

养殖大菱鲆腹水病病原菌的分离与鉴定

景亚运^{1,2}, 张正^{2*}, 王印度², 于永翔², 廖梅杰², 李彬² (1. 大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁大连 116023; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东青岛 266071)

摘要 [目的]从养殖大菱鲆中分离腹水病病原菌,并对其进行鉴定。[方法]从山东半岛2个不同的养殖场腹水病发病大菱鲆体内分离病原菌,并通过常规生理生化试验和16S rDNA基因序列对比对其进行鉴定。[结果]共分离到2株优势细菌。常规生理生化特征分析表明,这2株菌分别与鲨鱼弧菌(*Vibrio carchariae*)和大菱鲆弧菌(*Vibrio scophthalmi*)表性特征非常相似。系统发育树分析表明这2株菌与鲨鱼弧菌(*Vibrio carchariae*)和大菱鲆弧菌(*Vibrio scophthalmi*)的亲缘关系最近。[结论]这2株细菌被鉴定为鲨鱼弧菌(*Vibrio carchariae*)和大菱鲆弧菌(*Vibrio scophthalmi*)。

关键词 大菱鲆;腹水病;病原;鲨鱼弧菌;大菱鲆弧菌

中图分类号 S94 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)24-106-03

Isolation and Identification of Pathogenic Bacterium Associate with Ascites Disease of Cultured *Scophthalmus maximus*

JING Ya-yun^{1,2}, ZHANG Zheng^{2*}, WANG Yin-geng² et al (1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian, Liaoning 116023; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao, Shandong 266071)

Abstract [Objective] To isolate and identify pathogenic bacterium associate with ascites disease of cultured *Scophthalmus maximus*. [Method] Pathogenic strains were isolated from three diseased-turbot samples associate with ascites syndrome in three different aquatic plants on Shandong Peninsula. The traditional physiological and biochemical tests and 16S rDNA sequencing analysis were performed on the two strains. [Result] A total of two dominant bacterium were isolated. Analysis of traditional physiological and biochemical test showed that the two strains were *Vibrio carchariae* and *Vibrio scophthalmi*. Analysis of phylogenetic dendrogram showed that the two strains had close genetic relationship with *Vibrio carchariae* and *Vibrio scophthalmi*. [Conclusion] The two strains were identified as *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio scophthalmi*.

Key words *Scophthalmus maximus*; Enteritis diseases; Pathogeny; *Vibrio alginolyticus*; *Vibrio scophthalmi*

大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L)隶属鲆科菱鲆属,是水产品市场广受欢迎的一种名贵鱼种,经济价值很高^[1]。我国从1992年开始进行大菱鲆的引种工作,并于2001年开始进行大规模的商业养殖。但是,近几年随着大菱鲆养殖热潮的兴起,养殖规模迅速扩大,疾病的暴发也越来越频繁^[2-4]。通过对养殖大菱鲆进行系统的流行病学调查研究,发现腹水病是养殖大菱鲆最为常见的细菌性疾病之一。笔者从3个分布于山东半岛不同区域的养殖场采集了病鱼的样品,进行了细菌分离和病原的系统发育学研究。

1 材料与方 法

1.1 菌种的采集、分离和培养基 从位于青岛和荣成2个不同的养殖场采集到2个患腹水病的大菱鲆样品,这2个样品病鱼外观胸腔鼓胀、腹部隆起,解剖后发现胸腔内部充满无色或淡黄色液体,腹水病的病变症状非常明显。

在无菌条件下,将发病鱼的肝脏组织剪碎后用接种环直接挑取并接种于盐度为3%的TSB(胰蛋白胨大豆肉汤)平板培养基上,28℃下培养24~30h后,挑取优势菌的单个菌落纯化2遍后,用20%甘油置于-80℃冰箱中保存。腹水中的细菌则是使用一次性无菌医用注射器吸取少量腹水直接接种于盐度为3%的TSB平板培养基上,采用相同的方法分离和保存。TSB(胰蛋白胨大豆肉汤)培养基的成分为:胰蛋白胨17g,植物蛋白胨3g,NaCl30g,磷酸氢二钾25g,葡萄糖25g,蒸馏水1000mL,121℃下高压灭菌15min。

1.2 形态观察和生理生化试验 使用Nikon E800光学显微镜观察细菌个体形态、大小和鞭毛,用半固体培养基(TSB)穿刺接种培养结合水浸片观察细菌运动性。参照《伯杰氏细菌鉴定手册(第9版)》对细菌进行常规分类,用法国生物梅里埃公司API 20E试剂条和北京陆桥公司的菌种鉴定管进行常见碳、氮源利用和酶反应的测定,对于一些特征性反应则手工配制相应培养基进行。

