



## 研究报告

## 双斑东方鲀皮肤溃烂症病原菌鉴定及药敏分析

吴建绍\* 陆振 杨求华 朱志煌 周宸 林克冰 葛辉

福建省水产研究所 福建 厦门 361013

**摘要:**【背景】2016年6月福建省海水鱼类苗种繁育科研中试基地养殖的双斑东方鲀出现皮肤溃烂症,病鱼特征为:游动缓慢,停止摄食,口角、表皮、鳍条溃烂,肾脏、脾脏充血严重。【目的】对发生皮肤溃烂症双斑东方鲀病原进行鉴定,以期为该疾病有效防治提供技术支撑。【方法】从濒死病鱼肾脏、脾脏和病灶部位肌肉组织分离出优势菌株,经人工肌肉注射感染证实其为致病菌。经菌株形态学、生理生化特征分析、16S rRNA 基因序列分析和系统发育树构建等手段综合鉴定并进行药敏分析。【结果】从患病鱼体脾脏分离得到一株优势菌株 SBDFT-1#,人工感染实验证实为致病菌。结合形态、生理生化和分子生物学鉴定确定该菌为哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*),该菌为革兰氏阴性菌,极生单鞭毛,呈短杆状,菌体大小  $0.9 \times 2.0 \mu\text{m}$ 。该菌株在 2216E 平板培养基菌落呈乳白色,边缘透明,中间凸起;在 TCBS 培养基菌落呈黄色,边缘整齐,中央隆起。该菌对苯唑西林、头孢噻肟、氧氟沙星、链霉素、复方新诺明、多粘菌素 B 等 14 种抗生素敏感,对氨苄西林、青霉素、四环素、麦迪霉素等 9 种抗生素耐药。【结论】哈维氏弧菌是海水养殖经济鱼类的常见致病菌,但从患病双斑东方鲀体内分离出属首次报道,对防治双斑东方鲀皮肤溃烂症具有积极的指导意义。

**关键词:** 双斑东方鲀, 皮肤溃烂症, 哈维氏弧菌, 鉴定, 药敏分析

Identification and drug sensitivity analysis of pathogenic bacteria causing skin ulceration disease of *Takifugu bimaculatus*WU Jian-Shao\* LU Zhen YANG Qiu-Hua ZHU Zhi-Huang ZHOU Chen  
LIN Ke-Bing GE Hui

Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen, Fujian 361013, China

**Abstract:** [Background] In June 2016, *Takifugu bimaculatus*, cultured in Fujian Seawater Fish Seedling Breeding Research Base, outbreaked the skin ulceration disease. The main symptoms of diseased fishes were characterized by slow swimming, lack of appetite, ulceration of mouth, epidermis and fins, and severe hyperemia of kidneys and spleen. [Objective] Identify the pathogenic, and provide the technical support for effectively preventing and treating skin ulceration in *T. bimaculatus* farming. [Methods] The dominant strains were isolated from the kidney, spleen and muscle tissue of diseased fish. The strains were confirmed

**Foundation item:** Research Fund for Public Welfare Project of Fujian Province (2015R1003-15)

\*Corresponding author: Tel: 86-592-6012063; E-mail: wujianshao@sina.com

Received: 25-03-2019; Accepted: 29-05-2019; Published online: 20-06-2019

基金项目: 福建省省属公益类科研院所基本科研专项(2015R1003-15)

\*通信作者: Tel: 0592-6012063; E-mail: wujianshao@sina.com

收稿日期: 2019-03-25; 接受日期: 2019-05-29; 网络首发日期: 2019-06-20

to be a pathogenic bacterium by artificial intramuscular injection. The strains were identified by morphological, physiological and biochemical characteristics analysis, 16S rRNA gene sequence analysis, phylogenetic tree construction, and drug sensitivity analysis. **[Results]** The dominant strain SBDFT-1# was isolated from spleen of diseased fish, and was confirmed to be pathogenic strain of the skin ulceration disease. Strain SBDFT-1# was identified as *Vibrio harveyi*, with the morphological indexes of Gram-negative, single-flagellate, short rod-shaped, and a cell size of  $0.9 \times 2.0 \mu\text{m}$ . The colony of strain SBDFT-1# was milky white and yellow on the 2216E and TCBS plate medium, respectively, which were both central bulge and neat-transparent edges. Strain SBDFT-1# was sensitive to 14 antibiotics including Oxacillin, Cefotaxime, Ofloxacin, Streptomycin, Co-trimoxazole and Polymyxin B; while strain SBDFT-1# was resistant to 9 antibiotics such as Ampicillin, Penicillin, Tetracycline and Medecamycin. **[Conclusion]** This is the first report of *V. harveyi* as a pathogenic strain, isolated from the diseased *T. bimaculatus*, while it is a common pathogen in the economical fish farming. The study has a positive significantly guiding for the prevention and treatment of skin ulceration of *T. bimaculatus*.

**Keywords:** *Takifugu bimaculatus*, Skin ulceration, *Vibrio harveyi*, Identification, Drug sensitivity analysis

双斑东方鲀(*Takifugu bimaculatus*), 隶属鲀形目、鲀科、东方鲀属, 为近海暖温性底层鱼类, 其肉质细嫩、鲜美, 营养价值高, 被誉为“鱼中之王”, 为福建省当地特色养殖鱼类品种, 已在福建沿海规模化养殖。随着双斑东方鲀产业规模的扩大, 养殖过程中病害时有发生。国内有关东方鲀病害研究主要集中在红鳍东方鲀和暗纹东方鲀的病害<sup>[1-9]</sup>, 而针对双斑东方鲀的病害研究则比较少, 仅袁定清等<sup>[10]</sup>对双斑东方鲀的病害种类进行了调查及防治技术初探, 其病害有待于进一步深入研究。

