

两株养殖大菱鲆体表出血病原菌的分离鉴定

李杰¹, 莫照兰², 茅云翔³, 肖鹏²

(1. 中国海洋大学水产学院, 山东青岛 266003; 2. 中国科学院海洋研究所海洋生物学开放实验室, 山东青岛 266071; 3. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东青岛 266003)

摘要:从秦皇岛和胶南患出血病的大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)肾脏中分别分离得到优势菌株 MHK₂ 和 JN, 人工感染实验证实这两株菌对大菱鲆有较强的致病性, 半数致死量(LD₅₀)分别为 6.30×10^3 cfu/尾和 2.51×10^4 cfu/尾。对病原菌 16S rDNA 序列对比分析及进化树分析表明, MHK₂ 和 JN 与迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)高度一致。API ID32E 快速鉴定结果表明, MHK₂ 和 JN 生理生化特征与非致病性迟缓爱德华氏菌标准菌株 LSE₆ 一致, 属于迟缓爱德华氏菌。经 API ZYM 酶活检测, MHK₂ 和 JN 的碱性磷酸盐酶和酸性磷酸酶活性明显高于 LSE₆, 这两项酶活特征有望作为区别致病性和非致病性迟缓爱德华氏菌的一个标准。

关键词:大菱鲆(*Scophthalmus maximus*); 出血病; 迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)

中图分类号: S941.42

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)10-0001-05

大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)是由欧洲引入中国的名贵经济鱼类, 随着 1998 年人工苗种培育技术获得突破, 大菱鲆养殖已从山东省快速辐射至北方其他沿海各省。在大菱鲆养殖业迅猛发展的同时, 由于养殖设施及管理不规范、苗种和成鱼频繁交易及养殖大环境恶化, 大菱鲆病害日渐严重^[1,2]。病毒病、细菌病以及寄生虫病的爆发引起大菱鲆的大范围死亡^[2,3]。2004 年以来, 山东地区多个大菱鲆养殖场发生了由迟缓爱德华氏菌引起的爱德华氏菌病^[4,5], 损失严重。

迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)为革兰氏阴性杆菌, 属于肠杆菌科(Enterobacteriaceae)爱德华氏菌属(*Edwardsiella*)。该菌广泛存在于各种水生环境, 有较广的宿主范围, 在多种动物如鱼类、两栖类、爬行类以及包括人类在内的哺乳动物都发现它的存在^[6~8]。迟缓爱德华氏菌易感染水生鱼类, 引发爱德华氏菌病, 该病是中国养殖鱼类的主要疾病^[9~12]。

2004 年在河北秦皇岛养鱼场、2006 年在胶南大珠山养鱼场大菱鲆爆发细菌病, 发病鱼体长 7~12 cm, 鳍基部不同程度出血发红, 解剖可见腹腔大量腹水以及肠、胃不同程度的出血以及肝、肾肿大等症状, 发病鱼池大菱鲆死亡率在 25% 左右。本研究分别从两个养鱼场濒死的发病大菱鲆的肾脏分离得到了两株优势菌 MHK₂ 和 JN。人工感染实验证实这两株菌对大菱鲆有较强的致病性, 发病症状与自然发病鱼类似, 证实这两株菌是大菱鲆的病原菌。利用 16s rDNA 和 API ID32E 细菌鉴定试剂条对这

两株菌进行了鉴定, 确定两株菌都是迟缓爱德华氏菌, 并利用 API ZYM 酶活试剂条对病原菌酶活做了检测。

1 材料和方法

1.1 病原菌的分离

取发病养殖大菱鲆肾脏, 匀浆, 梯度稀释并涂布于胰大豆蛋白胨培养基(TSA)平板上, 选取优势菌落并纯化。其中, 自河北秦皇岛养鱼场发病濒死大菱鲆分离纯化的菌命名为 MHK₂; 自胶南大珠山养鱼场发病濒死大菱鲆分离纯化的菌命名为 JN。

