

养殖鱼类链球菌病原的分离鉴定 及其 16S rDNA 分析^{*}

周素明, 李安兴, 马跃, 刘瑞明

(中山大学 华南寄生生物研究中心 // 水生经济动物研究所, 广东 广州 510275)

摘 要: 从患病的海水网箱养殖鱼中分离到 5 株链球菌, 分别命名为 HD-1、HD-2、HD-3、HD-4 和 HD-50。常规生化结果表明, 其中 4 株即 HD-1、HD-2、HD-3 和 HD-4 为海豚链球菌 (*Streptococcus iniae*); 另外 1 株即 HD-50 为停乳链球菌 (*Streptococcus dysgalactiae*)。分别对上述分离菌株的 16S rDNA 进行 PCR 扩增和测序, 并与 NCBI 中收录的其它链球菌的 16S rDNA 序列一起进行聚类分析并构建了系统发生树, 确定其分类地位。分子分析结果与生化鉴定结果一致。攻毒实验表明以上 4 株 *S. iniae* 均能引起罗非鱼发病, 呈现典型的链球菌病症状, 并能从发病的罗非鱼脑、心、肝肾和血液中成功回收 *S. iniae*。以上生化和分子生物学鉴定以及罗非鱼攻毒实验结果表明养殖鱼类链球菌病的主要病原为 *S. iniae*。这与国外有关鱼类链球菌病原的研究报道一致。

关键词: 链球菌病; 16S rDNA; 海豚链球菌; 系统发生树

中图分类号: Q523 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2007) 02-0068-04

链球菌病是一种广泛危害淡、海水养殖鱼类的致死性疾病, 给水产养殖业, 特别是集约化鱼类养殖造成巨大的经济损失。引起鱼类链球菌病的病原菌有 *Streptococcus iniae*、*S. agalactiae*、*S. parauberis*、*Lactococcus garviae* 等^[1-3]。这些病原菌所引发鱼类的败血症、脑脊髓炎等病症表现非常相似, 并且在菌落、菌体形态上很难辨别^[1-2]。其中, *S. iniae* 最早是从亚马逊淡水海豚 (*Inia geoffrensis*) 的皮下脓肿中分离获得^[4]。该病原菌能广泛感染罗非鱼、虹鳉、鲷科鱼类、石斑鱼、鲷鱼等多种淡、海水鱼类, 是养殖鱼类的重要病原菌^[1-3], 但它在链球菌属中较为特殊。它不能用传统的 Lancefield 链球菌血清型对其进行分组^[4], 而且不同的地理株系在生化特性上存在差异^[5], 以致曾被鉴定为另一新种 “*Streptococcus shiloi*”^[6]。因此, 对 *S. iniae* 进行鉴定仅靠生理生化特征或某些病理特性是不够的。然而, 鱼链球菌病在国内并没有引起足够的重视, 在病原菌的鉴定方面, 多为简单的生理生化鉴定^[7], 分子生物学鉴定和研究却很少。在目前广泛用于细菌分类和鉴定的重要分子标记中, 16S rDNA 基因是在进化上最为保守的基因之一^[8], 因而 16S rDNA 序列分析对 *S. iniae* 的鉴定具有重要价值。本文采用传统生理生化试验与现代分子生物学手段相结合的方法对近 3 年来从南海海区网箱

养殖鱼类分离获得的几株链球菌进行病原学鉴定。

1 材料和方法

1.1 菌株

标准菌株 *Streptococcus iniae* ATCC29178 由美国乔治亚大学兽医学院 Prof. Harry W. Dickerson 惠赠。

野外分离株 HD-1、HD-2、HD-3、HD-4 和 HD-50 均采自广东省惠东县盐洲镇海水网箱养殖鱼类。HD-1 采自花尾胡椒鲷 (*Plectorhynchus cinctus*), HD-2、HD-3 采自平鲷 (*Sparus sarba*), HD-4 采自布氏石斑 (*Epinephelus bleekeri*), HD-50 采自卵形鲳鲷 (*Trachinotus ovatus*)。

