

文章编号: 1674 - 5566(2011)03 - 0405 - 07

黄鳝藤黄微球菌的分离鉴定及药敏试验

彭彬^{1,2}, 杨光友², 陈晓利^{1,2}, 占爱思², 何明莉¹

(1. 四川农业大学 动物科技学院水产养殖学系, 四川 雅安 625014; 2. 四川农业大学 动物医学院预防兽医学系, 四川 雅安 625014)

摘要: 为探讨黄鳝(*Monopterus albus*)出血病病原菌的种类及耐药情况, 采用动物回归和细菌常规分类鉴定方法及16S rDNA基因系统发育学分析等手段, 从四川名山地区黄鳝出血病病料中分离到具有致病性的菌株(HM₁), 经人工感染实验证实该菌为黄鳝出血病的病原菌。动物致病性试验显示, 该分离株对泥鳅和小白鼠不致病, 对云斑鲶有较弱的致病力。对该分离株的形态和生化指标进行分析, 试验结果与报道的藤黄微球菌一致, 为革兰氏阳性、球菌, 无运动力, 多成双、四联或簇状排列, 不形成链状排列, 不形成芽孢; 接触酶和明胶液化阳性; 乳糖、甘露醇、葡萄糖、七叶苷、硝酸盐还原、精氨酸双水解阴性等特征。采用细菌16S rDNA基因通用引物对该菌的16S rDNA基因进行PCR扩增、克隆测序, 得到1条长度为1 382 bp的核苷酸序列(GenBank登录号为: HM044913)。该序列经RDP(Ribosomal Database Project)数据库在线Classifier分析, 结果表明该菌株属于微球菌属细菌。以该菌16S rDNA序列和GenBank数据库内同源性较高的细菌16S rDNA序列进行同源性比对分析和构建系统发育树, 结果显示分离菌(HM₁)与微球菌属的藤黄微球菌菌株的同源性高达99%, 且在系统发育树上与其他不同来源的藤黄微球菌聚为一支。结合形态及生化特点将其确定为藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)。24种药物的药敏试验结果显示, 该分离株对诺氟沙星、头孢唑啉、羧苄西林等18种药物敏感; 对复达欣中度敏感; 但对萘啶酸、加替沙星、磺胺异恶唑等5种药物耐药。

研究亮点: 采用常规的细菌分离鉴定方法并结合16S rDNA基因系统发育学分析, 首次从患出血病的黄鳝体内分离得到了藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)致病菌株, 也是在水生动物体内首次分离获得了藤黄微球菌致病菌株, 并完成了其对24种药物的敏感性试验, 结果显示该致病菌株对诺氟沙星、头孢唑啉、羧苄西林等18种药物敏感, 对萘啶酸、加替沙星、磺胺异恶唑等5种药物耐药, 研究结果为黄鳝出血病防治提供了重要参考资料。

关键词: 黄鳝; 出血病; 藤黄微球菌

中图分类号: S 941.4

文献标志码: A

黄鳝出血病俗称“赤斑病”、“打印病”, 是导致养殖黄鳝死亡的主要细菌性病害之一。目前有关黄鳝出血病病原的研究报道不多, 陈怀青和陆承平^[1]和沈锦玉等^[2]分别报道了江苏地区和浙江地区的黄鳝出血病病原菌为嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)。马有智和舒妙安^[3]报道认为杭州地区黄鳝出血病病原菌为产碱假单胞菌(*Pseudomonas alcaligenes*)。徐海圣和舒妙安^[4]报道了杭州某水产养殖场的黄鳝出血病

病原菌为温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)。

四川为我国黄鳝的主产区之一, 黄鳝出血病的频频暴发给黄鳝养殖业造成了巨大的经济损失, 严重制约了四川地区黄鳝养殖业的发展。2008年, 我们在四川名山地区的黄鳝出血病病料中分离鉴定出了1株藤黄微球菌, 经研究确定该菌株为引起黄鳝出血病的病原菌之一, 现将研究结果报道如下。

收稿日期: 2010-10-13

修回日期: 2010-11-20

基金项目: 教育部《长江学者和创新团队发展计划》创新团队项目(IRT0848)

作者简介: 彭彬(1983—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物疾病学。E-mail: pengb1520@163.com

