

# 七带石斑鱼繁殖群体“突眼”症病原菌的分离与鉴定\*

陈超<sup>\*1</sup> 程波<sup>2</sup> 于宏<sup>1</sup> 王印庚<sup>1</sup> 杨志<sup>3</sup> 史成银<sup>1</sup>

曲江波<sup>3</sup> 赵丛明<sup>4</sup> 徐静荣<sup>3</sup> 姜卓<sup>5</sup>

(<sup>1</sup>中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(<sup>2</sup>新疆农业大学动物科学学院, 乌鲁木齐 830052)

(<sup>3</sup>烟台技术开发区天源水产有限公司 烟台 265600)

(<sup>4</sup>天津立达海水资源开发有限公司 天津 300381)

(<sup>5</sup>大连水产学院生命科学与技术学院, 大连 116023)

**摘要** 2007-2008 年间, 我们对爆发“突眼”症的七带石斑鱼繁育群体, 从细菌学、寄生虫学、病毒学等方面进行了全面的筛查和实验研究。从具有明显“突眼”症的七带石斑鱼病灶组织中分离出 1 株致病力极强的优势菌 CB1008, 经人工感染试验证实为此次七带石斑鱼“突眼”症的致病菌。该菌革兰氏染色呈阴性, 电镜下观察菌体呈短杆状, 极生单鞭毛。通过 API-32E 鉴定系统和菌体常规形态特征、培养特性、生理生化反应指标测定以及 16S rDNA 测序分析等综合鉴定, 菌株 CB1008 为弧菌属哈维氏弧菌 *Vibrio harveyi*。药敏试验结果表明, 该菌株对氯霉素、萘啶酸、四环素、氟哌酸、氟罗沙星等 5 种药物较为敏感。哈维氏弧菌是水产养殖病害常见病原菌, 作为七带石斑鱼的病原菌在国内属首次报道, 本文旨在为该鱼类的健康养殖和疾病防治提供理论依据和参考。

**关键词** 七带石斑鱼 “突眼”症 病原菌 哈维氏弧菌

## Isolation and identification of a pathogenic bacterium from *Epinephelus septemfasciatus* with exophthalmic disease

CHENG Bo<sup>2</sup> CHEN Chao<sup>1</sup> Yu Hong<sup>1</sup> WANG Yin-gen<sup>1</sup> YANG Zhi<sup>3</sup>

SHI Cheng-yin<sup>1</sup> QU Jiang-bo<sup>3</sup> ZHAO Cong-ming<sup>4</sup> XU Jing-rong<sup>3</sup> JIANG Zhuo<sup>5</sup>

(<sup>1</sup> Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(<sup>2</sup> College of Animal Science, Agricultural University of Xinjiang, Urumqi 830052)

(<sup>3</sup> Yantai Tianyuan Fisheries Corporation, 265600)

(<sup>4</sup> Lida Seawater Resources Development Corporation, Tianjin 300381)

(<sup>5</sup> College of Science and Technology of Life, Dalian Fisheries University, 116023)

**ABSTRACT** A pathogenic bacterial strain CB1008 was isolated from the eyes and

\*本研究受国家“863”项目(2006AA10A414-3)和农业部“948”项目(2008-Z8)资助。

\*通讯作者: 陈超, 男, 汉族, 副研究员, 1959.7 从事海水鱼类繁育与养殖技术研究。 [ysfrichenchao@126.com](mailto:ysfrichenchao@126.com) .

作者简介: 程波, 男, 汉族, 1982.4 在读硕士研究生, 从事水产动物疾病防治。 [chengbo0417@163.com](mailto:chengbo0417@163.com)

internal organs of seven-band grouper *Epinephelus septemfasciatus*. It was proved to be the pathogen of the diseased seven-band grouper by artificial infection test. Morphological observations showed that it was a short-rod and Gram-negative bacterium with single polar flagella. According to API-32E system, through traditional physiological and biochemical experiments and 16S rDNA gene homology comparison of the bacterium, the results showed that the reisolated strain CB1008 was *Vibrio harveyi*. The test of sensitivity of strain CB1008 to 36 kinds of antibiotics revealed that the pathogen was sensitive to Chloramphenicol, Nalidixan, Tetracycline, Norfloxacin, and Fleroxacin. *V. harveyi* is a kind of pathogenic bacterium commonly found in cultured marine finfish, but this is the first time that *V. harveyi* is reported as the pathogenic bacterium of seven-band grouper in China.

