

杨秀荣,曾燕玲,魏志琴. 乌江网箱养殖患病加州鲈鱼的细菌分离鉴定与回复感染[J]. 江苏农业科学,2013,41(11):252-254.

乌江网箱养殖患病加州鲈鱼的细菌分离鉴定与回复感染

杨秀荣,曾燕玲,魏志琴

(遵义师范学院生命科学学院/贵州省赤水河流域植物资源保护与应用研究特色重点实验室,贵州遵义 563002)

摘要:利用常用的细菌分离纯化方法从患病加州鲈鱼分离出 6 株菌株,分别编号为 I ~ VI;对这 6 株菌株的 16S rRNA 基因序列进行 PCR 扩增,均得到长约 1 500 bp 的片段;将扩增结果进行测序,并将测序结果输入到美国国立生物技术信息中心(NCBI)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中,用 BLAST 工具对序列进行同源性比对分析。分析结果, I 为微小杆菌属,同源性 98%; II、IV、VI 为巨型球菌,同源性 98%; III 为库特氏菌属,同源性 99%; V 为不动杆菌属,同源性 99%。分别将这几种细菌接种到健康加州鲈鱼体内,均能引起加州鲈鱼患病,巨型球菌的危害更大。

关键词:加州鲈鱼;细菌;分子鉴定;16S rRNA;回复感染

中图分类号: S943.211.42 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)11-0252-03

加州鲈鱼(*Micropterus salmonides*)属鲈形目,太阳鱼科^[1],原产于美国密西西比河。我国 1983 年引进,1985 年人工繁殖获得成功^[2]。由于加州鲈鱼生长快、肉味鲜美、易于养殖、经济效益高等特点,现在已经成为乌江网箱养殖重要的鱼类品种之一。随着工农业发展和人口增长,每年都有大量的工业和生活污水流入乌江,使乌江水质变差,鱼病发生频繁,给加州鲈鱼养殖造成了很大的经济损失,导致有的养殖户想养而不敢养殖加州鲈鱼,因此,加州鲈鱼病害的防治显得十分迫切。

目前,rRNA 与 rDNA 作为分子指标广泛应用于细菌遗传特征和分子差异研究^[3]。大量已知细菌的 rRNA 基因数据已被测定并输入了国际基因数据库,成为细菌鉴定和分类的参照系统^[4]。本研究以患病的加州鲈鱼为材料,利用常用的细菌分离纯化方法进行分离,对分离所得菌株采用 16S rRNA 基因序列测定,将测序结果输入国际基因数据库,通过同源性比对鉴定致病菌。再将分离到的细菌接种到健康加州鲈鱼体内,进一步证实分离到的细菌是致病性细菌或环境中的无关菌,以期对加州鲈鱼病害的防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

患病加州鲈鱼标本(6 尾)于 2008 年 4 月采自乌江上游主要支流中的偏岩河养殖场(遵义县境内),采集时标本材料个体病症相似。其中 2 尾加州鲈鱼病症为烂鳃、烂鳍,体表发红;4 尾加州鲈鱼病症为烂鳃、烂鳍,体表、肠发红,肠道出血。

1.2 细菌的分离

用无菌棉签分别沾取病鱼体表患处、鳃部、肠内溶物、体内血液、肝脏表面和内部等处液体,分别涂布于营养琼脂培养基平板上。接种后的平板倒置于 27 ℃ 恒温培养箱中培养 12 h。长出菌落后取出平板,将平板中不同的菌落分别转接

到空白营养琼脂培养基平板中,转接的平板仍然倒置于 27 ℃ 恒温箱中培养 12 h。重复此步骤几轮,直至 1 个平板中只长有 1 种菌落。

1.3 细菌的形态观察

将纯化后的平板取出,对所得的几个菌株先进行菌落形态观察,然后再进行革兰氏染色、观察。

1.4 细菌的生理生化鉴定

对所得菌株进行糖发酵试验(蛋白胨水培养基)、柠檬酸盐试验(柠檬酸盐培养基)、硝酸盐还原试验(硝酸盐培养基)、V-P 试验(葡萄糖蛋白胨水培养基)、甲基红试验(葡萄糖蛋白胨水培养基)等 5 种试验^[5],用于分析该菌株对碳源、氮源的利用情况以及其他的生理生化性质。根据糖酵解试验、生化试验等传统微生物学方法进行初步鉴别,然后选择不同菌株进行分子生物学鉴定。

