

海水工厂化养殖大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*) 和褐牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*) 腹水病病原菌的分离与鉴定*

薛淑霞 冯守明 孙金生¹⁾

(天津师范大学化学与生命科学学院 天津 300074 天津市水产研究所 天津 300221)

提要 从患腹水病大菱鲂和褐牙鲈成鱼体内分离到两株致病作用强的病原菌 FS1 和 FS2 经人工感染实验表明菌株 FS1 和菌株 FS2 为腹水症的致病菌。采用常规的生理生化鉴定方法及梅里埃全自动微生物分析系统 (VITEK 32), 结合分子生物学方法进行病原菌的鉴定。结果表明, 菌株 FS1 和菌株 FS2 分别为迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 和溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)。菌株 FS1 16S rRNA 基因序列与迟缓爱德华氏菌的同源性达 99%; 菌株 FS2 的 16S rRNA 基因序列与溶藻弧菌、哈维氏弧菌、副溶血弧菌等的同源性均达 99%。为最终确定菌株 FS2 的分类地位, 测定了其 HSP60 基因序列, 进行网上同源性比对。分析结果表明, 菌株 FS2 与溶藻弧菌的同源性达 99%, 而与其他弧菌 HSP60 基因的同源性均低于 91%。这两种致病菌混合感染或分别感染均可造成养殖鲈鱼腹水病。

关键词 大菱鲂, 褐牙鲈, 腹水病, 病原菌, 分离, 鉴定

中图分类号 S941

大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*) 和褐牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*) 均属于鲈形目 (Pleuronectiformes) 鲈科 (Bothidae), 大菱鲂隶属于菱鲂属 (*Scophthalmus*), 褐牙鲈隶属于牙鲈属 (*Paralichthys*), 它们都是名贵的海洋低温经济鱼类。大菱鲂主要产于大西洋东北部沿岸, 我国在 1992 年引入该品种, 1999 年首次突破了大菱鲂苗种规模化生产, 随后开展了大菱鲂的养殖。褐牙鲈是东北亚沿岸的特有种, 主要分布于渤海、黄海、东海、南海以及朝鲜、日本、俄国远东沿岸海区, 我国从 20 世纪 80 年代开始褐牙鲈的人工育苗和商品养殖, 目前已经达到一定的养殖规模。大菱鲂和褐牙鲈已经成为我国北方沿海海水工厂化养鱼的主导品种。但是, 随着高密度集约化养殖的发展, 养殖大菱鲂和褐牙鲈疾病频发, 给养殖单位造成了巨大的经济损失, 严重制约了大菱鲂和褐

牙鲈养殖业的发展。腹水病是危害最为严重的疾病之一, 患病鱼体肝脏、肾脏肿大, 腹部膨胀, 解剖后见微黄泛红粘稠的液体, 伴随有不同程度的肠积液, 故称为腹水病。腹水病是被不同病原感染流行于不同地区的可感染多种水生动物一种综合性疾病。据报道, 目前已经从上海和江苏地区患腹水症的异育银鲫体内分离到苏伯利气单胞菌和嗜水气单胞菌 (孙其焕等, 1991); 从山东青岛某养殖场患腹水症的牙鲈体内分离到鳃弧菌 (莫照兰等, 2003); 从浙江宁波某网箱养殖场患腹水症的黑鲷体内分离到拟态弧菌 (王国良等, 2003); 从广西南宁某养殖场患腹水症的野生胡子鲶体内分离到豚鼠气单胞菌 (黄伟坚等, 2000); 从湖南沅江某养殖场患腹水症的乌鳢体内分离到费氏枸橼酸杆菌 (舒新华等, 1998); 从福建省仙游县某鳊鲂养殖场中患腹水症的鳊鲂

