

银鼓鱼病原菌(海豚链球菌)的分离与鉴定

罗璋^{1,2} 许杰² 韩进刚² 徐赟霞² 马文婷² 冯守明¹

1. 天津市水产研究所, 天津 300221; 2. 天津市水产养殖病害防治中心, 天津 300221

摘要 从患病濒死的银鼓鱼(*Selenotoca multifasciata*)肾脏组织中分离到 Yg1 菌株, 用该菌株对健康银鼓鱼进行人工感染, 可使其致病, 发病症状与自然病鱼症状一致, 再分离菌株的各种特性与原分离菌株相同。通过 ATB 系统和菌体常规形态特征、生理生化反应指标测定以及 16S rRNA 测序分析等综合鉴定, Yg1 菌株为海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)。药敏试验结果表明, Yg1 菌株对恩诺沙星、土霉素、罗红霉素、强力霉素、四环素、左氟沙星等抗生素较为敏感。

关键词 银鼓鱼; 病原菌; 海豚链球菌; 药敏试验; 抗生素

中图分类号 Q 959.483 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)01-0095-05

银鼓鱼(*Selenotoca multifasciata*)属鲈形目、鲈亚目、金钱鱼科、*Selenotoca* 属。原产于印度尼西亚、菲律宾、泰国等地, 成鱼体长 20~30 cm, 体扁圆形, 银白色, 体表两侧腹部有稀疏的数十黑色圆斑, 似金钱状, 形态别致, 深受水族爱好者喜欢, 是一种名贵观赏鱼。

2009 年 3 月, 天津市津南国家农业园区某观赏鱼养殖场暴发了严重的银鼓鱼病害, 发病率达 50% 以上。患病鱼主要症状表现为反应迟钝、转圈、狂游、单侧、摄食量减少, 体表、眼球等部位有少量充血、眼球突出、肝脏、肾脏呈糜烂状。笔者所在实验室人员在此次发病的银鼓鱼进行了病原分离、分类鉴定、人工感染及药物敏感性研究, 旨在丰富银鼓鱼病原学的内容以及为银鼓鱼病害防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验鱼

患病银鼓鱼于 2009 年 3 月采自天津市津南区某观赏鱼养殖场, 体长(16.4±2.3) cm。健康银鼓鱼购于天津市龙泉观赏鱼养殖场, 体长(18.2±1.4) cm, 饲养于 80 cm×60 cm×40 cm 的玻璃缸中, 充气, 每天投喂 2 次观赏鱼浮性饲料, 暂养 7 d 后开始试验。

1.2 病原菌的分离

在无菌操作下从濒死病鱼肾脏取样, 在脑心浸

液琼脂(BHI)平板表面划线分离, 28℃培养 48 h, 选取优势菌的单菌落进一步划线纯化, 直至获得纯培养 Yg1 菌株, 转接脑心浸液琼脂斜面保存、备用。

1.3 人工感染试验

将 Yg1 菌株接种于脑心浸液琼脂斜面, 28℃培养 24 h, 用无菌生理盐水洗下菌苔, 制成菌悬液, 用麦氏比浊法调整菌液浓度为 3.0×10^6 cfu/mL。腹腔注射健康鱼 5 尾, 注射剂量为 0.2 mL/尾, 对照组鱼注射 0.75% 生理盐水, 注射剂量同上。试验组鱼分置于各玻璃缸中, 28℃水温饲养。定时观察记录, 取濒死鱼的肝脏、肾脏进行细菌再分离, 所分离菌株(编号为 Yg2)再次感染健康银鼓鱼, 观察结果。

1.4 细菌学常规鉴定

Yg1 菌株和 Yg2 菌株的形态、生理生化特性试验按文献[1-2]的方法进行。

1.5 ATB 系统鉴定

按照 rapid ID 32 STREP 试剂条说明书操作。

1.6 16S rRNA 序列测定与分析

1) 16S rRNA 序列的 PCR 扩增与测序。采用细菌 16S rRNA 序列扩增的通用引物(正向引物为 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 反向引物为 1492R: 5'-TACGGCTACCTTGTTACGCTT-3')[³], 对纯培养的细菌 16S rRNA 序列进行 PCR 扩增。反应体系(100 μL): 10×Buffer 10 μL,

收稿日期: 2011-04-28

基金项目: 天津市基金面上项目(11JCYBJC08800)、天津市科技发展项目(06YFGZNC001300)

