

鳊源致病性荧光假单胞菌的分离与鉴定

安伟 肖雨* 高晓华 张明辉 张崇文 邵玲 何正侃

上海市水产研究所 上海市水产技术推广站 上海 200433

摘要: 为确定导致鳊 (*Siniperca chuatsi*) 细菌性感染死亡的病原, 从患病濒死的鳊肝中分离出一株优势菌 B01, 经人工回感实验确定分离菌的致病性, 并利用 VITEK-2 全自动微生物鉴定仪及 16S rRNA 序列分析对纯培养细菌进行鉴定。此外, 对分离的菌株进行药敏实验。研究结果表明, 菌株 B01 对鳊鱼具有致病性。经 VITEK-2 全自动微生物鉴定仪鉴定菌株 B01 为荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*), 并在紫外光下可以产生荧光。进一步的 16S rRNA 基因序列和系统发育分析表明, 该菌与荧光假单胞菌同源性达到了 97% 以上。药物敏感性实验结果显示, 该分离株对恩诺沙星、诺氟沙星、链霉素和四环素等 6 种药物高度敏感。

关键词: 鳊; 荧光假单胞菌; 细菌性疾病; 致病性

中图分类号: Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2014)05-760-06

Isolation and Identification of Pathogenic *Pseudomonas fluorescens* from *Siniperca chuatsi*

AN Wei XIAO Yu* GAO Xiao-Hua ZHANG Ming-Hui ZHANG Chong-Wen
SHAOLing HE Zheng-Kan

Shanghai Fisheries Research Institute, Shanghai Fisheries Technical Extension Station, Shanghai 200433, China

Abstract: The aim of this study was to determine the pathogenic bacterium infecting *Siniperca chuatsi*. Bacteria were isolated from the liver of diseased *S. chuatsi* and identified by the Vitek 2 Compact Identification System and 16S rRNA sequence analysis. Healthy *S. chuatsi* was used for experimental infection with bacterial suspension. A bacterial strain B01 was isolated from diseased *S. chuatsi*. Identification demonstrated that the bacterium was *Pseudomonas fluorescens* (Table 1, Fig. 2), and its growth characteristics was also studied. The results indicated that the B01 could show fluoresce under ultraviolet (Fig. 1). Infection with the bacterial suspension to healthy *S. chuatsi* could reproduce the diseased symptoms as occurred naturally and the same bacterium could be recovered from these infected *Siniperca chuatsi*. The susceptibility test to antibiotics demonstrated that the bacterial strain B01 was susceptible to enrofloxacin, norfloxacin, streptomycin and tetracycline (Table 2). We conclude that *P. fluorescens* is a pathogen for *S. chuatsi*.

Key words: *Siniperca chuatsi*; *Pseudomonas fluorescens*; Bacterial disease; Pathogenicity

鳊 (*Siniperca chuatsi*) 在广东、湖北、湖南等地已形成产业化养殖模式, 但随着养殖规模和集约化程度的扩大, 鳊疾病发病率也不断升高, 严重影响了鳊鱼养殖业的健康发展 (He et al. 2001, 王桂堂 2003)。关于鳊病原学研究

基金项目 上海市农委青年成长计划项目 [沪农青字 (2014) 第 3-11 号];

* 通讯作者, E-mail: fxy88@hotmail.com;

第一作者介绍 安伟, 男, 助理工程师; 研究方向: 鱼类病害防治技术; E-mail: envijoy@126.com。

收稿日期: 2014-03-17, 修回日期: 2014-06-29

多集中在病毒性疾病方面(严家彬等 2002)。近年来,鳃流行病学调查表明,病原种类呈增多趋势,细菌性病原引发的鳃病频频发生,对鳃养殖业造成严重的经济损失。

2013年,上海某养殖场的鳃鱼发病大量死亡。患病鱼主要表现为进食减少,失去平衡侧翻,体色发黑,严重个体鳍基部充血。解剖可见,腹腔少量积水,肾有充血现象,肝肿大且严重充血。从患病濒死鳃鱼肝分离到一株细菌,经人工回感实验证实该菌株对鳃有较强致病性,并与自然发病症状相似,由此确定其致病性。经 VITEK2 全自动微生物鉴定仪和分子生物学鉴定,确定该致病菌为荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)。本实验对该菌生理生化特性、16S rRNA 序列同源性、菌株致病性以及药物敏感性进行研究,为鳃细菌性疾病病原学研究以及快速诊断和防控技术提供基础数据与参考。

