

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(4):542-547; 4 April 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

患溃烂症的眼斑拟石首鱼分离的灿烂弧菌的鉴定

马爱敏^{1,2}, 闫茂仓^{1,2}, 胡利华^{1,2}, 谢起浪^{1,2*}, 陈少波^{1,2}, 单乐州^{1,2}, 邵鑫斌^{1,2}

(¹ 浙江省海洋水产养殖研究所, 温州 325005)

(² 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室, 温州 325005)

摘要:【目的】从患溃烂症的眼斑拟石首鱼分离到优势菌株 M-1, 并进一步对该菌的系统发育学进行了分析。【方法】采用形态学、生理生化鉴定, 结合 16S rRNA 和 HSP60 基因序列分析。【结果】16S rRNA 基因同源性分析, 菌株 M-1 与灿烂弧菌 (AJ874361、AY046955) 聚为一群; HSP60 基因 (groES) 序列分析表明 M-1 与弧菌 (EU653883、AY837440) 聚为一个分支。【结论】菌株 M-1 属于灿烂弧菌 (*Vibrio splendidus*)。

关键词: M-1 菌株; 致病性; 16S rRNA 基因; HSP60 基因; 灿烂弧菌

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 04-0542-06

弧菌是近海特别是海水养殖环境中最常见的优势细菌类群之一, 其中的一些种不仅是人类也是海水养殖动物最常见的病原菌^[1]。对于这些细菌的鉴定, 目前多采用以生理生化特征为主的表型鉴定方法, 但表型鉴定方法相对耗时, 准确性也不高。随着分子生物学的发展, 现代细菌分类鉴定方法从只依赖表型方法到表型结合基因型方法, 16S rRNA 基因同源性分析已成为细菌分类鉴定中最常用的分子鉴定方法, 但对一些亲缘关系密切的细菌难以用此方法有效区分, 还需借助其它基因型方法。HSP60 基因 (groES) 是高度保守的管家蛋白——分子伴侣蛋白编码基因, 其进化速度相对 16S rRNA 基因更快, 在系统进化中高度保守, 并在不同种间具有足够的多态性, 适合用于细菌属内菌株的鉴定^[2-3]。

眼斑拟石首鱼 (*Sciaenops ocellatus*) 又名红拟石首鱼, 属鲈形目 (Perciformes)、石首鱼科 (Scuabudae)、拟石首鱼属 (*Sciaenops*)。因其生长速度快, 对环境适应性强, 易于养殖, 成为浙江、福建等省主要养殖鱼类之一^[4]。近年来由于养殖规模

的扩大和养殖密度的提高, 眼斑拟石首鱼的病害日趋严重, 2007 年我们从浙江省乐清湾网箱养殖的患溃烂症的眼斑拟石首鱼分离到优势菌株 M-1, 回接实验证明该菌对眼斑拟石首鱼具有致病性, 发病鱼主要特征为: 鱼体两侧, 特别是靠近尾部有出血点, 皮肤腐烂, 严重的形成溃疡; 背鳍、胸鳍、尾鳍的鳍条基部充血; 肝脏肿大, 糜烂; 肾脏糜烂。本文采用常规生理生化方法对 M-1 菌株进行了分类鉴定, 并进一步通过测定其 16S rRNA 和 groES 序列, 进行了该菌的系统发育学分析。旨在探讨眼斑拟石首鱼溃烂症的病原, 为其病害的研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及培养基: 菌株 M-1, 分离自浙江省乐清湾网箱养殖患病眼斑拟石首鱼的溃烂组织。Zobell 2216E 海水培养基: 蛋白胨 5.0 g, 酵母浸出膏 1.0 g, FePO₄ 0.001 g, 用陈海水定容至 1000 mL, pH7.6-7.8。固体 2216E 培养及含 1.6% 琼脂。

基金项目: 浙江省科技厅科研院所专项公益技术攻关项目 (2007F10009)