1.5 基因组 DNA 的提取、16S rRNA 基因的扩增、测序及数据处理

参见李顺等的方法^[6]。

1.6 回复感染

1.6.1 细菌的培养 将分离到的细菌接种于营养琼脂培养基平板上,置于 27 ℃ 隔水式恒温箱中培养,直至长出菌落。

1.6.2 细菌悬液制作 取出已长出菌落的平板,在超净工作台上用灭过菌的生理盐水洗下菌苔装于试剂瓶中,制作好后将试剂瓶保存于 4 ℃ 冰箱中。

1.6.3 感染加州鲈鱼 用于回复感染的健康加州鲈鱼取于乌江偏岩河养殖场网箱,体长 10 ~ 15 cm,体重 30 ~ 50 g,每组 10 尾。以肌肉注射(1 mL/尾)感染试验鱼,对照组注射相同剂量的生理盐水。将以上试验鱼置于 3 m × 3 m 的水泥鱼池中,水深 70 cm,连续充氧,观察 2 周。

1.6.4 细菌悬液浓度测定 用紫外分光光度计测定细菌悬液的吸光度,用平板菌落计数法测定细菌悬液中的活菌数目。

2 结果与分析

2.1 菌落外部形态、革兰氏染色

通过比较菌落外部形态与革兰氏染色的结果,从 6 尾患病加州鲈鱼中共得到 6 株不同菌株(表 1)。

收稿日期:2013-04-10

基金项目:贵州省遵义市科技项目[编号:遵市科合社字(2007)21 号]。

作者简介:杨秀荣(1962—)男,贵州沿河人,副教授,主要从事遗传学、鱼类疾病研究。E-mail: yangxiurong7525@163.com。

表 1 6 株细菌菌落形态和革兰氏染色

菌株	厚薄	大小	表面	边缘	隆起形状	颜色	革兰氏染色
I	厚	大	光滑	光滑	扁平	淡黄色	+
II	厚	中等	光滑	光滑	扁平	白色	-
III	厚	小	光滑	光滑	隆起	乳黄色	+
IV	薄	小	光滑	光滑	扁平	黄色	-
V	薄	大	光滑	规则	扁平	淡黄色	-
VI	厚	中等	光滑	光滑	扁平	白色	-

注：“+”表示革兰氏阳性菌，“-”表示革兰氏阴性菌。

2.2 糖酵解试验

对 6 株菌株进行了糖酵解试验,结果见表 2。

表 2 6 株细菌糖酵解试验

菌株	淀粉		乳糖		甘露醇		蔗糖		麦芽糖	
	颜色	产气	颜色	产气	颜色	产气	颜色	产气	颜色	产气
I	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
II	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-
III	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
IV	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
V	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
VI	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+

注:颜色变化中“+”表示变黄,“-”表示无变化;产气中“+”表示产气,“-”表示不产气。

2.3 生化试验

对 6 株菌株进行了生化试验,结果见表 3。

2.4 16S rRNA 基因的扩增

对分离到的 6 个菌株的 16S rRNA 基因用通用引物 27f、1525r 进行 PCR 扩增,均扩增出 1 条约 1.5 kb 的片段(图 1)。

表 3 6 株细菌生化试验

菌株	柠檬酸盐	硝酸盐	V-P 试验	甲基红
I	-	+	+	-
II	+	-	+	-
III	-	-	-	+
IV	+	-	+	-
V	-	-	-	+
VI	-	-	+	-

