

矛尾复虾虎鱼溃疡病病原创伤弧菌的鉴定

毕可然, 张晓君, 梁利国, 阎斌伦

(淮海工学院 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005)

摘要: 2009年8月江苏连云港赣榆县多家虾蟹养殖塘混养的矛尾复虾虎鱼(*Synechogobius hasta*)大量死亡, 从病鱼深层溃烂组织及肝脏中分离出大量优势生长的细菌, 人工感染试验证明分离菌对虾虎鱼的半数致死量(LD₅₀)为 1.63×10^6 cfu/g。对分离菌进行了形态特征、理化特性和分子生物学等方面的分析。一方面, 分离菌株16S rRNA和gyrB基因序列的BLAST搜索及最大简约法分析均表明其与创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)亲缘关系最近; 另一方面, 分离菌革兰氏阴性, 氧化酶阳性, 葡萄糖发酵型。因此, 引起江苏连云港赣榆县矛尾复虾虎鱼溃疡病病原菌是弧菌属的创伤弧菌。

关键词: 矛尾复虾虎鱼(*Synechogobius hasta*); 创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*); 16S rRNA基因; gyrB基因
中图分类号: S968 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2011)07-0020-06

矛尾复虾虎鱼(*Synechogobius hasta*)隶属鲈形目(Perciformes)虾虎鱼科(Gobiidae)。俗称海鲷鱼、沙光鱼、扔巴鱼, 是暖温性近海中小型底层鱼类, 主要产于中国渤海、黄海、东海、台湾海峡及沿海咸淡水水域^[1], 是最近几年在中国华北和华中大规模养殖的经济鱼类^[2]。该鱼肉质细嫩, 粗蛋白质、脂类、能源、磷和氨基酸等表观消化率高^[3], 深受消费者青睐。但随着养殖规模的逐年扩大、养殖密度的日益提高, 在2009年8~9月, 江苏连云港赣榆县多家虾蟹养殖池塘内的矛尾复虾虎鱼发生病害, 造成了巨大的经济损失。因此, 病害已成为制约矛尾复虾虎鱼健康养殖发展的关键因素之一。为了明确矛尾复虾虎鱼暴发性死亡原因, 本研究自发病虾虎鱼溃烂肌肉组织、肝脏中分离到菌落特征一致的优势生长细菌, 采用细菌常规生化鉴定方法和分子生物学分析方法对发病矛尾复虾虎鱼进行了致病菌的鉴定, 旨在为科学防治矛尾复虾虎鱼疾病提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 病鱼检验及细菌分离

2009年8月, 江苏连云港赣榆县虾蟹养殖塘混养矛尾复虾虎鱼发生严重疾病, 其症状为头部及体表出血, 部分病鱼肌肉溃烂, 严重的露出骨骼; 剖检可见病鱼肝脏出血、肿胀, 肠壁发红, 个别病鱼肝脏糜烂。随机取体表出血及溃烂严重的濒死病鱼10尾经75%酒精棉球擦拭消毒并刮去表层, 以该深层溃

烂组织、肝胰脏为样品, 划线接种于普通营养琼脂培养基, 28℃培养24h检查, 取分离菌移接于普通营养琼脂斜面(28℃培养24h)做纯培养供检验用, 菌株编号: S0908-2。

1.2 致病性试验

从连云港市赣榆县一家养殖池塘取规格一致、健康无病的矛尾复虾虎鱼100尾。在实验室水族箱系统内暂养2周后试验用。取平均初始体质量28g左右的矛尾复虾虎鱼40尾, 随机分为5组, 每组8尾, 置于5个室内流水容积为80L长方形玻璃纤维钢水族箱中。供试菌株S0908-2接种于普通营养肉汤, 28℃过夜培养, 供试菌液调至 2.1×10^8 、 2.1×10^7 、 2.1×10^6 、 2.1×10^5 cfu/mL, 共4个稀释度, 分别对4组健康矛尾复虾虎鱼腹腔注射, 每尾0.1 mL, 对照组接种同剂量无菌营养肉汤。接种后水族箱水温(27±2)℃, 连续充气, 每天换水, 定时观察记录2周, 计算半数致死量(LD₅₀)。

1.3 形态观察及理化特性分析

对供试菌株S0908-2涂片经革兰氏染色后镜检

收稿日期: 2010-11-02; 修回日期: 2011-04-18

基金项目: 江苏省水产三项工程资助项目(PJ2010-58); 江苏省自然科学基金资助项目(BK2009163); 江苏省生物多样性与生物技术重点实验室开放基金资助项目(164070302104)

