

研究报告

Research Report

非洲鲶鱼嗜麦芽窄食单胞菌与尖齿胡鲶(Burchell, 1822)鱼苗因水肿引起的死亡率的关系研究

Thangapalam Jawahar Abraham✉, Harresh Adikesavalu

西孟加拉动物和渔业科学大学渔业科学学院水生动物卫生系, 加尔各答泽加里亚-700094, 西孟加拉邦, 印度

✉ 通讯作者: abrahamtj1@gmail.com

水生生物研究, 2016 年, 第 5 卷, 第 5 篇 doi: [10.5376/aor.cn.2016.05.0005](https://doi.org/10.5376/aor.cn.2016.05.0005)

本文首次以英文发表在 International Journal of Aquaculture, 2016, Vol.6, No.13, 1-5 上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权, 用中文再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。如果读者对中文含义理解有歧义, 请以英文原文为准。

引用格式:

Abraham T.J., and Adikesavalu H., 2016, Association of *Stenotrophomonas maltophilia* in African Catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) Fry Mortalities with Dropsy, International Journal of Aquaculture, 6(13): 1-5 (doi: [10.5376/ija.2016.06.0013](https://doi.org/10.5376/ija.2016.06.0013))

摘要 这篇通讯报道了在育苗池生长的非洲鲶鱼的嗜麦芽窄食单胞菌与尖齿胡鲶(Burchell, 1822)鱼苗因膨胀腹部的死亡率及其表型表征的关联。在患病鱼苗中观察到的总体临床症状是嗜睡, 身体变色, 轻微的鳍/尾腐烂, 腹部膨胀, 肠和其他内脏器官肿胀, 以及内脏出血。受影响的鱼苗的腹腔充满具有胶状物质的透明粘性腹水。发病率和死亡率分别约为总鱼苗数的 60%和 20-25%。梅里埃 VITEK® 2 紧密系统将菌株鉴定为嗜麦芽窄食单胞菌。菌株对蛋白酶和脂肪酶活性是阳性的, 并且在羊血琼脂上显示 α 溶血。我们的研究表明嗜麦芽窄食单胞菌作为非洲尖齿胡鲶的病原体出现, 这是会引起关注的重要原因。

关键词 尖齿胡鲶; 嗜麦芽窄食单胞菌; 水肿; 表型鉴定

Association of *Stenotrophomonas maltophilia* in African Catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) Fry Mortalities with Dropsy

Thangapalam Jawahar Abraham ✉, Harresh Adikesavalu

Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Fishery Sciences, West Bengal University of Animal and Fishery Sciences, Chakgaria, Kolkata - 700094, West Bengal, India

✉ Corresponding author email: abrahamtj1@gmail.com

Abstract This communication reports the association of *S. maltophilia* in the mortalities of nursery grown African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) fries with distended abdomen and its phenotypic characterization. The gross and clinical signs observed in diseased fries were lethargy, body discolouration, mild fin/tail rot, distended abdomen, swelled intestine and other internal organs, and visceral haemorrhages. The abdominal cavity of affected fries was filled with transparent viscous ascites with jelly-like mass. Morbidity and mortality was about 60% and 20-25% of the total population, respectively. The BioMerieux Vitek 2 compact system identified the strains as *Stenotrophomonas maltophilia*. The strains were positive for protease and lipase activity and exhibited alpha haemolytic on sheep blood agar. Our results suggest that *S. maltophilia* in emerging as a pathogen of *C. gariepinus*, which is a serious cause for concern.

Keywords *Clarias gariepinus*; *Stenotrophomonas maltophilia*; dropsy; phenotypic characterization

