

草鱼肠道中香港海鸥型菌的选择性分离与鉴定

潘厚军, 吴淑勤, 李宁求, 石存斌, 李凯彬, 巩 华, 陶家发, 常藕琴

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东广州 510380)

摘要:从广东省某市池塘采集商品规格(体重 2.0~2.5 kg)的草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*), 利用加有头孢唑肟的麦康凯琼脂培养基, 对其肠道中细菌进行选择分离与鉴定。结果显示, 12 尾草鱼的肠道中, 5 尾可分离到具有以下特征的细菌: 两端生鞭毛, 菌体弯曲似海鸥状, 革兰氏染色阴性, 过氧化氢酶、氧化酶、尿素酶和精氨酸双水解酶阳性, 还原硝酸盐, 不发酵、氧化或同化葡萄糖、甘露醇等 15 种常见的糖醇类, 细菌形态、生化特性与报道的香港海鸥型菌相似, 阳性率为 41.7%。但在肌肉中未分离到此菌。进行分离细菌的 16S rRNA 基因序列分析, 与 GenBank 中登录的 4 株香港海鸥型菌序列的同源性为 99.7%~99.9%。由菌的培养特征、形态特点、理化特性、16S rRNA 基因序列分析等多元鉴定的结果表明, 从草鱼肠道中选择分离的细菌为香港海鸥型菌。药敏实验结果表明, 所分离菌株对奥格门丁和亚胺培南的敏感性与报道的香港海鸥型菌有一定区别。

关键词: 香港海鸥型菌; 草鱼; 选择分离; 鉴定

中图分类号: S941 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2005)03-0307-07

香港海鸥型菌(*Laribacter hongkongensis*)首先由 Yuen 等^[1]于 2001 年从一位硬化病人的胸腔脓血中分离(菌株号 HKU1), 通过生化特性和 16S rRNA 基因序列等分析, 发现此菌与其他属细菌有很大不同, 根据其在电子显微镜下的形态像海鸥呈弯曲状, 因此把这种细菌命名为香港海鸥型菌。2003 年, Woo 等^[2]从感染腹泻的 6 位病人的粪便中各分离出 1 株香港海鸥型菌, 这 6 株细菌与 HKU1 相比, 除具有鞭毛、对某些药物的敏感性、16S rRNA 基因有 0~2 个碱基的区别外, 其他生化特性和细菌形状都相同。2004 年, Woo 等^[3]在香港市场采集的草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、鲮(*Aristichthys nobilis*)、鲢(*Cirrhina molitorella*)、大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)和鱼糜制品中检到此菌, 并认为香港海鸥型菌引致的腹泻与进食淡水鱼类有关。

由于香港市场大部分淡水鱼由广东省供应, 因此本研究主要在广东省淡水鱼主产区的养殖池塘采样, 对商品规格草鱼进行香港海鸥型菌的选择分离、鉴定及特性分析, 并与人源分离株进行了比较, 旨在为此菌在淡水鱼中的检测和控制技术研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

草鱼, 共 12 尾, 体重 2.0~2.5 kg, 体质健壮。2004 年 6 月 18 日于广东省某市的不同地点的 4 个养殖池塘(A、B、C、D)采样, 水温为 26~28℃。每个池塘各 3 尾, 塑料袋中加水充氧后运送实验室。

1.2 培养基

CMA 平板: 按参考文献[4]的方法配置, 即麦康凯琼脂(卫生部上海生物制品研究所出品)加 32 μg/mL 头孢唑肟钠(广州白云山化学制药厂出品)。

普通营养琼脂、营养肉汤培养基和 5% 绵羊血琼脂平板: 广东环凯微生物科技有限公司出品。

1.3 CMA 选择性培养基分离

草鱼体表用 75% 酒精棉球消毒, 无菌条件下解剖, 剪取前肠和后肠共约 1.0 g, 混合并研磨均匀, 加 5.0 mL 灭菌生理盐水, 即为肠道组织匀浆液, 用无菌生理盐水稀释为 10%。取原液和 10% 肠道组织匀浆液各 0.1 mL 涂布 CMA 平板, 28℃ 培养 48~72 h, 观察有无菌落生长。同样取肌肉、肝脏和肾脏组织匀浆液涂布 CMA 平板分离细菌。按文献[1~2]的描述, 挑取生长的可疑菌落转接营养琼脂平板,

