

DOI: 10.12264/JFSC2022-0193

南移仿刺参美人鱼发光杆菌病原分离鉴定与药敏分析

王丽莉^{1,2}, 杨求华², 李慧耀², 杨福元^{2,3}, 吴建绍², 江兴龙¹, 林琪^{1,2,3}

1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021;

2. 福建省水产研究所, 福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室, 福建 厦门 361013;

3. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 2020 年 11 月, 福建霞浦海域养殖仿刺参(*Apostichopus japonicus*)出现较大面积发病情况, 为确定其病原并筛选可用药物, 本研究分离了南移仿刺参腐皮综合征病原并对其理化因子、毒力因子和药敏特性进行了分析。结果显示, 从体表病灶部位分离得到 1 株优势菌株 XP-11, 经人工感染试验结果显示, 菌株 XP-11 对仿刺参有明显的致病作用, 感染后也出现体表溃疡等与自然发病相同症状。基于形态观察、Biolog 自动微生物鉴定, 以及 16S rRNA、看家基因 *gyrB* 基因和尿素酶 C (*ure C*) 基因序列分析结果, 确定菌株 XP-11 为美人鱼发光杆菌美人鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*)。毒力基因检测结果显示, 菌株 XP-11 含有溶血素相关基因 *hlyAch* 和磷脂酶活性相关基因 *plpV* 两种美人鱼发光杆菌典型毒力基因。药敏分析结果显示, 菌株 XP-11 对四环素、恩诺沙星、复方新诺明等 8 种抗生素敏感, 进一步采用微量法进行 MIC 值测定结果显示, 恩诺沙星、硫酸新霉素、甲砒霉素、氟苯尼考、盐酸多西环素、氟甲唑、磺胺间甲噁啉钠、磺胺甲噁唑+甲氧苄啶等水产可用药对菌株 XP-11 的最小抑菌浓度(MIC)分别为 0.08、2、1、1、0.06、0.125、4、1.2/0.06 $\mu\text{g/mL}$ 。研究结果表明, 美人鱼发光杆菌美人鱼亚种是仿刺参腐皮综合征的病原菌, 其对仿刺参的半致死浓度(LD₅₀)为 1.08×10^5 CFU/g 体重。

关键词: 仿刺参; 美人鱼发光杆菌; 腐皮综合征; 毒力基因; 药物敏感性

中图分类号: S947

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)12-1800-12

仿刺参(*Apostichopus japonicus*)隶属于刺参科(Stichopodidae), 仿刺参属(*Apostichopus*), 是我国重要的经济海水养殖生物^[1]。仿刺参全人工繁育和增殖技术自 20 世纪 80 年代在我国实现突破以来, 逐步形成产业规模, 现已发展成为我国海水养殖单品种产值较高的种类之一^[2]。福建省自 2003 起开始进行“北参南养”试验, 经过近 20 年的发展, 已成为我国南方地区重要的仿刺参养殖产区^[3]。然而, 随着养殖规模的扩大, 病害也成为影响产业发展的主要制约因素, 其中腐皮综合征是仿刺参养殖过程中常见的疾病之一, 具有传播速度快、死亡率高的特点, 此病多以细菌性感

染为主, 常伴有霉菌以及寄生虫的继发性感染, 不同地区病参的致病菌种类各有不同, 即病原具有地域性和多样性的特点^[4]。2020 年 11 月, 福建霞浦东坑海域养殖仿刺参出现较大面积发病情况, 发病个体主要症状包括: 身体萎缩、厌食、体表出现大面积溃疡斑, 感染对象为体长 8~12 cm、体重 25~50 g 的半成品参, 相较于以往出现的病例^[5-6], 此次患病具有发病急、病程快、传播速度快、死亡率高的特点。现场采集患病仿刺参分离得到一株优势菌株, 并通过回归感染实验确定该菌株的致病性, 通过 16S rRNA 和看家基因 *gyrB* 序列分析初步鉴定该优势菌可能是美人鱼发光杆菌

收稿日期: 2022-06-19; 修订日期: 2022-08-05.

基金项目: 福建省种业创新与产业化工程项目(2021FJSC2Y03); 福建省科技计划项目(2022R10130010); 福建省渔业结构调整专项(2021HYJG17, 2021HYJG18).

作者简介: 王丽莉(1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向为仿刺参健康养殖技术. E-mail: wll17859769156@126.com

通信作者: 林琪, 研究员, 研究方向为水生生物健康养殖及苗种繁育技术. E-mail: xmqlin@sina.com

(*Photobacterium damsela*), 包括美人鱼发光杆菌美人鱼亚种和美人鱼发光杆菌杀鱼亚种。

美人鱼发光杆菌美人鱼亚种原名美人鱼弧菌(*Vibrio damsela*), 最早于 1981 年从患有皮肤溃烂病的雀鲷(*Chromis punctipinnis*)鱼类中被首次分离^[7], 1995 年 Gauthier 等^[8]根据分子和表型鉴定结果, 发现该菌与发光杆菌属特征更为相似, 并正式命名为美人鱼发光杆菌美人鱼亚种。美人鱼亚种可感染大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)^[9]、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)^[10]、银鲳(*Pampus argenteus*)^[11]、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[12]、宽吻海豚(*Tursiops truncatus*)^[13]等多种海洋生物, 该菌感染后宿主以出血、组织坏死和体表溃烂为主要症状, 组织病理性显示为肉芽肿性溃疡性皮炎^[14]。美人鱼发光杆菌杀鱼亚种被称为巴斯德氏菌(*Pasteurella piscicida*), 最早于 1963 年分离自美洲狼鲈(*Morone americanus*)^[15]; 其感染宿主均为鱼类, 可引起卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)^[16]、银花鲈(*Morone saxatilis*)^[17]等多种鱼类发病, 鱼类感染后体表一般无明显症状, 但内脏器官如脾脏、肾脏等会出现白色结节^[18]。

本研究通过形态学、生理生化特征、系统发育分析、毒力分析和药物敏感性分析等方法, 探究美人鱼发光杆菌对仿刺参的致病性, 研究结果旨在为南移仿刺参的健康养殖和由该病原引起的仿刺参疾病防治提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

患病仿刺参取自福建霞浦马坑海域养殖渔排。健康仿刺参取自福建漳州海参养殖基地, 选择平均体重为(18.5±10.4) g 的体表无损伤、活力状态好的个体用于人工感染试验。

1.2 病原菌的分离纯化

取典型症状的患病仿刺参, 体表用无菌生理盐水清洗后, 在无菌操作下, 用接种环从体表溃疡处取样, 划线接种于 TCBS 固体培养基上, 置于 30 ℃ 培养 24 h 后, 挑取典型优势菌落纯化培养 2~3 次, 将纯化后的单菌落接种于 2216E 液体培养基上, 用 30% 甘油生理盐水保存于 -80 ℃ 冰

