

大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)源美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damsela*)的分离鉴定及致病性研究*

张 飞¹ 苏永全² 王 军² 覃映雪¹ 马 英¹ 鄢庆枇^{1①}

(1. 集美大学水产学院 厦门 361021; 2. 厦门大学海洋与地球学院 厦门 361005)

摘要 于 2010 年从宁德患病大黄鱼中分离得到一株优势菌 NPL1006, 经鉴定该菌株为美人鱼发光杆菌。人工感染实验结果显示该菌对大黄鱼的半致死浓度(LD_{50})为 7.96×10^3 CFU/g 体重。药敏性实验结果显示 NPL1006 对头孢唑啉、头孢噻吩和诺氟沙星等 9 种药物高度敏感。采用纸片法检测得到 NPL1006 的胞外产物具有蛋白酶、明胶酶和淀粉酶活性。胞外产物感染斑马鱼研究结果显示其 LD_{50} 为 1.20mg 蛋白/kg 体重。以上结果表明大黄鱼源美人鱼发光杆菌 NPL1006 胞外产物含有多种毒力因子, 与该菌对大黄鱼的致病性密切相关。

关键词 大黄鱼, 美人鱼发光杆菌, 胞外产物, 致病性

中图分类号 S941.42

大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)俗称黄瓜鱼、大黄花鱼, 是中国近海特有的经济鱼类。目前, 大黄鱼是我国单一品种养殖量最大的海水鱼类, 被农业部确定为我国六种最具优势出口水产品之一(陈强等, 2007)。据测算, 2010 年我国养殖大黄鱼产量已达 8 万 t, 直接产值超 65 亿元。2011 年养殖大黄鱼的产量和产值都比上一年有较大幅度的增长。福建省是大黄鱼的主养区, 养殖大黄鱼超过全国总产量的 90%, 而福建的大黄鱼养殖主要集中在宁德地区(刘家富等, 2011)。

美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damsela*)包括美人鱼发光杆菌杀鱼亚种(*P. damsela* subsp. *Piscicida*)和美人鱼发光杆菌美人鱼亚种(*P. damsela* subsp. *damsela*)两个亚种。美人鱼发光杆菌杀鱼亚种原称为杀鱼巴斯德氏菌(*Pasteurella piscicida*), 不特异性寄生感染宿主, 对多种养殖鱼类均有高致病性(Magarios *et al.*, 2003)。美人鱼发光杆菌美人鱼亚种即

是原来的美人鱼弧菌(*Vibrio damsela*), 已经报道能导致许多的海洋鱼类创伤感染和致命性疾病。两亚种因在 DNA 杂交实验中的同源性超过 70%, 且两者的 16S rDNA 序列完全同源, 1999 年被分类归纳为同一种(Osorio *et al.*, 2000)。国内目前有报道从半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)和卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)分离到美人鱼发光杆菌, 研究了卵形鲳鲹发光杆菌病的病理变化, 证实了美人鱼发光杆菌的 LPS 或 OMP 疫苗能给卵形鲳鲹提供良好的免疫保护效果(苏友禄等, 2011)。

2010 年 7 月, 福建宁德三都湾网箱养殖大黄鱼暴发疾病, 病鱼体表无破损, 头部、鳃盖、腹部、背鳍和尾鳍有血丝, 肠胃有多处大穿孔, 5 天内的死亡率可达 20% 以上。本文从患病濒死大黄鱼的内脏分离致病菌, 并进行人工感染、生化鉴定、分子鉴定、药敏试验、ECP 毒性试验等研究, 以为大黄鱼的病害防治提供参考。

* 公益性行业(农业)科研专项(200903029); 国家自然科学基金项目(31272699, 41176115); 福建省杰出青年基金项目(2011J06014)资助。张 飞, E-mail: zhangfei2008090612@yahoo.cn

