

文章编号: 1674-5566(2010)01-0050-06

条石鲷烂尾白浊症病原菌的 分离鉴定及系统发育分析

闫茂仓^{1,2}, 单乐州^{1,2}, 马爱敏^{1,2,3}, 谢起浪^{1,2}, 陈少波^{1,2}, 邵鑫斌^{1,2}

(1 浙江省海洋水产养殖研究所, 浙江 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, 浙江 温州 325005;

3 山东农业大学动物科技学院, 山东 泰安 271018)

摘要:从患烂尾白浊症的条石鲷肾脏和肝脏等病变组织分离出致病力较强的菌株 TP0701, 人工感染实验证实该菌株为条石鲷的病原菌。对该细菌进行了形态、生理生化特性测定和 16S rRNA 分子鉴定, 测定 16S rRNA 基因序列, 分析相关细菌相应序列的同源性, 构建了系统进化树。结果表明菌株 TP0701 与恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 的亲缘关系最近, 具有 98.1% 的同源性。结合该菌株的生理生化特性, 可鉴定菌株 TP0701 为恶臭假单胞菌。

关键词:条石鲷; 16S rRNA 基因; 恶臭假单胞菌

中图分类号: S 943 **文献标识码:** A

Identification and phylogenetic analysis of a pathogenic bacterial strain isolated from *Oplegnathus fasciatus* with tail rot and whitish symptom

YAN Mao-cang^{1,2}, SHAN Le-zhou^{1,2}, MA Ai-min^{1,2,3}
XIE Qi-lang^{1,2}, CHEN Shao-bo^{1,2}, SHAO Xin-bin^{1,2}

(1. Zhejiang Mariculture Research Institute Wenzhou 325005, China;

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

3. Department of Animal Sciences and Technology Shandong Agricultural University Tai'an 271018, China)

Abstract: A pathogenic bacterial strain TP0701 was isolated from red drum (*Oplegnathus fasciatus*) with tail rot and whitish symptom. It was proved to be the pathogen of the red drum (*Oplegnathus fasciatus*) by artificial infection test. The traditional physiological and biochemical experiments were done. To investigate the phylogenetic position of this pathogen, 16S rDNA of TP0701 was sequenced and compared with that of other related strains. Molecular phylogenetic tree was constructed based on the genetic distance analysis. The results showed that strain TP0701 exhibited the highest levels of similarity to the *Pseudomonas putida*. Analysing all the results of several methods, strain TP0701 was identified as *Pseudomonas putida*.

收稿日期: 2009-08-05

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); 浙江省科技厅重大科技攻关项目 (2005C12006-02); 浙江省科技厅科研院所青年人才计划项目 (2006R20001); 温州市科技兴海项目 (S20070051)

作者简介: 闫茂仓 (1981-), 男, 助理研究员, 硕士, 主要从事海水养殖及病害防治方面的研究。E-mail: yanmaocang@126.com

通讯作者: 陈少波, E-mail: chenshaob@hotmail.com

Key words: *Oplegnathus fasciatus* 16S rDNA gene; *Pseudomonas Putida*

条石鲷 (*Oplegnathus fasciatus*) 隶属于硬骨鱼纲 (*Osteichthyes*) 鲈形目 (*Perciformes*) 石鲷科 (*Oplegnathidae*) 石鲷属 (*Oplegnathus*), 为温热带近海鱼类, 主要分布于我国的黄海、东海, 日本北海道以南等海域^[1-2]。条石鲷体态优美、色泽艳丽、肉质细嫩、营养价值高, 是一种具有较高经济价值和观赏价值的海产鱼类, 具有良好的养殖前景。目前, 国内正开展条石鲷亲鱼培育和繁殖技术研究, 并取得了育苗成功, 人工养殖正处于推广阶段。然而养殖过程中已经发生细菌、病毒、寄生虫性疾病, 以烂尾白浊病和刺激隐核虫最为严重^[2-4]。2007年7月, 乐清湾网箱试养条石鲷, 出现烂尾白浊病, 死亡率达50%以上。本研究利用从患病鱼分离到的1株优势菌对条石鲷进行人工回归感染, 确定其致病性, 并在生理生化鉴定的基础上, 采用16S rDNA基因序列分析的方法进行鉴定, 同时, 进行了药物敏感实验和药物防治治疗。旨在探讨条石鲷烂尾白浊病的病原, 为条石鲷疾病的防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

