



## 患腹水病牙鲆病原菌分离、鉴定及病原菌的特性

尚 琨<sup>1,2,3</sup>, 曲凌云<sup>1,2\*</sup>, 王玉芬<sup>4</sup>, 王 斌<sup>3</sup>,  
赵 涵<sup>5</sup>, 高 萍<sup>1,2</sup>, 刘 欣<sup>6</sup>

- (1. 自然资源部第一海洋研究所, 山东 青岛 266061;  
2. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266235;  
3. 大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁 大连 116023;  
4. 中国水产科学研究院北戴河中心实验站, 河北 秦皇岛 066100;  
5. 青岛大学附属医院, 山东 青岛 266032;  
6. 齐鲁工业大学生物工程学院, 山东 济南 250353)

**摘要:** 为确定引起河北北戴河地区养殖牙鲆患腹水病死亡的病原, 本实验从患腹水病牙鲆体内分离到3株优势菌, 对分离株进行生理生化鉴定和16S *rRNA*序列比对来确定分离株的生物学地位, 进一步通过毒力基因(*toxR*、*vhhA*、*vhhB*)鉴定及组织病理学分析其病理特征, 并通过人工回感实验分析分离株毒性。结果显示, 通过生理生化实验及16S *rRNA*序列比对, 确定此次从患病牙鲆中分离到的3株菌株均为哈维氏弧菌; 经鉴定, 3株分离株毒力基因(*toxR*、*vhhA*、*vhhB*)结果均为阳性, 病理组织切片结果显示, 该分离株对牙鲆多器官(肠、肾脏、脾脏和肝脏)均可造成不同程度的病理损伤, 呈全身性感染; 人工回感实验显示, 菌株BDHYPPFS-Y1G对牙鲆的半致死浓度为 $LD_{50}=5.88 \times 10^6$  CFU/mL, 低于自然状态毒性; 药敏实验表明, 3株分离株均对呋喃妥因高度敏感。本实验确认了此次牙鲆腹水病的病原菌, 并初步研究了病原菌致病性以及药物敏感性, 以为牙鲆工厂化养殖疫病防控提供科学依据。

**关键词:** 牙鲆; 腹水病; 哈维氏弧菌; 分离; 鉴定

中图分类号: S 917.1

文献标志码: A

腹水病是鲆鲽鱼类养殖过程中危害严重的疾病之一。国内报道的鲆鲽鱼类腹水病病原包括迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)<sup>[1-2]</sup>、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)<sup>[3]</sup>、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)<sup>[4]</sup>、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)<sup>[5]</sup>等。夏季是养殖鲆鲽鱼类腹水病频繁暴发的时期, 患腹水病病鱼的主要特征为行动迟缓、摄食能力减弱、体表变黑、腹部膨胀, 失去原有的体型比例; 鱼体腹腔或肠道

内有不同程度无色或淡黄色积液, 肝脏由淡红色变成米黄色<sup>[6]</sup>。由于鲆鲽鱼类腹水病可由单个或多个病原菌共同引发, 且传染性强、死亡率高, 这对不同地区病原菌的确定、腹水病的防控以及患病鱼的治疗造成了一定的困难。因此, 加强对鲆鲽鱼类腹水病病原的分离和鉴定, 详细了解鲆鲽鱼类腹水病病原, 对有效防控鲆鲽鱼类腹水病具有重要意义。

2018年9月, 河北北戴河地区养殖牙鲆发生

收稿日期: 2018-12-20 修回日期: 2019-04-26

资助项目: 国家重点研发计划(2017YFC1404504); 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室渔业科技青年人才计划(2018-MFS-T16); 鳌山科技创新计划(2015ASKJ02-03)

通信作者: 曲凌云, E-mail: qlly@fio.org.cn

腹水病, 在半个月的病程中牙鲆累计死亡率超过60%。为查清病原, 本实验室对患有腹水症的濒死牙鲆进行了病原菌分离纯化和验证, 以期为牙鲆生产养殖过程中有效防治腹水病提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

患病牙鲆取自河北北戴河地区某牙鲆养殖场, 挑选具有典型腹水症状的牙鲆, 体质量为(34±1) g, 体长为(15±1) cm; 健康牙鲆取自青岛胶南养殖场, 体质量为(20±1) g, 体长为(13±1) cm。

### 1.2 病原菌分离纯化

无菌条件下, 取具有典型腹水症状的濒死牙鲆的肝脏、肾脏、脾脏等病灶组织, 研磨稀释后涂布于TCBS培养基和2216 E培养基, 30 °C培养24 h后肉眼观察菌落形态、大小、颜色等, 挑取不同形态的优势菌落进行3次以上的纯化培养, 保存备用, 菌株编号分别为BDHYPFS-Y1G、BDHYPFS-Y2P、BDHYPFS-Y2S。

### 1.3 组织病理观察

取健康和自然发病牙鲆的肝脏、脾脏和肾脏等组织, 于Bouin氏液固定12~24 h后转入75%酒精保存。组织样品通过清洗、脱水、石蜡包埋、切片、H.E染色、清洗及封片后, 在倒置生物显微镜(尼康TE2000-U)下观察并拍照记录。

### 1.4 病原菌鉴定

**生理生化特征分析** 将分离株BDHYPFS-Y1G、BDHYPFS-Y2P和BDHYPFS-Y2S分别接种于2216E固体培养基上, 28 °C恒温培养24 h后, 用无菌接种环挑取适量单菌落接种于细菌微量鉴定管中, 用无菌封口膜封口, (36±1)°C恒温培养。