罗璋, 硕士, 助理研究员。研究方向: 水产养殖动物病害防治。E-mail: luozhang2001@tom.com

通讯作者: 冯守明, 副研究员。研究方向: 水产养殖动物病害防治。E-mail: smfeng65@163.com

MgCl₂ (25 mmol/L) 10 μL, dNTP (各 10 mmol/L) 2 μL, DNA 模板 2 μL, P1、P2 引物 (10 μmol/L) 各 2 μL, TaqDNA 聚合酶 (5 U/μL) 1 μL, 超纯水 71 μL。反应程序: 95 °C 预变性 6 min; 接着 94 °C 变性 1 min, 52 °C 复性 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环; 72 °C 温育 6 min。扩增产物交由上海生工生物工程技术有限公司进行双向测序。

2) 序列分析与系统发育树的构建。测序结果与所有已登录 GenBank 的基因片段进行同源性比较, 选取已登录的链球菌属 16S rRNA 基因序列, 采用 ClustalX 1.8 软件进行多序列匹配排列, 采用邻位相连法构建系统发育树, 通过自举分析进行置信度检测, 自举数集 1 000 次。

1.7 药敏试验

28 °C 培养过夜的液体培养物以麦氏比浊法调节菌液浓度至 10⁸ cfu/mL, 取菌液 100 μL 均匀涂布 BHI 平板, 适当干燥后贴药敏纸片, 28 °C 培养 48 h 后测定抑菌圈直径, 按产品说明书判定对药物的敏感度。

2 结果与分析

2.1 人工感染试验

试验组 5 尾银鼓鱼于感染第 3 天出现死亡, 5 d 内全部死亡。对照组继续观察 1 周没有出现任何病症。人工感染后试验鱼发病症状同自然发病鱼。死鱼解剖后, 可见肝脏发白, 与自然发病的患鱼症状基本相似, 对照组健康活泼不表现任何症状。从感染后的病鱼肾脏中再次分离细菌, 用优势菌 Yg2 再次感染银鼓鱼, 得到相同的结果。

2.2 病原菌常规鉴定结果

病原菌呈革兰氏阳性, 菌体球形, 常呈链状分布 (图 1)。不运动, 不产生孢子。菌株生长缓慢, 在脑心浸液琼脂平板上 28 °C 培养 48 h 后, 菌落呈圆形, 湿润, 不透明, 边缘整齐, 乳白色, 菌落直径约为 0.5~1.0 mm。在脑心浸液培养基中底层呈混浊生长, 表层较清亮, 一摇菌体即均匀散开, 整管培养基成浑浊状。根据常规生理生化测试可初步判断 Yg1、Yg2 菌株为海豚链球菌, 具体常规生理生化特征见表 1。

2.3 ATB 系统鉴定结果

运用 ATB 鉴定细菌对 Yg1、Yg2 菌株进行鉴定, 鉴定结果为不可接受的生化谱。具体生化反应见表 2。

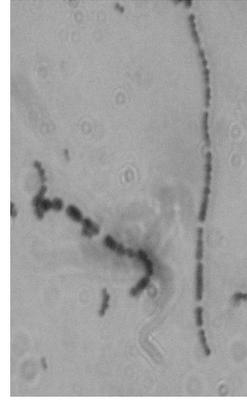


图 1 Yg1 菌株的显微形态

Fig. 1 Micrograph of the isolate Yg1 (×1 000)

表 1 Yg1、Yg2 菌株的部分生理生化特征¹⁾

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of Yg1 and Yg2

项目 Items	Yg1	Yg2	项目 Items	Yg1	Yg2
革兰氏染色 Gram stain	+	+	运动性 Motility	-	-
10 °C 生长 10 °C growth	-	-	接触酶 Catalase	-	-
45 °C 生长 45 °C growth	-	-	甲基红试验 MR reaction	+	+
V-P	-	-	七叶苷 Esculin hydrolysis	+	+
Vogus-proskauer	-	-	蔗糖 Sucrose	+	+
6.5% NaCl	-	-	甘露醇 Mannito	-	-
葡萄糖 Glucose	+	+	葡萄糖产气 Glucose gas production	-	-
山梨醇 Sorbito	-	-	海藻糖 Fucose	+	+
溶血类型 Hemolysis	β	β	水杨苷 Salicin	+	+
乳糖 Lactose	-	-	菊糖 Inulin	-	-
阿拉伯糖 Arabirose	-	-	脲酶 Urease	-	-
棉籽糖 Raffinose	-	-			
山梨醇 Sorbitol	-	-			

1) “+”表示反应结果阳性; “-”表示反应结果阴性。下表同。

“+” represents positive reaction results; “-” represents negative reaction results. The same as below.