1.2 病原的分离、培养

从发病网箱养殖的鱼中获取出现突眼、眼白浊, 或具有转圈游动等神经症状的病鱼, 用灭菌的接种环从病鱼的脑、肝、脾、肾等组织内取少量组织, 划线接种于 BHI 固体培养基 (脑心浸液培养基, 另加 $w=1\%$ NaCl), 于 $27\sim 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\sim 48\text{ h}$ 。同时制作以上组织的涂片。组织涂片经革兰氏染色和镜检, 判定有革兰氏阳性链状球菌, 并从相对应的平板中选取白色的小菌落进行纯培养。然后进行菌落涂片镜检、触酶试验和血琼脂平板 (购至广州环凯微生物试剂公司) 培养确认其溶血特

^{*} 收稿日期: 2006-07-07

基金项目: 广州市科技攻关引导资助项目 (2002Z3-E0271); 惠州市科技攻关资助项目 (200606); 广东省农业攻关资助项目 (2004-33000-4202078)

作者简介: 周素明 (1981 年生), 女, 博士研究生; 通讯联系人: 李安兴, E-mail: lianxing@mail.sysu.edu.cn

性。将上述分纯的菌株接种于 5 mL BHI 液体培养基（另加 $w=1\%$ NaCl）中培养 20 h。向该培养物中加入 15% ~ 20% 甘油，作为长期保存菌体储藏于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中；向上述培养物中加体积分数为 40% 甘油，作为短期保存菌储藏于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

1.3 生理生化鉴定试验

HD-1、HD-2 及 HD-50 的常规生化鉴定参照 Nguyen 和 Kana^[5] 的鉴定方法。生化鉴定试剂盒购自广州环凯微生物试剂公司；HD-3、HD-4 是委托 Intervet Nobe Singapore Pte Ltd 进行生化鉴定。

1.4 罗非鱼攻毒实验

HD-1、HD-2、HD-3、HD-4 和 HD-50 的 24 h 纯培养物离心后用灭菌的 PBS 缓冲液重悬至约 10^7 cfu mL⁻¹（经涂板计数确认），每株 0.1 mL 分别腹腔注射 20 条健康罗非鱼（体质量 80 ~ 100 g），同时用 0.1 mL 灭菌 PBS 腹腔注射 20 条罗非鱼作为对照。实验期间水温保持在 28 ~ 32 $^{\circ}\text{C}$ 。

通过尾静脉无菌抽取攻毒后 48 h 发病鱼的静脉血 0.1 mL（注射器内先吸入微量肝素钠），静脉血中加入 2 倍量 0.025% 的 triton X-100 混匀后用灭菌 PBS 作 10 倍等比稀释后涂板，28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 ~ 48 h 后计数菌落。

从发病鱼的脑、肝、脾、肾等组织无菌采样作涂板培养，同时作组织涂片。对涂片进行革兰氏染色和镜检，对涂板回收的细菌作菌落和细菌形态鉴定及触酶试验。

1.5 16S rDNA 的 PCR 扩增及序列分析

链球菌菌体 DNA 的提取：挑取单菌落接种到 5 mL BHI 液体培养基中，振荡培养培养 24 h（28 $^{\circ}\text{C}$ ）。链球菌菌体 DNA 的提取参照革兰氏阳性菌 DNA 提取方法。

16S rDNA 的 PCR 扩增：引物参照 Lau 等的设计^[9]，正向引物为 5-GAGTTGCGAACGGGTGAG-3，反向引物为 5-CTTGTTACGACTTCAACG-3，由北京赛百盛生物公司合成。反应体系 50 μL ：1 $\times$ PCR buffer MgCl₂ 2 mmol $\cdot$ mL⁻¹，dNTP 200 $\mu\text{mol}\cdot$ mL⁻¹，引物 0.2 $\mu\text{mol}\cdot$ mL⁻¹，Taq Polymerase (MBI) 1.25 U。循环参数：94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min 40 个循环（PCR 仪为 PTC-200 MJ 公司）。扩增产物由上海联合基因生物工程公司进行序列测定。测得序列采用 Clustal 1.8 msw 软件与从 GenBank 数据库中获得的其他链球菌属细菌的 16S rDNA 序列（表 2）进行多序列比对（multiple alignments），并利用 MEGA 3 软件对其进行统计和聚类分析。