病鱼采自乐清湾网箱养殖条石鲷, 体重80~150 g

健康条石鲷为浙江省海洋水产养殖研究所清江试验场自繁条石鲷, 体重为(80±6.2) g

Zobell 2216E海水培养基: 蛋白胨 5.0 g 酵母浸出膏 1.0 g $\text{Fe}_2(\text{PO}_4)_3$ 0.01 g 用陈海水定容至 1 000 mL pH 7.6~7.8。琼脂 1.6%, TCBS 琼脂粉购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.2 病原菌的分离

取腹水症状典型的濒死病鱼, 无菌条件下在肝、肾等部位分离细菌, 划线接种于 2216E 平板上, 25℃培养 24 h 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 TP0701)。

1.3 人工感染实验

细菌接种 Zobell 2216E, 28℃培养 24 h 后, 用无菌生理盐水洗下, 调整细菌浓度为 1.5×10^6

cells/mL, 1.5×10^7 cells/mL, 1.5×10^8 cells/mL, 1.5×10^9 cells/mL 进行人工感染试验, 各实验组每尾鱼注射 0.2 mL 菌液, 对照组注射 0.2 mL 生理盐水, 每组实验鱼 10 尾, 实验时温度为 25℃左右。注射后观察鱼的发病死亡情况, 连续观察 14 d 并对死亡鱼及时剖检和致病菌的再次分离。

1.4 病原菌形态与理化特性检测

参照《伯杰氏细菌鉴定手册》^[5]及《常见细菌系统鉴定手册》^[6]。首先对菌株 TP0701 作革兰氏染色, 在光学显微镜和磷钨酸染色电子显微镜下观察细菌形态, 然后进行生理生化特性测定, 对病原菌初步鉴定和常规分类。所用试剂均购自杭州天和微生物试剂有限公司及广州环凯微生物科技公司。

1.5 16S rDNA 序列测定与分析

1.5.1 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, 12 000 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。

1.5.2 16S rDNA 的扩增及纯化

细菌 16S rDNA 通用引物如下, 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), 反向引物为 1492R: 5'-TACGGCTACCTGTACGACTT-3' (对应于 E. Coli 16S rDNA 的第 1492-1510 个碱基位置)^[7]。引物由上海生工生物工程公司合成。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 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, 整个反应完成后, 通过 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳对 PCR 扩增产物进行鉴定, 并切下目的条带, 用柱式 DNA 胶回收试剂盒 (按照说明书操作) 回收 PCR 产物。产物送至上海生工生物工程公司进行序列测定。

1.5.3 序列分析与数据处理

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, 将菌株

TP0701的 16S rDNA 序列与从 GenBank 数据库中获得的假单胞菌 16S rDNA 序列,采用 ClustalX 2.0 软件进行多序列匹配排列,采用 MegAlign 4.0 软件进行系统进化树的建立。

1.6 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 CFU/mL~ 10^8 CFU/mL,具体操作参照纸片法抗菌药物敏感试验操作标准^[8]。药物敏感判定标准参照 CLSI 抗菌药物敏感性标准 M02-A10 和 M07-A8。药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司,共 19 种抗菌药物。

2 结果

2.1 症状

2007 年 7 月,乐清湾网箱养殖条石鲷,出现烂尾白浊病的现象,且死亡率达 50% 以上,水温 25℃ 左右,主要表现为:病鱼游动缓慢,散布在网箱周围,烂尾、烂鳍,烂处白浊、发光,眼球浑浊、

