

条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)源美人鱼发光 杆菌杀鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*)的分离鉴定*

王庚申^{1,2} 许文军¹ 谢建军¹ 汪 玮¹ 施 慧^{1①}

(1. 浙江省海洋水产研究所 舟山 316021; 2. 浙江省海水增殖重点实验室 舟山 316021)

摘要 2013 年浙江省舟山市某网箱养殖条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)暴发了一种严重的疾病, 病鱼主要症状为脾、肾出现 1–2 mm 的白色类结节。从患病鱼内脏处分离得到 1 株优势菌 OF-1, 经人工感染实验证实为此次引起条石鲷死亡的致病菌, 半数致死量为 5.93×10^4 CFU/g。形态学观察结果显示, 菌株 OF-1 为革兰氏阴性、短杆状, 在 TCBS 培养基上不生长。API 20E 细菌鉴定系统、16S rRNA 系统发育树分析结果证实, 该菌株为美人鱼发光杆菌杀鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*)。该菌对庆大霉素、青霉素、氟哌酸、氧氟沙星、氨苄青霉素等药物高度敏感, 对红霉素、链霉素、卡那霉素、茶唑青霉素等药物具有抗性。

关键词 条石鲷; 美人鱼发光杆菌杀鱼亚种; 细菌鉴定

中图分类号 S941.42 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)02-0151-07

条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)俗称日本鸚鵡鱼, 主要分布在我国的海黄、东海、台湾沿海以及日本北海道以南等海域, 系温热带近海岩礁鱼类(朱元鼎等, 1963)。条石鲷体态优美, 色泽鲜艳, 肉质细致, 营养丰富, 具有较高的经济价值和观赏价值(武云飞等, 1999)。我国于 2004 年首次完成条石鲷规模化人工育苗, 目前, 条石鲷已成为我国海水网箱养殖和人工增殖放流的优良品种之一(牛化欣等, 2008)。近年来, 国外关于条石鲷营养需求(Shan *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2009)、免疫(Kim *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009; Zoysa *et al.*, 2012)及病害(畑井喜司雄等, 2007; Jung *et al.*, 2000)等方面的研究取得了一些进展; 国内也有一些条石鲷人工繁育(倪梦麟等, 2007)、早期发育(柳学周

等, 2008)、生理(柳敏海等, 2009; 孙鹏等, 2010)及组织学(王健鑫等, 2006; 何滔等, 2013)等方面的报道, 但有关条石鲷病害方面的研究还鲜见报道。

美人鱼发光杆菌杀鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*)即原来的杀鱼巴斯德氏菌(*Pasteurella piscicida*), 最早从美国的野生美洲狼鲈(*Morone americana*)和条纹狼鲈(*Morone saxatilis*)分离得到(张飞等, 2012), 随后由该菌引起的鱼类感染相继在日本和美国发生, 造成了鱼类大量死亡。美人鱼发光杆菌杀鱼亚种对宿主无专一性, 可感染多种养殖鱼类, 通常在 18–20℃时发病(Magarinos *et al.*, 1992)。

2013 年 8 月, 浙江省舟山市某网箱养殖条石鲷暴发了一种严重的疾病, 死亡率达到 20%以上。患病

* 浙江省自然科学基金项目(Y15C190018)、浙江省科技计划项目(2015F30003、2015F50004)、浙江省科技厅重点农业项目(2012C12010-1)和浙江省海洋与渔业科技示范推广项目(浙海渔计[2013]112 号)共同资助 [This work was supported by Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (Y15C190018), the Science and Technology Project of Zhejiang Province (2015F30003 and 2015F50004), Key Agricultural Project from Zhejiang Province Science and Technology Department (2012C12010-1), and Demonstration and Promotion Project from Zhejiang Ocean and Fishery Bureau([2013]No.112)]. 王庚申, E-mail: wgs-1988@163.com

① 通讯作者: 施 慧, 副高级工程师, E-mail: huishi2002@126.com

收稿日期: 2015-12-09, 收修改稿日期: 2015-12-21

鱼主要症状为体色加深, 离群独游, 反应迟钝, 食欲减退, 体表无明显发病症状; 解剖可见脾脏、肾脏表面出现许多 1–2 mm 左右白色类结节, 严重者肝脏、肠道也会出现相同的白点(图 1)。本研究从患病条石鲷的内脏分离得到优势菌, 对细菌进行人工感染确定其致病性, 并运用形态学观察、生理生化测定及 16S rRNA 基因序列分析对病原菌进行鉴定, 最后进行了药物敏感实验, 本研究结果将为条石鲷健康养殖和疾病防治提供理论依据。



