

半滑舌鳎源美人鱼发光杆菌的分离鉴定及致病性研究*

邵蓬¹, 武尊¹, 雍朋政¹, 赵重阳¹, 许远飞¹, 汤青平¹, 汪笑宇²

(1. 天津农学院水产学院, 天津市水产生态及养殖重点实验室, 天津 300384; 2. 天津渤海水产研究所, 天津 300457)

摘要: 探究引起半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Gunther)发病死亡的原因及其病原菌的药敏特性, 为生产中有效防治该病提供理论依据。于2018年从天津市某养殖场患病半滑舌鳎中分离得到3株优势菌, 回归感染实验证实菌株PSC0601对半滑舌鳎具有致病性。通过肉眼观察可见半滑舌鳎腹腔严重肿胀, 腹部两侧肌肉出血, 解剖后可见半滑舌鳎肠道、肝脏等组织器官亦有大量出血。经API鉴定系统和16S rDNA序列分析鉴定该菌株为美人鱼发光杆菌美人鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*)。该菌在绵羊血平板上呈现 β 型溶血, 人工回归感染实验结果显示该菌对半滑舌鳎的半数致死量(LD_{50})为 1.5×10^4 CFU/g。对48种抗菌药物的药敏实验结果表明, 菌株PSC0601对氟苯尼考、氯霉素、阿莫西林、阿奇霉素、壮观霉素、头孢哌酮等20种药物具有较高敏感性。研究结果表明, 美人鱼发光杆菌美人鱼亚种对半滑舌鳎具有较强致病性, 可导致肝脏、肠道等器官发生出血性坏死, 引发鱼类死亡。本文通过对该菌的药物敏感性进行研究, 以期对鱼类养殖过程中由该菌引起的爆发性疾病提供药物防治理论依据。

关键词: 半滑舌鳎; 美人鱼发光杆菌美人鱼亚种; 致病性; 药敏实验

中图分类号: S941.42

文献标志码: A

文章编号: 1672-5174(2020)06-042-08

DOI: 10.16441/j.cnki.hdx.20180414

引用格式: 邵蓬, 武尊, 雍朋政, 等. 半滑舌鳎源美人鱼发光杆菌的分离鉴定及致病性研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2020, 50(6): 42-49.

SHAO Peng, WU zun, YONG Pengzheng, et al. Isolation and identification of *Photobacterium damsela* from half-smooth tongue sole and evaluation of its pathogenicity[J]. Periodical of Ocean University of China, 2020, 50(6): 42-49.

美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damsela*)又称为美人鱼弧菌(*Vibrio damsela*), 包括2个亚种美人鱼发光杆菌美人鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*)和美人鱼发光杆菌杀鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*), 都是革兰氏阴性细菌性鱼类病原体, 呈杆状或者球杆状, 在海洋中广泛存在。美人鱼发光杆菌杀鱼亚种是巴斯德菌病的致病因子^[7]。美人鱼发光杆菌美人鱼亚种不仅是野生和养殖鱼类的病原体, 也是海洋动物和人类的病原体, 没有明显的宿主特异性, 最初于1981年被分离为雀鲷(*Chromis punctipinnis*)皮肤溃疡的致病因子^[6]。它是导致各种海洋物种溃疡和出血性败血症的主要病原体, 如五条鲷(*Seriola quinqueradiata*)^[11]、卵形鲳鲷(*Trachinotus ovatus*)^[3]、军曹鱼(*Rachycentron canadum*)^[2]、条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)^[1]等多种海洋经济鱼类。该菌使患病鱼临床表现为体表溃疡, 败血症, 鳍部出血, 断尾。据报道, 美人鱼发光杆菌美人鱼亚种引起人类伤口感染和致命性坏死性筋膜炎^[8-9], 并且还从患有菌血症或脑膜炎的患者中分离出来并可

能导致致命的结果^[5]。

2018年6月, 天津市滨海新区某海水工厂化养殖场半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Gunther)一周内死亡率达到20%, 对患病濒死的半滑舌鳎进行病原分离, 得到3株优势菌, 通过回归感染实验确定菌株PSC0601对该鱼致病, 通过细菌形态, 生理生化和16S rDNA基因序列对致病菌进行鉴定, 通过药敏实验和病理组织切片, 以期对半滑舌鳎的健康养殖和病害的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

濒死患病半滑舌鳎选自天津市滨海新区某海水养殖场, 体长(21±2) cm, 体质量(40±2) g, 健康半滑舌鳎选自天津市滨海新区乾盛源半滑舌鳎养殖公司, 体长(19±2) cm, 体质量(36±3) g, 暂养7 d后用于感染实验。

细菌分离所用的2216E和TCBS培养基购自青岛海博生物技术有限公司; 脑心浸液培养基购自青岛海博生

* 基金项目: 天津市科技支撑项目(18YFZCNC01190)资助

Supported by Tianjin Science and Technology Project(18YFZCNC01190)

