

红鳍东方鲀病原鱼肠道弧菌的生物学特性研究

张晓君¹ 陈翠珍² 阎斌伦¹ 房海² 秦国民¹ 徐静¹

(1. 淮海工学院海洋学院, 江苏省海洋生物技术重点实验室, 连云港 222005; 2. 河北科技师范学院动物科学系, 秦皇岛 066600)

摘要: 对引起红鳍东方鲀发病死亡的病原细菌进行了分离和主要生物学特性研究, 包括病原性、形态特征、理化特性、16S rRNA基因序列及其系统发育学分析、胞外酶及溶血素活性、K抗原及耐药性等。结果表明, 引起红鳍东方鲀发病死亡的病原细菌为弧菌属(*Vibrio* Pacini 1854)的鱼肠道弧菌(*V. ichthyenteri* Ishimaru et al 1996), 2株代表菌株 16S rRNA基因序列(GenBank登录号分别为: EF611424和 EF635304)与 GenBank数据库中鱼肠道弧菌的同源性在 98%—100%, 且在构建的 MP系统发生树中与鱼肠道弧菌聚为一个分支。分离菌不具有淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶、DNA酶、脲酶、明胶酶和卵磷脂酶活性, 且在含 7%家兔脱纤血液营养琼脂培养基上不溶血。不具有 K抗原。人工感染试验中分离菌对红鳍东方鲀表现出明显的致病性。药敏试验结果显示, 4株分离菌对供试 37种抗菌药物中的苯唑青霉素和杆菌肽 2种耐药。

关键词: 鱼肠道弧菌; 生物学特性; 系统发育学

中图分类号: S852.61 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2009)06-1118-08

鱼肠道弧菌(*Vibrio ichthyenteri* Ishimaru et al 1996)是于 1996年由 Ishimaru et al 首次报道, 并将其作为一个新种弧菌命名。自 1971年以来, 在日本孵化场养殖的牙鲆发生肠不透明及肠坏死并伴随高死亡率, Ishimaru et al^[1]经对分离自幼牙鲆的 7株分离菌的检验结果, 表明其病原为一种新的病原弧菌并命名为鱼肠道弧菌。此后, Kim D H. et al^[2]与陈翠珍等^[3]均报道过从患病牙鲆体内分离到该菌。

2005年 11月, 作者对河北省昌黎一海水养殖场养殖红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes* L.)发生的疾病进行了检验, 所检 5尾(其中濒死的 3尾和刚刚死亡的 2尾)病死鱼表现为体表腹部充血, 各鳍均有不同程度的出血(尤以腹鳍和尾鳍明显), 部分病鱼腹鳍和尾鳍溃烂且部分断掉; 剖检见肝脏不同程度肿胀、充血或有出血, 肠壁出血, 肠黏膜充血或有出血。以其鳍溃烂组织和肝脏组织为材料做细菌学检验, 结果检出了鱼肠道弧菌(*Vibrio ichthyenteri*)和杀对虾弧菌(*Vibrio penaeicida*)两种病原菌。本文报道了所检 4株鱼肠道弧菌的病原性、形态特征、主要理化性状及系统发育学、胞外酶及溶血素活性、K抗原及

血清同源性与药物敏感性等方面的研究结果, 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 细菌分离 以病死红鳍东方鲀的鳍溃烂组织及肝组织为材料, 先经抹片后革兰氏染色镜检细菌; 镜检到细菌后再取新鲜鳍溃烂组织及肝组织用普通营养琼脂培养基做划线接种分离培养(28℃培养 48h检查)细菌, 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, 其编号为: HC051105-1(分离自鳍溃烂组织)、HC051105-3(分离自肝组织)、HC051105-5(分离自鳍溃烂组织)、HC051105-7(分离自肝组织), 置 4℃普通冰箱中保存供检验用。

1.2 致病性试验 将供试代表菌株 HC051105-1接种于普通营养琼脂斜面 28℃培养 20h 以无菌生理盐水洗下并调成 6×10^8 CFU/mL 菌液, 经腹腔接种健康红鳍东方鲀, 每尾接种 0.2 mL 共 6尾; 同时设立同剂量、同批无菌生理盐水接种的对照; 均隔离养殖于试验水族箱中, 每天观察其感染后的发病与

