

卵形鲳鲹美人鱼发光杆菌杀鱼亚种的分离鉴定

王瑞旋¹, 冯娟¹, 苏友禄¹, 蓝祥宾², 王江勇¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所 广东 广州 510300; 2. 美国大豆出口协会上海办事处 上海 200336)

摘要: 2006年海南省凌水网箱养殖卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)出现大批死亡。肉眼观察病鱼体表完好,部分病鱼内脏稍肿大,病理组织研究显示脾脏和肝脏有灰白色结节。从病鱼的脾脏分离到1株明显优势菌,命名为TOS1,人工感染确认TOS1对卵形鲳鲹有强致病性,其半数致死量为 1.1×10^6 CFU/g,组织病理研究显示相同症状,因此确定TOS1为本次流行病的病原菌。经API鉴定系统和16S rDNA序列分析结合常规生化指标,将TOS1鉴定为美人鱼发光杆菌杀鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*)。该菌具有很强的溶血性和较强的蛋白酶活性,对多种抗生素和中草药均具抗性,仅对诺氟沙星、环丙沙星、氯霉素、庆大霉素等敏感,对中草药番石榴(*Psidium guajava*)和苍术(*Atractylodes lancea*)高度敏感。以上敏感药物可作为该病预防或治疗的参考用药。[中国水产科学, 2010, 17(5): 1020-1027]

关键词: 卵形鲳鲹; 美人鱼发光杆菌杀鱼亚种; 细菌鉴定; 药敏试验

中图分类号: S941

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)05-1020-08

卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*),属鲈形目(Perciformes),鲳科(Carangidae),鲳亚科(Trachinotinae),鲳鲹属(*Trachinotus*),俗称红三、金鲳、短鳍鲳、黄腊鲳,是一种暖水性鱼类,广泛分布于世界各大洋,在东南亚、澳大利亚、日本、美洲热带和温带的大西洋海岸、非洲西岸等地区均有分布,在中国的东海、南海和黄海均有一定的资源量,也是中国台湾省海水网箱养殖的主要品种之一^[1]。20世纪90年代初,福建、广东、海南等地开始发展养殖并取得成功,此后养殖规模逐年扩大^[2]。该鱼种肉质鲜美可口,具有鲳类的特殊香味,历来被列为名贵食用鱼类。由于卵形鲳鲹在海南、广东和福建沿海养殖能顺利越冬^[3-4],加上其生长速度甚快,当年即可达到上市商品鱼规格,养殖经济效益显著,因而深受养殖者的欢迎。然而,由于各地卵形鲳鲹的养殖都采用高密度的网箱养殖,加上在养殖过程中缺乏科学的防治措施,导致

病害发生越来越频繁,其中以细菌性疾病最为常见,如已报道的病原菌嗜麦芽假单胞菌(*Pseudomonas maltophilia*)^[5]、鲈诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*)^[6-7]及创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)^[8]等。近年来由于流行病暴发而引起鱼的大规模死亡时有发生^[9],造成了严重的经济损失。因此,本研究针对卵形鲳鲹在无明显体外症状下大批死亡的情况,对其病原美人鱼发光杆菌杀鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*)进行了较系统的研究,以期对该病进行有效防治和控制。

1 材料与方法

1.1 病鱼来源

2006年4月份,海南省凌水养殖基地网箱。肉眼观察,病鱼表现为摄食及活动能力下降,体色发黑,最终死亡。

收稿日期: 2009-10-30; 修订日期: 2010-01-18.

基金项目: 中国水产科学研究院南海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2008TS08, 2009TS06).

作者简介: 王瑞旋(1979-),女,助理研究员,主要从事海水养殖生物疾病控制研究. E-mail: wxlxw@21cn.com

通讯作者: 王江勇,副研究员,主要从事海水养殖生物疾病控制研究. Tel: 020-89108321; E-mail: wjy104@163.com

1.2 疾病症状观察及病原菌的分离纯化

将病鱼(垂死)进行解剖,肉眼观察,同时将内脏组织压片进行显微镜观察,并选用TCBS培养基、脑心浸汁琼脂和营养琼脂培养基,取内脏(包括肾、脾、肝)及肠道适量,称重,用0.85%生理盐水人工匀浆。取匀浆液(定量)进行10倍系列稀释(用0.85%生理盐水),选取 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 稀释度分别涂布于各种培养基上,每个涂布梯度设3个平行,28℃培养96 h后计数观察。观察优势菌情况并进行分离纯化培养。

