

# 龙胆石斑鱼源美人鱼发光杆菌的生物学特性与系统发育学分析

张晓君<sup>1</sup> 秦国民<sup>1</sup> 陈翠珍<sup>2</sup> 房海<sup>2</sup> 阎斌伦<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>淮海工学院海洋学院 江苏省海洋生物技术重点建设实验室, 连云港 222005)

(<sup>2</sup>河北科技师范学院动物科学系, 秦皇岛 066600)

**摘要** 对从1尾病死的观赏用龙胆石斑鱼 *Epinephelus lanceolatus* L. 中分离到的细菌, 进行了形态特征、理化特性和对抗菌类药物的敏感性等较系统的表观生物学性状鉴定。同时, 测定了16S rRNA 基因序列、分析了相关细菌相应序列的同源性、构建了系统发生树。结果表明, 供试两株纯培养菌(编号: HQ061227-1、HQ061227-2)为发光杆菌属 *Photobacterium* (Beijerinck 1889) 的美人鱼发光杆菌美人鱼亚种 *P. damsela* subsp. *damsela* (Love et al. 1982; Smith et al. 1991), 用 HQ061227-1 株作为代表菌株的16S rRNA 基因序列长度(不包括引物结合区)为1469bp (GenBank 登录号: EF635307), 与 GenBank 数据库中美人鱼发光杆菌美人鱼亚种的同源性在99%。药敏试验结果显示, 对供试37种抗菌药物中的青霉素G等4种耐药, 对头孢唑啉等32种敏感, 对氨基青霉素低敏。

**关键词** 龙胆石斑鱼 美人鱼发光杆菌美人鱼亚种 生物学特性 系统发育学  
**中图分类号** S943 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)03-0038-06

## Biological characterization and phylogenetic analysis of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from diseased *Epinephelus lanceolatus* L.

ZHANG Xiao-jun<sup>1</sup> QIN Guo-min<sup>1</sup>

CHEN Cui-zhen<sup>2</sup> FANG Hai<sup>2</sup> YAN Bin-lun<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>College of Ocean, Key Laboratory of Oceanic Biotechnology of Jiangsu, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005)

(<sup>2</sup>Department of Animal Science, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao 066600)

**ABSTRACT** The biological characteristics and phylogenetic analysis of bacteria isolated from *Epinephelus lanceolatus* L. were studied, including morphological characteristics, physiological and biochemical characteristics. In addition, the 16S rRNA gene were partially sequenced and compared with sequences registered in databases; and molecular phylogenetic trees were constructed. The results showed that the two pure strains (HQ061227-1、HQ061227-2) belonged to *P. damsela* subsp. *damsela* (Love et al. 1982; Smith et al. 1991) of *Photobacterium* (Beijerinck 1889).

淮海工学院引进人才科研启动基金项目(KQ07106)和连云港市科技攻关项目(CN0826)共同资助

收稿日期:2008-03-05;接受日期:2008-05-12

作者简介:张晓君(1969-),女,博士,教授。主要从事水产动物病害及病原微生物学研究。E-mail:zxj9307@163.com

inck 1889), the sequenced 16S rRNA gene of strain HQ061227-1 (accession No. EF635307) is 1 469bp in length, and exhibited high similarity (99%) with the 16S rRNA gene of *P. damsela* from GenBank database. Antibiotic sensitivity using 37 antimicrobial agents showed that the isolates were sensitive to 32 agents including cefazolin, resistant to 4 agents including penicillin G, and slightly sensitive to ampicillin.

