

养殖大菱鲆腹水症病原菌 SR1 的分离及鉴定

张伟妮, 周 丽, 邢 靖, 战文斌

(中国海洋大学 教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要:从患腹水症的养殖大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)腹水分离到1株优势细菌 SR1, 人工感染实验证实其具有致病性。经 API ID32E 系统鉴定为溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*), 并测定了其 16S rRNA 基因序列和热激蛋白 HSP60(Heat shock protein, HSP)基因序列。基于 16S rRNA 基因序列构建的系统树结果表明, 菌株 SR1 与溶藻弧菌(AY967727)亲缘关系最近, 然而置信度较低, 仅有 27%, 不能有效地鉴定到种。HSP60 基因序列分析表明, 该菌株与溶藻弧菌(AF230931)同源性最高, 为 99.2%。系统发育树表明 SR1 确与溶藻弧菌(AF230931)聚为一个分支, 且置信度较高, 为 84%。综合上述结果, 菌株 SR1 可鉴定为溶藻弧菌。[中国水产科学, 2006, 13(4): 603-609]

关键词:腹水症大菱鲆; 16S rRNA 基因; HSP60 基因; 溶藻弧菌

中图分类号: S943.399.42 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2006)04-0603-07

大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)为原产于欧洲的冷水性底栖海水鱼类, 隶属于鲽形目(Pleuronectiformes)、鲽科(Bothidae)、菱鲽属(*Scophthalmus*)。营养丰富、经济价值高, 是优质的海水养殖鱼类之一^[1]。自 1992 年引进中国以来, 养殖规模逐渐扩大, 疾病的发生也日渐增加, 已经报道的有病毒病、细菌病和寄生虫病, 其中尤以细菌病最为严重^[2-3], 且细菌病方面的研究多集中在弧菌属和气单胞菌属^[4]。

2002 年 6 月, 山东省荣成地区发生大规模的大菱鲆鱼苗腹水症。本研究利用从患病鱼体腹水中分离到的 1 株优势细菌对健康大菱鲆进行回接感染, 确定其致病性, 并在常规生理生化鉴定和 API 系统鉴定的基础上, 采用 16S rRNA 和 HSP60 基因序列分析的方法进行分类鉴定, 以确定该株致病菌的分类地位并鉴定到种。本研究旨在探讨大菱鲆腹水症的病原, 并进一步比较两种分子鉴定方法的优劣。

1 材料与方法

1.1 材料

患病大菱鲆取自山东荣成俚岛瓦屋石养鱼厂, 病鱼共 10 尾, 体质量(10±5)g, 体长(8±1)cm, 症状为腹水、体表溃瘍、眼球突出等。

健康大菱鲆购自山东青岛润渤水产有限公司, 共 60 尾, 体质量(12.3±6)g, 体长(10±2)cm。

Zobell 2216E 培养基: 酵母膏 1g, 蛋白胨 5g, 硝酸高铁 0.1g, 氯化钠 30g, 蒸馏水 1L, pH 7.6~7.8, 琼脂 20g。

溶藻弧菌标准菌株 283(LMG4408T), 由中国海洋大学联合国教科文组织中国海洋生物工程中心(UNESCO-BAC)提供, 来自英国 Heriot-Watt 大学生物学系。

1.2 病原菌的分离

取腹水症状典型的濒死病鱼, 无菌条件下从体表、肝、肾、眼球等部位分离细菌, 划线接种于 2216E 平板上, 25℃培养 24h, 挑取形态一致的优势菌落进行纯化培养, 直至获得纯培养菌(编号为 SR1), 2216E 冻存液(15%甘油)-80℃保存备用。

1.3 人工感染实验

实验菌株 25℃培养 24h 后, 用 1.5% 无菌生理盐水洗脱得菌悬液, McFarland 比浊法将细菌浓度定为 9×10^8 CFU/mL, 10 倍系列稀释菌悬液至浓度为 9×10^7 CFU/mL、 9×10^6 CFU/mL、 9×10^5 CFU/mL 和 9×10^4 CFU/mL。

