

患暴发性败血症中华鳖体内细菌的分离与鉴定

胡广洲, 李登峰, 苏秀榕, 李太武, 贺静静, 王孟前, 李慧, 李晔

(宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 从患暴发性出血性败血症中华鳖 (*Trionyx sinensis*) 的肠、心、肝、胃等组织和腹腔液中分离培养得到8株细菌。通过光镜与电镜观察和16S rDNA序列测定、比对, 对所分离细菌进行鉴定。结果表明, 它们分别为格氏乳球菌 (*Lactococcus garvieae*)、假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.)、海氏肠球菌 (*Enterococcus hirae*)、屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*)、人苍白杆菌 (*Ochrobactrum anthropi*)、嗜性嗜血杆菌 (*Haemophilus segnis*)、弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*) 和迟钝爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*)。用含抗生素的20种药敏纸片对格氏乳球菌、弗氏柠檬酸杆菌和迟钝爱德华氏菌进行药敏试验发现, 格氏乳球菌对青霉素等4种药物敏感, 对头孢唑啉等6种药物中度敏感, 对阿米卡星等10种药物有耐药性。弗氏柠檬酸杆菌对头孢唑啉等13种药物敏感, 对青霉素等3种药物中度敏感, 对万古霉素等4种药物有耐药性。迟钝爱德华氏菌对新霉素等3种药物敏感, 对阿米卡星等5种药物中度敏感, 对青霉素等12种药物有耐药性。本研究旨在为中华鳖败血症的防治技术提供科学支撑。[中国水产科学, 2010, 17(4): 859-868]

关键词: 中华鳖; 败血症; 细菌; 16S rDNA; 药敏试验

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)04-0859-10

随着中华鳖 (*Trionyx sinensis*) 养殖规模的不断扩大, 高密度、集约化养殖模式使养殖鳖的生态环境受到破坏, 导致其免疫机能衰退, 病害日益严重。迄今为止, 养殖中华鳖已发生的疾病的种类繁多, 发病情况复杂。尽管病鳖发病症状相似, 病原却不尽相同。有关鳖败血症的报道较多, 川崎义一等^[1]、张奇亚等^[2]针对该病进行了病原方面的研究, 较多的观点认为该病是由病毒感染破坏鳖免疫系统, 细菌并发或继发感染引起。细菌产生的外毒素能促使鳖红肿、坏死、出血, 引起鳖发病死亡^[3]。气单胞菌属细菌 (*Aeromonas* sp.)、弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*)、迟钝爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 对鳖的致病性已有不少报道^[4-6]。随着养殖规模的迅速扩大, 新的鳖病害逐渐出现并于近期迅速发展。2007年以来, 浙江若干生态养殖场养殖的中华鳖出

现大规模暴发性死亡。该病发生在高温季节, 主要症状为出血性败血, 常规药物进行治疗无效, 给养殖者造成严重损失。本课题组研究发现(另文发表), 其症状与以往报道的中华鳖病害有所差异, 光镜与电镜观察均显示出一种新病毒的严重感染。分别用分离培养的病毒、病鳖组织匀浆过滤液、病毒与细菌的混合液及PBS对健康中华鳖进行肌肉注射, 前3组鳖均出现感染死亡, 病症与自然感染一致。病毒与细菌的混合液攻毒组死亡率较单纯的病毒攻毒组、病鳖组织匀浆过滤液攻毒组高5.6%、14.9%。因此, 病毒应为该暴发性出血性败血症的主要病原, 细菌加剧病情。本研究就患病中华鳖体内的病原菌分离纯化、形态观察、16S rDNA序列分析鉴定及药敏实验结果进行报告, 旨在为该病的有效防治技术提供科学支撑。

收稿日期: 2009-10-25; 修订日期: 2009-12-06.

基金项目: 国家自然科学基金项目(30840061); 宁波大学学科项目(XK0715049); 宁波大学人才项目(XR0713017).

作者简介: 胡广洲(1985-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 水产动物病害防治. E-mail: arsenalakers@163.com

通讯作者: 李登峰, 副研究员, 研究方向: 水产动物病害防治. E-mail: lidengfeng@nbu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 患病中华鳖 2008年9月,取自宁波中华鳖生态养殖场,病鳖症状为:外观无明显异常,行动迟钝,不摄食,严重时口鼻流血水。解剖可见:腹腔、肠、胃内充满黄红色血水,解剖后长期不凝固;肠、胃表面呈鲜红色,肝肿大呈土红色,伴有黑红色出血点;胆大,脾肾红黑色,肌肉苍白无血色。从开始出现症状到大规模暴发性死亡时间为3~4 d,7~9 d累积死亡率在90%以上。

1.1.2 试剂 营养琼脂培养基:牛肉膏3.0 g,蛋白胨10.0 g, NaCl 5.0 g, 琼脂15.0 g, H₂O 1 000 mL, pH 7.4。液体培养基按照上述配方配制,不加琼脂。