收稿日期: 2004-12-13; 修订日期: 2005-02-24。

作者简介: 潘厚军(1968-), 女, 副研究员, 从事水产动物病害研究。Tel: 020-81617592。E-mail: phj001@163.net

通讯作者: 吴淑勤。Tel: 020-81616813。E-mail: sqwxm@163.net

划线接种纯化,转接斜面,4℃保存备用。

将上述制备的肠道组织匀浆液涂布营养琼脂平板,28℃培养,作为选择培养对照。

1.4 细菌生化鉴定

进行细菌的常规生化鉴定,主要检测项目为:革兰氏染色、细胞色素氧化酶、过氧化氢酶、尿酶、精氨酸双水解酶、硝酸盐还原、葡萄糖、肌醇等糖醇类利用。

1.5 菌体形态的电镜观察

1.5.1 扫描电镜观察 细菌在营养肉汤培养基中,28℃、180 r/min 摇床培养 16 h,用无菌生理盐水离心(3 000 r/min,20 min)洗 2 次菌体,2.5%戊二醛固定,PBS 洗涤,锇酸重固定,PBS 洗涤,依次进入 30%、50%、70%、100%、100% 酒精中脱水,醋酸异戊酯置换,临界点干燥后,喷金,Hitachi S-520 型扫描电镜观察。

1.5.2 透射电镜观察 细菌在营养肉汤培养基中 28℃静置培养 16 h,直接吸取菌液滴于铜网,3%磷钨酸负染约 30 s,于 JEM100-CXII 透射电镜下观察。

1.6 16S rRNA 基因序列分析

1.6.1 PCR 模板 DNA 的制备 细菌接种在普通营养琼脂平板上,28℃培养 24 h,取单菌落悬浮于 50 μL 的灭菌双蒸水中,煮沸 5 min,12 000 r/min 离心 5 min,取上清即为 PCR 模板 DNA。

1.6.2 16S rRNA 基因的 PCR 扩增与序列测定 扩增 16S rRNA 基因的正向引物为 P1:5' GGC AGC AGT GGG GAA TTT TG 3',反向引物 P2:5' ACA AGG CCC GGG AAC GTA TT 3'。PCR 反应条件为:94℃预变性 2 min;接着 94℃ 30 s,57℃ 45 s,72℃ 60 s,30 个循环;72℃延伸 7 min。PCR 产物经纯化后,直接在 ABI PRISM™ 377 全自动 DNA 测序仪上进行序列测定。

1.6.3 序列分析及数据处理 所测序列通过 Blast 与 GenBank 中序列进行比较,用 Vector NTI suite 9.0 软件进行序列同源性分析。

1.7 药敏实验

以纸片法在营养琼脂平板上进行,28℃恒温培养 24 h 后观察抑菌圈有无并测量直径。药敏纸片购自北京天坛药物生物技术开发公司,根据文献[6-7]的标准判定细菌对药物的敏感性。

2 结果与分析

2.1 CMA 选择性培养基分离

12 尾草鱼中有 5 尾(A 池 2 尾,B 池 2 尾,C 池

1 尾)的肠道组织匀浆液在 CMA 上培养 48 h 后,原液和 10 倍稀释液涂布的平板上均观察到有圆形、表面光滑、中央稍隆起的菌落生长。原液涂布的 CMA 平板菌落计数为 23~168 个,10 倍稀释液为 3~19 个。计算出分离的细菌数 $1.15 \times 10^3 \sim 9.50 \times 10^3$ CFU/g。

