

斑点叉尾鮰一株致病菌的分离鉴定及系统发育分析

耿毅,汪开毓*,陈德芳,黄小丽

(四川农业大学动物科技学院 雅安 625014)

摘要:从发生急性流行性传染病的斑点叉尾鮰肝、肾分离到一高致病性的菌株(CCF00024),经人工感染实验证实其为该病的病原菌。对该菌的形态、生理生化及 16S rDNA 序列分析结果表明,其为非发酵型,严格需氧,革兰氏阴性杆菌,极生多鞭毛,对除麦芽糖和甘露糖以外的多种糖类不能利用产酸,氧化酶阴性,DNA 酶、蛋白酶、脲酶、赖氨酸脱羧酶阳性,MR 阴性。在以该菌 16S rDNA 序列(GenBank 登录号 AY970826)和 GenBank 及 RDP 数据库内同源性较高的细菌 16S rDNA 序列构建的系统发育树中,分离菌 CCF00024 与嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)聚在一簇,特别是与 *S. maltophilia* M5-1 的同源性最高,其序列相似性达 99.6%,结合形态和生理生化特点将其鉴定为嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)。

关键词:斑点叉尾鮰;急性流行性传染病;嗜麦芽寡养单胞菌;系统发育

中图分类号:S941.429 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-6209(2006)04-0649-04

斑点叉尾鮰(*Ictalurus punctatus*)亦称沟鲶,是世界公认的最适宜深加工的优质淡水鱼类,我国于 1984 年引进该品种,并于 1987 年人工繁殖成功^[1]。目前,已推广到 30 多个省市进行养殖,特别是在广东、湖南、湖北、江苏、四川、重庆和云南等省市形成了较大的养殖规模。但近几年来在四川、重庆等地发生了一种斑点叉尾鮰急性流行性传染病^[2],以病鱼体表现圆形或椭圆形的褪色斑,腹水、肠炎和后肠的肠套叠为病变特征。该病具有发病突然,死亡率高,传染快等特点,已给当地的斑点叉尾鮰养殖带来严重的经济损失。本研究从发病鱼体内分离到一株高致病性的病原菌,并采用的细菌表型特征以及 16S rDNA 序列分析构建系统发育树等方法,对该菌进行了分类鉴定。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品:病鱼采自四川成都龙泉湖斑点叉尾鮰养殖场;健康斑点叉尾鮰来自四川省斑点叉尾鮰繁育基地,体重 140 ± 10.7g。

1.1.2 主要试剂:普通营养琼脂、TSA、TSB 和兔血营养琼脂按常规方法自制,细菌生化微量鉴定管购自杭州天和生物试剂有限公司,批号:20040719;Taq DNA 聚合酶购自大连 TaKaRa 公司。

1.2 病原菌分离

从病鱼肝、肾取样划线接种于普通营养琼脂平板和兔血营养琼脂平板置于 28℃ 培养 24h,挑取单个优势菌落在 TSA 平板上再次划线,获得纯培养的 CCF00024 菌株,转接到 TSA 斜面培养基于 4℃ 保存备用。

1.3 人工感染实验

将分离菌株 CCF00024 接种 TSA,28℃ 培养 18h 后,用无菌生理盐水洗下,参照麦氏比浊管调整细菌浓度为 1.5 × 10⁸ CFU/mL。健康斑点叉尾鮰 60 尾平均分成 3 组,其中 2 组作为实验组,每尾鱼腹腔接种 0.5mL 菌液;另外 1 组作为对照组每尾鱼注射 0.5mL 无菌生理盐水。接种后观察鱼的发病死亡情况,并对死亡鱼及时剖检和致病菌的再次分离。

1.4 病原菌形态与理化特性检测

将菌株 CCF00024 接种 TAB 和兔血平板,28℃ 培养 24h 后观察菌落的大小、形态,同时革兰氏染色光学显微镜和磷钨酸染色电子显微镜观察细菌形态特征,各项生理生化指标的测定参照有关文献进行^[3]。

1.5 16S rDNA 基因序列测定与系统发育分析

1.5.1 PCR 模板 DNA 的制备:将细菌接种在 TSB 中,28℃ 震荡培养 18h,取菌液 1mL 4000r/min 离心 5min,去上清,加入双蒸水 100μL,于 100℃ 水浴中煮沸 8min,12000r/min 离心 5min,取上清作为 PCR 模板 DNA。

