

文章编号: 1000-0615(2008)03-0449-06

乌鳢致病诺卡氏菌的鉴定及系统发育分析

王国良^{1,2}, 徐益军¹, 金珊¹

(1. 宁波大学生命科学与生物工程学院教育部应用海洋生物技术重点实验室, 浙江 宁波 315211;
2. 宁波大学医学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 2006 年 6 月, 浙江萧山养殖乌鳢(*Ophiocephalus argus* Cantor) 暴发一种类似细菌性的结节病, 从患典型症状乌鳢肝脏和肾脏中分离到纯度一致的菌株 W060622。形态结构观察显示, 菌株 W060622 革兰氏阳性, 好氧, 具有弱抗酸性, 菌体呈长或短杆状, 或细长分枝状。常规生理生化试验表明, 该菌株具有诺卡氏菌属(*Nocardia*) 的基本特性。对其 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增、测序及系统发育分析, 结果表明, 该菌株与诺卡氏菌属的菌株亲缘关系最近, 与鳊鱼诺卡氏菌(*Nocardia serioleae* JCM 3360^T) 的 16S rRNA 基因序列相似性达 99.9%。据此鉴定菌株 W060622 为鳊鱼诺卡氏菌(*Nocardia serioleae*)。

关键词: 乌鳢; 鳊鱼诺卡氏菌; 结节病; 生理生化; 16S rRNA; 系统发育分析

中图分类号: S 941 **文献标识码:** A

诺卡氏菌(*Nocardia* sp.) 隶属于放线菌目(Actinomycetales), 诺卡氏菌科(Nocardiaceae)^[1], 是一类革兰氏阳性丝状杆菌, 广泛分布在土壤、活性污泥、水中。诺卡氏菌的有些种存在于动植物和人的组织中, 以腐生为主, 一些菌株是人和动物的机会致病菌。在水产养殖中, 星状诺卡氏菌(*Nocardia asteroides*)^[2-4]、粗形诺卡氏菌(*Nocardia crassostreae*)^[5] 和鳊鱼诺卡氏菌(*Nocardia serioleae*)^[6-7] 是引起诺卡氏菌病的主要病原菌。诺卡氏菌曾是日本鳊鱼养殖中最主要的病原菌之一, 也是太平洋牡蛎养殖的主要病原菌之一, 近年来对我国台湾和大陆的海淡水养殖影响较大。

本次乌鳢(*Ophiocephalus argus* Cantor) 诺卡氏菌病主要发生在浙江杭州及绍兴一带乌鳢养殖池塘, 患病对象主要为 2 龄鱼, 发病季节在 5-8 月和 10-11 月。病鱼以肝、脾、肾等内脏出现大量白色结节为主要症状, 结节大小直径 1~5 mm。发病死亡率高达 100%。本研究主要通过 16S rRNA 基因序列相似性及系统发育分析, 结合菌株形态、生理生化特性等将该乌鳢病原菌鉴

定为鳊鱼诺卡氏菌(*N. serioleae*)。这是国内外首次在养殖乌鳢中发现诺卡氏菌病^[8]。

1 材料与方法

1.1 菌株来源及菌落形态观察

供试菌株 原始菌株分离自浙江萧山患结节病乌鳢的肝脏和肾脏, 经转接纯化得到菌株 W060622, 该菌株已通过回归感染证实为该病的病原菌(另文发表)。

菌落形态 选择胰酪大豆琼脂(TSA)培养基, 制成培养皿平板。划线接种菌株 W060622, 28℃培养 5~7 d, 观察菌落形态。

1.2 菌体形态观察

显微形态 对分离菌株进行革兰氏染色和抗酸染色, 于 400 倍和 1000 倍显微镜下镜检。

利用扞片法观察菌丝体形态。取融化并冷却至约 50℃的 TSA 培养基制备平板, 凝固待用。挑取菌种在平板上划线接种, 将已灭菌的盖玻片以大约 45°角扞入培养基内(扞在接种线上), 将平板倒置, 于 28℃培养 5~7 d。取出盖玻片, 于 400 倍和 1000 倍显微镜下镜检。

