

青海湖斑头雁粪便细菌分离鉴定与耐药性分析

陈卓^{①②} 罗静^② 张国钢^{①*} 何宏轩^{②*}

① 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 全国鸟类环志中心, 国家林业局森林保护学重点实验室 北京 100091;

② 中国科学院动物研究所动物生态与保护学重点实验室, 野生动物疫病研究中心 北京 100101

摘要: 为了解斑头雁 (*Anser indicus*) 粪便中携带细菌多样性及其耐药情况, 对青海湖斑头雁粪便细菌进行分离培养、生化鉴定、16S rRNA 基因 PCR 扩增和序列分析, 并进行细菌耐药性试验。结果显示: 从 30 份斑头雁粪便中共分离到 123 株细菌, 可分为 10 类细菌, 分别从每类细菌中挑出一株代表性菌株进行鉴定, 鉴定结果显示这 10 株细菌分别为大肠埃希菌 (*Escherichia coli*)、水生拉恩氏菌 (*Rahnella aquatilis*)、蒙氏肠球菌 (*Enterococcus mundtii*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、柠檬节杆菌 (*Arthrobacter citreus*)、腐败希瓦氏菌 (*Shewanella putrefaciens*)、河生肠杆菌 (*Enterobacter amnigenus*)、成团泛菌 (*Pantoea agglomerans*)、杀鲑气单胞菌 (*Aeromonas salmonicida*) 和产酸克雷伯菌 (*Klebsiella oxytoca*)。选取氨苄西林、哌拉西林、阿莫西林/克拉维酸、头孢唑林、头孢他啶、氨基糖苷、庆大霉素、卡那霉素、阿米卡星、四环素、氯霉素、环丙沙星、诺氟沙星药敏纸片, 对分离菌株进行耐药性分析, 发现水生拉恩菌、杀鲑气单胞菌和成团泛菌表现为多重耐药性; 其他细菌对氨苄西林和四环素有一定的耐药性, 对其余受试药物都有不同程度的敏感性。野鸟携带耐药性的条件致病菌, 可能会对野生动物健康造成威胁, 本研究对斑头雁粪便中携带的条件致病菌及其耐药性进行探究, 以为野鸟携带细菌的耐药机制提供研究理论依据, 同时也对野生动物疫病的监测与防控有重要意义。

关键词: 斑头雁; 粪便细菌; 分离鉴定; 耐药性

中图分类号: Q939, Q958 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2016) 04-590-09

Isolation, Identification and Antimicrobial Susceptibility of Fecal Bacteria from Bar-headed Geese *Anser indicus* from Qinghai Lake

CHEN Zhuo^{①②} LUO Jing^② ZHANG Guo-Gang^{①*} HE Hong-Xuan^{②*}

① Key Laboratory of Forest Protection of State Forestry Administration, National Bird Banding Center of China, The Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, The Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091; ② National Research Center for Wildlife Born

Diseases, Key Laboratory of Animal Ecology and Conservation Biology, Institute of Zoology,

Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

基金项目 林业公益性行业科研专项项目 (No. 201404404), 国家林业局野生动物疫源疫病项目专项, 中国科学院战略生物资源科技支撑体系运行专项 (No. CZBZX-1), “十二五”国家科技支撑计划项目 (No. 2013BAD12B04);

* 通讯作者, E-mail: zm7672@caf.ac.cn, hehx@ioz.ac.cn;

第一作者介绍 陈卓, 女, 硕士研究生; 研究方向: 野生动植物保护与利用; E-mail: chenzhuohappy@126.com.

收稿日期: 2015-12-03, 修回日期: 2016-03-15 DOI: 10.13859/j.cjz.201604010

Abstract: To investigate the diversity and antibiotic susceptibility of bacteria from Bar-headed Geese (*Anser indicus*), we collected their feces in Qinghai Lake area during July, 2015. Bacteria were isolated and identified by colonial morphology observation, biochemical properties tests, amplification of 16S rRNA genes by PCR and sequences analysis. A total of 123 bacteria strains belonging to 10 genus were isolated from 30 feces samples. One strain from each of the 10 genus was further cultured and identified. The growth statuses of 10 strains on nutrition agar medium were shown in Fig. 1. The results of gram dyeing, culture shape and detection rate of isolated bacterial strains were shown in Table 1. The biochemical analysis results and Phylogenetic analysis were presented in Table 2 and Fig. 3. The results indicated that 10 isolated strains were *Escherichia coli*, *Rahnella aquatilis*, *Enterococcus mundtii*, *Bacillus subtilis*, *Arthrobacter citreus*, *Shewanella putrefaciens*, *Enterobacter amnigenus*, *Pantoea agglomerans*, *Aeromonas salmonicida*, and *Klebsiella oxytoca*, respectively. The resistance of isolates to 13 drugs (Ampicillin, Piperacillin, Amoxicillin/Clavulanic Acid, Cefazolin, Ceftazidime, Aztreonam, Gentamicin, Kanamycin, Amikacin, Tetracycline, Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Norfloxacin) was evaluated and shown in Table 3. Among these bacteria, *R. aquatilis*, *A. salmonicida* and *P. agglomerans* were multidrug resistant, while other bacteria were resistant to ampicillin and tetracycline and showed varying degrees of sensitivity to the rest drugs. The results obtained from this study indicate that Bar-headed Geese carry amounts of pathogens which exhibit antibiotic resistance. This would provide references to study the antibiotic resistance mechanisms of bacteria in wild birds, and is of great value to the surveillance of wildlife disease.

