

黄鳍鲷海豚链球菌的分离·鉴定及药敏试验

王汉清¹, 黄郁葱², 林潮峰¹, 齐冬梅^{1*}

(1. 广东永顺生物制药股份有限公司, 广东广州 510000; 2. 广东海洋大学水产学院, 广东湛江 524088)

摘要 [目的] 鉴定引起黄鳍鲷眼球充血、肝肾肿大等病征的病原菌。[方法] 从发病黄鳍鲷肝肾组织中分离致病菌, 并结合致病菌的形态特征、培养特性、生理生化特征及 16S RNA 基因测序进行鉴定, 测定分离菌株的半数致死量(LD₅₀); 通过药敏试验筛选对分离菌株敏感的抗生素。[结果] 经鉴定分离菌株为海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)。回归试验结果证实该分离菌株是引起此次黄鳍鲷发病的病原菌, 其对黄鳍鲷的 LD₅₀ 为 5.0×10³ CFU/g。药敏试验结果表明, 该分离菌株对头孢噻吩、头孢唑肟、头孢他啶和头孢曲松等抗菌药物有较高的敏感性。[结论] 研究结果可为黄鳍鲷海豚链球菌病的防治提供理论依据。

关键词 黄鳍鲷; 海豚链球菌; 分离; 鉴定

中图分类号 S917.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)21-0100-03

Isolation, Identification and Drug Sensitivity Test of *Streptococcus iniae* from *Sparus latus*WANG Han-qing¹, HUANG Yu-cong², LIN Chao-feng¹ et al (1. Guangdong Winsun Bio-pharmaceutical Co., Ltd, Guangzhou, Guangdong 510000; 2. Fisheries College of Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088)

Abstract [Objective] To identify the pathogen that caused bloodstream congestion, hepatorenal enlargement and other symptoms in *Sparus latus*. [Method] The pathogen was isolated from the liver and kidney tissues of diseased *S. latus*. Combined with its morphological characteristics, culture characteristics, physiological and biochemical characteristics and 16S RNA gene sequencing results, the pathogen was identified. LD₅₀ of the isolated strain was determined and the sensitive antibiotics were screened out by drug sensitivity test. [Result] The isolated strain was identified as *Streptococcus iniae*. The results of the regression test proved that the isolated strain was the pathogen that caused the disease of *S. latus*. Its LD₅₀ to *S. latus* was 1.84×10⁴ CFU/g. The results of drug sensitivity test showed that the isolated strain was highly sensitive to cefthixone, cefuroxime, ceftazidime, ceftriaxone, etc. [Conclusion] The research could provide theoretical basis for the prevention and control of *S. suis*.

Key words *Sparus latus*; *Streptococcus iniae*; Isolation; Identification

黄鳍鲷(*Sparus latus*)又名阔黑鲷, 隶属鲷亚目(Percoidae)鲷科(Sparidae)鲷属(*Sparus*), 为浅海近岸底栖鱼类, 是我国海水养殖的重要品种之一, 广泛分布于我国台湾、广东沿海、福建、浙江, 俗称黄脚立、黄墙、赤翅等^[1-3]。2017年湛江部分黄鳍鲷养殖区域暴发了以眼球充血突出、鳃盖内缘出血、剖检出现肝肾肿大及腹腔积液等症状为主要病征的疫情, 传染速度快, 死亡率较高, 给养殖户造成了巨大的经济损失。笔者对此病的病原菌开展了分离与培养, 利用生化鉴定及 16S RNA 基因测序进行比对, 测定分离菌株的 LD₅₀, 通过药敏试验筛选敏感抗生素, 旨在为黄鳍鲷的病害防治提供一定的理论依据。

1 材料与方

1.1 病料及试验鱼 病料采自湛江某养殖网箱发病黄鳍鲷; 回归感染试验所用的健康黄鳍鲷购自湛江某育苗场, 无病史, 平均体质量约 40 g, 试验前在循环养殖系统中暂养 7 d。

