

从养殖贝类和大菱鲆分离的海洋发光弧菌的分类地位分析

刘 斌^{1,2}, 叶德赞^{1,2}, Günter Jost³, 林 义^{1,2}, 黄翔玲^{1,2}, 郑森林¹

(1. 国家海洋局 第三海洋研究所, 福建 厦门 361005; 2. 国家海洋局海洋 生物遗传资源重点实验室, 福建 厦门 361005; 3. 德国莱布尼兹波罗的海研究所, 罗斯托克 D-18119)

摘要: 海洋发光弧菌是海水养殖中重要的条件致病菌。从福建省晋江市附近水产养殖场花蛤、牡蛎软组织及波罗地海大菱鲆肠道内含物中分离得到 16 株发光细菌, 采用 ARDRA(amplified ribosomal DNA restriction analysis)、16S rDNA 序列测定、Biolog 碳源代谢分析及药敏试验等方法对这些菌株的分类地位进行了分析。结果表明: 基于 ARDRA 分析指纹图谱, 16 株发光菌分属于 3 个 OTUs(Operational Taxonomic Unit, OTU); 对菌落和细胞形态、ARDRA 指纹图谱及来源不同的 5 个菌株进行 16S rDNA 序列测定和系统发育分析, 结果显示这些菌株均属于 *Vibrio* 属, 分别与 *Vibrio campbellii*, *V. orientalis*, *V. fischeri* 及 *V. azureus* 等亲缘关系最近, 表明 ARDRA 方法存在一定的局限性, 难以区分同一属内的近缘种; Biolog 碳源代谢分析无法将海洋细菌鉴定至种的水平, 但可将亲缘关系较近的菌株划分至同一群体; 5 株菌的药敏试验结果显示各菌株均对复方新诺明和庆大霉素等敏感, 且亲缘关系较近的菌株也具有相似的药物敏感性。四种方法相结合可将细菌区分为属内分类地位相一致的不同群体, 为后续更精确的在生理生化方面鉴定细菌提供参考, 同时为海水养殖中防治潜在的由发光弧菌引发的病害提供有益的帮助。

关键词: 海洋发光弧菌; ARDRA; 系统发育分析; Biolog 碳源代谢分析; 药敏试验

中图分类号: Q93

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2011)11-0029-06

弧菌是海洋环境中常见的条件致病菌, 在某些环境条件下可引起水产养殖动物的病害。迄今已有分离报道的水产致病性弧菌达 10 多种, 危害的对象包括鱼类、甲壳类和贝类动物等^[1]。刘文华等^[2]对厦门浔江牡蛎养殖区弧菌的研究表明, 水体弧菌密度与牡蛎体的弧菌密度呈密切相关性, 是引起养殖区牡蛎严重死亡的原因; *Vibrio campbellii* 可引起鱼、虾和贝类的大量死亡^[3]; 发光弧菌 *V. fischeri* 可引起大黄鱼体表溃烂症^[4]; 而同样具有发光特性的 *V. harveyi* 感染对虾幼体后即能在幼体体内大量繁殖, 致使对虾幼体活力下降, 游泳能力变差, 体色发白, 部分肌肉坏死, 是一种在对虾育苗和养殖中都经常发生的细菌性疾病, 具有发病急, 传播广, 感染力强, 致死率高和防治困难等特点, 给世界养虾业造成了巨大的经济损失^[5-6]。

作者采用 ARDRA、16S rDNA 序列测定、Biolog 碳源代谢分析及药敏试验等方法, 对从福建省晋江市附近水产养殖场的贝类软组织及波罗地海大菱鲆肠道内含物中分离得到的 16 株发光细菌的分类地位进行了分析, 也为防治海水养殖中潜在的由发光弧菌引发的病害提供了帮助。

1 材料与方 法

1.1 培养基及主要试剂和仪器

发光菌培养基: 蛋白胨 5.0g, 酵母膏 1.0g, 甘油 3 mL, 陈海水 1000 mL, 琼脂 15 g, pH 7.0; 引物由上海英骏生物技术有限公司合成, DNA Marker、*Ex Taq* 酶及限制性内切酶 *Afa*、*Msp* 均购自大连 Takara 公司; Biolog 微生物自动鉴定系统由美国 Biolog 公司生产; 药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.2 菌株来源

