

大黄鱼结节病病原菌—诺卡氏菌的鉴定及其系统发育分析

王国良,袁思平,金 珊

(宁波大学 生命科学与生物工程学院,浙江 宁波 315211)

摘要:一株分离自浙江台州、舟山海水网箱养殖患结节病大黄鱼(*Larimichthys crocea*)的病原菌,经生理生化试验及形态结构观察显示,该菌株革兰氏阳性,好氧,具有弱抗酸性,菌体呈长或短杆状,或细长分枝状,过氧化氢酶阳性,氧化酶阴性,还原硝酸盐,不水解酪素、黄嘌呤、酪氨酸、淀粉和明胶,能以柠檬酸盐为唯一碳源生长。对其 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增、测序和系统发育分析,结果表明,该菌株与诺卡氏菌属的菌株亲缘关系最近,与鳙鱼诺卡氏菌(*Nocardia seriolae* JCM 3360^T)的 16S rRNA 基因序列相似性达 99.9%。据此鉴定结果认为,该菌株为鳙鱼诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*)。[中国水产科学,2006,13(3):410-414]

关键词:诺卡氏菌属;鳙鱼诺卡氏菌;16S rRNA;系统发育;大黄鱼

中图分类号:Q939.13 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)03-0410-05

诺卡氏菌(*Nocardia* sp.)属于细菌域,厚壁菌门,放线细菌纲(Actinobacteria),放线菌目(Actinomycetales),诺卡氏菌科(Nocardiaceae)^[1]。一类革兰氏阳性丝状杆菌,广泛分布在土壤、活性污泥、水、动植物和人的组织中,以腐生为主。一些菌株是人和动物的机会致病菌。

在水产动物中,首例报道诺卡氏菌病的是虹彩脂鱼(*Hyphessobrycon innesi*)^[2],以后陆续发生在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[3]、黄尾鲷(*Seriola quinqueradiata*)^[4-5]、红鲈(*Oncorhynchus nerka*)^[6]、乌鳢(*Channa maculata*)^[7]、大西洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[8]、大口鲈(*Micropterus salmoides*)^[9]和海鲈(*Lateolabrax japonicus*)^[10]等水产养殖动物中,分别由星状诺卡氏菌(*N. asteroides*)^[2-3,7,9]、杀鲑诺卡氏菌(*N. salmonicida*)^[6]、粗形诺卡氏菌(*N. crassostreae*)^[8]和鳙鱼诺卡氏菌(*N. seriolae*)^[4-5,10]引起,给水产养殖造成了巨大损失。诺卡氏菌曾是日本鳙鱼养殖中最主要的病原菌之一,也是大西洋牡蛎养殖的主要病原菌之一,近年来对中国台湾水产养殖业影响较大。

本次大黄鱼(*Larimichthys crocea*)诺卡氏菌病病鱼主要发生在浙江沿海网箱养殖大黄鱼,患病对象主要为 2 龄鱼,发病季节在 9~11 月。病鱼以心、脾、肾等内脏出现大量白色结节为主要症状,结节直

径 1~3 mm。平均死亡率 15%。这是中国大陆首次在水产养殖动物中发现诺卡氏菌病,也是首次在网上箱养殖大黄鱼中发现了诺卡氏菌病。本研究主要通过 16S rRNA 基因序列相似性分析,结合形态、生理生化特性将该大黄鱼病原菌鉴定为鳙鱼诺卡氏菌(*N. seriolae*),旨在有效控制该病原菌所致大黄鱼疾病提供理论指导,而且为放线菌的开发丰富内容。

1 材料与方法

1.1 菌株及培养条件

供试菌株 H031016,分离自浙江台州、舟山海水网箱养殖患结节病大黄鱼(*Larimichthys crocea*),该菌株已通过回复感染证实为该病的病原菌。培养基为胰酪大豆琼脂(TSA)。28℃培养 7~10 d,备用。

1.2 形态结构观察及生理生化实验

1.2.1 电镜观察 将供试菌株制成菌悬液,吸取一滴置于铜网膜上,醋酸铀染色,日立 H-300 型透射电子显微镜观察。

1.2.2 生理生化实验 按照《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology》(Volume 4)^[11]、中科院微生物研究所放线菌分类组刘志恒^[12]的相应属、种鉴定有关内容和方法,对供试菌株的酶类产生、水解活性、单一碳源生长及温度耐受性进行研究。