注:“+”表示“阳性”或“能利用”;“-”表示“阴性”或“不能利用”。

M 1 2 3 4 5 6

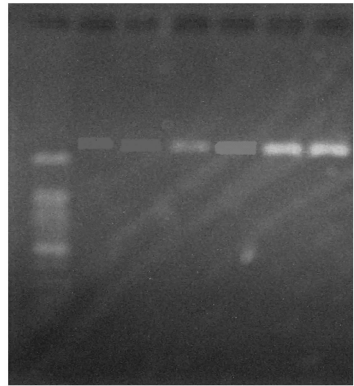


图1 6株菌株16S rRNA基因PCR扩增
(M为100 bp ladder)

2.5 16S rRNA 测序

6 号菌株的测序结果(1 441 bp,不包括引物序列)见表 4 (其余菌株的测序结果略)。

表 4 6 号菌株的 16S rRNA 基因片段序列

序号	测序结果
1	TCGCTCTCTTACCATGCAGTCGAGCGGGGAAAAGTAGCTTGCTACTGGACCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG
81	AATCTGCCTATTAGTGGGGGACAAACATCTCGAAAGGGATGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCT
161	TCGGGCCCTTGCCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTGTGGGTAAAGGCCCTACCAAGCGCAGCATCTGTGA
241	GCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
321	GGACAATGGGGGAACCTGTATCCAGCCATGCCCGCTGTGTGAAGAAGGCCTTTTGGTTGTAAAGCACTTTTAAGCGAGGA
401	GGAGGCTACCGAGATTAATACTCTTGGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCG
481	CGGTAATACAGAGGCTGCAAGCGTTAATCGGATTTACTGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGCCAAATTAAGTCAAAATGTGA
561	AATCCCCGAGCTTAACCTTGGGAATTGCATTTCGATACTGCTTGGCTAGAGTATGGGAGAGGATGGTGAATTTCCAGGTGTA
641	GCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAATACTGACACTGAGGTGCCAA
721	AGCATGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCCTTTGAGG
801	CTTAGTGGCGCAGCTAACCGGATAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTAAACCTCAAAATGAATTGACGGG
881	GGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATAGTAAGAACT
961	TTCCAGAGATGGATTGGTGCCCTTCGGGAACCTTACATACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTG
1 041	GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTTTCCTTATTTGCCAGCGGGTTAAGCCGGGAACCTTTAAGGATACTGCCAGTG
1 121	ACAAACTGGAGGAAGCGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGG
1 201	TACAAAGGGTTGCTACCTCGCGAGAGGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACT
1 281	CCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTCACACCCGCCCGT
1 361	CACACCATGGGAGTTGTGTGCACCAGAAGTAGGTAGTCTAACCTTAGGGGGACGCTACCACGATGGCCCGT

2.6 菌株的鉴定

对 16S rRNA 基因部分序列正、反方向测序的结果进行拼接,将拼接后的测序结果输入到 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。利用 BLAST 工具,对序列进行同源性

比对分析,结果见表 5。

2.7 回复感染

将初步鉴定的以上细菌分别接种到健康加州鲈鱼,均能导致加州鲈鱼患病,开始死亡时间、死亡率、主要症状见表 6。

表 5 6 株菌株与相似序列的菌种名称、登录号、同源性

菌株	相似菌种	登录号	同源性 (%)
I	<i>Exiguobacterium sibiricum</i>	NC010556.1	98
II	<i>Macrococcus caseolyticus</i>	FJ263452.1	98
III	<i>Kurthia gibsonii</i>	AM184261.1	99
IV	<i>Macrococcus caseolyticus</i>	AP009484.1	98
V	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	DQ289068.1	99
VI	<i>Macrococcus caseolyticus</i>	AP009484.1	98

对照组症状不明显。

3 讨论

随着现代生物技术的发展,DNA 分子鉴定技术在生物分子鉴定中被广泛应用。16S rRNA 基因序列分析技术在微生物分子检测及分类鉴定中得到了广泛的应用。以 16S rRNA 基因为目的基因现代分子生物学技术能精确揭示微生物种类及遗传的多样性,使 16S rRNA 基因序列分析成微生物分类鉴定的主要依据,已被广泛应用到菌种鉴定、群落对比分析、