2016年6月福建省海水鱼类苗种繁育科研中试基地部分养殖的双斑东方鲀体表出现溃烂, 病鱼特征为: 游动缓慢, 停止摄食, 口角、表皮、鳍条缺损溃烂, 溃烂处周边皮肤发红, 病鱼易出现死亡。本研究对引起双斑东方鲀皮肤溃烂的病原进行分离、纯化, 通过菌株形态学、生理生化特征分析、16S rRNA 基因序列分析和系统发育树构建对菌株进行鉴定, 开展了病原菌致病性和药物敏感性分析, 以期对养殖过程中该疾病的有效防治提供技术参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 试验鱼

双斑东方鲀试验鱼来自福建省海水鱼类苗种繁育科研中试基地。取具有典型皮肤溃烂症病鱼用

于病原分离; 取体表无损伤、健康活泼、平均体长  $18.0 \pm 1.0 \text{ cm}$ 、体重  $161.0 \pm 3.5 \text{ g}$  的双斑东方鲀个体用于人工感染试验。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

细菌生化微量反应管和药敏纸片, 杭州天和微生物试剂有限公司。PCR 仪, Thermo 公司; VITEK<sup>®</sup> 2 COMPACT 全自动微生物分析仪, 梅里埃公司。

#### 1.1.3 培养基

2216E 培养基(g/L): 蛋白胨 5.0, 酵母膏 1.0, 柠檬酸铁 0.1, 琼脂 16.0, pH 7.6。

TCBS 培养基(g/L): 琼脂 15.0, 酵母浸粉 5.0, 蛋白胨 10.0, 硫代硫酸钠 10.0, 枸橼酸钠 10.0, 牛胆粉 5.0, 牛胆酸钠 3.0, 蔗糖 20.0, 氯化钠 10.0, 柠檬酸铁 1.0。

2216E 液体培养基(g/L): 蛋白胨 5.0, 酵母膏 1.0, 柠檬酸铁 0.1, 氯化钠 19.5, 氯化镁 5.9, 硫酸钠 3.2, 氯化钙 1.8, 氯化钾 0.6, 碳酸氢钠 0.2。

### 1.2 病原菌分离

观察病鱼(濒死)体表体征及内脏器官情况; 取体表黏液、溃疡处肌肉组织、鳃及内脏器官等显微镜检, 观察是否有寄生虫或真菌感染。用灭菌海水清洗病鱼(濒死)体表, 无菌操作条件下从病鱼的脾脏、肾脏和溃疡处肌肉等器官组织分离细菌, 划线接种于 2216E 平板和 TCBS 培养基上, 置  $28^\circ\text{C}$  恒温箱培养。24 h 后观察菌落大小及形态, 挑取形态

一致的优势菌落纯化培养,纯化2-3次后再转接至斜面培养基上,用甘油生理盐水(30%)保存于超低温冰箱,备用。

### 1.3 人工感染实验

将1.2所分离纯化的优势菌株接种于2216E液体培养基,100 r/min、28 °C培养24 h。用无菌生理盐水将细菌培养物梯度稀释,配制成浓度分别为 $3\times 10^8$ 、 $3\times 10^7$ 、 $3\times 10^6$ 、 $3\times 10^5$  CFU/mL的菌悬液,备用。参照文献[2]进行人工感染实验设计,实验组分4个注射浓度梯度,分别为 $3\times 10^8$ 、 $3\times 10^7$ 、 $3\times 10^6$ 、 $3\times 10^5$  CFU/mL,采用肌肉注射方式感染,注射菌悬液量为0.2 mL/尾,对照组注射相同剂量无菌生理盐水,每组各30尾鱼。试验期间每天正常饲养、投饵、换水,连续观察14 d,记录各组实验鱼发病及死亡情况。采用冠氏法计算菌株对双斑东方鲀的半致死浓度(LD<sub>50</sub>)<sup>[11]</sup>。从人工感染后濒死患病鱼的肾脏、脾脏和溃疡处肌肉等组织再次分离、纯化细菌,并再重复人工感染一次。

### 1.4 病原菌鉴定确认

病原菌部分生理生化鉴定参照《伯杰氏鉴定细菌学手册》<sup>[12]</sup>和《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[13]</sup>方法进行,同时采用VITEK® 2 COMPACT全自动微生物分析仪对病原菌进行其它理化指标分析。病原菌经培养基28 °C培养24 h后,涂片、革兰氏染色观察、透射电镜观察拍照。

### 1.5 16S rRNA 基因序列分析鉴定与系统发育分析

#### 1.5.1 模板DNA制备及扩增

将分离纯化的菌株接种于液体培养基,100 r/min、28 °C培养过夜,取培养菌液10 µL于PCR反应管,8 000 r/min离心5 min,弃上清,加10 µL ddH<sub>2</sub>O,99 °C加热10 min,12 000 r/min离心5 min,取上清(细菌DNA)作为PCR反应模板。PCR扩增引物为27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')。PCR反应体系:细菌DNA 1 µL,10×PCR缓冲液5 µL,dNTPs 200 µmol/L,引物各0.4 µmol/L,Taq聚合酶1.25 U。PCR反应条件:94 °C 5 min;94 °C 1 min,55 °C

1 min,72 °C 1.5 min,30个循环;72 °C 10 min。

PCR扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

#### 1.5.2 16S rRNA 基因序列分析和系统发育树构建

PCR扩增产物送至Invitrogen公司测序。去除前后模糊序列后,将测得基因序列经BLAST程序与GenBank核酸数据库进行相似性比对分析,相似的序列在ClustalX软件进行多重匹配并聚类分析。采用MEGA 4.0软件邻接法(neighbor-joining)构建系统发育树。

### 1.6 病原菌药物敏感性分析

药敏试验采用KB纸片扩散法。纯化的病原菌通过梯度稀释,配制成 $1.0\times 10^9$  CFU/mL菌悬液,吸取0.1 mL均匀涂布在2216E平板上,用无菌镊子将抗生素纸片贴在2216E培养基上,每一平板放置3片药敏纸片,28 °C培养24 h后,测定抑菌圈的直径。根据天和微生物试剂有限公司网站所给出药敏纸片抑菌范围解释标准,判断致病菌株对药物的敏感程度。