介绍

嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*), 一种运行型, 有氧的, 非发酵的, 孢子的, 革兰氏阴性的杆菌, 以前称为嗜麦芽黄单胞菌(*Xanthomonas maltophilia*), 已经基于 DNA-rRNA 杂交研究和测序和 PCR 扩增 16S rRNA 基因映射(Palleroni and Bradbury, 1993)得到了现在的名称。虽然它不是一种高致病性的病原体, 但是它已经成为与菌血症(Brooke, 2012)患者和感染病患者如肺炎, 血流感染, 以及尿道感染, 腹内感染, 脑膜炎和眼感染(Falagas et al., 2009)等感染病的粗死亡率相关的重要医院病原体。它已从土壤和植物的根, 动物, 无脊椎动物, 水处理和分配系统、污水处理厂、落水洞, 湖泊, 河流, 含水层中的断裂表面生物膜生物膜, 清洗沙拉, 血液透析用水、透析液样品, 水龙头, 自来水、瓶装水、腐蚀氯溴化十六烷基三甲铵局部消毒剂, 洗手肥皂, 隐形眼镜护理液, 制冰机, 和洗涤槽排水管(Brooke, 2012)中重新获得。Ugur et al. (2002)将嗜麦芽窄食单胞菌分类为欧洲鳗鲡皮肤中的优势菌种之一, 占总微生物群落的 12.05%。嗜麦芽窄食单胞菌作为毒性病原体是从中国四川省的传染性肠套叠综合征(IIS)的鲶鱼带状疱疹样斑点分离出的(Geng et al., 2007; Geng et al., 2010a, Geng et al., 2010b)。

在印度, 由于经济回报高, 投入少, 鲶鱼的产量多年来一直在增长。西孟加拉邦在鲶鱼生产中占据第二位, 并且自 2007 年以来, 占印度总鲶鱼产量的 16-20% (Dahdf, 2012)。随着养殖鲶鱼产量的增加, 传染病发病率也在增加(Kumar et al., 2013)。早些时候我们报道了这种生物作为机会性病原体在培养的非非洲鲶鱼革胡子鲶幼鱼中的分离状态, 表型和分子表征(Abraham et al., 2016)。在这篇文章中, 我们报告了嗜麦芽窄食单胞菌与尖齿胡鲶(Burchell, 1822)因膨胀腹部的死亡率及其表型特征的关联。

1 材料与方法

1.1 抽样和细菌学

在 2016 年 2 月的常规鱼病监测期间, 非洲鲶鱼革胡子鲶(Burchell, 1822)鱼苗(≈1.50-2.50 厘米)在印度西孟加拉邦北帕尔加纳斯北部 Ramchandrapur (Lat 22°54'01" N; Long 88°24'48" E)的一个苗圃中检查了非洲鲶鱼革胡子鲶(Burchell, 1822)鱼苗(≈1.50-2.50 厘米)的典型的水肿症状(图 1)。在现场, 记录到患病的革胡子鲶鱼苗的行为异常, 以及其总体和临床体征。并在在现场分别用氧气填充的聚乙烯袋将具有典型疾病症状(n = 60)和明显健康的鱼苗(n = 20)的病原体粪肠球菌进行细菌学分析。在细菌学分析之前, 首先在无菌盐水中漂洗病态和健康的鲶鱼鱼苗(每种 5 份), 并用无菌纸巾擦拭粘附的盐水。在无菌环境下, 用无菌针刺穿鱼苗腹部, 将来自腹水的接种物划线到脑心浸液琼脂(BHIA), 补充有 100 IU / ml 青霉素 G 钠盐(GSPA)(HiMedia, 2009)的谷氨酸淀粉酚红琼脂, 和爱德华氏菌琼脂(EIA)(Shotts 和 Waltman II, 1990)平板上, 并在 30±2℃下温育 24-48 小时。显然, 健康的鱼苗没有腹液积聚。基于优势和确定的菌落形态, 挑选来自谷氨酸淀粉酚红琼脂的代表性粉红色的菌落, 在脑心浸液琼脂上纯化并在室温下保持在脑心浸液琼脂斜面上, 在-20℃下作为甘油储备液。