PCR扩增试剂、pMD18-T载体购自Takara公司;PCR引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细菌分离 在无菌条件下,用酒精棉球擦拭病鳖体表后解剖,从肝、肠、心、胃和腹水等取样,分别在营养琼脂培养基平板(pH 7.4)上划线培养,28℃恒温培养24 h,根据菌落特征的不同,挑取单菌落划线分离,数次传代后将纯化的菌株转接到斜面编号保藏备用。

1.2.2 细菌形态观察 将细菌接种于营养琼脂培养基平板上,28℃培养24 h,观察菌落的形态特征;将细菌接种至液体培养基,100 r/min振荡培养18 h,取菌悬液进行革兰氏染色,油镜下观察菌体形态特征;菌稀释液和菌沉淀经无菌水洗涤后染色,分别于透射电镜(日立H-7650)和扫描电镜(日立S-3400N)下观察并拍照。

1.2.3 细菌DNA提取 挑单菌落置于含有25 μL灭菌超纯水的PCR管中,100℃水浴裂解10 min,10 000 r/min离心3 min,取上清用于PCR扩增。

1.2.4 16S rDNA PCR扩增 采用细菌通用引物:16sF₂(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和

16sR₂(5'-CCGTCAATTCCTTTTTRAGTTT-3'),进行PCR扩增。25 μL扩增反应体系:10×buffer(Mg²⁺) 2.5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 2.5 μL,稀释100倍的模板DNA 1 μL,2.5 mmol/L dNTPs 2 μL,10 μmol/L引物各1 μL,1.0 U/反应Taq DNAase, ddH₂O补足至25 μL。PCR扩增条件:95℃预变性4 min;94℃变性45 s,55℃退火45 s,72℃延伸1 min,35个循环后72℃延伸10 min。扩增产物用1.3%的琼脂糖凝胶电泳检测。经割胶回收、连接转化后,挑取阳性克隆子进行序列测定。

1.2.5 克隆测序及系统发育树构建 克隆测序工作由上海英骏生物技术有限公司完成。将所得到的菌株16S rDNA序列在GenBank数据库中用Blastn软件进行比对分析,运用MEGA 4.0软件中的N-J法^[7]构建系统发育树。

1.2.6 药敏试验 药物敏感性试验按纸片扩散法^[8]进行,测定抑菌圈直径,并参照NCCLS判断标准^[9]进行敏感性判定。检测的抗生素包括青霉素、头孢唑啉、头孢西丁、复达欣、万古霉素、庆大霉素、链霉素、卡那霉素、妥布霉素、新霉素、阿米卡星、强力霉素、四环素、氯霉素、红霉素、复方新诺明、呋喃妥因、呋喃唑酮、诺氟沙星和环丙沙星等20种。药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司。

2 结果与分析

2.1 细菌的培养特性和形态特征

从患病的中华鳖的腹腔液、肠、心、肝和胃中共分离到8株细菌,分别编号为T1、T2、T3、T4、T5、T6、T7和T8,固体营养琼脂培养基上观察到菌落的具体培养特征、细菌革兰氏染色和光、电镜观察结果(表1)显示,菌落的形态基本为圆形,表面湿润,边缘整齐,呈不透明或者半透明,颜色为乳白或淡黄,除T5、T6外大部分菌株生长旺盛。光、电镜观察结果显示,细菌T1、T3和T4呈球状,T2、T5、T6、T7和T8呈杆状,其中T2、T5、T7和T8具有鞭毛(图1、图2)。

表 1 细菌培养特性及形态特征
Tab. 1 Characteristics of bacterial colonies and morphology of T1-T8

