

## 一株牙鲆皮肤溃烂症病原菌的鉴定\*

莫照兰<sup>1</sup> 茅云翔<sup>2</sup> 陈师勇<sup>1</sup> 张培军<sup>1\*\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院海洋研究所 实验海洋生物学 开放实验室 青岛 266071)

(<sup>2</sup> 青岛海洋大学 海洋生命学院 青岛 266003)

**摘 要** 从山东荣成养鱼场发病牙鲆分离到一株病原菌 M3,革兰氏阴性,杆状,能运动,菌落半透明,用 BIOLOG 细菌鉴定系统不能鉴定。通过 16S rDNA 序列分析和同源性检索发现 M3 菌株与弧菌属的同源性较高,为 94%~98%。系统发育学分析表明菌株 M3 与鳃弧菌关系最近,相似性为 99.6%,其生化性状也和鳃弧菌的特征相似,故可把 M3 定为鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)。

**关键词** 牙鲆,鳃弧菌,16S rDNA,系统发育学分析

中图分类号:Q93-331 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2002)03-0263-07

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是一种名贵的海水经济鱼类,在中国北方沿海地区已经形成较大的工厂化生产规模。近年来由于养殖规模的扩大和养殖密度的提高,牙鲆出现了各种疾病,如病毒病、细菌病和寄生虫病<sup>[1-3]</sup>,导致严重的经济损失。1999 年我们从患溃烂症养殖牙鲆分离到一株细菌 M3,该菌对牙鲆具有致病性,主要症状为鳍条出血,体表溃烂形成一深洞,消化道弥漫性出血<sup>[4]</sup>。对 M3 进行常规生化鉴定,发现它在美国 BIOLOG 细菌鉴定系统的生化反应能力较差,测定了其 16S rDNA 序列,并做了系统学分析。结果表明该菌株为鳃弧菌。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株及培养基

菌株 M3 来自山东荣成邱家养殖场发病牙鲆,分离自皮肤溃烂组织。Zobell 2216E 海水培养基:酵母粉 1.0g,蛋白胨 5.0g,FePO<sub>4</sub> 0.1g,用陈海水定容至 1000mL,pH7.6~7.8,琼脂 2.0%。TCBS 琼脂培养基:蛋白胨 10.0g,酵母粉 5.0g,NaCl 10.0g,胆盐 8.0g,蔗糖 20.0g,柠檬酸铁 1.0g,Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 10.0g,溴麝香草酚蓝 0.04g,麝香草酚蓝 0.04g,琼脂 15.0g,蒸馏水定容至 1000mL,pH8.6。

### 1.2 形态观察及生理生化实验

光镜与电镜结合观察个体形态、大小和鞭毛。按 Oliver<sup>[5]</sup>的方法对细菌进行常规分类,同时用美国 BIOLOG 公司[BIOLOG Inc. Hayward, CA, USA]的革兰氏阴性细菌鉴定系统

\* 国家重点基础研究专项资助项目(G1999012003)。

\*\* 通讯作者

作者简介 莫照兰(1967-)女,广西南宁市人,在中国科学院海洋研究所开放室工作,博士,主要从事海洋微生物及水产动物病害研究。

收稿日期 2001-06-08,修回日期 2001-10-08

[GN Microplate] 进行 95 种唯一碳源的生化反应测试,使用 BIOLOG Micro Station system 3.50 软件分析。

### 1.3 16S rDNA 序列测定和分析

**1.3.1 细菌 DNA 的制备** 将细菌接种在平板上,28℃ 培养过夜。取单一菌落悬浮于 50 $\mu$ L 无菌蒸馏水中,于 100℃ 水浴 5min,离心,取上清作为细菌 DNA 原液。

**1.3.2 16S rDNA 序列的 PCR 扩增与测序**:用于 PCR 扩增的正向引物为 27F:5'-AGAGTTTGATC(C/A)TGGCTCAG-3 (对应于 *E. coli* 16S rDNA 基因的第 8~27 个碱基位置),反向引物 1492R:5'-TACGG(C/T)TACCTTGTACGACTT-3 (对应于 *E. coli* 16S rDNA 基因的第 1492~1510 个碱基位置)<sup>61</sup>。在 100 $\mu$ L 的 PCR 反应体系中含有:1 $\times$  PCR 缓冲液,1.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>,4 $\times$  dNTP 混合物各 200 $\mu$ mol/L,引物各 0.5 $\mu$ mol/L,Taq DNA 聚合酶 2.5U,2 $\mu$ L DNA 原液。PCR 反应条件为:96℃ 预变性 6min;接 94℃ 变性 1min,50℃ 复性 1min,72℃ 延伸 2min,30 个循环;最后 72℃ 温育 6min。PCR 扩增产物经 DNA 纯化系统(Wizard PCR Preps, Promega)纯化后,直接交由上海生物工程技术公司进行序列测定。测序所用的仪器为 Perkin Elmer 公司的 ABI PRISMTM 377 DNA Sequencer 测序仪。