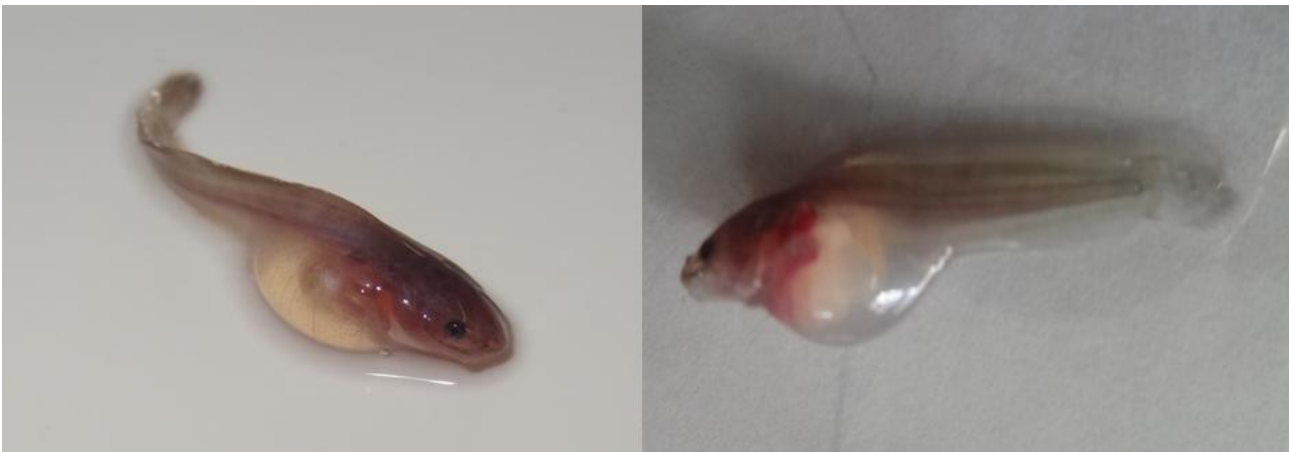


图 1 非洲鲶鱼革胡子鲶鱼苗水肿的典型症状, 腹腔内充满透明的胶冻样粘稠性腹水

Figure 1 African catfish *Clarias gariepinus* fries with typical symptoms of dropsy. The abdominal cavity was filled with transparent jelly-like viscous ascites

1.2 细菌菌株的表型特征

进行一系列生化反应来识别随机挑选的细菌到属的水平(Collins et al., 2004)。十个分离株的初始表征表明, 细菌菌株是假定的假单胞菌。此外, 两个菌株 EGC 和 RGC 的表征, 显示在谷氨酸淀粉酚红琼脂上的粉红色着色, 通过 Vitek 2 紧密系统进行操作(法国生物梅里埃公司)。在明胶琼脂, 三丁酸甘油琼脂和绵羊血琼脂(海美迪, 孟买)上分别测试菌株的蛋白酶, 脂肪酶和溶血活性(Collins et al., 2004)。

2 结果与讨论

在调查的育苗池中, 将嗜麦芽窄食单胞菌鱼苗储存在尺寸长度 6 m×宽度 5 m×水深 0.3 m 的高密度(≈200 000 nos/tank)的三个胶合罐中。水循环并且通气充足。根据需要为它们供给 1.0 mm 大小的商业颗粒饲料。发病率约占总鱼苗数的 60%。在大约 10 天, 20-25% 的鱼苗在所有三个水罐中死亡。在患病鱼苗中观察到的总体临床体征包括嗜睡, 身体变色, 轻微的鳍/尾部腐烂, 腹部膨胀, 内部器官炎症, 肠肿胀和内脏出血。受影响的鱼苗的腹腔充满透明的胶冻状粘液腹水。来自腹水样品的接种物在谷氨酸淀粉酚红琼脂上主要产生粉红色的菌落。在爱德华氏菌琼脂上没有绿色半透明菌落, 或在 48 小时后在谷氨酸淀粉酚红琼脂上没有和/或分散存在少量黄色菌落, 因此排除了气单胞菌属和爱德华氏菌的参与。从谷氨酸淀粉酚红

琼脂上的腹水中分离的细菌菌株(n = 10)被假定为假单胞菌属。通过 BioMerieux Vitek 系统进一步表征两个菌株 EGC 和 RGC, 其将菌株鉴定为嗜麦芽窄食单胞菌具有 99% 的概率(表 1)。这些菌株对蛋白酶和脂肪酶活性是阳性的, 并且在羊血琼脂上显示 α 溶血。在表型上, 在目前研究的菌株和参考嗜麦芽杆菌菌株 SK1 之间只发生了微小的变化(Abraham et al., 2016), 特别是在利用谷氨酸、甘氨酸、精氨酸酶丙二酸、乳酸碱化期间(表 1)。