收稿日期: 2018-12-17; 修订日期: 2019-03-31

作者简介: 邵蓬(1982-), 男, 硕士, 高级工程师。E-mail: shaopeng@tjau.edu.cn

物技术有限公司;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;16S rDNA 所用的引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司合成;TAE 缓冲液购自上海百赛生物科技有限公司;药敏实验所用的药敏纸片购自温州市康泰生物科技有限公司。

1.2 病原菌的分离培养

在无菌条件下解剖具有典型症状的濒死病鱼,取病鱼的心、肾脏、肝脏、脾脏、肠道等部位,加入灭菌的磷酸盐缓冲液(PBS)研磨,取研磨液划线接种于 2216E 平板上,置于 25 °C 培养箱中培养 24 h,在平板上挑取形态一致的优势菌落进行多次纯化培养,直到获得纯培养菌株后,放入-80 °C 冰箱保存备用。

1.3 致病菌的鉴定

1.3.1 致病菌的形态学观察 挑取纯培养菌株中的单菌落,分别在 2216E 琼脂平板和血琼脂平板上进行菌落形态和溶血性的观察,并且对分离后的菌株进行革兰氏染色,通过镜检观察其形态和大小。

1.3.2 致病菌 16S rDNA 基因序列测定与系统发育学分析 制备模板 DNA:挑取 PSC0601 菌株的单菌落置于已装好 100 μ L 超纯水的离心管中,煮沸 10 min,12 000 g 离心 10 min,取上清液为模板 DNA。PCR 扩增所用的引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,上下游引物序列分别为 27F (5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-CTACGGT-TACCTTGTTAGGAC-3')。50 μ L PCR 反应体系: Taq DNA 聚合酶 25 μ L、上下游引物各 1.5 μ L、灭菌双蒸水 20 μ L、DNA 模板 2 μ L。PCR 反应条件:95 °C 预变性 3 min; 98 °C 变性 10 s; 55 °C 复性 15 s; 72 °C 延伸 10 s, 30 个循环;最后 72 °C 温育 5 min。产物经琼脂糖凝胶电泳。

对该菌株的测序结果经过拼接后,通过 NCBI 的 blast 检索系统进行同源性分析,下载同源性高的菌株序列和其他相关菌种的菌株序列。然后采用 MEGA7.0 软件构建系统发育树。

1.3.3 致病菌的生理生化鉴定 按照所购买的产品说明书所述以法国 API 20E 细菌鉴定系统的生化实验测定细菌的生理生化指标。

1.4 人工回归感染实验

将 PSC0601 菌株接种于 BHI(含 2.0% NaCl)液体培养基,30 °C 恒温摇菌 24 h,麦氏比浊法调整细菌浓度为 1.0×10^8 CFU/mL,无菌生理盐水稀释为 1.0×10^6 、 1.0×10^5 、 1.0×10^4 、 1.0×10^3 和 1.0×10^2 CFU/mL,共 5 个稀释度。

选择规格均一、活力好的半滑舌鳎进行回归感染实验。实验在 60 L 定制水族缸中进行,随机分成 6 组,5 组实验组,1 组对照组,每组 10 条鱼,采用腹腔注射

的方式,实验组每尾鱼腹腔注射菌液 0.2 mL,对照组鱼腹腔注射无菌生理盐水 0.2 mL。注射后,7 d 观察试验鱼的发病症状及死亡情况,死鱼立即解剖取样,并从死鱼的病灶进行细菌的分离鉴定。采用 Bliss 法测定 7 d 的 LD₅₀。

1.5 致病菌的药敏试验

药敏实验采用纸片扩散法(K-B 法),挑取单菌落制成浓度约为 1.0×10^8 CFU/mL 菌悬液,无菌棉签蘸取纯化的菌液(0.5 个麦氏浊度),在培养基表面涂布均匀,培养基底下垫一张适用于药敏试验纸片粘贴标准的六方形白纸,将药敏纸片按照六方形白纸安放位置分别贴放到培养基表面,25 °C 培养 24 h,测定药敏纸片抑菌圈直径,重复 2 次,取平均值,按照所购抗菌药物药敏纸片的产品使用说明,对结果进行判定。

1.6 主要器官组织病理观察

用解剖工具分别取患病半滑舌鳎和正常半滑舌鳎的肝脏和肠。用 Bouin 氏液固定 24 h,直接用 70%乙醇洗数次,再用 70%~100%乙醇逐级脱水 45~60 min,然后二甲苯透明,石蜡包埋,用石蜡切片机切片,HE 染色,中性树胶封片,在显微镜下观察并拍照保存。