1 材料及方法

1.1 实验用鱼 养殖条件下患病和健康的鳃鱼,体长 15~25 cm,均由上海市孙农养殖场提供,其中,发病鳃鱼 5 尾,健康鳃鱼 40 尾。

1.2 主要试剂和仪器 TSA 培养基(北京陆桥技术有限责任公司),GN 细菌鉴定卡(生物梅里埃中国有限公司),胶回收试剂盒,药敏试剂盒(杭州天和微生物试剂有限公司)等。VITEK2 全自动细菌鉴定仪(生物梅里埃中国有限公司),PCR 仪(美国应用生物系统公司)等。

1.3 病原菌分离与培养 取具有典型症状的濒死鳃鱼个体,体表经消毒后,在无菌条件下取肝,于 TSA 琼脂平板划线接种,28℃ 培养 24 h 后,挑取单菌落纯化培养一次,获得的纯化菌落编号为 B01。将 B01 菌落于 VITEK2 全自动细菌鉴定仪上进行自动鉴定。将已鉴定的单菌落再纯化一次,于金氏培养基琼脂平板划线接种,28℃ 培养 24 h,在紫外光 360 nm 处观察。

1.4 人工感染实验 将菌株 B01 扩大培养,制成浓度为 1×10^{11} cfu/L (cfu 是单位体积中的

活菌个数)的菌悬液。选择规格一致的健康鳃鱼随机分成 2 组,每组 15 尾,采用腹腔注射法进行人工感染。实验组每尾鱼注射 0.2 ml 浓度为 1×10^{11} cfu/L 菌悬液,对照组注射 0.2 ml 灭菌的生理盐水。连续观察 14 d,记录发病及死亡情况。再从濒死鳃鱼肝中重新分离病原菌并进行鉴定。

1.5 VITEK2 全自动微生物鉴定仪的鉴定

将菌株 B01 接种到 TSA 培养平板上,28℃ 培养 24 h 得到单菌落,向专用试管中加入 3 ml 灭菌的 0.45% 生理盐水,用无菌接种环取单菌落,制备浓度 $1.5 \times 10^{11} \sim 1.91 \times 10^{11}$ cfu/L 的菌悬液,然后采用 GN 鉴定卡进行鉴定,5~10 h 后自动输出鉴定结果。

1.6 16S rRNA 序列同源性分析及系统发育树的构建 将 B01 菌种接种于 TSB 液体培养基中,28℃ 培养 24 h 后离心集菌。参照 TaKaRa MininBEST Universal Genomic DNA Kit Ver. 4.0 试剂盒方法提取 DNA,作为 PCR 反应的模板。

依据细菌 16S rRNA 技术在细菌鉴定方面应用,合成通用扩增引物,上游引物 27F:5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3',下游引物 1429R:5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'。25 μl 反应体系:上、下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μl,10 × PCR Buffer 2.5 μl,dNTP Mix (10 mmol/L) 2 μl,Taq DNA 聚合酶(5 U/μl) 0.25 μl,DNA 模板 1 μl,ddH₂O 补足 25 μl。反应程序:95℃ 预变性 3 min;95℃ 变性 30 s,55℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 90 s,共 30 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,采用 Axgen DNA 凝胶回收试剂盒进行纯化后,送上海生工生物有限公司测序。

菌株 B01 的 16S rRNA 序列与 NCBI 的基因库中细菌 16S rRNA 的序列进行对比分析。采用 ClustalX1.8 软件进行多序列匹配排列,用 MEGA4.0 软件的 Neighbor-joining 法(Saitou et al. 1987)构建菌株 B01 的系统发育树,并采用 Bootstrap 1 000 次进行检验。

1.7 药敏实验 将已纯化的菌株 B01 制成浓度约为 10^{11} cfu/L 菌悬液, 参照纸片扩散法进行药敏实验。取 100 μ l 菌悬液涂布于 TSA 固体培养基上, 将药敏纸片贴在平皿上, 28 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后测量各个药物抑菌圈直径。