1.3 回归感染

实验用健康的卵形鲳鲆,平均每尾体质量为17.4 g,每组10尾,分别置于上述5种浓度的细菌悬液中,作为5个试验组,并设1个生理对照组,每组设2个重复,共120尾。养殖水温26~29℃,全天充气,每天投饵、换水,暂养7 d后,腹腔注射0.1 mL/尾,定时观察记录,取濒死鱼内脏器官进行细菌再分离,注射10 d后停止观察。采用改良寇氏法的处理数据,计算出半致死浓度 LD_{50} 。

1.4 病原菌鉴定

1.4.1 常规鉴定 包括负染电镜观察、革兰氏染色、溶血试验、氧化酶、触酶及多个生化反应等^[10]。同时进行API(32E)系统鉴定。

1.4.2 16S rDNA序列测定和分析 提取已确定的病原菌DNA: 用生理盐水洗脱斜面上生长良好的菌苔,室温下5 000 r/min离心10 min,弃上清。加50 μ L无菌冰冻双蒸水,于水浴锅中煮沸10 min,取出立即置于-20℃10 min,取DNA溶液进行琼脂糖凝胶电泳检查制备的DNA完整性,若符合要求置于-20℃保存备用。用于16S rDNA扩增的通用引物,其正向引物8F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(对应于*E. coli* 16S rDNA第8~27个碱基位置),反向引物1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'(对应于*E. coli* 16S rDNA的第1 492~1 510个碱基位置)^[11]。24 μ L PCR反应体系中: 10 $\times$ PCR缓冲液2.5 μ L; 1.5 mmol/L $MgCl_2$; 4 $\times$ dNTP混合物各200 μ mol/L; 引物各10 μ mol/L; *Taq* DNA聚合酶0.5 μ L(2.5 U/ μ L)和DNA模板1 μ L。PCR反应条件: 94℃预变性5 min;

94℃变性45 s; 52℃复性40 s; 70℃延伸1 min, 35个循环; 最后70℃温育10 min。琼脂糖凝胶电泳获得特异性条带, PCR产物切胶回收后送上海英骏生物公司测序,测序结果经Blast分析后用Clustalx软件和GenBank中的相关菌株进行同源性比对,用PhyIip软件构建系统发育树。

1.5 药物敏感实验

1.5.1 纸片扩散法(K-B法) 针对菌株对多种抗生素的敏感性研究。按照NCCL实验操作标准^[12],取100 μ L菌悬液(浓度约 1×10^8 CFU/mL)涂布于MHA培养基,10 min后贴各种药物纸片(购自杭州天和微生物试剂公司),于27℃培养24 h后测量抑菌圈直径。

1.5.2 试管稀释法 针对菌株对多种中草药的敏感性研究。在营养肉汤培养基中分别加入不同的中草药(终浓度为 1×10^{-6} g/mL),取100 μ L菌悬液(浓度约 1×10^8 CFU/mL)接种于液体培养基中,同时设阳性对照和阴性对照,于27℃培养箱中培养约24 h后肉眼观察(与对照对比),取澄清的试验管进行平板涂布计数,将无菌落生长的平板对应稀释度定为最小杀菌浓度,即MBC值。

2 结果与分析

2.1 优势菌株的致病性

分离得到绝对优势菌株,编号为TOS1。人工感染确认TOS1对卵形鲳鲆有强致病性,通过改良寇氏法结合实验鱼的平均体质量,计算出半数致死量 LD_{50} 为 1.1×10^6 CFU/g,显示与自然发病鱼相同症状,即在病鱼脾脏和肾脏出现灰白色结节(表1、图1、图2)。

2.2 菌株TOS1的鉴定

2.2.1 常规生理生化指标检测 经负染电镜观察显示(图3),菌株TOS1为革兰氏阴性菌,菌体椭圆形,呈单个分布,大小约 $2.08\ \mu\text{m}\times 1.56\ \mu\text{m}$,运动,1~2根鞭毛侧极生,生化反应检测结果表明该菌株为 α 溶血,对O/129不敏感,不产芽孢,在无盐胨水、1%NaCl胨水、6%NaCl胨水、8%NaCl胨水、10%NaCl胨水中均不生长。在营养琼脂培养基上菌落为圆