实验用健康大菱鲆每 5 尾 1 组, 按不同菌悬液浓度分为 5 个实验组, 并设生理盐水对照组, 每组设

收稿日期: 2005-11-28; 修订日期: 2006-01-10。

基金项目: 国家自然科学基金项目(30271016); 山东省教育厅科技计划项目(032070104); 教育部海水养殖重点实验室开放基金项目(200212)。

作者简介: 张伟妮(1980-), 女, 硕士, 水生生物学专业。E-mail: weiniazhang@gmail.com

通讯作者: 周 丽(1963-), 女, 博士, 教授。E-mail: zhoulili@ouc.edu.cn

2个重复,共60尾。养殖水温为17~18℃,全天充气,每天投饵、换水。暂养7d后,背鳍下方肌肉注射0.1 mL不同浓度的菌悬液,对照组注射同体积的无菌生理盐水(1.5%)。定时观察记录,取濒死鱼的病灶及内脏器官进行细菌再分离,所分离菌株(编号为SR1-1)再次感染大菱鲆,观察结果。

1.4 细菌鉴定

1.4.1 常规鉴定及 API 系统鉴定 菌株 SR1、SR1-1 及标准菌株 283 的生理生化特征实验参照《常见细菌系统鉴定手册》^[5] 和《伯杰氏细菌学鉴定手册》(第九版)^[6] 进行,快速鉴定采用法国生物梅里埃公司 mini API 鉴定系统 ID32E 鉴定条。

1.4.2 16S rRNA 和 HSP60 基因序列测定和分析

(1)模板 DNA 的制备 菌株 SR1 于 2216E 平板 25℃ 培养 24 h。挑取单一菌落悬浮于无菌去离子水中,100℃ 水浴 5 min,冷却后 4℃ 12 000 r/min 离心 10 min,上清液即为 PCR 扩增反应的模板。

(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'-A-GAGTTTGATC(C/A) TGGCTCAG-3' (对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的第 8~27 个碱基位置),反向引物为 1492R:5'-TACGG(C/T) TACCTTGT-TACTT-3' (对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的第 1492~1510 个碱基位置)^[7]。100 μL PCR 反应体系中含有:10 μL 10×PCR 缓冲液,6 μL 25 mmol/L MgCl₂,2 μL 10 mmol/L 4×dNTP,引物各 1 μL, Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)1 μL,模板 DNA 2.5 μL。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 4 min;接 94℃ 变性 30 s,55℃ 复性 30 s,72℃ 延伸 100 s,30 个循环;最后 72℃ 温育 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]。PCR 反应体系同 16S rRNA 基因。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,交由上海生物工程技术公司进行 PCR 产物的纯化和序列测定。

(3)序列分析与系统发育树的构建 菌株 SR1 的 16S rRNA 和 HSP60 基因序列已经提交 GenBank 核苷酸序列数据库,存取号分别为 DQ269211 和 DQ269210。通过 Blast 从国际互联网 GenBank 数据库中检索与其同源性较高的细菌基因序列,从中选取与所分析的细菌基因序列同源性较高的已知菌株,采用 ClustalX1.8 软件进行多序列匹配排列,用 Mega 2.1 采用邻位相连法(Neighbor-joining method)获得系统发育树,通过自举分析(Bootstrap)进行置信度检测,自举数集 1 000 次。

2 结果

2.1 人工感染实验

感染实验结果见表 1。人工感染后实验鱼摄食量减少,活动减弱,出现腹水,个别死亡鱼眼球突出。死鱼解剖检查,可见肝脏发白,肛门红肿,内有黄脓样物流出。对照组不表现任何症状。从病鱼腹水、肝脏和眼球分离细菌,用优势菌 SR1-1 再次感染大菱鲆,得到相同的结果。表明 SR1 是大菱鲆腹水症的致病菌。

