

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16310

线纹海马尾部溃烂症病原轮虫弧菌的分离鉴定及特性分析

杨求华^{1,2}, 郑乐云¹, 黄种持¹, 林琪¹, 陆振², 周宸¹

1. 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;

2. 汕头大学 理学院, 广东 汕头 515063

摘要: 本研究分离了线纹海马(*Hippocampus erectus*)尾部溃烂症病原并对其理化、胞外酶和药敏特性进行了分析。结果显示, 分离于患病海马肝脏的优势菌株 HM-10 为线纹海马尾部溃烂症病原菌, 其对海马的半致死浓度(LD₅₀)为 1.51×10^6 CFU/g 体重。API 20E 理化分析显示, 该菌精氨酸双水解酶阴性, 赖氨酸、鸟氨酸脱羧酶阳性, L-阿拉伯糖、杏仁苷产酸。基于形态观察、理化指标对比, 以及 16S rRNA 和看家基因(*gyrB*、*rpoD*、*recA*)序列分析结果, 确定菌株 HM-10 为轮虫弧菌(*Vibrio rotiferianus*)。采用平板玻璃纸覆盖法制备该菌胞外产物(ECP), 溶血及胞外酶活性分析结果显示, 菌株 HM-10 的 ECP 对绵羊血有较强的溶血活性, 同时具有蛋白酶、明胶酶、淀粉酶、脲酶活性, 但不具有脂肪酶和卵磷脂酶活性。药敏分析结果显示, 菌株 HM-10 对氨基糖苷类、青霉素类、头孢类、酰胺醇类及多肽类等 17 种药物敏感。本研究确定了线纹海马尾部溃烂症的病原菌为轮虫弧菌, 结果对海马养殖中弧菌病的防治提供了参考资料。

关键词: 线纹海马; 尾部溃烂症; 轮虫弧菌; 病原鉴定; 特性分析

中图分类号: S947

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)05-1131-10

海马 (*Hippocampus* spp.) 隶属于海龙科 (Syngnathidae), 海马属, 因其头部酷似马头而得名^[1], 具有很高的药用和观赏价值^[2]。由于受到自然栖息地破坏以及人为过度捕捞等因素的影响, 现今所有已知的海马均已被列入野生动植物濒危物种国际贸易公约(CITES)名录^[3]。海马的人工繁育及养成已成为海马资源保护的重要手段, 在缓解野生种群数量锐减压力上发挥着重要作用^[4]。大海马(*H. kuda*)、三斑海马(*H. trimaculatus*)以及线纹海马(*H. erectus*)是目前国内最主要的 3 个养殖品种^[2,5-6], 然而, 疾病问题一直阻碍着海马养殖业的发展^[7], 肠胃炎^[8-9]、体表溃疡症^[10]、肾损伤^[11]以及盾纤毛虫寄生^[12]等疾病均可造成养殖海马的大量死亡; 溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)^[10]、灿烂弧菌(*V. splendidus*)^[10]、强壮弧菌(*V.*

fortis)^[9]、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)^[8]、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)^[13-14]等也已被报道为海马病原菌。但轮虫弧菌作为养殖海马病原菌的研究还未见报道。

形态学及生理生化测定作为传统的分类方法已被广泛应用于菌株鉴定^[15-16], 弧菌属因其同属不同种菌株之间生化指标的相似性, 往往需要通过大量的指标来进行区分, 鉴定过程费时费力^[17]; 自动微生物鉴定系统具有快速鉴别菌种能力, 但受制于数据库标准菌株数量及更新速度的影响, 鉴定结果也容易出现偏差^[18]。基于 PCR 扩增技术的分子鉴定手段应运而生, 16S rRNA、看家基因序列分析等研究方法已被用作菌种系统发育分析以及新种的鉴定^[19-21]。

2014 年 2 月至 2015 年 7 月间, 笔者对福建东

收稿日期: 2016-10-18; 修订日期: 2017-02-21.

基金项目: 福建省公益行业专项(2015R1003-6 & 2014R1003-14); 福建省海洋高新产业发展专项(闽海洋高新(2014)18 号); 福建省海洋经济创新发展区域示范项目(2014FJPT01); 福建省海洋高新产业发展专项([2016]23 号).

作者简介: 杨求华(1988-), 男, 博士研究生, 工程师/执业兽医师, 研究方向为水产动植物病害防治. E-mail: qhyang1314@163.com

通信作者: 周宸, 教授级高工. Tel: 0592-6012063; E-mail: ccdaif@fjscs.ac.cn

山养殖海马开展疾病调查,发现线纹海马育苗期尾部溃烂症是造成育苗成活率低下的主要疾病之一,其中育苗期内 5~8 cm 海马最易发生此病,患病海马离群独游,活力差,腹部凹陷,尾部不能正常弯曲、呈 L 形或后翘呈 C 形,尾末端表皮脱落、溃烂、露骨,解剖后可见肝脏红肿或呈土黄色,肠道白浊,一旦发病,5 天内死亡率可达 20% 以上。本研究对患病的濒死线纹海马进行病原分离、致病性、生理生化、分子鉴定和药敏分析,以期为线纹海马养殖过程中的疾病防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

患病和感染试验所用海马均取自福建东山某海马养殖场。取具有典型病症个体用于病原分离实验;取体表无损伤、活力强的健康个体用于感染实验。海马个体的平均体质量和标准体长分别为 (0.47 ± 0.160) g 和 (6.37 ± 0.637) cm。

