

褐点石斑鱼脱鳞病病原菌的分离与鉴定

徐先栋^{1,4}, 谢珍玉^{1,2,3}, 欧阳吉隆¹, 王世锋^{1,2,3}, 周永灿^{1,2,3}

(1. 海南大学 海洋学院, 海南 海口 570228; 2. 海南大学 海洋生物实验教学示范中心, 海南 海口 570228; 3. 海南大学 海南省热带水生生物技术重点实验室, 海南 海口 570228; 4. 江西省水产科学研究所, 江西 南昌 330039)

摘要: 从海南陵水新村港网箱养殖脱鳞病濒死褐点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*)体内分离到3株优势菌株XC08061、XC08062和XC08063, 经回归感染试验确定为致病菌。这3株细菌经生化鉴定以及16S rDNA测序分析, 确定均为哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)。其中, XC08061对体长为12~14 cm褐点石斑鱼的半致死剂量为 5.8×10^2 CFU/g 鱼体质量。药敏试验表明, 该菌具有较强的耐药性, 在所检测的25种抗菌药物中, 仅对新生霉素、头孢噻肟、先锋必/舒巴坦、诺氟沙星、依诺沙星和庆大霉素6种抗菌药物敏感。

关键词: 褐点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*); 哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*); 脱鳞病; 分离; 鉴定

中图分类号: S941.42 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2012)02-0067-08

石斑鱼(*Epinephelus*)属硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鲈形目(Perciformes)、鲷科(Serranidae)、石斑鱼属(*Epinephelus*)的种类^[1]。其肉质鲜美, 价格昂贵, 是海南等中国南方地区主要的海水养殖鱼类之一。随着石斑鱼养殖的发展, 其病害问题也日益突出, 目前国内外报道较多的主要包括赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)^[2-3]、点带石斑鱼(*E. malabaricus*)^[4-5]和斜带石斑鱼(*E. coioides*)^[6-7]等石斑鱼疾病, 对这些种类的养殖造成了严重威胁。褐点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*)俗称老虎斑, 是海南近年来新增的且已成为当前深受欢迎的石斑鱼养殖品种, 有关其病害鲜见报道。2008年6月, 在海南陵水新村港某海水鱼类网箱养殖场发生了褐点石斑鱼爆发性死亡, 该病发病急、传播快、死亡率高、危害大。从初次出现发病症状到死亡高峰只要2~3 d, 最高死亡率可达90%以上。病鱼主要症状为身体两侧的鳞片脱落, 当地渔民因此称之为“脱鳞病”; 此外, 还伴有局部体表溃疡以及烂尾和烂鳍等症状(图1)。剖开腹腔可见胆囊破裂, 胆汁浸染体腔, 肝脾肿大, 腹腔有淡黄色腹水(图2)。作者对引起该病的病原进行了研究, 以期为该病的控制奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

患病褐点石斑鱼取自海南陵水新村港某网箱养

殖场, 为具有典型患病症状的濒死个体。病鱼体长为12~14 cm, 体质量30~35 g。感染试验用褐点石斑鱼购自海南文昌某石斑鱼养殖场, 选择活力好、无患病史、体长12~14 cm、体质量30~36 g(平均32.5 g)的健康个体, 暂养7 d后用于相关试验。

哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)标准菌株由泰国渔业部宋卡滨海水产动物健康研究所 Jirapora Kasornchaada 博士惠赠。

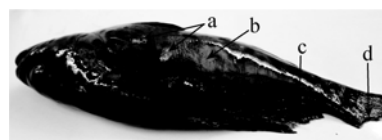


图1 脱鳞病褐点石斑鱼外部症状

Fig. 1 The external symptom of *E. fuscoguttatus* with scale-peeled syndrome disease

a. 溃疡; b. 脱鳞; c. 烂鳍; d. 烂尾

a. skin ulceration; b. scale-peeled area; c. fin ulceration; d. tail ulceration

收稿日期: 2010-08-30; 修回时间: 2010-10-24

基金项目: 国家自然科学基金(40866002、30760190); 农业科技成果转化项目(2009GB2E200302); 海南省基金项目: 育厅研究生创新课题(Hswsy2009-22); 国家级第二批高等学校特色专业建设点资金(TS10477)