箱中, 备用。

1.3 人工感染实验

将 1.2 中分离得到的菌株接种于 2216E 液体培养基中, 30 ℃ 恒温培养 24 h, 离心后取菌体沉淀, 采用麦氏比浊法测定菌浓度, 用无菌生理盐水配制成浓度为 1.0×10^9 CFU/mL 的菌悬液。实验在 5 L 定制水桶内进行, 将 210 头仿刺参随机分成 7 组, 每组设 3 个平行, 每个平行 10 头仿刺参。其中实验组包括 6 个浓度(10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 和 10^4 CFU/mL 浓度菌悬液), 采用腹腔注射感染, 注射剂量为 0.2 mL/头, 对照组注射等体积无菌生理盐水。试验期间控制水温为 20~22 ℃, 盐度 30~31, 期间不投饵、连续充气, 每日换水量为 20%, 连续 14 d 观察记录仿刺参发病和死亡情况, 采用改良的寇氏法计算病原菌对仿刺参的半致死浓度(LD₅₀), 并对濒死仿刺参进行病原菌重分离鉴定。

1.4 病原菌的鉴定

1.4.1 菌株和菌落形态观察 将 1.3 中保存的病原菌分别接种于 TCBS 和 2Z16E 平板上, 在 30 ℃ 恒温培养 24 h 后, 观察菌落形态, 采用扫描电子显微镜观察菌株个体形态。

1.4.2 菌株生理生化特性分析 参考《伯杰氏鉴定细菌学手册》^[19]和《常见细菌系统鉴定手册》^[20]等文献, 并结合 Biolog 自动微生物鉴定系统对病原菌 XP-11 的生理生化指标进行分析鉴定。

1.4.3 16S rRNA、*gyrB*、*ureC* 基因序列分析 提取病原菌 DNA 作为模板, 选择 16S rRNA 通用引物进行扩增: 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGG-CTCAG-3'), 1492R (5'-ACGGCTACCTTGTAC-GACTT-3')^[21]; *gyrB* 基因扩增引物: F (5'-GAAG-TTATCATGACGGTACTTC-3'), R (5'-AGCGTAC-GAATGTGAGAACC-3')^[22]; *ureC* 基因序列引物: F (5'-TGGGTTTATTTGGTAAAGG-3'), R (5'-AG-TGGATAGCAACTTGAA-3')^[23]。PCR 扩增体系为 12.5 μL 2×Taq master Mix、1 μL 模板 DNA、引物各 1 μL, 补充 ddH₂O 至 25 μL; PCR 扩增程序为 94 ℃ 5 min, 35 个循环(94 ℃ 30 s、55 ℃ 30 s、72 ℃ 60 s), 72 ℃ 7 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测正确后, 送至厦门铂尚生物技

术有限公司测序, 测序结果提交至 GenBank 数据库。采用 NCBI-BLAST 软件进行序列比对, 下载同源序列, 用 MEGA 4.0 软件采用 Neighbour-Joining 方法对构建系统发育进化树(bootstrap=1000)。

1.5 病原菌毒力基因检测

普通 PCR 检测 5 种美人鱼发光杆菌典型毒力基因: 毒性质粒复制起点基因(*pPHDD1*)、溶血性

相关基因 *dly*、溶血性相关基因 *hlyApl*、溶血性相关基因 *hlyAch* 和磷脂酶活性相关基因 *plpV*; 5 种美人鱼发光杆菌非典型毒力基因: 哈维氏弧菌溶血素基因 *vhh*、霍乱弧菌溶血素基因 *hlyA*、副溶血弧菌耐热直接溶血素 (thermostable direct haemolysin, TDH)基因 *tdh*、TDH 相关溶血素基因 *trh* 和创伤弧菌溶血素基因 *vvh*, 其所需的引物序列如表 1 所示。PCR 扩增体系及程序参照 1.4.3。

表 1 毒力基因引物序列
Tab. 1 The primer of virulence gene sequences used in this study

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') sequence (5'-3')	典型宿主 typical host	参考文献 reference
<i>pPHDD1</i> -F	TGGAATAACTATGAGTAACA	美人鱼发光杆菌	[24]
<i>pPHDD1</i> -R	CATTACCAAAACATCTACAT	<i>Photobacterium damsela</i>	
<i>dly</i> -F	CCTATGGGACATGAATGG	美人鱼发光杆菌	[25]
<i>dly</i> -R	GCTCTAGGCTAAATGAATC	<i>Photobacterium damsela</i>	
<i>hlyApl</i> -F	GCTATAAATGAATAAGAAAA	美人鱼发光杆菌	[26]
<i>hlyApl</i> -R	TTGAAGCTAACTCAAAAA	<i>Photobacterium damsela</i>	
<i>hlyAch</i> -F	AATGTTTCTTTCCGTTGGGC	美人鱼发光杆菌	[26]
<i>hlyAch</i> -R	CCGGAGTTCCACCAGTAAAT	<i>Photobacterium damsela</i>	
<i>plpV</i> -F	TCTCATAATAGCAGTAATCT	美人鱼发光杆菌	[26]
<i>plpV</i> -R	TTACTAAGCAGAATCCAGCC	<i>Photobacterium damsela</i>	
<i>vhh</i> -F	GATTGGGAATGGGCAGAAAA	哈维氏弧菌	[27]
<i>vhh</i> -R	GGAATCGCCATTGTGATGC	<i>Vibrio. harveyi</i>	
<i>hlyA</i> -F	GGCAAACAGCGAAACAAATACC	霍乱弧菌	[28]
<i>hlyA</i> -R	CTCAGCGGGCTAATACGGTTTA	<i>Vibrio cholerae</i>	
<i>tdh</i> -F	CCACTACCACTCTCATATGC	副溶血弧菌	[29]
<i>tdh</i> -R	ATACGAGTGGTTGCTGTTCATG	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	
<i>trh</i> -F	CAGTTTGCTATTGGCTTCG	副溶血弧菌	[27]
<i>trh</i> -R	CAGAAAGAGCAGCCATTG	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	
<i>vvh</i> -F	GCTATTTCACCGCCGCTCAC	创伤弧菌	[30]
<i>vvh</i> -R	CCGCAGAGCCGTAAACCGAA	<i>Vibrio vulnificus</i>	

1.6 患病仿刺参病理组织观察

采集自然发病情况下濒死仿刺参, 取体壁和呼吸树等组织用 10%中性福尔马林固定, 制备组织切片、石蜡包埋, 切片后使用苏木精-伊红(HE)染色, 并进行显微拍照观察^[31]。

1.7 药物敏感性分析

采用琼脂平板扩散法(K-B 法)对病原菌的药物敏感性进行分析。挑取菌株 XP-11 单菌落置于无菌生理盐水制成菌悬液, 浓度约为 1×10^8 CFU/mL (0.5 麦氏单位), 将菌悬液均匀涂布于 TSA 平板,

用无菌镊子将抗菌药物纸片(购自于杭州滨和微生物试剂有限公司)紧密贴于平板, 纸片相距大于 24 mm; 把平板倒置于 30 ℃恒温培养 16~18 h 后测定抑菌圈直径。

采用微量法测定病原菌对 8 种农业农村部允许使用的水产用抗菌药物的最小抑菌浓度(MIC)值, 配制浓度为 2×10^6 CFU/mL 病原菌 XP-11 菌悬液备用, 吸取 200 μL 菌悬液加入 96 孔药物敏感性测试板(购自于南京菲恩医疗科技有限公司), 将测试板置于 28 ℃恒温培养 24~28 h 后观察结