1.2 病原菌的分离纯化

参考文献[22]的方法,取典型症状的患病海马,用灭菌海水清洗体表,以无菌操作取肝脏组织,制成悬浮液后用接种环接种于 TCBS 培养基上,28℃ 恒温培养 24 h,观察菌落形态,挑取典型优势菌落纯化培养 2~3 次,将纯化后的菌落接种于 2216E 培养基上,经纯化后的菌落转接到斜面培养基上,用 30% 甘油生理盐水保存于-80℃ 冰箱,备用。

1.3 人工感染实验

将待检菌株接种于 2216E 培养基,28℃ 恒温培养 24 h 后用无菌 PBS 配制成 1.194×10^9 CFU/mL 菌悬液,而后等比稀释成 1.194×10^8 CFU/mL、 1.194×10^7 CFU/mL、 1.194×10^6 CFU/mL 和 1.194×10^5 CFU/mL 菌悬液。设计 5 个梯度(10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 和 10^5 菌浓度)实验组和 1 个对照组(每组 10 尾海马),每组设 2 个平行,采用腹腔注射方式感染,注射量为 0.050 mL/ind,对照组注射相同剂量的无菌 PBS。试验期间不投饵,连续充气,日换水量约为 60%,感染后观察海马发病死亡情况,同时对濒死海马进行重分离实验。使用 Graphpad

Prism 软件对海马成活率数据进行分析^[23],参考改良的冠氏法^[24]计算菌株对海马的半致死浓度(LD₅₀)。

1.4 病原菌的鉴定

1.4.1 病原菌理化特性测定 病原菌的生理生化鉴定按《伯杰氏鉴定细菌学手册》^[15]和《常见细菌系统鉴定手册》^[16]方法进行,同时采用 API 20E 半自动及 Biolog 自动微生物鉴定系统进行理化指标分析^[22]。病原菌个体形态采用透射电镜进行拍照观察。

1.4.2 病原菌 16S rRNA 及看家基因片段序列分析

参考相关文献[20-21, 25],对病原菌 16S rRNA 基因及 *gyrB*、*rpoD* 和 *recA* 3 个看家基因片段序列进行扩增。基因引物序列如下: 16S rRNA: 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 1492R (5'-ACGGCTACCTTGTACGACTT-3')^[25]; *gyrB*: 3F (5'-TCCGGCGGTCTGCACGGCGT-3'), 14R (5'-TTGTCCGGGTTGTACTCGTC-3')^[20]; *rpoD*: 70Fs (5'-ACGACTGACCCGGTACGCATGTA-3'), 70Rs (5'-ATAGAAATAACCAGACGTAAGTT-3')^[20]; *recA*: 63F (5'-ATCGAGCGGTCGTTTCGGCAAGGG-3'), 504R (5'-CGRATCTGGTTGATGAAGA TCACCAT-3')^[21]。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检验正确后送至 Invitrogen 公司测序。测序获得的核酸序列提交至 GenBank 数据库,采用 BLAST 在 GenBank 数据库中比对相似序列,下载同源序列,采用 MEGA 4.0 软件 Neighbour-Joining 方法对 4 个基因及其连接基因分别构建系统进化树(bootstrap=1000)。

1.5 病原菌胞外产物的制备及其特性分析

1.5.1 病原菌胞外产物制备 参考相关文献[24],采用平板玻璃纸覆盖法制备病原菌的胞外产物(ECP),常规方法对病原菌的 ECP 进行 SDS-PAGE 电泳分析。其中分离胶 12%、浓缩胶 5%,每孔上样量为 20 μL;起始电压 80 V,待样品进入分离胶后恒压 120 V,电压完毕后,采用考马斯亮蓝 R-250 染色,而后扫描保存结果。

1.5.2 病原菌胞外产物酶与溶血活性的测定 参考文献[24]的方法,测定病原菌胞外产物的淀粉酶、蛋白酶、明胶酶、脂肪酶、卵磷脂酶和脲酶活性及其溶血活性。

1.6 病原菌药物敏感性分析

采用琼脂平板扩散法^[26]对病原菌的药物敏感性进行检测,使用 Graphpad prism 软件对药敏结果进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 病原菌的分离和致病性确定

从患病海马(图 1a)肝组织中分离得到 1 株优势菌株 HM-10, 人工感染实验结果显示, 该菌对线纹海马具有明显的致病作用, 感染后患病海马症状与自然发病症状相同, 表现为尾部溃烂, 不能正常弯曲(图 1c), 其不同浓度对海马的致死率如图 2 所示, 采用改良的冠氏法计算得到 HM-10 对线纹海马的半致死浓度 LD₅₀ 为 1.51×10⁶ CFU/g

体重。从感染后发病的海马中重新分离得到一株优势菌 HMCf-2, 其理化性质与注射菌株 HM-10 一致。

2.2 病原菌的菌种鉴定

2.2.1 病原菌菌落及菌株形态观察 经 28℃ 恒温培养 24 h 后, 病原菌 HM-10 在 TCBS 培养基上形成中央隆起, 边缘整齐, 表面湿润、光滑的圆形黄色菌落, 菌落直径 1~2 mm(图 1b); 在 2216E 培养基上形成白色、半透明, 直径 0.5~1 mm 菌落。透射电镜结果显示, 菌株 HM-10 呈单个排布, 短杆状、两端钝圆, 具单根极生鞭毛, 菌体大小约为 1.8×0.8 μm(图 1d)。

