

鲟源鲁氏耶尔森氏菌的分离鉴定 及药敏特性研究

杨移斌¹ 夏永涛² 郑卫东³ 胡 鲲¹ 杨先乐¹

(1. 上海海洋大学国家水生动物病原库, 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院, 北京 100039;
3. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 武汉 430223)

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *YERSINIA RUCKERI* FROM *ACIPENSER BAERII* AND ITS ANTIBIOTIC SENSITIVITY

YANG Yi-Bin¹, XIA Yong-Tao², ZHENG Wei-Dong³, HU Kun¹ and YANG Xian-Le¹

(1. State Collection Center of Aquatic Pathogen, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100039, China; 3. Yangtze River Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 4310223, China)

关键词: 鲁氏耶尔森氏菌; 16S rDNA; 药敏特性; 西伯利亚鲟

Key words: *Yersinia Ruckeri*; 16S rDNA; Antibiotic sensitivity; *Acipenser baerii*

中图分类号: S941 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2013)02-0393-06

西伯利亚鲟隶属于硬骨鱼纲, 辅鳍亚纲, 硬鳞总目, 鲟形目(Acipenseriformes), 全世界现存 26 种鲟^[1], 我国的鲟类有 2 科 3 属 8 种, 分布在长江水系的有中华鲟(*Acipenser sinensis*)、白鲟(*Psephurus gladius*)和达氏鲟(*Acipenser dabryanus*); 黑龙江水系的有施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)和达氏鲟(*Huso dauricus*); 新疆地区有裸腹鲟(*Acipenser nudiventris*)、小体鲟(*Acipenser ruthenus*)和西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)^[2]。鲟鱼是地球上最古老的鱼种之一, 素有“活化石”之称, 是我国的名特优珍品, 肉味鲜美、骨软、营养价值高, 鲟鱼肉和卵的蛋白含量高达 18%和 29%。另外特别值得一提的是具有“黑色黄金”之称的鲟鱼子酱, 是由鲟鱼卵加工而成, 更是驰名中外的高档食品, 在国际市场十分走俏。我国第一个鲟鱼养殖场 1992 年在大连瓦房店成立, 开启了我国鲟鱼的商业化养殖, 西伯利亚鲟养殖规模居中国鲟鱼养殖产量的第 1 位^[2], 但随着养殖品种及规模的不断增加, 病害正在逐

步增加, 已经严重影响了鲟鱼养殖产业的健康发展。如革兰氏阴性菌嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、豚鼠气单胞菌(*Aeromonas carvia*)和类志贺邻单胞菌(*Plesimonas shigelloides*)^[3-6]感染鲟鱼致病的报道, 还有革兰氏阳性菌链球菌感染鲟鱼使其致病^[7,8]的报道。2012 年 6 月我国浙江省衢州市鲟鱼养殖场养殖的鲟鱼出现生殖孔红肿, 有脓状物流出, 病鱼解剖观察发现性腺从生殖孔处开始布有小斑点, 呈紫红色, 性腺呈糜烂状并最终与体壁脱离, 心脏出现充血, 肝脏颜色呈灰色, 体壁未充血, 也未出血, 脾脏严重充血导致呈紫黑色, 肠内无食物, 肾脏未充血, 但是发生病变。发病鲟鱼集中在西伯利亚鲟、史氏鲟和杂交鲟。本研究从发病鲟鱼中分离出一株高致病性的致病菌, 通过常规生理生化鉴、16S rDNA 序列测定和系统发育分析的方法对该菌进行了分类鉴定, 并测定了其一些生物学特性和对药物敏感性, 旨在为鲟鱼鲁氏耶尔森氏菌病的有效防控提供理论参考依据, 且为鲟鱼

收稿日期: 2012-08-06; 修订日期: 2012-12-27

基金项目: 国家重大科技成果转化项目“鲟繁育及养殖产业化重大科技成果转化与应用-鲟鱼疾病防控技术研究”(ZD-2012-345-6); 公益性行业(农业)科研专项经费(201203085); 国家 863 计划项目(2011AA10A216); 国家自然科学基金项目(31172430); 上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字(2011)第 4-8 号)资助