图 1 患病条石鲷

Fig.1 Diseased *O. fasciatus*

1 材料与方法

1.1 实验材料

患病条石鲷取自浙江省舟山市某养殖网箱, 体长为 10–12 cm。人工感染实验所用条石鲷为浙江省海洋水产研究所西轩岛试验场放流的健康条石鲷, 体长为 8–10 cm, 暂养 7 d 后用于感染实验。

细菌分离所用的 TSA 培养基购自北京陆桥技术有限责任公司; TCBS 培养基购自杭州微生物试剂有限公司; 法国 API 20E 细菌鉴定系统试剂条购自生物梅里埃中国有限公司; 细菌生化鉴定管购自杭州微生物试剂有限公司; 切胶回收试剂盒和引物由生工生物工程(上海)股份有限公司提供; *Taq* DNA 聚合酶、10×PCR 缓冲液、dNTP 等购自宝生物工程(大连)公司。

1.2 病原菌的分离培养

无菌条件下解剖病鱼, 观察体表和各器官的病变情况。取体表黏液、鳃丝、肝脏、肾脏、脾脏等处组织, 制成水浸片, 在显微镜下进行检查, 以初步观察和确认可疑致病原。

取有典型症状的濒死条石鲷, 用 75% 的酒精棉球反复擦拭病鱼体表, 无菌解剖后, 用接种环在脾脏、肾脏及肝脏处取样, 平板划线接种于 TSA 和 TCBS

培养基, 28℃ 恒温培养 48 h, 挑取形态一致的优势菌落进行纯化培养, 获得纯培养菌株后, –80℃ 保存备用。

1.3 人工感染实验

健康条石鲷暂养 7 d 后, 选择规格均一、活力好的个体用于感染实验。实验在 80 L 水族箱中进行, 每 8 尾条石鲷为 1 组, 每个细菌浓度设 3 个平行, 并设 3 个对照组。

将分离到的优势菌经 TSA 培养基培养 48 h, 用 1.5% 灭菌生理盐水洗下细菌, 分光光度法结合平板计数法制成浓度为 2×10^9 、 2×10^8 、 2×10^7 、 2×10^6 、 2×10^5 、 2×10^4 CFU/ml 的菌悬液。采用腹腔注射法对条石鲷进行人工感染, 每尾鱼注射 0.2 ml 菌悬液, 对照组注射等量的 1.5% 灭菌生理盐水。连续观察 14 d, 随时记录发病症状和死亡情况。实验期间水温为 26–28℃, 盐度为 30–32, 充气, 不投喂, 每天换水量为 50%。采用 Reed-Muench 法(安德森, 1984)计算半数致死量 LD_{50} 。

1.4 病原菌的鉴定

1.4.1 形态学观察 将纯化菌株接种于 TSA 培养基, 28℃ 培养 24 h, 观察菌落形态并挑取纯培养物进行革兰氏染色和负染, 观察细菌形态及大小。

1.4.2 生理生化鉴定 按照产品说明所述方法以法国 API 20E 细菌鉴定系统的生化实验及细菌生化鉴定管测定细菌的生理生化指标。

1.4.3 16S rRNA 基因序列分析及系统发育树的构建 模板 DNA 的制备: 挑取单菌落置于 100 μ l 灭菌蒸馏水中, 煮沸 10 min, 冰浴 5 min, 12000 g 离心 5 min, 取上清液作为模板 DNA。16S rRNA 基因扩增采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATC(C/A)TGGCTCAG-3') 和 1492R(5'-TACGG(C/T)TAC CTTGTTACGACTT-3')。25 μ l PCR 反应体系: 10×PCR 缓冲液 2.5 μ l、dNTP 混合物 2 μ l、上下游引物各 0.5 μ l、*Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μ l) 0.5 μ l、模板 DNA 5 μ l, 灭菌双蒸水补足反应体系。PCR 扩增程序: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 52℃ 45 s, 72℃ 45 s, 进行 30 个循环; 72℃ 7 min。PCR 产物由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 测序结果经 Blast 后用 ClustalX 软件进行多序列匹配排列, 然后用 MEGA 软件构建系统发育树。

