

三疣梭子蟹牛奶病病原的分离鉴定

王高学,黄增荣,袁 明

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 从浙江舟山市养殖场患“牛奶病”的三疣梭子蟹(*Portunus tritubercularus*)乳化的蟹足、步足及肝胰脏中分离到1株细菌A1,对其进行了形态特征、生理生化测定和16S rRNA基因序列比较鉴定,并对其药物敏感性进行了检测。结果表明,分离菌株A1为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*),其对丁胺卡那霉素、氟苯尼考、盐酸萘诺沙星、甲磺酸培氟沙星、盐酸左氧氟沙星、庆大霉素、卡那霉素、环丙沙星、诺氟沙星、新霉素、氧氟沙星等高度敏感,对青霉素钠、头孢曲松、酒石酸吉他霉素、头孢氨苄、四环素、麦迪霉素、土霉素等中度敏感,而对磺胺喹噁啉钠、复方新诺明、磺胺二甲嘧啶钠、磺胺嘧啶等不敏感。

[关键词] 三疣梭子蟹;牛奶病;恶臭假单胞菌;16S rRNA

[中图分类号] S945

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)06-0029-05

Isolation and identification of the pathogen of milk disease cultured in swimming crab *Portunus tritubercularus* (portunidae)

WANG Gao-xue, HUANG Zeng-rong, YUAN Ming

(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University,
Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: One bacterial strain was isolated from the emulsificated pincers, pace foot and liver of swimming crab *Portunus tritubercularus* (portunidae) which suffered from the emulsification disease. The strain was confirmed to be the pathogen of the disease by the artificial infection experiment. And it was identified as *Pseudomonas putida* by morphological features, physiological, biochemical characteristic and 16S rRNA gene sequence comparison analysis. Meanwhile, its sensitivity to antibiotics was detected. The results showed that *Pseudomonas putida* was highly sensitive to Pefloxacin mesylate, Neomycin, Norfloxacin, Ofloxacin et al; it was moderately sensitive to Kitasamycin Tartrate, Ceftriaxon, and Terramycin; but it was insensitive to the Sulfamethoxazole Co., Sulfadiazine, Sulphadimidine Sodium, and Sulfaquinoxaline Sodium et al.

Key words: *Portunus tritubercularus*; milk disease; *Pseudomonas putida*; 16S rRNA

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)是我国海产经济蟹类,经济价值较高。近年来,由于市场需求扩大,浙江省沿海的三疣梭子蟹养殖业发展非常迅速,但是病害发生也越来越频繁,其中以“牛奶病”造成的经济损失最大。三疣梭子蟹“牛奶病”发病季节以春、秋季为主,9月为发病高峰期。其主要症状

是内脏组织溶解为乳白色液体,折断步足可流出大量白色粘液,患病严重时肌肉可全部化为粘液,如牛奶一般,当地人因此将该病命名为“牛奶病”。关于该病病原的研究,国内外报道很少。许文军等^[1]认为该病系酵母菌感染引起,赵青松等^[2]认为该病由溶藻弧菌和葡萄假丝酵母感染所致。另外,也有人

†收稿日期] 2006-04-18

[作者简介] 王高学(1965-),男,陕西富平人,副教授,主要从事水产动物病害防治与生物工程制药研究。
E-mail: wanggaixue @126.com

怀疑是孢子虫感染,但至今未见相关文献报道。为了进一步明确该病原,本试验于 2004-10~2006-02,从浙江舟山市养殖场和暂养场采集发病典型的三疣梭子蟹,进行了病原的分离、鉴定。现将研究结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 发病的三疣梭子蟹,采自浙江舟山市多个养殖场和暂养场,包括发病初期到濒死期各个不同病程,质量 160~240 g;健康三疣梭子蟹,由舟山某养殖场提供,质量 120~150 g;健康中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*),购自西安水产品市场,质量 80~100 g;健康昆明系小白鼠,购自第四军医大学实验动物中心,质量 18~22 g。