收稿日期: 2008-05-27 修订日期: 2009-03-19

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK2009163); 连云港市科技攻关项目(CN0826); 淮海工学院引进人才科研启动基金资助项目(KQ07106)

作者简介: 张晓君(1969—), 女, 河北秦皇岛人; 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: zxp307@163.com

通讯作者: 阎斌伦, E-mail: yanbinlun@yahoo.com.cn

死亡情况,以复制出同自然病例一样的感染症,并能重新分离回收得到原感染菌作为相应病原菌的判定指标。

1.3 形态与菌落特征检查 取纯培养菌移接于普通营养琼脂斜面,置 28℃培养 20h 后制备成涂片标本,经革兰氏染色镜检细菌形态;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、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℃及 37℃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。

1.4 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、H₂S、吲哚、MR、V-P 试验、硝酸盐还原、OF 试验、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》^[4]及《人及动物病原细菌学》^[5]进行。

1.5 16S rRNA 基因序列测定与系统发育学分析

1.5.1 PCR 模板 DNA 的制备 择代表菌株 HC051105-1 及 HC051105-3 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。

1.5.2 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'-AGAGTTTGATC (C/A) TGGCT-CAG-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'-GGTTACCTT-GTTACGACT T-3' (对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的第 1492—1510 个碱基位置)^[6]。在 20 μL 反应体系中含有: 无菌蒸馏水 14.4 μL、1×PCR 缓冲液 2 μL、1.5 mmol/L MgCl₂ 1.6 μL、4×dNTP 混合物 0.4 μL、引物各 0.2 μL、2.5 U/μL 的 Taq DNA 聚合酶 0.2 μL、模板 DNA 1 μL。PCR 反应条件为: 95℃预变性 3min 94℃变性 1min 55℃复性 1min 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。

1.5.3 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),使用 MEGA3 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis MEGA) 及 PAUP4.0 软件,采用最大简约法(Maximum parsimony MP)建树方法,构建 MP 系统发生树,并通过 Bootstrap 法(1000 次重复)检验。

1.6 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《Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th ed》^[7]、《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology》^[8]、《Bacterial Fish Pathogens Disease of Farmed and Wild Fish》^[9] 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。

1.7 胞外酶活性及溶血活性检测 分离菌的胞外蛋白酶活性、卵磷脂酶活性、脂酶活性、淀粉酶活性、尿素酶活性和 DNA 酶活性采用平板检验方法,明胶酶活性采用试管液化方法。将处于对数生长期的 4 株供试菌分别点种于含有脱脂牛奶(10%)、蛋黄液(10%)、吐温 80 (1.0%)、淀粉(1%)、尿素(2.0%,含酚红指示剂)和 DNA (0.5%)的平板中,将供试菌穿刺接种于含明胶(8%)的培养基试管,于 28℃恒温培养适当时间后观察。含脱脂牛奶、蛋黄液、吐温 80 及 DNA 的平板可以直接观察水解圈;含尿素的平板观察菌苔是否变红色;含淀粉的平板则在观察之前需要分别加入显色剂碘液。透明的水解圈区域显示有酶活。含明胶的培养基试管于 28℃恒温培养 24h 后,置于 4℃冰箱中过夜后观察。

分离菌的溶血活性采用将菌株接种至血液琼脂(含 7%家兔脱纤血的营养琼脂)培养基平板的方法,将接种后的血液琼脂培养基平板置恒温培养箱中培养适当时间后观察菌株周围是否出现溶血圈。若出现溶血圈则为阳性,表明该菌能分泌溶血毒素。

1.8 K 抗原及血清同源性检测 选取代表菌株 HC051105-1 接种于适宜发育的液体培养基中经培养扩繁后,分别制备成福尔马林灭活的全菌(OK)抗原及经热处理(121℃作用 1h)的菌体(O)抗原,

经分别强化免疫接种家兔制备相应抗血清。

1.8.1 K 抗原的检测 取分离菌分别移接于普通营养琼脂斜面 28℃培养 18h 作为 OK 玻板凝集原, 分别与代表菌株 HC051105-1 所制备的 OK、O 抗血清做玻板凝集反应 (直接取菌少许与 1 小滴约 0.025mL 血清混匀) 若与相应 OK、O 抗血清均呈基本一致凝集强度的明显凝集 (++) , 则判定为无明显 O 凝集抑制性 K 抗原的存在 (混匀后即刻出现明显凝集并于 2min 内判定结果) ; 若仅与 OK 抗血清明显凝集、与 O 抗血清不凝或仅轻微不明显凝集, 则判为存在 O 凝集抑制性 K 抗原 (出现接近于 + 的现象说明存在 K 抗原但可能在有的菌体表达不良) ; 同时以无菌生理盐水代替抗血清作为对照, 需不出现凝集 (菌株不自凝) 。

