

## 鲢鱼弧菌病病原菌(哈维氏弧菌)的分离与鉴定

张凤萍, 彭志兰, 张健, 柳敏海, 傅荣兵, 罗海忠\*

(浙江省舟山市水产研究所, 舟山 316000)

**摘要:**【目的】2009年春季,浙江省舟山地区养殖鲢鱼暴发弧菌病。症状主要表现为体表病灶部位出血、肌肉溃烂、内脏器官有白斑等。【方法】从病鱼体表溃疡部位及内脏分离出优势菌株 090212,经人工感染证实该菌即为致病菌。通过 API 系统和菌体常规形态特征、培养特性和生理生化反应指标测定以及 16S rRNA 测序分析等综合鉴定,【结果】确认 090212 为哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*),该菌为革兰氏阴性,菌体呈短杆状,极生单鞭毛。该菌对氟苯尼考、四环素等 5 种抗生素敏感。【结论】哈维氏弧菌是海水养殖鱼类的常见致病菌,但作为养殖鲢鱼的病原菌尚属首次报道,将对鲢鱼的病害防治和健康养殖具有重要的指导意义。

**关键词:** 鲢鱼;哈维氏弧菌;病原菌;16S rDNA

**中图分类号:** Q939      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 03-0304-06

鲢鱼(*Müchthys müuy*)属硬骨鱼纲(*Osteichthyes*)、鲈形目(*Perciformes*)、石首鱼科(*Sciaenidae*)、鲢鱼属(*Müchthys*),俗称米鱼、敏鱼、黑鮰,在我国沿海均有分布,以东海的舟山群岛产量最大<sup>[1]</sup>。鲢鱼属于暖温性底层经济鱼类,具有生长快、抗逆性强、肉鲜味美、营养丰富等优点,备受国内外消费者青睐,其鳔的干制品俗称“鱼肚”,为高级滋补品,具有较高的食用和药用价值,市场前景广阔。近年来,鲢鱼人工繁殖与养殖在我国南方沿海发展很快。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,且有愈演愈烈之势。其中细菌性疾病是鲢鱼养殖中危害最为严重的一种疾病,已成为鲢鱼养殖产业化发展的主要瓶颈。发病个体的主要症状包括:厌食、游动迟缓、尾柄和胸鳍基部呈出血性溃疡、内脏器官有白斑(图 1)。目前,有关鲢鱼的研究报道主要集中在早期发育、生物学特性、人工育苗、养殖技术、生理、生态、代谢、人工调控繁殖季节和环境

毒理等方面<sup>[2–7]</sup>,关于鲢鱼病害方面的研究,国内外尚未见报道。

本文首次从患病的鲢鱼尾柄溃疡部位及内脏分离出一株优势菌,经回接感染证实了该菌株是引起此次病害的病原菌。并根据细菌的电子显微形态特征、生理生化反应、API 32E 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分类鉴定,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:**患病鲢鱼于 2009 年 2 月 12 日取自浙江省舟山市朱家尖养殖基地的 3 龄亲鱼,体重 1.5–2.5 kg,体长 35–60 cm;人工感染用健康鲢鱼平均体重 1.5 kg,平均体长 32 cm,购自浙江省舟山市台门金马养殖场。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**TSB(胰蛋白胨大豆肉汤)