2 结果

2.1 致病菌的分离 从患病鳊的肝分离出一株优势菌, 在 TSA 固体培养基上 28 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 菌落呈圆形, 不透明, 微隆起, 边缘整齐, 黄色, 菌落直径 1 mm 左右。金氏培养基琼脂平板上的菌落, 在波长为 360 nm 的紫外光下, 能够显示荧光(图 1)。

2.2 人工感染实验 以浓度为 1×10^{11} cfu/L 的菌悬液腹腔注射感染健康鳊个体 15 尾, 感染组鱼从第 3 天开始出现病症, 主要表现为体色发黑, 游动迟缓, 身体失去平衡, 第 7 天开始出现死亡, 14 天内累积死亡率达到了 80%, 而对照组在实验期间均健康。感染后濒临死亡的鳊被解剖后, 有少量血色腹水, 胃部肿胀并有未消化食物, 肝充血严重。从人工感染鳊的肝中再次分离出相同的致病菌。

2.3 VITEK2 全自动微生物鉴定仪鉴定 从患病鳊和人工感染的鳊肝组织中分离的细菌经

VITEK2 全自动细菌鉴定仪鉴定为同一种细菌。该菌株为荧光假单胞菌, 可信度达 97%, 结果评价为 Excellent identification (极好的鉴定)。具体的生化反应结果见表 1。

2.4 序列分析与系统发育树的构建 菌株 B01 的 16S rRNA 经过 PCR 扩增后目的片段大约 1 500 bp, 测序确定为 1 473 bp。测得序列在 NCBI 中 Blast 比对发现, 此菌株与荧光假单胞菌的同源性极高, 同源性大于 97%。选择同源性较高的菌株 16S rRNA 序列构建系统发育树, B01 菌株与荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* (DQ084460.1) 聚合为一支(图 2)。

2.5 药敏实验 对菌株 B01 进行药物敏感性实验, 该菌对恩诺沙星、诺氟沙星、磺胺异恶唑、链霉素、复方新诺明及四环素药物敏感; 对氟苯尼考、新霉素、利福平、庆大霉素药物中度敏感; 对青霉素、甲氧苄氨嘧啶不敏感(表 2)。

3 讨论

利用从自然患病鳊肝组织分离的致病菌株采用腹腔注射对健康鳊进行人工感染实验, 得到与自然发病鳊相似的症状, 并从感染发病的鳊分离出与自然患病鳊相同的菌株。由此表明, 所分离的菌株 B01 是引起鳊死亡的致病菌。

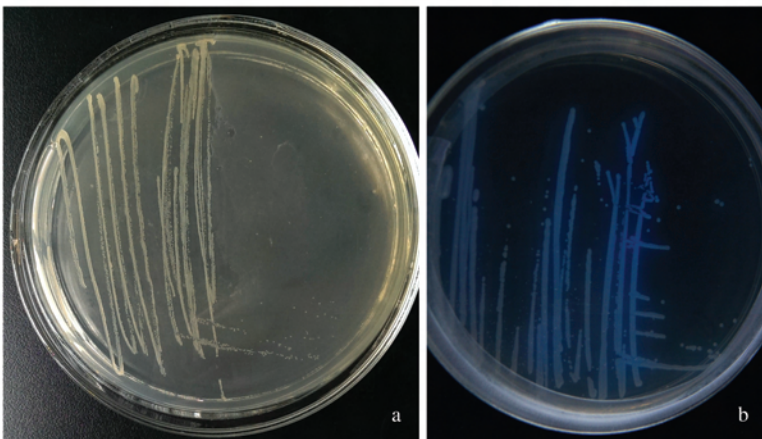


图 1 分离菌株的菌落

Fig. 1 Colony of the isolated bacteria

a. 菌株 B01 在 TSA 平板上形成的菌落; b. 在紫外光下菌株 B01 的荧光菌落。

a. The colony of strain B01 on TSA plate; b. Fluorescence under ultraviolet light.