1.8.2 血清同源性的检定 取上述 4 株供试纯培养菌, 分别移接于普通营养肉汤管 (20 mL/管) 置 28℃振荡培养 18h 后, 每个菌株等分 10 mL 管的各 2 份, 其中 1 份直接作为试管 OK 凝集原, 另 1 份经 121℃处理 1h 作为试管 O 凝集原, 分别与上述用 HC051105-1 菌株制备的 OK 及 O 抗血清做相应及交叉的试管凝集试验^[10]。方法是将抗血清用含 0.5% 石炭酸的无菌生理盐水做 1:2 倍 (第 1 管) 至 1:65536 倍 (第 16 管) 的倍比稀释 (即 1bg2 至 16bg2) 0.2 mL/管, 然后分别用前述 OK、O 凝集原 (等量加入并混匀其总量为 0.4 mL/管) 做相应及交叉的试管凝集反应, 同时设立以无血清的对照管, 具体为混匀后置室温下经 24h 左右判定结果, 以仍能呈现明显凝集 (++) 的抗血清最高稀释倍数作为相应抗血清的凝集效价, 并以各供试菌株与制备抗血清用的代表菌株间进行比较后的凝集效价相同或仅差 1 个滴度的判为同血清型菌株 (血清同源) 。

1.9 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^[11]。

2 结果

2.1 病变组织中的细菌与细菌分离

以所检 5 尾红鳍东方鲀鳍溃烂组织、肝组织为材料, 直接做抹片后经革兰氏染色镜检, 结果均有不同量但均较多、形态特征一致的细菌。具体为: 革兰氏染色阴性, 杆状 (菌体稍弯曲) 两端钝圆, 散在

(有的成双), 无芽孢, 大小多在 (0.4—0.7) μm × (1.2—2.5) μm。

以鳍溃烂组织及肝组织进行细菌分离培养, 结果均分离到两种优势生长的细菌, 菌落特征: 其中一种 (记作 A 菌) 为圆形光滑、边缘整齐、稍隆起、透明至半透明、浅灰白色, 24h 检查直径多在 0.3—0.4 mm 左右、48h 多在 1.2 mm 左右, 生长良好; 另一种 (记作 B 菌) 为圆形光滑、边缘整齐、稍隆起、半透明至不透明、灰白色, 24h 检查直径多在 0.3—0.5 mm、48h 多在 1.2 mm 生长良好; 在菌落分布上, A 菌多于 B 菌。从 2 种分离菌 (A 和 B 菌) 各取 4 个菌落 (A、B 菌各 2 个) 做纯培养共 8 株, 其中 4 株 A 菌即本次所报道的鱼肠道弧菌。

2.2 分离菌的致病性

代表菌株 HC051105-1 腹腔注射感染健康红鳍东方鲀后, 感染后 3—4d 陆续死亡并出现明显的肝脏肿胀、充血或有出血等病变。对照的红鳍东方鲀在 14d 观察期内均正常, 并且未分离到细菌; 取感染死亡鱼进行细菌学检验, 结果均检验并分离到大量纯一的原感染菌的菌落。

2.3 形态特征与培养特性

分离自红鳍东方鲀肝脏及鳍溃烂组织的 4 株纯培养菌 (A 菌) 的形态特征表现一致, 均为革兰氏染色阴性、杆状 (有的稍弯曲)、一端或两端钝圆 (有的一端或两端稍尖些)、无芽孢、散在, 大小多在 (0.4—0.6) μm × (1.0—2.5) μm。