* 天津市农业重点攻关项目资助, 05YFG PNC02000 号。薛淑霞, 硕士生, E-mail: shuxiaxu@126.com

1) 通讯作者: 孙金生, 教授, E-mail: jssun1965@yahoo.com.cn

收稿日期: 2005-05-08 收修改稿日期: 2005-10-22

体内同时分离到嗜水气单胞菌、温和气单胞菌和迟缓爱德华氏菌(董传甫等, 2002)。

天津是我国海水工厂化养殖大菱鲂和褐牙鲈的主要地区, 养殖设施先进, 大菱鲂和褐牙鲈的工厂化养殖已被列为天津市重点发展的 4 条水产品产业带之一。但是, 近年来由于腹水病的爆发流行, 致使多家企业亏损。作者于 2003—2005 年对天津地区海水工厂化养殖场养殖鲆鱼腹水病的发生和流行情况进行了调查, 采用常规的生理生化鉴定方法及全自动细菌鉴定系统, 结合分子生物学方法进行了养殖鲆鱼腹水病病原菌的分离、鉴定, 为进一步开展腹水

病早期、敏感诊断技术和防治技术研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

患腹水病大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*)、褐牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*) 分别取自天津市海发海珍品养殖场、天津市八一盐场养殖场。挑选自然发病且症状明显的病鱼进行致病细菌分离、鉴定。样品数量和规格等详见表 1。细菌培养基为 2216E 培养基、普通营养琼脂培养基和 TCBS 培养基。

表 1 实验用鱼
Tab. 1 Description of experiment fish

采样地点	样品种类	样品数量 (尾)	样品规格 (体长: cm)
天津市海发海珍品养殖场	褐牙鲈	7	7. 0—9. 5
	大菱鲂	8	8. 2—11. 0
天津市八一盐场养殖场	褐牙鲈	10	14. 6—17. 4
	大菱鲂	10	23. 6—26. 9

1.2 病原的分离鉴定

在无菌条件下, 从病鱼的肝脏、肾脏、腹水等病灶处用接种环挑取组织, 在平板上划线分离培养。37℃恒温培养箱中培养 24h, 从平板上挑取优势菌落中的单菌落, 再次进行平板划线, 直至获得纯培养。取纯培养细菌分别进行细菌的形态特征, 生理生化特性检验、人工感染实验及细菌的分子生物学鉴定。根据结果进行细菌的相应的属、种鉴定。

1.2.1 菌落形态特征及生化特性检验 细菌的形态特征和染色结果观察在普通显微镜下进行。根据细菌形态、菌落形态和革兰氏染色等特征, 对分离、纯化的菌株进行分类, 选择数据卡, 采用梅里埃全自动微生物分析系统 (VITEK32) 和常规生化鉴定。然后根据不同属的特征选择生化反应试验, 进行进一步鉴定。细菌生化反应鉴定管 (杭州天和微生物试剂有限公司)。

1.2.2 人工感染实验

(1) 单剂量菌液人工感染实验

实验用健康大菱鲂取自天津市海发海珍品养殖场, 平均体长为 (8.6±1.2) cm。实验设 7 组, 每组 7 尾大菱鲂, 其中 6 组为实验组 (每株菌

设三个平行实验组), 1 组为对照组。实验鱼经暂养 72h 后, 进行人工注射感染试验。实验中病原菌的注射浓度用灭菌生理盐水配制成浓度约为 3×10^8 cfu/ml。注射方法为腹腔注射。注射剂量为 0.1ml。对照组注射同体积灭菌生理盐水。注射后观察试验鱼情况。对肾脏、腹水进行病原菌平板分离, 采用细菌生化反应鉴定管对分离细菌进行鉴定, 并与攻毒细菌进行比较。观察病鱼症状, 试验结束后统计发病率, 将人工感染病鱼的症状与天然发病鱼症状比较。

(2) 菌株 FS2 半致死剂量实验

实验用健康褐牙鲈取自天津市海发海珍品养殖场, 平均体长 (12.1±1.8) cm。实验设 6 组, 每组 10 尾大菱鲈 (同时设一个平行实验组)。暂养 72h 后, 开始人工感染实验。将菌株 FS2 接种于 2216E 培养基上, 28℃培养 24h, 用无菌生理盐水制成菌悬液, 比浊法调整菌液的浓度为 2.1×10^8 cfu/ml。10 倍梯度稀释至 2.1×10^4 cfu/ml。腹腔注射, 每尾注射 0.1ml。对照组注射等体积无菌生理盐水。每天少量投喂, 部分换水, 连续观察一周, 记录死亡情况。对频死的鱼记录表观症状, 解剖观察内脏情况, 对腹水、肝脏和肾脏进行

