

大口鲶致病菌的分离鉴定、系统发育分析及相关特性的研究

曹海军¹ 李永文^{1,2} 雷雨¹ 吴江² 徐恒^{1,2*}

(¹ 四川大学生命科学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室 成都 610064)

(² 成都通威水产科技有限公司 成都 610081)

摘 要: 从四川鲶科鱼类养殖场濒死的大口鲶 (*Silurus meridionalis* Chen) 体内分离到 3 株优势菌, 人工感染试验表明菌株 TWN3 致病性最强。通过形态学观察、生理生化测定 结合 DNA 的 G+Cmol%、16S rDNA 序列同源性和系统发育分析, 确定 TWN3 为普通变形杆菌 (*Proteus vulgaris*)。再根据生理生化特性, 可进一步确定 TWN3 属于普通变形杆菌 (*Proteus vulgaris*) 中的 *P. vulgaris* BG3。该菌株不溶血, 对庆大霉素等 4 种药物敏感, 对小鼠有较强的致病性。生长特性研究表明, 该菌最适生长温度 37℃、最适 pH6.0、37℃ 时盐度 1.5% 生长最适。普通变形杆菌致病性广泛, 但作为养殖大口鲶的致病菌国内外未见报道。另外, 对该菌的分类学研究、生长特性、感染途径及防治进行了讨论。

关键词: 普通变形杆菌, 大口鲶, 致病菌, 16S rDNA, 系统发育分析, 生长特性

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)01-0001-06

大口鲶 (*Silurus meridionalis* Chen) 又名南方鲶或南方大口鲶, 属鲶科鲶属, 主要分布于长江、珠江及闽江流域, 是我国特有的经济鱼类。大口鲶个体大、生长快、抗病力强、易起捕、肉质好、无细刺, 20 世纪 80 年代被人工驯养以来, 已成为我国名特优养殖对象。

大口鲶抗病性强, 在成鱼的养殖阶段很少患病, 因此有关大口鲶成鱼的致病菌研究, 国内外报道较少。大口鲶的细菌性病原一般为嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、柱状屈挠杆菌 (*Flexibacter columnaris*)、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、白皮假单胞菌 (*Pseudomonas dermoalba*)^[1]。2005 年 10 月, 四川鲶科鱼类养殖场大口鲶成鱼大规模死亡, 本文从濒死大口鲶成鱼组织中分离出 1 株新的致病菌, 对该菌株进行了形态学观察和分类学鉴定, 同时进行了溶血试验、药敏试验、感染试验及其生长特性方面的研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 患病大口鲶 2005 年 10 月, 取自四川鲶科鱼类养殖场, 病鱼体表无明显溃烂, 胃肠浆膜水肿充血, 肠道甚至糜烂状坏死, 肝脏有斑点状坏死。

1.1.2 健康鱼: 回归感染试验所用大口鲶取自通威水产科技有限公司无公害鱼养殖基地, 平均体长 55cm, 平均体重 2.8kg。人工感染试验所用鲫鱼来源同上, 平均体长 13cm, 平均体重 25g。

1.1.3 试验小鼠: 人工致病试验所用 KM 小鼠 20 只, 清洁级, 雌雄各半, 体重 20 ± 1g, 购于成都中医药大学动物实验中心。

1.1.4 主要试剂和仪器: 胰蛋白胨 (Tryptone)、酵母粉 (Yeast extract)、琼脂糖 (Agarose) 为英国 Oxoid 公司产品; 细菌微量生化反应管购自杭州天和微生物试剂公司; 药敏纸片购自北京天坛药物生物技术公司; PCR 反应试剂均购自大连 TaKaRa 公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京三博远志生物公司; LRH-150 生化培养箱 (上海齐欣科学仪器公司); TU-1800 紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器公司); DU* 800 紫外分光光度计 (Beckman Coulter 公司); HBPX220PCR 扩增仪 (Thermo Hybaid 公司)。