作者简介: 毕可然(1978-), 女, 内蒙古人, 讲师, 博士, 主要从事水产动物病原鉴定和检测研究, 电话: 15896101504, E-mail: bikeran@126.com; 张晓君, 通信作者, 教授, E-mail: zyxj9307@163.com

其形态。取纯培养菌, 分别接种于细菌理化特性鉴定用培养基中, 按常规进行氧化酶、接触酶、糖(醇及苷)类代谢、H₂S、吲哚、MR、V-P 试验、硝酸盐还原、OF 试验和枸橼酸盐利用等较系统的理化特性测定, 主要参照文献[4]及文献[5]进行。培养基及细菌微量生化反应管等购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.4 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列测定及系统发生分析

取纯培养供试菌液接种于含盐 1% 的 LB 肉汤中 28 °C 培养 16 h, 按少量细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(上海赛百盛基因技术有限公司)所述方法提取基因组 DNA 保存于-20 °C 冰箱供 PCR 使用。提取的基因组 DNA 分别利用细菌 16S rRNA 基因通用引物对 27F: 5'-AGA GTT TGA TC(C/A) TGG CTC AG-3'; 1492R: 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'^[6]和 *gyrB* 基因 PCR 通用引物对 UP1: 5'-GAA GTC ATC ATG ACC GTT CTG CAY GCN GGN GGN AAR TTY GA-3'; UP2r: 5'-AGC AGG GTA CGG ATG TGC GAG CCR TCN ACR TCN GCR TCN GTCAT-3'^[7]进行 PCR 扩增。每对 PCR 反应体系为 20 μL: 无菌蒸馏水 14.4 μL, 10×PCR 缓冲液 2 μL, 1.5 mmol/L MgCl₂ 1.6 μL, 4×dNTP 混合物 0.4 μL, 10 pmol/L 引物各 0.2 μL, 2.5U/μL 的 Taq DNA 聚合酶 0.2 μL, Genomic DNA 1 μL。PCR 反应条件为: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 55 °C (27F/1492R)和 57 °C (UP1/UP2r)退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 8 min。PCR 扩增产物送上海生物工程技术公司测序部测序。

测序后的序列均使用 DNASTAR 软件包(Madison, Wisconsin)中 SeqMan II 软件进行校对和拼接。拼接后的序列分别上传到 NCBI 的 BLAST 检索系统(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>)进行同源性分析, 同时 GenBank 数据库中同源物种序列被下载利用 Clustal X1.8^[8]软件进行多序列比对, 比对后序列利用 PAUP4.0 软件包^[9]中最大简约法(maximum parsimony, MP)构建系统发生树。

1.5 菌种分类位置确定

根据细菌形态、培养及理化特性测定的结果, 主要依据文献[10], 文献[11]及有关资料, 并结合细菌 16S rRNA 和 *gyrB* 基因系统发生分析结果, 进行分离菌的种属分类位置判定。

2 结果

2.1 分离菌的致病性

人工感染实验结果表明, 菌株 S0908-2 对矛尾复虾虎鱼有较强的毒力, 半数致死量(LD₅₀)为 1.63×10⁶ cfu/g。取感染死亡虾虎鱼肝脏组织做细菌分离、培养和检验实验, 结果不仅分离到大量优势生长的菌株, 同时该分离菌的形态、生长特性同菌株 S0908-2 相似。表明分离菌 S0908-2 是导致 2009 年 8 月连云港赣榆县养殖矛尾复虾虎鱼溃疡并大量死亡的病原菌。

2.2 菌体形态及理化特征

供试菌株 S0908-2 革兰氏染色为阴性短杆菌, 大小在(0.5~0.8) μm×(0.8~3.2) μm; 在普通营养琼脂培养基平板上, 菌落边缘出现锯齿状, 单个菌落光滑圆形, 隆起, 半透明, 乳白色, 培养 24 h 检查直径多在 1 mm 左右。常规生理生化试验表明, 菌株 S0908-2 氧化酶和接触酶阳性, 葡萄糖发酵型, 符合弧菌属共有特征; 该菌精氨酸双水解酶阴性, 利用葡萄糖产酸, 不利用肌醇、蔗糖、阿拉伯糖, 在无 NaCl 胨水中不生长, 1%、3%和 6%NaCl 胨水中能生长, 这些指标与创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)的生理生化特性均一致, 因此可将其初步鉴定为创伤弧菌, 其生理生化特性见表 1。