Key words: Bar-headed Geese, *Anser indicus*; Fecal bacteria; Isolation and identification; Antibiotic resistance

野鸟在迁徙过程中会携带多种能导致人兽共患病的病原细菌, 并通过粪便排出体外, 污染水环境及栖息地, 对家畜家禽以及人类的健康造成威胁 (Reed et al. 2003, Hubalek 2004)。1994 ~ 1995 年, 携带弯曲杆菌 (*Campylobacter*) 的红脚雁 (*Anser brachyrhynchus*), 在从斯瓦尔巴群岛向德国迁徙的过程中, 排泄粪便污染水环境, 导致挪威约 1 000 人感染病原菌并患肠胃炎 (Varslot et al. 1996)。

青海湖作为重要的候鸟繁殖地和迁徙停歇地, 每年约有 15 万只候鸟在此停留 (Hou et al. 2009, Prosser et al. 2011), 在秋季迁徙期候鸟的种类和数量较多 (张国钢等 2008, Cui et al. 2011), 频繁的个体及种群间接触会促进病原菌扩散 (Hubalek 2004)。2005 年青海湖野鸟暴发禽流感疫情, 导致大批野鸟死亡, 其中, 超过一半为斑头雁 (*Anser indicus*), 随后青海西藏地区又陆续出现斑头雁感染禽流感病毒死亡的

事件, 这使斑头雁受到广泛关注 (Chen et al. 2005, Liu et al. 2005, 刘冬平 2010)。然而, 斑头雁作为青海湖的优势种之一 (孔飞等 2011), 对其病原学的研究却只集中在禽流感方面 (Bourouiba et al. 2010, Nemeth et al. 2013), 对其携带的细菌性病原及其耐药情况了解较少。本研究对青海湖斑头雁新鲜粪便中的细菌进行分离鉴定, 并对获得的菌种进行耐药性检测, 分析其携带细菌的种类及其耐药性。这可为进一步研究野鸟携带细菌的耐药机制提供依据, 对野生动物疫病的监测与防控也有重要意义。

1 材料及方法

1.1 样品

2015 年 7 月在青海湖黑马河湿地、泉吉河口及倒淌河湿地, 采集斑头雁新鲜粪便 30 份。将采集的样品放入低温保温箱中送回实验室立

即处理。

1.2 细菌分离纯化

每份新鲜粪便样本取 1 g 于 700 μ l 无菌 PBS 缓冲液 (NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na_2HPO_4 1.44 g, KH_2PO_4 0.24 g, pH 7.4, 加蒸馏水定容至 1 L, 实验室配制) 中, 震荡混匀后, 800 r/min 离心 1 min, 取上清加入 5 ml 营养肉汤培养基 (北京陆桥技术有限责任公司), 放入 37°C 摇床培养 12 h。吸取菌液 1 ml 进行 10 倍梯度稀释, 取 10^{-8} 稀释的菌液 200 μ l, 涂布在鲜血琼脂培养基 (北京陆桥技术有限责任公司) 上, 放入培养箱中 37°C 培养 24 ~ 48 h。挑取肉眼能区分出的表征各异的菌落, 在营养琼脂培养基 (北京陆桥技术有限责任公司) 上划线接种, 并进行纯化培养。37°C 培养 15 ~ 24 h 后对细菌进行革兰氏染色, 并记录菌株的形态。根据细菌在营养琼脂培养基上的不同表征及革兰氏染色结果, 对分离到的细菌进行初步分类。计算每类细菌的检出率, 即存在某一类细菌的样品数占总样品数的百分比。

1.3 生化鉴定

挑取纯培养的单菌落到生理盐水管中, 调节麦氏度为 0.5, 吸取 0.5 ml 菌液接种于细菌生理生化鉴定管 (北京陆桥技术有限责任公司) 中, 放入培养箱 37°C 培养 24 ~ 38 h, 判定结果, 判定依据为《伯杰氏细菌鉴定手册》第八版 (布坝南等 1984), 以及《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠等 2001)。