1.5 药物敏感实验

用灭菌生理盐水从培养 48 h 的 TSA 培养基上洗下待测菌株, 通过分光光度法结合平板计数法调整其菌液浓度为 10^9 CFU/ml。取 0.1 ml 菌悬液涂布于 TSA 培养基, 然后贴上药敏纸片(购自杭州微生物试剂有限公司), 28℃ 培养 24 h 后, 测量抑菌圈的直径。

2 结果

2.1 病原菌的分离培养

水浸片观察结果显示, 肝脏、脾脏及肾脏等处有许多活动的杆状细菌。从多条患病条石鲷肝脏、脾脏及肾脏处分离得到同一种优势菌(记为 OF-1)。该菌在 TSA 培养基上 28℃ 培养 24 h 后, 菌落呈圆形、半透明、中央隆起、边缘规则、表面光滑湿润、乳黄色, 直径为 0.3–0.5 mm, 48 h 后直径为 1.0–1.6 mm; 在 TCBS 培养基上不生长。

2.2 人工感染实验

实验鱼从第 2 天开始出现死亡(表 1), 第 3 天各实验组的死亡个体脾脏、肾脏开始出现白点, 对照组在实验期间无症状、无死亡。人工感染实验发病鱼与自然发病鱼的症状相同, 脾脏、肾脏处可见白色结节,

从感染鱼分离得到的致病菌与 OF-1 的菌落形态、生理生化特征一致, 证实菌株 OF-1 为此次条石鲷内脏白点病的致病菌。经计算, 菌株 OF-1 的半数致死量 LD₅₀ 为 5.93×10⁴ CFU/g。

2.3 病原菌的鉴定

菌株 OF-1 为革兰氏阴性菌, 短杆状, 两端着色加深; 细菌单个存在, 或两个、多个连接成长杆状(图 2)。生理生化结果显示(表 2), 氧化酶、V-P 实验、精氨酸双水解酶、发酵葡萄糖及甘露糖等为阳性; β-半乳糖苷酶、赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶、柠檬酸盐利用、H₂S 产生、脲酶、色氨酸脱氨酶、产生吲哚、明胶酶以及发酵甘露醇、肌醇、山梨醇、鼠李糖、蔗糖、蜜二糖、苦杏仁苷、阿拉伯糖等为阴性, 在 API 20E 细菌鉴定系统编号为 2005004, 与美人鱼发光杆菌杀鱼亚种生理生化特征一致。

表 1 条石鲷腹腔注射感染实验结果

Tab.1 The mortality of *O. fasciatus* infected by intraperitoneal injection

实验分组 Group	细菌浓度 Bacteria concentration(CFU/ml)	尾数 Number	注射剂量 Injection dosage(ml)	死亡时间 Time to death (d)	死亡数 Number of death	死亡率 Mortality (%)
OF-1	2×10 ⁹	24	0.2	2–4	24	100
	2×10 ⁸	24	0.2	3–5	24	100
	2×10 ⁷	24	0.2	3–8	20	83.3
	2×10 ⁶	24	0.2	4–6	4	16.7
	2×10 ⁵	24	0.2	–	0	0
	2×10 ⁴	24	0.2	–	0	0
对照 Control	生理盐水 1.5% saline	24	0.2	–	0	0