**KEY WORDS**      *Epinephelus septemfasciatus*      Exophthalmic disease  
Pathogenic bacteria      *Vibrio harveyi*

七带石斑鱼 *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg 隶属于鲈形目 Perciformes、鲷科 Serranidae、石斑鱼属 *Epinephelus*，是该属中大型的石斑鱼类。其肉质细嫩、味道鲜美，深受消费者的喜爱。日本和韩国消费需求旺盛，是一种极具市场潜力的高档名贵海水鱼类品种。2007 年初，中国水产科学研究院黄海水产研究所在烟台开发区天源水产有限公司培育的一批七带石斑鱼繁育群体，出现眼睛异常增生，眼球突出等现象。部分种鱼透过角膜可见眼球内积液，最终导致角膜白浊、失明，病鱼游动失去平衡、不能正常摄食而死亡。发病时间于 2007 年 8 月开始，水温 20~26℃，盐度 25~31、溶氧 6.2~6.6 mg/L、pH 值 7.6~8.0。为了找出诱发七带石斑鱼“突眼”症的原因，课题组对其“突眼”症进行细菌学、寄生虫学、生态学、病毒学等多项排除方法的研究，旨在为其健康养殖和疾病防控提供理论依据和参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 患病石斑鱼

选取七带石斑鱼繁殖群体中患有典型“突眼”症状的个体，取自课题组暂养在烟台天源水产养殖有限公司。鱼龄 3~4 龄，体重为 3.5~5.1Kg，体长 60.0~69.5cm，共 4 尾。

#### 1.1.2 健康石斑鱼

实验用健康石斑鱼幼鱼取自烟台天源水产养殖有限公司，体重 3.5~5.2g，体长 5.3~6.2cm，共计 150 尾幼鱼。

## 1.2 细菌的分离与纯化

在无菌条件下，取眼睛、脾脏、肝脏、肾脏、肠等组织，用接种环挑取少量组织剪碎后，在灭菌的 TCBS 培养基上划线分离，28℃ 恒温培养 24h。挑取形态特征一致的优势单菌落于 TSB 固体培养基上重复培养 3 次，将获得纯化的菌株保种于 20%甘油盐溶液中，于-80℃ 超低温冰箱保存备用。

## 1.3 电镜观察

用无菌去离子水离心洗涤菌体两次，悬浮，取一滴于铜网上，磷钨酸负染，晾干，透射电镜观察菌株的个体形态、大小、鞭毛等。

对眼睛、脾脏、肝脏、肾脏、肠等组织样品标本，采用透射电镜和扫描电镜相结合的方式检查是否含有病毒颗粒。

## 1.4 人工感染试验

将分离出的致病菌株在 TSB 固体培养基上 28℃ 恒温培养 24h 后，用 1.5% 的无菌生理盐水将细菌从平板上洗下，采用麦氏比浊法和平板稀释计数法制得浓度为  $3.0 \times 10^8$  CFU/mL 的菌悬液，10 倍系列梯度稀释后备用。实验分为两个大组 A、B（A 组采用肌肉注射，B 组采用腹腔注射）和一个小组 C，每个大组有 7 个小组（6 个实验组，1 个对照组），每个小组 10 尾石斑鱼幼鱼。用有效水体为 50cm×30cm×30cm 塑料水箱，实验水温为  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ，日换水量约 2/3，连续充气暂养。7d 后开始试验，实验组分别为肌肉或腹腔注射 0.1mL 10 倍梯度稀释后的菌悬液；对照组肌肉或腹腔注射同等剂量无菌生理盐水。观察石斑鱼发病症状并记录死亡情况，取濒死石斑鱼的病灶眼睛、肝脏、肠、脾脏等组织进行细菌的再次分离，方法同 1.2。用再次分离的优势菌株制成高浓度的菌悬液  $3.0 \times 10^8$  CFU/mL 直接肌肉注射 C 组，最后将第二次分离的优势菌株与原菌株一起做细菌鉴定。

采用文献邹玉霞（2004）等的方法计算出石斑鱼的半致死浓度： $\lg LD_{50} = X_k - d(\sum P_i - 0.5)$ ，其中  $X_k$  为最大对数剂量， $d$  为相邻两组对数剂量之差数， $P_i$  为死亡率， $i$  为组号。

## 1.5 API-32E 生理生化鉴定

采用法国梅里埃（BioMérieux）公司的 API-32E 鉴定系统对纯化菌株进行生理生化指标的测试，并补充其它一些相关的生理生化实验。将优势菌株接种于 TSB 培养基平板上，28℃ 培养 24h 后用 1.5% 无菌生理盐水洗下菌落，用 API/ATB 光电比浊仪配制 0.5mol/L McFarland 的菌悬液，吸取菌悬液 55μL/孔，为防止小孔内液体的干燥，在试剂条边缘滴加几滴无菌蒸馏水，置于 28℃ 恒温培养箱孵育 24h，用 API-32E 细菌自动鉴定仪自动读取或人工读取反应结果。