2.3 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列与系统发育学

S0908-2 菌株 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列全长依次是 1450bp 和 1194bp。上传 NCBI 经 BLAST 同源性检索结果均显示与创伤弧菌 16S rRNA、*gyrB* 基因序列同源性最高, 均达到 99%。基于比对结果从 GenBank 数据库分别下载已有弧菌属菌株 16S rRNA 和 *gyrB* 基因同源序列, 下载的序列经 Clustal X1.8 软件比对分析后, 可构建最大简约树的碱基分别是 1311bp (16S rRNA)和 1050bp (*gyrB*)。两基因系统发生分析结果均支持分离菌株 S0908-2 是创伤弧菌的一员, 系统发生树见图 1 和图 2。

3 讨论

在细菌鉴定和系统分类学研究中, 核糖体小亚基 rRNA(16S rRNA)基因素有“分子化石”之称, 几乎可以对所有的细菌进行属水平上的鉴定^[12]。然而, 由于 16S rRNA 分子高度保守, 对序列相似性极高

表 1 菌株 S0908-2 与创伤弧菌的表型特征比较

Tab. 1 Physiological and biochemical characteristics of S0908-2 and *V. vulnificus*

测定项目	菌株 S0908-2	创伤弧菌 ^a	测定项目	菌株 S0908-2	创伤弧菌 ^a
革兰氏染色	-	-	水杨苷	-	-
37 生长	+	+	胆汁七叶苷	+	+
氧化酶	+	+	-半乳糖苷酶	+	
接触酶	+	+	丙二酸盐利用	+	+
精氨酸双水解酶	-	-	淀粉酶	+	+
OF	F	F	枸橼酸盐利用	-	+
动力		+	醋酸盐利用	-	·
葡萄糖:产酸	+	+	酒石酸盐利用	-	·
产气	-	-	黏液酸盐利用	-	·
乳糖	+	d	苯丙氨酸脱氨酶	-	·
麦芽糖	+	·	蕈糖	+	+
甘露醇	+	d	棉子糖	-	·
甘露糖	+	+	果糖	+	·
蔗糖	-	-	蜜二糖	-	-
阿拉伯糖	-	-	纤维二糖	+	+
阿拉伯醇	-	·	甲基红	-	·
木糖	-	-	V-P 试验	-	-
半乳糖	+	+	葡萄糖铵	+	·
山梨醇	-	-	尿素酶	+	·
山梨糖	-	·	乙酰胺酶	-	·
卫茅醇	-	·	硝酸盐还原	+	+
赤鲜醇	-	·	-甲基-D-葡萄糖苷	+	·
苦杏仁苷	+	·	DNA	-	·
鼠李糖	-	-	NaCl 中生长 0%	-	-
糊精	+	·	NaCl 中生长 1%	+	+
肌醇	-	-	NaCl 中生长 3%	+	+
侧金盏花醇	-	·	NaCl 中生长 6%	+	+

注：“+”为阳性，“-”为阴性，“F”为发酵型，“d”为 26%~75% 阳性，“·”为原文中无记载。上角标 a 指表中数据取自文献[10]

的近缘种无法做进一步区分，常不能反映关系较近的物种间关系；另 16S rRNA 基因序列的高级结构对一级结构进化有束缚，序列比对时可能还必须考虑二级结构，否则会影响系统发育关系的准确性^[13]。因此，在最近研究中，一些研究者尝试用其他保守的蛋白编码基因进行细菌系统发育分析，与 16S rRNA 基因序列分析得到的结果相互补充和验证。*gyrB* 基因是单拷贝的持家基因，普遍存在于各种细菌中，编码 DNA 促旋酶(DNA gyrase)的 B 亚单位，序列长度约 1.2~1.4 kb，平均碱基替换率为每 100 万年变化 0.7%~0.8%，比 16S rDNA 的每 5000 万年变化 1% 的速率要快^[14]，而且不发生水平转移，因此特别适用于菌种间的区别和鉴定。在弧菌科致病菌区分中，基于 *gyrB* 基因序列分析，16S rRNA 基因不能区分的副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)和溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)、霍乱弧菌(*V. cholera*)等被明显分为不

