

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55 (1) :96 - 106; 4 January 2015  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140165

## 尼罗罗非鱼致病性类志贺邻单胞菌 (*Plesiomonas shigelloides*) 的分离鉴定及其病理学观察

刘志刚, 可小丽, 卢迈新\*, 高风英, 曹建萌, 朱华平, 王淼

中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 广东 广州 510380

**摘要:**【目的】2013年5月广东番禺某养殖场罗非鱼出现大量死亡现象, 临床症状表现为鱼体体色发黑、体表出血、鳞片脱落、鳍条溃烂等, 解剖发现腹腔有大量腹水、胆囊肿大、肝呈黄色、脾脏呈暗红色。为确定病原, 【方法】从具以上临床症状的病鱼组织中分离获得可疑菌株1株, 编号PYS1。采用形态特征、生长特性、理化特征、16S rRNA基因序列分析等理化及分子生物学技术鉴定该菌株种类。通过人工回归感染及组织病理学研究确定该菌株的致病性, 并开展药物敏感性试验筛选其敏感药物。【结果】结果表明PYS1菌株为类志贺邻单胞菌 (*Plesiomonas shigelloides*), 在16S rRNA基因序列构建的分子进化树中与其他鱼源类志贺邻单胞菌聚为一支。药敏试验结果表明该菌株已呈现多重耐药性, 仅对少数检测抗生素(头孢曲松、头孢洛克和头孢唑啉等)敏感。人工回归感染结果显示PYS1菌株可使尼罗罗非鱼出现与自然发病鱼相似症状, 其对尼罗罗非鱼半致死量为  $1.425 \times 10^8$  CFU/尾, 石蜡切片显示其对感染鱼的肠、肝、脾、肾和心脏等组织均可造成损伤。【结论】证明类志贺邻单胞菌为上述养殖场尼罗罗非鱼发病的病原, 且为首次报道该菌对尼罗罗非鱼的致病性。

**关键词:** 尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*), 类志贺邻单胞菌 (*Plesiomonas shigelloides*), 致病性, 组织病理变化

**中图分类号:** R37      **文章编号:** 0001-6209(2015)01-0096-11

罗非鱼 (*Tilapia*) 隶属鲷形目、丽鱼科、罗非鱼属, 原产于非洲。由于其具有食性杂、生长快、繁殖力强等优点, 被誉为未来动物性蛋白质的主要来源之一, 已被多个国家和地区引种养殖<sup>[1-2]</sup>。中国是世界最大的罗非鱼生产国和出口国, 近十年来我国罗非鱼总产量不断增加, 2012年达136.8万吨, 出口量达36万吨<sup>[3]</sup>。近年来, 随着养殖规模的扩大, 养殖环境严重恶化, 养殖模式和病害防控措施相对滞后等弊端日益突出, 导致罗非鱼各类病害频繁爆

发, 给罗非鱼养殖业造成了巨大损失。其中细菌性病原对罗非鱼的危害最为严重, 主要包括无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、海豚链球菌 (*S. iniae*)、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、爱德华氏菌 (*Edwardsiella*)、水点状假单胞菌 (*Pseudomonas punctata* f. *ascitae*)、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 和柱状黄杆菌 (*Flavobacterium columnare*) 等<sup>[4]</sup>。近年研究发现罗非鱼病原菌种类有增加的趋势, 如维氏气单胞菌 (*Aeromonas*

基金项目: 现代农业产业技术体系专项资金 (CARS-49); 广州市科技计划项目 (2013J4100078, 201300000064)

\* 通信作者。Tel: +86-20-81617843; E-mail: mx-lu@163.com

作者简介: 刘志刚 (1988-), 男, 江西吉安人, 研究实习员, 主要从事水产动物病害防治研究。E-mail: wenliugang@163.com

收稿日期: 2014-04-03; 修回日期: 2014-05-29

*veronii*)<sup>[5]</sup>、绿色气球菌 (*Aerococcus viridans*)<sup>[6]</sup> 及蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)<sup>[7]</sup> 等。

类志贺邻单胞菌 (*Plesiomonas shigelloides*) 是一种革兰氏阴性、氧化酶阳性的运动性杆菌, 隶属肠杆菌科, 邻单胞菌属<sup>[8]</sup>, 是人类重要的肠炎性病原, 可引起急性肠胃炎、腹泻等症状, 同时也可以引起败血症、脑膜炎、化脓性关节炎、骨髓炎、腹膜炎、蜂窝组织炎和肺炎等肠外感染症状<sup>[9-11]</sup>。类志贺邻单胞菌广泛分布于自然界, 除了感染人类外, 对水生动物也具有一定的致病力, 如中华鳖 (*Trionyx sinensis*)<sup>[12]</sup>、暗纹东方鲀 (*Takifugu obscurus*)<sup>[13]</sup>、草鱼 (*Ctenopharygodon idellus*)<sup>[14]</sup>、黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*)<sup>[15]</sup>、杂交鲟 (*Huso huso* ♀ × *Acipenser ruthenus* ♂)<sup>[16]</sup> 等都有被其感染而引起死亡的报道。2013年5月, 广东番禺某罗非鱼养殖场出现罗非鱼大量死亡的现象, 患病鱼体主要临床症状为体色发黑、体表出血、鳞片脱落、鳍条溃烂等, 解剖发现腹腔有大量腹水、肝呈黄色、胆囊肿大。镜检未发现寄生虫, 从组织中分离到可疑菌株 PYS1。本实验通过形态特征观察、生理生化及分子生物学方法对分离菌株进行鉴定, 并对其培养特性、药敏、致病性及鱼体病理变化进行了初步研究, 这为该病原菌的预防和治疗奠定了理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:** 菌株 PYS1 为本实验室 2013 年从广东番禺养殖场发病尼罗罗非鱼组织中分离得到。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 革兰氏快速染色液 (珠海贝索生物有限公司)、API 20E 试剂盒 (Biomerieux)、药敏纸片 (杭州天和微生物试剂有限公司)、细菌 DNA 提取试剂盒 (Omega)、Taq 酶 (TaKaRa)、pMD19-T 载体 (TaKaRa)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  感受态细胞 (TaKaRa)、BHI 培养基 (广州威佳生物有限公司); 光学显微镜 (ZEISS)、PCR 仪器 (SensoQuest)、恒温摇床 (华利达实验设备有限公司) 和生物组织石蜡包埋机 (湖北安立信医疗实业有限公司) 等。