1.4 16S rRNA 扩增

参照细菌基因组 DNA 试剂盒 (北京康为世纪生物科技有限公司) 说明书提取细菌总 DNA, 利用细菌的 16S rRNA 基因通用引物 (上游引物: 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3', 下游引物: 5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3', 引物均由北京六合华大基因科技有限公司合成) 进行 PCR 扩增。扩增体系: $2 \times \text{Taq PCR Master Mix}$ (北京康为世纪生物科技有限公司) 25 μ l, dd H_2O 21 μ l, 上下游引物各 1 μ l, DNA 模板 2 μ l, 总体积 50 μ l。扩增程序: 94°C 5 min;

94°C 30 s, 55°C 45 s, 72°C 90 s, 共 30 个循环; 72°C 10 min。阳性对照中, 模板为实验室保存的大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) 菌株的 DNA; 阴性对照中, 模板为 dd H_2O 。分别取 5 μ l PCR 产物和 DL 2000 Marker (大连宝生物工程有限公司), 用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 若检测结果中出现 1 465 bp 的条带则为阳性。阳性产物回收纯化, 并送往北京六合华大基因科技有限公司进行测序。

将测序结果与 GenBank 中参考菌株的 16S rRNA 序列进行相似性比对, 其中, 同种不同株的细菌 16S rRNA 基因的相似性大于 99%, 同属细菌相似性为 97% ~ 99%, 而相似性小于 97% 则为潜在新菌株 (Drancourt et al. 2000, 2004)。在 NCBI 中登录各细菌的 16S rRNA 序列信息。运用 MEGA 6.0 软件 (Tamura et al. 2013), 采用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 对测序获得的 16S rRNA 序列构建系统进化树 (Saitou et al. 1987)。

1.5 药敏试验

采用药敏纸片琼脂扩散法 (K-B 法), 将麦氏度为 0.5 的菌液均匀涂在 MH 琼脂培养基 (北京陆桥技术有限责任公司) 上, 贴上 13 种药敏纸片 (北京天坛药物生物技术开发公司), 药敏纸片上分别含有抗生素氨苄西林、哌拉西林、阿莫西林/克拉维酸、头孢唑林、头孢他啶、氨基曲南、庆大霉素、卡那霉素、阿米卡星、四环素、氯霉素、环丙沙星、诺氟沙星。将贴有药敏纸片的培养基, 放入培养箱中 35°C 培养 16 ~ 18 h 后测量抑菌圈直径, 并依据纸片法抗菌药物敏感试验标准 (WS/T125-1999, 中华人民共和国卫生部 2000) 判定结果。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922, 若质控菌株药物敏感度正常, 则药敏试验的结果可靠。