2.2.2 病原菌理化特性分析 参考微生物鉴定手册, 病原菌 HM-10 及重分离菌 HMCf-2 均为革兰

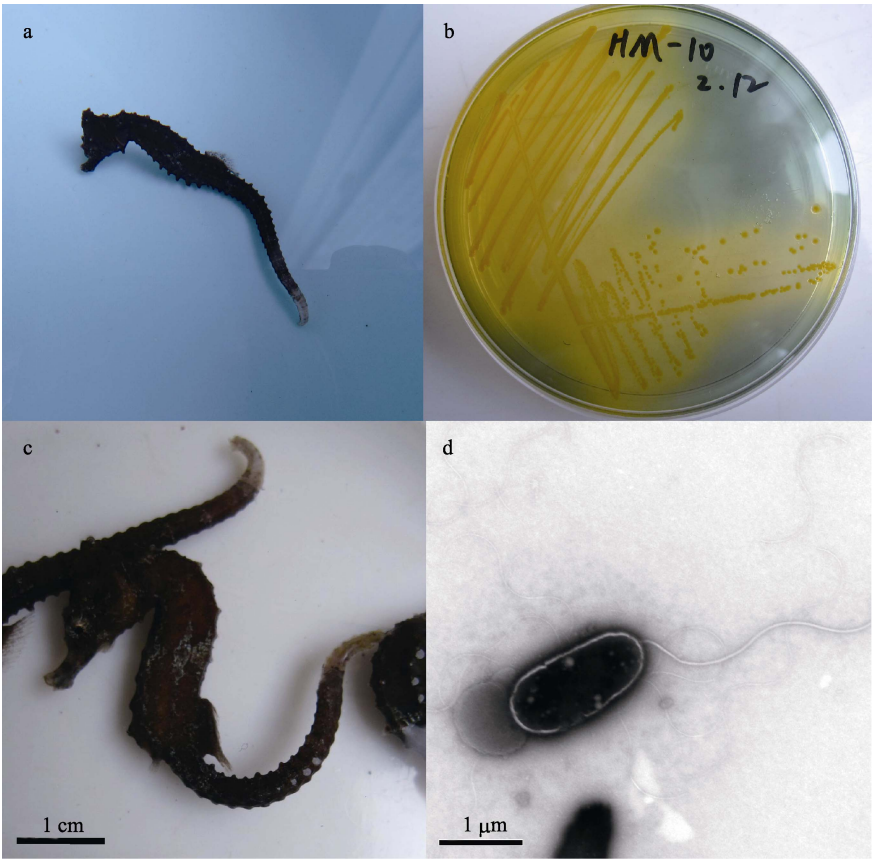


图 1 线纹海马发病症状及菌株分离结果

a, c. 海马自然及人工感染后发病症状(海马尾部不能正常弯曲, 呈 L 形或后翘呈 C 形, 尾末端溃烂);
b. 海马肝脏分离菌 HM-10 的菌落形态(TCBS 培养基呈黄色菌落); d. 菌株 HM-10 透射电镜图(× 4000).
Fig. 1 Symptoms of lined seahorse *Hippocampus erectus* and strain isolation results
a, c. Symptoms of seahorse with natural and injured infection (tail festered, and could not normal bending with L-shaped or post-warped with C-shaped); b. colony morphology of strain HM-10 isolated from liver of sick seahorse (orange colonies in TCBS plates); d. transmission electron microscopy figure of HM-10 with 4000 multiples.

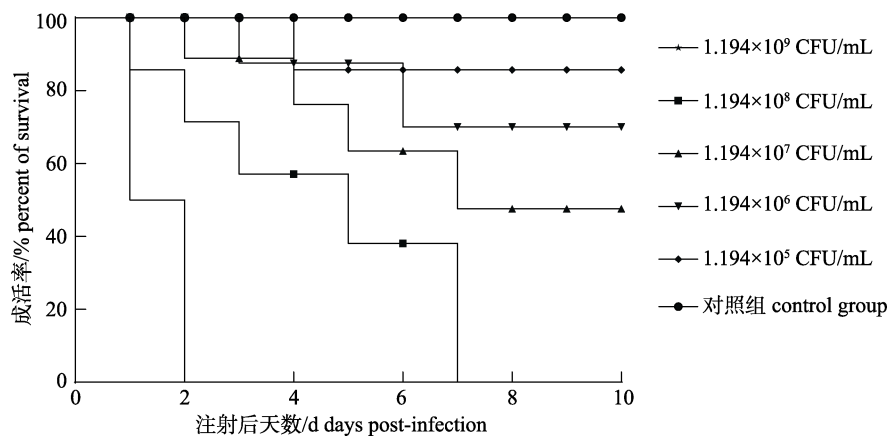


图 2 菌株 HM-10 对线纹海马人工感染实验结果($n=10$, 2 组平行)
Fig. 2 Results of artificial infection of *Hippocampus erectus* infected by strain HM-10 ($n=10$, two duplications for each trial)

氏阴性,具运动性,葡萄糖发酵产气,氧化酶阳性,触酶阳性;API 20E 鉴定系统测试结果显示, HM-10 和 HMCf-2 精氨酸双水解酶阴性,赖氨酸脱羧酶及鸟氨酸脱羧酶阳性;参考文献资料,将这两株与其他轮虫弧菌(BV1 和 LMG 21460^T)的理化指标进行比对(表 1),结果表明,除了是否利用密二糖、*D*-甘露糖及对多黏菌素 B 的敏感性不同外,菌株 HM-10 和 HMCf-2 与轮虫弧菌标准菌

株 LMG 21460^T 的理化指标基本相同。采用 Biolog 自动微生物鉴定系统分析,在培养后 4 h、8 h 和 18 h 进行测定,均未能得到菌株 HM-10 和 HMCf-2 鉴定结果。

2.2.3 病原菌基因序列分析 PCR 扩增得到病原菌 HM-10 的 16S rRNA、*gyrB*、*rpoD* 和 *recA* 基因片段,其长度分别为 1422 bp、1090 bp、826 bp、804 bp;上传序列至 NCBI 数据库获得序列登录

