

养殖大菱鲂溃疡症病原菌的分离鉴定及系统发育分析

范文辉^{1,2} 黄 捷^{1*} 王秀华¹ 史成银¹ 刘 莉¹

(¹ 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 青岛 266071)

(² 中国海洋大学生命科学与技术学部 青岛 266003)

摘 要 2004 年夏季山东海阳一带养殖大菱鲂 (*Scophthalmus maximus* L.) 暴发溃疡病。症状主要表现为体表病灶部位出血、肌肉溃烂、眼球凸出等,解剖可见鳃丝贫血,肝脏充血,肾脏和胆囊肿大,肠壁充血并呈透明状,从出现发病症状起,大约一周后开始出现死亡。从病鱼体表溃疡部位及内脏分离出优势菌并命名为 H1,经人工感染证实 H1 即为引起本次养殖大菱鲂体表溃疡症的病原菌。对病原菌进行鉴定揭示该菌革兰氏染色阴性,菌体呈短杆状,极生单鞭毛。综合该菌在形态、生理生化、API 20NE 与 API 20E 自动鉴定结果、16S rDNA 同源性等方面的特性,确认 H1 为哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*),该菌对呋喃妥因、菌必治等多种抗生素敏感。哈维氏弧菌是海水养殖鱼类的常见致病菌,但作为养殖大菱鲂的病原菌属首次报道。

关键词 哈维氏弧菌,大菱鲂,溃疡症,病原菌,16S rDNA

中图分类号 :Q939 **文献标识码** :A **文章编号** :0001-6209(2005)05-0665-06

大菱鲂 (*Scophthalmus maximus* L.) 原产于西欧沿海,是当前欧洲的重要海水养殖鱼类之一,1992 年被引种到我国,1998 年形成大规模产业化养殖的局面^[1],该鱼具有生长快、抗病力强、肉质鲜美、商品价值高等许多优点,现已成为我国北方沿海养殖的优良品种,年创产值超过 15 亿元。然而随着养殖密度的增加,水体环境的恶化,各种细菌性疾病、寄生虫病、病毒性疾病时有发生^[2-4],且有愈演愈烈之势。其中细菌性疾病是大菱鲂养殖中危害最为严重的一种疾病,国内外报道的大菱鲂细菌性病原主要包括弧菌属的鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*)、灿烂弧菌 (*Vibrio solentidus*)、海弧菌 (*Vibrio pelagius*)、溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)、美人鱼弧菌 (*Vibrio damsela*) 等^[2,5-9]。鳃弧菌在弧菌中最具代表性,其毒力最强,可造成大菱鲂苗和成鱼的大规模死亡。另外,嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、迟缓爱德华氏菌 (*Ewardsiella tarda*)、链球菌 (*Streptococcus parauberis*) 等也可以对养殖大菱鲂致病并造成不同规模的死亡^[10-12]。国内外目前还没有哈维氏弧菌导致大菱鲂大规模死亡的报道。

本文首次从患溃疡病的大菱鲂体表溃疡部位及内脏分离出一株优势菌,经回归感染证实了该菌株是引起此次病害的病原菌,并根据电镜下的形态特征、传统生理生化反应、API 20NE 和 API 20E 自动鉴

定系统鉴定结果以及 16S rDNA 同源性分析对该病原菌进行了综合鉴定,同时还对其进行了药敏实验,旨在为该病的诊断与防治提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 患病大菱鲂于 2004 年 8 月 17 日取自山东省海阳市一大菱鲂养殖场,本实验室样品编号 20040817,体长 10 cm 左右;人工感染用健康大菱鲂平均体长 13 cm,购自山东省胶南市一大菱鲂养殖场。

1.1.2 主要试剂 :TSB(胰蛋白胨大豆肉汤)培养基和 TCBS 培养基购自北京陆桥生物技术有限公司,用时补加 NaCl 至 3%;API 20E 和 API 20NE 自动鉴定卡,使用时在 AUX 培养基中补加 NaCl 至 3%;药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.2 病原菌的分离