病原菌平板分离。采用寇氏法(杨茂成, 1990)计算半致死剂量。

1.2.3 16S rRNA 基因序列测定和分析 将细菌接种在普通营养琼脂平板上, 37℃培养过夜, 挑取单菌落, 悬浮于 100μl 灭菌的双蒸水中, 于 100℃水浴 15min 取上清作为 PCR 模板。采用细菌的 16S rRNA 基因序列的通用引物, 正向引物为 27f 5'-AGAGTTTGATCCTGG-3', 反向引物为 1492R: 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'。50μl PCR 反应体系包括: 1 × PCR Buffer; 2.5mmol/L MgCl₂; 4 × dNTP 混合物各 200μmol/L, 引物各 1.0μmol/L, Taq DNA 聚合酶 0.5μl(5U/μl), DNA 模板 2μl。PCR 反应条件为: 94℃预变性 4min; 94℃变性 1min; 57.2℃复性 1min; 72℃延伸 1.5min, 30个循环; 最后, 72℃延伸 10min。PCR 产物经纯化、连接、转化、克隆, 经检测取阳性克隆子送北京华大基因研究中心进行测序。测序结果利用 BLASTN 软件进行网上比对。

1.2.4 HSP60 基因序列测定和分析 将细菌接种在普通营养琼脂平板上, 37℃培养过夜, 挑取单菌落, 悬浮于 100μl 灭菌的双蒸水中, 于 100℃水浴 15min 取上清作为 PCR 模板。采用 HSP60 基因保守序列设计的引物 F: 5'-ACAA-CAGCAACGGTACTAGC-3'; R: 5'-CAACTTTCAG-GATGCCAC-3'(李宁求等, 2005)进行菌株 FS2 的扩增。50μl PCR 反应体系包括: 1 × PCR Buffer; 2.5mmol/L MgCl₂; 4 × dNTP 混合物各 200μmol/L, 引物各 1.0μmol/L, Taq DNA 聚合酶 0.5μl(5U/μl), DNA 模板 2μl。PCR 反应条件为: 94℃预变

性 4min; 94℃变性 1min; 55℃复性 1min; 72℃延伸 1.5min, 30个循环; 最后, 72℃延伸 10min。PCR 产物经纯化、连接、转化、克隆, 经检测取阳性克隆子送北京华大基因研究中心进行测序。测序结果利用 BLASTN 软件进行网上比对。

2 结果

2.1 病原的分离纯化及生化鉴定

根据革兰氏染色结果和细菌及菌落形态, 从患病的大菱鲆、褐牙鲆鱼体中分离并纯培养的病菌菌株被分为两类, 分别命名为 FS1 和 FS2。菌株 FS1 和 FS2 既可分别感染致病, 也可混合感染致病。菌株 FS1 在普通营养琼脂培养基上呈圆形、灰白色、表面光滑、边缘整齐, 菌落直径约为 1.0mm, 革兰氏染色为阴性。菌株 FS2 在 TCBS 培养基上呈圆形、黄色、富有粘性; 在普通营养琼脂培养基上呈圆形、隆起、透明或半透明、灰白色或黄色、边缘整齐、有光泽; 革兰氏染色为阴性。利用 GYZ-15e 和 GYZ-9V 生化反应鉴定系统(杭州天和微生物试剂有限公司)分别对菌株 FS1 和菌株 FS2 进行初步鉴定。结果分别见表 2 和表 3。然后送至天津市防病中心采用梅里埃全自动微生物分析系统(VITEK 32)对菌株进行鉴定(表 4)。根据伯杰氏手册(第九版)关于致病性弧菌生理生化指标鉴定说明, 在全自动微生物分析系统鉴定结果的基础上, 补充了部分生理生化试验, 结果见表 5。综合以上生理生化鉴定结果, 初步确定菌株 FS1 为迟缓爱德华氏菌, 菌株 FS2 为溶藻弧菌。

表 2 GYZ-15e 系统对菌株 FS1 鉴定结果
Tab 2 Results of biochemical test of Strain FS1 by GYZ-15e

实验项目	检测结果	实验项目	检测结果
硫化氢	+	葡萄糖产气	+
苯丙氨酸	-	赖氨酸	+
葡萄糖酸盐	-	鸟氨酸	+
蛋白胨水	+	棉子糖	-
葡磷酸水	+	山梨醇	-
枸橼酸盐	-	侧金盏花醇	-
尿素	-	木胶糖	-
半固体	+		