**KEY WORDS** *Epinephelus lanceolatus* L. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*  
Biological characterization Phylogenetic analysis

美人鱼发光杆菌 *Photobacterium damsela* 包括美人鱼发光杆菌美人鱼亚种即原来的美人鱼弧菌和美人鱼发光杆菌杀鱼亚种 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* 两个亚种。美人鱼弧菌是于1981年由 Love 等首次从患皮肤溃疡病的少女鱼 Damsel fish 病灶处分离到的,并作为一种新的弧菌被命名,在有的资料中也将该菌称为海鱼弧菌、雀鲷弧菌及少女鱼弧菌等,美国 CDC 曾将其称为 EF-5 群弧菌。该菌广泛存在于海水及寄生于海产动物中,主要感染变温动物尤其是养殖鱼类,除感染雀鲷科鱼 *Chromis punctipinis* 类外,还感染鲨鱼 Bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*、大菱鲆 Turbot, *Scophthalmus maximus* 和五条鲷 Yellowtail, *Seriola quinqueradiata* 等 (Fujioka *et al.* 1998; Fouz *et al.* 1991; Sakata *et al.* 1989)。由该菌所引起的鱼类疾病主要表现为特征性皮肤损伤即形成溃疡,在胸鳍和尾柄处尤为严重,这些溃疡直径在 5~20mm,并伴随肌肉液化,组织病理学检验表明,存在肉芽肿性溃疡性皮炎 (Austin *et al.* 1999)。在我国,刘明等 (1998) 报道该菌可引起热带海水鱼——蝴蝶鱼的感染发病,病鱼表现为出血症;黄志坚等 (1999) 报道从养殖鳊鱼的细菌性病害分离到该菌并证实其具有一定致病力;叶巧真等 (2000) 报道,从患白底板病和红底板病的病鳖中分离到美人鱼发光杆菌,并对中华鳖具有一定的致病性。此外,该菌也是人的致病菌,在养殖鱼类的刺及牙齿上常可分离到,因此在养殖过程中要特别注意鱼受该菌感染。

2006年12月,作者对河北秦皇岛山海关海洋公园养殖的1条病死的观赏用龙胆石斑鱼 *Epinephelus lanceolatus* L. 进行了检验。以其肝脏和肾脏组织为材料做细菌学检验。结果表明,为发光杆菌属 (*Photobacterium* Beijerinck 1889) 的美人鱼发光杆菌美人鱼亚种 *P. damsela* subsp. *damsela* (Love *et al.* 1982; Smith *et al.* 1991), 该菌即为原归于弧菌属 (*Vibrio* Pacini 1854) 的美人鱼弧菌 *V. damsela* (Love *et al.* 1982)。为丰富该菌在生物学性状和分子生物学等方面的内容,作者对其进行了形态特征与培养特性、理化特性、对抗菌类药物的敏感性及 16S rRNA 基因序列测定与系统发育学分析,旨在能为对该菌的有效检验及进一步研究等提供一定的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 病鱼临床剖检

对病死龙胆石斑鱼进行主要病理变化检验,同时以病变肝、肾组织为材料,先经抹片后革兰氏染色镜检细菌;再用普通营养琼脂培养基做划线接种分离培养细菌 (28℃ 培养 24h 和 48h 检查),取分离菌移接于普通营养琼脂斜面 (28℃ 培养 24h) 做纯培养供检验用。

### 1.2 形态与菌落特征检查

取纯培养菌分别移接于普通营养琼脂斜面置 28℃ 培养 20h,制备涂片标本进行革兰氏染色做形态特征检查;各菌株分别划线接种于普通营养琼脂、血液营养琼脂 (含 7% 家兔脱纤血的普通营养琼脂)、庆大霉素琼脂和硫代硫酸钠柠檬酸钠胆酸钠蔗糖琼脂 (TCBS) 等不同培养基平板,置 28℃ 培养 24h 和 48h,分别检查生长情况及菌落特征。同时,分别接种于普通营养肉汤 (管) 中,置 28℃ 培养 24h,检查液体培养的生长表现。

### 1.3 理化特性检查

取纯培养菌,分别接种于细菌理化特性鉴定用培养基中,按常规进行氧化酶、接触酶、糖(醇及苷)类代谢、H<sub>2</sub>S、吲哚、MR、V-P 试验、硝酸盐还原和 OF 试验和枸橼酸盐利用(Simmons)等较系统的理化特性测定,主要参照《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠等 2001)及《人及动物病原细菌学》(杨正时等 2003)进行。