2 结 果

2.1 形态特征

分离的细菌在固体培养基上生长缓慢，24 ~ 48 h 内菌落较小，但边缘平整，白色。在血平板上，HD-1、HD-2、HD-3 和 HD-4 都呈 β 溶血，而 HD-50 呈 α 溶血。革兰氏染色呈阳性，形态为球形链状，HD-3 的链较长，HD-1、HD-3、HD-4 及 HD-50 的链相对较短。

2.2 生理生化特性

分离株 HD-1、HD-2、HD-5 生理生化试验详细结果见表 1。根据文献[5]初步鉴定 HD-1、HD-2 为 *Streptococcus iniae* HD-50 为 *Streptococcus dysgalactiae*。

表 1 生理、生化试验结果
Tab. 1 Results of physiological and biochemical identification of the isolates

项目	标准株 (ATCC29178)	HD-1	HD-2	HD-50
生长	10 $^{\circ}\text{C}$	-	-	-
	6.5% NaCl	-	-	-
	45 $^{\circ}\text{C}$	-	-	-
	溶血	N	β	β
	运动性	-	-	-
发酵产酸	甘露醇	+	+	+
	蔗糖	+	+	+
	山梨醇	-	-	-
	水杨苷	-	-	-
	棉子糖	-	-	-
	木糖	-	-	+
	乳糖	+	+	+
	麦芽糖	+	+	+
	阿拉伯糖	-	-	-
水解	精氨酸	+	+	+
	马尿酸	-	-	-
	七叶苷	-	+	+
	淀粉	+	+	+
脱羧	精氨酸	+	+	+
	鸟氨酸	-	-	-
	赖氨酸	-	-	-
其他	V-P	-	-	-
	DNA 酶	-	-	-
	尿素酶	-	-	-
	H ₂ S	-	-	-
	过氧化氢酶	-	-	-

注：“+”为阳性，“-”为阴性，“N”为不确定

2.3 菌株对罗非鱼致病结果

健康的罗非鱼分别腹腔注射菌株 HD-1、HD-

2. HD-3和 HD-4后, 24 h内就开始发病。始发症状为厌食, 精神不振。继而发生皮肤黑色素沉着, 皮肤、鳍条、鳃盖广泛出血, 或出现泳姿异常、狂游等神经症状。最早死亡时间在攻毒后不到 24 h, 死亡高峰在 24 ~ 72 h, 1周内总死亡率在 75% ~ 100%。解剖发现病鱼脑部充血, 有出血点; 胆囊肿大; 肝脏淤血、出血, 有的有坏死灶。但 HD-50 攻毒后未见明显发病, 7 d内也未见死亡。

经涂板回收和组织涂片镜检发现, HD-1、HD-2、HD-3和 HD-4攻毒后发病鱼的脑、肝、脾、肾中均有大量链球菌。攻毒后 24 h发病鱼的血液涂板计数在 $105 \sim 106 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间。涂板回收细菌的菌落形态及细菌形态也都与攻毒的链球菌菌株完全一致。

2.4 扩增产物序列测定、同源比对及聚类分析

通过对 5株分离株的 16S rDNA 进行 PCR 扩增, 获得 1 300 bp大小的片段。经过序列测定和同源比对发现, 菌株 HD-1、HD-2、HD-3和 HD-4的 16S rDNA 序列与 *S. iniae* 序列具最高同源性在 99.62% ~ 99.77%之间。而 HD-50的 16S rDNA 序列与 *S. dysgalactiae* 同源性非常高, 只有一个碱基的差异。从图 1中可以看出 HD-1、HD-2、HD-3和 HD-4与 *S. iniae* 的亲缘关系最近。而 HD-50与 *S. dysgalactiae* 的亲缘关系最近。分离株的 16S rDNA 序列聚类分析结果与生化鉴定结果是完全一致的, 因此可以将 HD-1、HD-2、HD-3、HD-4鉴定为 *S. iniae* HD-50则鉴定为 *S. dysgalactiae*。