果。参照试剂盒说明书, 以及美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)抗生素敏感试验标准判断病原菌对药物的敏感性^[32]。

2 结果与分析

2.1 病原菌的分离和致病性确定

现场观察结果显示, 患病仿刺参个体萎缩, 附着能力下降, 厌食、反应迟钝, 活力差, 体表出现大面积溃疡斑, 露出皮下肌肉组织, 呈蓝褐相

间色, 但未出现吐肠现象(图 1a), 从体表病灶部位分离得到 1 株优势菌株, 编号为 XP-11。经人工感染试验结果显示, 菌株对仿刺参有明显的致病作用, 感染后也出现体表溃疡等与自然发病相同症状(图 1b), 人工感染后的死亡率如表 2 所示, 采用改良的冠氏法计算得到病原菌 XP-11 对仿刺参的半致死浓度 LD₅₀ 为 1.08×10⁵ CFU/g 体重。从感染后濒死的仿刺参中重分离得到 1 株优势菌 CSHS-1, 其理化特性与注射菌株 XP-11 一致, 根据科赫法则确定菌株 XP-11 为仿刺参的病原菌^[33]。

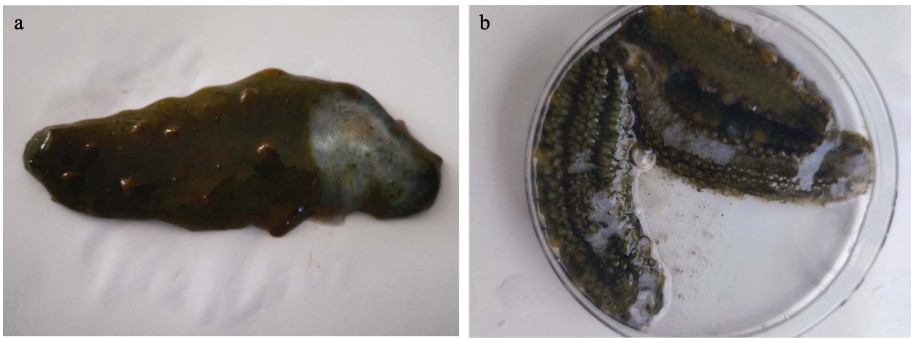


图 1 自然发病(a)和人工感染发病(b)仿刺参症状
Fig. 1 Symptoms of sea cucumber *Apostichopus japonicus* under natural state (a) and artificial infection (b)

表 2 菌株 XP-11 人工感染实验结果
Tab. 2 Results of artificial infection of strain XP-11

组别 group	菌浓度/(CFU/mL) strain concentration	实验数/头 number of infections	死亡数/头 number of deaths	累积死亡率/% cumulative mortality	半致死浓度/ (CFU/g 体重) LD ₅₀ value
XP-11 组 XP-1 group	1.0×10 ⁴	30	0	0	1.08×10 ⁵
	1.0×10 ⁵	30	3	10.0	
	1.0×10 ⁶	30	8	26.6	
	1.0×10 ⁷	30	16	53.3	
	1.0×10 ⁸	30	24	80.0	
	1.0×10 ⁹	30	30	100	
对照组 control group	—	30	0	0	

2.2 病原菌的鉴定

2.2.1 病原菌菌落及菌株形态观察 经 30 ℃ 恒温培养 24 h 后, 病原菌 XP-11 在 TCBS 培养基上形成中央隆起、边缘整齐、表面湿润光滑的圆形绿色菌落, 菌落直径为 1~2 mm (图 2a); 在 2216E 培养基上形成中央隆起、表面光滑的圆形、白色不透明、直径为 1~2 mm 的菌落。扫描电镜结果显示, 菌株 XP-11 呈单个或多个排布, 形状为短

杆状、两端钝圆, 菌体大小约为(3.7~0.9) μm×(1.2~1.5) μm (图 2b)。

2.2.2 病原菌理化特性分析 生理生化分析结果显示, 病原菌 XP-11 和重分离菌 CSHS-1 均为革兰氏阴性, 具有运动性, 葡萄糖发酵不产气, 氧化酶阳性、触酶阴性; 可以利用糊精、麦芽糖、果糖等, 不能利用海藻糖、蔗糖、乳糖、鼠李糖等碳源; 参考文献[19,33], 将菌株 XP-11 和重分离菌

CSHS-1 与已发表的美人鱼发光杆菌(ST1、ATCC 33539)的理化指标进行对比(表 3)。结果表明,除了利用半乳糖、甘露醇,明胶酶、脂肪酶等指标存在差异外,菌株 XP-11 和 CSHS-1 与美人鱼发

光杆菌标准菌株 ATCC 33539 的理化指标基本相同。进一步采用 Biolog 自动微生物鉴定系统分析,鉴定菌株 XP-11 为美人鱼发光杆菌美人鱼亚种(*P. damsela* subsp. *damsela*), 鉴定可能性为 98.9%。

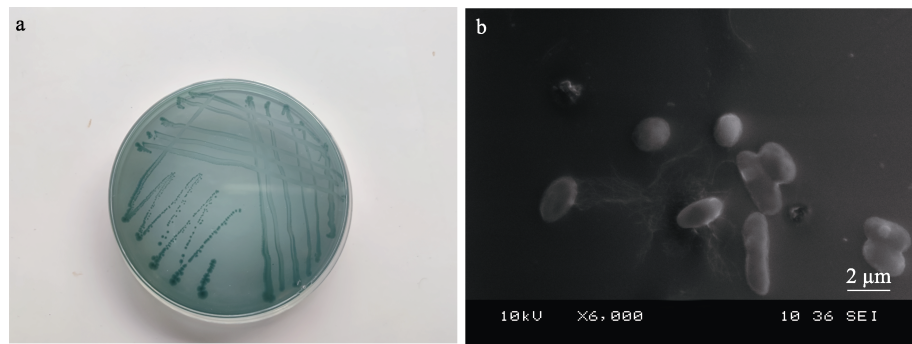


图 2 病原菌 XP-11 的菌落形态(a)和扫描电镜图(b)
Fig. 2 Characteristics of colony morphology (a) and scanning electron microscopy (b) of pathogenic strain XP-11

表 3 病原菌 XP-11、重分离菌 CSHS-1 及参考菌株 ST1、ATCC 33539 生理生化特性对比
Tab. 3 Comparison of physiological and biochemical characteristics among pathogen XP-11, CSHS-1 and reference strain ST1, ATCC 33539

指标 index	1	2	3	4	指标 index	1	2	3	4
利用 utilization of:					革兰氏染色 Gram staining	—	—	—	—
麦芽糖 maltose	+	+	+	+	运动性 motility	+	+	+	+
木糖 xylose	—	—	—	—	氧化酶 oxidase	+	+	—	+
海藻糖 trehalose	—	—	—	—	触酶 catalase	—	—	—	—
蔗糖 sucrose	—	—	—	—	H ₂ S 产生 H ₂ S production	—	—	—	—
棉子糖 raffinose	—	—	—	—	O-F 测试 O-F test	F	F	F	F
乳糖 lactose	—	—	—	—	脲酶 urease	+	+	+	+
蜜二糖 melibiose	—	—	—	—	明胶酶 gelatinase	—	—	—	d
水杨苷 salicin	—	—	—	—	脂肪酶 lipase	+	+	+	d
果糖 fructose	+	+	+	+	生长 growth in:				
半乳糖 galactose	—	—	+	+	37 ℃ 生长 growth at 37 ℃	—	—	—	d
鼠李糖 rhamnose	—	—	—	—	0% NaCl	—	—	—	—
山梨醇 sorbitol	—	—	—	—	1% NaCl	+	+	+	+
甘露醇 mannitol	—	—	+	+	3% NaCl	+	+	+	+
甘油 glycerol	+	+	+	+	6% NaCl	—	—	—	—