作者简介: 杨移斌(1988—), 男, 江西抚州人; 在读硕士; 研究方向为水产动物医学。E-mail: yangyb988@126.com

通信作者: 杨先乐(1948—), E-mail: xlyang@shou.edu.cn

健康养殖及病害防治增加新的内容。

1 材料与方法

1.1 试验材料

实验用鱼 试验用鱼为易感染发病的西伯利亚鲟,病鱼采自浙江衢州鲟鱼养殖场,人工感染用健康西伯利亚鲟取自此养殖基地。

主要试剂 普通营养琼脂、5%绵羊血平板和水解酪蛋白琼脂(MH)按常规方法自制;脑心浸出液琼脂购自北京陆桥生物制品有限公司;细菌生化微量鉴定管购自杭州微生物试剂有限公司;细菌基因组DNA提取试剂盒、PCR扩增细菌16S rDNA试剂盒、TaqDNA聚合酶均购自上海生工生物工程技术有限公司;药敏纸片购自杭州微生物试剂有限公司。

1.2 方法

流行病学调查及发病症状观察 调查养殖场鲟鱼发病情况及死亡率,了解发病种类及规格以及掌握相应水域环境状况。查看鱼体外表,解剖观察内脏器官是否有明显的病变,从而确定疾病的基本症状,并取病样组织进行病原菌分离与纯化。

病原菌分离纯化 选取具有典型症状的西伯利亚鲟,用75%的酒精在病鱼体表消毒后,解剖开取其性腺、肝、肾等病灶组织少许,无菌条件下划线接种于脑心浸出液琼脂和营养琼脂平板上,置于28℃恒温培养箱中培养24—48h,挑起在平板上较多的、形态颜色一致的菌落,选择单个菌落进一步划线培养纯化,最后转移到营养琼脂固体斜面培养基上,于4℃冰箱保存备用。

人工感染试验 选取健康的西伯利亚鲟,设1个实验组和1个对照组。试验组为6尾,对照组为4尾,水温都控制在20—22℃,模拟自然发病环境状况。细菌HD0923在营养琼脂上28℃培养24h,用无菌生理盐水洗下菌苔,用麦氏比浊法测定并调节菌悬液浓度为 4×10^7 CFU/mL,分别对实验组鲟鱼进行胸鳍基部注射,每尾注射0.2 mL菌液。对照组注射相同剂量的无菌生理盐水,试验鱼缸连续充氧,不投喂。观察鱼的发病及死亡情况,并对濒死鱼及时剖检和对致病菌的再次分离与纯化。

病原菌形态与理化特性检测 将菌株HD0923接种普通营养琼脂平板,28℃培养24h后观察菌落的大小、形态及颜色,同时革兰氏染色,采用光学显微镜观察细菌形态,其他各项生理生化指标的测定参照文献[9]进行。

菌株HD0923的16S rDNA基因序列测定与分析
(1)细菌16S rDNA模板的制备:将细菌接种于脑心浸出液培养基(BHI)中,28℃震荡培养18h,12000 r/min离心收集菌体,按细菌基因组DNA提取试剂盒说明书提取细菌总DNA,作为PCR的模板DNA。

(2)16S rDNA基因系列的扩增与测序:用于16S

rDNA的PCR反应的引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

正向引物为27F: 5'-AGAGTTTGATC(C/A)TGGCTC-AG-3'(对应于*E. coli*的16S rRNA基因的第8—27 bp位置)。

反向引物1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'(对应于*E. coli*的16S rRNA基因的第1492—1510 bp位置)。

PCR反应条件为:95℃变性3min,94℃平衡35s,55℃退火35s,72℃延伸1min,此阶段35个循环,72℃温育10min。经PCR扩增后的产物进行1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测以证明PCR扩增得到的片段是否是目的片段后,将PCR的最终产物送上海生工生物工程技术有限公司进行纯化和序列测定。

(3)构建系统发育树:将菌株HD0923的16S rDNA序列运用NCBI数据库中细菌的16S rDNA进行比对,从中选取17株与该株细菌基因序列最相似的菌株和5种水产常见病原菌,采用Clustal w软件进行多序列匹配分析,用MEGA5.1软件包中的Neighbor-Joining法构建系统进化树,通过1000次Bootstrap检验置信度。

药物敏感试验 药敏试验采用K-B法,将菌株HD0923接种于脑心浸出液(BHI)液体培养基,置于28℃摇床培养18h后分别涂布水解酪蛋白琼脂(MH)平板。选择17种药敏纸片均匀贴于平板,每个平板贴5片,置28℃下培养24h后测量抑菌圈直径。根据《现代诊断学手册》^[10]标准判定细菌对药物的敏感性。