## 1.6 16S rDNA 序列测定和分析

### 1.6.1 PCR 模板 DNA 的制备

将菌株接种在 TSB 培养基平板上，28℃ 下恒温培养 24h，用灭菌牙签挑取单菌落悬浮于 50μL 无菌去离子水中，100℃ 金属浴 5 min，12000 r/min 离心 10min，上清液即为 PCR 反应所用模板 DNA。

## 1.6.2 PCR 扩增与测序

引物采用细菌 16S rDNA 序列扩增的通用引物，正向引物为 27f：5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'；反向引物为 1492r：5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'；PCR 反应体系（25 $\mu$ L）：2.5 $\mu$ L 10 $\times$  PCR 缓冲液（含 Mg<sup>2+</sup>），0.5 $\mu$ L 10mmol/L 4 $\times$ dNTP，各 0.5 $\mu$ L 10 $\mu$ mol/L 正、反向引物，0.2 $\mu$ L 5U/ $\mu$ L Taq DNA 聚合酶，1 $\mu$ L DNA 模板，20 $\mu$ L 灭菌超纯水。PCR 反应条件为：94 $^{\circ}$ C 预变性 5min；94 $^{\circ}$ C 变性 1min，55 $^{\circ}$ C 复性 1min，72 $^{\circ}$ C 延伸 1min，30 个循环；最后 72 $^{\circ}$ C 温育 6min。取 PCR 产物 5 $\mu$ L，经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测，紫外观察仪观察并拍照。PCR 产物经普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收与纯化后，送于天根生化科技（北京）有限公司测序，测序结果登陆 GenBank 进行 Blast 比对，构建系统进化树。

## 1.7 药物敏感试验

采用药敏纸片扩散法，药敏纸片为杭州天和微生物试剂有限公司生产。将菌株接种于 TSB 培养基上，28 $^{\circ}$ C 恒温培养 24h 后，用接种针挑取单菌落于 1.5% 的无菌生理盐水中，制成浓度为  $1.0 \times 10^9$  CFU/mL 的菌悬液，吸取 110 $\mu$ L 菌悬液均匀涂布于 TSB 培养基平板上。用无菌镊子将抗生素纸片轻轻贴在培养基表面，28 $^{\circ}$ C 恒温培养 24h 后，测定抑菌圈的直径。

## 2 结果与分析

经统计，七带石斑鱼“突眼”症发生率高达 75%。对其病灶部位的病毒检查、检测中未检出病毒颗粒；寄生虫学检查未发现任何寄生虫，组织切片未观察到寄生虫及其诱发原因；环境因子检查全部数据均符合七带石斑鱼生理生态条件，无明显刺激、诱发原因。患病鱼主要表现为单眼或双眼突出，严重的可达 2cm；厌食、腹部朝上漂浮于水面、旋转游动、反应迟钝；肝脏色泽变浅呈土黄色，脾脏暗红色、肠道萎缩；发病后期，病鱼消瘦；部分病鱼的背鳍、尾鳍轻微充血、红肿、溃烂，相关组织及其病灶部位的细菌检查均检出致病菌。

### 2.1 病原菌的形态特征

从患病七带石斑鱼的眼睛、脾脏、肾脏等组织分离出病原菌各一株，共计 5 株，在 TCBS 平板上的优势菌落均为黄色，挑取优势菌在 TSB 固体培养基上纯化培养，结果均生长良好。在 TCBS 平板上的菌落为黄色、圆形、中间略有隆起、边缘整齐、不透明；而在 TSB 固体培养基平板上菌落为灰白色、圆形、中间略有隆起、略有粘性、不透明，边缘光滑。且对该 5 株菌所测的生理生化特征相同，故判定为同一种细菌，将眼睛分离出的菌株记为 CB1008。菌株 CB1008 经革兰氏染色为阴性，电镜负染后观察，菌体呈短杆状、两端钝圆、极生单鞭毛、菌体大小为  $(0.7 \sim 1.0) \mu\text{m} \times (1.5 \sim 1.8) \mu\text{m}$ 、鞭毛长约  $4.2 \sim 5.0 \mu\text{m}$  (图 1)。