另 7 尾鱼的肠道组织匀浆液未观察到有此形状的菌落(偶有 1~5 个皱缩或不规则形状的菌落)。而肌肉、肝脏和肾脏的组织匀浆液在 CMA 平板上未分离到细菌。

12 尾鱼的肠道组织匀浆液原液和 10 倍稀释液涂布的营养琼脂平板,均有细菌生长,菌落数比 CMA 平板明显增多,从菌落颜色、形状、大小等观察,种类颇多。

2.2 分离的典型菌落生化鉴定

5 尾草鱼肠道中选择分离的 GRA1、GRA2、GRB1、GRB2 和 GRC1 等 5 株细菌经生化鉴定,特性相同。在营养琼脂上 28℃培养 24 h,为针尖样大小,48 h 直径可达 1.0 mm;在绵羊血琼脂平板上培养,菌落为灰色,不溶血,比营养琼脂上培养的略大,48 h 直径为 1.2~1.5 mm。革兰氏染色阴性,过氧化氢酶、氧化酶、尿酶和精氨酸双水解酶阳性,还原硝酸盐,不发酵和利用葡萄糖、乳糖、肌醇等 15 种糖醇类,在 0~2% NaCl 胨水中生长,3% NaCl 胨水中不生长。从草鱼肠道分离的细菌生化特性与报道的香港海鸥型菌特性^[1-2]相似,结果详见表 1。

2.3 电镜观察

分离细菌在扫描电镜(图 1)和负染后透射电镜下(图 2)观察,菌体弯曲、细长、螺旋形或海鸥状,长 1.6~2.5 μm,直径 0.43~0.57 μm。负染后透射电镜下观察可见两端生鞭毛(图 2)。

2.4 16S rRNA 基因序列分析

PCR 扩增分离菌 16S rRNA 基因序列的分析结果表明,不包括引物结合区,所获序列长度为 985 bp。Blast 分析表明,分离菌 16S rRNA 基因序列与 GenBank 中登录的 4 株香港海鸥型菌仅有 1~2 个碱基的差异,同源性为 99.7%~99.9%;而其他淡水鱼几种主要致病性细菌的同源性低于 84.4%(表 2)。图 3 示 GRA1 菌与香港海鸥型菌 HKU1 株 16S rRNA 基因序列比较结果,二者仅有 1 个碱基的差异,即在 430 位以 T 代替了 C。据此,将分离的 GRA1 等 5 株细菌鉴定为香港海鸥型菌。

表1 草鱼肠道中选择分离的细菌与报道的香港海肠型菌生化特性比较
Tab.1 Comparison of biochemical characteristics between selective isolates from the intestine of grass carp and the reported *Laribacter hongkongensis*

项目 Item	GRA1, etc	报道的香港海肠型菌 ^[1-2] Reported <i>Laribacter hongkongensis</i> ^[1-2]	项目 Item	GRA1, etc	报道的香港海肠型菌 ^[1-2] Reported <i>Laribacter hongkongensis</i> ^[1-2]
运动 Mobility	+	d	糖醇类利用 Fermentation, oxidation or assimilation of		
革兰氏染色 Gram staining	-	-	葡萄糖 Glucose	-	-
过氧化氢酶 Catalase	+	+	蔗糖 Sucrose	-	-
细胞色素氧化酶 Cytochrome oxidase	+	+	乳糖 Lactose	-	-
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	麦芽糖 Maltose	-	-
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	+	+	鼠李糖 Rhamnose	-	-
脲酶 Urease	+	+	阿拉伯糖 Arabinose	-	-
鸟氨酸脱羧酶 Ornithin decarboxylase	-	-	肌醇 Inositol	-	-
赖氨酸脱羧酶 Lysin decarboxylase	-	-	山梨醇 Sorbitol	-	-
丙二酸 Malonate	-	-	甘露醇 Mannitol	-	-
柠檬酸利用 Citrate utilization	-	-	侧金盏花醇 Adonitol	-	-
吲哚产生 Indole production	-	-	水杨苷 Salicin	-	-
β -半乳糖苷酶 β -Galactosidase	-	-	卫矛醇 Dulcitol	-	-
硫化氢产生 H_2S production	-	-	棉子糖 Raffinose	-	-
明胶液化 Gelatinase	-	-	木糖 Xylose	-	-
			蜜二糖 Melibiose	-	-

注: "+"—阳性; "-"—阴性; "d"—报道的大部分菌株阳性, HKU1 菌株阴性。

Note: "+"—Positive; "-"—Negative; "d"—Reported major part of strains positive, but HKU1 negative.