表 1 病原菌 HM-10、重分离菌 HMCf-2 及参考菌株 BV1、LMG 21460^T 生理生化特性对比
Tab. 1 Comparison of physiological and biochemical characteristics between pathogen HM-10, HMCf-2 and reference strains BV1, LMG 21460^T

指标 index	1	2	3	4	指标 index	1	2	3	4
利用 utilization of:					生长 growth in:				
<i>L</i> -阿拉伯糖 <i>L</i> -arabinose	+	+	+	+	0%氯化钠 1%NaCl	ND	ND	ND	-
<i>D</i> -甘露糖 <i>D</i> -mannose	+	+	+	+	1%氯化钠 1%NaCl	+	+	+	ND
密二糖 melibiose	-	-	-	+	4%氯化钠 4%NaCl	+	+	+	ND
α -乳糖 α -lactose	-	-	-	-	8%氯化钠 8%NaCl	-	-	+	-
<i>D</i> -甘露醇 <i>D</i> -mannitol	+	+	+	-	V-P 反应 voges-proskauer	-	-	-	-
<i>DL</i> -乳酸 <i>DL</i> -lactic acid	-	-	-	W	酶活性 activity of:				
溴琥珀酸 bromosuccinic acid	ND	ND	ND	-	α -糜蛋白酶 α -chymotrypsin	ND	ND	ND	+
<i>L</i> -谷氨酸 <i>L</i> -glutamic acid	-	-	+	-	脲酶 urease	+	+	ND	+
<i>L</i> -苏氨酸 <i>L</i> -threonine	-	-	-	-	产酸 acid form:				
柠檬酸盐 citrate	-	-	ND	-	<i>L</i> -阿拉伯糖 <i>L</i> -arabinose	+	+	+	+
敏感性 susceptibility to:					杏仁苷 amygdalin	+	+	ND	+
氨苄青霉素 ampicillin (30 μ g)	R	R	R	R	精氨酸双水解酶 arginine-dihydrolase	-	-	ND	-
多黏菌素 B polymyxin B (300 U)	S	S	ND	R	赖氨酸脱羧酶 lysine-decarboxylase	+	+	ND	+
阿米卡星 Amikacin (30 μ g)	S	S	I	I	鸟氨酸脱羧酶 ornithine-decarboxylase	+	+	ND	+

注: 1. 菌株 HM-10; 2. 菌株 HMCf-2; 3. 轮虫弧菌 BV 1^[27]; 4. 轮虫弧菌 LMG 21460^T[28]。+: 阳性; -: 阴性; ND: 无记录; W: 弱反应; R: 耐药; I: 中度敏感; S: 敏感。
Note: 1: strain HM-10; 2: strain HMCf-2; 3: strain *Vibrio rotiferianus* BV 1^[27]; 4: strain *Vibrio rotiferianus* LMG 21460^T[28]. +: positive; -: negative; ND: no data; W: weak reaction; R: resistant; I: inter-mediate; S: sensitive.

号分别为 KX962166、KX962168、KX981594 和 KX981595。经 BLAST 比对, 菌株隶属于弧菌属 (*Vibrio*), 与同属的轮虫弧菌 (*V. rotiferianus*) 的同源关系最近。从 GenBank 数据库中下载同属其他种的相关序列, 利用 MEGA 4.0 软件采用 N-J 法构建系统发育进化树(图 3)。结果显示, 病原菌 HM-10 与同为弧菌属的轮虫弧菌聚为一支(图 3a~3d)。将所有菌株的 16S rRNA、*gyrB*、*rpoD* 和 *recA* 4 个基因序列进行拼接, 获得同等序列长度的拼接序列 16S rRNA-*gyrB*-*rpoD*-*recA*(总长度 4054 bp), 同法构建系统发育进化树(图 3e)显示其与轮虫弧菌也聚为一支, 二者同源率为 97.5%。

2.3 病原菌胞外产物特性分析

采用平板玻璃纸覆盖法制备的病原菌 HM-10 胞外产物 SDS-PAGE 电泳结果(图 4)显示, 菌株的 ECP 中含有 20 多条蛋白条带, 颜色深浅不一, 不均匀地分布在 10~130 kD 区域内, 其中 25~55 kD 区域密集分布有 7 条颜色较深的条带。溶血性实验及胞外酶活性实验结果显示, 菌株 HM-10 胞外产物具有较强的溶血活性及蛋白酶、明胶酶、淀粉酶和脲酶活性, 但不具有脂肪酶和卵磷脂酶活性(表 2)。

2.4 病原菌药物敏感性分析

选择 12 大类共 33 种抗生素对病原菌 HM-10 的药物敏感性进行分析。结果显示, HM-10 对其中的 17 种药物敏感, 12 种药物中度敏感, 4 种药物耐药(图 5)。敏感性的药物主要分布在头孢类、氨基糖苷类、青霉素类、硝基呋喃类、酰胺醇类和多肽类, 具体包括头孢呋辛、头孢曲松、头孢噻肟、头孢他啶、头孢噻吩、头孢吡肟、头孢西丁、头孢哌酮、卡那霉素、壮观霉素、妥布霉素、哌拉西林、氨苄西林、链霉素、呋喃妥因、氯霉素、多粘菌素 B; 耐药性药物包括大环内酯类的克林霉素、氟喹诺酮类的环丙沙星、青霉素类的青霉素以及四环素类的四环素。

