

4 株奶牛源左氏无绿藻的分离与鉴定

戴迪¹, 廖俊¹, 林伟东¹, 冯清¹, 黄攀¹, 梁祥焕², 王建³, 秦爱建^{1*}, 金文杰^{1*}

(1. 扬州大学兽医学院, 江苏省动物预防医学重点实验室, 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏扬州 225009; 2. 扬州大学实验农牧场, 江苏扬州 225009; 3. 武进区动物疫病预防控制中心, 江苏常州 213000)

摘要 无绿藻是一种普遍存在的微藻, 属于绿球藻, 可引起人类和动物广泛地感染, 其中的左氏无绿藻与一种严重的牛乳腺炎有关。该研究采集江苏部分地区患乳房炎奶牛奶样, 用绵羊血琼脂培养、分离, 用革兰氏染色镜检及 PCR 方法确定得到 4 株左氏无绿藻(*P. zopfii*)。这是首次在江苏地区发现奶牛源左氏无绿藻。

关键词 奶牛乳房炎; 左氏无绿藻; PCR 鉴定

中图分类号 S852.66 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)01-0078-02

Isolation and Identification of 4 *Prototheca zopfii* Sourced from Cow

DAI Di, LIAO Jun, LIN Wei-dong et al (College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Jiangsu Key Laboratory of Animal Preventive Medicine, Jiangsu Collaborative Innovation Center of Animal Epidemic Disease and Zoonosis Control and Prevention, Yangzhou, Jiangsu 225009)

Abstract *Prototheca* is a widespread microalgae, which belongs to *Chlorococcum* sp. People and animal can commonly infect *prototheca*. Among of them, *Prototheca zopfii* was related to severe mastitis of cow. Milk samples of cow having mastitis were collected from part of Jiangsu. 4 *P. zopfii* were identified by gram stain microscopy and PCR method using sheep blood agar to cultur and isolate them. *P. zopfii* sourced from cow was first discovered in Jiangsu area.

Key words Cow mastitis; *Prototheca zopfii*; PCR identification

无绿藻是一种和绿藻相近的无叶绿素藻类, 是自然界一种常见条件致病真菌, 可广泛存在于污水、土壤、植物及动物中; 无绿藻病可引起人与动物的感染。在牛的无绿藻感染症中, 其多表现为顽固性乳房炎, 因无绿藻的菌落形态与酵母样真菌类似, 故而在临床诊断中容易发生误诊。

从 1894 年 Kruger 发现无绿藻后, 陆续确认了 6 种无绿藻: *Prototheca moriformis* (1894)、*Prototheca stagnora* (1985)、*Prototheca ulemae* (1986)、*Prototheca wickerhamii* (1959)、*Prototheca zopfii* (1894)、*Prototheca blaschkeae* (2006)。

在 1952 年, 左氏无绿藻首次被确定为奶牛乳房炎的致病菌^[1-3], 能引起奶牛产奶量急剧下降, 乳房轻度肿胀, 乳汁呈水样, 伴有絮状沉淀, 且对抗生素治疗效果不佳^[4-6], 容易成为感染源, 故最好的控制方法就是淘汰患病牛只。左氏无绿藻感染奶牛后易造成严重的经济损失, 并对食品公共安全存在潜在的威胁。

无绿藻引起的乳房炎在德国、美国、意大利、葡萄牙、英国、日本和西班牙等国家被广泛报道, 目前国内鲜有相关的报道, 因而对无绿藻性临床型乳房炎的诊断及其危害评估和防控具有很大的必要性和迫切性^[7]。

1 材料与方

1.1 试剂 新鲜脱脂绵羊鲜血(杭州微生物有限公司), 琼

脂粉, 革兰染色液(广州蕊特科技有限公司), PCR Mast mix (Dye plus)(诺唯赞生物科技有限公司); 试剂盒: 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(GenScript)。

1.2 培养基 绵羊血琼脂培养基, 配制方法参考文献[8], 改良马丁培养基, 购自青岛高科园海博生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 左氏无绿藻的分离。从江苏部分养殖场患乳房炎的奶牛采集好奶样, 4℃保存。分离奶样中细菌时, 先将采样管中奶样摇匀, 在无菌条件下, 取出 100 μL 奶样, 均匀涂布到 60 mm 规格的血琼脂平板上, 在超净台内晾干后, 在 37℃ 恒温培养箱倒置培养 24 h, 然后观察菌落, 根据其颜色、形态、溶血性、数目(菌落数目小于 3 的舍弃), 分别挑取可疑单菌落划线接种于绵羊血新鲜血培养基上进行纯化培养, 37℃ 恒温培养箱中 48 h。挑取单菌落分别进行革兰染色并在 1 000 倍光镜下进行形态学观察。