收稿日期: 2007-07-13

资助项目: 宁波市自然科学基金资助(2007A610069)

作者简介: 王国良(1955-), 男, 浙江定海人, 教授, 主要从事水产动物病害研究。Tel: 0574-87600922, E-mail: wanggl@nbip.net

亚显微观察 无菌生理盐水洗下 TSA 斜面上的菌苔, 稀释并制成菌悬液。吸取一滴菌悬液置于封口膜上, 然后将其覆盖于 200 目的涂有聚乙烯甲醛(formavar-carbon)的铜网上, 放置 5 min。醋酸铀(PTA, pH 6.5)染色 3~5 min, 干燥, TECNAI 10 型透射电子显微镜观察。

取结节症状典型的病鱼肾脏组织用 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双固定, 4% 醋酸铀染色 30 min。酒精逐级脱水后, 用 100% 丙酮脱水。无水丙酮与包埋剂渗透组织, 震荡, 包埋, 并置烘箱内于 37、45 和 60 °C 逐级聚合。修块, 制备 100~120 nm 超薄切片, 醋酸铀和柠檬酸铅染色, TECNAI 10 型透射电子显微镜观察。

1.3 常规生理生化试验

参照文献[9-10]的相关属、种鉴定内容和方法, 对供试菌株的酶类产生、水解活性、单一碳源生长及温度、盐度和 pH 耐受性等进行研究, 将分离菌株鉴定到属。

1.4 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

基因组 DNA 提取和 PCR 扩增参照东秀珠^[11]的方法, 稍加改进。16S rRNA 基因 PCR 扩增引物分别为: P1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; P2: 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'。分别对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的第 8~27 和第 1492~1514 个碱基位置, 由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

PCR 反应体系总体积为 25 μL : 1 \times PCR Buffer 2.5 μL , 2.5 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂ 2 μL , dNTP(各 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.2 μL , 引物 P1、P2(25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 1 μL , Taq DNA 聚合酶(5 U \cdot μL^{-1}) 0.2 μL , DNA 模板 2 μL , ddH₂O 16.1 μL 。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 1 min, 47 °C 复性 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min, PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

PCR 产物的回收纯化采用上海基康生物有限公司的 DNA 快速纯化回收试剂盒。PCR 产物直接测序, 测序工作由上海基康生物有限公司 ABI 377 DNA 自动测序仪完成。测序引物为:

P1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

P2: 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'

P3: 5'-GTAGGGTGCAGCGTTG-3'

1.5 系统发育分析

所测序列利用 GenBank 数据库中的 BLAST 进行相似性比较。根据返回的结果, 从 GenBank 数据

库中调用 15 组邻近种的相关序列, 在 Clustalx (1.83) 软件包中进行多重序列匹配排列(multiple alignments)和聚类分析, 最后形成 1 个多重序列匹配排列阵, 其中形成的缺口用“-”填补, 用 N-J 法构建系统进化树, 并通过自举分析(bootstrap)进行置信度检测, 自举数据集为 1000 次。

2 结果

2.1 菌落形态

病原菌在 TSA、小川及罗氏培养基上均能生长, 好氧, 且生长缓慢, 需 5~7 d 才能长出。菌落呈淡黄色沙粒状, 表面粗糙, 干燥易碎, 边缘不整齐, 偶尔在表面形成皱折。在 TSA 中培养 7 d 后, 直径约 1~3 mm(图 1)。