按改进的寇氏法^[3]计算菌株 SR1 的半致死量 LD₅₀=1.4×10⁶ CFU/尾,表明 SR1 为较强毒力的菌株。

表 1 人工感染实验结果

Tab.1 Results of artificial infection experiment

分组 Group	菌液浓度/(CFU·mL ⁻¹) Bacterial concentration	剂量/mL Dose	实验数/尾 Test No.	死亡数/尾 Death No.	死亡率/% Mortality
1	9×10 ⁸	0.1	10	10	100
2	9×10 ⁷	0.1	10	8	80
3	9×10 ⁶	0.1	10	4	40
4	9×10 ⁵	0.1	10	1	10
5	9×10 ⁴	0.1	10	0	0
对照 Control	1.5% NaCl	0.1	10	0	0

2.2 细菌鉴定

2.2.1 生理生化特征 菌株 SR1 和 SR1-1 均革兰氏染色阴性,杆状,具有运动性,电镜照片示 SR1 有 1 根很长的极生单鞭毛(图 1)。在 TCBS 培养基上菌落均呈黄色。常规生化测试表明,其氧化酶和接触酶均呈阳性,发酵葡萄糖产酸,对弧菌抑制剂 O/129(2,4-二氨基-6,7-二异丙基噻唑,150 μ g)敏感。根据这些特征,可初步判定为弧菌属细菌(*Vibrio* sp.)。经 API 系统鉴定,2 株菌都为溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)。

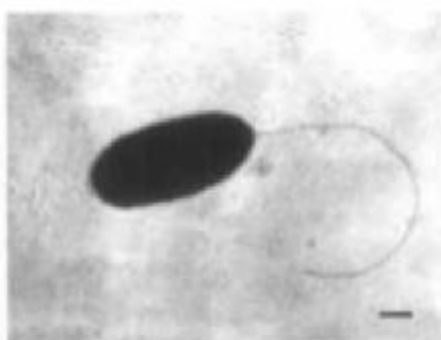


图1 菌株 SR1 的电镜照片(标尺=200 nm)
Fig.1 Electron micrograph of strain SR1
(bar=200 nm)

对菌株 SR1 和 SR1-1 进一步进行其他生理生化测试,并且将测试结果与溶藻弧菌标准菌株 283 及弧菌属其他部分细菌的表型特征^[3-6]进行了比较(表 2)。根据比较结果,菌株 SR1 和 SR1-1 生理生化特征一致,与溶藻弧菌标准菌株 283 仅在 D-甘露醇作为唯一碳源利用方面不同;与副溶血弧菌在 V.P. 反应、鸟氨酸脱羧、赖氨酸脱羧、D-甘露醇和蔗糖作为唯一碳源利用等 5 方面不同;与鳗弧菌生物变种 I 在 40 $^{\circ}$ C 生长、精氨酸双水解、D-甘露醇、D-山梨醇、L-阿拉伯糖和纤维二糖等 6 个方面不同;与哈维氏弧菌在 V.P. 反应、鸟氨酸脱羧、赖氨酸脱羧、D-甘露醇和纤维二糖等 5 方面不同。结果表明,在生理生化表型特征上菌株 SR1 和 SR1-1 与溶藻弧菌最为接近。

2.2.2 基因序列分析和系统发育树的构建 为了从分子水平上对菌株 SR1 进行鉴定,测定了其 16S rRNA 和 HSP60 基因序列。以总 DNA 为模板,经通用引物 27F 和 1492R 扩增到约 1 500 bp 条带,经引物 P1 和 P2 扩增到约 500 bp 的条带(图 2)。

