

## 半滑舌鳎皮肤溃疡病病原研究

陈政强<sup>1,2,3</sup>, 姚志贤<sup>1</sup>, 林茂<sup>1,2,3</sup>, 常建波<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021;

2. 集美大学福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室, 福建 厦门 361021;

3. 集美大学水产生物技术研究所, 福建 厦门 361021)

**摘要:** 为了对半滑舌鳎皮肤溃疡病的病原进行研究, 从患有严重皮肤溃疡病的半滑舌鳎病灶中分离病原菌, 并经人工感染确认病原。对引起此次疾病的病原菌的形态特征、理化特性、胞外产物酶活性与溶血活性及其对抗菌类药物的敏感性等生物学特性进行了研究和分析, 还测定了 16 S rRNA、*gyrB* 基因序列, 分析了相应序列的同源性并构建了系统发育树。结果从病灶中分离得到 4 株优势菌, 经人工注射感染证实菌株 A3 为引起养殖半滑舌鳎皮肤溃疡病的病原菌, 其半数致死量 LD<sub>50</sub> 为  $1.5 \times 10^{4.2}$  CFU/mL。其中, 16 S rRNA、*gyrB* 在 GenBank 中的登录号分别是 JN391271、JN168881。从基于 16 S rRNA 与 *gyrB* 基因序列构建的系统发育树看, 分离筛选出来的病原菌与哈维氏弧菌同源性最高, 结合生理生化特征和 16 S rRNA、*gyrB* 基因序列分析结果, 认为该病原菌为哈维氏弧菌。胞外产物酶活性及溶血活性检测结果表明, 该病原菌具有淀粉酶、尿素酶、脂肪酶、蛋白酶和卵磷脂酶活性而不具有明胶酶活性, 在 4% 羊血 TSA 平板上呈  $\beta$  溶血活性。病原菌的药物敏感性试验结果显示, 该菌对四环素、强力霉素、诺氟沙星、磺胺异恶唑等敏感, 而对其他用于试验的抗生素敏感度低或具有一定的抗性。

**关键词:** 半滑舌鳎; 皮肤溃疡病; 哈维氏弧菌; 16 S rRNA 基因; *gyrB* 基因

**中图分类号:** S 941.41<sup>+7</sup>

**文献标志码:** A

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)属鲽形目(Pleuronectiformes)、舌鳎科(Cynoglossidae)、舌鳎属, 俗称牛舌头、鳎目、鳎米等, 是一种温水性近海大型底层鱼类, 主要分布在我国黄海和渤海海域, 具有活动范围小、营养等级低、个体大、生长快等优点<sup>[1-3]</sup>。半滑舌鳎味道鲜美, 出肉率高, 口感爽滑, 鱼肉久煮而不老, 无腥味和异味, 高蛋白, 营养丰富, 历来受广大消费者青睐。目前, 已成为我国沿海地区海水养殖鱼类的优良品种之一, 工厂化育苗年产量可达到数百万尾商品鱼苗的水平。随着产业规模的不断扩大, 近年来养殖半滑舌鳎陆续发生各种疾病, 幼鱼因病而出现大量死亡的现象频繁发生, 造成了很大的经济损失, 病害已成

为制约其发展的重大障碍。针对近年来福建省漳州地区养殖半滑舌鳎皮肤性溃疡病频发并且呈现蔓延、加重趋势的具体情况, 本研究就引起半滑舌鳎皮肤溃疡病的病原进行分离、鉴定, 并做相关生物学研究, 旨在揭示诱发该疾病的主要病原及其生物学特性, 为该病的有效防治提供依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验用鱼

实验用半滑舌鳎取自福建省漳州市诏安海康水产养殖有限公司。取皮肤溃疡病症状显著的半滑舌鳎患病个体用于病原分离与检测; 取体色正常、体表无损伤、活力良好, 平均体质量为(120±20) g、平均

收稿日期: 2011-08-05

修回日期: 2012-02-08

资助项目: 福建省海洋与渔业厅重点项目(2008-01-10); 公益性行业(农业)科研专题(201203085)

通讯作者: 常建波, E-mail: changjianbo@jmu.edu.cn

体长为(32±2) cm 的半滑舌鳎健康个体用于人工感染试验, 试验前饲养在集美大学水产学院海水养殖试验场, 暂养 2 周, 使其恢复体能、适应环境。

### 1.2 实验所用药物和试剂

弧菌科细菌生化鉴定管(杭州天和微生物试剂有限公司), 药敏纸片(杭州天和微生物试剂有限公司)、DNA 抽提试剂盒(OMEGA BIO-TEK)、gel Extraction Kit(OMEGA BIO-TEK)、pMD18-T Vector(TAKARA)。

### 1.3 病原菌分离

取症状典型的患病半滑舌鳎鳃、体表患病组织在显微镜下进行寄生虫和真菌排查。同时, 在无菌条件下从患病半滑舌鳎腹水、体表上分离细菌, 划线接种于 TCBS 平板、2216E 平板上, 于 28 °C 恒温箱培养 24 h, 挑取形态一致的优势菌落再次划线分离, 纯化获得纯培养的菌株, 转接到 TSA 平板上, -80 °C 保存备用。