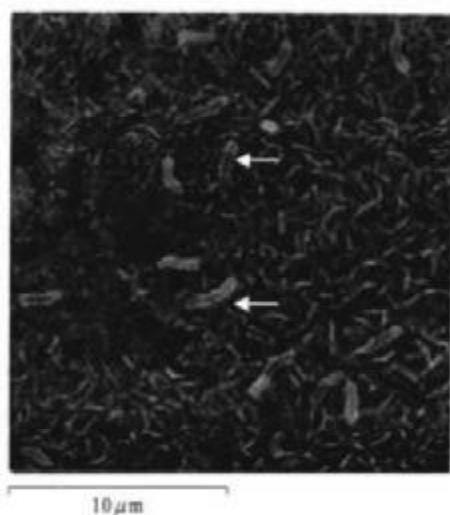


图1 草鱼肠道选择分离细菌的扫描电镜照片
(箭头所示为菌体)

Fig.1 Scanning electron micrograph of selective isolates from the intestine of Grass carp
(arrows showing the bacteria)

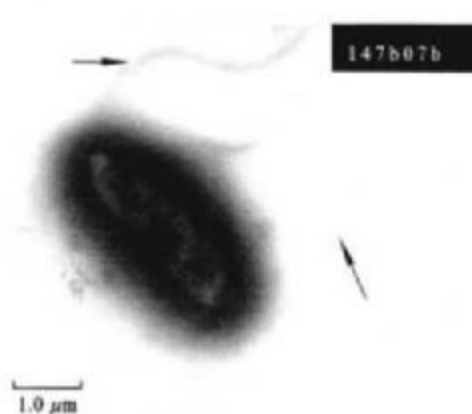


图2 草鱼肠道选择分离细菌的透射电镜照片
(箭头示鞭毛)

Fig.2 Transmission electron micrograph of selective isolates from the intestine of Grass carp
(arrows showing the flagellum)