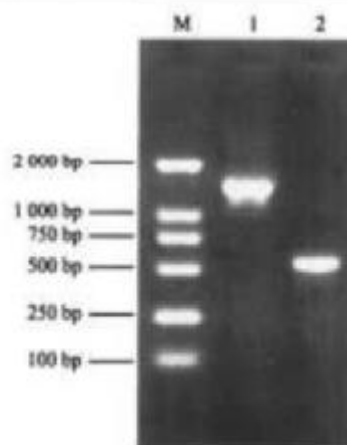


图2 菌株 SR1 的 16S rRNA 和 HSP60 基因的 PCR 扩增产物

M-Marker;1-菌株 SR1 的 16S rRNA 基因的 PCR 扩增产物;2-菌株 SR1 的 HSP60 基因的 PCR 扩增产物

Fig.2 PCR amplified products of 16S rRNA and HSP60 genes of strain SR1

M-Marker;1-16S rRNA gene PCR product of strain SR1;2-HSP60 gene PCR product of strain SR1

不包括引物结合区,所扩增的 16S rRNA 基因序列长度为 1 431 bp。将菌株 SR1 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 基因序列自然聚类,在相近的 100 个序列中,88 个为弧菌属细菌的 16S rRNA 基因序列,菌株 SR1 与它们的同源性为 97%~99%。从这 100 个序列中选取 25 个进行系统发育学分析,结果如图 3 所示,菌株 SR1 与 *V. alginolyticus* (AY967727)聚合。然而置信度较低,仅有 27%,尚不能据此确定其种的分类地位。

扩增到的菌株 SR1 的 HSP60 基因部分序列长度为 507 bp, Blast 分析显示,该序列与 *V. alginolyticus* (AF230931)最为接近,相似性达到 99.2%。系统发育树结果表明,该菌株与 *V. alginolyticus* (AF230931)聚为一个分支,且置信度较高,为 84%,然后再和 *V. alginolyticus* (AF230930)聚合(图 4)。综合菌株 SR1 的生理生化特征和 16S rRNA、HSP60 基因序列分析结果,将这株大菱鲆腹水症的致病菌鉴定为溶藻弧菌。

表2 菌株 SR1、SR1-1 与 283 及弧菌属部分细菌生理生化特征的比较

Tab.2 Comparison of physiological and biochemical characteristics of SR1, SR1-1 and 283 and some members of genus *Vibrio*

鉴定项目 Items	SR1	SR1-1	283	副溶血弧菌 <i>V. parahaemol- yticus</i>	鳃弧菌生物变种 I <i>V. anguillarum biovar I</i>	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>
氧化酶反应 Oxidase	+	+	+	+	+	+
V.P. 反应 Voges-Proskauer	+	+	+	-	+	-
生长需要 Na ⁺ Na ⁺ required for growth	+	+	+	+	+	+
从 D-葡萄糖产气 D-Glucose, gas	-	-	-	-	-	-
还原硝酸盐 Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+
O/129 (150 µg) 敏感 O/129 (150 µg) sensitivity	+	+	+	+	+	+
4℃生长 4℃, growth	-	-	-	-	-	-
30℃生长 30℃, growth	+	+	+	+	+	+
35℃生长 35℃, growth	+	+	+	+	+	+
40℃生长 40℃, growth	+	+	+	+	-	d
明胶酶 Gelatinase	+	+	+	+	+	+
淀粉酶 Amylase	+	+	+	+	+	+
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase *	-	-	-	+	-	+
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase *	-	-	-	-	+	-
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase *	-	-	-	+	-	+
利用:肌醇 Utilization of: myo-Inositol *	-	-	-	-	d	-
D-甘露醇 D-Mannitol	-	-	+	+	+	+
D-山梨醇 D-Sorbitol	-	-	-	-	+	-
海藻糖 Trehalose *	+	+	+	+	+	+
D-甘露糖 D-mannose	+	+	+	+	+	+
D-半乳糖 D-galactose	+	+	+	+	d	d
蔗糖 sucrose *	+	+	+	-	+	d
鼠李糖 Rhamnose *	-	-	-	-	-	-
L-阿拉伯糖 L-arabinose *	-	-	-	d	+	d
纤维二糖 Cellobiose *	-	-	-	-	+	+
水杨苷 Salicin	-	-	-	-	-	d
柠檬酸盐 Citrate	+	+	+	+	+	+
半乳糖醛酸盐 Galacturonate *	-	-	-	-	-	-

注: "+" 为"阳性"; "-" 为"阴性"; "d" 11%~89% 菌株呈阳性; "*" 为 ID32E 试剂条的部分指标。

Note: "+" "positive"; "-" "negative"; "d" 11%~89% of strains are positive; "*" "partial items of ID32E.