取患病典型的濒死大菱鲂,用 70% 酒精棉球对病鱼体表消毒后,取出病鱼的溃疡处肌肉、肝、肾、脾等组织小块于离心管中,用无菌盐水冲洗组织块,剪碎后划线接种于 TSB 培养基平板,28℃ 下恒温培养 24h 后,挑取形态特征一致的优势菌落进行分离纯化,斜面保存,同时将纯化后的优势菌接种至 TSB 和 TCBS 培养基上,28℃ 培养 24~48h 观察菌落颜色及特征。

基金项目:中国水产科学研究院黄海水产研究所海水养殖生物病害控制与分子病理学实验室经费资助

* 通讯作者。Tel 86-532-5823062;Fax 86-532-5811514;E-mail:Huanglei@ysfri.ac.cn

作者简介:范文辉(1978-),女,河南新乡人,硕士研究生。主要从事海水鱼类细菌病害研究。

收稿日期:2005-01-30 修回日期:2005-04-29

1.3 人工感染试验

将 24h 的细菌培养物用 1.5% 无菌盐水制成菌悬液,经平板计数浓度为 3.2×10^9 CFU/mL,10 倍系列稀释后备用。实验分为 4 组(3 个实验组,1 个对照组),每组 4 尾。用有效水体为 70cm × 60cm × 50cm 水族箱,每箱放养健康大菱鲂 4 尾,实验水温为 $13 \pm 1^\circ\text{C}$,日换水量约 50%,连续充气暂养。7d 后实验组分别肌肉注射 0.1mL 10 倍梯度稀释的菌悬液,对照组肌肉注射同等剂量的无菌盐水。观察大菱鲂发病症状并记录情况,取濒死大菱鲂的病灶、肝、肾、脾进行细菌的再分离。

1.4 药敏试验

采用纸片扩散法,取 100 μL 菌悬液(3.2×10^9 CFU/mL)涂布于 TSB 培养基平板,用无菌镊子将抗生素纸片轻轻贴在平板表面,28 $^\circ\text{C}$ 恒温培养 24h 后测定抑菌圈直径。

1.5 病原菌的电镜观察

用无菌去离子水离心洗涤两次菌体,悬浮,取一滴于铜网上,磷钨酸负染,晾干,透射电镜观察 H1 菌的个体形态、大小、鞭毛等,按 Oliver^[13]的方法对其进行分类到属。

1.6 生理生化特征的测定

利用 API 20NE 和 API 20E 自动鉴定系统,按说明所述方法进行鉴定,并按东秀珠^[14]所述测定生理生化方法进行补充鉴定。

1.7 16S rDNA 序列测定和分析

1.7.1 模板的制备:用接种环挑单一菌落悬浮于 50 μL 无菌去离子水,100 $^\circ\text{C}$ 水浴 5min,12000r/min 离心 20min,取上清作为 PCR 反应所用模板。

1.7.2 PCR 扩增和测序:扩增 16S rDNA 的正向引物为 27F:5'-AGAGTTTGATC(C/A)TGGCTCAG-3'(对应于 *E. coli* 16S rDNA 序列的第 8~27 个碱基位置);反向引物 1492R:5'-TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT-3'(对应于 *E. coli* 16S rDNA 序列的第 1492~1510 个碱基位置)。PCR 反应体系(100 μL):10 μL 10 × PCR 缓冲液(含 Mg^{2+}),2 μL 10mmol/L 4 × dNTP,各 5 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 正向和反向引物,1 μL Taq DNA 聚合酶(5U),10 μL 模板。PCR 反应条件:94 $^\circ\text{C}$ 4min,94 $^\circ\text{C}$ 30s,55 $^\circ\text{C}$ 30s,72 $^\circ\text{C}$ 1min40s,30 个循环,72 $^\circ\text{C}$ 6min。PCR 产物由上海博亚公司纯化和测序,测序所用仪器为 ABI PRISM™ 3730 DNA 测序仪。