通讯作者: 鄢庆枇, 教授, E-mail: yanqp@jmu.edu.cn

收稿日期: 2012-04-08, 收修改稿日期: 2012-05-29

1 材料与方 法

1.1 实验用鱼

濒死患病大黄鱼取自宁德市三都澳大黄鱼某养殖渔排, 体重 100g 左右。

健康大黄鱼购自宁德市海鸥公司大湾渔排。体重 150g 左右, 体长 18—24cm。

健康斑马鱼购自厦门水族店。体重 0.4g 左右, 体长(2.4±0.1)cm。

1.2 病原菌的分离纯化

无菌操作从病鱼肝脏、脾和胃组织中取样, 划线接种于 TCBS 琼脂平板上, 置于 28℃ 下培养 24h。挑取形态一致的优势菌落进行多次纯化培养, 直到获得纯培养菌。转接 TSA 斜面, 置于 28℃ 下培养 24h。20%甘油生理盐水洗脱, -80℃ 低温冰箱保存备用。

1.3 人工感染实验

1.3.1 初步人工感染实验 将分离的菌株接种于 TSA 琼脂斜面, 于 28℃ 下培养 12h 后, 用无菌生理盐水洗脱, 采用麦氏比浊法调整细菌浓度为 3.0×10^8 CFU/ml。设计 23 个试验组, 1 个对照组, 每组 4 尾。对试验组每尾鱼肌肉注射 0.1ml 的菌悬液, 给对照组每尾鱼注射 0.1ml 无菌生理盐水。连续饲养 3d, 观察、记录鱼的发病症状及死亡情况。

1.3.2 半致死浓度 LD_{50} 的测定 选取从感染试验中筛选出的致病力最强的一株菌株 NPL1006。将菌株在 0.85% 的生理盐水洗下配制成浓度梯度的菌悬液, 再次感染试验鱼。采用麦氏比浊法调整细菌浓度为 3.0×10^8 CFU/ml, 用生理盐水等梯度稀释至 3.0×10^7 、 3.0×10^6 、 3.0×10^5 、 3.0×10^4 CFU/ml。将 60 尾健康大黄鱼随即分成 6 组, 每组 10 尾, 背部肌肉注射。观察记录试验鱼的发病症状及死亡情况, 并从濒死鱼的病灶进行细菌再分离。采用改良的冠氏法方法计算 7d 的 LD_{50} 。

1.4 病原菌的鉴定

1.4.1 时间飞行质谱微生物鉴定仪分析 挑取适量菌落样品, 加入无水乙醇固定灭活 3min, 10000r/min 高速离心去上清。先后加入 70%甲酸和乙腈, 仔细混匀室温放置 3min, 10000r/min 高速离心, 吸取上清点靶, 使用 Microflex LRF20 时间飞行质谱微生物鉴定仪进行鉴定。

1.4.2 病原菌 16S rDNA 基因的测定 菌株 NPL1006 基因组 DNA 的提取, 使用 E.Z.N.A Bacterial DNA Kit(购自 Omega 公司)提取。设计 2 条引物(由上

海英俊生物技术有限公司合成), 16S F: 5'-GCCTAATACATGCAAGTCG-3', 1506R: 5'-GGCTACCTTGTTACGAC-3'。25μl PCR 扩增体系: 模板 1μl, 引物各 0.5μl, Mg^{2+} 2μl, DNTP 2μl, 10×Buffer 2.5μl, Taq 酶 0.2μl, 去离子水 15.3μl。扩增条件: 预变性: 94℃、5min; 变性: 94℃、50s; 退火: 54℃、50s; 延伸: 72℃、90s; 然后回到变性温度 30 个循环; 保温: 72℃、10min。1%琼脂糖凝胶 100mA, 110V, 电泳 20min 判定 PCR 扩增结果。PCR 产物回收纯化: 用 E.Z.N.A Gel Extraction Kit(购自 Omega 公司)回收纯化 PCR 产物。纯化后的 PCR 产物送华大基因进行基因测序。

1.5 NPL1006 菌株 16S rDNA 基因序列系统发育树构建

对 NPL1006 菌株的 16S rDNA 基因序列通过 NCBI 的 Blast 检索系统(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>)进行序列同源性分析, 并使用 ClustalX 1.83 软件与从 GenBank 数据库中获得的序列相似性较高的菌株的序列进行多序列匹配排列, 采用邻接法获得系统发育树, 并通过 Bootstrap 法(1000 次重复)检验。

