

王 艺,李瑾年,兰 云,等. 鲫鱼鳃中迟钝爱德华氏菌的分离与鉴定[J]. 江苏农业科学,2013,41(5):220-221.

鲫鱼鳃中迟钝爱德华氏菌的分离与鉴定

王 艺¹,李瑾年¹,兰 云¹,胡秀彩²,沈晓静²,李 雪²,吕爱军²

(1. 安徽农业大学动物科技学院,安徽合肥 230036; 2. 江苏师范大学生命科学学院,江苏徐州 221116)

摘要:以市售鲫鱼(*Carassius auratus*)为研究对象,从鳃中分离获得一株细菌,编号为 Et-1,通过细菌形态学观察、理化特征鉴定、16S rDNA 克隆测序及系统发育进化树构建等方法进行系统鉴定,结果表明 Et-1 菌株为革兰阴性杆菌,进一步 PCR 扩增 Et-1 菌株的 16S rDNA 序列为 1 508 bp;系统进化树分析表明,Et-1 菌株与迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)亲缘关系最近,自然聚为一支,序列同源性达 98.7%~100%,最终确定 Et-1 为迟钝爱德华氏菌。

关键词: 鲫鱼;鳃;迟钝爱德华氏菌;分离鉴定;DNA 测序

中图分类号: S917.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)05-0220-02

鲫鱼(*Carassius auratus*)是一种杂食性鱼类,也是水产养殖的优质鱼类。细菌性疾病是造成鲫鱼生产乃至水产业严重损失的重要疾病之一^[1]。爱德华氏菌属(*Edwardsiella*)细菌常引起鱼类的败血症,主要包括迟钝爱德华氏菌(*E. tarda*)、鲢爱德华氏菌(*E. ictaluri*)和保科爱德华氏菌(*E. hoshinae*)^[2]。邓先余等从患红头病的黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)、患腹水病的牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)体内分离获得了迟钝爱德华氏菌病原菌^[3-4]。迟钝爱德华氏菌是爱德华氏菌属的模式种,宿主十分广泛,是感染淡水鱼和海水鱼的主要病原菌之一。此外,迟钝爱德华氏菌是爱德华氏菌属中唯一的人畜共患病病原菌^[5]。

近几年来,鱼类微生态学成为了国内外学者研究的热点之一,尤其在鱼类肠道细菌研究方面取得了一定的进展^[6-7]。但是,目前关于鱼类鳃中细菌分布的研究还不够深入,国内外文献鲜有报道^[5,8]。最近,陈强等采用 16S rDNA 测序等方法对欧洲鳗(*Anguilla anguilla*)迟钝爱德华氏菌进行了分子鉴定,在 GenBank 上经序列比对发现同源率达 99%^[9]。本试验对鱼类鳃中迟钝爱德华氏菌进行了形态特征观察、16S rDNA 测序等系统鉴定,不仅为鱼类鳃中细菌的组成与功能研究提供了科学参考,而且为鱼病防治等奠定了基础。

1 材料与方法

收稿日期:2012-11-01

基金项目:国家自然科学基金(编号:30800847)。

作者简介:王 艺(1987—),女,江苏徐州人,硕士研究生,研究方向为预防兽医学。E-mail:wangyi_870712@163.com。

通信作者:李瑾年,教授,硕士生导师,主要从事微生物与免疫学研究。E-mail:lijinnian2000@163.com。

[2]杨再福,张阿林,赵林娥. 锦鲤的人工繁殖技术[J]. 科学养鱼,1999(1):38.

[3]孙向军,李铁梁,姜 娜. 天然增艳物质对池塘养殖锦鲤体色的影响研究[J]. 饲料工业,2010,31(8):19-20.

[4]闫珊珊. 红白锦鲤着色效果的初步研究[D]. 天津:天津农学院,2010.