1.2 人工感染实验

实验用大菱鲆购自胶南大场养鱼场, 平均体质量 12 g/尾, 随机分组、每组 10 尾暂养于 15 L 水族箱中, 水温 20℃, 正常通气喂食换水, 暂养 1 周后进行实验。

将过夜培养的 MHK₂、JN 培养物, 以无菌 PBS (pH 7.4) 离心(4 000 r/min)洗涤两次, 调节菌悬液密度至 10^8 cfu/mL。用 PBS 进行 10 倍系列稀释, 每

收稿日期: 2008-05-21; 修回日期: 2008-07-23

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(2006AA100310); 国家重点基础研究发展计划资助项目(2006CB101803); 国家海洋局 908 专项项目(908-01-ZH3); 国家自然科学基金资助项目(30671613)

作者简介: 李杰(1982-), 男, 山东青岛人, 硕士研究生, 主要从事海洋微生物与水产动物病害研究, 电话: 0532-82898561, E-mail: blowpac@163.com; 莫照兰, 通讯作者, E-mail: zhlm@ms.qdio.ac.cn

尾大菱鲆腹腔注射 0.1 mL; 对照组注射 0.1 mL PBS。连续观察 14 d, 随时记录发病症状及死亡情况, 根据改进的寇氏法^[13]计算半致死量(LD₅₀)。

1.3 细菌 16S rDNA 序列的测定

采用细菌 16S rDNA 通用引物, 扩增 16S rDNA 基因保守区段 27-524 核苷酸序列。正向引物序列为 5-GAGTTTGMTTCCTGGCTCAG-3, 反向引物序列为 5-CTGCTGGCACGGAGTTAG-3。引物由上海生物工程公司合成。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 7 min。扩增产物经电泳检测后交由博尚公司测序, 测序结果在 NCBI 中进行比对, 采用 Mega4.0 进行进化树分析作图。

1.4 病原菌 API ID32E 快速鉴定

API ID32E 细菌快速鉴定系统和 ATB Expression 微生物鉴定分析仪由生物梅里埃公司生产, 按照其说明书, 对 MHK₂、JN 进行培养和鉴定; 对照为非致病性迟缓爱德华氏菌标准菌株 LSE₆, 由新加坡国立大学赠送。

1.5 病原菌 API ZYM 酶活检测

API ZYM 酶活检测系统由生物梅里埃公司生产, 按照其说明书, 对 MHK₂、JN 和 LSE₆ 进行酶活测定。

2 结果

2.1 病原菌的分离和人工感染实验

从发病大菱鲆肾脏组织匀浆稀释液中分离得到优势菌株 MHK₂ 和 JN, TSA 平板上生长 24 h 后, 其菌落都为圆形、透明、边缘整齐的较小菌落。

人工感染实验发现, 感染的大菱鲆很快发病, 都出现鳍基部不同程度出血发红, 腹水, 肠、胃出血, 以及肝、肾肿大等症状。发病鱼在一周内死亡, 对照组无死亡现象。从人工感染的发病鱼肾脏重新分离菌株, 在 TSA 平板上生长 24 h 后, 菌落形态及生理生化特征均与 MHK₂、JN 一致。根据平板计数结果, MHK₂ 菌悬液密度为 2.61×10^8 cfu/mL, JN 菌悬液密度为 2×10^8 cfu/mL, 各密度组死亡鱼数见表 1。根据改进的寇氏法^[13]计算 LD₅₀, 得到 MHK₂ 的 LD₅₀ 为 6.30×10^3 cfu/尾, JN 的 LD₅₀ 为 2.51×10^4 cfu/尾。

表 1 MHK₂ 和 JN 人工感染实验

Tab. 1 Infection experiments on turbot by MHK₂ and JN

菌密度 (cfu/mL)	实验鱼数 (尾)	鱼死亡数(尾)	
		MHK ₂	JN
10 ⁷	10	10	10
10 ⁶	10	10	10
10 ⁵	10	10	10
10 ⁴	10	7	4
10 ³	10	4	0
10 ²	10	0	0
LD ₅₀ (cfu/尾)		6.30×10^3	2.51×10^4