1.6 药物敏感实验

采用纸片扩散法。取 NPL1006 菌株用无菌生理盐水从培养 24h 的 TSA 斜面上洗脱制成浓度约为 10×10^8 CFU/ml 菌悬液, 各取 0.1ml 分别涂布于 TSA 平板, 10min 后贴各种药物纸片(购自杭州天和微生物试剂公司), 于 28℃ 培养 24h 后测量抑菌圈直径。

1.7 致病性实验

1.7.1 胞外产物的制备 用平板玻璃纸覆盖技术制备 ECP。将菌株接种于 TSB 液体培养基(2% NaCl, W/V), 120r/min, 28℃ 摇床培养 24h 后, 离心收集菌液, 无菌 PBS(0.01mol/L, pH 7.4)反复洗涤菌液 3 次, 最后取 0.2ml 用 PBS 稀释的菌悬液均匀涂布于表面覆盖着一层灭菌玻璃纸的 TSA 平板上, 28℃ 培养 48h。每平板用 4ml PBS 洗下菌苔, 收集菌悬液于 4℃、15000g 离心 30min, 收集上清液, -80℃ 冰冻 48h 后, 放冷冻干燥机内冻干 48h。用适量 PBS 充分溶解后通过 0.22μm 滤纸过滤除菌, 即得胞外产物粗取物, Bradford 方法测定蛋白含量之后, 小量分装, 置 -20℃ 备用。

1.7.2 ECP 酶活性定性分析 分别用蒸馏水配制无菌的酪蛋白(0.4%)、明胶(0.4%)、可溶性淀粉(0.2%)、蛋黄(2.5%)、吐温 80(1.0%)和尿素(2.0%)酚红指示剂等 6 种琼脂平板, 平板打孔后加入 25μl ECP, 加等量生理盐水(0.85%)作阴性对照。28℃ 分别温育 24h 和 48h 后向酪蛋白琼脂平板中加入三氯乙酸溶液

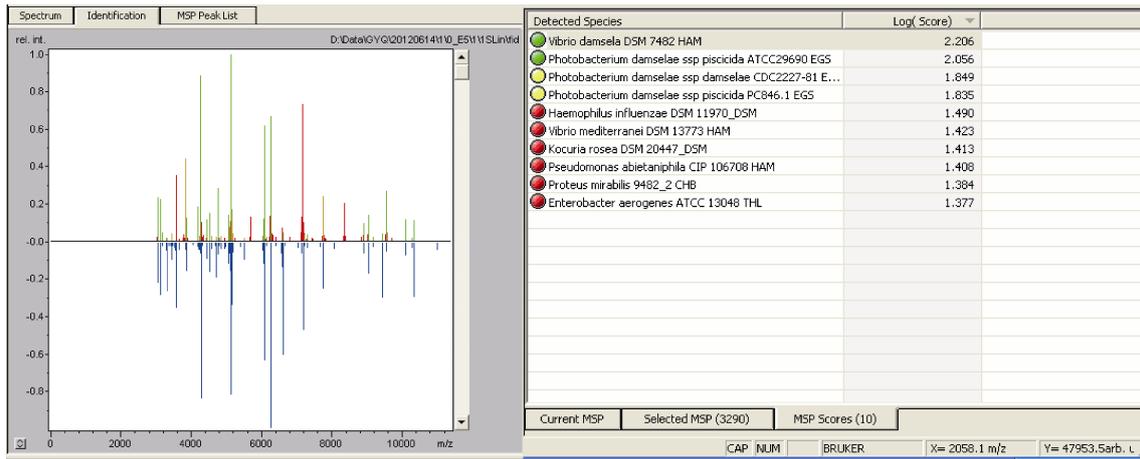


图 1 时间飞行质谱鉴定仪对 NPL1006 的鉴定结果
Fig.1 Results of NPL1006 identified by Time of Flight Mass Spectrometer