表1 卵形鲳鲹人工感染TOS1结果
Tab. 1 Pathogenicity of TOS1 strain to golden pompano

分组 Group	菌液浓度/(CFU · mL ⁻¹) Bacterial concentration	剂量/mL Dosage	实验数/尾 Individual number	死亡数/尾 Death number	死亡率/% Mortality
1	1.2×10 ⁹	0.1	20	17	85
2	1.2×10 ⁸	0.1	20	12	60
3	1.2×10 ⁷	0.1	20	3	15
4	1.2×10 ⁶	0.1	20	0	0
5	1.2×10 ⁵	0.1	20	0	0
对照 Control	0.9%生理盐水0.9%Saline	0.1	20	0	0

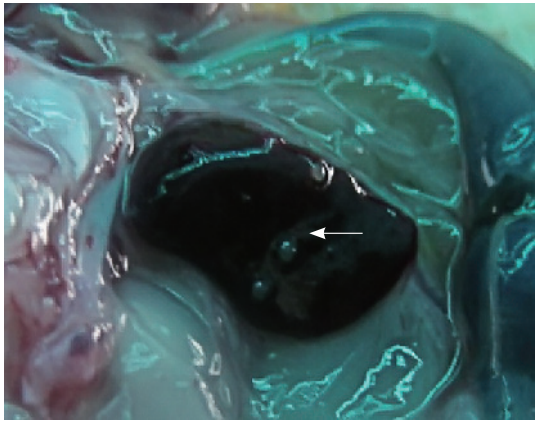


图1 病鱼脾脏出现灰白色结节(箭头示)
Fig. 1 Gray nodules scattered on the spleen of diseased fish
(Arrow)

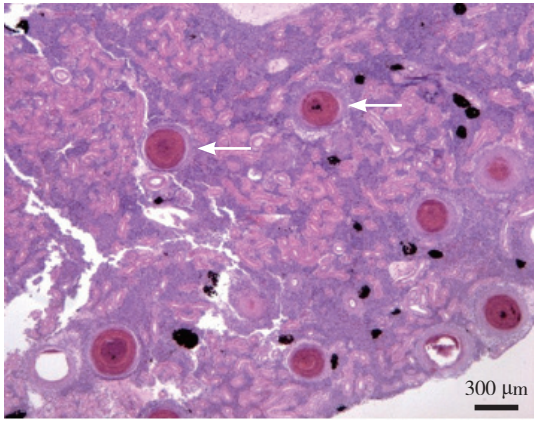


图2 病鱼肾脏组织灰白色结节(箭头示)
Fig. 2 Gray nodules scattered on the kidney of diseased fish
(Arrow)

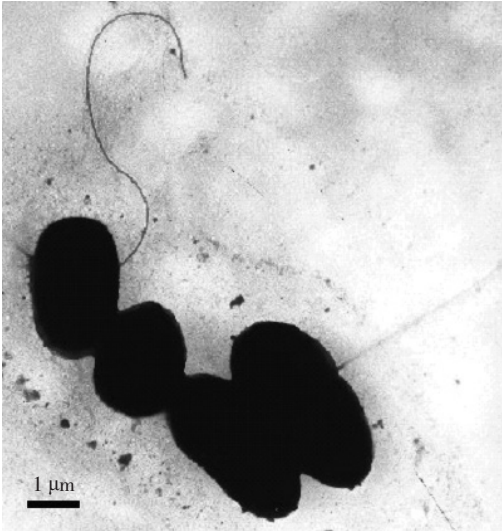


图3 菌株TOS1在电镜下的形态
Fig. 3 Electron micrograph of TOS1 after negative staining

形,表面光滑湿润,边缘光滑,菌落直径1~2 mm, 美人鱼发光杆菌杀鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida*), %ID: 99.9, T值: 0.51。其他生理生化指标见表2。API (32E) 鉴定TOS1为