**基金项目:**国家级星火计划(2008GA700005);浙江省重大科技专项重点项目(2008C12082);浙江省海洋与渔业局水产种子种苗(200813215)

\* 通信作者。Tel: +86-580-2023823; E-mail: haizhongluo@163.com

**作者简介:**张凤萍(1980–),女,研究方向:水产动物病害防治。E-mail: zhangfp-123@163.com

**收稿日期:**2009-09-14; **修回日期:**2009-12-09

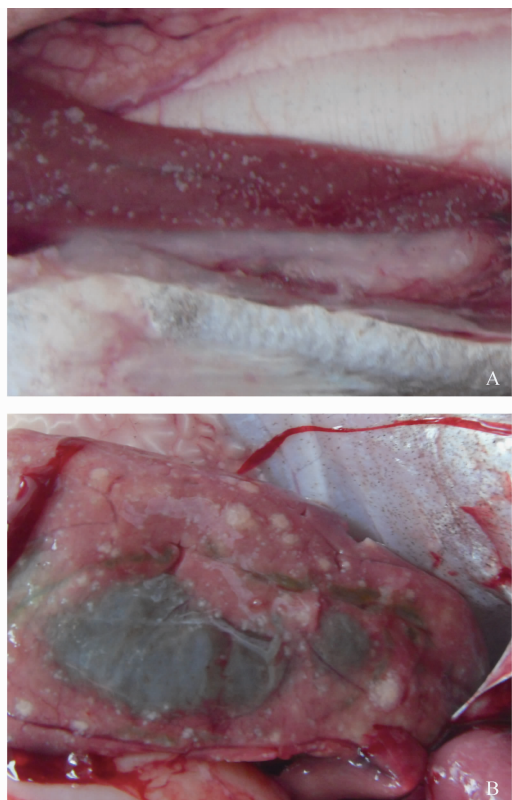


图1 患病鲢鱼(A)和人工感染发病的鱼(B)

Fig.1 The diseased *Mùchthys miiuy* (A) and the diseased *Mùchthys miiuy* of artificial infection (B).

培养基和 TCBS 培养基购自北京陆桥生物技术有限公司;法国 API 32E 细菌鉴定系统试剂条购自生物梅里埃中国有限公司;药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司;细菌 16S rDNA 设计通用扩增引物和 PCR 所用 Buffer、dNTP、*Taq* 酶等均购自上海生工生物工程技术有限公司。

## 1.2 病原菌的分离

取患病典型的濒死鲢鱼,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、心脏等组织小块于洁净的平皿中,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℃ 下恒温倒置培养 24 h,挑取形态特征一致的优势菌落进行分离纯化,将纯化后的优势菌接种至 TSB 和 TCBS 培养基上 28℃ 培养 24 h,观察菌落颜色及特征。同时将纯化后的菌株置于 15% 甘油中,并保存于 -80℃ 超低温冰箱中备用<sup>[8]</sup>。

## 1.3 人工感染试验

将细菌的 24 h 培养物用 1.5% 无菌生理盐水制成菌悬液,用比浊仪(意大利产品)测定结合平板计数法调整浓度为  $1.0 \times 10^9$  CFU/mL,10 倍系列稀释后备用。实验分为 5 组(4 个实验组,1 个对照组),每组 10 尾,暂养于有效水体为 120 cm × 100 cm ×

80 cm 的养殖池,实验水温为  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ,每天换水 1 次,投饵 2 次,连续充气暂养,暂养 1 周无异常后开始实验。实验组分别肌肉注射 0.1 mL 10 倍梯度稀释的菌悬液;对照组肌肉注射同等剂量的无菌生理盐水。观察鲢鱼发病症状并记录情况,第 14 天结束试验。取濒死鲢鱼的病灶、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 ( $1 \times 10^9$  CFU/mL)均匀涂布于 TSB 培养基平板,用无菌镊子将药敏纸片轻轻贴在平板表面,28℃ 恒温培养 24 h 后测定抑菌圈直径。