### 1.2 形态学观察

将 PYS1 菌株划线接种于血琼脂平板上, 置于 28℃ 恒温培养箱中培养 24 h。观察菌落形态及溶血

情况。挑选单菌落用革兰氏快速染色液进行革兰氏染色后, 置于显微镜下观察细菌形态。

### 1.3 生理生化鉴定

PYS1 菌株的生理生化指标采用 API 20E 试剂盒进行检测, 操作方法详见该试剂盒说明书, 通过 apiweb<sup>TM</sup> 鉴定软件判读实验结果, 并参照伯杰氏细菌鉴定手册<sup>[8]</sup> 中细菌生理生化指标进行确认。

### 1.4 分子鉴定

用细菌 DNA 提取试剂盒 (Omega) 抽提细菌基因组 DNA, 步骤参照说明书。以基因组 DNA 为模板, 用通用引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492R: 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' 扩增细菌的 16S rRNA 基因片段。PCR 反应条件为: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 90 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 胶回收目的片段, 连接至 pMD19-T 载体, 转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  感受态细胞, 挑取阳性克隆送至上海英潍捷基贸易有限公司进行测序。通过 GenBank 中的 BLAST 程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 进行序列同源性分析, 并下载相关细菌 16S rRNA 基因序列, 通过 Clustal x 软件进行多重比对, 用 MEGA 4 软件中邻接法 (neighbor joining, NJ) 构建分子系统进化树。

### 1.5 最适生长条件测定

将 PYS1 菌株接种于 BHI 液体培养基中, 于 28℃、200 r/min 下振荡培养 24 h 后, 用新鲜 BHI 培养基稀释至  $1 \times 10^8$  CFU/mL, 备用。研究 PYS1 菌株最适生长温度时按 1:50 (V/V) 的比例将备用菌液接种于新鲜的 BHI 培养基中, 分别置于 25℃、28℃、31℃、34℃、37℃ 和 40℃ 恒温摇床中, 以 200 r/min 的转速进行振荡培养, 每个温度设置 3 个重复。研究 PYS1 菌株最适生长 pH 时, 按 1:50 (V/V) 的比例将上述备用菌液接种于 pH 值分别为 4、5、6、7、8、9 的新鲜 BHI 培养基中, 置于 37℃ 恒温摇床中, 以 200 r/min 的转速进行振荡培养, 每个 pH 设置 3 个重复。研究 PYS1 菌株最适生长盐度时, 按 1:50 (V/V) 的比例将上述备用菌液接种于盐度分别为 0.1‰、3‰、5‰、7‰、9‰、11‰ 的新鲜的营养肉汤培养基中 (pH = 8.0), 置于 37℃ 恒温摇床中, 以 200r/min 的转速进行振荡培养, 每个盐度设置 3 个重复。监测 0-14 h 内各组菌液的吸光值 ( $OD_{600}$ ), 每隔 2 h 检测 1 次, 绘制生长曲线。

## 1.6 药物敏感试验

利用 K-B 法检测其药物敏感性。首先将 PYS1 菌株接种于 BHI 液体培养基, 37°C 振荡培养 24 h 后, 用 0.85 % 无菌生理盐水稀释至 0.5 个麦氏浓度, 取 150  $\mu\text{L}$  菌液涂布于血琼脂平板上, 待菌液被吸收后, 贴药敏纸片 (购于杭州天和微生物试剂有限公司), 置于 37°C 恒温培养箱中倒置培养 24 h, 测量抑菌圈直径, 按美国临床标准研究所 CLSI/NCCLS 2012 年颁布的药敏试验标准和规定进行敏感性结果判定。

## 1.7 人工回归感染试验

试验用尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*, GIFT strain) 由广东罗非鱼良种场提供, 体重为 50 - 60 g, 试验前在室内养殖条件下驯养 2 周。选用健康 (实验前抽样检测, 实验鱼不携带病原菌、寄生虫等病原)、个体大小一致的尼罗罗非鱼用于试验。驯养和试验期隔天换水约 1/3, 溶氧保持在 7.0 mg/L 以上, pH 7.0 - 8.0, 水温  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , 每天投喂饲料 2 次, 每次约为鱼体重的 1.5 %。

将分离纯化的 PYS1 菌株接种于 BHI 液体培养基中 37°C 振荡培养 24 h 后, 4000  $\times$  g 离心 10 min 沉淀菌体, 去上清后用 0.85 % 无菌生理盐水稀释成不同浓度的菌液 ( $1 \times 10^9$  CFU/mL、 $1 \times 10^8$  CFU/mL、 $1 \times 10^7$  CFU/mL、 $1 \times 10^6$  CFU/mL、 $1 \times 10^5$  CFU/mL)。将罗非鱼随机分为 6 组 (5 个感染组和 1 个空白对照组), 每组 15 尾。分别用不同浓度的菌液对 5 个感染组罗非鱼进行腹腔注射感染, 每尾 200  $\mu\text{L}$  菌液, 对照组注射等量的生理盐水, 观察各组的死亡情况, 统计 7 d 内各组的总死亡率。将从上述人工回归感染出现明显症状的病鱼中分离细菌进行鉴定和再次感染实验, 方法同上。

## 1.8 组织病理学观察

PYS1 菌株感染尼罗罗非鱼后取感染组濒死鱼和对照组健康鱼样本, 无菌解剖, 剪取大小约 0.5 cm  $\times$  0.5 cm  $\times$  0.2 cm 的鳃、肌肉、肝脏、脾脏、肠、胃、肾脏和脑 8 种组织, 置于中性福尔马林固定液中固定 48 h 后, 进行脱水、透明、透蜡、包埋、切片和贴片处理, 再进行 HE 染色, 用中性树胶封片后在显微镜下进行观察。

## 2 结果

### 2.1 形态特征

PYS1 菌株在血琼脂平板上 28°C 培养 24 h 后, 可形成圆形、微隆起的灰白色菌落、表面光滑、湿润、边缘整齐, 直径为 1 mm - 2 mm, 不形成溶血环 (图 1-A)。革兰氏染色结果表明, 该菌为革兰氏阴性杆菌, 细菌大小为 1.80  $\mu\text{m}$   $\times$  0.49  $\mu\text{m}$ , 两端钝圆, 单个或两个相连 (图 1-B)。