2.2 病原菌 16S rDNA 序列分析和比较

序列 Genbank 编号为 EU761592。MHK₂ 与迟缓爱德华氏菌标准菌株 AY775313 相似度为 100%, JN 与 AY775313 相似度为 99%, 初步确认两株菌应该属于爱德华氏菌属, 可能是迟缓爱德华氏菌。根据 16S rDNA 构建的系统发生树如图 1, 由图 1 可以看出, 与 MHK₂、JN 聚类的一个分支上的细菌都是爱德华氏菌, 与迟缓爱德华氏菌亲缘关系最近。

2.3 API ID32E 快速细菌鉴定

利用 API ID32E 鉴定试剂条检测, 生化鉴定结果(表 2)可以看出 MHK₂ 和 JN 与迟缓爱德华氏菌标准菌株 LSE₆ 完全一致。经 ATB Expression 微生物鉴定分析仪分析, 待鉴定菌株 MHK₂、JN 的鉴定结果只有一项与迟缓爱德华氏菌不符合(吡啶), 并鉴定为迟缓爱德华氏菌。据此鉴定结果, 可以确认 MHK₂、JN 为迟缓爱德华氏菌。

2.4 病原菌 API ZYM 酶活检测

API ZYM 酶活检测结果见表 3。其中, MHK₂ 和 JN 是本研究待检测的菌株, LSE₆ 是迟缓爱德华氏菌非致病性菌株, 由表 3 可以看出, MHK₂ 和 JN 碱性磷酸盐酶活性很强, 而迟缓爱德华氏非致病性菌株 LSE₆ 几乎没有任何碱性磷酸盐酶活性; MHK₂ 和 JN 的酸性磷酸酶的活性也要高于非致病性菌株 LSE₆。在白氨酸芳胺酶和萘酚-AS-BI-磷酸水解酶活性上, MHK₂、JN 和 LSE₆ 大致相同。在 API ZYM 所检测的其他 15 种酶中, 这 3 株菌都没有表现出活性。

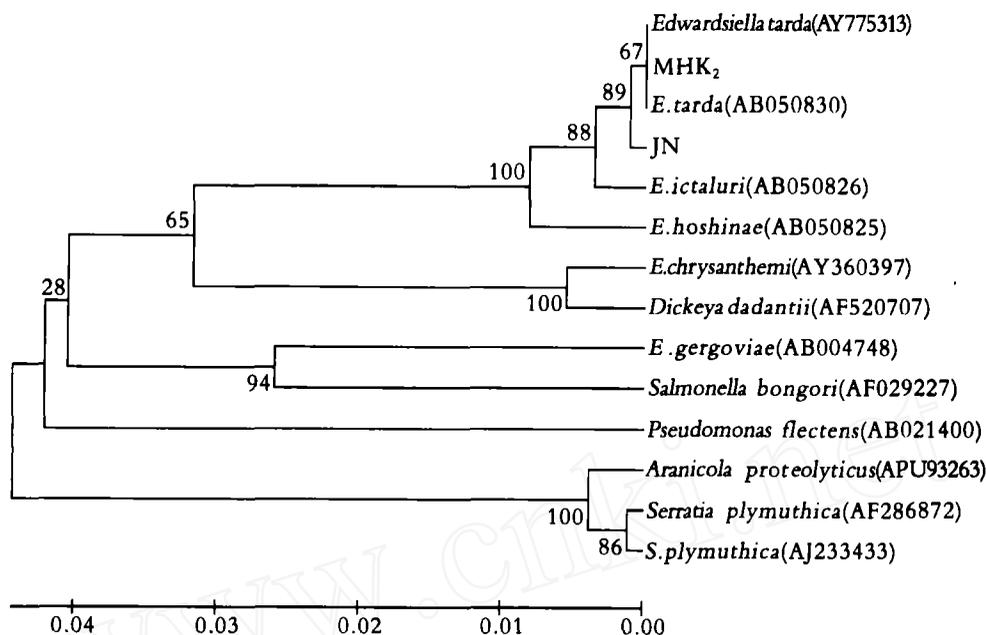


图1 基于16S rDNA序列构建的系统发生树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence analysis