2 结果

2.1 患病鱼临床症状检查结果

患病半滑舌鳎拒食,行动迟缓,受惊吓后,过度反应,体表鳍条、尾鳍无明显症状,腹部肿胀明显,解剖腹腔内有积水,内脏组织器官出血严重。通过水浸片显微镜下观察鳃、体表粘液及病变组织,未发现真菌及寄生虫。

2.2 病原菌的分离及形态学观察

分别从患病半滑舌鳎肝脏和肠道分离得到 3 株优势菌,经过人工感染预试验证实其中优势菌 PSC0601 为致病菌,其他 2 株菌 PSC0602、PSC0603 均不致病。在 2216E 琼脂平板上 25 °C 培养 24 h 后, PSC0601 菌株的菌落为圆形,乳白色,表面光滑湿润,边缘光滑,菌落直径 1~2 mm。病原菌在绵羊血平板上呈现典型的 β 型溶血(见图 1),病原菌进行革兰氏染色,在镜下观察,呈球杆状革兰氏阴性菌(见图 2 箭头所示)。



图 1 PSC0601 菌株血琼脂培养

Fig.1 PSC0601 strain blood agar culture



图2 PSC0601菌株革兰氏染色

Fig.2 PSC0601 strain Gram stain

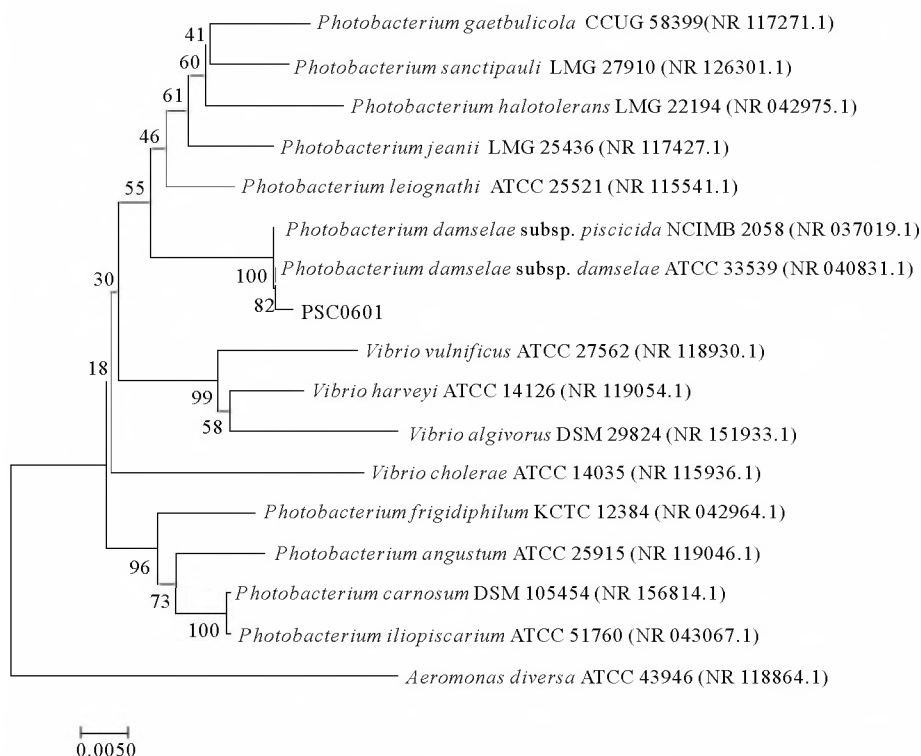


图3 基于菌株 PSC0601 的 16S rDNA 序列所构建的系统发育树

Fig 3 Phylogenetic tree constructed based on the 16S rDNA sequence of strain PSC0601

在 GenBank 数据库选取同源性较高的美人鱼杆菌菌株和不同亲缘关系的菌株的 16S rDNA 序列,利用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树(见图 3),进行系统进化分析,结果发现 PSC0601 菌株与美人鱼发光杆菌的 2 个亚种处为同一分支,进一步证明 PSC0601 菌株为美人鱼发光杆菌。

2.3.2 生理生化反应结果 生理生化结果表明(见表 1),该 PSC0601 菌株在 25 和 37 °C 均生长;在革兰氏染色、β-半乳糖苷酶、赖氨酸脱羧酶、色氨酸脱氨酶、H₂S 产生、鸟氨酸脱羧酶、吲哚产生等生化项目结果显示为阴性;在氧化酶、精氨酸双水解酶、脲酶、V-P 实验、葡萄糖、硝酸盐还原等生化项目结果显示为阳性;在 O-F 实验结果显示能发酵;该 PSC0601 菌株在 API 20E 细菌鉴定系统编号为 201500457,与美人鱼发光杆菌美人鱼亚种生理生化特征一致。