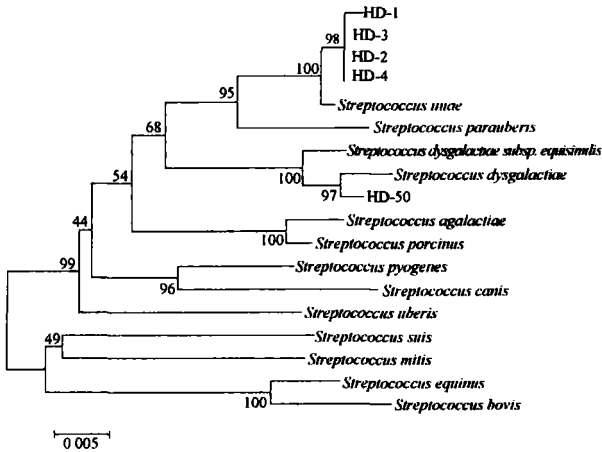


图 1 16S rRNA 基因序列分析聚类结果
Fig. 1 Phylogenetic relationship among the *Streptococcus* species based on analysis of 16S rRNA gene sequences

3 讨论

据国外报道, *S. iniae*感染鱼的种类较多, 对淡、海水养殖鱼类都有较大危害, 所以人们普遍认为鱼类链球菌病的主要病原为 *S. iniae*^[1-3]。我们从 5种不同鱼上分离的 5株链球菌中经鉴定就有 4株为 *S. iniae* 且攻毒实验表明 4株 *S. iniae*对罗非鱼具有很高的毒力, 而唯一的 *S. dysgalactiae*分离株对罗非鱼几乎没有毒力, 因此, 可以认为 *S. iniae*也是目前我国海水养殖鱼类链球菌病的首要病原。尽管 *S. dysgalactiae*对罗非鱼的毒力较弱, 但也曾造成日本网箱养殖鲷鱼大量死亡^[10], 然而目前尚未见其感染其他鱼种的报道, 可能是 *S. dysgalactiae*对宿主有选择性。

我们分离的菌株在生化特性上虽然同标准株 *S. iniae* ATCC29178极为相似, 但仍然存在一些差异, 如水解七叶苷的活性不同。除此以外, 4株 *S. iniae*的菌落及菌体形态也有差别, 即 HD-3菌落较之其他分离株和标准株更大更具粘性, 而且菌体的链较长。为了验证生化鉴定结果, 我们对其 16S rDNA 基因进行测序。从序列比对及聚类分析结果看, 分离株 HD-1、HD-2、HD-3和 HD-4与标准株 ATCC29178虽然具有较高的同源性, 但也存在种间的遗传差异, 这与巨大的地理差异有关。另外, HD-3在菌落形态及菌体形态上与 HD-1、HD-2和 HD-4有差异, 但 16S rDNA 序列却与 HD-2和 HD-4完全相同。HD-1的 16S rDNA 却与其他分离株有差别, 但差别小于链球菌的种间差别, 因此 HD-1、HD-3与另外两个分离株属于 *S. iniae* 的不同株。

作为鱼类链球菌病的主要病原菌, *S. iniae*同

表 2 16S rRNA 序列来源和数据库存取号		
Tab. 2 The source and locus number in GeneBank of the sequences of 16S rRNA gene		
名称	菌株	存取号
<i>Streptococcus iniae</i>	ATCC 29178	AF335572.1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC 23956	AB002480.1
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	ATCC 43078	AB002485.1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 12344	AB002521.1
<i>Streptococcus porcinus</i>	ATCC 43138	AB002523.1
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	ATCC 35666	AB096755.1
<i>Streptococcus uberis</i>	ATCC 27958	AB002527.1
<i>Streptococcus suis</i>	ATCC 43765	AB002525.1
<i>Streptococcus equinus</i>	NCTC 9814	AB002514.1
<i>Streptococcus mitis</i>	NCTC 3165	AB002520.1
<i>Streptococcus canis</i>	ATCC 43498	AB002483.1
<i>Streptococcus parauberis</i>	SAP 99	AF284579.2
<i>Streptococcus bovis</i>	ATCC 33317	AB002482.1

时也可以感染人类，属人畜共患病原^[11]。国内 *S. iniae* 感染人的报道极少，仅香港有两例感染人的临床报道^[9]。究其原因，一方面可能是患者对软组织损伤及蜂窝质炎等症状没有加以重视，另一方面也可能被误诊为其他更为常见的人病原链球菌如 *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* 或 *S. uberis* 等^[12]。我国对 *S. iniae* 作为人畜共患病原的研究几乎为空白，需要进行深入研究。

新加坡因特威公司谭子龙博士参与了部分样品采集和病原鉴定工作，特此致谢。

参考文献:

[1] ELDAR A, BEJERANO Y, LIBOFF A, et al. Experimental streptococcal meningoencephalitis in cultured fish [J]. Vet Microbiol 1995 43: 33 – 40.