### 1.4 人工感染试验

将分离纯化的 4 株优势菌接种于新鲜的 TSA 斜面, 28 °C 培养 18 h, 用无菌海水调制成浓度分别为  $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^3$  CFU/mL 的菌悬液, 备用。

取半滑舌鳎健康个体 140 尾, 按每 35 尾一组分为 4 个实验组, 分别进行上述 4 株优势菌的人工感染试验。每一实验组设置 7 个单元, 各 5 尾实验鱼。其中 6 个单元的实验鱼用于背肌注射不同浓度的菌悬液, 注射剂量为每尾 100  $\mu$ L, 另 1 个单元的实验鱼注射等量 PBS 作为实验对照。

实验鱼饲养于室内的水族箱内, 连续观察 14 d, 期间每天正常饲养并换水、吸除底污一次, 记录半滑舌鳎的发病症状和死亡情况, 按照 Reed 阐述的方法计算半数致死量<sup>[4]</sup>。

从人工感染后濒死的半滑舌鳎中, 取患病症状与自然患病濒死半滑舌鳎症状相似的实验鱼再次分离、纯化细菌, 并再次进行人工感染试验。

### 1.5 病原菌的鉴定

**形态、菌落特征观察及理化特性研究** 取纯培养菌接种于 TCBS 和 2216E 平板上, 观察其形态和菌落特征, 并进行革兰氏染色镜检; 接种到 TSA 平板培养 10 h 后, 无菌水洗下, 滴一滴在铜网上, 负染, 透射电镜观察。利用 Biolog 系统鉴定仪并结合

常规的生理生化鉴定方法对病原菌进行理化特性测定, 并参照《伯杰氏细菌学鉴定手册》进行分类<sup>[5]</sup>。

**PCR 模板 DNA 的制备** 取纯培养菌接种于 TSB 中 28 °C 培养 16 h, 参照 OMEGA 公司细菌组 DNA 抽提试剂盒所述方法提取 DNA 作为 PCR 模板。

**16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增和序列测定** 16S rRNA 基因 PCR 扩增的两个引物<sup>[6]</sup>分别为 P1: 5'-AGA GTT TGA TC(C/A)TGG CTC AG-3'、P2: 5'-ATT CAC CGT GGC ATT CTG ATC C-3'。在 25  $\mu$ L 反应体系中含有: ddH<sub>2</sub>O 16.75  $\mu$ L, 10×PCR buffer 2.5  $\mu$ L, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2  $\mu$ L, dNTPs 0.5  $\mu$ L, 引物各 0.5  $\mu$ L, 2.5 U/ $\mu$ L 的 *Taq* DNA 聚合酶 0.25  $\mu$ L, 模板 DNA 2  $\mu$ L。PCR 反应条件为 95 °C 预变性 2 min、94 °C 变性 30 s、58 °C 复性 45 s、72 °C 延伸 1 min 30 s, 30 个循环后 72 °C 温育 7 min。PCR 产物经纯化后与 pMD18-T Vector 连接, 连接产物转化 *E.coli* JM109 后, 涂布于含有氨苄青霉素(100  $\mu$ g/mL)的 LB 平板, 37 °C 过夜培养, 经 PCR 检测后挑取阳性克隆交由 IntrovoGen 公司进行基因序列测定。

***gyrB* 基因序列的 PCR 扩增与序列测定** *gyrB* 基因 PCR 扩增的两个引物分别为 P1: 5'-TCC GGC GGT CTG CAC GGC GT-3'、P2: 5'-TTG TCC GGG TTG TAC TCG TC-3'。在 25  $\mu$ L 反应体系中含有: ddH<sub>2</sub>O 16.75  $\mu$ L, 10×PCR buffer 2.5  $\mu$ L, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2  $\mu$ L, dNTP Mix 0.5  $\mu$ L, 引物各 0.5  $\mu$ L, 2.5 U/ $\mu$ L 的 *Taq* DNA 聚合酶 0.25  $\mu$ L, 模板 DNA 2  $\mu$ L。PCR 反应条件为 95 °C 预变性 5 min、94 °C 变性 1 min、57 °C 复性 1 min、72 °C 延伸 2 min, 30 个循环后 72 °C 温育 7 min。PCR 产物经纯化后与 pMD18-T Vector 连接, 连接产物转化 *E.coli* JM109 后, 涂布于含有氨苄青霉素(100  $\mu$ g/mL)的 LB 平板, 37 °C 过夜培养, 经 PCR 检测后挑取阳性克隆交由 IntrovoGen 公司进行基因序列测定。

**16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列分析与系统发育树的构建** 将分离菌的 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列通过 NCBI 的 Blast 检索系统进行序列同源性分析, 从中分别选取与所获的序列同源性较高的菌株的 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列, 用 MEGA 5.05 采用邻位相连法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统发育树, 通过自举分析(Bootstrap)进行置信度检测, 自举数集 1 000 次。