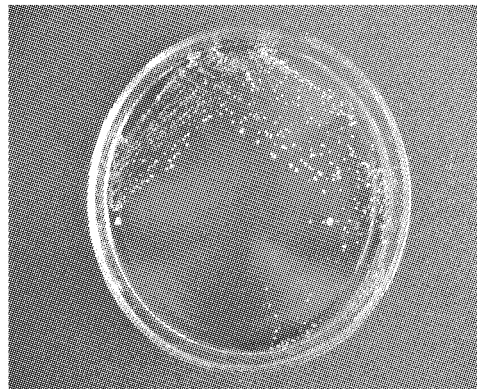


图 1 TSA 上菌落形态

Fig. 1 Growing on TSA of fish isolate

2.2 菌体形态

显微形态 病原菌革兰氏阳性, 具有弱抗酸性, 菌体短杆状。扞片法观察显示, 菌体基丝发达、繁茂, 呈分枝状, 丝状体长 10~40 μm (图 2)。

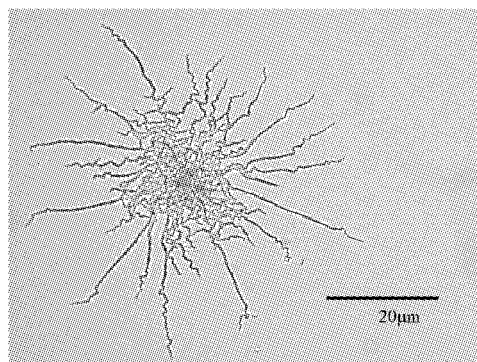


图 2 菌丝体观察

Fig. 2 Micrograph of mycelium (Bar = 20 μm)

2.2 菌体形态

亚显微观察 菌体呈长或短杆状, 或细长分枝状, 常断裂成杆状或球状体, 两端膨大成椭

球形,直径0.2~0.6 μm ,长1.0~3.0 μm ,大多成群紧密排列。病鱼组织透射电镜观察发现大量菌体,与分离菌株形态相同,且菌体结构特殊,中央或两端有丝状的类核体,胞壁为三层结构,外围高电子密度层与质膜之间被一低电子密度层隔开(图3)。

2.3 生理生化特征

病原菌过氧化氢酶阳性、氧化酶阴性,产生脲酶,还原硝酸盐,不水解酪素、腺嘌呤、黄嘌呤、

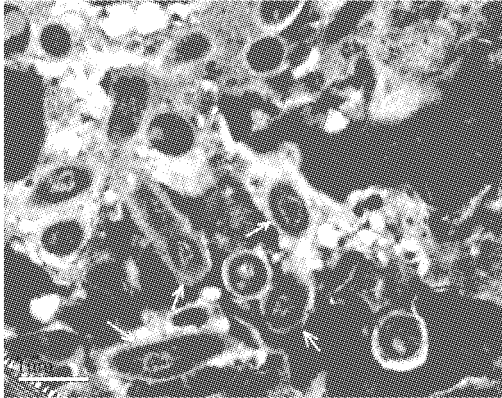


图3 病鱼肾脏组织中菌体的透射电镜观察
Fig.3 Transmission electron micrograph of bacteria in kidney lesions (Bar=1 μm)

次黄嘌呤、酪氨酸、弹性蛋白、淀粉和明胶,水解七叶灵,能以柠檬酸盐为唯一碳源生长(表1)。温度、盐度、pH 耐受上限分别为45 $^{\circ}\text{C}$ 、40及9.0。50 $^{\circ}\text{C}$ 处理8 h后转接培养不生长。上述生理生化特性与诺卡氏菌属基本一致^[12],且与其中的鲟鱼诺卡氏菌(*N. seriolae*)完全相同。

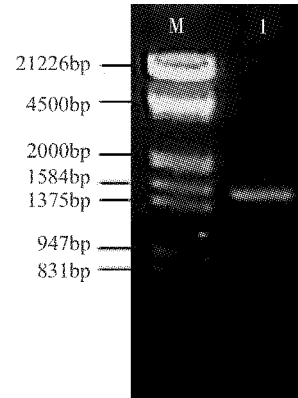


图4 16S rRNA PCR结果

Fig.4 Results of 16S rRNA amplification

2.4 16S rRNA 序列及进化树分析

用引物 P1、P2 扩增菌株的 16S rRNA 基因,共 1430 个碱基,PCR 产物凝胶电泳图谱见图 4。其序列在 GenBank 中的注册号为 EF192033。