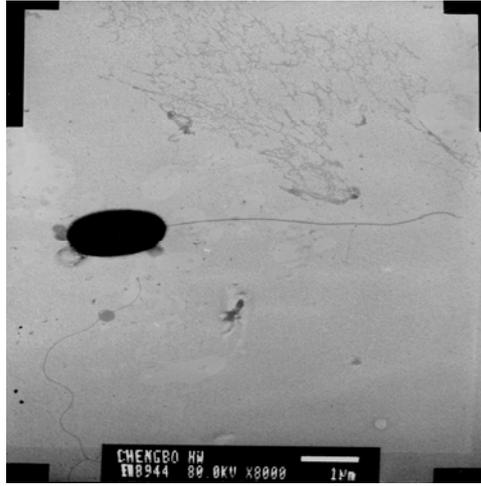


图 1 菌株 CB1008 的电镜负染图片 (bar= 1 $\mu$ m)

Fig.1 Electron microscope photograph of strain CB1008 (bar= 1 $\mu$ m)

## 2.2 人工感染试验结果

人工感染试验结果(表1),对石斑鱼幼鱼注射不同浓度的菌液后,初期表现为:石斑鱼幼鱼游泳能力减弱,摄食量减少或不进食,注射部位红肿发炎,注射处鳞片开始脱落。中期表现为:注射部位开始溃烂,眼变的略微白浊并且向外开始突出,后期表现为:外部症状越来越明显,病灶部位肌肉腐烂,眼球有明显的突出,最后死亡。显微镜下镜检发现病灶部位有大量运动的细菌,病鱼体表分泌的粘液增多,粘液中也有大量细菌的存在。肝脏颜色变浅呈土黄色,脾脏颜色暗红,胆囊有轻微肿大,肠内有淡黄色液体。部分病鱼的背鳍、尾鳍轻微充血、红肿、溃烂,症状和自然感染病鱼基本一致。在中低浓度的感染试验组中,部分幼鱼“突眼”症状表现的不是很明显。从人工感染发病的石斑鱼幼鱼的病灶部位再分离的优势菌株CB1024,其形态、生理生化特征与CB1008相似,用菌株CB1024高浓度菌悬液C( $3.0 \times 10^8$  CFU/mL)再次肌肉注射感染石斑鱼幼鱼,实验组幼鱼全部死亡。因此,可以确认本次试验所分离的菌株CB1008为此次七带石斑鱼“突眼”病的病原菌。经计算可知,采用肌肉注射的石斑鱼半致死浓度LD<sub>50</sub>为 $3.78 \times 10^6$  CFU/mL,采用腹腔注射的石斑鱼半致死浓度LD<sub>50</sub>为 $5.98 \times 10^6$  CFU/mL。

表 1 菌株CB1008人工感染试验结果

Table 1 Results of artificial infection of strain CB1008

分组	菌液浓度	试验个数	注射剂量	每天死亡数(个)							死亡率(%)	LD <sub>50</sub>
Group	(CFU/mL)	Number of	(ml)	Number of death							Mortality rate	(CFU/mL)
	Bacterium	test fish	Dosage of	1	2	3	4	5	6	7		
	concentration		injection	d	d	d	d	d	d	d		
A1	$3.0 \times 10^8$	10	0.1	9	1	0	0	0	0	0	100	

A2	$3.0 \times 10^7$	10	0.1	4	5	0	0	0	0	0	90	
A3	$3.0 \times 10^6$	10	0.1	0	1	2	1	0	0	0	40	
A4	$3.0 \times 10^5$	10	0.1	0	0	0	0	0	0	1	10	$3.78 \times 10^6$
A5	$3.0 \times 10^4$	10	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	
A6	$3.0 \times 10^3$	10	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	
A对照	生理盐水	10	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	
A control	Normal saline											
B1	$3.0 \times 10^8$	10	0.1	9	0	1	0	0	0	0	100	
B2	$3.0 \times 10^7$	10	0.1	2	3	1	1	0	0	0	70	
B3	$3.0 \times 10^6$	10	0.1	0	1	2	0	0	0	0	30	
B4	$3.0 \times 10^5$	10	0.1	0	2	0	0	0	0	0	20	$5.98 \times 10^6$
B5	$3.0 \times 10^4$	10	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	
B6	$3.0 \times 10^3$	10	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	
B对照	生理盐水	10	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	
B control	Normal saline											
C	$3.0 \times 10^8$	10	0.1	10	0	0	0	0	0	0	0	