### 1.6 胞外产物酶活性及溶血活性检测结果

将分离菌接种于 TSB, 28 °C 摇床培养培养 36~48 h, 培养物经 12 000 r/min 离心 30 min, 取上清, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后, 即为胞外产物 (ECP)。按照文献[7-8]所述方法, 采用琼脂平板扩散法进行胞外产物酶活性检测。分别制备明胶 (0.4%)、脱脂牛奶 (10%)、淀粉 (1.0%)、吐温 80 (1.0%)、蛋黄 (2.5%)、尿素 (2.0%)、羊血 (4%) 的 TSA 平板。在平板上打孔, 分别加入 30 μL ECP, 28 °C 培养 24~36 h, 向明胶平板中加入酸性氯化汞溶液, 向淀粉平板中加入鲁戈氏碘液, 以出现透明圈 (明胶、蛋白酶、淀粉、羊血平板) 或不透明的晕圈 (蛋黄、吐温 80 平板) 或变成红色 (尿素平板) 为阳性。

### 1.7 药敏试验

采用药敏纸片法, 将药敏纸片置于涂满菌液的培养皿中, 24 h 后观察, 记录各药敏纸片的抑菌圈直径 (mm), 并按照药敏纸片抑菌范围解释标准判断实验结果。

## 2 结果

### 2.1 病鱼检查结果

患病半滑舌鲷主要表现为体表溃烂、尾部出血, 有些肠脱出肛外, 解剖发现腹腔内积有大量的腹水, 肝脏发白。通过水浸片显微镜下观察, 未发现有寄生虫和真菌。

### 2.2 病原菌的分离及其形态特征

从患病半滑舌鲷的皮肤分离到优势菌 4 株, 经后面的人工感染证实菌株 A3 为引起该疾病的病原菌。该菌株在 TCBS 和 2216E 培养基上的形态和培养特征分别为 A3 在 TCBS 上菌落圆形光滑、边缘整齐、较隆起、黄色, 培养 24 h 菌落直径多在 2 mm。在 2216E 上菌落圆形光滑、边缘整齐、较隆起、乳白色。革兰氏染色结果表明, 该菌是革兰氏阴性菌。透射电镜下, 该菌呈曲杆状, 两端钝圆, 菌体大小为 (0.9~1.1) μm × (1.3~1.9) μm 具有一根极生单鞭毛 (图 1)。

### 2.3 人工感染试验结果

以分离到的菌株感染半滑舌鲷, 菌株 A3 在感染 2 d 后半滑舌鲷就开始出现死亡, 而对照组在 14 d 内均正常 (表 1)。人工感染后实验鱼摄食量减少, 活力减弱, 皮肤出现溃疡、出血, 出现腹水, 而对照组不表现任何症状。由此计算出 A3 菌对半滑

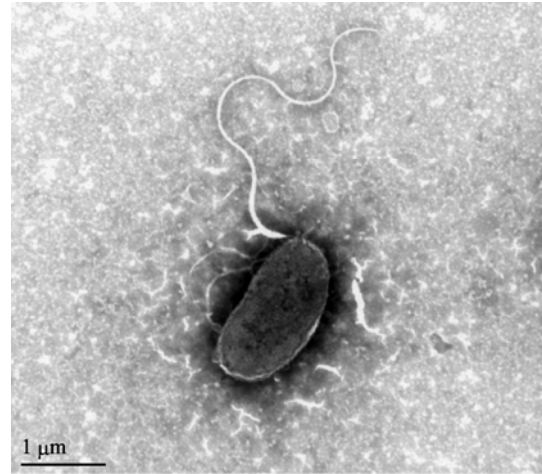


图 1 菌株 A3 的透射电镜观测图  
Fig. 1 The transmission electron microscopy of strain A3

表 1 菌株 A3 人工感染试验结果  
Tab. 1 Results of artificial infection of strain A3

| 组别<br>group             | 菌液浓度/<br>(CFU/mL)<br>concentration<br>of bacteria | 试验鱼数量/<br>尾<br>number of<br>trials | 试验鱼死亡<br>数量/尾<br>number of<br>deaths | 死亡率/%<br>mortality |
|-------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|--------------------|
| 试验组(A3)<br>experimental | $1.5 \times 10^8$                                 | 5                                  | 5                                    | 100                |
|                         | $1.5 \times 10^7$                                 | 5                                  | 5                                    | 100                |
|                         | $1.5 \times 10^6$                                 | 5                                  | 5                                    | 100                |
|                         | $1.5 \times 10^5$                                 | 5                                  | 5                                    | 100                |
|                         | $1.5 \times 10^4$                                 | 5                                  | 2                                    | 40                 |
| 对照组<br>control          | $1.5 \times 10^3$                                 | 5                                  | 1                                    | 20                 |
|                         | PBS                                               | 5                                  | 0                                    | 0                  |

舌鲷的  $LD_{50}$  为  $1.5 \times 10^{4.2}$  CFU/mL。

取人工感染后发病濒死半滑舌鲷病变组织接种于 TSA 平板, 可分离到大量菌落形态高度一致的细菌, 其菌落形态、大小以及生理生化特征均与 A3 菌株相同。取再次分离的菌株进行人工感染得到了一致的感染结果。

### 2.4 生理生化特征

经常规生理生化鉴定指标和 Biolog 自动鉴定系统结果显示, A3 菌株为哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 相似性达到 99.7%, 其生理生化试验结果见表 2。

### 2.5 16S rRNA 和 gyrB 基因序列分析及系统发育树构建

对 A3 菌株进行了 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列的测定, PCR 扩增产物电泳结果如图 2、图 3 所