**1.3.3 序列分析及数据处理** 将菌株 M3 的 16S rDNA 序列与从 Genbank 数据库中获得的弧菌属细菌的 16S rDNA,采用 Clustalw 1.3 软件进行多序列匹配排列,用 PHYLIP 软件包(3.573e)的 SEQBOOT、DNADIST、CONSENSE 分析,重复数 1000 次,用 Neighbor-Join 方法绘制进化树。

**1.3.4 核酸序列存取号(Accession number)**:菌株 M3 的 16S rDNA 序列已存放在 GenBank 核苷酸序列数据库中,存取号为 AY035897。其它相关菌株的数据存取号如表 1。

## 2 结果

### 2.1 形态特征

菌株在 2216E 培养基 24h 的菌落呈圆形、半透明,表面光滑、边缘整齐,直径约 1.5mm,在 TCBS 培养基的菌落呈黄色,直径约 3mm。革兰氏染色阴性,短杆状,可运动,有一根很长的极生单鞭毛和周生菌毛,菌体大小为 0.8~1.0 $\times$ 1.5~1.7 $\mu$ m(图 1)。

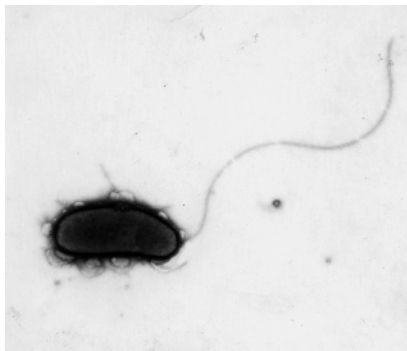


图 1 菌株 M3 的电镜照片  
( $\times 20\ 000$ )

Fig.1 The electron micrograph of strain M3  
( $\times 20\ 000$ )

### 2.2 生长条件

菌株 M3 兼性厌氧,生长需要 NaCl 和微量 Fe<sup>3+</sup>。在 1%~4% 盐浓度范围内生长良好,最适生长的 NaCl 为 3%,最适生长温度 25℃,最佳生长 pH 值为 8.0。

### 2.3 生理生化特性

根据 BIOLOG 系统反应结果,M3 可利用的唯一碳源有糊精,N-乙酰-D-葡糖胺,果糖,半乳糖,龙胆二酸,葡萄糖,肌糖,乳糖,麦芽糖,甘露醇,甘露糖, $\beta$ -甲基-D-葡糖苷,阿洛酮糖,山梨醇,蔗糖,松二糖,葡糖酸,D,L-乳酸,琥珀酸,L-丙氨酰甘氨酸,天门冬素,天门冬氨酸,谷氨酸,氨基乙酰-L-天门冬氨酸,肌苷,葡糖-1-磷酸盐。