### 1.4 16S rRNA 基因序列测定与系统发育学分析

#### 1.4.1 PCR 模板 DNA 的制备

择代表菌株接种于 LB 肉汤中 28℃ 培养 16h,按小量细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(大连宝生物工程有限公司产,批号 DV810A)所述方法提取 DNA 作为 PCR 模板 DNA。

#### 1.4.2 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增与测序

16S rRNA 基因 PCR 扩增的两个引物分别为 27F(正向引物):5'-AGA GTT TGA TC(C/A) TGG CTC AG-3'(对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的第 8~27 个碱基位置)、1492R(反向引物):5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'(对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的第 1492~1510 个碱基位置)(Martin *et al.* 1998)。在 20 $\mu$ l 反应体系中含有:无菌蒸馏水 14.4 $\mu$ l,1 $\times$ PCR 缓冲液 2 $\mu$ l,1.5m mol/L MgCl<sub>2</sub> 1.6 $\mu$ l,4 $\times$ dNTP 混合物 0.4 $\mu$ l,引物各 0.2 $\mu$ l,2.5U/ $\mu$ l 的 Taq DNA 聚合酶 0.2 $\mu$ l,模板 DNA 1 $\mu$ l。PCR 反应条件为:95℃ 预变性 3min、接 94℃ 变性 1min、55℃ 复性 1min 和 72℃ 延伸 2min,30 个循环后 72℃ 温育 6min。PCR 扩增产物经 DNA 纯化系统(Wizard PCR Preps, Promega)纯化后,由上海生物工程技术公司进行基因序列测定。

#### 1.4.3 16S rRNA 基因序列系统发育树构建

对供试菌株的 16S rRNA 基因序列通过 NCBI 的 Blast 检索系统(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>)进行序列同源性分析,并使用 ClustalX 1.83 软件与从 GenBank 数据库中获得的序列相似性较高的菌株的序列进行多序列匹配排列(Multiple Alignments),采用邻接法(Neighbor joining method)获得分支系统树,并通过 Bootstrap 法(1000 次重复)检验。

### 1.5 菌种分类位置确定

根据细菌形态、培养及理化特性测定的结果,主要依据 Holt 等(1994)、Krieg 等(1984)Austin 等(1999)及有关资料,并结合细菌发育学分析的结果,进行分离菌的种属分类位置判定。

### 1.6 药物敏感性测定

经鉴定后的菌株,用常规琼脂扩散(K-B)法进行对常用抗菌类药物的敏感性测定,以是否出现抑菌圈及抑菌圈直径大小作为敏感与耐药的判定指标(叶应妩等 1997)。

## 2 结果

### 2.1 临床症状

所检石斑鱼体长 1.2m,体重 50kg;体表黏液明显增多(甚至形成了一层白色的膜状物),鳞片脱落较严重,口腔充血和出血,眼球表面有一层灰白色伪膜,鳃盖下缘有充血现象,鳃丝充血严重且灰白色黏液增多,各鳍均有不同程度的充血和出血(尤其以尾鳍严重);剖检见腹腔积液明显(不很混浊),肝脏肿胀充血,胆囊稍肿大且有胆汁外渗现象,肠道有充血现象。

### 2.2 病变组织中的细菌

在被检龙胆石斑鱼的肝、肾组织中,均存在多量革兰氏阴性、散在(个别菌体成双排列)、两端钝圆(个别菌体一端或两端稍尖)、大小多在(0.6~1.0) $\mu$ m $\times$ (1.2~2.2) $\mu$ m 的杆菌,有的菌体呈球杆状或近似球状。

### 2.3 细菌分离与纯培养菌株

从被检龙胆石斑鱼的肝、肾组织中,均分离到了多量同种细菌,肾脏中明显多于肝脏中的。菌落特征为圆形光滑、边缘整齐、透明至半透明、较隆起、浅灰白色和闪光,2h 检查菌落直径多在 0.5mm 左右,48h 多在 1.2mm 左右。从肾脏、肝脏分离菌各取 1 个菌落做纯培养 1 株共两株,记作 HQ061227-1(分离于肾脏)、HQ061227-2(分离于肝脏),置 4℃ 普通冰箱中保存供检验用。