1.1.2 试剂 用于细菌表型鉴定的各种糖类和氨基酸均购自中国医药(集团)上海化学试剂公司,*Taq* DNA 聚合酶购自 Fermentas (MBI) 公司,dNTPs 等生化试剂均购自上海生工生物技术有限公司,其他普通化学试剂均购自西安化学试剂厂。

1.1.3 引物 PCR 扩增细菌 16 S rRNA 基因采用通用引物,正向引物为:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3'(对应于 *E. coli* 8~27 bp);反向引物为:5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'(对应于 *E. coli* 1492~1510 bp)^[3-5]。引物由上海生工生物技术有限公司合成,预期扩增片断长度为 1500 bp。

1.2 病原菌的分离

将发病的三疣梭子蟹用无菌蒸馏水冲洗干净后,用体积分数 75%酒精棉球反复擦拭体表进行消毒。用一次性注射器从病变蟹足、步足关节膜处进针抽取液体,接种到普通营养琼脂平板、海水营养琼脂平板(用原海区海盐代替普通平板的 NaCl,浓度和原海区相同)。打开头胸甲,无菌操作取病变的肝脏、生殖腺和组织溶解液分别接种到上述培养基。25℃培养 24 h 以上,挑选优势单个菌落,命名为 A1,保种,备用。

1.3 病原菌的致病性试验

1.3.1 菌悬液的制备 将分离的病原菌接种于普通营养琼脂平板,25℃培养 18 h 后,用 0.6%无菌生理盐水洗下菌苔,制成菌悬液,再采用平板活菌计数法计数菌悬液浓度为 3×10^5 mL⁻¹,备用。

1.3.2 试验分组 取健康三疣梭子蟹 15 只,随机分为试验组(10 只)和对照组(5 只);试验组注射浓度为 3×10^5 mL⁻¹ 的菌悬液,对照组注射等量的无

菌生理盐水,剂量为 0.2 mL/只;注射部位为第 3 步足基部关节膜处。中华绒螯蟹感染试验同三疣梭子蟹,剂量为 0.15 mL/只。健康昆明系小白鼠 15 只,随机分为试验组(10 只)和对照组(5 只);试验组腹腔注射浓度为 3×10^5 mL⁻¹ 的菌悬液,对照组腹腔注射等量的无菌生理盐水,剂量为 0.2 mL/只。注射后连续观察,记录发病及死亡情况,并按 1.2 方法再分离病原菌。

1.4 病原菌鉴定

病原菌 A1 各项形态特征及生理生化性质测定按照文献[3-4]的方法进行。

1.5 病原菌 16S rRNA 基因序列分析

1.5.1 PCR 模板的制备 将 A1 纯培养物接种普通肉汤,25℃摇床培养 24 h,离心收集菌体,按北京天为时代科技有限公司的离心柱型细菌基因组 DNA 提取试剂盒 II 说明,提取细菌基因组 DNA。

1.5.2 16S rRNA 基因扩增与测序 PCR 反应体系(50 μL):10×PCR Buffer 5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 4 μL,2 mmol/L dNTPs 4 μL,5 U/μL 的 *Taq* DNA 聚合酶 1 μL,0.6 mmol/L 的上、下游引物各 1 μL,模板 DNA 2 μL,ddH₂O 32 μL。PCR 反应条件:94℃预变性 5 min;93℃变性 40 s,57℃复性 30 s,72℃延伸 60 s,循环 30 次;最后在 72℃保温 10 min^[6-9]。PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,再用 Roche High pure PCR product purification Kit 试剂盒纯化回收,回收产物送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.5.3 序列分析 将所测序列用 Blast 软件与 GenBank 数据库中已登录的同属 16S rRNA 序列进行比对,并用 DNASTAR 软件构建系统进化树。