1.7.3 系统发育学分析:将所得的 1424bp 序列(Accession number: AY928014)与 GenBank 中的核酸

序列进行 BLAST 分析,选取与菌株 H1 相似性最高的细菌 16S rDNA 序列,用 OMIGA 对 H1 菌和 GenBank 中 19 种细菌的 16S rDNA 序列进行对比分析,用 Genedoc 软件把分析结果转换为 Phy 格式后输入 TREECON 软件,采用邻接法(Neighbor-joining)获得系统发育树,通过自展分析(Bootstrapping)进行系统发育树的评估,自展数据集为 1000 次。

2 结果

2.1 患病症状及解剖观察

大菱鲂患病初期表现为烂鳃、粘鳃,体表病灶部位稍发白,局部病灶充血发红,与周围皮肤分界明显,此时病鱼停止摄食,缓慢浮游于养殖池边缘;中后期表现为体表开始溃烂,溃烂多发生在头部,鳃盖周围,上、下体侧鳍基处,形成溃疡面或深洞。水浸片镜检发现病灶部位有大量活泼运动的细菌,病鱼体表粘液增多,粘液中可见大量的细菌。解剖肝脏充血,脾液化状,肾脏和胆囊肿大,肠壁充血并变得薄而透明,肠内有淡黄色液体。患病鱼如得不到及时的治疗,可引起大批死亡。

2.2 病原菌

从患病大菱鲂的溃烂肌肉、肝、肾和脾中分离到优势度在 95% 以上的病原菌各一株,共 4 株。TSB 培养基上 4 株菌落形态、大小、颜色均一致,TCBS 培养基上均呈黄色,且对该四株菌所测生理生化特征相同,故判定为同一种细菌,以从肝脏分离的菌株(命名为 H1,本实验室菌株编号为 2004081801)作为代表,进行后续实验。

2.3 感染实验

人工感染后的大菱鲂病症与自然发病的病症相似,高浓度 H1 菌悬液(3.2×10^9 CFU/mL)感染大菱鲂在 24h 内死亡,症状为头部和上、下体侧处出血发红,解剖可见肝脏充血,肠壁充血且内部有少量积水,脾肿大,肾脏暗红。中浓度(3.2×10^8 CFU/mL ~ 3.2×10^7 CFU/mL)菌液感染大菱鲂 48h 后开始出现发病症状,表现为头部、鳍基发红,此时病鱼停止摄食,活力大大减弱,触摸后不游动。5d 后体表病灶部位开始出现轻度溃疡。至第 7d 时实验组大菱鲂全部死亡,对照组无一例死亡。按 1.2 所述方法取人工感染后发病死亡的大菱鲂的溃疡肌肉、肝、脾和肾涂布 TSB 培养基平板,可分离到较多的菌落形态高度一致的细菌,能使 TCBS 培养基变黄,经生理生化鉴定与 H1 菌相同,再次感染大菱鲂后仍能出现与自然发病情况下相同的症状。该结果表明 H1 菌