1.2 病原菌的分离

方法参照文献 [2], 经过多次纯化, 将得到的 3 株菌斜面培养后保存于 4℃ 冰箱备用。

1.3 回归感染试验

所获得的 3 株菌, 30℃ 普通营养琼脂斜面培养 24h, 用 0.85% 的无菌生理盐水洗下制成菌悬液, 对

基金项目: 四川省科技攻关项目 (05NG002-002-4) 通威股份科技发展项目

* 通讯作者。Tel: 86-28-85414644; E-mail: xuheng@email.scu.edu.cn

作者简介: 曹海军 (1978 -) 男, 河南南阳人, 硕士研究生, 主要从事微生物生物技术研究。E-mail: chjr007@163.com

其他作者: 张涛^{1,2} 张学俊¹

收稿日期: 2006-04-20 接受日期: 2006-06-12 修回日期: 2006-07-06

12尾健康鲫鱼进行腹腔注射,记录发病和死亡情况,从中筛选出致病力最强菌株 TWN3。

配制成浓度 9×10^8 CFU/mL 的 TWN3 菌株悬液,腹腔注射健康大口鲶,无菌生理盐水作对照,每组4尾,每尾 0.2mL。对刚病死的大口鲶,无菌操作,立即剖检,并做病原菌的分离培养。

1.4 病原菌的鉴定

1.4.1 形态学观察:普通营养琼脂平板,30℃ 恒温培养,观察菌落特征。光镜下观察菌体形态特征,方法参照文献 [3]。运动性观察采用半固体琼脂穿刺法。参照文献 [4],AMRAY-1000B 扫描电镜下观察 TWN3 的形态和大小。

1.4.2 生理生化特性试验 参照文献 [4] 所述方法。

1.5 生长特性的测定

按文献 [5] 方法进行温度和 pH 对 TWN3 生长影响试验,参照文献 [3],测定生长曲线,参照文献 [6, 7] 进行不同温度条件下盐度的耐受性试验。以上试验均取 0.1mL 菌悬液(37℃ 培养 24h)加入到 5mL 对应的 LB 液态培养基中,恒温静止培养 24h,测 OD_{560} 值。

1.6 溶血试验

将 TWN3 菌株分别划线、穿刺接种到 4% 兔鲜血琼脂平板上,37℃ 培养 24 ~ 48h,观察有无溶血现象。

1.7 KM 小鼠致病和鲫鱼人工感染试验

将回归试验所得到的 TWN3 菌悬液,依次稀释,配制成 8.1×10^7 CFU/mL、 7.6×10^6 CFU/mL、 6.3×10^5 CFU/mL 的菌悬液,分别腹腔注射 KM 小鼠,每组4只,每只 0.3mL,无菌生理盐水作对照。观察一周,并对死亡小鼠进行病原菌分离。