## 2 结果与分析

### 2.1 病鱼体征和病原菌分离结果及致病性确定

#### 2.1.1 病鱼体征

病鱼特征为:游动缓慢,停止摄食,口角和表皮溃烂,鳍条缺损溃烂,溃烂处周边皮肤发红,肾脏、脾脏充血严重。体表病灶组织、鳃、内脏器官等镜检未发现寄生虫或真菌。

#### 2.1.2 病原菌分离结果

从脾脏和肾脏中均可分离到单一的SBDFT-1#菌落;从患病鱼体表病灶分离出4株菌,4株菌菌落形态各不同,其中SBDFT-1#为优势菌,SBDFT-2#、SBDFT-3#和SBDFT-4#为少数菌。SBDFT-1#在2216E平板上培养24 h后菌落形态为乳白色,边缘透明,中间凸起,直径1.0-1.5 mm左右(图1A);在TCBS培养基上培养24 h后菌落呈黄色,直径为1.5-2.0 mm,表面光滑,边缘整齐,中央隆起(图1B)。根据内脏器官和体表病灶分离菌株结果及病鱼体表病灶特征,确认以优势菌株SBDFT-1#进行后续所有实验。

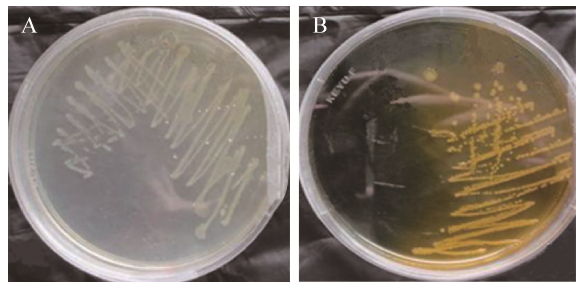


图 1 菌株 SBDFT-1#菌落图  
Figure 1 Colony of strain SBDFT-1#  
注: A: 在 2216E 平板形成乳白色菌落; B: 在 TCBS 培养基形成黄色菌落。  
Note: A: Milky white colonies of strain in 2216E medium; B: Yellow colonies of strain in TCBS medium.

2.1.3 致病性确定

人工感染实验结果显示, 优势菌 SBDFT-1#对双斑东方鲀具有明显致病性。感染后患病(濒死)的双斑东方鲀症状表现为: 体表溃烂, 溃烂处周边皮肤发红, 鳍条缺损, 肾脏、脾脏充血严重; 这些特

征与自然发病症状大致相同, 但感染初期鱼体皮肤发红, 注射部位肿胀明显, 后期发脓严重且液化(图 2)。不同浓度菌悬液肌肉注射感染后, 对双斑东方鲀的致死率见表 1,  $3\times10^8$  CFU/mL 组实验鱼第 3 天就出现死亡, 第 10 天全部死亡;  $3\times10^7$  CFU/mL 组第 6 天出现死亡, 至第 14 天死亡率为 50%;  $3\times10^6$  CFU/mL 组第 10 天出现死亡, 至第 14 天死亡率为 10%;  $3\times10^5$  CFU/mL 组实验鱼有症状, 但至第 14 天未出现死亡。根据实验鱼死亡情况, 计算出菌株 SBDFT-1#对双斑东方鲀的半致死浓度 LD<sub>50</sub> 为  $2.38\times10^7$  CFU/mL。人工感染后, 从发病双斑东方鲀的脾脏、肾脏和体表病灶部位均可重新分离到与 SBDFT-1#形态一致的菌落, 其理化性质也一致。再次分离到菌株重新人工感染获得相同结果。根据人工感染和重新人工感染的患病鱼症状及重分离细菌鉴定结果, 确定菌株 SBDFT-1#为病原致病菌。

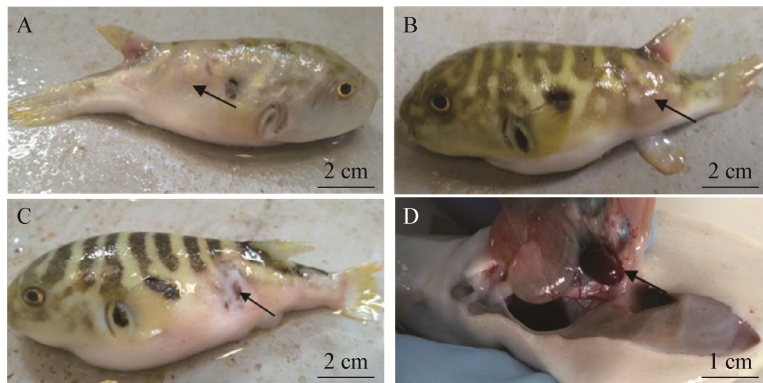


图 2 致病菌 SBDFT-1#人工感染后发病症状  
Figure 2 Symptom of *T. bimaculatus* infected with pathogenic strain SBDFT-1#  
注: A: 感染初期皮肤发红; B: 注射部位肿胀明显; C: 发生皮肤溃疡; D: 脾脏充血严重。  
Note: A: Redness of skin at the beginning of infection; B: Obvious swelling of the injection site; C: The skin ulceration; D: Spleen severely hemorrhagic.

表 1 双斑东方鲀人工感染试验结果

Table 1 Results of <i>Takifugu bimaculatus</i> artificial infected with pathogenic strain SBDFT-1#						
组别	菌液浓度	注射剂量	试验尾数	死亡时间	死亡尾数	死亡率
Group	Concentration (CFU/mL)	Injection dose (mL)	Amount	Time to death (d)	Number of death (ind.)	Nonainy rate (%)
感染组 Infection	$3\times10^8$	0.2	30	3-10	30	100
	$3\times10^7$	0.2	30	6-14	15	50
	$3\times10^6$	0.2	30	10-14	3	10
	$3\times10^5$	0.2	30	—	0	0
对照组 Control	灭菌生理盐水 Sterile saline	0.2	30	—	0	0

注: —: 14 d 内未观察到死亡。  
Note: —: No death was observed for 14 days.