表 6 6 株菌株回复感染结果

菌株	菌液吸光度	菌液活菌数 ($\times 10^8$ 个/mL)	接种后死亡时间 (d)	死亡率 (%)	主要症状
I	0.149	0.556	2	40	头部充血,腹腔内有黄色积液
II	0.153	0.650	2	50	体表掉鳞、出血
III	0.036	0.137	2	40	鳃丝变色
IV	0.668	2.330	4	80	身体表面黏液较重、掉鳞明显,肠道充血
V	0.065	0.247	2	50	鳃丝变色
VI	0.632	2.120	3	80	身体表面黏液重、掉鳞、鳍、肠道充血

群落中系统发育及多样性的评估等领域,是一种客观和可信度较高的分类和鉴定方法^[7]。

本研究应用常用的细菌分离纯化方法,从患病加州鲈鱼中分离出了 6 株菌株,分别扩增出了 16S rRNA 基因约 1 500 bp 的片段。一般认为,16S rDNA 序列同源性大于 98%,可以认为属于同一种;同源性大于 95%而小于 98%,可以认为是同一个属的不同种;同源性在 93%~95%之间,可以认为属于不同的属^[8]。通过对这 6 个菌株的 16S rRNA 基因序列进行同源性比对分析,初步鉴定 I 为微小杆菌属,同源性 98%;II、IV、VI均为巨型球菌,同源性 98%;III为库特氏菌属,同源性 99%;V为不动杆菌属,同源性 99%。

将初步鉴定的细菌接种到健康的加州鲈鱼,微小杆菌、巨型球菌、库特氏菌、不动杆菌等均能导致加州鲈鱼患病。不同病菌导致加州鲈鱼的死亡率不一样,说明不同病菌致病能力可能不同。

对细菌引起鱼类病害的研究中,郭全友等从海水养殖的大黄鱼体内分离到了不动杆菌^[9],但未对其致病性进行分析。不动杆菌可引起人类伤口感染、尿道感染^[10],但它能否引起鱼类患病国内还未见报道。1983 年 Collins 等从马铃薯加工流出物中分离出嗜碱菌株,提出了微小杆菌属。第一个被发现的菌种为金橙黄微小杆菌,模式种。大部分为新认识的细菌,研究较少,未见其引起鱼类疾病的报道。巨型球菌和库特氏菌也未见引起动物疾病的报道。

参考文献:

[1] 沈玉帮,张俊彬,李家乐. 草鱼种质资源研究进展[J]. 中国农学通报,2011,27(7):369-373.
[2] 雷慧僧,薛镇宇,王 武. 池塘养鱼新技术[M]. 北京:金盾出版社,1997:380.
[3] 屈良鹄. 微生物系统发育的分子遗传学研究概述[M]. 上海:复旦大学出版社,1993:65-70.
[4] 周 惠,屈良鹄. 5 种新分离细菌的分子鉴定及分类[J]. 中山大学学报:自然科学版,1999,38(1):120-122.
[5] 杜连祥,路福平. 微生物学实验技术[M]. 北京:中国轻工业出版社,2006:30-52.
[6] 李 顺,王庆容. 乌江网箱养殖丁鲷细菌的分离与分子鉴定[J]. 西南师范大学学报:自然科学版,2009,4(5):147-152.
[7] 雷正瑜. 16S rDNA 序列分析技术在微生物分类鉴定中的作用[J]. 湖北生态工程职业技术学院学报,2006,4(1):4-7.
[8] Fry N K, Warwick S, Saunders N A, et al. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family Legionellaceae[J]. Journal of General Microbiology, 1991, 137(5): 1215-1222.
[9] 郭全友,杨宪时,许 钟. 养殖大黄鱼细菌菌群分离鉴定与分析[J]. 微生物学通报,2006,33(3):92-97.
[10] 王凌伟,陈升汶. 不动杆菌微生物学耐药研究新进展[J]. 国外医药:抗生素分册,2004,25(3):134-137.