## 1.5 菌株鉴定

**1.5.1 形态学观察:**将细菌菌株纯化培养后,进行革兰氏染色和负染,分别使用光镜和电镜观察细菌的个体形态、大小和鞭毛着生方式。

**1.5.2 生理生化特征的测定:**利用 API 32E 自动鉴定系统,按照 ID 32E 试剂条说明书操作,并用细菌微量鉴定管进行生理生化反应以补充鉴定。

**1.5.3 细菌的 16S rDNA 序列测定和分析:**(1)模板的制备:用无菌牙签挑纯化的单一菌落悬浮于 50 μL 无菌去离子水中,100℃ 水浴 5 min,4℃  $14007 \times g$  离心 10 min,取上清作为 PCR 反应所用模板。(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 bp 位置);反向引物 1492R:5'-TACGG (C/T) TACCTT GTTA-CGACTT-3' (对应于 *E. coli* 16S rDNA 序列的第 1492 - 1510 bp 位置)。PCR 反应采用 50 μL 反应体系,反应条件:94℃ 5 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min40 s,30 个循环;72℃ 10 min。PCR 产物由上海生工纯化和测序。(3)系统发育学分析:将菌株的 16S rDNA 序列与 NCBI 的 GenBank 中的核酸序列进行 BLAST 分析,选取与菌株 090212 相似性最高的细菌 16S rDNA 序列,将相关序列用 MEGA 进行比对,并构建系统发育树,用 Bootstrap 分析评估树的稳定性。

同时对标准菌株溶藻弧菌、灿烂弧菌、哈维氏弧菌、副溶血弧菌进行形态学观察、生理生化特征的测定,以做对照。

## 2 结果

### 2.1 病原菌的分离

从患病鲢鱼的溃烂肌肉、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:菌落为圆形,直径 1.5 – 2 mm,中心略隆起,表面光滑、湿润,边缘整齐,半透明。TCBS 培养基上均呈黄色,圆形,边缘整齐,直径 1 – 1.5 mm。且对该 4 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 090212)作为代表,进行后续实验。

### 2.2 人工感染实验结果

人工感染后的鲢鱼病症与自然发病的病症相似,高浓度感染组( $1 \times 10^9$  和  $1 \times 10^8$  组)试验鲢鱼的死亡均发生在注射后的第 2 天,死亡率分别为 70% 和 50%,且在实验的第 8 天全部死亡;低浓度感染组( $1 \times 10^7$  和  $1 \times 10^6$  组)鲢鱼均在第 4 天时开始死亡,死亡率分别为 30% 和 10%,第 14 天时的最终死亡率分别升至 80% 和 50%。在整个试验过程中,对照组鲢鱼没有死亡。按 1.2 所述方法取人工感染后发病死亡的鲢鱼的溃疡肌肉、肝、脾和肾划线于 TSB 培养基平板,分离得到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 090212 菌相同,再次感染鲢鱼后仍能出现与自然发病情况下相同的症状。该结果表明 090212 菌即为鲢鱼弧菌病的病原。

### 2.3 药敏试验结果

表 1 为药敏试验结果。在所试的 28 种药物中,以氟苯尼考、四环素、复达新、先锋霉素 IV 和复方新诺明 5 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菌株 090212 引起的鲢鱼的弧菌病。

### 2.4 病原菌的鉴定分析

**2.4.1 形态特征:**菌株 090212 革兰氏染色呈阴性(图 2-A),水浸片观察和半固体穿刺培养显示其具有一定运动能力,与标准菌株哈氏弧菌相似。透射电镜下,该菌呈短杆状,两端钝圆,菌体大小为  $(0.5 - 0.8) \mu\text{m} \times (1.4 - 1.6) \mu\text{m}$ ,具有一根极生单鞭毛,长约  $3.0 - 3.5 \mu\text{m}$ (图 2-B)。

**2.4.2 生理生化特征:**菌株 090212 为葡萄糖发酵型,对特异的弧菌抑制剂 O/129 敏感,氧化酶和过氧化氢酶均呈阳性,还原硝酸盐、产生吡啶、鸟氨酸脱羧酶及赖氨酸脱羧酶; $\text{H}_2\text{S}$ 、V-P 反应、半乳糖酸盐、脲酶、精氨酸双水解酶、肌醇、侧金盏花醇、鼠李糖均为阴性;生长需要钠盐, $4^\circ\text{C}$  以下和  $40^\circ\text{C}$  以上不能生长。参照文献[9]和[10]进行了 55 项生理生化指标测定,结果显示其与哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)的生理生化特征相似,初步确认 090212 菌

