

• 研究简报 •

红鳍东方鲀皮肤溃烂病病原菌的分离与鉴定

王斌, 于兰萍, 胡亮, 李艳, 刘双凤, 姜志强

(大连水产学院 农业部海洋水产增养殖与生物技术重点开放实验室, 辽宁 大连 116023)

摘要: 从体表溃烂的养殖红鳍东方鲀 (*Fugu obscurus*) 病灶处分离到 1 株优势生长菌, 编号为 H-06091。分别通过创伤浸泡和注射方式感染健康红鳍东方鲀, 发现这两种途径均可引发皮肤溃烂, 两种途径的感染率均为 100%, 2×10^8 cell/mL 菌浓度注射组死亡率为 100%, 4×10^7 cell/mL 菌浓度注射组死亡率为 50%, 创伤浸泡感染未见死亡。药敏实验表明, 复方新诺明、呋喃妥因、链霉素、环丙沙星、利福平、红霉素、氟哌酸、氟喹酸、庆大霉素、阿米卡星、四环素、青霉素 G 等抗菌素对 H-06091 有较强的抑制作用。按照《常见细菌系统鉴定手册》进行菌种鉴定并测定其 16S rRNA 基因序列, 结果表明, 该菌呈革兰氏染色阴性, 氧化酶阳性, 接触酶阳性, V-P 试验阴性, 硝酸盐还原反应阳性等特征, 符合哈氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 特征, 其 16S rRNA 基因序列与 GenBank 中哈氏弧菌同源率为 99%, 因此将 H-06091 鉴定为哈氏弧菌。
[中国水产科学, 2008, 15 (2): 352-358]

关键词: 红鳍东方鲀; 细菌鉴定; 哈氏弧菌

中图分类号: S941.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)02-0352-07

红鳍东方鲀 (*Fugu obscurus*), 属鲀科, 东方鲀属, 是少数几种营海水、半咸水、淡水洄游生活的鱼类之一。近几年在中国的江苏、上海、辽宁等地, 红鳍东方鲀的人工养殖已初具规模, 其产品主要出口日本、韩国。随着养殖规模的扩大, 病害时有发生。刘振勇等^[1]报道过红鳍东方鲀的一种寄生虫病组织病理研究, 杜佳银^[2]简单报道过红鳍东方鲀的一种链球菌病, 杨鸾劫等^[3]报道过毛霉感染引起暗纹东方鲀 (*Takifugu fasciatus*) 体表溃烂, 杨鸾劫等^[4]、李瑾年等^[5]报道了几种细菌引起的暗纹东方鲀病害, 周凯等^[6]报道了暗纹东方鲀的一种病毒性疾病, 而有关红鳍东方鲀弧菌病国内外未见报道。2006 年秋大连地区部分养殖红鳍东方鲀出现不同程度的体表溃烂, 且传染性较强、死亡率较高, 严重影响了其生产。本研究对该病进行了病原确定、病原菌分离鉴定以及病原的药物敏感性分析, 旨在为进一步研究该病的发生机制、探索有效治疗方法, 为控制疾病的发生与蔓延打下理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

患病红鳍东方鲀取自于大连某养殖场, 全长

15~19 cm。健康红鳍东方鲀购于大连富谷水产养殖公司。在 40 cm×50 cm×60 cm 的水槽中暂养, 水温 18 ℃, 与正常养殖同法投喂鲜活蛤。

细菌分离及培养用培养基为 2216E 海水培养基, 包括斜面、平板和液体^[7]。

生理生化试验所用培养基的配制参考《常见细菌系统鉴定手册》^[8]和《微生物学实验手册》^[9]。

1.2 病原菌的分离与纯化

观察不同发病程度个体的体征及器官损坏情况。取发病症状典型的濒死病鱼, 用 70% 的酒精棉球反复擦拭消毒病鱼的腹部和体表, 按不同方法采样: (1) 用接种环在患病鱼的背部、鳍、口周围、眼睛周围等溃烂处轻轻刮取黏液, 于 2216E 平板上划线分离, 置 25 ℃恒温培养 48 h。(2) 无菌操作打开腹腔, 用接种环刺入病鱼肝脏和肾脏内, 分别划线接种 2216 E 平板上, 同法培养。挑取形态特征一致的生长菌落进行纯化培养, 转接斜面 25 ℃恒温培养 48 h 后, 置于 15 ℃保存备用。

1.3 人工感染实验

健康河鲀暂养 5 d 后进行人工感染实验, 用分离到的生长最优势菌株 H-06091 对健康红鳍东方鲀进行创

收稿日期: 2007-04-04; 修订日期: 2007-11-05.