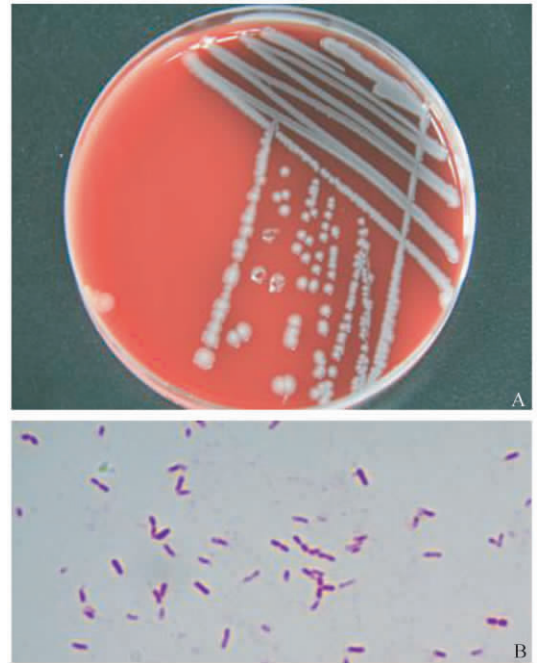


图 1. PYS1 菌株菌落形态及革兰氏染色结果

Figure 1. The colony morphology and gram staining of PYS1 strain. A: The colony morphology of PYS1 strain growth on sheep blood agar plate; B: The bacterial form of PYS1 strain (1000  $\times$ ).

### 2.2 生理生化特性

PYS1 菌株的  $\beta$ -半乳糖苷酶、精氨酸双水解酶、赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶、细胞色素氧化酶试验和吲哚试验为阳性, 能利用葡萄糖、肌醇、密二糖, 脲酶、色氨酸脱氢酶、明胶酶、柠檬酸钠、产  $\text{H}_2\text{S}$  试验、VP 试验为阴性, 不能分解鼠李糖、蔗糖、阿拉伯糖、甘露醇、山梨醇、苦杏仁苷。apiweb<sup>TM</sup> 鉴定软件判读结果表明 PYS1 菌株为类志贺邻单胞菌 (*Plesiomonas shigelloides*), 置信度为 99.9 %, T 值为 1.0。

### 2.3 16S rRNA 基因序列分析

通过 PCR 扩增和克隆测序获得 PYS1 菌株的 16S rRNA 基因片段 1506 bp。将获得的序列用 GenBank 中的 BLAST 程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 进行序列同源性分析, 结果表明序列与已报道的类志贺邻单胞菌 16S rRNA 基因序列 (登录号: Q359962.1; KC825322.1) 相似性高达 99%。下载 GenBank 中相关细菌 16S rRNA 基因序列, 通过 Clustal x 软件进行多重比对, 用 MEGA 4 软件中邻接法 (neighbor joining, NJ) 构建分子系统进

化树 (图 2), 结果显示, PYS1 菌株与其它类志贺邻单胞菌聚为一支 (支持率达 100%), 且与从黄颡鱼肠道粘液中分离的类志贺邻单胞菌 (*Plesiomonas shigelloides*, GQ359962.1) 亲缘关系最近 (支持率达 99%), PYS1 菌株与肠杆菌科的迟钝爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*, KC763831.1) 和弗氏志贺菌 (*Shigella flexneri*, KC887964.1) 的亲缘关系比其与弧菌科的霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*, AY513501.1) 和嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*, JN561162.1) 的亲缘关系要近。

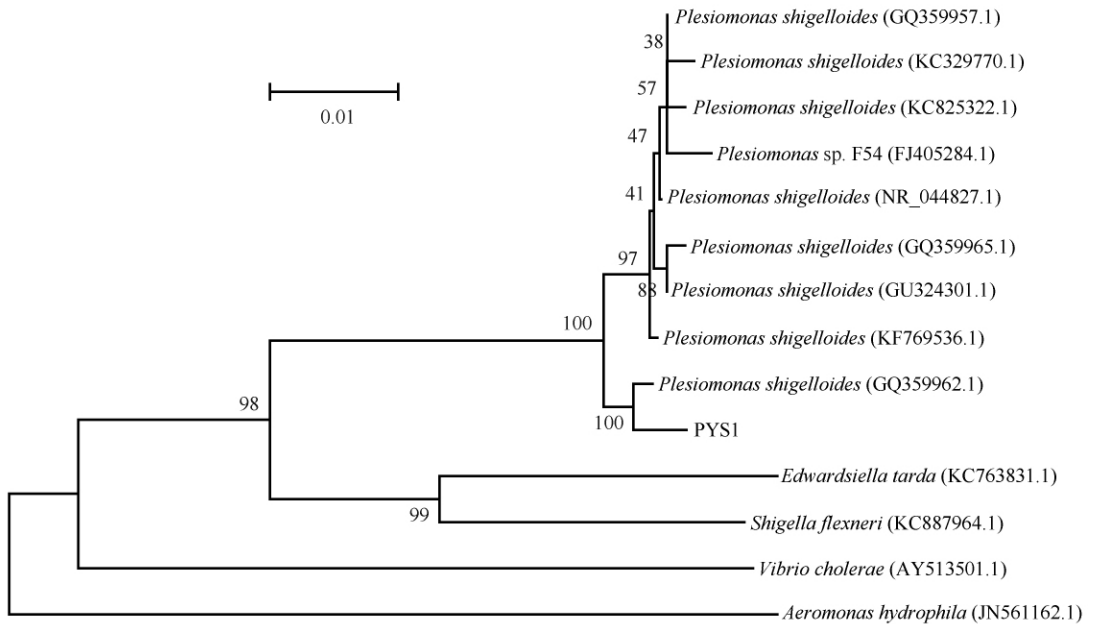


图 2. 基于 16S rRNA 基因序列的 NJ 系统进化树

Figure 2. NJ phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences. PYS1 indicates the 16S rRNA sequence of isolated strain. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch point is the percentage supported by bootstrap. The scale bar represents 0.01 sequence divergence.