表 1 药敏试验结果

Table 1 Drugs sensitivity test			
Chemical	Content /( $\mu\text{g}/\text{disc}$ )	Diameter/mm	Sensitivity
Florfenicol	30	22	S
Tetracycline	30	20	S
Erythromycin	15	10	R
Ceftazidime	30	19	S
Neomycin	30	10	R
Cefalexin	30	19	S
Amikacin	30	10	R
Sulfamethoxazole	23, 75/1, 25	17	S
Cefuroxime	30	9	R
Minocycline	30	21	M
Midecamycin	30	0	R
Doxycycline	30	20	M
Norfloxacin	10	0	R
Cefobine	75	20	M
Oxacillin	1	0	R
Ceftriaxone	30	18	M
Cefradine	30	0	R
Piperacillin	100	14	R
Ciprofloxacin	5	0	R
Furazolidone	300	13	R
Vancomycin	30	0	R
Gentamicin	10	11	R
Penicillin	10IU	0	R
Kanamycin	30	10	R
Clindamycin	2	0	R
Cefamezin	30	10	R
Polymyxin B	300IU	0	R
Ofloxacin	5	10	R

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

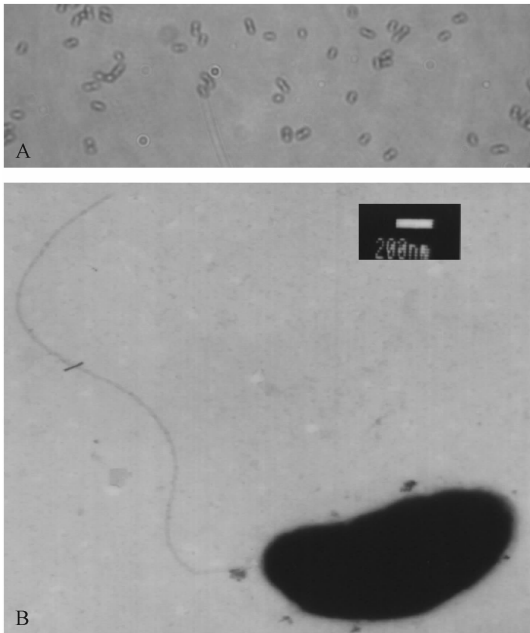


图 2 090212 革兰氏染色图片 (A,1000 × ) 和电镜负染图片 (B,标尺 =200 nm)

Fig.2 Microphotograph after Gram-staining (A, 1000 × ) and Electron microscope photograph (B, bar = 200 nm) of bacterium 090212.

株为哈氏弧菌。090212 菌的生理生化鉴定结果见表 2。

表 2 菌株 090212 与哈维氏弧菌标准菌株的形态及生理生化特征比较

Table 2 Morphological, physiological and biochemical characteristics of 090212 compared with *Vibrio harveyi* ATCC 33842

Items	090212	<i>V. harveyi</i>
Gram stain	—	—
Flagella	m	m
Irradiance	—	d
Growth on TCBS	+	+
Sensitivity to O/129(10 μg)	+	+
Sensitivity to O/129(150 μg)	+	+
Growth at 4℃	—	—
28℃	+	+
35℃	+	+
40℃	—	d
Growth: NaCl 0	—	—
NaCl 3%	+	+
NaCl 6%	+	+
NaCl 8%	+	+
NaCl 10%	+	+
O/F test	F	F
Oxidase	+	+
Catalase	+	+
H <sub>2</sub> S	—	—
V-P	—	—
Nitrate reduction	+	+
Lipase *	+	+
D-Maltose *	+	+
D-Glucose *	+	+
Sucrose *	+	d
D-Galacturonate *	—	—
β-N-Acetyl-Glucoaminidase *	—	—
L-Aspartic acid Arylamidase *	—	—
Arginine dihydrolase *	—	—
Urease *	—	—
Inositol *	—	—
α-maltose *	+	+
D-Cellobiose *	+	+
β-Galactosidase *	+	+
D-Trehalose *	+	+
α-Glucosidase *	—	—
L-Arabinose *	—	d
Ornithine decarboxylase *	+	+
Indole production *	+	+
D-Mannitol *	+	+
Phenol Red *	+	+
5-KetoGluconate *	—	—
L-Arabitol *	—	—
Lysine decarboxylase *	+	+
β-Glucosidase *	+	+
Malonate *	—	—
D-sorbitol *	+	+
β-Glucuronidase *	—	—
Adonitol *	—	—
L-Rhamnose *	—	—
α-Galactosidase *	+	+
D-Arabitol *	—	—
D-Arabinose *	—	—