1.2 培养基与主要试剂 鲜血培养基、BHI 培养基、新型微生物微量生化鉴定盒, 购自广东环凯微生物科技有限公司; *Ex Taq* DNA 聚合酶、DNA Marker2000 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。

1.3 细菌分离及形态特征观察 取发病养殖场具有典型病征的濒死鱼, 无菌剪取少量肝肾组织接种于鲜血培养基上, 28℃下培养 18~24 h 后, 挑取优势菌落划线, 分别接种于 BHI 平板和鲜血培养基, 观察菌落形态, 挑取典型菌落进行

革兰氏染色并镜检。分离菌经液体培养基培养后进行菌种冻干, -80℃条件下保存。

1.4 细菌的生理生化鉴定 参照海豚链球菌的常规生理生化指标进行鉴定^[4], 测定项目包括葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇、蔗糖、海藻糖、松三糖、淀粉、山梨醇、阿拉伯糖、棉子糖、木糖、水杨苷、VP 试验、过氧化氢酶、鸟氨酸和赖氨酸等微量生化反应。

1.5 系统发育学分析 使用细菌 16S RNA 基因的通用引物进行 PCR 扩增, 参考朱飞舟等^[5]的方法。16S RNA 基因扩增的正向引物(27F)为 AGAGTTTGATCCTGGCTCAG, 反向引物为 ACGGCTACCTGTTCAGACTT。PCR 反应体系(50 μL)如下: *Ex Taq* DNA 聚合酶(5U/μL, 含 Mg²⁺) 0.5 μL、10×PCR 缓冲液 5 μL、dNTP 4 μL、10 μmol/L 正向引物 1 μL、10 μmol/L 反向引物 1 μL、DNA 模板 1 μL、37.5 μL ddH₂O。PCR 反应条件如下: 94℃ 5 min; 94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 90 s, 共 32 个循环; 72℃ 延伸 7 min。PCR 产物采用 Gel Extraction Kit 回收后, 送交上海生工进行测序, 测序结果经 Blast 分析后, 构建基因进化树。

1.6 毒力测定 将试验黄鳍鲷(平均体质量约 40 g)分为 5 个浓度梯度的攻毒组和 1 个对照组, 每组试验鱼 20 尾。将试验黄鳍鲷饲养在循环式养殖系统中, 水温控制在 30℃, 攻毒后饲养观察 7 d, 每天记录其游动、进食及死亡的情况。攻毒组剂量分别为 1.0×10³、1.0×10⁴、1.0×10⁵、1.0×10⁶ 和 1.0×10⁷ CFU/尾, 每尾腹腔注射 0.1 mL; 对照组注射 PBS, 每尾腹腔注射 0.1 mL。对死亡试验鱼进行剖检, 利用改良寇氏法计算出该菌株的半数致死量(LD₅₀)。

作者简介 王汉清(1989—), 男, 安徽蒙城人, 硕士, 从事动物病害研究及疫苗开发工作。* 通讯作者, 副研究员, 博士, 从事疫苗开发及科研管理工作。

收稿日期 2018-05-20; 修回日期 2018-05-23

1.7 药敏试验 采用纸片扩散法(K-B法)^[6]进行药敏试验。将新鲜培养菌液均匀涂布于BHI平板上,取妥布霉素等28种常见抗生素药敏纸片均匀贴于平板表面,置于28℃培养箱中培养18~24h,测量记录平板上抑菌圈直径。

2 结果与分析

2.1 发病症状与流行情况 发病鱼水面打转、眼球充血突出,鳃盖内缘出血,鳍基出血,肛门发红,鳃贫血;解剖腹腔有腹水,肝肾肿大、充血;肠道充血,内有透明积液;脑部充血或出血。该病于5月份开始发病,流行范围广,传染性强,发病率和死亡率高,6—7月水温升高至30℃以后死亡率为50%~80%,给养殖业造成严重的经济损失。