2 结果

2.1 细菌分离纯化

从 30 份粪便样品中共分离出 123 株细菌, 将分离菌在营养琼脂上划线培养后, 根据其在

营养琼脂上的不同表征及革兰氏染色结果, 对分离到的细菌进行初步分类, 得到 10 类细菌, 其在营养琼脂上的生长情况见图 1。从 10 类细

菌中各挑取 1 株典型细菌进行纯化鉴定。革兰氏染色结果、在营养琼脂上的培养性状以及检出率见表 1。

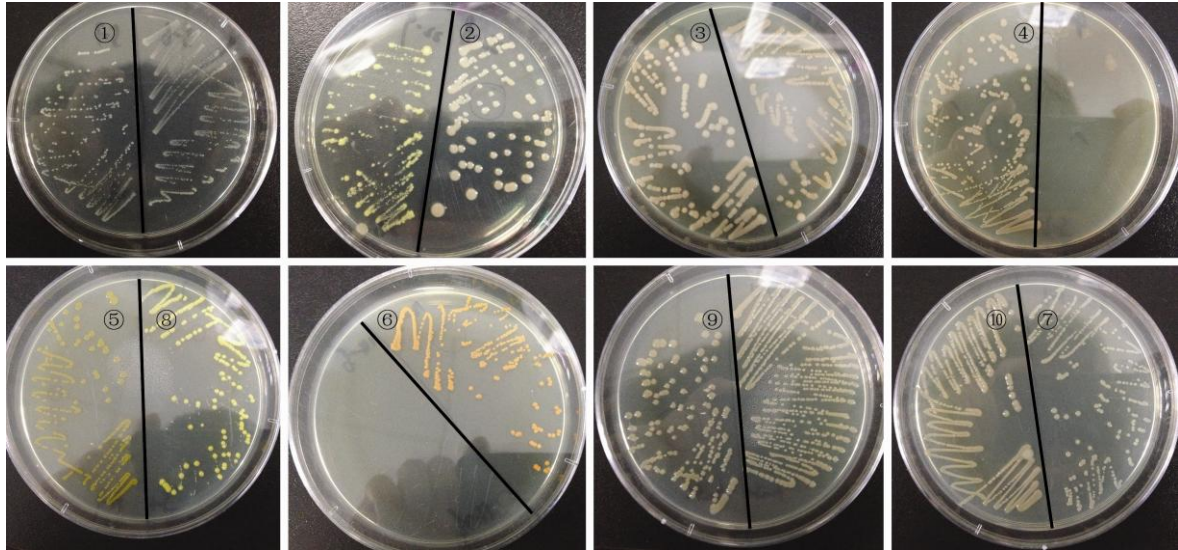


图 1 10 种分离菌在营养琼脂培养基上的生长情况

Fig. 1 Ten isolated strains grown on nutrition agar medium

表 1 分离菌的革兰氏染色结果、菌落形态特征及检出率

Table 1 Gram dyeing, culture shape and detection rate of isolated bacterial strains

编号 Number	菌体 Strain	革兰氏染色 Gram dyeing	营养琼脂培养性状 Culture shape on nutrient agar medium	检出率 Detection rate
1	杆状 Rod	阴性 Negative	圆形, 灰白色, 半透明, 光滑, 微凸, 边缘整齐 Round, gray, translucent, smooth, slightly convex, edge neat	27/30 (90%)
2	杆状 Rod	阴性 Negative	圆形, 白色, 光滑, 凸起, 边缘整齐 Round, white, smooth, convex, edge neat	16/30 (53%)
3	球状 Coccus	阳性 Positive	圆形, 白色, 不透明, 光滑, 边缘整齐 Round, white, opaque, smooth, edge neat	13/30 (43%)
4	杆状 Rod	阳性 Positive	圆形, 白色, 不透明, 不光滑, 边缘不整齐 Round, white, opaque, not smooth, the edge is not neat	13/30 (43%)
5	杆状 Rod	阳性 Positive	圆形, 黄色, 不光滑, 边缘不整齐 Round, yellow, not smooth, edge is not neat	12/30 (40%)
6	杆状 Rod	阴性 Negative	圆形, 棕红色, 光滑, 微凸, 边缘整齐 Round, red brown, smooth, slightly convex, edge neat	11/30 (37%)
7	杆状 Rod	阴性 Negative	圆形, 白色, 不透明, 光滑, 边缘整齐 Round, white, opaque, smooth and neat	10/30 (33%)
8	杆状 Rod	阴性 Negative	圆形, 黄色, 光滑, 微凸, 边缘整齐 Round, yellow, smooth, slightly convex, edge neat	9/30 (30%)
9	杆状 Rod	阴性 Negative	圆形, 灰白色, 不透明, 光滑, 微凸, 边缘整齐 Round, gray, opaque, smooth, slightly convex, edge neat	8/30 (27%)
10	杆状 Rod	阴性 Negative	圆形, 灰白色, 半透明, 光滑, 凸起, 边缘整齐 Round, gray translucent, smooth, slightly convex, edge neat	4/30 (13%)

2.2 分离菌的生化鉴定

对 10 株细菌进行生化鉴定,生化鉴定结果见表 2。1 ~ 10 号细菌分别与埃希菌属 (*Escherichia*)、拉恩氏菌属 (*Rahnella*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*)、希瓦氏菌属 (*Shewanella*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、泛菌属 (*Pantoea*)、气单胞菌属 (*Aeromonas*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*) 的生化指标一致,故初步判定 1 ~ 10 号细菌分别属于上述 10 个属。

2.3 16S rRNA 鉴定结果

对 10 株分离菌的 16S rRNA 进行扩增之后,用 1.0% 琼脂糖凝胶对产物进行检测(图 2)。10 个样本均得到明亮的电泳条带,且大小在 1 000 ~ 2 000 bp 之间,与预期大小相符,可用于测序。将测序结果在 GenBank 中进行相似性比对,并用测序获得的 16S rRNA 序列构建了

系统进化树(图 3),判定出 10 株分离菌分别为大肠埃希菌、水生拉恩氏菌 (*Rahnella aquatilis*)、蒙氏肠球菌 (*Enterococcus mundtii*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、柠檬节杆菌 (*Arthrobacter citreus*)、腐败希瓦氏菌 (*Shewanella pulrefaciens*)、河生肠杆菌 (*Enterobacter amnigenus*)、成团泛菌 (*Pantoea agglomerans*)、杀鲑气单胞菌 (*Aeromonas salmonicida*) 和产酸克雷伯菌 (*Klebsiella oxytoca*),与生化鉴定结果一致。

