

文章编号: 1004 - 7271(2008)03 - 0280 - 05

养殖大菱鲆迟缓爱德华氏菌的分离 鉴定与系统发育分析

杨春志^{1,2}, 王秀华¹, 黄 健¹

(1. 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 中国水产科学
研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;
2. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘 要:从患病的大菱鲆成鱼体内分离到一株致病菌(编号1101),经人工感染试验证实该菌具有较强的毒力($LD_{50} = 3.34 \times 10^6$ CFU/mL),并能从病鱼中重新分离出此菌。应用API20E自动鉴定卡及16S rRNA序列分析方法对该菌进行了综合鉴定。结果显示菌株1101为革兰氏染色阴性、氧化酶阴性、触酶阳性,API20E鉴定系统鉴定为迟缓爱德华氏菌,相似率达99%。测定了其16S rRNA序列,长度为1419 bp,在GenBank上经同源性比对与迟缓爱德华氏菌聚为一类,同源性达99%,据此鉴定为迟缓爱德华氏菌(*Ewardsiela tarda*)。药敏试验结果表明菌株1101对多粘菌素较敏感,而对其它药物中度或不敏感。

关键词:大菱鲆; 迟缓爱德华氏菌; 16S rRNA; 系统发育树

中图分类号:S 941.4 文献标识码:A

Identification and phylogenetic analysis of pathogen-*Ewardsiela tarda* from cultured turbot (*Scophthalmus maximus*)

YANG Chun-zhi, WANG Xiu-hua, HUANG Jie

(1. Key Laboratory of Sustainable Utilization of Marine Fishery Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
2. College of Life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: A strain of bacteria (strain number 1101) was isolated from diseased turbot (*Scophthalmus maximus*) in a fish farm in Shandong peninsula. Challenge test proved that the strain had higher virulence. Identifying methods including 16S rRNA sequence test, physiological and biochemical characteristics and phylogenetic analysis were employed to identify the strain 1101 respectively. The results show that strain 1101 was Gram negative, oxidase negative, catalase positive. Result by API20E indicated that strain 1101 was *Ewardsiela tarda* with 99% reliability. A 1419 bp DNA was sequenced and compared with other bacteria in GenBank. Homology analysis and phylogenetic study showed that it has the highest similarity to *Ewardsiela tarda* with 99% similarity. According to morphological features, physiological and biological characteristics and 16S rDNA homology comparison of the bacteria, the pathogenic bacteria were *Ewardsiela tarda*. Drugs sensitivity

收稿日期: 2007-04-30

基金项目: 国家 863 计划项目(2006AA100310); 山东省科技攻关计划项目(2006GG2205005)

作者简介: 杨春志(1981 -), 男, 河北邢台人, 硕士研究生, 专业方向为水产动物疾病学。

通讯作者: 黄 健, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

tests showed that strain 101 has sensitive to polymyxin. While other drugs had no obvious inhibitory activity to the strain.

Key words: turbot; *Ewardsiella tarda*; 16S rRNA; phylogenetic tree

大菱鲆现已成为我国北方沿海鱼类养殖的主要品种,随着养殖密度的增加与水环境的恶化以及药物的滥用,疾病发生越来越频繁。特别是细菌性疾病近年来发病十分严重,国内外报道的大菱鲆细菌性病原有鳃弧菌、灿烂弧菌、海弧菌、溶藻弧菌、美人鱼弧菌等,除此之外,还有嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、迟缓爱德华氏菌(*Ewardsiella tarda*)、副乳房链球菌(*Streptococcus parauberis*)等^[1-6]。近年来,迟缓爱德华氏菌病在我国海水养殖中发生的频率越来越高,有时会引起大规模死亡,2006年秋季,山东沿海某养殖场的大菱鲆成鱼发生大规模死亡,作者从中分离了一株优势菌,经感染证实了该菌株是引起此次病害的病原菌,经 API20E 自动鉴定卡及 16S rDNA 序列分析鉴定为迟缓爱德华氏菌。本文通过对病原菌的分离和生理生化与分子生物学等方面的鉴定以及药敏试验,以期为大菱鲆养殖的病害防治提供更多的参考资料。