2.2 分离菌的形态特征 从患病鱼的溃疡分离到1株优势菌株,命名为ALZJ07株。在BHI培养基上28℃培养24h的菌落呈乳白色、表面光滑、圆形,中央隆起,直径约0.7mm(图1);在新鲜血琼脂平板上28℃下培养24h的菌落呈β溶血、圆形、表面光滑的露珠样,直径约0.7mm(图2)。革兰氏染色镜检呈革兰氏阳性球菌,多数呈链状排列,亦有单个或成对排列。

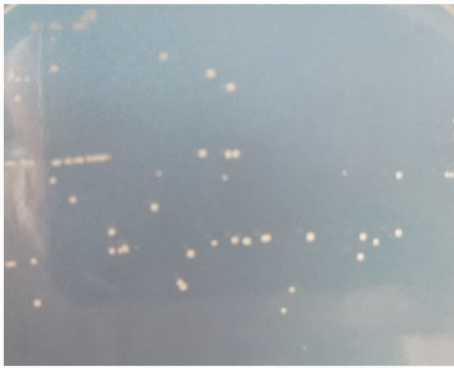


图1 BHI平板上的菌落形态

Fig. 1 Colony morphology on BHI plate

2.3 分离菌的生理生化特性 由表1可知,ALZJ07菌株可发酵葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇、蔗糖、海藻糖、松三糖和淀粉,不发酵山梨醇、阿拉伯糖、棉子糖、木糖、水杨苷,VP试验、过氧化氢酶反应和H₂S反应呈阴性,鸟氨酸和赖氨酸呈

阴性,精氨酸双水解酶显示为阳性等,基本符合海豚链球菌的生化特性。

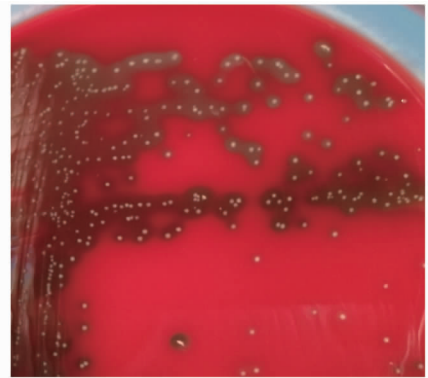


图2 鲜血培养基上的菌落形态

Fig. 2 Colony morphology on blood agar medium

2.4 系统发育树分析 为进一步确定该分离菌株ALZJ07的分类地位,测定其16S RNA的序列。经过Blast分析发现,ALZJ07与海豚链球菌的序列同源性在99%以上,根据测定ALZJ07所得的16S RNA基因序列与相关属种16S RNA基因序列构建系统发育树,可见ALZJ07与海豚链球菌聚为一支(图3),说明其与海豚链球菌的亲缘关系最近,可将ALZJ07确定为海豚链球菌。

表1 ALZJ07菌株的生理生化试验结果

Table 1 Physiological and biochemical test results of ALZJ07 strain

测定项目 Determination item	结果 Result	测定项目 Determination item	结果 Result
葡萄糖 Glucose	+	阿拉伯糖 Arabinose	-
甘露醇 Mannitol	+	淀粉 Starch	+
蔗糖 Sucrose	+	半乳糖 β-Galactose	-
松三糖 Melzitose	+	精氨酸 Arginine	+
山梨醇 Sorbitol	-	海藻糖 Trehalose	+
水杨苷 Salicin	-	鸟氨酸 Ornithine	-
棉子糖 Raffinose	-	赖氨酸 Lysine	-
木糖 Xylose	-	V-P	-
乳糖 Lactose	+	H ₂ S	-
麦芽糖 Maltose	+	过氧化氢酶 Catalase	-

