

黑鲷肠炎病原恶臭假单胞菌的分离和鉴定

毛芝娟¹ 王美珍² 陈吉刚¹ 杨季芳¹

(¹浙江万里学院生物与环境学院, 宁波 315100)

(²华中农业大学水产学院, 武汉 430070)

摘 要 2008 年 3 月, 浙江省象山港养殖黑鲷暴发了严重的肠炎病情, 病鱼肠道肿胀, 充满黄色黏液。以 ZoBell2216E 平板自病鱼肠道黏液分离到 4 株菌 BB01、BB02、BB03 和 BB04。通过人工感染试验验证了前 3 株为病原菌, 其中 BB01 菌株 96h 的半数致死浓度 LD₅₀ 为 4.61×10⁴ CFU/g 鱼体重。3 株分离菌革兰氏染色阴性, 短杆状, 氧化酶试验阳性, 氧化葡萄糖, 不产气, 4℃ 生长, 精氨酸双水解酶阳性, 利用麦芽糖、柠檬酸盐, 硝酸盐降解阳性, DNA 酶、乙酰胺酶阴性; 与已发表的恶臭假单胞菌 16S rRNA 序列的同源性达 99% 以上; 经形态和理化特性鉴定及 16S rDNA 序列测定, 此 3 株菌同属于恶臭假单胞菌。药敏试验结果表明, 菌株 BB01 对头孢类等多数抗生素种类敏感, 而对氧氟沙星耐药。

关键词 黑鲷 病原 恶臭假单胞菌 16S rDNA

中图分类号 S941.42 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2010)03-0023-07

Isolation and characterization of *Pseudomonas putida*, a causative agent of gastroenteritis in black sea bream, *Sparus macrocephalus*

MAO Zhi-juan¹ WANG Mei-zhen² CHEN Ji-gang¹ YANG Ji-fang¹

(¹Biological and Environmental College, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100)

(²Fishery College, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

ABSTRACT An outbreak of serious mortality among the cultured black sea bream *Sparus macrocephalus*, characterized by a swollen intestine containing yellow fluid, occurred in early spring of 2008 in Xiangshan Bay, Zhejiang Province. Four strains of bacteria, BB01, BB02, BB03 and BB04 were isolated from the intestinal yellow fluid of the moribund black sea bream with Zobell2216E agar and/or thiosulfate citrate bile salt sucrose agar. The former three were identified as causative agents *via* artificial challenge. The 96h LD₅₀ value of BB01 was 4.61×10⁴ CFU/g bream body weight. The former three strains were characterized as *Pseudomonas putida* through morphological, physical and biochemical profiles tests and 16S rRNA sequencing. The three strains were Gram-negative, short-rod-shaped, oxidase and glucose oxidation positive, gas negative, maltose and citrates utilization positive, arginine dihydrolase positive, nitrate reduction positive, DNA enzyme and acetamidase negative. The 16S rRNA sequence of BB01 shared the identity of over 99% with those of *P. putida* strains. Drug sensitivity tests

showed that the strain BB01 was susceptible to most of the tested antibiotics while resistant to ofloxacin.

KEY WORDS *Sparus macrocephalus* Pathogen *Pseudomonas putida* 16S rRNA

鲷科鱼类,包括真鲷 *Pagrus major* 和黑鲷 *Sparus macrocephalus* 均为我国东南沿海养殖的重要经济鱼类品种(蔡厚才等 2004; 刘端炜等 2002)。近年来,黑鲷养殖快速兴起,但是,病害的频频发生已经严重影响了产业的健康发展。已经报道的黑鲷病原包括引起幼鱼夏季腹水症的拟态弧菌 *Vibrio mimicus* 和哈维氏弧菌 *V. harveyi*(王国良等 2003; 潘晓艺等 2005)。2008 年 3 月上中旬,浙江省象山港网箱养殖黑鲷发病,病鱼腹部胀满,肠道肿胀,充满黄色黏液。本研究自此次发病鱼中分离和鉴定病原,开展了病原菌毒力、生物学特性测试和 16S rDNA 序列测定的部分研究工作,以期为该病的防治提供必要的技术依据。

1 材料与方法

1.1 试验用鱼

黑鲷病鱼取自浙江省象山港养殖网箱,体重 250~300 g/尾;健康黑鲷购自同一海区养殖网箱,平均体重 75 ± 10 g。以 200 L 塑料水族箱加海水充气暂养,试验期间水温 20~22 °C。

