



裸项栉鰕虎鱼感染创伤弧菌初报

罗琴芳^{1#}, 黄文科^{1#}, 袁文², 潘金春², 黄韧², 陈瑞爱^{1,3,4*}

(1. 广东温氏大华农生物科技有限公司, 广东 云浮 527499; 2. 广东省实验动物监测所, 广州 510260;
3. 肇庆大华农生物药品有限公司, 广东 肇庆 526238; 4. 华南农业大学兽医学院, 广州 510642)

【摘要】 目的 分离及鉴定感染实验用鰕虎鱼的病原菌。方法 将病料分离培养, 纯化培养后, 用16s rRNA及生理生化方法鉴定病原菌。结果 分离到了革兰阴性弧菌, 命名为: *GDLAMI-1210* 株, 显微镜下观察为逗点样形态, 电镜下可看到菌的一端钝圆, 一端长杆弯曲的鞭毛, 生理生化鉴定结果与弧菌一致, 16s rRNA 测序结果与创伤弧菌标准菌株 (*ATCC27562T*) 等聚为一类菌, 回归实验证实该菌对裸项栉鰕虎鱼有一定的致病性。结论 裸项栉鰕虎鱼感染创伤弧菌初报。

【关键词】 裸项栉鰕虎鱼; 弧菌; 致病性

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2017) 02-0225-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2017.02.020

A report of *Vibrio* sp. *GDLAMI-1210*, isolated from *Ctenogobius gymnauchen* cultured in seawater

LUO Qin-fang^{1#}, HUANG Wen-ke^{1#}, YUAN Wen²,
PAN Jin-chun², HUANG Ren², CHEN Rui-ai^{1,3,4*}

(1. Guangdong Wens Dahuanong Biotechnology Co., LTD., Yunfu Guangdong 527499, China;
2. Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangzhou 510260;
3. Zhaoqing Dahuanong Biological Pharmaceutical Co., LTD, Zhaoqing Guangdong 526238;
4. College of Veterinary, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

【Abstract】 Objective To observe and identify the microorganism isolated from diseased and dead *Ctenogobius gymnauchen* cultured in seawater near the Daya Bay of south China sea. **Methods** *GDLAMI-1210* strain was isolated from the diseased *Ctenogobius gymnauchen* (Bleeker). We applied physiological and biochemical characteristics in the bacterial classification. In order to confirm the results, we amplified a 1438 bp sequence of *GDLAMI-1210*'s 16 S rRNA (HM 362434) and compared with other sequence in GenBank, and followed by artificial infection. **Results** The *GDLAMI-1210* strain was Gram-negative and in a shape of short rod with single polar flagellum. The homology analysis and phylogenetic study showed that the 16 S rRNA sequence of *GDLAMI-1210* has the highest similarity to *Vibrio* sp. *espec Vibrio vulnificus*, showing 99% identity. **Conclusions** To our knowledge, this is the first report that the causative pathogen, *Vibrio* sp., leads to the mortality of *Ctenogobius gymnauchen* (Bleeker).

【Key words】 *Ctenogobius gymnauchen* (Bleeker); *Vibrio* sp.; Pathogen

Corresponding author: CHEN Rui-ai, E-mail: chensa@163.com

由于鱼类的流动性, 鱼体中生理生化指标的变化或鱼体内污染物含量的变化是鱼体对游动沿途海

区污染状况“空间匀和”后的结果, 即反映沿途海区污染的平均状况, 因此, 很多鱼类(特别是游泳能力

[作者简介] 罗琴芳(1970-), 女, 博士, 研究方向: 禽病及生药创制研究。E-mail: luqinffer@hotmail.com。黄文科(1980-), 男, 硕士, 研究方向: 禽病及生药创制研究。E-mail: 22932662@qq.com。#共同第一作者

[通讯作者] 陈瑞爱(1970-), 女, 教授, 研究方向: 动物疫病防控及生药创制研究。E-mail: chensa@163.com

很强的鱼类)可用作环境污染的指示生物。鰕虎鱼为底栖穴居性鱼类,个体小、易繁殖、分布广,多数栖息在热带海水中,在海洋环境毒理学研究方面具有明显的优势^[1]。

裸项栉鰕虎鱼个体小,性成熟早,繁殖周期短,繁殖力强,便于实验室内饲养管理,其存活率,生存状态能够直接反应海水质量,具有较高的实验动物开发价值。广东省实验动物监测所联合相关单位已逐步开展了裸项栉鰕虎鱼的人工饲养、生长繁殖特性、胚胎、组织学特性等方面的研究^[2-4]。就其毒理、病理学方面的研究,国内外尚无报道。本文针对某试验中心裸项栉鰕虎鱼突然发病、死亡率近 100% 的突发事件,对其病鱼进行病原分析的部分实验结果进行报道。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