表 3 GYZ-9V 系统对菌株 FS2 鉴定结果
Tab. 3 Results of biochemical test of Strain FS2 by GYZ-9V

实验项目	检测结果	实验项目	检测结果
赖氨酸	+	甘露醇	+
精氨酸	-	水杨素	-
鸟氨酸	-	6% 氯化钠胨水	+
葡萄糖产气	-	枸橼酸盐	-
蔗糖	+		

表 4 分离菌 FS1 和 FS2 的生化性状
Tab. 4 Biochemical characteristics of Strains FS1 and FS2 by API

项 目	FS1	FS2	项 目	FS1	FS2
三氯新 (DP-300)	+	-	山梨醇 (SOR)	-	-
葡萄糖氧化 (OFG)	+	+	蔗糖 (SUC)	-	+
阳性生长控制 (GC)	+	+	肌醇 (INO)	-	-
醋酸盐 (ACE)	-	-	侧金盏花醇 (ADO)	-	-
七叶树苷 (ESC)	-	-	香豆酸 (COU)	-	-
植物尿蓝母 (PLI)	-	-	硫化氢 (H ₂ S)	-	-
尿素 (URE)	-	-	β-半乳糖苷酶 (ONP)	-	-
枸橼酸盐 (CIT)	-	-	鼠李糖 (RHA)	-	-
丙二酸盐 (MAL)	-	-	阿拉伯糖 (ARA)	-	-
苯丙氨酸 (TDA)	-	-	葡萄糖发酵 (GLU)	+	-
多粘菌素 B (PXB)	-	-	精氨酸 (ARG)	-	-
乳糖 (LAC)	-	-	赖氨酸 (LYS)	+	+
麦芽糖 (MLT)	-	+	鸟氨酸 (ORN)	+	+
甘露醇 (MAN)	-	-	氧化酶 (OXI)	-	+
木糖 (XYL)	-	-	10% 乳糖 (TLA)	-	
棉子糖 (RAF)	-	-			

表 5 菌株 FS2 部分生理生化性状
Tab. 5 Part of biochemical characteristics of Strain FS2

项 目	结 果	项 目	结 果
AGS(精氨酸葡萄糖斜面)	KA	D 甘露醇	+
NaCl 生长: 0%	-	VP 试验	-
3%	+	精氨酸二氢酶	-
6%	+	赖氨酸脱羧酶	-
8%	+	鸟氨酸脱羧酶	-
10%	+	O/129 10 ^μ g	R
42℃ 生长	+	150 ^μ g	S
D 纤维二糖	-	明胶酶	+
D 甘露糖	+	脲酶	-

注: + 示阳性, - 示阴性, K 示碱性, A 示酸性, R 示抗性, S 示敏感性

2.2 人工感染实验

2.2.1 单剂量菌液人工感染实验 人工感染实验结果表明,菌株 FS1和 FS2均能诱发大菱鲆产生典型腹水病症状,并导致死亡。FS1在注射 34h后开始发病,FS2在注射 19h后即开始发病。72h后实验组全部死亡,对照组在 72h内未见死亡。FS1菌株感染的实验组死亡鱼体体表有出血点、有腹水、肠积液、肾脏肿大、脾和胆囊肿大;FS2菌株感染的实验组死亡鱼体体表腐烂、有腹水、肠积液。与自然发病的大菱鲆症状相同。人工感染试验结果表明,菌株 FS1和 FS2均是大菱鲆和褐牙鲆腹水病原发病原。

2.2.2 菌株 FS2半致死剂量实验 结果见表 6。人工感染后的褐牙鲆出现体表出血,部分伴有溃疡点,解剖后见腹水,肠积液,肝脏和肾脏肿大,与自然发病的褐牙鲆症状相同,表明菌株 FS2是褐牙鲆的致病菌。

用改进的寇氏法计算菌株 FS2的半致死剂量:

$$\lg LD_{50} = X_k - d \left[\sum P - 0.5 \right]$$

其中, X_k 为最大对数剂量, d 为相邻两组对数剂量之差数, $\sum P$ 为各组死亡率之和。经计算 $LD_{50} = 1.05 \times 10^5$ cells