选取健康鲫鱼 5 尾 1 组,按以下操作进行感染试验,观察一周。

(1) 注射感染:腹腔注射 8.1×10^7 CFU/mL 的菌悬液,每尾 0.2mL,注射等量无菌生理盐水作对照。

(2) 浸浴感染:将健康鲫鱼腹部去鳞 3 ~ 4 片,置于约为 3.6×10^4 CFU/mL 的菌液中浸浴 4h 后,换水暂养,无菌水浸泡作对照。

1.8 药敏试验

采用琼脂扩散纸片法(K-B)和牛津杯定量扩散法,30℃ 恒温培养 48h 观察抑菌圈的有无及大小。

1.9 病原菌 TWN3 DNA 的 G + C 含量测定

方法参照文献 [4],*E. coli* K12 作对照。

1.10 病原菌 TWN3 的 16S rDNA 测定和系统发育学分析

1.10.1 DNA 模板的制备:常规酚氯仿法提取 TWN3 菌株的基因组 DNA。

1.10.2 PCR 扩增和测序:用于 16S rDNA 的 PCR 反应的引物为通用引物。正向引物为 BSF8/20 :5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(对应于 *E. coli* 的 16S rDNA 序列的第 8 ~ 27 碱基位置);反向引物为 BSR1541/20 :5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'(对应于 *E. coli* 的 16S rDNA 序列的第 1522 ~ 1541 碱基位置)。PCR 反应条件:95℃ 4min,94℃ 45s,56℃ 45s,72℃ 2min,共 30 个循环,72℃ 8min。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,回收后与 pMD18-T Vector 连接,转化大肠杆菌 JM109 进行培养,筛选阳性克隆,提取转化子质粒,酶切验证后,ABI3730 自动 DNA 测序仪测序,由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.10.3 系统发育学分析:将所得到的 TWN3 菌株 16S rDNA 序列在 GenBank 数据库中 Blast 分析,获得相似性 $\geq 98\%$ 的 16S rDNA 序列,利用 ClustalX (1.83) 软件进行比对,通过 Mega3.1 软件选用 Kimura2-parameter 距离模型,采用最小进化法 (Minimum Evolution) 构建系统树,通过自举分析 (Bootstrap) 进行置信度检测,自举数据集为 2000 次。

2 结果

2.1 病原菌分离及回归感染试验

从濒死大口鲶的胃、肠、肝、脾、肾中获得 3 株优势菌,分别编号为 TWN1、TWN2、TWN3,其中 TWN3 在肾脏优势度达 90% 以上。通过健康鲫鱼感染试验,TWN3 菌株感染率最高(表 1),死亡鲫鱼病症与大口鲶相似。

表 1 TWN1、TWN2、TWN3 菌株对鲫鱼感染试验结果

Table 1 Results of respective infection test on crucian carps with strain TWN1, TWN2 and TWN3

| Group | Strain density (CFU/mL) | Injection dose (mL) | Death number of each day | | | | | | | Death number | Death rate (%) |
|---------|----------------------------|------------------------|--------------------------|----|----|----|----|----|----|-----------------|-------------------|
| | | | 1d | 2d | 3d | 4d | 5d | 6d | 7d | | |
| TWN1 | 9.2×10^8 | 0.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 25 |
| TWN2 | 1.1×10^9 | 0.2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 50 |
| TWN3 | 9.0×10^8 | 0.2 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 100 |
| control | 0.85% NaCl | 0.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

通过回归感染试验,同样表明 TWN3 菌株对大口鲇有较高的感染率(表 2),病症与自然情况下相同。选取病死的大口鲇对应组织进行病原菌分离,

结果显示 TWN3 在胃、肠、肝、脾、肾中优势度大致为 55%、55%、75%、65%、95%。

表 2 TWN3 菌株回归感染大口鲇试验结果

Table 2 Results of recurrent infection test on *Silurus meridionalis* Chen with strain TWN3

| Group | Strain density (CFU/mL) | Injection dose/mL | Death number of each day | | | | | | | Death number | Death rate /% |
|---------|----------------------------|----------------------|--------------------------|----|----|----|----|----|----|-----------------|------------------|
| | | | 1d | 2d | 3d | 4d | 5d | 6d | 7d | | |
| TWN3 | 9.0×10^8 | 0.2 | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 100 |
| control | 0.85% NaCl | 0.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

2.2 TWN3 菌株的形态学特征及运动性观察

TWN3 菌株在 30℃ 条件下,培养大约 10h 出现菌落。直径约 1mm,表面光滑湿润,半透明,灰白色,有时略带蓝光。14~24h 呈迁徙扩散生长,以中间菌落为圆心,同心环状扩散,36h 可弥漫整个平板。革兰氏染色阴性,大多直杆状,有时呈长丝状,菌体大小为 $0.4 \sim 0.8 \mu\text{m} \times 1.0 \sim 3.0 \mu\text{m}$ (图 1)。具运动性,无荚膜,周生鞭毛,不产芽孢。在 LB 和牛肉膏蛋白胨培养基中均产生强烈腐败气味。

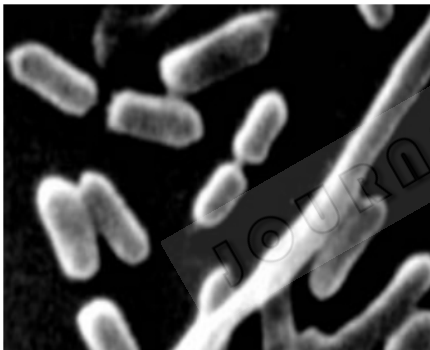


图 1 菌株 TWN3 电镜照片(4000×)

Fig.1 Electron micrograph (4000×) of strain TWN3.