选用清洁级裸项栉鰕虎鱼 25 尾,尾重 4 ~ 5 g, 30 ~ 35 日龄。由广东省实验动物监测所提供并饲养。饲养期间给予标准饲料(由广东省实验动物监测所提供),12 h 循环灯光,标准海水,饲养水温为 (28 ± 0.5) °C。裸项栉鰕虎鱼饲养及组织取材均于广东省实验动物监测所实验设备内【SYXK(粤)2012-0122】。本实验所有操作均符合中华人民共和国《实验动物管理条例》。

1.1.2 培养基与试剂

各种培养基(5% 绵羊血平板等)(北京陆桥,中国),生化鉴定管(北京陆桥,中国),哥伦比亚血琼脂培养基(广州迪景微,中国),16s rRNA PCR 用聚合酶 exTaq(TaKaRa,中国),西班牙琼脂糖购自(鼎国生物,中国),2216 改良培养基(由蛋白胨 5 g、酵母提取物 1 g、硫酸铁 0.1 g、15 g 琼脂、天然海水 0.22 μm 过滤 1000 μL 配制),不同浓度 NaCl 溶液按常规方法配制。

1.2 方法

1.2.1 细菌分离、鉴定

病料来源于广东省惠州市大亚湾地区浅水海域。直接将海水、病死裸项栉鰕虎鱼体表抹片革兰染色镜检。将病死裸项栉鰕虎鱼无菌下剖检,组织器官病料接种哥伦比亚血琼脂培养基,37°C 培养;组织器官病料同时抹片染色镜检。

1.2.2 细菌纯化培养

将哥伦比亚血琼脂培养基上单菌落接种在 2216 改良培养基上,28°C 培养。

1.2.3 细菌生理生化特性检测

按常规方法进行。

1.2.4 16s rRNA PCR

合成引物 P1:5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; P2:5' -GGTACCTTGTACGACTT-3'。挑取单菌落溶于 exTaq 酶 50 μL 的 PCR 反应体系中,进行 PCR 扩增,PCR 反应体系及程序按 exTaq 酶说明书进行(其中 Tm 为 50°C)。扩增产物电泳鉴定有预期带后,送交华大基因公司进行测序分析。

表 1 用于 16s rRNA 基因序列分析的菌株

Tab.1 Strains used for sequence analysis of the 16s rRNA

菌株名称 Strains	菌株简称 Strain abbreviation	菌株保藏号 Strain preservation number	GeneBank 收录号 GeneBank accession number
<i>V. splendidus</i>	<i>V. splen</i>	LP1	AY129277
<i>V. aestuarianus</i>	<i>V. aestu</i>	KT0901	AF172840
<i>V. chagasii</i>	<i>V. chaga</i>	LMG13237	AJ490157
<i>V. tapetis</i>	<i>V. tapet</i>	CECT 4600	Y08430
<i>V. orientalis</i>	<i>V. orien</i>	ATCC33934T	X74719
<i>V. navarrensis</i>	<i>V. navar</i>	CIP103381T	X74715
<i>V. vulnificus</i>	<i>V. vulni</i>	ATCC27562T	X56582
<i>V. vulnificus</i>	<i>V. vulni</i>	C7184	X76334
<i>V. vulnificus</i>	<i>V. vulni</i>	Vv34	EF546291
<i>V. fluvialis</i>	<i>V. fluvi</i>	NCTC11327T	X76335
<i>V. diazotrophicus</i>	<i>V. diazo</i>	ATCC33466T	X74701
<i>V. hispanicus</i>	<i>V. hispa</i>	LMG13211	AY254041
<i>V. anguillarum</i>	<i>V. angui</i>	ATCC 12964(T)	X16895
<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. metsc</i>	NCTC11170	X74712
<i>V. ordalii</i>	<i>V. ordal</i>	ATCC33509T	X74718
<i>V. scophthalmi</i>	<i>V. scoph</i>	CECT 4638; A089	U46579
<i>V. pomeroyi</i>	<i>V. pomer</i>	LMG20537T	AJ491290
GDLAMI-1210	GDLAMI-1210		HM 362434

1.3 人工接种试验

将分离鉴定的菌进行扩增培养、离心后,用灭菌的 PBS 按 10 倍比稀释至 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 ffu/mL,按每尾 50 μ L 的剂量腹腔接种裸项栉鰕虎鱼(试验前 1 d 停止喂食,试验当天不喂食,试验次日再开始喂食)。每天观察鱼临床症状及死亡率,连续观察 7 d,对症状明显的濒死病鱼进行解剖和接种,对再分离菌株进行上述同样的分离鉴定、纯化和人工感染。

