

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190128001

http://www.yykxjz.cn/

兰欣, 李杰, 李贵阳, 肖鹏, 莫照兰. 发病鲆鲽类分离菌株的 16S rRNA 基因测序分析. 渔业科学进展, 2020, 41(3): 142–150  
Lan X, Li J, Li GY, Xiao P, Mo ZL. Sequencing and phylogenetic analysis of the 16S rRNA genes of bacterial strains isolated from diseased flatfish. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(3): 142–150

# 发病鲆鲽类分离菌株的 16S rRNA 基因测序分析\*

兰 欣<sup>1,2</sup> 李 杰<sup>3</sup> 李贵阳<sup>3</sup> 肖 鹏<sup>1</sup> 莫照兰<sup>3①</sup>

(1. 中国科学院海洋研究所实验海洋生物学重点实验室 青岛 266071; 2. 中国科学院大学 北京 100049;  
3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 青岛海洋科学与  
与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

**摘要** 细菌性疾病是中国海水养殖鲆鲽类的主要病害, 为全面了解病原菌种类, 本研究对 1999~2012 年从山东、江苏、河北、天津等沿海地区养殖场发病鲆鲽鱼类中分离得到的 124 株优势菌株进行了 16S rRNA 基因测序和系统发育学分析。将基因序列与 GenBank 核酸序列数据库进行相似度比对分析, 结果显示, 有 83 株与弧菌属(*Vibrio* sp.)细菌相似度最高, 11 株与气单胞菌属(*Aeromonas* sp.)细菌相似度最高, 4 株与爱德华氏菌属(*Edwardsiella* sp.)细菌相似度最高, 26 株为其他 15 种属的细菌。根据系统发育学分析结果, 进一步将 66 株菌鉴定为 16 个种, 优势种为溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)、哈氏弧菌(*V. harveyi*)、鳃弧菌(*V. anguillarum*)、杀鲑气单胞菌(*A. salmonicida*)和迟缓爱德华氏菌(*E. tarda*)。选择其中的 9 株鳃弧菌和 4 株迟缓爱德华氏菌进行人工感染实验, 结果显示, 其中 7 株鳃弧菌和 3 株迟缓爱德华氏菌对大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)有较强的致病性。研究结果可为阐明中国海水养殖鲆鲽类的流行病发生历史、病原种类、病原监测及疾病控制提供重要参考。

**关键词** 鲆鲽类; 病原菌; 16S rRNA 基因; 系统发育学分析; 鉴定

**中图分类号** S943 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)03-0142-09

近年来, 中国水产养殖业发展迅速, 已成为国民经济的重要组成部分, 但随着养殖规模的扩大, 水产病害也越来越严重, 成为制约中国水产业发展的一个重要因素。据统计, 2017 年水产养殖因病害造成的直接经济损失达约 361 亿元, 在监测到的 96 种病原中, 细菌性疾病种类占了 46 种(张显良等, 2018)。中国海水养殖地域范围分布广, 从辽宁到海南的纬度跨度达 23°, 同时, 养殖品种多, 导致不同地区养殖病害种类复杂, 极大地增加了病害防控的难度。鲆鲽类

是中国海水养殖的重要品种, 在辽宁、河北、山东、江苏等多个省份均有养殖。对养殖鲆鲽类进行流行病学调查, 可为中国水产流行病学的监控提供基础数据, 并可进一步有针对性地对细菌性病害进行防治, 对中国水产事业的发展有重要意义。

水产养殖动物的病原主要有细菌、病毒、真菌和寄生虫四大类。其中, 细菌性疾病是鱼类中最为常见且是危害最大的一类疾病。现已报道的海水鱼类细菌病原超过 40 种, 包括弧菌(*Vibrio*)、爱德华氏菌

\* 国家重点研发计划(2018YFC0311300)、中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2019ZD0706)和鳌山科技创新计划(2015ASKJ02)共同资助 [This work was supported by National Key R&D Program of China(2018YFC0311300), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund (2019ZD0706), and Aoshan Technology Innovation Program (2015ASKJ02)]. 兰 欣, E-mail: lanxinqd@vip.qq.com

① 通讯作者: 莫照兰, 研究员, E-mail: mozl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-01-28, 收修改稿日期: 2019-03-19

(*Edwardsiella*)、气单胞菌(*Aeromonas*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、屈挠杆菌(*Flexibacter*)、巴斯德氏菌(*Pasteurella*)、肾杆菌(*Renibacterium*)、链球菌(*Streptococcus*)、分枝杆菌(*Mycobacterium*)和诺卡氏菌(*Nocardia*)等(Austin *et al*, 2007; Fryer *et al*, 1993)。

目前, 16S rRNA 基因的高通量测序在环境细菌组成分析研究中已得到广泛应用, 通过提取、扩增和分析水体、鱼体表和组织的总 DNA, 对 16S rRNA 基因进行扩增、测序和比对, 判断细菌的种类组成, 并可获得大量的非可培养细菌的数据。16S rRNA 是高度保守的分子, 又有中度保守和高度变化的序列区域, 适合于研究进化距离不同的各类原核生物的亲缘关系, 目前已广泛应用于细菌的分类研究(东秀珠等, 2001; Borrell *et al*, 1997)。但由于病原需要通过柯赫氏法则进行确定, 因此, 在病原的鉴定过程中, 分离培养依旧是不可缺少的一部分。鲆鲽类是中国重要的海水养殖品种, 本实验室自 1999 年以来, 开展了海水养殖鲆鲽类病害调查, 从江苏、山东、河北、天津等沿海养殖场的发病鱼分离收集菌株。本研究通过分析分离菌株的 16S rRNA 基因序列, 对其进行分类, 并对其中的鳃弧菌和迟缓爱德华氏菌进行致病性检验, 以期对中国海水养殖鲆鲽类的细菌性病原种类有深入的了解, 为病害控制提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株来源