1.2 试验菌株

自病鱼分离的 4 菌株 BB01、BB02、BB03 和 BB04 用于本试验。标准株恶臭假单胞菌购自中国科学院微生物菌种保藏中心。

1.3 人工感染试验

半数致死浓度试验中,试验鱼每组 10 尾,分别以 $10^5 \sim 10^8$ cells/ml 浓度的菌悬液腹腔注射,每尾注射 0.2 ml。对照组则注射相同剂量的灭菌 PBS。每日观察和统计攻击后 10 d 内的发病和死亡情况。自濒死发病鱼肝、肾、肠道黏液等组织中重新分离病菌并进行形态和生理生化鉴定。

1.4 菌株分类鉴定

1.4.1 菌株的形态学检测

菌株形态学检测采用电镜负染法,收集经 12 h 培养的菌细胞,以 2.5% 浓度的戊二醛溶液固定,冰浴 1 h,以灭菌蒸馏水悬浮菌体,经 3% 磷钨酸染色后滴于铜网上,备作电镜观察用。

1.4.2 菌株的理化特性鉴定

以常规生理生化测试法进行初步分类,所有测试均进行两次重复。微量生化鉴定管购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.4.3 分离株的分子生物学鉴定

1.4.3.1 分离株基因组 DNA 提取

取 1.5 ml 各分离菌株的过夜培养物, $5\ 000 \times g$ 离心 5 min, 收集菌体; 以无菌水离心洗涤两次; 收集菌细胞沉淀, 以 100 μ l TZ 缓冲液(2% Triton X-100, 2.5 g/L NaN₃, 12.5 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)重新悬浮, 沸水浴 10 min, 冰浴 5 min, $1\ 000 \times g$ 离心 10 min, 收集上清液, 即为细菌基因组 DNA, 备作 PCR 模板用。

1.4.3.2 16S rDNA PCR、测序和系统发育分析

16S rDNA PCR 引物采用革兰氏阴性菌通用引物 P1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', P2: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3', 目的片段长度 1 503bp。PCR 产物经胶回收试剂盒(上海生工生物工程有限公司, 简称生工)回收后直接送生工公司测序。所得序列递交到 GenBank, 在 NCBI 网站经 BLASTN 进行在线序列比对。

2.3 菌株分类

除 BB02 菌株甘露糖利用阳性外,3 个分离株表现了几乎完全相同的形态学(图 2)和生理生化特性(表 2),与参考菌株相同,革兰氏阴性,短杆状,能运动,拥有 1 根或 1 根以上极生和侧生鞭毛。菌株在 TCBS 培养基上生长缓慢,呈现绿色透明菌落。氧化酶阳性,氧化葡萄糖,不产气。甲基红试验阴性、明胶酶阴性。利用葡萄糖、柠檬酸盐和麦芽糖;降解硝酸盐;精氨酸双水解酶、鸟氨酸脱羧酶阳性。在无盐胨水中不生长,在 6%NaCl 浓度的胨水中生长,4℃生长,41℃不生长。根据形态学和生理生化反应特性结果,与参考菌株相比较,3 株分离菌被初步鉴定为恶臭假单胞菌。同时,3 株自人工感染发病鱼组织中重新分离到的菌株 BB01'、BB02'和 BB03',其形态特性及主要的生理生化特性与假单胞菌属种类的特点相符,与原攻击株相同(表 3)。

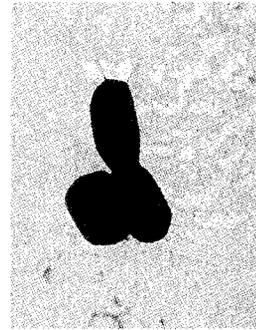


图 2 负染的分离株 BB01 电子显微镜照片(×15 000)

Fig. 2 Photograph of bacteria BB01 under electronic microscope after negative staining

表 2 分离株的形态和生理生化特性

Table 2 Morphological, physical and biochemical characteristics of isolated strains