1.3 16S rDNA 序列测定分析

1.3.1 PCR模板的制备。将细菌分别接种于TSB平板上,28℃下培养24h后取单一菌落悬浮于无菌去离子水中,100℃水浴5~10min后,4℃下12000r/min离心10min,上清液即为PCR扩增反应的模板。

1.3.2 16S rDNA基因序列的PCR扩增和序列测定。16S rDNA基因扩增的正向引物(P27f)为5'-AGAGTTTGATC(C/A)TGGCTCAG-3',反向引物(P1429r)为5'-GGC-TACCTTGTACGACTT-3'(此引物为细菌16S rDNA基因序列扩增的通用引物)。PCR扩增体系(100μL):1×PCR缓冲液、1.5mmol/L MgCl₂、4×dNTP混合物125μmol/mL、引物各7.5nmol/mL、Taq DNA聚合酶1μL(5U/μL)、1μL DNA原液。PCR反应条件为:94℃预变性4min;94℃变性30s,55℃复性30s,72℃延伸100s,35个循环;最后72℃温育15min。PCR产物经过琼脂糖电泳确定特异条带后,直接交由上海生物工程技术公司进行PCR产物纯化和序列测定。

1.3.3 序列分析和系统发育树的构建。将所获得的16S rDNA基因序列使用BIOEDIT软件进行对比分析,确定其相似性。从GenBank中选取与其相似率最高的细菌16S rDNA基

基金项目 山东省自主创新与成果转化专项(2014ZZCX06205)。

作者简介 景亚运(1990-),男,河北任丘人,硕士研究生,研究方向:海水养殖病害研究。*通讯作者,副研究员,博士,硕士生导师,从事海水养殖病害研究。

收稿日期 2016-06-29

因序列,使用 BIOEDIT 软件中集成的 Clustal W 软件进行多序列匹配排列,使用系统发生推断软件包 PHYLIP3.6a3 进行统计和聚类分析。采用邻位相连法(Neighbor-joining)获得系统发育树,通过自举分析(Bootstrapping)进行系统进化树的评估,自举数据集为 1 000 次。

1.3.4 构建系统发育树的 16S rDNA 基因序列来源。从 GenBank 数据库中选取 25 株与分析细菌的 16S rDNA 基因序列相似性较高的已鉴定至种的菌株,与分离到的菌株共同构建系统发育树。选取菌株的相关数据和存取号见表 1。

表 1 构建系统发育树的 16S rDNA 基因序列及其数据库存取号

Table 1 The strains for phylogenetic dendrogram construct from GenBank and their access number

存取号	菌株名称	菌株号
Access number	Strain name	Strain number
AF134581	<i>V. carchariae</i>	—
AF172840	<i>V. aestuarianus</i>	KT0901
AJ491290	<i>V. pomeroyi</i>	LMG 20537
AY069971	<i>Listonella. anguillarum serovar O2a</i>	—
AY227706	<i>V. splendidus</i>	DCM1
U46579	<i>V. scophthalmi</i>	CECT 4638
X56577	<i>V. diazotrophicus</i>	ATCC 33466
X74689	<i>V. aestuarianus</i>	ATCC 35048T
X74693	<i>V. harveyi</i>	ATCC 35084T
X74715	<i>V. navarrensis</i>	—
X74718	<i>V. ordalii</i>	ATCC 33509T
X76333	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 27562T
X76334	<i>V. vulnificus</i>	C7184
AF134581	<i>V. carchariae</i>	—
AF172840	<i>V. aestuarianus</i>	KT0901

2 结果与分析

2.1 形态特征和运动性 从这 2 个病鱼样品中分离到 2 株优势细菌,分别编号为菌株 VII 和菌株 IX。这 2 株菌在盐度 3% 的 TSB 培养基上 28 ℃ 下培养 24 ~ 30 h 后,形成的单个菌落均较小、透明、接近无色。水浸片显微检查和半固体琼脂穿刺接种培养都发现菌株 VII 有较强的运动性,菌株 IX 没有明显的运动性。在 TCBS 琼脂平板培养基上,菌株 VII 和菌株 IX 都呈明显黄色的菌落。

2.2 生长特性 这 2 株菌的温度生长范围存在差异,菌株 VII 在 10 ~ 40 ℃ 范围内都能生长,并且在此范围内没有表现太大的生长速度差异。菌株 IX 在 10 ~ 30 ℃ 范围内能良好地