3 讨论

3.1 病原菌的分类鉴定

柯霍氏法则(kochs postulate), 又称亨勒-柯霍法则, 是一套建立疾病和微生物之间因果关系

的研究思维, 现今被广泛应用于疾病病原学研究^[29]。在本研究中, 笔者从患尾部溃烂症的线纹海马体内分离得到一优势菌株 HM-10, 人工感染试验后发现被感染海马出现与自然发病相同的症状, 从感染后濒死海马的肝脏重新分离到与注射菌株生化特性相同的菌株 HMCf-2, 根据柯霍氏法则确定菌株 HM-10 为海马尾部溃烂症的病原菌。基于病原菌 16S rRNA 及看家基因(*gyrB*、*rpoD*、*recA*)序列分析, 并参考与标准菌株 LMG 21460 的生理生化对比结果, 确定菌株 HM-10 为轮虫弧菌(*Vibrio rotiferianus*)。

轮虫弧菌是隶属于弧菌属的一个菌种, 最早见于 Gomez-Gil 等^[28]的报道。2003 年, Gomez-Gil 等从褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*)中分离得到 5 株菌, 基于密二糖利用, L-阿拉伯糖、杏仁苷产酸, 以及 DNA 杂交率等指标的差异, 将 5 株菌从坎贝弧菌(*V. campbellii*)、哈维氏弧菌等其他弧菌中区分出来, 作为一个新种并确定其标准菌株为 LMG 21460^T。2011 年, Chowdhury 等^[30]报道了一株可引起泥蟹幼虫患病的病原菌轮虫弧菌 DAT722; 2012 年, 陈政强等^[27]在对患病半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)病原研究中分离得到一株轮虫弧菌 BV1, 经确定该菌可引起半滑舌鲷皮肤溃疡; 此后又相继出现轮虫弧菌引起凡纳滨对虾^[31-32]、海水鱼类^[33]患病的报道。本研究发现轮虫弧菌可引起线纹海马的尾部溃烂症。

细菌的胞外产物(ECP)是指细菌在生长过程中不断向外界分泌的代谢产物, 是决定病原菌毒力的重要因素^[34]。有报道指出, 细菌 ECP 的蛋白酶和明胶酶能分解机体组织的胶原蛋白, 淀粉酶能分解糖原, 而溶血因子则能使血细胞溶解, 从而引起机体表皮、肌肉及结缔组织溶解、坏死并形成溃疡^[24]。在本研究中, 病原菌 HM-10 的 ECP 具有蛋白酶、明胶酶、淀粉酶、脲酶及溶血活性, 由该菌引起的海马烂尾病可能与这些酶的活性密切相关, 其致病机理有待于进一步研究。

3.2 海马体表溃疡症的病原及病因分析

体表溃疡症为海马的主要疾病之一, Balcázar 等^[10]报道了由溶藻弧菌和灿烂弧菌感染引起的斑状海马(*H. guttulatus*)、短鼻海马(*H. hippocampus*)