即为养殖大菱鲂体表溃疡症的病原。

2.4 药敏试验

表 1 为药敏试验结果。在所试的 39 种药物中，

以呋喃妥因、菌必治等 19 种抗生素的抑制作用极强，生产上可酌情使用其中部分低残留药物治疗 H1 菌引起的大菱鲂的皮肤溃疡症。

表 1 药敏试验结果

Table 1 The results of the drugs sensitivity test

Drug	Concentration (μg/disc)	Diameters of micro-biostatic circles/mm	Sensitivity	Drug	Concentration (μg/disc)	Diameters of micro-biostatic circles/mm	Sensitivity
Nitrofurantoinum	300	40	S	Piperacillin	100	16	R
Chloramphenicol	30	40	S	Ciprofloxacin	5	12	R
Ceftriaxone sodium	30	36	S	Polymyxin B	300	10	R
Furazolidone	300	34	S	Mezlocillin	75	8	R
Cetazidime	30	32	S	Cefuroxime	30	0	R
Minocyclin	30	32	S	Metronidazole	5	0	R
Dxycycline	30	31	S	Azlocillin	75	0	R
Teracycline	30	30	S	CarbenicillinNa ₂	100	0	R
Cefotaxime sodium	30	29	S	Erythromycin	15	0	R
Rifampicin	15	27	S	Midecamycin	30	0	R
Norfloxacin	10	27	S	Acetylspiramycin	30	0	R
Lomefloxacin	10	25	S	Penicillin	10	0	R
Novobiocin	30	25	S	Oxacillin	1	0	R
Cefoperazone	75	25	S	Ampicillin	10	0	R
Co-Sinomnin	1.25/23.75	24	S	Optochin	5	0	R
Cefazolin	30	23	S	Cephalosporinon	30	0	R
Flumark	10	2.2	S	Sterptomycin	10	0	R
Amikacin	30	19	S	Bacitracin	0.04IU/disc	0	R
Gentamicin	10	17	S	Amphotericin B	30	0	R
Kanamycin	30	14	M				

S : High sensitive ; M : Medium sensitive ; R : Resistant .

2.5 形态特征及运动性

H1 菌在 TSB 培养基 28℃ 培养 24h 后，菌落圆形，边缘整齐，表面隆起光滑，呈淡灰黄色，能在 TCBS 培养基上生长良好并使培养基变黄，革兰氏染色阴性，短杆状，两端钝圆，具一根极生单鞭毛（图 1），水浸片检查和半固体穿刺培养发现 H1 菌具有一定运动能力。菌体大小为(0.6~0.8)μm×(1.4~1.6)μm，鞭毛长约 3.6~4.5μm。

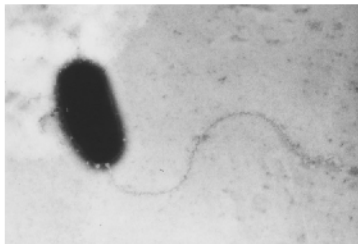


图 1 菌株 H1 的电镜照片(15000 ×)

Fig.1 Electron micrograph of negative-stained H1 cell with one flagella(15000 ×)

2.6 生理生化特征

API 20NE 和 API 20E 系统鉴定结果(表 2 表 3)显示 H1 菌为嗜水气单胞菌，鉴定结果可信度分别为 99.9% 和 61.5%。但嗜水气单胞菌不具带鞘极

生鞭毛且对弧菌抑制剂 O/129 不敏感，这与图 1 中的 H1 菌体形态特征和对 O/129 敏感不符，再考虑到 API 20NE 和 API 20E 的鉴定菌谱只包括弧菌属的部分成员(不包括哈维氏弧菌)，因此选取针对弧菌类细菌的代表性生理生化反应，用传统的生理生化方法再次鉴定。

传统生理实验(表 4)结果表明 H1 在 0% NaCl 条件下或 37℃ 下不能生长，但在 6% NaCl 条件下可生长，而根据文献[14]可知嗜水气单胞菌在 0% NaCl 条件下和 37℃ 下可正常生长，在 6% NaCl 条件下不可生长，这与 H1 的生理特征不符。

传统生理生化试验结果(表 4)表明 H1 菌兼性厌氧，氧化酶反应阳性，生长需要 Na⁺ 离子，代谢葡萄糖产酸但不产气，不产色素，对弧菌抑制剂 O/129 (2,4-二氨基-6,7-二异丙基喋啶磷酸盐)敏感，能使 TCBS 培养基变黄。根据这些特征并结合形态特征，可判定 H1 为弧菌科弧菌属细菌。通过与弧菌科其它部分成员的比较确认，H1 的生长和生理生化特征与哈氏弧菌最接近。综合以上结果，可以初步将 H1 鉴定为哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)。