1 GCCTAATACA TGCAAGTCGA GCGGACGCGA CTTAACTGAA CCTTCGGGGA ACGTTAAGGG
61 GCGGACGCGG CGGACGGGTG AGTAATGCCT GGAATATGC CCTGATGTGG GGGATAACTA
121 TTGGAACGA TAGCTAATAC CGCATAATCT CTTGCGAGCA AAGAGGGGGA CCTTCGGGGC
181 TCTCGCGTCA GGATTAGCCC AGTGGGATT AGCTTGTGG TGAGGTAATG GCTCACCAAG
241 GCAACGATCC CTAGCTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA CTGGAACGTA GACACGGTCC
301 AGACTCTAC GGGAGGCAGC AGTGGGGAAT ATTGCACAAT GGGGAAAACC CTGATGCAGC
361 CATGCCCGGT GTGTGAAGAA GGCCTTCGGG TTGTAAAGCA CTTTCAGTAG GGAGGAAGGT
421 AGTGTAGTTA ACACCTGCAC TATTTGACGT TACCTACAGA AGAAGCACCG GCTAACTCCG
481 TGCCAGCAGC CGCGTAATA CGGAGGTGC GAGCGTAAAT CGGAATTACT GGGCGTAAAG
541 CGCATGCAGG CGGCTGTGA AGTCAGATGT GAAAGCCCGG GGCCTAACCT CGGAATTGCA
601 TTTGAAACTG GCAGGCTAGA GTCTGTGAGA GGGGGGTAGA ATTTTCAGGTG TAGCGGTGAA
661 ATGCGTAGAG ATCTGAAGGA ATACCAGTGG CGAAGGCGGC CCCCTGGACA AGGACTGACG
721 CTCAGATGCG AAAGCGTGGG GAGCAAACAG GATTAGATAC CCTGGTAGTC CACGCCGTAA
781 ACGATGTCTA CTTGGAGGTT GTGGCCTTGA GCCGTGGCTT TCGGAGCTAA CGCGTTAAGT
841 AGACCGCCTG GGGAGTACGG TCGCAAGATT AAAACTCAAA TGAATTGACG GGGGCCCGCA
901 CAAGCGGTGG AGCATGTGGT TTAATTCGAT GCAACGCGAA GAACCTTACC TACTCTTGAC
961 ATCCAGAGAA GCTTGAAGAG ATTCAGATGT GCCTTCGGGA ACTCTGAGAC AGGTGCTGCA
1021 TGGCTGTGCT CAGCTCGTGT TGTGAAATGT TGGTAAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCT
1081 TATCCTTGTG TGCCAGCACT TCGGTTGGGA ACTCCAGGGA GACTGCCGGT GATAAACCGG
1141 AGGAAGGTGG GGACGACGTC AAGTCATCAT GGCCCTTACG AGTAGGGCTA CACACGTGCT
1201 ACAATGGCAT ATACAGAGGG CAGCAAGACC GCGAGGTGGA GCGAATCCCA GAAAGTATGT
1261 CGTAGTCCGG ATCGGAGTCT GCAACTCGAC TCCGTGAAGT CGGAATCGCT AGTAATCGTG
1321 GATCAGAATG CCACGGTGAA TACGTTCCCG GGCCTTGTAC ACACGCGCCG TCACACCATG
1381 GGAGTGGGCT GCACCAGAAG TAGATAGCTT AACCTTCGGG AGGGCGTTTA CCACGGTGTG
1441 GTTCATGACT GGGGTGAAGT CGTAACAAGG TAGCC

图 2 菌株 NPL1006 的 16S rDNA 基因检测结果
Fig.2 Sequence of 16S rDNA gene of strain NPL1006