表 6 褐牙鲆 FS2感染实验
Tab. 6 Infection of flounder challenged by bacteria FS2

分 组	菌液浓度 (cfu/ml)	剂 量	实验数 (尾)	累计死亡数 (尾)	死亡率 (%)
1	2.1 × 10 ⁸	0.1	10	10	100
2	2.1 × 10 ⁷	0.1	10	10	100
3	2.1 × 10 ⁶	0.1	10	6	60
4	2.1 × 10 ⁵	0.1	10	2	20
5	2.1 × 10 ⁴	0.1	10	0	0
对照组	0.85% 灭菌生理盐水	0.1	10	0	0

2.3 16S rRNA 基因序列和同源性分析

为进一步从分子生物学角度确定菌株 FS1和菌株 FS2的分类学地位,测定了其 16S rRNA 基因序列,不包括两端引物结合区,所扩增的菌株 FS1的 16S rRNA 基因序列长度为 1459bp,菌株 FS2的 16S rRNA 基因序列长度为 1485bp。将菌株 FS1和菌株 FS2的 16S rRNA 基因序列在网上进行同源性比对,发现菌株 FS1与爱德华氏菌属 16S rRNA 基因序列自然聚类,在最相近的 15 个序列中,菌株 FS1与迟缓爱德华氏菌的同源性在 99% 以上。综合生化鉴定和 16S rRNA 基因序列分析结果,菌株 FS1鉴定为迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*);菌株 FS2与弧菌属的 16S rRNA 基因序列自然聚类,但是与哈维氏弧菌、溶藻弧菌和副溶血弧菌的同源性均在 99% 以上,不能由此确定其分类学地位。

2.4 HSP60 基因序列和同源性分析

测定菌株 FS2的 HSP60 基因序列,不包括两端引物结合区,所扩增的菌株 FS2的基因序列长度为 553bp。将菌株 FS2的 HSP60 基因序列在网

上进行同源性比对,发现菌株 FS2与溶藻弧菌的 HSP60 基因序列同源性达 99%,而与其他弧菌的 HSP60 基因序列的同源性均在 91% 以下。综合以上结果,综合判定菌株 FS2为溶藻弧菌。

3 讨论

腹水病是我国海水工厂化鱼类养殖中流行范围广、危害严重的细菌性疾病。近年来,对各地爆发的养殖鲆鱼腹水病调查和病原学研究结果表明,多种病菌均能导致腹水病的发生和流行,不同地区养殖鲆鱼腹水病的致病病原不完全一致,主要有迟缓爱德华氏菌、鳃弧菌等。这说明腹水病是一种综合性病症,它是由不同病原感染流行于不同地区的一种水生动物疾病。腹水病的这一特征给该病的诊断和防治造成了困难。为了有针对性地开展诊断技术和免疫防治及综合控制技术研究,作者对天津地区养殖鲆鱼腹水病进行了调查和致病病菌的分离、鉴定。结果表明,天津地区海水工厂化养殖大菱鲆和褐牙鲆腹水病菌是迟缓爱德华氏菌和溶藻弧菌。其中,溶藻弧菌是首次从患腹水症的养殖大菱鲆和褐

牙鲈体内被分离到。溶藻弧菌是沿海地区食物中毒和散在性腹泻的重要病原菌,同时也是多种水生动物的致病菌,如南美白对虾(周永灿等, 2003)、斜带石斑鱼(胡学峰等, 2005; 陈晓燕等, 2003)、鲑点石斑鱼(黄志坚等, 2002)、贝类(LEE, 1995)、大黄鱼(林克冰等, 1999)、黄鳍鲷(丁燊等, 2004)、锯缘青蟹(毛芝娟等, 2001)等均可被溶藻弧菌感染致病,并产生不同的病症。迟缓爱德华氏菌是肠杆菌科爱德华氏菌属中唯一使人致泻和其他疾病的细菌,也引起贝类、鱼类、两栖类和鸟类等多种动物的感染(高大庆等, 2001)。迟缓爱德华氏菌是海水中的常在菌,在各地养殖的患腹水症大菱鲈和褐牙鲈中均被分离到。迟缓爱德华氏菌除引起鱼类的腹水症外,也是鳗鲡肝肾病(卢全章等, 1994)、红头病(周凯等, 1999)和爱德华氏菌病(王国良等, 2003)的病原菌。