[2] ELDAR A, GHITTINO C. *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* similar but different diseases [J]. Dis Aquat Org 1999 36(3): 227 – 231.

[3] SHOEMAKER C A, KLESIUS P H, EVANS J J. Prevalence of *Streptococcus iniae* in tilapia hybrid striped bass and channel catfish on commercial fish farms in the United States [J]. AJVR 2004 62: 174 – 177.

[4] PIER G B, MADN S H. *Streptococcus iniae* sp. nov., a betahemolytic streptococcus isolated from an Amazon freshwater dolphin *Inia geoffrensis* [J]. Int J Syst Bacteriol 1976 26: 545 – 553.

[5] NGUYEN H T, KANA I K. Selective agars for the isolation

of *Streptococcus iniae* from the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* and its cultural environment [J]. J Appl Microbiol 1999 86: 769 – 776.

[6] ELDAR A, FRELIER P F, ASSENTA L, et al. *Streptococcus shibui* the name for an agent causing septicemic infection in fish is a junior synonym of *Streptococcus iniae* [J]. Int J Syst Bacteriol 1995 45: 840 – 842.

[7] 柴家前, 丁巧玲, 王振龙, 等. 罗非鱼链球菌的分离鉴定 [J]. 中国预防兽医学报, 2002 24(1): 18 – 20.

[8] CLARRIDGE III J E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases [J]. Clinical Microbiology Review 2004 17(4): 840 – 862.

[9] LAU S K B, WOO P C Y, TSE H, et al. Invasive *Streptococcus iniae* infections outside North America [J]. J Clin Microbiol 2003 41(3): 1004 – 1009.

[10] NOMOTO R, MUNASINGHE L I, JIN D H, et al. Lancefield group C *Streptococcus dysgalactiae* infection responsible for fish mortalities in Japan [J]. J Fish Dis 2004 27: 679 – 686.

[11] MITCHELL R, WEINSTEIN M D, MARGARET L, et al. Invasive infections due to a fish pathogen *Streptococcus iniae* [J]. N Engl J Med 2004 337(9): 589 – 594.

[12] MATA A I, BLANCO M M, DOMINGUEZ L, et al. Development of a PCR assay for *Streptococcus iniae* based on the lactate oxidase (*lao*) gene with potential diagnostic value [J]. Vet Microbiol 2004 101: 109 – 116.

Isolation, Identification and Characteristics of 16S rDNA Gene Sequences of the Pathogens Responsible for the Streptococcosis in Cultured Fish

ZHOU Su-ming, LI An-xing, MA Yue, LIU Ruim-ing

(The Center of Parasitic Organism in South China, The Institute of Aquatic Economic Animals, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract Five strains of *Streptococcus* designated HD-1, HD-2, HD-3, HD-4 and HD-50 were isolated from diseased seawater farmed fish in Guangdong Province. HD-1, HD-2, HD-3 and HD-4 were identified according to their physiological and biochemical characteristics as *Streptococcus iniae* and HD-50 as *Streptococcus dysgalactiae*. The 16S rDNA of these isolates were amplified and sequenced and the sequences were aligned with those of other *Streptococci* retrieved from NCBI. The result of the alignment and clustering analysis is in accordance with the result of physiological and biochemical identification of the isolates. Typical symptoms of streptococcosis and death were showed after healthy tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged in p with these *Streptococcus iniae* isolates and the bacteria were successfully recovered from the brain, liver, kidney, spleen and blood of the infected tilapia. It is concluded that *Streptococcus iniae* is the primary pathogenic agent of streptococcosis in farmed fish, which is in accordance with the related reports from other countries in the world.

Key words streptococcosis; 16S rDNA; *Streptococcus iniae*; phylogenetic tree