作者简介: 徐先栋(1982-), 男, 江西鄱阳人, 硕士研究生, 主要从事水生生物病害及其控制研究, 电话: 0791-88101682, E-mail: xuxd2009@163.com; 周永灿, 通信作者, E-mail: zychnu@163.com



图2 脱鳞病褐点石斑鱼内部症状

Fig. 2 The internal symptom of *E. fuscoguttatus* with scale-peeled syndrome disease

a. 腹水; b. 胆汁浸染腹腔症状
a. ascites; b. rupture of gallbladder

1.2 细菌分离

从体表溃疡、肝脏、肾脏和脾脏等部位取样,接种于 2216E 海水平板和 TCBS 平板^[8], 28℃ 培养 24 h 后记录结果。挑取优势菌以 2216E 海水平板纯化 2 次后,斜面保存备用。同时将优势菌株培养液与等体积 80%甘油混合,于-80℃ 冰箱中长期保存备用。

1.3 病原菌确定

健康褐点石斑鱼暂养 7 d 后,分组饲养于 45 cm × 35 cm × 40 cm(长×宽×高)的水族箱中,每箱 5 尾。每天正常投喂石斑鱼人工配合饲料,日换水量为水体的 1/3。将从患病褐点石斑鱼中分离的优势菌株经扩大培养,用无菌生理盐水配制 1.1×10^6 CFU/mL 的菌悬液,腹腔注射接种健康褐点石斑鱼,接种量 0.2 mL/尾,对照组腹腔注射等量无菌生理盐水,每组 5 尾并各设置 1 个重复。记录感染后 15 d 内各组石斑鱼的发病及死亡情况,并从感染患病个体进行细菌分离,根据柯赫法则确定病原菌。

1.4 病原菌的菌种鉴定

1.4.1 表型鉴定

病原菌经进一步纯化后,参照 Mercedes-Anicel 方法^[9]和东秀珠等^[10]的方法进行形态学和生理生化检测鉴定。生化鉴定管及相关试剂均购自杭州微生物有限公司。

1.4.2 16S rDNA 序列测定与分析

病原菌经振荡培养 24 h 后,参照《分子克隆实验指南》(第 3 版)^[11]的方法提取细菌总 DNA,对病原菌的 16S rDNA 序列的 PCR 扩增与测序:

正向引物 Pf: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'

反向引物 Pr: 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT-3'

扩增目的片段大小约为 1.5 kb。

PCR 反应体系(50 μL): ExTaqDNA 聚合酶 (5 U/μL, 含 Mg^{2+})0.3 μL, dNTP 4 μL, 10 × PCR 缓冲液 5 μL, 正向引物 Pf(10 μmol/L)1 μL, 反向引物 Pr(10 μmol/L)1 μL, DNA 模板 2 μL, 加超纯水至总体积 50 μL。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 1 min、57℃ 退火 1 min、72℃ 延伸 90 s, 30 个循环; 最后于 72℃ 温育 10 min。1%琼脂糖电泳观察结果。采用大连宝生物(Takara)公司的 DNA 凝胶回收试剂盒对 PCR 产物进行回收。连接 pMD19-T Vector, 筛选阳性克隆送 Takara 公司进行核苷酸序列测定。采用 MEGA 4.1 软件将待检菌株的 16S rDNA 序列与从 GenBank 中获得的同源性最高的细菌 16S rDNA 序列进行多序列匹配排列,构建系统进化树。

1.5 病原菌对褐点石斑鱼 LD₅₀ 值测定

病原菌经 2216E 液体培养基 28℃ 扩大培养 24 h 后,离心分离细菌并以无菌生理盐水制备以下 5 种浓度的菌悬液: 2.4×10^3 、 2.4×10^4 、 2.4×10^5 、 2.4×10^6 、 2.4×10^7 CFU/mL。试验共分 6 组,每组设置一个重复;其中 5 组为感染组,各感染组依次分别以腹腔注射接种上述菌液;对照组腹腔注射无菌生理盐水。每组接种 5 尾,接种量 0.2 mL/尾。连续 15 d 观察记录各组石斑鱼发病和死亡数量,测定致病菌株对健康褐点石斑鱼的 LD₅₀ 值^[12]。