有的瞎掉,甚至眼球脱落,肠道内无内容物,肝脏肿胀、严重者有出血点,肾脏肿大(图 1)。



图 1 患烂尾白浊病条石鲷

Fig 1 *Oplegnathus fasciatus* diseased tail rot and whitish

2.2 人工感染实验

感染实验结果见表 1。人工感染后摄食减少,开始出现烂尾、烂鳍现象,烂尾、烂鳍边缘发白; 1.5×10^9 cells/mL 浓度组感染后 2 d 即开始死亡,第 5 d 全部死亡; 1.5×10^6 cells/mL 浓度组 14 d 内无死亡;对照组不表现任何症状。

表 1 人工感染实验结果

Tab. 1 Results of artificial infection experiment

组别	菌液浓度 (cells/mL)	感染方式	剂量 (mL)	实验尾数	死亡尾数	死亡率 (%)
实验组	1.5×10^9	胸腔注射	0.2	10	10	100
	1.5×10^8	胸腔注射	0.2	10	9	90
	1.5×10^7	胸腔注射	0.2	10	4	40
	1.5×10^6	胸腔注射	0.2	10	0	0
对照组	生理盐水	胸腔注射	0.2	10	0	0

2.3 菌株的形态特征

菌株 TP0701 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 3~5 mm;在 TCBS 培养基上菌落呈绿色,直径约 2~3 mm;革兰氏染色阴性(图 2),短杆状,可运动。

2.4 生理生化特性

病原菌 TP0701 为非发酵型短杆菌,不产芽孢,氧化酶和接触酶均为阳性,对 O/129 不敏感,4℃ 生长,42℃ 不生长,生长需要 Na^+ ,甲基红、VP 试验均为阴性,不能产生靛基质,不能利用肌醇、乳糖、蔗糖、阿拉伯糖、甘露糖、纤维二糖、水杨素,能还原硝酸盐,不能液化明胶,精氨酸双水解酶阳性,赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶和精氨

酸脱羧酶阴性,不产硫化氢,枸橼酸盐阳性。其生理生化性状见表 2。



图 2 菌株 TP0701 革兰氏染色

Fig 2 Gram stain of strain TP0701

表 2 TP0701菌株的生理生化特征
Tab 2 Biochemical and physiological characteristics of strain TP0701

项目	菌株	恶臭假单胞菌	项目	菌株	恶臭假单胞菌
革兰氏染色	G ⁻	G ⁻	果糖	+	+
氧化发酵	不发酵	不发酵	纤维二糖	-	-
氧化酶	+	+	甘露醇	-	-
接触酶	+	+	山梨醇	-	-
O/129(10 μg)	R	R	肌醇	-	-
O/129(150 μg)	R	R	明胶液化	-	-
4°C	+	+	枸橼酸盐	+	+
10°C	+	+	葡萄糖(产气)	-	-
30°C	+	+	葡萄糖(产酸)	-	-
42°C	-	-	硝酸盐(还原)	+	+
无盐胨水	-	-	硝酸盐(产气)	-	-
1% NaCl胨水	+	+	VP试验	-	-
3% NaCl胨水	+	+	MR试验	-	-
6% NaCl胨水	+	+	吲哚产生	-	-
8% NaCl胨水	-	-	硫化氢	-	-
10% NaCl胨水	-	-	精氨酸双水解酶	+	+
阿拉伯糖	-	-	赖氨酸脱羧酶	-	-
蔗糖	-	-	精氨酸脱羧酶	-	-
乳糖	-	-	鸟氨酸脱羧酶	-	-
甘露糖	-	-	水杨素	-	-
麦芽糖	-	-	ONPG	+	+

2.5 细菌 16S rRNA 基因序列分析

PCR扩增出菌株 TP0701的 16S rRNA 基因片段约为 1.4 kb(图 3所示), 对此片段进行纯化回收、克隆、测序, 结果表明菌株 TP0701的 16S rRNA 基因片段大小为 1455 bp, 将序列和 GenBank