* 通信作者。E-mail: xie_q12002@163.com

作者简介: 马爱敏 (1983-), 女, 河南省郑州人, 研究实习员, 主要从事鱼类病害方面的研究。E-mail: ammaaimin@163.com

收稿日期: 2009-10-18; 修回日期: 2010-01-18

TCBS 琼脂粉购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.1.2 主要试剂和仪器: Taq DNA 聚合酶, dNTP, 基因组 DNA 提取试剂盒, Ex Taq 聚合酶 PCR 反应试剂盒, 引物合成 (上海生工); 生理生化特性微量发酵管; 药敏纸片 (杭州天和及广州环凯); PCR 仪, 微量加样器 (Eppendorf 公司); S-3000N 可变电压扫描电子显微镜 (日本 HITACH 公司); 凝胶成像系统 (BIO-RAD 公司)。

1.2 人工感染试验

将菌株 M-1 接种 Zobell 2216E, 28℃ 培养 24 h 后, 用无菌生理盐水洗下, 参照麦氏比浊管调整细菌浓度为 1.5×10^8 cells/mL。健康眼斑拟石首鱼 80 尾平均分成 4 组, 其中 2 组作为试验组, 每尾鱼胸腔注射 0.2 mL 菌液; 另外 2 组作为对照组, 每尾鱼注射相同剂量的无菌生理盐水。注射后观察鱼的发病死亡情况, 并对死亡鱼及时剖检和致病菌的再次分离。

1.3 病原菌形态观察

将纯化的细菌划线接种于 Zobell 2216E 和 TCBS 平板, 28℃ 培养 24 h 后, 观察菌落特征。取 Zobell 2216E 平板 24 h 培养物, 革兰氏染色, 光学显微镜观察细菌形态。同时用无菌水洗下少量菌落, 负染, 透射电镜观察。

1.4 病原菌溶血试验

取纯化的分离菌培养物, 划线接种于 Zobell 2216E 兔血琼脂培养基上, 28℃ 培养 24 h, 观察溶血情况及兔血琼脂板上的菌落形态。

1.5 病原菌理化特性鉴定

病原菌理化特性的鉴定参照文献[5]和[6]进行。

1.6 16S rRNA 和 HSP60 基因序列测定与分析

1.6.1 PCR 模板 DNA 的制备: 细菌接种于 Zobell 2216E 液体培养基, 28℃ 摇床震荡培养 24 h。取 3 mL 菌液, 12000 r/min 离心 5 min, 弃上清。按照上海生工生物工程公司基因组 DNA 提取试剂盒的操作手册, 提取细菌基因组 DNA。

1.6.2 基因序列的 PCR 扩增与测序: 用于 16S rRNA 基因 PCR 扩增的正向引物为 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (对应于 *E. coli* 16S rDNA 的第 8-27 个碱基位置), 反向引物 1492R: 5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3' (对应于 *E. coli* 16S rDNA 的第 1492-1510 个碱基位置)^[7]。采用 Ex Taq 聚合酶 PCR 反应试剂盒进行 PCR 扩增, PCR 反应条件为: 96℃ 预变性 6 min, 94℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 完成 30 个循环后于 72℃ 延伸 6 min。

HSP60 基因 PCR 扩增的正向引物为 P1: 5'-ACAACAGCAACGGTACTAGC-3', 反向引物为 P2: 5'-CAACTTTCACGATGCCAC-3'^[8]。反应条件为: 94℃ 预变性 2 min; 接着 94℃ 30 s, 50℃ 45 s, 72℃ 60 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 7 min。

PCR 产物经琼脂糖电泳确定特异条带后, 交由上海生工生物工程公司进行 PCR 产物的纯化和序列测定。

1.6.3 序列分析与系统发育树的构建: 所测序列利用 GenBank 数据库中的 Blast 进行相似性比较。根据返回的结果, 从 GenBank 数据库选取与所分析的细菌基因序列同源性较高的已知相关序列, 采用 MEGA 4 软件进行多重序列匹配 (multiple alignments) 分析, 用 N-J 法构建系统发育树, 并通过自举分析 (bootstrap) 进行置信度检测, 自举数集 1000 次。