基金项目: 大连水产学院农业部海洋水产增养殖与生物技术重点开放实验室基金项目 (K2003-05).

作者简介: 王斌 (1962-), 女, 教授, 从事水产病原微生物与免疫. E-mail: wangbin@dlfu.edu.cn

伤浸泡和肌肉注射两种途径感染,实验水温 18℃。

1.3.1 创伤浸泡感染 菌株 H-06091 经 2216E 斜面 25℃培养 48 h 活化后,用接种环将其刮下接到 2216E 液体培养基中,用摇床培养 48 h 后,4 000 r/min,离心 10 min,弃上清,加生理盐水混匀离心洗涤 3 次,调菌密度为 10^9 cell/mL 备用。将体长 (17 ± 2) cm 的健康红鳍东方鲀按每组 8 尾分组,共 2 组接受感染:感染 1 组,将鱼体背部刮伤 $1\sim 1.5$ cm²,放入有少量海水的水桶中,放入菌密度 10^5 cell/mL 的菌液中浸泡 20 min 后移入水槽常规饲养;感染 2 组不刮伤,仅放入菌密度 10^5 cell/mL 的菌液中浸泡 20 min。每天 1 次,共 10 d。设 2 组对照:对照 1 组刮伤后,生理盐水浸泡 20 min 后移入水槽;对照 2 组不划伤,正常养殖。

1.3.2 注射感染 同法制备菌密度为 4×10^7 cell/mL 和 2×10^8 cell/mL 的菌液进行注射感染实验,每组 8 尾,各组注射相应浓度菌液。分两点背部肌肉注射,每尾共注射 0.1 mL。对照组注射等量的无菌生理盐水。

1.4 病原菌的鉴定

菌株 H-06091 于 2216E 斜面 25℃培养 48 h,进行革兰氏染色。用半固体 2216E 穿刺法接种培养和水浸片结合观察细菌运动性。2216E 平板 25℃培养 48 h 观察菌落形态及大小。按《常见细菌系统分类手册》^[8] 所述方法鉴定到种。

1.5 16S rDNA 基因序列的PCR扩增与测序

挑取单菌落置于 10 μL 灭菌水中,99℃变性,3 500 r/min,10 min 离心取上清作为模板,使用 TaKaRa 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit(Code No.D310),以 Forward primer/Reverse primer2 为引物,扩增目的片段。以 Seq Forward 为引物对回收产物进行 DNA 测序。所用试剂均购自宝生物工程大连有限公司。

1.6 抗生素敏感实验

采用纸片扩散法。取确定为病原的菌株 H-06091,用无菌生理盐水从培养 48 h 的 2216E 斜面上洗脱制成 10^9 cell/mL 菌悬液,各取 0.1 mL 等量涂布于多个 2216E 平板上进行药敏试验。每一平板放置 4 片药敏纸片,分别用复方新诺明、呋喃妥因、链霉素、环丙沙星、利福平等 14 种药物,于 25℃恒温箱中培养 48 h 后测量抑菌圈直径。

2 结果与分析

2.1 自然发病病鱼体征及细菌分离结果

病鱼:口、眼周围、背部及鳍均出现出血现象并有不同程度的溃烂,溃烂面积 $2\sim 4$ cm² (图 1)。腹部少见溃烂病灶,但可见不同程度的出血点。解

剖腹腔发现肠空无食,无弹性,肝脏、肾、脾充血。



图 1 红鳍东方鲀原发性皮肤溃烂病症状

Fig.1 Symptom of skin canker in primarily infected *Fugu obscurus*

从患病鱼体表病灶分离出 3 株细菌,编号为 H-06091、H-06092 和 H-06093。3 株菌菌落形态不同,其中编号 H-06091 为优势菌株,后两株呈零星散在生长。从肝脏和肾脏中均分离到单一的与 H-06091 个体及菌落特征完全相同的菌株,未分离到 H-06092 和 H-06093 菌株。根据体表病灶及内脏的分离结果,以 H-06091 进行所有实验。H-06091 在 2216E 平板上 25℃培养 48 h 的菌落形态为圆形乳白色,边缘透明,中心隆起,直径 2 mm 左右。

2.2 人工感染实验

2.2.1 创伤浸泡感染 感染 1 组在第 3 天开始出现创伤处溃疡糜烂,出血,肠空无食,肝、肾、脾充血,症状与自然发病相同(图 2)。至第 10 天所有的实验鱼均出现该类症状,感染率达到 100%(表 1),但未发生死亡。无创伤浸泡感染 2 组未出现明显症状。浸泡对照 1 组的创伤未出现感染并逐渐愈合,未出现任何发病症状。浸泡对照 2 无症状现出。