中已报道的 16S rRNA 基因序列进行 Blast分析, 并利用 DNA Star软件与 GenBank中相似序列进行系统学分析, 构建系统发育树, 结果显示菌株与已登陆的恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* (EU661866) 同源性最高(图 4和图 5), 达 98.1%, 遗传距离为 0.2, 二者在系统发育树上聚为一支, 结合形态学和生理生化特性, 将其鉴定为恶臭假单胞菌, 登陆号为: GV073466。

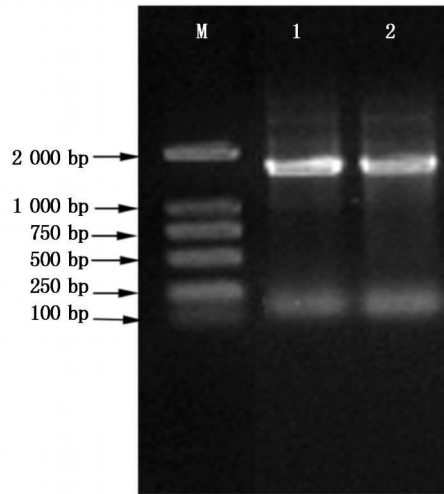


图 3 菌株 TP0701的 PCR产物电泳结果

Fig 3 Results of PCR production electrophoresis of isolated strain TP0701

M: Marker DL2000; 1, 2: 菌株 TP0701的 PCR产物。

Percent Identity																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
1	■	91.9	92.8	93.4	91.3	93.7	94.7	95.2	95.3	95.1	95.2	93.9	95.2	95.3	95.2	95.3	95.3	93.9	92.9	1
2	6.3	■	99.0	94.5	96.3	93.6	95.2	92.9	93.7	93.5	94.2	93.9	93.5	94.0	94.2	94.2	94.2	94.2	94.2	2
3	5.9	0.2	■	93.4	97.6	95.3	95.9	94.3	95.1	95.1	95.9	93.0	95.1	94.9	95.9	95.9	95.8	95.8	93.2	3
4	5.4	2.9	2.4	■	95.1	96.6	97.1	97.3	97.2	97.3	96.9	97.2	97.2	97.3	97.3	97.2	97.2	97.4	96.4	4
5	6.8	1.0	0.9	3.4	■	94.9	95.0	94.2	94.9	94.7	94.1	93.9	94.0	95.2	94.2	94.2	94.1	95.3	92.9	5
6	4.2	3.4	3.0	1.9	3.9	■	99.1	98.1	99.0	98.4	97.8	98.1	97.9	99.2	97.9	97.9	98.0	99.1	96.7	6
7	4.2	3.4	3.0	1.9	3.8	0.0	■	98.9	99.5	99.3	98.7	98.4	98.9	99.5	98.7	98.8	98.9	99.0	97.0	7
8	4.4	3.5	3.0	1.8	3.9	0.2	0.2	■	99.0	99.0	99.9	98.5	99.8	99.2	99.5	99.7	99.8	98.4	97.1	8
9	4.2	3.5	3.1	1.8	4.0	0.1	0.1	0.1	■	99.5	99.8	98.5	99.7	99.9	99.7	99.8	99.9	99.3	97.3	9
10	4.5	3.4	2.9	1.8	3.9	0.3	0.3	0.4	0.2	■	99.7	98.3	99.8	99.9	100.0	99.8	99.8	99.0	97.3	10
11	4.4	3.3	3.0	1.8	4.0	0.3	0.3	0.1	0.1	0.3	■	98.4	99.8	99.9	99.5	99.7	99.9	98.1	97.3	11
12	4.4	3.6	3.1	2.0	4.0	0.1	0.1	0.2	0.1	0.3	0.3	■	98.5	98.5	98.3	98.4	98.5	98.4	98.1	12
13	4.3	3.4	3.0	1.9	4.0	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.3	■	100.0	99.7	99.8	99.9	98.2	97.4	13
14	4.3	3.4	3.0	1.9	4.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.0	■	99.9	99.9	100.0	99.5	97.3	14
15	4.4	3.3	2.9	1.8	3.8	0.3	0.3	0.4	0.2	0.0	0.4	0.3	0.2	0.1	■	99.8	99.8	98.4	97.3	15
16	4.3	3.3	2.9	1.8	3.8	0.2	0.3	0.2	0.1	0.2	0.2	0.3	0.1	0.1	0.2	■	99.9	98.2	97.3	16
17	4.2	3.4	3.0	1.9	3.9	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	0.0	0.2	0.1	0.1	■	98.3	97.4	17
18	4.3	3.4	3.0	1.7	3.8	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.4	0.3	0.2	0.2	0.1	0.3	0.2	■	97.0	18
19	4.6	3.7	3.3	2.0	4.6	0.8	0.8	0.4	0.3	0.4	0.3	0.4	0.3	0.2	0.5	0.4	0.3	0.9	■	19