Note: “ + ”-positive; “ - ”-negative; “ m ”-monotrichous; “ F ”-fermentation; “ \* ”-partial items of ID32E; “ d ”-sometimes negative sometimes positive.

2.4.3 16S rDNA 序列系统发育分析:为了进一步明确菌株 090212 的分类地位,测定了其 16S rDNA 部分序列,序列长度为 1458 bp,在 GenBank 中的注册号为 GU262992。通过国际互联网 NCBI,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,95% 为弧菌属细菌,其余的为不可培养的细菌。图 3 是根据菌株 090212 的 16S rDNA 序列与相关属种 16S rDNA 序列构建的系统发育树。以 *Vibrio parahaemolyticus* 作为外群种,其中 090212 与 *Vibrio harveyi* (DQ995520) 和 *Vibrio harveyi* (EU090704) 亲缘关系最近,序列同源性为 99%,可将其鉴定为哈维氏弧菌。

3 讨论

目前,有关鳎鱼的研究报道主要集中在早期发育、生物学特性、人工育苗、养殖技术、生理、生态、代谢、人工调控繁殖季节和环境毒理等方面,关于鳎鱼疾病学方面的研究在国内外尚属空白,笔者通过对养殖鳎鱼细菌性流行病的调查发现,弧菌病是鳎鱼养殖中危害极大的病症,可危及鱼苗和成鱼。本文从病鱼体表病灶及内脏分离出一株优势菌 090212,并对其进行了综合鉴定。由分离株 090212 的光镜和电镜下的形态学观察、API 系统 ATB 仪试剂条、细菌学常规生理生化特征鉴定及 16S rDNA 基因测序分析,确定 090212 菌株为弧菌属的哈维氏弧菌。

近年研究表明,哈维氏弧菌已成为我国海水鱼类弧菌病的重要病原菌,王国良等<sup>[11]</sup>报道从养殖患病大黄鱼病灶组织上分离到 1 株哈维氏弧菌;也有文献报道,哈维氏弧菌能引起海水养殖青石斑鱼 (*Epinephlus awoara*)、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)、鲈鱼 (*Lateolabrax japonicus*)、尖吻鲈 (*Lates calcarifer*) 等鱼类不同程度的体表溃疡病<sup>[12-15]</sup>。而哈维氏弧菌引发养殖鳎鱼发病在国内外尚属首次报道。

鳎鱼属于暖温性底层经济鱼类,具有抗病力强的特点,然而,随着养殖规模的扩大,鳎鱼疾病频繁暴发,危害逐渐加重,严重制约着鳎鱼养殖业的发展。而本项研究揭示了哈维氏弧菌是目前舟山地区鳎鱼发病的主要原因,目前舟山地区已多次发生类似病害,但该病害的致病原是否存在地域性和多样性尚待进一步调查研究。笔者认为,哈维氏弧菌的致病性与鳎鱼的生理状态及养殖环境的理化条件密切相关,首先,在养殖条件下,养殖环境较自然环境