注:“+”表示阳性;“-”表示阴性

Note:“+” stands for positive;“-” stands for negative

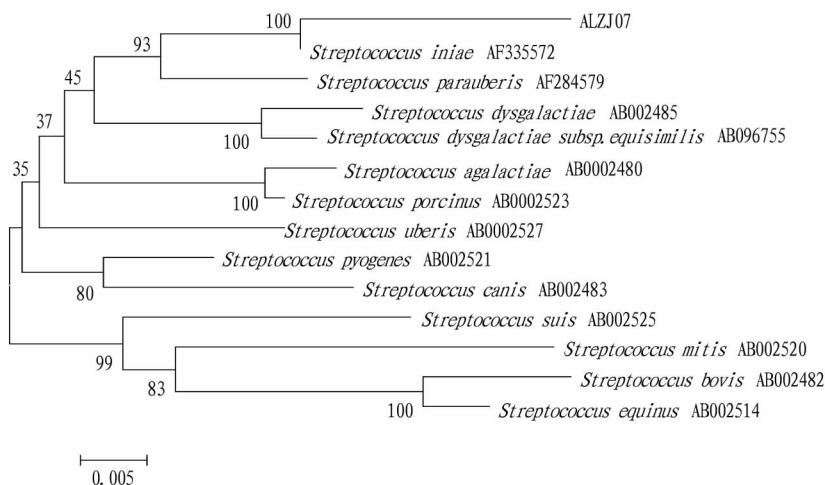


图3 基于16S RNA序列的系统发育树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis based on 16S RNA sequences

2.5 毒力测定 根据攻毒后试验鱼死亡统计结果,进行LD₅₀测定,测定结果见表2。根据测定结果,计算出ALZJ07菌株的LD₅₀为5.0×10³ CFU/g。对发病死亡的试验鱼进行外观检查和剖检,主要病变为鳃盖内缘出血,鳍基出血;解剖腹腔有腹水,肝肾肿大,肠道充血,内有透明积液。

2.6 药敏试验结果 采用纸片扩散法测定了病原株ALZJ07对28种不同药物的敏感性。由表3可知,分离菌株ALZJ07对头孢噻吩、头孢呋辛、头孢他啶、呋喃妥因、头孢曲松、左氟沙星、头孢唑酮、青霉素G、克林霉素、麦迪霉素、头孢唑林、四环素、氯霉素、氨苄西林、克拉霉素、氧氟沙星等高度敏感;ALZJ07对大观霉素、环丙沙星、诺氟沙星等中度敏感;对妥布霉素、卡那霉素、链霉素、多黏菌素B、阿米卡星、万古霉

素、庆大霉素、氨基曲南、复方新诺明等耐药。

表2 病原株ALZJ07对黄鳍鲷的半数致死量(LD₅₀)

Table 2 LD₅₀ of pathogen strain ALZJ07 to *S. latus*

菌液浓度 Concentration of bacteria solution CFU/尾	接种鱼数量 Number of inoculated fishes//尾	死亡鱼数量 Number of dead fishes 尾	存活鱼数量 Number of living fishes 尾	死亡率 Death rate %
1×10 ⁷	20	20	0	100
1×10 ⁶	20	17	3	85
1×10 ⁵	20	10	10	50
1×10 ⁴	20	7	13	35
1×10 ³	20	0	20	0
0	20	0	20	0

表3 病原菌株ALZJ07的药敏试验结果

Table 3 The drug sensitivity test results of pathogen strain ALZJ07

序号 No.	抗生素名称 Name of antibiotics	抑菌圈直径 Diameter of bacteriostatic circle/mm	敏感性 Sensitivity	序号 No.	抗生素名称 Name of antibiotics	抑菌圈直径 Diameter of bacteriostatic circle/mm	敏感性 Sensitivity
1	妥布霉素	15	R	15	庆大霉素	14	R
2	卡那霉素	16	R	16	大观霉素	18	I
3	链霉素	13	R	17	克林霉素	31	S
4	头孢噻吩	38	S	18	环丙沙星	23	I
5	多粘菌素 B	11	R	19	氨基曲南	13	R
6	头孢呋辛	40	S	20	麦迪霉素	26	S
7	头孢他啶	28	S	21	头孢唑林	35	S
8	呋喃妥因	26	S	22	四环素	24	S
9	头孢曲松	41	S	23	氯霉素	28	S
10	左氟沙星	30	S	24	氨苄西林	37	S
11	阿米卡星	12	R	25	复方新诺明	21	R
12	头孢唑酮	37	S	26	诺氟沙星	21	I
13	青霉素 G	30	S	27	克拉霉素	31	S
14	万古霉素	21	R	28	氧氟沙星	29	S