通讯作者: 杨光友, E-mail: guangyou1963@yahoo.com.cn

1 材料与amp;方法

1.1 菌株分离

采集到来自四川省名山(HM)地区的患出血病的黄鳝,病鳝体长13.0~57.5 cm,体重2.9~154.5 g。选取自然发病的出血病症状典型的濒死病鳝,无菌操作取其肝脏接种普通营养琼脂平板。28℃培养24 h后随机挑取形态和颜色各不相同的单菌落作纯化培养。细菌分离纯化方法参照文献[5-6]中的方法进行,纯化菌株于4℃保存备用。

1.2 分离株的理化特性鉴定

按照《常见细菌系统鉴定手册》^[5]和《伯杰细菌鉴定手册》^[7]中的方法进行细菌学鉴定。细菌微量生化反应管购自杭州微生物试剂有限公司。藤黄微球菌标准株购自中国农业微生物菌种保藏管理中心(菌株保藏编号:ACCC 41016)。

1.3 动物回归试验

健康黄鳝购自四川简阳某黄鳝养殖场,规格为25~35 g/尾,室内暂养1周后分批次进行人工感染试验。各分离株分别接种于普通肉汤,28℃恒温培养16 h后,调节菌悬液细菌浓度为 3.3×10^6 CFU/mL、 3.3×10^7 CFU/mL、 3.3×10^8 CFU/mL 3个浓度备用。实验组黄鳝按0.1 mL/尾剂量腹腔注射菌悬液;对照组黄鳝按0.1 mL/尾剂量腹腔注射无菌肉汤。试验期间水温为24~26℃,连续观察记录7 d,对发病黄鳝无菌操作取其肝脏进行病原菌的分离鉴定。

1.4 动物致病性试验

1.4.1 泥鳅致病性试验

健康泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)购自雅安市水产品市场,规格为10~15 g/尾,室内暂养1周后用于致病性试验。取黄鳝回归试验中的致病菌株进行培养,调节菌悬液细菌浓度为 3.3×10^8 CFU/mL备用,实验组泥鳅按0.1 mL/尾剂量腹腔注射;对照组泥鳅按0.1 mL/尾剂量腹腔注射无菌肉汤。试验期间水温为24~26℃,连续观察记录7 d,致病性试验结果观察与分析同上。

1.4.2 云斑鲟致病性试验

健康云斑鲟(*Ictalurus nebulosus*)购自雅安市水产品市场,规格为40~45 g/尾,室内暂养1周后用于致病性试验。取黄鳝回归试验中的致病

菌株进行培养,调节菌悬液细菌浓度为 3.3×10^8 CFU/mL备用,按0.1 mL/尾剂量腹腔注射;对照组云斑鲟按0.1 mL/尾剂量腹腔注射无菌肉汤。试验期间水温为24~26℃,连续观察记录7 d,致病性试验结果观察与分析同上。

1.4.3 小白鼠病性试验

健康小鼠来自四川农业大学动物寄生虫病学实验室。取黄鳝回归试验中的致病菌株进行培养,调节菌悬液细菌浓度为 3.3×10^8 CFU/mL备用,按0.2 mL/只剂量腹腔注射;对照组小白鼠按0.2 mL/只剂量腹腔注射无菌肉汤。连续观察记录7 d,致病性试验结果观察与分析同上。

1.5 致病菌株的鉴定

对动物回归试验中表现出与黄鳝出血病自然发病有相似症状的病鳝及时进行病变检测,无菌操作取其肝脏进行病原菌的分离纯化。对分离得到的纯化菌株按前述的方法进行形态学和理化特性鉴定。以动物回归发病黄鳝体内是否分离到原感染菌来判定供试菌株是否为黄鳝出血病的病原菌。对确定为黄鳝出血病病原菌的菌株,在理化特征鉴定的基础上再进行16S rDNA基因水平的辅助鉴定。

1.6 致病菌株16S rDNA基因鉴定

1.6.1 菌株总DNA的制备

菌株总DNA提取采用煮沸法,参照何智^[8]的方法调整后进行。取28℃恒温培养16 h后的菌悬液1 mL 12 000 r/min离心2 min,弃上清,加超纯水100 μL重悬,100℃煮沸10 min,冰浴5 min,12 000 r/min离心2 min,取上清分装即为菌株总DNA,-20℃保存备用。