表 1 从尖齿胡鲶水肿的鱼苗中分离出的嗜麦芽窄食单胞菌菌株 EGC 和 RGC 分离株的表型特征

Table 1 Phenotypic characteristics of *Stenotrophomonas maltophilia* strains EGC and RGC isolated from *Clarias gariepinus* fries with dropsy

特征 Characteristics	目前的研究 Present study			参照 Reference	特征 Characteristics	目前的研究 Present study		
	品种 Strain		品种 Strain			品种 Strain		品种 Strain
	EGC	RGC				EGC	RGC	
D-葡萄糖(dGLU) D-Glucose (dGLU)	-	-	-	丙氨酸-苯丙氨酸-脯氨酸芳胺酶 (APPA) Ala-Phe-Pro-arylamidase (APPA)	+	+	+	
蔗糖(SAC) Saccharose/Sucrose (SAC)	-	-	-	吡咯烷基芳胺酶 L Pyrrolydonyl-arylamidase (PyrA)	-	-	-	
D-纤维二糖 D-Cellobiose (dCEL)	-	-	-	β -N-乙酰葡萄糖苷酶 Beta-N-Acetyl-glucosaminidase(BNAG)	-	-	-	
侧金盏花醇(ADO) Adonitol (ADO)	-	-	-	谷氨酰芳胺酶(AGLTp) GlutamylarylamidasepNA(AGLTp)	-	-	-	
L-阿拉伯糖醇(IARL) L-Arabitol (IARL)	-	-	-	γ -谷氨酰转移酶(GGT) Gamma-glutamyl-transferase (GGT)	+	+	+	
D-甘露醇 D-Mannitol (dMAN)	-	-	-	β -丙氨酸芳胺酶 Beta-alanine arylamidase pNA (BALap)	-	-	-	
D-山梨醇 D-Sorbitol (dSOR)	-	-	-	L-脯氨酸芳胺酶 L-Proline arylamidase (ProA)	+	+	+	
D-麦芽糖 D-Maltose (dMAL)	-	-	-	酪氨酸芳胺酶 Tyrosine arylamidase (TyrA)	-	-	-	
D-甘露糖 D-Mannose (dMNE)	-	-	-	N-乙酰- β -半乳糖氨酶 Beta-N-acetyl-galactosaminidase (NAGA)	-	-	-	
D-塔格糖 D-Tagatose (dTAG)	-	-	-	氨基乙酸芳胺酶 Glycine arylamidase (GlyA)	-	-	-	
D-海藻糖 D-Trehalose (dTRE)	-	-	-	谷氨酸-甘氨酸-精氨酸芳胺酶 Glu-Gly-Arg-arylamidase(GGAA)	+	-	+	
硫化氢产生 H2S production (H2S)	-	-	-	ELLMAN Ellman (ELLM)	-	-	-	
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase (LDC)	-	-	-	L-乳酸盐同化 L-Lactate assimilation (ILATa)	-	-	-	
鸟氨酸脱羧酶 Orinithine decarboxylase (ODC)	-	-	-	组氨酸同化 L-Histidine assimilation (IHISa)	-	-	-	
L-苹果酸盐同化 L-Malate assimilation (IMLTa)	-	-	-	5-酮-葡萄糖苷 5-Keto D-gluconate (5KG)	-	-	-	