2.2 病原菌的菌种鉴定

2.2.1 病原菌菌株形态观察

透射电镜结果显示：菌株 SBDFT-1#菌体大小约为 0.9×2.0 μm，呈短杆状，极生单鞭毛，两端钝圆(图 3A)；菌株革兰氏染色为阴性(图 3B)。

2.2.2 病原菌生理生化特性

病原菌 SBDFT-1#生理生化分析结果见表 2，其生理生化特征为：具运动性，氧化酶、接触酶阳性，生长需要 NaCl，4 °C 和 42 °C 不生长，葡萄糖发酵，丙氨酸-苯丙氨酸-脯氨酸芳胺酶、谷氨

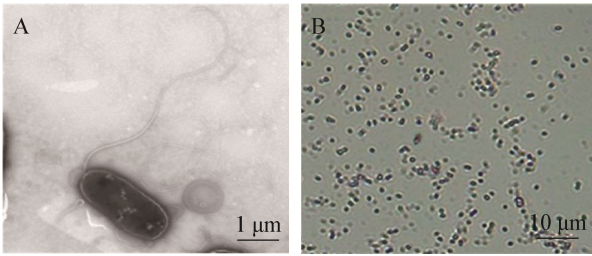


图 3 菌株 SBDFT-1#菌体形态  
Figure 3 Bacterial morphology of strain SBDFT-1#

注：A：电镜照片；B：革兰氏染色图。  
Note: A: Electron micrograph of strain SBDFT-1#; B: Microphotograph of Gram-staining.

表 2 致病菌 SBDFT-1#生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of pathogenic strain SBDFT-1#

序号 No.	项目 Item	结果 Results	序号 No.	项目 Item	结果 Results
1	运动性 Motility	+	31	4 °C 生长 Grow at 4 °C	—
2	接触酶 Catalase	+	32	15 °C 生长 Grow at 15 °C	+
3	氧化酶 Oxidase	+	33	25 °C 生长 Grow at 25 °C	+
4	吲哚产生 Indole production	—	34	30 °C 生长 Grow at 30 °C	+
5	V-P 试验 Voges-Proskauer	—	35	37 °C 生长 Grow at 37 °C	+
6	NaCl 生长 Grow at NaCl	+	36	42 °C 生长 Grow at 42 °C	—
7	丙氨酸-苯丙氨酸-脯氨酸芳胺酶 APPA	+	37	谷氨酸-甘氨酸-精氨酸芳胺酶 GGAA	+
8	侧金盏花醇 ADO	—	38	D-塔格糖 dTAG	—
9	L-吡咯烷酮芳胺酶 PyrA	—	39	D-海藻糖 dTRE	+
10	L-阿拉伯醇 IARL	—	40	柠檬酸盐(钠) CIT	—
11	D-纤维二糖 dCEL	+	41	丙二酸盐 MNT	—
12	β-半乳糖苷酶 BGAL	—	42	5-酮基-D-葡萄糖酸盐 5KG	—
13	硫化氢产生 H <sub>2</sub> S production	—	43	L-乳酸盐碱化 ILATK	—
14	β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶 BNAG	—	44	β-N-乙酰氨基半乳糖苷酶 NAGA	—
15	谷氨酰芳胺酶 AGLTP	—	45	琥珀酸盐碱化 SUCT	—
16	D-葡萄糖 dGLU	—	46	α-葡萄糖苷酶 AGLU	—
17	γ-谷氨酰转移酶 GGT	—	47	α-半乳糖苷酶 AGAL	—
18	发酵/葡萄糖 OFF	+	48	磷酸酶 PHOS	+
19	β-葡萄糖苷酶 BGLU	—	49	甘氨酸芳胺酶 GlyA	+
20	D-麦芽糖 dMAL	+	50	鸟氨酸脱羧酶 ODC	—
21	D-甘露醇 dMAN	+	51	赖氨酸脱羧酶 LDC	—
22	D-甘露糖 dMNE	—	52	脱羧酶 DEC	—
23	β-木糖苷酶 BXYL	—	53	L-组氨酸同化 IHISA	—
24	β-丙氨酸芳胺酶 BA <sub>lap</sub>	—	54	香豆酸 CMT	—
25	L-脯氨酸芳胺酶 ProA	+	55	β-葡萄糖醛酸酶 BGUR	—
26	脂肪酶 LIP	—	56	O/129 耐药 O129R	S
27	古老糖 PLE	—	57	蔗糖 SAC	—
28	酪氨酸芳胺酶 TyrA	—	58	L-苹果酸盐同化 IMLTa	—
29	尿素酶 URE	—	59	ELLMAN	—
30	D-山梨醇 dSOR	—	60	L-乳酸盐同化 ILATA	—

注：+：反应阳性；—：反应阴性；S：敏感。  
Note: +: Positive reaction; -: Negative reaction; S: Sensitive.



酸-甘氨酸-精氨酸芳胺酶、D-海藻糖、D-纤维二糖、D-麦芽糖、D-甘露醇、磷酸酶、甘氨酸芳胺酶、L-脯氨酸芳胺酶等反应为阳性, 其余反应为阴性(表2)。参考文献[12-14]进行了60项相关生理生化指标测定, 结果显示其与哈维氏弧菌生理生化特征相似, 初步判断菌株 SBDFT-1# 为哈维氏弧菌。

### 2.2.3 病原菌 16S rRNA 基因序列分析

对菌株 SBDFT-1# 进行 PCR 扩增, 获得长度为 1 426 bp 的核酸片段。上传测序序列至 NCBI 数据库获得序列登录号为 MK685121.1, 并进行 BLAST 比对, 结果显示菌株 SBDFT-1# 与数据库中 *Vibrio harveyi* 的一致性最高, 相似度为 100%; 利用 MEGA 4.0 软件构建的系统发育树结果显示, 菌株 SBDFT-1# 与 *V. harveyi* (EU090704.1) 聚为一支, 置信度 98% (图