HKU1	(351)	CCCTGATCCAGCCATGCGGGGTGCTGAAGAAGGCTTCGGGTTGTAAAG
GRA1		CCCTGATCCAGCCATGCGGGGTGCTGAAGAAGGCTTCGGGTTGTAAAG
HKU1	(401)	GACTTTTGTTCAGGGAGGAAATCCCTAAGG C TAATAACCTTGGGGGATGAC
GRA1		GACTTTTGTTCAGGGAGGAAATCCCTAAGG T TAATAACCTTGGGGGATGAC
HKU1	(451)	AGTAOCTGAAGAATAAGCACCGGCTAACTAAGTGCCAGCAGCGCGGTAA
GRA1		AGTAOCTGAAGAATAAGCACCGGCTAACTAAGTGCCAGCAGCGCGGTAA
HKU1	(501)	TACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCA
GRA1		TACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCA
HKU1	(551)	GGCGGTTTGAAAAGTCAGCTGTGAAAACCGCGGCTCAACCTGGGAAGT
GRA1		GGCGGTTTGAAAAGTCAGCTGTGAAAACCGCGGCTCAACCTGGGAAGT
HKU1	(601)	CGGTTGAAACTCTCAAGCTAGAGTGGGTGAGAGGGGGTGGAAATTCACG
GRA1		CGGTTGAAACTCTCAAGCTAGAGTGGGTGAGAGGGGGTGGAAATTCACG
HKU1	(651)	TGTAGCAGTGAAATGGGTAGAGATGTGGAGGAACACCAATGGGGAAGCA
GRA1		TGTAGCAGTGAAATGGGTAGAGATGTGGAGGAACACCAATGGGGAAGCA
HKU1	(701)	GCCCCGCGGATGACACTGACGCTCATGCACGAAAGGTTGGGAGCAAC
GRA1		GCCCCGCGGATGACACTGACGCTCATGCACGAAAGGTTGGGAGCAAC
HKU1	(751)	AGGATTAGATAACCTGGTAGTCCAGGCCCTAAAGCATGTGACTAGCGT
GRA1		AGGATTAGATAACCTGGTAGTCCAGGCCCTAAAGCATGTGACTAGCGT
HKU1	(801)	TGGAGATTTGGGTTTCTGGTGCGCAGCTAACCGGTGAAGTGGACGGCT
GRA1		TGGAGATTTGGGTTTCTGGTGCGCAGCTAACCGGTGAAGTGGACGGCT
HKU1	(851)	GGGGAGTACGGTGGCAAGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGGGC
GRA1		GGGGAGTACGGTGGCAAGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGGGC
HKU1	(901)	ACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAAATGGATGCAAGCGGAAAAACCTTAC
GRA1		ACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAAATGGATGCAAGCGGAAAAACCTTAC
HKU1	(951)	CTGGTCTTGACATGTACCGAAGCTGGAAGAGATTGAGGGTGCCGAAAG
GRA1		CTGGTCTTGACATGTACCGAAGCTGGAAGAGATTGAGGGTGCCGAAAG
HKU1	(1001)	GGAGCGGTAAACACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCAGCTGGTGTGTGAGA
GRA1		GGAGCGGTAAACACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCAGCTGGTGTGTGAGA
HKU1	(1051)	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTCAATAGTTGCCAGC
GRA1		TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTCAATAGTTGCCAGC
HKU1	(1101)	ATTAAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT
GRA1		ATTAAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT
HKU1	(1151)	GGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGACAGGGCTTCACACGTC
GRA1		GGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGACAGGGCTTCACACGTC
HKU1	(1201)	ATACAATGGTGGTACAGAGGGTCCCTAAGCCCGGAGGTAGTGCCAATCT
GRA1		ATACAATGGTGGTACAGAGGGTCCCTAAGCCCGGAGGTAGTGCCAATCT
HKU1	(1251)	CATAAAACCGATGTAGTCCGGATGCGAGTCTGCAACTGACTGGGTGAA
GRA1		CATAAAACCGATGTAGTCCGGATGCGAGTCTGCAACTGACTGGGTGAA
HKU1	(1301)	GTCGGAAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGTGG
GRA1		GTCGGAAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGTGG

图3 PCR扩增的GRA1菌16S rRNA基因序列与GenBank中香港海鸬型菌HKU1株匹配序列比较结果
(阴影部分表示相同的碱基序列)

Fig.3 Comparison of 16S rRNA gene sequence between GRA1 strain and *Laribacter hongkongensis* HKU1 strain (AF389085) accessed in GenBank
(Shadows mean the same base sequence)

表2 草鱼肠道选择分离的细菌与 GenBank 中登录的香港海鸥型菌及淡水鱼主要致病菌的 16S rRNA 基因序列同源性

Tab.2 Homology of 16S rRNA gene sequence between selective isolates from the intestine of grass carp and *Laribacter hongkongensis* or pathogenic bacteria of freshwater fish in GenBank

细菌名称 Name of bacteria	菌株号 Strain	登录号 Accession No.	同源性/% Homology
香港海鸥型菌 <i>Laribacter hongkongensis</i>	HKU1	AF389085	99.9
香港海鸥型菌 <i>Laribacter hongkongensis</i>	NZ3166_99	AF449219	99.9
香港海鸥型菌 <i>Laribacter hongkongensis</i>	NZ3804_98	AF449221	99.9
香港海鸥型菌 <i>Laribacter hongkongensis</i>	NZ2153_99	AF449220	99.7
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	HY03	AY538658	83.0
软体动物气单胞菌 <i>Aeromonas molluscorum</i>	93M	AY532688	83.4
鲶鱼爱德华氏菌 <i>Edwardsiella ictaluri</i>		AF310622	81.8
迟缓爱德华氏菌 <i>Edwardsiella tarda</i>	ATCC15947	AF050827	81.5
鳃弧菌 <i>Listonella anguillarum</i>	M3	AY035897	80.2
荧光假单胞菌 <i>Pseudomonas fluorescens</i>		AY605696	84.4