同的致病菌^[15]，在牡蛎创伤弧菌鉴定中，Kumar 等^[16]使用创伤弧菌 *gyrB* 基因特异引物 *gyr-vv1* 和 *gyr-vv2* 实现了 30 CFU/g 创伤弧菌的低浓度检测。本研究采用了细菌 16S rRNA 和 *gyrB* 基因通用引物对创伤弧菌疑似株序列进行了 PCR 扩增、测序和系统发生分析，两基因分析结果均支持 S0908-2 菌株隶属于创伤弧菌，同时在 *gyrB* 基因系统发生树中，S0908-2 菌株与已报道创伤弧菌菌株聚类节点的自引导值是 99%(图 2)，而 16S rRNA 基因聚类节点自引导值仅为 69%(图 1)。此外，生理生化特性(在无盐条件下不生长；氧化酶、接触酶阳性，葡萄糖发酵型；能利用 D-半乳糖、乳糖、纤维二糖；不利用蔗糖、阿拉伯糖；精氨酸双水解酶阴性等)也判定分离于发病矛尾复虾虎鱼的致病菌株为创伤弧菌。因此，结合菌株生理生化特性和多基因分子鉴定，确诊连云港赣榆县多家虾蟹养殖塘混养的矛尾复虾虎鱼暴发的疫病为创伤弧菌病。

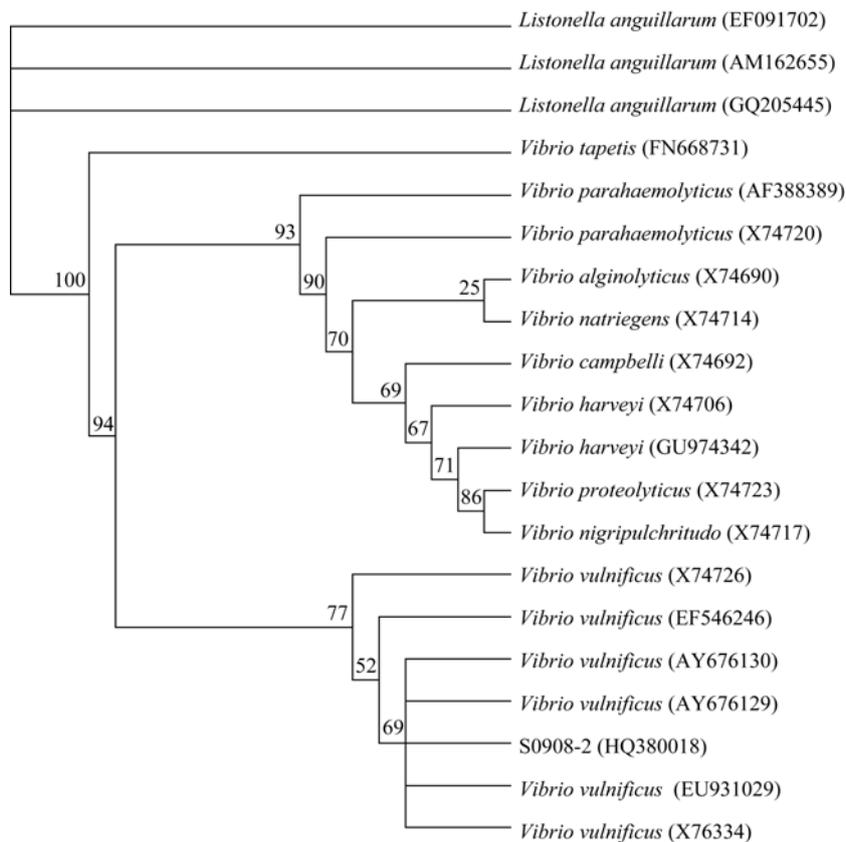


图 1 基于 S0908-2 分离菌株 16S rDNA 序列构建的最大简约树

Fig. 1 Maximum parsimony tree based on 16SrDNA sequence of the isolated S0908-2 strain