### 2.4 最适生长条件

PYS1 菌株在不同温度下的生长情况表明, 该菌株在 25℃ - 37℃ 范围内都能较好的生长, 在 37℃ 条件下最早达到稳定期, 且到达稳定期时与各组菌液的吸光值之间无显著差异; 40℃ 时该菌生长受到一定的抑制, 稳定期时的菌液吸光值要显著低于其他温度下的吸光值 (图 3-A)。PYS1 菌株在不同 pH 下的生长情况表明, 在 pH 为 4 时, 其生长受到严重抑制; pH 5 - 8 范围内的生长速率随 pH 的增加而加快, pH 值为 8 时生长速率最快, pH 值升至 9 时菌株生长速率下降 (图 3-B)。PYS1 菌株在不同盐度

(0 - 11 ‰) 中生长情况表明, 它在 0 - 11 ‰ 盐度下都能较好生长, 其中 5 ‰ 盐度时生长速率最快, 稳定期  $OD_{600}$  值最大 (图 3-C)。

### 2.5 药敏试验

本试验检测了 PYS1 菌株对 31 种抗生素 (包括大环内酯类、 $\beta$ -内酰胺类、环素类、喹诺酮类、氨基糖苷类、糖肽类和林可霉素类) 的敏感性 (表 1)。结果表明, 该菌株对多数抗生素表现为耐药, 仅对头孢曲松、头孢克洛、头孢唑啉、头孢噻吩、米诺四环素、强力霉素和氧氟沙星敏感, 对头孢哌酮、头孢氨苄、氟罗沙星和链霉素中度敏感。

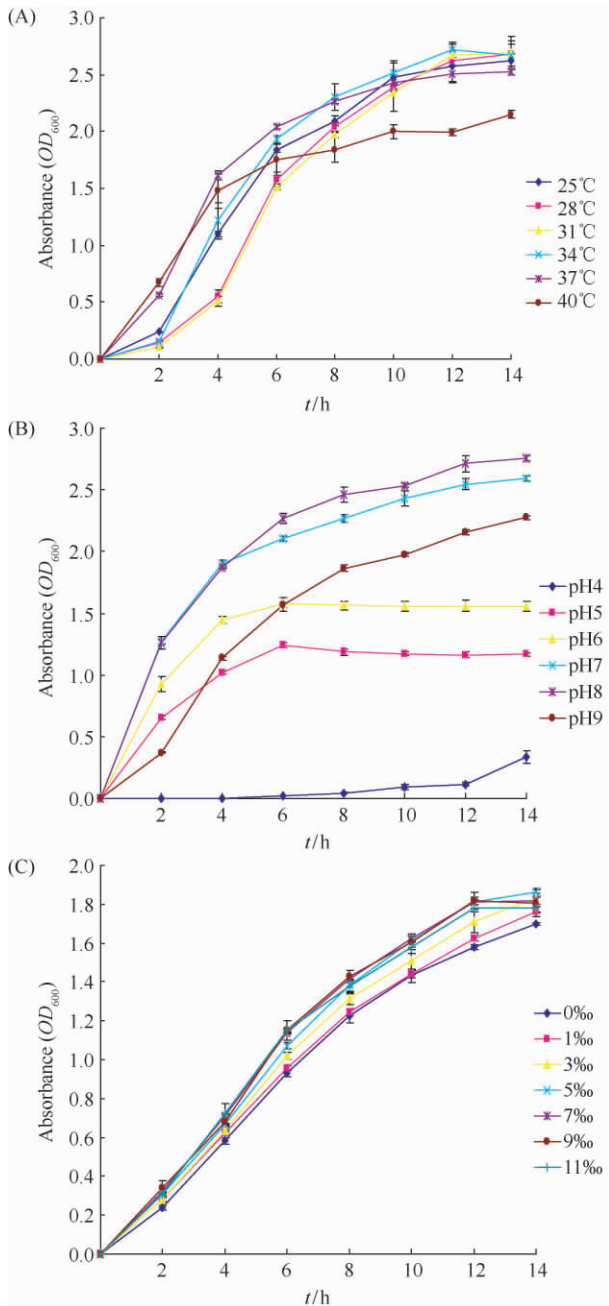


图 3. 菌株 PYS1 在不同培养温度 (A)、不同 pH (B) 和不同盐度 (C) 条件下的生长曲线

Figure 3. The growth curves of PYS1 strain in different temperatures (A), pH (B) and salinity (C).

## 2.6 人工回归感染试验

不同浓度 PYS1 菌株人工腹腔注射感染尼罗罗非鱼后, 部分罗非鱼出现与自然发病相似症状, 表现为鱼体体色发黑、鳞片脱落、鳍条溃烂、眼球凹陷, 解剖发现腹腔有大量腹水、肝呈黄色、脾脏成暗红色、胆囊肿大 (图 4)。攻毒后 7 d 内各组罗非鱼的死亡

情况见表 2, 高浓度组 ( $1 \times 10^9$  CFU/mL) 的死亡率达到 60%, 低浓度组 ( $1 \times 10^5$  CFU/mL) 和对照组均无鱼体死亡, 用 SPSS 17.0 中回归分析方法计算得到 PYS1 菌株对实验尼罗罗非鱼的半致死浓度为  $1.425 \times 10^8$  CFU/尾。解剖发病鱼体, 重新接种细菌, 可分离到与 PYS1 菌株形态相同的细菌, 生理生化 and 分子鉴定结果为类志贺邻单胞菌。用该分离菌株进行再次感染, 尼罗罗非鱼会出现相同临床症状并死亡。

表 1. 分离菌株 PYS1 的药物敏感性实验结果

Table 1. Results of antibiotic sensitivity test of PYS1 strain

Classes of antibiotics	Antibiotics	Contents/ ( $\mu\text{g}/\text{piece}$ )	Antibiotic sensitivity
Macrolides group	Acetylspiramycin	30	R
	Midecamycin	30	R
	Roxithromycin	15	R
$\beta$ -lactam group	Ceftriaxone	30	S
	Cefaclor	30	S
	Cefazolin	30	S
	Cefoperazone	75	I
	Cephalothin	30	S
	Cefalexin	30	I
	Amoxicillin	10	R
Tetracyclines group	Oxacillin	1	R
	Penicillin	1	R
	Ampicillin	10	R
	Minocycline	30	S
Quinolone group	Tetracycline	30	R
	Doxycycline	30	S
	Norfloxacin	10	R
	Ofloxacin	5	S
	Enrofloxacin	5	R
	Nalidixic acid	30	R
	Lomefloxacin	10	R
Aminoglycosides group	Enoxacin	10	R
	Fleroxacin	5	I
	Spectinomycin	100	R
	Streptomycin	10	I
	Amikacin	30	R
	Neomycin	30	R
Glycopeptides	Tobramycin	10	R
	Gentamicin	10	R
Lincomycin	Vancomycin	30	R
	Lincolmensin	2	R

S: Sensitive; I: Intermediate; R: Resistant.