1.6 药敏试验

选取杭州微生物有限公司生产的 25 种药敏纸片,分别检测抑菌圈直径,参照抗菌药物敏感试验标准^[13]确定各种药物对病原菌株的敏感性。

2 结果

2.1 细菌分离

细菌分离结果表明,从病鱼的肝脏、脾脏和肾脏都分离到大量的细菌,并且,所分离细菌的菌落形态一致:圆形、表面光滑、半透明,经 24 h 培养的菌落直径约 1 mm。TCBS 培养 24 h 的菌落呈黄色,直径约 1 mm。从病灶处也分离到大量细菌,其中大部分菌落的形态与从肝脏等部位分离的细菌相同,夹杂有少量其他形态的菌落。分别挑取从病鱼肝、脾、肾组织分离的 3 株细菌,分别命名为 XC08061、XC08062、XC08063。

2.2 病原菌确定

以 1.1×10^6 CFU/mL 的 XC08061、XC08062 和

XC08063 菌液分别对 30~35 g 的健康褐点石斑鱼进行人工感染, 结果表明(表 1): 所有 3 株菌株均可使感染石斑鱼致病, 感染后 3 d 以内的死亡率 70% 以上, 其中菌株 XC08061 的感染死亡率达 100%。3 d 内未死亡的个体, 至 15 d 内也不再死亡。人工感染 1 d 内死亡的个体, 其腹腔内有淡黄色积液、体侧有局部鳞片脱落现象; 感染后 2 d 内死亡的个体鳞片脱落和腹水的症状更加明显。从人工感染患病个体的肝脏、脾脏和肾脏也分离到大量与感染菌株菌落形态相同的细菌。根据科赫法则, 判定上述三株细菌均为褐点石斑鱼脱鳞病的病原菌。

2.3 病原菌的鉴定

2.3.1 表型鉴定

对菌株 XC08061、XC08062 和 XC08063 的形态和生理生化特征鉴定结果表明(表 2), 3 株细菌的生化特征非常接近, 只有 40 生长、L-阿拉伯糖及蔗糖利用三指标存在差别: 具体为: 菌株 XC08062 在 40 下能够生长、蔗糖利用为阴性, 其余 2 株细菌在 40 下不生长, 蔗糖利用为阳性; 菌株 XC08061 的 L-阿拉伯糖试验呈阳性, 其余 2 株细菌为阴性。与哈氏弧菌标准菌株的相关形态和生理生化特征相比, 菌株 XC08063 与标准菌株完全一致, 而菌株 XC08061、XC08062 仅分别在 L-阿拉伯糖、蔗糖和 40 培养结果存在差异, 其余指标完全相同。

2.3.2 16S rDNA 序列测定与分析

分别以菌株 XC08061、XC08062、XC08063 的总 DNA 为模板, 经细菌 16S rDNA 通用引物扩增均获得约 1500 bp 的基因片段, 对其测序并提交 Genbank 核酸序列数据库, 登录号分别为 GQ180184、GQ180185、GQ180186。将这 3 株菌株的基因序列与 Genbank 中同源性最高的及亲缘关系较远的共 29 株其他菌株的基因序列进行同源性比对和多序列匹配排列, 构建系统进化树(图 3), 结果表

明, 该 3 株菌与 5 株哈氏弧菌聚为一支, 置信度达 100%, 同亲缘关系较远的鳃弧菌(*V. anguillarum*)、创伤弧菌(*V. vulnificus*)、河流弧菌(*V. fluvialis*)分支明显。结合生化鉴定和表型特征, 可以判定菌株 XC08061、XC08062、XC08063 均为哈氏弧菌。

2.4 病原菌对褐点石斑鱼的 LD₅₀ 值测定

根据表 1 的结果, 取感染实验中死亡率最高的菌株 XC08061, 测定其对体质量为 30~35 g 的健康褐点石斑鱼的 LD₅₀ 值。结果表明(表 3), 接种浓度为 4.8×10^5 CFU/尾时, 实验鱼死亡率达 100%; 接种浓度为 4.8×10^2 CFU/尾时, 实验鱼死亡率为 0。经计算, 该菌株对体质量为 30~35 g 的褐点石斑鱼 LD₅₀ 值为 5.8×10^2 CFU/g 鱼体质量。