1 材料与方法

1.1 病原菌的分离

参照范文辉^[7]的方法,取患出血病症状典型的濒死大菱鲆,用 70% 酒精棉球对病鱼体表消毒后,用无菌剪刀剪开腹腔并取出病鱼肝、肾、脾等组织小块于 1 mL 无菌离心管中,在超净工作台上用无菌蒸馏水反复冲洗组织块,划线接种于 2216E、TSB 琼脂, LB 培养基, 28 °C 培养 24 ~ 48 h, 进行细菌形态特征等观察。

1.2 人工感染实验

感染用鱼全长(12 ± 2) cm, 水温为 20 ~ 22 °C, 试验容器为 150 L 的水槽。先将分离菌接种在 TSB 固体培养基 28 °C 培养 36 h, 用灭菌的生理盐水洗下菌落, 调整菌液浓度为 2×10^8 。10 倍系列稀释共四个组, 每组 8 尾, 每尾腹腔注射 200 μL, 对照组注射等量生理盐水, 观察其感染后的发病与死亡情况, 计算 15 d 内的半数致死量。

1.3 生理生化试验

采用 API20E(法国梅里埃公司生产)自动鉴定卡按说明所述方法进行鉴定, 并附加氧化酶试验, 采用 apilabplus3.3.3 软件对 API 鉴定卡鉴定结果进行分析, 并按东秀珠^[8]等所述方法进行补充鉴定。

1.4 病原菌 16S rRNA 序列测定及系统发育树的建立

用细菌的通用引物扩增 16S rRNA, 正向引物为 27F: 5'-AGAGTTTGATC(C/A)TGGCTCAG-3'(对应于 E. coli 16S rDNA 序列的第 8-27 个碱基位置); 反向引物 1492R: 5'-TACGG(C/T)TACCTTGTACGACTT-3'(对应于 E. coli 16S rDNA 序列的第 1492-1510 个碱基位置)。引物由上海生工公司合成。100 μL 的 PCR 反应体系中含有: 10 μL 10 × PCR 缓冲液(含 Mg²⁺), 2 μL 10 mmol/L 4 × dNTP, 各 5 μL 10 μmol/L 正向和反向引物, 1 μL 5 U/μL TaqDNA 聚合酶, 10 μL 模板。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 4 min, 1 次; 94 °C 40 s, 55 °C 40 s, 72 °C 1 min 40 s, 30 个循环; 扩增产物经电泳检测后送上海英骏生物技术公司测序。

将所得序列与 GenBank 中的核酸序列进行 BLAST 分析, 选取与病原菌相似性最高的 21 株细菌 16S rDNA 序列, 用 Clustalx (1.83) 软件进行序列比对, 然后用 MEGA (3.1) 软件通过自举分析(Bootstrapping)进行系统发育树的评估, 自举数据集为 1000 次, 采用邻位相连法(Neighbor-joining)获得系统发育树。

1.5 药敏试验

采用纸片扩散法, 将培养 24h 的细菌培养物以无菌海水鱼用生理盐水洗下制成 1.5×10^8 CFU/mL

的菌悬液,取 80 μL 菌悬液涂布于 TSB 培养基平板,用无菌镊子将抗生素纸片(杭州微生物试剂有限公司)轻轻贴在平板表面,28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 48 h 后观察抑菌圈直径的大小。

2 结果

2.1 病原菌特性

从患病大菱鲂分离到一株优势菌编号为 1101,此菌在 2216E 琼脂平板上生长缓慢,28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 48 h 后形成白色细小菌落,直径小于 0.5 mm。在 TSB 和 LB 培养基上 37 $^{\circ}\text{C}$ 生长 36 h 后形成圆形菌落,直径约 0.5 mm,微黄色,不透明;在 TCBS 平板上难以生长,有时为绿色状菌落。革兰氏染色观察发现菌体呈短杆状,单个或成对排列,革兰氏阴性,触酶阳性。

2.2 感染实验

在半个月內,各感染组陆续出现死亡,对照组未出现症状,感染后的病鱼体表变黑,吻端发红,腹部鼓起有土黄色腹水,肛门红肿或突出体外;解剖后肝脏苍白,有的为白色斑点,脾脏肿大,肾脏暗黑色,易碎成糜状;肠黏膜充血,肿胀。经计算半数致死量为 3.34×10^6 cfu/mL,表明此菌有很强的毒性。从发病鱼中重新分离出菌株经鉴定与 1101 一致。