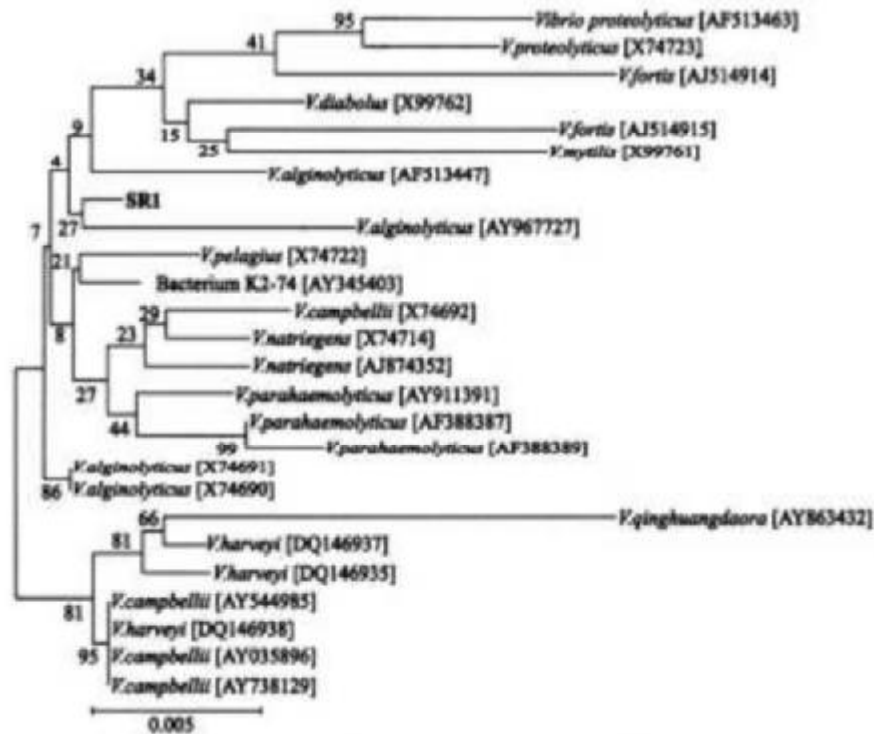


图3 以16S rRNA基因构建的弧菌系统发育树

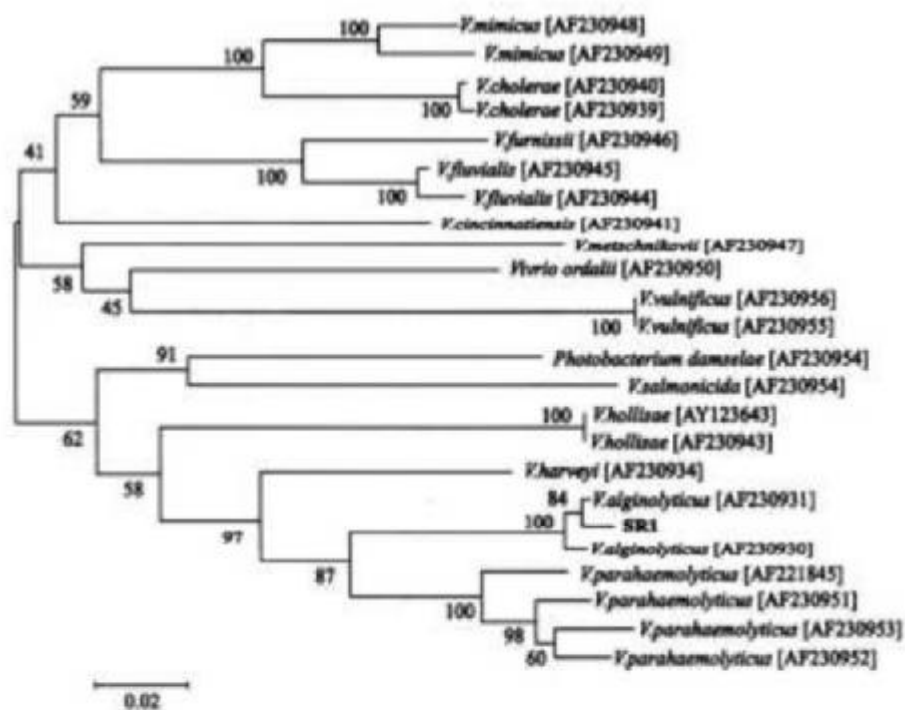
Fig.3 Phylogenetic tree of *Vibrio* based on 16S rRNA genes