注:S表示敏感,I表示中度敏感,R表示耐药

Note:S stands for sensitive;I stands for intermediately sensitive;R stands for resistant

3 结论与讨论

笔者通过对分离菌株的培养特性、形态学特征、生理生化特性、16S RNA 测序分析,确定该分离菌株为海豚链球菌。1976年从患皮肤脓肿的亚马逊淡水海豚中首次分离出海豚链球菌,20世纪90年代后虹鳟、蓝子鱼、罗非鱼、条纹鲈、金头鲷和牙鲆等20多种养殖和野生鱼类中均有海豚链球菌的病例报道,认为其为引起鱼类链球菌病的主要病原菌^[7-12]。

人工感染试验表明,分离菌株通过腹腔注射攻毒感染黄鳍鲷,感染后死亡率较高,当攻毒剂量大于1×10⁷ CFU/尾时,试验鱼的死亡率达到100%,表明分离菌株具有较强的毒力,攻毒发病试验鱼与养殖现场观察到发病黄鳍鲷病征一致,主要病征符合海豚链球菌感染的特征^[13]。这说明该分离菌为引发疫情的病原菌。

药敏试验结果表明,分离菌株ALZJ07对妥布霉素、卡那霉素、链霉素、多黏菌素B、阿米卡星、万古霉素、庆大霉素、氨基曲南、复方新诺明等多种抗生素耐药。由于水产养殖中大量使用抗生素进行疫病的防治,导致病原菌耐药性日益增

强,应该严格控制水产养殖中过度使用抗生素。沈锦玉等^[14]应用海豚链球菌疫苗在大黄鱼上获得良好的免疫效果,海豚链球菌病的防治可以采用疫苗、有益微生物和生态防病等综合措施。

参考文献

- [1] 朱元鼎,张春霖,成庆泰. 东海鱼类志[M]. 北京:科学出版社,1963:315-316.
- [2] 许波涛. 海水养鱼的优良品种——黄鳍鲷[J]. 海洋科学,1983,7(1):57-58.
- [3] 朱丽敏,吴泽阳,张俊,等. 黄鳍鲷细菌性溃疡病致病菌研究[J]. 湛江海洋大学学报,1998,18(2):5-9.
- [4] 房海,陈翠珍,张晓君. 水产养殖动物病原原细菌学[M]. 北京:中国农业出版社,2010:609-610.
- [5] 朱飞舟,陈利玉,陈汉春. 16S rRNA 基因序列分析法鉴定病原细菌[J]. 中南大学学报(医学版),2013,28(10):1035-1041.
- [6] 李云章. 兽医专业毕业实习指导[M]. 北京:中国农业出版社,2013:73-74.
- [7] 殷战,徐伯亥. 鱼类细菌性疾病的研究[J]. 水生生物学报,1995,19(1):76-83.
- [8] WEINSTEIN M R, LITT M, KERTESZ D A, et al. Invasive infections due to a fish pathogen, *Streptococcus iniae*[J]. N Engl J Med, 1997, 337(9): 589-594.