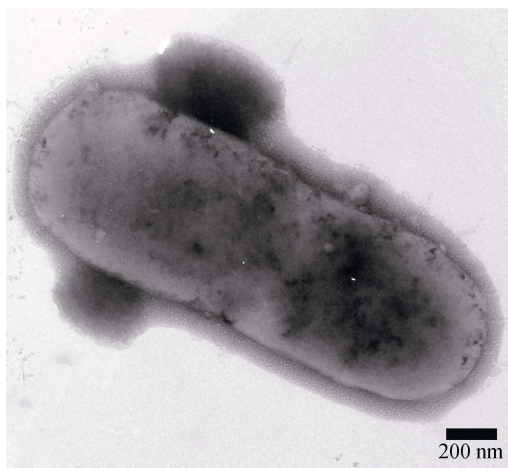


图 2 分离菌株的电镜照片

Fig.2 The electronic microphotograph of the isolated strain

2.4 16S rRNA 基因序列分析及系统发育树构建

测序得到的 16S rRNA 基因序列长度为 1454 bp

(GenBank 登录号为: KF956381), 在 GenBank 数据库中进行 Blast 比对, 与美人鱼发光杆菌同源性最高, 均达到 99% 以上。选取同源性较高的菌株 16S rRNA 序列, 用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树, 结果显示, 菌株 OF-1 与美人鱼发光杆菌 2 个亚种聚为一簇, 说明菌株 OF-1 与美人鱼发光杆菌亲缘关系最近。

2.5 药物敏感实验

菌株 OF-1 对 25 种抗菌药物的敏感性实验结果见表 3。结果显示, 该菌对呋喃妥因、庆大霉素、青霉素、先锋必、氟哌酸、氧氟沙星、氨苄青霉素、先锋 VI、氯霉素、环丙沙星、四环素敏感; 对先锋噻肟、利福平、头孢肤肟中度敏感; 对红霉素、万古霉素、菌必治、链霉素、卡那霉素、苯唑青霉素等药物具有抗性。

3 讨论

美人鱼发光杆菌杀鱼亚种感染不同鱼种所呈现

表 2 菌株 OF-1 生理生化指标
Tab.2 Physiological and biochemical characteristics of the bacterial strain OF-1

检测项目 Test items	OF-1	<i>P. damsela</i> subsp. <i>Piscicida</i> (Zorrilla <i>et al.</i> , 1999)	检测项目 Test items	OF-1	<i>P. damsela</i> subsp. <i>Piscicida</i> (Zorrilla <i>et al.</i> , 1999)
革兰氏染色 Gram stain	-	-	柠檬酸盐利用 Citrate utilization	-	-
运动性 Motility	-	-	淀粉酶 Amylase	-	-
氧化酶 Oxidase	+	±	脂酶 Lipase	+	±
O/129 (10 µg)	-	-	明胶酶 Gelatinase	-	-
O/129 (150 µg)	-	-	脲酶 Urease	-	-
TCBS 生长 Growth on TCBS	-	-	B-半乳糖苷酶 β-galactosidase	-	-
0% NaCl 生长 Growth in 0% NaCl	-	-	鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-	-
3% NaCl 生长 Growth in 3% NaCl	+	+	精氨酸双水解酶 Arginine digydrolase	+	±
6% NaCl 生长 Growth in 3% NaCl	-	-	赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	-	-
8% NaCl 生长 Growth in 8% NaCl	-	-	色氨酸脱氨酶 Tryptophan deaminase	-	-
4℃ 生长 Growth at 4℃	-	-	葡萄糖 Glucose	+	+
10℃ 生长 Growth at 10℃	+	+	甘露醇 Mannitol	-	-
20℃ 生长 Growth at 20℃	+	+	甘露糖 Mannose	+	+
30℃ 生长 Growth at 30℃	+	+	麦芽糖 Maltose	-	-
37℃ 生长 Growth at 37℃	-	-	蔗糖 Sucrose	-	-
葡萄糖产气 Gas from glucose	-	-	蜜二糖 Melibiose	-	-
O-F 实验 O-F Test	F	F	鼠李糖 Rhamnose	-	-
硝酸盐还原 Nitrate reduction	-	-	肌醇 Inositol	-	-
吲哚产生 Indole production	-	-	D-山梨醇 D-sorbitol	-	-
V-P 实验 V-P test	+	±	苦杏仁苷 Amygdalin	-	-
H ₂ S 产生 H ₂ S production	-	-	阿拉伯糖 Arabinose	-	-

注: +表示阳性; -表示阴性; ±表示弱阳性; F 表示发酵
Note: +: Positive; -: Negative; ±: Weak positive; F: Fermentative