1.5.2 16S rDNA 序列扩增与测序:采用 1 对扩增细菌 16S rDNA 的通用引物^[4,5],其上、下游引物的序列分别为:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 5'-TACGGCTACCTGTAGGAC-3'。PCR 反应条件为:94℃ 5min;94℃ 1min,54℃ 1min,72℃ 2min,30 个循环;72℃ 10min。PCR 产物经 DNA 纯化系统纯化后,上海博亚生物有限公司进行序列测定。

1.5.3 系统发育树的构建:将菌株 CCF00024 的 16S rDNA 序列与 GenBank 中已知核酸序列进行 Blast 分析,调出与该序列相关性较高的核酸序列,参照远方等^[6]的方法,采用 DNASTAR 软件的 Multiple Sequence Alignment 程序选用 Clustal W 法进行

基金项目:四川省科技攻关项目(03JY029-040-2)

* 通讯作者。Tel:86-0835-2885910;Fax:86-0835-2886080;E-mail:kywang@sicau.edu.cn

作者简介:耿毅(1974-),男,四川安岳人,讲师,博士研究生,主要从事水产动物病害学研究。E-mail:gengyisicau@eyou.com

收稿日期:2005-08-25;接受日期:2005-09-29;修回日期:2005-11-03

多序列比对, 然后采用近邻法构建系统发育树。

2 结果

2.1 人工感染试验

试验组斑点叉尾鲴在接种感染后 8h, 斑点叉尾鲴表现为游动无力, 呼吸缓慢, 并逐步出现头向上, 尾向下悬垂于水体中的特殊姿势, 12h 后开始发生死亡, 在接种后 36h 内死亡率达 100%, 而对照组未见任何异常。死亡的斑点叉尾鲴表现为口腔周围、下颌、腹部等充血、出血, 腹部膨大, 肛门红肿, 剖解可见腹腔内有淡黄色或带血的腹水, 胃内充满大量浓稠的粘液, 胃粘膜充血, 出血, 肠壁变薄, 肠腔内充有大量淡黄色或含血的液体, 肠粘膜充血、出血, 并于中后肠出现 1~2 个肠套叠, 与自然发病斑点叉尾鲴症状和病变相似^[2]。并从感染死亡鱼肝、肾分离到与 CCF00024 形态与生理生化一致的细菌, 表明 CCF00024 是斑点叉尾鲴急性流行性传染病的病原菌。

2.2 形态特征

CCF00024 为 G-杆菌, 无荚膜, 无芽孢, 极生端鞭毛, 鞭毛

数 ≥ 2 (图 1)。菌株 CCF00024 在普通营养琼脂菌落呈灰白色, 圆形, 表面光滑, 边沿整齐的半透明菌落; 在 TSA 平板上形成圆形, 表面光滑, 边缘整齐, 直径 0.8mm ~ 1.2mm 的透明的无色菌落; 在兔血平板上出现明显的 β 溶血环, 且溶血环呈草绿色。

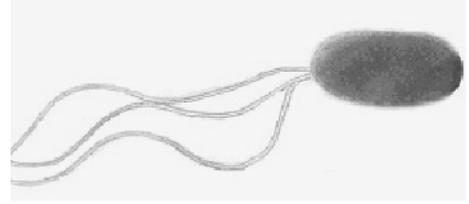


图 1 菌株 CCF00024 的电镜照片 (17000 ×)

Fig. 1 The electron micrograph of strain CCF00024 (17000 ×).

2.3 生理生化特征

CCF00024 为非发酵型严格的需氧, 具有运动能力的 G-杆菌, 生长温度范围为 15~41℃, 最适生长温度为 25~30℃, 在含盐量 5% 以下的培养基上能生长, 生长的 pH 范围为 5.0~9.0, 最适 pH 为 6.0~7.0, 其他的生理生化特征见表 1。

表 1 CCF00024 菌株的生理生化特征

Table 1 Biochemical and physiological characteristics of CCF00024

Test items	CCF00024	<i>S. maltophilia</i> **	Test items	CCF00024	<i>S. maltophilia</i> **
Oxidation/Fermentative	+/-	+/-	D-gulucose produce gas	-	-
Oxidase	-	-	Acid production		
Catalase	+	+	D-gulucose	w	+
DNAase	+	+	Lactose	-	+
Lipase Tween 80	+	+	Maltose	+	+
Protease	+	+	Mannose	+	+
Urease	+	-	Sucrose	-	+
Phe deaminase	-	-	Rhamnose	-	-
Lys decarboxylase	+	+	Arabitol	-	-
Arg dihydrolase	-	-	Raffinose	-	-
Om decarboxylase	-	-	Cellobiose	-	+
Nitrate reduction	+	+	Xylose	-	+
Citrate	+	-	Fructose	w	+
Malonate	+	-	Trehalose	-	-
Methyl red	-	-	Mannitol	-	-
Indol	-	-	Salicin	-	-
H ₂ S Hydrogen sulfide	-	-	Inositol	-	-
Gelatine hydrolysis	+	+	Sorbitol	-	-
Milk catabolize	+	+	Esculin	+	+

+ . Positive ; - . Negative ; W. Weak reaction. **Data from references 7 and 8.