2 结果

2.1 自然发病流行情况及临床表现

2012年6月中旬至8月浙江衢州衢州市水产食品科技开发有限公司的花园基地接连不断出现3龄以上的以西伯利亚鲟、史氏鲟、杂交鲟为主的死亡现象,本公司其他几个相邻鲟鱼养殖基地相继发生,死亡率高达80%。发病水温在20—22℃。发病初期病鱼缓慢游动,精神不振,表现为邻近水面离群独游或者静止不动,严重者身体失去平衡、贴壁侧游或尾巴向上、头向下漂浮在水中,食欲渐减至不食,生殖孔出现红肿溃烂。检查鲟鱼性腺成熟度时,能发现鲟鱼生殖孔出现轻微红点,即开始发病。发病鲟鱼的主要症状初期体表表现为有绝大多数发病鲟鱼下颌有溃烂产生,尤以生殖孔部位出血溃烂明显。解剖观察发现内脏器官存在不同程度的损伤,体壁未充血,肝脏呈灰色且肿大、易碎,脾脏出血严重导致呈紫黑色,肾脏呈紫红色,心脏呈嚷肿状。溃烂部位集中在性腺,溃烂前表面形成紫红色出血点,深度大约3 cm左右,有的布满整个性腺,有的在靠近生殖孔一端发现,有的从靠近生殖孔一端开始溃烂,有的是整个性腺一起溃烂,性腺溃烂成脓血水,从生殖孔流出体外,性腺从体壁脱落,最终发病鲟鱼死亡。

2.2 病原菌分离

从 5 尾具有典型发病症状但未死亡的病鱼肝脏、肾脏和性腺组织取样于营养琼脂和脑心浸出液琼脂平板上划线, 置于 28℃ 恒温培养箱培养 24h 后获得一株优势细菌, 编号为 HD0923。该菌在营养琼脂平板上生长良好, 形成椭圆形, 表面光滑, 边缘整齐, 整个菌落呈凸起状, 直径 1 mm 的透明的白色菌落。从人工感染的病鱼取同样的组织划线分离, 得到的菌株菌落形态、大小、颜色与此一致。

2.3 人工感染试验

试验组西伯利亚鲟在接种感染后 24h, 表现为无力游动, 呼吸缓慢, 生殖孔红肿, 有橙色脓状液体从生殖孔流出, 发病鲟占试验组鲟总数 66.7%, 而对照组未见异常。对发病的西伯利亚鲟进行观察发现生殖孔红肿溃烂, 解剖可见肝脏呈灰色, 脾脏严重出血呈紫黑色, 肾脏呈紫红色, 心脏呈嚙肿状, 性腺表面有紫红色出血点, 性腺出现溃烂, 从靠近生殖孔处开始溃烂, 性腺溃烂成脓血水, 从生殖孔流出体外, 与自然发病鲟鱼和病变相似。并从感染死亡鱼肝脏、肾脏和性腺组织分离到与菌株 HD0923 形态、生理生化和 16S rDNA 序列分析一致的细菌, 表明菌株 HD0923 是鲟鱼此病的病原菌。

2.4 形态特征

分离菌株 HD0923 为革兰氏阴性短状杆菌, 无芽孢和荚膜, 在普通营养琼脂菌落呈灰白色, 椭圆形, 表面光滑, 边缘整齐的白色菌落, 整个菌落呈凸起状, 直径 0.7—1 mm; 在脑心浸出液琼脂平板上形成椭圆形, 表面光滑, 边缘整齐, 整个菌落呈凸起状, 直径 1—1.3 mm 的透明的白色菌落; 在 5% 绵羊血平板上不出现溶血现象。

2.5 生理生化特征

分离菌株 HD0923 适宜生长温度范围为 18—36℃, 最适生长温度为 24—31℃, 其中在 28—29℃ 有一个生长的明显加快阶段。其适宜生长的 pH 范围为 4—10, 最适 pH 为 5.0—8.0, 其他的生理生化特征(表 1)。