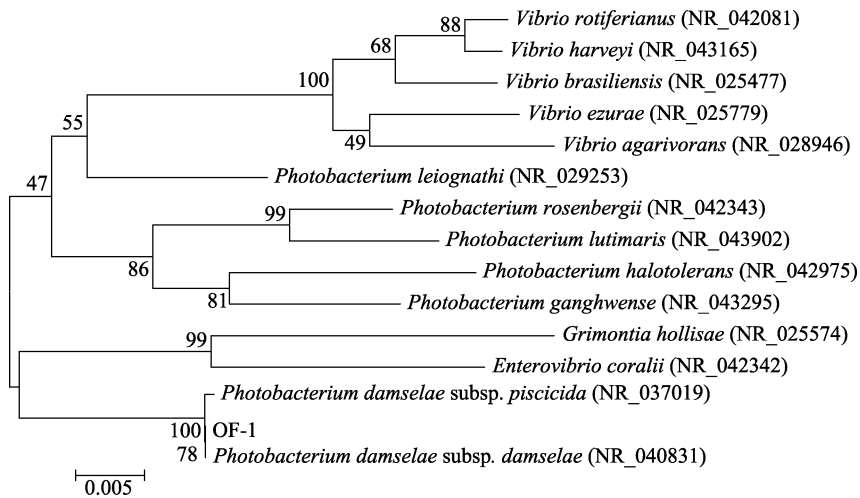


图 3 菌株 OF-1 16S rRNA 基因序列聚类分析结果
Fig.3 Cluster analysis based on the 16S rRNA sequence of strain OF-1

表 3 菌株 OF-1 药敏实验结果
Tab.3 Sensitivity of strain OF-1 to antibiotics

药物名称 Name of antibiotics	药物含量 Contents ($\mu\text{g}/\text{Tablet}$)	抑菌圈直径 Sterilizing diameter (mm)	敏感度 Sensitivity
先锋噻肟 Cefotaxime	30	19	I
红霉素 Erythromycinum	15	12	R
呋喃妥因 Nitrofurantoin	300	17	S
利福平 Rifampicine	5	18	I
庆大霉素 Gentamicinum	10	18	S
万古霉素 Vancomycin	30	8	R
青霉素 Penicillin G	10	16	S
先锋必 Cefoperazone	75	24	S
菌必治 Ceftriaxone	30	0	R
氟哌酸 Norfloxacin	10	26	S
链霉素 Streptomycin	10	0	R
卡那霉素 Kanamycinum	30	0	R
复达欣 Ceftazidime	30	11	R
苯唑青霉素 Proctaphlin	1	0	R
阿米卡星 Amikaxing	30	14	R
氧氟沙星 Ofloxacin	5	27	S
氨苄青霉素 Ampicillin	10	20	S
妥布霉素 Tobramycin	10	0	R
先锋 V Cefamezin	30	0	R
先锋 VI Cefalexin	30	20	S
复方新诺明 Sulfamethoxazolum	23.7/1.25	0	R
氯霉素 Chloromycetin	30	24	S
环丙沙星 Ciprofloxacin	5	30	S
氧哌嗪青霉素 Piperacillin	100	0	R
四环素 Tetracycline	30	35	S
头孢呋肟 Cefuroxime sodium	30	15	I

注: S 表示敏感; I 表示中度敏感; R 表示耐药

Note: S: Sensitive; I: Intermediate sensitive; R: Resistant

的症状有明显差异, 此次条石鲷感染死亡症状主要表现为脾脏、肾脏出现灰白色的结节, 最终发生死亡, 与其他多数受感染的鱼类, 如军曹鱼(*Rachycentron canadum*)、黄尾鲷(*Seriola quinqueradiata*)、金头鲷(*Sparus aurata*)、卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)、五条鲷(*Seriola quinqueradiata*)等死亡症状相似(王瑞旋等, 2010; 任燕等, 2012); 但与半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)感染此菌的主要症状为体表溃烂、鳍基部出血、胆囊发黑和肾脏发黄等症状明显不同(Wang *et al.*, 2007)。目前, 关于美人鱼发光杆菌杀鱼亚种引起条石鲷感染死亡报道尚属首次。人工感染实验证实菌株 OF-1 为此次引起条石鲷死亡的致病菌, 半数致死量为 5.93×10^4 CFU/g, 与王瑞旋等(2010)从卵形鲳鲹所分离菌半数致死量(1.1×10^6 CFU/g)相比较低, 但明