1.3.2 PCR 鉴定左氏无绿藻。特异性 PCR 分析 4 个左氏无绿藻分离株的 18S rRNA。酵母样细胞在改良马丁固体培养基上 37℃ 培养 48 h 后用于基因提纯。使用 GenScript 细菌 DNA 提纯试剂盒提取基因组 DNA, 溶解在 50 μL 的超纯水中。

左氏无绿藻的鉴定采用 PCR 方法, 参考文献[9] 选用引物 Proto18-4f(5'-GACATGGCGAGGATTGACAGA-3') 和 Proto18-4r(5'-AGCACACCCAATCGGTAGGA-3') 进行鉴定, 目的条带大小 450 bp。

20 μL PCR 扩增体系如下: 1 μL 上游引物, 1 μL 下游引物, 1 μL DNA 模板, 7 μL ddH₂O, 10 μL 2 × Taq Master Mix (Dye Plus); 5 min 95℃ 32 个循环, 模板变性(1 min 95℃), 引物退火(1 min 57℃), 聚合(45 s 72℃), 10 min 72℃, PCR 产物在 2% 的琼脂进行电泳(80 V, 80 min), 用 Gelsafe 进行显色。

对阳性 PCR 产物进行测序分析。

基金项目 江苏省“青蓝工程”; 江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(14)2088); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD); 常州市科技支撑项目(CE20152006); 扬州大学科研项目(x20160716); 江苏省人兽共患病学重点实验室开放课题(R1607)。

作者简介 戴迪(1994—), 女, 四川三台人, 本科生, 专业: 兽医学。* 通讯作者, 秦爱建, 教授, 博士生导师, 博士, 从事病原微生物研究; 金文杰, 副教授, 硕士生导师, 博士, 从事病原微生物研究。

收稿日期 2017-09-20

2 结果与分析

2.1 左氏无绿藻革兰氏染色结果 单菌落经革兰氏染色可见大的球形细胞、中央区着深紫色、边缘红染^[10]。

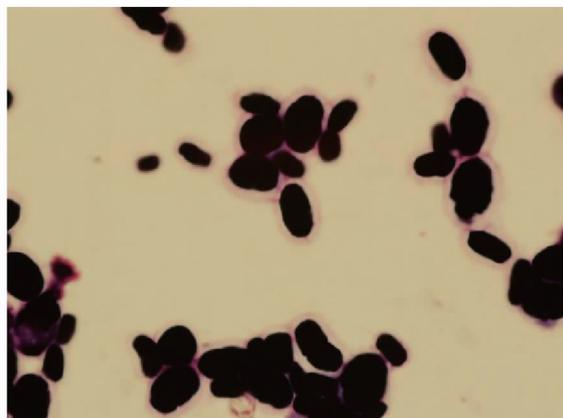


图 1 革兰氏染色镜检

Fig.1 Gram stain microscopy

2.2 不同培养基纯化培养

2.2.1 绵羊血琼脂生长情况。4 个分离株在 37 °C、48 h 绵羊血琼脂培养结果(图 2),在血平板上生长较缓慢为点状白色圆形。



图 2 绵羊血琼脂培养基(37 °C,48 h)

Fig.2 Sheep blood agar medium(37 °C,48 h)

2.2.2 改良马丁培养基生长情况。37 °C、48 h 改良马丁培养基中纯化培养结果(图 3),生长良好,菌落呈白色,圆形,边缘皱褶,表面呈颗粒状。

2.3 PCR 鉴定结果 PCR 结果显示编号 1、2、3、4 菌种在约 450 bp 处有阳性条带(图 4),将测序结果进行 BLAST 比对,与 GenBank 公布的左氏无绿藻相关基因同源性达 99%。

3 结论与讨论

该研究基于左氏无绿藻的形态学特征、镜检特点、分子生物学特征进行鉴定,最终确定 4 个分离株为左氏无绿藻。与血平板生长状况相比较,左氏无绿藻在改良马丁固体培养基(pH 6.4 ± 0.2)上生长较好,菌落较大,颜色发白,表面呈颗粒状,革兰氏染色后可见边缘浅红色的孢囊。另外,左氏无绿藻的生长速度相对于细菌较慢,因此在收集奶样时要严格按照标准程序进行无菌采集,否则会因细菌的快速生长而影响对无绿藻的检测^[11],恒温培养需要较长的培养时间。



图 3 改良马丁固体培养基(pH 6.4 ± 0.2,37 °C,48 h)

Fig.3 Improved Martin solid culture medium (pH 6.4 ± 0.2, 37 °C,48 h)