1.7 药物敏感实验

用比浊法和稀释涂布平板法测定菌浓度, 使菌液浓度为 $10^7 - 10^8$ cells/mL, 具体操作参照纸片法抗菌药物敏感试验操作标准^[9]。药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司, 共 17 种抗菌药物。

2 结果

2.1 人工感染试验

胸腔注射菌株 M-1 的活菌液 2-4 d 后, 实验组眼斑拟石首鱼开始发病死亡, 而对照组眼斑拟石首鱼不表现任何症状。人工感染后发病的眼斑拟石首鱼主要表现为鱼体两侧特别是靠近尾部有出血点, 皮肤腐烂, 严重的形成溃疡, 背鳍、胸鳍、尾鳍的鳍条基部充血, 肾脏、肝脏糜烂。与自然发病眼斑拟石首鱼症状和病变相似。从感染死亡鱼再次分离细菌, 获得与 M-1 形态与生理生化性状一致的菌落, 并再次感染成功, 证明所分离的细菌为眼斑拟石首鱼的致病菌。

2.2 菌株 M-1 的形态特征

菌株 M-1 在 Zobell 2216E 培养基培养 24 h 的菌落呈圆形、半透明, 表面光滑、边缘整齐, 直径约 8-10 mm; 在 TCBS 培养基上菌落呈黄色, 直径约 25-30 mm; 在血液琼脂平板上生长良好, 菌落直径稍大, 出现溶血现象 (图 1)。

菌株 M-1 革兰氏染色阴性, 杆状, 可运动; M-1 菌株细胞呈短杆状, 略显弧形, 菌体大小为 $(0.6 - 0.8) \mu\text{m} \times (1.4 - 1.7) \mu\text{m}$, 具有极生单鞭毛, 是菌体长度的 2 倍多。



图1 菌株 M-1 在血琼脂平板上的溶血环

Fig. 1 Hemolysis ring on blood agar plate.

2.3 生理生化特征

M-1 为发酵型具有运动能力的革兰氏阴性杆菌,氧化酶阳性,在 0% NaCl 胨水中不生长,8% 和 10% NaCl 胨水中能生长;能在 42℃ 生长;精氨酸双水解酶、赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶阴性;硝酸盐还原、明胶酶为阳性,ONPG、枸橼酸盐、水杨素、七叶苷、VP 为阴性,吲哚为阳性,不产生 H₂S,利用葡萄糖产酸,不利用肌醇、蔗糖、甘露糖和阿拉伯糖。其生理生化性状见表 1。