表2 菌株TOS1的主要生理生化指标检测结果
Tab. 2 Main phenotypic traits of TOS1 strain

生理生化指标 Phenotypic trait	检测结果 Detection result	生理生化指标 Phenotypic trait	检测结果 Detection result
d-葡萄糖 D-glucose	+,产气 Aerogenesis	卵磷脂酶 Lecithase	+
蔗糖 Saccharose	-	明胶酶 Gelatinase	-
L-阿拉伯 L-arabinose	-	脂肪酶 Lipase	-
L-鼠李糖 L-rhamnose	-	酪蛋白酶 Caseinase	+
α -麦芽糖 α -maltobiose	-	精双水解酶 Arginine dihydrolase	+
d-麦芽糖 D-maltobios	+	鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-
d-纤维二糖 D-cellobiose	-	赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	-
d-海藻糖 D-mycoese	+	DNA酶 DNA-enzyme	-
蜜二糖 Melibiose	-	β -半乳糖苷酶 β -galactosidase	-
古老糖 Antiquity sugar	-	α -葡萄糖苷酶 α -glucosidase	-
d-甘露醇 D-mannite	-	β -葡萄糖苷酶 β -glucosidase	+
肌醇 Inositol	-	β -葡萄糖醛酸酶 β -glucuronidase	-
D-阿拉伯醇 D-arabite	-	L-天冬氨酸芳胺酶 L-asparagic acid arylamine enzyme	-
侧金盏花醇 Adonitol	-	V-P	+
d-山梨醇 D-sorbierite	-	吲哚 Indole	-
水杨素 Salicin	-	H ₂ S	-
七叶苷 Esculin	-	柠檬酸盐 Citrate	-
苦杏仁苷 Amygdalin	-	丙二酸盐 Malonate	-
氧化酶 Oxidase	+	5-酮基葡萄糖酸盐 5-oxogluconic acidsal	-
触酶 Catalase	+	d-半乳糖酸盐同化 D-galactonic acid sal	-
脲酶 Urease	+	β N乙酰葡萄糖胺 β N-acet-glucosamine	+
淀粉酶 Amylase	+		

2.2.2 16S rDNA 序列和系统发育分析 双向测序得到的16S rDNA 片段长度为1 418 bp, 登录GenBank 数据库进行同源性检索, 登录序号为lc136615, 在相近的200个检索结果中, 与发光杆菌属细菌的16S rDNA 基因序列自然聚类。从中选取同源性较高的发光杆菌属菌株, 从GenBank 下载其16S rDNA 序列, 用Phylip 软件构建系统树, 发现该菌株与美人鱼发光杆菌杀鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*) 最接近(图4), 相似度达到99% 以上。结合形态学和生理生化特征鉴定其为美人鱼发光杆菌杀鱼亚种。

2.3 药物敏感测试

2.3.1 菌株TOS1对多种抗生素药物的敏感性 如表3所示, 菌株TOS1对多种抗菌力较强的药物均产生抗药性, 且在20种抗菌药物中, 该菌没有对任何

一种药物具高度敏感性, 这一点值得引起注意。
2.3.2 菌株TOS1对多种中草药的敏感性 菌株TOS1对多种中草药均无敏感性(表4), 而对番石榴(*Psidium guajava*) 和苍术(*Atractylodes lancea*) 高度敏感(MBC值: 10⁻⁶ g/mL), 其次是板蓝根(*Isatis tinctoria*) (MBC值: 10⁻⁴ g/mL)。

3 讨论

美人鱼发光杆菌杀鱼亚种(*P. damsela* subsp. *piscicida*) 曾被称为杀鱼巴斯德氏菌(*Pasteurella piscicida*), 美人鱼弧菌(*Vibrio damsela*), 寄生感染宿主不具特异性, 对多种养殖鱼类均有高致病性^[13]。最早于1963年分离自野生美洲狼鲈(*Morone americanus*) 和斑点叉尾鲷(*Morone saxatilis*)^[14], 此后严重威胁日本的五条鲷(*Seriola quinqueradiata*), 同时也引起