本研究所用菌株为 1999~2012 年从江苏、山东、河北、天津等沿海地区海水养殖场发病鲆鲽类内脏分离纯化(表 1), 用甘油保存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

### 1.2 细菌 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增和测序

取保存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱的菌株在胰大豆蛋白胨平板(TSA)划线,  $28^{\circ}\text{C}$ 培养 24~36 h, 挑取单一菌落悬浮于 50  $\mu\text{l}$  无菌蒸馏水, 在  $100^{\circ}\text{C}$  水浴 5 min 裂解细胞, 离心沉淀细胞碎片, 取上清液作为细菌 DNA 模板。以细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-GGTTACCTT GTTACGAC TT-3')进行 PCR 扩增(Lane, 1991)。50  $\mu\text{l}$  PCR 反应体系: 5  $\mu\text{l}$   $10\times$  Taq buffer, 1  $\mu\text{l}$  2.5 mmol/L dNTPs (Thermo, 美国), 3  $\mu\text{l}$  25 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 10  $\mu\text{mol/L}$  引物各 1  $\mu\text{l}$ , Taq 酶 0.5  $\mu\text{l}$  (Thermo, 美国), DNA 模板 2  $\mu\text{l}$ , ddH<sub>2</sub>O 补至 50  $\mu\text{l}$ 。反应程序:  $95^{\circ}\text{C}$  5 min;  $95^{\circ}\text{C}$  1 min,  $52^{\circ}\text{C}$  1 min,  $72^{\circ}\text{C}$  1 min 40 s, 30 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 用 DNA 胶回

收试剂盒(上海生工)进行纯化, 纯化产物送上海桑尼生物科技有限公司测序。

### 1.3 16S rRNA 基因序列比对分析

所得序列在 GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 核酸数据库进行 Blast 比对分析, 根据序列相似性  $>95\%$  为同属细菌, 在  $70\% \sim 95\%$  为不同属细菌(杨霞等, 2008), 初步确定所测细菌在属水平上的分类地位。采用 BioEdit 的 ClustalW Multiple alignment 比对分析, 运用 Mega5.05 以 Neighbor-Joining 法, 重复 1000 次计算 bootstrap 值, Kimura 2-parameter 模型构建系统发育树。

### 1.4 人工感染实验

选择均重约为 30 g 的健康大菱鲆(*Scophthalmus maximus*), 养殖水温为  $16^{\circ}\text{C} \sim 18^{\circ}\text{C}$ , 通过肌肉注射方式进行人工感染。选取鉴定为鳃弧菌和迟缓爱德华氏菌的菌株接种于 TSB 液体培养基,  $28^{\circ}\text{C}$  摇床培养 12 h。离心收集菌体, 用生理盐水将菌液依次稀释至  $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$  和  $10^3$  CFU/ml。每个浓度注射 10 尾鱼, 每尾注射 0.1 ml, 对照组注射等体积的灭菌生理盐水。每天正常饲喂、换水, 记录发病和死亡情况, 对死亡鱼及时解剖, 并对病原进行分离。同时, 平板计数稀释液以确定菌液具体浓度。根据改进的寇氏法(杨茂成, 1990)计算菌株的半数致死量(50% lethal dose, LD<sub>50</sub>)。

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌 16S rRNA 基因扩增及序列分析

以引物对 27F/1492R 进行 PCR 扩增, 获得 1500 bp 左右的 DNA 片段。对纯化的 DNA 片段进行测序, 获得的 16S rRNA 基因序列提交至 GenBank, 登录号见表 1。Blast 结果显示, 所得 124 个 16S rRNA 基因序列与 GenBank 核酸数据库序列的最高相似性达  $99\% \sim 100\%$ , 可鉴定到属的地位, 其中, 弧菌属(*Vibrio* sp.) 数量最多, 共分离到 83 株, 占  $66.9\%$ ; 其次依次为气单胞菌属(*Aeromonas* sp.) (共 11 株, 占  $8.9\%$ )、爱德华氏菌属(*Edwardsiella* sp.) (4 株, 占  $3.2\%$ )、假交替单胞菌属(*Pseudaltermonas* sp.) (3 株, 占  $2.4\%$ ) 和假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.) (3 株, 占  $2.4\%$ ) 等(表 2)。在 1999~2004 年, 分离到的细菌大部分属于弧菌属, 占  $77.3\%$ ; 在 2005 年以后, 随着养殖技术的提高和养殖条件的改善, 弧菌的比例逐渐下降, 仅占  $29.6\%$ , 气单胞菌属和爱德华氏菌属的菌株

逐渐增多, 分别占 40.7%和 11.1%。

根据在 GenBank 核酸数据库中进行 Blast 比对的结果, 并从 GenBank 选取属内具有代表性的 16S rRNA 基因序列作为参考序列, 与所得序列共同构建系统进化树(图略)。综合相似性和系统进化结果, 将

66 株细菌鉴定到种的水平, 其中, 15 株为溶藻弧菌(占 12.1%), 9 株为哈氏弧菌(占 7.3%), 9 株为鳃弧菌(占 7.3%), 6 株为杀鲑气单胞菌(占 4.8%), 4 株为迟缓爱德华氏菌(占 3.2%), 以及其他种类的细菌(表 3), 其余菌株均须结合其他方法鉴定到种的水平。

表 1 分离菌株 16S rRNA 基因序列在 GenBank 核酸数据库 BLAST 分析  
Tab.1 BLAST analysis of 16S rRNA gene sequences in GenBank Nucleotide Database