2.5 药敏试验

选取 25 种抗菌药物分别对菌株 XC08061 进行药敏检测, 结果表明(表 4), 该菌株只对新生霉素、头孢噻肟、先锋必/舒巴坦、诺氟沙星、依诺沙星和庆大霉素 6 种抗菌药物敏感; 对卡那霉素、头孢肤肟、呋喃妥因等 6 种抗菌药物中度敏感, 对链霉素、先锋霉素 V、乙酰螺旋霉素等 13 种抗菌药物均不敏感, 总体具有较强的耐药性。

3 讨论

褐点石斑鱼脱鳞病是近年来海南陵水等地褐点石斑鱼养殖中常见的爆发性疾病, 该病爆发速度快、死亡率高, 对海南褐点石斑鱼养殖造成了巨大的危害。作者从病鱼的肝脏、脾脏和肾脏组织中分离了 XC08061、XC08062 和 XC08063 共 3 株细菌, 回归感染试验结果表明它们均属于该病的病原菌。该 3 株菌虽然在生理生化检测结果与哈氏弧菌标准菌株最为接近, 但前两个菌株的个别检测指标与哈氏弧菌标准菌株还存在差异。Mercedes 等^[9]及 Nogueroles 等^[14]认为, 细菌生化鉴定的一些指标存在可变性,

表 1 3 株细菌对斜带石斑鱼的感染结果

Tab. 1 The artificial infection results of healthy *E. fuscoguttatus* by three bacterial strains isolated from *E. fuscoguttatus* with scale-peeled syndrome disease

菌株	菌液浓度 (CFU/mL)	接种量 (mL)	感染数 量(尾)	不同时间的死亡数量(尾)				合计	死亡率(%)
				1d	2d	3d	4~15d		
XC08061	1.1×10^6	0.2	5×2	9	1	—	—	10	100
XC08062	1.1×10^6	0.2	5×2	5	1	1	0	7	70
XC08063	1.1×10^6	0.2	5×2	6	2	0	0	8	80
对照	0	0.2	5×2	0	0	0	0	0	0

表 2 菌株 XC08061、XC08062、XC08063 和哈氏弧菌标准菌株的形态及生理生化特征

Tab. 2 Morphological, physiological and biochemical characteristics of strains XC08061、XC08062、XC08063 and standard strain of *V. harveyi*

鉴定项目	不同菌株的生理生化特征			
	XC08061	XC08062	XC08063	哈氏弧菌标准菌株
4 生长	-	-	-	-
28 生长	+	+	+	+
35 生长	+	+	+	+
40 生长	-	+	-	-
0 %NaCl 生长	-	-	-	-
2 % NaCl 生长	+	+	+	+
6 %NaCl 生长	+	+	+	+
8 %NaCl 生长	+	+	+	+
10 %NaCl 生长	-	-	-	-
TCBS 生长颜色	Y	Y	Y	Y
革兰氏染色	-	-	-	-
V.P. 反应	-	-	-	-
O/ 129 (10 μg)	-	-	-	-
O/ 129 (150 μg)	+	+	+	+
ONPG 反应	-	-	-	-
柠檬酸盐利用	+	+	+	+
吲哚试验	+	+	+	+
精氨酸双水解酶	-	-	-	-
赖氨酸脱羧酶	+	+	+	+
鸟氨酸脱羧酶	+	+	+	+
精氨酸脱羧酶	-	-	-	-
葡萄糖产气 e	-	-	-	-
L-阿拉伯糖	+	-	-	-
甘露糖	+	+	+	+
氧化酶	+	+	+	+
葡萄糖	+	+	+	+
葡萄糖胺	-	-	-	-
蔗糖	+	-	+	+
甘露醇	+	+	+	+
乳糖	-	-	-	-
纤维二糖	+	+	+	+

注: +. 反应阳性; -. 反应阴性; Y. 黄色

以其判定细菌种类具有一定的不确定性, 为此, 作者进一步利用 16S rDNA 序列比较对生理生化鉴定结果进行验证。一般认为, 不同菌株 16S rDNA 序列的同源性高低与其亲缘关系呈正相关, 同源性大于 97.5% 的菌株可视为同种^[15-16], 不过, 也有 16S

rDNA 序列同源性大于 97.5% 的菌株却属于不同种的情况, 如哈氏弧菌与副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)(Genbank 登录号: EU660363)以及需钠弧菌(*V. natriegens*)(Genbank 登录号: EU660320)的 16S rDNA 序列的同源性均在 98% 以上, 但却属于不同种。因