表 1 16S rDNA 序列来源和数据库存取号

Table 1 16S rDNA sources and accession number

Abbreviation code	Strain number	Scientific name	Accession number
Vcinc35912	ATCC35912T	<i>Vibrio cincinnatiensis</i>	X74689
Vmets11170	NCTC11170	<i>V. metschnikovii</i>	X74709
Vmets69.14T	CIP69.14T	<i>V. metschnikovii</i>	X74711
Vchol14371	ATCC14371	<i>V. cholerae</i>	X74696
Vchol4033	ATCC14033	<i>V. cholerae</i>	X74694
Vsple33125T	ATCC33125T	<i>V. splendidus</i>	X74724
VspleSCB8	SCB8	<i>V. splendidus</i>	Z31657
Vorda33509	ATCC33509	<i>V. ordalii</i>	X70641
Vorda33509T	ATCC33509T	<i>V. ordalii</i>	X74718
Vangu43313	ATCC43313	<i>V. anguillarum</i>	X71817
Vangu12964T	ATCC12964T	<i>V. anguillarum</i>	X16895
Vangu2130	NCMB2130	<i>V. anguillarum</i>	X71818
Vangu11431	ATCC11431	<i>V. anguillarum</i>	X71821
Vorie33934T	ATCC33934t	<i>V. orientalis</i>	X71719
Vorie33933	ATCC33933	<i>V. orientalis</i>	Z21731
Vfum35016T	ATCC35016T	<i>V. furnissii</i>	X74704
Vvul27562T	ATCC27562T	<i>V. vulnificus</i>	X76733
Vvul7184	ATCC7184	<i>V. vulnificus</i>	X56582
Vvul29307	ATCC74727	<i>V. vulnificus</i>	X74727
Vflu33809T	ATCC33809T	<i>V. fluvialis</i>	X74703
Vflu11327T	NCTC11327T	<i>V. fluvialis</i>	X76335
Vdiaz33466T	ATCC33466T	<i>V. diazotrophicus</i>	X74704
Vdiaz33466	ATCC33466	<i>V. diazotrophicus</i>	X56577
VaesKT0901	KT0901	<i>V. aestuarianus</i>	AF172840
Vaest35048T	ATCC35048T	<i>V. aestuarianus</i>	X74689
ProfSS9	SS9	<i>Photobacterium profundum</i>	AB003191
Pleio25521T	ATCC22521T	<i>P. leiognathi</i>	D25309
Pleio25521	ATCC22521	<i>P. leiognathi</i>	X74686
Pdams2058	NCIMB2058	<i>P. damsela</i>	X78105
Pdams33539	ATCC33539T	<i>P. damsela</i>	X74700

葡糖-6-磷酸盐等 29 种,不能利用的唯一碳源有 环糊精, N-乙酰-D-氨基半乳糖,侧金盏花醇,树胶醛糖,阿拉伯糖醇,赤藻糖醇,密二糖,密三糖,鼠李糖,海藻糖,木糖醇,甲基丙酮酸盐,甲基琥珀酸盐,乙酸,丙烯酸,柠檬酸,蚁酸,半乳糖醛酸,氨基葡萄糖醛酸,葡萄糖醛酸,  $\alpha$ -羟基丁酸,  $\beta$ -羟基丁酸,  $\gamma$ -羟基丁酸,  $\rho$ -羟基苯乙酸,衣康酸,  $\alpha$ -酮基丁酸,  $\alpha$ -酮基戊二醛,  $\alpha$ -酮基戊酸,丙二酸,丙酸,奎尼酸,葡萄糖二酸,葵二酸,丁二酸,丙酰胺, D-丙胺酸,氨基乙酰谷氨酸, L-组胺,羟基-L-葡氨酸,亮氨酸,鸟氨酸, L-苯基丙氨酸,焦谷氨酸, D-丝氨酸, L-苏氨酸, D, L-肉碱,  $\gamma$ -氨基丁酸,噁唑丙烯酸,尿苷,胸腺嘧啶,苯基丙氨酸,腐胺, 2-

氨基乙醇 2,3-丁二醇等 54 种 ;对肝糖、吐温-40、吐温-80、纤维二糖、海藻糖、半乳糖、溴化琥珀酸、琥珀酸盐、丙胺酸、葡氨酸、甘油、D,L-α-磷酸甘油等 12 种唯一碳源的反应不确定。软件分析结果表明 M3 与霍乱弧菌( *Vibrio cholerae* )具有最高相似率为 0.593( 最大相似率 1.000 ) ,因此不能作出鉴定。

菌株 M3 氧化酶反应阳性 ,对弧菌抑制剂 O/129( 2,4-二氨基-6,7-二异丙基喋啶磷酸盐 ,150μg/mL )敏感 ,发酵葡萄糖不产酸 ,不产色素。根据这些特征 ,M3 初步判定为弧菌科弧菌属细菌 ,进一步进行了其它生化测试 ,其与弧菌属部分细菌的特征比较如表 2。根据比较结果 ,菌株 M3 的生化特征与鳗弧菌 *Vibrio anguillarum* 较接近。为了确定菌株 M3 的分类学位置 ,测定了 16S rDNA 序列 ,并与其它细菌的 16S rDNA 序列进行比较分析。

表 2 菌株 M3 与弧菌属( *Vibrio* )部分成员表型特征的比较

Table 2 Comparison of phenotypic feaures of M3 and some members of genus *Vibrio*