项目 Item	菌株 Strain				项目 Item	菌株 Strain			
	BB01	BB02	BB03	<i>P. putida</i>		BB01	BB02	BB03	<i>P. putida</i>
鞭毛数目 Number of flagella	>1	>1	>1	>1	甘露糖 Mannose	-	+	-	-
革兰氏染色 Gram stain	-	-	-	-	阿拉伯糖 Arabinose	-	-	-	-
形态 Morphology	短杆状	短杆状	短杆状	短杆状	肌醇 Inositol	-	-	-	-
4℃生长 Growth at 4℃	+	+	+	+	柠檬酸盐 Citrates	+	+	+	+
41℃生长 Growth at 41℃	-	-	-	-	麦芽糖 Maltose	+	+	+	+
TCBS 培养基生长 Growth on TCBS agar	+	+	+	+	甘露醇 Mannitol	-	-	-	-
O/F	O	O	O	O	木糖 Xylose	-	-	-	-
葡萄糖产气 Gas from glucose	-	-	-	-	山梨醇 Sorbitol	-	-	-	-
氧化酶 Oxidase	+	+	+	+	明胶 Gelatin	-	-	-	-
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	+	+	+	-	尿素 Urea	-	-	-	-
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	-	-	-	-	苦杏仁苷 Amygdale amara	-	-	-	-
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	+	+	+	-	蜜二糖 Melibiose	-	-	-	-
硝酸盐降解 Nitrate reduction	+	+	+	+	鼠礼糖 Rhamnose	-	-	-	-
DNA 酶 DNA Enzyme	-	-	-	-	ONPG	-	-	-	-
乙酰胺酶 Acetamidase	-	-	-	-	产 H ₂ S Production of H ₂ S	-	-	-	-
MR 反应 MR test	-	-	-	-	0%NaCl 生长 Growth at 0%NaCl	-	-	-	-
VP 反应 VP test	-	-	-	-	1%NaCl 生长 Growth at 1%NaCl	+	+	+	+
吲哚反应 Indole test	-	-	-	-	3%NaCl 生长 Growth at 3%NaCl	+	+	+	+
含碳化合物利用 Utilization of carbon-containing compound					6%NaCl 生长 Growth at 6%NaCl	+	+	+	+
蔗糖 Sucrose	-	-	-	-	8%NaCl 生长 Growth at 8%NaCl	-	-	-	-

注:“+”阳性;“-”阴性;“O”氧化型

2.4 16S rDNA 测序

分离菌株 BB01 用于 16S rDNA PCR 扩增和测序。PCR 反应获得约 1 500bp 长度的特异性目的片段,测序后获得 1 398bp 的准确序列,经 BLASTN 比对后显示,序列与恶臭假单胞菌及杀香鱼假单胞菌 *P. pleco-glossicida* 代表种同源性均达 99% 以上。该序列在 GenBank 的登录号为 FJ004920。

表 3 人工感染试验重分离株的形态和主要生理生化特性

Table 3 Morphological, physical and biochemical characteristics of reisolated strains

项目 Item	重分离菌株 Reisolated strains			项目 Item	重分离菌株 Reisolated strains		
	BB01'	BB02'	BB03'		BB01'	BB02'	BB03'
革兰氏染色 Gram stain	—	—	—	氧化酶 Oxidase	+	+	+
形态 Morphology	短杆状	短杆状	短杆状	精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	+	+	+
TCBS 培养基生长 Growth on TCBS agar	+	+	+	硝酸盐降解 Nitrate reduction	+	+	+
41℃ 生长 Growth at 41℃	—	—	—	吲哚反应 Indole test	—	—	—
O/F	O	O	O	产 H ₂ S Production of H ₂ S	—	—	—
葡萄糖产气 Gas from glucose	—	—	—	明胶液化 Gelatin liquidation	—	—	—

注:“+”阳性;“—”阴性;“O”氧化型

2.5 BB01 菌株对抗生素的敏感性

BB01 菌株对多数测试的抗生素种类敏感,包括头孢吡肟、头孢西丁、链霉素、氨苄青霉素、卡那霉素和氧哌嗪青霉素等,而对麦迪霉素和氧氟沙星耐药(表 4)。

表 4 BB01 菌株对 16 种抗生素的敏感性

Table 4 Drug sensitivity of strain BB01 to antibiotics

抗生素种类 Antibiotics		纸片浓度 Concentration (µg/disc)	抑菌圈直径 Diameter of inhibitory zone (mm)	药物敏感性 Sensitivity
头孢吡肟	Cefepime	30	33	S
头孢西丁	Cefoxitin	30	36	S
头孢他定	Ceftazidime	30	35	S
头孢呋肟	Cefuroxime sodium	30	34	S
头孢噻肟	Cefotaxime	30	39	S
先锋必	Cefoperazone	75	23	S
先锋霉素 V	Cefazolin sodium	30	36	S
菌必治	Ceftriaxone sodium	30	34	S
链霉素	Streptomycin	10	28	S
妥布霉素	Tobramycin	10	22	S
氨苄青霉素	Ampicillin	10	38	S
卡那霉素	Kanamycin	30	20	S
氧哌嗪青霉素	Piperacillin	100	36	S
麦迪霉素	Medecamycin	30	12	R
氨曲南	Aztreonam	30	31	S
氧氟沙星	Ofloxacin	5	13	R