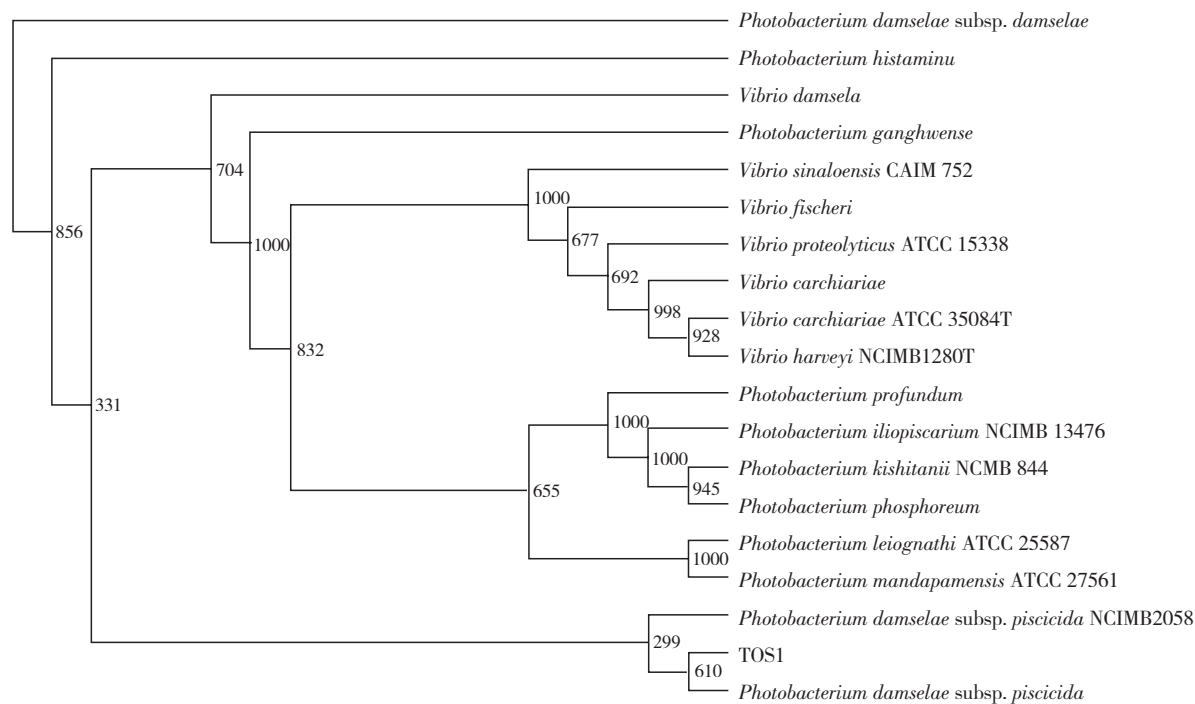


图4 基于16S rDNA基因序列构建的菌株TOS1的系统发育树
节点处数字表示1 000次重复抽样检测的bootstrap值。
Fig. 4 Phylogenetic tree based on 16S rDNA gene sequences of the TOS1
Numbers on the nodes indicate bootstrap value of 1 000 repeats.

表3 菌株TOS1对20种抗生素纸片的敏感性测试结果
Tab. 3 Susceptibility tests for TOS1 to 20 different species antibiotics

药物名称 Medicine	单片药物含量 Antibiotic content in a scrip	药物敏感度 Susceptibility
诺氟沙星 Norfloxacin	10 μg	I
环丙沙星 Profloxacin	5 μg	I
氧氟沙星 Ofloxacin	5 μg	R
利福平 Rifampin	5 μg	R
青霉素 Penicillin	10 U	R
氨苄青霉素 Ampicillin	10 μg	R
羧苄青霉素 Carbenicillin	100 μg	R
复方新诺明 Sulfamethoxazole/Trimethoprium	1.25/23.75 μg	I
红霉素 Erythromycin	15 μg	I
卡那霉素 Kanamycin	30 μg	R
庆大霉素 Gentamicin	10 μg	I
氯霉素 Chloramphenicol	30 μg	I
四环素 Tetracycline	30 μg	I
多黏菌素B Polymyxin B	300 U	R
痢特灵 Foroxone	300 μg	R
新霉素 Neomycin	30 μg	I
头孢唑啉 Cefazolin	30 μg	R
万古霉素 Vancomycin	30 μg	R
链霉素 Streptomycin	10 μg	I
磺胺异噁唑 Sulfisoxazole	300 μg	R

注：R. 不敏感；I. 中度敏感；S. 高度敏感。
Note: R. Resistance; I. Intermediate sensitivity; S. Sensitivity.