(下转第112页)

本。白志民等^[7]用2%~3%味精菌体蛋白饲喂生长猪后,其饲喂效果显著,生长性能较好,可提高饲料利用率。江绍安等^[8]研究发现,在生长育肥猪日粮中添加3%~4%单细胞蛋白(替代25.0%~33.3%的豆粕蛋白)可提高日增重,降低饲料消耗和饲养成本,减少疾病发生率。Øverland等^[9-10]研究发现,育肥猪日粮中添加部分单细胞蛋白饲料可以显著改善猪肉的脂肪质量,降低冷冻储存中猪肉的脂质氧化速率,并提高猪肉的感官质量。陈娟等^[11]研究发现日粮中添加5%的酿酒酵母培养物可提高育肥猪生长性能,改善肌肉肉质,缓解高温应激对育肥猪生长造成的不利影响。

益生菌能将鸡粪中的非蛋白氮转化为菌体蛋白,从而提高粗蛋白的消化吸收率和真蛋白质含量,并有效降解粗纤维,改善饲料的适口性^[12-13]。该试验发现鸡粪发酵物15%替代常规配合饲料的料肉比最好,但30%鸡粪发酵物替代常规配合饲料的试验组料肉比与常规配合饲料(对照组)基本相当,说明使用鸡粪发酵物替代5%~30%的常规配合饲料是可行的。微生物发酵饲料是利用微生物的新陈代谢和繁殖菌体来生产和调制的饲料,它主要是利用微生物的发酵作用改变饲料的理化性状,增加适口性及营养价值,提高消化利用率^[14-15]。自配无抗配合饲料添加试验组的料肉比明显优于对照组,发酵饲料添加比例为20%时饲喂效果最佳,可提高育肥猪的末重和平均日增重。酿酒酵母培养物能够促进育肥猪的生长,降低饲养成本,显著提高育肥猪的生产性能和养殖效益^[16-17]。该研究用10%酿酒酵母培养物替代常规配合饲料的C1组料肉比低于对照组,因此用10%酿酒酵母培养物替代常规配合饲料的方案是可行的。

研究发现,在育肥猪的日粮中添加部分发酵饲料可在一定程度上降低饲料成本^[18]。何正兴等^[19]研究表明,饲料中添加适当比例的微生物发酵饲料可提高育肥猪的经济效益。该试验结果表明,随着非粮型单细胞蛋白饲料加量的增大,饲料成本明显降低。从毛利润来看,A2和B2组毛利润分别为423.59元和488.87元,说明在育肥猪的日粮中添加一定量的微生物发酵饲料能够明显降低饲料成本,提高经济效益。

4 结论

(1)将非粮型单细胞蛋白饲料添加到育肥猪日粮中,对育肥猪的生长性能等无不良影响,适当添加可有效降低饲养成本,在家畜日粮中完全可以代替部分蛋白质饲料使用,添加比例以5%~30%为宜。从解决人畜争粮问题、发展生态养

殖、节约粮食、降低饲养成本和增加经济效益的角度考虑,非粮型单细胞蛋白饲料具有很好的开发潜力和推广前景。

(2)自配无抗配合饲料添加试验组的料肉比明显优于对照组,且毛利润显著增加,说明在育肥猪的日粮中添加一定量的微生物发酵饲料能够明显降低饲料成本,提高经济效益,而且也证实无抗养殖是可行的。