图4 以HSP60基因构建的弧菌系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of *Vibrio* based on HSP60 genes

3 讨论

传统的细菌学鉴定方法发现菌株 SR1 为革兰氏阴性杆菌,具有运动性,氧化酶和接触酶阳性,发酵葡萄糖产酸,对弧菌抑制剂 O/129 敏感,符合弧菌科弧菌属的典型特征。API 系统鉴定表明,SR1 为溶藻弧菌。但是,由于 API 系统主要适用于临床和陆地环境的细菌鉴定,其数据库中没有足够的海洋细菌的特征资料,用于鉴定海洋细菌有一定的局限性。因此在本实验中,API 系统的鉴定指标仅作为参考,同时参照文献[5]和文献[6]对该菌株进行了其他生理生化指标的测定。结果表明,菌株 SR1 与弧菌属的溶藻弧菌最接近,而与其他弧菌差别较大。

随着分子生物学的发展,现代细菌分类鉴定从传统的表型分类进入基因型分类水平,16S rRNA 分析已成为研究生命系统进化及细菌分类的常用工具。从 16S rRNA 基因序列系统发育树上看,该菌株与 *V. alginolyticus* (AY967727) 聚合在一起,然而置信度仅为 27%;另外,本实验构建的系统发育树中很多节点置信度都很低,这可能是由于弧菌属 16S rRNA 基因序列的种间差异不显著,导致弧菌不具有唯一的聚类特征,这与 Kim 等的观点一致^[9]。同时也证明了 16S rRNA 基因序列同源性分析不适宜用于亲缘关系较近的弧菌种之间的鉴别。

热激蛋白(Heat shock protein, HSP)是另一类常用于生物进化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,携带更多的多态信息^[8,10]。本实验以 HSP60 基因构建的系统树,绝大部分主要分支的置信度都在 70% 以上,说明该序列应用于海洋弧菌系统演化研究的有效性和可靠性;另外,本研究发现,以 HSP60 基因构建的系统树在置信度上普遍明显高于 16S rRNA 基因。这与李宁求^[8]、Kwok 等^[11]认为 HSP60 基因比 16S rRNA 基因更适合于海洋弧菌分类研究的结论一致。

目前国内外报道的大菱鲆的弧菌属病原菌主要有鳃弧菌(*V. anguillarum*)、灿烂弧菌(*V. splendidus*)、海利斯顿氏菌(*V. pelagius*)、美人鱼弧菌(*V. damsela*)等^[3-4,12-14]。而关于溶藻弧菌的报道很少,仅见于大菱鲆的育苗期^[15-16]。

Tanasomwang^[17]发现溶藻弧菌可以引起牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) 苗种和幼鱼的腹水症。而关于大菱鲆腹水症的病原菌,则未见报道。本实验从患腹水症的大菱鲆体内分离到致病性的溶藻弧菌,是养殖大菱鲆腹水症的基础性研究。

参考文献:

- [1] 雷芳霖,刘新富. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)引进养殖的初步研究[J]. 现代渔业信息, 1995, 10(11): 1-3.
- [2] 程开敏,俞开康,战文斌,等. 大菱鲆疾病的研究进展[J]. 鱼类病害研究, 2001, 23(2): 33-38.
- [3] 邹玉霞,张培军,真照兰,等. 大菱鲆出血症病原菌的分离和鉴定[J]. 高技术通讯, 2004, 14(4): 89-93.
- [4] 张正,王印庚,杨官品,等. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)细菌性疾病的研究现状[J]. 海洋通报, 2004, 3: 83-89.
- [5] 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.
- [6] Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition [M]. Maryland: Williams & Wilkins, 1994.
- [7] Fole M F, Cavanaugh C M. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(10): 3724.
- [8] 李宁求,白俊杰,吴家勤,等. 斜带石斑鱼 3 种致病弧菌的分子生物学鉴定[J]. 水产学报, 2005, 29(3): 356-361.
- [9] Kim Y B, Okada J, Matsumoto C, et al. Identification of *Vibrio* *Parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *susR* gene[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37: 1173-1177.
- [10] Kwok A Y, Chow A W. Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* based on partial Hsp60 gene sequences[J]. J Syst Evol Microbiol, 2003, 53(1): 87-92.
- [11] Kwok A Y, Wilson J T, Coulthart M, et al. Phylogenetic study and identification of human pathogenic *Vibrio* species based on partial Hsp60 gene sequences[J]. Can J Microbiol, 2002, 48(10): 903-910.
- [12] Gatesope F J, Lambert C, Nicolas J L. Pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*[J]. J Appl Microbiol, 1999, 87(5): 757-763.
- [13] Villamil L, Figueroa A, Toranzo A E, et al. Isolation of a highly pathogenic *Vibrio pelagius* strain associated with mass mortalities of turbot, *Scophthalmus maximus*, larvae[J]. J Fish Dis, 2003, 26(5): 293-303.
- [14] Novos B, Nunes S, Ferrnandez et al. Epizootic study in a turbot farm: bacteriology, virology, parasitology and histology[J]. Aquaculture, 1992, 107: 253-258.
- [15] Austin B, Stobi M, Robertson P A W, et al. *Vibrio alginolyticus*: the cause of gill disease leading to progressive low-level mortalities among juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L. in a Scottish aquarium[J]. J Fish Dis, 1993, 16: 277-280.

- [16] 姚志刚,丁天宝.大菱鲆育苗期的细菌病研究[J].海洋科学, 2004, 28(9): 10-12.
- [17] Tanasakwong V. Intestinal microflora of larval and juvenile stages in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Fish Pathol, 1988, 23(2): 77-83.

Isolation and identification of pathogen SR1 associated with swollen abdomen of cultured turbot (*Scophthalmus maximus*)

ZHANG Wei-ni, ZHOU Li, XING Jing, ZHAN Wen-bin

(The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Bacterial strain SR1, which was isolated from the ascites of cultured turbot (*Scophthalmus maximus*) with swollen abdomen, was proved to be a pathogen by muscle injection experiments. By API ID32E systematic identification, strain SR1 was indentified as *Vibrio alginolyticus*, and 16S rRNA and heat shock protein (HSP60) genes partial sequences were determined. Phylogenetic tree of *Vibrio* based on 16S rRNA gene indicated that strain SR1 showed the highest level of similarity to *V. alginolyticus* (AY967727), but the bootstrap was only 27% which was too low to give identification of the strain effectively. Sequences analysis of HSP60 gene revealed that strain SR1 exhibited the highest level of 99.2% similarity to *V. alginolyticus* (AF230931). Phylogenetic tree based on HSP60 gene showed that strain SR1 clustered together with *V. alginolyticus* (AF230931), and had high bootstrap which was 84%. Based on the results obtained, strain SR1 was identified as *V. alginolyticus*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(4): 603-609]

Key words: *Scophthalmus maximus*; swollen abdomen; 16S rRNA gene; HSP60 gene; *Vibrio alginolyticus*