将 2008 年 5 月采集自福建省晋江市附近营前、白沙及江崎水产养殖场正常生长状态下的花蛤及牡蛎样品去除贝壳后研磨, 取 5 g 经充分研磨的样品置于 45 mL 内置玻璃珠的无菌生理盐水中, 振荡混匀,

收稿日期: 2010-10-25; 修回日期: 2011-02-16

基金项目: 中德合作项目(HB080302(1)); 海洋公益性创业科研专项(200905011)

作者简介: 刘斌(1986-), 男, 硕士研究生, 主要从事海洋微生物研究, E-mail: hautliubin@163.com; 叶德赞, 通信作者, 研究员, 电话: 0592-2195275, E-mail: yedezan@189.cn

取上清液稀释为 10^{-1} , 10^{-2} 两个梯度, 各梯度分别吸取 100 μL , 用涂布棒均匀涂布于发光菌培养基上, 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 24 h, 于暗室中挑取发出荧光的菌株。经分离纯化, 共得到 12 株发光细菌。采取同样的方法于 2009 年 7 月在购自市场的波罗地海大菱鲆肠道内含物中分离得到 4 株发光细菌。

1.3 细菌基因组 DNA 的提取

细菌基因组 DNA 的提取参照《精编分子生物学实验指南》^[7] 中的细菌基因组 DNA 的小量制备方法, 并将提取的 DNA 模板储存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

1.4 细菌 16S rDNA 的 PCR 扩增

所用引物为细菌 16S rDNA 通用引物, 扩增正向引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3'; 反向引物 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 30 个循环后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 最终延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 16S rDNA PCR 产物的 ARDRA 分析

PCR 扩增产物用限制性内切酶 *Afa*、*Msp* 进行双酶切, 酶切反应体系为 20 μL , 其中 PCR 产物 10 μL , 内切酶各 0.5 μL , 相应的 10 \times Buffer 2 μL , 0.1% BSA 2 μL , 去离子水 5 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温 3 h。酶切产物用 3% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 16S rDNA PCR 产物测序及系统发育树的构建

PCR 产物经纯化后送上海英骏生物技术有限公司测序。用 EzTaxon Server version 2.1 对所得到的 16S rDNA 序列进行分析, 并用 Mega 4.1 软件包采用 Neighbor-Joining 算法自展 1000 次进行系统发育树的构建。

1.7 Biolog 碳源代谢分析

按照 Biolog 微生物鉴定操作步骤, 调整接种菌悬液浊度为 28%T, 接种至 96 孔 GN2 微孔鉴定板中, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养至第 24 小时、48 小时、72 小时, 结合“人工”及“自动”两种读板模式, 分别测定 3 次。采用 NTSYS-pc 2.10e 软件对读取结果进行聚类分析。

1.8 药敏试验

药敏试验采用 K-B 纸片琼脂扩散法进行, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 24 h 后取出, 记录各药敏纸片的抑菌圈直径(包括药敏纸片直径 7 mm)。按 CLSI 抗菌药物敏感性试验执行标准(2009 年版)判断药敏结果。

2 结果与分析

2.1 发光细菌的分离、形态观察及染色

经分离纯化得到 16 株发光细菌(表 1), 经革兰氏染色及 KOH 拉丝法验证, 这些菌株均为革兰氏阴性菌; 在发光菌甘油培养基上的菌落均为圆形, 浅黄色, 表面光滑湿润, 边缘整齐或呈锯齿状, 隆起形状分扁平 and 微凸; 油镜下观察, 呈长杆状、短杆状或弧状; 在黑暗中均发射浅绿色荧光。