菌株编号 Strains name	GenBank 登录号 Access number	与 GenBank 有最高相似度的细菌 The highest identification strains in GenBank, Access number	分离年份 Year of isolation
M3	AY035897	<i>Vibrio anguillarum</i> 775, CP002284	1999~2001
B17	AY046955	<i>Vibrio</i> sp. clone H02C48-20, HQ161427	1999~2001
M4	AY046956	<i>Vibrio</i> sp. J207, GU223597	1999~2001
SMP1	EF091702	<i>Vibrio anguillarum</i> 610, AM162655	2004
MHK9	EF091705	<i>Vibrio anguillarum</i> strain HQ010516A-1, DQ068758	2005
MHK2	HQ611038	<i>Edwardsiella tarda</i> C07-087, CP004141	2005
MHK25	HQ611039	<i>Edwardsiella tarda</i> C07-087, CP004141	2005
5SHT	KC884584	<i>Vibrio</i> sp. D4058, DQ480136	2007
8SHT	KC884585	<i>Vibrio scophthalmi</i> strain D725, JF836195	2007
25C	KC884586	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 13150, DQ068942	2002~2003
AJ1	KC884587	<i>Vibrio harveyi</i> CGB10, GU070669	1999~2001
AX4	KC884588	<i>Vibrio scophthalmi</i> LMG 19158, HM771340	1999~2001
AX6	KC884589	<i>Vibrio ponticus</i> strain AN62, JQ409384	1999~2001
B17-4	KC884590	<i>Vibrio</i> sp. CIFRI CH-TSB-27, JF784044	1999~2001
DFHYSS-1	KC884591	<i>Vibrio litoralis</i> strain MANO22D, NR043545	2010
ED2-1	KC884592	<i>Vibrio scophthalmi</i> strain D725, JF836195	1999~2001
ED3	KC884593	<i>Vibrio</i> sp. A975, GU223593	1999~2001
ED22	KC884594	<i>Vibrio harveyi</i> strain VSH5, KC261414	1999~2001
F6	KC884595	<i>Vibrio</i> sp. A5-15, JX134469	1999~2001
H5	KC884596	<i>Vibrio scophthalmi</i> strain D725, JF836195	1999~2001
HFST-4	KC884597	<i>Vibrio azureus</i> strain UDC491, HM032017	2009
IM4-1	KC884598	<i>Vibrio harveyi</i> strain CAIM 1792, JQ434106	1999~2001
IM4-2	KC884599	<i>Vibrio harveyi</i> strain CAIM 1792, JQ434106	1999~2001
IM7-1	KC884600	<i>Vibrio</i> sp. SBP, HQ123984	1999~2001
L2	KC884601	<i>Vibrio</i> sp. CIFRI CH-TSB-27, JF784044	2002~2003
L4	KC884602	<i>Vibrio anguillarum</i> 610, AM162655	2002~2003
L6	KC884603	<i>Vibrio</i> sp. CIFRI CH-TSB-27, JF784044	2002~2003
L8	KC884604	<i>Vibrio vulnificus</i> NBRC 15645, AB680930	2002~2003
L9	KC884605	<i>Vibrio damsela</i> subsp. <i>damsela</i> NBRC 15633, AB680919	2002~2003
L10-1	KC884606	<i>Vibrio furnissii</i> NCTC 11218, CP002377	2002~2003
L10-2	KC884607	<i>Vibrio furnissii</i> strain 9119-82, NR037067	2002~2003
L15	KC884608	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> BB22OP, CP003973	2002~2003
L15-2	KC884609	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> BB22OP, CP003973	2002~2003
L18	KC884610	<i>Vibrio furnissii</i> NCTC 11218, CP002377	2002~2003
L21	KC884611	<i>Vibrio damsela</i> subsp. <i>damsela</i> NBRC 15633, AB680919	2002~2003
L25	KC884612	<i>Vibrio</i> sp. CIFRI CH-TSB-27, JF784044	2002~2003
L32	KC884613	<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6 strain CMCP6, NR074889	2002~2003