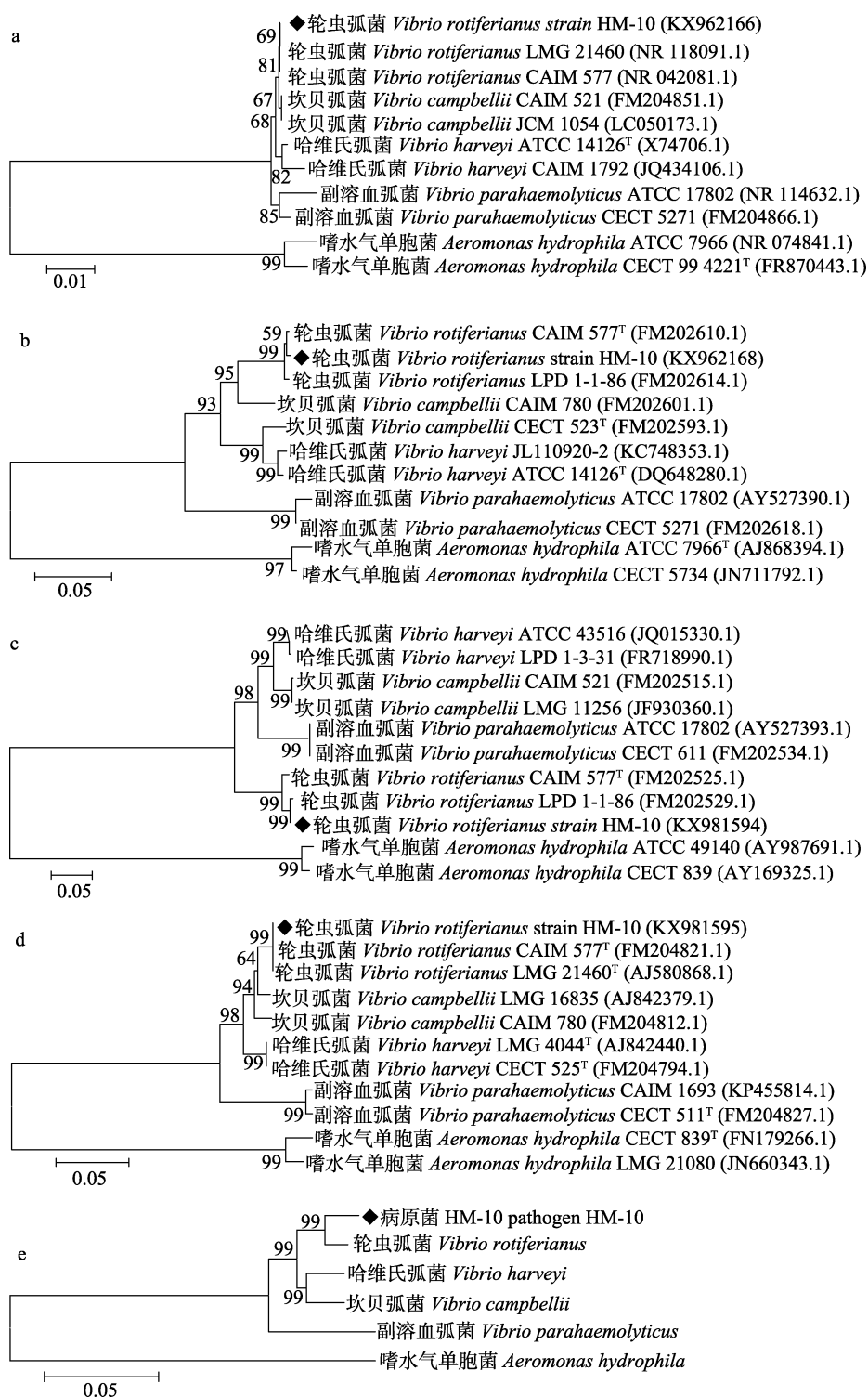


图 3 NJ 法构建病原菌 HM-10 16S rRNA、*gyrB*、*rpoD*、*recA* 基因系统发育进化树

a. 16S rRNA; b. *gyrB*; c. *rpoD*; d. *recA*; e. 16S rRNA-*gyrB*-*rpoD*-*recA* 连接基因(总长度 4054 bp). 线段 0.01(a)、0.05(b, c, d, e)代表进化距离; 括号中为 GenBank 登录号.

Fig. 3 NJ-phylogenetic trees based on individual analyses of the 16S rRNA, *gyrB*, *rpoD* and *recA* gene sequences of strain HM-10

a. gene 16S rRNA; b. gene *gyrB*; c. gene *rpoD*; d. gene *recA*; e. concatenated 16S rRNA-*gyrB*-*rpoD*-*recA* gene sequences (total 4054 bp). Bars, 0.01(a) nucleotide substitution per 100 nucleotides of 16S rRNA sequence, 0.05 (b, c, d, e) amino acid substitutions per site. GenBank accession numbers are in bracket.

表 2 病原菌 HM-10 的 ECP 酶活性和溶血性实验结果
Tab. 2 The activities and hemolytic experiments of ECP of strain HM-10

时间/h time	可溶性淀粉 soluble starch(0.2%)	蛋黄 yolk(2.5%)	酪蛋白 casein(0.4%)	明胶 gelatin(0.4%)	吐温 80 tween 80(1.0%)	尿素 urea(2.0%)	脱纤维绵羊血 sheep blood(5%)
24	+	—	+	+	—	+	+
48	+	—	+	+	—	+	+

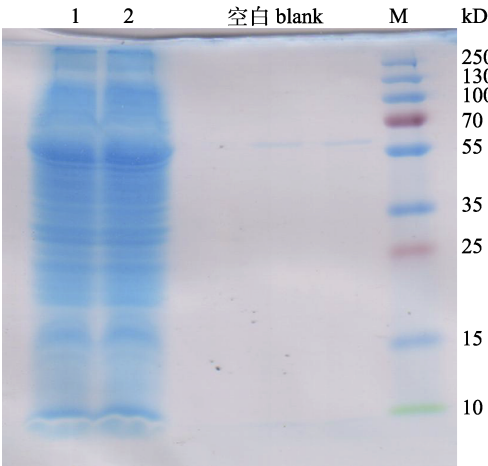


图 4 病原菌 HM-10 的胞外产物 SDS-PAGE 电泳图谱
1, 2: 两个平行蛋白条带; M: 蛋白分子量标准.
Fig. 4 SDS-PAGE electrophoretic pattern of ECP of strain HM-10
1, 2: two parallel protein bands; M: maker.

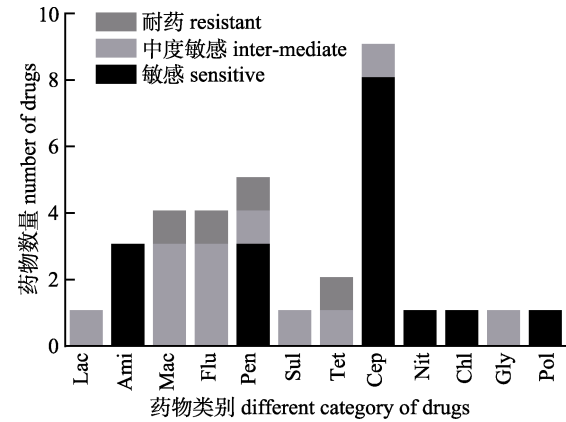


图 5 病原菌 HM-10 药敏实验结果
Lac: β -内酰胺类($n=1$), Ami: 氨基糖苷类($n=3$), Mac: 大环内酯类($n=4$), Flu: 氟喹诺酮类($n=4$), Pen: 青霉素类($n=5$), Sul: 磺胺类($n=1$), Tet: 四环素类($n=2$), Cep: 头孢类($n=9$), Nit: 硝基呋喃类($n=1$), Chl: 酰胺醇类($n=1$), Gly: 糖肽类($n=1$), Pol: 多肽类($n=1$).
Fig. 5 Results of antibiotic sensitivity test of strain HM-10
Lac: Beta lactam ($n=1$), Ami: Aminoglycoside ($n=3$), Mac: Macrolides ($n=4$), Flu: Fluoroquinolones ($n=4$), Pen: Penicillins ($n=5$), Sul: Sulfanilamide grous ($n=1$), Tet: Tetracyclines ($n=2$), Cep: Cephalosporins ($n=9$), Nit: Nitrofurans ($n=1$), Chl: chloromycetin ($n=1$), Gly: glycopeptides ($n=1$), Pol: polypeptide ($n=1$).