4 株纯培养菌均在 28℃条件下生长, 菌苔呈半透明至不透明状的灰白色, 生长中度, 在 37℃不生长。在所试培养基上的生长情况 (28℃培养) 表现一致。在普通营养琼脂培养基上, 菌落特征与生长情况与从病料中直接分离的相一致; 在血液营养琼脂 (含 7% 家兔脱纤血的营养琼脂) 培养基上, 菌落圆形光滑、边缘整齐、稍隆起、浅乳白色、不溶血、湿润闪光, 培养 24h 直径多在 0.5 mm 左右、48h 多在 1.5 mm 左右, 生长良好; 在 TCBS 庆大霉素琼脂培养基上, 培养 48h 未见生长; 在普通营养肉汤培养基 (管) 中, 4 株供试菌生长表现一致, 均为轻度均匀混浊生长, 管底形成圆点状菌体沉淀 (摇动后呈线状上升易消散) 。

2.4 理化性状

4 株分离菌所测主要理化性状的反应结果一致 (表 1)。

表 1 分离菌的理化特性

Tab 1 Physiological and biochemical characteristics of isolates

特性	Characteristic	鱼肠道弧菌 <i>V. ichthyenteri</i>	分离菌 Isolates
37℃生长	Growth at 37℃	—	—
氧化酶	Oxidase	+	+
接触酶	Catalase	+	+
产 H ₂ S	H ₂ S production	—	—
O-F 试验	O-F test	F	F
动力	Motility	+	+
枸橼酸盐利用	Citrate utilization	—	—
葡萄糖: 产酸	Glucose acid production	+	+
葡萄糖: 产气	Glucose gas production	°	—
山梨醇	Sorbitol	°	—
蜜二糖	Melibiose	—	—
棉子糖	Raffinose	—	—
菊糖	Inulin	—	—
水杨苷	Salicin	—	—
吐温 80	Tween 80	—	—
硝酸盐还原	Nitrate reduction	+	+
半乳糖	Galactose	—	+
蔗糖	Sucrose	+	+
鼠李糖	L-Rhamnose	—	—
肌醇	Inositol	—	—
甲基红	MR test	°	+
V-P 试验	V-P test	°	—
阿拉伯糖	Arabinose	—	—
甘露醇	Mannitol	—	—
吲哚	Indole	—	—
七叶苷利用	Esulin	°	—
赤藓醇	Erythritol	—	—
海藻糖	Trehalose	+	+
PA (SIM)		°	—
阿拉伯醇	Arabitol	°	—
乙酰胺酶	Acetamidase	°	—
糊精	Oextrin	+	+
卫茅醇	Dulcitol	—	—
甘油	Glycerol	—	—
麦芽糖	Maltose	+	+
丙二酸盐利用	Malonate utilization	°	+
醋酸盐利用	Acetate utilization	°	—
木糖	Xylose	—	—
木糖醇	Xylitol	°	—
苦杏仁苷	Amygdalin	°	—
松三糖	Melezitose	°	—

续表

特性	Characteristic	鱼肠道弧菌 <i>V. ichthyenteri</i>	分离菌 Isolates
山梨糖	Sorbitose	°	—
侧金盏花醇	Adonitol	—	—
酒石酸盐利用	Tartrate utilization	°	—
黏液酸利用	Mucate utilization	°	—
β-半乳糖苷酶	ONPG	—	+
α-甲基-D-葡萄糖苷	α-methyl-D-glucoside	°	—
乳糖	Lactose	—	—
果糖	Fructose	+	—
甘露糖	Mannose	+	—
纤维二糖	Cellobiose	—	—
精氨酸双水解酶	Arginine dihydrolase	—	—
苯丙氨酸脱氨酶	Phenylalanine deaminase	°	—
NaCl中生长:	0%	—	—
Growth at NaCl	1%	+	+
	6%	+	+
O/129	10 μg	S	S
	150 μg	S	S

注：+示阳性，—示阴性，°示文中未记述，F示发酵型，S示敏感；鱼肠道弧菌的结果来自《Bacterial Fish Pathogens Disease of Farmed and Wild Fish》^[9]

Notes +, positive —, negative °, not describe F fermentative S sensitive the results of *V. ichthyenteri* come from《Bacterial Fish Pathogens Disease of Farmed and Wild Fish》^[9]