1.6.2 16S rDNA序列扩增与测序

以菌株总DNA为PCR扩增模板,引物为细菌16S rDNA基因通用引物,引物序列为F5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和R5'-TACGGCTACTTGTACGAC-3'。25 μL反应体系中含有:DNA模板1.5 μL,上游引物1.0 μL,下游引物1.0 μL,2×Taq PCR Mastermix 12.5 μL,无菌蒸馏水9.0 μL。PCR反应条件为:94℃预变性5 min,94℃变性30 s,50℃复性30 s,72℃延伸1 min,30个循环,72℃延伸10 min。PCR产物经1%的琼脂糖凝胶电泳后观察结果。取目的条带胶回收产物送上海英骏生物技术公司测序。

1.6.3 序列分析及系统发育树构建

将测序所得菌株 16S rDNA 序列,于 RDP (Ribosomal Database Project) 数据库进行在线 Classifier 分析,分析菌株的种属归类。再将菌株序列于 GenBank 数据库进行 Blast 分析,选取相似性 $\geq 99\%$ 的细菌 16S rDNA 基因序列,利用 Clustal X(1.83) 软件与 Mega 3.0 软件进行序列比对和构建系统发育树。

1.7 药物敏感性试验

试验采用圆纸片琼脂扩散法进行。调节菌悬液细菌浓度为 3.3×10^8 CFU/mL 备用,操作方法及结果判定参照文献[6,9]进行。药敏纸片购

自杭州微生物试剂有限公司。

2 结果

2.1 分离菌株的动物回归和致病性试验

经动物回归试验研究发现,来自名山地区的患出血病黄鳝肝脏中分离到的 1 株革兰氏阳性球菌 (HM₁) 致病菌株为黄鳝出血病病原菌之一。当菌悬液细菌浓度升高至 3.3×10^8 CFU/mL 时,实验组黄鳝腹腔注射 HM₁ 菌株悬液后 72 h 内全部死亡,病鳝表现出与自然发病出血病相似之症状,对照组黄鳝眼观无异常变化,结果见表 1。

表 1 黄鳝动物回归试验结果
Tab.1 Results of artificial infection test to *Monopterus albus*

菌株	细菌浓度/ (CFU/mL)	试验尾数	注射量 /mL	死亡尾数						死亡率 /%
				12h	24h	36h	48h	60h	72h	
HM ₁	3.3×10^6	10	0.1	0	0	1	0	0	0	6.67 ± 5.774
		10	0.1	0	1	0	0	0	0	
		10	0.1	0	0	0	0	0	0	
	3.3×10^7	10	0.1	0	2	1	1	1	0	43.33 ± 5.774
		10	0.1	0	3	0	1	0	0	
		10	0.1	0	2	1	0	1	0	
	3.3×10^8	10	0.1	1	4	2	2	1	0	100
		10	0.1	0	5	3	2	0	0	
		10	0.1	0	4	4	1	1	0	
对照组	无菌肉汤	10	0.1	0	0	0	0	0	0	

取 HM₁ 菌株对泥鳅、小白鼠和云斑鲶进行动物致病性试验。分离菌株对泥鳅、小白鼠和云斑鲶的致病性试验结果(表 2)。从表可以看出,分离菌株对泥鳅和小白鼠均不致病,对云斑鲶具有

致病性;云斑鲶于腹腔注射 HM₁ 菌株菌悬液 30h 后,体表开始出现轻微溃疡症状,并于 96 h 后出现死亡病例。

表 2 HM₁ 菌株动物致病性试验结果
Tab.2 Results of artificial infection test to HM₁ strain

动物	细菌浓度/ (CFU/mL)	动物数	注射量 /mL	死亡尾数					死亡率 /%
				24h	48h	96h	120h	168h	
泥鳅	3.3×10^8	10	0.1	0	0	0	0	0	0
		10	0.1	0	0	0	0	0	
		10	0.1	0	0	0	0	0	
对照组	无菌肉汤	10	0.1	0	0	0	0	0	0
小白鼠	3.3×10^8	5	0.2	0	0	0	0	0	0
		5	0.2	0	0	0	0	0	
		5	0.2	0	0	0	0	0	
对照组	无菌肉汤	5	0.2	0	0	0	0	0	0
云斑鲶	3.3×10^8	10	0.1	0	0	1	0	0	13.33 ± 5.774
		10	0.1	0	0	1	1	0	
		10	0.1	0	0	0	1	0	
对照组	无菌肉汤	10	0.1	0	0	0	0	0	0