2.3 致病菌的鉴定

2.3.1 致病菌 16S rDNA 基因序列测定与系统发育学分析 采用通用引物扩增所分离菌株的 16S rDNA 基因,测序结果经过去除载体序列和拼接后,PSC0601 菌株 16S rDNA 基因的片段为 1 454 bp,在 NCBI 数据库中进行 Blast 比对,结果显示 PSC0601 菌株与美人鱼发光杆菌的同源性最高,均都达到 99%,所以不能以此直接区分 PSC0601 菌株为美人鱼亚种或杀鱼亚种,还要通过生理生化特性进行分析才能确定其为美人鱼亚种或杀鱼亚种。

2.4 人工回归感染实验

感染实验结果显示,注射菌株 PSC0601 的实验组半滑舌鲷在感染 1 d 拒食、受惊吓后,过度反应、腹腔肿大。在感染的 2 d 注射浓度为 1×10^6 组最先开始死亡,感染至 7 d 该组实验鱼全部死亡,人工感染实验发病鱼与自然发病鱼的症状相同,体表腹腔肿大,腹部两侧肌肉出血,体内组织器官出血严重。而对照组及另一实验组(1×10^2)不表现出任何症状,无一死亡(见表 2)。从人工感染后发病的濒死半滑舌鲷肝脏及肠道处分离细菌,均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原感染菌 PSC0601 相同,再次感染半滑舌鲷,也导致其死亡,说明所分离的菌株 PSC0601 对半滑舌鲷具有致病性。根据表 2 的实验结果,按照 Bliss 法,计算得到半数致死量 LD₅₀ 为 1.5×10^4 CFU/g,菌株 PSC0601 有强的致病性。

表 1 菌株 PSC0601 的主要生理生化指标检测结果

Table 1 Test results of main physiological and biochemical indexes of strain PSC0601

生理生化指标 ^①	菌株 ^② PSC0601	参考菌株 ^③ (201500457)	生理生化指标 ^①	菌株 ^② PSC0601 ^②	参考菌株 ^③ (201500457)
革兰氏染色 Gram stain	—	—	蔗糖 Sucrose	—	—
运动性 Motility	+	+	鼠李糖 Rhamnose	—	—
McC 生长 McC growth	+	+	葡萄糖 Glucose	+	+
25℃生长 25℃ growth	+	+	蜜二糖 Melibiose	—	—
37℃生长 37℃ growth	+	+	阿拉伯糖 Arabinose	—	—
尿酶 Urease	+	+	肌醇 Inositol	—	—
氧化酶 Oxidase	+	+	甘露醇 Mannitol	—	—
明胶酶 Gelatinase	—	—	山梨醇 Sorbitol	—	—
色氨酸脱氨酶 Tryptophan deaminase	—	—	H ₂ S 产生 H ₂ S production	—	—
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	—	—	吲哚产生 Indole production	—	—
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	—	—	硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+
β-半乳糖苷酶 β-galactosidase	—	—	柠檬酸盐利用 Citrate utilization	—	—
精氨酸双水解酶 Arginine digydrolase	+	+	V-P 实验 V-P test	+	+
苦杏仁苷 Amygdalin	—	—	O-F 实验 O-F test	F	F

注：—表示阴性；+表示阳性；F 表示发酵。

Note: —:means negative; + :means positive; F : means fermentation.

①Physiological and biochemical indexes;②Bacterial strain;③Reference strains

表 2 半滑舌鲷人工回归感染实验结果

Table 2 Half-smooth tongue sole artificial regression infection experiment results

组别 Group	菌株浓度 Concentration /CFU·mL ⁻¹	注射剂量 Dose/mL	感染死亡鱼数 Number of dead fish infected							死亡数 Number of deaths	死亡率 Mortality/%
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d		
实验组 Test	1×10 ⁶	0.2	0	3	2	1	2	1	1	10	100
	1×10 ⁵	0.2	0	0	2	2	1	2	1	8	80
	1×10 ⁴	0.2	0	0	0	0	0	1	2	3	30
	1×10 ³	0.2	0	0	0	0	0	1	1	2	20
	1×10 ²	0.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
对照组 Control	0.85%NaCl	0.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0

2.5 药敏实验结果

通过对 48 种抗菌药物药敏实验结果显示(见表 3),PSC0601 菌株对氟苯尼考、氯霉素、阿莫西林、阿奇霉素、壮观霉素、头孢哌酮等 20 种药物高度敏感;对利

福平、克拉霉素、罗红霉素、诺氟沙星、多黏菌素 B、新霉素、呋喃唑酮 7 种药物中度敏感;对土霉素、四环素、红霉素、环丙沙星、庆大霉素、链霉素等 21 种药物不敏感。