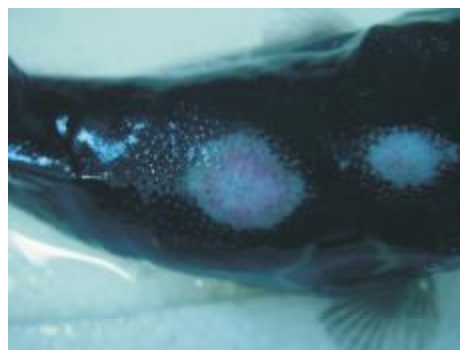


图 2 红鳍东方鲀创伤浸泡感染症状

Fig.2 Symptom of skin canker in wounded and bacterium-marinated *Fugu obscurus*

表 1 红鳍东方鲀创伤浸泡和常规浸泡感染实验结果

Tab.1 Result of marinating *Fugu obscurus* with strain H-06091 suspension

处理组 Treatment group	菌液浓度 / (cell · mL ⁻¹) Bacterium concentration	个体数 / ind N	发病时间 / d Infected time	感染数 Number of infection	感染率 / % Infection rate
感染 1 组 (创伤浸泡) Wounding and bacterium-marinated group	4×10 ⁵	8	3-10	8	100
感染 2 组 (非创伤浸泡) Bacterium-marinated group	4×10 ⁵	8	0	0	0
对照 1 组 Control 1	0	8	0	0	0
对照 2 组 Control 2	0	8	0	0	0

2.2.2 注射感染 2×10⁸ cell/mL 菌浓度注射组实验鱼于第 3 天开始死亡,死亡鱼的体征为,注射部位明显肿胀,注射部位解剖可见皮下肌肉组织糜烂坏死,液化严重,基本无正常组织结构,有大量的脓液流出,镜检见大量吞噬细胞和菌体,实验鱼感染 6 d 后全部死亡;4×10⁷ cell/mL 菌浓度注射组第 8

天出现死亡,至 14 d 时死亡 4 尾,之后再无死亡,一周后结束实验,死亡率 50%,症状与 2×10⁸ cell/mL 菌浓度注射组完全相同,解剖剩余的 4 尾,可见与死亡的实验鱼同样的体征,从出现死亡到实验结束均未出现体表溃烂 (表 2)。

表 2 红鳍东方鲀注射感染实验结果

Tab.2 Result of injection with strain H-06091 to *Fugu obscurus*

实验分组 Group	感染菌液浓度 / (cell · mL ⁻¹) Bacterium concentration	实验个体数 / ind N	剂量 / mL Dosage	死亡时间 / d Time to death	死亡数 Number of death	死亡率 / % Mortality rate	感染数 Number of infection	感染率 / % Infection rate
感染 1 组 Infection 1	2×10 ⁸	8	0.1	3-6	8	100	8	100
感染 2 组 Infection 2	4×10 ⁷	8	0.1	8-14	4	50	8	100
对照组 Control	生理盐水 Saline	8	0.1	0	0	0	0	0

两种感染途径死亡及感染鱼体内均可再次分离到与原菌株相同形态的菌落。

2.3 病原菌的鉴定

菌株 H-06091 革兰氏染色阴性,短杆状,单生极毛 (图 3)。根据其菌体形态,精氨酸双水解、V-P 实验阴性,明胶酶、淀粉酶、氧化酶和脂酶阳性,乳糖发酵反应阳性等特征判断,与《常见细菌系统鉴定手册》^[8] 中哈氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 的生化指标相符 (表 3)。

2.4 H-06091 菌株 16S rRNA 基因的 PCR 扩增与测序

将 H-06091 菌株的 16S rRNA 基因测序结果与 GenBank 中的相关数据比对,发现其与哈氏弧菌的同源性达到 99%,测定序列见图 4,根据 H-06091 菌株的 16S rRNA 基因序列与相关属种 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 (图 5),可见 H-06091 菌株与哈维氏弧菌聚为一支,说明 H-06091 菌株与哈维氏弧菌亲缘关系最近,可将其鉴定为哈维氏弧菌。

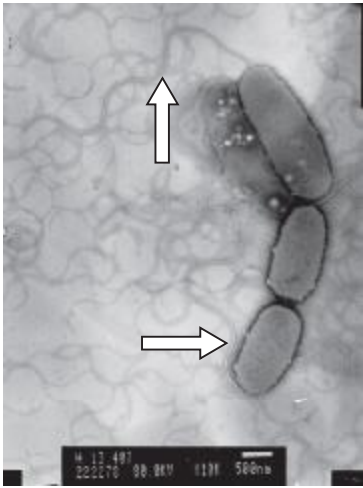


图 3 H-06091 菌株电镜照片

注: 箭头示极生鞭毛

Fig.3 Morphology of strain H-06091 under electronic microscope

Note: arrows show flagella.

