

养殖牡蛎体内检出坎氏弧菌的鉴定

沈晓盛 蔡友琼* 房文红 顾润润 高丹枫

(中国水产科学研究院东海水产研究所 上海 200090)

摘 要 2003 年 9 月从福建近海养殖太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)体内分离出 4 株细菌,对它们形态、生理生化特征、盐度、温度和 pH 生长条件以及 16S rRNA 基因序列进行了研究。结果表明 4 株细菌均为革兰氏阴性杆菌,具极生单鞭毛,发酵葡萄糖产酸不产气,氧化酶阳性,生长需 NaCl,无色,不发光,在 TCBS 平板上形成中等大小圆形绿色菌落,对弧菌抑制剂 O/129 敏感,具有弧菌属的典型特征。结合 16S rRNA 基因序列分析结果,该菌(编号 SXS1)与坎氏弧菌的亲缘关系最为接近,其同源性达 99.0%,因此将该菌鉴定为坎氏弧菌。对该菌在环境中的分布与水产养殖动物疾病的关系进行了讨论。

关键词 坎氏弧菌 牡蛎 16S rRNA 基因 系统发育树

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)02-0177-04

坎氏弧菌(*Vibrio campbellii*)是海洋环境及水产品中常见菌^[1~4],该菌虽然不是人源的致病性弧菌,但在腹泻病人粪便中有检出^[5]。坎氏弧菌也是水产养殖动物的致病菌之一^[6~8],可引起鱼、虾和贝的大量死亡,对水产养殖业造成一定的经济损失,因而日益引起人们的关注。

近年来,该菌在鱼虾病害中常分离到,在法国沿岸岛屿大量死亡中的螺类和新西兰岛屿大量病害的目鱼苗体内均分离得到该菌^[9~10],进一步证实了该菌在水产动物中的致病性。作者于 2003 年 9 月从

福建近海养殖太平洋牡蛎体内检出四株细菌,经形态、生理生化、生长条件及 16S rRNA 基因序列的测定及系统发育树分析,鉴定为坎氏弧菌。目前在养殖牡蛎体内分离到该菌在国内外尚属首次。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源和分离方法 试验菌株于 2003 年 9 月从福建近海养殖太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)体内分离到,试验菌株的来源见表 1。

表 1 分离菌株的来源

Table 1 Source of isolated strains

Number of strains	Number of sample	Name of sample	Weight of sample/g	Sample date	Sample position	Sample stations
SXS1	443	<i>Crassostrea gigas</i>	20 ± 5	2003.9.5	Luoyuan town of Fujian province	D ₃ (N 26°22'447" E 119°44'507")
SXS2	445	<i>Crassostrea gigas</i>	20 ± 5	2003.9.5	Luoyuan town of Fujian province	D ₃ (N 26°22'447" E 119°44'507")
SXS3	446	<i>Crassostrea gigas</i>	20 ± 5	2003.9.5	Luoyuan town of Fujian province	D ₃ (N 26°22'447" E 119°44'507")
SXS4	447	<i>Crassostrea gigas</i>	20 ± 5	2003.9.5	Luoyuan town of Fujian province	D ₃ (N 26°22'447" E 119°44'507")

将鲜活牡蛎用自来水冲洗干净,再用 70% 的酒精棉球对牡蛎体表反复擦拭消毒,无菌刀开启,取出牡蛎肉于无菌匀浆罐中匀浆,取 25g 样品于 225mL 3% 的无菌盐水中稀释,再用接种环于 TCBS 平板划线接种,30℃ 培养 24h 后,选取可疑菌落进行重复划

线分纯,纯培养物于 4℃ 冰箱中保存备用。

1.1.2 主要试剂和仪器 溶解血性弧菌增菌液、氯化钠蔗糖琼脂、3.5% 氯化钠三糖铁琼脂、选择性琼脂平板、TCBS 琼脂平板以及其它所有生化试剂均购于上海市疾病预防控制中心,纯度均为分析纯。

基金项目:农业部项目资助(070106)

* 通信作者。Tel/Fax 86-21-65680121 E-mail caiyuqiong@163.com

作者简介:沈晓盛(1977-),男,重庆人,实习研究员,学士,主要从事微生物方面研究。E-mail foodsmc98@tom.com

其他作者:郑国兴

收稿日期:2004-07-01,修回日期:2004-11-22

PCR 扩增试剂盒购于上海生工生物工程技术服务有限公司。电子天平(JA12002 上海精密天平),手提式压力蒸汽灭菌器(YXQ. SG41.280 上海华线医用核子仪器有限公司),隔水式电热恒温培养箱(PYX-DHS 上海跃进医疗器械厂),PCR 扩增仪(GENE CYCLER™ BIO-RAD)。