**分子生物学鉴定** 挑取新鲜培养的单菌落于无菌水中, 99 °C水浴20 min, 取上清液作为模板。利用通用引物扩增16S *rRNA*基因全长, 同时利用特异性引物检测其毒力基因(表1)。反应体系60 μL: 10 μmol/L的正/反向引物各3 μL, DNA模板3 μL, 2×*Taq* mix 30 μL, 无菌水补至60 μL。反应条件: 95 °C预变性5 min, 94 °C变性45 s, 42~55 °C退火45 s(不同引物退火温度不同, 表1), 72 °C延伸90 s, 34个循环; 72 °C终延伸10 min。PCR反应产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将返回的测序菌种的16S *rRNA*基因扩增序列通过EzBio Cloud数据库进行序列同源性分析, 比对后将该菌种的16S *rRNA*基因扩增序列提交到GenBank进行序列号的注册, 获取登录号。用Clustal W软件将NCBI数据库中获得的相关度较高的序列和其他种属的序列进行多序列比对, 用MEGA 6.0软件采用邻接法(NJ)构建系统发育树, 并通过自举分析(bootstrap)进行置信度检测, 自举数据集为1 000次。

### 1.5 人工回感实验

按照蒋魁等<sup>[10]</sup>的方法, 取健康牙鲆幼鱼180尾, 暂养1周后进行人工回感实验。将纯化的菌株BDHYPFS-Y1G用无菌生理盐水制成菌悬液, 将菌液浓度调整成10<sup>8</sup> CFU/mL, 10倍梯度稀释至10<sup>4</sup> CFU/mL, 共5个实验组, 每组3个平行, 每个平行10尾鱼, 每尾鱼腹腔注射300 μL菌悬液, 对照组注射同等体积的生理盐水。在水温(19±1) °C下连续观察7 d并记录实验鱼的发病特征、死亡情况及濒死症状。解剖观察濒死牙鲆体内的器官病变情况, 取病变组织及腹水进行病原菌的分离与鉴定。采用寇氏法计算菌株BDHYPFS-Y1G的半致死量:

$$\lg LD_{50} = X_g - d \left( \sum P - 0.5 \right)$$

式中,  $X_g$ 为死亡率为100%组的对数剂量,  $d$ 为对

表 1 腹水病病原菌引物序列

Tab. 1 Primer sequence of ascites pathogen

基因 genes	片段大小/bp fragment size	PCR引物序列(5'-3') primer sequence of PCR	退火温度/°C annealing temperature	参考文献 references
16S <i>rRNA</i>	1 500	27-F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 1492rrrr: GGTTACCTTGTACGACTT	55	[7]
<i>toxR</i>	390	<i>ToxR</i> -F: TTCTGAAGCAGCACTCAC <i>ToxR</i> -R: TCGACTGGTGAAGACTCA	42	[8]
<i>vhhA</i>	1 300	<i>vhhA</i> -F: ATCATGAATAAAACTATTACGTTACT <i>vhhA</i> -R: GAAAGGATGGTTGACAAT	53	[9]
<i>vhhB</i>	216	<i>VhhB</i> -F: TCAGTGCCTCTCAAGTAAGA <i>VhhB</i> -R: GCTTGATAACACTTTGCGGT	53	[9]

数组距,  $\sum P$ 为各组死亡率之和。

### 1.6 药敏实验

采用药敏纸片扩散法对3株优势菌进行药敏实验。取100  $\mu$ L新鲜菌液涂布于2216E琼脂培养基上,用无菌镊子将药敏纸片(杭州微生物试剂有限公司)贴于培养基表面,30  $^{\circ}$ C培养24 h后,根据杭州微生物试剂有限公司提供的《药敏试验纸片法的抑菌范围解释标准》,通过测定抑菌圈直径确定病原菌株对抗生素的耐药性。

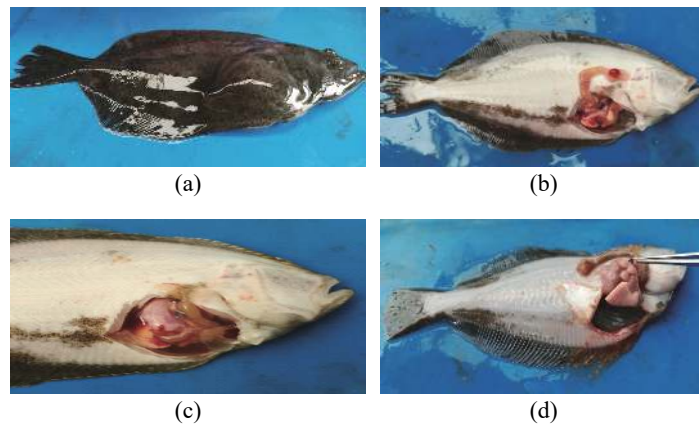


图1 自然发病牙鲆的临床症状

(a) 病鱼腹部肿大; (b) 病鱼肠道末端红肿; (c) 病鱼腹腔有大量的腹水; (d) 病鱼肝脏发白

Fig. 1 Clinical symptoms of naturally infected *P. olivaceus*

(a) swelling of abdomen in diseased fish; (b) redness and swelling at the end of the hindgut; (c) abdomen of sick fish had a large amount of ascites; (d) blanching of liver in diseased fish

### 2.2 主要器官组织病理结果

与对照组相比,患病牙鲆肠道上皮组织中的杯状细胞数量增多,固有层毛细血管网萎缩,黏膜层和黏膜固有层组织分离(图版-2)。患病牙鲆肝脏内呈明显脂肪变性和空泡变性,细胞核被挤压至一侧,胞质间出现大小不等的空泡,细胞界限不明显,胞内物质凝缩,染色变深,嗜碱性,肝组织出现红细胞浸润(图版-4)。患病牙鲆脾脏中的组织结构松散,红髓、白髓结构不清晰,椭圆体萎缩,结构变形,出现大小不等的缝隙(图版-6)。患病牙鲆肾脏的造血组织出现局灶性大面积坏死;肾小球上皮细胞萎缩溶解,基膜解体破碎,肾间质结构松散(图版-8)。