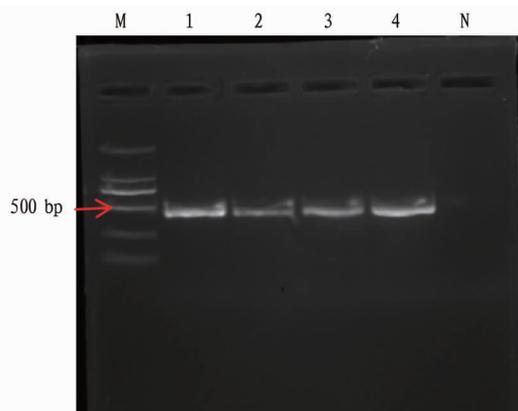


图 4 左氏无绿藻特异性基因 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳分析

Fig.4 Agarose gel electrophoresis analysis of screening PCR amplification products of *Prototheca zopfii*

左氏无绿藻能引起动物疾病,并通过牛奶传染给人类。左氏无绿藻不仅对绝大多数抗生素耐药^[12],而且该病原对巴氏消毒法具有耐受性^[13],从而能引起人类肠道感染和肠炎。因此,确认食用牛奶中左氏无绿藻的存在非常重要,它们对人类健康有潜在的危害。

参考文献

- [1] COSTA E O, CARCIO A C, MELVILLE P A, et al. *Prototheca* sp. outbreak of bovine mastitis[J]. Zentralbl veterinarmed B, 1996, 43(6): 321-324.
- [2] J'ANOSI S, R'ATZ F, SZIGETI G, et al. Review of the microbiological, pathological, and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca zopfii*[J]. Vet Q, 2001, 23(2): 58-61.
- [3] ROESLER U, HENSEL A. Longitudinal analysis of *Prototheca zopfii*-specific immune responses: Correlation with disease progression and carriage in dairy cows[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(3): 1181-1186.
- [4] MARQUES S, SILVA E, CARVALHERIA J, et al. Short communication: *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Prototheca wickerhamii* and *Prototheca zopfii* isolated from bovine mastitis[J]. Journal of dairy science, 2006, 89(11): 4202-4204.
- [5] CORBELLINI L G, DRIEMEIER D, CRUZ C, et al. Bovine mastitis due to *Prototheca zopfii*: Clinical, epidemiological and pathological aspects in a Brazilian dairy herd[J]. Tropical animal health and production, 2001, 33(6): 463-470.
- [6] TORTORANO A M, PRIGITANO A, DHO G, et al. *In vitro* activity of conventional antifungal drugs and natural essences against the yeast-like alga *Prototheca*[J]. J Antimicrob Chemother, 2008, 61(6): 1312-1314.

(下转第 86 页)

3 讨论

良种是水产养殖业结构调整和水产业持续健康发展的首要物质基础^[9]。选择育种是一种常用育种技术手段,已经成功应用于珍珠贝养殖群体的遗传改良。日本是开展珠母贝遗传育种最早的国家^[10],从20世纪70年代开始针对马氏珠母贝壳特征、壳重及珍珠层颜色进行了近30年的选择育种,已选育出壳凸度、壳重和壳宽等不同系列的马氏珠母贝品系。国内马氏珠母贝遗传育种研究开展较晚,但发展较快,已先后选育马氏珠母贝“海选1号”^[8]、“南科1号”^[11]和“南珍1号”^[12]等养殖新品种。

良种推广是水产业增产增收的关键,推广的品种必须能适应当地的气候和环境条件。开展马氏珠母贝良种规模化繁育并进行推广养殖,提高珍珠贝主产区优质苗种的覆盖面,有望改良现有养殖群体的育珠性状,提高珍珠质量与产量。在上述马氏珠母贝良种中,“海选1号”基础群体亲本来源于北部湾野生群体,为本地土著群体;选育工作在雷州半岛开展,选系适应当地气候、水文条件;选育过程中,采用边研发边推广的原则,在湛江地区(海水珍珠主产区)进行选系苗种的扩繁与中试,养殖效果和经济效益已在当地获得验证。因此,湛江市水产技术推广中心站选用“海选1号”加以推广。

该研究比较了马氏珠母贝“海选1号”和对照群体受精率、孵化率和变态率及不同月龄生长数据,结果显示3日龄“海选1号”幼虫的存活率、壳长和壳高与对照组差异不显著,说明生长、存活等表型性状在生活史的早期尚未表现出来,这与闫喜武等^[13]对2个壳色品系菲律宾蛤仔及郑怀平等^[14]对不同壳色海湾扇贝的研究结果是一致。“海选1号”的孵化率和变态率显著高于对照群体;10日龄、15日龄和20日龄“海选1号”幼虫的存活率显著高于对照群体,说明“海选1号”与对照群体之间抗逆性存在差异,且“海选1号”表现出更强的抗逆性。5日龄、10日龄、15日龄、20日龄“海选