2.6 16S rDNA 的 PCR 扩增结果及系统发育分析

PCR 扩增分离株 HD0923 获得的 16S rDNA 基因片段约 1500 bp (图 1)。测序获得长 1416 bp 的片段, 获得的序列与 GenBank 中已收录的相关性较高的 16S rDNA 序列进行比对分析结果表明, 从发病西伯利亚鲟分离的细菌 16S rDNA 基因序列与鲁氏耶尔森氏菌(*Y. ruckeri*)同源性最高, 为 100%, 选取了检索的部分耶尔森氏菌属细菌和水产上常见病原菌的 16S rDNA 基因序列用 Neighbor-Joining 方法进行系统发育学分析, 其系统发育树(图 2)。在系统发育树上 HD0923 株与鲁氏耶尔森氏菌(*Y. ruckeri*)聚为一个分支, 同源性达到 100%。根据分离菌的形态特征及理化特性, 结合 16S rDNA 序列测定与系统发育分析结果, 判定该菌为鲁氏耶尔森氏菌(*Y. ruckeri*)。

表 1 HD0923 菌株的生理生化特征

Tab. 1 Physiological and biochemical characteristics of HD0923

测定项目 Test item	HD0923	<i>Y. ruckeri</i>
吲哚试验 Indole test	-	-
甲基红 Methyl red	+	+
V-P 试验 Voges-Proskauer test	-	-
硫化氢 H ₂ S	-	-
明胶液化 Gelatin liquefaction	+	+
运动性 Motility	+	(+)
KCN 生长 Growth in KCN	-	d
尿素 Urea	-	-
赖氨酸 Lysine	+	(+)
精氨酸 Arginine	-	-
鸟氨酸 Ornithine	+	+
枸橼酸盐 Citrate	-	-
七叶苷 Esculoside	-	-
丙二酸 Malonic acid	-	-
木糖 Xylose	-	-
麦芽糖 Maltose	+	+
阿拉伯糖 Arabinose	(+)	-
海藻糖 Trehalose	+	+
果糖 Fructose	-	-
蔗糖 Sucrose	-	-
棉子糖 Raffinose	-	-
纤维二糖 Cellobiose	-	-
鼠李糖 Rhamnose	-	-
肌醇 Inositol	-	-
山梨醇 Sorbitol	+	-
甘露醇 Mannitol	+	+
D-阿东醇 D-adonitol	-	-
蜜二糖 Melibiose	-	-
水杨苷 Salicin	-	-
乳糖 Lactose	-	-
D-葡萄糖产气	-	-
D- glucose aerogenesis	-	-
D-葡萄糖产酸	+	+
D- glucose acid production	+	+

注: “+”- 阳性; “-”- 阴性; “(+)”- 阳性反应超过 24h, “(-)”- 阴性反应超过 24h; “d”- 11%—89% 菌株为阳性

Note: “+”- positive; “-”- negative; “(+)” The time of Positive reaction exceed 24h; “(-)” The time of negative reaction exceed 24 h; “d”- 11%—89% strain is positive

2.7 药敏试验结果

分离株 HD0923 对 17 种药物的敏感性结果(表 2)表明, 分离菌株 HD0923 对强力霉素、丁胺卡那霉素、氟苯尼考、链霉素、先锋霉素 V、阿莫西林、阿奇霉素、左氧氟沙星、痢特灵、庆大霉素 10 种药物高度敏感, 对青霉素和克林霉素不敏感, 对其他几种药物中度敏感。

3 讨论

目前国内关于鲟鱼细菌性病害的报道呈不断增加的趋势,如杨治国、储卫华、曹海鹏等先后对西伯利亚鲟相关疾病进行了报道,主要病原为嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*)以及类志贺邻单胞菌(*Plesiomonas shigelloides*)^[3-6],潘厚军等对西伯利亚鲟感染停乳链球菌^[8]的报道,使得鲟鱼健康养殖受到巨大的威胁,西伯利亚鲟细菌性疾病成为了其养殖业可持续发展的瓶颈之一。