### 2.3 病原菌分离与鉴定结果

通过分离纯化方法分别从患病牙鲆的肾脏、脾脏、肝脏中获得3株优势菌,其菌落特征

<http://www.scxuebao.cn>

## 2 结果

### 2.1 患病牙鲆病症

患病牙鲆表现为食欲减退或丧失,体色发黑,游动失去平衡,游动力减弱,腹部肿大(图1-a),严重时肠道挤出肛门外,半个月累计死亡率高达60%以上。濒死病鱼解剖后肠道底部肿大(图1-b),部分鱼体肠道肿胀透明,腹腔内充满淡黄色腹水(图1-c),肠道内少量白便,肝脏呈乳白色(图1-d),部分鱼体肝脏有出血点。

一致,在TCBS培养基上为黄色、不透明、平滑、边缘无透明圈(图2-a);在2216E培养基上均

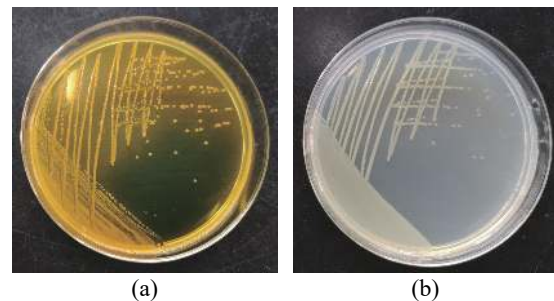


图2 菌株BDHYPFS-Y1G在不同培养基上的菌落形态 (a) 菌株BDHYPFS-Y1G在TCBS培养基上的菌落形态; (b) 菌株BDHYPFS-Y1G在2216E培养基上的菌落形态

Fig. 2 Colony morphologies of BDHYPFS-Y1G on different plates

(a) colony morphologies of BDHYPFS-Y1G on TCBS plate; (b) colony morphologies of BDHYPFS-Y1G on 2216E plate

为灰白色、不透明、平滑、边缘无透明圈(图2-b)。

**生化鉴定** 利用细菌微量鉴定管分别对分离株BDHYPFS-Y1G、BDHYPFS-Y2P、BDHYPFS-Y2S进行鉴定, 结果显示, 3株分离株生理生化鉴定结果相同, 均可发酵肌醇、山梨糖醇、鼠李糖、蔗糖、蜜二糖、苦杏仁苷、甘

露醇、山梨醇、棉子糖、水杨苷、麦芽糖; 赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶、色氨酸脱羧酶、尿素酶、VP、明胶液化、葡萄糖产气实验呈阳性; 可在1%、3%、6%和10% NaCl胨水中生长; 精氨酸双水解酶、阿拉伯糖发酵、H<sub>2</sub>S产气等11个实验检测结果均为阴性(表2)。

表 2 病原菌的理化特性

Tab. 2 Physiological and biochemical characteristics of pathogenic bacteria

实验项目 test items	结果 results			实验项目 test items	结果 results		
	1	2	3		1	2	3
阿拉伯糖 arabinose	-	-	-	鼠李糖 rhamnose	+	+	+
H <sub>2</sub> S	-	-	-	蔗糖 sucrose	+	+	+
明胶 gelatin	+	+	+	甘露醇 mannitol	+	+	+
赖氨酸脱羧酶 lysine decarboxylase	+	+	+	山梨醇 sorbitol	+	+	+
鸟氨酸脱羧酶 ornithine decarboxylase	+	+	+	蜜二糖 melibiose	+	+	+
精氨酸双水解酶 arginine dihydrolase	-	-	-	苦杏仁苷 amygdalin	+	+	+
色氨酸脱羧酶 tryptophane decarboxylase	-	-	-	肌醇发酵 inositol fermentation	-	-	-
ONPG	-	-	-	棉子糖 raffinose	+	+	+
葡萄糖产气 glucose gas production	+	+	+	七叶苷 raffinose	-	-	-
V-P	+	+	+	水杨苷 saligenin	+	+	+
尿素酶 urea enzymes	+	+	+	木糖 xylose	-	-	-
西蒙氏柠檬酸盐 simone citrate	-	-	-	无盐胨水 no salt peptone water	-	-	-
脂酶 lipoidase	-	-	-	1% NaCl	+	+	+
麦芽糖 maltose	+	+	+	3% NaCl	+	+	+
吲哚实验 indole test	-	-	-	6% NaCl	+	+	+
				10% NaCl	+	+	+

注: +. 阳性, -. 阴性; 1. 菌株BDHYPFS-Y2S, 2. 菌株BDHYPFS-Y2P, 3. 菌株BDHYPFS-Y1G

Notes: +. positive, -. negative; 1. BDHYPFS-Y2S, 2. BDHYPFS-Y2P, 3. BDHYPFS-Y1G

**分子生物学鉴定** 对菌株BDHYPFS-Y2S、BDHYPFS-Y2P和BDHYPFS-Y1G进行PCR扩增, 得到的16S *rRNA*基因片段序列结果输入到EzBio Cloud数据库中进行序列比对, 发现菌株BDHYPFS-Y2S、BDHYPFS-Y2P和BDHYPFS-Y1G均为哈维氏弧菌, 与哈维氏弧菌参考菌株同源性分别为99.25%、99.72%和99.11%。

选择GenBank数据库中已报道的同源性较高的哈维氏弧菌以及其他种属的细菌的16S *rRNA*基因序列进行同源性比对。利用MEGA 6.0软件采用邻接法构建系统发育树, 结果显示, 菌株BDHYPFS-Y2S、BDHYPFS-Y2P和BDHYPFS-Y1G均与哈维氏弧菌标准株聚为一支(图3)。

毒力基因特异性PCR结果显示, 菌株BDHYPFS-Y2S、BDHYPFS-Y2P和BDHYPFS-Y1G扩增*toxR*、*vhhB*和*vhhA*基因均为阳性(图4)。