1号”幼虫的壳长和壳高均显著大于对照组;40日龄、100日龄、150日龄、250日龄和360日龄“海选1号”稚贝的壳长和壳高均显著大于对照组,说明随着贝体的生长,表型性状在“海选1号”与对照群体之间的差异越来越明显,“海选1号”群体生长更快,该研究再次证明了“海选1号”具有较好的生长优势。

4 结论

与对照群体相比较,马氏珠母贝“海选1号”养殖新品种具有较好的生长优势,可在湛江及周边地区大力推广养殖。

参考文献

- [1] 蔡英亚,张英,魏若飞. 贝类学概论[M]. 上海:上海科技出版社,1995:208-210.
- [2] 张翀. 湛江南珠产业发展对策探讨[D]. 湛江:广东海洋大学,2011.
- [3] 何毛贤,史兼华,林岳光,等. 马氏珠母贝选育子一代生长特性研究[J]. 热带海洋学报,2006,25(1):19-22.
- [4] DENG Y W, DU X D, WANG Q H. Selection for fast growth in the Chinese pearl oyster, *Pinctada martensii*; Response of the first generation line [J]. Journal of the world aquaculture society, 2010, 40(6): 843-847.
- [5] WANG Q H, DENG Y W, DU X D, et al. Realized heritability and genetic gains of three generation for superior growth in the pearl oyster *Pinctada martensii* [J]. Acta ecologica sinica, 2011, 31(2): 108-111.
- [6] 王爱民, 阎冰, 叶力, 等. 马氏珠母贝不同地理种群内自繁和种群间杂交子一代主要性状的比较[J]. 水产学报, 2003, 27(3): 200-206.
- [7] SHI Y H, HONG K, GUIO X M, et al. Genetic linkage map of the pearl oyster, *Pinctada martensii* (Dunker) [J]. Aquaculture research, 2009, 41(1): 35-44.
- [8] 杜晓东, 邓岳文, 王庆恒, 等. 马氏珠母贝“海选1号”[J]. 中国水产, 2015(10): 53-56.
- [9] 史聚宝, 雷宗昌, 史惠琴. 良种推广中存在的问题及对策[J]. 中国种业, 2010(4): 27-29.
- [10] 唐启升. 水产学学科发展现状及发展方向研究报告[M]. 北京:海洋出版社, 2013:9.
- [11] 何毛贤. 马氏珠母贝“南科1号”[J]. 海洋与渔业, 2016(10): 51.
- [12] 喻达辉, 黄桂菊, 刘宝锁, 等. 马氏珠母贝“南珍1号”[J]. 中国水产, 2016(10): 80-82.
- [13] 闫喜武, 张国范, 杨凤, 等. 菲律宾蛤仔莆田群体两个壳色品系生长发育的比较[J]. 大连海洋大学学报, 2005, 20(4): 266-269.
- [14] 郑怀平, 张国范, 刘晓, 等. 不同贝壳颜色海湾扇贝 (*Argopecten irradians*) 家系的建立及生长发育研究[J]. 海洋与湖沼, 2003, 34(6): 632-639.

(上接第79页)

- [7] GAO J, ZHANG H Q, HE J Z, et al. Characterization of *Prototheca zopfii* associated with outbreak of bovine clinical mastitis in herd of Beijing, China [J]. Mycopathologia, 2012, 173(4): 275-281.
- [8] 陈天寿. 微生物培养基的制造与应用配制[M]. 北京:中国农业出版社, 1995.
- [9] ROESLER U, MOLLER A, HENSEL A, et al. Diversity within the current algal species *Prototheca zopfii*: A proposal for two *Prototheca zopfii* genotypes and description of a novel species, *Prototheca blaschkeae* sp. nov [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2006, 56(6): 1419-1425.
- [10] 张寒琪, 高健, 吴桥兴, 等. 奶牛中型无绿藻性乳房炎[J]. 中国兽医杂志, 2011, 47(5): 13-14.

- [11] TENHAGEN B A, KALBE P, KLÜNDER G, et al. Individual animal risk factors for *Prototheca mastitis* in cattle [J]. Dtsch tierarztl wochenschr, 1999, 106(9): 376-380.
- [12] WAWRON W, BOCHNIARZ M, PIECH T, et al. Antimicrobial susceptibility of *Prototheca zopfii* isolated from bovine mastitis [J]. Bull Vet Inst Pulawy, 2013, 57(4): 485-488.
- [13] LASSA H, JAGIELSKI T, MALINOWSKI E. Effect of different heat treatments and disinfectants on the survival of *Prototheca zopfii* [J]. Mycopathologia, 2011, 171(3): 177-182.

科技论文写作规范——作者

论文署名一般不超过5个。中国人姓名的英文名采用汉语拼音拼写,姓氏字母与名字的首字母分别大写;外国人姓名、名字缩写可不加缩写点。