图 4. 罗非鱼腹腔注射感染 PYS1 菌株后的症状

Figure 4. The symptom of tilapia peritoneal injected with PYS1 strain. A and B represent the symptom of diseased fish. A: Scales shed, fin rot (as shown by arrow); B: Enophthalmos, yellow liver, dark red spleen, enlarged gallbladder and ascitic fluid in the abdominal cavity (as shown by arrow). C and D indicate the characterization of healthy fish.

表 2. 罗非鱼腹腔注射感染 PYS1 菌株后的死亡情况

Table 2. The cumulative mortality rate of tilapia intraperitoneally injected with PYS1 strain

<i>c</i> (bacterium) / (CFU/mL)	Number of fish ( <i>n</i> )	The time (d) and deaths ( <i>n</i> ) after infection								Number of death ( <i>n</i> )	Mortality rate/%
		1	2	3	4	5	6	7			
$1 \times 10^9$	15	3	5	0	0	0	0	1	9	60.0	
$1 \times 10^8$	15	0	4	1	0	1	1	0	7	46.7	
$1 \times 10^7$	15	0	3	1	0	0	0	0	4	26.7	
$1 \times 10^6$	15	1	0	0	0	0	0	0	1	7.7	
$1 \times 10^5$	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Median lethal dose (CFU /fish)										$1.425 \times 10^8$	

## 2.7 组织病理学

PYS1 菌株感染尼罗罗非鱼后,对尼罗罗非鱼的损伤主要表现在肠、肝、脾、肾和心脏组织。石蜡切片结果表明,发病鱼肠组织中肠绒毛膜上皮细胞脱落,局部淋巴细胞浸润,粘膜上皮中杯状细胞肿胀,数量增多(图 5-A);发病鱼肝组织中部分肝细胞坏

死,细胞核溶解,大量肝细胞出现空泡化(图 5-B);发病鱼脾脏组织中淋巴细胞增多,多点出血(图 5-C);发病鱼肾脏组织中肾小管管壁细胞裂解,肾小管结构被破坏(图 5-D);发病鱼心脏组织中心肌细胞体积变大,细胞核增大,染色深(图 5-E)。

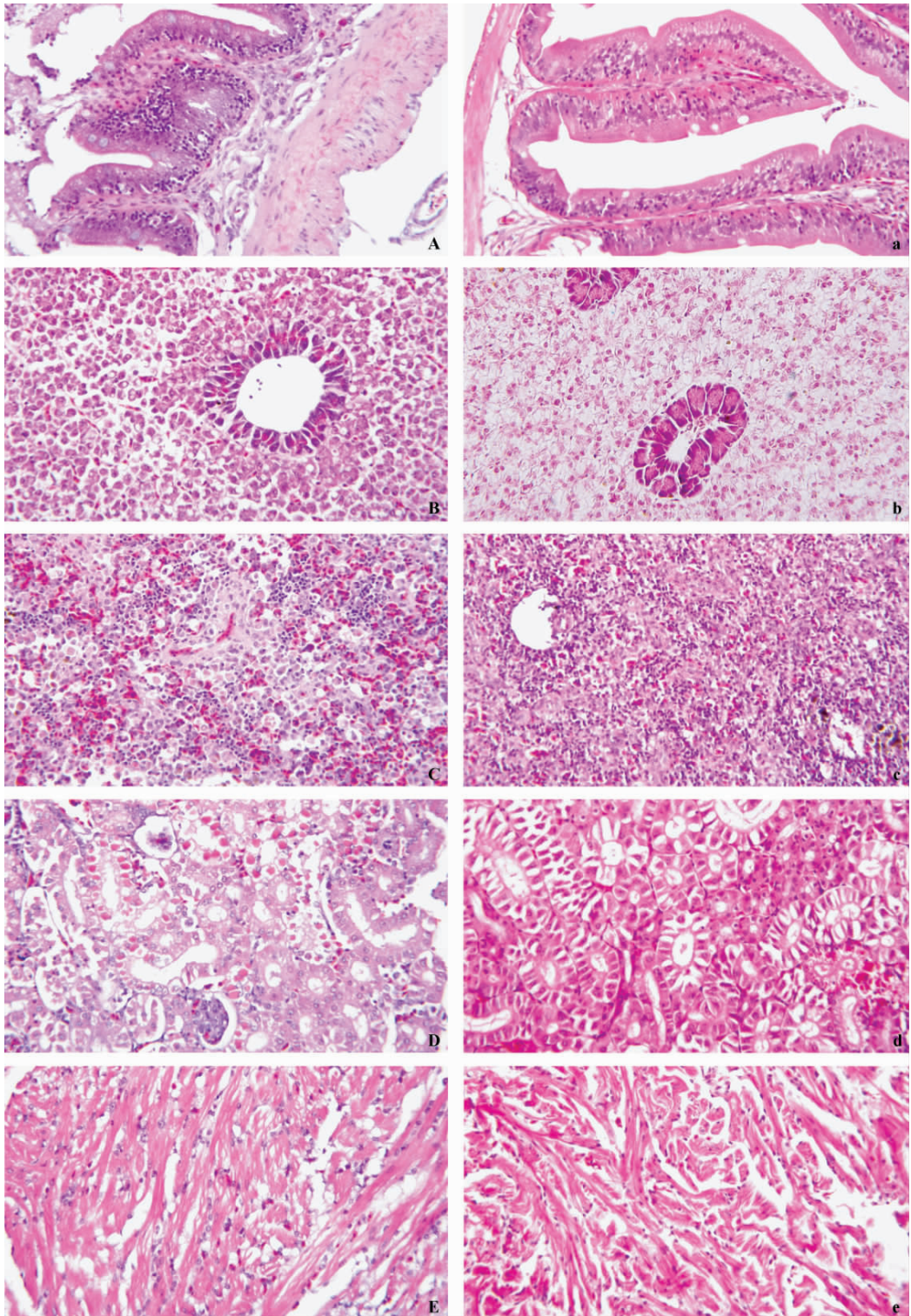


图 5. PYS1 菌株感染罗非鱼后各组织病理变化图谱

Figure 5. Pathological changes of tilapia tissues after infected with PYS1 strain. A-E: Pathological changes in different tissues of infected fish. A: Intestine of diseased fish (HE, 400 $\times$ , similarly hereinafter), intestinal villus cell fell off, partial lymphocytic infiltrates, goblet cells swelling and increased; B: Liver of diseased fish, part of liver cells death, cell nucleus cracked, vacuolation of a large number of liver cells; C: Spleen of diseased fish, lymphocytes increased, multiple points bled; D: Kidney of diseased fish, wall cells of renal tubular cracked, structure of renal tubular was damaged; E: Heart tissue of diseased fish, size of myocardial cell and it's nucleus increased, nucleus deep dyed. a-e: Normal tissues (a: intestine; b: liver; c: spleen; d: kidney; e: heart) of healthy fish.