续表 1

菌株编号 Strains name	GenBank 登录号 Access number	与 GenBank 有最高相似度的细菌 The highest identification strains in GenBank, Access number	分离年份 Year of isolation
L33	KC884614	<i>Vibrio metschnikovii</i> strain H050610-1, EF645831	2002~2003
L35	KC884615	<i>Vibrio furnissii</i> NCTC 11218, CP002377	2002~2003
L37	KC884616	<i>Vibrio harveyi</i> ATCC 35084, HM771342	2002~2003
L38	KC884617	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> BB22OP, CP003973	2002~2003
L40	KC884618	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> NBRC 12711, AB680329	2002~2003
L41	KC884619	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> BB22OP, CP003973	2002~2003
L44	KC884620	<i>Vibrio</i> sp. SBP, HQ123984	2002~2003
L47	KC884621	<i>Vibrio harveyi</i> ATCC BAA-1116, CP000789	2002~2003
L48	KC884622	<i>Vibrio harveyi</i> strain VSH5, KC261414	2002~2003
L50	KC884623	<i>Vibrio</i> sp. CIFRI CH-TSB-27, JF784044	2002~2003
L52	KC884624	<i>Vibrio</i> sp. CIFRI CH-TSB-27, JF784044	2002~2003
L53	KC884625	<i>Vibrio</i> sp. SBP, HQ123984	2002~2003
L62	KC884626	<i>Vibrio anguillarum</i> NBRC 13266, AB680389	2002~2003
L63	KC884627	<i>Vibrio</i> sp. A975, GU223593	2002~2003
L66	KC884628	<i>Vibrio harveyi</i> strain VSH5, KC261414	2002~2003
L67	KC884629	<i>Vibrio</i> sp. Y1-10, JX134423	2002~2003
MHK4	KC884630	<i>Vibrio damsela</i> subsp. <i>damsela</i> 04Ya311, AB571870	2005
MHK5	KC884631	Bacterium 3H203, JF411537	2005
MHK13	KC884632	<i>Vibrio anguillarum</i> AQ_Vang_001_2012_A4398, KC404866	2005
MT83	KC884633	<i>Vibrio</i> sp. HS1, EU086102	1999~2001
MWL1	KC884634	<i>Vibrio scophthalmi</i> strain D725, JF836195	1999~2001
NH1	KC884635	<i>Vibrio harveyi</i> strain VSH5, KC261414	2004
NH2	KC884636	<i>Vibrio</i> sp. Y1-10, JX134423	2004
NH4	KC884637	<i>Vibrio commol/Lunis</i> strain F052, JF836182	2004
NH6	KC884638	<i>Vibrio</i> sp. CF4-11, FJ169995	2004
NH7	KC884639	<i>Vibrio harveyi</i> CGB10, GU070669	2004
SMP2	KC884640	<i>Vibrio scophthalmi</i> LMG 19158, HM771340	2004
SMP3	KC884641	<i>Vibrio anguillarum</i> 610, AM162655	2004
SMP4	KC884642	<i>Vibrio anguillarum</i> 610, AM162655	2004
SMQ6	KC884643	<i>Vibrio scophthalmi</i> LMG 19158, HM771340	1999~2001
SMQ7	KC884644	<i>Vibrio scophthalmi</i> LMG 19158, HM771340	1999~2001
SMQ8	KC884645	<i>Vibrio ichthyenteri</i> isolate HQ010223-1, DQ003270	1999~2001
SMQ9	KC884646	<i>Vibrio scophthalmi</i> LMG 19158, HM771340	1999~2001
SMQ10	KC884647	<i>Vibrio ichthyenteri</i> isolate HQ010223-1, DQ003270	1999~2001
SMQ15	KC884648	<i>Vibrio scophthalmi</i> strain D725, JF836195	1999~2001
SMQ16	KC884649	Marine bacterium B27, AB607151	1999~2001
SMQ29	KC884650	<i>Vibrio anguillarum</i> 775, CP002284	1999~2001
SMW3	KC884651	<i>Vibrio scophthalmi</i> LMG 19158, HM771340	2004
STD3-90	KC884652	<i>Vibrio harveyi</i> isolate EHP13, FJ227119	1999~2001
TW3	KC884653	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 13150, DQ068942	1999~2001
TWL2	KC884654	<i>Vibrio</i> sp. CIFRI CH-TSB-27, JF784044	1999~2001
TWL3	KC884655	Bacterium 4D704, JF411554	1999~2001
TWL4	KC884656	<i>Vibrio</i> sp. V639, DQ146989	1999~2001
WT82	KC884657	<i>Vibrio neptunius</i> strain LMG 20536, NR025476	1999~2001

续表 1

菌株编号 Strains name	GenBank 登录号 Access number	与 GenBank 有最高相似度的细菌 The highest identification strains in GenBank, Access number	分离年份 Year of isolation
X32	KC884658	<i>Vibrio scophthalmi</i> strain D725, JF836195	1999~2001
XJ3	KC884659	<i>Vibrio ponticus</i> strain AN62, JQ409384	1999~2001
YL1	KC884660	<i>Vibrio</i> sp. CIFRI CH-TSB-27, JF784044	1999~2001
YR1	KC884661	<i>Vibrio</i> sp. Y1-10, JX134423	1999~2001
JN	KC884662	<i>Edwardsiella tarda</i> C07-087, CP004141	2007
SMQ34	KC884663	<i>Edwardsiella tarda</i> C07-087, CP004141	1999~2001
2E42-LD	KC884664	<i>Aeromonas</i> sp. SXHSY1, JX110711	2012
3A5LX	KC884665	<i>Aeromonas</i> sp. SXHSY1, JX110711	2012
3B5-2	KC884666	<i>Aeromonas</i> sp. SXHSY1, JX110711	2012
8C31-L	KC884667	<i>Aeromonas</i> sp. Z2_S_TSA18, KC213894	2012
8C41-L	KC884668	<i>Aeromonas</i> sp. SXHSY1, JX110711	2012
MHK8	KC884669	Uncultured bacterium clone OTU-14_BBA, JN981934	2005
MHK10	KC884670	<i>Aeromonas allosaccharophila</i> strain QL01, KC130967	2005
MHK14	KC884671	Uncultured bacterium clone C6, JX262562	2005
MHK20	KC884672	<i>Aeromonas allosaccharophila</i> strain QL01, KC130967	2005
MHK26	KC884673	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> NBRC12658, AB680307	2005
ZD3	KC884674	<i>Aeromonas</i> sp. Z3_S_TSA6, KC213888	2012
9DLP	KC884675	<i>Pseudomonas</i> sp. XjGEB-1, JQ320089	2012
2SHT	KC884676	Uncultured bacterium clone JdFBHulkDF9, JQ678565	2012
100409-4	KC884677	Uncultured bacterium clone D49, EU234302	2010
100409-5	KC884678	<i>Psychrobacter</i> sp. enrichment culture clone B2-3, GU570644	2010
DA1	KC884679	<i>Brevibacterium</i> sp. MN3-3, JQ396535	1999~2001
F2	KC884680	<i>Virgibacillus</i> sp. B1-21, EU435360	1999~2001
IM1-1	KC884681	Uncultured bacterium clone TE-2-B10, JQ337350	1999~2001
L1	KC884682	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain FF111, GQ280904	2002~2003
L12	KC884683	Uncultured <i>Proteus</i> sp. clone W60, JF733467	2002~2003
L16	KC884684	<i>Providencia vermicola</i> strain AR_PSBH1, HM582881	2002~2003
L29	KC884685	Uncultured <i>Proteus</i> sp. clone W60, JF733467	2002~2003
L34	KC884686	Uncultured proteobacterium clone nLO3SP1, JQ218658	2002~2003
L39-1	KC884687	<i>Jeotgalicoccus halotolerans</i> strain YKJ-101, NR025643	2002~2003
L54	KC884688	<i>Halomonas</i> sp. BJGMMOL/L-B48, JQ716248	2002~2003
L56	KC884689	<i>Halomonas</i> sp. BJGMMOL/L-B48, JQ716248	2002~2003
L58	KC884690	<i>Brachybacterium</i> sp. PL16F2_S1, JF274910	2002~2003
L60	KC884691	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> B136-33, CP004061	2002~2003
L68	KC884692	Uncultured bacterium clone TE-2-B10, JQ337350	2002~2003
L70	KC884693	<i>Pseudomonas straminea</i> NBRC 16640, AB681096	2002~2003
MHK15	KC884694	<i>Pantoea</i> sp. HC001005-1, EU364832	2005
SMP5	KC884695	<i>Arthrobacter creatinolyticus</i> NML12-0043, JX476083	2004
SMW6	KC884696	Uncultured proteobacterium clone nLO3SP1, JQ218658	2004
SMW8	KC884697	<i>Enterococcus casseliflavus</i> EC20, CP004856	2004
T2	KC884698	<i>Virgibacillus</i> sp. B1-21, EU435360	1999~2001
WT65-2	KC884699	<i>Brachybacterium</i> sp. PB10, DQ643203	1999~2001
ZMN6	KC884700	<i>Arthrobacter</i> sp. S44, HE662658	1999~2001