表 4 28 种中草药水提取物对菌株 TOS1 的最小抑菌浓度 (MBC)

Tab.4 Minimal inhibitory concentration (MBC) for 28 Chinese herbal medicines to TOS1 *in vitro*

中草药种类 Chinese herbal medicine	MBC 值/(g · mL ⁻¹) MBC value	中草药种类 Chinese herbal medicine	MBC 值/(g · mL ⁻¹) MBC value
番石榴 <i>Psidium guajava</i>	10 ⁻⁶	臭草 <i>Ruta graveolens</i>	—
苍术 <i>Atractylodes lancea</i>	10 ⁻⁶	莲子心 <i>Nelumro nucifera</i>	—
槟榔 <i>Areca catecthu</i>	10 ⁻¹	枸骨叶 <i>Llex cornuta</i>	—
黄芩 <i>Scutellaria</i>	10 ⁻¹	板蓝根 <i>Lsatis tinctoria</i>	10 ⁻⁴
丁香 <i>Eugenia caryophyllata</i>	100	五味子 <i>Schisandra chinensis</i>	10 ⁻³
穿心莲 <i>Andrographis paniculata</i>	100	白术 <i>Atractylodes macrocephala</i>	10 ⁻³
肉桂 <i>Cinnamomum cassia</i>	100	绞股蓝 <i>Gynostemma pentaphyllum</i>	—
火炭母 <i>Polygonum chinense</i>	100	地丁 <i>Viola labridorica</i>	10 ⁻³
花椒 <i>Zanthoxylum bungeanum</i>	—	女贞子 <i>Ligustrum lucidum</i>	10 ⁻³
苦楝皮 <i>Melia azedarach</i>	—	白芍 <i>Paeoniae lactiflorae</i>	—
鸡矢藤 <i>Herba paederiae</i>	—	岗梅根 <i>Llex asprella</i>	—
野菊花 <i>Chrysanthemum indicum</i>	—	瓜蒌皮 <i>Trichosanthes kirilowii</i>	—
百部 <i>Stemona tuberosa</i>	—	粉防己 <i>Stephania terrandra</i>	—
辣蓼 <i>Polygonum glabrum</i>	—	金银花 <i>Lonicera japonica</i>	—

注:“—”表示对菌株完全无抑菌效果。
Note:“—” donates non-effectiveness to the bacterium.

鲆鲽类等发病^[6,15-18],此菌曾经严重威胁水产养殖重要经济品种^[19-24],通常 18 ~ 20 ℃时发病。不同鱼种感染此菌表现出的症状有较大差异,如半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)的大量死亡,其症状主要表现为体表溃烂、鳍基部出血等,解剖可见胆囊发黑,肾脏发黄^[13]。然而多数受感染鱼类如军曹鱼(*Rachycentron canadum*)^[23]、黄尾鲷(*Seriola quinqueradiata*)、金头鲷(*Sparus aurata*)等^[25]则与卵形鲳鲆症状比较类似,均是内脏出现灰白色结节,最终死亡。养殖卵形鲳鲆感染美人鱼发光杆菌杀鱼亚种尚未见报道,以往已见报道的卵形鲳鲆的弧菌病、诺卡氏菌与此次报道的病原在症状上存在明显的差异。患弧菌病病鱼多数表现为鳍条充血,鳃丝、肝、肠壁严重充血^[8],组织病理分析可见脾肾出血严重,而此次研究中病鱼虽然在行为方面也出现摄食与活动能力下降情况,但直至最终死亡也几乎无可见外部症状。受诺卡氏菌感染的卵形鲳鲆往往在体表、鳃和多数内脏均出现大量白色结节,而此次研究中,病鱼的体表和鳃并未见白色结节,仅在脾脏和肾脏出现灰白色结节,而且在发病初期只能通过组织病理切片才能清晰辨认出结节症状。

由于受感染的鱼类在发病初期通常不出现外部

症状或症状不明显,病情持续时间长,因此在该病早期阶段很难进行诊断和防治,导致发病率和死亡率均较高。从病变器官来看,发病最严重的器官都是与血液循环有密切关系的器官。目前研究资料表明,美人鱼发光杆菌杀鱼亚种的重要致病因子为胞外蛋白酶类、胞外溶血素和细胞溶素等^[26-29],病原菌所产生的胞外蛋白酶可以激活机体的血管舒张素-激肽级联机制,以增加感染部位的血管通透性,导致血液的渗出,从而引起感染部位的水肿及出血;所产生的大量胞外溶血素、细胞溶素等可以破坏机体的红细胞,通过释放血红素,为其提供更多的铁离子^[8],最终导致组织器官坏死,病鱼死亡。值得注意的是,此次研究得到的菌株 TOS1 具有很强的 α 溶血性,且来源于脾脏和肾脏,说明该菌也可能是通过胞外酶的释放导致鱼体死亡,其具体的发病机制有待进一步研究。