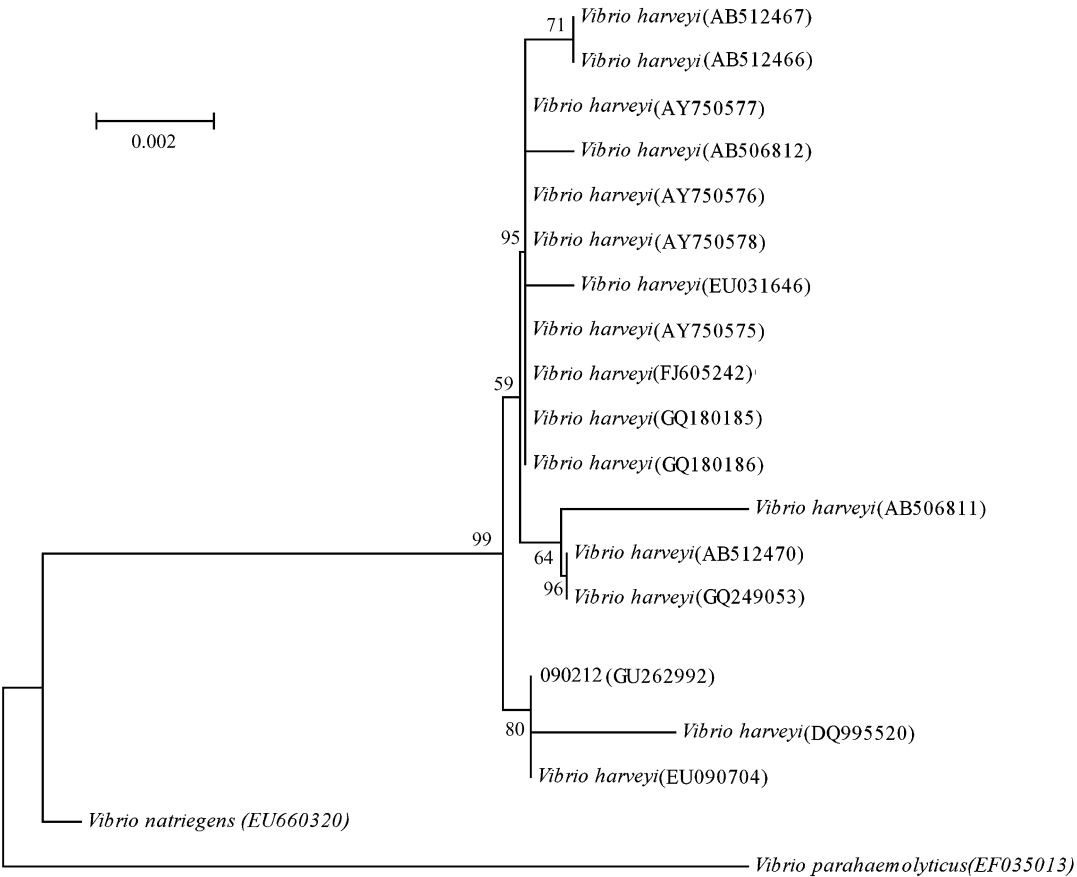


图3 16S rDNA 基因序列分析聚类结果

Fig.3 Clustering results of 16S rDNA gene sequence analysis. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar,0.2% sequence divergence.

差,如水浅、水交换量不足等;加之养殖密度过高,造成鲢鱼的抗病能力下降而容易发病;另外,在养殖过程中,由于饵料的投入、排泄物的积累造成养殖环境的恶化,为弧菌的大量繁殖提供了条件。因此,在鲢鱼养殖期间一定要切实确保水体水温在安全范围以内,同时加大换水量及频率、定期进行池底的底质改良、抑制有害菌的优势性增生是保证鲢鱼健康养殖的重要措施。鉴于此,今后还应该深入进行养殖鲢鱼病原检测方面的研究,以便为疾病早期诊断和防治提供科学指导依据。

参考文献

[ 1 ] 朱元鼎,张春霖,成庆泰,等. 东海鱼类志. 北京:科学出版社,1963: 308.

[ 2 ] 李明云,郑忠明,竺俊全,等. 鲢鱼亲鱼培育及其人工繁殖的研究. 水产科学 ( Fisheries Science ), 2005, 24 ( 1 ):32-34.

[ 3 ] 罗海忠,傅荣兵,陈波,等. 舟山近海鲢鱼胚胎和早期仔鱼的发生及与盐度的关系. 浙江海洋学院学报 ( Journal of Zhejiang Ocean University ), 2006,25 ( 1 ):

15-22.