表3 菌株PSC0601药敏实验结果

Table 3 Results of antibiotic sensitivity test of strain PSC0601

抗菌药物 ^①	单片药物规格 ^② /μg·片 ⁻¹	抑菌圈直径 ^③ /mm	药物敏感度 ^④	抗菌药物 ^①	单片药物规格 ^② /μg·片 ⁻¹	抑菌圈直径 ^③ /mm	药物敏感度 ^④
头孢唑肟 Ceftizoxime	30	34	S	诺氟沙星 Norfloxacin	10	14	I
头孢吡肟 Cefepime	30	31	S	呋喃唑酮 Furazolidone	300	17	I
头孢哌酮 Cefoperazone	75	22	S	新霉素 Neomycin	30	14	I
头孢曲松 Ceftriaxone	30	27	S	四环素 Tetracycline	30	7	R
头孢噻肟 Cefotaxime	30	31	S	多西环素 Doxycycline	30	8	R
头孢噻吩 Cefotaxime	30	28	S	米诺环素 Minocycline	30	10	R
氨苄西林 Ampicillin	10	21	S	替加环素 Tigecycline	15	7	R
替卡西林 Ticarcillin	75	28	S	土霉素 Oxytocin	30	10	R
阿莫西林 Amoxicillin	10	21	S	红霉素 Ergomycin	15	12	R
阿洛西林 Azlocillin	75	25	S	链霉素 Streptomycin	10	11	R
美洛西林 Mezlocillin	75	24	S	克林霉素 Clindamycin	2	8	R
氯霉素 Chloramphenicol	30	29	S	林可霉素 Lincomycin	2	11	R
阿奇霉素 Azithromycin	15	18	S	庆大霉素 Gentamicin	10	12	R
壮观霉素 Spectamycin	100	28	S	卡那霉素 Kanamycin	30	12	R
亚胺培南 Imipenem	10	25	S	麦迪霉素 Medicamycin	30	12	R
美罗培南 Meropenem	10	28	S	万古霉素 Vancomycin	30	6	R
厄他培南 Ertapenem	10	26	S	恩诺沙星 Enrofloxacin	5	8	R
磺胺甲恶唑 Sulfamethoxazole	25	22	S	左氟沙星 Levofloxacin	5	12	R
甲氧苄啶 Trimethoprim	5	25	S	环丙沙星 Ciprofloxacin	5	12	R
氟苯尼考 Florfenicol	30	29	S	氧氟沙星 Ofloxacin	5	10	R
利福平 Rifampin	5	20	I	羧苄西林 Carbenicillin	100	17	R
克拉霉素 Clarithromycin	15	14	I	萘啶酸 Nalidixic acid	30	6	R
罗红霉素 Roxithromycin	15	14	I	替考拉宁 Koalaranin	30	6	R
多黏菌素 B Polymyxin B	30	15	I	丁胺卡那 Amikacin	30	13	R

注: 敏感度判定标准: S 为高度敏感, I 为中度敏感, R 为不敏感。

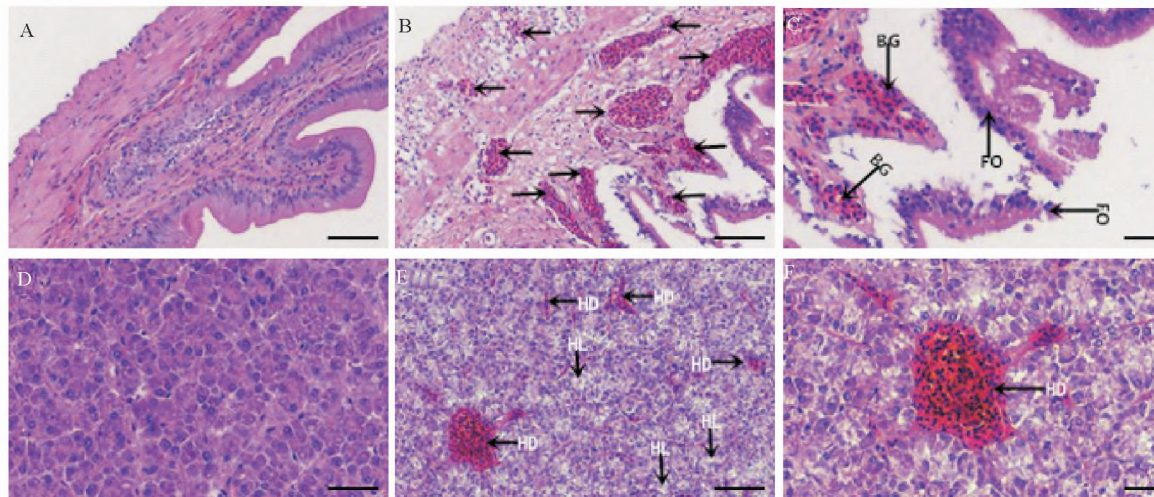
Note: Sensitivity criteria: S; highly sensitive, I; moderately sensitive, R; not sensitive.