4), 结合生理生化实验结果将其鉴定为哈维氏弧菌。

### 2.3 病原菌药物敏感性分析

菌株 SBDFT-1# 对 13 大类 32 种抗生素敏感性分析结果: 对 14 种药物敏感, 9 种药物中度敏感, 9 种药物耐药(表 3)。敏感性药物主要分布在青霉素类、头孢类、头霉素类、酰胺醇类、喹诺酮类、氨基糖苷类、氨基环醇类、磺胺类和其它类, 具体包括苯唑西林、头孢噻肟、头孢曲松、头孢他啶、头孢西丁、氯霉素、氧氟沙星、链霉素、妥布霉素、卡那霉素、大观霉素、复方新诺明、呋喃妥因、多粘菌素 B 等; 耐药性药物包括青霉素类的氨苄西林、青霉素、哌拉西林, 头孢类的头孢唑啉、头孢吡肟, 四环素类的四环素和大环内酯类的红霉素、克拉霉素、麦迪霉素等。

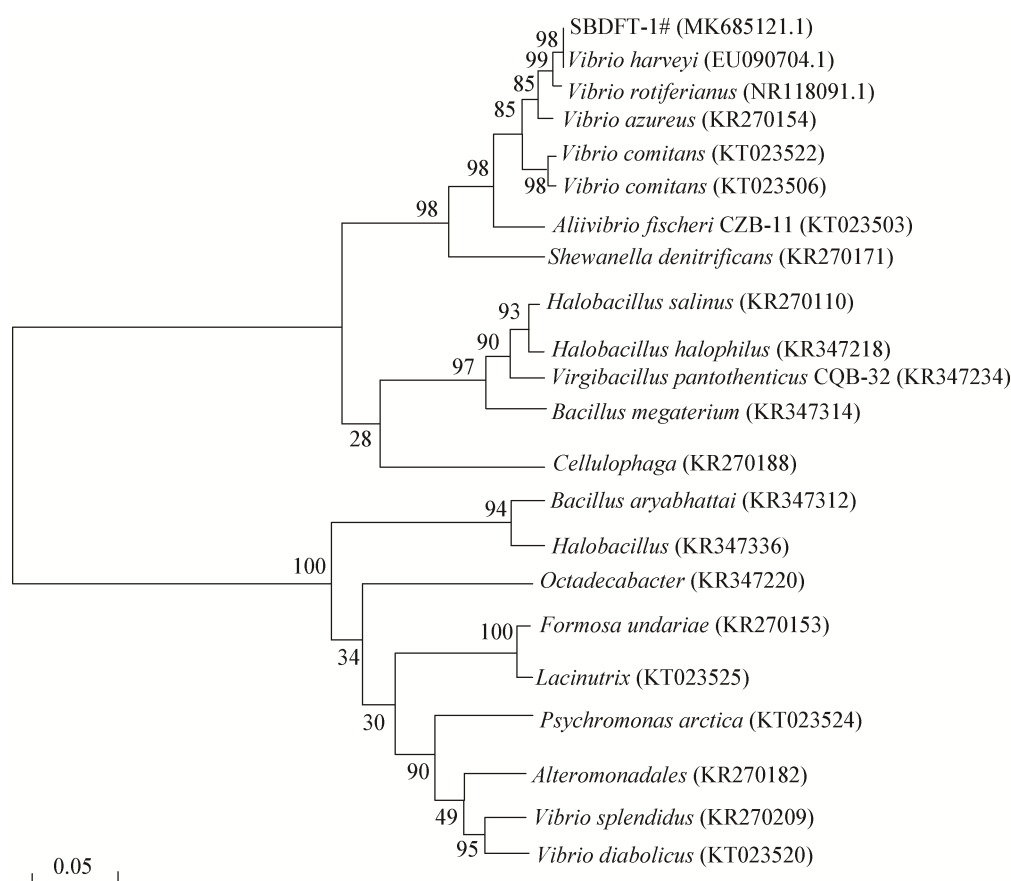


图 4 菌株 SBDFT-1# 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of strain SBDFT-1# based on 16S rRNA gene sequence

表 3 菌株 SBDFT-1#对抗生素的敏感性  
Table 3 The sensitivity of SBDFT-1# to antibacterial agents

抗生素类别	药物	敏感性	抗生素类别	药物	敏感性
Classification of antibiotics	Drugs	Sensitivity	Classification of antibiotics	Drugs	Sensitivity
青霉素类	氨苄西林	R	喹诺酮类	环丙沙星	I
	Ampicillin			Ciprofloxacin	
	苯唑西林	S		左氧氟沙星	I
	Oxacillin			Levofloxacin	
	青霉素	R		诺氟沙星	I
	Penicillin			Norfloxacin	
	哌拉西林	R		氧氟沙星	S
头孢类	Piperacillin		四环素类	四环素	R
	头孢唑啉	R		Tetracycline	
	Cefazolin			米诺环素	I
	头孢噻吩	I		Minocycline	
	Cefalotin		氨基糖甙类	链霉素	S
	头孢呋辛	I		Streptomycin	
	Cefuroxime			妥布霉素	S
	头孢哌酮	I		Tobramycin	
	Cefoperazone			卡那霉素	S
	头孢噻肟	S		Kanamycin	
	Cefotaxime		大环内酯类	红霉素	R
	头孢曲松	S		Eryphilin	
	Ceftriaxone			克拉霉素	R
	头孢吡肟	R		Clarithromycin	
	Cefepime			麦迪霉素	R
	头孢他啶	S		Medicamycin	
头霉素类	Cefoperazone		氨基环醇类	大观霉素	S
	头孢西丁	S		Spectinomycin	
Cephamecins	Cefacillin		磺胺类	复方新诺明	S
酰胺醇类	氯霉素	S		Sulfamethoxazole	
Chloromycetins	Chloramphenicol		其它	呋喃妥因	S
单环类	氨基南	I		Nitrofurantoin	
Monobactams	Aztreon		Others	多粘菌素 B	S
糖肽类	万古霉素	I		Polymyxin B	
Glycopeptides	Vancomycin				

注：S：敏感；I：中度敏感；R：不敏感。  
Note: S: High sensitivity; I: Moderate sensitivity; R: Resistance.