表 1 B01 菌株的 VITEK2 鉴定结果
Table 1 VITEK2 identification of B01

生化反应 Reaction	结果 Result	生化反应 Reaction	结果 Result	生化反应 Reaction	结果 Result
D-山梨醇 D-sorbitol	-	β -木糖苷酶 Beta-xylosidase	-	琥珀酸盐产碱 Succinate alkalisation	-
侧金盏花醇 Adonitol	-	丙二酸盐 Malonate	-	脱羧酶阴性控制 Decarboxylase base	-
吡咯烷基芳胺酶 L-pyrrolydonyl-arulamidase	+	L-脯氨酸芳胺酶 L-proline arylamidase	+	α -半乳糖苷酶 Alpha-galactosidase	-
L-阿拉伯醇 L-arabinitol	-	脂酶 Lipase	-	磷酸酶 Phosphatase	-
D-纤维二糖 D-cellobiose	-	古老糖 Palatinose	-	氨基乙酸芳胺酶 Glycine arylamidase	-
β -半乳糖苷酶 Beta-galactosidase	-	酪氨酸芳胺酶 Tyrosine arylamidase	+	鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-
H ₂ S 产生 H ₂ S production	-	尿素酶 Urease	-	赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	-
β -N-乙酰葡萄糖苷酶 Beta-N-acetyl-glucosaminidase	-	丙氨酸-苯丙氨酸-脯氨酸芳胺酶 Ala-Phe-Pro-Ary lamidase	-	N-乙酰- β -半乳糖苷酶 Beta-N-acetyl-galactosaminidase	-
β -葡萄糖苷酶 Beta-glucosidase	-	蔗糖 Saccharose	-	组氨酸同化 L-Histidine assimilation	-
D-葡萄糖 D-glucose	-	D-塔格糖 D-tagatose	-	COURMARATE courmarate	-
Y-谷氨酰转移酶 Y- glutamyl transferase	-	D-海藻糖 D-trehalose	-	β -葡萄糖苷酸酶 Beta-glucuronidase	-
发酵/葡萄糖 Fermentation / glucose	-	柠檬酸盐(钠) Citrate (Sodium)	+	O/129 耐受 O/129 resistance	-
谷氨酰芳胺酶 Glutamyl arylamidase pNA	-	β -丙氨酸芳胺酶 Beta-alanine arylamidase pNA	-	谷氨酸-甘氨酸-精氨酸芳胺酶 Glu-Gly-Arg-Ary lamidase	-
D-麦芽糖 D-maltose	-	5-酮-葡萄糖苷 5-keto-D-gluconate	-	L-苹果酸盐同化 L-malate assimilation	-
D-甘露醇 D-mannitol	-	L-乳酸产碱 L-lactate alkalisation	+	ELLMAN ellman	-
D-甘露糖 D-mannose	-	α -葡萄糖 Alpha-glucosidase	-	L-乳酸盐同化 L-lactate assimilation	-

“+”表示阳性;“-”表示阴性。“+”Denotes positivity;“-”Denotes negativity.

另外采用 VITEK2 全自动微生物鉴定仪对菌株进行鉴定,并结合 16S rRNA 基因序列的同源性分析,将此菌鉴定为荧光假单胞菌。由于病鱼的典型症状为肝充血,故称此病为肝出血病。目前国内已有报道从患烂鳃病和细菌性败

血病的鳎中分离到柱状嗜纤维菌 (*Cytophaga columnaris*) (李海燕等 2000) 和嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) (陈昌福等 1996)。本研究验证了荧光假单胞菌对鳎具有强致病性,这对深入研究鳎细菌性疾病病原流行特征以及