2.4 16S rRNA 的 PCR 扩增结果与系统发育树分析

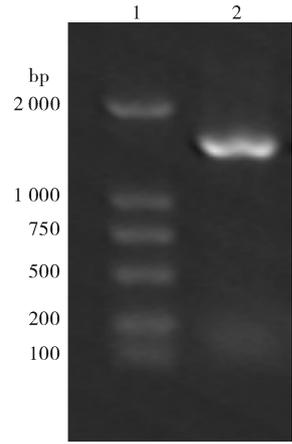
以 Yg1 菌株的总 DNA 为模板, 经细菌通用引物 27F 和 1492R 扩增到约 1 500 bp 条带, 见图 2。将测序产物 1 168 bp 的序列 (GenBank 登录号 GQ169798) 与 GenBank 中所用已登录的链球菌属 16S rRNA 基因进行匹配排列, 构建系统发育树 (图 3), 结果表明 Yg1 菌株与 *S. iniae* 聚成一群, 与 *S. iniae* ATCC29178 (登录号 DQ303187) 的同源性

表 2 ATB 系统细菌鉴定结果¹⁾

Table 2 Results of bacterial identification by ATB system

生化项目 Items	Yg1	Yg2	生化项目 Items	Yg1	Yg2
乳糖 LAC	-	-	糖原 GLYG	-	-
D-海藻糖 TRE	+	+	D-松三糖 MLZ	+	+
D-密二糖 MEL	-	-	D-甘露醇 MAN	-	-
支链淀粉 PUL	-	-	L-阿拉伯糖 LARA	-	-
D-阿拉伯醇 D-ARL	-	-	环氏糊精 CDEX	-	-
α -半乳糖苷酶 α -GAL	-	-	D-麦芽糖 D-MAL	+	+
尿素酶 URE	-	-	β -甘露醇 β -MAN	-	-
β -葡萄糖醛酸 β -GUR	+	+	β -葡萄糖苷酶 β -GLU	?	?
β -半乳糖苷酶 β -GAL	-	-	β -半乳糖苷酶 β -GAL	-	-
碱性磷酸酶 PAL	-	-	VP 试验 V-P test	+	+
β -N-乙酰葡萄糖胺 β -N-AL	-	-	D-核糖 RIB	+	+
D-塔格糖 TAG	-	-	D-山梨醇 SOR	-	-
蔗糖 SAC	+	+	甲基- β -D-葡萄糖吡喃苷 M- β -DG	-	-
D-棉籽糖 RAF	-	-	丙氨酸苯丙氨酸脯氨酸芳酰胺 APPA	+	+
精氨酸双水解酶 ADH	?	?	焦谷氨酸芳酰胺 PYRA	-	-
马尿酸盐 HIP	-	-	甘氨酸色氨酸芳酰胺 GTA	-	-

1) “?” 表示反应结果不明确。“?” represents no reaction results.



1. DNA marker; 2. 16S rRNA gene of Yg1.

图 2 Yg1 菌株 16S rRNA 基因 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplification of 16S rRNA gene

最高,为 98%。因此,综合各方面试验结果,可将 Yg1 菌株鉴定为海豚链球菌。

2.5 药敏试验

从 Yg1 菌株对 12 种药物的药敏试验结果可知,该菌株对恩诺沙星、土霉素、罗红霉素、强力霉素、四环素、左氟沙星等 6 种抗生素敏感,对链霉素、头孢氨苄、氨苄青霉素、呋喃唑酮、磺胺甲基异噁唑等 5 种抗生素不敏感(表 3)。