3 讨论与结论

病原菌鉴定是指将分离、纯化的病原菌进行系统分类鉴定。传统细菌分类鉴定依据菌株形态学及生理生化测定完成，鉴定过程耗时、繁琐；通过全自动微生物分析仪对细菌分类鉴定，可快速、准确测定细菌生理生化特性<sup>[15]</sup>，但受制于全自动微生物鉴定系统海洋微生物标准菌株数据库缺乏，无法完全达到鉴定到种；分子生物学鉴定快速、准确，但缺乏表型鉴定<sup>[16]</sup>。目前海洋生物致病菌分类鉴定

方法主要基于菌株生物学特性、生理生化特征和 16S rRNA 基因序列分析相结合确认<sup>[17-19]</sup>，其鉴定结果更加准确、可靠。本研究从患皮肤溃烂症双斑东方鲀内脏器官分离、纯化出致病菌，结合人工感染试验，采用菌株形态学、生理生化特征分析、16S rRNA 基因序列分析和系统发育树构建等手段，鉴定致病菌 SBDFT-1#为哈维氏弧菌。

哈维氏弧菌是一种广泛分布于海洋水体中的细菌<sup>[20]</sup>，属于比较流行、常见的致病性弧菌，可引

起多种海水养殖经济鱼类(如红鳍东方鲀、大黄鱼、花鲈、斜带石斑鱼、大菱鲆、鳊鱼、半滑舌鳎、浅色黄姑鱼、豹纹鳃棘鲈、海马、美洲黑石斑等)<sup>[2,21-30]</sup>感染发生皮肤溃疡。本研究首次从患病双斑东方鲀分离出哈维氏弧菌,并确认其致病性。其致病特征为双斑东方鲀口角、表皮、鳍条缺损溃烂,病灶处周边皮肤发红,游动缓慢,肾脏、脾脏充血,病鱼停止摄食,易出现死亡。多数患哈维氏弧菌病的鱼类会出现皮肤肌肉溃烂、眼球突出、体表出血、内脏充血肿大等症状<sup>[14,31]</sup>,而本研究报道的双斑东方鲀和王斌等<sup>[2]</sup>报道的红鳍东方鲀患病后未出现眼球突出症状,Qin 等<sup>[29]</sup>报道线纹海马患病后体表出现穿孔症状,表明不同鱼类患哈维氏弧菌病的发病特征有差异。研究发现哈维氏弧菌肌肉注射感染试验鱼,其注射部位组织症状表现为肿大发炎,后液化溃烂<sup>[2,21-22,30,32]</sup>,本研究证实了双斑东方鲀肌肉注射感染试验也会出现相似症状。

本研究选 32 种抗生素进行药敏试验,目的在于分析菌株 SBDFT-1#对不同药物的敏感性和耐药谱情况,而并非可用于养殖生产,仅供临床参考。在水产许可药物目录内(农业部第 1435 号公告、第 1506 号公告、第 1759 号公告和第 1960 号公告及 2010 年版《中华人民共和国兽药典》中予以公布的),菌株 SBDFT-1#对磺胺类药物(复方新诺明)敏感,对多数喹诺酮类药物中度敏感,可使用复方新诺明防治该养殖区双斑东方鲀哈维氏弧菌病。不同来源地区、不同宿主的哈维氏弧菌株耐药谱型存在差异,谢楚萍等<sup>[27]</sup>从浅色黄姑鱼分离出哈维氏弧菌耐药谱为氨苄西林、青霉素、苯唑青霉素、先锋霉素 VI、羧苄青霉素和卡那霉素;陈建国等<sup>[30]</sup>从美洲黑石斑鱼分离出哈维氏弧菌耐药谱为氨苄西林、头孢氨苄、诺氟沙星、头孢拉定、多粘菌素 B、阿奇霉素、青霉素等;Austin 等<sup>[33]</sup>研究发现哈维氏弧菌耐药谱为氨苄青霉素、链霉素、磺胺二甲唑;本研究从双斑东方鲀分离出的哈维氏弧菌耐药谱为氨苄西林、青霉素、哌拉西林、头孢唑啉、四环素、克拉霉素、麦迪霉素等;而刘开放等<sup>[34]</sup>认为来源于

不同养殖水体的哈维氏弧菌耐药谱型多样,且差异明显。哈维氏弧菌的耐药谱型复杂多样,因此各养殖区应做好不同来源哈维氏弧菌的药敏分析实验和耐药谱型调查,然后根据菌株药敏实验结果指导生产用药。使用抗生素是防治水生生物微生物疾病的主要手段,但是长期滥用抗生素会导致病原产生耐药性,药物也会残留在生物体内。所以生产上应在药敏实验基础上选择适合的许可药物进行病害防治,且商品鱼上市前留有足够休药期。

在养殖过程中,双斑东方鲀因水环境恶化、相互咬伤或发生寄生虫感染致抵抗力变弱,易导致哈维氏弧菌感染。生产上防治哈维氏弧菌病应以预防为主:合理控制养殖密度,尽量避免相互咬伤或皮肤损伤,同时加强营养、提高鱼体免疫力;病发期,要加强病鱼隔离,及时正确药物治疗。