菌株编号 Isolation number	菌落形态 Colony morphology	菌落直径 (24h)/mm Colony size (24h)	菌落干湿度 Colony humidity	菌落透明度 Colony transparency	菌落颜色 Colony colour	菌落边缘 Colony edge	菌落长势 Colony growth vigor	组织来源 Tissue origin	革兰氏染色 Gram stain	细菌形状 Bacteria shape	鞭毛有无 With or without flagellum
T1	圆形 Round	1.5	湿润 Humid	不透明 Opaque	白 White	整齐 Tidiness	旺盛 Vigorous	肠 Intestine	阳性 Positive	球状 Globosity	无 Without
T2	圆形 Round	2	湿润 Humid	半透明 Translucent	淡黄 Yellowish	整齐 Tidiness	旺盛 Vigorous	腹水 Peritoneal fluid	阴性 Negative	杆状 Rhabditiform	有 With
T3	圆形 Round	1	湿润 Humid	半透明 Translucent	白 White	整齐 Tidiness	旺盛 Vigorous	胃 Stomach	阳性 Positive	球状 Globosity	无 Without
T4	圆形 Round	1	湿润 Humid	半透明 Translucent	乳白 Milky white	整齐 Tidiness	旺盛 Vigorous	肝 Liver	阳性 Positive	球状 Globosity	无 Without
T5	圆形 Round	1.3	湿润 Humid	半透明 Translucent	乳白 Milky white	整齐 Tidiness	缓慢 Slow	心 Heart	阴性 Negative	杆状 Rhabditiform	有 With
T6	圆形 Round	1	湿润 Humid	不透明 Opaque	淡黄 Yellowish	整齐 Tidiness	缓慢 Slow	肝 Liver	阴性 Negative	杆状 Rhabditiform	无 Without
T7	圆形 Round	1.6	湿润 Humid	不透明 Opaque	淡黄 Yellowish	整齐 Tidiness	旺盛 Vigorous	肠 Intestine	阴性 Negative	杆状 Rhabditiform	有 With
T8	圆形 Round	1.5	湿润 Humid	不透明 Opaque	淡黄 Yellowish	整齐 Tidiness	旺盛 Vigorous	胃 Stomach	阴性 Negative	杆状 Rhabditiform	有 With

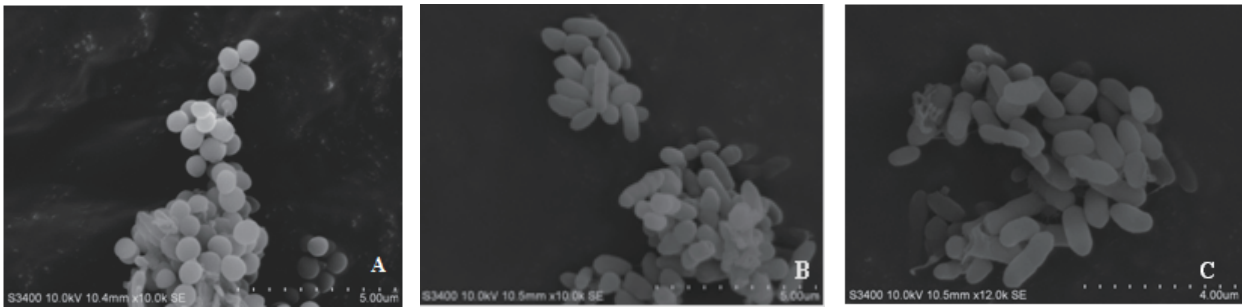


图1 从患病中华鳖体内分离的部分菌株扫描电镜图

A: 菌株T1; B: 菌株T7; C: 菌株T8

Fig. 1 Scanning electron micrograph (SEM) of partial strains isolated from diseased *Trionyx sinensis*

A: strain T1; B: strain T7; C: strain T8

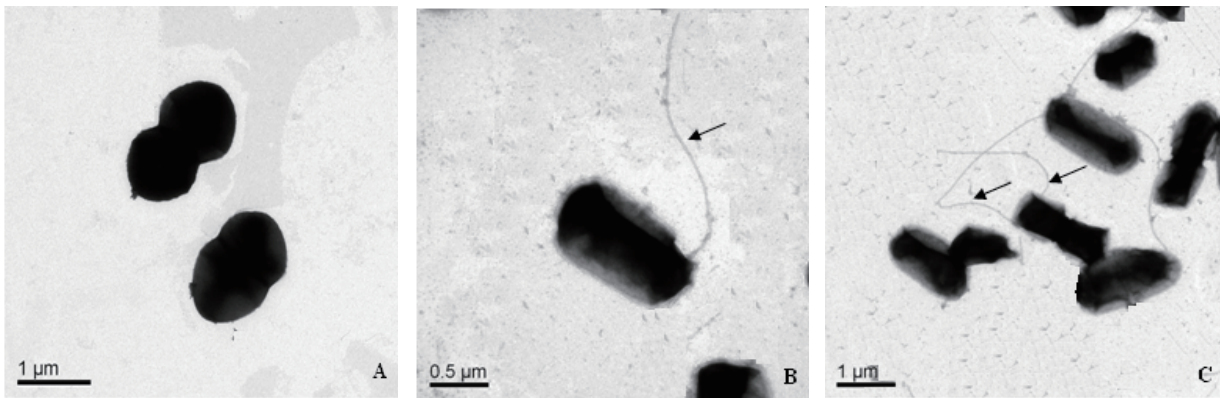


图2 从患病中华鳖体内分离的部分菌株透射电镜图

A: 菌株T1; B: 菌株T7; C: 菌株T8. 箭头示鞭毛.

Fig. 2 Transmission electron micrograph (TEM) of partial strains isolated from diseased *Trionyx sinensis*

A: strain T1; B: strain T7; C: strain T8. Arrows show flagellum.