素、米诺环素、阿奇霉素、呋喃妥因和新生霉素等 9 种中度敏感;对青霉素 G、头孢哌酮、克林霉素、利

福平和万古霉素等 5 种药物有抗性。

2.7 致病性实验结果

2.7.1 ECP 底物酶活性 酶活性实验结果表明, NPL1006 的胞外产物具有蛋白酶、明胶酶和淀粉酶活性, 不具有脲酶、卵磷脂酶和脂肪酶活性。酶活性实验结果如表 3。

2.7.2 ECP 的溶血性 NPL1006 的胞外产物对绵羊血的红细胞和大黄鱼血的红细胞有较强的溶血效果。

2.7.3 SDS-PAGE 电泳实验结果 SDS-PAGE 电泳结果如图 4。图 4 显示, 胞外产物有 20 多条蛋白条带, 颜色深浅不一, 不均匀分布于 12—105kDa 区域内, 其中, 33—40kDa 区域密集分布有 5 条颜色深的条带。

2.7.4 感染实验结果 胞外产物(ECP)感染斑马鱼的实验结果如表 4。从表 4 可知, ECP 浓度为 0.084 mg/ml 时实验斑马鱼的死亡率为 100%, 0.00525mg/ml 时死亡率为 0, 对照组无死亡。以 100℃ 处理 10min 的 0.084mg/ml 处理组死亡率为 0, 说明 100℃ 加热处理使得 ECP 中蛋白酶等酶的活性丧失, 无致病性。通过改良的冠氏法计算得到 LD_{50} 为 1.20mg 蛋白/kg 体重。

3 讨论

美人鱼发光杆菌杀鱼亚种最早于 1963 年分离自野生美洲狼鲈(*Morone americanus*)和斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*), 此后严重威胁五条鲷(*Seriola quinqueradiata*)和鲆鲽类, 通常 18—20℃ 时发病(Zorrilla *et al.*, 1999; 张晓君等, 2009)。不同鱼种

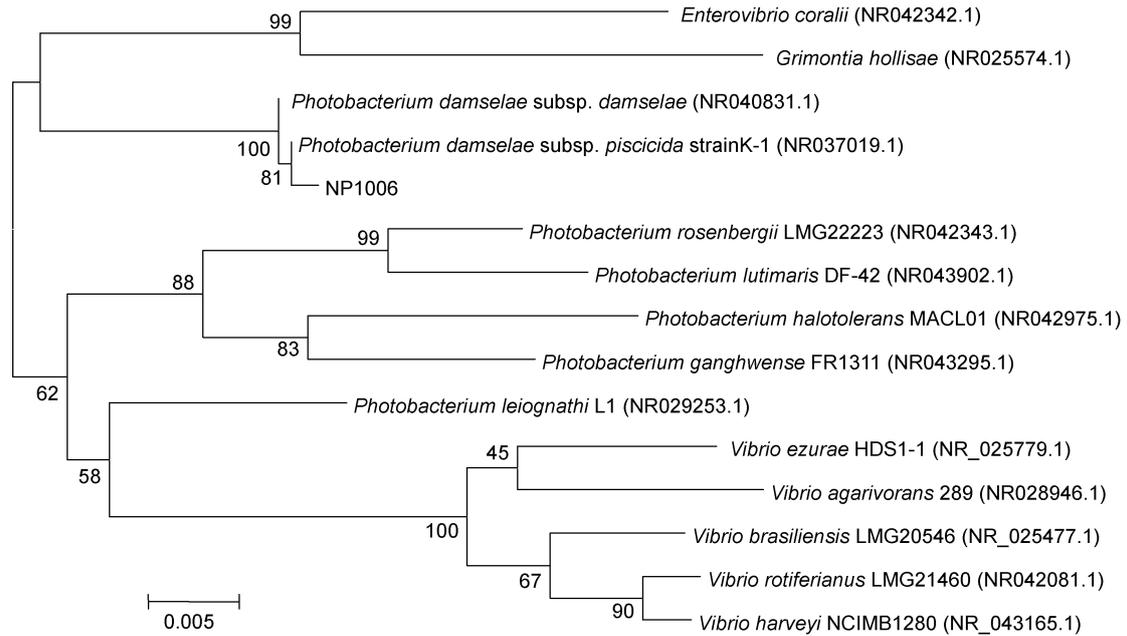


图 3 NPL1006 菌株 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence of strain NPL1006