注: 1. 菌株 XP-11; 2. 菌株 CSHS-1; 3. 美人鱼发光杆菌 ST1^[34]; 4. 美人鱼发光杆菌 ATCC 33539^[19]. +表示阳性; —表示阴性; ND 表示无记录; d 表示有 26%-75%可能性为阳性.
Note: 1. Strain XP-11; 2. Strain CSHS-1; 3. Strain *P. damsela* ST1; 4. Strain *P. damsela* ATCC 33539. + denotes positive; — denotes negative; ND denotes no data; d denotes 26%-75% positive probability.

2.3 病原菌 16S rRNA、gyrB 和 ureC 基因序列分析

PCR 扩增得到菌株 XP-11 的 16S rRNA 和 gyrB 基因片段, 其长度分别为 1454 bp 和 604 bp, 上传序列至 NCBI 数据库获得序列登录号分别为 ON287257

和 ON315384。通过 BLAST 序列比对结果显示, 菌株 XP-11 隶属于发光杆菌属(*Photobacterium*), 与同属美人鱼发光杆菌 ATCC 33539 (序列登录号 NR040831.1)和美人鱼发光杆菌 9046-81 (CP046752.1) 的 16S rRNA 序列相似性最高, 分别为 99.79%和

99.83%。从 GenBank 数据库中下载相似序列, 利用 MEGA 4.0 软件采用 N-J 法构建系统发育进化树(图 3a,3b), 结果显示病原菌 XP-11 与同属的美人鱼发光杆菌聚为一支。此外, 本研究从菌株 XP-11 中扩增得到长度为 401 bp 的 *ureC* 基因片段(登录号 ON758349), 序列比较结果显示该序列与美人鱼发

光杆菌美人鱼亚种 V1607-1 (LC374023.1)的相似性最高, 为 96.55%, 构建系统发育进化树显示菌株 XP-11 与美人鱼发光杆菌美人鱼亚种聚为一支(图 3c)。因此, 结合生理生化结果和基因序列分析结果, 鉴定菌株 XP-11 为美人鱼发光杆菌美人鱼亚种(*P. damsela* subsp. *damsela*)。

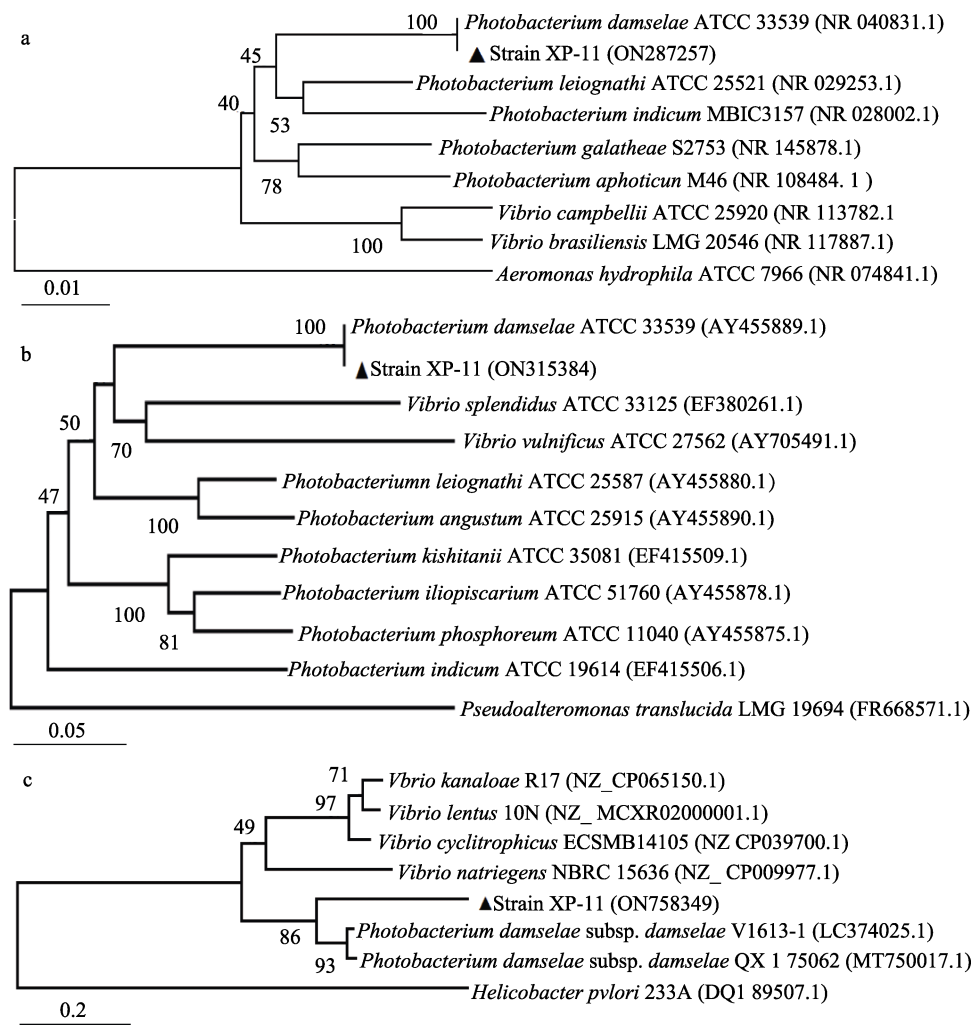


图 3 NJ 法构建病原菌 XP-11 16S rRNA (a)、*gyrB* (b)和 *ureC* (c)基因系统发育进化树
Fig. 3 NJ-phylogenetic trees based on individual analyses of the 16S rRNA (a), *gyrB* (b) and *ureC* (c) gene sequences of strain XP-11

2.4 病原菌毒力基因检测

毒力基因检测结果显示, 病原菌 XP-11 含有溶血性相关基因 *hlyA* 和磷脂酶活性相关基因 *plpV* 等 2 种美人鱼发光杆菌典型毒力基因, 以及 TDH 相关溶血素基因 *trh*、霍乱弧菌溶血素基因 *hlyA*、哈维氏弧菌溶血素基因 *vhh* 和创伤弧菌溶血素基因 *vvh* 等 4 种非典型毒力基因(图 4)。

2.5 患病仿刺参体壁和呼吸树组织病理观察

采用 HE 染色法对患病仿刺参体壁和呼吸树进行组织病理观察结果显示, 患病仿刺参体壁组织细胞间界限模糊且排列无序, 间隙变大, 胞内物质颜色加深, 部分角质层、表皮层溶解消失, 结缔组织分解成块状, 与角质层、表皮层混合在一起(图 5b); 呼吸树内皮层和肌层开始溶解, 结