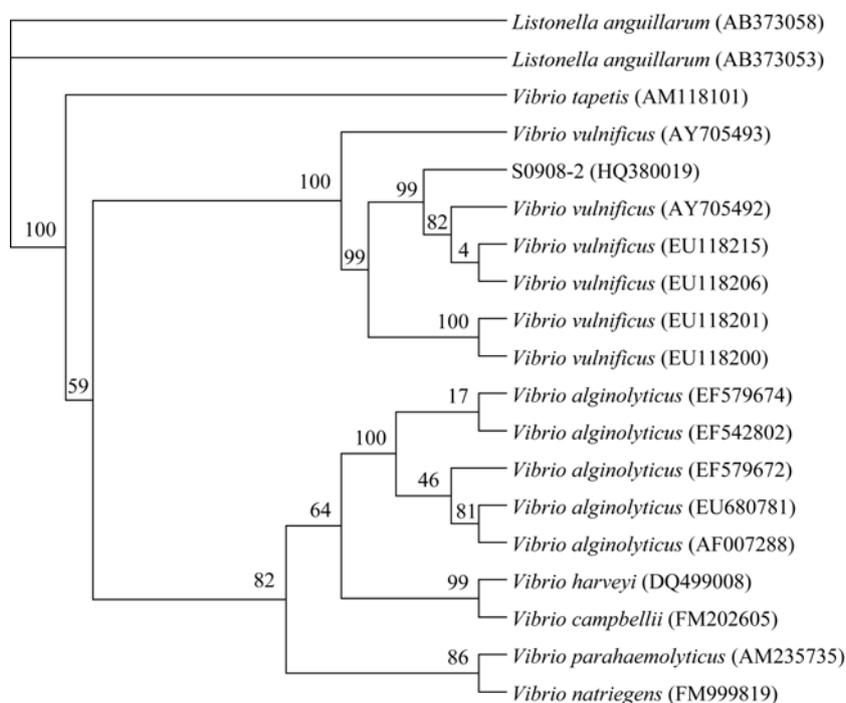


图 2 基于 S0908-2 分离菌株 *gyrB* 基因序列构建的最大简约树

Fig. 2 Maximum parsimony tree based on *gyrB* gene sequence of the isolated S0908-2 strain

创伤弧菌是一种有荚膜的革兰氏阴性嗜盐弧菌,广泛分布于河口和沿海水域水产品中,不仅是海水养殖经济动物弧菌病的主要致病菌之一,可引起日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)^[17]、欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)^[18]、罗非鱼(*Tilapia*)^[19]、石斑鱼(*Epinephelus*)^[20]、石鲈(*Kareius bicoloratus*)^[21]、军曹鱼(*Rachycentron canadum*)^[22]、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[23]、黄姑鱼(*Nibea albiflora*)^[24]等暴发流行性病而大规模死亡;同时还是引起人兽共患病的重要病原菌^[25],既能通过生食含菌的海产品引起原发性败血症和坏死性胃肠炎、脑膜炎、肺炎、角膜炎等疾病,也能通过海水介质致使皮肤创口组织坏死引起严重的创口感染。本研究中 S0908-2 菌株对矛尾复虾虎鱼表现出较强的致病性,人工感染后较短时间内发生死亡,死亡个体头部及体表出血,肌肉溃烂,肠壁发红,肝脏出血糜烂。对养殖和食用带来很大危害。因此,矛尾复虾虎鱼创伤弧菌病的研究将成为海水养殖业的重要课题之一。