生长,在 30 ~ 40 ℃ 范围内可以微弱生长。

在盐度 1% ~ 5% 的范围内,这 2 株细菌生长非常良好,在此范围外表现出一定的盐度生长差异性。当 pH 高于 6.5 时,它们都能够良好生长,说明这 2 株细菌都是嗜碱性的。

2.3 生理生化特征 由表 2 可知,这 2 株细菌明显不是同一种细菌。它们在 TCBS 平板生长旺盛,且菌落都呈明显黄色,对 O/129 特征性抑制剂敏感,据此可将它们归为弧菌属细菌。通过查阅相关文献发现,菌株 VII 在一些主要指标上与鲨鱼弧菌(*Vibrio carchariae*)非常相近,菌株 IX 与大菱鲆弧菌(*Vibrio scophthalmi*)的生理生化特征非常相似。

表 2 分离菌株的主要生理生化特征

Table 2 Physiological and chemical characteristics of the three strains

检验项目	菌株 VII	菌株 IX	检验项目	菌株 VII	菌株 IX
Detection item	Strain VII	Strain IX	Detection item	Strain VII	Strain IX
明胶液化 Gelatin liquefaction	+	-	精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	(+)	-
乳糖 Lactose	-	-	西蒙氏枸橼酸 Simon's citric acid	+	(+)
蔗糖 Saccharose	+	-	柠檬酸利用 Utilization of citric acid	+	-
葡萄糖 Glucose	+	(+)	吲哚产生 Indole production	-	-
葡萄糖产气 Glucose gas	-	-	丙二酸盐 Malonate	-	-
阿拉伯糖 Arabinose	-	-	硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+
D-甘露糖 D-mannose	(+)	-	靛基质 Indole	+	-
密二糖 Melibiose	-	-	ONPG	-	-
鼠李糖 Rhamnose	-	-	V. P	(+)	(+)
棉子糖 Raffinose	-	-	M. R	(+)	(+)
山梨醇 Sorbitol	-	-	H ₂ S 产生 H ₂ S production	-	-
侧金盏花醇 Adonitol	-	-	O/129 (10 μg)	+	+
肌醇 Inositol	-	-	O/129 (150 μg)	+	+
甘露醇 Mannitol	+	-	氧化酶 Oxidase	+	+
水杨素 Salicin	(+)	-	西蒙氏枸橼酸 Simon's citric acid	+	(+)
苦杏仁甙 Amygdalin	+	-	柠檬酸利用 Utilization of citric acid	+	-
氧化酶 Oxidase	+	+	吲哚产生 Indole production	-	-

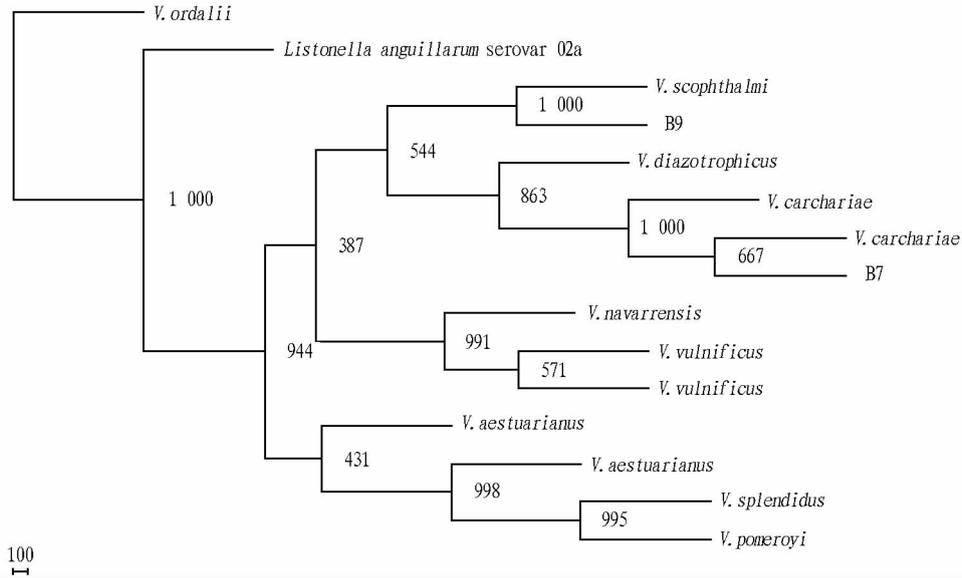
注: + 表示阳性; - 表示阴性; (+) 表示弱阳性生长^[5]。

Note: + indicated positive; - indicated negative; and (+) indicated the growth of weak positive^[5].