### 2.3 生理生化鉴定结果

用API-32E细菌自动鉴定仪自动读取和人工读取反应结果,菌株CH1008两次的读取结果均为不可接受生化谱,结果表明菌株CB1008在个别测试中生化谱的表现型不具有典型性,或不在API-32E鉴定系统收录的菌株生化谱之内。根据其形态和生理生化特征(表2),菌株CH1008经革兰氏染色为阴性,短杆状,极生单鞭毛,在TCBS上生长为黄色。对弧菌抑制剂O/129敏感,精氨酸双水解、V-P实验为阴性,鸟氨酸脱羧酶、氧化酶和脂酶等为阳性,温度4℃时不生长,盐度为0时也不生长等特征判断,对照《伯杰氏细菌鉴定手册》(第九版)、《一般细菌常用鉴定方法》以及相关文献(West 1984 毛芝娟等 2002)进行各项生理生化特性的比较,发现与弧菌属中的哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)的生理生化指标最为相符。因此,可将菌株CB1008鉴定为哈维氏弧菌。

表 2 菌株 CB1008 的形态、生理生化特征

Table 2 Morphological, physiological and biochemical characteristics of strain CB1008

鉴定项目	菌株CB1008	鉴定项目	菌株CB1008
Item	Strain CB1008	Item	Strain CB1008
革兰氏染色	-	酚红	+
Gram stain		Phenol red	
运动性	+	甘露醇	+
Motility		Mannitol	
O/129(10μg/片)	S	麦芽糖	+
O/129(10μg/piece)		D-maltose	
O/129(150μg/片)	S	侧金盏花醇	-
O/129(150μg/piece)		Adonitol	
4℃生长	-	古老糖	-

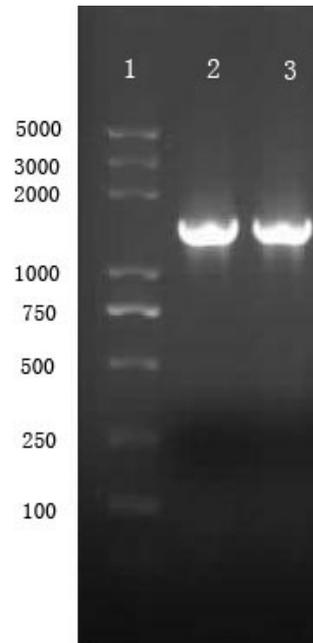
Growth at 4		PLE	
15 生长	+	$\beta$ -葡萄糖酸酶	-
Growth at 15		$\beta$ -Glucuronidase	
28 生长	+	丙二酸	-
Growth at 28		Malonate	
37 生长	+	吲哚产生	+
Growth at 37		Indole production	
40 生长	+	N-乙酰- $\beta$ -葡萄糖甙酶	-
Growth at 40		N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase	
0%NaCl生长	-	$\beta$ -半乳糖甙酶	-
Growth on 0% NaCl		$\beta$ -Galactosidase	
3%NaCl生长	+	葡萄糖	+
Growth on 3% NaCl		Glucose	
6%NaCl生长	+	蔗糖	+
Growth on 5% NaCl		Sucrose	
8%NaCl生长	+	L-阿拉伯糖	-
Growth on 8% NaCl		L-arabinose	
10%NaCl生长	-	D-阿拉伯糖醇	-
Growth on 10% NaCl		D-arabitol	
鸟氨酸脱羧酶	+	$\alpha$ -葡萄糖	+
Ornithine decarboxylase		$\alpha$ -Glucosidase	
V-P反应	-	$\alpha$ -半乳糖甙酶	+
Voges-Proskauer		$\alpha$ -Galactosidase	
氧化酶	+	海藻糖	+
Oxidase		Trehalose	
精氨酸双水解酶	-	鼠李糖	-
Arginine dihydrolase		Rhamnose	
赖氨酸脱羧酶	+	肌醇	-
Lysine decarboxylase		Inositol	
脲酶	+	纤维二糖	+
Urease		D-cellobiose	
L-阿拉伯糖醇	-	山梨醇	+
L-arabitol		D-sorbitol	
半乳糖酸盐	-	$\alpha$ -麦芽糖甙酶	-
Galacturonate		$\alpha$ -Maltosidase	
5-酮基葡萄糖酸钠	-	L-天门冬素芳胺酶	-
5-Ketogluconate		L-Aspartic acid arylamidase	
脂肪酶	+	$\beta$ -葡萄糖甙酶	+
Lipase		$\beta$ -Glucosidase	

注：-反应阴性；+反应阳性；S.敏感；

## 2.4 菌株16s rDNA序列分析

为了进一步确认病原菌CB1008的分类位置,对该菌16S rDNA部分序列进行了测定,序列长度为

1416bp(图2)。将该序列与Genebank上登录的16S rDNA序列进行同源性比较,发现与哈维氏弧菌同源性高达99% , 选取与哈维氏弧菌同源性最高的16株细菌的16S rDNA序列 , 对该序列构建系统进化树(图3) , 从图中可以看出该菌与哈维氏弧菌的亲缘关系最为接近 , 因此 , 可将其菌株CB1008鉴定为哈维氏弧菌。