表 2 菌株 H1 的 API20 NE 生化试验结果

Table 2 Results of bio-chemical characteristics of strain H1 by API20 NE

Items	Results	Items	Results	Items	Results
Nitrate reduction	+	PNPG	+	N-acetylglucosamine	+
Indole production	+	Urease	+	Decanoate	+
Arginine dihydrolase	-	Glucose	+	Adipate	+
Polychrom dihydrolase	+	Arabinose	+	Malate	+
Gelatinase	+	Mannose	+	Citrate	+
Oxidase	+	Mannitol	+	Phenylacetic acid	-
Acid from glucose	+	Maltose	+	Gulcoheptonate	+

表 3 菌株 H1 的 API20 E 生化试验结果

Table 3 Results of bio-chemical characteristics of strain H1 by API20 E

Items	Results	Items	Results	Items	Results
ONPG	+	Citrate	+	Glucose	+
H ₂ S	-	Urease	-	Mannitol	+
V-P	-	Indole production	+	Inositol	-
Arginine dihydrolase	-	Gelatinase	+	Sorbierite	+
Lysine decarboxylase	+	oxidation/fermentation		Rhamnose	-
Ornithine decarboxylase	+	Sucrose	+	Meilbiose	-
Tryptophan deaminase	-	Laetile	+	Arabinose	+

表 4 菌株 H1 的传统生理生化试验结果

Table 4 Results of physiological and bio-chemical characteristics of strain H1

Items	Results	Items	Results	Items	Results
Growth : NaCl 0%	-	Growth at 4°C	-	Gram stain	-
NaCl 1%	+	28°C	+	O/129	+
NaCl 2%	+	37°C	-	TCBS agar	Yellow
NaCl 3%	+	Growth at pH5	-	Oxidase	+
NaCl 4%	+	pH6	+	Catalase	+
NaCl 5%	+	pH7	+	Amylase	+
NaCl 6%	+	pH8	+	Urease	-
NaCl 7%	+	pH9	+	Gelatinase	+
NaCl 8%	-	pH10	+	H ₂ S	-
Arginine dihydrolase	-	Cellobiose	+	Citrate	+
Ornithine decarboxylase	+	Adonitol	-	ONPG	+
Lysine decarboxylase	+	Rahmnose	-	V-P	-
Acid from glucose	+	Lactose	-	Lipase (Tween 80)	+
Gas from glucose	-	Xylose	-	Nitrate reduction	+

2.7 16S rDNA 序列系统发育分析

在 GenBank 中进行同源序列检索,结果显示所检索的 100 个相似性较高的菌株的 16S rDNA 序列中 86% 为弧菌属细菌,其余的为不可培养的细菌或未鉴定到种属。图 2 是根据菌株 H1 的 16S rDNA 序列与相关属种 16S rDNA 序列构建的系统发育树。图中可见菌株 H1 与哈维氏弧菌自然聚为一支,经过同源性比较发现菌株 H1 的与哈维氏弧菌的 16S rDNA 序列同源性高达 99%,说明菌株 H1 与哈维氏弧菌亲缘关系最近,可将其鉴定为哈维氏弧菌。