## 2.4 人工回感实验及半致死量测定

人工回感实验发现, 注射BDHYPFS-Y1G后24 h内开始出现腹水症状, 感染期间对照组未见死亡情况; BDHYPFS-Y1G感染的实验组死亡鱼体出现的腹水症状, 与养殖场中自然发病的牙鲆症状相同。同时, 从感染的病鱼中再次分离到优势菌, 生理生化鉴定结果与菌株BDHYPFS-Y1G一致, 且16S *rRNA*序列比对与菌株BDHYPFS-Y1G的一致性为100%。实验表明, 菌株BDHYPFS-

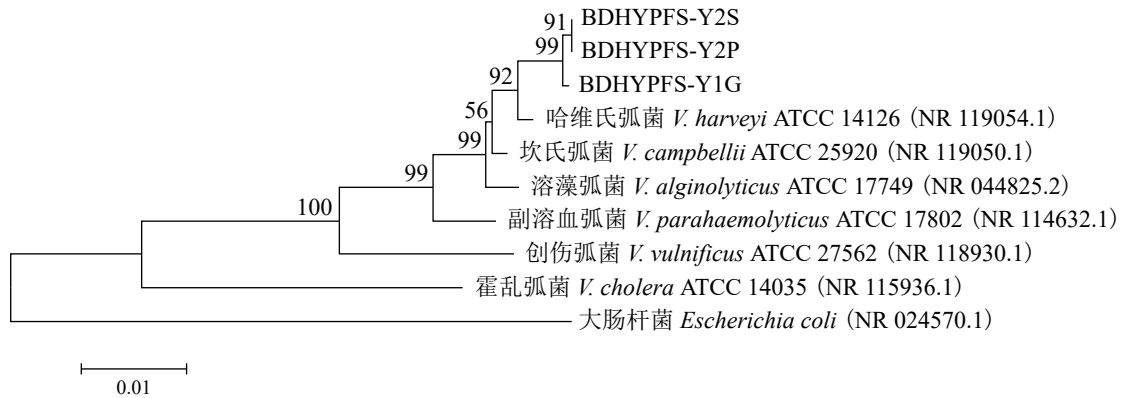


图3 基于16S rRNA基因序列的系统发育进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence

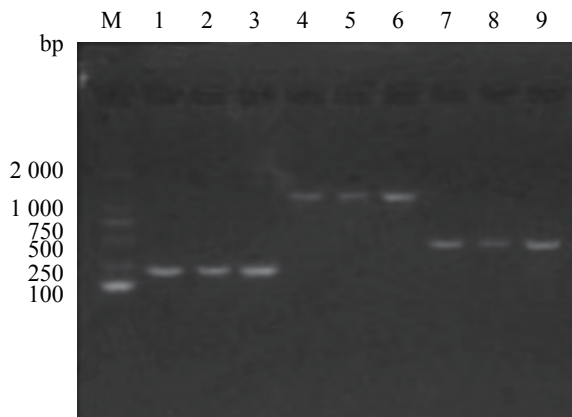


图4 菌株BDHYPFs-Y2S、BDHYPFs-Y2P和BDHYPFs-Y1G毒力基因电泳图

M. 标准物质2000; 1-3. 分别为BDHYPFs-Y2S、BDHYPFs-Y2P、BDHYPFs-Y1G的vhhB基因; 4-6. 分别为BDHYPFs-Y2S、BDHYPFs-Y2P、BDHYPFs-Y1G的vhhA基因; 7-9. 分别为BDHYPFs-Y2S、BDHYPFs-Y2P、BDHYPFs-Y1G的toxR基因

Fig. 4 Electropherogram figure of virulence gene

M. Marker 2000; 1-3. vhhB genes of BDHYPFs-Y2S, BDHYPFs-Y2P, BDHYPFs-Y1G; 4-6. vhhA genes of BDHYPFs-Y2S, BDHYPFs-Y2P, BDHYPFs-Y1G; 7-9. toxR genes of BDHYPFs-Y2S, BDHYPFs-Y2P, BDHYPFs-Y1G

Y1G为牙鲆腹水病原。

根据半致死量实验结果, 采用寇氏法计算LD<sub>50</sub>=5.88×10<sup>6</sup> CFU/mL(表3)。

2.5 药敏实验

菌株BDHYPFs-Y2S、BDHYPFs-Y2P和BDHYPFs-Y1G对17种抗菌药物的药敏实验结果显示, BDHYPFs-Y2S、BDHYPFs-Y2P和BDHYPFs-Y1G均对呋喃妥因抗菌药物敏感; 对左氧氟沙星、诺氟沙星抗菌药物中度敏感; 对庆大霉素、磺胺异恶唑、四环素等7种抗菌药物耐药(表4)。

表3 菌株BDHYPFs-Y1G感染实验

Tab. 3 Infection of P. olivaceus challenged by BDHYPFs-Y1G

分组 group	菌液浓度(CFU/mL) concentration of bacterium	剂量/mL dosage	数量/尾 quantity	累计死亡/尾 cumulative death	死亡率/% death rate
1	10 <sup>8</sup>	0.3	30	30	100
2	10 <sup>7</sup>	0.3	30	24	80
3	10 <sup>6</sup>	0.3	30	9	30
4	10 <sup>5</sup>	0.3	30	2	6
5	10 <sup>4</sup>	0.3	30	0	0
对照组 control	0.9% NaCl	0.3	30	0	0

3 讨论

腹水症是一种综合性病症, 从临床症状上看, 腹水病共同性特征为腹腔有积液, 不同的致病菌可导致不同的患病症状。迟缓爱德华氏菌感染大菱鲆(Scophthalmus maximus)时, 其症状为体表有出血点, 肝脏、肾脏、脾脏和胆囊肿大<sup>[11]</sup>; 溶藻弧菌感染牙鲆的主要症状为体表腐烂<sup>[11]</sup>; 温和气单胞菌(A. sobria)感染的腹水病症状为眼球突出、鳍基部出血、内脏出血<sup>[12]</sup>; 本研究患病牙鲆腹水特征与其他腹水病报道一致, 腹腔内黄色积液增多, 腹腔压力增大, 导致消化道末端挤出肛外。患病牙鲆肝脏呈乳白色, 呈现贫血症状。本实验分别从肾脏、脾脏和肝脏中分离出3株优势菌(BDHYPFs-Y2S、BDHYPFs-Y1G、BDHYPFs-Y2P), 经生理生化及分子生物学方法鉴定, 显示3株分离株均为哈维氏弧菌。通过预实验, 选取3株中毒性最强的菌株BDHYPFs-Y1G对健康牙鲆进行人工感染实