2.3 TWN3 菌株的生理生化特征

MR 试验阳性,VP 反应阴性;能液化明胶,产硫化氢和吲哚,葡萄糖发酵产酸产气;葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、D-木糖氧化产酸产气;甘油氧化产酸;不能利用水杨苷、D-甘露醇、肌醇、卫矛醇、D-甘露糖、乳糖、L-鼠李糖、棉子糖、松三糖、山梨糖产酸;接触酶、苯丙氨酸脱氨酶、脂酶、脲酶阳性;DNA 酶、淀粉酶阴性;氧化酶、赖氨酸脱羧酶、精氨酸双水解酶、鸟氨酸脱羧酶阴性;ONPG 反应阴性,不水解七叶灵、KCN 不生长、还原硝酸盐。以上特征与《伯杰氏系统细菌学手册》^[8]所述基本一致。

2.4 TWN3 菌株的生长特性

该菌株 10℃ 以下几乎不生长,37℃ 以上生长速度急剧下降,43℃ 以上不生长,生长最适温度范围为

25~39℃,生长最适温度 37℃。

pH 值低于 4 不生长,pH4~5.5 生长缓慢,高于 10 时生长速度急剧下降,pH11 时不生长。生长最适 pH 范围 6.0~10.0,最适生长 pH6.0。

由生长曲线可知,生长延迟期 0~1.5h,对数生长期 1.5~4h,稳定期 4~15h,15h 后为衰亡期。

由图 2 可知,随温度增加,最适生长盐度范围扩大,在 3.5%~12% 盐度范围内,生长都呈下降趋势;不同温度条件下,随盐度增高,生长变化总趋势一致。37℃、盐度 1.5% 生长最适。

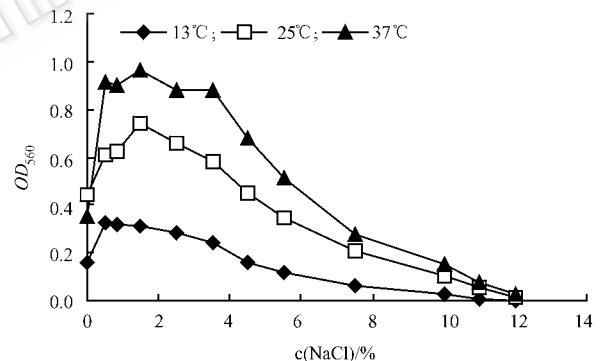


图 2 菌株 TWN3 的温度与盐度正交生长曲线

Fig.2 Growth curve of salinity and temperature of strain TWN3.

2.5 溶血试验结果

4% 兔鲜血琼脂平板划线和穿刺接种均不溶血。穿刺接种兔鲜血琼脂平板,菌落迁徙扩散现象很明显。

2.6 KM 小鼠的致病性和鲫鱼人工感染结果

腹腔注射 KM 小鼠,结果见表 3。刚死亡小鼠的尾部仍呈红色,可推断未出现溶血现象。立即剖检,小鼠小肠病症最为明显,胀气,大多化脓性坏死;大肠和胃有出血现象;肝脏斑点状坏死。从死亡的 KM 小鼠肠、肝、胃、肾中分离到 TWN3 菌株。

对健康鲫鱼进行腹腔注射和浸浴感染,结果见表 3。浸浴感染致死的鲫鱼皮肤无明显溃烂,死亡鲫鱼表现症状与试验联合相同。http://journals.im.ac.cn

表3 KM小鼠的致病试验和鲫鱼人工感染结果

Table 3 The results of pathogenicity test in KM mice and artificial infection test on crucian carps with strain TWN3

| Subject | Way of infection | Animal number | Strain density (CFU/mL) | Death number of each day | | | | | | | Death rate /% |
|---------|------------------|---------------|----------------------------|--------------------------|----|----|----|----|----|----|------------------|
| | | | | 1d | 2d | 3d | 4d | 5d | 6d | 7d | |
| KM mice | injection | 4 | 9.0×10^8 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| | | 4 | 8.1×10^7 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 100 |
| | | 4 | 7.6×10^6 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 75 |
| | | 4 | 6.3×10^5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 25 |
| | control | 4 | 0.85% NaCl | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Crucian carps | injection | 5 | 8.1×10^7 | 2 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | | | 0.85% NaCl | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 20 |
| soaking | | 5 | 3.6×10^4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 20 |
| | | 5 | sterile water | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Each KM mouse injected with a dose of 0.3mL suspension ; each crucian carp injected with a dose of 0.2mL suspension.