2.4 药敏试验

对 10 株分离菌进行药敏试验显示,大肠埃希菌对四环素耐药;水生拉恩氏菌对氨苄西林、头孢唑林、头孢他啶和四环素耐药;蒙氏肠球菌对氨苄西林和卡那霉素耐药;枯草芽孢杆菌仅对氨苄西林耐药,对其余抗生素都敏感;柠檬节杆菌对卡那霉素耐药;腐败希瓦氏菌对四

表 2 从青海湖斑头雁粪便中分离的肠道细菌的微量生化鉴定结果
Table 2 Identification of intestinal bacteria from feces of Bar-headed Geese from Qinghai Lake by biochemical analysis

项目 Item	菌种编号 Bacteria number									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
甘露醇 Mannitol	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
葡萄糖 Glucose	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
蔗糖 Sucrose	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
乳糖 Lactose	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
阿拉伯糖 Arabinose	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
黄色素 Yellow pigment	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
接触酶 Catalase	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
氧化酶 Oxidase	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
V-P 反应 V-P reaction	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
吲哚 Indole	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
H ₂ S	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-

“+”为阳性,“-”为阴性。“+” means positive,“-” means negative.

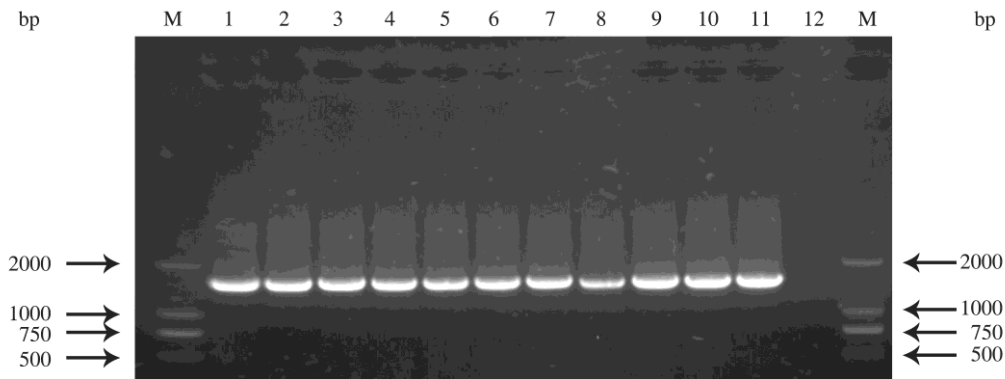


图 2 16S rRNA 基因 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplification results of 16S rRNA