体表溃疡症, 患病海马表现为嗜睡、食欲下降、体表出现小白点, 严重者出现尾部溃烂; Qin 等^[11]的研究也表明, 哈维氏弧菌感染后患病线纹海马出现体表穿孔、烂尾等症状, 解剖后发现肾肿胀, 呈苍白色, 其中肾损伤被认为是海马死亡的主要病理学特征; 而在另一起由哈维氏弧菌引起水族缸观赏海马患病的报道中, 患病海马表现为体表出血、腹水、肠道中空以及肝出血等症状^[13]。以上研究表明, 弧菌可引起海马出现体表溃疡症状, 本研究中也显示, 轮虫弧菌感染后引起线纹海马出现尾部不能正常弯曲、呈 L 形或后翘呈 C 形, 尾末端溃烂症状。弧菌为条件致病菌, 广泛分布于河口、大洋及海岸沉积物中, 研究表明, 不同的环境因子下优势生长的弧菌种类各不相同, 水环境温度、盐度、pH、有机物含量、化学耗氧量(COD)以及原生生物种类等均与弧菌的生长密切相关^[14]。在不同的养殖生境条件下, 环境因子的差异影响了优势弧菌的生长, 在本研究中, 线纹海马养殖于福建省东山县的半工厂化室内水泥池, 其环境因子有别于海马体表溃疡症的其他报道^[10-11], 因此引起该病的病原也不尽相同。此外, 在海马疾病的治疗方面, 有报道指出, 由于冰冻饵料及未消毒活饵料的大量投喂已造成大海马肠炎病的大量死亡, 饵料质量及养殖水体质量的控制是预防海马肠炎病发生的关键因素^[2, 35]。在其他疾病的治疗上, Alcaide 等^[13]使用氯霉素为患有体表出血、腹水的海马进行治疗取得良好的实验效果, 不过其治疗的海马为观赏性用途, 而在水产养殖用药方面需严格遵守《无公害食品渔药使用准则》的要求。本研究药敏实验结果显示, 病原菌 HM-10 对头孢类的药物敏感性最高, 但其成本较为昂贵, 并不适用于养殖生产, 氨基糖苷类和磺胺类药物的药敏结果在准则允许范围内可被用于生产中的参考。