弧菌是水产动物的主要致病类群。由于弧菌种类多、种间特征比较接近,对弧菌的鉴定最为困难。不论是传统的生理生化试验还是分子生物学方法,都不可避免地存在一定的缺陷性。对于菌株 FS1,通过常规的生理生化鉴定、全自动细菌鉴定系统及生化鉴定管,结合 16S rRNA 基因序列分析方法即可明确鉴定为迟缓爱德华氏菌。而对于弧菌菌株 FS2 虽然全自动细菌鉴定系统所出示的报告结果是溶藻弧菌,但是其中的甘露醇一项的结果与伯杰氏手册(第九版)(Holt *et al.* 1994)中关于“致病性弧菌的鉴别性状”中所述的结果不一致,并且全自动微生物分析系统报告中的生化项目指标虽然多达 30 项,但很大一部分不是弧菌属的特征性指标,为此,作者根据伯杰氏手册(第九版)中关于“致病性弧菌的鉴别性状”中所规定的生化项目指标,按照《一般细菌常用鉴定方法》(中国科学院微生物研究所细菌分类组, 1978)做了关于菌株 FS2 的补充生化试验,结果表明,菌株 FS2 的生化试验结果与伯杰氏手册(第九版)中关于“致病性弧菌的鉴别性状”中所述的溶藻弧菌的生化性状最为接近。为从分子生物学的角度进一步确定菌株 FS2 的分类学地位,测定了其 16S rRNA 基因序列,网上进行同源性比对,发现其与溶藻弧菌、哈维氏弧菌、副溶血弧菌等的同源性都达 99%。热激蛋白(heat shock protein)是另一类应用于生物进化及分类的大分子物质,由于其进化速度较快,被广

泛地应用于亲缘关系较近的细菌的分类鉴定(Kwok *et al.* 1999; Jian *et al.* 2001),作者根据致病性弧菌的 HSP60 的通用引物(李宁求等, 2005),扩增了菌株 FS2 的 HSP60 基因序列,网上进行同源性比对,发现其与溶藻弧菌的同源性达 99%,而与其他弧菌的同源性均在 91% 以下。据报道, HSP60 种内序列的相似性为 91%—98%,种间序列相似性为 74%—93% (Kwok *et al.* 1999)。根据上述综合结果,菌株 FS2 被确定为溶藻弧菌。同时说明,鉴定弧菌必须结合多种方法,进行综合判定。

参 考 文 献

丁 燊, 徐 刚, 2004 黄鳍鲷弧菌病病原特性及其全菌苗的研究. 微生物学通报, 31(2): 1—5
王国良, 郑天伦, 金 珊等, 2003 黑鲷幼鱼腹水病原菌. 中国兽医学报, 23(1): 33—35
中国科学院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, 135—177
毛芝娟, 卓华龙, 杨季芳等, 2001 锯缘青蟹细菌性传染病的病原菌研究. 台湾海峡, 20(2): 187—192
卢全章, 朱心玲, 1994 鳗鲡肝肾病病原菌的研究. 水生生物学报, 18(4): 360—368
孙其焕, 孙佩芳, 金利华等, 1991 异育银鲫溶血性腹水病病原的研究. 水产学报, 15(2): 130—139
李宁求, 白俊杰, 吴淑勤等, 2005 斜带石斑鱼 3 种致病性弧菌的分子生物学鉴定. 水产学报, 20(3): 356—361
杨茂成主编, 1990 兽医统计学. 北京: 中国展望出版社, 232
陈晓燕, 胡超群, 陈 偿等, 2003 人工养殖点带石斑鱼弧菌病原菌的分离及鉴定. 海洋科学, 27(6): 68—72
林克冰, 周 宸, 刘家富等, 1999 海水养殖大黄鱼弧菌病的病原菌. 台湾海峡, 18(3): 342—346
周 凯, 郑国兴, 孙其焕, 1999 欧洲鳗鲡红头病病原的研究. 水生生物学报, 23(4): 304—310
周永灿, 张 本, 陈雪芬等, 2003 养殖对虾细菌性红体病的初步研究. 海洋科学, 27(5): 61—65
胡学峰, 石存斌, 潘厚军等, 2005 海水养殖斜带石斑鱼溃疡病病原菌(溶藻弧菌)的初步研究. 中国海洋大学学报, 35(2): 232—236
莫照兰, 茅云翔, 陈师勇等, 2003 养殖牙鲈鱼苗腹水症病原菌的鉴定及系统发育学分析. 海洋与湖泊, 34(2): 131—141
高大庆, 阚 飙, 陆承平等, 2001 迟缓爱德华氏菌溶血相关基因的测序和初步的功能分析. 遗传学报, 28(12): 1162—1167
黄伟坚, 黄 均, 秦爱珍等, 2000 野生胡子鲶腹水病病原