2.4 16S rDNA 的 PCR 扩增结果与系统发育分析

PCR 扩增出 CCF00024 菌株的 16S rDNA 片段约 1500bp, 测序结果表明该片段有 1427bp, 在 GenBank 中的登陆序号为 AY970826。将获得的序列在 RDP 数据库进行在线 Classifier, 结果表明该菌属于嗜麦芽寡养单胞菌属的细菌, 再将获得的序列与 RDP 和 GenBank 数据中已报道的 16S rDNA 序列进行 Blast 分析, 调出相关性最高的序列和嗜麦芽寡养单胞菌属

内相关菌株的 16S rDNA 序列用 DNASTAR 软件进行多序列比对分析和构建系统发育树 (图 2) 结果表明 CCF00024 菌在系统发育数上与 *S. maltophilia* 聚为一簇, 其同源性在 99.4~99.6% 之间, 其中 CCF00024 菌与 *S. maltophilia* M5-1 的同源性最高, 达 99.6%, 两者在系统发育树上聚为一支, 结合形态学和理化特征鉴定其为嗜麦芽寡养单胞菌 (*S. maltophilia*)。

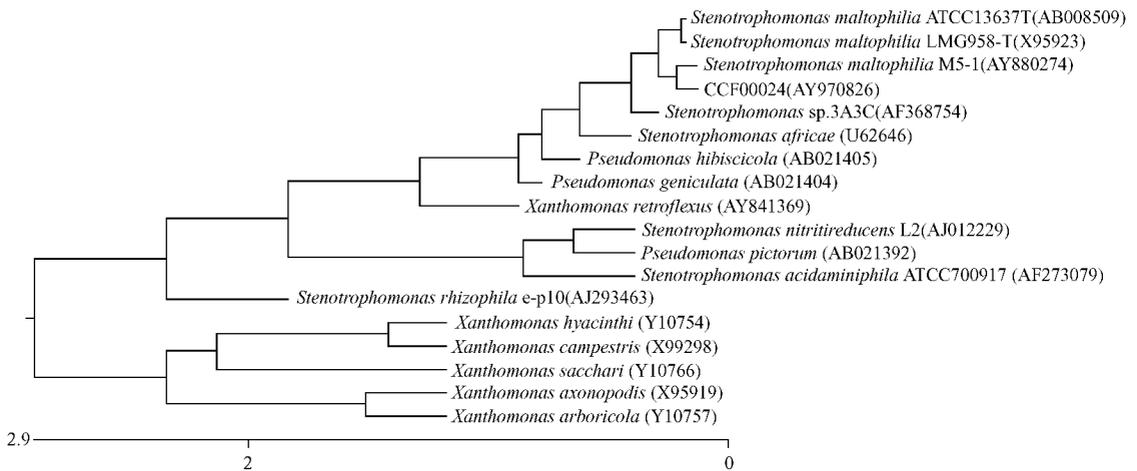


图2 CCF00024 与相关菌株的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of strain CCF00024 and its relatives. The tree was constructed by NDAstar based on 16S rDNA sequence of strain CCF00024 and its relatives in *Stenotrophomonas* genus and *Xanthomonas* genus. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The scale below the tree represent the nucleotide substitutions.