### 2.4 纯培养菌的生物学性状

#### 2.4.1 形态特征

两株供试纯培养菌的形态特征为革兰氏染色阴性、散在(个别菌体成双排列)、两端钝圆(个别菌体一端或两端稍尖),大小多在(0.6~1.0)μm ×(1.0~2.0)μm 的杆菌(极个别菌体稍有弯曲现象),有半数以上菌体呈球杆状或近似球状。

#### 2.4.2 培养特性

两株供试纯培养菌在普通营养琼脂上的菌落特征,与从病料中直接分离的相一致,生长良好;在血液营养琼脂上的生长情况和菌落特征,均与在普通营养琼脂上的相一致,呈 β 型溶血,培养 48h 菌落直径多在 1.5mm 左右;在 TCBS 上菌落圆形光滑、边缘整齐、较隆起、绿色,培养 24h 检查菌落直径多在 1.2mm 左右、48h 多在 1.8mm 左右,生长较丰盛;在庆大霉素琼脂上,培养 24h 检查仅在划线接种的起始部有菌苔和很小的菌落生长,48h 检查菌落直径多在 1.0mm 左右,菌苔(落)呈灰色或灰褐色。在普通营养肉汤培养基(管)中,上部分培养液仍是透明的,下部分有絮膜状悬浮的沉淀物,摇动后散开成小颗粒状的中度混浊。

#### 2.4.3 理化性状

供试两株纯培养菌,对所测主要理化性状的反应结果一致(见表 1)。

表 1 分离菌的理化特性

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of isolates

特性 Character	分离菌(两株) Isolates	美人鱼发光杆菌美人鱼亚种 <sup>a</sup> <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>
37℃ 生长 Growth at 37℃	+	+
氧化酶 Oxidase	+	+
接触酶 Catalase	+	•
H <sub>2</sub> S 产生 H <sub>2</sub> S production	-	•
O-F 试验 O-F test	F	•
动力 Motility	+	+
明胶液化 Gelatin hydrolysis	-	-
葡萄糖: 产酸 Glucose, acid production	+	+
产气 Gas production	+	+
山梨醇 Sorbitol	-	-
蜜二糖 Melibiose	-	-
蔗糖 Sucrose	-	-
鼠李糖 L-Rhamnose	-	•
阿拉伯糖 Arabinose	-	•
肌醇 Inositol	-	-
甘露醇 Mannitol	-	-
麦芽糖 Maltose	-	•
木糖 Xylose	-	-
苦杏仁苷 Amygdalin	-	•
山梨糖 Sorbose	-	•
侧金盏花醇 Adonitol	-	•
棉子糖 Raffinose	-	•
菊糖 Inulin	-	•
水杨苷 Salicin	-	•
半乳糖 Galactose	+	+
海藻糖 Trehalose	+	-
糊精 Oextrin	+	•
卫茅醇 Dulcitol	-	•
甘油 Glycerol	+	•
纤维二糖 Cellobiose	-	-
α-甲基-D-葡萄糖苷 α-methyl-D-glucoside	-	•

#### 2.4.4 16S rRNA 基因序列 与系统发育学

取 HQ061227-1 株作为代表菌株进行 16S rRNA 基因序列与系统发育学分析,结果该菌株 16S rRNA 基因序列长度(不包括引物结合区)为 1 469bp (GenBank 登录号: EF635307); 将 HQ061227-1 株的 16S rRNA 基因序列在国际互联网上进行同源性检索,结果均与发光杆菌属和弧菌属细菌的 16S rRNA 基因序列自然聚类。在检索出的美人鱼发光杆菌序列中, HQ061227-1 株与它们的同源性在 99%。选取了其中部分菌株的 16S rRNA 基因序列进行系统发育学分析,其系统发育树如图 1 所示。