表 4 菌株BDHYPFS-Y2S、BDHYPFS-Y2P、BDHYPFS-Y1G的药敏实验结果  
Tab. 4 Drug sensitive test results of BDHYPFS-Y2S, BDHYPFS-Y2P, BDHYPFS-Y1G

抗生素 antibiotics	药量/( $\mu\text{g}$ /片) concentration	R/mm	I/mm	S/mm	抑菌圈直径/mm diameter of inhibited zone		
					BDHYPFS-Y2S	BDHYPFS-Y1G	BDHYPFS-Y2P
呋喃妥因 nitrofurantoin	300	$\leq 14$	15~16	$\geq 17$	22(S)	18(S)	18(S)
萘啶酸 nalidixic acid	30	$\leq 13$	14~18	$\geq 19$	20(S)	19(S)	13(R)
痢特灵 furazolidone	300	$\leq 14$	15~16	$\geq 17$	18(S)	16(I)	17(S)
氧氟沙星 ofloxacin	5	$\leq 12$	13~15	$\geq 16$	18(S)	13(I)	14(I)
头孢他啶 fortum	30	$\leq 14$	15~17	$\geq 18$	11(R)	16(I)	14(I)
头孢噻肟 cefotaxime	30	$\leq 14$	15~22	$\geq 23$	15(I)	22(S)	15(I)
左氧氟沙星 levofloxacin	5	$\leq 13$	14~16	$\geq 17$	14(I)	14(I)	14(I)
诺氟沙星 norfloxacin	10	$\leq 12$	13~16	$\geq 17$	14(I)	12(I)	14(I)
奈替米星 netilmicin	30	$\leq 12$	13~14	$\geq 15$	14(I)	14(I)	18(S)
氟苯尼考 florfenicol	30	$\leq 12$	13~17	$\geq 18$	9(R)	11(R)	11(R)
新霉素 neomycin	30	$\leq 12$	13~16	$\geq 17$	0(R)	9(R)	0(R)
美满霉素 minocycline	30	$\leq 14$	15~18	$\geq 19$	0(R)	0(R)	0(R)
庆大霉素 gentamycin	10	$\leq 12$	13~14	$\geq 15$	0(R)	11(R)	7(R)
四环素 tetracycline	30	$\leq 14$	15~18	$\geq 19$	0(R)	0(R)	0(R)
磺胺异恶唑 sulfisoxazole	300				0(R)	0(R)	0(R)
青霉素 penicillin	10				0(R)	0(R)	0(R)
氨苄西林 ampicillin	10				0(R)	0(R)	0(R)

注: S. 高度敏感; I. 中度敏感; R. 低敏感度或不敏感

Notes: S. highly susceptible; I. intermediately susceptible; R. denoted low or no sensitivity

验, 能够复制牙鲆自然发病症状, 且从人工感染的患腹水病牙鲆的病灶组织中再次得到分离株, 人工感染分离株与自然分离株BDHYPFS-Y1G相比, 生理生化特征一致, 16S *rRNA*序列一致性为100%, 证实哈维氏弧菌为患腹水病牙鲆的病原菌。由于目前国内哈维氏弧菌引起牙鲆腹水症暴发的报道相对较少, 本实验可以提供并填补哈维氏弧菌致牙鲆患腹水病例证, 以供后续腹水病防控研究。

溶血活性通常为寄生型细菌及病毒所共有的特征, 通过溶解红细胞、分解血红蛋白来获取本身所需铁离子, 有研究表明, 噬菌体如VHML等可能通过基因的水平转移导致哈维氏弧菌产生溶血活性<sup>[13-14]</sup>。本研究观察发现, 自然发病状态下牙鲆的肠、肝脏、脾脏和肾脏均有不同程度的损伤, 呈全身性感染。多器官共同的病理特征表现为组织泛白, 细胞呈现空泡变性、破裂变形, 血红细胞浸润及溶解。本研究

分离的3株哈维氏弧菌溶血素基因*vhhA*、*vhhB*检测均呈阳性, 通过病理特征推测为哈维氏弧菌的溶血素基因*vhhA*、*vhhB*表达胞外溶血素, 溶血素侵袭宿主血细胞膜并引起细胞破裂溶解<sup>[15]</sup>, 呈现本实验观察到的病理特征。

影响哈维氏弧菌感染鱼类的外界环境因素有温度、pH、盐度等, 其中温度是影响鱼类的生长率、存活率和抗病能力最重要的环境因素之一, 且作用于病原菌在鱼体内的增殖。本研究回感实验表明, 实验水温为(19 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 时, 哈维氏弧菌分离株BDHYPFS-Y1G的LD<sub>50</sub>为5.88 $\times$ 10<sup>6</sup> CFU/mL, 低于自然状态下的毒性。许国晶等<sup>[16]</sup>研究发现, 水温为9~21 $^{\circ}\text{C}$ , 牙鲆的黏液抗体水平随水温的升高而升高, 达到峰值的时间随温度升高而缩短, 且在最适生活温度(21 $^{\circ}\text{C}$ )时, 抗体应答强度最大; 对比腹水病暴发现场水温(26 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ , 本研究实验水温为(19 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ , 牙鲆的黏液抗体水平接近峰值、免疫力强; 钟硕良等<sup>[17]</sup>