2.5 16S rRNA 基因序列与系统发育学

分离菌 (HC051105-1 及 HC051105-3)所扩增的 16S rRNA 基因序列长度 (不包括引物结合区), HC051105-1 株为 1452 bp (GenBark 登录号: EF611424)、HC051105-3 株为 1461 bp (GenBark 登录号: EF635304); 将 2 株菌的 16S rRNA 基因序列在 NCBI 上通过 Blast 进行同源性检索, 结果均与弧菌属细菌的 16S rRNA 基因序列自然聚类。在检索出的鱼肠道弧菌序列中, HC051105-1 及 HC051105-3 株与它们的同源性在 98%至 100%。选取了其中相似性较高的部分菌株的 16S rRNA 基因序列, 并以嗜水气单胞菌 (登录号 AF468055)作为外围菌进行系统发育学分析, 构建了 MP 系统发育树 (图 1), HC051105-1 及 HC051105-3 株均与鱼肠道弧菌聚为一个大分支, 且自举值为 99%。

2.6 菌种判定

4 株供试菌对所测形态及理化特性等的表型性状的结果一致, 属于同种细菌。根据表型特征及系统发育学分析的结果, 判定为弧菌属 (*Vibrio* Pacini 1854) 的鱼肠道弧菌 (*Vibrio ichthyenteri* Ishinura 1996)。

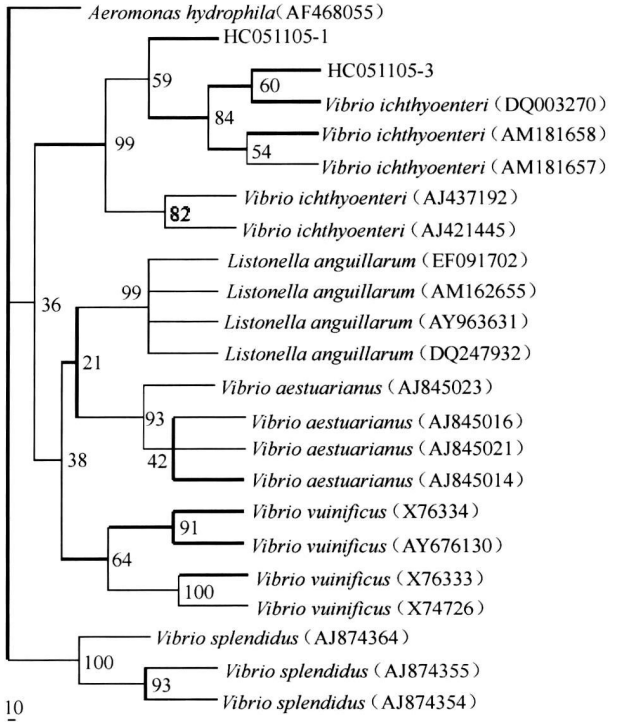


图 1 HC051105-1 及 HC051105-3 菌株 16S rRNA 基因序列 MP 系统发育树 (图中 AF468055 至 AJ874354 为菌株在 NCBI 的登录号, 数字为自举值)
Fig 1 The maximum parsimony phylogenetic tree based on the partial 16S rRNA gene sequences (AF468055- AJ874354 were database accession numbers in NCBI, numbers above branches in tree are bootstrap values)

2.7 胞外酶活性及溶血活性

酶活性实验结果表明,4株鱼肠道弧菌均无淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶、DNA酶和卵磷脂酶、脲酶及明胶酶活性;且4株鱼肠道弧菌在含7%家兔脱纤血液营

养琼脂培养基上均无溶血现象。

2.8 菌株K抗原及血清同源性

应用玻板凝集和试管凝集反应对供试4株鱼肠道弧菌所测K抗原及血清同源性结果见表2。

表2 四株分离菌凝集反应结果
Tab 2 Results of the agglutination test of 4 isolates

抗血清 (HC051105-1)Antiserum		玻板凝集原 Slide agglutination antigen	试管凝集原 Tube agglutination antigen	
			OK	O
OK 抗血清	OK-antiserum	++	5lg2 (1:32X)**	9lg2 (1:512X)
O 抗血清	O-antiserum	++	5lg2 (1:32X)	6lg2 (1:64X)
生理盐水	Saline water	—	0lg2 (<1:2X)	0lg2 (<1:2X)