Continue Table 1

特征 Characteristics	目前的研究 Present study		参照 Reference	特征 Characteristics	目前的研究 Present study		参照 Reference
	品种 Strain	品种 Strain	品种 Strain		品种 Strain	品种 Strain	品种 Strain
	EGC	RGC	SK1a		EGC	RGC	SK1a
柠檬酸盐(钠) Citrate (sodium) (CIT)	+	+	+	古老糖 Palatinose (PLE)	-	-	-
尿素酶 Urease (URE)	-	-	-	丙二酸盐 Malonate (MNT)	+	+	-
葡萄糖发酵 Fermentation/ glucose (OFF)	-	-	-	乳酸盐产碱 L-Lactate alkalisation(ILATk)	+	+	-
磷酸酶 Phosphatase (PHOS)	+	+	+	琥珀酸盐产碱 Succinate alkalisation (SUCT)	+	+	+
β -葡萄糖苷酸酶 Beta-glucuronidase (BGUR)	-	-	-	α -半乳糖苷酶 Alpha-galactosidase (AGAL)	-	-	-
脂酶 Lipase (LIP)	+	+	+	β -葡萄糖苷酶 Beta-glucosidase (BGLU)	+	+	(+)
α -葡萄糖苷酶 Alpha-glucosidase (AGLU)	-	-	-	COURMARATE Coumarate (CMT)	-	-	-
β -木糖苷酶 Beta-xylosidase (BXYL)	-	-	-	O/129 耐受 O/129 Resistance (O129R)	-	-	-
β -D-半乳糖苷酶 Beta-galactosidase (BGAL)	-	-	-				

注: a: SK1 菌株的结果来自 Abraham et al. (2016)

Note: a: The results of the strain SK1 was from Abraham et al. (2016)

自 2006 年以来,作为鱼类病原体的嗜麦芽窄食单胞菌的报道开始出现(Kapetanoviæ et al., 2006; Geng et al., 2007; Geng et al., 2010a, Geng et al., 2010b; Musa et al., 2008; Abraham et al., 2016)。从在水泥罐中具有 60% 发病率和 20% 至 25% 死亡率的尖齿胡鲶中分离的具有 α -溶血性, 蛋白酶和脂肪酶活性的嗜麦芽窄食单胞菌属菌株表明了嗜麦芽窄食单胞菌正在作为有毒病原体出现, 并且导致在鱼苗期的尖齿胡鲶鱼苗的显著死亡。在我们早期的研究中, 观察到在农场水平有 5% 的死亡率, 以及分别在 1.40×10^7 个细胞/鱼通过腹膜内和肌内注射嗜麦芽窄食单胞菌, 分别观察腹部粘性胶装物质产生的实验中获得 35 \pm 5% 和 10% 死亡率 (Abraham et al., 2016)。然而, 通过鲶鱼腹膜注射的毒力试验(Geng et al., 2010a)确定了嗜麦芽窄食单胞菌是强毒性病原体。鱼的嗜麦芽窄食单胞菌的病理和发病机制仍然很少被了解。细胞外酶在嗜麦芽窄食单胞菌下的相关感染的发病机理中所起到的作用已经被提出(Bottone et al., 1986)。然而, 很少的早期结果证实了嗜麦芽窄食单胞菌的细胞外产物(ECP)显示出对鲶鱼(Geng et al., 2010b)和小鼠(Du et al., 2011)的强毒力。根据有关研究所说(Geng et al., 2010b), ECP 是嗜麦芽窄食单胞菌的一个重要致病因子, 它可以诱导淋巴细胞凋亡, 多器官蜕化和死亡。虽然在这项研究中没有进行详细的发病机制调查, 但假定的毒力因子如蛋白酶, 脂肪酶和 α -溶血素的产生可能与涉及嗜麦芽窄食单胞菌的鲶鱼苗死亡率有关。此外, 我们对嗜麦芽窄食单胞菌在生长阶段(Abraham et al., 2016)的尖齿胡鲶鱼苗中 5% 死亡率和在育苗室阶段的鱼苗中的 20-25% 的死亡率的参与度的持续观察表明嗜麦芽窄食单胞菌在作为尖齿胡鲶的病原体出现, 这是需要严肃重视的问题。所以进一步的研究是必要的, 以了解病理学以及这种新出现的病原体在培养鲶鱼及其控制措施的发病机制。

利益冲突

作者声明没有利益冲突。

致谢

研究工作得到了印度政府农业研究委员会的支持, 印度政府, 新德里根据利基优质领域计划。作者感谢加拿大西部孟加拉动物和渔业科学大学副校长提供必要的基础设施以便开展这项工作。