2.2 细菌 16S rDNA 鉴定

对8株细菌的DNA进行PCR扩增,均获得了约900 bp的目的条带(图3)。

Blastn 比对结果表明, T1 与格氏乳球菌 (*Lactococcus garvieae*) 具有最大相似度(99%), T2 与假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.) 细菌具有最高相似度(99%), T3、T4分别与肠球菌属的海氏肠球菌 (*Enterococcus hirae*)、屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) 具有最高相似度(99%), T5与人苍白杆菌 (*Ochrobactrum anthropi*) 具有最高相似度(99%), T7与弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*) 具有最高相似度(99%), T6、T8分别与嗜性嗜血杆菌

(*Haemophilus segnis*)、迟钝爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 具有最高相似度(98%)。

从GenBank中选取最相似菌和标准菌株的16S rDNA 基因序列(表2),构建了细菌系统发育树(图4)。由图4可知, T1 与格氏乳球菌同源, T2和假单胞菌属细菌同源, T3和T4分别与肠球菌属的海氏肠球菌和屎肠球菌同源, T5和人苍白杆菌同源, T6和嗜性嗜血杆菌同源, T7和弗氏柠檬酸杆菌同源, T8和迟钝爱德华氏菌聚为一簇。各个细菌与其相似性序列的同源性皆在98%以上,可认为是同一属的细菌。本研究经16S rDNA方法比对所得的同源性最高的细菌形态特征与光、电镜观察结果相似。

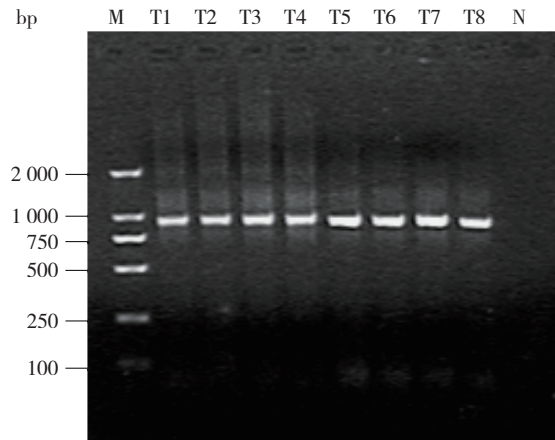


图3 8株细菌的16S rDNA PCR扩增产物电泳图谱
M: DNA marker (DL2000); T1-T8: T1-T8的扩增产物; N: 阴性对照,模板为ddH₂O.

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA fragments of T1-T8 isolated from sick *Trionyx sinensis*
M: DNA marker (DL2000); T1-T8: amplified 16S rDNA fragments from T1-T8; N: control, amplified product from ddH₂O.

表2 16S rDNA 序列来源和数据库存取号
Tab. 2 16S rDNA sources and accession number

菌株名称 Strain	GenBank (NCBI 登录号) GenBank accession number
<i>Lactococcus garvieae</i> An1-1	AB244437.1
<i>L. garvieae</i> NRIC 0612	AB267905.1
<i>Pseudomonas</i> sp. NJ 24	AM421976.1
<i>P. fluorescens</i> ATCC 13	FJ971870.1
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 19434	DQ411813.1
<i>E. hirae</i> NRIC 0109	AB362598.1
<i>E. faecium</i>	AB326300.1
<i>Ochrobactrum anthropi</i> YZ-1	EU275247.1
<i>O. anthropi</i> ATCC 4918	CP000759.1
<i>Haemophilus segnis</i>	AF224299.1
<i>Pasteurella aerogenes</i> ATCC 27883T	U66491.1
<i>Citrobacter freundii</i> 7	DQ294285.1
<i>C. freundii</i> ATCC 8090	FJ971857.1
<i>Enterococcus tarda</i> NuF194	AB050828.1
<i>E. tarda</i> ATCC 15947	AB050827.1

2.3 药敏试验

格氏乳球菌、弗氏柠檬酸杆菌和迟钝爱德华氏菌为水产养殖常见致病菌,用20种抗生素药敏纸片分别对其进行药敏试验,结果表明(表3),格氏乳球菌对青霉素、万古霉素、呋喃妥因和呋喃唑酮敏感,对头孢唑啉、头孢西丁、复达欣、四环素、强力霉素和红霉素中度敏感;对阿米卡星、庆大霉素、卡那霉素、

链霉素、妥布霉素、新霉素、氯霉素、复方新诺明、环丙沙星和诺氟沙星有耐药性。弗氏柠檬酸杆菌对头孢唑啉、头孢西丁、复达欣、阿米卡星、庆大霉素、卡那霉素、链霉素、妥布霉素、新霉素、氯霉素、诺氟沙星、呋喃妥因和呋喃唑酮敏感;对青霉素、四环素和环丙沙星中度敏感;对万古霉素、复方新诺明、强力霉素和红霉素有耐药性。迟钝爱德华氏菌对新霉素、