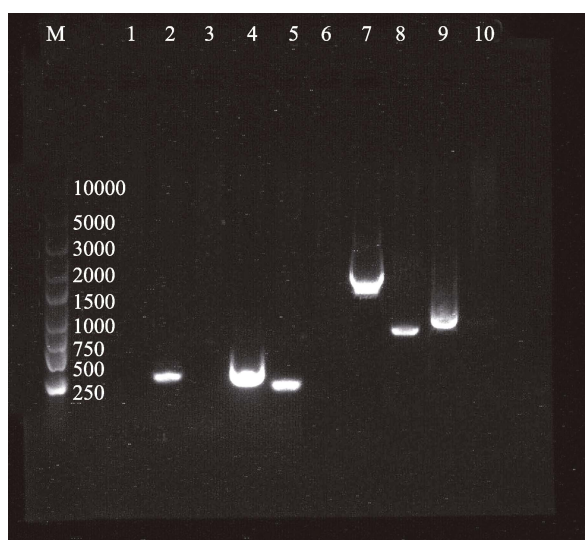


图 4 病原菌 XP-11 毒力基因检测电泳图

M: DNA marker; 1: 毒性质粒复制起点基因 *pPHDD1*; 2: 溶血性相关基因 *hlyApl*; 3: 溶血性相关基因 *hlyAch*; 4: 溶血性相关基因 *dly*; 5: 磷脂酶活性相关基因 *plpV*; 6: 副溶血弧菌相关溶血素基因 *trh*; 7: 霍乱弧菌溶血素基因 *hlyA*; 8: 哈维弧菌溶血素基因 *vhh*; 9: 创伤弧菌溶血素基因 *vvh*; 10: 副溶血弧菌耐热直接溶血素基因 *tdh*.

Fig. 4 Detection electrophoresis of virulence genes of pathogenic strain XP-11

M: DNA marker; 1: The virulence plasmid *pPHDD1* replication origin; 2: Hemolytic related gene *hlyApl*; 3: Hemolytic related gene *hlyAch*; 4: Hemolytic related gene *dly*; 5: Phospholipase activity related genes *plpV*; 6: *Vibrio parahaemolyticus* the haemolysin gene *trh*; 7: *Vibrio cholerae* haemolysin gene *hlyA*; 8: *Vibrio harveyi* haemolysin gene *vhh*; 9: *Vibrio vulnificus* haemolysin gene *vvh*; 10: *Vibrio parahaemolyticus* the rmostable direct haemolysin gene *tdh*.

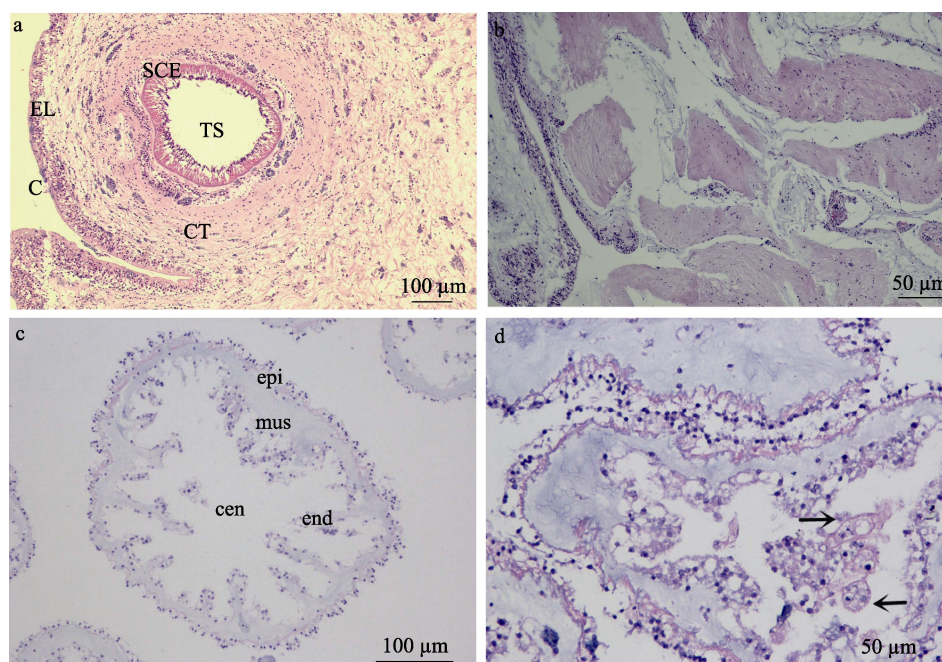


图 5 患病仿刺参的体壁和呼吸树病理性变化

- a. 对照组, 健康仿刺参体壁; b. 患病仿刺参体壁, 细胞间界限模糊, 表皮层溶解消失(箭头);
c. 对照组, 健康仿刺参呼吸树; d. 患病仿刺参呼吸树, 中央腔中可见后口虫虫体(箭头). C: 角质层; EL: 上皮层;
CT: 结缔组织; TS: 管状结构; SCE: 单层立方上皮; epi: 上皮层; mus: 肌肉层; cen: 中央腔; end: 内皮层.

Fig. 5 Histopathological change of body wall and respiratory tree of sick *Apostichopus japonicus*

a. Body wall of healthy *A. japonicus*, control group. b. Body wall of sick *A. japonicus*, the boundary between cells blurred, the epidermis dissolved and disappeared (Arrow). c. Respiratory tree of healthy *A. japonicus*, control group. d. Respiratory tree of sick *A. japonicus*, *Boveria* sp. were found in the central lumen. C: Stratum corneum; EL: Epithelium layer; CT: Connective tissue; TS: Tubular structure; SCE: simple cuboidal epithelium; epi: epithelial layer; mus: muscular layer; cen: central lumen; end: endothelial layer.

构不清晰, 在呼吸树中央腔内可见寄生虫结构(图 5d)。

2.6 病原菌药物敏感性分析

K-B 法药敏分析结果显示, 病原菌 XP-11 对

四环素、恩诺沙星、环丙沙星、头孢曲松、氧氟沙星、头孢哌酮、头孢拉定和复方新诺明等 8 种抗生素敏感, 对多黏菌素 B 和氟哌酸等 2 种抗生素中度敏感; 对庆大霉素、链霉素、红霉素、阿

奇霉素、新霉素、卡那霉素、利福平、氨苄青霉素、阿米卡星和阿莫西林等 10 种抗生素耐药; 最小抑菌浓度(MIC 值)测定结果显示, 8 种水产用抗菌药物恩诺沙星、硫酸新霉素、甲矾霉素、氟苯尼考、盐酸多西环素、氟甲喹、磺胺间甲嘧啶钠、磺胺甲噁唑+甲氧苄啶对病原菌 XP-11 的 MIC 值分别为 0.08、2、1、1、0.06、0.125、4、1.2/0.06 $\mu\text{g/mL}$, 均表现出较高的敏感性(表 4)。

表 4 病原菌 XP-11 药敏实验结果
Tab. 4 Results of antibiotic sensitivity test of pathogenic strain XP-11