收稿日期:2005-06-17; 修订日期:2005-09-09。

基金项目:浙江省自然科学基金项目(Y304078)、浙江省教育厅项目(20051691)。

作者简介:王国良(1955-),男,教授,从事水产动物病害研究。Tel: 0574-87600122。E-mail: wanggl@nbu.edu.cn

1.3 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

基因组 DNA 提取和 PCR 扩增参照东秀珠^[13]和姜成林^[14]的方法进行。

16S rRNA 基因 PCR 扩增引物分别为: P1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; P2: 5'-TACGCTACCTTGTTACGACTT-3'。分别对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的第 8~27 和第 1492~1514 个碱基位置。PCR 产物的回收纯化采用上海生工科技公司的 DNA 快速纯化回收试剂盒。PCR 产物直接测序, 测序工作由上海基康生物有限公司用 ABI377 DNA 自动测序仪测序。测序引物分别为: P1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; P2: 5'-TACGCTACCTTGTTACGACTT-3'; P3: 5'-GTAGGGTGCGAGCGTTG-3'; P4: 5'-GCAGTTCAGGCTCATATCC-3'; P5: 5'-CCCCGTGAAGTTGGAGTC-3'。

1.4 系统发育分析

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 数据库调用相关序列, 在 Clustalx(1.83) 程序包中进行多重序列匹配排列 (multiple alignments) 分析, 最后形成 1 个多重序列匹配排列阵, 其中形成的缺口用“-”填补, 用 N-J 法构建系统进化树, 并进行 Bootstrap 检验, 重复 1000 次。

2 结果

2.1 形态学特征

病原菌革兰氏阳性, 好氧, 具有弱抗酸性, 菌体呈长或短杆状, 或细长分枝状, 常断裂成杆状至球状体, 直径 0.2~1.0 μm , 长 2.0~5.0 μm 。可单个、成对、Y 或 V 字状排列或排列成栅状, 有假分枝, 并具膨大或棒状末端 (图 1)。不运动, 不生孢子。病原菌生长缓慢, 在 TSA、L-J 和小川培养基上 28 $^{\circ}\text{C}$, 7~10 天才能长出, 菌落呈白色或淡黄色沙粒状, 粗糙易碎, 边缘不整齐, 偶尔在表面形成皱折。该菌基丝发达、繁茂, 呈分枝状, 丝状体长 10~50 μm 。

2.2 生理生化特征

生理生化实验结果见表 1。病原菌过氧化氢酶阳性、氧化酶阴性, 产生脲酶, 还原硝酸盐, 不水解酪素、黄嘌呤、酪氨酸、淀粉和明胶, 水解七叶灵, 能以柠檬酸盐为唯一碳源生长, 具有了诺卡氏菌属基本的生理生化特征^[11], 而且与其中的鳃鱼诺卡氏菌 (*N. serioleae*) 完全相同。



图 1 患病大黄鱼病原菌的透射电镜照片 ($\times 12000$)

Fig.1 Transmission electron micrograph of pathogenic bacteria in diseased yellow croaker ($\times 12000$)

2.3 系统发育学分析

用引物 P1 和 P2 扩增菌株的 16S rRNA 基因, 共 1482 个碱基, 其序列在 GenBank 中的注册号为: AY846841。将该序列与 GenBank 中相关数据进行相似性分析。结果表明, 菌株与诺卡氏菌属的菌株亲缘关系最近, 从 95.6% 到 99.9% (表 2), 与鳃鱼诺卡氏菌 *Nocardia serioleae* JCM3360^T (Z36925) 的 16S rRNA 基因序列相似性达 99.9%, 只有 2 个碱基的差别。从 N-J 法建立的系统发育树 (图 2) 上可以看出, 该菌株与 *N. serioleae* JCM3360^T (Z36925) 位于同一个分支上, 距离非常近, 此发育分支与其他几个分支聚成 1 个集中于豚鼠耳炎诺卡氏菌 (*N. otitidiscaviarum*) 的 rRNA 亚群。据此鉴定该菌株为鳃鱼诺卡氏菌 (*Nocardia serioleae*)。