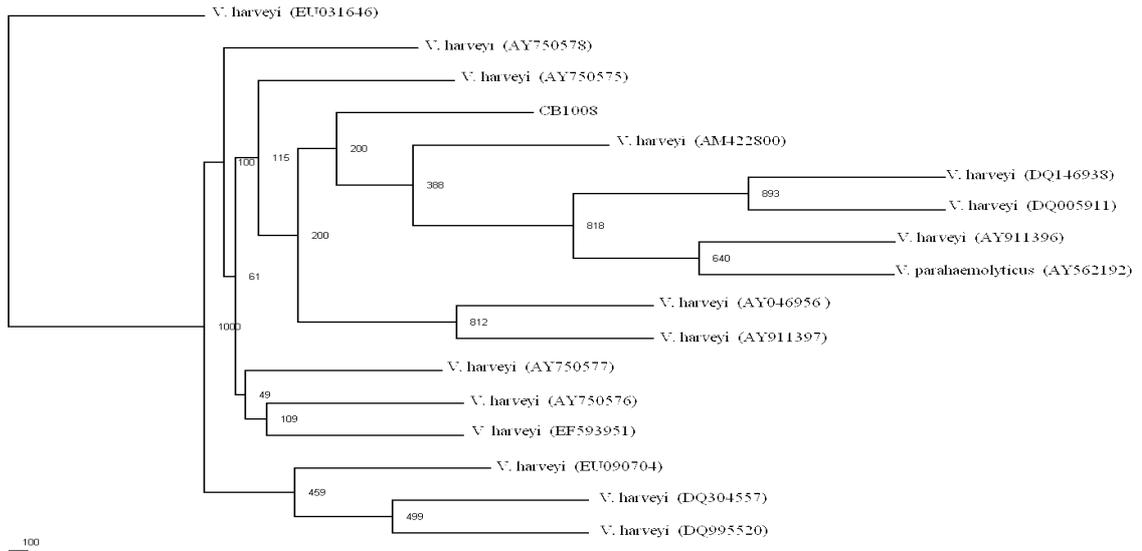


注 : 1: DNA marker; 2 , 3: 16S rDNA PCR产物

Note : 1: DNA marker ; 2,3: strain CB1008

**图 2 16S rDNA PCR产物琼脂糖电泳图**

Fig.2 Agarose electrophoresis of 16S rRNA PCR products



注：括号中数字代表该序列的GenBank登录

Note : Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank.

图 3 16S rDNA序列所构建的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence

## 2.5 药物敏感试验结果

菌株CB1008对36种药物的敏感试验结果(表3)可知该菌株对青霉素、新霉素、链霉素、红霉素、痢特灵等18种药物不敏感。对菌必治、利福平、奥复星、环丙沙星等13种药物中度敏感。对氯霉素、萘啶酸、四环素、氟哌酸、氟罗沙星等5种药物敏感。

表 3 菌株CB1008药敏实验结果

Table 3 Results of strain CB1008 drug sensitivity test

药物	药片浓度	抑菌圈直径	敏感性	药物	药片浓度	抑菌圈直径	敏感性
Drug	Concentration	Diameters of micro-biostatic circles(mm)	Sensitivity	Drug	Concentration (µg/disc)	Diameters of micro-biostatic circles(mm)	Sensitivity
青霉素 Benzyl penicillin	10	0	R	罗美沙星 Lomefloxacin	10	11	D
氯霉素 Choramphenicol	30	22	S	氟罗沙星 Fleroxacin	5	17	S
菌必治 Ceftriaxone	30	17	D	克拉霉素 Clarithromycine	15	12	R
利福平 Rifampicin	15	18	D	丁胺卡那 Amikacin sulfate	30	11	R

红霉素	15	11	R	庆大霉素	10	11	R
Erythromycin				Gentamycin			
萘啶酸	30	23	S	阿奇霉素	15	13	D
Nalidixan				Azithromycin			
新霉素	30	12	R	新生霉素	30	21	D
Neomycin				Novobiocin			
链霉素	10	8	R	卡那霉素	30	10	R
Streptomycin				Kanamycin			
痢特灵	300	12	R	美满霉素	30	20	D
Furazolidonum				Minocycline hydrochloride hydrate			
四环素	30	24	S	强力霉素	30	19	D
Tetracycline				Doxycycline Hyclate			
奥复星	5	13	D	盖博斯林	30	18	D
Ofloxacin				Ceftizoxime			
头孢他啶	30	16	D	恩诺沙星		16	D
Ceftazidime				Enrofloxacin Bace			
氟哌酸	10	18	S	苯唑青霉素	1	0	R
Norfloxacine				Oxacillin			
先锋必	75	16	R	氨苄青霉素	10	0	R
Cefoperazone Sodium				Amoxicillin			
头孢氨苄	30	9	R	多粘菌素B	300U	0	R
Cephalexin				Polymyxin B			
头孢唑啉	30	11	R	复方新诺明	25	20	R
Cefazolin				Sinomine Compositea			
头孢拉定	30	0	R	头孢他啶	30	16	D
Cefradine				Fortum			
环丙沙星	5	17.5	D	乙酰螺旋霉素	30	0	R
Ciprofloxacin				Acetylspiramycin			