3 讨论

目前国内在大菱鲆疾病学研究方面涉及较少,作者通过对养殖大菱鲆细菌性流行病的调查中发现,溃疡症是 2004 年养殖大菱鲆中新出现的病症,

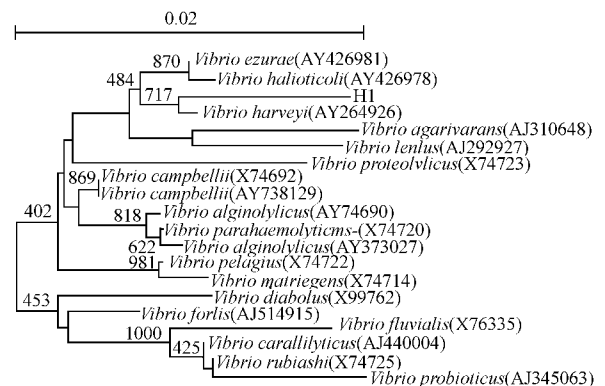


图 2 基于 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree based on 16S ribosomal DNA sequences. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Bootstrap values, expressed as percentages of 1000 replications, are given at branch points. The scale bar indicated 0.02 substitutions per nucleotide position.

可危及鱼苗和成鱼。从患溃疡症病鱼体表病灶及内脏分离出一株优势菌 H1, 并对其进行了综合鉴定。由分离株 H1 的光镜和电镜下的形态学观察、传统生理生化特征、API 20E 与 API 20NE 自动鉴定生化特征结果可知, H1 菌为哈氏弧菌。为了使鉴定结果更加可信, 我们又从细菌的 16S rDNA 序列同源性的角度对 H1 菌进行了系统发育学分析, 结果表明菌株 H1 与哈氏弧菌的 16S rDNA 序列同源性高达 99%, 进一步证实 H1 为哈氏弧菌。

目前国内外还没有哈氏弧菌导致养殖大菱鲆较大规模死亡的报道, 仅有文献表明可在由隐核虫、粘细菌和弧菌联合作用致病的大菱鲆体表溃疡处分离到两株生理生化特征与哈氏弧菌相似的弧菌^[15]。哈氏弧菌是海水鱼类养殖业中一种比较常见的条件致病菌, 能引起海水养殖青石斑鱼 (*Epinephelus awoara*)、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)、鲈鱼 (*Lateolabrax japonicus*)、尖吻鲈 (*Lates calcarifer*)、大黄鱼等鱼类不同程度的体表溃疡病, 其症状与大菱鲆溃疡症相似^[16~20]。根据作者所调查的发病情况来看, 养殖大菱鲆溃疡症多发生在水温较高、寄生虫活跃的夏季, 有时伴有寄生虫感染 (可造成鱼体创伤), 水温降低后病情有所缓解, 说明哈氏弧菌为养殖大菱鲆的条件致病菌, 其致病条件与水温、鱼体创伤与否关系甚为密切, 因此作者认为在高温季节有必要对养殖大菱鲆溃疡症进行预防, 且防止寄生虫感染是其中非常关键的一个环节。另外作者还发现, 养殖大菱鲆溃疡症暴发的初期, 病鱼鳃部发生病变, 体表局部 (如鳍基处) 出血, 该症状与鳃弧菌引起的感染症状相似^[21], 说明不同的病原菌可导致大菱鲆发生相同或相似的症状, 因此生产上应进行病原诊断后合理施药, 不可根据表观发病症状推断使用何种药物。

本实验采用传统的生理生化、电镜观察、API 20E 和 API 20NE 自动鉴定系统和最新的分子生物学等多种方法对分离菌 H1 进行了鉴定比较, 结果发现, 各种方法都存在着不容忽视的缺陷。传统的生理生化试验不仅操作繁琐耗时长并且受人为主观因素影响较大。自动鉴定系统 API 20E 主要针对肠杆菌科和其它非苛养革兰氏阴性杆菌, 鉴定谱包括 102 种细菌 (包括弧菌属的 6 种细菌), 鉴定准确率为 92.05%。API 20NE 针对非肠杆菌科的非苛养革兰氏阴性菌, 鉴定谱包括 52 种细菌 (包括弧菌属的 6 种细菌), 鉴定准确率为 92.53%。无论 API 20E 还是 API 20NE, 每种鉴定卡上的生化反应只有 20 种左