①Antibacterial drugs; ②Single tablet drug specifications; ③Diameter of inhibition circle; ④Drug sensitivity

2.6 患病半滑舌鲷肠及肝脏组织病理观察

采用 HE 染色法对患病鱼肝脏及肠道进行组织病理观察(见图 4), 肝脏病理切片显示, 肝细胞肿胀, 肝细胞索结构紊乱, 肝血窦充血明显, 肝细胞溶解性坏死。

图中肝血窦扩张、充血明显, 且这种类型的肝血窦在肝小叶中普遍存在。肠道病理切片显示, 肠道中粘膜、粘膜下层、粘膜肌层均出现出血, 肠道横纹边缘粘膜上皮结构紊乱、脱落、粘膜固有层出血且局灶性坏死。



(A 肠道, 对照组。B 肠道, 粘膜、粘膜下层、粘膜肌层出血(向左和向右箭头)。C 肠道, 粘膜上皮结构紊乱, 脱落(箭头 FO); 粘膜固有层出血(箭头 BG)。D 肝脏, 对照组。E 肝脏, 肝血窦充血(箭头 HD); 肝细胞溶解性坏死(箭头 HL)。F 肝脏, 肝血窦扩张充血(箭头 HD)。图片 A、B、D 和 E 的比例尺 = 50 μm , 图片 C 和 F 的比例尺 = 20 μm 。A intestinal, control group. B intestinal, mucosal, submucosal, mucosal muscle layer bleeding (left and right arrows). C intestinal, mucosal epithelial structure disorder, shedding (arrow FO); mucosal lamina propria bleeding (arrow BG). D liver, control group. E liver, hepatic sinus congestion (arrow HD); hepatocyte lytic necrosis (arrow HL). F liver, hepatic sinusoidal dilatation and hyperemia (arrow HD). Scale bar of A, B, D and E = 50 μm , Scale bar of C and F = 20 μm .)

图 4 美人鱼发光杆菌感染半滑舌鲷的肠和肝组织病理学变化

Fig 4 *Photobacterium damsela* infects the intestinal and liver histopathological changes of half-smooth tongue sole

3 讨论

美人鱼发光杆菌是公认的鱼类病原体, 研究表明该菌对多种海洋经济鱼类致病, 目前已陆续从养殖大菱鲆(*Psetta maxima*)^[4]、军曹鱼(*Rachycentron canadum*)^[2]、五条鲷(*Seriola quinqueradiata*)^[11]、条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)^[1]体内分离到该菌并通过人工回归试验验证美人鱼发光对以上宿主的致病性。本次研究从患病的半滑舌鲷肝脏、肠道中分离到大量形态均一的菌落, 经形态学、生理生化分析及分子生物学鉴定所得的优势致病菌株为美人鱼杆菌美人鱼亚种。美人鱼发光杆菌美人鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*)是美人鱼发光杆菌的一个亚种。据报道, 美人鱼亚种已被公认为海洋动物和人类的新兴病原体^[10]。患病半滑舌鲷体表腹腔肿胀, 腹部两侧肌肉出血。体内肝脏肠道等组织器官出血严重, 其中肝脏表现最为严重, 鳃轻微出血, 脑部解剖出血也非常严重, 说明该菌的致病性是很强的。组织病理分析可见肠和肝脏出血严重, 进行该菌人工回归感染实验后, 与病鱼症状基本一致, 从回归感染实验中的患病半滑舌

鲷再次进行细菌的分离鉴定, 也证实该 PSC0601 菌株为此次患病半滑舌鲷主要的致病菌。目前国内外关于半滑舌鲷感染美人鱼发光杆菌美人鱼亚种的报道较少, 本次研究中, 患病半滑舌鲷为典型的出血性败血症与 Nan 等^[12]感染的半滑舌鲷相似, 但体表却无明显的溃疡症状。该菌对半滑舌鲷的半数致死量(LD_{50})为 1.5×10^4 CFU/g, 与 Nan 等^[12]从半滑舌鲷所分离菌的半数致死量(LD_{50}) 3.1×10^4 CFU/g 相比较低, 可能是其不同菌株的毒力不同而导致的。

在细菌分类学研究中, 16S rDNA 基因序列是最常用的遗传标记, 通常将 16S rDNA 基因同源性大于 97.5% 的菌株为同种菌株^[13]。该研究中菌株 PSC0601 与美人鱼亚种和杀鱼亚种的 16S rDNA 的基因序列的同源性均达到 99% 以上。构建系统发育树, 显示 PSC0601 菌株与美人鱼发光杆菌聚为一支, 亲缘关系最近, 但却不能直接鉴定其种。一些有关美人鱼杆菌的报道表明, API 20E 是鉴定美人鱼发光杆菌的一种有效手段, 其鉴定该菌株准确率为 100%^[18]。本次研究中, PSC0601 菌株在 API 20E 细菌鉴定系统编号为 201500457, 与美人鱼发光杆菌美人鱼亚种生理生化特