M. DL2000 DNA 分子量标准；1 ~ 10. 1 ~ 10 号分离菌的 16S rRNA PCR 产物；11. 阳性对照；12. 阴性对照。

M. DL2000 DNA Marker; 1 - 10. 16S rRNA PCR products of 10 isolates; 11. Positive control; 12. Negative control.

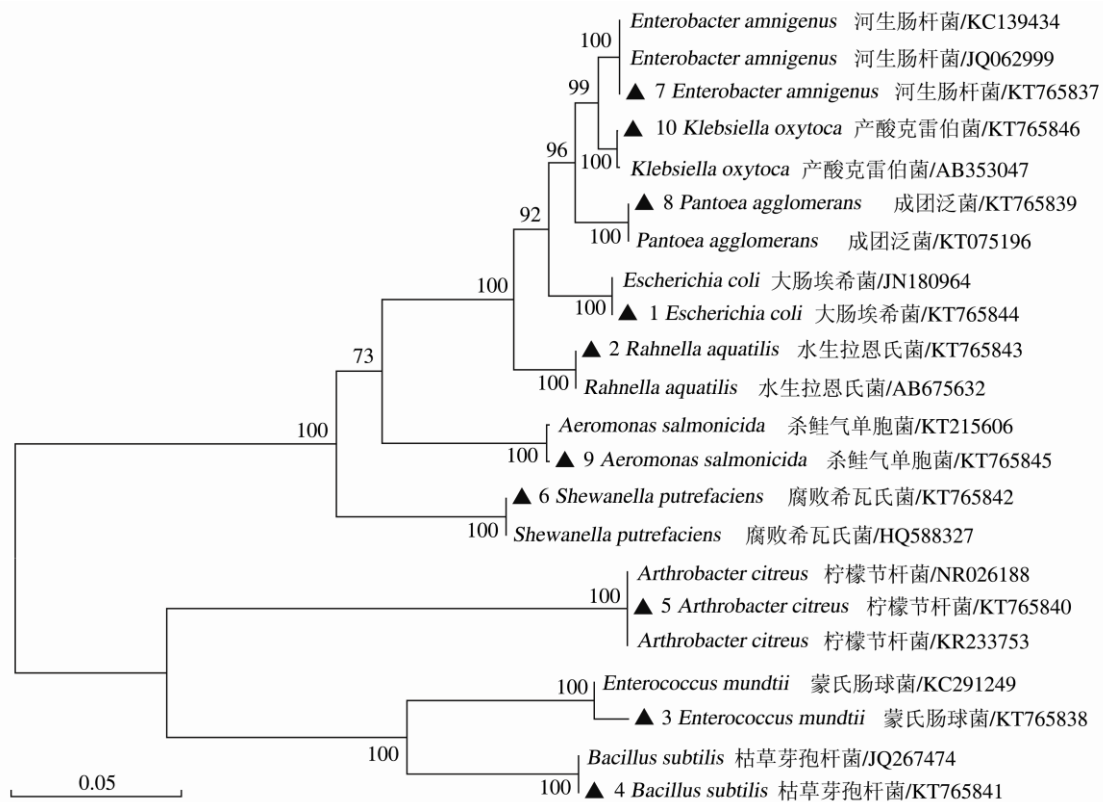


图 3 从青海湖斑头雁粪便中分离的肠道细菌 16S rRNA 系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic analysis based on 16S rRNA sequences of intestinal bacteria from feces of Bar-headed Geese from Qinghai Lake

种名后为此种细菌 16S rRNA 登录号；▲ 为本次分离的菌株；分枝上数字表示自展值为 1 000 时的置信度；标尺为碱基替换率。

Accession numbers of 16S rRNA are indicated after the species name; ▲ isolated strains; The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1 000 replicates) are shown next to the branches; Bar is the units of the number of base substitutions per site.

环素耐药，对头孢唑林敏感；河生肠杆菌对四环素耐药；成团泛菌对氨苄西林、头孢唑林、头孢他啶耐药；杀鲑气单胞菌对氨苄西林、阿莫西林/克拉维酸和四环素耐药；产酸克雷伯菌对氨苄西林和庆大霉素耐药。10 种分离菌种对其余抗生素具有不同程度的敏感性（表 3）。质控菌株药物敏感度正常。

3 讨论

从 30 份青海湖斑头雁粪便中分离到 123 株细菌，对其进行形态学观察并分类，根据其生化特性及 16S rRNA 鉴定结果，鉴定出 10 种细菌。其中大肠埃希菌（金红芝等 2004）、肠

球菌（金红芝等 2004）、成团泛菌（孙富艳等 2009）、水生拉恩菌（张俊威等 2000）、产酸克雷伯菌（Nemet et al. 2011）是重要的条件致病菌。当机体免疫力下降时，这些细菌就会侵染机体，引起机体感染或死亡，对机体构成严重威胁（金红芝等 2004），已有报道证实成团泛菌是一种在正常人的肠道和呼吸道偶可发现的细菌，一般不会引起临床病理变化，多导致免疫功能低下患者的机会性感染。水生拉恩氏菌可以引起临床呼吸道感染（张俊威等 2000，Nemet et al. 2011）。腐败希瓦氏菌可导致鱼类发病，江西盐城一家养殖场的异鱼银鲫（*Carassius auratus gibelio*）暴发疾病，致病菌

表 3 分离菌株药敏试验结果

Table 3 Antibiotic resistance test of the isolated bacterial strains

项目 Item	药物浓度 Drug concentration (μg/片)	抑菌圈直径 (mm) / 药物敏感性 Inhibition zone diameters (mm) / Antibiotic susceptibility									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
氨苄西林 Ampicillin	10	14/I	0/R	0/R	0/R	16/I	27/S	18/S	0/R	0/R	0/R
哌拉西林 Piperacillin	100	22/S	26/S	21/S	20/S	26/S	26/S	20/S	19/S	18/S	21/S
阿莫西林/克拉维酸 Amoxicillin/Clavulanic Acid	20/10	23/S	25/S	23/S	25/S	24/S	28/S	24/S	22/S	0/R	22/S
头孢唑林 Cefazolin	30	27/S	0/R	25/S	22/S	21/S	20/I	21/I	3/R	25/S	20/I
头孢他啶 Ceftazidime	30	28/S	0/R	27/S	20/S	23/S	26/S	24/S	0/R	27/S	25/S
氨曲南 Aztreonam	30	24/S	22/S	25/S	24/S	25/S	20/S	26/S	20/S	31/S	26/S
庆大霉素 Gentamicin	10	20/S	18/S	22/S	25/S	20/S	17/S	23/S	19/S	25/S	22/R
卡那霉素 Kanamycin	30	19/S	21/S	23/R	20/S	7/R	22/S	21/S	20/S	15/I	25/S
阿米卡星 Amikacin	30	20/S	22/S	21/S	19/S	17/S	18/S	22/S	23/S	26/S	20/S
四环素 Tetracycline	30	0/R	0/R	18/S	21/S	17/S	8/R	0/R	12/I	0/R	24/S
氯霉素 Chloramphenicol	30	22/S	25/S	14/I	19/S	26/S	22/S	28/S	22/S	26/S	21/S
环丙沙星 Ciprofloxacin	5	26/S	28/S	22/S	24/S	26/S	26/S	23/S	21/S	17/I	26/S
诺氟沙星 Norfloxacin	10	17/S	22/S	25/S	19/S	23/S	19/S	20/S	24/S	15/I	28/S

