

长鳍真鲨源哈氏弧菌的主要生物学性状研究

房海¹ 秦国民² 陈翠珍¹ 张晓君² 葛慕湘¹

(¹河北科技师范学院 河北省预防兽医学重点实验室, 秦皇岛 066004)

(²淮海工学院 江苏省海洋生物技术重点实验室, 连云港 222005)

摘要 从两尾病死的观赏用长鳍真鲨 *Oceanic whitetip shark, Carcharhinus longimanus* 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生物学性状检验。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, 构建了系统发育树。结果表明, 8株供试纯培养菌(编号: HQ050226-1至HQ050226-4、HQ050227-1至HQ050227-4)为弧菌属(*Vibrio* Pacini 1854)的哈氏弧菌(*Vibrio harveyi* Johnson and Shunk 1936)。所扩增的16S rRNA 基因序列长度(不包括引物结合区), HQ050226-1株为1463bp(GenBank 登录号: EF635305)、HQ050227-1株为1464bp(GenBank 登录号: EF635306), 与GenBank 数据库中哈氏弧菌的同源性在98%及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33种敏感。

关键词 长鳍真鲨 哈氏弧菌 生物学性状 系统发育学

中图分类号 Q939.1; Q959.426 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)01-0019-07

Biological characteristics of *Vibrio harveyi* from diseased oceanic whitetip shark *Carcharhinus longimanus* L.

FANG Hai¹ QIN Guo-min² CHEN Cui-zhen¹

ZHANG Xiao-jun² GE Mu-xiang¹

(¹ Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine of Hebei, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao 066004)

(² Key Laboratory of Oceanic Biotechnology of Jiangsu, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005)

ABSTRACT The biological characteristics of bacteria isolated from oceanic whitetip shark *Carcharhinus longimanus* L. were examined, including morphological characteristics, physiological and biochemical characteristics and antibiotic sensitivity. In addition, the 16S rRNA gene were partially sequenced and compared with sequences listed in databases; molecular phylogenetic trees were constructed. The results showed that the eight pure strains (HQ050226-1 to HQ050226-4 and HQ050227-1 to HQ050227-4) belonged to *Vibrios* (*V. harveyi*). The sequenced 16S rRNA gene of strain HQ050226-1 (GenBank accession No. EF635305) was 1463bp in length, the sequenced 16S rRNA gene of strain HQ050227-1 (GenBank accession No. EF635306) was 1464bp in length, and exhibited high similarity (98% and 99%) to the 16S rRNA gene of *V. harveyi* from GenBank database. Antibiotic sensitivity using 37 antimicrobial agents showed that isolates were

河北省自然科学基金项目(C2005000498)资助

收稿日期:2007-10-22,接受日期:2007-12-24

作者简介:房海(1956-),男,教授,主要从事病原微生物学研究。E-mail:fanghaihb@163.com, Tel:(0335)8387028

resistant to 4 agents including penicillin G, but were sensitive to 33 agents including cefazolin.

KEY WORDS Oceanic whitetip shark (*Carcharhinus longimanus* L.)
Vibrio harveyi Biological Characterization

长鳍真鲨 Oceanic whitetip shark (*Carcharhinus longimanus* L.) 分类于真鲨目 Carcharhiniformes、真鲨科 Carcharhinidae、真鲨属 *Carcharhinus*, 广布于世界热带和暖温带海域, 目前已成为海洋世界里的主要观赏鱼类之一。随着鲨鱼从自然海区转养至室内水族馆养殖, 由细菌引起的疾病早已有记述。Grimes 等(1984)报道, 在美国曾由鲨鱼弧菌 *Vibrio carchariae* 引起水族馆养殖的沙洲鲨 Sandbar shark (*Carcharhinus plumbeus* L.) 和柠檬鲨 Lemon shark (*Negraprion brevirostris* L.) 发生“血管炎(Vasculitis)”, 病鱼表现为昏睡, 不摄食, 定向障碍, 形成皮下囊肿; 剖检可见脑部发炎, 脑膜发炎, 肾脏坏死, 血管炎, 无典型特征的肝脏和脾脏损伤 (Grimes *et al.* 1984a; Colwell *et al.* 1984)。