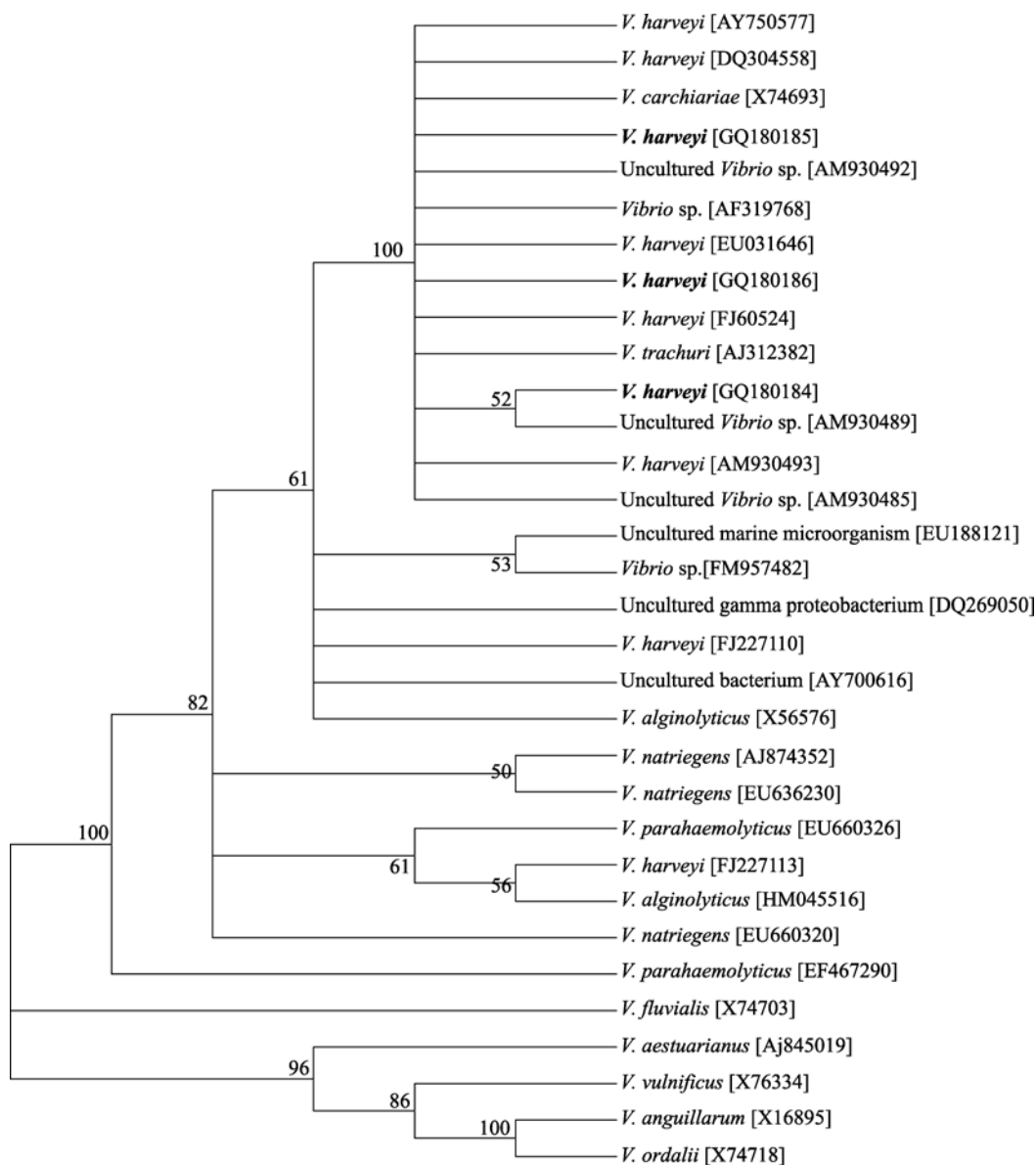


图 3 以 16S rDNA 序列构建的弧菌系统发育树

Fig. 3 The phylogenetic tree of *Vibrio* based on 16S rDNA genes
括号内的代号为该序列在 Genbank 核酸数据库中登录号