“S”为敏感，“I”为中度敏感，“R”为耐药；判定标准参照纸片法抗菌药物敏感试验标准（WS/T125-1999）。1~10 分别为大肠埃希菌、水生拉恩氏菌、蒙氏肠球菌、枯草芽孢杆菌、柠檬节杆菌、腐败希瓦氏菌、河生肠杆菌、成团泛菌、杀鲑气单胞菌和产酸克雷伯菌。

“S” means sensitive, “I” means intermediate, “R” means resistant; The criteria of antibiotic resistance references the standard of antibiotics susceptibility test (Kirby- Bauer method) (WS/T125-1999). 1 - 10 are *Escherichia coli*, *Rahnella aquatilis*, *Enterococcus mundtii*, *Bacillus subtilis*, *Arthrobacter citreus*, *Shewanella putrefaciens*, *Enterobacter amnigenus*, *Pantoea agglomerans*, *Aeromonas salmonicida* and *Klebsiella oxytoca*, respectively.

即为腐败希瓦氏菌(秦蕾等 2012)。产酸克雷伯菌可导致人畜患病,常引起腹泻和食物中毒(于兰等 2003,李刚山等 2009,Nemet et al. 2011)。杀鲑气单胞菌为气单胞菌属最早报道的鱼类病原菌之一,主要引起鲑科鱼类感染并引发疥疮病和溃疡病,对鱼类有严重危害(李绍戊等 2015,刘宁等 2015),目前该菌宿主范围在明显扩大,除了鲑科外的其他鱼类感染杀鲑气单胞菌已多有记述(丁雷等 2002,李健等 2003)。8 月份,青海湖斑头雁已经基本完成换羽,并开始准备冬季迁徙(Cui et al. 2011)。斑头雁在冬季迁徙时,中途会停歇在河流、湖泊和农田等地(刘冬平 2010),其粪便中携带的致病菌会对这些栖息环境造成污染,从而感染其他野生动物或家畜家禽。

对从斑头雁粪便中分离的菌株进行的药敏试验显示,水生拉恩菌、杀鲑气单胞菌和成团泛菌表现为多重耐药性,这与临床分离到的相应细菌耐药性一致(韩善桥等 2008,方毅等 2015,刘宁等 2015)。抗生素的滥用,以及农药化肥中抗生素的污染,导致耐药菌株出现并不断蔓延(Carroll et al. 2015)。从青海湖斑头雁粪便中分离到耐药菌株,可能是由于斑头雁在迁徙停歇地接触受污染的农田、垃圾等,导致其摄入含有耐药基因的细菌,并使其携带的细菌获得耐药性。而这些耐药菌株也可能随着斑头雁的迁徙,扩散到更广泛的地区,并对人类和野生动物的健康、鱼类养殖业等产业造成潜在的威胁。因此,调查斑头雁携带致病菌、条件致病菌和耐药菌株的情况,对野生动物疫病的监测与防控,以及对人类健康和野生动物的保护具有重要意义。