2.2 菌株的形态及生理生化特性测定

经鉴定 HM₁ 菌株为革兰阳性球菌,无运动能力,细胞球形,直径约 0.5 ~ 2.0 μm 大小,多成双、四联或簇状排列,不形成链状排列,不形成芽孢。营养琼脂平板 28 °C 培养 18 ~ 24 h 可见圆形、突起、表面光滑、边缘整齐、不透明、乳黄色菌落、含盐量 1% 以下培养基都能生长。生理生化试验结

果表明:HM₁ 分离株与藤黄微球菌标准菌株在接触酶、乳糖、甘露醇、葡萄糖、明胶、七叶苷、硝酸盐还原、精氨酸双水解等生理生化特征方面表现出了相一致的特点,仅氧化酶,甘露糖等少数理化特征存在差异(表 3)。因此,在常规鉴定的基础上我们对 HM₁ 分离株进行 16S rDNA 基因水平的辅助鉴定。

表 3 HM₁ 分离株与藤黄微球菌标准株生理生化特性的比较
Tab.3 The results of physiological and biochemical characteristics compared to the type strain of *Micrococcus luteus*

鉴定项目	HM ₁	<i>M. luteus</i>	鉴定项目	HM ₁	<i>M. luteus</i>
菌落颜色	黄色	黄色	乳糖	-	-
37°C 生长	+	+	甘露醇	-	-
运动性	-	-	明胶	+	+
接触酶	+	+	七叶苷	-	-
氧化酶	-	+	硝酸盐还原	-	-
甘露糖	+	-	精氨酸双水解	-	-
葡萄糖	-	-			

注: + 为阳性; - 为阴性;理化特性参照《常见细菌系统鉴定手册》^[5]。

2.3 16S rDNA 基因分析

HM₁ 菌株经细菌 16S rDNA 基因通用引物扩增出大小约为 1 500 bp 的目的片段(图 1)。测序结果显示该扩增片段长度为 1 382 bp (GenBank 登录号为: HM044913)。将该序列在 RDP 数据库进行在线 Classifier 分析,结果表明该菌株属于微球菌属细菌。再将分离菌株的 16S rDNA 序列通过 Genbank 中已报道的 16S rDNA 序列进行 Blast 同源性分析,结果表明该菌株与藤黄微球菌 16S rDNA 序列同源性高达 99%。同时,选取不同来源的藤黄微球菌 16S rDNA 序列进行多序列比对和系统发育树构建(图 3)。结合分离株的形态学和理化特征及 16S rDNA 基因分析结果将 HM₁ 菌株鉴定为藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)。