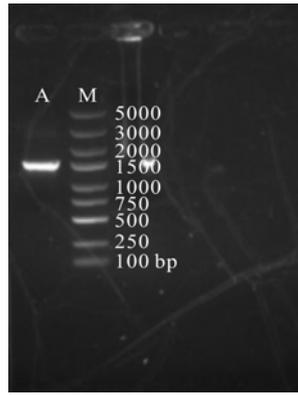


图1 分离菌株 HD0923 的 16S rDNA 的 PCR 扩增结果

Fig.1 The result of 16SrDNA PCR amplification of HD0923 strain

A: PCR 扩增产物 PCR amplification products; M: DNA Marker DL5000

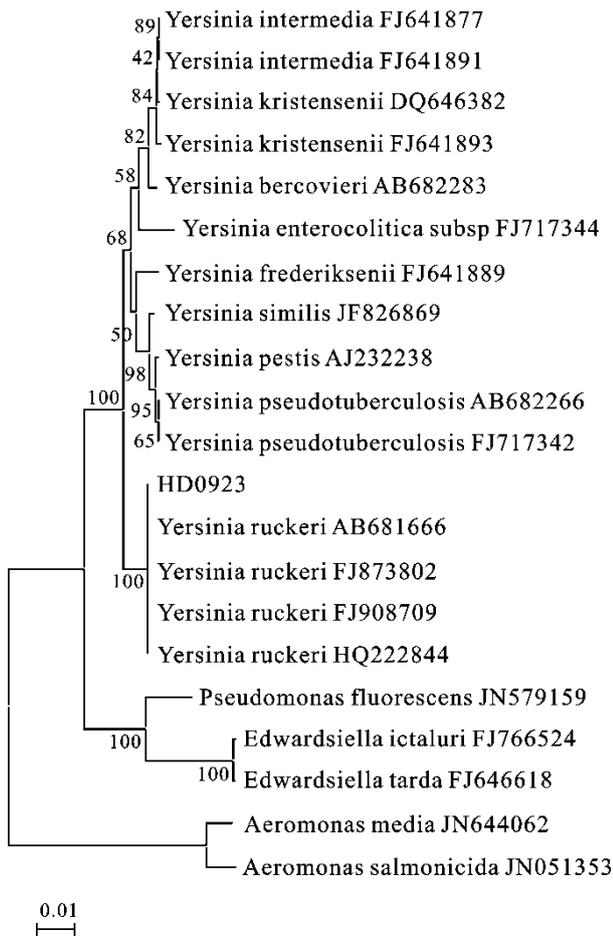


图 2 根据 16S rDNA 基因序列同源性构建的系统发育树

Fig. 2 The phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence homolog

本研究从发病西伯利亚鲟的肝脏、肾脏和性腺均分离到一株革兰氏阴性细菌 HD0923, 发现其对鲟具有明显的致病性, 经人工感染后出现生殖孔红肿溃烂, 解剖发现各器官不同程度损伤, 性腺发生溃烂; 与自然发病的症状一致, 而在人工感染发病鲟鱼肝脏、肾脏和性腺也分离到与 HD0923 形态特征、理化特性一致的菌株, 表明菌株 HD0923 是西伯利亚鲟的该病的致病菌。菌株 HD0923 经过形态学和生理生化鉴定以及 16S rDNA 序列分析及系统发育分析证实该菌株为鲁氏耶尔森氏菌(*Y. ruckeri*)。

目前的细菌分类鉴定法, 主要包括表型鉴定和分子遗传学鉴定两大类^[11]。细菌的常规鉴定法—形态法是经典、常用的分类鉴定方法, 其结果准确, 但鉴定耗时较长。依据细菌生理生化特性进行分类的方法, 通常由于生化的不完全性, 反应过度, 结果判断误差等造成鉴定不准, 以及从不同的水域和寄主体内分离到的菌株由于水域、气候、水质等方面的不同而产生细小的生化特性差异, 一般情况下只能准确鉴定到属。在本研究中因阿拉伯糖等生化特性方面与标准菌株不同, 也与汪开毓等在斑点叉尾鲷体内分离到的鲁氏耶尔森氏菌不同^[12], 随着科学技术的发展, 特别是分子生物学取得突破性进展, 细菌的鉴定也进入到分子生物学水平, 多种基因型分类方法也应运而生, 如 DNA 杂交、rDNA 指纹图、质粒图谱、(G+C) mol%、16S rDNA 序列分析及 GyrB 序列分析等。16S rDNA 序列分析成为细菌种属鉴定和分类的常用标准方法, 并于广泛应用于水产动物疾病病原菌的种属鉴定^[13, 14]。主要步骤是把测出来的细菌 16S rDNA 基因序列在 NCBI 数据库进行同源性比对, 从而构建其系统发育树, 确定细菌种类。本研究通过 16S rDNA 序列同源性分析, 构建了系统发育树, 结果发现分离到的菌株 HD0923 为与鲁氏耶尔森氏菌的同源性达到 100%, 结合形态学和生理生化鉴定结果, 从而确定该致病菌 HD0923 为鲁氏耶尔森氏菌。