## 3 讨论

### 3.1 菌株鉴定

本研究通过细菌形态学和 API 20E 生理生化等结果初步鉴定 PYS1 菌株为类志贺邻单胞菌 (*Plesiomonas shigelloides*)。其生理生化检测结果与异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*)<sup>[17]</sup> 中分离的类志贺邻单胞菌之间存在差异, 密二糖发酵试验结果不同, 这可能是由于不同宿主菌株差异所造成。进一步克隆测序 PYS1 菌株的 16S rRNA 基因序列, 测得序列与已报道的类志贺邻单胞菌 16S rRNA 基因序列 (GeneBank 登录号: Q359962.1; KC825322.1) 相似性高达 99%。同时, 构建的 NJ 分子系统进化树也表明, PYS1 菌株与其它类志贺邻单胞菌聚为一支, 且与从黄颡鱼肠道粘液中分离的类志贺邻单胞菌 (GeneBank 登录号: GQ359962.1) 亲缘关系最近, 因此可判定 PYS1 菌株为类志贺邻单胞菌。PYS1 菌株与肠杆菌科细菌的亲缘关系比其与弧菌科细菌的亲缘关系要近, 这与类志贺邻单胞菌现在归属于肠杆菌科、邻单胞菌属的分类位置相吻合, 而在以往的研究中曾因为该菌与宋内氏痢疾杆菌有共同抗原, 与气单胞菌关系邻近而把其归类为弧菌科、邻单胞菌属<sup>[8, 18]</sup>。

### 3.2 菌株培养特性及耐药性

研究表明, 类志贺邻单胞菌可在 8℃ - 45℃ 温度范围内生长, 但大多数菌株在 35℃ - 38℃ 温度范围内生长最佳, 它可在 pH 值为 4.0 - 9.0 条件下生长, 可耐受 20‰ - 30‰ 的盐度, 对营养要求较低<sup>[19]</sup>。本试验结果表明 PYS1 菌株的最佳生长温度为 37℃, 最适 pH 值为 8, 盐度为 5‰。这与斑点叉尾鲷中分离的类志贺邻单胞菌的培养特性类似, 其生长盐度为 0 - 25‰, pH 值为 5 - 10, 最适生长温度为 37℃<sup>[20]</sup>。该菌对温度、盐度、pH 和营养的适应范围较广, 使其在各种水体和不同季节都能存活, 且在水温较高时更容易流行。药敏实验结果表明, 该菌株对多数抗生素均呈现耐药, 仅对头孢曲松、头孢克洛和头孢唑啉等 7 种抗生素敏感。这可能是由于养殖过程中大量抗生素的不科学使用, 导致该病原菌已产生多重耐药。本文药敏试验结果与其它文献<sup>[12, 17]</sup> 报道的类志贺邻单胞菌分离菌株的耐药性存在较大差异, 这可能主要与菌株来源、亚种类别、

各地抗生素药物使用史不同等原因有关。药敏试验结果充分说明, 在该病害的防治过程中, 应该参照分离菌株的药敏试验结果, 科学合理地使用抗生素, 才能达到科学有效治疗的目的。

### 3.3 菌株致病性

PYS1 菌株人工感染尼罗罗非鱼后, 其临床症状与自然发病症状相似, 且高浓度菌液注射组 ( $1 \times 10^9$  CFU/mL) 7 d 内的死亡率达到 60%, 表明 PYS1 菌株为致病菌, 可单独引起尼罗罗非鱼发病。类志贺邻单胞菌是水生环境中广泛传播的新兴病原, 温带和热带地区的淡水生态环境 (例如, 湖泊、河流和水体表层) 和河海口是其主要栖息地, 在寒带气候的淡水中也有报道<sup>[21 - 22]</sup>。类志贺邻单胞菌在水体中呈单细胞生存, 可侵染部分水生动物, 如鱼类、蟹、虾、贻贝和牡蛎等<sup>[23 - 24]</sup>。国外较早就有非致病性罗非鱼源类志贺邻单胞菌分离的报道<sup>[25 - 26]</sup>, 但近年来国内有多例类志贺邻单胞菌感染养殖鱼类的报道, 如暗纹东方鲀、草鱼、黄颡鱼、鲟鱼及鲫鱼等, 导致鱼类发病死亡, 且发病期多集中于水温较高的季节<sup>[13 - 17]</sup>。本文是首次报道类志贺邻单胞菌可感染尼罗罗非鱼并引起患病, 从其较高的半致死量 ( $1.425 \times 10^8$  CFU/尾) 可推测, 目前其对罗非鱼的致病力并不强, 但其潜在危险性仍不容忽视。

关于致病性类志贺邻单胞菌感染鱼体后组织病理变化的研究报道较少。王小亮等<sup>[16]</sup> 发现杂交鲟人工感染致病性类志贺邻单胞菌后, 可引起肝、肾和脾组织病变, 肝细胞肿胀, 胞浆内充满空泡, 脾脏充血, 脾实质细胞坏死, 肾小管上皮细胞坏死, 肾小球细胞核浓缩, 出现空泡。本试验中组织病理变化观察结果表明, 致病性类志贺邻单胞菌 (PYS1 菌株) 对尼罗罗非鱼的损伤主要表现在肠、肝、脾、肾和心脏组织, 肠绒毛膜上皮细胞脱落, 局部淋巴细胞浸润, 粘膜上皮中杯状细胞肿胀, 数量增多; 肝组织中部分肝细胞死亡, 细胞核裂解, 大量肝细胞出现空泡化, 脾脏中淋巴细胞增多, 多点出血, 肾小管管壁细胞裂解, 肾小管结构被破坏, 心肌细胞增大等。本试验结果与鲟鱼中的组织病理变化相类似, 但也有不同之处, 这可能是由于鱼种及菌株差异所造成。研究表明, 类志贺邻单胞菌能够产生热稳定性和热不稳定性两种肠毒素、类霍乱毒素、溶血素和细胞毒素, 还能产生细胞粘附和侵袭相关的致病因子, 它可入侵结肠腺癌细胞 (Caco-2) 导致该细胞凋