注:S为敏感；D为中度敏感；R为不敏感

### 3 讨论

经人工感染试验证实从患“突眼”症的七带石斑鱼中分离的菌株对健康石斑鱼有较强的致病作用，人工感染出现的症状与自然发病症状大致相同。人工感染发病和死亡的石斑鱼幼鱼均能分离出单一菌

株CB1024,其形态和生化特征分别与菌株CB1008一致,将菌株CB1008与CB1024再一次用16S rDNA序列测定和分析,测序的结果登陆GenBank进行Blast比对,结果为同一株菌。在注射生理盐水的对照组中石斑鱼不发病。可以确认菌株CB1008就是七带石斑鱼“突眼”病的病原菌。对于各种鱼类而言,高浓度细菌经肌肉注射直接进入体内容易造成全身出血性症状,死亡迅速;较低浓度感染时可出现注射点局部溃疡伴有全身出血,并且该类症状不具有病原特异性(王斌等 2008),此结果与本次试验部分中低浓度试验组“突眼”症状表现的不明显相一致。突眼是一个逐渐病变的过程,这可能和感染时间、鱼体自身机制、周围环境等相关因素有关,具体致病机理还有待进一步研究和完善。

在采用API-32E鉴定系统对分离出的菌株CB1008进行分类学鉴定时,发现人工读取和自动读取菌株CB1008的生化谱都为不可接受生化谱,分析其原因可能是API-32E鉴定系统是鉴定肠杆菌科和其他营养要求不高的革兰氏阴性杆菌系统,应用的主要对象是一些重要的医学微生物,提供信息的菌株有些并不适用于海洋微生物,其生化测试结果是基于表现型的分类分型方法,且菌株个体之间也存在较大的差异。菌株CB1008在个别测试中生化谱的表现型不具有典型性,或是恰巧不在API-32E鉴定系统收录的菌株生化谱之内,因此,无法通过生化谱直接读取鉴定结果。根据其菌体呈短杆状、两端钝圆、极生单鞭毛;革兰氏染色为阴性,在TCBS上生长为黄色;对弧菌抑制剂O/129敏感等形态和生理生化的相关指标进行分析比较,可以将菌株CB1008鉴定为哈维氏弧菌(*V.harveyi*)。为了再次确认菌株CB1008为哈维氏弧菌的准确性,实验采用了16S rDNA的鉴定方法对菌株CB1008进行了分类学的鉴定。由测序结果可知序列长度为1416bp,将序列进行BLAST分析,选取与菌株CB1008相似性最高的16种细菌的16S rDNA序列,构建系统发育树,进行对比分析,最终可以确认菌株CB1008就是哈维氏弧菌。最新的16S rDNA系统发育学分析技术是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,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(范文辉等 2005)。由此可知,造成此次七带石斑鱼“突眼”病的致病菌就是哈维氏弧菌。

由于哈维氏弧菌的16S rDNA片段与鲨鱼弧菌(*V.carchariae*)相应片段的同源性高达98%,在《伯杰氏细菌鉴定手册》(第九版)中根据鲨鱼弧菌和与哈维氏弧菌生理生化特征的相似性和DNA的高度同源性,已将鲨鱼弧菌归属于哈维氏弧菌(覃映雪等 2004)。哈维氏弧菌广泛的存在于海水之中,是一种条件致病菌,当养殖海域环境条件恶化,引起这些致病菌大量繁殖,而养殖动物免疫力低下时就会暴发细菌性疾病(Hilde Ktuse 1990)。有相关研究表明,对不同环境来源的海水样品进行分析后,结果发现无论是自然海水环境还是养殖海水环境,都存在致病性相关的哈维氏弧菌,其中养殖环境中