显高于 Wang 等(2007)报道美人鱼发光杆菌杀鱼亚种对半滑舌鲷的 LD_{50} (5.5×10^3 CFU/g), 这可能与不同菌株的毒力及不同养殖品种的抵抗力有关。

O'Hara 等(2003)采用 6 种常用的细菌鉴定系统对美人鱼发光杆菌进行鉴定, 结果发现, API 20E 对美人鱼发光杆菌的鉴定准确率为 100%。但是, Thyssen 等(2000)通过实验发现, 只有 76% 的美人鱼发光杆菌杀鱼亚种在 API 20E 测定时系统编号为 2005004, 而且必须结合杀鱼亚种对温度和盐度的严格需求进行鉴定。本研究中, 菌株 OF-1 的 API 20E 系统编号为 2005004, 在 6%NaCl 胨水以及在 4℃、37℃ 不生长, 与美人鱼发光杆菌杀鱼亚种生理生化特征一致。目前, 16S rRNA 是细菌鉴定和系统发育地位研究最常用的工具, 普遍认为 16S rRNA 同源性大于 97.5% 的

细菌可视为同种(赛文婴等, 2000)。利用 16S rRNA 通用引物扩增了菌株 OF-1 的 16S rRNA 基因片段, 测序并构建系统发育树, 显示菌株 OF-1 与美人鱼发光杆菌聚为一簇, 亲缘关系最近, 综合细菌形态学特征、生理生化及分子鉴定结果, 将菌株 OF-1 鉴定为美人鱼发光杆菌杀鱼亚种。

在对抗菌药物敏感性研究方面, Thyssen 等(2001)对采自不同地区的 145 株美人鱼发光杆菌杀鱼亚种进行了抗菌药物敏感性研究, 结果显示, 93% 的菌株对红霉素具有抗性; 几乎所有的欧洲菌株对卡那霉素敏感, 而来自日本的菌株 49% 对卡那霉素具有抗性。本研究中, 菌株 OF-1 对红霉素、卡那霉素均有抗性。王瑞旋等(2010)报道, 美人鱼发光杆菌杀鱼亚种对受试的 20 种抗菌药物有抗性, 仅对诺氟沙星、环丙沙星、复方新诺明、红霉素、庆大霉素、氯霉素、四环素、新霉素、链霉素等药物中度敏感; 在 28 种受试中草药中对番石榴和苍术高度敏感。而本研究中, 菌株 OF-1 对环丙沙星、氯霉素、四环素、庆大霉素高度敏感, 对复方新诺明、红霉素、链霉素具有抗性。由于氯霉素、红霉素、环丙沙星等为水产禁药, 故本结果仅为其他同类药物使用提供参考。