The codes in blanket are the sequences' accession NO. at Genebank nucleic acid database

表 3 不同浓度 XC08061 人工感染褐点石斑鱼的累积死亡率

Tab. 3 The accumulated mortality rate of *E. fuscoguttatus* infected by different concentration of strain XC08061

菌液浓度 (CFU/mL)	接种量 (mL/尾)	接种浓度 (CFU/尾)	感染数量 (尾)	不同时间的死亡数量(尾)				累计 死亡率(%)
				1 d	2 d	3 d	4~15 d	
2.4×10^7	0.2	4.8×10^6	5×2	10	—	—	—	100
2.4×10^6	0.2	4.8×10^5	5×2	10	—	—	—	100
2.4×10^5	0.2	4.8×10^4	5×2	6	0	0	0	60
2.4×10^4	0.2	4.8×10^3	5×2	1	2	0	0	30
2.4×10^3	0.2	4.8×10^2	5×2	0	0	0	0	0
对照	0.2	0	5×2	0	0	0	0	0

表 4 病原菌 XC08061 对 25 种抗菌药物的敏感性

Tab. 4 The sensitivity of strain XC08061 to 25 chemotherapeutic agents

药物	药物剂量 ($\mu\text{g}/\text{片}$)	抑菌圈直径 (mm)	敏感性	药物	药物剂量 ($\mu\text{g}/\text{片}$)	抑菌圈直径 (mm)	敏感性
新生霉素	30	18	S	先锋霉素 V	30	10	R
头孢噻肟	30	29	S	乙酰螺旋霉素	30	15	R
先锋必/舒巴坦	75	26	S	新霉素	30	17	R
诺氟沙星	10	23	S	先锋霉素 IV	30	14	R
依诺沙星	10	23	S	强力霉素	30	12	R
庆大霉素	10	16	S	氨苄青霉素	10	-	R
卡那霉素	30	16	I	头孢他啶	30	-	R
头孢肤肟	30	15	I	羧苄西林	100	-	R
呋喃妥因	300	17	I	万古霉素	30	-	R
哌拉西林钠	100	20	I	杆菌肽	10 IU/片	-	R
复方新诺明	1.25	22	I	青霉素	10 IU/片	-	R
头孢三嗪	30	15	I	利福平	5	-	R
链霉素	10	12	R				

注: S. 敏感; I. 中介; R. 耐药; -. 无抑菌圈

此, 为提高细菌种类鉴定的准确率, 常常将生理生化指标测定与 16S rDNA 序列的同源性分析结合起来。作者综合该 2 种方法的检测结果, 确定石斑鱼脱鳞病的 3 株病原菌均为哈氏弧菌。

哈氏弧菌是一种常见的海洋生物致病菌, 可导致多种海水养殖动物疾病, 已报道的感染对象十分广泛, 包括大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)等鱼类^[17]、斑节对虾(*Penaeus monodon*)等虾类^[18]、文蛤(*Meretrix meretrix*)等贝类^[19]以及刺参(*Stichopus japonicus*)等棘皮动物^[20]。该病原引起的疾病不仅死亡率高, 而且发病迅速, 感染后可在短时间内导致感染动物死亡^[21]; 该病原引起疾病的症状也多种多样, 除常见的体表溃烂和充血等症状外, 还可引起遮目鱼(*Chanos chanos*)和斑节对虾的烂眼^[18,22], 引起军曹(*Rachycentron canadum*)的肠胃炎等^[23]。作者对海南陵水褐点石斑鱼脱鳞病的病原检测结果表明其病原也是哈氏弧菌, 该病发生后除有常见的体表溃疡症状外, 最显著的症状为体侧的鳞片成片脱落, 并伴有烂鳍、肝脾肿大、腹腔积水乃至因胆囊破裂而致胆汁浸染体腔等症状, 与已有报道存在一定的差异。褐点石斑鱼脱鳞病发生后死亡速度快, 人工感染实验表明, 感染死亡的个体主要集中在感染后 2 d 以内, 感染个体若 3 d 内不死亡, 则在 15 d 内也全部成活, 与 Estes 等^[21]报道的太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)幼虫哈氏弧菌病相似。