(3)用10%酿酒酵母培养物替代常规配合饲料,可以节约饲料成本,降低料肉比,提高经济效益。

参考文献

- [1] 马纯艳,王升厚. 菌糠单细胞蛋白饲料生产技术研究[J]. 食用菌, 2005,27(3):56-58.
- [2] 李德允,李文奎,汪淳锡,等. 鸡粪配合饲料对猪的育肥效果[J]. 延边大学学报,1997,19(3):182-183,196.
- [3] 张发明. 乌梅生物活性部位初步筛选及有效成分结构解析[D]. 北京: 中国农业大学,2009.
- [4] 杨阳. 肉桂酸和香豆素类衍生物的合成及其抗氧化性能的研究[D]. 长春: 吉林大学,2014.
- [5] 许家玉. 乌梅散加地方治疗猪传染性胃肠炎效果研究[J]. 安徽农学通报,2016,22(8):107-110.
- [6] 刘奎,童晓莉,王永才,等. 味精菌体蛋白替代豆粕对生长猪生产性能的影响[J]. 饲料工业,2009,30(5):38-39.
- [7] 白志民,白成军,郑伟. 味精蛋白在饲料中的应用[J]. 养殖技术顾问, 2006(5):17.
- [8] 江绍安,夏晨. 菌体蛋白粉在生长肥育猪日粮中的应用试验[J]. 饲料工业,2005,26(3):38-39.
- [9] ØVERLAND M, KJOS N P, OLSEN E, et al. Changes in fatty acid composition and improved sensory quality of backfat and meat of pigs fed bacterial protein meal[J]. Meat Sci, 2005,71(4):719-729.
- [10] ØVERLAND M, SKREDE A, MATRE T. Bacterial protein grown on natural gas as feed for pigs[J]. Animal Sci, 2001,51(2):97-106.
- [11] 陈娟,吕常旭,李双全,等. 高温环境下酵母培养物对育肥猪生长性能及肉品质的影响[J]. 饲料博览,2017(7):1-5.
- [12] 郭苏晓,肖正中. 复合益生菌对鸡粪饲料发酵效果的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医,2016(7):184-185.
- [13] 张紫薇,卜棚,陈月丽,等. 复合益生菌制剂在杜陆二元杂种猪中的应用效果[J]. 饲料研究,2017(16):1-6.
- [14] 周映华,胡新旭,卞巧,等. 无抗发酵饲料对生长育肥猪生长性能、肠道菌群和养分表观消化率的影响[J]. 动物营养学报,2015,27(3):870-877.
- [15] 何佳,李慧,曾新福,等. 复合益生菌对断奶仔猪生长性能、粪便微生物菌群和免疫功能的影响[J]. 饲料研究,2017(18):21-24.
- [16] SCHEUERMANN S E. Effect of the probiotic Paciflor® (CIP 5832) on energy and protein metabolism in growing pigs[J]. Animal feed science and technology, 1993,41(3):181-189.
- [17] 张丽,丁宏标. 酵母培养物、枯草芽孢杆菌和木瓜蛋白酶对保育猪生长性能、营养物质表观消化率和粪便微生物数量的影响[J]. 动物营养学报,2016,28(11):3642-3649.
- [18] 赵会英,杨在宾,王功赢,等. 日粮中添加发酵饲料对妊娠后期母猪和育肥猪生产性能的影响和效益分析[J]. 山东畜牧兽医,2013,34(5):13-14.
- [19] 何正兴,单昊书,凌方正,等. 微生物发酵蛋白饲料对肥育猪生产性能、猪肉品质及经济效益的试验分析[J]. 农业装备技术,2010,36(3):63-64.
- [10] Int J Syst J Syst Bacteriol, 1976,26(4):545-553.
- [12] ELDAR A, PERL S, FRELIER P E, et al. Red drum *Sciaenops ocellatus* mortalities associated with *Streptococcus iniae* infection [J]. Dis Aquat Org, 1999,36(2):121-127.
- [13] EVANS J J, SHOEMAKER C A, KLESJUS P H. Distribution of *Streptococcus iniae* in hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) following naive inoculation [J]. Aquaculture, 2001,194(3/4):233-243.
- [14] 沈锦玉,许文军,尹文林,等. 哈维氏弧菌灭活疫苗在养殖大黄鱼中的应用与评价[J]. 大连海洋大学学报,2010,25(3):210-213.

(上接第102页)

- [9] ELDAR A, BEJERANO Y, BERCOVIER H. *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile*: Two new streptococcal species causing a meningoen cephalitis in fish [J]. Curr Microbiol, 1994,28(3):139-143.
- [10] PERERA R, JOHNSON S, COLLINS M, et al. *Streptococcus iniae* associated with mortality of *Tilapia nilotica* and *T. aurea* hybrids [J]. Journal of aquatic animal health, 1994,6(4):335-340.
- [11] PIER G, MADIN S. *Streptococcus iniae* sp. nov., a beta-hemolytic streptococcus isolated from an Amazon fresh water dolphin, *Inia geoffrensis* [J].