[ 4 ] 罗海忠,陈波,傅荣兵,等. 鲢鱼性腺发育人为调控技术研究. 海洋渔业 ( Marine Fisheries ), 2007, 29 ( 2 ): 128-133.

[ 5 ] 柳敏海,罗海忠,陈波,等. 鲢鱼鳃丝 Na-K-ATPase 性质的初步研究. 浙江海洋学院学报 ( Journal of Zhejiang Ocean University ), 2007,26 ( 1 ):12-16.

[ 6 ] 柳敏海,陈波,施兆鸿,等. 五种重金属对早繁鲢鱼胚胎和仔鱼的毒性效应. 海洋渔业 ( Marine Fisheries ), 2007,29 ( 1 ):57-62.

[ 7 ] 柳敏海,罗海忠,陈波,等. 铜、镉对鲢鱼幼鱼鳃丝 Na-K-ATPase 和肝脏 SOD 酶活性的影响. 安全与环境学报 ( Journal of Safety and Environment ), 2007,7 ( 4 ):5-8.

[ 8 ] 范文辉,黄捷,王秀华,等. 大菱鲆溃疡症病原菌的分离鉴定及系统发育分析. 微生物学报 ( Acta Microbiologica Sinica ), 2005,45 ( 5 ):665-670.

[ 9 ] Williams & Wilkins. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9<sup>th</sup> eds. Maryland: Science Press, 1994: 110-111.

[ 10 ] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京:科学出版社,2001:111-113.

- [11] 王国良, 祝璟琳, 金珊. 养殖大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 3 种致病弧菌的分子鉴定及其系统发育学分析. 海洋与湖沼 (*Oceanologia Et Limnologia Sinica*), 2008, 39(2): 162-167.
- [12] 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 (*Journal of Fisheries of China*), 2004, 28(3): 297-302.
- [13] 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 (*Journal of Fishery Sciences of China*), 2004, 11(7): 313-317.
- [14] 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 (*Journal of Oceanography of Huanghai & Bohai Seas*), 2000, 18(3): 85-89.
- [15] Glazebrook JS, Campbell RSF. Diseases of barramundi (*Lates calcarifer*) in Australia // Copland JW, et al. ed. Management of Wild and Cultured Sea Bass/barramundi (*Lates calcarifer*). Canberra: ACIAR, 1987: 204-206.

## Isolation and identification of the pathogenic strain of *Vibrio harveyi* from *Miichthys miiuy*

Fengping Zhang, Zhilan Peng, Jian Zhang, Minhai Liu, Rongbing Fu, Haizhong Luo\*

(Fisheries Institute of Zhoushan, Zhoushan 316000, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] An outbreak of disease on the cultured *Miichthys miiuy* occurred in Zhoushan of Zhejiang province. The symptom displayed as skin ulceration and the inside apparatus turned white. [ **Methods** ] We isolated a dominant bacterial strain from the diseased *Miichthys* and assigned it as strain 090212. The artificial infection test proved that the isolate 090212 was the pathogenic bacterium that caused the disease. We applied physiological and biochemical characterization and API system in the bacterial classification. In order to confirm the result, we amplified a 1458bp sequence of 090212's 16S rDNA and compared with other *Vibrio* in GenBank. [ **Results** ] The results turned out that 090212 was Gram negative and short rod with single polar flagellum. Homology analysis and phylogenetic study showed that strain 090212 had the highest similarity to *Vibrio harveyi*, with 99% identity. The sensitivity test of strain 090212 to 28 kinds of antibiotics revealed that the pathogen was sensitive to drugs such as Florfenicol and Tetracycline. [ **Conclusion** ] This paper revealed for the first time that the causative pathogen, *Vibrio harveyi*, lead to the mass mortality of *Miichthys*, which will be helpful in the disease control and health management during *Miichthys* cultivation.

**Keywords:** *Miichthys*; *Vibrio harveyi*; Pathogen; 16S rDNA

(本文责编:王晋芳)