表 2 菌株 A3 生理生化试验结果  
Tab. 2 Results of biochemical characteristics of strain A3

| 项目 items                                               | 结果 results | 项目 items                                              | 结果 results |
|--------------------------------------------------------|------------|-------------------------------------------------------|------------|
| 糊精 dextrin                                             | +          | 明胶 gelatin                                            | +          |
| D-麦芽糖 D-maltose                                        | +          | 甘氨酸-L-脯氨酸 glycyl-L-proline                            | +          |
| D-海藻糖 D-trehalose                                      | +          | L-丙氨酸 L-alanine                                       | +          |
| D-纤维二糖 D-cellobiose                                    | +          | L-精氨酸 L-arginine                                      | MN         |
| 龙胆 gentiobiose                                         | N          | L-天氨酸 L-aspartic acid                                 | +          |
| 蔗糖 sucrose                                             | +          | L-谷氨酸 L-glutamic acid                                 | +          |
| D-松二糖 D-turanose                                       | N          | L-组氨酸 L-histidine                                     | +          |
| 水苏糖 stachyose                                          | N          | L-焦古氨酸 L-pyroglutamic acid                            | N          |
| PH6                                                    | +          | L-丝氨酸 L-serine                                        | +          |
| PH5                                                    | -          | 林可霉素 lincomycin                                       | -          |
| D-棉子糖 D-raffinose                                      | N          | 盐酸胍 guanidine HCl                                     | MN         |
| $\alpha$ -D-乳糖 $\alpha$ -D-lactose                     | N          | 硫酸四癸钠 niaproof 4                                      | +          |
| D-蜜二糖 D-melibiose                                      | N          | 果胶 pectin                                             | +          |
| $\beta$ -甲基-D-葡萄糖苷 $\beta$ -methyl-D-glucoside         | MN         | D-半乳糖醛酸 D-galacturonic acid                           | N          |
| D-水杨苷 D-salicin                                        | +          | L-半乳糖酸内酯 L-galactonic acid lactone                    | N          |
| N-乙酰-D-氨基葡萄糖 N-acetyl-D-glucosamine                    | +          | D-葡萄糖酸 D-葡萄糖酸 D-gluconic acid                         | +          |
| N-乙酰- $\beta$ -D-氨基甘露 N-acetyl- $\beta$ -D-Mannosamine | +          | D-葡萄糖醛酸 D-glucuronic acid                             | +          |
| N-乙酰-D-半乳糖 N-acetyl-D-galactosamine                    | +          | 葡萄糖酰胺 glucuronamide                                   | B          |
| N-乙酰神经氨酸 N-acetyl neuraminic acid                      | N          | 粘酸 mucic acid                                         | N          |
| 1%氯化钠 1% NaCl                                          | +          | 奎尼酸 quinic acid                                       | N          |
| 4%氯化钠 4% NaCl                                          | +          | D-糖酸 D-saccharic acid                                 | N          |
| 8%氯化钠 8% NaCl                                          | +          | 万古霉素 vancomycin                                       | +          |
| $\alpha$ -D-葡萄糖 $\alpha$ -D-glucose                    | +          | 四氮唑紫 tetrazolium violet                               | -          |
| D-甘露糖 D-mannose                                        | +          | 四氮唑蓝 tetrazolium blue                                 | +          |
| D-果糖 D-fructose                                        | +          | 对羟基苯甲酸 p-gydroxy-phenylacetic acid                    | N          |
| D-半乳糖 D-galactose                                      | +          | 甲基丙酮酸 methyl pyruvate                                 | +          |
| 3-甲基葡萄糖 3-methyl glucose                               | N          | D-乳酸甲酯 D-lactic acid methyl ester                     | B          |
| D-岩藻糖 D-fucose                                         | N          | L-乳酸 L-lactic acid                                    | +          |
| L-岩藻糖 L-fucose                                         | B          | 柠檬酸 citric acid                                       | +          |
| L-鼠李糖 L-rhamnose                                       | B          | $\alpha$ -酮戊二酸 $\alpha$ -keto-glutaric acid           | N          |
| 肌苷 inosine                                             | +          | D-苹果酸 D-malic acid                                    | MN         |
| 1%乳酸钠 1% sodium lactate                                | +          | L-苹果酸 L-malic acid                                    | +          |
| 夫西地酸 fusidic acid                                      | +          | 溴丁二酸 bromo-succinic acid                              | +          |
| D-丝氨酸 D-serine                                         | +          | 萘啶酸 nalidixic acid                                    | -          |
| 山梨醇 D-sorbitol                                         | B          | 氯化锂 lithium chloride                                  | +          |
| D-甘露醇 D-mannitol                                       | +          | 甲酸盐 potassium tellurite                               | -          |
| D-阿拉伯糖醇 D-arabitol                                     | +          | 吐温 40 tween 40                                        | MN         |
| 肌醇 myo-inositol                                        | N          | g-氨基丁酸 g-amino-butryric acid                          | N          |
| 甘油 glycerol                                            | +          | $\alpha$ -羟基丁酸 $\alpha$ -hydroxy-butryric acid        | +          |
| D-葡萄糖-6-磷酸 D-glucose-6-PO <sub>4</sub>                 | +          | $\beta$ -羟基-D,L 酪酸 $\beta$ -hydroxy-D,L-butryric acid | N          |
| D-果糖-6-磷酸 D-fructose-6-PO <sub>4</sub>                 | +          | $\alpha$ -酮丁酸 $\alpha$ -keto-butryric acid            | +          |
| D-天冬氨酸 D-aspartic acid                                 | N          | 乙酰乙酸 acetoacetic acid                                 | +          |
| D-丝氨酸 D-serine                                         | +          | 丙酸 propionic acid                                     | N          |
| 醋竹桃霉素 troleandomycin                                   | MN         | 醋酸 acetic acid                                        | +          |
| 利福霉素 SV rifamycin SV                                   | +          | 甲酸 formic acid                                        | N          |
| 米诺环素 minocycline                                       | -          | 氨曲南 aztreonam                                         | -          |
| 氧化酶 oxidase                                            | +          | 丁酸钠 sodium butyrate                                   | -          |
| 触酶 accelerant                                          | +          | 溴酸钠 sodium bromate                                    | -          |
| 糖发酵(O/F)                                               | F          |                                                       |            |