	M3	<i>V. anguillarum</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. furnissii</i>	<i>V. costicola</i>
Mono-polar flagellum	+	+	+	+	d	+
Indole production	-	+	+	+	-	-
Methyl red test	+	d	d	d	+	-
Voges-Proskauer reaction	-	d	d	d	-	d
Citrate utilization	+	-	d	+	-	-
O/129 sensitivity	+	+	+	+	-	d
Novobiocin sensitivity	+	+	+	+	+	+
Gelatin hydrolysis	+	+	+	+	+	d
Casein hydrolysis	-	+	+	+	+	-
Tween-80 hydrolysis	+	d	+	+	+	d
Lecithinase	+	...	+	+	...	d
H <sub>2</sub> S production	-	-	-	-	-	-
Acid production :						
Arabinose	-	-	-	d	-	-
Mannose	+	+	d	+	+	+
Glucose	+	+	+	d	d	+
Mannitol	+	+	+	+	d	d
Inositol	-	-	-	-	-	-
Salicin	...	-	-	-	d	-
Starch hydrolysis	+	+	+	+	d	-
Na <sup>+</sup> required for growth	-	+	+	-	-	-
7.5% NaCl growth	-	d	d	+	+	+
10% NaCl growth	-	-	-	d	-	+
5°C growth	-	+	-	-	+	+
37°C growth	-	d	+	+	-	d
42°C growth	-	-	d		-	-
Thoney's Arginine dihydrolase	+	+	-	-	-	+
Lysine decarboxylase	-	-	+	+	+	-
Ornithine decarboxylase	-	-	+	+	-	-
Haemolysis( horse blood )	+	d	d	d	-	-
Luminescence	-	-	-	-	d	-
Pathogenicity	+	+	+	+	-	-

## 2.4 16S rDNA 序列分析和系统发育

对获得的 M3 16S rDNA 序列图谱进行分析处理,对相对方向的序列结果取其互补序列,去掉重叠区域和引物区,连接三个引物的测序结果得到长度为 1438bp 的序列。图 2 列出了菌株 M3 的 16S rDNA 序列。

```

1   CAGGCCTAAC ACATGCAAGT CGAGCGGCAG CACAGAGGAA CTGTTCCTT GGGTGGCGAA
61  GCGGCGGACG GGTGAGTAAT GCCTAGGAAA TTGCCCTGAT GTGGGGGATA ACCATTGGAA
121 ACGATGGCTA ATACCCGATG ATGCCTACGG GCCAAAGAGG GGGACCTTCG GGCCTCTCGC
181 GTCAGGATAT GCCTAGGTGG GATTAGCTAG TTGGTGAGGT AATGGCTCAC CAAGGCGACG
241 ATCCCTAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC CACACTGGAA CTGAGACACG GTCCAGACTC
301 CTACGGGAGG CAGCAGTGGG GAATATTGCA CAATGGGCGC AAGCCTGATG CAGCCATGCC
361 GCGTGTATGA AGAAGGCCCT CGGGTTGTA AGTACTTTCA GTCGTGAGGA AGGTGGTGT
421 GTTAATAGCA GCATCATTG ACGTTAGCGA CAGAAGAAGC ACCGGCTAAC TCCGTGCCAA
481 GCAGCCGCGG TAATACGGAG GGTGCGAGCG TTAATCGGAA TACTGGGCG TAAAGCGCAT
541 GCAGGTGGTG GATTAAGTCA GATGTGAAAG CCCGGGGCTC AACCTCGGAA CCGCATTTGA
601 AACTGGTTCA CTAGAGTACT GTAGAGGGGG GTAGAATTTC AGGTGTAGCG GTGAAATGCG
661 TAGAGATCTG AAGGAATACC GGTGGCGAAG GCGGCCCTT GGACAGATAC TGACACTCAG
721 ATGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC CGTAAACGAT
781 GTCTACTTGG AGGTGTGGC CTTGAGCCGT GGCTTTCGGA GCTAACGCGT TAAGTAGACC
841 GCCTGGGGAG TACGGTCGCA AGATTA AAAAC TCAATGAAT TGACGGGGGC CCGCACAAAGC
901 GGTGAGCAT GTGTTTAAAT TCGATGCAAC GCGAAGAACC TTACTACTC TTGACATCCA
961 GAGAAGCCAG CGGAGACGCA GGTGTGCCTT CGGGAGCTCT GAGACAGGTG CTGCATGGCT
1021 GTCGTCAGCT CGTGTGTGTA AATGTTGGGT TAAGTCCCGC AACGAGCGCA ACCCTTATCC
1081 TTGTTTGCCA GCGAGTCATG TCGGGA ACTC CAGGGAGACT GCCGGTGATA AACCGGAGGA
1141 AGGTGGGGAC GACGTCAAGT CATCATGGCC CTTACGAGTA GGGCTACACA CGTGCTACAA
1201 TGCGCATAAC AGAGGGCAGC AAGCTAGCGA TAGTGAGCGA ATCCAAAAA GTGCGTCGTA
1261 GTCGGGATTG GAGTCTGCAA CTCGACTCCA TGAAGTCCGA ATCGTAGTA ATCGTAGATC
1321 AGAATGCTAC GGTGAATACG TTCCCGGGCC TTGTACACAC CGCCCGTCAC ACCATGGGAG
1381 TGGGTGCAA AAGAAGTGGG TAGTTTAAAC TTTCGGGGAG GACGCGCATG TGTTAGGC