表1 患病乌鳢病原菌及参照菌株的生理生化特性

Tab.1 Physiological and biological characteristics of isolate W060622 from snakehead and reference strains of *Nocardia*

| 鉴定项目 identification item | 乌鳢病原菌 fish isolate W060622 | 参照菌株 <i>N. seriolae</i> JCM3360 ^T | 鉴定项目 identification item | 乌鳢病原菌 fish isolate W060622 | 参照菌株 <i>N. seriolae</i> JCM3360 ^T |
|----------------------------------|----------------------------------|--|--|----------------------------------|--|
| 酶类产生 production of enzyme | | | 水解 decomposition | | |
| 过氧化氢酶 catalase | + | + | 次黄嘌呤 hypoxanthine | - | - |
| 氧化酶 oxidase | - | - | 酪氨酸 tyrosine | - | - |
| 脲酶 urease | - | - | 单一碳源利用 growth on sole carbon sources | | |
| 硝酸盐还原 nitrate | + | + | 甘露醇 mannitol | - | - |
| 水解 decomposition | | | 阿拉伯糖 arabinose | - | - |
| 七叶灵 aesculin | + | + | 山梨醇 sorbitol | - | - |
| 明胶 gelatin | - | - | 柠檬酸盐 citrate | + | + |
| 弹性蛋白 elastin | - | - | 温度、盐度、pH 耐受性 tolerance of temperature, salinity, pH | | |
| 淀粉 starch | - | - | 45 $^{\circ}\text{C}$ 生长 growth at 45 $^{\circ}\text{C}$ | - | - |
| 酪素 casein | - | - | 50 $^{\circ}\text{C}$ 培养 8h 8h under 50 $^{\circ}\text{C}$ | - | - |
| 腺嘌呤 adenine | - | - | 40‰ NaCl salinity 40 | - | - |
| 黄嘌呤 xanthine | - | - | pH 9.0 生长 growth at pH 9.0 | - | - |

注：“+”阳性；“-”阴性

Notes：“+”positive；“-”negative

将该序列与 GenBank 中已报道的 16S rRNA 基因序列进行 Blast 分析,调用相关性最高菌株的 16S rRNA 基因序列用 Clustalx(1.83)软件包进行多重序列比对分析并构建系统发育树(图 5)。结果表明,菌株与诺卡氏菌属的菌株亲缘关系最近,与鳊鱼诺卡氏菌 *Nocardia serioleae* JCM3360^T (Z36925) 的 16S rRNA 基因序列相似性达 99.9%,只有两个

碱基的差别。从 N-J 法建立的系统发育树上可以看出,该菌株与 *N. serioleae* JCM3360^T (Z36925) 位于同一个分支上,遗传距离为 0.011,自举置信值达 100%。此发育分支与其它几个分支聚成一个集中于豚鼠耳炎诺卡氏菌(*N. otitidiscaviarum*) 的 rRNA 亚群。据此鉴定该菌株为鳊鱼诺卡氏菌 (*Nocardia serioleae*)。