亡<sup>[27-28]</sup>。由此推测类志贺邻单胞菌主要通过分泌外毒素及细菌被裂解后释放内毒素对鱼体造成损伤。

致病性类志贺邻单胞菌对水产动物的危害日益严重,且有研究表明它可能是一种潜在的人畜共患病原<sup>[29]</sup>。这警示我们需要密切关注该病原菌在鱼类中的流行病学传播途径,并对该病原的分子分型、致病机理和防控方法进行深入研究。

## 参考文献

- [1] Di G. Discussion of the development of tilapia industrialization in china. *Chinese Fisheries Economics*, 2002, (4): 17-18. (in Chinese)  
邸刚. 关于我国罗非鱼产业化发展的探讨. 中国渔业经济, 2002, (4): 17-18.
- [2] He Y, Zhang H, Gong Y, Yuan Y. The varieties and development analysis of chinese tilapia aquaculture. *Journal of Aquaculture*, 2009, 30 (2): 12-14. (in Chinese)  
贺艳辉, 张红燕, 龚赟翀, 袁永明. 我国罗非鱼养殖品种及养殖发展分析. 水产养殖, 2009, 30 (2): 12-14.
- [3] Dai Y, Yuan Y, Zhang H, He Y. Analysis on export trade outlook of tilapia in china in 2012. *Chinese Fisheries Economics*, 2013, 31 (2): 170-176. (in Chinese)  
代云云, 袁永明, 张红燕, 贺艳辉. 2012年中国罗非鱼产品出口贸易分析及展望. 中国渔业经济, 2013, 31 (2): 170-176.
- [4] 杨弘, 卢迈新. 罗非鱼安全生产技术指南. 北京: 中国农业出版社, 2012: 195-206.
- [5] Li J, Ye X, Lu M, Deng G, Chi Y, Huang Z. Isolation and Identification of *Aeromonas veronii* from infected tilapia fry and analysis of its drug sensitivity. *Journal of Hydroecology*, 2011, 32 (3): 132-136. (in Chinese)  
黎炯, 叶星, 卢迈新, 邓国成, 迟妍妍, 黄樟翰. 罗非鱼维氏气单胞菌的分离和药敏试验. 水生生态学杂志, 2011, 32 (3): 132-136.
- [6] Ke X, Lu M, LI J, Ye X, Gao F, Zhu H, Huang Z. Studies on identification and pathogenicity of *Aerococcus viridans* isolated from tilapia. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35 (5): 796-802. (in Chinese)  
可小丽, 卢迈新, 黎炯, 叶星, 高风英, 朱华平, 黄樟翰. 罗非鱼绿色气球菌的鉴定及致病性研究. 水生生物学报, 2011, 35 (5): 796-802.
- [7] Wang Z, Huang H. Isolation, identification and histopathologic observation of a pathogen from hemorrhage tilapia. *Journal of Huaqiao University (Natural Science)*, 2012, 33 (6): 660-666. (in Chinese)  
王忠敏, 黄惠莉. 一株罗非鱼出血病致病菌的分离鉴定及组织病理观察. 华侨大学学报 (自然科学版), 2012, 33 (6): 660-666.
- [8] Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol. 2)*. New York: Springer, 2005: 740-744.
- [9] Ueda Y, Suzuki N, Furukawa T, Takegaki Y, Takahashi N, Miyagi K, Noda K, Hirose H, Hashimoto S, Miyamoto H, Yano S, Miyata Y, Taguchi M, Ishibashi M, Honda T. Bacteriological studies of traveller's diarrhoea (6). Analysis of enteropathogenic bacteria at kansai airport quarantine station from September 4th, 1994 through December 1996. *Kansenshogaku Zasshi*, 1999, 73 (2): 110-121.
- [10] Shah N, DuPont HL, Ramsey DJ. Global etiology of travelers' diarrhea: systematic review from 1973 to the present. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2009, 80 (4): 609-614.
- [11] Schneider F, Lang N, Reibke R, Michaely HJ, Hiddemann W, Ostermann H. *Plesiomonas shigelloides* pneumonia. *Medecine et Maladies Infectieuses*, 2009, 39 (6): 397-400.
- [12] Wu H, Xue J. Pathogens of haemorrhagic intestinal necrosis in soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis*) and their drug sensitivity. *Chinese Journal of Veterinary*, 2004, 24 (4): 18-21. (in Chinese)  
吴惠仙, 薛俊增. 中华鳖出血性肠道坏死症病原及其药敏性. 中国兽医学报, 2004, 24 (4): 18-21.
- [13] Yang Y, Chen H, Fang P, Duan J. Separation and identification of pathogenic bacteria of *Fugu obscurus* cultured in factory. *Journal of Zhanjiang Ocean University*, 2005, 25 (4): 1-3. (in Chinese)  
杨鸾劫, 陈辉, 方苹, 段金荣. 工厂化养殖暗纹东方鲀致病菌的分离和鉴定. 湛江海洋大学学报, 2005, 25 (4): 1-3.
- [14] Hu Q, Lin Q, Shi C, Fu X, Li L, Liu L, Wu S. Isolation and identification of a pathogenic *Plesiomonas shigelloides* from diseased grass carp. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54 (2): 229-235. (in Chinese)  
胡钱东, 林强, 石存斌, 付小哲, 李宁求, 刘礼辉, 吴淑琴. 草鱼致病性类志贺邻单胞菌的分离与鉴定. 微生物学报, 2014, 54 (2): 229-235.
- [15] Zuo Y, Yi Y, Xia J, Luo F, Yang J, Feng D, Wu S.