```

图 2 M3 菌株的 16S rDNA 序列 (GeneBank 查询号码 AY035897)

Fig. 2 The sequence of 16S rDNA of strain M3 (GeneBank accession number :AY035897)

将 M3 菌株的 16S rDNA 序列在国际互连网上进行同源性检索,结果发现,在最相近的 100 个序列中,前 55 个均为弧菌属细菌, M3 与它们的同源性为 94% ~ 98%。其余的为发光杆菌属 (Photobacterium) 细菌和未鉴定的细菌,仅占 11%。从 100 个序列中选取 30 个菌株的 16S rDNA 序列进行系统学分析,结果如图 3 所示。M3 与鳗弧菌 (Vang2130, Vang12964T, Vang43313), 病海鱼弧菌 (Vord33509, Vord33509T) 聚成一支,与它们的遗传距离依次为 0.004, 0.011, 0.024, 0.012, 0.008, 相似性依次为 99.6%, 99.0%, 97.7%, 98.7% 和 99.2%。从图 3 还可看到, M3 与鳗弧菌 (NCMB2130) 聚为一群,二者相似性最高。而霍乱弧菌 (Chol14731, Chol14033) 与发光杆菌聚成另一分支, M3 与它们的遗传距离为 0.061 ~ 0.066, 相似性为 93.9% ~ 95.6%, 由此可看到菌株 M3 与鳗弧菌的亲缘关系最