征一致,并且我们通过对该美人鱼发光杆菌不同种的耐受温度进行补充鉴定,杀鱼亚种在 37 °C 下不生长而美人鱼亚种在 37 °C 下生长良好,并且 API 20E 细菌鉴定手册表明美人鱼亚种在 25 °C 下生长良好。本研究结果显示,该菌在 25 和 37 °C 下生长良好,进一步证实了 PSC0601 菌株为美人鱼发光杆菌美人鱼亚种。

目前对于鱼类细菌病的治疗,生产上通常采用抗生素治疗。因为巴斯德菌病是水产养殖中经济损失巨大的主要原因,因此美人鱼发光杆菌杀鱼亚种的抗生素敏感性比美人鱼发光杆菌美人鱼亚种更受关注。从不同国家分离的美人鱼发光杆菌杀鱼亚种菌株被发现对一些抗生素有抗性,如氨苄青霉素,羧苄青霉素,头孢噻吩,头孢唑啉,红霉素,卡那霉素和四环素^[14-17],但对于美人鱼发光杆菌美人鱼亚种对多种抗生素抗性的相关报道也陆续增多,包括对四环素,环丙沙星,氟苯尼考,氨苄青霉素,磺胺甲恶唑/甲氧苄啶,氧噻酸,土霉素,红霉素和青霉素 G 的抗性^[7],对此本研究也对该 PSC0601 菌株进行了 48 种抗生素药物的药敏实验分析,该菌株对氟苯尼考、氯霉素、阿莫西林、阿奇霉素、壮观霉素、头孢哌酮等 20 种药物高度敏感,由于氯霉素等为水产禁用药物,故本结果可为同类药物使用提供参考依据。本研究结果发现该菌对大多数抗生素耐药,我国抗生素仍是水产养殖病害的主要防治措施,水产抗生素滥用不仅会污染水体环境,而且还会加速细菌对抗生素的耐药,因此,还应研究疾病发生的流行病学和病原菌的耐药机制,如开发疫苗、中草药防治^[19]、益生菌调控等其他合理有效的方法预防疾病的发生,是实现健康养殖势在必行的的重要手段。

4 结语

研究显示引起天津市滨海新区某海水工厂化养殖场半滑舌鳎患病的病原菌为美人鱼发光杆菌美人鱼亚种。该菌能使半滑舌鳎的肝脏,肠道等器官发生明显的病理性变化并导致其死亡。该菌对氟本尼考、氯霉素等高度敏感,可以使用这些药物对患病的半滑舌鳎进行治疗。但由于美人鱼发光杆菌对抗生素会产生耐药性,所以为防止再次出现感染该菌导致养殖鱼大量死亡的情况,应加深对该病原体致病机理以及免疫原性的研究,以期达到用该菌的疫苗对其进行有效防治的目的。

参考文献:

- [1] 王庚申,许文军,谢建军,等. 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[J]. 渔业科学进展, 2017, 38(2): 151-157.
Wang G S, Xu W J, Xie J J, et al. Isolation and identification of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from diseased rock

- bream (*Oplegnathus fasciatus*) [J]. Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(2): 151-157.
- [2] Tran H B, Lee Y H, Guo J J, et al. De novo transcriptome analysis of immune response on cobia (*Rachycentron canadum*) infected with, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, revealed inhibition of complement components and involvement of MyD88-independent pathway[J]. Fish&Shellfish Immunology, 2018, 77:120-130.
- [3] 宋沙沙,马红玲,冯娟,等. 卵形鲳鲹 Tf、TNF α 和 C-Lys 的组织分布及对美人鱼发光杆菌感染的响应[J]. 南方水产科学, 2017, 13(2): 77-84.
Song S S, Ma H L, Feng J, et al. Tissue distribution and response to infection of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* of Tf, TNF α and C-Lys in *Trachinotus ovatus*[J]. South China Fisheries Science, 2017, 13(2): 77-84.
- [4] 吴同垒,张志强,李巧玲,等. 大菱鲆源美人鱼发光杆菌杀鱼亚种的分离鉴定[J]. 中国兽医学报, 2018(2): 301-306.
Wu T L, Zhang Z Q, Li Q L, et al. Isolation and identification of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from turbot[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2018(2): 301-306.
- [5] Rivas A J, Lemos M L, Osorio C R. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, a bacterium pathogenic for marine animals and humans[J]. Frontiers in Microbiology, 2013, 4: 283.
- [6] Rivas A J, Balado M, Lemos M L, et al. The *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* hemolysins damselysin and HlyA are encoded within a new virulence plasmid[J]. Infection and Immunity, 2011, 79(11): 4617-4627.
- [7] Chiu T H, Kao L Y, Chen M L. Antibiotic resistance and molecular typing of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, isolated from seafood [J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 114(4): 1184-1192.
- [8] Clarridge J E, Zigelboim-Daum S. Isolation and characterization of two hemolytic phenotypes of *Vibrio damsela* associated with a fatal wound infection[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1985, 21(3): 302.
- [9] Yamane K, Asato J, Kawade N, et al. Two cases of fatal necrotizing fasciitis caused by *Photobacterium damsela* in Japan[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(3): 1370-2.
- [10] Labella A, Sanchezmontes N, Berbel C, et al. Toxicity of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* strains isolated from new cultured marine fish[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2010, 92(1): 31-40.
- [11] Aoki T, Teru Y, Morimoto N, et al. Complete genome sequence of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* strain ot-51443 isolated from yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) in Japan[J]. Genome Announc, 2017, 5(21): 1-2.
- [12] Nan Y, Zhiqiang Z, Tonglei W, et al. isolation and identification of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*(PDD) from tongue sole[J]. Animal Husbandry&Feed Science, 2018, 10(2): 99-102.
- [13] 鲁辛辛,黄艳飞,田晓波. 细菌 rDNA 分类鉴定的方法学研究[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(5): 435-437.
Lu X X, Huang Y F, Tian X B. Methodological study on bacterial rDNA classification and identification [J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2006, 29(5): 435-437.
- [14] Thyssen A, Ollevier F. In vitro antimicrobial susceptibility of

- Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* to 15 different antimicrobial agents[J]. *Aquaculture*, 2001, 200(3): 259-269.
- [15] Kawanishi M, Kijima M, Kojima A, et al. Drug resistance and random amplified polymorphic DNA analysis of *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* isolates from cultured *Seriola* (yellowtail, amberjack and kingfish) in Japan[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, 42(6): 648-653.
- [16] Martínez-Manzanares E, Tapia-Paniagua S T, Díaz-Rosales P, et al. Susceptibility of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* strains isolated from *Senegalese sole*, *Solea senegalensis* Kaup, and gilthead seabream, *Sparus aurata* L. to several antibacterial agents[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2008, 31(1): 73-76.
- [17] Laganà P, Caruso G, Minutoli E, et al. Susceptibility to antibiotics of *Vibrio* spp. and *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* strains isolated from Italian aquaculture farms[J]. *New Microbiologica*, 2011, 34(1): 53.
- [18] O'Hara C M, Sowers E G, Bopp C A, et al. Accuracy of six commercially available systems for identification of members of the family vibronaceae[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41(12): 5654-9.
- [19] 王洪彬, 李永慧, 吴同垒, 等. 中草药对美人鱼发光杆菌的体外抑菌试验[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2018(6): 155-157.
- Wang H B, Li Y H, Wu T L, et al. In vitro antibacterial test of chinese herbal medicine to *Photobacterium damsela* [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2018 (6): 155-157.

Isolation and Identification of *Photobacterium damsela* from Half-Smooth Tongue Sole and Evaluation of Its Pathogenicity

SHAO Peng¹, WU Zun¹, YONG Peng-Zheng¹, ZHAO Chong-Yang¹,
XU Yuan-Fei¹, TANG Qing-Ping¹, WANG Xiao-Yu²

(1. Tianjin Key Laboratory of Aqua-Ecology and Aquaculture, College of Fisheries, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China; 2. Tianjin Bohai Sea Fisheries Research Institute, Tianjin 300457, China)

Abstract: To determine the causes of half-smooth tongue sole death and the drug sensitivity of the pathogens thus providing a theoretical basis for effective prevention and treatment of the disease in production, three dominant bacteria were isolated from a diseased half-smooth tongue sole in a farm in Tianjin in 2018. Regression infection experiment confirmed that strain PSC0601 was pathogenic to half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Gunther). The abdominal cavity of the half-smooth tongue sole is severely swollen, and the muscles on both sides of the abdomen are bleeding. After dissection, the half-smooth tongue sole, the intestine, the liver and other tissues and organs also have a large amount of bleeding. The strain was identified as *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* by API identification system and 16S rDNA sequence analysis. The strain showed β -type hemolysis on the sheep blood plate. The results of artificial regression infection showed that the median lethal dose (LD₅₀) of the strain to the half-smooth tongue sole was 1.5×10^4 CFU/g. The susceptibility test results of 48 antibacterial drugs showed that the strain PSC0601 had higher sensitivity to 20 drugs such as florfenicol, chloramphenicol, amoxicillin, azithromycin, spectinomycin and cefoperazone. Research indicated that *P. damsela* subsp. *damsela* is highly pathogenic to half-smooth tongue sole, causing fish hemorrhagic necrosis in liver, intestines and other organs, and leading to fish death. This drug sensitivity of these two bacteria should aid to providing a theoretical basis for drug prevention and control of explosive diseases caused by the bacteria in fish culture.

Key words: half-smooth tongue sole; *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*; pathogenicity; drug sensitivity test

责任编辑 朱宝象