抗菌药物 antibacterial	药物含量/ μg disc content	抑菌圈直径/mm inhibition zone diameter	最小抑菌浓度 /($\mu\text{g/mL}$) MIC value	敏感性 sensitivity
庆大霉素 Gentamicin	10	16	—	R
四环素 Tetracycline	30	32	—	S
链霉素 Streptomycin	10	15	—	R
多粘菌素 B Polymyxin B	300	18	—	I
红霉素 Erythromycin	15	13	—	R
阿奇霉素 Azithromycin	15	18	—	R
新霉素 Neomycin	30	18	—	R
卡那霉素 Kanamycin	30	16	—	R
环丙沙星 Ciprofloxacin	5	42	—	S
利福平 Rifampicin	5	16	—	R
头孢曲松 Ceftriaxone Sodium	30	36	—	S
氧氟沙星 Ofloxacin	5	22	—	S
头孢哌酮 Cefoperazone	75	27	—	S
氟哌酸 Norfloxacin	10	20	—	I
头孢拉定 Cefradine	30	27	—	S
氨苄青霉素 Ampicillin	10	11	—	R
阿米卡星 Amikacin	30	13	—	R
阿莫西林 Amoxicillin	10	14	—	R
复方新诺明 Compound Sulfamethoxazole	1.25/23.75	30	—	S
恩诺沙星 Enrofloxacin	5	36	0.008	S
硫酸新霉素 Neomycin sulphate	—	—	2	ND
甲矾霉素 Thiamphenicol	—	—	1	ND
氟苯尼考 Florfenicol	—	—	1	S
盐酸多西环素 Doxycycline hyclate	—	—	0.06	S
氟甲喹 Flumequine	—	—	0.125	S
磺胺间甲氧嘧啶钠 Sodium Sulfamonomethoxine	—	—	4	S
磺胺甲恶唑+甲氧苄啶 Sulfamethoxazole + rimethoprim	—	—	1.2/0.06	S

注: R 表示耐药; I 表示中度敏感; S 表示敏感; ND 表示无耐药临界值。
Note: R indicates resistant; I indicates inter-mediate; S indicates sensitive; ND indicates no critical value of drug resistance.

3 讨论

3.1 美人鱼发光杆菌的分离与鉴定

美人鱼发光杆菌是海水养殖鱼类中常见的病原菌之一, 其不同亚种感染宿主后表现出了不同的发病症状, 其中杀鱼亚种通常在水温 18~20 $^{\circ}\text{C}$

时引起发病, 以内脏出现白色结节为主要症状^[15], 如卵形鲳鲹感染美人鱼发光杆菌后期脾脏、肾脏和心脏等部位有直径为 0.5~1.0 mm 的白色粟米样结节^[35]; 条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)感染杀鱼亚种后脾脏、肾脏出现灰白色结节, 最终发生死亡^[36]。而美人鱼亚种感染后主要表现为外部皮肤

溃疡,并且有可能发展成出血性败血症、淤点和内脏器官病变^[37],如半滑舌鳎感染美人鱼发光杆菌后表现为体表溃烂、腹部肿胀、鳍部出血^[10];银鲷感染美人鱼亚种后出现眼内出血、肝脏出血和组织坏死等症状^[12]。目前,关于美人鱼发光杆菌引起仿刺参感染患病的报道尚属首次。本研究中对患病仿刺参主要症状为体表溃疡,从病灶处分离得到一株优势菌 XP-11,经回归感染实验确定其为致病菌,结合生理生化和基因序列分析鉴定为美人鱼发光杆菌。Biolog 自动微生物鉴定系统是以细菌对微平板上 95 种碳源的利用情况为基础进行的鉴定。本研究中病原菌 XP-11 与数据库中美人鱼发光杆菌美人鱼亚种匹配度高。为了进一步对病原菌进行鉴定,本研究对菌株 XP-11 的 16S rRNA、*gyrB* 和 *ureC* 序列进行分析,系统发育进化树中病原菌 XP-11 的 16S rRNA 和 *gyrB* 基因与美人鱼发光杆菌的同源性均达到 99%以上且聚为同一分支,说明该菌株与美人鱼发光杆菌亲缘关系最近。但由于 16S rRNA 和 *gyrB* 基因的保守性,不能区分两亚种,所以本研究采用两亚种间的差异结构基因 *ureC* 进行扩增并构建系统发育进化树,结果显示病原菌 XP-11 与美人鱼亚种聚为一支,因此确定了病原菌 XP-11 为美人鱼发光杆菌美人鱼亚种。

3.2 美人鱼发光杆菌的致病性

美人鱼发光杆菌的致病性与其产生的 4 种不同毒素相关^[38],并将其分为含有毒力质粒 *pPHDD1* 和不含有毒力质粒 *pPHDD1* 菌株,其中含有毒力质粒菌株除了产生质粒编码的毒素磷脂酶(*Dly*)和磷脂酶 P (*PhlyP*)外,还产生质粒编码的毒素磷脂酶 C (*PhlyC*)和磷脂酶 *PlpV*^[27-28]。磷脂酶 *Dly* 是一种对鞘磷脂作用的磷脂酶-D, *PlpV* 则被认为是一种磷脂酶-A2,而 *PhlyP* 和 *PhlyC* 是成孔毒素^[38-39],这 4 种毒素主要通过 II 型分泌系统对宿主产生毒力^[40-41]。而不含毒力质粒菌株只产生 *phlyC* 和 *plpV*^[39]。Vences 等^[26]的研究表明具有 *pPHDD1* 质粒的美人鱼发光杆菌具有更强毒力,而磷脂酶 *plpV* 在无 *pPHDD1* 质粒的菌株中主要以卵磷脂依赖的方式对血细胞产生溶血活性。本研究中病原菌 XP-11 对仿刺参的半致死浓度

(LD₅₀)为 1.08×10^5 CFU/g 体重,高于张飞等^[9]报道的美人鱼发光杆菌 NPL1006 对大黄鱼的 LD₅₀ (7.96×10^3 CFU/g 体重),而与条纹狼鲈分离菌的 LD₅₀ (1.3×10^5 CFU/g)相近^[15],这可能与不同宿主对美人鱼发光杆菌的敏感性有关,也可能与不同美人鱼发光杆菌菌株的致病力有关;本研究毒力基因检测显示病原菌 XP-11 不含有毒力质粒 *pPHDD1*,仅含有溶血性相关基因 *hlyAch* 和磷脂酶活性相关基因 *plpV* 两种典型毒力因子。Schroeder 等^[42]认为毒力基因可以是细菌原本具有的,也可从其他细菌基因通过水平转移获得,本研究发现病原菌 XP-11 含有 4 种弧菌类的非典型毒力因子 *hlyA*、*vhh*、*trh* 和 *vvh* 基因。邓益琴等^[27]分析了 35 株不同来源美人鱼发光杆菌中 5 个非典型毒力因子基因(*hlyA*、*vhh*、*trh*、*vvh* 和 *tdh*)的分布情况,发现大多数美人鱼发光杆菌都含有 *hlyA* 基因,其次是 *vvh*、*trh*、*vhh* 和 *tdh*,这表明了美人鱼发光杆菌可以通过获取外来毒力基因增强自身毒力作用。本研究中病原菌 XP-11 引起仿刺参患病可能是多种毒力因子共同作用的结果,但不同的毒力基因对毒性的作用大小及毒力基因的水平转移机制仍有待进一步研究。