[5]韩学哲. 饵料中不同添加剂对观赏鱼体色的影响[D]. 河北大

1.1 材料

鲫鱼(0.2~0.3 kg)购自徐州市某菜市场,迅速带回实验室备用。LB 培养基、SS 琼脂培养基、细菌微量生化鉴定管及三糖铁(TSI)培养基等购自杭州微生物试剂有限公司。细菌基因组提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、PCR Master Mix 等购自上海生工生物工程公司,pMD18-T Vector 试剂盒购自 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌分离、形态观察与生化试验 参照胡秀彩等的方法^[7]进行,将纯化细菌分别接种于 19 种微量发酵管中,29℃培养 24~48 h,观察细菌的生理生化反应。

1.2.2 细菌总 DNA 提取、16S rDNA PCR 扩增及系统发育树分析 采用细菌基因组提取试剂盒提取细菌总 DNA,琼脂糖凝胶电泳检测后保存于 -20℃备用。PCR 扩增反应体系(25 μL):DNA 模版 1 μL,上游引物(27F:AGAGTTTGATCATGGCTCA)1 μL,下游引物(1492 R:GAGAGTTTGATCATGGCTCAG)1 μL,Master Mix 12.5 μL,双蒸水 9.5 μL。PCR 循环参数:94℃预变性 5 min;95℃变性 45 s,55℃退火 45 s,72℃延伸 1 min,30 个循环;72℃延伸 10 min,4℃保存。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果,PCR 产物切胶回收连接 pMD18-T 载体,转化大肠埃希菌 DH5α 筛选阳性克隆,送上海生工生物工程有限公司测序。将 16S rDNA 序列通过 NCBI 的 Blast 检索系统进行序列同源性分析,使用 ClustalX 软件进行多序列比对,采用 MEGA 4 软件邻接法(neighbor joining)构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 分离菌形态及培养特征

从鲫鱼鳃中分离纯化获得 1 株细菌,暂时编号为 Et-1,学,2001.

[6]汪学杰,胡隐昌,牟希东,等. 优质锦鲤的繁殖和培育技术[J]. 内陆水产,2008(5):37-39.

[7]陈万光. 池塘精养日本锦鲤成鱼试验[J]. 淡水渔业,2003,33(5):39-40.

[8]陈万光,张耀武,郭国强. 日本锦鲤亲鱼培育及人工繁殖技术[J]. 安徽农业科学,2007,35(19):5773-5774.

革兰氏染色镜检为革兰阴性小杆菌,单个或成对排列;Et-1菌株接种于SS培养基平板29℃培养24h,多数菌落中心呈黑色且光滑、透明、湿润,为圆形,直径约有1.5~2.0mm;Et-1菌株在TSI培养基斜面呈红色,下部呈黑色。

2.2 主要理化特性

细菌生理生化试验结果表明,Et-1菌株能利用葡萄糖产酸产气,MR试验、半固体试验和硫化氢试验呈阳性,氧化酶试验、VP试验、吡唑试验呈阴性,以上结果基本符合爱德华氏菌属的特征,初步确定Et-1菌株为爱德华氏菌属细菌。

2.3 16S rDNA 克隆及测序结果

以细菌基因组DNA为模板,PCR扩增Et-1菌株的16S rDNA序列,电泳检测发现约在1500bp处有明显目的条带(图1);进一步对16S rDNA测序,结果表明目的片段大小为1508bp。

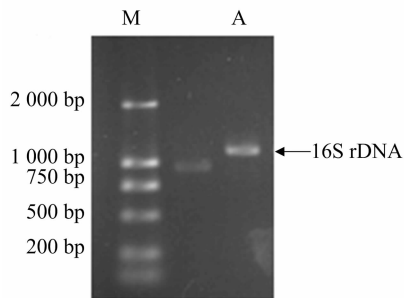


图1 16S rDNA基因PCR电泳结果

2.4 系统发育进化树分析

采用Blast程序对Et-1菌株16S rDNA序列进行同源性检索,结果表明Et-1菌株与迟钝爱德华氏菌16S rDNA序列同源性在98.7%~100%之间,因此最终确定Et-1菌株为*E. tarda*。选取8个遗传距离较近的参比菌株,构建Et-1的系统发育进化树,结果显示Et-1与*E. tarda*(AB050829)参比株的亲缘关系最近,自然聚为一支(图2)。

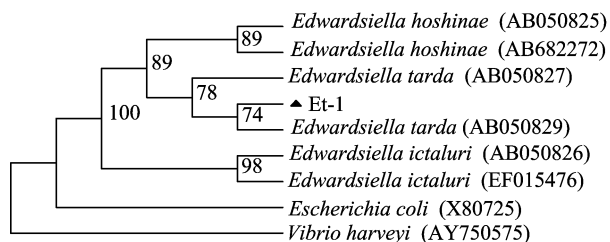


图2 Et-1菌株系统发育进化树

3 讨论

爱德华氏菌(*Edwardsiella*)常能从冷血动物或者其他环境特别是淡水中分离到,对鱼类有致病性,对人类是一种条件致病菌^[2,5]。最近,国内学者相继从患腹水病的牙鲆(*P. olivaceus*)等体内分离到迟钝爱德华氏菌^[3~4]。邓先余等从黄颡鱼中分离到2株细菌,试验发现其生理生化特性与迟钝爱德华氏菌(*E. tarda*)非常相似,最后经16S rDNA测序,确定为迟钝爱德华氏菌^[3]。邓显文等从发病斑点叉尾鲷(*Ictalurus*