注: ++, 明显凝集; —, 不凝集; **, 凝集效价
Note ++, obvious agglutination; —, no agglutination; **: agglutination titre

从表2可以看出4株鱼肠道弧菌的玻板凝集原与HC051105-1株制备的OK、O抗血清均明显凝集(++)、与对照的生理盐水均不凝集(—)仍呈均匀混浊态,初步表明该菌不存在O凝集抑制性K抗原。4株纯培养菌制备的OK及O试管凝集原与HC051105-1株制备的OK抗血清的凝集效价在OK凝集原的完全一致,均为5lg2(1:32倍);O凝集原的完全一致,均在9lg2(1:512倍),比相应OK凝集原的高4个抗体滴度;OK、O凝集原与HC051105-1株制备的O抗血清的凝集效价,在O凝集原的完全一致,均为6lg2(1:64倍);OK凝集原的完全一致,均在5lg2(1:32倍),比相应O凝集原的低1个抗体滴度,进一步表明了该菌不存在K抗原。使用全菌(OK)凝集原与OK、O抗血清的抗体效价与使用热处理(O)凝集原与OK、O抗血清的抗体效价相比均表现的低,其原因可能是经热处理(121℃作用1h)后的菌体更易于与抗体结合之故。

2.9 药物敏感性

测定4株分离菌对37种抗菌类药物的敏感性,结果均对供试的青霉素G、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、氨基苄青霉素、庆大霉素、妥布霉素、丁胺卡那霉素、新霉素、诺氟沙星、氧氟沙星、环丙沙星、氯霉素、呋喃妥因、呋喃唑酮、恩诺沙星、克林霉素、万古霉素、新生霉素、氨基糖苷类、阿奇霉素、链霉素、多黏菌素B、卡那霉素、大观霉素、四环素、多西霉素、复方新诺明、甲氧苄氨嘧啶、利福平、红霉素等35种药物高度敏感;对苯唑青霉素和杆菌肽2

种耐药。

3 讨论

本次对发生在河北昌黎地区养殖红鳍东方鲀大量死亡的病鱼进行病原研究,通过对病鱼溃烂组织及肝组织抹片标本经染色后镜检发现细菌,有规律地自病鱼溃烂组织及肝组织中分离到优势生长的细菌,并经鉴定表明为同种细菌,对健康红鳍东方鲀进行人工感染试验,能够引起健康红鳍东方鲀的发病与死亡并能重新分离回收到原感染菌,表明所检出并经鉴定的鱼肠道弧菌为本次被检病死红鳍东方鲀的相应病原菌。本文首次报道了鱼肠道弧菌对红鳍东方鲀的感染,进一步表明了该菌在水产养殖动物中的广泛致病作用。另一方面,通过本次对鱼肠道弧菌较系统的鉴定,进一步丰富了该菌在形态与培养特性、理化特性及16S rRNA基因序列与系统发育学方面的内容,为对该菌的有效检验提供了可参考的资料。

弧菌的致病性取决于弧菌与宿主细胞间的相互作用,致病过程也包括黏附、侵袭、体内增殖及产生毒素等,而这些又与弧菌产生的各种毒力因子有关。目前已发现的弧菌毒力因子有外毒素(Exotoxin)、蛋白酶(Protease)、荚膜(Capsule)、载铁体(Siderophore)及外膜蛋白(Outer membrane protein OMP)等,如鳃弧菌(Vibrio anguillarum)^[12]、溶藻胶弧菌(V. alginolyticus)、副溶血弧菌(V. parahaemolyticus)^[13]、创伤弧菌(V. vulnificus)^[14]、哈维氏弧菌^[15]等多种鱼、虾类病原弧菌均可产生具有强烈致病作用的胞外蛋白酶;溶血素也是多数病原菌的重要致病因子之一,目前也已

在鳃弧菌、副溶血弧菌等病原弧菌的胞外产物中检测到。而本次通过对分离鉴定的病原鱼肠道弧菌胞外酶及溶血活性的检测,表明 4株供试菌均无淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶、DNA酶和卵磷脂酶、脲酶及明胶酶活性,且均在含 7%家兔脱纤血的营养琼脂培养基上无溶血现象,提示该菌的致病机理可能与其他毒力因子的分泌及该菌的生存能力、侵袭能力以及抗宿主的防御能力等诸方面相关。