参 考 文 献

- Bourouiba L, Wu J, Newman S, et al. 2010. Spatial dynamics of bar-headed geese migration in the context of H5N1. *Journal of the Royal Society Interface*, 7(52): 1627–1639.
- Carroll D, Wang J, Fanning S, et al. 2015. Antimicrobial resistance in wildlife: implications for public health. *Zoonoses and Public Health*, 62(7): 534–542.
- Chen H, Smith G J D, Zhang S Y, et al. 2005. Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. *Nature*, 436(7048): 191–192.
- Cui P, Hou Y, Tang M, et al. 2011. Movement patterns of bar-headed geese *Anser indicus* during breeding and post-breeding periods at Qinghai Lake, China. *Journal of Ornithology*, 152(1): 83–92.
- Drancourt M, Berger P, Raoult D. 2004. Systematic 16S rRNA gene sequencing of atypical clinical isolates identified 27 new bacterial species associated with humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5): 2197–2202.
- Drancourt M, Bollet C, Carlioz A, et al. 2000. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(10): 3623–3630.
- Hou Y S, He Y B, Xing Z, et al. 2009. Distribution and diversity of waterfowl population in Qinghai Lake National Nature Reserve. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 34(1): 184–187.
- Hubalek Z. 2004. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. *Journal of Wildlife Diseases*, 40(4): 639–659.
- Liu J, Xiao H, Lei F, et al. 2005. Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds. *Science*, 309(5738): 1206.
- Nemet Z, Szenci O, Horvath A, et al. 2011. Outbreak of *Klebsiella oxytoca* enterocolitis on a rabbit farm in Hungary. *Veterinary Record*, 168(9): 243–243.
- Nemeth N M, Brown J D, Stallknecht D E, et al. 2013. Experimental infection of bar-headed geese (*Anser indicus*) and Ruddy Shelducks (*Tadorna ferruginea*) with a clade 2.3.2 H5N1 highly pathogenic avian influenza virus. *Veterinary Pathology*, 50(6): 961–970.
- Prosser D J, Cui P, Takekawa J Y, et al. 2011. Wild bird migration across the Qinghai-Tibetan plateau: a transmission route for highly pathogenic H5N1. *PLoS One*, 6(3): e17622.
- Reed K D, Meece J K, Henkel J S, et al. 2003. Birds, migration and emerging zoonoses: west Nile virus, Lyme disease, influenza A and enteropathogens. *Clinical Medicine & Research*, 1(1): 5–12.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4): 406–425.

- Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725–2729.
- Varslot M, Resell J, Fostad I G. 1996. Water-borne *Campylobacter* infection—probably caused by pink-footed geese. Two outbreaks in Nord-Trøndelag, Stjørdal in 1994 and Verdal in 1995. *Tidsskrift for Den Norske Legeforening*, 116(28): 3366–3369.
- 布坝南 R, 吉本斯 N: 中国科学院微生物研究所译. 1984. 伯杰氏细菌学鉴定手册. 8 版. 北京: 科学出版社, 274–675.
- 丁雷, 岳永生, 宋憬愚. 2002. 虹鳟皮肤溃烂病的病原菌研究. *淡水渔业*, 32(3): 28–30.
- 东秀珠, 蔡妙英. 2001. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 195–370.
- 方毅, 赵付菊, 张景皓, 等. 2015. 痰标本中检出一例水生拉恩菌. *检验医学*, 30(7): 774–775.
- 韩善桥, 虞积耀, 姜涛, 等. 2008. 赛江水中肠杆菌科细菌分离及耐药性监测. *中国卫生检验杂志*, 18(9): 1845–1846.
- 金红芝, 李堃宝. 2004. 人肠道微生态系统的研究进展. *自然杂志*, 26(2): 88–91.
- 孔飞, 何玉邦, 张洪峰, 等. 2011. 青海湖湿地鸭科鸟类群落结构. *动物学杂志*, 46(6): 57–64.
- 李刚山, 范泉水, 朱姝媛, 等. 2009. 云南边防部队产酸克雷伯菌生化特性与致病性研究. *中国热带医学*, 9(11): 2150–2150.
- 李健, 陈沁, 王巧全, 等. 2003. 出口渔场灭鲑气单胞菌灭鲑亚种的分离鉴定. *黑龙江畜牧兽医*, (4): 38–39.
- 李绍戊, 王荻, 连浩淼, 等. 2015. 大西洋鲑杀鲑气单胞菌无色亚种的分离鉴定和致病性研究. *水生生物学学报*, 39(1): 234–240.
- 刘冬平. 2010. 青海湖斑头雁 (*Anser indicus*) 的繁殖期活动性、迁徙路线及其与禽流感暴发的时空关系. 北京: 中国林业科学研究院博士学位论文, 54–87.
- 刘宁, 时晓, 杜迎春, 等. 2015. 患病细鳞鱼杀鲑气单胞菌的分离与鉴定. *淡水渔业*, (1): 88–92.
- 秦蕾, 张晓君, 毕可然. 2012. 一种新的异育银鲫病原——腐败希瓦氏菌. *微生物学报*, 52(5): 558–565.
- 孙富艳, 卢洪洲. 2009. 成团泛菌感染的研究近况. *中国感染与化疗杂志*, 9(5): 389–391.
- 于兰, 董捷, 赵郁, 等. 2003. 产酸克雷伯氏菌引起食物中毒 15 例报告. *武警医学*, 14(2): 108–109.
- 张国钢, 刘冬平, 江红星, 等. 2008. 禽流感发生后青海湖水鸟的种群现状. *动物学杂志*, 43(2): 51–56.
- 张俊威, 刘春婷, 吕吉燕. 2000. 水生拉恩氏菌致呼吸道感染 2 例. *黑龙江医药科学*, 23(5): 封三.
- 中华人民共和国卫生部. 2000. 纸片法抗菌药物敏感试验标准 (WS/T 125-1999). 北京: 中国标准出版社, 2–20.