注: +. 阳性; -. 阴性; B. 临界; F. 发酵; MN. 假阴性; N. 鉴定值低于 A1 孔。

Notes: +. positive; -. negative; F. fermentation; MN. mismatched negative; N. the values less than A1 well in identification plate.

示, 其长度分别为 1379、1130 bp。菌株 A3 的 16S rRNA 基因序列经过 Blast 同源检索, 发现其与弧菌属同源性较高, 相似性为 98%~99%, 从中选取 6 个序列进行系统发育学分析, 结果表明菌株 A3 与哈维氏弧菌聚合(图 4), 不过置信度较低仅为 16%。将 *gyrB* 基因部分序列进行 Blast 分析, 发现该菌株与哈维氏弧菌极为相似(相似性 100%)。系统发育树(图 5)显示, 该菌株与哈维氏弧菌聚为一支, 且置信度为 100%。结合菌株 A3 的生理生化特征和 16S rRNA、*gyrB* 基因序列分析结果, 有较充分的依据确认该菌为哈维氏弧菌。

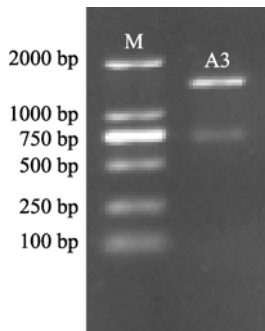


图 2 16 S rRNA PCR 产物琼脂糖电泳图  
Fig. 2 Agarose electrophoresis of 16 S rRNA PCR products

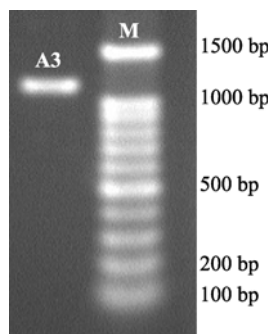


图 3 *gyrB* PCR 产物琼脂糖电泳图  
Fig. 3 Agarose electrophoresis of *gyrB* PCR products

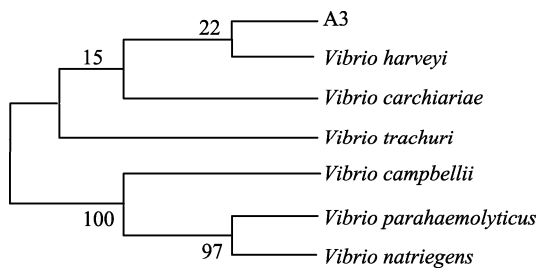


图 4 16S rDNA 序列构建的系统发育树  
Fig. 4 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence

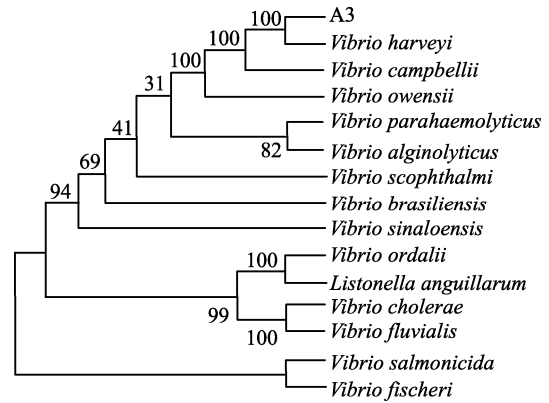


图 5 *gyrB* 序列构建的系统发育树  
Fig. 5 Phylogenetic tree based on *gyrB* sequence

2.6 胞外产物酶活性及溶血活性结果

菌株 A3 的胞外产物具有淀粉酶、尿素酶、脂肪酶、蛋白酶和卵磷脂酶活性而不具有明胶酶活性, 在 4%羊血 TSA 平板上呈 β 溶血活性。

2.7 药敏试验

在所试的 17 种抗生素中, A3 菌株对四环素、强力霉素、诺氟沙星、磺胺异噁唑、氧氟沙星、新生霉素、萘啶酸、氟啶酸和左氧氟沙星敏感, 而对其他用于试验的抗生素敏感度低或具有一定的抗性(表 3)。