右, 对种类繁多的细菌而言缺乏针对性, 存在一定比例的错误鉴定率, 对于研究较少的海洋细菌更不易得到准确的鉴定结果。如果待鉴定菌不在 API 20NE 和 API 20E 的鉴定谱内, 其结果只能作为一个参考。最新的 16S rDNA 系统发育学分析技术的通过比较细菌核糖体 RNA 基因片段的同源性实现对细菌的分类学鉴定, 理论上具有很好的可靠性, 但是截止到 1996 年只有 3500 余种细菌的完整的 16S rDNA 序列被测定^[21], 给鉴定结果的准确性带来很大的影响, 如果没有生化鉴定结果作为佐证, 可能无法得出准确的结论。因此在进行生物物种鉴定时应采用多种方法取长补短, 相互补充, 才能保证鉴定结果的客观性和科学性。

致谢 本文 API 20E 和 API 20NE 自动鉴定工作得到青岛出入境检验检疫局雷质文的热心帮助, 特此致谢!

参 考 文 献

- [1] 马爱军, 雷霖霖, 陈四清, 等. 大菱鲆营养需求与饲料研究进展. 海洋与湖沼, 2003, 34(7): 450-459.
- [2] 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. 高技术通讯, 2004, 4: 89-93.
- [3] 杜家垠. 海水养殖鱼类盾纤虫病. 福建水产, 2001, 2: 65-68.
- [4] 史成银, 王印庚, 黄 捷, 等. 大菱鲆病毒性疾病研究进展. 2003, 高技术通讯, 9: 99-105.
- [5] Novoa B, Nunez S, Fernandez C, et al. Epizootic study in a turbot farm: bacteriology, virology, parasitology and histology. *Aquaculture*, 1992, 107: 253-258.
- [6] Home M T, Richaards R H, Roberts R J, et al. Peracute vibriosis in juvenile Turbot *Scophthalmus maximus*. *J Fish Biol*, 1977, 11: 355-361.
- [7] Gatesope F J, Lambert C, Nicolas J L. Pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *J Appl Microbiol*, 1999, 87(5): 757-763.
- [8] Villamil L, Figueras A, Toranzo A E, et al. Isolation of a highly pathogenic *Vibrio pelagius* strain associated with mass mortalities of turbot, *Scophthalmus maximus*, larvae. *J Fish Dis*, 2003, 26(5): 293-303.
- [9] 姚志刚, 丁天宝. 大菱鲆育苗期的细菌病研究. 海洋科学, 2004, 28(9): 10-12.
- [10] Gatesoupe F J. Experimental infection of turbot, *Scophthalmus maximus*, larvae with a strain of *Aeromonas hydrophila*. *J Fish Dis*, 1991, 14: 495-498.
- [11] Baya A M, Romalde J L, Green D E, et al. Edwardsiellosis in wild striped bass from the Chesapeake Bay. *J Wildl Dis*, 1997, 33(3): 517-525.
- [12] Romalde J L, Magarinos B, Villar C, et al. Genetic analysis of turbot pathogenic *Streptococcus parauberis* strains by ribotyping and random amplified polymorphic DNA. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, 179(2): 297-304.

- [13] Oliver J D. Taxonomic scheme for the identification of marine bacteria. *Deep-Sea Res*, 1982, **29**: 794 - 795.
- [14] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, 353 - 398.
- [15] Devesa S, Barja J L, Toranzo A E. Ulcerative skin and fin lesions in reared turbot, *Scophthalmus maximus*. *J Fish Dis*, 1989, **12**: 323 - 333.
- [16] 覃映雪, 池信才, 苏永全, 等. 网箱养殖青石斑鱼的溃疡病病原. 水产学报, 2004, **28**(3): 297 - 302.
- [17] 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. 中国水产科学, 2004, **11**(7): 313 - 317.
- [18] 王国良, 金珊, 薛良义, 等. 海水网箱养殖鲈鱼皮肤溃疡病及其病原菌的研究. 黄渤海海洋, 2000, **18**(3): 85 - 89.
- [19] Glazebrook J S, Campbell R S F. Diseases of barramundi (*Lates calcarifer*) in Australia. In: Copland JW, et al. ed. Management of Wild and Cultured Sea Bass/barramundi (*Lates calcarifer*). Canberra: ACIAR, 1987, 204 - 206.
- [20] 毛之娟, 刘国勇, 陈昌福. 大黄鱼溃疡病致病菌的初步分离与鉴定. 安徽农业大学学报, 2002, **29**(2): 178 - 181.
- [21] Sallen B, Rajoharison A, Desvarenne S. Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of listeria species. *Jut J Sys Bacterilo*, 1996, **46**(3): 669 - 674.