2.2 ARDRA 结果分析

研究表明^[8], 每一个菌种的 16S rDNA 都有一个独特的酶切图谱, 每种代表一个操作分类单位(即 OTU), 用 16S rDNA 序列的 ARDRA 分析可以区分出菌种。本研究选用限制性内切酶 *Afa* 和 *Msp* 对 16 株发光菌 16S rDNA 的 PCR 扩增产物进行双酶切分析, 其结果见图 1。根据图 1 中的限制性酶切图谱, 可将 16 株菌分为 3 组, 即 3 个不同的 OTUs, 其中 OTU2 包含菌株 FY-6 和 FJ-2, 属于 OTU3 的仅有菌株 FJ-1, 其余 13 个菌株则均属于 OTU1。

表 1 16 株发光细菌来源

Tab. 1 The sample sources of 16 luminous bacteria

菌株编号	采样地点	菌株来源	养殖状态	分离时间(年-月)
FY-1 ~ FY-10	营前养殖场	菲律宾蛤仔软组织	正常	2008-05
FJ-1 ~ FJ-2	江崎养殖场	僧帽牡蛎软组织	正常	2008-05
FB-1 ~ FB-4	波罗地海	大菱鲆肠道内含物	正常	2009-07

2.3 16S rDNA 序列测定及系统发育分析

根据发光细菌菌落和细胞形态、16S rDNA 序列

的 ARDRA 指纹图谱及样品来源的不同, 选取其中 5 个菌株进行 16S rDNA 序列测定并进行系统发育分析。所有测序菌株均与数据库中已知标准菌株的 16S

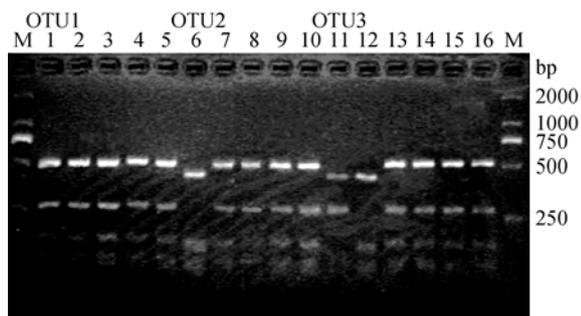


图1 限制性内切酶 *Afa* 和 *Msp* 双酶切 16S rDNA 的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of *Afa* + *Msp* digestion of PCR-amplified 16S rDNAs
 M: DL2000 DNA Marker(Takara 公司); 泳道 1~10 分别代表 FY-1~FY-10;11、12 分别代表 FJ-1 及 FJ-2; 13~16 则分别代表 FB-1~FB-4; 其中 OTU2 包含泳道 6 和 12, 属于 OTU3 的只有泳道 11, 其他泳道则属于 OTU1
 M .DL2000 DNA Marker(Takara); Lane 1~10.FY-1 ~ FY-10; 11, 12. FJ-1,and FJ-2; 13~16. FB-1 ~ FB-4; OTU2 (6,12); OTU3 (11); OTU1 (others)

rDNA 序列具有较高的相似性(表 2)。结合实验菌株 16S rDNA 序列的最高相似性及在系统发育树(图 2)中所处的分支可知, 所有 5 株发光菌株均属于 *Vibrio* 属, 分别与 *V. campbellii*, *V. orientalis*, *V. fischeri* 及 *V. azureus* 具有最近的亲缘关系, 其中菌株 FY-1 和 FB-1 虽同属 OTU1, 鉴定结果却有所不同, 但两株菌在系统发育树中的位置较为接近。

2.4 Biolog 碳源代谢分析

微生物对碳源的利用能力是表征微生物生长情况的主要指标^[9]。本研究中 5 株海洋发光弧菌的 Biolog 碳源代谢分析与数据库中标准菌株的相似性较低, 无法鉴定至种。5 株菌对 95 种碳源的利用率及聚类分析结果见图 3, 各株菌的碳源利用图谱均有所不同, 其中 FY-1 可利用 57 种碳源, FB-1 可利用 54 种, FJ-1 则可利用 34 种, 而 FJ-2 与 FY-6 的碳源利用谱较窄, 分别可利用 18 种和 14 种碳源, 但各