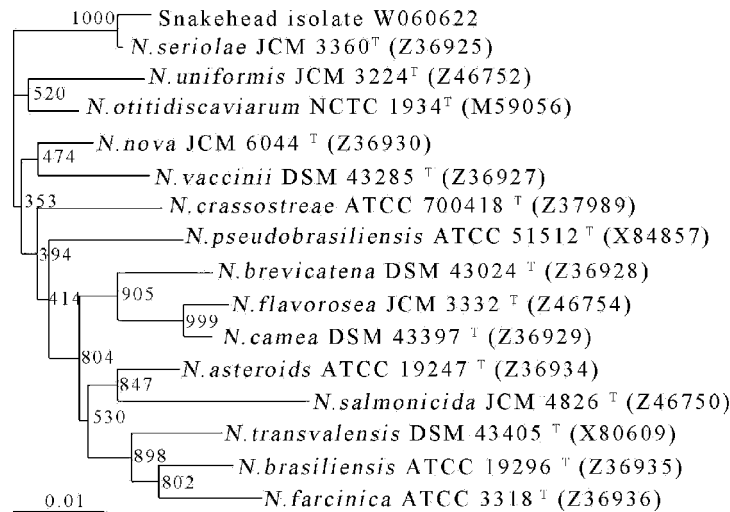


图 5 根据 16S rRNA 基因序列同源性构建的 W060622 与相关菌株的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of *Nocardia* based on 16S rRNA sequence homology

The numbers at the nodes indicate the levels of bootstrap support based on neighbour-joining analyses of 1000 resampled data sets. The scale represents 0.01 nt substitutions per position.

3 讨论

3.1 关于鱼类结节病病原

引起鱼类患结节病的病原有棒状杆菌^[13] (*Corynebacterium* sp.)、分枝杆菌^[14] (*Mycobacterium* sp.)、诺卡氏菌^[2] (*Nocardia* sp.)、巴斯德氏菌^[15] (*Pasteurella* sp.)、嗜水气单胞菌^[16] (*Aeromonas* sp.) 以及类立克次氏体(Rickettsia-like organism)^[17] 等,而引起鳊科鱼类结节病的病原有诺卡氏菌^[18]、分枝杆菌^[14]及类立克次氏体^[17]。本研究中病鱼肾脏组织的电镜观察显示,肉芽肿组织中含有大量形态、大小一致的菌体,而未见病毒颗粒、类立克次体等其它原核生物体。从分离菌株的形态、染色等特征可初步确定为诺卡氏菌引起。

3.2 诺卡氏菌的分类

诺卡氏菌的分类由最初的以形态描述、生理生化特征为主发展到现在的多相分类。修正后的诺卡氏菌属成为一个均一的分类单元,属内至少可归为 3 个 rRNA 亚群,集中于最早描述的

种,即星状诺卡氏菌(*N. asteroides*)、巴西诺卡氏菌(*N. brasiliensis*)和豚鼠耳炎诺卡氏菌(*N. otitidiscaviarum*)^[1]。

鳊鱼诺卡氏菌(*N. serioleae*)最早于 1968 分离自日本养殖五条鳊(*Seriola quinqueradiata*),此后在花鲈^[7]及大黄鱼^[19]养殖中相继报道鳊鱼诺卡氏菌感染病例。最初只在形态和生理生化特征上作了描述,并命名为阿米巴诺卡氏菌(*N. kampach*)^[6]。Kudo 等^[20]在 1988 年利用分子分类的方法[(G+C)%和 DNA-DNA 杂交]确定该菌株的分类地位,并正式命名为鳊鱼诺卡氏菌(*N. serioleae*)。此后,Chun 等^[21]和王国良等^[19]分别对鳊鱼诺卡氏菌的 16S rRNA 基因进行了 PCR 扩增和测序,并对诺卡氏菌属进行了系统发育分析。至此,诺卡氏菌的分类地位基本明确。

3.3 乌鳢致病诺卡氏菌的鉴定

本研究应用微生物的多相分类(polyphasic taxonomy)方法对病原进行研究,包括微生物的表型、基因型及系统发育信息等,以达到正确分类的目的。首先,病原菌在形态、生长和生理生