表 3 H-06091 菌株生化特征
Tab.3 Biochemical characteristics of strain H-06091

检测项目 Item	结果 Result	检测项目 Item	结果 Result
氧化酶 Oxidase	+	O/129 (10 µg/ 片) O/129 (10 µg/piece)	S
接触酶 Catalase	+	O/129 (150 µg/ 片) O/129 (150 µg/piece)	S
运动性 Motility	-	4 °C 生长 Growth at 4 °C	-
甲基红试验 Methyl red test	+	15 °C 生长 Growth at 15 °C	+
V-P 试验 Voges-Prokauer test	-	25 °C 生长 Growth at 25 °C	+
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	-	30 °C 生长 Growth at 30 °C	+
明胶水解 (20℃) Gelatinase (20℃)	+	37 °C 生长 Growth at 37 °C	+
淀粉酶 Amylase	+	40 °C 生长 Growth at 40 °C	+
脂酶 Lipase	+	碳源利用 Carbohydrate utilization	
葡萄糖氧化发酵		柠檬酸盐 Citrate test	+
Fermentation of glucose oxidation	+	乳糖 Lactose	-
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	蔗糖 Sucrose	+
从 D- 葡萄糖产气 Gas from D-glucose	-	D- 甘露糖 D-Mannose	+
生长需要 Na ⁺ Growth in NaCl	+	麦芽糖 Maltose	+
乳糖发酵 Fermentation of lactose	+	D- 山梨醇 D-Sorbitol	-
TCBS growth on TCBS	Y	D- 半乳糖 D-Galactose	+

注: - 反应阴性; + 反应阳性; S. 敏感; Y. 黄色 .
Note: Negative reaction; + Positive reaction; S.Sensitive; Y.yellow.

CCAGCCTGAACACAAAGTGGTAGCGTCCCTCCCGAAGGTATAACTACCTACTTCCTTTTGCA	60
GCCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTTACCGTGGC	120
ATTTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAGTCGAGTTGCAGACTCCGATC	180
CGGACTACGACGCACCTTTTGGGATTTCGCTCACCTCTCGCAAGTTGGCCGCCCTCTGTATG	240
CGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCGTCCC	300
CACCTTCCCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCCTGGAGTTCCCACCCGAAGTGCITGGCAA	360
ACAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAACACGAGCTGA	420
CGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGT	480
TCCTTGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTC	540
CACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAAATTCATTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCC	600
AGGCGGTCTACTTAACGCGTTAGCTCCGAAAGCCACGGCTCAAGGCCACAACCTCCAAGT	660
AGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTC	720
GCATCTGAGTGTGAGTATCTGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATTCCTTCAGATC	780
TCTACGCATTTACCGCTACACCTGAAATTCTACCCCCCTCTACAGTACTCTAGTCTGCC	840
AGTTTCAAATGCTATTCCGAGGTTGAGCCCCGGGCTTTCACATCTGACTTAACAAACCAC	900
CTGCATGCGCTTTACGCCCAGTAATTCCGATTAAACGCTCGCACCCCTCCGTATTACCGCGG	960
CTGCTGGCACGAGTTAGCCCGTGCTTCTTCTGTCGCTAACGTCAAATGATGCAGCTATAA	1020
CTACACTACCGTCTTCACGACTGAAGTGCCTTTACACCCGAGCTTCTTCACAACACGCGCA	1080
TGCTGCATCAGCTTGCGCCATTGTGCAGTATCCCCACTGCTGCTCCGTAGATCTGACGAG	1140
TCTCAGGTCAGTTGCTGATCATCCTCCGAACAGCTAGATCGCGCTGGGTAACATTACCTC	1200
CACTGCAATCCACTAGCAAAGTACCGAGAGACGAAGTCCCCCTGTTGACCGAAG	1255