在药物防治研究方面,20 种受试药物中 TOS1 对诺氟沙星、环丙沙星、氯霉素、庆大霉素等敏感,同已报道的美人鱼发光杆菌杀鱼亚种对喹诺酮类药物比较敏感^[30]的结果一致。由于环丙沙星和氯霉素均为水产禁用药物^[31-32],故本结果可为同类药物使用提供参考依据。28 种受试中草药中以番石榴和苍术

杀菌效果较好,已有研究表明中草药在防治海水养殖动物细菌性疾病中具有很好的应用前景^[33]。因此在疾病的高发季节,建议合理使用番石榴、苍术等中草药加上部分抗生素药物进行预防。

参考文献:

- [1] 区又君,李加儿. 卵形鲳鲹的早期胚胎发育[J]. 中国水产科学,2005,12(6): 786-788.
- [2] 杨火盛. 卵形鲳鲹人工养殖试验[J]. 福建水产,2006(1): 39-41.
- [3] 张其永,洪万树. 网箱养殖卵形鲳和布氏鲳分类性状的研究[J]. 台湾海峡,2000,19(4): 499-505.
- [4] 李庆欣. 卵形鲳在热带海区的网箱养殖试验[J]. 南海研究与开发,1994(4): 48-51.
- [5] 周永灿,张本,陈雪芬,等. 嗜麦芽假单胞菌脂多糖的制备及其在卵形鲳鲹中的免疫效应[J]. 水产学报,2002,26(2): 143-148.
- [6] 黄郁葱,简纪常,吴灶和,等. 卵形鲳鲹结节病病原的分离与鉴定[J]. 广东海洋大学学报,2008,28(4): 49-53.
- [7] 王瑞旋,刘广锋,王江勇,等. 养殖卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)诺卡氏菌病的研究[J]. 海洋湖沼通报,2010(1): 52-58.
- [8] 赵典惠,刘丽波,孙际佳,等. 用美人鱼弧菌与创伤弧菌人工感染卵形鲳鲹的组织病理学研究[J]. 大连水产学院学报,2007,22(6): 454-459.
- [9] 王江勇,郭志勋,黄剑南,等. 一起卵形鲳鲹幼苗死亡原因的调查[J]. 南方水产,2006,2(3): 54-56.
- [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.
- [11] Polz M F, Cavanaugh C M. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR[J]. Appl Environ Microbiol, 1998,64(10): 3724-3730.
- [12] NCCLS performance standards for antimicrobial susceptibility testing[P]. Sixteenth informational supplement,2006, M100-S16: 48.
- [13] Wang Y, Han Y, Li Y, et al. Isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from diseased tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Gunther) in China[J]. Acta Microbiol Sin,2007,47(5): 763-768.
- [14] Snieszko S F, Bullock G L, Hollis E, et al. *Pasteurella* sp. from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tidewater areas[J]. J Bacteriol,1964,88: 1814-1815.
- [15] Magarios B, Romalde J L, López-Romalde S, et al. Pathobiological characterization of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* strains isolated from cultured sole (*Solea senegalensis*) [J]. Bull Eur Assoc Fish Pathol,2003,23 : 183-190.
- [16] Zorrilla I, Balebona M C, Mori igo M A, et al. Isolation and characterization of the causative agent of pasteurellosis, *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*, from sole *Solea senegalensis* (Kaup) [J]. J Fish Dis,1999,22 : 167-171.
- [17] Baudin-Laurencin F, Pepin J F, Raymond J C. First observation of an epizootic of pasteurellosis in farmed and wild fish of the French Mediterranean coasts [C]// Abstr 5th Int Conf Eur Assoc Fish. Pathol, Budapest, Hungary, 1991: 17.
- [18] Ceschia G, Quaglio F, Giorgetti G, et al. Serious outbreak of pasteurellosis (*Pasteurella piscicida*) in euryhaline species along the Italian coasts [C]// Abstr 5th Int Conf Eur Assoc Fish. Pathol, Budapest, Hungary,1991: 26.
- [19] Snieszko S F, Bullock G L, Hollis E, et al. *Pasteurella* sp. from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tide water areas [J]. J Bacteriol,1964,88: 1814-1815.
- [20] Kusuda R, Miura W. Characteristics of a *Pasteurella* sp. pathogenic for pond cultured ayu [J]. Fish Pathol,1972,7: 51-57.
- [21] Toranzo A E, Barreiro S, Casal J F, et al. Pasteurellosis in cultured gilthead seabream, *Sparus aurata*: First report in Spain [J]. Aquaculture,1991,99: 1-15.
- [22] Toranzo A E, Santos Y, Núez S, et al. Biochemical and serological characteristics, drug resistance, and plasmid profiles of Spanish isolates of *Aeromonas salmonicida* [J]. Fish Pathol,1991,26 : 55-60.
- [23] Liu P C, Lin J Y, Lee K K, et al. Virulence of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in cultured cobia *Rachycentron canadum* [J]. J Basic Microbiol,2003,43(6): 499-507.
- [24] 王瑞旋,徐力文,冯娟. 海水鱼类细菌性疾病病原及其检测、疫苗研究概况[J]. 南方水产,2005,1(6): 72-79.
- [25] Romalde J L. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen [J]. Int