1.6 病原菌的药敏试验

采用试管连续倍比稀释法^[10-11]测定磺胺嘧啶、磺胺噻唑、复方新诺明、头孢氨苄等 22 种抗菌药物的最低抑菌质量浓度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)和最低杀菌质量浓度(Minimum Bactericidal Concentration, MBC)。抗菌药物预配制成 500 μg/mL,菌悬液浓度为 8×10^5 mL⁻¹。于 25℃培养,24 h 后肉汤没有浑浊试管中的最小药物质量浓度为该药物对试验细菌的 MIC,48 h 后肉汤没有浑浊的最小质量浓度的试管再进行普通平板划线培养,若无菌落生长,说明该试管药物质量浓度为该药物对试验细菌的 MBC。抑菌效价 < 1.56 μg/mL 判为高度敏感,抑菌效价在 1.56~12.5 μg/mL 判为中度敏感,抑菌效价 > 12.5 μg/mL 判

为不敏感。

2 结果与分析

2.1 三疣梭子蟹牛奶病原菌的分离及感染试验

从发病三疣梭子蟹体内分离到的优势菌株 A1 , 人工注射感染结果 (表 1) 表明 : 该菌对三疣梭子蟹、中华绒螯蟹及昆明系小白鼠均有明显的致病作用。三疣梭子蟹在注射后病蟹表现为行动迟缓 , 对外界刺激反应慢或无反应 , 大多于 24~48 h 死亡 , 打开头胸甲 , 体液较多且混浊 , 有一股腐臭气味。在人工

感染病例中未见肝胰脏、螯足及步足肌肉溶解液化呈乳白色牛奶状 , 这可能是由于人工感染发病迅速 , 病程短。中华绒螯蟹表现大致与三疣梭子蟹相同。昆明系小白鼠注射感染后表现为被毛直立 , 蜷缩成一团 , 渴饮 , 摄食少或不摄食 , 1 周内全部死亡 , 解剖发现肠粘膜发红 , 脾脏肿大 , 肝脏颜色变深 , 有淤血症状。对照组均未表现任何症状。对原来分离的菌株和再次从人工感染病例中分离出的菌株进行形态、生理生化鉴定和分子生物学鉴定 , 所有的鉴定结果相同。证实该菌为三疣梭子蟹“牛奶病”病原菌。

表 1 三疣梭子蟹牛奶病原人工感染试验结果

Table 1 Results of artificial infection experiment of milk disease of <i>Portunus trituberculatus</i>						
试验动物 Experimental animal	处理 Treatment	菌液浓度/ mL · ⁻¹ Bacterail concentration	剂量/ (mL · 只 · ⁻¹) Dose	试验数 Test No.	死亡数 Death No.	死亡率/ % Mortality
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	试验组 Test group	3 ×10 ⁵	0.2	10	10	100
	对照组 Control group	无菌生理盐水 Stroke-physiological saline solution	0.2	5	0	0
中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i> test	试验组 Test group	3 ×10 ⁵	0.15	10	10	100
	对照组 Control group	无菌生理盐水 Stroke-physiological saline solution	0.15	5	0	0
小白鼠 <i>Mus musculus albus</i>	试验组 Test group	3 ×10 ⁵	0.2	10	10	100
	对照组 Control group	无菌生理盐水 Stroke-physiological saline solution	0.2	5	0	0

2.2 病原菌鉴定结果

病原菌 A1 为 G⁺ 好氧兼性厌氧非发酵型杆菌 , 分散排列 , 不产芽孢。25 °C 培养 24 h , 普通营养琼脂平板上可见呈圆形、白色透明、光滑湿润、边缘整齐的菌落。由生理生化试验结果 (表 2) 可知 , 病原

菌 A1 氧化酶、接触酶均呈阳性 , 生长需要 Na⁺ , 发酵葡萄糖产酸 , 甲基红、维 - 倍试验均为阴性 , 不能产生靛基质 , 不能利用肌醇 , 发酵果糖产酸 , 能还原硝酸盐 , 不能液化明胶 , 不能水解淀粉 , 精氨酸双水解酶阳性 , 鸟氨酸脱羧酶、赖氨酸脱羧酶阴性。