注:S为敏感;R为耐药

3 讨论

假单胞菌属细菌种类繁多,种类之间差异性大,许多种类如恶臭假单胞菌、荧光假单胞菌 *P. fluorescens* 和铜绿假单胞菌 *P. aeruginosa* 等是人类的重要临床病原 (Carpenter *et al.* 2008; Sakai *et al.* 1989; Smith *et al.* 2002; Szeto *et al.* 2001); 目前国内也陆续报道了这些种类可引起养殖鱼类和甲壳动物的疾病,如欧洲鳗 *Anguilla anguilla* 烂鳃病、大黄鱼 *Pseudosciaena crocea* 肝肾白点病及罗氏沼虾 *Macrobrachium rosenbergii* 黑鳃病等(樊海平 2001; 沈锦玉等

2008; 陶保华等 2000)。其他一些假单胞菌属种类则作为养殖鱼类病原首次得到分离和鉴定,如 *P. anguilliseptica* 引起鳕鱼 *Gadus morhua*、金鲷 *Sparus aurata* 和大菱鲆 *Scophthalmus maximus* 的冬季综合症 (Balboa *et al.* 2007; Blanco *et al.* 2002; López-Romalde *et al.* 2003)。日本在患出血性腹水症的香鱼中分离到了假单胞菌属的一新种——杀香鱼假单胞菌,其理化特性及 16S rDNA 序列与恶臭假单胞菌生物 B 型呈现了高度的相似性和同源性 (Wakabayashi *et al.* 1996; Nishimori *et al.* 2000)。

本研究分离和鉴定了浙江省象山港养殖黑鲟肠炎病的病原,其中 BB01 株的 16S rDNA 序列与恶臭假单胞菌、杀香鱼假单胞菌均存在高度的同源性,同时该菌的主要理化特性与恶臭假单胞菌基本相同;虽然该菌多数理化特性也与杀香鱼假单胞菌非常接近 (Nishimori *et al.* 2000),但本研究中的分离菌株 4℃ 生长,赖氨酸脱羧酶阴性,与杀香鱼假单胞菌不同;结合形态和生理生化特性及 16S rDNA 序列分析结果,分离株 BB01、BB02 和 BB03 可以鉴定为恶臭假单胞菌。

近年来,研究者们从浙江省象山港海域养殖的患肝肾结节病的大黄鱼体内分离到了数种假单胞菌种类(刘家富等 2004; 沈锦玉等 2008),其中沈锦玉等(2008)的研究表明了病原菌为恶臭假单胞菌;本研究自同一海域相

同季节患肠炎病的黑鲷体内也鉴定了该种病原菌。恶臭假单胞菌事实上是海淡水鱼类肠道菌群的重要成员之一(周志刚等 2007)。环境中的恶臭假单胞菌也可能随食物进入肠道,在一定条件下该菌异常增殖,破坏了肠道内正常菌群的平衡而造成鱼体发病。不过,不同鱼类感染该菌引起的症状存在差异性,其中的机理尚不清楚。

在海水养殖鱼类中,已经报道了坎贝氏弧菌 *V. carchariae* 能够引起胃肠炎症状,特征表现为肠道肿胀,充满黄色黏液(Lee *et al.* 2002; Yii *et al.* 1997)。拟态弧菌则在夏季引起黑鲷幼鱼腹水症(王国良等 2003)。弧菌的最适生长温度为 20~25 °C,多数弧菌病在此温度范围内发生。本研究分离的恶臭假单胞菌在 4 °C 也能生长,这种低温生长特性正与疾病暴发季节相符,3 月上中旬发病水温约为 12 °C 左右。可以推测,在 1 年中的不同季节,养殖环境中存在的病原菌优势种类(如弧菌和假单胞菌等)不同,但均可以在一定条件下感染黑鲷,引起发病,表现出相似的症状。

本研究结果显示了分离菌 BB01 对多数测试的抗生素药物敏感,而对氧氟沙星耐药,提示了该菌可能是养殖水环境中的土著成员,因为在过去,喹诺酮类抗生素包括氧氟沙星等曾经被广泛地应用于鱼类疾病防治。