2.4 16S rDNA 基因序列分析和系统发育树的构建 将获得的16S rDNA序列使用DNAMAN软件进行比对,发现它们的相似率为93.98%。综合上述生理生化试验结果,可以确定这2株细菌同属不同种。将这2株细菌的16S rDNA基因序列分别输入NCBI GenBank数据库中进行相似性检索,结果发现与菌株Ⅶ相似性最高的前100个序列中65%为弧菌属细菌,与其最相近的已鉴定的细菌16S rDNA序列是鲨鱼弧菌(*Vibrio carchariae*)的16S rDNA序列,相似率为99.71%。与菌株Ⅸ相似性最高的前100个序列中84%为弧菌属细菌,与其相似率最高的已鉴定的细菌16S rDNA序列是

大菱鲆弧菌(*Vibrio scophthalmi*)的16S rDNA序列,相似率为99.37%。

从GenBank数据库中选取与菌株Ⅶ和菌株Ⅸ的16S rDNA序列相似性较高的13株细菌的16S rDNA序列(表1)进行系统发育学分析,并构建系统发育树。从图1可以看出,B7(菌株Ⅶ)与*V. carchariae*自然聚类成一个分支,B9(菌株Ⅸ)与*V. scophthalmi*自然聚类成一个分支^[6]。综合生理生化试验结果和16S rDNA系统发育学分析,可初步鉴定这2株从患腹水病的大菱鲆体分离到的优势细菌中1株为鲨鱼弧菌(*Vibrio carchariae*),另1株为大菱鲆弧菌(*Vibrio scophthalmi*)。



注:基于16S rDNA基因序列用邻位相连法完成,分枝上的数字是1 000次重复抽样检测的Bootstrap值。

Note: Based on 16S rDNA sequence with Neighbor-joining method, the digit on the ramification was bootstrap valuation of 1 000 replications of sampling detection.

图1 16S rDNA基因序列的聚类分析结果

Fig.1 Cluster analysis result of 16S rDNA gene sequence

3 讨论

流行病学调查表明,腹水病是养成期大菱鲆的常见疾病,流行面积较广,在环渤海沿岸和山东半岛以及江苏省等大菱鲆的主要养殖区都发生过。对腹水病的病原学初步研究表明,细菌是导致腹水病发病的主要原因。腹水病发病初期属于内脏器官的病变,发病中后期则会导致全身感染,并可导致大规模的死亡,发病后具有非常典型的外观病变特征,在养殖生产中若注意观察是比较容易发现和识别的^[7]。

腹水病属于内脏器官的病变,其发病机理是比较复杂的^[8]。针对来源不同的样品,对腹水病进行的细菌分离也证实了这一点。从腹水病发病病鱼的内脏组织和腹腔积水中分离到鲨鱼弧菌和大菱鲆弧菌,此外还有1株待鉴定的细菌。从病原学研究来看,推测腹水病可能是多种病原都能致病。

鲨鱼弧菌是国外的一些相关文献报道的对大菱鲆致病的常见病害细菌之一^[9],国内莫照兰等^[10]也报道了鲨鱼弧菌可对养殖牙鲆致病。目前我国对养殖大菱鲆的病害研究还相对较少,尽管已经从发病的大菱鲆体内检测到鲨鱼弧

菌,并已证实了在腹水病患病状态下这种弧菌属于优势菌群,但对于这2种弧菌的入侵方式、致病力以及是原发病原还是继发病原都尚需深入研究。据国外文献报道,大菱鲆弧菌是大菱鲆幼苗期肠道中占优势数量的一种细菌,正常情况下并无致病性^[11]。在来自不同地理区域的大菱鲆样品肠道中都可检出大菱鲆弧菌;在一些育苗场的水体和活饵体内,也曾检出大菱鲆弧菌,但在养殖池底的沉积物中并不常见^[12]。因此,推断大菱鲆弧菌可能是健康大菱鲆肠道中的正常优势菌群,但在大菱鲆内脏器官被感染或其他病原细菌入侵后可能转变为条件致病菌,应属于继发性病原。但是对于该菌一些病原学方面的具体特性还有待进一步研究。此外,在来自其他地区的患腹水病的大菱鲆样品中还分离到1株已证实为非弧菌属的细菌,通过对其生理生化特征和16SrDNA基因序列的研究,并未找到相似性很高的已知菌种,今后对这株细菌的鉴定和相关病原学方面的研究也将逐渐开展。

由于试验成本和试验条件的限制以及腹水病的发病机理本身具有复杂性,尚未完成对腹水病的人工回接感染试

(下转第122页)