3.3 美人鱼发光杆菌的药物敏感性

仿刺参疾病病原具有复杂性和多样性的特点^[4],对病原菌的药敏试验是实施精准用药和减量用药的前提与基础,不同来源和不同株系的美人鱼发光杆菌对药物的敏感性也不同。张飞等^[9]对同一海域养殖大黄鱼分离美人鱼发光杆菌的药敏结果表明,头孢唑啉、头孢噻吩、庆大霉素、卡那霉素、头孢他啶、氧氟沙星、诺氟沙星、依诺沙星和多黏菌素 B 等 9 种药物能有效抑制美人鱼发光杆菌 NPL1006 生长。对华南地区不同患病鱼类的 35 株美人鱼发光杆菌的耐药性分析结果表明,美人鱼发光杆菌对庆大霉素、诺氟沙星、环丙沙星、氯霉素和氟苯尼考显示出较高的药物敏感性^[27]。此外同样分离自霞浦吊笼养殖的患病仿刺参病原菌(哈维氏弧菌 FJXPH0612),对阿奇霉素、大观霉素、呋喃妥因、氯霉素、头孢吡肟、头孢呋辛、头孢噻肟、头孢他啶、头孢哌酮和复方新诺明等药物敏感^[6]。根据《水产养殖用药明

白纸》, 氧氟沙星、诺氟沙星、氯霉素等药物已被列为水产养殖禁用药物, 因此本研究选择 8 种批准使用的抗生素药物进行 MIC 测定, 结果表明恩诺沙星、盐酸多西环素和氟苯尼考等抗生素对病原菌 XP-11 也显示明显的抑制作用, 可用于对美人鱼发光杆菌引起的南移仿刺参疾病治疗。

参考文献:

- [1] Liao YL. Fauna of China: Echinoderma. Holothuria[M]. Beijing: Science Press, 1997: 48-152. [廖玉麟. 中国动物志: 棘皮动物门. 海参纲[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 48-152.]
- [2] Liao M J, Wang Y G, Li B, et al. Present status and existing problem for sea cucumber culture industry in China and discussion on its countermeasures (Continued)[J]. Scientific Fish Farming, 2021(2): 24-25. [廖梅杰, 王印庚, 李彬, 等. 我国海参养殖产业现状、存在问题及对策探讨(上)[J]. 科学养鱼, 2021(2): 24-25.]
- [3] Fang L P, Zhou C, Huang R F, et al. Identification and characterization of *Vibrio pomeroi* isolated from *Apostichopus japonicus* with skin ulcer syndrome during aestivation[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2014, 53(2): 273-282. [方旅平, 周宸, 黄瑞芳, 等. 度夏仿刺参病原菌伯麦罗氏弧菌的分离鉴定和特征研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2014, 53(2): 273-282.]
- [4] Zhang C Y, Chen G F, Xu Z, et al. Advances in diseases of sea cucumber *Apostichopus japonicus*—a review[J]. Fisheries Science, 2011, 30(10): 644-648. [张春云, 陈国福, 徐仲, 等. 海参疾病学研究进展[J]. 水产科学, 2011, 30(10): 644-648.]
- [5] Ge H, He L B, Lin Q, et al. Analysis and identification of causative pathogen for skin ulcerative syndrome in Fujian Sea cage cultured *Apostichopus japonicus*[J]. Journal of Fujian Fisheries, 2012, 34(2): 105-110. [葛辉, 何丽斌, 林琪, 等. 福建海区网箱养殖刺参“腐皮综合症”病原分析与鉴定[J]. 福建水产, 2012, 34(2): 105-110.]
- [6] Yang Q H. Isolation, identification and antibiotic sensitivity analysis of bacterial pathogen from skin ulcer disease in *Apostichopus japonicus* cultured in South China[J]. Journal of Fujian Fisheries, 2015, 37(2): 98-106. [杨求华. 南移仿刺参体表溃疡症病原菌的分离鉴定及药敏分析[J]. 福建水产, 2015, 37(2): 98-106.]
- [7] Love M, Teebken-Fisher D, Hose J E, et al. *Vibrio damsela*, a marine bacterium, causes skin ulcers on the damselfish *Chromis punctipinnis*[J]. Science, 1981, 214(4525): 1139-1140.
- [8] Gauthier G, Lafay B, Ruimy R, et al. Small-subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurella piscicida* (Snieszko et al.) Janssen and Surgalla to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb. nov.[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1995, 45(1): 139-144.
- [9] Zhang F, Su Y Q, Wang J, et al. Studies on the isolation, identification and virulence of *Photobacterium damsela* isolated from *Pseudosciaena crocea*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(6): 1202-1208. [张飞, 苏永全, 王军, 等. 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)源美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damsela*)的分离鉴定及致病性研究[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(6): 1202-1208.]
- [10] Shao P, Yong P Z, Zhou W L, et al. First isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from half-smooth tongue sole suffering from skin-ulceration disease[J]. Aquaculture, 2019, 511: 734208.
- [11] Tao Z, Shen C, Zhou S M, et al. An outbreak of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* infection in cultured silver pomfret *Pampus argenteus* in Eastern China[J]. Aquaculture, 2018, 492: 201-205.
- [12] Singaravel V, Gopalakrishnan A, Dewangan N K, et al. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* associated with bacterial myonecrosis and hepatopancreatic necrosis in broodstock Pacific white leg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)[J]. Aquaculture International, 2020, 28(4): 1593-1608.
- [13] di Francesco G, Camm à C, Curini V, et al. Coinfection by *Ureaplasma* spp., *Photobacterium damsela* and an actinomyces-like microorganism in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) with pleuropneumonia stranded along the Adriatic coast of Italy[J]. Research in Veterinary Science, 2016, 105: 111-114.
- [14] Austin B, Austin D A. Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish[M]. New York: Halsted Press, 1999.
- [15] Zorrilla I, Balebona M C, Mori i go M A, et al. Isolation and characterization of the causative agent of pasteurellosis, *Photobacterium damsela* sp. *piscicida*, from sole, *Solea senegalensis* (Kaup)[J]. Journal of Fish Diseases, 1999, 22(3): 167-172.
- [16] Wang R X, Feng J, Su Y L, et al. Studies on the isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from diseased golden pompano (*Trachinotus ovatus* Linnaeus) and antibacterial agents sensitivity[J]. Veterinary Microbiology, 2013, 162(2-4): 957-963.
- [17] Nitzan S, Shwartsburd B, Vaiman R, et al. Some characteristics of *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* isolated in Israel during outbreaks of pasteurellosis in hybrid bass (*Morone saxatilis* × *M. chrysops*)[J]. Bulletin-European Association of Fish Pathologists, 2001, 21(2): 77-80.
- [18] Barnes A C, dos Santos N M S, Ellis A E. Update on bacterial vaccines: *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*[J]. Developments in Biologicals, 2005, 121: 75-84.
- [19] Bergey D H, Holt J G. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994
- [20] Dong X Z, Cai M Y. Manual of Familiar Bacterium Identification[M]. Beijing: Science Press, 2001: 114-116. [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, 114-116.]
- [21] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing[M]//Stackebrandt E, Goodfellow M. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. New York: John Wiley & Sons, 1991.
- [22] Ast J C, Cleenwerck I, Engelbeen K, et al. *Photobacterium kishitani* sp. nov., a luminous marine bacterium symbiotic with deep-sea fishes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(Pt 9): 2073-2078.
- [23] Yu T, Jiang H, Yang Y T, et al. Rapid detection of *Photobacterium damsela* with visual RPA-LFD technology[J]. Journal of China University of Metrology, 2020, 31(4): 496-501. [余庭, 蒋晗, 杨宇婷, 等. 可视化 RPA-LFD 技术快速检测美人鱼发光杆菌[J]. 中国计量大学学报, 2020, 31(4): 496-501.]
- [24] Terceti M S, Vences A, Matanza X M, et al. Molecular epidemiology of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* outbreaks in marine rainbow trout farms reveals extensive horizontal gene transfer and high genetic diversity[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2155.
- [25] 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.
- [26] Vences A, Rivas A J, Lemos M L, et al. Chromosome-encoded hemolysin, phospholipase, and collagenase in plasmidless isolates of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* contribute to virulence for fish[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(11): e00401-17.
- [27] Deng Y Q, Xu L W, Zhang Y Q, et al. Analysis of virulence genes and antibiotic resistance of *Photobacterium damsela* isolated from marine fishes in coastal South China[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(11): 2606-2619. [邓益琴, 徐力文, 张亚秋, 等. 我国华南沿海海水养殖鱼类病原菌美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damsela*)分离株的毒力基因和耐药性分析[J]. 微生物学报, 2020, 60(11): 2606-2619.]
- [28] Saravanan V, Sanath Kumar H, Karunasagar I, et al. Putative virulence genes of *Vibrio cholerae* from seafoods and the coastal environment of Southwest India[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 119(3): 329-333.
- [29] Jun T D, Ohashi T, Nishimura N, et al. Detection of the thermostable direct hemolysin gene (*tdh*) and the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*) of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction[J]. Molecular and Cellular Probes, 1992, 6(6): 477-487.
- [30] Lee J Y, Bang Y B, Rhee J H, et al. Two-stage nested PCR effectiveness for direct detection of *Vibrio vulnificus* in natural samples[J]. Journal of Food Science, 1999, 64(1): 158-162.
- [31] Wick M R. The hematoxylin and eosin stain in anatomic pathology-An often-neglected focus of quality assurance in the laboratory[J]. Seminars in Diagnostic Pathology, 2019, 36(5): 303-311.
- [32] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. Twenty-First Informational Supplement M100-S21, 2011.
- [33] Lipkin W I. Microbe hunting in the 21st century[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(1): 6-7.
- [34] Zhang X J, Qin G M, Bing X W, et al. Phenotypic and molecular characterization of *Photobacterium damsela*, a pathogen of the cultured tongue sole *Cynoglossus semilaevis* in China[J]. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 2011, 45(1): 1-13.
- [35] 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.
- [36] 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. [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.]
- [37] Labella A, Sanchez-Montes 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.
- [38] Osorio C R, Vences A, Matanza X M, et al. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, a generalist pathogen with unique virulence factors and high genetic diversity[J]. Journal of Bacteriology, 2018, 200(15): e00002-e00018.
- [39] Kreger A S, Bernheimer A W, Etkin L A, et al. Phospholipase D activity of *Vibrio damsela* cytolysin and its interaction with sheep erythrocytes[J]. Infection and Immunity, 1987, 55(12): 3209-3212.
- [40] Rivas A J, von Hoven G, Neukirch C, et al. Phobalysin, a small β -pore-forming toxin of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*[J]. Infection and Immunity, 2015, 83(11): 4335-4348.
- [41] Rivas A J, Vences A, Husmann M, et al. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* major virulence factors *dly*, plasmid-encoded *HlyA*, and chromosome-encoded *HlyA* are secreted via the type II secretion system[J]. Infection and Immunity, 2015, 83(4): 1246-1256.
- [42] Schroeder M, Brooks B D, Brooks A E. The complex relationship between virulence and antibiotic resistance[J]. Genes, 2017, 8(1): 39.