2.7 药敏试验结果

在所试的 18 种药物中,该菌株对庆大霉素、卡那霉素、痢特灵、诺氟沙星 4 种药物敏感;红霉素、氨

苄青霉素、复合磺胺、万古霉素等药物不敏感;其他几种中度敏感(表 4)。

表4 药敏试验结果

Table 4 Results of the drug sensitivity test

| Drug | Dose ($\mu\text{g}/\text{disc}$) | Diameter of antibacterial circle/mm | Sensitivity | Drug | Dose ($\mu\text{g}/\text{disc}$) | Diameter of antibacterial circle/mm | Sensitivity |
|--------------------|---------------------------------------|--|-------------|---------------|---------------------------------------|--|-------------|
| Gentamicin | 10 | 25 | S | Cefradine | 30 | 0 | R |
| Kanamycin | 30 | 22 | S | Penicillin | 10IU | 0 | R |
| Furazolidone | 300 | 18 | S | TMP/SMZ | 1.25/23.75 | 8 | R |
| Norfloxacin | 10 | 19 | S | Rifampin | 5 | 16 | R |
| Amoxicillin | 10 | 16 | M | Vancomycin | 30 | 0 | R |
| Chloramphenicol | 30 | 16 | M | Tetracycline | 30 | 12 | R |
| Ethylsuccinate * | 15 | 16 | M | Spectinomycin | 100 | 14 | R |
| Acetylspiramycin * | 15 | 14 | M | Ampicillin | 10 | 0 | R |
| Erythromycin | 15 | 0 | R | Streptomycin | 10 | 8 | R |

S: High sensitive; M: Medium sensitive; R: Resistant. *: drug sensitivity test through Oxford cup method, judging standard refer to Erythromycin.

2.8 TWN3 菌株 DNA 中 G + C 含量

TWN3 菌株 DNA 的 G + Cmol% 为 39.1%, 与《伯杰氏系统细菌学手册》^[8]所述相符。

2.9 16S rDNA 的 PCR 扩增及系统发育的分析

2.9.1 16S rDNA 的获得: PCR 扩增产物(即 16S rDNA 基因)片段大小 1500bp 左右,大小与引物设计区域相同。

2.9.2 16S rDNA 测序和系统发育分析 经 16S rDNA 序列测定,序列长度为 1535bp, NCBI 的序列登录号为: DQ499636。Genbank 中 BLAST 比对,菌株 TWN3 与普通变形杆菌(*P. vulgaris*) 同源性最高,最高相似性为 99.52%。ClustalX (1.83) 多重同源序列分析后 Mega3.1 软件构建进化树(图 3),可以看出,菌株 TWN3 与 *P. vulgaris* 位于同一分支。参照《伯杰氏系统细菌学手册》^[8],结合菌株 TWN3 生化特性,进一步确定该菌株属于 *P. vulgaris* BG3。

3 讨论

3.1 关于普通变形杆菌及其分类研究

由普通变形杆菌引发的人类疾病^[9,10]国内有较多报道。此类菌对虾^[11]、蟹^[12,13]、赤点石斑鱼^[14]、鳕鱼^[15]均具感染性甚至致死,本文从大口鲇成鱼体内分离出一株普通变形杆菌 TWN3 病原。目前,普通变形杆菌导致淡水鱼类大口鲇大量死亡的报道国内外尚属首次。同时说明,普通变形杆菌致病广泛,宿主从无脊椎动物到脊椎动物直至人类,是人畜共患致病菌之一。