近,而与霍乱弧菌的亲缘关系较远。

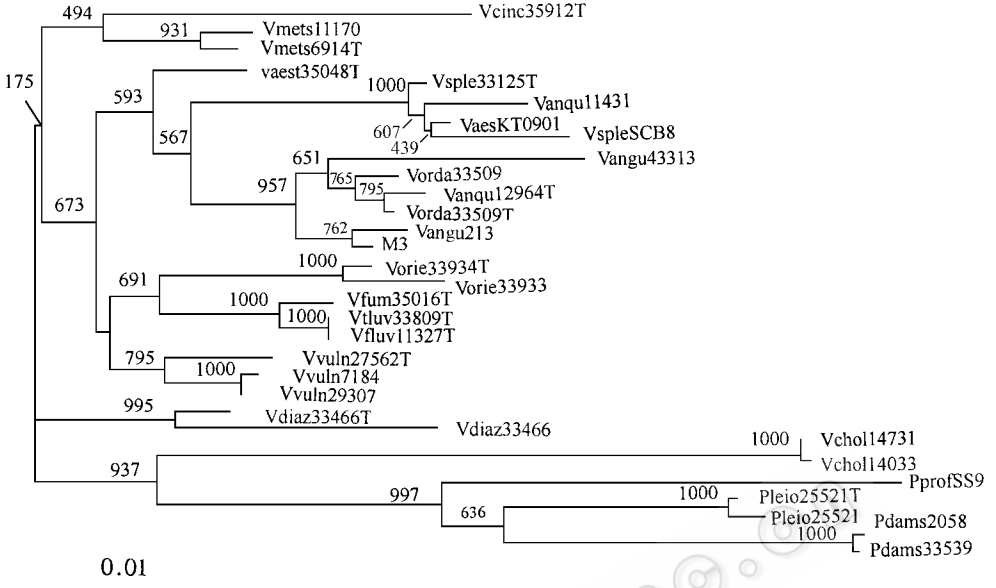


图 3 16S rDNA 序列分析聚类结果

Fig.3 Dendrogram of 16S rDNA sequence analysis

### 3 讨论

普通细菌学方法证明 M3 菌株为革兰氏阴性杆菌,氧化酶反应阳性,对弧菌抑制剂 O/129 敏感等,葡萄糖反应不产酸,不产色素等,具有弧菌科弧菌属的典型特征。使用能分析 95 种生化反应的美国 BIOLOG 公司的革兰氏阴性细菌鉴定系统 GN Microplate 进行研究,发现 M3 菌株可利用其中的 29 种唯一碳源,但对其中的 12 种唯一碳源的生化反应较差。在实验中发现,菌株 M3 在 2216E 海水培养基的生长较在胰大豆蛋白胨(含 2% NaCl 和 0.001% FePO<sub>4</sub>)的要好。一般地,海水细菌的生长需要多种离子,因此需要在基础培养基中添加一些电解质<sup>[7]</sup>,这可能是菌株 M3 在 BIOLOG 系统生化反应较差的原因。虽然 M3 与霍乱弧菌具有最大相似性,但相似率仅为 59.3%,因此不能作出结果判定。表 2 列出了菌株 M3 与弧菌属一些成员的形态及生理生化特征的比较,其与鳗弧菌在吡啶、柠檬酸盐、水解酪素、生长需要 NaCl 以及在 5℃ 生长方面有所不同,而与霍乱弧菌在吡啶、水解酪素、生长需要 NaCl、37℃ 生长、精氨酸双水解、赖氨酸脱羧、鸟氨酸脱羧方面有所不同,与肋生弧菌和费氏弧菌的反应特征差别较大。因此,从生理生化特征来看,M3 与鳗弧菌较接近。

从系统发育树上看,菌株 M3 与鳗弧菌 Vangu2130 聚为一群,具有最高的相似性为 99.6%,而与霍乱弧菌的遗传距离较远,相似性较低,为 94.1%。从系统发育树和 16S rDNA 序列相似性角度分析,菌株 M3 与鳗弧菌非常接近。

综上所述,从形态、生理生化、系统发育学、16S rDNA 序列同源性等方面分析,菌株 M3 可鉴定为鳗弧菌。鳗弧菌是海水鱼的重要病原菌之一,常引起鱼类的败血症,可从病

鱼、正常鱼和水环境中分离到<sup>[8]</sup>, 目前国内还没有从养殖牙鲆分离的报道。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] 曲凌云, 孙修勤, 张进兴. 青岛海洋大学学报, 2000, 30( 2 ) : 105 ~ 110.
- [ 2 ] 莫照兰, 陈师勇, 谭训刚, 等. 海洋科学集刊, 2002, 44 : 161 ~ 165.
- [ 3 ] 周丽, 宫庆礼, 等. 青岛海洋大学学报, 1997, 27( 2 ) : 173 ~ 180.
- [ 4 ] Mo Zhaolan, Tan Xungang, Chen shiyong, et al. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2001, 19( 4 ) : 319 ~ 326.
- [ 5 ] Oliver J D. Deep Sea Res, 1982, 29 : 795 ~ 798.
- [ 6 ] Polz M F, Cavanaugh C M. Appl Environ Microbiol, 1998, 64( 10 ) : 3724 ~ 3730.
- [ 7 ] Macleod R A. Bacteriological Reviews, 1965, 29 : 9.
- [ 8 ] Austin B, Austin D A. Vibrionaceae representatives. In Laird L M. ed. Bacterial Fish Pathogens : Disease in Farmed and Wild Fish. England : Ellis Horwood Limited, 1993. 265 ~ 294.

## Classification for One Pathogenic *Vibrio anguillarum* Strain Isolated From Skin-ulcer Flounder\*

Mo Zhaolan<sup>1</sup> Mao Yunxiang<sup>2</sup> Chen Shiyong<sup>1</sup> Zhang Peijun<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

(<sup>2</sup> Marine Life of Sciences, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China)

**Abstract :** A pathogenic bacterial strain M3 revealed gram negative rod shape, motile and translucent clone was studied. This bacterium was isolated from the skin-ulcer flounder in the fish farm of RongCheng City, Shandong Province, and could not be identified by BIOLOG ID SYSTEM. Comparative 16S rDNA sequence analyses revealed that strain M3 was most related to the genus of *Vibrio*. The overall similarity value between strain M3 and *Vibrio* species were 94% to 98%. Phylogenetic analysis showed that M3 strain exhibited the highest level of similarity to *Vibrio anguillarum*, and the biological features of strain M3 were very similar to that of *Vibrio anguillarum*. Based on the results obtained, strain M3 was identified as *Vibrio anguillarum*.

**Key words :** Flounder, *Vibrio anguillarum*, 16S rDNA, Phylogenetic analysis

\* Subsidized with the Special Funds for the Major State Basic Research Project( G1999012003 )