#### 2.4.5 细菌种类

根据表型特征及系统发育学分析的结果,判定分离菌为发光杆菌属的美人鱼发光杆菌美人鱼亚种,该菌即为原归于弧菌属的美人鱼弧菌。

#### 2.5 药物敏感性

用 HQ061227-1 菌株进行的药敏测定,结果对供试 37 种抗菌类药物的敏感性为:均对头孢唑啉、头孢拉啶、头孢噻肟、头孢曲松、头孢他啶、头孢哌酮、头孢吡肟、氨曲南、红霉素、阿奇霉素、链霉素、卡那霉素、庆大霉素、妥布霉素、丁胺卡那霉素、新霉素、大观霉素、诺氟沙星、氧氟沙星、环丙沙星、四环素、多西霉素、氯霉素、克林霉素、多黏菌素 B、利福平、复方新诺明、甲氧苄啶、呋喃妥因、呋喃唑酮、新生霉素和恩诺沙星等 32 种药物高度敏感(抑菌圈直径在 16~40 mm);对氨苄青霉素低敏(抑菌圈直径为 12 mm);对青霉素 G、苯唑青霉素、万古霉素和杆菌肽等 4 种耐药(无抑菌圈形成)。

### 3 讨论

美人鱼发光杆菌广泛存在于海水及海产动物中,主要感染变温动物尤其是养殖鱼类,也属于人及鱼类共染的一种病原菌。本次所检病死龙胆石斑鱼表现为败血症感染病变,通过对病死鱼肝和肾等病变组织做直接染色标本发现细菌、有规律地分离到细菌并经鉴定表明为同种细菌,以及对分离菌进行了主要理化特性方面较系统的表现分类学指征检验并结合 16S rRNA 基因序列测定与系统发育学分析,表明所检出的细菌为发光杆菌属的美人鱼发光杆菌且为被检龙胆石斑鱼的相应病原菌,进一步证明了美人鱼发光杆菌广泛的致病作用。

本次对美人鱼发光杆菌美人鱼亚种的菌种判定,是通过比较系统的表现生物学分类指征检验并结合 16S

(续表 1)

特性 Character	分离菌(两株) Isolates	美人鱼发光杆菌美人鱼亚种 <sup>a</sup> <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>
乳糖 Lactose	-	-
甘露糖 Mannose	-	+
果糖 Fructose	+	·
甲基红 MR test	-	·
V-P 试验 V-P test	-	+
吲哚 Indole	-	·
硝酸盐还原 Nitrate reduction	-	+
枸橼酸盐利用 Citrate utilization (Simmons)	-	-
丙二酸盐利用 Malonate utilization	-	·
尿素酶 Urease	-	·
乙酰胺酶 Acetamidase	-	·
淀粉酶 Diastase	-	·
$\beta$ -半乳糖苷酶 ONPG	-	·
卵磷脂酶 Lecithinase	+	·
蛋白酶 Proteinase	-	·
DNA 酶 DNase	+	·
苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase	-	·
脂酶(吐温 80) Lipase (tween 80)	+	·
NaCl 中生长 Growth at NaCl:0	-	·
1%	+	·
6%	+	·
O/129 敏感性 sensitivity :10 $\mu$ g	S	·
150 $\mu$ g	S	·

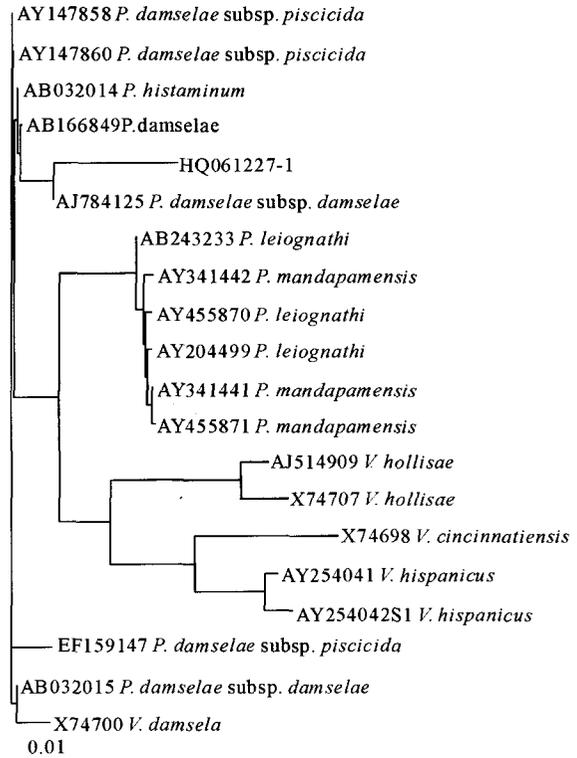
注:“+”示阳性;“-”示阴性;“F”示发酵型;“·”示在原文中无记载。上角标 a 指表中数据取自《Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed》1994 中的美人鱼弧菌