菌株均可利用吐温 40、N-乙酰基-D-葡萄糖胺、D-纤维二糖、D-果糖、α-D-葡萄糖、L-天冬酰胺酸、L-谷氨酸、甘氨酸-L-天门冬氨酸、肌苷和尿苷等 10 种碳源。由图 3 中的碳源代谢聚类分析结果可知, 菌株 FY-6 与 FJ-2 碳源利用情况虽有所差异, 但处于同一分支, 相似度较高, 而其他菌株的碳源利用情况差异较大。

2.5 药敏试验

选用复方新诺明、氟哌酸等 11 种药物进行了药敏性试验。依据 2009 年版 CLSI 抗菌药物敏感性试验执行标准判断药敏结果(表 3)。试验结果表明, 各菌株对同一药物的敏感性多有不同, 但系统发育分析中亲缘关系较近的 FY-6 及 FJ-2 也具有较为相似的药物敏感性, 且所有菌株均对复方新诺名和庆大霉素等敏感。

3 讨论

近些年来, 分子生物学手段发展迅速, 一些新的基于细菌基因组序列的分子生物学方法, 如 ARDRA、rep-PCR、RAPD 等, 为细菌的分离鉴定和多样性研究提供了有力的工具。ARDRA 方法可在 16S rDNA 序列水平上区分细菌种的差异。但研究中也发现 ARDRA 存在着一定的局限性: 用 ARDRA 区分不同的 16S rDNA 片段的精确性有赖于所选用的限制性内切酶的种类和数量, 选用不同的酶可能会划分出不同的 OTUs, 尤其是要区分同一个属内的不同种时需要用几种不同的酶消化, 以综合分析得到的电泳图谱^[10]。本研究中, 通过 *Afa* 和 *Msp* 两种酶的 ARDRA 方法筛选菌株, 16 株发光细菌可分为 3 个 OTUs, 但随后的序列测定和系统发育分析结果表明, 两种酶的 ARDRA 方法可在属水平上对细菌做有效甄别, 也可以区分同一属内亲缘关系较远的种, 但难以区分同一属内的近缘种。

表 2 5 株发光细菌的 16S rDNA 序列相似性

Tab. 2 Similarity of 16S rDNA sequences from the five luminous bacteria

菌株编号	序列长度(bp)	GenBank 登录号	标准菌株	序列相似性(%)
FY-1	1344	GU083604	<i>V. campbellii</i> ATCC 25920(T) (X74692)	99.926
FY-6	1364	GU083605	<i>V. orientalis</i> ATCC 33934(T) (X74719)	99.486
FJ-1	1355	GU083602	<i>V. fischeri</i> ATCC 7744(T) (X74702)	99.335
FJ-2	1369	GU083603	<i>V. orientalis</i> ATCC 33934(T) (X74719)	99.781
FB-1	1376	GU083601	<i>V. azureus</i> LC2-005(T) (AB428897)	98.613