- 分离和鉴定. 中国兽医科技, 30(4): 30—33
- 黄志坚, 何建国, 2002 鲑点石斑鱼细菌病原的分离鉴定和致病性. 中山大学学报, 41(5): 64—67
- 董传甫, 林天龙, 陈日升等, 2002 日本鳎败血腹水病病原研究. 水产科学, 21(1): 5—8
- 舒新华, 金燮理, 肖克宇等, 1998 乌鳢腹水病病原的分离和鉴定. 湖南农业大学学报, 24(4): 286—290
- Holt J T, Krieg N R, Sneath P H A *et al*, 1994 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th Williams & Wilkins Co Baltimore, 190—191, 254—255
- Jan W, Zhu L, Dong X *et al*, 2001 New approach to phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences. Int J Syst Evol Microbiol 51(5): 1633—1638
- Kwok A Y, Su S C, Reynolds R P *et al*, 1999. Species identification and phylogenetic relationships based on partial HSP60 gene sequences within the genus *Staphylococcus*. Int J Syst Bacteriol 49(3): 1181—1192
- LEE K K, 1995 Pathogenesis studies on *Vibrio alginolyticus* in the grouper *Epinephelus malabaricus* Bloch et Schneider. Microb Pathog 19: 39—48
- Jan W, Zhu L, Dong X *et al*, 2001 New approach to phylogenetic

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PATHOGENIC BACTERIA IN SWOLLEN ABDOMEN OF CULTURED TURBOT(*SCOPHTHALMUS MAXIMUS*) AND FLOUNDER(*PARALICHTHYS OLIVACEUS*)

XUE Shu-Xia FENG Shou-Ming SUN Jin-Sheng

(College of Chemistry and Biology, Tianjin Normal University, Tianjin, 300074; Tianjin Fishery Institute, Tianjin, 300221)

Abstract Turbot(*Scophthalmus maximus*) and flounder(*Paralichthys olivaceus*) are two members of Bothidae of Pleuronectiformes. They are rare oceanic fish species in high economic value in northern China. With the rapid development in high-density aquaculture, diseases have become a major obstacle to the cultivation of them and other aquatic animals. During 2003—2005, an outbreak of swollen abdomen in fish farms in Tianjin, China resulted in serious mortality. The suffered fish show special syndrome such as slow moving, swollen abdomen with much yellowish or sanguineous mucoid fluid, and tumid liver and kidney. Two strains of pathogenic bacteria, namely FS1 and FS2 were isolated from suffered adult fishes. Strains FS1 and FS2 were proved to be the pathogenic bacteria by the infection experiment. Strain FS2 was virulent to *P. olivaceus* with an LD_{50} at 1.05×10^5 cells by intramuscular injection experiment.

In this research, different methods including VITEK system, traditional physiological and biochemical identification and molecule methods were used to identify the two pathogenic bacteria. The results showed that the strains were respectively identified as *Edwardsiella ictala* and *Vibrio alginolyticus*. The 16S rRNA gene sequence of Strain FS1 showed 99% similarity to *E. ictala*, while that of Strain FS2 shared 99% similarity with *V. alginolyticus*, *V. hatweyi* and *V. parahaemolyticus*. In order to identify Strain FS2, HSP60 gene partial sequence of the strain was determined. By online homological comparison, the Strain FS2 was found having 99% similarity to *V. alginolyticus*, while the similarity to other vibrios was less than 91%. Whether mixed infection or individual infection could result in swollen abdomen of cultured turbot and flounder.

Key words *Scophthalmus maximus*, *Paralichthys olivaceus*, Swollen abdomen, Pathogenic bacteria, Isolation, Identification