鲁氏耶尔森氏菌属于肠杆菌科(Enterobacteriaceae)、耶尔森氏菌属(*Yersinia*), 是冷水性鲑科鱼类的常见红嘴病病原菌^[15], 现在几乎对养殖的鲑鳟鱼类品种都具感染性, 并且该菌亦被发现能引起温水性鲤科鲢、鳙鱼的发病和死亡^[16], 危害较大。该菌自 1952 首次从美国暴发的红嘴病中分离到后^[15], 现流行于澳大利亚、南非和西欧等地, 宿主范围和地域都进一步扩大, 表明该菌具有广泛的致病性。但是在人工养殖的鲟鱼体内引起性出血溃烂在国内尚属首次, 笔者推测可能原因是鲟鱼亦属冷水性鱼类, 在生活习性上与鲑科鱼类具有一定的相关性。而且此次西伯利亚鲟自然感染鲁氏耶尔森氏菌发病的水温在 20—22℃左右, 出现的临床症状与文献报道的感染鲁氏耶尔森氏菌后发病鱼的临床症状相似^[17, 18], 发病水温相近, 特别与汪开毓等报道斑点叉尾鲷感染鲁氏耶尔森氏菌导

表 2 HD0923 药敏试验结果
Tab.2 Antibiotic sensitivity test of strain HD0923

药物 Drug	抑菌圈直径判断标准 The judgement standard of inhibition zone diameter (mm)			药物含量 Dose ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (mm)	敏感性 Sensitivity
	耐药 Resistant	中度敏感 Medium sensitivity	敏感 Sensitive			
	强力霉素 Deoxycycline	≤ 12	13—15			
丁胺卡那霉 Amikacin	≤ 14	15—16	≥ 17	30	24	高度敏感
氟苯尼考 Florfenicol	≤ 12	13—17	≥ 18	75	30	高度敏感
链霉素 Streptomycin	≤ 11	12—14	≥ 15	10	18	高度敏感
氯霉素 Chloramphenicol	≤ 12	13—17	≥ 18	30	17	中度敏感
头孢噻肟 Claforan	≤ 14	15—22	≥ 23	30	15	中度敏感
先锋霉素 V Xianfeng Meisu V	≤ 14	15—17	≥ 18	30	19	高度敏感
青霉素 Penicillin	≤ 19	20—27	≥ 28	10U	0	耐药
红霉素 Erythromycin	≤ 13	14—22	≥ 23	15	21	中度敏感
克林霉素 Clindamycin	≤ 14	15—20	≥ 21	2	0	耐药
阿莫西林 Amoxicillin	≤ 13	14—17	≥ 18	10	21	高度敏感
阿奇霉素 Azithromycin	≤ 13	14—17	≥ 18	15	22	高度敏感
利福平 Rifampicin	≤ 16	17—19	≥ 20	5	19	中度敏感
左氧氟沙星 Levofloxacin	≤ 13	14—16	≥ 17	5	34	高度敏感
痢特灵 Furazolidone	≤ 14	15—16	≥ 17	300	20	高度敏感
庆大霉素 Gentamycin	≤ 12	13—14	≥ 15	10	21	高度敏感
新霉素 Neomycin	≤ 12	13—16	≥ 17	30	15	中度敏感

致肛门红肿, 下颌出血, 脾脏严重出血呈紫黑色, 性腺有不同程度的出血等症状相似^[12]。不同的是本次发病鲟鱼的性腺发生严重溃烂, 死亡率高, 鲟充血体内各实质器官充血不如其他报道鱼类明显。另据文献资料表明当水温低于 20℃ 时, 鲁氏耶尔森氏菌分泌的致病性外毒素溶血素的能力增强使细菌的毒力增大, 但在最适生长温度 28℃ 时, 鲁氏耶尔森氏菌分泌的致病性毒素溶血素的活性并不强^[19]。在本研究中在 5% 绵羊血平板上生长的鲁氏耶尔森氏菌未出现溶血现象, 与汪开毓等结果相同^[12]。据本研究观察发现此次发布鲟鱼性腺产生严重溃烂, 这与鲑鳟鱼类、温水性鲢鳙以及斑点叉尾鲷感染鲁氏耶尔森氏菌的症状明显不同, 可能是由于不同水域条件、发病物种以及不同气候环境导致的, 需进一步探究。