2.3 生理生化特征

氧化酶反应阴性。API20E 自动鉴定卡鉴定结果如表 1 所示,显示 1101 为迟缓爱德华氏菌,可信度为 99%。

表 1 菌株 1101 API20E 生化鉴定结果

Tab. 1 Results of bio-chemical characteristics of strain 2006101101 by API 20E

鉴定项目	结果	鉴定项目	结果
ONPG	-	脲酶 urease	-
硫化氢 H_2S	+	山梨醇 sorbitol	-
伏-波试验 V-P	+	蔗糖 sucrose	-
精氨酸双水解 arginine dihydrolase	-	苦杏仁苷 laetrile	-
赖氨酸脱羧酶 lysine decarboxylase	+	鼠李糖 rhamnose	-
鸟氨酸脱羧酶 ornithine decarboxylase	+	蜜二糖 melibiose	-
色氨酸脱氨酶 tryptophan deaminase	-	阿拉伯糖 arabinose	-
吲哚产生 indole production	+	葡萄糖 glucose	+
明胶酶 gelatinase	-	甘露醇 mannitol	-
柠檬酸盐 citrate	-	肌醇 inositol	-

2.4 16S rRNA 基因序列分析

测序后得到长 1 419 bp 的序列(序列未显示),将此序列在 NCBI 上进行同源性检索,从中选取 21 个相关菌株的 16S rRNA 基因序列进行系统发育学分析,结果如图 1 所示。图中可见此菌株与爱德华氏菌属聚为一支,与迟缓爱德华氏菌更为接近。经同源性比较发现菌株与 AF053975 等六株菌的 16S rDNA 序列同源性高达 99% ~ 100%,可将其鉴定为迟缓爱德华氏菌。

2.5 药敏试验

结果见表 2。在所试的 26 种药物中,绝大多数药物已对此菌株效果甚微,仅有多粘菌素等对此菌有抑菌作用。

3 讨论

迟缓爱德华氏菌是日本学者于 1962 年在鳗鲡养殖场发病的鳗鱼中首次分离得到的^[9]。它可引起多种海、淡水鱼类的疾病^[10],并且属于人畜共患的病原^[11],因此对该菌的研究具有重要意义。

本文从患病大菱鲆亲鱼体内分离出菌株 1101, 经感染试验证明其为强毒株, 在较低的剂量下也可引起幼鱼死亡。利用 API20E 鉴定系统可准确鉴定为迟缓爱德华氏菌, 可信度为 99%。通过 16S rRNA 基因序列测序并建立系统发育树表明此病原与迟缓爱德华氏菌自然类聚。综合 1101 的生理生化特征和 16S rRNA 基因的系统发育学分析结果, 可鉴定为迟缓爱德华氏菌。

近年来我国对鳎的迟缓爱德华氏菌研究较多^[12-14], 而有关迟缓爱德华氏菌感染大菱鲆的研究比较少。从文献中可知从幼鱼到成鱼, 迟缓爱德华氏菌都可感染。李筠^[15]等报道了山东地区引起养殖大菱鲆腹水病病原为迟缓爱德华氏菌; 薛淑霞^[16]报道了天津地区迟缓爱德华氏菌可引起大菱鲆和褐牙鲆的腹水病; 王斌^[17]报道了大连地区全长 10~15 cm 规格的大菱鲆幼鱼在春、夏季频繁发生的一种以全身出血合并腹水为主要症状的疾病, 发病率达 70%~80%, 死亡率为 90%~95%, 病害的水温一般为 18~20℃, 经鉴定为迟缓爱德华氏菌。本文报道了大菱鲆成鱼感染迟缓爱德华氏菌, 死亡率在 30% 左右。由此可推测感染大菱鲆的迟缓爱德华氏菌病在北方沿海养殖区已经蔓延, 应当引起重视。