化等基本特征上均具备了诺卡氏菌属特有的生物学特征。为了进一步确定病原菌的分类地位,作者对该菌株进行了 16S rRNA 基因的分子生物学鉴定和系统发育分析。结果表明,菌株与鲷鱼诺卡氏菌 *Nocardia serioleae* JCM3360^T (Z36925) 的 16S rRNA 基因序列相似性达 99.9%, 仅有两个碱基的差别。从系统发育树上可以看出,该菌株与 *N. serioleae* JCM3360^T (Z36925) 位于同一个分支上,遗传距离为 0.011,自举置信值达 100%。据此可以确定该菌株与鲷鱼诺卡氏菌 (*Nocardia serioleae*) 属同一个种。

3.4 研究展望

诺卡氏菌病主要发生在人类和畜牧业中,对鱼类的感染在国内外亦已有报道。本次乌鳢诺卡氏菌病与此前报道的鱼类诺卡氏菌病类似,病程较长,在发病前期无症状或症状不明显,发病率和死亡率都较高,对水产养殖业造成较大损失。因此,该病的早期检测技术和防治研究应该引起相关学者的重视。

参考文献:

- [1] 张建丽, 刘志恒. 诺卡氏菌型放线菌的分类[J]. 微生物学报, 2001, 41(4): 513-517.
- [2] Valdez I E, Conroy D A. The study of a tuberculosis-like condition in neon tetras (*Hyphessobrycon innesi*). II. Characteristics of the bacterium isolated [J]. Microbiologia Espanola, 1963, 16: 249-253.
- [3] Snieszko S F, Bulloch G L, Dunbar C E, et al. Nocardial infection in hatchery-reared fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. Journal of Bacteriology, 1964, 88: 1809-1810.
- [4] Chen S C, Tung M C, Tsai W C. An epizootic in Formosa snake-head fish (*Channa maculata* Lacepede), caused by *Nocardia asteroides* in fresh water pond in Southern Taiwan [J]. Coa Fish Ser, 1989, 15: 42-48.
- [5] Friedman C S, Beaman B L, Chun J, et al. *Nocardia crassostreae* sp. nov., the causal agent of nocardiosis in Pacific oysters [J]. Int J Syst Bacteriol, 1998, 1: 237-246.
- [6] Kusuda R, Taki H, Takeuchi T. Studies on a nocardial infection of culture yellow tail. II. Characteristics of *Nocardia kampachi* isolated from a gill-tuberculosis of yellow tail [J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1974, 10: 369-373.
- [7] Chen S C, Lee J L, Lai C C, et al. Nocardiosis in sea bass, *Lateolabrax japonicus*, in Taiwan [J]. J Fish Dis, 2000, 23(5): 299-307.
- [8] 徐益军, 王国良, 金 珊. 养殖乌鳢新病害—诺卡氏菌病 [J]. 中国水产, 2007, 3: 62-63.
- [9] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, et al. Bergey's manual of determinative bacteriology (9th ed.) [M]. London: Williams & Wilkins Press, 1994: 190-194, 259-271.
- [10] 刘志恒, 姜成林. 放线菌现代生物学与生物技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2004: 77-80.
- [11] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 409-412.
- [12] Lechevalier H A. Nocardiform Actinomycetes. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 4 [C]. Baltimore: The Williams and Wilkins Co, 1989: 2348-2404.
- [13] Humphrey J D, Lancaster C E, Gudkovs N, et al. The disease status of Australian salmonids: bacteria and bacterial diseases [J]. J Fish Dis, 1987, 10: 403-410.
- [14] Enrico T, Alessandro B, Elena B, et al. Identification of the newly described *Mycobacterium poriferiae* form tuberculous lesions of snakehead fish (*Channa striatus*) [J]. Comp Immun Microbiol Infect Dis, 1996, 19: 25-29.
- [15] 钱云霞, 邵健忠, 王国良. 海水养殖鱼类细菌性疾病研究概况 [J]. 海洋湖沼通报, 2001, 2: 78-87.
- [16] 金 珊, 王国良, 赵青松, 等. 鲈细菌性类结节病的病原及血液病理研究 [J]. 水产学报, 2004, 28(6): 703-708.
- [17] 郭琼林, 贾伟章, 韩先朴, 等. 我国淡水养殖乌鳢的类立克次体感染 [J]. 自然科学进展, 2004, 14(1): 59-64.
- [18] Chen S C. Study on the pathogenicity of *Nocardia asteroides* to Formosa snakehead, *Channa maculata* (Lacepede), and largemouth bass, *Micropterus salmoides* (Lacepede) [J]. J Fish Dis, 1992, 15: 47-53.
- [19] Wang G L, Yuan S P, Jin S. Nocardiosis in large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson) [J]. J Fish Dis, 2005, 28: 339-345.
- [20] Kudo T, Hatal K, Seino A. *Nocardia seriolae* sp. nov. causing nocardiosis of cultured fish [J]. Int J Syst Bacteriol, 1988, 38: 173-178.
- [21] Chun J, Goodfellow M. A phylogenetic analysis of the genus *nocardia* with 16S rRNA gene sequences [J]. Int J Syst Bacteriol, 1995, 45: 240-245.