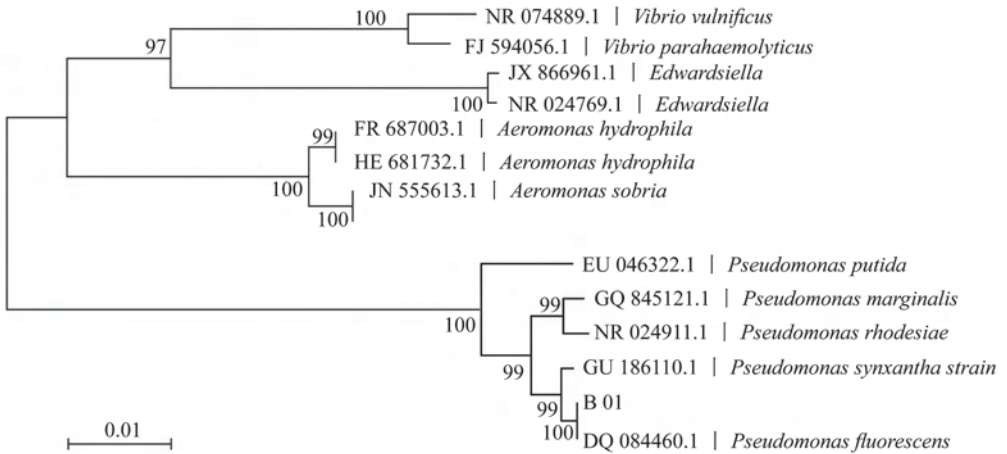


图 2 以 16S rRNA 基因序列构建的菌株 B01 的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *Pseudomonas fluorescens* based on 16S rRNA gene sequence of strain B01

枝上数字为置信度;各个支末端为基因的登录号和种名;标尺代表进化距离;*Vibrio vulnificus*. 创伤弧菌; *Vibrio parahaemolyticus*. 副溶血弧菌; *Edwardsiella*. 迟缓爱德华氏菌; *Aeromonas hydrophila*. 嗜水气单胞菌; *Aeromonas sobria*. 温和气单胞菌; *Pseudomonas putida*. 恶臭假单胞菌; *Pseudomonas marginalis*. 边缘假单胞菌; *Pseudomonas rhodesiae*. 罗氏假单胞菌; *Pseudomonas synxantha strain*. 丝状假单胞菌; *Pseudomonas fluorescens*. 荧光假单胞菌

The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. Scale indicates evolutionary distance.

表 2 药物敏感性实验

Table 2 Antibiotic susceptibility test

抗生素 Antibiotics	含量(μg) Contents	抑菌圈(mm) Diameter of inhibition	判定标准 Criterion			结果判定 Result
			耐药 Resistance	中度敏感 Medium sensitivity	敏感 Sensitivity	
恩诺沙星 Enrofloxacin	10	28	≤12	13-16	≥17	S
诺氟沙星 Norfloxacin	10	26	≤15	16-20	≥21	S
氟苯尼考 Florfenicol	30	16	≤12	13-17	≥18	I
磺胺异恶唑 Bacteresulf	250	24	≤12	13-16	≥17	S
新霉素 Neomycin	30	14	≤12	13-16	≥17	I
青霉素 Penicillin	10	-		24	24	R
链霉素 Streptomycin	300	18	≤11	12-14	≥15	S
复方新诺明 Bactrim	75	20	≤10	11-15	≥16	S
利福平 Rifampicin	5	18	≤16	17-19	≥20	I
甲氧苄氨嘧啶 Trimethoprim	5	-	≤10	11-15	≥16	R
庆大霉素 Gentamicin	120	13	≤12	13-14	≥15	I
四环素 Tetracycline	30	24	≤14	15-18	≥19	S

判定标准依据药物抑菌圈的大小;S. 敏感; I. 中度敏感; R. 耐药; “-”代表无效果。

The criterion is corresponding drug's bacteriostasis size; S. Highly sensitive; I. Moderately sensitive; R. Low or no sensitivity; “-” denotes invalid.

寻找防治此类疾病的有效措施具有一定的意义。

荧光假单胞菌是一种条件致病菌, 可引发鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)、鲫鱼 (*Rassius aumtus*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)、青鱼 (*Mylopharyngdon piceus*) 等大多数淡水鱼类败血症和赤皮病(张水波 2011)。全年均可发病, 且死亡率较高, 尤其在捕捞运输过程或机械损伤时更易感染发病, 给我国水产养殖业造成了严重的经济损失。关于荧光假单菌对水生动物的致病性研究, 有报道从大鲵 (*Andrias davidianus*) 肝和肾中分离到此菌, 人工感染证明此菌对大鲵有致病性(杜宗君等 2011)。罗非鱼 (*Oreochromis spp*) 内脏同样也分离一株荧光假单胞菌, 导致罗非鱼内脏败血性坏死, 鳍条充血并有糜烂等症状, 且感染组在 7 d 内全部死亡(邓显文等 2010)。对比本研究感染鳊在 14 d 内的累积死亡率为 80%, 可能是不同寄主分离的菌株的致病性不同或是实验条件不同而产生差异。