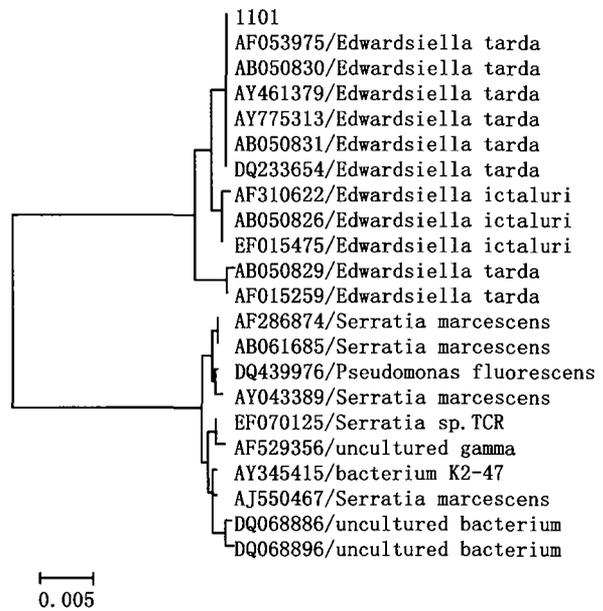


图 1 基于 16S rDNA 序列的系统发育树
Fig. 1 Phylogentic tree based on 16S ribosomal DNA sequence

表 2 药敏试验结果

Fig. 2 The results of the drugs sensitivity test

药物名称	抑菌圈直径 (mm)	敏感度	药物名称	抑菌圈直径 (mm)	敏感度
强力霉素	0	R	阿奇霉素	7	R
菌必治	23 圈内模糊	R	头孢拉丁	12 圈内模糊	R
头孢氨噻肟	23 圈内模糊	R	青霉素	7	R
吡哌酸	0	R	呋喃唑酮	0	R
环丙沙星	0	R	氟哌酸	0	R
美满霉素	0	R	奈啶酸	0	R
佐氟沙星	0	R	复方新诺明	17 圈内模糊	R
新生霉素	0	R	利福平	17	I
磺胺间甲氧嘧啶	0	R	氯霉素	0	R
多粘菌素	11	S	庆大霉素	13	I

注: R = 耐药, I = 中介, S = 敏感

从药敏试验结果来看, 该菌对大多数抗生素已不敏感, 仅有少数几种药物可抑制其生长, 可以设想, 一旦暴发此病, 很难用药物控制, 将会对生产极为不利, 这就要求采用免疫防治等途径来消除不利影响。

参考文献:

[1] 邹玉霞, 张培军, 莫照兰, 等. 大菱鲆出血症病原菌的分离和鉴定[J]. 高技术通讯, 2004, 4: 89-93.
 [2] Novoa B, Nunez S, Fernandez C, et al. Epizootic study in a turbot farm; bacteriology, virology, parasitology and histology[J]. Aquaculture, 1992, 107: 253-258.
 [3] Home M T, Richards R H, Roberts R J, et al. Peracute vibriosis in juvenile Turbot *Scophthalmus maximus*[J]. J Fish Biol, 1977, 11: 355-361.
 [4] 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.

- [5] Villamil L, Figueras 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.
- [6] 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.
- [7] 范文辉, 黄捷, 王秀华, 等. 养殖大菱鲆溃疡症病原菌的分离鉴定及系统发育分析[J]. 微生物学报, 2005, 45(5):665-670.
- [8] 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.
- [9] Hoshina T. On a new bacterium, *Paracolobactrum anguillimortiferum* sp nov Bull Japan Soc[J]. Sci Fish, 1962, 28(2):162-164.
- [10] 郑大海, 麦康森. 迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)研究概况[J]. 海洋湖沼通报, 2004(1):52-59.
- [11] 马勋, 欧阳志明, 陈怀清, 等. 迟缓爱德华氏菌对 Hep-2 细胞的侵袭性[J]. 微生物报, 1998, 38(5):336-340.
- [12] 韩先朴, 李伟, 陈光辉. 鳗鲡爱德华氏病的研究[J]. 水生生物学报, 1989, 13(3):259-264.
- [13] 王国良, 徐兴林, 路正. 鳗鲡爱德华氏菌病原及一新种[J]. 水产学报, 1993, 17(3):224-229.
- [14] 卢全章, 朱心玲. 鳗鲡肝肾病原菌的研究[J]. 水生生物学报, 1994, 18(4):360-368.
- [15] 李筠, 颜显辉, 陈吉祥, 等. 养殖大菱鲆腹水病原的研究[J]. 中国海洋大学学报, 2006, 36(4):649-654.
- [16] 薛淑霞, 冯守明, 孙金生. 海水工厂化养殖大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)和褐牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)腹水病原菌的分离与鉴定[J]. 海洋与湖沼, 2006, 37(6):548-554.
- [17] 王斌, 孙岑, 范薇, 等. 养殖大菱鲆出血性败血症病原菌致病性的研究及鉴定[J]. 大连水产学院学报, 2006, 21(2):100-104.