Punctatus)皮肤等组织中分离到4株细菌,其中1株为迟钝爱德华氏菌(*E. tarda*),3株为鲟爱德华氏菌(*E. ictaluri*)^[10]。Ling等^[11]报道通过绿色荧光蛋白标记迟钝爱德华氏菌,发现致病性迟钝爱德华氏菌存在于鳃、体表和胃肠道等部位,但非致病性迟钝爱德华氏菌只在胃肠道中检测到,并且在一个周期(即7d)后组织中细菌数量将呈下降趋势,因此推测鳃和体表是致病菌进入宿主体内的特有途径。本试验从市售鲫鱼鳃中分离到细菌Et-1,通过细菌形态学、生理生化试验和细菌16S rDNA分子鉴定,最终确定Et-1菌株为迟钝爱德华氏菌(*E. tarda*),但它能否通过鳃侵入引起健康鲫鱼临床发病,有待深入研究。

鳃既是鱼类的呼吸器官,也是鱼类的重要排泄器官,表面积大、细菌较易聚集,是良好的细菌繁殖基地。因此,研究鱼鳃细菌菌群对了解其生理生态功能和鱼类健康有重要作用。近年来,国内外相关报道主要集中在鱼类病原分离、病理诊断及防治等方面,而有关鱼鳃中细菌生态学的研究报道较少^[5,8]。本试验从市售鲫鱼鳃中分离到迟钝爱德华氏菌,但是并没有引起鲫鱼明显病变,说明该菌很可能为条件致病菌,值得进一步研究。本研究对探讨鱼类水产品食用安全性及在水产养殖过程中防治疾病等具有一定意义。

参考文献:

- [1] Toranzo A E, Magariños B, Romalde J L. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems[J]. *Aquaculture*, 2005, 246 (1/2/3/4): 37-61.
- [2] Mohanty B R, Sahoo P K. Edwardsiellosis in fish: a brief review[J]. *Journal of Biosciences*, 2007, 32(7): 1331-1344.
- [3] 邓先余, 罗文, 谭树华, 等. 黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)“红头病”病原菌迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)的分离及鉴定[J]. *海洋与湖沼*, 2008, 39(5): 511-516.
- [4] 肖颖, 李晓娟, 张亚宁, 等. 牙鲆迟钝爱德华氏菌的分离及其鉴定[J]. *河北师范大学学报: 自然科学版*, 2010, 34(4): 481-486.
- [5] Good C M, Thorburn M A, Ribble C S, et al. Rearing unit-level factors associated with bacterial gill disease treatment in two Ontario, Canada government salmonid hatcheries[J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 2009, 91(2/3/4): 254-260.
- [6] Lü A J, Hu X C, Zheng L, et al. Isolation and characterization of *Citrobacter* spp. from the intestine of grass carp *Ctenopharyngodon idellus*[J]. *Aquaculture*, 2011, 313(1/2/3/4): 156-160.
- [7] 胡秀彩, 王艺, 吕爱军. 弗氏柠檬酸杆菌的分离鉴定与PCR-SSCP分析[J]. *微生物学杂志*, 2011, 31(4): 12-18.
- [8] 张红见, 韩志辉, 李小龙. 鲫鱼鳃中沙门氏菌的分离与鉴定[J]. *青海畜牧兽医杂志*, 2009, 39(2): 21-22.
- [9] 陈强, 龚晖, 杨金先. 欧洲鳊迟钝爱德华氏菌的分离鉴定[J]. *中国人兽共患病学报*, 2011, 27(1): 7-10.
- [10] 邓显文, 谢芝勋, 刘加波, 等. 广西斑点叉尾鲟爱德华氏菌的分离鉴定[J]. *广西农业科学*, 2008, 39(2): 231-235.
- [11] Ling S H M, Wang X H, Lim T M, et al. Green fluorescent protein-tagged *Edwardsiella tarda* reveals portal of entry in fish[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 194(2): 239-243.