2.5 药敏实验

GRA1 菌和 GRA2 菌对 14 种药物的敏感性表现一致,对庆大霉素、四环素、左氟沙星、复方新诺明、诺氟沙星、环丙沙星、卡那霉素等 7 种药物敏感,对奥格门丁、红霉素和氨苄西林中等敏感,对青霉素、亚胺培南、头孢拉定、利福平耐受。另 3 株细菌对大部分药物的敏感性与 GRA1 菌相同,不同之处表现在:GRB1 菌对四环素中等敏感;GRB2 菌对红

霉素和亚胺培南敏感;GRC1 菌对红霉素敏感,而对头孢拉定和环丙沙星中等敏感(表 3)。

香港大学报道的 7 株香港海鸥型菌对庆大霉素、奥格门丁、亚胺培南均敏感^[2]。本实验从草鱼肠道中分离的 5 株细菌均对庆大霉素敏感;对奥格门丁中等敏感;对亚胺培南除 GRB2 菌敏感外,其余 4 株菌均耐受。结果表明,5 株从草鱼肠道中分离的细菌对药物的敏感性与香港海鸥型菌有一定区别。

表3 从草鱼肠道分离的 5 株细菌对药物的敏感性

Tab.3 Susceptibility of the five strains isolated from the intestine of grass carp to 14 kinds of antibiotics

抗菌药物 Antibiotics	含药量 Dose/($\mu\text{g} \cdot \text{disc}^{-1}$)	药敏结果 Susceptibility results				
		GRA1	GRA2	GRB1	GRB2	GRC1
奥格门丁 Amoxicillin/clavulanic acid	10	M	M	M	M	M
青霉素 Penicillin	10	R	R	R	R	R
庆大霉素 Gentamicin	10	S	S	S	S	S
红霉素 Erythromycin	15	M	M	M	S	S
四环素 Tetracycline	30	S	S	M	S	S
左氟沙星 Levofloxacin	5	S	S	S	S	S
亚胺培南 Imipenem	NK	R	R	R	S	R
复方新诺明 Sulfamethoxazole	25	S	S	S	S	S
头孢拉定 Cefradine	30	R	R	R	R	M
诺氟沙星 Norfloxacin	10	S	S	S	S	S
氨苄西林 Ampicillin	10	M	M	M	M	M
环丙沙星 Ciprofloxacin	5	S	S	S	S	M
卡那霉素 Kanamycin	30	S	S	S	S	S
利福平 Rifampin	5	R	R	R	R	R

注:M—中等敏感;NK—含量不明;R—抗性;S—敏感。

Note: M—mid sensitive; NK—dose not known; R—resistant; S—sensitive.

3 讨论

从草鱼肠道中选择分离的 CRA1 等 5 株细菌的菌落形态、生化特性、电镜下形态与 Woo 等^[2]分离的 6 株香港海鸥型菌相似。与 Yuen 等^[1]分离的 HKU1 株菌落形态相同、生化特性大部分相似,但在有无鞭毛和运动性方面存在差异,表现在 CRA1 等 5 株细菌具鞭毛、运动,而 HKU1 株无鞭毛、不运动。16S rRNA 基因序列分析结果表明,分离菌与 GenBank 中登录的香港海鸥型菌的同源性为 99.7%~99.9%。细菌形态、生化和分子生物学多元鉴定结果表明,草鱼肠道中选择分离的细菌为有鞭毛的香港海鸥型菌。Woo 等^[2]从 6 位腹泻病人粪便中分离的 6 株香港海鸥型菌两端生鞭毛;本研究从草鱼肠道中分离细菌的鞭毛着生位置、形状与 Woo 等分离的相似;Yuen 等从脓血样本中分离的 HKU1 株无鞭毛。Woo 等^[2]认为,鞭毛的差异是由细菌因所处环境而致抗原变异引起。5 株香港海鸥型菌对药物的敏感性与 Woo 等^[2]结果有差异,而 Woo 等实验的 7 株细菌之间亦存在差异^[2]。药物的敏感性虽与菌的种类有一定关系,但并非鉴定所必需。布坎南等^[8]认为,一般地说对许多抗菌素的敏感性在分类上并不很重要,因为该性状在一个种和另一个种以及一个种内的菌表现均各异。