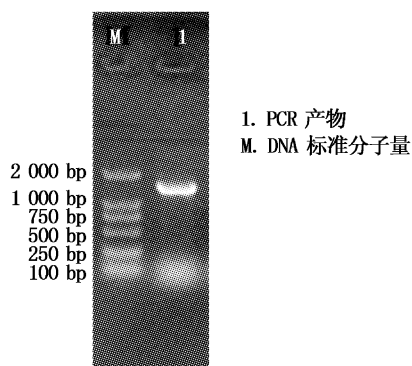


图 1 分离菌株的 16S rDNA PCR 产物电泳图

Fig.1 The electrophoresis of 16S rDNA PCR amplification of isolated strain

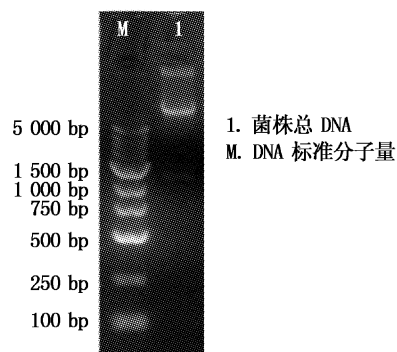


图 2 分离菌株总 DNA 电泳图

Fig.2 The electrophoresis of genomic DNA of isolated strain

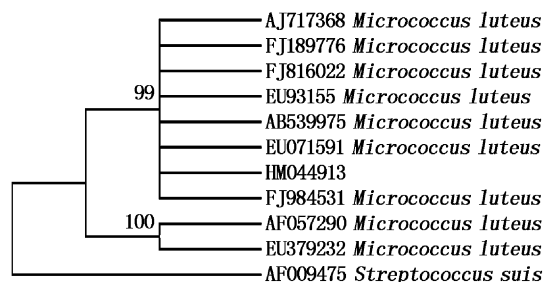


图 3 分离菌株(GenBank 编号 HM044913)及其他不同地区不同来源的菌株 16S rDNA 基因序列聚类图

Fig.3 The NJ trees of the isolated strain (GenBank accession number HM044913) and the others strain 16S rDNA sequences

AJ717368 至 AF009475 为菌株在 NCBI 的登录号

2.4 药物敏感性试验

24 种药物的药敏试验结果表明:HM₁ 菌株对

诺氟沙星等 18 种药物敏感;对复达欣中度敏感;对萘啶酸等 5 种药物耐药,具体结果见表 4。

表 4 藤黄微球菌分离株药敏试验结果
Tab.4 The results of antibiotic sensitivity test

药物名称	敏感性	药物名称	敏感性	药物名称	敏感性
萘啶酸	R	头孢噻肟	S	呋喃妥因	R
诺氟沙星	S	羧苄西林	S	拉氧头孢钠	R
环丙沙星	S	氨苄西林	S	亚胺硫霉素	S
加替沙星	R	阿米卡星	S	多粘菌素 B	S
磺胺异恶唑	R	奈替米星	S	阿奇霉素	S
头孢唑啉	S	四环素	S	壮观霉素	S
头孢呋新	S	多西环素	S	乙酰螺旋霉素	S
头孢西丁	S	磷霉素	S	复达欣	I

注:R 为耐药;I 为中度敏感;S 为敏感。

3 讨论

藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) 为微球菌属 (*Micrococcus*) 细菌,微球菌属细菌是一类氧化酶、触酶阳性,专性需氧的革兰氏阳性球菌,一般出现于土壤和脊椎动物皮肤中,也见于肉类、乳制品、土壤、淡水及空气环境中,多数不致病,少数菌株为条件致病菌^[5,10]。有关微球菌属细菌在水生动物上致病的报道不多。郭青等^[11]报道微球菌属的变异微球菌 (*Micrococcus varians*) 为牙鲆出血病的病原菌,患出血病的牙鲆主要表现为体表弥散性出血,上下颌、鳍条基部出血发红,剖解可见病鱼肝脏有不规则出血点。

FLEMING^[12]首次从感冒病人鼻液中分离获得藤黄微球菌, FOSSE 等^[13], PECES 等^[14]和 YANG 等^[15]报道藤黄微球菌还能引起人的脑膜炎、肺炎、败血症、脓毒性关节炎。在动物方面藤黄微球菌也有致病的报道,纪素玲和徐亚芬^[16]和索珍和王玲^[17]报道该菌曾导致西藏地区的仔猪、鸡、鹅出现腹泻、血便、食欲废绝,最后衰竭死亡的传染性疾病;其中又以幼龄动物为易感对象。喻述容和余建秋^[18]报道刚出生 3 d 的患病大熊猫幼崽口腔分泌物中分离获得了藤黄微球菌。陈宇明^[19]报道藤黄微球菌感染导致的猪败血症病例中以 2 月龄内仔猪为主要感染对象。本研究首次从黄鳝体内分离获得了藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*),动物回归试验证实该菌株为引起黄鳝出血病的病原菌。16S rDNA 基因系统发育学分析显示,该分离株与其他来源藤黄微球菌在系统发育上具有很高的同源性,属于微球菌