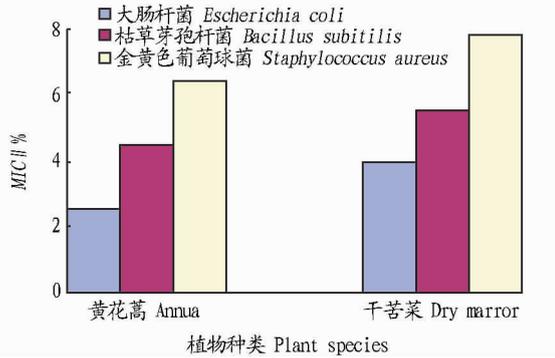


图1 2种菊科植物的MIC

Fig.1 MIC of two Compositae plants

表1 苦菜不同加工方法制备药液的抑菌效果

Table 1 The bacteriostatic effect of different processing methods for preparation of sowthistle liquor

mm

加工方法 Processing method	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	枯草杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>
黄花蒿 Annua	7.483	9.354	10.833
干苦菜 Dry marror	9.498	6.667	8.978
复配提取液 Compound extract	9.752	9.990	10.000

参考文献

- [1] 杨顺义, 苍耳、狼毒等植物提取物抑菌活性的初步研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2003.
- [2] 刘利本, 平家奇, 高海飞, 等. 蒲公英不同部位提取物体外抑菌作用的比较[J]. 延边大学农学学报, 2010(1): 65-68.
- [3] 赵白叶. 半胱氨酸蛋白酶 IdeS 的原核表达、纯化、活性鉴定及应用

- [D]. 聊城: 聊城大学, 2014.
- [4] 吴静. 黄花蒿的抑菌活性及有效成分的初步分离研究[D]. 重庆: 西南大学, 2008.
- [5] 史冬燕. 菏泽地区2种菊科植物的抑菌作用研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(17): 7986-7987.

(上接第108页)

验。该试验中所分离的这些细菌来自不同的养殖场,具有一定的代表性,它们极有可能是这2种疾病的第一致病原或继发性病原。根据这些细菌的多样性推测,它们也存在联合致病的可能性。腹水病是大菱鲆养殖过程中极为常见的一种细菌性疾病,由于是内部器官的感染,发病前期没有明显的症状,给生产上及时发现和预防该病造成了一定的困难^[13]。因此,选购健康的苗种、规范健康养殖工艺和加强卫生操作管理防治腹水病的有效措施。

参考文献

- [1] 雷霖霖, 刘新富. 大菱鲆 *Scophthalmus maximus* 引进养殖的初步研究[J]. 现代渔业信息, 1995, 10(11): 1-3.
- [2] 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.
- [3] 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(6): 61-68.
- [4] 张正, 王印庚, 韩文君, 等. 养殖大菱鲆烂鳍病病原菌的鉴定及系统发育学研究[J]. 海洋科学进展, 2004(4): 193-197.
- [5] HOLT J G, KRIEG N R, SNEATH P H A, et al. Bergery's manual of deter-

- minative bacteriology [M]. Ath ed. Baltimore: Williams&Wilkins Press, 1994: 262-263, 193-194.
- [6] GAUGER E J, GOMEZ-CHIARRI M. 16S ribosomal DNA sequencing confirms the synonymy of *Vibrio harveyi* and *V. carchariae* [J]. Diseases of aquatic organisms, 2002, 52: 39-46.
- [7] 张正. 养殖大菱鲆流行病调查及主要细菌性疾病的病原学研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004.
- [8] 赵贵萍, 张璐, 汤陈坚. 大菱鲆和牙鲆腹水病的危害与防治[J]. 科学养鱼, 2008(6): 54-55.
- [9] DEVESA S, BARJA J L, TORANZO A E. Ulcerative skin and fin lesions in reared turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) [J]. Journal of fish diseases, 2006, 12(4): 323-333.
- [10] 莫照兰, 茅云翔, 陈师勇, 等. 一株牙鲆出血症病原菌的分子生物学鉴定[J]. 高技术通讯, 2001(12): 12-17.
- [11] 史秀清, 张正, 王印庚, 等. 大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 仔稚鱼发育期消化道可培养细菌的菌群特征分析[J]. 渔业科学进展, 2015(4): 73-82.
- [12] MONTES M, PEREZ M J, NIETO T P. Numerical taxonomy of gram-negative, facultative anaerobic bacteria isolated from skin of turbot *Scophthalmus maximus* and surrounding water [J]. Syst Appl Microbiol, 1999, 22(4): 604-618.
- [13] 丁春林, 李文全, 张健, 等. 工厂化养殖大菱鲆肠炎病、腹水病防治技术探讨[J]. 河北渔业, 2014(1): 46-47.