2005年2月, 作者对河北秦皇岛某海洋公园养殖的相继死亡两尾观赏用长鳍真鲨进行了检验。分别以两尾长鳍真鲨的病变组织为材料做细菌学检验。结果表明, 分离菌株为弧菌属 (*Vibrio* Pacini 1854) 的哈氏弧菌 (*Vibrio harveyi*)。为丰富该菌在生物学性状、分子生物学等方面的内容, 作者对其进行了形态特征及理化特性、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 临床剖检与细菌分离

对发病(死)长鳍真鲨进行主要病理变化检验, 同时以两尾病死长鳍真鲨的血液、肝脏、脾脏、肾脏和性腺为材料, 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(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。

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、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、H₂S、吲哚、MR、V-P 试验、硝酸盐还原、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

取纯培养菌分别接种于 LB 肉汤中 28℃培养 16h, 按少量细菌基因组 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 1 492~1 510 个碱基位置)(Martin *et al.* 1998)。在

20 μ l 反应体系中含有:无菌蒸馏水 14.4 μ l,10 \times PCR 缓冲液 2 μ l,1.5mmol/L MgCl₂ 1.6 μ l,4 \times dNTP 混合物 0.4 μ l,引物各 0.2 μ l,2.5U/ μ l 的 Taq DNA 聚合酶 0.2 μ l,模板 DNA 1 μ l。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 3min、接 94 $^{\circ}$ C 变性 1min、55 $^{\circ}$ C 复性 1min、72 $^{\circ}$ C 延伸 2min,30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 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(1 000 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《Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed》(Holt *et al.* 1994)、《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology》(Krieg *et al.* 1984)、《Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish》(Austin *et al.* 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 临床症状鱼主要病理变化

所检两尾长鳍真鲨其中 1 尾体长 1.5m,体重 20kg;鳍基部溃烂出血,鳞片脱落,脱鳞处表面暴露肌肉呈红色,但质地正常(未腐烂);剖检见肝脏肿胀,质地糜烂,多处存在大量灰黄色、圆形或椭圆形,直径在 2~8mm 或 2mm \times 4mm 或 4mm \times 8mm 大小不等的病灶(内部质地泥状);脾脏肿胀,存在大量同肝脏上的坏死灶(呈直径 1~2mm 的圆形或 1mm \times 2mm 大小的椭圆形);生殖腺肿胀且严重出血,有少量同肝脏上的病灶(直径 2mm 左右的圆形或 2mm \times 3mm 大小的椭圆形);胸腔有血样积液,胃内无食物,小肠内黏膜出血呈鲜红色,肾脏变化不明显。另 1 尾体长 1.5m,体重 13kg;尾鳍基部溃烂、出血、有裂口(长 2~6cm),尾鳍基部向头部处(长度 25cm 左右)有大面积鳞片脱落(接近整个周围)并有溃烂出血现象,臀鳍基部溃烂并有长 10~12cm 的裂口;剖检见肝脏肿胀,土黄色,无明显病灶,脾脏肿胀,有直径 1~2mm 的灰黄色病灶,性腺严重出血、肿胀,胸腔积水(淡黄色透明液并有少量絮状物),胃内有少量食物。

2.2 病变组织中的细菌

在两尾被检长鳍真鲨的血液、肝脏、脾脏、肾脏和性腺组织中,均存在大量革兰氏阴性、散在(个别的成双排列)、两端钝圆(极个别菌体一端或两端稍尖)、大小多在 0.8~1.1 μ m \times 1.2~2.5 μ m 的杆菌(个别菌体稍弯曲),有的菌体近似球杆状。