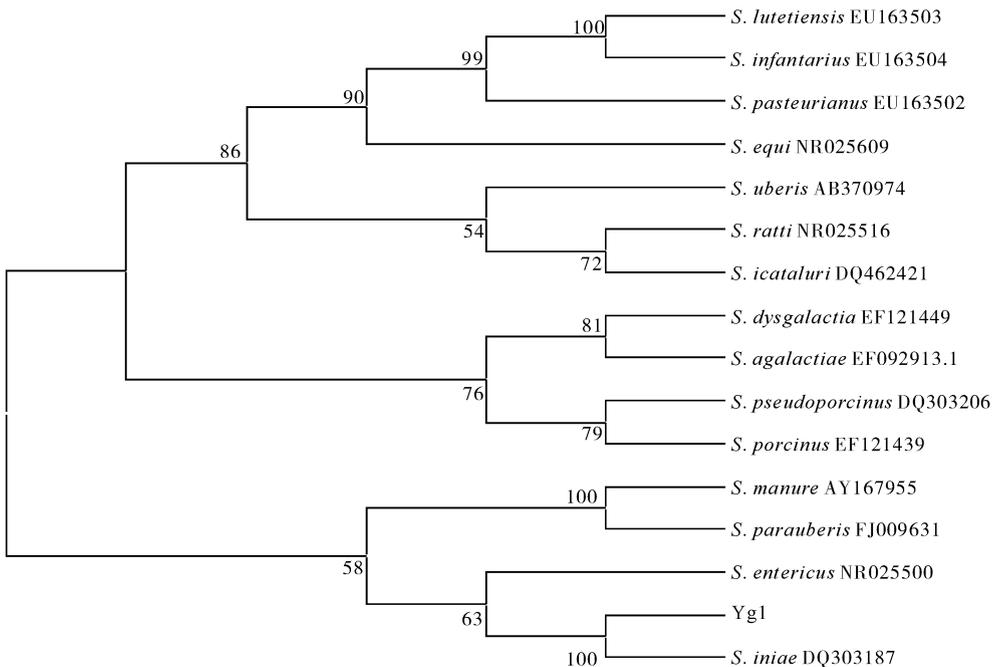


图 3 Yg1 菌株的 16S rDNA 基因序列分析聚类结果

Fig. 3 Clustering result of gene sequence of 16S rDNA of the bacterial strain Yg1

表 3 菌株 Yg1 药敏试验结果¹⁾

Table 3 Result of drug sensitivity test to strain Yg1

药物 Drug	敏感性 Sensitivity	药物 Drug	敏感性 Sensitivity
恩诺沙星 Enrofloxacin	S	罗红霉素 Roxithromycin	S
链霉素 Streptomycin	R	强力霉素 Doxycycline	S
头孢氨苄 Cephalexin	R	呋喃唑酮 Furazolidone	R
土霉素 Oxytetracycline	S	四环素 Tetracycline	S
氨苄青霉素 Ampicillin	R	左氟沙星 Levofloxacin	S
磺胺甲基异噁唑 Sulfamet hoxazole	R		

1)“S”表示敏感;“R”表示耐药。“S” represents sensitive;“R” represents resistant.

3 讨论

人工注射感染试验结果表明, Yg1 菌株对健康银鼓鱼表现较强的致病力, 可使健康鱼体出现与自然病鱼相似的症状, 并从人工感染病鱼体内分离到各种特性与原分离菌株相同的细菌, 故认为 Yg1 菌株是引起此次银鼓鱼病害的致病菌。

目前, 对于细菌的鉴定主要有 3 种方法: 常规生理生化方法、自动鉴定仪和分子生物学方法。不管是传统的生化鉴定还是全自动微生物鉴定仪鉴定或是借助分子生物学的鉴定方法都存在不容忽视的缺陷, 在进行微生物种类鉴定的时候应采用各种方法取长补短互相补充, 才能保证鉴定结果的客观性和科学性^[4]。本试验先用常规生理生化方法将病原菌初步鉴定为海豚链球菌, 然后使用 ATB 细菌自动鉴定仪进行鉴定。对于链球菌属的细菌而言, ATB 细菌鉴定仪只能鉴定包括副血链球菌 (*Streptococcus parasanguis*)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、乳房链球菌 (*Streptococcus uberis*) 等在内的 30 种链球菌, 海豚链球菌未包括在其数据库中, 所以导致 ATB 自动鉴定中出现不可接受生化谱的试验结果。随着分子生物学的发展, 现代细菌分类鉴定从传统的表型分类进入基因型分类水平, 16S rRNA 分析已成为研究细菌分类的常用工具, 并广泛应用于水产动物细菌性病原的鉴定^[4-7]。本试验通过 3 种方法相结合, 将 Yg1 菌株鉴定为海豚链球菌。

本试验 PCR 产物的测序结果要比预期扩增片

段小, 原因是双向测序中其中一个反应由于信号弱而未被测全, 由于大部分序列已测出, 没有影响到结果的比较, 所以对本试验并未造成影响, 必要时可采用克隆测序确保待测序列的完整性。

由链球菌感染引起鱼类的死亡在 20 世纪 70 年代已有零星报道, 90 年代呈上升趋势, 目前链球菌已成为鱼类的重要致病菌之一^[8]。海豚链球菌是目前我国海水养殖鱼类链球菌病的首要病原^[9], 能危害彩虹鲷 (*Oncorhynchus mykiss*)^[10]、罗非鱼 (*Oreochromis spp.*)、杂交条纹鲈 (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*)、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)^[11]、红拟石首鱼 (*Sciaenops ocellatus*)^[12]、美国红鱼 (*Sciaenops ocellatus*)^[13]、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)^[14] 等水产养殖品种。同时可在不同种鱼类之间交叉传播^[14], 并能感染人类, 能引起人蜂窝组织炎、淋巴管炎、败血症、心内膜炎、脑膜炎、骨髓炎等, 属于人鱼共患菌^[12, 15-17]。因此, 由海豚链球菌引起的鱼类病害应给予足够的重视。