2 结果与分析

为便于描述,分离菌命名为 *GDLAMI-1210* 株。

2.1 *GDLAMI-1210* 株的培养特性

在 5% 绵羊血平板中,菌落为 α 溶血、土褐色大菌落,革兰染色呈红色,短杆状、逗点状、锤状菌。在 2216 改良培养基中,28 $^{\circ}$ C 培养 18 h,菌落呈土黄色大菌落。革兰染色呈短杆状、逗点状菌(如图 1 所示)。培养 24 h 的菌在电镜下观察,有较长的单鞭毛(如图 2 所示)。



图 1 分离菌革兰染色结果

Fig. 1 Results of Gram staining of the isolated bacteria

2.2 *GDLAMI-1210* 株的生化鉴定结果

GDLAMI-1210 株的生化鉴定结果显示:生化项目的氧化酶、动力、 β -半乳糖苷、细胞色素氧化酶、赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶、赖氨酸脱羧酶、1% NaCl 蛋白胨水、3% NaCl 蛋白胨水、5% NaCl 蛋白胨水、8% NaCl 蛋白胨水、甘露醇、肌醇均为阳性;生化项目的精氨酸双水解酶、靛基质、明胶、V-P 试验、乳糖、蔗糖、纤维二糖均为阴性。

2.3 *GDLAMI-1210* 株的 16s rRNA PCR 鉴定结果

GDLAMI-1210 株与 Olivares-Fuster 等在 2007 年分离报道的创伤弧菌 Vv34 株的 16s rRNA 最为接近,与创伤弧菌 *ATCC 27562T*、*C7184* 株 16s rRNA

聚为一群(如图 3 所示)。

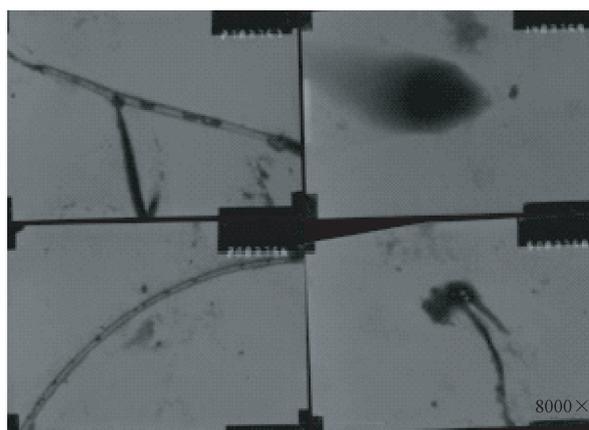


图 2 分离菌电镜下特征

Fig. 2 Ultrastructural characteristics of the isolated bacteria

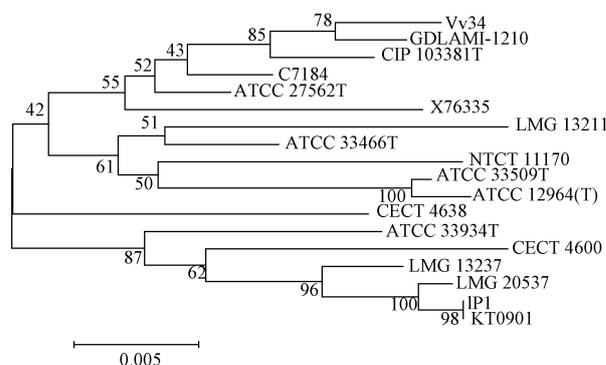


图 3 4 株弧菌 16s rRNA 序列聚类

Fig. 3 Clustering analysis of the 16 S rRNA of the 4 strains

2.4 *GDLAMI-1210* 株人工接种试验结果

GDLAMI-1210 株被人工接种裸项栉鰕虎鱼后,7 d 内裸项栉鰕虎鱼死亡情况为:感染组 1(1×10^4 稀释)死亡数是 5/5;感染组 2(1×10^5 稀释)死亡数是 4/5;感染组 3(1×10^6 稀释)死亡数是 1/5;感染组 4(1×10^7 稀释)死亡数是 1/5;空白对照组(PBS)死亡数是 0/5。

3 讨论

3.1 关于 *GDLAMI-1210* 株鉴定

本试验从人工养殖的裸项栉鰕虎鱼脑、尾分离出一株革兰阴性菌(*GDLAMI-1210*),通过人工接种试验证实其为该病的病原菌。根据该菌的形态学特征和生理生化特性初步确定为弧菌,但其生理生化特性与文献报道的诸多弧菌菌株的生理生化特性存在一定的差异^[6],而不能进行确切的鉴定。16s rRNA 是核糖体 RNA 的一种,其分子在结构上的保