由表 1 可以看出,M-1 菌株除 MR 反应阳性和 β-半乳糖苷酶阴性外,其它生理生化指标与灿烂弧菌生物 II 型完全符合。

表 1 菌株 M-1 的生理生化特征

Table 1 Biochemical and physiological characteristics of strain M-1

Item	Strain M-1	<i>Vibrio splendidus</i>		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
		biotype I	biotype II		
Gram stain	-	-	-	-	-
Flagella	m	m	m	m	m
Motility	+	+	+	-	-
Oxidation/Fermentation	F	/	/	F	F
Oxidase	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+
Sensitivity to O/129 (10ug)	S	S	S	S	S
Sensitivity to O/129 (150ug)	S	S	S	S	S
Growth on TCBS	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow
Growth at 4℃	+	+	+	-	-
Growth at 35℃	+	+	+	+	+
Growth at 42℃	+	+	+	/	d
Growth on 0% NaCl	-	-	-	-	+
Growth on 1% NaCl	+	+	+	+	+
Growth on 3% NaCl	+	+	+	+	+
Growth on 6% NaCl	+	d	+	+	+
Growth on 8% NaCl	+	+	+	+	-
Growth on 10% NaCl	+	+	+	d	-
Lysine decarboxylase	-	-	-	+	+
Arginine decarboxylase	-	/	/	+	+
Ornithine decarboxylase	-	-	-	+	+
Arginine dihydrolase	-	+	-	-	-
Sucrose	-	d	-	d	+
Mannitol	-	-	-	+	+
Glucose	+	+	+	+	+
Arabinose	-	-	-	d	-
Lactose	-	-	-	-	-
Cellobiose	-	+	d	-	-
Mannitol	-	+	-	+	+
Inositol	-	-	-	-	-
Salicin	-	-	-	-	-
Citrate	-	-	-	+	d
Voges - Proskauer reaction	-	-	-	-	+
Methylred reaction	+	-	-	d	d
Indole Production	+	+	+	+	+
H ₂ S production	-	-	-	-	-
Potassium cyanide	-	/	/	-	-
Urease	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	+	+	+	+	+
Esculin	-	-	-	/	/
β - galactosidase	-	+	+	/	/
Gelatinase	-	-	-	+	+

“+” positive reaction;“-” negative reaction;“m” monotrichous;“S” sensitivity;“F” fermentation;“d” uncertainty.

2.4 基因序列与系统发育树的构建

经通用引物 27F 和 1492R 所扩增的 16S rRNA 基因序列, 除去引物结合区, 长度为 1456 bp (GenBank 登录号: EU931031)。将菌株 M-1 的 16S rRNA 基因序列用 Blast 在国际互联网上进行检索,

发现其与弧菌属的 16S rRNA 基因序列聚为一群, 从同源性较高的序列中选取典型的序列进行系统发育学分析, 结果显示 (图 2), 菌株 M-1 与 *V. splendidus* (AJ874361) 和 *V. splendidus* (AY046955) 聚合。

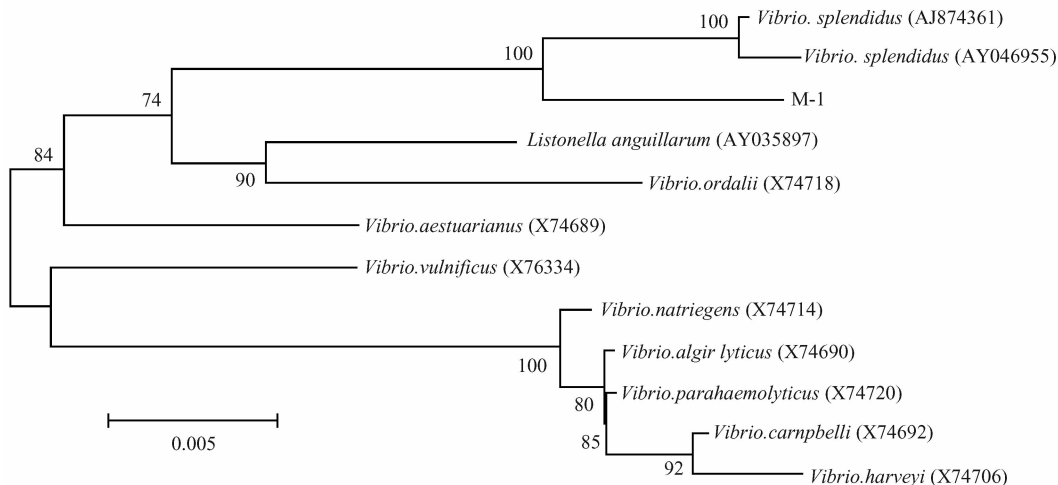


图 2 根据分离菌株 M-1 的 16S rRNA 基因序列绘制的系统发育树

Fig.2 Establishment of phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences of selected *Vibrio* sp. Strains. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The scale bar corresponds to 0.005 substitutions per nucleotide position. The numbers at the nodes indicate the levels of bootstrap support (%) based on 1000 resample data sets.