药物敏感试验结果表明, 该病原菌株对恩诺沙星、土霉素、罗红霉素、强力霉素、四环素、左氟沙星等药物敏感, 这为生产中治疗药物的选择提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [2] KRIEG N R, HOLT J G. Bergey's manual of systematic bacteriology[M]. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984.
- [3] POLZ M F, CAVANAUGH C M. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(10): 3724.
- [4] 顾泽茂, 柳阳, 陈昌福, 等. 鲍曼不动杆菌斑点叉尾鲷株的分离与鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(4): 489-493.
- [5] 张伟逆, 周丽, 妍婧, 等. 养殖大菱鲆腹水症病原菌 SR1 的分离及鉴定[J]. 中国水产科学, 2006, 13(4): 603-609.
- [6] GAUGER E J, GOMEZ-CHIARRI M. 16S ribosomal DNA sequencing confirms the synonymy of *Vibrio harveyi* and *V. carchariae*[J]. Dis Aquat Organ, 2002, 52(1): 39-42.
- [7] 张波, 曾令兵, 罗晓松, 等. 青鱼肠道出血症病原菌的分离与鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(5): 607-612.
- [8] 张新艳, 樊海平, 钟全福, 等. 罗非鱼无乳链球菌的分离、鉴定及致病性研究[J]. 水产学报, 2008, 32(5): 772-779.
- [9] 周素明, 李安兴, 马跃, 等. 养殖鱼类链球菌病原的分离鉴定及其 16S rDNA 分析[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2007, 46(2): 68-71.

- [10] ELDAR A, GHITTINO C. *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases[J]. *Dis Aquat Org*, 1999, 36(3):227-231.
- [11] SHOEMAKER C A, KLESIOUS P H, EVANS J J, et al. Prevalence of *Streptococcus iniae* in tilapia, hybrid striped bass, and channel catfish on commercial fish farms in the United States[J]. *AJVR*, 2001, 62:174-177.
- [12] 沈智华, 钱冬, 许文军, 等. 红拟石首鱼海豚链球菌分离、鉴定及致病性研究[J]. *水生生物学报*, 2005, 29(6):678-683.
- [13] ELDAR A, PERL S, FRELIER P E, et al. Red drum *Sciaenops ocellatus* mortalities associated with *Streptococcus iniae* infection[J]. *Dis Aquat Org*, 1999, 36:121-127.
- [14] ZLOT-KIN A, HER-SHKO H, ELDAR A. Possible transmission of *Streptococcus iniae* from wild fish to cultured marine fish[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64:4065-4067.
- [15] LEHANE L, RAWLIN G T. Topically acquired bacterial zoonoses from fish; a review[J]. *Med J Aust*, 2000, 173:256-259.
- [16] LAU S K P, WOO P C Y, TSE H, et al. Invasive *Streptococcus iniae* infections outside North America[J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41:1004-1009.
- [17] MITCHELL R, WEINSTEIN M D, MARGARET L, et al. Invasive infections due to a fish pathogen, *Streptococcus iniae* [J]. *N Engl J Med*, 2004, 337(9):589-594.

Isolation and identification of pathogenetic *Streptococcus iniae* from *Selenotoca multifasciata*

LUO Zhang^{1,2} XU Jie² HAN Jin-gang²
XU Yun-xia² MA Wen-ting² Feng Shou-ming¹

1. *Tianjin Fishery Research Institute, Tianjin 300221, China;*

2. *Tianjin Aquiculture Disease Prevention and Cure Center, Tianjin 300221, China*

Abstract One strain Yg1 was isolated from the kidney of diseased *Selenotoca multifasciata*. The healthy *Selenotoca multifasciata* could be infected through artificial infection by these bacteria. The symptoms in artificially infected fish were similar to those infected naturally. The characters of re-isolated strains were the same as the initially isolated strain, which was identified as *Streptococcus iniae* by the means of ATB system, morphological, physiological and biochemical tests, and 16S rRNA sequence analyses. The pathogens were sensitive to the following antibiotics: enrofloxacin, oxytetracycline, roxithromycin, doxycycline, tetracycline, levofloxacin.

Key words *Selenotoca multifasciata*; pathogen; *Streptococcus iniae*; drug sensitive examination; antibiotics

(责任编辑:边书京)