参 考 文 献

- Anderson DP. Immunology of Fish. Beijing: China Agriculture press, 1984 [安德森 DP. 鱼类免疫学. 北京: 中国农业出版社, 1984]
- He T, Xiao ZH, Liu QH, *et al.* Ontogeny of the gill and Na⁺, K⁺-ATPase activity of rock bream (*Oplegnathus fasciatus*). Journal of Fisheries of China, 2013, 37(4): 520–525 [何滔, 肖志忠, 刘清华, 等. 条石鲷鳃的组织发育及鳃上钠钾三磷酸腺苷酶活性的早期变化. 水产学报, 2013, 37(4): 520–525]
- Jung SJ, Oh MJ. Iridovirus-like infection associated with high mortalities of striped beakperch, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et Schlegel), in southern coastal areas of the Korean peninsula. Journal of Fish Diseases, 2000, 23(3): 223–226
- Kim MS, Hwang YJ, Yoon KJ, *et al.* Molecular cloning of rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) tumor necrosis factor- α and its effect on the respiratory burst activity of phagocytes. Fish and Shellfish Immunology, 2009, 27(5): 618–624
- Kim YI, Ha YM, Ahn SJ, *et al.* Production and characterization of polyclonal antibody against recombinant ORF 049L of rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) iridovirus. Process Biochemistry, 2007, 42(2): 134–140
- Kishio Hatai, Kazuo Ogawa. New atlas of fish diseases. Beijing: China Agricultural University press, 2007 [畑井喜司雄, 小川和夫. 新鱼病图谱. 北京: 中国农业大学出版社, 2007]
- Liu MH, Peng ZL, Fu RB, *et al.* Annual variation of the female *Oplegnathus fasciatus* in gonadosomatic index, sex hormone and biochemical composition. Journal of Shanghai Ocean University, 2009, 18(5): 636–639 [柳敏海, 彭志兰, 傅荣兵, 等. 雌性条石鲷性体指标、性激素及生化组成的周年变化分析. 上海海洋大学学报, 2009, 18(5): 636–639]
- Lim SJ, Lee KJ. Partial replacement of fish meal by cottonseed meal and soybean meal with iron and phytase supplementation for parrot fish *Oplegnathus fasciatus*. Aquaculture, 2009, 290(3–4): 283–289
- Liu XZ, Xu YJ, Wang YY, *et al.* Characters of development and growth of early life stages of the rock bream *Oplegnathus fasciatus*. Acta Zoologica Sinica, 2008, 54(2): 332–341 [柳学周, 徐永江, 王妍妍, 等. 条石鲷的早期生长发育特征. 动物学报, 2008, 54(2): 332–341]
- Magarinos B, Romalde JL, Bandin I, *et al.* Phenotypic, antigenic, and molecular characterization of *Pasteurella piscicida* strains isolated from fish. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(10): 3316–3322
- Ni ML, Fan WM, Mao ZZ, *et al.* Research on whole artificial breeding technique of *Oplegnathus fasciatus* from the inshore water of Zhoushan. Journal of Zhejiang Ocean University(Natural Science), 2007, 26(2): 143–146 [倪梦麟, 范卫明, 毛志增, 等. 舟山沿海条石鲷人工育苗技术研究. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2007, 26(2): 143–146]
- Niu HX, Chang J, Ma S. Research progress on biology and breeding ecology of *Oplegnathus fasciatus*. Fisheries Science and Technology Information, 2008, 35(1): 50–52 [牛化欣, 常杰, 马牲. 条石鲷的生物学及养殖生态学研究进展. 水产科技情报, 2008, 35(1): 50–52]
- O'Hara CM, Sowers EG, Bopp CA, *et al.* Accuracy of six commercially available systems for identification of members of family *Vibrionaceae*. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(12): 5654–5659
- Ren Y, Shi CB, Chang OQ, *et al.* Identification of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from diseased yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) and the sensitivity to antimicrobial agents. Guangdong Agricultural Sciences, 2012, 39(22): 148–152 [任燕, 石存斌, 常藕琴, 等. 五条鲫源美人鱼发光杆菌杀鱼亚种的分离鉴定及药物敏感性试验. 广东农业科学, 2012, 39(22): 148–152]
- Sai WY, Dong XZ. Application of directed evolution of orthologous gene in the bacteria phylogenetic. Microbiology China, 2000, 27(5): 377–381 [塞文婴, 东秀珠. 定向进化同源基因在细菌系统发育研究中的应用. 微生物学通报, 2000, 27(5): 377–381]
- Shan XJ, Quan HF, Dou SZ. Effects of delayed first feeding on growth and survival of rock bream *Oplegnathus fasciatus* larvae. Aquaculture, 2008, 277(1–2): 14–23
- Sun P, Peng SM, Yin F, *et al.* Effect of salinity on activity of Na⁺/K⁺-ATPase in juvenile of *Oplegnathus fasciatus*. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(8): 1024–1029 [孙鹏, 彭士明, 尹飞, 等. 盐度对条石鲷幼鱼 Na⁺/K⁺-ATP 酶活力的影响. 水产学报, 2010, 34(8): 1024–1029]
- Thyssen A, Grisez L, van Houdt R, *et al.* Phenotypic characterization of the marine pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Microbial Pathogenesis, 2000, 28(2): 119–126
- Thyssen A, Ollevier F. In vitro antimicrobial susceptibility of *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida* to 15 different antimicrobial agents. Aquaculture, 2001, 200(3–4): 259–269
- Wang JX, Shi G, Li P, *et al.* Morphology and histology of digestive in *Oplegnathus fasciatus*. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(5): 618–626 [王健鑫, 石戈, 李鹏, 等. 条