2.3 细菌分离与纯培养菌株

以两尾被检长鳍真鲨的肝脏和性腺组织为材料,均分离到了大量同种细菌。培养 24h 检查其菌落特征为圆形光滑、透明、稍隆起、无色、边缘整齐、闪光、直径多在 1mm 左右,48h 的菌落直径多在 1.6mm 左右,呈很浅灰橘黄色、半透明或较透明,生长良好。从每尾鱼分离菌各取 4 个菌落做纯培养 4 株,共 8 株,其编号为:第 1 尾长鳍真鲨的为 HQ050226-1 和 HQ050226-2(分离于肝脏)、HQ050226-3 和 HQ050226-4(分离于性腺),第 2

尾长鳍真鲨的为 HQ050227-1 和 HQ050227-2(分离于肝脏)、HQ050227-3 和 HQ050227-4(分离于性腺);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

8 株供试纯培养菌的形态特征一致,均为革兰氏染色阴性、两端钝圆(极个别菌体一端或两端稍尖)、散在(个别的成双排列)、大小多在 0.6~1.0 μm ×1.2~2.0 μm 的杆菌(个别菌体稍弯曲),有的菌体呈球杆状或近似球状。

2.4.2 培养特性

8 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,24 h 直径多在 1.2 mm 左右、48h 多在 1.6~2.0 mm,有狭窄 β 型溶血现象,生长良好;在 TCBS 上菌落圆形光滑、稍隆起、边缘整齐、闪光、绿色,培养 24h 检查直径多在 1.2 mm 左右、48h 多在 1.8 mm 左右,生长良好;在庆大霉素琼脂上生长不良,仅在划线接种的起始部生长些菌苔或有很少的菌落(24 h 直径多在 0.5 mm 左右、48 h 多在 1.0 mm 左右),菌苔(落)无色。在普通营养肉汤培养基中,28℃培养 24 h 检查呈轻度均匀混浊生长,管底有点状菌体沉淀(摇动后易消散)。

2.4.3 理化性状

供试 8 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 the isolates

特性 Characteristics	分离菌(8株) Isolates	哈氏弧菌 ^a <i>V. harveyi</i>
37℃生长 Growth at 37℃	+	+
氧化酶 Oxidase	+	+
接触酶 Catalase	+	+
H ₂ S 产生 H ₂ 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	-	11%~89%(阳性)
鼠李糖 L-Rhamnose	-	-
阿拉伯糖 Arabinose	+弱	11%~89%(阳性)
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	-	·

续表 1

特性 Characteristics	分离菌(8株) Isolates	哈氏弧菌 ^a <i>V. harveyi</i>
棉子糖 Raffinose	—	·
七叶苷 Aesculin	+弱	·
IPA(SIM)	—	·
菊糖 Inulin	—	·
水杨苷 Salicin	+	d
半乳糖 Galactose	+	d
海藻糖 Trehalose	+	+
糊精 Dextrin	+	·
卫茅醇 Dulcitol	—	·
甘油 Glycerol	+弱	·
纤维二糖 Cellobiose	+	+
α -甲基-D-葡萄糖苷 α -methyl-D-glucoside	—	·
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	—	·
醋酸盐利用 Acetate utilization	—	·
尿素酶 Urease	—	·
酒石酸盐利用 Tartrate utilization	—	·
黏液酸盐利用 Mucate utilization	—	·
乙酰胺酶 Acetamidase	—	·
淀粉酶 Diastase	+	+
β -半乳糖苷酶 β -galactosidase	+	·
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 μ g	S	S
150 μ g	S	S

注:“+”示阳性,“—”示阴性,“F”示发酵型,“S”示敏感,“·”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)

2.4.4 16S rRNA 基因序列与系统发育学

对 HQ050226-1 株、HQ050227-1 株所扩增的 16S rRNA 基因序列长度(不包括引物结合区), HQ050226-1 株为 1463bp (GenBank 登录号: EF635305)、HQ050227-1 株为 1464bp (GenBank 登录号: EF635306); 将 HQ050226-1 株和 HQ050227-1 株的 16S rRNA 基因序列在国际互联网上进行同源性检索, 结果均与弧菌属细菌的 16S rRNA 基因序列自然聚类。在检索出的哈氏弧菌序列中, HQ050226-1 株和 HQ050227-1 株与它们的同源性在 98% 及 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。