表2 分离菌株在属水平上的分类地位  
Tab.2 Classification status of the isolated strains on genus level

菌株编号 Strain name	数量 Number	比例 Percentage (%)	属 Genus
5SHT, 8SHT, 25C, AJ1, AX4, AX6, B17, B17-4, DFHYSS-1, ED2-1, ED3, ED22, F6, H5, HFST-4, IM4-1, IM4-2, IM7-1, L2, L4, L6, L8, L9, L10-1, L10-2, L15, L15-2, L18, L21, L25, L32, L33, L35, L37, L38, L40, L41, L44, L47, L48, L50, L52, L53, L62, L63, L66, L67, M3, M4, MHK4, MHK5, MHK9, MHK13, MT83, MWL1, NH1, NH2, NH4, NH6, NH7, SMP1, SMP2, SMP3, SMP4, SMQ6, SMQ7, SMQ8, SMQ9, SMQ10, SMQ15, SMQ16, SMQ29, SMW3, STD3-90, TW3, TWL2, TWL3, TWL4, WT82, X32, XJ3, YL1, YR1	83	66.9	<i>Vibrio</i> sp.
2E42-LD, 3A5LX, 3B5-2, 8C31-L, 8C41-L, MHK8, MHK10, MHK14, MHK20, MHK26, ZD3	11	8.9	<i>Aeromonas</i> sp.
JN, MHK2, MHK25, SMQ34	4	3.2	<i>Edwardsiella</i> sp.
2SHT, L34, SMW6	3	2.4	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.
9DLP, L60, L70	3	2.4	<i>Pseudomonas</i> sp.
100409-5, IM1-1, L68	3	2.4	<i>Psychrobacter</i> sp.
SMP5, ZMN6	2	1.6	<i>Arthrobacter</i> sp.
L58, WT65-2	2	1.6	<i>Brachybacterium</i> sp.
L54, L56	2	1.6	<i>Halomonas</i> sp.
L12, L29	2	1.6	<i>Proteus</i> sp.
F2, T2	2	1.6	<i>Virgibacillus</i> sp.
100409-4	1	0.8	<i>Bacillus</i> sp.
DA1	1	0.8	<i>Brevibacterium</i> sp.
SMW8	1	0.8	<i>Enterococcus</i> sp.
L39-1	1	0.8	<i>Jeotgalicoccus</i> sp.
MHK15	1	0.8	<i>Pantoea</i> sp.
L16	1	0.8	<i>Providencia</i> sp.
L1	1	0.8	<i>Stenotrophomonas</i> sp.

表3 分离菌株在种水平上的分类地位  
Tab.3 Classification status of the isolated strains on species level

菌株编号 Strain name	数量 Number	比例 Percentage (%)	种 Species
ED3, L2, L6, L25, L50, L52, L63, L67, NH2, NH6, STD3-90, TWL2, YL1, YR1	15	12.1	<i>Vibrio alginolyticus</i>
M4, AJ1, IM4-1, IM4-2, L37, MHK5, NH7, TWL3, TWL4	9	7.3	<i>Vibrio harveyi</i>
M3, SMP1, MHK9, L4, L62, MHK13, SMP3, SMP4, SMQ29	9	7.3	<i>Vibrio anguillarum</i>
L9, L21, MHK4	3	2.4	<i>Vibrio damsela</i>
L10-1, L10-2, L18	3	2.4	<i>Vibrio furnissii</i>
B17, 5SHT, SMQ16	3	2.4	<i>Vibrio splendidus</i>
F6, MT83	2	1.6	<i>Vibrio azureus</i>
AX6, XJ3	2	1.6	<i>Vibrio ponticus</i>
L8, L32	2	1.6	<i>Vibrio vulnificus</i>
DFHYSS-1	1	0.8	<i>Vibrio litoralis</i>
L33	1	0.8	<i>Vibrio metschnikovii</i>
WT82	1	0.8	<i>Vibrio neptunius</i>
2E42-LD, 3A5LX, 3B5-2, 8C31-L, 8C41-L, ZD3	6	4.8	<i>Aeromonas salmonicida</i>
MHK8, MHK10, MHK20	3	2.4	<i>Aeromonas allosaccharophila</i>
MHK14, MHK26	2	1.6	<i>Aeromonas veronii</i>
JN, MHK2, MHK25, SMQ34	4	3.2	<i>Edwardsiella tarda</i>