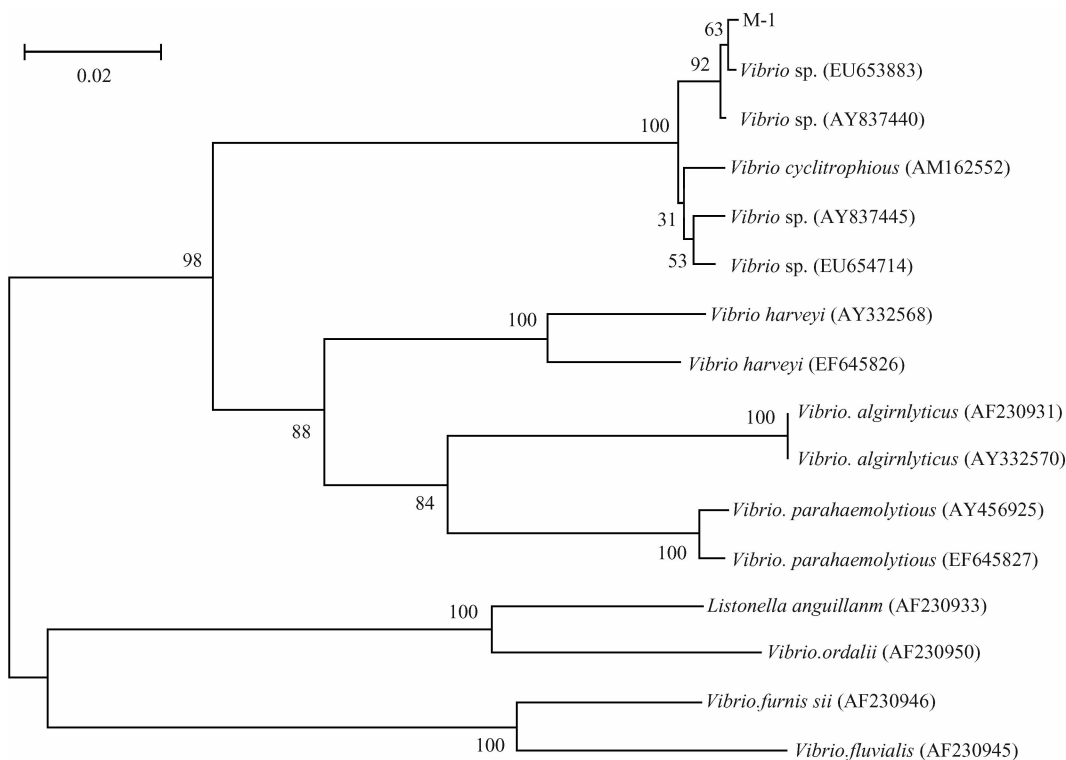


图 3 根据分离菌株 M-1 的 HSP60 基因序列绘制的系统发育树

Fig.3 Establishment of phylogenetic tree based on the HSP60 gene sequences of selected *Vibrio* sp. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The scale bar corresponds to 0.02 substitutions per nucleotide position. The numbers at the nodes indicate the levels of bootstrap support (%) based on 1000 resample data sets.

经引物 P1 和 P2 扩增到的菌株 M-1 的 HSP60 基因部分序列长度为 562 bp (GenBank 登录号: EU931030)。Blast 分析显示,与该基因序列同源性较高的 100 个序列全部是弧菌属细菌的 HSP60 基因序列。系统发育树结果表明(见图 3),该菌株与 *Vibrio sp.* (EU653883) 同源性最高,且聚为一个分支。综合菌株 M-1 的生理生化特征和 16S rRNA、HSP60 基因序列分析结果,将致病菌 M-1 鉴定为灿烂弧菌。