据研究,草鱼肠道中的常见细菌包括链球菌属(*Streptococcus*)、哈夫尼亚菌属(*Hafnia*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、柠檬酸菌属(*Citrobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、致病杆菌属(*Xenorhabdus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)等,细菌总数在 $10^5 \sim 10^8$ CFU/g^[9~10]。本研究的草鱼肠道组织匀浆液接种在 CMA 平板上,生长的菌数在 10^4 CFU/g 以下,说明大部分肠道常见细菌不能在其上生长,大大减少了检测鉴定目标细菌的工作量。本结果表明,CMA 选择培养基是从草鱼肠道中分离香港海鸥型菌较理想的培养基。本研究的 12 尾草鱼中有 5 尾肠道中分离到香港海鸥型菌,阳性率为 41.7%;从肌肉中未分离到此菌。而 Woo 等^[2]从市场采集的草鱼中检出此菌的阳性率为 59% (10/17),从鱼糜制品中检出的阳性率为 15% (2/13)。分离结果阳性率的差异可能与草鱼的取样数量、来源等有关。本研究肌

肉中分离细菌是在严格无菌条件下操作,无肠道细菌的污染,另据实验,分离细菌保持在 63℃、8 min, 90℃、2 min 即可完全灭活(本文结果未体现)。因此,只要注意饮食卫生,食用草鱼还是比较安全的。

香港大学医学院研究人员在腹泻患者粪便和淡水商品鱼中均分离到香港海鸥型菌^[2~3],本实验结果亦表明,体质健壮的草鱼肠道中可能存在香港海鸥型菌,但此菌对草鱼是否有致病作用、对人体的致病机理尚待研究,其在草鱼等淡水鱼类、淡水水体、人体的传播途径亦有待探讨。

参考文献:

- [1] Yuen K Y, Woo P C Y, Teng J L L, et al. *Laribacter hongkongensis* gen. nov. sp. nov., a novel Gram-negative bacterium isolated from a cirrhotic patient with bacteremia and empyema[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(12): 4 227~4 232.
- [2] Woo P C Y, Peter K, Anadi P B, et al. *Laribacter hongkongensis*: a potential cause of infectious diarrhea [J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2003, 47: 551~556.
- [3] Woo P C Y, Lau S K, Teng J L L, et al. Association of *Laribacter hongkongensis* in community-acquired gastroenteritis with travel and eating fish: a multicentre case-control study[J]. Lancet, 2004, 363: 1 941~1 947.
- [4] Lau S K P, Woo P C Y, Wai-ting Hui, et al. Use of oxoid oxycou MacConkey agar for selective isolation of *Laribacter hongkongensis*[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(10): 4 839~4 841.
- [5] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册(第1版)[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [6] 马绪荣, 苏德模. 药品微生物学检验手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 216.
- [7] 曹英林, 周家滨. 医学免疫学与微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2000. 90~92.
- [8] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册(第8版)[M]. 北京: 科学出版社, 1984. 591~614.
- [9] 周文豪, 陈孝敏, 张冬晓, 等. 摄食不同饲料对草鱼肠道菌群影响的研究[J]. 华中农业大学学报, 1998, 17(3): 252~256.
- [10] 赵庆新, 谭远德. 鲤科鱼肠道菌分布及共生关系研究[J]. 中国预防兽医学报, 2001, 23(2): 130~133.
- [11] 叶 军, 孔 杰, 刘 萍, 等. 对虾病原菌 2.58 菌株 16S rRNA 基因片段的克隆和序列测定[J]. 海洋水产研究, 1997, 18(1): 9~15.
- [12] 莫照兰, 茅云翔, 陈仰勇, 等. 养殖牙鲆细菌腹水症病原菌的鉴定及系统发育学分析[J]. 海洋与湖沼, 2003, 34(2): 131~141.