作者贡献

TJA 在构思和设计, 结果分析与解释以及收稿写作部分做出贡献, HA 在样品收集和数据分析以及数据采集方面做出贡献。全体作者都阅读并同意最终的文本。

参考文献

- Abraham T.J., Paul P., Adikesavalu H., Patra A. and Banerjee S., 2016, *Stenotrophomonas maltophilia* as an opportunistic pathogen in cultured African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), *Aquaculture*, 450: 168–172
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.015>
- Bottone E.J., Reitano M., Janda J.M., Troy K. and Cuttner J., 1986, *Pseudomonas maltophilia* exoenzyme activity as a correlate in pathogenesis of *Ecthyma gangrenosum*, *Journal of Clinical Microbiology*, 24: 995-997
- Brooke J.S., 2012, *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen, *Clinical Microbiology Review*, 25: 2–41
<http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00019-11>
- Collins C.H., Lyne P.M., Grange J.M. and Falkinham III J.O., 2004, Collins and Lyne's Microbiological methods, 8th ed. Arnold, London, UK, p.456
- Dahdf 2012. Handbook on fisheries statistics 2011, Department of Animal Husbandry, Dairying and Fisheries, Ministry of Agriculture, Govt. of India. New Delhi, p.170
- Du Z., Huang X., Wang K., Deng Y., Chen D., Geng Y. and Su X., 2011., Pathology of extracellular protease of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to mice, *African Journal of Biotechnology*, 10(10): 1953-1958
- Falagas M.E., Kastoris A.C., Vouloumanou E.K., Rafailidis P.I., Kapaskelis A.M. and Dimopoulos G., 2009, Attributable mortality of *Stenotrophomonas maltophilia* infections: a systematic review of the literature, *Future Microbiology*, 4: 1103–1109
<http://dx.doi.org/10.2217/fmb.09.84>
- Geng Y., Wang K., Chen D. and Huang X., 2007, Isolation, identification and phylogenetic analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* in channel catfish, *Chinese Journal of Veterinary Science*, 27(3): 330-335
- Geng Y., Wang K., Chen D., Huang X., He M. and Yin Z., 2010a, *Stenotrophomonas maltophilia*, an emerging opportunist pathogen for cultured channel catfish, *Ictalurus punctatus*, in China, *Aquaculture*, 308(3-4): 132-135
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.08.032>
- Geng Y., Wang K., Xiao D., Chen D. and Huang J., 2010b, Pathological studies on channel catfish induced by extracellular products of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 34 (2): 345-352
<http://dx.doi.org/10.3724/SP.J.1035.2009.00345>
- Heil N., 2009, National wild fish health survey. Laboratory procedures manual, 5th ed. U.S. Fish and Wildlife Service, Warm Springs, GA HiMedia 2009, The HiMedia manual. A manual of microbiology laboratory practice, HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, p.1194
- Kapetanoviæ D., Kurtoviæ B., Vardiæ I., Teskered E. and Teskered Z., 2006, Gill disease in a gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.), *Medycyna Weterynaryjna*, 62(11): 1239
- Kumar K., Paniprasad K., Raman R.P., Kumar S. and Purushothaman C.S., 2013, Association of *Enterobacter cloacae* in the mortality of *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878) reared in culture pond in Bhimavaram, Andhra Pradesh, India, *Indian Journal of Fisheries*, 60(3): 147-149
- Musa N., Wei L.S., Shaharom F. and Wee W., 2008, Surveillance of bacteria species in diseased freshwater ornamental fish from aquarium shop, *World Applied Sciences Journal*, 3(6): 903-905
- Palleroni N.J. and Bradbury J.F., 1993, *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43: 606–609
<http://dx.doi.org/10.1099/00207713-43-3-606>
- Shotts E.B. and Waltman II W.D., 1990, A medium for the selective isolation of *Edwardsiella ictaluri*, *Journal of Wildlife Diseases*, 26: 214-218
<http://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-26.2.214>
- Ugur A., Yilmaz F. and Sahin N., 2002, Microflora on the skin of European eel (*Anguilla anguilla* L., 1758) sampled from creek Yuvarlak çay, Turkey, *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgah*, 54(2): 89-94