- Microbiol, 2002, 5: 3–9.
- [26] Fouz B, Barja J L, Amaro C, et al. Toxicity of the extracellular products of *Vibrio damsela* isolated from diseased fish [J]. Curr Microbiol, 1993, 27: 341–347.
- [27] Osorio C R, Romalde J L, Barja J L, et al. Presence of phospholipase –D (dly) gene coding for damselysin production is not a prerequisite for pathogenicity in *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* [J]. Microb Pathogen, 2000, 28: 119–126.
- [28] Sugita H, Shinagawa Y, Okano R. Neuraminidase producing ability of intestinal bacteria isolated from coastal fish [J]. Lett Appl Microbiol, 2000, 31: 10–13.
- [29] Ark S, Roh I, Paran N. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus* [J]. Microb Infect, 2000, 2: 177–188.
- [30] 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]. J Fish Dis, 2008, 31: 73–76.
- [31] 王瑞旋, 陈毕生. 喹诺酮类药物在水产养殖中的应用研究概况 [J]. 南方水产, 2007, 3 (3): 73–79.
- [32] 王瑞旋, 王江勇, 徐力文, 等. 军曹鱼养殖水体及其肠道弧菌的耐药性研究 [J]. 南方水产, 2007, 3 (5): 1–6.
- [33] 王瑞旋, 郭志勋, 冯娟, 等. 中草药对海水动物致病菌体外抑制作用的初步研究 [J]. 南方水产, 2009, 5 (6): 19–24.

Isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from diseased golden pompano (*Trachinotus ovatus* Linnaeus) and its drug sensitivity

WANG Ruixuan¹, FENG Juan¹, SU Youlu¹, LAN Xiangbin², WANG Jiangyong¹

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2. American Soybean Association Shanghai Office, Shanghai 200336)

Abstract: An epizooty occurred among cultured golden pompano (*Trachinotus ovatus*) with high mortality in Linshui of Hainan province, China in 2006. Diseased fish exhibited no obvious symptom, though pathological observation showed gray nodules scattered in spleen and kidney. A Gram-negative bacterium (designated strain TOS1) was isolated from its spleen. Pathogenicity assays revealed that TOS1 was virulent to golden pompano when it was challenged by intraperitoneal injection and the LD₅₀ was 1.1×10^6 CFU/g. The 16S rRNA sequence of TOS1 demonstrated high similarity (99%) with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Phylogenetic analysis results also indicated close genetic relationship between strain TOS1 and *P. damsela* subsp. *piscicida*. Additionally, morphological, physiological and biochemical results verified the identification result. The pathogen had strong hemolytic and protease activity and was sensitive to norfloxacin (10 µg/tablet), profloxacin (5 µg/tablet), gentamicin (10 µg/tablet), sulfamethoxazole/trimethoprim (1.25/23.75 µg/tablet), neomycin (30 µg/tablet), streptomycin (10 µg/tablet), chloramphenicol (30 µg/tablet) and tetracycline (30 µg/tablet), and very sensitive to two Chinese herbal medicines of *psidium guajava* and *atractylodes lancea* (MBC = 10^{-6} g/mL). [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17 (5): 1020–1027]

Key words: *Trachinotus ovatus*; *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*; identification; drug sensitivity test

Corresponding author: WANG Jiangyong. Tel: 020–89108321, E-mail: wjy104@163.com.