Selective isolation and identification of *Laribacter hongkongensis* from the intestine of *Ctenopharyngodon idellus*

PAN Hou-jun, WU Shu-qin, LI Ning-qiu, SHI Cun-bin, LI Kai-bin, GONG Hua, TAO Jia-fa, CHANG Ou-qin
(Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: *Laribacter hongkongensis*, a novel genus and species associated with community-acquired gastroenteritis and traveler's diarrhea was first isolated in Hongkong in 2001 from the blood and empyemic pus of a cirrhotic patient with bacteremia and empyema. Then it was sought in faecal specimens of six patients with community-acquired gastroenteritis. And then it was isolated in freshwater fishes such as grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*), big head carp (*Aristichthys nobilis*), mud carp (*Cirrhina molitorum*) and largemouth bass (*Micropterus salmoides*) and also in minced freshwater fish meat by Lau et al in 2004. Since *L. hongkongensis* is harmful to human health, the research of *L. hongkongensis* is necessary.

In this study, Cefoperazone Macconkey agar was used for selective isolation of bacteria from the intestine of grass carp (body weight 2.0–2.5 kg) cultured in some farms of Guangdong Province. Five strains of typical shaped bacteria colonies were obtained named GRA1, GRA2, GRB1, GRB2 and GRC1 from five grass carp respectively. They were identified by biochemical characteristics, scanning and transmission electron microscope and 16S rRNA gene sequence analyses. The sensitivities of the 5 strains to 14 antibiotics were tested by filter paper diffusion method. The results showed that the culture-positive of the typical shaped bacteria colonies was 41.7% (5/12) from the intestines of the fish. All strains could grow on normal nutrition agar, as colonies about 1 mm in diameter at 48 h incubation at 28 °C. And their colonies were non-hemolytic, gray and 1.2–1.5 mm in diameter on 5% sheep blood agar. The forms of all colonies on the three kinds of agar were circular with smooth face and swelled-like center. All the five strains were motile with bipolar flagellae, seagull in shape, 1.6–2.5 μm in length, 0.43–0.57 μm in diameter under scanning and transmission electron microscope. They were gram-negative bacteria, oxidase, catalase, urease and arginine dihydrolase positive. And they reduced nitrate but did not ferment, oxidize, or assimilate 15 kinds of tested sugar such as glucose, lactose, etc. The study showed that the morphological and biochemical characteristics of these five strains were similar to the 6 strains of *L. hongkongensis* isolated from the six patients with community-acquired gastroenteritis by Woo et al. Partial of 16S rRNA gene of the selective isolates was amplified by PCR, and the PCR product was analyzed. The length of PCR product was 985 bp except primer-combined region. This sequence was blast GenBank to analyze nucleotide identities with other bacteria by Vector NTI suite 9.0 software. The result showed that the sequence was 97.7%–99.9% homology with that of 4 strains of *L. hongkongensis*, such as HKU1 accession in GenBank, just only 1–2 base difference. But its nucleotide homology to that of major pathogenic bacteria of freshwater fish such as *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* and *Pseudomonas fluorescens* was less than 84.4%. In conclusion, the selective isolates from the intestines of grass carp were defined as *L. hongkongensis* based on the morphology in TEM, biochemical characteristics and the 16S rRNA gene sequence analyses. The test of susceptibility of the five strains to 14 kinds of antibiotics showed that all the five strains were sensitive to gentamicin, levofloxacin, sulfamethoxazole, norfloxacin, kanamycin and mid-sensitive to amoxicillin/clavulanate, ampicillin but resistant to penicillin and rifampicin. There were some differences in susceptibility to other 5 kinds of antibiotics among the five strains. It indicted that the susceptibilities to amoxicillin/clavulanate and imipenem of the five strains isolated from the grass carp in this experiment had some difference with those isolated from human being by Hongkong scientists.

Key words: *Laribacter hongkongensis*; *Ctenopharyngodon idellus*; selective isolation; identification

Corresponding author: WU Shu-qin. E-mail: sqwxm@163.net