图 4 各菌株 16S rDNA 序列相似性(右上部)与遗传距离(左下部)

Fig 4 Sequence similarity(upper right) and genetic distance (bottom left) of 16S rDNA

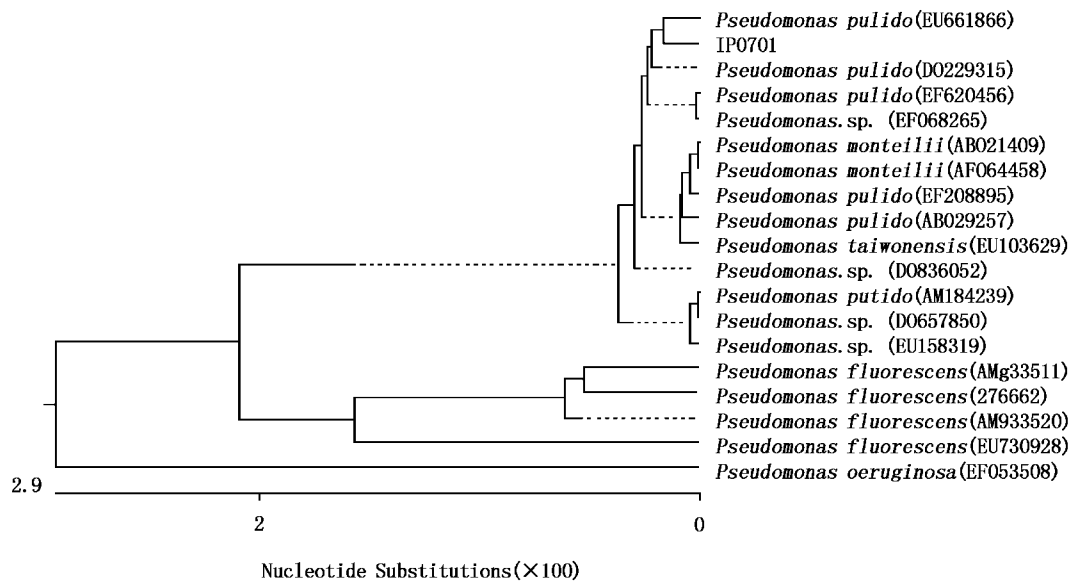


图 5 以 16S rRNA 基因构建的系统进化树

Fig 5 Phylogenetic tree based on 16S rRNA genes

2.6 药物敏感试验

对菌株 TP0701 进行药敏试验 (表 3), 结果表明, 菌株 TP0701 对青霉素 G、链霉素、氯霉素、庆

大霉素、红霉素、先锋必、氟哌酸、复方新诺明、利福平敏感, 对新霉素、氨苄青霉素、菌必治中度敏感, 对四环素、卡那霉素、头孢氨苄、头孢噻吩、头孢拉丁、呋喃妥因、阿米卡星有抗药性。