2.6 药物敏感实验

药敏实验结果(表 2)显示,菌株 M-1 对菌必治、复方新诺明、先锋必等 9 种药物敏感,对青霉素 G、利福平、四环素等有抗性。

表 2 M-1 菌株的药物敏感试验结果

Table 2 Sensitivity of strain M-1 to antibiotics

Antibacterial agents	content of per piece / μg	diameter of inhibiting ring/mm	sensitivity
Amikacin	30	16	I
Norfloxacin	10	17	S
Rifampicin	5	10	R
Cefalotin	30	22	S
Cefradine	30	22	S
Nitrofurantoin	30	16	I
Ceftriaxone	30	33	S
Cefobid	75	29	S
Streptomycin	10	20	S
Gentamicin	10	19	S
Cefalexin	30	18	I
Benzylpenicillin G	10	8	R
Tetracycline	30	11	R
Neomycin	30	19	I
Kanamycin	30	15	I
Ampicillin	10	24	S
trimethoprim-sulfamethoxazole	23.5/1.25	32	S

R: resistant; S: sensitive; I: midrange

3 讨论

本研究从患溃烂症的眼斑拟石首鱼分离到一株革兰氏阴性短杆菌(M-1),经人工感染试验证实对健康眼斑拟石首鱼有较强致病和致死作用,而且感染病鱼的症状与自然发病鱼的症状相同,因此证实该菌为其致病菌。

该菌的形态学特征和生理生化特性与灿烂弧菌非常相似,但由于其 MR 反应阳性和 β -半乳糖苷酶反应阴性,与灿烂弧菌生物 II 型标准菌株存在一定的差异,这可能是由于不同菌体之间的个体差异造成的。我们采用一对通用引物扩增出了该菌的 16S rRNA 基因片段,并进行了序列分析,将所获得 16S

rRNA 基因序列与 GenBank 数据库中已知的微生物 16S rRNA 基因序列进行同源性比对和系统发育分析,结果表明该菌的 16S rRNA 基因序列与灿烂弧菌 16S rRNA 基因序列的同源性最高,且在系统发育树上与灿烂弧菌菌株聚成一簇。

热激蛋白(heat shock protein, HSP)是另一类常用于细菌亲缘关系和分类研究的大分子物质,广泛存在于细菌及真核生物细胞中,其主要功能是作为分子伴侣参与蛋白质肽链折叠和组装,进化速度比 16S rRNA 快,本实验以 HSP60 基因构建的系统发育树,菌株 M-1 与弧菌属细菌聚为一簇。由于目前 GenBank 中尚未存在灿烂弧菌 HSP60 基因序列,所以无法确切比对。结合菌株 M-1 的形态、生理生化特性,16S rRNA 基因和 HSP60 基因序列结果,从而可确切鉴定该菌为灿烂弧菌。

灿烂弧菌分为生物 I 型和生物 II 型,2 种生物型都具有致病性。近年来由灿烂弧菌造成的水产动物病害也频频出现。张春云等^[10]首次揭示了灿烂弧菌导致养殖刺参大规模死亡;王印庚等^[11]报道灿烂弧菌是患烂胃病仿刺参耳状幼体的致病原之一;在养殖鱼类中,灿烂弧菌致病的实例已有多次报道, Gatesoupe 等^[12]用 6 株从大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 幼体中分离出的灿烂弧菌可以引起大菱鲆很高的死亡率。在西班牙西北部加利西亚省报道的养殖大菱鲆嘴部出血病,病原鉴定为灿烂弧菌生物 I 型^[13]。在中国,莫照兰等^[14]把患腹水症的牙鲆苗中分离的病原菌鉴定为灿烂弧菌生物 II 型,该病原菌导致牙鲆苗明显的病变和死亡。然而,灿烂弧菌导致眼斑拟石首鱼致病尚属首次报道。

对 17 种药物的敏感试验结果表明,菌株 M-1 对菌必治、复方新诺明、先锋必等 9 种药物敏感,对青霉素 G、利福平、四环素等有抗性,这对眼斑拟石首鱼的灿烂弧菌病的合理用药提供了依据。但在养殖生产中为了更有效地控制该病的发生与流行,需对该菌的生物类型和致病机理等问题进一步深入研究,以制定出科学、合理的防治措施。

参考文献

- [1] Thompson F L, Iida T, Swings J. Biodiversity of *Vibrios*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68 (3): 403-431.
- [2] 石存斌, 胡学峰, 李宁求, 等. 哈维氏弧菌 SpGY020601 株的鉴定和生物学特性分析. *水产学报 (Journal of Fisheries of China)*, 2004, 28(增刊): 117-123.