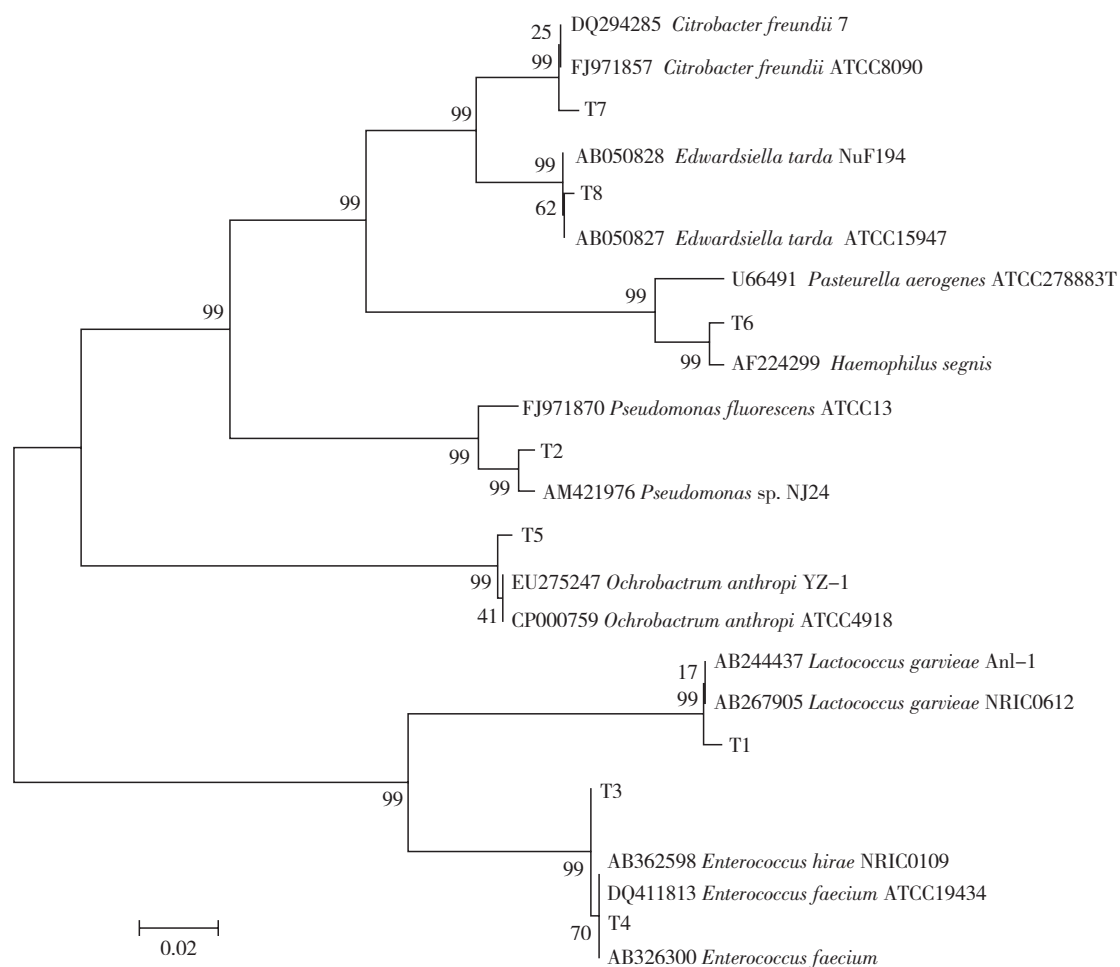


图4 细菌 16S rDNA 基因序列分子系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of the bacteria based on 16S rDNA sequences

呋喃妥因和呋喃唑酮敏感;对阿米卡星、庆大霉素、链霉素、氯霉素和红霉素中度敏感,对青霉素、头孢唑啉、头孢西丁、复达欣、万古霉素、卡那霉素、妥布霉素、复方新诺明、强力霉素、四环素、环丙沙星和诺氟沙星有耐药性。

3 讨论

16S rDNA 序列具有保守性、普遍性以及序列分析重现性高等特点。应用 16S rDNA 方法可快速、微量、准确、简便地对细菌进行分类鉴定,该方法已在细菌鉴定方面发挥着越来越重要的作用,正广泛应用于养殖环境微生物群落的分析和病原菌的鉴定之中^[10-11]。本研究应用 16S rDNA 方法所鉴定的 8 株细