3 讨论

通过对患有皮肤性溃疡病的半滑舌鳎进行解剖、细菌分离鉴定以及回归感染试验, 结果显示其中的两株菌有致病性, 其中一株为本实验所报道的哈维氏弧菌, 另一株为轮虫弧菌, 其余两株菌对半滑舌鳎无致病性。这两株致病菌无论是单独还是混合感染均能引起半滑舌鳎致病, 且感染症状与自然发病症状相似。

哈维氏弧菌是海水养殖鱼类中一种比较常见的致病性弧菌, 能感染海水养殖鱼类如大菱鲂(*Scophthalmus maximus* L.)<sup>[9]</sup>、鲈(*Lateolabrax japonicus*)<sup>[10-11]</sup>、青石斑鱼(*Epinephelus awoara*)<sup>[12]</sup>、斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)<sup>[13]</sup>、塞内加尔鳎(*Solea senegalensis*)和塞内加尔鳍截鳎(*Dicologlossa cuneata*)<sup>[14-18]</sup>等, 并且引发不同程度的皮肤溃疡性疾病。目前已有一些学者对引起半滑舌鳎患病的细菌性疾病进行了相关的报道, 如发光杆菌杀鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*)<sup>[19]</sup>、鳃利斯顿氏菌 (*Listonella anguillarum*)<sup>[20-21]</sup>和副溶血弧

表 3 药敏试验结果  
Tab.3 The results of the drug sensitivity test

| 药品<br>drug           | 药物含量<br>( $\mu\text{g}/\text{disc}$ )<br>concentration | 抑菌圈直径/mm<br>diameters of micro-<br>biostatic circles/mm | 敏感性<br>sensitivity | 药品<br>drug                                      | 药物含量<br>( $\mu\text{g}/\text{disc}$ )<br>concentration | 抑菌圈直径/mm<br>diameters of micro-<br>biostatic circles | 敏感性<br>sensitivity |
|----------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------|
| 青霉素 penicillin       | 10                                                     | -                                                       | R                  | 氧氟沙星 ofloxacin                                  | 5                                                      | 21                                                   | S                  |
| 卡那霉素<br>kanamycin    | 30                                                     | 15                                                      | I                  | 左氧氟沙星<br>levofloxacin                           | 5                                                      | 26                                                   | S                  |
| 链霉素<br>streptomycin  | 10                                                     | -                                                       | R                  | 诺氟沙星<br>norfloxacin                             | 10                                                     | 26                                                   | S                  |
| 四环素<br>tetracycline  | 30                                                     | 20                                                      | S                  | 萘啶酸 nalidixan                                   | 30                                                     | 25                                                   | S                  |
| 强力霉素<br>doxycycline  | 30                                                     | 19                                                      | S                  | 氟啶酸 enoxacin                                    | 10                                                     | 22                                                   | S                  |
| 阿奇霉素<br>azithromycin | 15                                                     | 16                                                      | I                  | 吡哌酸 pipemidic                                   | 30                                                     | 18                                                   | R                  |
| 新生霉素<br>novobiocin   | 30                                                     | 18                                                      | S                  | 磺胺异噁唑<br>sulfafurazole                          | 30                                                     | 25                                                   | M                  |
| 利福平 rifampin         | 5                                                      | 19                                                      | I                  | 复方磺胺甲噁唑<br>sulfamethoxazole<br>and trimethoprim | 15                                                     | 27                                                   | I                  |
| 甲氧苄啶<br>trimethoprim | 5                                                      | 6                                                       | R                  |                                                 |                                                        |                                                      |                    |

注: R. 耐药; I. 中度敏感; S. 敏感

Notes: R. resistance; I. intermediate; S. sensitive.

菌<sup>[22]</sup> (*V. parahemolyticus*), 但是从患病的半滑舌鲷体表分离出哈维氏弧菌尚属首次。

目前 16S rRNA 基因序列分析方法已被广泛用于鱼类细菌性疾病诊断<sup>[23-25]</sup>, 但是 16S rRNA 基因序列高度保守, 对于属以下的分类单位, 分辨率明显不足。gyrB 即促旋酶( gyrase)的 B 亚单位基因, 是与 DNA 复制、限制、修饰或修复有关的蛋白编码基因。gyrB 基因存在于大多数细菌中, 并且不会发生频繁的水平转移, 在不同的蛋白及蛋白的不同位点, 其氨基酸替代率也不相同<sup>[26]</sup>。因此, gyrB 基因在细菌的系统发育学, 特别是近缘种和菌株的区分及鉴定方面由于其明显的优越性而受到了高度关注<sup>[27-29]</sup>。本研究中以 gyrB 基因构建的系统发育树在置信度上明显高于 16S rRNA 基因, 应用于海洋弧菌的分类研究, gyrB 基因比 16S rRNA 基因更具有灵敏度和可靠性, 值得今后进一步研究探讨。

胞外产物(ECP)是细菌在生长与繁殖过程中不断向外界环境中释放的代谢物质, 包括多种酶和外毒素, 现已发现嗜水气单胞菌<sup>[30]</sup>、副溶血弧菌<sup>[31]</sup>、溶藻弧菌<sup>[32]</sup>和迟缓爱德华氏菌<sup>[33]</sup>等多种水产动物病原菌的胞外产物具有明显的致病性, 并导致鱼类出现与这些病原菌感染相似的症状和病理变化, 从而证实了这些病原菌的胞外产物在鱼类的感染