根据表型特征及系统发育学分析的结果, 判定分离菌为弧菌属的哈氏弧菌。

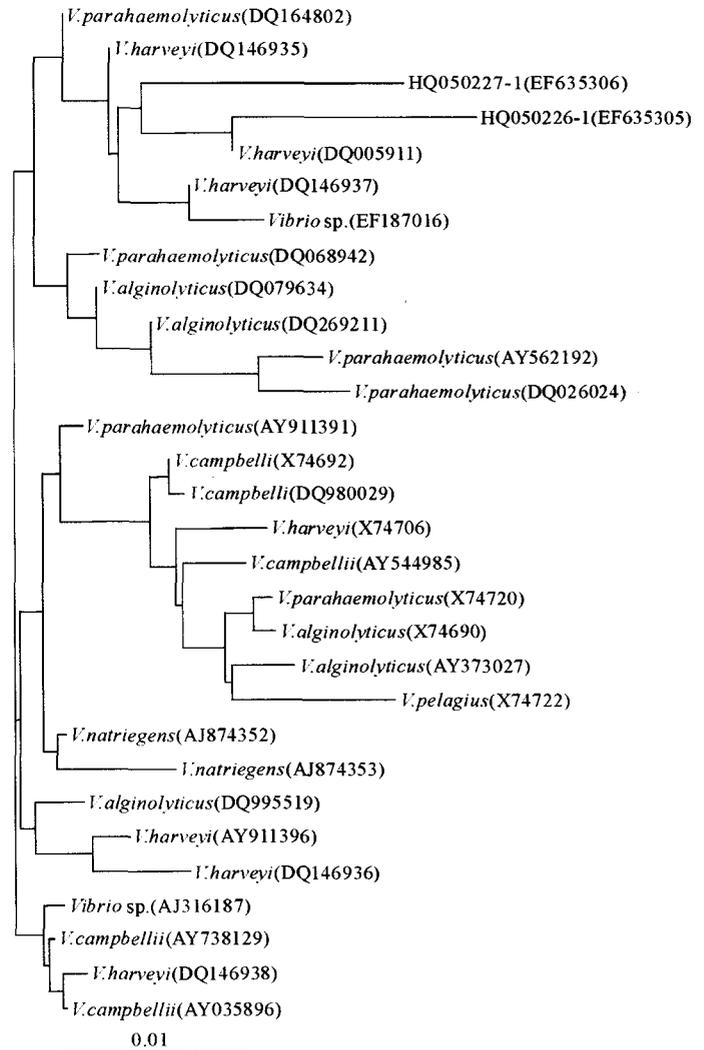
2.5 药物敏感性

HQ050226-1 株和 HQ050227-1 株两株菌对供试 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、万古霉素、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 33 种药物高度敏感或敏感(抑菌圈直径在 16~40mm); 对青霉素 G、苯唑青霉素、氨苄青霉素和杆菌肽等 4 种耐药(无抑菌圈形成)。

3 讨论

哈氏弧菌又称哈维氏弧菌, 也有的将其记作夏威夷弧菌; 以前曾由 Johnson 等(1936)将其命名为哈氏贝内克氏菌(*Beneckea harveyi*), 1981 年 Baumann 等将其正式归于弧菌属并命名为哈氏弧菌 *Vibrio harveyi* (Johnson *et al.* 1936; Baumann *et al.* 1981)。该菌是一种具有发光特性的弧菌, 是海水微生物区系的正常成员, 也是海水中一种常见的致病菌, 主要引起虾及鱼类的感染发病。