每个 Genbank 存取号代表一株菌株的 16S rDNA 序列

Sequences are all indicated by genbank accession number

表2 MHK₂、JN 和 LSE₆ API ID32E 生理生化特征比较

Tab. 2 Comparison between physiological and biochemical characteristics of MHK₂, JN and LSE₆

鉴定项目	MHK ₂	JN	LSE ₆	鉴定项目	MHK ₂	JN	LSE ₆
鸟氨酸脱羧酶	+	+	+	吡啶产生	-	-	-
精氨酸双水解酶	-	-	-	N-乙酰-β-葡萄糖苷酶	-	-	-
赖氨酸脱羧酶	+	+	+	β-半乳糖苷酶	-	-	-
脲酶	-	-	-	葡萄糖	+	+	+
L-阿拉伯糖醇	-	-	-	蔗糖	-	-	-
半乳糖酸盐	+	+	+	L-阿拉伯糖	-	-	-
5-酮基·葡萄糖酸钠	-	-	-	D-阿拉伯糖醇	-	-	-
脂肪酶	-	-	-	α-葡萄糖	-	-	-
酚红	+	+	+	α-半乳糖苷酶	-	-	-
β-葡萄糖苷酶	-	-	-	鼠李糖	-	-	-
甘露醇	-	-	-	海藻糖	-	-	-
麦芽糖	+	+	+	肌醇	-	-	-
侧金盏花醇	-	-	-	纤维二糖	-	-	-
PLE	-	-	-	山梨醇	-	-	-
β-葡萄糖酸酶	-	-	-	α-麦芽糖苷酶	-	-	-
丙二酸	-	-	-	L-天门冬素芳胺酶	-	-	-

表3 MHK₂、JN 和 LSE₆ 的 API ZYM 酶活检测

Tab.3 API ZYM system for research of enzymatic activity detection of MHK₂, JN and LSE₆.

测定的酶	MHK ₂	JN	LSE ₆
对照	0	0	0
碱性磷酸盐酶	4	4	1
酯酶(C4)	0	0	0
类脂酯酶(C8)	0	0	0
类脂酯酶(C14)	0	0	0
白氨酸芳胺酶	5	5	5
缬氨酸芳胺酶	0	0	0
胱氨酸芳胺酶	0	0	0
胰蛋白酶	0	0	0
胰凝乳蛋白酶	0	0	0
酸性磷酸酶	5	5	3
萘酚-AS-BI-磷酸水解酶	3	3	3
α-半乳糖苷酶	0	0	0
β-半乳糖苷酶	0	0	0
β-糖醛酸苷酶	0	0	0
α-葡萄糖苷酶	0	0	0
β-葡萄糖苷酶	0	0	0
N-乙酰-β-葡萄糖胺酶	0	0	0
α-甘露糖苷酶	0	0	0
β-岩藻糖苷酶	0	0	0