Identification and phylogenetic analyses of *Nocardia* in snakehead, *Ophiocephalus argus* Cantor

WANG Guo-Liang^{1,2}, XU Yi-Jun¹, JIN Shan¹

(1. The Key Laboratory of Applied Technology of Marine Biology, Ministry of Education, Faculty of Life-Science and Bio-Technology, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. The Medical School, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: A bacterial-like tubercular disease broke out in reared snakehead, *Ophiocephalus argus* Cantor, in Xiaoshan in Zhejiang Province in June, 2006. Pure bacteria were isolated from liver and kidney in diseased fish and numbered W060622. Experimental infection indicated that the isolated bacterium was the pathogen responsible for the mortalities. Cultures from liver and kidney were incubated for 4 – 6 days at 28 °C. Weakly pigmented yellowish adherent colonies 1 – 3 mm in diameter appeared as a heavy, almost pure growth on TSA. The bacteria were Gram-positive, aerobic, weakly acid-fast, bead-like or long, slender, and filamentous rods were observed in virtue of microscope and electron microscope. The organism was found to be catalase-positive, oxidase-negative, urea-produced, and could reduce nitrate and aesculin but not degrade adenine, xanthine, hypoxanthine, tyrosine, gelatin, elastin, starch and casein. It could utilize the citrate as sole carbon source but not mannitol, arabinose and sorbitol. The traditional physiological and biochemical methods showed that most of the phenotypes of strain W060622 were similar to *Nocardia*. A partial sequence of 16S rRNA gene of the bacteria was determined following PCR amplification and sequencing. The GenBank Accession No. is EF192033. The sequence was aligned with those available for nocardiae and phylogenetic trees inferred using N-J method. The unrooted evolutionary tree shows that strain W060622 forms a monophyletic clade with *Nocardia seriolae* JCM 3360^T (Z36925). This relationship was highlighted in the analyses by the high nucleotide similarity value (99.9%) and the high bootstrap value (1000) based on the neighbour-joining method. Thus, the pathogenic organism was identified as *Nocardia serioleae*. This is the first discovery on *Nocardia* sp.-infected snakehead in aquaculture. Fish tubercular diseases were reported caused by the pathogen of *Corynebacterium* sp., *Mycobacterium* sp., Rickettsia-like organism, *Nocardia* sp., etc., and they could be differentiated through the morphology, stain, physiological and biochemical characters. A kidney with nodular lesions was made ultrathin sections and observed under transmission electron microscope and no other prokaryotes were found except bacteria of *nocardia*. Based on the high morbidity and mortality and the difficulty of being detected, the pathology, immunology, detection and medication of nocardiosis in snakehead warrants will be further investigated.

Key words: *Ophiocephalus argus* Cantor; *Nocardia serioleae*; tubercular disease; physiological and biochemical; 16S rRNA; phylogenetic analysis