研究表明,水温为24~30℃,水体中哈维氏弧菌的生长及对日本对虾(*Penaeus japonicus*)仔虾的感染死亡率随水温上升而递增。陈建国等<sup>[18]</sup>发现,环境温度低于15℃时,哈维氏弧菌增殖遭到抑制,而在28~37℃时,其生长速率加快,表明哈维氏弧菌在腹水病暴发现场水温(26±1)℃下比人工感染时毒力更强。病原菌引发养殖动物疾病的状况是宿主、病原菌、环境因素相互作用的结果。病原菌毒力会随温度变化而发生变化,在实际养殖生产的病害防控中,需要密切关注环境温度等因素对疫情防控的影响。

哈维氏弧菌作为海洋鱼类和无脊椎动物致病菌<sup>[19]</sup>,其感染范围十分广泛,引起的病症也有多种。其可使红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)、斑节对虾(*P. monodon*)、卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)、青石斑鱼(*Epinephelus awoara*)、糙海参(*Holothuria scabra*)、管海马(*Hippocampus kuda*)等<sup>[20-25]</sup>多种水产动物产生发光弧菌病、急性败血症、突眼和慢性皮肤溃疡等<sup>[26]</sup>。目前,抗生素仍是治疗水生动物细菌性疾病的常用方法之一,本研究的药敏实验结果表明,菌株BDHYPFS-Y2S、BDHYPFS-Y2P和BDHYPFS-Y1G均对呋喃妥因抗菌药物高度敏感;对左氧氟沙星、诺氟沙星抗菌药物中度敏感;对庆大霉素、磺胺异恶唑、四环素等7种抗菌药物耐药,呈现多重耐药现象,说明引发此次牙鲆腹水病的病原菌具有较高的耐药性,可能与长期使用抗生素相关,这也为以后加强牙鲆养殖过程中的管理提供了参考。

#### 参考文献:

- [1] 朱壮春,史相国,张淑杰,等. 牙鲆腹水病病原研究[J]. 水产科学, 2006, 25(7): 325-329.  
Zhu Z C, Shi X G, Zhang S J, *et al.* The pathogenic bacteria of the ascites in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Fisheries Science*, 2006, 25(7): 325-329(in Chinese).
- [2] 李筠,颜显辉,陈吉祥,等. 养殖大菱鲆腹水病病原的研究[J]. 中国海洋大学学报, 2006, 36(4): 649-654.  
Li Y, Yan X H, Chen J X, *et al.* Studies on the characteristics of pathogenic *Edwardsiella tarda* isolated from diseased *Scophthalmus maximus*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2006, 36(4): 649-654(in Chinese).
- [3] 张伟妮,周丽,邢婧,等. 养殖大菱鲆腹水症病原菌SR1的分离及鉴定[J]. 中国水产科学, 2006, 13(4): 603-609.  
Zhang W N, Zhou L, Xing J, *et al.* Isolation and identification of pathogen SR1 associated with swollen abdomen of cultured turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(4): 603-609(in Chinese).
- [4] 孙祎敏,李楠,宋杰,等. 褐牙鲆腹水症病原菌的分离鉴定及其灭活疫苗的研制[J]. 水产科学, 2009, 28(11): 613-617.  
Sun Y M, Li N, Song J, *et al.* Isolation and identification of bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila* and development of the inactivated vaccine in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* diseased with ascites[J]. *Fisheries Science*, 2009, 28(11): 613-617(in Chinese).
- [5] 胡璇,孙敬锋,陈成勋,等. 养殖半滑舌鲷腹水病的病原分离鉴定及药物敏感性分析[J]. 天津农学院学报, 2014, 21(3): 12-16.  
Hu X, Sun J F, Chen C X, *et al.* Isolation and identification of pathogen of ascites disease from *Cynoglossus semilaevis* Gunther and its antibiotic sensitivity analysis[J]. *Journal of Tianjin Agricultural University*, 2014, 21(3): 12-16(in Chinese).
- [6] 王岚,王印庚,张正,等. 养殖大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)腹水病的病原多样性及其耐药性分析[J]. 渔业科学进展, 2017, 38(4): 17-24.  
Wang L, Wang Y G, Zhang Z, *et al.* Diversity and drug resistance of bacterial pathogens isolated from bacterial ascetic disease in cultured turbot *Scophthalmus maximus*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(4): 17-24(in Chinese).
- [7] 刘玉娟,田新朋,黄小芳,等. 中国南海沉积环境可培养细菌多样性研究[J]. 微生物学通报, 2014, 41(4): 661-673.  
Liu Y J, Tian X P, Huang X F, *et al.* Diversity of cultivable bacteria isolated from marine sediment environments in South China Sea[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(4): 661-673(in Chinese).
- [8] Conejero M J U, Hedreyda C T. Isolation of partial *toxR* gene of *Vibrio harveyi* and design of *toxR*-targeted PCR primers for species detection[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 95(3): 602-611.
- [9] Conejero M J U, Hedreyda C T. PCR detection of