哈氏弧菌对水产养殖动物尤其是对虾的危害严重, 有记述(Pizzutto *et al.* 1995, Jiravanichpaisal *et al.* 1994, Liu *et al.* 1996)该菌曾引起澳大利亚、印度、印度尼西亚、泰国、菲律宾及台湾对虾育苗场斑节对虾幼体的大量死亡。在我国, 李军等(1998)报道在山东丰城地区部分对虾育苗场发生由该菌引起的大规模暴发性传染病; 吴后波等(1997)报道, 该菌引起海水网箱养殖高体鲷的严重感染发病; 王保坤等(2002)报道在山



(图中 DQ164802 至 AY035896 为菌株在 NCBI 的登录号)
(DQ164802~AY035896 were database accession numbers in NCBI)

图 1 HQ050226-1 株和 HQ050227-1 株 16S rRNA 基因序列系统发育树
Fig. 1 Phylogenetic tree based on HQ050226-1 and HQ050227-1 16S rRNA gene sequences

东青岛胶南小口子网箱养鱼场养殖的花鲈幼鱼因该菌感染引起大量死亡;陈献稿等(2004)报道,该菌引起广东省阳江市东平镇海水养殖斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides* L. 发生溃疡病。

哈氏弧菌作为海水养殖鱼虾类病原菌早已被确认,本次又从病死长鳍真鲨病变血液、肝脏、脾脏、肾脏和性腺组织中检出,进一步表明了其在鱼、虾类的广泛致病作用。同时,本次对分离菌株进行了较系统的理化特性检验及系统发育学分析,也相对丰富了该菌的生物学性状内容,将有益于对该菌的分类鉴定与进一步研究。药敏结果显示,两株分离菌间无明显差异,这有助于对由该菌引起的感染症治疗时的选择用药及耐药规律的研究。

参 考 文 献

- 王保坤,余俊红,李 筠,纪伟尚,徐怀恕. 2002. 花鲈弧菌病原菌(哈维氏弧菌)的分离与鉴定. 中国水产科学,9(1): 52~55
- 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
- 李 军,徐怀恕. 1998. 中国对虾幼体致病菌哈维氏弧菌的分离及其生物学特性研究. 海洋与湖沼,29(4):353~361
- 吴后波,潘金培. 1997. 海水网箱养殖高体鲷弧菌病致病菌研究. 水产学报,21(2):171~174
- 杨正时,房 海. 2003. 人及动物病原细菌学. 石家庄:河北科学技术出版社,1 550~1 610
- 陈献稿,吴淑勤,石存斌,李宁求. 2004. 斜带石斑鱼病原菌(哈维氏弧菌)的分离与鉴定. 中国水产科学,11(4): 313~317
- Austin, B., and Austin, D. A. 1999. Bacterial fish pathogens: Disease of farmed and wild fish. Third(revised)edition. Praxis Publishing Ltd, Chichester, UK, 103~105
- Colwell, R. R., and Grimes, D. J. 1984. *Vibrio* diseases of marine fish populations. Helgoländer Meeresuntersuchungen, 37: 265~287
- Grimes, D. J., Stemmler, J. H., May, E. B. et al. 1984a. *Vibrio* species associated with mortality of sharks held in captivity. Microbial Ecology, 10: 271~282
- 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
- Jiravanichpaisal, P., Miyazaki, T., and Limsuwan, C. 1994. Histopathology, biochemistry, and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*. Journal of Aquatic Animal Health, 6: 27~35
- Krieg, N. R., and Holt, J. G. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 1. London: Williams and Wilkins, Baltimore, 545~548
- Liu, P. C., Lee, K. K., Yui, K. C. et al. 1996. Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Current Microbiology, 33: 129~132
- Polz, M. F., and Cavanaugh, C. M. 1998. Bias in template to product ratios in multitemplate PCR. Appl Environ Microbiol, 64 (10): 3 724~3 730
- Pizzotto, M., and Hirst, R. G. 1995. Classification of isolates of *Vibrio harveyi* virulent to *Penaeus monodon* larvae by protein profile analysis and M₁₃ DNA fingerprinting. Disease Aquatic Organism, 21: 61~68