细菌的 K 抗原成分在病原细菌的致病作用中常发挥着重要作用,可构成病原细菌的重要毒力因子,主要表现在抵抗机体免疫系统吞噬细胞的吞噬作用、对机体细胞的黏附发挥毒力作用、利于细菌向机体内部广为深入扩散的侵袭作用等方面。本次经用 4株供试菌制备的 OK、O凝集原与用代表菌株 HC051105-1所制备的 OK、O 抗血清做对应及交叉的凝集抗体效价测定,表明 4株供试菌均不存在不耐热的 K 抗原,且为同种血清型(血清同源),这一结果在对该菌进行血清型检定、血清流行病学调查、免疫血清学检验及致病机理研究方面具有一定的指导意义。

本次经以 37种抗菌类药物对 4株鱼肠道弧菌的药敏测定,尚未发现不同菌株间对某种抗菌药物敏感或耐药的明显差异性,供试 4株菌均对苯唑青霉素和杆菌肽 2种耐药(抑菌圈直径为 0),对其他 35种药物均高度敏感(抑菌圈直径在 20—42mm),该结果与分离自牙鲆的病原鱼肠道弧菌的药物敏感性方面的研究结果一致,初步显示该菌所测菌株在对供试抗菌类药物中所表现出的一致性,有益于在防治由该菌引起的水产动物疾病的选择用药。

参考文献:

- [1] Ishimaru K Akagawa Matsushita M Muroga K. *Vibrio ichthyocyteri* sp. nov. a pathogen of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1996 46: 155— 159
- [2] Kim D H Han H J Kim S M et al Bacterial enteritis and the development of the larval digestive tract in olive flounder *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel) [J]. *Journal of Fish Diseases* 2004 27(9): 497
- [3] Chen C Z Fang H Zhang X J et al Infection and characterization of *Vibrio ichthyocyteri* isolated from flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Journal of Tropical Oceanography* 2006 25

- (5): 80— 86 [陈翠珍, 房海, 张晓君, 等. 牙鲆鱼肠道弧菌感染症及病原特性研究. 热带海洋学报, 2006 25(5): 80— 86]
- [4] Dong X Z Cai M Y. *Manual of determinative bacteriology to usual bacteria* [M]. Beijing Science Press 2001, 106 — 120 [东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社. 2001, 106— 120]
- [5] Yang Z S Fang H. *Human and Animal Pathogenic Bacteriology* [M]. Shijiazhuang: Hebei Science and Technology Press 2003, 1550 — 1610 [杨正时, 房海. 人及动物病原细菌学. 石家庄: 河北科学技术出版社. 2003, 1550— 1610]
- [6] Martin F Polz Collen M Cavanaugh B. Bias in template to product ratios in multitemplate PCR [J]. *Appl Environ Microbiol* 1998 64(10): 3724— 3730
- [7] Holt J G Krieg N R Sneath P H A et al *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ninth Edition [M]. Baltimore: Williams and Wilkins 1994, 192, 253, 253— 274
- [8] Krieg N R Holt J G *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* [M]. Volume 1. London: Williams and Wilkins Baltimore 1984, 518— 538
- [9] Austin B Austin D A. *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish* [M]. Third (Revised) Edition Praxis Publishing Ltd Chichester UK 1999, 31, 114
- [10] Shen G X Zhou R L. *Laboratory Technology of Modern Immunology* [M]. Wuhan: Hubei Science and Technology Press 1998, 68— 73 [沈关心, 周汝麟. 现代免疫学试验技术. 武汉: 湖北科学技术出版社. 1998, 68— 73]
- [11] Ye Y W Wang Y S. *Operating Specification for Clinical Examination of National* (2th ed) [M]. Nanjing: Southeast University Press 1997, 553— 562 [叶应妩, 王毓三. 全国临床检验操作规程(第二版). 南京: 东南大学出版社. 1997, 553— 562]
- [12] Chen S Y Mo Z L Zhang Z D et al Purification and characterization of a virulent factor in extracellular products of *Vibrio anguillarum* [J]. *High Technology Letters* 2002 12(8): 96— 100 [陈师勇, 莫照兰, 张振冬, 等. 鳃弧菌胞外产物中致病因子的分离纯化及性质研究. 高技术通讯, 2002 12(8): 96— 100]
- [13] Wu H B Pan J P. Virulence mechanisms of pathogenic vibrio [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica* 2003 27(4): 422 — 426 [吴后波, 潘金培. 病原弧菌的致病机理. 水生生物学报, 2003 27(4): 422 — 426]
- [14] Kreger A Lockwood D. Detection of extracellular toxin(s) produced by *Vibrio vulnificus* [J]. *Infection and Immunity* 1981 33(2): 583 — 590
- [15] Shi C B Hu X F Chen X G et al Characteristics of the extracellular products of two pathogenic *Vibrio harveyi* strains [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica* 2007 31(1): 83 — 87 [石存斌, 胡学峰, 陈献稿, 等. 两株致病性哈维氏弧菌胞外产物的特性分析. 水生生物学报, 2007 31(1): 83 — 87]