表 2 三疣梭子蟹牛奶病原菌的生理生化特性

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of the pathogenic bacteria of milk disease of <i>Portunus trituberculatus</i>				
鉴定项目 Items	A1	恶臭假单胞菌 <i>P. putida</i>	鉴定项目 Items	A1 恶臭假单胞菌 <i>P. putida</i>
革兰氏染色 Gram stain	-	-	运动性 Moving test	+ +
O-F 试验 O-F test	0	0	氧化酶 Oxidase	+ +
乳糖 Lactose	-	ND	蔗糖 Sucrose	- ND
D-甘露糖 D-Mannose	+	ND	甘露醇 Mannitol	- -
接触酶 Catalase	+	+	淀粉酶 Amylase	- -
肌醇 Inositol	-	ND	果糖 Fructose	+ +
靛基质试验 Indole production	-	-	脂酶试验 Tween80Lipase	- d
甲基红反应 Methyl red	-	-	维 - 倍试验 V. P Voges Proskauer test	- -
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	+	+	明胶水解 Glutin hydrolyze	- -
葡萄糖产酸 Glucose , acid	+	+	葡萄糖产气 Glucose , gas	- -
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-	-	赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	- -
硝酸盐还原 Nitratereduction	+	+	H ₂ S 产生 H ₂ S production	- -
4 °C 生长 4 °C growth	+	+	41 °C 生长 41 °C growth	- -
0 %NaCl 生长 0 %NaCl growth	-	-	1 %NaCl 生长 1 %NaCl growth	+ +

注: + . 表示阳性; - . 表示阴性; d. 表示大部分种阳性; ND. 表示未测。
Note: + . positive; - . negative; d. mostly positive; ND. no record.

2.3 病原菌的 16 S rRNA 鉴定结果

对分离病原菌 A1 的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增并测序,扩增产物长度约为 1 500 bp (图 1)。将所测序列与 GenBank 上登录的同属 16S rRNA 序列进行同源性比较发现,所测序列与恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida* 登录号 PPU308313) 的同源性最高,达到 99.79 %。由构建的系统进化树(图 2)可知,分离菌株与恶臭假单胞菌的亲缘关系最近。按照文献[3-4]的鉴定标准,并结合生理生化及 16S rRNA 鉴定结果,可鉴定此病原菌为恶臭假单胞菌。

2.4 药敏试验结果

表 3 表明,A1 株菌均对丁胺卡那霉素、氟苯尼考、盐酸萘诺沙星、甲磺酸培氟沙星、盐酸左氧氟沙星、庆大霉素、卡那霉素、环丙沙星、诺氟沙星、新霉素、氧氟沙星等高度敏感;对青霉素钠、头孢曲松、酒石酸吉他霉素、头孢氨卡、四环素、麦迪霉素、土霉素等中度敏感;而对磺胺喹噁啉钠、复方新诺明、磺胺

二甲嘧啶钠、磺胺嘧啶等不敏感。

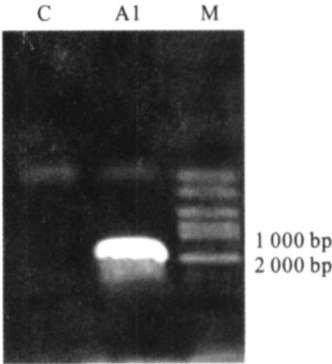


图 1 三疣梭子蟹牛奶病病原 16S rRNA 基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

M. DL2000 DNA 分子量标准;A1. 样品;C. 阴性对照 (PCR 扩增时不加模板)

Fig. 1 Agarose electrophoresis of 16 S rRNA PCR products of the pathogen of milk disease of *Portunus trituberculatus*