3 讨论

诺卡氏菌的分类经历了曲折的发展历程, 已由最初的以形态描述、生理生化特征为主发展到现在的多相分类。现在的诺卡氏菌属成为了 1 个均一的分类单元, 属内至少可归为 3 个 rRNA 亚群, 集中于最早描述的种, 即星状诺卡氏菌 (*N. asteroides*)、巴西诺卡氏菌 (*N. brasiliensis*) 和豚鼠耳炎诺卡氏菌 (*N. otitidiscaviarum*)^[11]。

表1 患病大黄鱼病原菌及参照菌株的生理生化特征

Tab.1 Physiological and biological characteristics of bacteria isolated from diseased yellow croaker and reference strains of *Nocardia*

	星状诺卡氏菌 <i>N. asteroides</i> ATCC19247 ^T	鳟鱼诺卡氏菌 <i>N. seriolae</i> JCM3360 ^T	杀鲑诺卡氏菌 <i>N. salmonicida</i> JCM4826 ^T	皮诺卡氏菌 <i>N. farcinica</i> ATCC3318	大黄鱼病原菌 Fob isolate H031016
过氧化氢酶(catalase)	+	+	+	+	+
氧化酶(oxidase)	-	-	-	-	-
脲酶(urea)	+	-	+	+	-
硝酸盐还原(nitrate)	+	+	+	+	+
水解(decomposition of):					
七叶灵(aesculin)	+	+	+	+	+
明胶(gelatin)	-	-	-	-	-
淀粉(starch)	-	-	-	-	-
酪素(casein)	-	-	-	-	-
黄嘌呤(xanthine)	-	-	-	-	-
酪氨酸(tryptone)	-	-	+	-	-
惟一碳源利用(growth on sole carbon sources):					
甘露醇(mannitol)	-	-	+	-	-
阿拉伯糖(arabinose)	-	-	-	+	-
山梨醇(sorbitol)	-	-	+	-	-
柠檬酸盐(citrate)	+	+	+	-	+
在45℃下生长(growth at 45℃)	-	-	-	+	-

注: "+"—阳性; "-"—阴性。

Note: "+" Positive; "-" Negative.

表2 病原菌与14株诺卡氏菌的16S rRNA基因序列相似性

Tab.2 Homology matrix of strain H031016 and 14 sequences of reference strains of *Nocardia*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
H031016	1	100%														
<i>N. seriolae</i>	2	99.9%	100%													
<i>N. brasiliensis</i>	3	96.4%	96.3%	100%												
<i>N. farcinica</i>	4	95.8%	95.7%	98.0%	100%											
<i>N. transvalensis</i>	5	96.2%	96.2%	97.6%	97.8%	100%										
<i>N. asteroides</i>	6	96.9%	96.8%	97.7%	97.6%	97.3%	100%									
<i>N. salmonicida</i>	7	95.6%	95.6%	96.3%	95.7%	95.8%	97.2%	100%								
<i>N. flaccovosus</i>	8	96.5%	96.5%	96.7%	96.7%	96.9%	97.6%	95.7%	100%							
<i>N. cavia</i>	9	96.7%	96.7%	97.0%	96.7%	96.9%	98.0%	96.3%	99.2%	100%						
<i>N. brevicatena</i>	10	96.9%	96.8%	96.5%	96.3%	96.7%	97.4%	95.7%	97.8%	97.8%	100%					
<i>N. succinii</i>	11	97.5%	97.5%	96.1%	96.7%	97.0%	97.1%	95.5%	96.6%	96.8%	97.4%	100%				
<i>N. nova</i>	12	97.7%	97.7%	96.7%	96.3%	97.4%	97.5%	96.3%	96.9%	96.7%	97.1%	98.2%	100%			
<i>N. crassaurens</i>	13	97.4%	97.4%	96.9%	96.1%	97.1%	96.9%	95.2%	96.5%	96.5%	96.2%	96.7%	97.7%	100%		
<i>N. otitidicavium</i>	14	98.2%	98.1%	96.3%	96.1%	96.9%	97.0%	95.4%	96.7%	96.7%	96.9%	97.6%	98.4%	97.7%	100%	
<i>N. pseudobrasiliensis</i>	15	96.7%	96.6%	96.7%	95.7%	96.4%	97.4%	95.9%	96.3%	96.7%	96.8%	96.6%	97.6%	97.2%	97.6%	100%