- [3] Goh S H, Wood J O. HSP60 gene sequences as universal targets for microbial species identification; studies with coagulase-negative staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996, 34(4): 818-823.
- [4] 陆丹霞. 美国红鱼的生物学特性、人工育苗及病害防治技术. *海洋渔业 (Marine Fisheries)*, 2003, 25(1): 34-36.
- [5] RE Buchanan, NE Gibbons. 伯杰细菌鉴定手册第八版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [6] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [7] 莫照兰, 茅云翔. 一株牙鲆出血症病原菌的分子生物学鉴定. *高技术通讯 (High Technology Letters)*, 2001, 11(12): 12-17.
- [8] 张伟妮, 周丽, 邢婧, 等. 养殖大菱鲆腹水症病原菌 SR1 的分离及鉴定. *中国水产科学 (Journal of Fishery Sciences of China)*, 2006, 13(4): 603-609.
- [9] 娄永新. 临床细菌检验与质量控制. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1987, 120-122.
- [10] 张春云, 王印庚, 荣小军. 养殖刺参腐皮综合征病原菌的分离与鉴定. *水产学报 (Journal of Fisheries of China)*, 2006, 30(1): 118-123.
- [11] 王印庚, 孙素凤, 荣小军. 仿刺参幼体烂胃病及其致病病原鉴定. *中国水产科学 (Journal of Fishery Sciences of China)*, 2006, 13(6): 908-916.
- [12] Lupiani B, Dopazo C P, Ledo A, et al. New syndrome of mixed bacterial and viral etiology in cultured turbot *Scophthalmus maximus*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1989, 1: 197-204.
- [13] Gatesoupe F J, Lambert C, Nicolas J L. Pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *Journal of Applied Microbiology* 1999, 87(5): 757-763.
- [14] 莫照兰, 茅云翔, 陈师勇, 等. 养殖牙鲆鱼苗腹水症病原菌的鉴定及系统发育学分析. *海洋与湖沼 (Oceanologia Et Limnologia Sinica)*, 2003, 34(2): 131-141.

Identification of a *Vibrio splendidus* strain isolated from ill *Sciaenops ocellatus*

Aimin Ma^{1,2}, Maocang Yan^{1,2}, Lihua Hu^{1,2}, Qilang Xie^{1,2*}, Shaobo Chen^{1,2},
Lezhou Shan^{1,2}, Xinbin Shao

(¹Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou 325005, China)

(²Zhejiang Key Laboratory of Exploitation and Preservation of Coastal Bio-resource, Wenzhou 325005, China)

Abstract: [**Objective**] We isolated bacterial strain named M-1 from ill *Sciaenops ocellatus* with ulceration, and further analyzed the phylogenetics of the bacterial strain. [**Methods**] We characterized the strain on the basis of its morphology, physiology, and sequence comparison of 16S rRNA and HSP60 genes. [**Results**] Strain M-1 was identified as *Vibrio splendidus*. 16SrRNA gene of strain M-1 and *Vibrio splendidus* (AJ874361) had nearest kinship, and the analysis of HSP60 gene sequence indicated that strain M-1 and *Vibrio* (EU653883, AY837440) located in the same phylogenetic tree. [**Conclusion**] The results suggested that strain M-1 was a member of *Vibrio splendidus*.

Keywords: Strain M-1; Pathogenicity; 16S rRNA gene; HSP60 gene; *Vibrio splendidus*

(本文责编: 张晓丽)