## 2.2 人工感染实验和半数致死量

选取鉴定为鳃弧菌和迟缓爱德华氏菌的菌株对大菱鲆进行人工感染实验和半数致死量计算。结果显示,在9株鳃弧菌中,7株对大菱鲆具有较强的致病性;在4株迟缓爱德华氏菌中,3株有较强的致病性。细菌的半数致死量如表4所示,鳃弧菌M3、SMP1和SMQ29对大菱鲆的半数致死量在 $10^5$  CFU/尾左右,L4、L62、SMP3和SMP4的半数致死量在 $10^6$  CFU/尾左右,鳃弧菌MHK9和MHK13的半数致死量都在 $10^7$  CFU/尾以上,属于非致病性菌株。迟缓爱德华氏菌JN、SMQ34和MHK2对大菱鲆的半数致死量在 $10^3\sim 10^4$  CFU/尾,MHK25的半数致死量超过 $10^7$  CFU/尾,也属于非致病性菌株。

表4 分离菌株对大菱鲆的半数致死量  
Tab.4 The 50% lethal dose of isolates in turbot

菌株 Strains	半数致死量 50% lethal dose (CFU/ind.)	
<i>Vibrio anguillarum</i>	M3	$10^{5.1}$
	SMP1	$10^{5.2}$
	SMQ29	$10^{5.4}$
	L4	$10^{6.2}$
	L62	$10^{6.5}$
	SMP3	$10^{6.8}$
	SMP4	$10^{6.8}$
	MHK13	$> 10^7$
	MHK9	$> 10^7$
<i>Edwardsiella tarda</i>	MHK2	$10^{4.1}$
	JN	$10^{3.4}$
	SMQ34	$10^{3.8}$
	MHK25	$> 10^7$

## 3 讨论

本研究采用16S rRNA基因序列测定及比对分析方法,对1999~2012年从发病海水养殖鲆鲽类中分离到的124株细菌进行了分类地位的分析。结果表明,分离到的弧菌菌株最多,占66.9%,表明弧菌病仍然是中国鲆鲽类养殖的主要疾病。弧菌广泛分布于海洋和河口环境,共发现有66个种(Garrity *et al.*, 2004),其中,对于水生动物危害严重的常见种类有鳃弧菌、溶藻弧菌、哈氏弧菌、创伤弧菌、拟态弧菌(*V. mimicus*)和河弧菌(*V. fluvialis*)等。本研究表明,溶藻弧菌、鱼肠道弧菌、大菱鲆弧菌、哈氏弧菌和鳃弧菌为江苏、山东、河北和天津鲆鲽类养殖场发病鱼分离到的优势种。鳃弧菌是鲆鲽类常见的致病菌,本研究共分

离到9株鳃弧菌,占分离弧菌的10.84%。另外,还分离到创伤弧菌、河弧菌、灿烂弧菌、费氏弧菌(*V. fischeri*)、梅氏弧菌(*V. metschnikovii*)、美人鱼弧菌(*V. damsela*)、病海鱼弧菌(*V. ordalii*)、栖黑海弧菌(*V. ponticus*),这些弧菌感染水产动物并引起疾病的事件在国内外均有报道(Austin *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 2007)。在分离得到的弧菌中,溶藻弧菌、创伤弧菌为食源性致病菌,可引起人类食物中毒(Austin, 2010),这表明对水产品来源的弧菌监测应当成为食品安全监管的重要内容。

气单胞菌属的细菌为人鱼共患病原,其中,杀鲑气单胞菌、嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)、维隆气单胞菌(*A. veronii*)是引起鱼疾病的主要病原(Austin *et al.*, 2007)。本研究鉴定的11株气单胞菌,分别为杀鲑气单胞菌、维隆气单胞菌和异常嗜糖气单胞菌(*A. allosaccharophila*)。杀鲑气单胞菌是鲑科鱼类的主要病原,引起鲑鳟鱼的病害并造成严重经济损失(Austin *et al.*, 2007),在中国已发现该病原可感染石斑(*Kareius bicoloratus*)、刺参(*Apostichopus japonicus*)等养殖对象(曹成易等, 2009; 杨嘉龙等, 2007; 张晓君等, 2005);维隆气单胞菌宿主广泛,可感染多种淡水养殖鱼类(Janda *et al.*, 2010),在海水鱼类的肠道中也广泛存在(Herrera *et al.*, 2006),在养殖环境恶化或病原感染的情况下,可能会入侵鱼体引起继发性感染;异常嗜糖气单胞菌也在西班牙养殖的欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)中有感染报道(Martinez-Murcia *et al.*, 1992)。

迟缓爱德华氏菌能感染许多动物并引发爱德华氏菌病,感染的动物包括鱼类、两栖类、爬行类直到哺乳类(Thune *et al.*, 1993)。多年来,中国北方的重要水产养殖品种如大菱鲆、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)等常受到迟缓爱德华氏菌感染,经济损失严重(王印庚等, 2007; 李杰等, 2008),给水产养殖业造成了严重影响。目前,迟缓爱德华氏菌是该属唯一可以感染人的致病菌,给水产食品安全带来威胁,应引起广泛的重视。