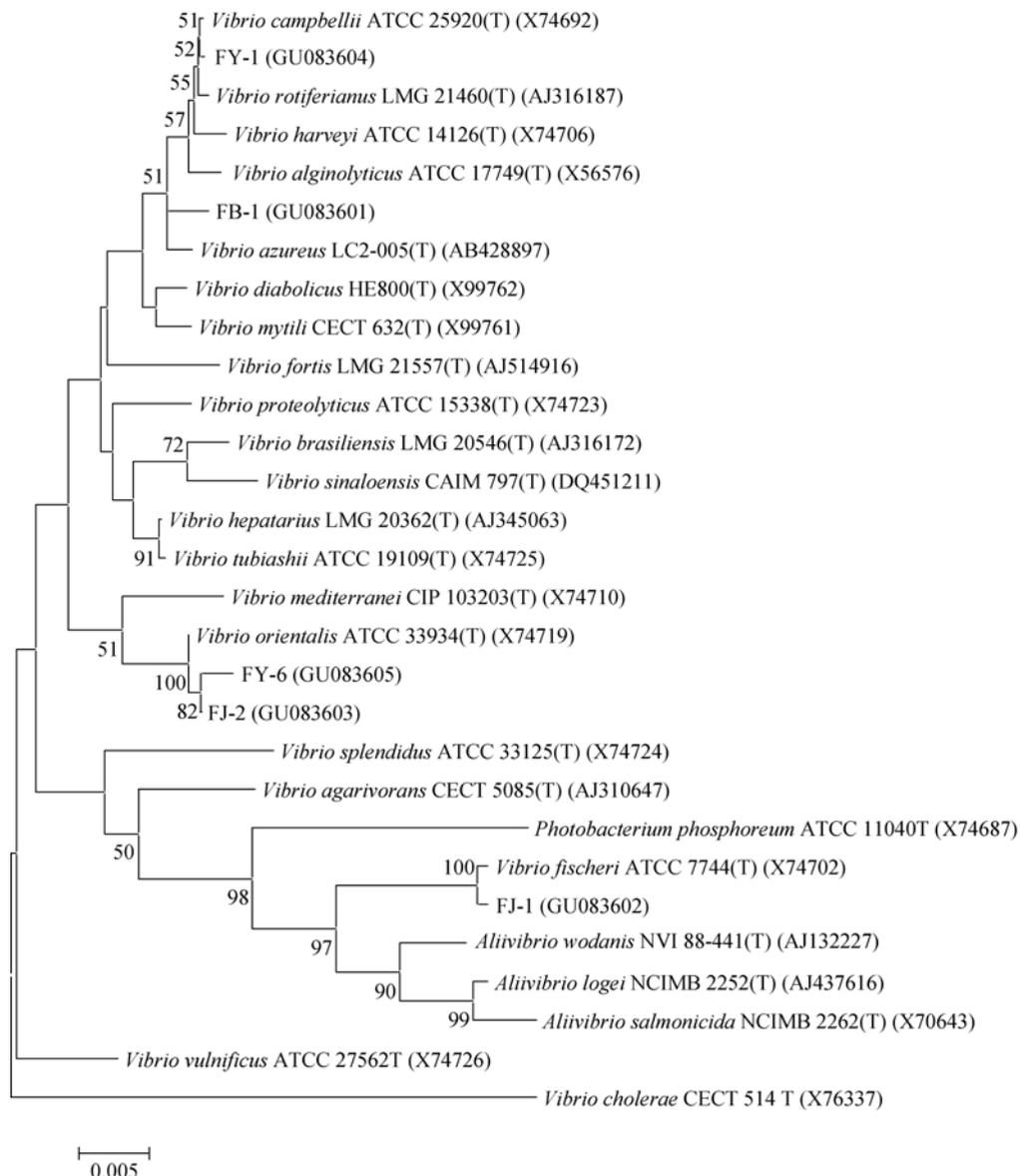


图 2 基于 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of the five luminous bacteria and relating species

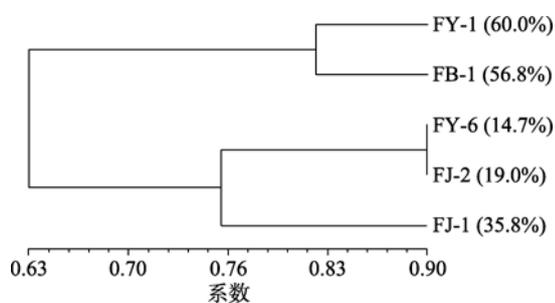


图 3 发光弧菌对 95 种有机碳源的利用率及聚类分析结果

Fig. 3 Cluster analysis of the utilizing rates of 95 C-Sources by the 5 strains

16S rDNA 序列测定及系统发育分析表明, 选取的 5 株发光菌均属于 *Vibrio* 属, 其中菌株 FJ-1 的近缘种为发光细菌 *V. fischeri*; 来源不同的菌株 FY-6 及 FJ-2 与具有发光特性的 *V. orientalis* 以 100% 的置信度处于同一分支, 亲缘关系最近; *V. azureus* 为最近报道的一发光新种^[11], 作者自波罗地海分离得到的发光菌株 FB-1 与其具有最大的 16S rDNA 序列相似性达 98.613%; 而发光菌株 FY-1 与 *V. campbellii* 序列相似性最高(99.926%), 但未见有关于 *V. campbellii* 发光的正式报道。谢文阳等^[12]从台湾沿岸浅水区域分离出来 4 株表型特性非常相似的发光菌株, 鉴定