rRNA 基因序列测定与系统发育学分析进行的。就个别生化性状指标来讲,分离菌与记载的存在一些差异,但其系统发育是与美人鱼发光杆菌美人鱼亚种相聚类的,这些指示在对细菌鉴定时不能仅仅依赖于生化指标的完全一致性,区域性的地方分离菌株间可能是会存在个别生化指标差异的。另一方面,本次对分离菌株较系统的理化特性检验,也相对丰富了该菌的一些生物学性状内容,将可能有益于对该菌的分离与鉴定。

药敏测定结果显示,分离菌均对供试的头孢唑啉等 32 种药物敏感、对氨苄青霉素等 5 种药物耐药或低敏,该结果有益于选择用药防治由美人鱼发光杆菌引起的感染症。考虑到细菌耐药变异的频繁性,提议有效用药还是对分离菌株在进行了药敏测定后选择敏感药物为宜。

## 参 考 文 献

- 东秀珠,蔡妙英. 2001. 常见细菌系统鉴定手册. 北京:科学出版社, 106~120
- 叶巧真,何建国,邱德金,陈健光,黄苑玲,张邦杰,叶普仁,梁仁杰,潘雷. 2000. 中华鳖白底板病和红底板病细菌的分离鉴定及致病性. 微生物学通报, 27(6):407~413
- 叶应妩,王毓三. 1997. 全国临床检验操作规程(第 2 版). 南京:东南大学出版社, 553~562
- 刘明,张弘,安淑荣. 1998. 蝴蝶鱼弧菌病的研究. 中国水产, 9:56~57
- 杨正时,房海主编. 2003. 人及动物病原细菌学. 石家庄:河北科学技术出版社, 1550~1610
- 黄志坚,何建国,翁少萍,曾慷. 1999. 鳊鱼细菌性病原的分离鉴定及致病性初步研究. 微生物学通报, 26(4):241~246
- Austin, B., and Austin, D. A. 1999. Bacterial fish pathogens; Disease of farmed and wild fish. Third(Revised)Edition. Praxis Publishing Ltd, Chichester, UK, 28:103~105
- Fouz, B. I., Larsen, J. L., and Toranzo, A. E. 1991. *Vibrio damsela* as a pathogenic agent causing mortalities in cultured turbot (*Scophthalmus maximus*). Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 11:80~81
- Fujioka, R. S., Greco, S. B., Cates, M. B., and Schroeder, J. P. 1988. *Vibrio damsela* from wounds in bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*. Diseases of Aquatic Organisms, 4:1~8
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A. et al. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. Ninth Edition. Baltimore: Williams and Wilkins, 192, 253, 256~257
- Martin, F. P., and Collen, M. C. 1998. Bias in template to product ratios in multitemplate PCR. Appl. Environ. Microbiol. 64 (10):3724~3730
- Sakata, T., Matsuura, M., and Shimokawa, Y. 1989. Characteristics of *Vibrio damsela* isolated from diseased yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Nippon Suisan Gakkaishi, 55:135~141



(图中 AY147858 至 X74700 为菌株在 NCBI 的登录号)  
(AY147858~ X74700 were database accession numbers in NCBI)

图 1 HQ061227-1 菌株 16S rRNA 基因序列系统发育树  
Fig. 1 Phylogenetic tree based on HQ061227-1 16S rRNA gene sequences