综上所述,作者初步判定江苏省连云港市特产经济动物-矛尾复虾虎鱼溃疡病病原是弧菌属的创伤弧菌。但有关此创伤弧菌对矛尾复虾虎鱼的致病机理,在中国所有野生和养殖矛尾复虾虎鱼中的分布有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 伍汉霖. 中国鱼类检索[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 429-436.
- [2] Luo Z, Li X, Bai H, et al. Effects of dietary fatty acid composition on muscle composition and hepatic fatty acid profile in juvenile *Synechogobius hasta*[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2008, 24: 116-119.
- [3] Luo Z, Li X, Gong S, et al. Apparent digestibility coefficients of four feed ingredients for *Synechogobius hasta*[J]. Aquaculture Research, 2009, 40: 558-565.
- [4] 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: 18-118.
- [5] 杨正时, 房海. 人及动物病原细菌学[M]. 石家庄: 河北科学技术出版社, 2003: 1550-1610.
- [6] Martin F P, Collen M C. Bias in template to product ratios in multitemplate PCR[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64 (10): 3724-3730.
- [7] Yamamoto S, Harayama S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(3): 1104-1109.
- [8] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 24: 4876-4882.
- [9] Swofford D L. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods), Version 4.0b10[M]. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates, 2002: 56-103.
- [10] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, et al. Bergey's manual of determinative bacteriology(9th edition)[M]. Baltimore, USA: Williams and Wilkins, 1994: 190-191.
- [11] Krieg N R, Holt J G. Bergey's manual of systematic bacteriology.(Volume 1)[M]. Baltimore, USA: Williams and Wilkin, 1984: 545-548.
- [12] Ward D W, Weller R, Bateson M M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community[J]. Nature, 1990, 345: 63-65.
- [13] Young J P W, Haukka K E. Diversity and phylogeny of rhizobia[J]. New Phytologist, 1996, 133: 87-94.
- [14] La Duc MT, Satomi M, Agata N, et al. *gyrB* as a phylogenetic discriminator for members of the *Bacillus anthracis-cereus-thuringiensis* group[J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 56(3): 383-394.
- [15] 李献梅, 王小芬, 杨洪岩, 等. 促旋酶(*gyrB*) B 亚单位基因 *gyrB* 在鉴别细菌近缘种中的应用[J]. 微生物学报, 2008, 48(5): 701-706.
- [16] Kumar H S, Parvathi A, Karunasagar I, et al. A *gyrB*-based PCR for the detection of *Vibrio vulnificus* and its application for direct detection of this pathogen in oyster enrichment broths[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 111(3): 216-220.
- [17] Muroga K, Nishibuchi Y M. Pathogenic *Vibrio* isolated from cultured eels. É. characteristics and taxonomic status[J]. Fish Pathology, 1976, 11(1): 141-145.
- [18] Biosca E G, Amaro C, Esteve C, et al. First record of *Vibrio vulnificus* biotype 2 from diseased European eel,

- Anguilla anguilla*[J]. Fish Disease, 1991, 14: 103-109.
- [19] Sakata T, Hattori M. Characteristics of *Vibrio vulnificus* isolated from diseased tilapia[J]. Fish Pathology, 1998, 23(1): 33-40.
- [20] 刘秀珍, 邹晓理, 莫小燕, 等. 海水网箱养殖石斑鱼病原菌研究[J]. 热带海洋, 1994, 13(1): 81-86 .
- [21] 沈志强, 刘吉山, 李峰, 等. 石鲈鱼创伤弧菌病的病原分离鉴定与防治[J]. 中国兽医科技, 2001, 31(10): 22-23 .
- [22] 简纪常, 吴灶和, 陈刚, 等. 海水网箱养殖军曹鱼弧菌病原的分离及其特性[J]. 中国兽医学报, 2003, 23(4): 329-330 .
- [23] 于兰萍, 王斌, 李艳, 等. 大菱鲆出血性败血症病原菌的分离与鉴定[J]. 大连水产学院学报, 2008, 23(5): 335-339.
- [24] 马爱敏, 闫茂仓, 常维山, 等. 黄姑鱼创伤弧菌的分离和鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(10): 960-964.
- [25] Cañigral I, Moreno Y, Alonso J L, et al. Detection of *Vibrio vulnificus* in seafood, seawater and waste water samples from a Mediterranean coastal area[J]. Microbiological Research, 2010, 165(8): 657-664.

Identification of *Vibrio vulnificus* from *Synechogobius hasta* with canker disease

BI Ke-ran, ZHANG Xiao-jun, LIANG Li-guo, YAN Bin-lun

(Key Laboratory of Oceanic Biotechnology of Jiangsu, Huaihai Institute of Technology, Lian Yungang 222005, China)

Received: Nov., 2, 2010

Key words: *Synechogobius hasta*; *Vibrio vulnificus*; 16S rRNA gene; *gyrB* gene

Abstract: In August 2009, mass mortality of *Synechogobius hasta* was observed in the shrimp and crabs pond of Ganyu county, Lianyungang city, Jiangsu province. Some pathogenic organisms were isolated from the liver and deep ulceration of the diseased *S. hasta*. The dominant bacterial strain was Gram-negative, oxidase positive, and fermented glucose to produce acids. In addition, 16S rRNA and *gyrB* genes analysis showed that isolation was closely related to *Vibrio vulnificus* than other bacterium. The sequences similarity coefficients were 0.99, on the other hand, and the phylogenetic trees strongly supported isolation were grouped with some reported *V. vulnificus*. Moreover, the LD₅₀ of the bacteria to *S. hasta* was 1.63×10^6 cfu/g. We concluded that *V. vulnificus* was an important pathogenic bacteria causing canker disease in *S. hasta* in Ganyu county, Lianyungang city, Jiangsu province.

(本文编辑: 谭雪静)