3 讨论

斑点叉尾鮰急性流行性传染病是近年来发生在四川、重庆等地危害很大的一种新型传染病^[2]。该病以体表出现圆形或椭圆形的褪色斑,腹水、肠炎和后肠的肠套叠为病变特征,尤其是后肠的肠套叠的病变在目前所报道的斑点叉尾鮰疾病中是极其罕见的。目前该病在这些区域已造成了严重的经济损失,并有进一步蔓延的趋势。本研究从病鱼的体内分离到一株 G-短杆菌 (CCF00024),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嗜麦芽寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*),但由于其在糖的利用产酸、脲酶、枸橼酸盐和丙二酸盐等利用上与嗜麦芽寡养单胞菌模式株存在一定的差异 (表 1),而不能进行确切的鉴定。16S rRNA 是核糖体 RNA 的一种,具有分子量适中,所含的遗传信息丰富,在结构上分为保守区 (Conserved domain) 和可变区 (Variable domain),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^[9]。目前,16S rRNA 或 16S rDNA 序列分析已广泛用于水产动物病原菌的鉴定^[10-12]。为此我们采用一对通用引物扩增出了该菌的 16S rDNA 片段,并进行了序列分析 (GenBank 登录号 AY970826),将所获得 16S rDNA 序列与 RDP 和 GenBank 数据库中已知的微生物 16S rDNA 序列进行同源性比对和系统发育分析,结果表明该菌的 16S rDNA 序列与嗜麦芽寡养单胞菌 16S rDNA 的同源性最高,且在系统发育树上与其他的嗜麦芽寡养单胞菌菌株聚在一簇,从而在分子生物学水平确切鉴定该菌为嗜麦芽寡养单胞菌。

嗜麦芽寡养单胞菌是由 Hugh 等于 1960 年发现,并命名为嗜麦芽假单胞菌 (*Pseudomonas maltophilia*),1983 年 Swings 等将其归为黄单胞菌属 (*Xanthomonas*),并命名为嗜麦芽黄单胞菌 (*X. maltophilia*),1993 年, Palleroni 等根据该菌的基因及

理化特征有别于其他黄单胞菌而将其从黄单胞菌属划出另建一新属,为寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*)^[7]。嗜麦芽寡养单胞菌属于非发酵型,专性需氧不形成芽孢的革兰氏阴性菌,广泛分布于各种水源、土壤和植物根系等,是人类重要的条件致病菌和院内感染菌,可引起败血症、心内膜炎、肺炎、结膜炎、脑炎、尿道、消化道感染和伤口感染等^[13],目前该菌已引起人类医学的高度重视。嗜麦芽寡养单胞菌除了对人类致病外,也有对山羊^[14]和猪^[15]等陆生动物以及一些水生动物感染而致病的报道, Ben 等 (2002) 报道嗜麦芽寡养单胞菌是欧洲和美国金枪鱼的一种严重的病原菌,可感染致病引起死亡,且该菌可在其产品中较长时间存活,是人类感染该菌的一感染源^[16];同时该菌还可感染鳄鱼^[17]、黄缘闭壳龟^[18]、卵型鲳^[19]和中华绒毛蟹^[20]等水产养殖动物而致病。目前,国内外都还未见该菌感染斑点叉尾鮰致病的报道,而本研究从发生“急性流行性传染病”的斑点叉尾鮰体内分离到了该菌,并通过人工感染试验发现该菌对斑点叉尾鮰具有高度的致病性,可引起 100% 的死亡率,并表现出与自然感染相似的临床症状与病理变化,由此可见该菌是斑点叉尾鮰“急性流行性传染病”的病原菌,且是斑点叉尾鮰的一种新的致病菌,但目前对该病原菌的病原学特性和致病机理等问题都不清楚,为了在养殖生产中更有效地控制该病的发生与流行对这些问题需进一步深入研究,以制定出科学、合理的防治措施。

参 考 文 献

- [1] 郭国民, 陈 慈, 李恒颂等. 我国斑点叉尾鮰养殖的现状和前景展望. 中山大学学报论丛, 1998, 4: 75-79.
- [2] 耿 毅, 汪开毓. 斑点叉尾鮰一种暴发性传染病的初报. 科学养鱼, 2005, 16(3): 51.
- [3] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, 364-398.