M. DL2000 DNA ladder;A1. 16 S rRNA gene amplification by PCR;C. Negative control

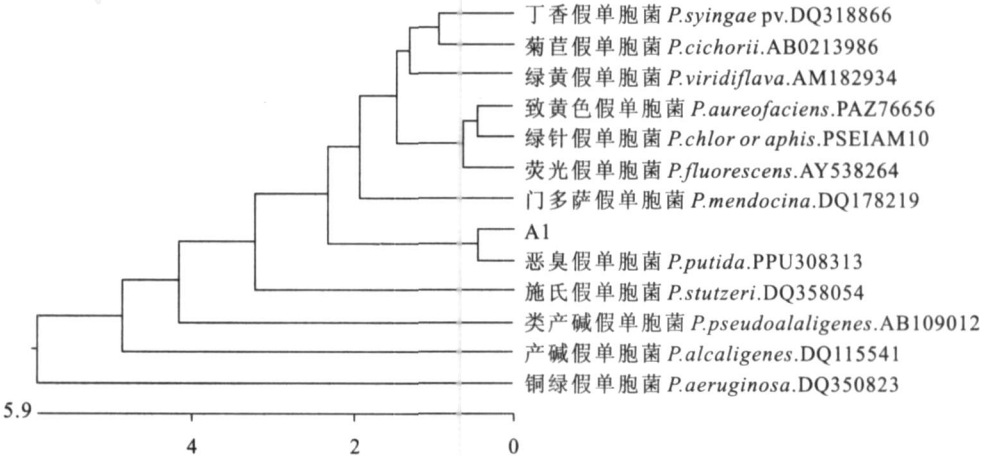


图 2 三疣梭子蟹牛奶病病原 16S rRNA 基因序列分析聚类结果

Fig. 2 Results of 16 S rRNA gene sequence analysis of pathogen of milk disease of *Portunus trituberculatus*

表 3 三疣梭子蟹牛奶病病原对不同抗菌药物的敏感性试验结果

Table 3 MIC and MBC of different antimicrobial agent against the pathogen of milk disease of <i>Portunus trituberculatus</i> μg/ mL					
药名 Medicines	分离菌株 A1 Isolated strain A1		药名 Medicines	分离菌株 A1 Isolated strain A1	
	MIC	MBC		MIC	MBC
磺胺喹噁啉钠 Sulfaquinoxaline sodium	25	50	磺胺嘧啶 Sulfadiazine	50	50
复方新诺明 Sulfamethoxazole Co.	25	50	头孢氨苄 Cefalexin	6.25	12.5
磺胺二甲嘧啶钠 Sulphadimidine sodium	50	50	庆大霉素 Gentamicin	0.781	1.56
青霉素钠 Benzylpenicillin sodium	12.5	25	四环素 Tetracycline	6.25	25
头孢曲松 Ceftriaxone	6.25	12.5	麦迪霉素 Medemycin	12.5	50
酒石酸吉他霉素 Kitasamycin tartrate	1.56	3.125	土霉素 Terramycin	3.125	12.5
丁胺卡那霉素 Amikacin	0.781	1.56	卡那霉素 Kanamycin	0.781	1.56
氟苯尼考 Florfenicol	0.781	1.56	环丙沙星 Ciprofloxacin	0.781	1.56
盐酸萘诺沙星 Enrofloxacin hydrochloride	0.049	0.098	诺氟沙星 Norfloxacin	0.025	0.049
甲磺酸培氟沙星 Pefloxacin mesylate	0.025	0.049	新霉素 Neomycin	0.025	0.049
盐酸左氧氟沙星 Levofloxacin hydrochloride	0.049	0.1968	氧氟沙星 Ofloxacin	0.049	0.09

3 讨论

分离菌株在人工感染试验中表现出与自然发病相似的症状,且从人工感染动物中分离出相同的细菌,经形态特征、培养特性和生理生化反应测定,并结合该菌 16S rRNA 基因序列比较分析结果,鉴定为恶臭假单胞菌。