1.2 细菌形态观察和生理生化测定

细菌形态,生理生化测定按文献[11,12]进行,采用微量发酵管。

1.3 细菌生长条件的测定

细菌生长与 NaCl 含量关系的测定采用 1% 的蛋白胨水(pH7.2)配制成不同 NaCl 含量,细菌生长与 pH 关系的测定采用 1% 蛋白胨水(含 3% NaCl),配制成不同的 pH 值,接种后均于 30℃ 静止培养 48h,用 721 分光光度计(波长 460nm)测定细菌生长的混浊度。细菌生长与温度关系的测定采用 1% 蛋白胨水(含 3% NaCl pH7.2),接种后,分别放在不同温度下静置培养 48h,用 721 分光光度计(波长 460nm)测定细菌生长的混浊度。

1.4 16S rRNA 基因序列分析

1.4.1 PCR 模板 DNA 的制备:将细菌接种在 TCBS 平板上,30℃ 培养过夜。用接种环从一单菌落挑取少许菌苔于 100 μ L 无菌生理盐水中,水浴煮沸 10min,冷却离心(7000g)10min,取上清作为模板。

1.4.2 16S rRNA 扩增与测序:扩增 16S rRNA 基因所用引物(采用弧菌通用引物)由上海生工生物工程技术服务公司合成,正向引物为 5'-AGAGTTTGATC(C/A)TACCTTGTTACGACTT-3',反向引物 5'-TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 反应体系(50 μ L):1 \times PCR 缓冲液 5 μ L,25mmol/L MgCl₂ 4 μ L,2mmol/L dNTPs 4 μ L,5U/ μ L 的 *Taq* DNA 聚合酶 1 μ L,0.6mmol/L 的引物各 1 μ L,模板 DNA 2 μ L,ddH₂O 32 μ L。PCR 反应条件:94℃ 5min;94℃ 1min,52℃ 1.5min,72℃ 1.5min 33 个循环,72℃ 10min。取 8 μ L 反应液在含 0.5 μ g/L EB 的 1% 琼脂糖凝胶上电泳,紫外灯下观察结果。PCR 扩增产物交由上海生工生物工程技术服务公司进行序列测定。

1.5 序列分析及系统发育树的构建

将菌株 SXS1 的 16S rRNA 基因序列与从 GenBank 数据库中获得的弧菌属细菌的 16S rRNA 基因序列,采用 Clustalx1.8 软件进行多序列匹配排列(Multiple alignments),并经人工仔细核查。采用 paup 4.0b10(Swofford, 1998) N6 软件包构建系统发育树。

2 结果

2.1 形态特征

从牡蛎体内分离到的 4 株菌均为革兰氏阴性杆菌,大小为 0.25 μ m ~ 0.5 μ m \times 1.0 μ m ~ 3.5 μ m,具极生单鞭毛(图 1)在 TCBS 平板上于 30℃ 下培养 24h,菌落呈圆形绿色,直径 0.5mm ~ 2.0mm。



图 1 菌株 SXS1 的电镜照片(7200 \times)

Fig.1 Electron micrograph of strain SXS1(7200 \times)

2.2 生理生化特征

4 菌株均能发酵葡萄糖产酸不产气,氧化酶和过氧化氢酶阳性,无色素,不发光。V-P 反应阴性,MR 反应阳性,生长需 NaCl,精氨酸和鸟氨酸脱羧酶阴性,赖氨酸脱羧酶阳性,对弧菌抑制剂 O/129 敏感,可溶血,能利用柠檬酸盐和还原硝酸盐,不能产生 H₂S,产生吲哚;精氨酸双水解酶阴性;苯丙氨酸脱羧酶阳性;ONPG 阴性;不发酵阿拉伯糖、肌醇、蔗糖、甘露醇、绵子糖、鼠李糖,发酵甘露糖。利用纤维二糖、蔗糖、D-葡萄糖酸盐、L-瓜氨酸作为唯一碳源生长,不利用 D-木糖、甘露醇、乙醇、L-亮氨酸。产生脂酶(吐温 80)、淀粉酶、卵磷脂酶,不产生藻胶酶、几丁质酶、酪蛋白酶。

2.3 生长条件

SXS1 菌株在 0.5% ~ 9% NaCl 范围均可生长,最适生长浓度为 1.0% ~ 6.0%,pH 生长范围为 5 ~ 10,最适生长 pH 范围为 6 ~ 9;在 5℃ 和 40℃ 中不长,最适生长温度范围为 15 ~ 35℃。

2.4 16S rRNA 基因序列和系统发育学分析

4 菌株形态特征及生理生化测定完全一致,因此只取 SXS1 菌株作 16S rRNA 基因序列的测定,基因序列长度为 1447bp,在 GenBank 库中的登录注册号为 AY544985,用 Blast 软件对测序结果进行同源性分析,发现与坎氏弧菌最为接近,其同源值达 99.0%,与其它弧菌的同源关系见系统发育树(图 2)。