本研究结果表明, 鲁氏耶尔森氏菌 HD0923 对强力霉素、丁胺卡那霉素、氟苯尼考、链霉素、先锋霉素 V、阿莫西林、阿奇霉素、左氧氟沙星、痢特灵、庆大霉素 10 种药物高度敏感, 但对青霉素和克林霉素不敏感, 表现很强的耐药性。这与汪开毓等从感染鲁氏耶尔森氏菌的斑点叉尾鲷体内分离到的鲁氏耶尔森氏菌药敏特性有所不同^[12], 与其结果对比氯霉素的敏感性下降, 产生药敏特性差异的可能原因是不同区域、不同水域环境中的菌株接触到不同的药物环境作用影响而产生耐药性变异的差异^[20]。此外, 本研究选取的药物并非均可用于生产, 在本

研究中仅用于分析鲁氏耶尔森氏菌 HD0923 的药敏特性, 鲁氏耶尔森氏菌 HD0923 的药敏实验结果表明, 在生产中治疗感染鲁氏耶尔森氏菌的病鱼时可选那些高度敏药物进行防治, 氟苯尼考来是个不错的选择。但是鲁氏耶尔森氏菌 HD0923 对一些水产常用抗生素已产生极强的耐药性, 这是个危险的信号, 暗示我们鲟鱼养殖者在养殖过程中要慎重选用渔用抗生素, 尽量防止细菌产生耐药性。虽然现在的化学药物是防治水产动物疾病防治的主要手段, 但是长期使用化学药品特别是抗生素等将导致病原产生耐药性, 结果是疾病防治失败, 同时也很有可能导致水产品中的药物残留问题, 影响水产品质量和安全等。自从鲁氏耶尔森氏菌的福尔马林灭活疫苗首次在鲑科鱼类疾病防治中使用以来^[21], 注射疫苗法都是预防鱼类鲁氏耶尔森氏菌病发生的重要方法^[22]。但由于鲁氏耶尔森氏菌是在鲟鱼体内被发现的报道不多, 相关的研究亦不多, 注射疫苗防治法研究的开展更少, 因此在探索疫苗免疫防治的同时不妨进行生态防治, 利用微生物制剂无残留以及对水质影响不大的优点进行防治, 降低养殖生产的损失。

参考文献:

- [1] Ruban G I. Species structure, contemporary distribution and status of the siberian sturgeon, *Acipenser baerii* [J]. *Envi-*