- hemolysin (*vhh*) gene in *Vibrio harveyi*[J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2004, 50(3): 137-142.
- [10] 蒋魁, 徐力文, 苏友禄, 等. 两株珍珠龙羴病原性哈维弧菌(*Vibrio harveyi*)的分离与鉴定[J]. *生态科学*, 2017, 36(6): 16-24.  
Jiang K, Xu L W, Su Y L, *et al.* Isolation and identification of two pathogenetic *Vibrio harveyi* strains from pearl gentian[J]. *Ecological Science*, 2017, 36(6): 16-24(in Chinese).
- [11] 薛淑霞, 冯守明, 孙金生. 海水工厂化养殖大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)和褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)腹水病病原菌的分离与鉴定[J]. *海洋与湖沼*, 2006, 37(6): 548-554.  
Xue S X, Feng S M, Sun J S. Isolation and identification of pathogenic bacteria in swollen abdomen of cultured turbot (*Scophthalmus maximus*) and flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2006, 37(6): 548-554(in Chinese).
- [12] 王亚军, 魏文娟, 潘厚军, 等. 斑点叉尾鲷“腹水症”病原的分离鉴定及体外芽孢杆菌拮抗试验[J]. *淡水渔业*, 2018, 48(3): 72-77.  
Wang Y J, Wei W J, Pan H J, *et al.* Isolation and identification of the pathogen *Aeromonas sobria* from *Ictalurus punctatus* and the Bacillus antagonistic experiment *in vitro*[J]. *Freshwater Fisheries*, 2018, 48(3): 72-77(in Chinese).
- [13] Oakey H J, Owens L. A new bacteriophage, VHML, isolated from a toxin-producing strain of *Vibrio harveyi* in tropical Australia[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 89(4): 702-709.
- [14] Munro J, Oakey J, Bromage E, *et al.* Experimental bacteriophage-mediated virulence in strains of *Vibrio harveyi*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2003, 54(3): 187-194.
- [15] 钟英斌, 张晓华, 陈吉祥, 等. 哈维氏弧菌溶血素基因 *vhhA* 在大肠杆菌中的表达及活性研究[J]. *中国海洋大学学报*, 2007, 37(1): 97-102.  
Zhong Y B, Zhang X H, Chen J X, *et al.* Expression of *Vibrio harveyi* hemolysin gene *vhhA* in *E. coli* and its biological activities[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2007, 37(1): 97-102(in Chinese).
- [16] 许国晶, 绳秀珍, 戍文斌. 温度对牙鲆皮肤黏液抗体产生的影响[J]. *中国水产科学*, 2011, 18(6): 1377-1383.
- Xu G J, Sheng X Z, Zhan W B. Effect of temperature on production of skin mucus antibody in flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(6): 1377-1383(in Chinese).
- [17] 钟硕良, 陈月忠, 周宸. 环境因子对发光细菌的生长及日本对虾仔虾感染死亡率的影响[J]. *中国水产科学*, 2001, 8(1): 41-45.  
Zhong S L, Chen Y Z, Zhou C. Effects of environmental factors on growth of luminous bacteria (*Vibrio harveyi*) and mortality of infected post-larvae of *Penaeus japonicus*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2001, 8(1): 41-45(in Chinese).
- [18] 陈建国, 陈超, 李炎璐, 等. 美洲黑石斑鱼(*Centropristis striata*)“突眼症”的病原菌分离鉴定[J]. *渔业科学进展*, 2017, 38(5): 32-40.  
Chen J G, Chen C, Li Y L, *et al.* Isolation and classification of exophthalmic disease-inducing pathogenic bacterium from *Centropristis striata*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(5): 32-40(in Chinese).
- [19] Austin B, Zhang X H. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2006, 43(2): 119-124.
- [20] 王力, 张吉鹏, 刘美如, 等. 红鳍东方鲀源哈维弧菌毒力基因检测及分型研究[J]. *现代农业科技*, 2018(2): 237-239, 242.  
Wang L, Zhang J P, Liu M R, *et al.* Virulence genes detection and BOX-PCR identification of *Vibrio harveyi* strains isolated from *Takifugu rubripes*[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2018(2): 237-239, 242(in Chinese).
- [21] Prayitno S B, Latchford J W. Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectivity[J]. *Aquaculture*, 1995, 132(1-2): 105-112.
- [22] Tu Z G, Li H Y, Zhang X, *et al.* Complete genome sequence and comparative genomics of the golden pompano (*Trachinotus ovatus*) pathogen, *Vibrio harveyi* strain QT520[J]. *PeerJ*, 2017, 5: e4127.
- [23] Qin Y X, Wang J, Su Y Q, *et al.* Studies on the pathogenic bacterium of ulcer disease in *Epinephelus awoara*[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2006, 25(1): 154-159.
- [24] Becker P, Gillan D, Lanterbecq D, *et al.* The skin



- ulceration disease in cultivated juveniles of *Holothuria scabra* (Holothuroidea, Echinodermata)[J]. *Aquaculture*, 2004, 242(1-4): 13-30.
- [25] Tendencia E A. The first report of *Vibrio harveyi* infection in the sea horse *Hippocampus kuda* Bleekers 1852 in the Philippines[J]. *Aquaculture Research*, 2004, 35(13): 1292-1294.
- [26] 张美霞, 耿慧君, 王丽丽, 等. 哈维弧菌对水产动物的致病性及其噬菌体防控研究进展[J]. *中国抗生素杂志*, 2017, 42(9): 717-723.
- Zhang M X, Geng H J, Wang L L, *et al.* Research progress in using bacteriophages on the pathogenicity of *Vibrio harveyi* to aquatic animals and its biocontrol approach[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2017, 42(9): 717-723(in Chinese).

## Isolation, identification and characteristics of pathogenic bacteria from *Paralichthys olivaceus* with ascites

SHANG Kun<sup>1,2,3</sup>, QU Lingyun<sup>1,2\*</sup>, WANG Yufen<sup>4</sup>, WANG Bin<sup>3</sup>,  
ZHAO Han<sup>5</sup>, GAO Ping<sup>1,2</sup>, LIU Xin<sup>6</sup>

(1. First Institute of Oceanography, Ministry of Resources, Qingdao 266061, China;

2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes,

Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266235, China;