- 石鲷消化道的形态学和组织学. 水产学报, 2006, 30(5): 618–626]
- Wang RX, Feng J, Su YL, *et al.* Isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from diseased golden pompano (*Trachinotus ovatus* Linnaeus) and its drug sensitivity. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(5): 1020–1027 [王瑞旋, 冯娟, 苏友禄, 等. 卵形鲳鲹美人鱼发光杆菌杀鱼亚种的分离鉴定. 中国水产科学, 2010, 17(5): 1020–1027]
- Wang Y, Han Y, Li Y, *et al.* Isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from diseased tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther) in China. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(5): 763–768
- Wu YF, Men Q, Kang B. A supplementary study on the morphology and ecology of two species rare fish from Qingdao. Journal of Ocean University of Qingdao, 1999, 29(4): 581–585 [武云飞, 门强, 康斌. 两种珍稀鱼类的形态学和生态学的补充研究. 青岛海洋大学学报, 1999, 29(4): 581–585]
- Zhang F, Su YQ, Wang J, *et al.* Studies on the isolation, identification and virulence of *Photobacterium damsela* isolated from *Pseudosciaena crocea*. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(6): 1202–1208 [张飞, 苏永全, 王军, 等. 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)源美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damsela*)的分离鉴定及致病性研究. 海洋与湖沼, 2012, 43(6): 1202–1208]
- Zhu YD, Zhang CL, Cheng QT, *et al.* Fishes of East China Sea. Beijing: Science press, 1963 [朱元鼎, 张春霖, 成庆泰, 等. 东海鱼类志. 北京: 科学出版社, 1963]
- Zorrilla I, Balebona MC, Moriigo MA. Isolation and characterization of the causative agent of pasteurellosis, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, from sole, *Solea senegalensis* (Kaup). Journal of Fish Diseases, 1999, 22(3): 167–172
- Zoysa MD, Ryu JH, Chung HC, *et al.* Molecular characterization, immune responses and DNA protection activity of rock bream (*Oplegnathus fasciatus*), peroxiredoxin 6 (Prx6). Fish and Shellfish Immunology, 2012, 33(1): 28–35

(编辑 冯小花)

Isolation and Identification of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from Diseased Rock Bream (*Oplegnathus fasciatus*)

WANG Gengshen^{1,2}, XU Wenjun¹, XIE Jianjun¹, WANG Wei¹, SHI Hui¹①

(1. Marine Fisheries Research Institute of Zhejiang, Zhoushan 316021;

2. Key Laboratory of Marine Culture and Enhancement of Zhejiang Province, Zhoushan 316021)

Abstract Rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) is an important economic fish cultured in China. In recent years, rock bream aquaculture has developed rapidly along the coast of China. In August 2013, an epizootic occurred among cultured rock bream in a cage culture farm in Zhoushan of Zhejiang Province, China, which caused a cumulative mortality up to 20%. The diseased fish had no obvious symptoms on body surface; the main symptom was characterized by many white nodules (1–2 mm) in the spleen and kidney. The aim of this research was to isolate and identify the bacterial isolate, then to determine the pathogenicity and test drug sensitivity of bacteria pathogen found in diseased rock bream. A dominant bacterium strain OF-1 was isolated from the liver, spleen and kidney. Artificial infection test with intraperitoneal injection method proved that the LD₅₀ value of bacterium strain OF-1 was 5.93×10^4 CFU/g. It was identified based on the morphology, the biochemical characteristics, and the 16S rRNA sequencing. The results of morphological tests indicated that strain OF-1 was gram-negative, rod bacteria and did not grow in the TCBS plate. OF-1 exhibited an API 20E index profile of 2005004, which was identical with the profile exhibited by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. The sequence analysis of 16S rRNA gene, the morphological, physiological and biochemical characteristics indicated that the bacterium strain OF-1 could be identified as *P. damsela* subsp. *piscicida*. The strain was highly sensitive to gentamicinum, penicillin G, norfloxacin, ofloxacin and ampicillin, but was resistant to erythromycinum, vancomycin, rocephin, streptomycin, kanamycinum and proctaphlin. This paper reported for the first time that *P. damsela* subsp. *piscicida* caused the disease of rock bream in China, which will provide reference in fish health management and disease control.

Key words *Oplegnathus fasciatus*; *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*; Bacterial identification

① Corresponding author: SHI Hui, E-mail: huishi2002@126.com