菌,无论球菌还是杆菌均与形态学观察结果一致。

在 8 株分离的细菌中,屎肠球菌、海氏肠球菌、嗜性嗜血杆菌、人苍白杆菌、假单胞菌在通常情况下不是致病菌。屎肠球菌、海氏肠球菌、嗜性嗜血杆菌和人苍白杆菌在医院环境中广泛存在,也是人类和动物肠道的正常菌群成员,一般不会引起动物患病,大多是手术之后引发感染。周霞等^[12]报道,肠球菌具有严重的耐药性,引起的感染治疗困难。这些细菌可能由于人类生活用水和粪便排放进入养殖水体进而侵入中华鳖体内。假单胞菌是水体中的正常菌群,为条件致病菌,当鱼体的生理状态及水环境的理化条件恶化时,引起众多鱼类致病,如曾有报道假单胞菌引起欧洲鳗鲡烂鳃病、大黄鱼死亡和中华鳖甲

表3 药敏试验结果
Tab. 3 Results of antibiotic sensitivity test

抗生素 Antibiotic	剂量/($\mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$) Medicine dosage	抑菌圈直径/mm (耐药性) Sterilizing diameter (Drug resistance)		
		格氏乳球菌 <i>L. garvieae</i>	弗氏柠檬酸杆菌 <i>C. freundii</i>	迟钝爱德华氏菌 <i>E. tarda</i>
青霉素 Penicillin	10 u · 片 ⁻¹	22 (S)	11 (I)	0 (R)
头孢唑啉 Cefazolin	30	16 (I)	23 (S)	0 (R)
头孢西丁 Cefoxitin	30	17 (I)	20 (S)	0 (R)
复达欣 Fortum	30	16 (I)	18 (S)	11 (R)
万古霉素 Vancomycin	30 u · 片 ⁻¹	19 (S)	0 (R)	0 (R)
庆大霉素 Gentamycin	10	0 (R)	20 (S)	14 (I)
链霉素 Streptomycin	10	0 (R)	19 (S)	14 (I)
卡那霉素 Kanamycin	30	12 (R)	19 (S)	12 (R)
妥布霉素 Tobramycin	10	0 (R)	19 (S)	11 (R)
新霉素 Neomycin	30	0 (R)	18 (S)	20 (S)
阿米卡星 Amikacin	30	0 (R)	18 (S)	16 (I)
强力霉素 Doxycycline	30	15 (I)	0 (R)	0 (R)
四环素 Acheomycin	30	17 (I)	15 (I)	0 (R)
氯霉素 Chloramphenicol	30	0 (R)	23 (S)	17 (I)
红霉素 Erythromycin	15	16 (I)	11 (R)	19 (I)
复方新诺明 Sulfamethoxazole	1.25	0 (R)	0 (R)	0 (R)
呋喃妥因 Nitrofurantoin	300	18 (S)	18 (S)	17 (S)
呋喃唑酮 Furazdidene	300	17 (S)	17 (S)	19 (S)
诺氟沙星 Norfloxacin	10	0 (R)	20 (S)	9 (R)
环丙沙星 Ciprofloxacin	5	11 (R)	20 (I)	11 (R)

注: S为敏感; I为中度敏感; R为耐药。
Note: S means sensitive; I means intermediate sensitive; R means resistant.

溃疡和穿孔病等^[13-15]。另外假单胞菌在改善水产养殖水体的水质方面也有一定的作用^[16]。

其他3株细菌包括格氏乳球菌、弗氏柠檬酸杆菌及迟钝爱德华氏菌是水产养殖中常见的病原菌。格氏乳球菌在水环境中广泛存在,能够引起牙鲆败血感染死亡,且对鳖和虹鳟等具有一定的致病作用^[17-19]。根据林启存等^[4]、陈翠珍等^[20]、沈锦玉等^[21]和李华等^[22]报道,弗氏柠檬酸杆菌曾引起中华鳖、红螯螯虾和中华绒螯蟹致病,感染该菌的病鳖症状也为出血、败血。迟钝爱德华氏菌在世界范围广泛存在,该菌对水产养殖危害巨大,是引起鳗鲡、罗非鱼、叉尾鲷和中华鳖等多种水产养殖动物疾病的病原^[23]。迟钝爱德华氏菌不但能引起中华鳖脏器官发生变质性病变^[24],还曾引发鳖白底板病^[25]。目前人们对该病原菌十分重视,相关报道较多。Kursat K等^[19]的研究结果表明格氏乳球菌对氯霉素和环丙沙星均敏感。而本实验中,从发病中华鳖分离的菌株对氯霉素和环丙沙星均有抗性,弗氏柠檬酸杆菌对复方新诺明有抗性,对呋喃唑酮敏感。与沈锦玉等^[21]从红螯螯虾分离的弗氏柠檬酸杆菌的药敏结果相反,与李华等^[22]的研究结果相反,本研究分离的弗氏柠檬酸杆菌菌株对卡那霉素和链霉素都敏感。沈锦玉等^[25]对迟钝爱德华氏菌的药敏试验结果表明,该菌株对头孢唑啉敏感,对新霉素和呋喃唑酮有耐药性,而本研究结果中该菌对呋喃唑酮和新霉素敏感,对头孢类和青霉素等大部分抗生素都有耐药性(表4)。同一种菌对药物的敏感性有所差异,原因可能是时间、地域及所处的生存环境不同,故有必要结合水产养殖过程中所遇到的特定病原菌菌株进行药敏试验,选择敏感药物进行疾病防治。弗氏柠檬酸杆菌与迟钝爱德华氏菌是重要的人畜共患病原菌,药敏试验表明由中华鳖中分离的弗氏柠檬酸杆菌对多种抗生素敏感。而迟钝爱德华氏菌耐药率高,且存在多重耐药性。目前世界卫生组织已将细菌耐药列为危害公共安全的人为因素之一,所以应对其予以重视,对其耐药性和耐药机制加强监测和研究。