引起三疣梭子蟹“牛奶病”的病原比较复杂,而本试验分离到的病原恶臭假单胞菌尚属首次报道。恶臭假单胞菌广泛存在于水体、土壤和空气中,被认为是一种条件致病菌^[9]。已有报道认为,该菌能引起欧洲鳗鲡^[12]、罗氏沼虾^[13]、中华绒螯蟹^[14]等水产动物发病。甚至还能引起人食物中毒和败血症^[15-16]等,在公共卫生方面尤其值得重视。

药敏试验结果表明,恶臭假单胞菌对盐酸萘诺沙星、甲磺酸培氟沙星、氧氟沙星、新霉素、诺氟沙星等高度敏感;对土霉素、酒石酸吉他霉素、头孢曲松等中毒敏感;而对磺胺喹噁啉钠、复方新诺明、磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶钠等不敏感。

三疣梭子蟹等甲壳动物无特异性免疫功能,所以在养殖或暂养时应注意环境对梭子蟹的影响,以加强饲养管理、减少水质污染、减少应激和增强体质为主,而以药物治疗为辅。由于细菌耐药机制的存在,不同时间、不同养殖场分离的相同病原菌对同一药物敏感性变化较大,且应用单一药物效果较几种敏感药物配合使用差。从本研究结果看,诺氟沙星、甲磺酸培氟沙星、氧氟沙星等是防治该病的首选药物,将其加高效粘合剂拌料投喂三疣梭子蟹可以有效防治该病。

[参考文献]

- [1] 许文军,金海卫,丁跃平,等.秋冬季节三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus* (Mies) 暂养常见疾病及防治措施[J].现代渔业信息,2004,19(7):23-25.
- [2] 赵青松,徐镇,陈寅儿,等.梭子蟹乳白病的间接 ELISA 诊断[J].上海水产大学学报,2005,14(3):248-252.
- [3] Holt J G, Krige N R, Sneath P H A, et al. Bergey's manual of bacteriology[M]. 9th ed. London: Williams and Wilkins Press, 1994:190-194;259-271.
- [4] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001:106-118.
- [5] 沈晓盛,蔡有琼,房文红,等.养殖牡蛎体内检出坎氏弧菌的鉴定[J].微生物学报,2005,45(2):177-180.
- [6] 陈吉祥,李彩凤,颜显辉,等.大菱鲆病原鳗弧菌生物学及分子特征研究[J].高技术通讯,2005,15(6):92-96.
- [7] 王建春,刘静,黄文红,等.通用引物 PCR 检测临床常见致病菌的实验研究[J].微生物学通报,2005,32(2):73-77.
- [8] 胡雪峰,石存斌,潘厚军,等.海水养殖斜带石斑鱼溃疡病病原菌(溶藻弧菌)的初步研究[J].中国海洋大学学报,2005,35(2):232-236.
- [9] 陈献稿,吴淑勤,石存斌,等.斜带石斑鱼病原菌(哈维氏弧菌)的分离鉴定[J].中国水产科学,2004,11(4):313-317.
- [10] 李健强,李六金.兽医微生物实验实习指导[M].西安:陕西科学技术出版社,1999.
- [11] 廖延雄.兽医微生物实验诊断手册[M].北京:中国农业出版社,1995.
- [12] 樊海平.恶臭假单胞菌引起的欧洲鳗鲡烂鳃病[J].水产学报,2001,25(2):147-150.
- [13] 陶保华,石和荣,黄俊文,等.假单胞菌引起罗氏沼虾黄鳃、黑鳃病的研究[J].中山大学学报:自然科学版,2000,39(S1):255-259.
- [14] 江定丰,李槿年,余为一.一株中华绒螯蟹病原菌鉴定及其致病机理的研究[J].水利渔业,2003,23(6):51-54.
- [15] 李庆山,邢瑞云,张芳萍,等.首次发现恶臭假单胞菌引起的食物中毒[J].中国公共卫生,2000,16(1):50-51.
- [16] 桂炳东,徐建民,贾坤如.3例恶臭假单胞菌败血症及其鉴定[J].中国人兽共患杂志,1995,11(3):21-22.