## REFERENCES

- [1] Liu ZY, Zhang GM, Xie YQ, et al. Tissue pathological observation on the *Paradeontacylix sinensis* disease of *Fugu rubripe*[J]. Journal of Jimei University (Natural Science), 2006, 11(1): 24-27 (in Chinese)  
刘振勇, 张国民, 谢有俭, 等. 红鳍东方鲀中华拟德氏吸虫病的组织病理学观察[J]. 集美大学学报: 自然科学版, 2006, 11(1): 24-27
- [2] Wang B, Yu LP, Hu L, et al. Isolation and identification of bacteriosis pathogen from cultured *Fugu obscurus* with canker of skin[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(2): 352-358 (in Chinese)  
王斌, 于兰萍, 胡亮, 等. 红鳍东方鲀皮肤溃烂病原菌的分离与鉴定[J]. 中国水产科学, 2008, 15(2): 352-358
- [3] Qin GM, Zhang XJ, Chen CZ, et al. Biological characterization of *Vibrio penaeicida* sp. nov. from *Takifugu rubrips* L.[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2008, 39(3): 228-233 (in Chinese)  
秦国民, 张晓君, 陈翠珍, 等. 红鳍东方鲀(*Takifugu rubrips*)病原杀对虾弧菌的主要生物学特性研究[J]. 海洋与湖沼, 2008, 39(3): 228-233
- [4] Zhang XJ, Chen CZ, Yan BL, et al. Studies on biological characteristics of pathogenic *Vibrio ichthyenteri* isolated from pufferfish (*Takifugu rubrips* L.)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2009, 33(6): 1118-1125 (in Chinese)  
张晓君, 陈翠珍, 阎斌伦, 等. 红鳍东方鲀病原鱼肠道弧菌的生物学特性研究[J]. 水生生物学报, 2009, 33(6): 1118-1125
- [5] Yang YJ, Chen H, Zhang CH. Histopathological observation



- of puffer *Fugu obscurus* infected with mucormycosis[J]. Microbiology China, 2008, 35(7): 1059-1062 (in Chinese)  
杨鸾劫, 陈辉, 张朝晖. 暗纹东方鲀毛霉菌感染的组织病理学观察[J]. 微生物学通报, 2008, 35(7): 1059-1062
- [6] Yang YJ, Chen H, Fang P, et al. Separation and identification of pathogenic bacteria of *Fugu obscurus* cultured in factory[J]. Journal of Zhanjiang Ocean University, 2005, 25(4): 18-21 (in Chinese)  
杨鸾劫, 陈辉, 方苹, 等. 工厂化养殖暗纹东方鲀致病菌的分离和鉴定[J]. 湛江海洋大学学报, 2005, 25(4): 18-21
- [7] Yang YJ, Yu JH, Chen H, et al. Separation and determination on virulence genes of *Vibrio cholerae* in *Fugu obscurus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(4): 525-530 (in Chinese)  
杨鸾劫, 俞菊华, 陈辉, 等. 暗纹东方鲀非 O1 霍乱弧菌的鉴定及毒力基因检测[J]. 水产学报, 2006, 30(4): 525-530
- [8] Li JN, Wei MF, Yu DP, et al. Separation and identification of a pathogenic bacterium in *Fugu obscurus*[J]. Reservoir Fisheries, 2001, 21(5): 42-43 (in Chinese)  
李瑾年, 魏梅芳, 于道平, 等. 暗纹东方鲀“脱粘病”病原菌的分离鉴定[J]. 水利渔业, 2001, 21(5): 42-43
- [9] Zhou K, Zheng GX. A virus disease of *Takifugu obscurus*[J]. Reservoir Fisheries, 2005, 25(5): 96-97 (in Chinese)  
周凯, 郑国兴. 暗纹东方鲀的一种病毒性疾病[J]. 水利渔业, 2005, 25(5): 96-97
- [10] Yuan DQ, Chen QC, Li JQ, et al. Investigation on disease species and preliminary control measures of *Takifugu bimaculatus*[J]. Scientific Fish Farming, 2004(4): 43-44 (in Chinese)  
袁定清, 陈启春, 李金秋, 等. 双斑东方鲀病害种类调查及防治措施初探[J]. 科学养鱼, 2004(4): 43-44
- [11] Zou YX, Zhang PJ, Mo ZL, et al. Isolation and identification of the pathogenic bacteria from *Scophthalmus maximus*[J]. High Technology Letters, 2004, 14(4): 89-93 (in Chinese)  
邹玉霞, 张培军, 莫照兰, 等. 大菱鲆出血症病原菌的分离和鉴定[J]. 高技术通讯, 2004, 14(4): 89-93
- [12] Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[M]. 2nd ed. New York, USA: Springer, 2005: 520-527, 544
- [13] Dong XZ, Cai MY. Handbook of Common Bacterial System Identification[M]. Beijing: Science Press, 2001: 114-116 (in Chinese)  
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: 114-116
- [14] Zhang XH, Zhong YB, Chen JX. The biological characteristics, epidemiology and detection techniques of *Vibrio harveyi*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2007, 37(5): 740-748 (in Chinese)  
张晓华, 钟英斌, 陈吉祥. 哈维氏弧菌的生物学特性、流行病学及检测技术[J]. 中国海洋大学学报, 2007, 37(5): 740-748
- [15] Du XB, Zhao Y, Li WJ. Methods of bacterial identification in the program of culture collection[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2009, 43(3): 50-52 (in Chinese)  
杜昕波, 赵耘, 李伟杰. 菌种保藏中的细菌鉴定方法[J]. 中国兽药杂志, 2009, 43(3): 50-52
- [16] Cao J, Ma L, Zhang WC, et al. Identification of *Vibrio alginolyticus* isolated from large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) and generation of *V. alginolyticus* ghosts[J]. Microbiology China, 2018, 45(1): 129-137 (in Chinese)  
曹际, 马林, 张文畅, 等. 大黄鱼源溶藻弧菌的鉴定及其菌蜕制备[J]. 微生物学通报, 2018, 45(1): 129-137
- [17] Zhang CY, Wang YG, Rong XJ. Isolation and identification of causative pathogen for skin ulcerative syndrome in *Apostichopus japonicus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(1): 118-123 (in Chinese)  
张春云, 王印庚, 荣小军. 养殖刺参腐皮综合征病原菌的分离与鉴定[J]. 水产学报, 2006, 30(1): 118-123
- [18] Ma AM, Yan MC, Chang WS, et al. Isolation and identification of *Vibrio vulnificus* from diseased *Nibea albiflora*[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2008, 24(10): 960-964 (in Chinese)  
马爱敏, 闫茂仓, 常维山, 等. 黄姑鱼创伤弧菌的分离和鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(10): 960-964
- [19] Wang Y. Isolation, identification and pathogenic mechanism of two bacterial pathogens of fish and taxonomic analysis of three novel marine bacterial species[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2010 (in Chinese)  
王燕. 两株海洋病原菌的分离鉴定、致病机理研究及三株海洋新菌的分类鉴定[D]. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 2010
- [20] Ramesh A, Venugopalan VK. Response of enteric luminous bacteria to environmental conditions in the gut of the fish[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1989, 66(6): 529-533
- [21] Mao ZJ, Liu GY, Chen CF. Isolation and identification of pathogenic bacteria causing ulcerosis in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2002, 29(2): 178-181 (in Chinese)  
毛芝娟, 刘国勇, 陈昌福. 大黄鱼溃疡病致病菌的初步分离与鉴定[J]. 安徽农业大学学报, 2002, 29(2): 178-181
- [22] Wang BK, Yu JH, Li J, et al. Isolation and identification of pathogen (*Vibrio harveyi*) from sea perch, *Lateolabrax japonicus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2002, 9(1): 52-55 (in Chinese)  
王保坤, 余俊红, 李筠, 等. 花鲈弧菌病原菌(哈维氏弧菌)的分离与鉴定[J]. 中国水产科学, 2002, 9(1): 52-55
- [23] Chen XG, Wu SQ, Shi CB, et al. Isolation and identification