- Separation and identification of two strains of *Plesiomonas shigelloides* isolated from *Pelteobagrus fulvidraco*. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2013, 41 (9): 199-201. (in Chinese)
- 左跃, 易弋, 夏杰, 罗福广, 杨军, 冯丹, 伍时华. 2株黄颡鱼源类志贺邻单胞菌的分离与鉴定. *江苏农业科学*, 2013, 41 (9): 199-201.
- [16] Wang X, Xu L, Cao H, Wang J, Wang S. Identification and drug sensitivity of a *Plesiomonas shigelloides* isolated from diseased sturgeons. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53 (7): 723-729. (in Chinese)
- 王小亮, 徐立蒲, 曹欢, 王静波, 王姝. 鲟致病性类志贺邻单胞菌的鉴定及药物敏感性. *微生物学报*, 2013, 53 (7): 723-729.
- [17] Lu W, Yang J, Chen H, Gu W, Yang Y. Identification of *Plesiomonas shigelloides* from hybridized prussian carp (*Carassius auratus gibelio* ♀ × *Cyprinus carpio* ♂). *Freshwater Fisheries*, 2009, 39 (2): 48-52. (in Chinese)
- 陆文浩, 杨家新, 陈辉, 顾伟, 杨鸢劫. 异育银鲫类志贺邻单胞菌的鉴定. *淡水渔业*, 2009, 39 (2): 48-52.
- [18] Meng S, Wang Y, Bai X, Ji S, Li A, Ye C. Novel real-time TaqMan PCR assay for detection of *Plesiomonas shigelloides*. *Disease Surveillance*, 2011, 26 (11): 906-910. (in Chinese)
- 孟双, 王艳, 白雪梅, 纪少博, 李爱华, 叶长芸. 类志贺邻单胞菌实时荧光 TaqMan PCR 快速检测体系的建立. *疾病检测*, 2011, 26 (11): 906-910.
- [19] Miller ML, Koburger JA. Tolerance of *Plesiomonas shigelloides* to pH, sodium chloride and temperature. *Journal of Food Protection*, 1986, 49: 877-879.
- [20] Chen L, Tan A, Zhou W. Identification and characteristics of a pathogenic bacterial strain from channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2009, 24 (3): 200-205. (in Chinese)
- 陈林, 谭爱萍, 邹为民. 斑点叉尾鲷致病菌株的鉴定及特性. *大连水产学院学报*, 2009, 24 (3): 200-205.
- [21] Miller WA, Miller MA, Gardner IA, Atwill ER, Byrne B. A, Jang S, Harris M, Ames J, Jessup D, Paradise D, Worcester K, Melli A, Conrad PA. *Salmonella* spp., *Vibrio* spp., *Clostridium perfringens* and *Plesiomonas shigelloides* in marine and freshwater invertebrates from coastal California ecosystems. *Microbial Ecology*, 2006, 52: 198-206.
- [22] Herrera FC, Santos JA, Otero A, García-López ML. Occurrence of *Plesiomonas shigelloides* in displayed portions of saltwater fish determined by a PCR assay based on the *hugA* gene. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 108 (2): 233-238.
- [23] Huber I, Spanggaard B, Appel KF, Rossen L, Nielsen T, Gram L. Phlogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 96 (1): 117-132.
- [24] Oxley AP, Shipton W, Owens L, McKay D. Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 93 (2): 214-223.
- [25] Mendoza C, Hernández P. Incidence of *Plesiomonas shigelloides* in tilapia tetrahíbridos (*Oreochromis* sp.). *Archivos Latinoamericanos Nutricion*, 1999, 49 (1): 67-71.
- [26] Donkeng NN, Maiwore J, Ngoune LT, Montet D, Mbofung CMF. Characterization of the bacterial flora of tilapia (*Oreochromis niloticus*) harvested from four lakes in the north of cameroon. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10 (71): 16016-16023.
- [27] Levin RE. *Plesiomonas shigelloides*-an aquatic food borne pathogen: a review of its characteristics, pathogenicity, ecology, and molecular detection. *Food Biotechnology*, 2008, 22 (2): 189-202.
- [28] Tsugawa H, Ono T, Murakami H, Okawa Y. Invasive phenotype and apoptosis induction of *Plesiomonas shigelloides* P-1 strain to Caco-2 cells. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 99 (6): 1435-1443.
- [29] González-Rey C, Siitonen A, Pavlova A, Ciznar I, Svenson SB, Krovacek K. Molecular evidence of *Plesiomonas shigelloides* as a possible zoonotic agent. *Folia Microbiologica*, 2011, 56 (2): 178-184.

# Identification and pathological observation of a pathogenic *Plesiomonas shigelloides* strain isolated from cultured tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Zhigang Liu, Xiaoli Ke, Maixin Lu<sup>\*</sup>, Fengying Gao, Jianmeng Cao, Huaping Zhu, Miao Wang

Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Science, Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510380, Guangdong Province, China

**Abstract:** [Objective] A mass mortality of tilapia broke out in an aquaculture farm in Panyu, Guangdong Province in May, 2013. Affected fish showed blackening of body color, haemorrhaging on surface, scales shedding, fin rotting, and the presence of yellow liver, dark red spleen, enlarged gallbladder and ascitic fluid in the abdominal cavity. The purpose of this research was isolating and identifying the pathogen. [Methods] We isolated a suspicious bacteria strain PYS1 from diseased fish with significant pathological signs. The homology of 16S rRNA gene sequence of strain PYS1 and its morphological, cultural, and physical and chemical characteristics were studied for its identification. Its pathogenicity was investigated by recursive infection experiment and histopathological study. Its effective medicines was screened by antibiotic sensitive test. [Results] The results showed that strain PYS1 was *Plesiomonas shigelloides* clustered with *P. shigelloides* strains isolated from other fishes in the molecular phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences. Strain PYS1 was multiple drug resistant and only sensitive to a small part of 31 tested antibiotics (e. g., ceftriaxone, cefaclor, cefazolin, etc.). The symptoms of tilapia (*O. niloticus*) artificially infected with strain PYS1 were similar with natural infected fish. The half lethal dose (LD<sub>50</sub>) of strain PYS1 to tilapia was  $1.425 \times 10^8$  CFU per fish. Paraffin sections showed intestine, liver, spleen, kidney and heart tissue injury caused by the strain. [Conclusion] Our study demonstrated that *P. shigelloides* was the pathogen of cultured tilapia in the aquaculture farm and first reported its bacterial pathogenicity on Nile tilapia.

**Keywords:** *Oreochromis niloticus*, *Plesiomonas shigelloides*, pathogenicity, histopathologic changes

(本文责编:王晋芳)

Supported by the China Agriculture Research System (CARS-49) and by the Guangzhou Plan Projects of Science and Technology (2013J4100078, 201300000064)

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel: +86-20-81617843; E-mail: mx-lu@163.com

Received: 3 April 2014/ Revised: 29 May 2014