注:数字的大小代表酶活的高低,最高为5,最低为0,低于3时视为没有活性

3 讨论

迟缓爱德华氏菌是水产养殖中重要病原之一,给水产养殖业造成了巨大的损失。在国内,许多学者先后报道了迟缓爱德华氏菌感染鱼类的病例。卢全章等^[4]鉴定广东潮州鳗鲡(*Anguilla japonica*)肝肾病的致病菌主要是迟缓爱德华氏菌,部分病例是由该菌和运动性嗜水气单胞菌引起的并发症。周凯等^[15]报道了欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)红头病,经鉴定其病原也为迟缓爱德华氏菌。此外,在鲤鱼(*Cyprinus carpio*)、罗非鱼(*Tilapia mossambica*)以及牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)等养殖鱼类中也相继发现迟缓爱德华氏菌感染病症^[16-18]。2007年,李筠、王印庚等^[4,5]分别对山东地区的养殖大菱鲆自然发生的爱德华氏菌病进行了调查研究,将病原鉴定为迟缓爱德华氏菌,证实迟缓爱德华氏菌可以侵染养殖大菱鲆。在此次调查研究中,来自河北和山东两家养殖场大菱鲆出血病的病原菌经过16S rDNA序列分析和API ID32E系统鉴定,均确定为迟缓爱德华氏菌,表明迟缓爱德华氏菌不仅仅在山东感染养殖大菱鲆引起爱德华氏菌病,在河北地区也有感

染养殖大菱鲆的病例发生。

在细菌鉴定分类和鉴定中,16S rDNA 因其独特的序列特性已成为最常用的工具^[19]。其分子内存在的可变区显示出细菌不同分类等级水平上的特异性,因此,只要测定16S rDNA的部分可变区序列即可达到对分离物鉴定的目的^[20]。目前普遍认为,16S rDNA的同源性大于97.5%的细菌菌株可视为同种,而同属的16S rDNA的同源性应大于或等于90%^[21]。本研究测定了两株菌的部分16S rDNA序列,与Genbank上的迟缓爱德华氏菌相似度都在99%以上,可以初步认为这两株菌属于迟缓爱德华氏菌。通过API ID32E细菌快速鉴定系统进一步检测确认,这两株菌都是迟缓爱德华氏菌。

环境水体中的迟缓爱德华氏菌包括致病性菌株和非致病性菌株^[22],非致病性菌株缺少一些致病因子编码基因,不会引发爱德华氏菌病。Srinivasa等^[23]研究发现,迟缓爱德华氏菌的重要毒力因子,如过氧化氢酶(KatB),只存在于致病性迟缓爱德华氏菌中,在非致病性菌株中没有相应的编码基因;同时,在致病性迟缓爱德华氏菌中,不同菌株过氧化氢酶的活力也有所差别。这可能也是造成致病性菌株毒力有所差别的原因。为比较致病性迟缓爱德华氏菌和非致病性迟缓爱德华氏菌的酶活差别,选用API ZYM的酶活检测试剂条对MHK₂、JN和LSE₆的胞外酶活做了检测。结果显示,尽管致病性菌株MHK₂、JN和非致病性菌株LSE₆在生理生化等鉴定特征上完全一致,但在胞外酶的活性上还是有一些差别,如酸性磷酸酶和碱性磷酸酶。这些酶活上的差别是否与迟缓爱德华氏菌致病机制紧密相关,能否作为迟缓爱德华氏菌致病性菌株和非致病性菌株的一个区分标准,需要进一步的研究来确定。

参考文献:

- [1] 雷霖霖. 大菱鲆养殖技术[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2003. 111-134.
- [2] 王印庚, 张正, 秦蕾, 等. 养殖大菱鲆主要疾病及防治技术[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(6): 61-68.
- [3] 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.
- [4] 李筠, 颜显辉, 陈吉祥, 等. 大菱鲆腹水病病原的研究[J]. 中国海洋大学学报, 2006, 36(4): 649-654.
- [5] 王印庚, 秦蕾, 张正, 等. 养殖大菱鲆的爱德华氏菌病[J]. 水产学报, 2007, 31(4): 487-495.
- [6] 蔡完其, 孙佩芳, 刘至治. 中华鳖爱德华氏菌病原和组织病理研究[J]. 水产学报, 1997, 21(4): 428-433.
- [7] Plumb J A. Edwardsiella septicaemia[J]. Fish Diseases and Disorders, 1999, 3: 479-521.