表 3 11 种药物对 5 株发光弧菌的抑菌圈直径及判断结果

Tab. 3 Sensitivity of the five luminous bacteria to 11 drugs

药物名称	剂量(μg/片)	菌株编号				
		FY-1	FY-6	FJ-1	FJ-2	FB-1
复方新诺明 SMZ/TMP	25	19.5 (S)	26 (S)	29 (S)	29 (S)	25 (S)
氟哌酸 NOR	10	14 (I)	21 (S)	20 (S)	20 (S)	16 (I)
庆大霉素 GM	10	21 (S)	16 (S)	15 (S)	17 (S)	23 (S)
四环素 TE	30	10 (R)	17 (S)	16.5 (S)	19 (S)	11 (R)
利福平 RA	5	17 (I)	22 (S)	17 (I)	22 (S)	20 (S)
氨基青霉素 AM	10	7 (R)	10.5 (R)	7 (R)	12.5 (R)	7 (R)
多黏菌素 B CT	30	9 (R)	15.5 (I)	11 (R)	17 (I)	8 (R)
妥布霉素 NN	10	14 (I)	11.5 (R)	13 (I)	12.5 (I)	17 (S)
先锋 CZ	30	8 (R)	22 (S)	16 (I)	20 (S)	11.5 (R)
先锋噻肟 CTX	30	19 (I)	30 (S)	18 (I)	29 (S)	19 (I)
阿米卡星 AN	30	15 (I)	14 (R)	9 (R)	12.5 (R)	14.5 (I)

注: (1) 药敏纸片直径为 7 mm; (2) 药敏试验解释标准: 敏感(S), 中介(I), 耐药(R)

为 *V. harveyi* 类似种, 但也大多与 *V. campbellii* 而非 *V. harveyi*, 具有最高的 16S rDNA 序列相似性。

Biolog 系统是一种测定微生物对 95 种不同单一碳源利用能力的快速、简便方法, 适用于陆地环境、临床细菌鉴定^[13]。本研究中利用 Biolog 系统得到的 5 株海洋发光弧菌的碳源利用图谱均有所不同, 但无法鉴定至种, 主要是因为海洋细菌的生长条件和陆地细菌有较大区别, 该系统的某些实验条件不适合海洋细菌, 并且目前该鉴定系统收集的标准菌株数据库尚无足够的海洋细菌的特征资料, 可鉴定的种类有限^[14]。药敏试验也属于菌种鉴定的生化指标范围, 其结果可为海水养殖中潜在的由发光弧菌引起的病害的防治提供帮助。两种方法得到的菌株 FY-6 和 FJ-2 的实验结果较为相似, 与 ARDRA 及 16S rDNA 序列测定方法一样, 可将其划分至同一群体, 推测为 *V. orientalis* 的不同亚种。

一般来说, 基于 16S rDNA 序列的分析可将细菌鉴定到属的水平, 常规生理生化特征研究方法依然是将细菌鉴定到种的最精确的方法。结合 ARDRA、16S rDNA 序列测定、Biolog 碳源代谢分析及药敏试验等方法, 虽无法鉴定海洋细菌至种, 但可将细菌区分为属内分类地位相一致的不同群体, 为后续更精确的在生理生化方面鉴定细菌提供参考依据。

参考文献:

[1] 李亚晨, 包永明, 吕建发, 等. 海洋水产动物弧菌病的生物防治[J]. 水产科学, 2004, 23(2): 35-38.
 [2] 刘文华, 叶德赞, 倪纯治, 等. 厦门浔江湾牡蛎养殖