Isolation and identification of *Photobacterium damsela* causing disease in cultured *Apostichopus japonicus* in southern China

WANG Lili^{1,2}, YANG Qiuhua², LI Huiyao², YANG Fuyuan^{2,3}, WU Jianshao², JIANG Xinglong¹, LIN Qi^{1,2,3}

1. Fisheries College of Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Key Laboratory of Cultivation and High-value Utilization of Marine Organisms in Fujian, Fisheries Research Institute of Fujian Province, Xiamen 361013, China;

3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Sea cucumber (*Apostichopus japonicus*), an important economic mariculture species in China, has high nutritional and medicinal values. In recent years, with the expansion of the breeding scale, new pathogens causing diseases often appear. In November 2020, a large-scale epidemic of skin ulcers was recorded in cultured *A. japonicus* in the Xiapu area of Fujian Province. In order to explore the pathogens causing diseases in *A. japonicus*, the potentially pathogenic bacteria were isolated, and the physicochemical properties, virulence factors, and drug sensitivity of the isolated bacteria were studied. The artificial regression infection results showed that the dominant strain isolated from the lesions on the body surface (XP-11) was the main pathogen causing the skin rot syndrome in *A. japonicus*, with the same symptoms of skin ulcers as the natural disease. The results showed that the dominant strain XP-11 isolated from the lesions on the body surface was the main pathogen causing the skin rot syndrome in *A. japonicus*. The strain XP-11 was identified as *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* based on morphological characteristics, Biolog's automatic microbial identification system, as well as 16S rRNA, housekeeping gene (*gyrB*), and urease C (*ureC*) gene sequence analyses. The results of virulence gene detection showed that the strain XP-11 contains two typical virulence genes of the hemolysin gene (*hlyAch*) and phospholipase activity gene (*plpV*). The results of antimicrobial susceptibility analysis showed that the strain XP-11 was sensitive to tetracycline, enrofloxacin, and trimethoprim/sulfamethoxazole. The minimum inhibitory concentrations of the strain XP-11 to Enrofloxacin, Neomycin sulfate, Thiamphenicol, Florfenicol, Doxycycline hydrochloride, Flumequine, sodium Sulfamethoxine, Sulfamethoxazole + Trimethoprim were 0.08, 2, 1, 1, 0.06, 0.125, 4, and 1.2/0.06 µg/mL, respectively. This is the first report regarding the diseases caused by *P. damsela* in sea cucumbers. In summary, *P. damsela* subsp. *damsela* was the causative agent of the skin ulceration syndrome of cultured *A. japonicus*, and the median lethal dose (LD₅₀) value was 1.08×10^5 CFU/g body weight. The results of this study provided valuable references for further prevention and control of diseases caused by *P. damsela* in the sea cucumber aquaculture industry.

Key words: *Apostichopus japonicus*; *Photobacterium damsela*; skin ulceration syndrome; virulence gene; drug sensitivity

Corresponding author: LIN Qi. E-mail: xmqlin@sina.com