STUDIES ON BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF PATHOGENIC *VIBRIO* *ICHTHYOENTERI* ISOLATED FROM PUFFERFISH (*TAKIFUGU RUBRIPS* L.)

ZHANG Xiao-Jun¹, CHEN Cui-Zhen², YAN Bin-Lun¹, FANG Hai², QIN Guo-Min¹ and XU Jing¹

(1. Key Laboratory of Oceanic Biotechnology of Jiangsu Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

2. Department of Animal Science, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao 066600, China)

Abstract Pufferfish (*Takifugu rubripes* L.) of the Order Tetraodontiformes is a mariculture fish with high economic value in the aquaculture industry in northern China. Presently, commercial production of pufferfish in China is hampered by variable mortalities and this may be due, at least in part, to pathogenic bacteria. In November 2005, our laboratory examined diseases occurring in pufferfish, and *Vibrio ichthyenteri* was isolated and identified based on its extensive phenotypic information. In the present paper, the isolation and characterization of the pathogenic bacteria obtained from pufferfish are described.

Biological study was carried out on pathogenic bacteria isolated from infected individuals using traditional and modern molecular techniques in morphology, physiology and biochemistry. Molecular identification of the isolates was conducted: the 16S rRNA genes were partially sequenced and compared with those of databases, and a molecular phylogenetic tree was constructed. The representative strain (HC051105-1) was used in experimental infection of selected pufferfish to confirm pathogenicity. In addition, extracellularase activity, hemolytic activity and drug resistance of isolates were all examined, and the isolates were checked for the presence of K-antigen by slide agglutination and tube agglutination using rabbit anti-serum.

Bacteriological cultures on nutrient agar and blood agar from the liver, kidney and spleen of moribund (or dead) pufferfish yielded an apparently pure culture. Four strains (HC051105-1, HC051105-3, HC051105-5 and HC051105-7) isolated from liver and kidney were randomly selected and examined and found quite similar in morphology, being Gram-negative, rod-shaped (some slightly curved), single with round ends, no endospores, and $(0.4 - 0.6) \mu\text{m} \times (1.0 - 2.5) \mu\text{m}$ in size. The sequenced 16S rRNA gene of represent strains HC051105-1 and HC051105-3 (GenBank accession No. EF611424 and EF635304) were 1452 bp and 1461 bp in length respectively, and the two strains shared high similarity (98% - 100%) with the 16S rRNA gene of *V. ichthyenteri* from GenBank database. The results showed that the identified strain belonged to *V. ichthyenteri* (Ishinaru et al. 1996) in terms of morphology, physiology and biochemistry up with the regarding criteria, and the results of molecular identification (16S rRNA partial sequence). The phenotypic determination of extracellularase activity and hemolytic activity showed the isolates have not diastase, proteinase, Lipase, DNase, lecithinase, urease and gelatinase, and could not produce haemolysin. Detection of K-antigen revealed the isolates have not K-antigen. In addition, an artificial infection experiment of strain (HC051105-1) revealed correspondent pathogenicity of *V. ichthyenteri* to pufferfish. The susceptibility of isolates to 37 antimicrobial agents showed that 4 strains were all resistant to oxacillin and bacitracin. The study further demonstrated the significance of *V. ichthyenteri* as pathogenic bacteria and extensive pathogenicity in the fish species.

Key words *Vibrio ichthyenteri*; Biological characteristics; Phylogenetic analysis