鳃弧菌和迟缓爱德华氏菌是近年来常见的鲆鲽类致病菌,针对这2种病原,对分离得到的菌株进行了大菱鲆感染实验。在分离到的9株鳃弧菌中,7株对大菱鲆具有较强的致病性;4株迟缓爱德华氏菌中,3株对大菱鲆有较强的致病性。近年来,随着鲆鲽类养殖业的发展,疾病种类也不断增加(李杰等, 2019)。中国鲆鲽类大规模养殖起源于20世纪90年代,本研究中检测的菌株大多是实验室在2000年左右分离(表1),这表明在规模化养殖初期,这些病原就开始

危害中国的养殖鲆鲽类,在今后的水产养殖疾病预防中需对其进行特别关注和重视。

有 26 株细菌未能鉴定到种的地位,分别为假单胞菌属、假交替单胞菌属、冷杆菌属(*Psychrobacter* sp.)、嗜盐单胞菌属(*Halomonas* sp.)等 15 个属。假单胞菌属细菌是动植物、人类常见的病原,能引起养殖鲆鲽类的脱鳞症(Li *et al.*, 2018)。假交替单胞菌对海洋动物致病性的报道不多,在中国已发现该属细菌可引起刺参、七带石斑鱼(*Epinephelus septemfasciatus*)疾病(王印庚等, 2006; 孟庆国等, 2006; 乔迁等, 2010)。其他 13 个种属的细菌为水环境的菌株,对水生动物的致病性尚未有报道,其致病性需要通过进一步的研究来确定。

鲆鲽类的规模化养殖在中国已有 20 多年历史,病害是影响鲆鲽类养殖业的重要因素,不仅引起鱼类死亡造成直接经济损失,而且可能导致药物滥用引起药残超标,造成消费者恐慌,进而影响市场价格。目前,国内对养殖鱼类的发病情况报道多集中于个体病例分析,缺乏对产业病害的整体分析,更缺乏规模化养殖起步阶段的病害情况资料。本研究对实验室自 1999 年以来从发病养殖鲆鲽类中分离的 124 株菌株进行了鉴定和综合分析,初步确定了中国养殖鲆鲽类主要流行的细菌性病原,为病害防治、流行病学衍化和疫苗开发提供了基础数据。

## 参 考 文 献

- Austin B, Austin DA. Bacterial fish pathogens: Disease of farmed and wild fish (4th ed.). Godalming, UK: Springer Praxis, 2007, 243–279
- Austin B. Vibrios as causal agents of zoonoses. *Veterinary Microbiology*, 2010, 140(3–4): 310–317
- Borrell N, Acinas SG, Figueras MJ, *et al.* Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35(7): 1671–1674
- Cao CY, Wang KY, Wang L, *et al.* Isolation and identification of pathogenic bacteria causing ulcer disease of Atlantic salmon. *Freshwater Fisheries*, 2009, 39(1): 54–57 [曹成易, 汪开毓, 王玲, 等. 大西洋鲑杀鲑气单胞菌的分离鉴定. *淡水渔业*, 2009, 39(1): 54–57]
- Dong XZ, Hong JH. Diversity of prokaryotic microorganisms. *Biodiversity Science*, 2001, 9(1): 18–24 [东秀珠, 洪俊华. 原核微生物的多样性. *生物多样性*, 2001, 9(1): 18–24]
- Fryer JL, Rohovec JS. Bacterial diseases of fish. Pathology of marine and estuarine organisms. Boca Raton, CRC Press, 1993, 53–83
- Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG. Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York, Berlin, Heidelberg: Springer, 2004
- Herrera FC, Santos JA, Otero A, *et al.* Occurrence of foodborne pathogenic bacteria in retail prepackaged portions of marine fish in Spain. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 100(3): 527–536
- Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity and infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 2010, 23(1): 35–73
- Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M, eds. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Chichester: J. Wiley & Sons, 1991, 125–175
- Li J, Chen SQ, Liu CL, *et al.* Association of *Pseudomonas anguilliseptica* with mortalities in cultured spotted halibut *Verasper variegatus* (Temminck & Schlegel, 1846) in China. *Aquaculture Research*, 2018, 49(5): 2078–2080
- Li J, Liu YK, Bai L, *et al.* Isolation and identification of *Mycobacterium marinum* associated with splenic and renal granulomas disease of cultured turbot (*Scophthalmus maximus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(5): 195–200 [李杰, 刘耀宽, 白露, 等. 大菱鲆脾肾结节病病原菌的分离和鉴定. *渔业科学进展*, 2019, 40(5): 195–200]
- Li J, Mo ZL, Mao YX, *et al.* Isolation and classification of two pathogenic bacteria associated with hemorrhages of *Scophthalmus maximus*. *Marine Sciences*, 2008, 32(10): 1–5 [李杰, 莫照兰, 茅云翔, 等. 两株养殖大菱鲆体表出血病原菌的分离鉴定. *海洋科学*, 2008, 32(10): 1–5]
- Martinez-Murcia AJ, Esteve C, Garay E, *et al.* *Aeromonas allosaccharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*. *FEMS Microbiology Letters*, 1992, 91(3): 199–205
- Meng QG, Wu LJ, Wu XZ, *et al.* The pathogen of ulcerative disease in cultivated juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fisheries Science*, 2006, 25(12): 635–639 [孟庆国, 吴刘记, 吴信忠, 等. 养殖刺参溃疡病病原学研究. *水产科学*, 2006, 25(12): 635–639]
- Qiao Q, Han NN, Chen C, *et al.* Isolation and identification of pathogenic *Pseudoalteromonas* sp. and antibiotic sensitivity research. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 2010, 38(26): 14224–14226, 14232 [乔迁, 韩娜娜, 陈超, 等. 致病性假交替单胞菌的分离鉴定及药敏特性研究. *安徽农业科学*, 2010, 38(26): 14224–14226, 14232]
- Thune RL, Stanley LA, Cooper RK. Pathogenesis of gram-negative bacterial infections in warmwater fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 1993, 3: 37–68
- Wang YG, Fang B, Zhang CY, *et al.* Etiology of skin ulcer syndrome in cultured juveniles of *Apostichopus japonicus* and analysis of reservoir of the pathogens. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(4): 610–616 [王印庚, 方波, 张春云, 等. 养殖刺参保苗期重大疾病“腐皮综合征”病原及其感染源分析. *中国水产科学*, 2006, 13(4): 610–616]
- Wang YG, Qin L, Zhang Z, *et al.* Edwardsiellosis in cultured *Scophthalmus maximus*. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(4): 447–495 [王印庚, 秦蕾, 张正, 等. 养殖大菱鲆的爱德华氏菌病. *水产学报*, 2007, 31(4): 447–495]