表 3 菌株 TP0701 对不同抗菌药物的敏感性

Tab 3 Sensitivity of the strain TP0701 to antibacterial agents

药物名称	纸片含量 (μg)	判断标准: 抑菌圈直径 (mm)			实际抑菌圈直径 (mm)	敏感性
		S	I	R		
四环素	30	≤ 14	15~18	≥ 19	0	R
新霉素	30	≤ 16	17~23	≥ 24	18	I
卡那霉素	30	≤ 13	14~17	≥ 18	12	R
氨苄青霉素	100	≤ 13	14~16	≥ 17	22	I
链霉素	10	≤ 11	12~14	≥ 15	20	S
氯霉素	30	≤ 12	13~17	≥ 18	36	S
庆大霉素	10	≤ 12	13~14	≥ 15	18	S
红霉素	15	≤ 13	14~22	≥ 23	34	S
头孢氨苄	30	≤ 14	15~17	≥ 18	0	R
头孢噻吩	30	≤ 14	15~17	≥ 18	0	R
头孢拉啶	30	≤ 14	15~17	≥ 18	0	R
呋喃妥因	30	≤ 14	15~16	≥ 17	0	R
菌必治	30	≤ 13	14~20	≥ 21	19	I
先锋必	75	≤ 15	16~20	≥ 21	22	S
阿米卡星	30	≤ 14	15~16	≥ 17	12	R
氟哌酸	10	≤ 12	13~16	≥ 17	21	S
复方新诺明	23.5/1.25	≤ 10	11~15	≥ 16	24	S
利福平	5	≤ 16	17~19	≥ 20	21	S

注: R 为耐药; S 为敏感; I 为中度。

3 讨论

本研究在国内首次对条石鲷病害研究进行了报道,填补了条石鲷病害防治研究的空白。从患烂尾白浊症的条石鲷肾脏、肝脏等病变组织分离到的菌株 TP07011,经人工感染实验证实对条石鲷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,因此证实该菌为其病原菌。

传统的细菌学鉴定方法发现菌株 TP0701 为革兰氏阴性杆菌,具有运动性,非发酵细菌,氧化酶和接触酶阳性,对弧菌抑制剂 O/129 不敏感,符合假单胞菌的特征。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,该菌株与恶臭假单胞菌 *P. putida* (EU661866.1)聚合在一起。证实菌株 TP0701 为恶臭假单胞菌。

恶臭假单胞菌能够引起多种水产动物疾病,如三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*)、欧洲鳗鲡 (*Anguilla anguilla*) 和大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 等^[9-11]。药敏实验显示,菌株 TP0701 对青霉素 G、链霉素、氯霉素、庆大霉素、红霉素、先锋必、氟哌酸、复方新诺明、利福平敏感,可为实

际生产的用药提供参考。然而随着抗生素的大量使用,会产生更多的抗性,达不到预期的效果,所以在今后的研究中,应向免疫防治方面转变,以期在生产带来更多的服务。

参考文献:

- [1] 刘朝阳,孙晓庆.条石鲷的生物学特性及增养殖前景[J].齐鲁渔业,2006,23(7):6.
- [2] 常抗美,毛建平,吴剑锋,等.条石鲷胚胎及仔稚鱼的发育[J].上海水产大学学报,2005,14(4):401-405.
- [3] 全汉锋,肖志忠.条石鲷人工繁育技术研究[J].台湾海峡,2007,26(2):295-300.
- [4] 辛俭,薛利建,毛国民,等.条石鲷的胚胎发育观察[J].浙江海洋学院学报,2005,24(1):31-36.
- [5] R. E. 布坎南, N. E. 吉本斯.伯杰细菌鉴定手册[M].8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[M].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[J].高技术通讯,2001,11(12):12-17.
- [8] 姜永新.临床细菌检验与质量控制[M].沈阳:辽宁科学技术出版社,1987,120-122.
- [9] 王学高,黄增荣,袁明.三疣梭子蟹牛奶病病原的分离鉴定[J].西北农林科技大学学报,2007,35(6):29-33.
- [10] 樊海平.恶臭假单胞菌引起的欧洲鳗鲡烂鳃病[J].水产学报,2001,25(2):147-150.
- [11] 刘家富,余祚溅,林永添,等.大黄鱼假单胞菌病的初步研究[J].海洋科学,2004,28(2):5-8.