区弧菌研究[J]. 台湾海峡, 1996, 15(4): 412-415.
 [3] 沈晓盛, 蔡友琼, 房文红, 等. 养殖牡蛎体内检出坎氏弧菌的鉴定[J]. 微生物学报, 2005, 45(2): 177-180.
 [4] 张庆华, 瞿小英, 郑岳夫, 等. 大黄鱼体表溃烂症病原菌的鉴定[J]. 上海水产大学学报, 2003, 12(3): 233-237.
 [5] 黄万红, 陈月忠. 对虾发光病生物防治技术的初步研究[J]. 福建水产, 2007, 2: 8-14.
 [6] 梁华芳, 庞雄明. 南美对虾和斑节对虾育苗中发光病的综合防治[J]. 水产养殖, 2003, 24(4): 31-32.
 [7] 奥斯伯 F M, 布伦特 R, 金斯顿 E, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 39.
 [8] Dunbar J, White S, Forney L. Genetic diversity through the looking glass: effect of enrichment bias [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(4): 1326-1331.
 [9] Kennedy A C, Smith K L. Microbial diversity and sustainability of agricultural soils [J]. Plant Soil, 1995, 23(2): 69-79.
 [10] Priemé A, Braker G, Tiedje J M. Diversity of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) gene fragments in forested upland and wetland soils [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68: 1893-1900.
 [11] Yoshizawa S, Wada M, Kita-Tsukamoto K, et al. *Vibrio azureus* sp. nov., a luminous marine bacterium isolated from seawater [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59: 1645-1649.
 [12] 谢文阳, 邱秀慧. 海洋弧菌多样性[J]. 世界科技研究

- 进展, 2005, 27(2): 34-41.
- [13] 谢家仪, 王永力. Biolog 细菌自动鉴定系统的应用与研究[J]. 微生物学通报, 1996, 23(5): 264-267.
- [14] 莫照兰, 茅云翔, 陈师勇, 等. 养殖牙鲆鱼苗腹水症病原菌的鉴定及系统发育分析[J]. 海洋与湖沼, 2003, 34(2): 131-141.

Classification of marine luminous bacteria isolated from farming seashells and *Scophthatmus maximus*

LIU Bin^{1,2}, YE De-zan^{1,2}, Günter JOST³, LIN Yi^{1,2}, HUANG Xiang-ling^{1,2}, ZHENG Sen-lin¹

(1. Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration Xiamen 361005, China; 2. Key Laboratory of Marine Biogenetic Resource, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China; 3. Leibniz Institute for Baltic Sea Research, Rostock D-18119, Germany)

Received: Oct., 25, 2010

Key words: marine luminous bacteria; ARDRA; phylogenetic analysis; biolog system; drug sensitive test

Abstract: Marine luminous vibrios are important opportunistic pathogens in marine aquaculture. 16 luminous bacteria were isolated from the soft bodies of clams (*Ruditapes philippinarum*) and of oysters (*Saccostrea cucullata*) collected in the aquacultural farms near Jinjiang in Fujian Province and from the gastroenteric contents of turbot fish (*Scophthatmus maximus*) from Baltic Sea. To ascertain the taxonomic statuses of the bacteria, four methods were applied. The ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis) fingerprints of 16 strains showed three different operational taxonomic units (OTUs). According to the bacterial morphology of colonies and cells, the ARDRA fingerprints, and sample sources, five strains were sent for sequencing of 16S rDNA. The results of phylogenetic analysis of 16S rDNA evinced that they are all belong to genus *Vibrio*, and most closely related to *V. fischeri*, *V. orientalis*, *V. azureus*, and *V. campbellii* respectively. This result indicates that ARDRA method has limitation when distinguishing different species that are closely related from the same genus. Biolog C-Source-Utilizing analysis could not identify marine bacteria to species level according to the database, but could classify the closely related bacteria species to the same group. The results of drug sensitive tests by the K-B method showed that the closely related species also had similar drug sensitivities. All of the five strains were sensitive to sulfamethoxazole and gentamicin, which will be helpful to treat potential luminous bacteria diseases in marine aquaculture. The combination of the four methods could classify the bacteria species to different groups and this could be the basis for further physiological characterization.

(本文编辑: 梁德海)