- [8] 周常义, 陈晓凤, 何仲京. 牛蛙迟缓爱德华氏菌变异株 K 的分离与鉴定[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2004, 9(1): 26-31.
- [9] 董传甫, 林天龙, 陈日升, 等. 日本鳗鲡败血腹水病病原研究[J]. 水产科学, 2002, 21(1): 5-8.
- [10] 张晓君, 陈翠珍, 房海, 等. 牙鲆迟缓爱德华氏菌嗜噪阴性变异株感染症及其病原特性研究[J]. 2004, 20(12): 1 079-1 803.
- [11] 薛淑霞, 冯守明, 孙金生. 海水工厂化养殖大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 和褐牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 腹水病病原菌的分离与鉴定[J]. 海洋与湖沼, 2006, 37(6): 548-554.
- [12] 梁万文, 陈明, 余晓丽, 等. 斑点叉尾鲷肠败血症病原菌的分离与鉴定[J]. 西南农业学报, 2007, 20(5): 1 124-1 129.
- [13] 杨茂成. 兽医统计学[M]. 北京: 中国展望出版社, 1990. 232-234.
- [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] 周凯, 郑国兴, 孙其焕. 欧洲鳗鲡红头病病原的研究[J]. 水生生物学报, 1999, 23(4): 304-310.
- [16] 张超睿, 王可之, 杨新山. 鲤鱼爱德华氏菌败血症的诊断和防治[J]. 内陆水产, 2002, 8: 31.
- [17] 孔繁德, 陈琼, 王生育. 福建家养淡水鱼暴发传染病的细菌分离鉴定与防治[J]. 福建农业学报, 2004, 19(4): 213-218.
- [18] 张浴阳, 王维娜, 王军霞, 等. 牙鲆爱德华氏菌病的研究[J]. 水产科学, 2003, 22(1): 34-36.
- [19] 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. 409-412.
- [20] Gray M W. On the evolutionary descent of organisms and organelles; a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 1984, 12(14): 5 837-5 851.
- [21] 赛文婴, 东秀珠. 定向进化同源基因在细菌系统进化研究中的应用[J]. 微生物学通报, 2000, 27(5): 377-381.
- [22] 葛艳, 陈怀青, 陆承平. 迟缓爱德华氏菌检验程序的研究[J]. 中国动物检疫, 1999, 16(3): 2-3.
- [23] Rao P S S, Yamada Y, Leung K Y. A major catalase (KatB) that is required for resistance to H₂O₂ and phagocyte-mediated killing in *Edwardsiella tarda*[J]. *Microbiology*, 2003, 149: 2 635-2 644.

Isolation and classification of two pathogenic bacteria associated with hemorrhages of *Scophthalmus maximus*

LI Jie¹, MO Zhao-lan², MAO Yun-xiang³, XIAO Peng²

(1. College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 3. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: May, 21, 2008

Key words: *Scophthalmus maximus*; Hemorrhages; *Edwardsiella tarda*

Abstract: Two dominated strains MHK₂ and JN were isolated from cultured turbot (*Scophthalmus maximus*) with hemorrhage disease in Qinhuangdao and Jiaonan respectively. Infection experiments showed that two strains were highly pathogenic to turbot. The LD₅₀ of MHK₂ is 6.30 × 10³ cfu/fish, and JN is 2.51 × 10⁴ cfu/fish. The sequences of 16S rDNA of MHK₂ and JN were compared to those in Genbank Database. They shared high similarity to *Edwardsiella tarda*. By API ID32E systematic identification, MHK₂ and JN were similar in characteristics to *E. tarda* standard strain LSE₆, and were identified as *E. tarda*. By API ZYM enzymatic activity detection, MHK₂ and JN were significantly higher in alkaline phosphatase and acid phosphatase activity than those of LSE₆. These two characteristics may be a way to distinguish the pathogenicity from the non-pathogenic *E. tarda*.

(本文编辑: 谭雪静)