- [4] Li R, Debella HJ, Carmichael WW. Isolates identifiable as *Arthrospira maxima* and *Arthrospira fusiformis* appear identical on the basis of a morphological study in culture and 16S rRNA gene sequence. *Phycologia*, 2001 **40**(4):367-371.
- [5] 莫照兰, 茅云翔, 陈师勇, 等. 养殖牙鲆鱼苗腹水症病原的鉴定及系统发育学分析. 海洋与湖沼, 2003 **34**(2):131-141.
- [6] 远方, 屈淑平, 崔崇士, 等. 一株新的胡萝卜软腐欧文氏菌的分离和鉴定. 微生物学报, 2004 **44**(2):136-140.
- [7] Denton M, Kevin GK. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev*, 1998 **11**(1):57-80.
- [8] Krieg NR, Holt JG. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 9th ed. Baltimore: Willia & Wilkins Press, 1994.
- [9] 陈文新. 细菌系统发育. 微生物学报, 1998 **38**(3):240-243.
- [10] Gauger EJ, Gomez CM. 16S ribosomal DNA sequencing confirms the synonymy of *Vibrio harveyi* and *V. carchariae*. *Dis Aquat Organ*, 2002 **52**(1):139-146.
- [11] Yoshiyuki Y, Yoshiko K, Hisatsugu W. Phylogenetic intrarelationships of atypical *Aeromonas salmonicida* isolated in Japan as determined by 16S rRNA sequencing. *Fish Pathology*, 2000 **35**(1):35-40.
- [12] Darwish AM, Ismael AA, Newton JC. Identification of *Flavobacterium columnare* by a species-specific polymerase chain reaction and renaming of ATCC43622 strain to *Flavobacterium johnsoniae*. *Molecular & Cellular Probes*, 2004 **18**(6):421-427.
- [13] Palleroni NJ, Bradbury JF. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1993, **43**(3):606-609.
- [14] Johnson EH, Busaidy R, Hameed MS. An outbreak of lymphadenitis associated with *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* in Omani goats. *Journal of Veterinary Medicine (Series B)*, 2003, **50**(2):102-104.
- [15] 张浩吉, 谢明权, 张健. 猪源嗜麦芽窄食单胞菌 16S rRNA 基因的克隆和序列分析. 中国兽医科技, 2004 **34**(6):3-5.
- [16] Ben GB, Vieites JM, Kim SH. Specific detection of *Stenotrophomonas maltophilia* strains in albacore tuna (*Thunnus alalunga*) by reverse dot-blot hybridization. *Food Control*, 2002, **13**(4):293-299.
- [17] Harris NB, Rogers DG. Septicemia associated with *Stenotrophomonas maltophilia* in a West African dwarf crocodile (*Osteolaemus tetraspis* subsp. *tetraspis*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2001, **13**(3):255-258.
- [18] 黄斌, 陈世锋, 陈勇. 黄缘闭壳龟囊肿病的研究. 淡水渔业, 2002 **32**(5):44-46.
- [19] 周永灿, 朱伟华, 张本, 等. 卵形鲳鲟大规模死亡的病原及其防治. 海洋科学, 2001 **25**(4):40-44.
- [20] 李耀年, 江定丰, 李琳. 28 株水产动物致病菌的编码鉴定. 水利渔业, 2004 **24**(2):62-64.

Isolation, identification and phylogenetic analysis of a pathogenic bacterium in channel catfish

GENG Yi, WANG Kai-yu*, CHEN De-fang, HUANG Xiao-li

(Animal Science and Technology College, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: A pathogenic bacterium (CCF00024) was isolated from the kidney and liver of the diseased channel catfish with acute epidemic disease. Artificial infection proved that the bacterium was the pathogen of the disease. Its morphological, physiological, biochemical characteristics and 16S rDNA sequence analysis were studied. The isolated strain is an aerobic, non-fermentative bacterium. The bacteria are gram negative, rods, with polar multi-flagella; Oxidase-negative, methyl-red-negative, lysine decarboxylase-positive, DNAase-positive, urease-positive, lipase-positive and protease-positive. The bacteria can't utilize most of sugars with production of acid, except maltose and mannose. A phylogenetic tree was constructed by comparing the 16S rDNA sequence of the isolated strain (GenBank accession number AY970826) with other relative bacteria species in the RDP and GenBank databases. In the phylogenetic tree CCF00024, *Stenotrophomonas maltophilia* 13637T, *Stenotrophomonas maltophilia* MG958T, and *Stenotrophomonas maltophilia* M5-1 constitute a branch. The similarity value between strain CCF00024 and those 5 strains *Stenotrophomonas maltophilia* are 99.4% ~ 99.6%. According to morphological, physiological, biochemical characteristics and phylogenetic analysis, the isolated strain (CCF00024) is identified as *Stenotrophomonas maltophilia*.

Keywords: Channel catfish; Acutely epidemic disease; *Stenotrophomonas maltophilia*; 16S rDNA; Phylogenetic analysis

Foundation item: Sichuan Science Research Fund (03JY029-040-2)

* Corresponding author. Tel: 86-835-2885910; Fax: 86-835-2886080; E-mail: kywang@sicau.edu.cn

Received: 25 August 2005/Accepted: 29 September 2005/Revised: 3 November 2005