注: 括号中数字代表该序列的 GenBank 登录号

表 2 菌株 NPL1006 药敏性实验结果

Tab.2 Results of antibiotic sensitivity test of strain NPL1006

| 药物名称 | 单片药物含量 | 药物敏感度 | 药物名称 | 单片药物含量 | 药物敏感度 |
|-------|--------|-------|--------|--------|-------|
| 青霉素 G | 10U | R | 米诺环素 | 30μg | I |
| 头孢唑啉 | 30μg | S | 阿奇霉素 | 15μg | I |
| 头孢哌酮 | 75μg | R | 克林霉素 | 2μg | R |
| 头孢噻吩 | 30μg | S | 诺氟沙星 | 10μg | S |
| 头孢他定 | 30μg | S | 氧氟沙星 | 5μg | S |
| 链霉素 | 10μg | I | 依诺沙星 | 10μg | S |
| 庆大霉素 | 10μg | S | 呋喃妥因 | 300μg | I |
| 卡那霉素 | 30μg | S | 利福平 | 5μg | R |
| 新霉素 | 30μg | I | 新生霉素 | 30μg | I |
| 妥布霉素 | 10μg | I | 多黏菌素 B | 300U | S |
| 四环素 | 30μg | I | 万古霉素 | 30μg | R |
| 强力霉素 | 30μg | I | | | |

注: R 表示不敏感; I 表示中度敏感; S 表示高度敏感

表 3 NPL1006 的 ECP 酶活性和溶血性实验结果

Tab.3 The activities and hemolytic experiments of ECP of strain NPL1006

| 时间 | 酪蛋白 (0.4%) | 明胶 (0.4%) | 尿素 (2.0%) | 可溶性淀粉 (0.2%) | 蛋黄 (2.5%) | 吐温 80 (1.0%) | 脱纤维绵羊血 (5%) | 大黄鱼血 (5%) |
|-----|---------------|--------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|----------------|--------------|
| 24h | + | + | - | + | - | - | + | + |
| 48h | + | + | - | + | - | - | + | + |

感染此菌表现出较大差异的症状, 多数受感染鱼类如军曹鱼(*Rachycentron canadum*)、黄尾鲷(*Seriola quinqueradiata*)、金头鲷(*Sparus aurata*)等均表现为内

脏出现灰白色结节, 最终死亡; 然而卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)表现为鳃盖部位轻微出血, 腹腔积水和内脏器官多灶性坏死, 脾脏、肾脏和心脏内有

亡。药敏性实验结果表明, 头孢唑啉、头孢噻吩、头孢他啶、庆大霉素、卡那霉素、诺氟沙星、氧氟沙星、依诺沙星和多黏菌素 B 等 9 种药物能有效的抑制美人鱼发光杆菌生长, 大黄鱼养殖过程中可以使用这 9 种药物预防美人鱼发光杆菌病。