守区能反映生物物种的亲缘关系,可变区具有能揭示生物物种的特征核酸序列等特点,被认为是最适细菌系统发育和分类鉴定的指标,被称为是细菌的“分子化石”,目前已广泛用于病原菌的鉴定^[7]。因此,根据弧菌 16s rRNA 特征^[5],采用一对 16s rRNA 通用引物,从细菌基因组扩增出约 1.5 kb 的 DNA 片段,将获得的片段送交华大基因公司测序,序列经 Blast 分析,与创伤弧菌株 *V. vulnificus* Vv34 的 16s rRNA 序列(GenBank 收录号 EF546291)最为接近,与创伤弧菌标准菌株 ATCC27562T 等聚为一类,从分子生物学鉴定方法进一步推断,*GDLAMI*-1210 株疑为创伤弧菌株。

3.2 裸项栉虾虎鱼人工感染 *GDLAMI*-1210 株的临床症状

弧菌广泛分布于近海及河口的海洋环境,已经证明有许多种弧菌是鱼类的重要条件性致病菌。其中尤以霍乱弧菌、副溶血性弧菌、创伤弧菌、哈维氏弧菌、拟态弧菌、费氏弧菌、溶藻弧菌、鳃弧菌等最为重要。弧菌病是世界各国水产养殖动物中普遍流行、危害最大的细菌性疾病之一。其中创伤弧菌有 2 个生物型,分别为生物 I 型和生物 II 型。生物 I 型主要是人类的致病菌,也能感染养殖鱼类,澳大利亚养殖的尖吻鲈发生过由创伤弧菌生物 I 型引起的弧菌病,死亡率高达 80%。创伤弧菌生物 II 型是海水养殖动物的致病菌,也是人类的条件致病菌,感染鱼发病症状相似,均表现为行动迟缓,经常游出水面,发病初期鳍末端充血、发炎;鱼体两侧有出血点;腹部、肛门红肿、出血;肝脏表面有出血点,肿大,颜色淡;肾脏水肿发黑有淤血现象;肠有炎症和积水,积水呈黄绿色;病鱼沉底死亡。本次人工感染实验结果表明:分离菌株 *GDLAMI*-1210 人工感染裸项栉虾虎鱼后较短时间内翻身游动,身体失去平衡,鱼鳃、鱼尾充血,随之死亡,死亡鱼身体变黑、肾脏肿大糜烂。这些症状与马爱敏^[5]、王志刚^[8]、Matsumoto 等^[9]报道的感染弧菌结果有部分相似之处,由此可推断,所分离的菌株 *GDLAMI*-1210 为一种创伤弧

菌。

3.3 裸项栉虾虎鱼的微生物质量控制

裸项栉虾虎鱼是一种具有较高应用价值的实验鱼类。分离培养创伤弧菌和回归实验,对于裸项栉虾虎鱼标准化研究,特别是裸项栉虾虎鱼的微生物质量控制具有重要的意义。海水中微生物的存在及裸项栉虾虎鱼对海水微生物的敏感性试验尚待开展。本试验是裸项栉虾虎鱼感染创伤弧菌的首次报道,该菌的生物学特性(具体的分类鉴定)、致病性,裸项栉虾虎鱼感染该菌的条件、病理变化特征,以及药物治疗或预防等方面的实验工作有待进一步的研究和报道。

参 考 文 献

- [1] 李建军,杨笑波,黄韧,等. 裸项栉虾虎鱼的生物学特性研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(1): 39-41.
- [2] 潘金春,谭文雅,魏社林,等. 裸项栉虾虎鱼消化系统组织形态学观察 [J]. 中国实验动物学报, 2008, 16(4): 289-292.
- [3] 李建军,杨笑波,魏社林,等. 盐度对裸项栉虾虎鱼繁殖和生长的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(3): 40-43.
- [4] 李建军,杨笑波,魏社林,等. 裸项栉虾虎鱼仔鱼日摄食量及摄食节律研究 [J]. 海洋环境科学, 2008, 27(4): 352-354.
- [5] 马爱敏,闫茂仓,常维山,等. 黄姑鱼创伤弧菌的分离和鉴定 [J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(10): 960-964.
- [6] 陈艳,付萍. 创伤弧菌检测方法的研究进展 [J]. 国外医学卫生学分册, 2008, 35(2): 91-96.
- [7] Hoffmann M, Brown EW, Feng PC, et al. PCR-based method for targeting 16S-23S rRNA intergenic spacer regions among *Vibrio* species [J]. BMC Microbiol, 2010, 10: 90.
- [8] 王志刚,邵平扬,曹浩强,等. 创伤弧菌的培养与鉴定 [J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(15): 2068-2070.
- [9] Matsumoto K, Ohshige K, Fujita N. Clinical features of *Vibrio vulnificus* infections in the coastal areas of the Ariake Sea, Japan [J]. Japan: J Infect Chemother, 2010, 16(4): 272-279.

[收稿日期] 2016-09-19