属的藤黄微球菌。

FLEMING^[12]发现溶菌酶的同时发现并命名了一种对溶菌酶高度敏感的黄色细菌,即藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*)。FLEMING 认为,正常状态下藤黄微球菌不致病是因为它们易被普遍存在于感染组织内、吞噬细胞中的溶菌酶破坏杀灭。TOMAS 等^[20]报道,与野生小鼠相比,藤黄微球菌对 M 型溶菌酶缺乏型小鼠的组织损害更大, M 型溶菌酶的正常表达量不足,无法有效杀灭体内的藤黄微球菌而使机体致病,这与 FLEMING 的结论相符合。

本研究通过对四川名山地区黄鳝出血病病原菌进行分离鉴定,确定了来自名山地区的 1 株藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) 菌株为引起黄鳝体表弥散性出血,肛门红肿外翻,肝脏肿大出血等症状并造成高死亡率的病原菌。动物感染试验结果显示,该分离株对泥鳅、小白鼠不致病,对云斑鲴有较弱的致病力。本研究中黄鳝源藤黄微球菌对泥鳅、小白鼠和云斑鲴表现出了不同程度的致病力,显示出了宿主差异性。推测其原因可能与不同动物的溶菌酶的类型和表达量存在差异所致。藤黄微球菌感染导致的病例中,可能与发病动物组织及分泌物中的溶菌酶因子表达量不足,不能有效控制藤黄微球菌菌群数量而发病。

藤黄微球菌作为致病菌致病的病例报道相对少见,人们很少注意它的抗药性以及其抗性分子活动机理,相关的药物敏感实验方面资料也少见报道。索珍和王玲^[17]、喻述容和徐建秋^[18]、陈宇明^[19]和刘广丽^[21]报道结果显示,分离自人和

动物的藤黄微球菌分离株对青霉素类药物均已产生耐药性。其他的药物在不同的分离株之间则呈现不同程度的药物敏感性。分析原因可能与离株分离的时间,地点,宿主以及相关的用药史不同也有关系。总体上藤黄微球菌的耐药范围相对较小,提示我们在今后的用药中更要注意抗生素药物的合理规范使用,避免使其对更多的药物产生耐药性。本研究结果显示,黄鳍源藤黄微球菌分离株对诺氟沙星、环丙沙星、头孢唑啉、头孢呋新、头孢西丁、头孢噻肟、羧苄西林、氨苄西林、阿米卡星、奈替米星、四环素、多西环素、磷霉素、阿奇霉素、壮观霉素、亚胺硫霉素、多粘菌素 B、乙酰螺旋霉素等 18 种药物敏感。对萘啶酸、加替沙星、磺胺异恶唑、呋喃妥因、拉氧头孢钠等 5 种药物耐药。本研究结果为黄鳍出血病防治提供了重要参考资料。

参考文献:

- [1] 陈怀青,陆承平. 嗜水气单胞菌: 黄鳍出血性败血症的病原[J]. 中国人兽共患病杂志,1991,7(4): 21-23.
- [2] 沈锦玉,刘问,钱冬. 养殖黄鳍“出血病”病原的研究[J]. 浙江海洋学院学报: 自然科学版,2001,20(2): 120-122.
- [3] 马有智,舒妙安. 黄鳍产碱假单胞菌的分离与鉴定[J]. 淡水渔业,2000,30(5): 33-34.
- [4] 徐海圣,舒妙安. 黄鳍温和气单胞菌病原的分离鉴定及免疫应答[J]. 中国兽医学报,2003,23(3): 240-242.
- [5] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社,2001:117-118.
- [6] 姚火春. 兽医微生物生物学试验指导[M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社,2002.
- [7] KRIEG N R, HOLT J G. Bergey's manual of systematic bacteriology (volume 1) [M]. Baltimore: Williams and Wilkins,1984.
- [8] 何智. 黄鳍出血病病原菌的分离、鉴定和组织病理学观察[D]. 雅安:四川农业大学,2009.
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twentieth Informational Supplement (M45-P) [S]. Pennsylvania Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.
- [10] 何晓青. 卫生防疫细菌检验 - 兼论医学细菌分类学基础[M]. 南昌: 新华出版社,1989.
- [11] 郭青,钱鸣亮,俞开康,等. 牙鲆出血性败血症病原菌的初步研究[J]. 湛江海洋大学学报,2000,20(1): 9-14.
- [12] FLEMING A. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions[J]. Proceedings of the Royal Society of London,1922,93(4): 306-317.
- [13] FOSSE T, PELOUX Y, GRANTHIL C. Meningitis due to *Micrococcus luteus*[J]. Infection,1985,13(3): 280-281.
- [14] PECES R, GAGO E, TEJADA F. Relapsing bacteremia due to *Micrococcus luteus* in a haemodialysis patient with a Perm-Cath catheter[J]. Nephrology Dialysis Transplantation,1997,12(11): 2428-2429.
- [15] YANG S, TAMAI R, AKASHI S. Synergistic effect of muramyl dipeptide with lipopolysaccharide or lipoteichoic acid to induce inflammatory cytokines in human monocytic cells in culture[J]. Infection and Immunity,2001,69(8): 2045-2053.
- [16] 纪素玲,徐业芬. 西藏猪微球菌病的发生及其病理学研究[J]. 畜牧兽医杂志,2000,19(6): 44-45.
- [17] 索珍,王玲. 家禽微球菌病的诊治[J]. 中兽医医药杂志,2001,20(3): 41-42.
- [18] 喻述容,余建秋. 大熊猫幼仔口腔分泌物中检出聚团肠杆菌和微球菌[J]. 应用与环境生物学报,2001,7(3): 286-287.
- [19] 陈宇明. 藤黄微球菌快速检测方法的建立及 rpf 基因的表达[D]. 长沙:湖南农业大学,2007.
- [20] TOMAS G, VICTORIA G, HSIANG-I L, et al. Increased inflammation in lysozyme M-deficient mice in response to *Micrococcus luteus* and its peptidoglycan[J]. Blood,2003,101(9): 2388-2397.
- [21] 刘广丽. 幼儿患者脑脊液内检出藤黄微球菌 1 例[J]. 泰山医学院学报,2008,29(9): 708.

Isolation and identification of *Micrococcus luteus* in rice field eel (*Monopterus albus*) in Sichuan Province

PENG Bin^{1,2}, YANG Guang-you², CHEN Xiao-li^{1,2}, ZHAN Ai-si², HE Ming-li¹

(1. College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, Sichuan, China; 2. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, Sichuan, China)

Abstract: This experiment was conducted to analyse the species and drug resistance of hemorrhagic pathogens from *Monopterus albus*. One hemorrhagic disease pathogens (HM₁) of *M. albus* from Mingshan in Sichuan was isolated using bacteria classification and identification technique, and was identified according to the morphological, physiological and biological characteristics and the phylogenetic analysis. On pathogenicity test of animals, the experimental *Ictalurus nebulosus* demonstrated weak pathogenic symptom, but not any pathogenic symptom in mice and *Misgurnus anguillicaudatus*. Morphological and physiological biochemical character homophily of HM₁ strain was in accordance with *Micrococcus luteus*, which presented gram positive coccus, non-motility, arranged in couples or quadruple or clumps, non-chain-like conformation, non-sporulation; catalase-positive, gelatin liquefaction-positive, lactose-negative, mannitol-negative, glucose-negative, aesculin hydrolysis-negative, nitrate reduction-negative, arginine hydrolytic enzyme-negative and so on. The 16S rDNA gene of HM₁ was amplified by PCR using the universal primers. Then, the 16S rDNA gene was cloned and sequenced. A sequence of 1 382 base pair (bp) was obtained from HM₁ (GenBank accession number: HM044913). The analysis using online Classifier software from the Ribosomal Database Project (RDP) database showed that the strain HM₁ was classified in *Micrococcus*. The nucleotide sequences homology of 16S rDNA from HM₁ strain had 99% identity with 7 strains *M. luteus* in GenBank. Phylogenetic trees reconstructed based on genes 16S rDNA indicate that the strains of HM₁ and other *M. luteus* in GenBank are clustered in the same clade. The results suggest that the isolated strain (HM₁) was classified in *M. luteus*. Antibiotic susceptibility tests showed that the isolated strain (HM₁) was sensitive to 18 kinds of drugs including norfloxacin, cefazolin sodium and carbenicillin, etc; and was medium sensitive to ceftazidime; and insusceptible to 5 kind of drugs such as nalidixic acid, gatifloxacin and sulfafurazole, etc.

Key words: *Monopterus albus*; hemorrhagic disease; *Micrococcus luteus*