VITEK2 全自动微生物鉴定仪, 其数据库中微量的生化反应包括了传统的生理生化测定分析, 简化了传统实验摸索过程, 避免人工操作造成的误差, 已被多个国家的官方检疫机构认可(Nakasone et al. 2007)。本实验对鳊鱼病原菌的鉴定报告在 5 ~ 10 h 完成, 大大提高检验效率, 且鉴定结果评价为极好的鉴定, 证实鉴定结果准确。同时构建的细菌 16S rRNA 基因序列系统发育树显示, 该菌与荧光假单胞菌自然聚合为一支, 置信度高达 100%。对菌株 B01 的分子生物学的鉴定也进一步证实了 VITEK2 全自动微生物鉴定仪的准确性。微生物自动鉴定和基因型同源性分析方法具有简捷、高效、特异等优点, 已广泛应用于现代细菌诊断领域(周勇等 2012)。本研究采用 VITEK2 全自动微生物鉴定仪和 16S rRNA 鉴定细菌的方法, 能够快速、准确地鉴定出病原菌, 适于在渔业生产中推广应用。

药敏实验表明, 鳊荧光假单胞菌对恩诺沙

星、诺氟沙星、链霉素、复方新诺明、四环素等药物敏感, 该结果可以为鳊养殖中针对此病的防治提供依据。鳊荧光假单胞菌与其他水生动物的荧光假单胞菌的药物敏感性不尽相同, 可能病原地域差异或是抗生素的长期滥用导致菌株的抗药谱已发生改变(李圆圆等 2008)。因此, 建议水生动物细菌性疾病治疗, 要针对不同地理位置, 不同生物来源选择性地进行治疗, 以防细菌耐药性的发生。

参 考 文 献

- He J G, Deng M, Weng S P, et al. 2001. Complete genome analysis of the mandarin fish Infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. *Virology*, 291(1): 126 - 139.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4): 406 - 425.
- Nakasone I, Kinjo T, Yamane N, et al. 2007. Laboratory-based evaluation of the colorimetric VITEK-2 Compact system for species identification and of the Advanced Expert System for detection of antimicrobial resistances: VITEK-2 compact system identification and antimicrobial susceptibility testing. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 58(2): 194 - 198.
- 陈昌福, 李静. 1996. 翘嘴鳊细菌性败血症病原菌的分离及其致病力的研究. *华中农业大学学报*, 15(4): 370 - 373
- 邓显文, 谢志勋, 刘加波, 等. 2010. 罗非鱼荧光假单胞菌的分离鉴定. *广西农业科学*, 41(6): 612 - 615.
- 杜宗君, 黄小丽, 邓永强, 等. 2011. 人工养殖大鲵病原荧光假单胞菌的分离鉴定. *四川农业学报*, 29(1): 103 - 107.
- 李海燕, 黄文芳. 2000. 鳊细菌性烂鳃病的组织及细胞超微结构观察. *华南师范大学学报*, 1: 109 - 112
- 李圆圆, 曹海鹏, 邓璐, 等. 2008. 西伯利亚鲟源嗜水气单胞菌致病菌的分离及其全菌苗的免疫效果. *动物学杂志*, 43(6): 1 - 9.
- 王桂堂. 2003. 鳊消化道内寄生范尼道佛吸虫月份变化的初步观察. *水生生物学报*, 27(1): 108 - 109.
- 严家彬, 李新辉, 吴淑勤. 2002. 鳊鱼病毒病研究进展. *湛江海洋大学学报*, 13(4): 73 - 77.
- 张水波. 2011. 几种主要细菌性鱼病的防治(二). *渔业致富指南*, 11(2): 56 - 58.
- 周勇, 曾令兵, 李瑞伟, 等. 2012. 患病黄颡闭壳龟中产酸克雷伯菌的分离与鉴定. *淡水渔业*, 42(3): 38 - 43.