哈维氏弧菌的数量明显高于其他环境，占弧菌总数的26.53%（陈吉祥等 2005）。在养殖过程中引起的弧菌病害时有发生，并且流行于多个国家和地区，是许多养殖鱼类的病原菌。然而，哈维氏弧菌引起石斑鱼“突眼病”的相关研究报道较少，国内外主要是对其生理生化做了些相关研究，对于其致病机理报道的却很少。陈献稿等（2004）、覃映雪等（2004）、王国良等（2008）、郭明元等（2006）、王保坤等（2002）和范文辉等（2005）研究表明，哈维氏弧菌可引起养殖斜带石斑鱼(*E.coioides*)、青石斑鱼(*E.awoara*)、大黄鱼(*P.crocea*)、军曹鱼(*R.canadum*)、花鲈(*L.japonicus*)、以及大菱鲆(*S.maximus*)等鱼的发病,发病的症状各有不同,但一般都有眼球突出、体表出血、肌肉溃烂等症状。张晓华等(2007)用从病鱼上分离的哈维氏弧菌菌株,重新感染健康鱼后所出现的症状均与自然感染的患病鱼的症状相似,这与本次患病石斑鱼成鱼和人工感染试验石斑鱼幼鱼所表现出的症状相一致。溶血素被认为是许多病原菌的致病因子,在弧菌中普遍存在,张晓华等(2007)对不同来源的19株哈维氏弧菌的致病性及其胞外产物的毒性进行了研究,结果发现,致病性强的菌株中的溶血性和其他胞外产物都具有很强的毒性。而在此次人工感染试验中,用浓度为 $5.0 \times 10^8$  CFU/mL与 $5.0 \times 10^7$  CFU/mL的菌液无论采用肌肉注射还是体腔注射石斑鱼幼鱼,都出现了较高的死亡率。前者在不到两天的时间里石斑鱼幼鱼的死亡率达到100%。而后者的死亡率也在70%以上,可见哈维氏弧菌是毒性很强的致病菌,具有很强的致病性。

## 参考文献：

- 王 斌,于兰萍,胡 亮,李 艳,刘双凤,姜志强.2008.红鳍东方鲀皮肤溃烂病原菌的分离与鉴定.中国水产科学,15(2):352~357
- 王保坤,余俊红,李筠,纪伟尚,徐怀恕.2002.花鲈弧菌病原菌(哈维氏弧菌)的分离与鉴定.中国水产科学,9(1):52~55
- 王国良,祝 琳,金 珊.2008.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,39(2):162~167
- 中国科学院北京微生物研究所细菌分类组.1978.一般细菌常用鉴定方法.北京:科学出版社,94~119
- 毛芝娟,刘国勇,陈昌福.2002.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,29(2):178~181
- 陈吉祥,杨 慧,颜显辉,钟英斌,张晓华,李 筠.2005.致病性哈维氏弧菌溶血素基因克隆及其检测.中国水产科学,12(5):580~587
- 陈献稿,吴淑勤,石存斌,李宁求.2004.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,11(4):313~317
- 张晓华,钟英斌,陈吉祥.2007.哈维氏弧菌的生物学特性、流行病学及检测技术.中国海洋大学学报,37(5):740~748
- 邹玉霞,张培军,莫照兰,刘 婷,徐永立.2004.大菱鲆出血症病原菌的分离和鉴定.高技术通讯,(4)89~93
- 范文辉,黄 健,王秀华,史成银,刘 莉.2005.养殖大菱鲆溃疡病病原菌的分离鉴定及系统发育分析.微生物学报,45(5):665~670
- 郭明元,刘广锋,冯 娟.2006.1株军曹鱼病原弧菌的鉴定及其系统发育树分析.中国水产科学,13(5):823~828
- 覃映雪,池信才,苏永全,王德祥,陈信忠.2004.网箱养殖青石斑鱼的溃疡病病原.水产学报,28(3):297~302

Beatty, K.T., McGarvey, D.J., Crier, H.J., et al.. 1990. *Vibrio harveyi* an opportunistic pathogen of the common snook, *Centroponutts undecimalis* (Bloch) held in captivity. *Journal of fish disease*, 13:557 – 560.

Hilde Ktuse and Henning Sorum. 1994. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Applied and environmental microbiology*, 60(11):4012 ~ 4020.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath PHA., et al.. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9th ed.). London: Williams & Wilkins Press, 190 ~ 194, 259 ~ 271

Mercedes, A. and Anicent, R. B.. 1994. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *J Applied Bact*, 76:79 ~ 85.

West, P. A. and Colwell, R. R.. 1984. Identification and classification of Vibrionaceae-An Overview. *Vibrioin the Environment*. New York: John Wiley & Sons Inc. 285 ~ 363

Zhang X H and Austin B. 2000. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. *J Fish Dis*, 23:93 ~ 102