参 考 文 献

- 左凤琴, 简纪常, 吴灶和, 2006. 鱼源溶藻弧菌胞外产物的特性研究. 水生生物学报, 30(5): 553—557
- 刘家富, 韩坤煌, 2011. 我国大黄鱼产业的发展现状与对策. 福建水产, 33(5): 4—8
- 牟海津, 李 筠, 包振民等, 2000. 副溶血弧菌胞外产物对中国对虾的致病性分析. 海洋与湖沼, 31(3): 273—280
- 苏友禄, 冯 娟, 郭志勋等, 2011. 3 种美人鱼发光杆菌疫苗对卵形鲳鲹的免疫效果. 华南农业大学学报, 32(3): 105—110
- 苏友禄, 冯 娟, 郭志勋等, 2012. 美人鱼发光杆菌杀鱼亚种感染卵形鲳鲹的病理学观察. 海洋科学, 36(2): 75—81
- 杨嘉龙, 周 丽, 邢 婧等, 2007. 养殖刺参溃疡病杀鲑气单胞菌的分离、致病性及胞外产物特性分析. 中国水产科学, 14(6): 981—989
- 吴后波, 潘金培, 2003. 病原弧菌的致病机理. 水生生物学报, 27(4): 422—426
- 张晓君, 秦国民, 阎斌伦等, 2009. 龙胆石斑鱼源美人鱼发光杆菌的生物学特性与系统发育学分析. 渔业科学进展, 30(3): 38—43
- 陈 强, 鄢庆彬, 邹文政等, 2007. 环境因子对溶藻弧菌粘附大黄鱼表皮粘液影响的研究. 海洋与湖沼, 38(4): 361—366
- 陈雅芳, 王 军, 苏永全等, 2006. 养殖石斑鱼溃疡病病原哈维氏弧菌胞外产物的研究. 海洋科学, 30(10): 30—34
- 周 晶, 2009. 病原菌致病性胞外产物(ECP)的研究进展. 畜牧与饲料科学, 30(1): 8—9
- 覃映雪, 苏永全, 王 军等, 2008. 哈维氏弧 TS-628 菌株胞外产物(ECP)蛋白酶活性的研究. 海洋水产研究, 29(1): 81—85
- Love M, Fisher D T, Hose J E *et al*, 1981. *Vibrio damsela*, as a marine bacterium, causes skin ulcers on the damselfish *Chromis punctipinnis*. Science, 214: 1140—1141
- Magarios B, Romalde J L, Lopez-Romalde S *et al*, 2003. Pathobiological characterization of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* strains isolated from cultured sole (*Solea senegalensis*). Bull Eur Assoc Fish Pathol, 23: 183—190
- Martinez-Manzanares E, Tapia-Paniagua S T, Diaz-Rosales P *et al*, 2008. Susceptibility of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* strains isolated from Senegalese sole, *Solea senegalensis* Kaup, and gild head seabream, *Sparus aurata* L, to several antibacterial agents. J Fish Dis, 31: 73—76
- Osorio C R, Romalde J L, Barja J L *et al*, 2000. Presence of phospholipase-D (dly) gene coding for damselysin production is not a prerequisite for pathogenicity in *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. Microb Pathogen, 28: 119—126
- Sakata T, Matsuura M, Shimokawa Y, 1989. Characteristics of *Vibrio damsela* isolated from diseased yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Nippon Suisan Gakkaishi, 55: 135—141
- Wang Y, Han Y, Li Y *et al*, 2007. Isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from diseased tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Gunther) in China. Acta Microbiol Sin, 47(5): 763—768
- Zorrilla I, Balebona M C, Moriigo M A *et al*, 1999. Isolation and characterization of the causative agent of pasteurellosis, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, from sole *Solea senegalensis* (Kaup). J Fish Dis, 22: 167—171

STUDIES ON THE ISOLATION, IDENTIFICATION AND VIRULENCE OF *PHOTOBACTERIUM DAMSELAE* ISOLATED FROM *PSEUDOSCIAENA CROCEA*

ZHANG Fei¹, SU Yong-Quan², WANG Jun², QIN Ying-Xue¹, MA Ying¹, YAN Qing-Pi¹
(1. Fisheries College of Jimei University, Xiamen, 361021; 2. College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen, 361005)

Abstract A dominant strain (NPL1006) was isolated from diseased *Pseudosciaena crocea* in 2010. The results of artificial infection experiment showed that the LD_{50} of NPL1006 to *P. crocea* was 7.96×10^3 CFU/g body weight. NPL1006 was identified as *Photobacterium damsela* by Time of Flight Mass Spectrometer and the 16S rDNA sequencing analysis. Susceptibility experiments showed that NPL1006 is highly sensitive to 9 drugs such as Cefazolin, Cefalotin and Norfloxacin. The extracellular products of NPL1006 were found to exhibit protease, gelatinase and amylase activities. The LD_{50} of extracellular products to zebrafish was 1.20mg protein/kg body weight. These results suggested that extracellular products of *P. damsela* NPL1006 separated from *P. crocea* contained a variety of virulent factors, and it's closely related to the pathogenicity of the bacteria *P. crocea*.

Key words *Pseudosciaena crocea*, *Photobacterium damsela*, ECP, Pathogenicity