近几年,普通变形杆菌分类研究有新的发展,1993 年, Costas 等^[16]把普通变形菌进一步化分为 biogroup 2, 3a 和 3b, 1994 年, O'Hara 等^[17]还认为以往所确定的普通变形杆菌没有典型的遗传学特征。2000 年, O'Hara 等^[18]通过研究,认为 *P. vulgaris* biogroup 3 又可划分为 *Proteus* genomospecies 3, 4, 5

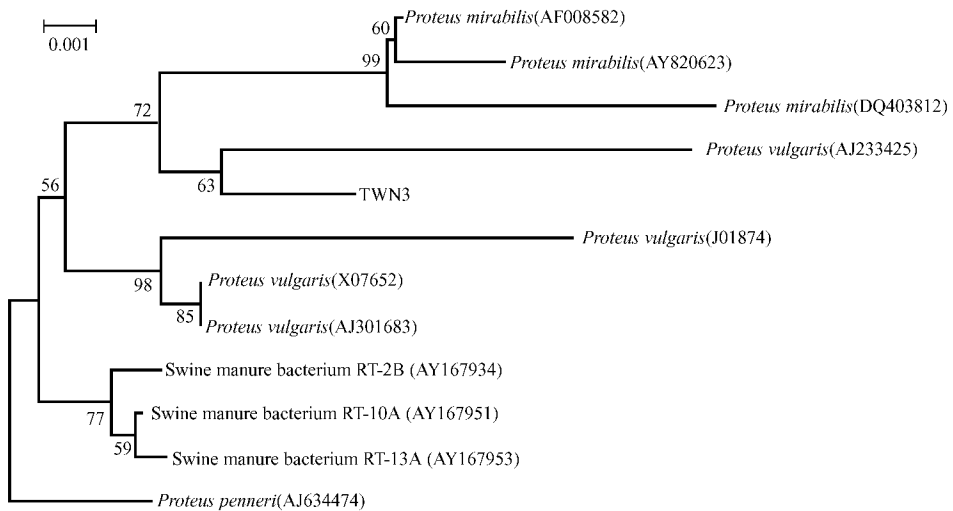


图3 根据 16S rDNA 序列同源性构建的 TWN3 与相关菌株系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree about TWN3 and its related strains, based on 16S rDNA sequence of homology. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap with 2000 repetitions. Bar, 0.1% sequence divergence. Sequences accession numbers in GenBank are in brackets.

和 6 四种类群,并建议 *Proteus* genomospecies 3 更名为 *Proteus hauseri*, *Proteus* genomospecies 4, 5 和 6 保持未命名状态。本文根据《常见细菌系统鉴定手册》^[4]和《伯杰氏系统细菌学手册》^[8]进行分类鉴定,可确定 TWN3 菌株为 *P. vulgaris* biogroup 3,但 KCN 生长试验与所述不一致。参照 O'Hara 等^[18]生化实验,进一步深入,如确定 TWN3 为 *Proteus* genomospecies 6 则甘油产酸试验不符。将来研究很可能在 *P. vulgaris* biogroup 3 中鉴定出新的种^[8],所以普通变形杆菌的分类学研究急需深入完善。TWN3 菌株更确切更深入分类地位,须共同探讨。

3.2 关于细菌鉴定

目前,关于细菌鉴定方法已有较多讨论^[2,6],作者认为,由于 NCBI 收录的 16S rDNA 序列数量和种类有限,部份来源菌株分类地位不明,以及所使用分析软件和方法的不同,都会影响系统进化的分析结果。对于在分类学上需要进一步要探讨的属种,16S rDNA 系统分析的局限性则会更大。因此进行菌种鉴定时,传统生理生化实验仍很重要。

3.3 关于普通变形杆 TWN3 的特性和病理学

TWN3 菌株最适生长温度范围为 25~39℃,与养殖水体温度和哺乳类动物及人体温度基本一致,这为其宿主的广泛性提供了前提。该菌株对 pH 选择范围较广、盐的耐受度很强、盐的耐受范围在不同温度条件下差异不明显,使其生长环境很广泛。此外,在 10℃ 以下该菌几乎不生长,但在适宜的条件下生长速度很快,可以预测,由其引发的水产养殖类疾病有一定季节性和爆发性。