致病中发挥着重要的作用, 为研究这些致病菌的致病机理奠定了基础。Saed<sup>[34]</sup>研究发现哈维氏弧菌的胞外产物对棕色斑点石斑鱼有致病性, 另外许多研究结果<sup>[35-37]</sup>指出, 哈维氏弧菌分泌的胞外产物可能对水产养殖动物的致病性起重要作用。实验结果表明, 该病原菌胞外产物具有多种酶活性和溶血活性, 这与上述学者针对哈维氏弧菌的研究结果基本一致, 也为进一步确认所分离病原菌株的致病机理和免疫防治提供了一定的基础。

#### 参考文献:

- [1] 刘彦, 窦海鸽. 半滑舌鲷生物学特征及其增殖发展前景[J]. 中国水产科学, 2005, (3): 62-64.
- [2] 柳学周, 庄志猛, 马爱军, 等. 半滑舌鲷繁殖生物学及繁育技术研究[J]. 海洋水产研究, 2005, 20(5): 7-14.
- [3] 姜言伟, 万瑞景, 陈瑞盛. 渤海半滑舌鲷人工育苗工艺技术的研究[J]. 海洋水产研究, 1993 (14): 25-33.
- [4] Reed L J, Muech H. A simple method of estimating fifty percent endpoints[J]. American Journal of Hygiene, 1938, 27:493-497.
- [5] Brenner D J, Krieg N R, Staley J T. Bergey's manual of systematic bacteriology [M]. 10th Edn. Newyork: Springer-Verlog, 2004.
- [6] 李宁求, 白俊杰, 吴淑琴, 等. 斜带石斑鱼 3 种致病性弧菌的分子生物学鉴定[J]. 水产学报, 2005, 29(3): 356-361.

- [7] 阳涛, 汪开毓. 南方鲇源豚鼠气单胞菌胞外产物活性与致病性研究[J]. 淡水渔业, 2008, 38(2): 40-45.
- [8] 陈德芳, 汪开毓. 斑点叉尾鮰源嗜麦芽寡养单胞菌胞外产物的生物学特性与致病性研究[J]. 水利渔业, 2008, 28(1): 99-101.
- [9] 范文辉, 王秀华, 史成银, 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.
- [10] 王国良, 金珊. 海水网箱养殖鲈鱼皮肤溃疡病及其病原菌的研究[J]. 黄渤海海洋, 2000, 18(3): 1-6.
- [11] 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.
- [12] 覃映雪, 池信, 苏永全, 等. 网箱养殖青石斑鱼的溃疡病病原[J]. 水产学报, 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[J]. 中国水产科学, 2004, 11(4): 313-317.
- [14] Zorrilla I, Arijó S, Chabrilón M, et al. *Vibrio* species isolated from diseased farmed sole, *Solea senegalensis* (Kaup), and evaluation of the potential virulence role of their extracellular products[J]. Fish Disease, 2003, 26(2): 103-108.
- [15] Rico R M, Tapia-Paniagua S, Martínez-Manzanares E, et al. Characterization of *Vibrio harveyi* strains recovered from diseased farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*)[J]. Applied Microbiology, 2008, 105(3): 752-760.
- [16] Arijó S, Chabrilón M, Díaz-Rosales P, et al. Bacteria isolated from outbreaks affecting cultured sole, *Solea senegalensis* (Kaup)[J]. European Association of Fish Pathologists, 2005, 25(4): 148-154.
- [17] Chabrilón M, Rico R M, Arijó S, et al. Interactions of microorganisms isolated from gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. on *Vibrio harveyi*, a pathogen of farmed Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup)[J]. Fish Disease, 2005, 28(9): 531-537.
- [18] López J R, de la Roca E, Nuñez S, et al. Identification of *Vibrio harveyi* isolated from diseased cultured wedge sole *Dicologlossa cuneata*[J]. Disease of Aquatic Organisms, 2009, 84(3): 209-217.
- [19] Wang Y, Han Y, Li Y, et al. Isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from diseased tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther) in China[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(5): 763-768.
- [20] Tian X Q, Zhou L, Zhan W B. Isolation and characterization of pathogenic *Listonella anguillarum* of diseased half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther)[J]. Journal of Ocean University of China, 2008, 7(3): 343-351.
- [21] 张晓君, 秦国民, 阎斌伦, 等. 半滑舌鳎病原鳃利斯顿氏菌表型及分子特征研究[J]. 海洋学报, 2009, 31(5): 112-122.
- [22] 郑法新, 程璐. 云南红豆杉内生放线菌对半滑舌鳎病原菌的拮抗作用研究[J]. 科学养鱼, 2009, 7: 48-50.
- [23] 叶军, 孔杰, 刘萍, 等. 对虾病原菌 2-5B 菌株 16S rRNA 基因片段的克隆和序列测定[J]. 海洋水产研究, 1997, 18(1): 9-15.
- [24] 莫照兰, 徐永力, 张培军. 养殖牙鲆鳃弧菌疫苗的研究[J]. 海洋科学, 2002, 26(4): 63-66.
- [25] Aznar R, Ludwig W, Amann R I, et al. Sequence determination of rRNA genes of pathogenic *Vibrio* species and whole-cell identification of *Vibrio vulnificus* with rRNA-targeted oligonucleotide probes[J]. Journal of Systematic Bacteriology, 1994, 44(2): 330-337.
- [26] 侯晓丽, 陈智. 分类及鉴别细菌的新靶标-gyrB 基因[J]. 国外医学: 流行病学传染病学分册, 2005, 32(1): 38-41.
- [27] Yamamoto S, Harayama S. Phylogenetic analysis of *Acinetobacter* strains based on the nucleotide sequences of gyrB genes and on the amino acid sequences of their products[J]. Journal of Systematic Bacteriology, 1996, 46(2): 506-511.
- [28] Zhang X J, Qin G M, Yan B L, et al. Phenotypic and molecular characterization of pathogenic *Listonella anguillarum* isolated from half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2009, 31(5): 112-122.
- [29] Venkateswaran K, Dohmoto N, Harayama S. Cloning and nucleotide sequence of the gyrB gene of *Vibrio parahaemolyticus* and its application in detection of this pathogen in shrimp[J]. American Society for Microbiology, 1998, 64(2): 681-687.
- [30] Rodriguez L A, Ellis A E. Purification and characterization of an extracellular metalloprotease, serine protease and haemolysin of *Aeromonas hydrophila* strain B32: all are lethal for fish[J]. Microbial Pathogenesis, 1992, 13(1): 17-24.
- [31] 徐海圣, 舒妙安, 占秀安, 等. 养殖河蟹弧菌病原菌分离鉴定及其胞外产物的致病性[J]. 水产学报, 2002, 26(4): 357-362.
- [32] 金珊, 郑天伦, 王国良, 等. 溶藻弧菌胞外产物对大黄鱼的致病性[J]. 中国兽医学报, 2004, 24(5): 439-441.
- [33] 葛艳, 陈怀青, 陆承平. 迟缓爱德华氏菌胞外产物的细胞毒性和动物致病性[J]. 中国兽医学报, 2000, 20(1): 34-37.
- [34] Saeed M O. Association of *Vibrio harveyi* with mortalities in cultured marine fish in Kuwait[J]. Aquaculture, 1995, 136(1): 21-29.
- [35] Liu P C, Lee K K, Chen S N. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon* [J]. Letters in Applied Microbiology, 1996, 22(6): 413-416.
- [36] Liu P C, Lee K K. Cysteine proteinase is a major exotoxin of pathogenic luminous *Vibrio harveyi* in the tiger prawn, *Penaeus monodon* [J]. Letters in Applied Microbiology, 1999, 28(6): 428-430.
- [37] Montero AB, Austin B. Characterization of extracellular products from an isolate of *Vibrio harveyi* recovered from diseased post larval *Penaeus vanamei* (Bonne) [J]. Fish Disease, 1999, 22(5): 377-386.