- ronmental Biology of Fishes*, 2002, **17**: 221—230
- [2] Cui H, He J X, Zheng W Z. Analysis and development proposals about the status of the our sturgeon industry [J]. *China Fisheries*, 2006, (6): 8—10 [崔禾, 何建湘, 郑维中. 我国鲟鱼产业现状分析及发展建议. 中国水产, 2006 (6): 8—10]
- [3] Yang Z G. Isolation and identification of the *Aeromonas hydrophila* pathogen the sturgeon [J]. *Freshwater Fisheries*, 2001, (5): 40—41 [杨治国. 鲟鱼嗜水气单胞菌的分离及鉴定. 淡水渔业, 2001, (5): 40—41]
- [4] Meng Y, Xiao H B, Zhang L, *et al.* Isolation and identification of the hemorrhagic septicemia pathogen of Amur Sturgeon, *Acipenser schrenckii* Brandt [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2007, **26**(6): 822—826 [孟彦, 肖汉兵, 张林, 等. 施氏鲟出血性败血症病原菌的分离和鉴定. 华中农业大学学报, 2007, **26**(6): 822—826]
- [5] Li Y Y, Cao H P, He S, *et al.* Isolation and identification of *Aeromonas hydrophila* strain X1 from *Acipenser baerii* and its antibiotic sensitivity [J]. *Microbiology*, 2008, **35**(8): 1186—1191 [李圆圆, 曹海鹏, 何珊, 等. 鲟源致病性嗜水气单胞菌 X1 的分离鉴定与药敏特性研究. 微生物学通报, 2008, **35**(8): 1186—1191]
- [6] Cao H P, Yang X L, Gao P, *et al.* Preliminary study of the pathogens isolated from bacterial septicaemia syndrome of sturgeons [J]. *Freshwater Fisheries*, 2007, **37**(2): 53—56 [曹海鹏, 杨先乐, 高鹏, 等. 鲟细菌性败血症综合征致病菌的初步研究. 淡水渔业, 2007, **37**(2): 53—56]
- [7] Roy P E, Yanong Ruth. Francis-Floyd. *Streptococcal infections of fish* [J]. *Circular*, 2006, **57**: 1—6
- [8] Pna H J, Liu X Y, Chang O Q, *et al.* Isolation, identification and pathogenicity of *Streptococcus dysgalactiae* from Siberian Sturgeon, *Acipenser baerii* [J]. *Fishery Sciences of China*, 2009, **16**(6): 891—904 [潘厚军, 刘晓勇, 常藕琴, 等. 西伯利亚鲟停乳链球菌的分离、鉴定与致病性. 中国水产科学, 2009, **16**(6): 891—904]
- [9] Dong X Z, Cai M Y. *General Manual of Systematic and Determinative Bacteriology* [M]. Beijing: Science Press. 2001, 84—85 [东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社. 2001, 84—85]
- [10] Wang S J. *Modern Diagnostic Handbook* [M]. Beijing Medical University and China Peking Union Medical College Joint Press. 1995, 511—522 [王淑娟. 现代诊断学手册. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社. 1995, 511—522]
- [11] Li L, Li J N, Yu W Y. Research progress about bacterial classification and identification [J]. *Anhui Agricultural Sciences*, 2004, **32**(3): 549—551 [李琳, 李瑾年, 余为一. 细菌分类鉴定方法的研究概况. 安徽农业科学, 2004, **32**(3): 549—551]
- [12] Fan F L, Wang K Y, Geng Y, *et al.* Isolation, identification and phylogenetic analysis of *Yersinia ruckeri* in channel catfish *Ictalurus punctatus* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2010, **41**(6): 862—868 [范方玲, 汪开毓, 耿毅, 等. 斑点叉尾 (*Ictalurus punctatus*) 源鲁氏耶尔森氏菌的分离鉴定及系统发育分析. 海洋与湖沼, 2010, **41**(6): 862—868]
- [13] Eddy F, Powell A, Gregory S, *et al.* A novel bacterial disease of the European shore crab, *Carcinus maenas* molecular pathology and epidemiology [J]. *Microbiology*, 2007, **153**: 2839—2849
- [14] Zhou S M, Li A X, Ma Y, *et al.* Isolation, identification and characteristics of 16S rDNA gene sequences of the pathogens responsible for the *Streptococciosis* in cultured fish [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2007, **46**(2): 68—71 [周素明, 李安兴, 马跃, 等. 养殖鱼类链球菌病病原的分离鉴定及其 16S rDNA 分析. 中山大学学报, 2007, **46**(2): 68—71]
- [15] Huang Q Y (Eds.). *Disease of Aquatic Animals* [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press. 1998, 103—139 [黄琪琰 (主编). 水产动物疾病学. 上海: 上海科学技术出版社. 1998, 103—139]
- [16] Xu B H, Yin Z, Chen Y, *et al.* A new infectious disease *Yersinia ruckeri* of silver carp and bighead carp, a new silver carp, bighead carp pathogens [J]. *Chinese Science Bulletin*, 1991, **82**(8): 620—622 [徐伯亥, 殷战, 陈燕, 等. 鲢、鳙鱼一种新的传染病—*Yersinia ruckeri* 一种新的鲢、鳙鱼病原菌. 科学通报, 1991, **82**(8): 620—622]
- [17] Zhang X J. *Yersinia ruckeri* and relative infection of fish [J]. *Journal of Hebei Normal University of Science & Technology*, 2004, **18**(3): 77—80 [张晓君. 鲁氏耶尔森氏菌及鱼类相应感染症. 河北科技师范学院学报, 2004, **18**(3): 77—80]
- [18] Danley M L, Goodwin A E, Killian H S. Epizootics in farm-raised channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), caused by the enteric redmouth bacterium *Yersinia ruckeri* [J]. *Journal of Fish Diseases*, 1999, **22**: 451—456
- [19] Fernandez L, Prieto M, Guijarro J A. The iron- and temperature-regulated hae molysin YhlA is a virulence factor of *Yersinia ruckeri* [J]. *Microbiology*, 2007, **153** b: 483—489
- [20] Li A H, Cai T Z, Wu Y S, *et al.* Investigation on drug resistance of fish bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila* in china [J]. *Microbiology*, 2001, **28**(1): 58—63 [李爱华, 蔡桃珍, 吴玉深, 等. 我国鱼类病原—嗜水气单胞的耐药性研究. 微生物学报, 2001, **28**(1): 58—63]
- [21] Ellis A E. Immunity to bacteria in fish [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1999, **9**: 291—308
- [22] Martin K R, Kurt B. Innate immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against primary and secondary infections with *Yersinia ruckeri* [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2009, **33**(1): 35—455