综上所述,恶臭假单胞菌已经成为低温季节养殖鱼类的重要病原。有必要深入研究该菌的致病机制,如感染途径和毒力因子等,从而为该病的预防提供必要的技术支撑。

参 考 文 献

- 王国良,郑天伦,金 珊,陆彤霞. 2003. 养殖黑鲷腹水病病原菌. 中国兽医学报, 23(1): 33~35
- 刘家富,余祚澥,林水添,陈洪清,谢文秋. 2004. 大黄鱼假单胞菌病的初步研究. 海洋科学, 28(2): 5~7
- 刘端炜,赵广苗,任全娜. 2002. 黑鲷池塘养殖技术. 中国水产, (9): 53~62
- 沈锦玉,余旭平,潘晓艺,许文军,尹文林,曹 铮. 2008. 网箱养殖大黄鱼假单胞菌病原的分离与鉴定. 海洋水产研究, 29(1): 1~6
- 周志刚,石鹏君,姚 斌,何凤旭,苏永全. 2007. 海水鱼消化道菌群结构研究进展. 海洋水产研究, 28(5): 123~131
- 陶保华,石和荣,黄俊文,王 刚. 2000. 假单胞菌引起罗氏沼虾黄鳃、黑鳃病的研究. 中山大学学报(自然科学版), 39(21): 255~259
- 蔡厚才,叶 鹏,谢秉笑,蔡开宽,金杨德. 2004. 南鹿海区真鲷深水网箱养殖技术. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 23(4): 347~350, 377
- 潘晓艺,沈锦玉,尹文林,曹 铮,马海其,常抗美. 2005. 黑鲷分离哈维氏弧菌 BK-1 的最适培养条件研究. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 24(3): 240~243
- 樊海平. 2001. 恶臭假单胞菌引起的欧洲鳗鲡烂鳃病. 水产学报, 25(2): 147~150
- Balboa, S., Ferguson, H. W., and Romalde, J. L. 2007. Phenotypic, serological and genetic characterization of *Pseudomonas anguilliseptica* strains isolated from cod, *Gadus morhua* L., in northern Europe. J. Fish Dis. 30: 657~664
- Blanco, M. M., Gibello, A., Vela, A. I., Moreno, M. A., Domínguez, L., and Fernandez-Garayzábal, J. F. 2002. PCR detection and PFGE DNA macrorestriction analyses of clinical isolates of *Pseudomonas anguilliseptica* from winter disease outbreaks in sea bream *Sparus aurata*. Dis. Aquat. Org. 50: 19~27
- Carpenter, R. J., Hartzell, J. D., Forsberg, J. A., Babel, B. S., and Ganesan, A. 2008. *Pseudomonas putida* war wound infection in a US Marine; a case report and review of the literature. J. Infect. 56: 234~240
- Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 17th informational supplement M100~S17. Wayne, P. A.; Clinical and Laboratory Standards Institute
- Lee, K. K., Liu, P. C., and Chuang, W. H. 2002. Pathogenesis of gastroenteritis caused by *Vibrio carchariae* in cultured marine fishes. Mar. Biotech. 4: 267~277
- López-Romalde, S., Magariños, B., Ravelo, C., Toranzo, A. E., and Romalde, J. L. 2003. Existence of two O-serotypes in the fish pathogen *Pseudomonas anguilliseptica*. Vet. Microbiol. 94: 325~333
- Nishimori, E., Kita-Tsukamoto, K., and Wakabayashi, H. 2000. *Pseudomonas plecoglossicida* sp. nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 83~89
- Smith, J., Ashhurst-Smith, C., and Norton, R. 2002. *Pseudomonas fluorescens* pseudobacteraemia; a cautionary lesson. J. Paediatrics Child Health, 38: 63~65
- Szeto, C. C., Chow, K. M., Leung, C. B., Wong, T. Y. H., Wu, A. K. L., Wang, A. Y. M., Liu, S. F., and Li, P. K. T. 2001. Clinical course of peritonitis due to *Pseudomonas* species complicating peritoneal dialysis; a review of 104 cases. Kidney International, 59: 2 309~2 315
- Wakabayashi, H., Sawada, K., Ninomiya, K., and Nishimori, E. 1996. Bacterial hemorrhagic ascites of ayu caused by *Pseudomonas* sp. Fish Pathol. 31: 239~240
- Yii, K. C., Yang, T. I., and Lee, K. K. 1997. Isolation and characterization of *Vibrio carchariae*, a causative agent of gastroenteritis in the groupers, *Epinephelus coioides*. Curr. Microbiol. 35: 109~115