参考文献:

- [1] 川崎义一,朱正军,冉旭. 鳖各种疾病的症状和对策[J]. 福建水产,1988(4): 91-93.
- [2] Zhang Q Y, Li Z Q, Jiang Y L, et al. Discovery of virus pathogen from soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis*) [J]. Chin Sci Bull, 1997, 42(6): 503-506.
- [3] 陆宏达,金丽华. 鳖嗜水气单胞菌败血症的研究[J]. 水产学报, 1996, 20(3): 223-234.
- [4] 林启存,朱丽敏,李忠全,等. 中华鳖弗氏柠檬酸杆菌败血症病原分离鉴定与药敏试验[J]. 水产科学, 2008, 27(1): 42-43.
- [5] 林禹,胡毅军,蔡开珍. 幼鳖爱德华氏菌败血症的诊断和防治[J]. 水产养殖, 1995, 5(5): 5.
- [6] 钱冬,陈月英,沈锦玉,等. 引起鱼类暴发性流行病的嗜水气单胞菌的血清型、毒力及溶血性[J]. 微生物学报, 1995, 35(6): 460-464.
- [7] Saitou N, and Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Molec Biol Evol, 1987, 4(4): 406-425.
- [8] 沈萍,范秀容,李广武. 微生物学实验: 第3版[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 62-64.
- [9] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [S]. Eighteenth informational supplement. NCCLS document M100-S18, 2008: 25-61.
- [10] Kim M S, Jeong H D. Development of 16S rRNA targeted PCR methods for the detection and differentiation of *Vibrio vulnificus* in marine environments [J]. Aquaculture, 2001, 193(3-4): 199-211.
- [11] Paungfoo C, Prasertsan P, Burrell P C, et al. Nitrifying bacterial communities in an aquaculture wastewater treatment system using fluorescence in situ hybridization (FISH), 16S rRNA gene cloning, and phylogenetic analysis [J]. Biotechn Bioeng, 2007, 97(4): 985-990.
- [12] 周霞,王晓兰,剡根强,等. 肠球菌研究进展[J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2008, 26(6): 708-712.
- [13] 沈锦玉,余旭平,潘晓艺,等. 网箱养殖大黄鱼假单胞菌病原的分离与鉴定[J]. 海洋水产研究, 2008, 29(1): 1-6.
- [14] 樊海平. 恶臭假单胞菌引起的欧洲鳗鲡烂鳃病[J]. 水产学报, 2001, 25(2): 147-150.
- [15] 李庆乐,施军,何为. 鳖甲溃疡和穿孔病的病原及其防治[J]. 湛江海洋大学学报, 1998, 18(2): 10-14.
- [16] 周凤,方萍,朱日清,等. 一株假单胞菌的分离鉴定及其对水产养殖水体氮化合物去除效果[J]. 浙江农业学报, 2008, 20(4): 274-277.
- [17] 房海,陈翠珍,张晓君. 牙鲆格氏乳球菌感染症及其病原[J]. 中

表4 本研究与其他药敏试验结果比较
Tab. 4 Comparison of antibiotic sensitivity test results of this study and others