- Xie ZY, Hu CQ, Zhang LP, *et al.* Identification and pathogenicity of *Vibrio ponticus* affecting cultured Japanese sea bass, *Lateolabrax japonicus* (Cuvier in Cuvier and Valenciennes). *Letters in Applied Microbiology*, 2007, 45(1): 62–67
- Yang JL, Zhou L, Xing J, *et al.* Identification of *Aeromonas salmonicida* associated with skin ulceration of cultured sea cucumber *Apostichopus japonicus* and characterization of the extracellular products. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(6): 981–989 [杨嘉龙, 周丽, 邢婧, 等. 养殖刺参溃疡病杀鲑气单胞菌的分离、致病性及胞外产物特性分析. *中国水产科学*, 2007, 14(6): 981–989]
- Yang MC. *Veterinary statistics*. Beijing: China Prospect Publishing House, 1990, 232–234 [杨茂成. *兽医统计学*. 北京: 中国展望出版社, 1990, 232–234]
- Yang X, Chen L, Wang CQ. Advance in application of 16S rRNA gene in bacteriology. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science)*, 2008, 36(2): 55–60 [杨霞, 陈陆, 王川庆. 16S rRNA 基因序列分析技术在细菌分类中应用的研究进展. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2008, 36(2): 55–60]
- Zhang XJ, Fang H, Chen CZ, *et al.* Studies on characterization of *Aeromonas salmonicida* subsp. *Flounderacida* subsp. Nov. from diseased stone flounder (*Kareius bicoloratus* L.). *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2005, 36(1): 51–60 [张晓君, 房海, 陈翠珍, 等. 石鲈(*Kareius bicoloratus* L.)源杀鲑气单胞菌杀鲈亚种生物学性状的研究. *海洋与湖沼*, 2005, 36(1): 51–60]
- Zhang XL, *et al.* *Aquatic animal health in China*, 2017. Beijing: China Agriculture Press, 2018 [张显良, 等. 2017 年中国水生动物卫生状况报告. 北京: 中国农业出版社, 2018]

(编辑 马瑾艳)

## Sequencing and Phylogenetic Analysis of the 16S rRNA Genes of Bacterial Strains Isolated from Diseased Flatfish

LAN Xin<sup>1,2</sup>, LI Jie<sup>3</sup>, LI Guiyang<sup>3</sup>, XIAO Peng<sup>1</sup>, MO Zhaolan<sup>3①</sup>

(1. *Institution of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao* 266071; 2. *Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100049; 3. *Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao* 266071)

**Abstract** Flatfish are the major industrial aquaculture marine fish species bred in North China. During the culturing process, members of this species are exposed to infection from a variety of pathogens. Diseases caused by bacterial pathogens are the major cause of harm to cultured flatfish in China. To investigate the bacterial pathogens that affect flatfish, we focused on 124 strains isolated from organs of diseased flatfish in Shandong, Jiangsu, Hebei, Tianjin and other similar places between 1999 and 2012. The 16S rRNA gene of the isolates was sequenced, analyzed using BLAST (GenBank), and subjected to phylogenetic analysis by using Mega 5.05. The results identified 66.90% of isolates as *Vibrio* (83 strains), 8.90% as *Aeromonas* (11 strains), 3.20% as *Edwardsiella* (4 strains), and other 15 genera (26 strains). According to the phylogenetic tree, 66 strains were identified as 16 species; the dominant species were *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. anguillarum*, *V. damsela*, *V. furnissii*, *V. splendidus*, *A. allosaccharophila*, *A. salmonicida*, and *E. tarda*. To evaluate the pathogenicity of isolates, the virulence of *V. anguillarum* and *E. tarda* strains isolated from diseased fish was further determined by experimental infection based on the 50% lethal dose (LD<sub>50</sub>) in turbot (*Scophthalmus maximus*). The results showed that seven *V. anguillarum* strains and three *E. tarda* strains were pathogenic to fish. The LD<sub>50</sub> values were 10<sup>5.1</sup> to 10<sup>6.8</sup> CFU/fish for pathogenic *V. anguillarum* and 10<sup>3.4</sup> to 10<sup>4.1</sup> CFU/fish for pathogenic *E. tarda*. There were also two strains of *V. anguillarum* and one strain of *E. tarda* that showed low virulence to turbot, with an LD<sub>50</sub> higher than 10<sup>7</sup> CFU/fish. The presented results provide significant information to ascertain the bacterial pathogens of flatfish, which is important for establishing strategies for the epidemiology, monitoring, and control of bacterial diseases.

**Key words** Flatfish; Pathogen; 16S rRNA gene; Phylogenetic analysis; Identification

① Corresponding author: MO Zhaolan, E-mail: mozl@ysfri.ac.cn