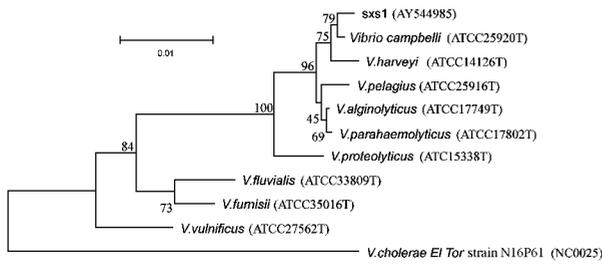


图2 根据 16Sr RNA 序列同源性构建的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequence of homology. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 1% sequence divergence.

3 讨论

从养殖太平洋牡蛎体内检出的 4 株细菌均为革兰氏阴性杆菌,具极生单鞭毛,发酵葡萄糖产酸不产气,氧化酶阳性,生长需 NaCl,无色素,不发光,在 TCBS 平板上形成中等大小圆形绿色菌落,对弧菌抑制剂 O/129 敏感,具有弧菌属的典型特征。根据测定的主要生理生化特性,与《伯杰氏细菌鉴定手册》(第九版)^[13]以及 Colwell 有关环境中弧菌资料的比较^[11]结合该菌 16S rRNA 基因序列在系统发育树中的位置并与 GenBank 中坎氏弧菌的 16S rRNA 基因序列比较,两者具有很高的同源性(99.0%),因此将其鉴定为坎氏弧菌。

坎氏弧菌是海洋环境中的常见菌,广泛分布于沿海水域、河口及水产品中。在人源致病性弧菌的诊断中也常检测到,如周明岛等^[5]在调查海口市致病性弧菌分布时,从腹泻病人粪便中检出弧菌 221 株,其中有 25 株为坎氏弧菌,占 11.3%,仅次于副溶血性弧菌。陈梅等^[3]对山东近海主要养殖动物弧菌种类与分布的调查中,在鲈鱼和黑鲷体内检出多株坎氏弧菌。王祥红等^[4]在研究中国对虾肠道微生物区系时发现中国对虾肠道弧菌属中坎氏弧菌占 20%。作者从福建沿岸养殖太平洋牡蛎体内分离到 4 株坎氏弧菌,进一步说明坎氏弧菌在海洋水域及海水养殖动物中分布是广泛的。

坎氏弧菌是水产养殖动物的条件致病弧菌之一,许兵等^[8]报道了坎氏弧菌可引起养殖中国对虾(*Penaens chinensis*)红腿病,病菌可侵入循环系统导致败血症,是养殖对虾的一种常见病,危害较为严重。马键民等^[6]报道坎氏弧菌是皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)脓毒败血症病原菌,病鲍腹足肌肉上可见大小不等的脓疮,血淋巴液和脓汁中充满大量

杆菌,死亡率极高,是北方沿海养鲍业最主要的流行病。作者从福建沿海养殖太平洋牡蛎体内检出 4 株坎氏弧菌,但未发现养殖牡蛎患病,国内也未见坎氏弧菌引起牡蛎患病的报导。一般认为,弧菌是一种条件致病菌,是水产养殖动物体内外和养殖环境中的正常菌群,当环境条件异常,导致弧菌大量繁殖时或养殖动物因种种原因,体质下降时,往往会引起弧菌病的暴发流行。作者分离到的 4 株坎氏弧菌均有溶血现象,说明它们能产生某种细胞外毒素,具有一定的毒性,坎氏弧菌可感染皱纹盘鲍患病,感染同属贝类的牡蛎患病的可能性很大,对牡蛎养殖业具有潜在的危险,应引起足够重视。

致谢 本文承蒙中国水产科学研究院东海水产研究所马凌波博士以及上海水产大学刘承初博士和张庆华老师的指点,在此一并表示谢忱!