Identification and phylogenetic study of pathogenic bacteria causing ulcer disease of cultured Turbot (*Scophthalmus maximus*)

FAN Wen-hui^{1,2} HUANG Jie^{1*} WANG Xiu-hua¹ SHI Cheng-yin¹ LIU Li¹

(¹ Key Laboratory of Sustainable Utilization of Marine Fishery Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Qingdao 266071, China)

(² Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: An outbreak of ulcer disease of the cultured turbot *Scophthalmus maximus* L. occurred in an indoor farm in Haiyang, Shandong Province in the sweltering August of 2004 and caused significant mortality. At the beginning, infected turbot displayed sluggish swimming and anorexia. Several days later, the turbot eyes swelled, the fins and tail turned red, and the back gradually ulcerated. Dissection of the moribund fish showed that the ulcerative gills paled, the liver became bloodshot, the kidney and gallbladder swelled, the intestinal wall became filmy and bloodshot. The time course from appearance of disease signs to death lasted about a week. A dominant strain of bacteria, which was Gram-negative and short rod with single polar flagellum under electron microscope, was isolated from the diseased turbot and designated as H1. In artificial infection test, all fish of the experimental groups died in a week after intramuscularly injected with bacterial suspension, while the control group showed no signs in 10 d post-challenge. The moribund experimental fish had similar gross signs as the natural infected fish. The bacteria re-isolated from the challenged fish also had the same characteristics as H1, which proved that the isolate H1 was the pathogenic bacteria that triggered this ulcer disease. Different methods were used to identify the pathogenic bacteria. The identification result by API 20NE and API 20E system indicated that H1 was *Aeromonas hydrophila*, with 99% reliability and 61.5% respectively. While traditional biochemical identification revealed that H1 exhibited relatedness to *Vibrio harveyi*. In order to confirm the different result, a 1424 bp sequence of H1's 16S rDNA was amplified and compared with other *Vibrio* spp. in GenBank, homology analysis and phylogenetic study showed that H1 has the highest similarity to *V. harveyi*, with 99% identity. According to morphological features, physiological and biological characteristics and 16S rDNA homology comparison of the bacteria, the pathogenic bacteria were *V. harveyi*. Drugs sensitivity test showed that the pathogenic bacteria were highly sensitive to nitrofurantoinum and ceftriaxone sodium etc. This is the first report that *V. harveyi* was found as the pathogenic bacteria of cultured turbot in China. The research suggests that *V. harveyi* should be regarded as an important pathogen of turbot and can cause ulcer disease under conditions of high temperatures. Therefore, it is necessary to prevent against ulcer disease in culture turbot in summer.

Key words: *Vibrio harveyi*, Turbot (*Scophthalmus maximus*), Ulcer disease, Pathogeny, 16S rDNA

Foundation item: Yellow Sea Fisheries Research Institute Chinese Academy of Fishery Sciences Maricultural Organism Disease Control and Molecular Pathology Laboratory Grant

* Corresponding author. Tel: 86-532-5823062; Fax: 86-532-5811514; E-mail: Huangjie@ysfri.ac.cn

Received date: 01-30-2005