致谢：特别感谢集美大学水产学院关瑞章教授对本文写作方面的指导。

参考文献：

- [1] Lourie S A, Pritchard J C, Casey S P, et al. The taxonomy of Vietnam's exploited seahorses (family Syngnathidae)[J]. Biol J Linn Soc, 1999, 66: 231–256.
- [2] Lin Q, Lin J, Huang L. Effects of light intensity, stocking density and temperature on the air-bubble disease, survivorship and growth of early juvenile seahorse *Hippocampus erectus* Perry, 1810[J]. Aquac Res, 2010, 42: 91–98.
- [3] Vincent A, Foster S J, Koldewey H J. Conservation and management of seahorses and other Syngnathidae[J]. J Fish Biol, 2011, 78(6): 1681–1724.
- [4] Koldewey H J, Martin-Smith K M. A global review of seahorse aquaculture[J]. Aquaculture, 2010, 302: 131–152.
- [5] Xu Y J, Lu H X, Lu G M. Study on the artificial eco-aquaculture of the three-spot seahorse, *Hippocampus trimaculatus* Leach[J]. Progress in Fishery Sciences, 2011, 32(5): 38–43. [徐永健, 陆慧贤, 卢光明. 三斑海马的人工生态养殖[J]. 渔业科学进展, 2011, 32(5): 38–43].
- [6] Deng G, Lv J Y, Lin Q. Effects of water-bloom on environmental factors in breeding water for juvenile seahorse, *Hippocampus kuda* Bleeker[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2005, 12(4): 477–482. [邓钢, 吕军仪, 林强. 大海马育苗池水华发生期间细菌动态及相关理化参数[J]. 中国水产科学, 2005, 12(4): 477–482].
- [7] Lin T, Zhang D, Liu X, et al. Variations of immune parameters in the lined seahorse *Hippocampus erectus* after infection with enteritis pathogen of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2016, 50: 247–254.
- [8] Yang Y Y, Yang W D, Cheng G, et al. Study on isolation, identification and sensitivity to antibiotics of seahorse *H. Kelloggii*[J]. Chinese Frontier Health Quarantine, 2006, 29(4): 232–238. [杨弘诣, 杨为东, 程刚, 等. 一种海马肠道疾病病原体的鉴定及其对抗生素的敏感性研究[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2006, 29(4): 232–238].
- [9] Wang X, Zhang Y, Qin G, et al. A novel pathogenic bacteria (*Vibrio fortis*) causing enteritis in cultured seahorses, *Hippocampus erectus* Perry, 1810[J]. J Fish Dis, 2016, 39: 765–769.
- [10] Balcázar J L, Gallo-Bueno A, Planas M, et al. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from captive-bred seahorse with disease symptoms[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2010, 97: 207–210.
- [11] Qin G, Wang X, Tan S, et al. A bacterial infection by *Vibrio harveyi* causing heavy reduction of cultured lined seahorse *Hippocampus erectus*[J]. J Fish Dis, 2017, 40(4): 601–605.
- [12] Wei X D, Chen D H, Ye C M. Breeding actuality and developing direction of seahorses in China[J]. Supplement to the Journal of Sun Yatsen University, 2002, 22(3): 236–239. [魏祥东, 陈东红, 叶长明. 海马的人工养殖现状及前景[J]. 中山大学学报论丛, 2002, 22(3): 236–239.]
- [13] Alcaide E, Gil-Sanz C, Sanjuán E, et al. *Vibrio harveyi* causes disease in seahorse, *Hippocampus* sp.[J]. J Fish Dis, 2001, 24: 311–313.
- [14] Tendencia E A. The first report of *Vibrio harveyi* infection in the sea horse *Hippocampus kuda* Bleekers 1852 in the Philippines[J]. Aquac Res, 2004, 35: 1292–1294.
- [15] Brenner D J, Krieg N R, Staley J T, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2 part B[M]. 2nd ed. USA: Springer, 2005: 520–527, 544.
- [16] Dong X Z, Cai M Y. Handbook of Common Bacterial System 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.]
- [17] Vandenbergh J, Thompson F L, Gomez-Gil B, et al. Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems[J]. Aquaculture, 2003, 219: 9–20.
- [18] Yang Q H. Isolation and identification of the pathogenic *Aeromonas* spp. from farmed eels[D]. Xiamen: Jimei University, 2012. [杨求华. 养殖鳗鲡致病性气单胞菌的分离与鉴定[D]. 厦门: 集美大学, 2012.]
- [19] Cano-Gómez A F, Goulden E, Owens L, et al. *Vibrio owensii* sp. nov., isolated from cultured crustaceans in Australia[J]. FEMS Microbiol Lett, 2010, 302: 175–181.
- [20] Soler L, Yáñez M A, Chacon M R, et al. Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2004, 54: 1511–1519.
- [21] Aliliche K, Beghalem H, Landoulsi A, et al. Molecular phylogenetic analysis of *Rhizobium sulae* isolated from Algerian *Hedysarum flexuosum*[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2016, 109(7): 897–906.
- [22] Yang Q H, Ge H, Fang L P, et al. Identification of *Vibrio tubiashii* isolated from diseased pond-cultured sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*)[J]. South China Fisheries Science, 2014, 10(4): 45–51. [杨求华, 葛辉, 方旅平, 等. 池塘养殖刺参病原菌塔式弧菌的分离与鉴定[J]. 南方水产科学, 2014, 10(4): 45–51].
- [23] 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.]
- [24] Zhang F, Su Y Q, Wang J, et al. Study 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.]
- [25] Lane D J. 16S/23S rRNA sequencing[M]// Stackebrandt E, Goodfellow M. *Nucleic Acid Techniques In Bacterial Systematics*. New York: John Wiley & Sons, 1991: 115–175.
- [26] Wang Y S, Wu J G. *National Guide to Clinical Laboratory Procedures*[M]. Nanjing: Southeast University Press, 2005: 172–176. [王毓三, 武建国. 临床检验操作规程[M]. 南京: 东南大学出版社, 2005: 172–176.]
- [27] Chen Z Q, Yao Z X, Lin M, et al. Characterization of pathogenic bacteria *Vibrio rotiferianus* isolated from *Cynoglossus semilaevis* Günther[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2012, (6): 147–153. [陈政强, 姚志贤, 林茂, 等. 半滑舌鳎病原菌轮虫弧菌(*Vibrio rotiferianus*)的分离与鉴定[J]. 生物技术通报, 2012, (6): 147–153.]
- [28] Gomez-Gil B, Thompson F L, Thompson C C, et al. *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, 53: 239–243.
- [29] Lipkin, W. Microbe hunting in the 21st century[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(1): 6–7.
- [30] Chowdhury P R, Boucher Y, Hassan K A, et al. Genome Sequence of *Vibrio rotiferianus* strain DAT722[J]. *J Bacteriol*, 2011, 193(13): 3381–3382.
- [31] Jin C Y. Identification and characterization of pathogenic bacteria causing vibriosis in cultured American white shrimp (*Penaeus vannamei*)[J]. *Marine Environmental Science*, 2013, 32(5): 647–651. [金春英. 南美白对虾弧菌病原的分离和鉴定[J]. 海洋环境科学, 2013, 32(5): 647–651.]
- [32] Gong B, Pan Y S, Zhang Y Q, et al. Isolation, identification and drug-sensitivity test of bacterial pathogen from vanname prawn (*Litopenaeus vannamei*)[J]. *Journal of Microbiology*, 2014, 34(5): 70–74. [龚斌, 潘育胜, 张艳秋, 等. 凡纳滨对虾细菌性病原的分离鉴定和耐药性研究[J]. 微生物学杂志, 2014, 34(5): 70–74.]
- [33] Cui J, Fan X T, Liu W Z, et al. Isolation and identification of *Vibriosis* pathogens of marine cultured fishes in Southern China[J]. *Natural Science Journal of Hainan University*, 2014, 32(3): 244–251. [崔婧, 范雪亭, 刘文竹, 等. 华南地区海水养殖鱼类主要弧菌病原的分离与鉴定[J]. 海南大学学报: 自然科学版, 2014, 32(3): 244–251.]
- [34] Shi C B, Hu X F, Chen X G, et al. Characteristics of the extracellular products of two pathogenic *Vibrio harveyi* strains[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, 31(1): 83–87. [石存斌, 胡学峰, 陈献稿, 等. 两株致病性哈维氏弧菌胞外产物的特性分析[J]. 水生生物学报, 2007, 31(1): 83–87.]
- [35] Li F, Wang K, Luo W, et al. Comparison of intestinal bacterial flora in healthy and intestinal-diseased seahorses *Hippocampus trimaculatus*, *Hippocampus erectus*, and *Hippocampus spinosissimus*[J]. *J World Aquac Soc*, 2015, 46(3): 263–272.

Corresponding author: ZHOU Chen. Email: ccdaifj@fjscs.ac.cn