参 考 文 献

- [1] Colwell R R. *Vibriosis in the environment*. ed. New York: John Wiley & Sons, 1984.
- [2] Alsina M, Blanch A R. A set of keys for biochemical identification of environmental vibrio species. *Journal of Applied Bacteriology*, 1994, **76**: 79-85.
- [3] 陈梅,王奎旗,徐怀恕.山东近海主要养殖动物的弧菌检测与病害防治的研究. *齐鲁渔业*, 2000, **17**(6): 6-8.
- [4] 王祥红,李军,祁白忠,等.中国对虾肠道微生物区系的研究,对虾苗期细菌病害的诊断与控制.北京:海洋出版社, 1999: 84-87.
- [5] 周明岛,徐海英,傅海玲,等.海口市致病性弧菌分布的调查. *中华流行病学杂志*, 1991, **12**(特3): 13-16.
- [6] 马键民,王琦,马福恒,等.皱纹盘鲍脓毒败血症病原菌的发现及初步研究. *水产学报*, 1996, **20**(4): 332-336.
- [7] Sahul Hameed A S, Rao P V, Fanmer J J, et al. Characteristics and pathogenicity of a *Vibrio campbellii* like bacterium affecting hatchery reared *Penaeus indicus* larvae. *Aquaculture Research*, 1996, **27**: 853-863.
- [8] 许兵,纪伟尚,徐怀恕.中国对虾病原菌及致病机理的研究. *海洋学报*, 1993, **15**(1): 98-106.
- [9] Martin Y, Bonnefont J L, Chancerelle L. Gorgonians mass mortality during the 1999 late summer in French Mediterranean coastal waters: the bacterial hypothesis. *Water Research*, 2002, **36**: 779-782.
- [10] Diggles B K, Carson J, Hine P M, et al. *Vibrio* species associated with mortalities in hatchery-reared turbo(*Colistium nudipinnis*) and brili(*C. guntheri*) in New Zealand. *Aquaculture*, 2001, **183**: 1-12.
- [11] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册.北京:科学出版社, 2001.
- [12] 徐怀恕.水产养殖动物弧菌病害研究方法,对虾苗期细菌病害的诊断与控制.北京:海洋出版社, 1999: 166-190.
- [13] John G H, Noel R K, Peter H A S, et al. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins Press, 1994, 190-194, 259-274.

Identification of *Vibrio campbellii* isolated from cultured pacific oyster

SHEN Xiao-sheng CAI You-qiong* FANG Wen-hong GU Run-run GAO Dan-feng
(East China Sea Fisheries Research Institute , Chinese Fisheries Academy of Fishery Science , Shanghai 200090 , China)

Abstract : Four bacterial strains were isolated from cultured pacific oyster (*Grassostrea gigia*) in September 2003 at coast of Fujian province. Their morphological , physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA sequence were analyzed. And the relationship between reproduction of the bacterium and NaCl concentrations , pH and temperature were also determined. The results showed that four strains were gram-negative rods with a single polar flagellum , glucose fermented without gas production , oxidase positive , required sodium ions for growth , no pigment , non-luminescence ; They grew well on TCBS-plate as green colonies and were sensitive to the vibriostatic agent O/129. Therefore , it was confirmed that the strains belonged to the genus of *Vibrio* . The sequence analysis of 16S rRNA gene of SXS1 isolation and comparison with that of other related vibrios- showed that SXS1 was very close to *Vibrio campbellii* . The similarities was 99% . The distribution of *V. campbellii* in environment and its relationship to the diseases of aquaculture animals were discussed.

Key words : *Vibrio campbellii* , Oyster , 16S rRNA gene , Phylogenetic tree

Foundation item :Ministry of Agriculture Foundation (070106)

* Corresponding author. Tel/ Fax 86-21-65680121 ;E-mail :caiyuqiong@163.com

Other author ZHENG Guo-xing

Received date 07-01-2004

李季伦院士八十寿辰庆典在北京中国农业大学举行

3月12日中午,中国科学院院士李季伦先生八十寿辰庆祝会在中国农业大学西区学苑餐厅三层隆重举行。庆祝会由中国农大生物学院微生物系主办,中国科学院院长路甬祥发来了贺辞。农大的校领导、生物学院的领导、李先生的亲朋好友、学长、同事以及专程从外地赶来的学生弟子和历届来宾共200余人出席了庆祝会。

李季伦先生1925年出生于河北省乐亭县,1948年毕业于南京中央大学生物系。大学毕业后,一直从事教学科研工作,培养了大量专业人才,不仅在基础科学研究有重大建树,在应用研究领域也取得了重大突破。研究工作涉及生物固氮、真菌毒素以及与农业生产有关的微生物发酵产品的研制。在固氮酶催化机制研究方面,李先生首次提出双位点放 H_2 途径模式;在研究固氮螺菌固氮基因表达调控的基础上,构建了抗铵固氮的基因工程菌;在真菌毒素研究方面,他发现了串珠镰刀菌素是克山病的主要致病因子;在微生物发酵产品方面,他先后研制开发了玉米赤霉醇、莫能菌素、马杜霉素等。研制和开发的农牧用微生物制剂在农业生产中取得了巨大的经济效益和社会效益。1985年李先生担任《微生物学报》第四届编委会副主编,1988年至今任主编,20多年来为了学报的发展,李先生认真负责地为学报做了许许多多的事情。

李季伦院士是我国著名的农业微生物专家,他学风严谨、为人正直、平易近人,深受众人的爱戴和敬重。“莫道桑榆晚,为霞尚满天”。衷心祝愿李季伦先生健康长寿。

《微生物学报》编辑部