在分离过程中,同时获得 TWN1 和 TWN2 优势菌,三者是否协同致病,尚待研究。回归感染实验中分离的 TWN3 菌株,肾脏中优势度最高,但肾脏没有表观病变症状,感染试验表明, TWN3 对哺乳动物小鼠致病性较强,病症与鱼类一致,同时通过腹腔注射感染大口鲇, TWN3 所导致的发病及死亡时间均比嗜水气单胞菌对照组提前,表明此菌株致病力很强。以上现象和有关致病机理需进一步研究。

3.4 关于普通变形杆 TWN3 的感染途径及防治

大口鲇抗病性强,通过对健康大口鲇皮肤分泌液蛋白组分进行初步分析,后来经实验证实,大口鲇分泌液蛋白对 TWN3 具抗菌活性。此外,死亡和濒死的大口鲇皮肤均无明显溃疡,这与文献[11,12,14]所报道的不同。再结合鲫鱼感染试验,作者认为 TWN3 通过消化系统感染大口鲇。

目前,水产养殖中抗生素频繁使用,抗生素残留等引发的毒副危害日益突出,鉴于 TWN3 菌株对许多抗生素不敏感及不同的普通变形杆菌菌株对抗菌药物敏感性差异较大^[19],结合文献[20]的研究,作者认为此类菌引发的鱼病用蛭弧菌微生物制剂进行防治很具可行性。

参 考 文 献

- [1] 林春友,金宝全,樊振忠.天津地区养殖南方大口鲇常见病记述.水利渔业,2004,24(4):74-75.
- [2] 范文辉,黄捷,王秀华,等.养殖大菱鲆溃疡病病原菌的分离鉴定及系统发育分析.微生物学报,2005,145(5):665-670.
- [3] 杨文博.微生物学实验.北京:化学工业出版社,2004.
- [4] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册.北京:科学出版社,2001.

- [5] 黄文芳, 李小波. 丰产鲫细菌性败血症病原 CSS-4-2 的生长特性. *微生物学通报* 2004, 31(1):14-16.
- [6] 张庆华, 熊清明, 肖琳琳, 等. 大黄鱼溃烂症的一种致病细菌——奇异变形杆菌 ZXS02 菌株. *水产学报* 2005, 29(6):824-830.
- [7] 战文斌, 周丽, 陈章群, 等. 一种新的对虾病原菌—雷氏普罗威登氏菌. *中国水产科学*, 1997, 14(1):38-44.
- [8] Garrity GM, Brenner DJ, Krieg NR, *et al.* *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. New York: Springer, 2005.
- [9] 任建安, 王革非, 王新波, 等. 肠外瘘并发腹腔感染的细菌学与耐药性分析. *外科理论与实践* 2001, 6(6):363-366.
- [10] 董建, 刘渠, 甘莉萍, 等. 一起普通变形杆菌引起的食物中毒调查. *现代预防医学* 2001, 28(4):518-519.
- [11] 许兵, 纪伟尚, 徐怀怨. 一种新的对虾病原菌(普通变形菌). *水产学报*, 1992, 16(2):130-136.
- [12] 孙佩芳, 蔡完其, 吴建农, 等. 鳖穿孔病的病原研究. *水产学报*, 1996, 20(2):120-124.
- [13] 陈晓凤, 周常义, 青新. 鳖“白板病”致病细菌的研究. *水产学报*, 1997, 21(3):309-315.
- [14] 杨霞, 吴信忠. 赤点石斑鱼的普通变形菌病原学研究. *水产科学* 2005, 24(9):5-7.
- [15] 何成伟, 陈武恒, 周煜华, 等. 暹罗鳄鱼结膜炎致病细菌的分离与鉴定. *中国兽医科技* 2003, 33(2):75-76.
- [16] Costas M, Holmes B, Frith KA, *et al.* Identification and typing of *Proteus penneri* and *Proteus vulgaris* biogroups 2 and 3, from clinical sources, by computerized analysis of electrophoretic protein patterns. *J Appl Bacteriol* 1993, 75:489-498.
- [17] O'Hara CM, Hickman-Brenner FW, Steigerwalt AG, *et al.* Abstr. 94th Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol, 1994, abstr. C-253, 535.
- [18] O'Hara CM, Brenner FW, Steigerwalt AG, *et al.* Classification of *Proteus vulgaris* biogroup 3 with recognition of *Proteus hauseri* sp. nov. nom. rev. and unnamed *Proteus* genomospecies 4, 5 and 6. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000, 50:1869-1875.
- [19] 李權年, 余为一, 祖国掌, 等. 中华鳖普通变形杆菌的分离鉴定及其致病性研究. *中国兽医科技*, 1999, 29(3):28-30.
- [20] 李永文, 朱文漪, 顾继锐, 等. 大口鲈病原菌蛙弧菌的分离及生物学特性研究. *淡水渔业* 2006, 36(2):9-12.