- of pathogenetic *Vibrio harveyi* from estuary cod *Epinephelus coioides*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2004, 11(4): 313-317 (in Chinese)
- 陈献稿, 吴淑勤, 石存斌, 等. 斜带石斑鱼病原菌(哈维氏弧菌)的分离与鉴定[J]. 中国水产科学, 2004, 11(4): 313-317
- [24] Fan WH, Huang J, Wang XH, et al. Identification and phylogenetic study of pathogenic bacteria causing ulcer disease of cultured Turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2005, 45(5): 665-670 (in Chinese)
- 范文辉, 黄捷, 王秀华, 等. 养殖大菱鲆溃疡症病原菌的分离鉴定及系统发育分析[J]. 微生物学报, 2005, 45(5): 665-670
- [25] Zhang FP, Peng ZL, Zhang J, et al. Isolation and identification of the pathogenic strain of *Vibrio harveyi* from *Miichthys miiuy*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(3): 304-309 (in Chinese)
- 张凤萍, 彭志兰, 张健, 等. 鲢鱼弧菌病病原菌(哈维氏弧菌)的分离与鉴定[J]. 微生物学报, 2010, 50(3): 304-309
- [26] Chen ZQ, Yao ZX, Lin M, et al. Study on pathogen of skin ulcer disease of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(5): 764-771 (in Chinese)
- 陈政强, 姚志贤, 林茂, 等. 半滑舌鲷皮肤溃疡病病原研究[J]. 水产学报, 2012, 36(5): 764-771
- [27] Xie CP, Huang SY, Zheng YS, et al. Isolation and identification of a bacterial pathogen from Chu's croaker *Nibea coibor*[J]. Journal of Applied Oceanography, 2013, 32(3): 411-417 (in Chinese)
- 谢楚萍, 黄思韵, 郑仰思, 等. 养殖浅色黄姑鱼体表溃烂症病原菌的分离与鉴定[J]. 应用海洋学学报, 2013, 32(3): 411-417
- [28] Xu XL, Shao P, Li H, et al. Identification and phylogenetic analyses of *Vibrio harveyi* isolated from *Plectropomus leopardus*[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2014, 33(4): 112-118 (in Chinese)
- 徐晓丽, 邵蓬, 李灏, 等. 豹纹鳃棘鲷致病性哈维氏弧菌的分离鉴定与系统发育分析[J]. 华中农业大学学报, 2014, 33(4): 112-118
- [29] Qin G, Wang X, Tan S, et al. A bacterial infection by *Vibrio harveyi* causing heavy reduction of cultured lined seahorse *Hippocampus erectus*[J]. Journal of Fish Diseases, 2017, 40(4): 601-605
- [30] Chen JG, Chen C, Li YL, et al. Isolation and classification of exophthalmic disease-inducing pathogenic bacterium from *Centropomus striata*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(5): 32-40 (in Chinese)
- 陈建国, 陈超, 李炎璐, 等. 美洲黑石斑鱼(*Centropomus striata*)“突眼症”的病原菌分离鉴定[J]. 渔业科学进展, 2017, 38(5): 32-40
- [31] Cui J, Fan XT, Liu WZ, et al. Isolation and identification of *Vibriosis* pathogens of marine cultured fishes in southern China[J]. Journal of Hainan University (Natural Science), 2014, 32(3): 244-251 (in Chinese)
- 崔婧, 范雪亭, 刘文竹, 等. 华南地区海水养殖鱼类主要弧菌病原的分离与鉴定[J]. 海南大学学报: 自然科学版, 2014, 32(3): 244-251
- [32] Xu XJ, Xu B, Wang J, et al. Histopathological studies on *Pseudosciaena crocea* artificially challenged with *Vibrio harveyi*[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2009, 48(2): 281-286 (in Chinese)
- 徐晓津, 徐斌, 王军, 等. 哈维氏弧菌人工感染大黄鱼的组织病理学研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2009, 48(2): 281-286
- [33] Austin B, Austin DA, Farhat Z, et al. Diagnosis and control of bacterial fish pathogens with emphasis on *Vibrio harveyi*[J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 1999, 29(3): 489-499
- [34] Liu KF, Bu J, Zhang X, et al. Resistance to antibiotic of *Vibrio harveyi* strains isolated from mariculture in South China[J]. Journal of Hainan University (Natural Science), 2017, 35(2): 131-139 (in Chinese)
- 刘开放, 步君, 章翔, 等. 华南地区海水养殖水域中哈维氏弧菌的抗药性分析[J]. 海南大学学报: 自然科学版, 2017, 35(2): 131-139