抗生素 Antibiotics	迟钝爱德华氏菌 <i>E. tarda</i>		格氏乳球菌 <i>L. garvieae</i>		弗氏柠檬酸杆菌 <i>C. freundii</i>			
	鳖来源 Origin rom soft-shelled turtle	鳖来源 ^[25] Origin from soft-shelled turtle ^[25]	鳖来源 Origin from soft-shelled turtle	虹鳟来源 ^[19] Origin from rain- bow trout ^[19]	鳖来源 Origin from soft-shelled turtle	螯虾来源 ^[21] Origin from Crayfish ^[21]	蟹来源 ^[22] Origin from crab ^[22]	蟹来源 ^[20] Origin from crab ^[20]
青霉素 Penicillin	R	R	S	S	I	R	/	R
头孢唑啉 Cefazolin	R	S*	I	/	S	I	/	/
头孢西丁 Cefoxitin	R	/	I	/	S	/	/	/
复达欣 Fortum	R	/	I	/	S	/	/	S
万古霉素 Vancomycin	R	/	S	S	R	/	/	R
庆大霉素 Gentamycin	I	I	R	R	S	S	S	S
链霉素 Streptomycin	I	R	R	/	S	I	S	S
卡那霉素 Kanamycin	R	I	R	/	S	/	R*	S
妥布霉素 Tobramycin	R	/	R	/	S	/	/	S
新霉素 Neomycin	S	R*	R	R	S	S	/	S
阿米卡星 Amikacin	I	S	R	/	S	S	S	S
强力霉素 Doxycycline	R	R	I	/	R	R	/	/
四环素 Acheomycin	R	R	I	/	I	R	R	I
氯霉素 Chloramphenicol	I	R	R	S*	S	S	R*	S
红霉素 Erythromycin	I	R	I	S	R	R	/	R
复方新诺明 Sulfamethoxazole	R	R	R	/	R	S*	R	S
呋喃妥因 Nitrofurantoin	S	/	S	/	S	/	S	I
呋喃唑酮 Furazolidone	S	R*	S	/	S	R*	I	S
诺氟沙星 Norfloxacin	R	R	R	/	S	S	S	S
环丙沙星 Ciprofloxacin	R	/	R	S*	I	/	I	S

注: S为敏感, I为中度敏感, R为耐药, “/”表示本实验使用的抗生素其他人未使用, “*”表示其他人与本试验结果相比, 细菌对抗生素的敏感性差异较大。
Note: S means sensitive, I means intermediate sensitive, R means resistant, “/” means antibiotics used in this study hadn’ t been used in others, “*” means antibiotics sensitivity in this study was quite different from others.

- 国水产科学, 2006, 13 (3): 403–409.
- [18] 陈泽祥, 褐雄标, 许力干, 等. 鳖源格氏乳球菌的分离及鉴定[J]. 现代农业科技, 2008 (10): 151–154.
- [19] Kursat K, Osman E. 2008. Antibiotic susceptibility of *Lactococcus garvieae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms [J]. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 2008, 52 (2): 223–226.
- [20] 陈翠珍, 张晓君, 房海, 等. 中华绒螯蟹病原弗氏柠檬酸杆菌的鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22 (2): 136–141.
- [21] 沈锦玉, 顾志敏, 潘晓艺, 等. 红螯螯虾弗氏柠檬酸杆菌病原的分离与鉴定[J]. 中国水产科学, 2005, 12 (2): 197–200.
- [22] 李华, 邢殿楼, 白国福, 等. 弗氏柠檬酸杆菌对河蟹致病性的研究[J]. 水生生物学报, 2001, 25 (3): 217–222.
- [23] 郑大海, 麦康森. 迟钝爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 研究概况[J]. 海洋湖沼通报, 2004, 1 (1): 52–59.
- [24] 蔡完其, 孙佩芳. 中华鳖爱德华氏菌病原和组织病理研究[J]. 水产学报, 1997, 21 (4): 428–433.
- [25] 沈锦玉, 潘晓艺, 余旭平, 等. 中华鳖白底板病原的分析[J]. 中国水产科学, 2007, 14 (5): 815–822.

Isolation and identification of bacteria from soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis*) associated with fulminant septicaemia

HU Guangzhou, LI Dengfeng, LI Taiwu, SU Xiurong, HE Jingjing, WANG Mengqian, LI Hui, LI Ye

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology Certificated by Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, Zhejiang, China)

Abstract: Eight bacteria were isolated from sick soft-shelled turtles (*Trionyx sinensis*) associated with fulminant septicaemia. Morphology of the bacteria was characterized by LM, SEM and TEM. 16S rDNA of the bacteria were amplified and sequenced. Results showed that they were *Lactococcus garvieae*, *Pseudomonas* sp., *Enterococcus hirae*, *Enterococcus faecium*, *Ochrobactrum anthropii*, *Haemophilus segnis*, *Citrobacter freundii* and *Edwardsiella tarda*. Antibiotic sensitivity patterns of *L. garvieae*, *C. freundii* and *E. tarda* were evaluated against 20 antibiotics. *L. garvieae* was sensitive to 4 antibiotics including Penicillin, and was moderately sensitive to 6 antibiotics including Cefazolin, but was resistant to 10 antibiotics including Amikacin. *C. freundii* was sensitive to 13 antibiotics including Cefazolin, and was moderately sensitive to 3 antibiotics including Penicillin, but was resistant to 4 antibiotics including Vancomycin. *E. tarda* was sensitive to 3 antibiotics including Neomycin, and was moderately sensitive to 5 antibiotics including Amikacin, but was resistant to 12 antibiotics including Penicillin. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17 (4): 859–868]

Key words: soft-shelled turtle; septicaemia; bacteria; 16S rDNA; antibiotic sensitivity

Corresponding author: LI Dengfeng. E-mail: lidengfeng@nbu.edu.cn