3. College of Fisheries and Life, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

4. Beidaihe Central Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qinhuangdao 066100, China;

5. The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266032, China;

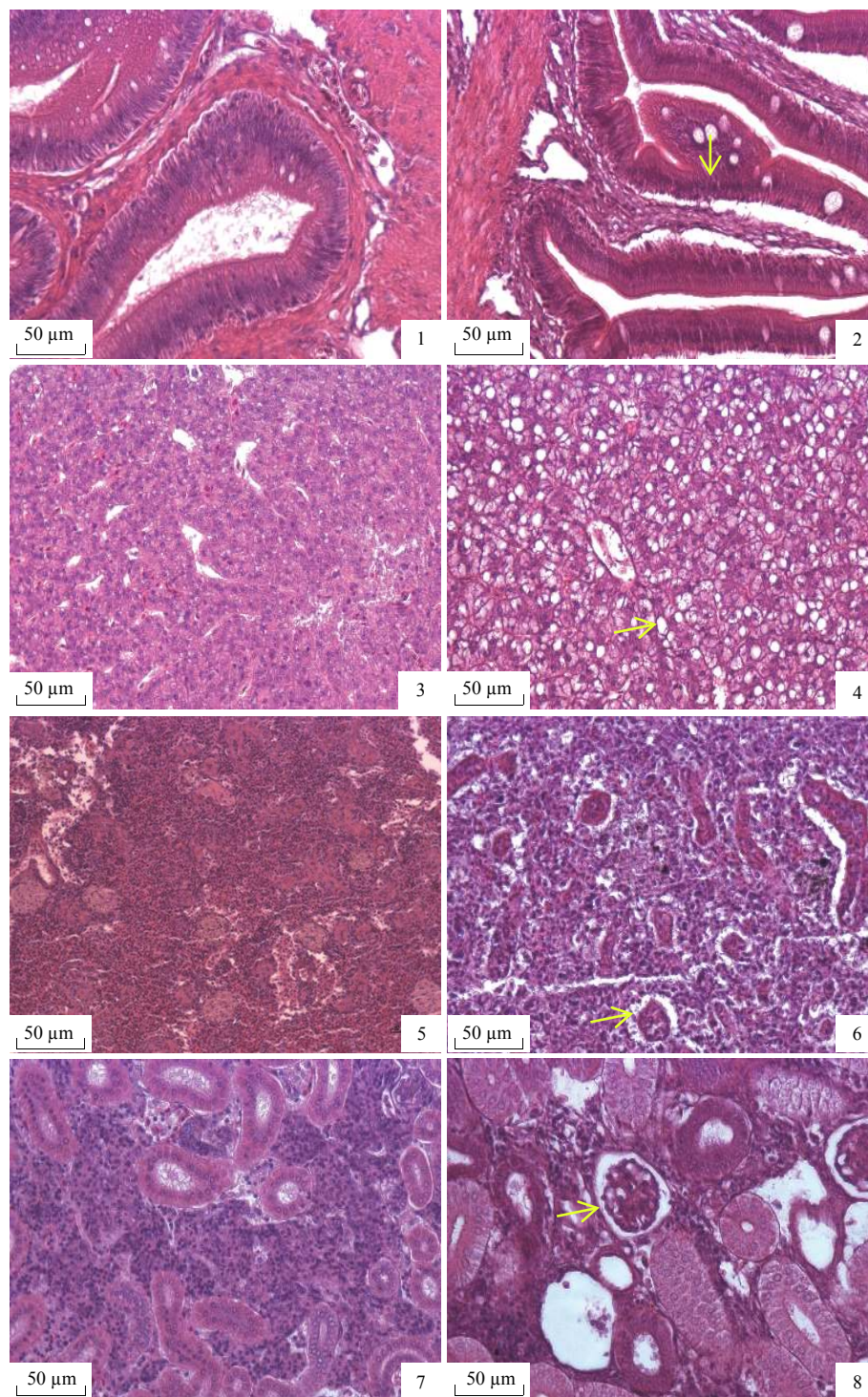
6. School of Bioengineering, Qilu University of Technology, Jinan 250353, China)

**Abstract:** In order to determine the pathogen, which can cause the death of cultured *Paralichthys olivaceus* from ascites disease in Beidaihe area, Hebei Province, three dominant bacteria were isolated from *P. olivaceus* infected with ascites. The biological status of the isolates was determined by physiological and biochemical identification and 16S *rRNA* sequence alignment. The pathological characteristics of the isolates were further identified by virulence genes (*toxR*, *vhhA*, *vhhB*) and histopathological analysis. The results showed that the three isolates were *Vibrio harveyi* and the virulence genes of the three isolates were all positive. Pathological sections showed that the isolates could be used to damage multiple organs (intestine, kidney, spleen and liver) of *P. olivaceus*. The LD<sub>50</sub> of strain BDHYPFS-Y1G to *P. olivaceus* was 5.88×10<sup>6</sup> CFU/g, which was lower than the toxicity of natural state. Drug susceptibility test indicated that all three isolates were highly sensitive to the nitrofurantoin. This study confirmed the pathogen of this ascites disease, and preliminarily studied the pathogenicity and drug sensitivity of the pathogen, which can provide scientific basis for the prevention and control of the disease in industrial culture of flounder.

**Key words:** *Paralichthys olivaceus*; ascites disease; *Vibrio harveyi*; isolation; identification

**Corresponding author:** QU Lingyun. E-mail: qly@fio.org.cn

**Funding projects:** National Key R & D Program of China (2017YFC1404504); Youth Talent Program Supported by Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao) (2018-MFS-T16); Aoshan Science and Technology Innovation Project (2015ASKJ02-03)



图版 患病牙鲆组织病理学观察

1. 健康肠道组织H.E染色; 2. 肠道黏膜层和黏膜固有层组织分离(→); 3. 健康肝脏组织H.E染色; 4. 肝脏出现空泡变性(→); 5. 健康脾脏组织H.E染色; 6. 椭圆体萎缩(→); 7. 健康肾脏组织H.E染色; 8. 上皮细胞萎缩溶解, 基膜解体破碎(→)

**Plate Histopathological observation of diseased *P. olivaceus***

1. H.E staining result of healthy gut; 2. separation of intestinal mucosa and lamina propria(→); 3. H.E staining result of healthy liver; 4. cavitation degeneration(→); 5. H.E staining result of healthy spleen; 6. ellipsoid atrophy(→); 7. H.E staining result of healthy kidney; 8. the epithelial cells atrophy and dissolve, and the basement membrane disintegrates(→)