## Study on pathogen of skin ulcer disease of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)

CHEN Zheng-qiang<sup>1,2,3</sup>, YAO Zhi-xian<sup>1</sup>, LIN Mao<sup>1,2,3</sup>, CHANG Jian-bo<sup>1,2,3\*</sup>

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety, Fujian Province, Jimei University, Xiamen 361021, China;

3. Institute of Aquaculture Biotechnology, Jimei University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** The pathogen was isolated from lesion and was identified by artificial infection in order to investigate the pathogen of skin ulcer of *Cynoglossus semilaevis*. The morphological, physiological and biochemical characteristics, and the activity of extracellular products and hemolysin and the sensitivity to the antimicrobial agents were studied, the 16S rRNA and *gyrB* genes were partially sequenced and compared with sequences deposited in GenBank, and the molecular phylogenetic trees were constructed. Four strains of dominant bacteria associated with serious skin ulcers were isolated from half-smooth tongue sole, *C. semilaevis*. Bacterial strain A3 was proved to be a pathogen by muscle injection with bacteria suspension, and the LD<sub>50</sub> was  $1.5 \times 10^{4.2}$  CFU/mL. The GenBank accession no. was JN391271 and JN 168881 respectively of sequenced 16S rRNA gene and *gyrB* gene of isolate. 16S rRNA and *gyrB* genes exhibited high similarity with *Vibrio harveyi* from GenBank database. The results of physiological and biochemical tests and molecular identification suggested that the pathogen was *V. harveyi*. Detection of the activity of extracellular products and hemolysin showed that the strain could produce amylase, lipase, urease, lecithinase, proteinase and with  $\beta$  haemolysis in containing 4% defibrinated rabbit blood of TSA plates, but no gelatinase. The results of drug resistance of the pathogen to 17 antimicrobial agents showed that the strain was sensitive to tetracycline, doxycycline, norfloxacin, sulfafurazole and so on, but lowly sensitive or resistant to other tested antimicrobial agents.

**Key words:** *Cynoglossus semilaevis*; skin ulcer disease; *Vibrio harveyi*; 16S rRNA gene; *gyrB* gene;

**Corresponding author:** CHANG Jian-bo. E-mail: changjianbo@jmu.edu.cn