鳟鱼诺卡氏菌(*N. seriolae*)最早于1968年分离自日本养殖黄尾鲷(*Seriola quinqueradiata*),最初只在形态和生理生化特征上做了描述,并命名为阿米巴诺卡氏菌(*N. kampachi*)^[4]。1988年,Kudo^[5]利用分子分类的方法[(G+C)%和DNA-DNA杂交]详细的确定该菌株的分类地位,并正式命名为鳟鱼诺卡氏菌(*N. seriolae*)。1995年,Chun和Goodfellow^[15]对鳟鱼诺卡氏菌的16S rRNA基因进

行了PCR扩增和测序(序列为Z36925)并对诺卡氏菌属进行了系统发育分析。至此,诺卡氏菌的分类地位基本明确。

本研究中,病原菌在形态、生长和生理生化等基本特征上都具备了诺卡氏菌属特有的生物学特征。16S rRNA系统发育分析结果表明,菌株与鳟鱼诺卡氏菌 *Nocardia seriolae* JCM3360^T(Z36925)的16S rRNA基因序列相似性达99.9%,在系统发育树(图

2)上可以看出,该菌株与 *N. seriolae* JCM3360^T (Z36925)位于同一个分支上,距离非常近,据此可以确定该菌株与鳟鱼诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*)是同一个种。

诺卡菌病主要发生在人类和畜牧业中,近几年

在水产动物中也有较多报道,对水产养殖业造成较大损失^[10]。由于诺卡氏菌病情不剧烈,在发病前期无症状或症状不明显,持续时间长,发病率和死亡率都较高,故给该病的早期诊断和防治带来极大困难,应该引起相关学者的关注。

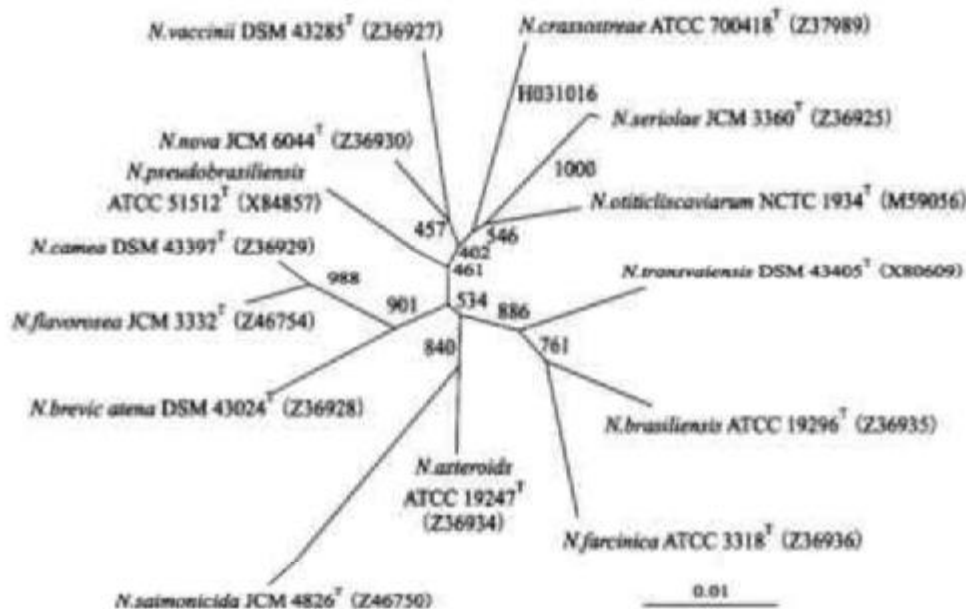


图2 根据 16S rRNA 基因序列同源性构建的系统发育树
Fig.2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences homology
Bootstrap=1 000. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide

参考文献:

- [1] 张建丽, 刘志恒. 诺卡氏菌型放线菌的分类[J]. 微生物学报, 2001, 41(4):513-517.
- [2] Valdes I E, Conroy D A. The study of a tuberculosis-like condition in neon tetras (*Hyphessobrycon innesi*). II. Characteristics of the bacterium isolated[J]. Microbiologia Espanola, 1963, 16:249-253.
- [3] Sziesuko S F, Bulloch G L, Dunbar C E, et al. Nocardial infection in hatchery-reared fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. Journal of bacteriology, 1964, 88:1 809-1 810.
- [4] Kusuda R, Taki H, Takeuchi T. Studies on a nocardial infection of culture yellow tail. II. Characteristics of *Nocardia kumpachi* isolated from a gill-tuberculosis of yellow tail[J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1974, 10:369-373.
- [5] Kudo T, Hatai K, Seino A. *Nocardia seriolae* sp. nov. causing nocardiosis of cultured fish[J]. Int J Syst Bacteriol, 1988, 38: 173-178.
- [6] Isik K, Chun J, Hah Y C, et al. *Nocardia salmonicida* nom. rev., a fish pathogen[J]. Int J Syst Bacteriol, 1999, 49:833-837.
- [7] Chen S C, Tung M C, Tsai W C. An epizootic in Formosa snake-head fish (*Channa maculata* Lacpepe), caused by *Nocardia asteroides* in fresh water pond in Southern Taiwan[J]. Con Fish. Ser, 1989, 15:42-48.
- [8] Friedman C S, Beaman B L, Chun J, et al. *Nocardia crassostreae* sp. nov., the causal agent of nocardiosis in Pacific oysters[J]. Int J Syst Bacteriol, 1998, 1:237-246.
- [9] Chen S C, Tung M C. A epizootic in large mouth bass, *Micropterus salmoides*, Lacpepe caused by *Nocardia asteroides* in freshwater pond in southern Taiwan[J]. Journal of Chinese Society of Veterinary science, 1991, 17:15-22.
- [10] Chen S C, Lee J L, Lai C C, et al. Nocardiosis in sea bass, *Lateolabrax japonicus*, in Taiwan[J]. J Fish Dis, 2000, 23(5): 299-307.
- [11] Lechevalier H A. Nocardiform Actinomycetes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 4 [C]. Baltimore: The Williams and Wilkins Co., 1989. 2 348-2 404.
- [12] 刘志恒, 姜成林. 放线菌现代生物学与生物技术[M]. 北京:

- 科学出版社, 2004.
- [13] 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.
- [14] 姜成林, 徐丽华. 放线菌分类[M]. 云南: 云南大学出版社, 1995.
- [15] Chan J, Goodfellow M. A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences[J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1995, 45:240-245.

Identification and phylogenetic analysis of a strain of *Nocardia*, A pathogen of large yellow croakers (*Larimichthys crocea*) with tuberculosis

WANG Guo-liang, YUAN Si-ping, JIN Shan

(Faculty of Life science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: A pathogenic bacterium was isolated from large yellow croaker, *Larimichthys crocea*, with white nodules, 0.1-0.2 cm in diameter, scattered on the heart, spleen and kidney. The bacteria were aerobic, Gram-positive, acid-fast, bead-like or long, slender, filamentous rods, and formed weakly pigmented, tan/yellow and white adherent colonies 1-2 mm in diameter on Lowenstein Jensen medium (LJM) and tryptic soy agar (TSA) respectively. The organism was found to be catalase-positive, oxidase-produced, and could reduce nitrate and aesculin but not degrade xanthine, tyrosine, casein, starch and gelatin. It could utilized the citrate as sole carbon source but not mannitol, arabinose and sorbitol. A almost complete 16S rRNA gene sequence of the 16S rRNA gene of the bacteria was determined following PCR amplification and sequencing. The GenBank Accession No. is AY846841. The sequence was aligned with those available for nocardiae and phylogenetic trees inferred using N-J method. The organism and the type strain of *Nocardia serioleae* JCM 3360^T (Z36925) consistently formed a monophyletic clade with a distant sequence similarity of 99.9%. Base on the morphological, physiological, biochemical properties and Phylogenetic Analysis, the pathogenic organism was identified as *Nocardia serioleae*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13 (3):410-414]

Key words: *Nocardia*; *Nocardia serioleae*; 16SrRNA; Phylogenetic Analysis; *Larimichthys crocea*