Isolation, identification, phylogenetic analysis and related properties of a pathogen in *Silurus meridionalis* Chen

CAO Hai-jun¹, LI Yong-wen^{1, 2}, LEI Yu¹, WU Jiang², XU Heng^{1, 2*}

(¹ Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment, Ministry of Education, College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

(² Chenglu TongWei Aquatic Science and Technology Co, Ltd, Chengdu 610081, China)

Abstract In October 2005, a large number of adults of *Silurus meridionalis* Chen died in the mud fish farming of Sichuan province. Later, three predominate strains of bacteria were isolated from the body of moribund fish. By artificial infection tests, strain TWN3 was confirmed to be the pathogen of the disease.

Based on the characteristics of morphology, physiology and biochemistry tests, TWN3 was initially identified as *Proteus vulgaris*, and its G + C content of DNA is 39.1%. After being amplified, the sequence of its 16S rDNA was analyzed in the database of NCBI and it showed that TWN3 had the highest similarity to *P. vulgaris*, with 99.52% identity. By constructing the molecular phylogenetic dendrogram with Minimum Evolution method in Mega3.1, it was revealed that TWN3 was in the same branch with *P. vulgaris*. Based on all the results above, TWN3 is identified as *P. vulgaris*. However, the result of one biochemistry test, growth in KCN, deviates from the description in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. With reference to the Manual above, *Proteus vulgaris* is divided into two groups, *P. vulgaris* BG2 and 3. According to the specific biochemical properties, TWN3 is classified as a member of *P. vulgaris* BG3.

Relevant tests of biological properties were also conducted, which showed that this strain has no haemolysis and is sensitive to four kinds of antibiotic such as gentamicin. Moreover, it can strongly cause diseases to mice. The research on the growth property of strain TWN3 indicated that its growth temperature ranges from 10°C to 43°C, optimum 37°C; growth pH ranges from 4 to 11, optimum 6. Its optimum salinity varies under different temperatures and it grows best under 1.5% salinity while 37°C. The aim of these researches is to provide an evidence for the prevention and cure of TWN3.

According to the appearance of the diseased *Silurus meridionalis* Chen and results of artificial infection test on crucian carps, it is considered that *Silurus meridionalis* Chen is infected through digestive system and it is also recommended that *Bdellovibrio* should be used in biological control.

Although the pathogenicity of *P. vulgaris* is extensive, there has been no report that *P. vulgaris* is considered as the pathogen of cultivated *Silurus meridionalis* Chen so far. In addition, the identification of strain TWN3 has positive effects on the future research on the taxonomy of *Proteus*.

Keywords: *Proteus vulgaris*; *Silurus meridionalis* Chen; pathogen; 16S rDNA; phylogenetic analysis; growth property

Foundation item: Vital Technological Research Project of Sichuan(05NG002-002-4); Technological Development Project of TongWei Company Limited

* Corresponding author. Tel 86-28-85414644; E-mail: xuheng@email.scu.edu.cn

Other authors: ZHANG Tao^{1, 2}, ZHANG Xue-jun¹

Received: 20 April 2006/Accepted: 12 June 2006/Revised: 6 July 2006

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>