LD₅₀ 值是评价外源性物质对受其影响的动物的

毒性大小的重要参数, 也是评价病原菌对水产养殖生物危害性的主要指标之一^[24]。陈献稿等^[7]用哈氏弧菌腹腔注射感染斜带石斑鱼(*E. coioides*)所得的 LD₅₀ 值为 2.7×10^6 CFU/g 鱼体质量; Liu 等^[23]用哈氏弧菌腹腔注射平均体质量为 10 g 的军曹幼鱼 LD₅₀ 值为 7.48×10^4 CFU/g 鱼体质量。作者所分离的哈氏弧菌菌株 XC08061 腹腔注射感染平均体质量为 32.5 g 的褐点石斑鱼所得 LD₅₀ 值仅为 5.8×10^2 CFU/g 鱼体质量, 低于陈献稿等对斜带石斑鱼感染结果和 Liu 等对军曹感染结果, 说明该菌株对褐点石斑鱼具有较强毒性。

对于养殖鱼类细菌性疾病的应急治疗, 使用抗生素类药物仍然是一种快速高效的手段^[24]。本研究检测了 25 种抗菌药物病原菌 XC08061 的敏感性, 结果只有新生霉素、头孢噻肟、先锋必/舒巴坦、诺氟沙星、依诺沙星和庆大霉素 6 种抗菌药物对其敏感, 说明该菌株存在较强耐药性。在防治该病时可根据具体情况考虑选择此 6 种药物。不过, 由于抗生素类药物存在药物残留、耐药性和污染环境等显著缺陷, 在水产养殖的病害防治中即使是国家尚未列入禁用药物清单的各类抗生素药物, 在使用后也必须严格执行国家有关休药期的有关规定, 以保证食用水产品的安全。作者对病原菌 XC08061 的药敏检测结果与其他学者检测的哈氏弧菌药敏结果存在一定差异^[20,25], 说明哈氏弧菌的药敏性可能因区域、菌株类型等的不同而存在差异。因此, 在相关疾病防治时需

要根据病原菌的具体情况选择合适的种类,在使用前最好对病原菌株进行药敏检测。

参考文献:

- [1] 廖经球, 尹绍武, 陈国华, 等. 褐点石斑鱼的核型研究[J]. 水产科学, 2006, 26(11): 567-569.
- [2] 黄剑南, 林鑫, 翁少萍, 等. 中国大亚湾赤点石斑鱼神经坏死病毒分离株的基因型分析[J]. 高技术通讯, 2004, 14(11): 75-80.
- [3] 杨霞, 吴信中. 赤点石斑鱼的普通变形菌病原学研究[J]. 水产科学, 2005, 24(9): 5-7.
- [4] 陈晓燕, 胡超群, 陈偿, 等. 人工养殖点带石斑鱼弧菌病原菌的分离及鉴定[J]. 海洋科学, 2003, 27(6): 68-72.
- [5] Lee K K. Pathogenesis studies on *Vibrio alginolyticus* in the grouper, *Epinephelus malabaricus* Bloch et Schneider[J]. Microb Pathog, 1995, 19(1): 39 - 48.
- [6] Yui K C, Yang T I, Lee K K. Isolation and characterization of *Vibrio carchariae*, a causative agent of gastroenteritis in the groupers, *Epinephelus coioides*[J]. Curr Microbiol, 1997, 35(2): 109-115.
- [7] 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.
- [8] 徐怀恕, 杨学宋, 李筠. 对虾苗期细菌病害的诊断与控制[M]. 北京: 海洋出版社, 1999:166 - 190.
- [9] Mercedes A, Anicent R B. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1994, 76: 78-85.
- [10] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 353-381.
- [11] 萨姆布鲁克 J, D W 拉塞尔. 分子克隆实验指南(第三版)[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 87 - 99.
- [12] Bliss C I. The determination of the dosage-mortality curve from small numbers[J]. Quart J Pharm and Pharmacol, 1938, 11: 192-216.
- [13] WS/T 125-1999, 纸片法抗菌药物敏感试验标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 1999.
- [14] Nogueroles I, Blanch A R. Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous keys[J]. J Appl Microbiol, 2008, 105: 175-185.
- [15] Thompson F L, Iida T, Swings J. Biodiversity of vibrios[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2004, 68: 403-431.
- [16] 蹇文婴, 东秀珠. 定向进化同源基因在细菌系统进化研究中的应用[J]. 微生物学通报, 2000, 27(5): 377-381.
- [17] 石亚素, 董国忠, 薛超波, 等. 舟山养殖大黄鱼烂尾病中哈氏弧菌的分离鉴定及药敏实验[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(3): 267-269.
- [18] Lee K K, Chen Y L, Liu P C. Hemostasis of tiger prawn *Penaeus monodon* affected by *Vibrio harveyi*, extracellular products and a toxic cysteine protease[J]. Blood Cells, Molecules and Diseases, 1999, 25(13): 180-192.
- [19] 刘连生, 闫茂仓, 林志华, 等. 引起文蛤暴发性死亡病原菌的分离和鉴定[J]. 微生物学通报, 2009, 36(1): 71-77.
- [20] 杨嘉龙, 周丽, 绳秀珍, 等. 养殖刺参溃疡病病原菌 RH2 的鉴定及其生物学特性分析[J]. 水产学报, 2007, 31(4): 504-511.
- [21] Estes R M, Friedman C S, Elston R A, et al. Pathogenicity testing of shellfish hatchery bacterial isolates on Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae[J]. Dis Aquat Organ, 2004, 58: 223-230.
- [22] Ishimaru K, Muroga K. Taxonomical re-evaluation of two pathogenic *Vibrio* species isolated from milkfish and swimming crab[J]. Fish Pathol, 1997, 32: 59-64.
- [23] Liu P C, Lin J Y, Chuang W H, et al. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) from the farmed marine cobia fish *Rachycentron canadum* L with gastroenteritis syndrome[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2004, 20: 495 - 499.
- [24] 杨宁, 谢珍玉, 黄纪徽, 等. 海南养殖的奥尼罗非鱼暴发性出血症病原的分离与鉴定[J]. 海南大学学报(自然科学版), 2009, 27(1): 43-47.
- [25] 王斌, 于兰萍, 胡亮, 等. 红鳍东方鲀皮肤溃烂病原菌的分离与鉴定[J]. 中国水产科学, 2008, 15(2): 352-358.

Isolation and identification of bacterial pathogens from *Epinephelus fuscoguttatus* with scale-peeled syndrome disease

XU Xian-dong^{1,4}, XIE Zhen-yu^{1,2,3}, OUYANG Ji-long¹, WANG Shi-feng^{1,2,3},
ZHOU Yong-can^{1,2,3}

(1. College of Marine Science, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Experimental Teaching Demonstration Center of Marine Biology, Hainan University, Haikou 570228, China; 3. Key Laboratory of Tropical Aquatic Biotechnology of Hainan Province, Hainan University, Haikou 570228, China; 4. Jiangxi Institute for Fisheries Science, Nanchang 330039, China)

Received: Aug.,30, 2010

Key words: *Epinephelus fuscoguttatus*; *Vibrio harveyi*; scale-peeled syndrome disease; isolation; identification

Abstract: A serious scale-peeled disease was broken out in the cage cultured brown-marbled grouper *Epinephelus fuscoguttatus* (weight 30-35g) in Lingshui County, Hainan province, China. The moribund/dead groupers were characterized by scale-peeled, rupture of gallbladder and ascites. Three strains of bacteria, XC08061, XC08062 and XC08063, were isolated from the liver, spleen and /or the kidney of the diseased grouper and they were all proved to be pathogens by artificial infection. The moribund/dead fish exhibited scale-peeled as that observed in natural outbreak. All these three strains were identified to be *Vibrio harveyi* by biochemical tests and 16S rDNA sequences analysis. The LD₅₀ value of XC08061 for 12-14 cm *E. fuscoguttatus* is 5.8×10^2 colony forming units (CFU)/g of fish body. Drug susceptibility tests with 25 antibiotics indicated that the pathogen was only sensitive to novobiocin, cefotaxime, cefobid/sulbactam, norfloxacin, enoxacin and gentamicin, exhibiting relatively strong drug tolerance.

(本文编辑: 谭雪静)