图 4 H-06091 菌株 16S rRNA 基因测序结果
Fig.4 Sequence of 16S rRNA gene of strain H-06091

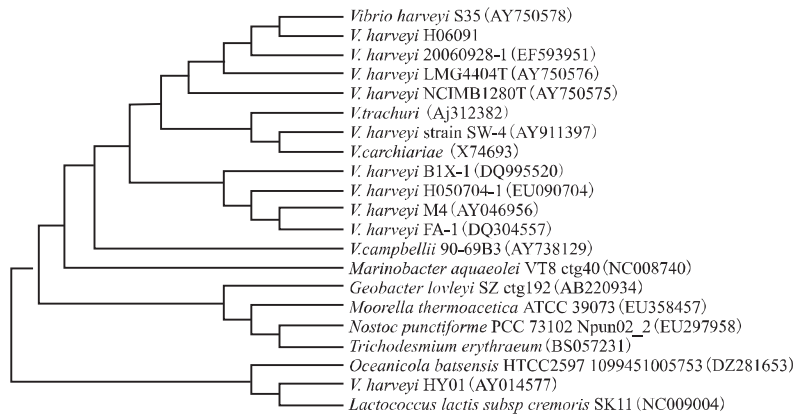


图5 H-06091 菌株 16S rRNA 序列的系统发育树
注：括号中数字代表该序列的 GenBank 登录号。

Fig.5 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence

Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank.

2.5 药敏实验结果

本次实验共进行了 14 种抗菌药物抑菌实验，H-06091 菌株对复方新诺明、呋喃妥因、链霉素、环丙沙星、利福平、红霉素、氟哌酸、氟喹酸、庆大霉素、阿米卡星、四环素、青霉素 G 等 12 种药物均敏感；对氨苄青霉素和氯霉素不敏感。抑菌情况见表 4。

3 讨论

通过创伤浸泡和注射两种途径的人工感染可知，经两种途径感染后的实验鱼均可出现明显的病症，创伤浸泡感染后症状与自然发病完全相同。浸泡感染 2 组虽未出现明显症状，但在实验过程中个别实验鱼

体表被同类咬伤，伤处经过菌液浸泡之后也出现相似的症状。浸泡对照 1、2 组未出现感染发病症状。但注射感染的体征是皮下组织液化、产生大量白色脓汁，腹腔脏器出现与浸泡创伤组相同的现象，但死亡个体肝脏液化严重，这一点与自然发病者不同。本研究发现，注射感染发病情况与注射菌的浓度有关， 2×10^8 cell/mL 菌浓度注射组死亡出现早，死亡率高达 100%；注射菌浓度降低 1 个数量级后，死亡时间推后，死亡率降低。从两种感染方式发病个体病灶处分离到与自然发病相同的细菌。因此可以确定菌株 H-06091 是红鳍东方鲀表皮溃烂病的病原体。

表 4 H-06091 药敏实验结果

Tab.4 Sensitivity of strain H-06091 to some antibiotic medicines

药物名称 Medicines	药物剂量 / (μg · 片 ⁻¹) Dose of drug	抑菌圈直径 / cm Sterilizing diameter
复方新诺明 Trimethoprim +Sulfamethoxazole	23.75/1.25	2.4
链霉素 Streptomycinum	10	1.6
氨苄青霉素 Carbenicillinum	100	—
呋喃妥因 Nitrofurantoinum	300	1.7
氟哌酸 Norfloxacin	10	1.3
氯霉素 Chloramphenicolum	30	—
红霉素 Erythromycinum	15	1.4
氟喹酸 Ofloxacin	5	1.3
青霉素 G Penicillin G	10	0.8
庆大霉素 Gentamycinum	10	1.2
环丙沙星 Ciprofloxacin	5	1.6
阿米卡星 Amikacin	30	1.0
四环素 Tetracyclinum	30	0.9
利福平 Rifampicin	5	1.6

注：“—”表示无抑菌圈出现。
Note: “—” means no antibacterium ring.

对试验菌株 H-06091 进行系统鉴定,所有特征均符合哈氏弧菌,经 16S rRNA 基因测序并比对, H-06091 菌株与哈氏弧菌同源性达 99%,系统发育树中与哈氏弧菌聚为一支,可以将该菌定为哈氏弧菌。

哈氏弧菌是多种养殖对虾的病原菌^[10-11],同时也可引起多种海水养殖鱼类溃疡病^[12-17]。范文辉等^[12]在研究中指出,肌肉注射哈氏弧菌可引起养殖大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 体表溃烂,表现症状与本研究报道的红鳍东方鲀病症很相似,但死亡率比后者高。同样陈献稿等^[13]、覃映雪等^[14]、王保坤等^[15]、毛芝娟等^[16]和童国忠等^[17]用哈氏弧菌通过肌肉注射或腹腔注射感染斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)、青石斑鱼 (*Epinephelus awoara*)、花鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 和大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 时,肌肉注射均表现为注射部位的组织液化溃烂,不同程度死亡;腹腔注射表现为不同程度的体表溃烂,死亡率极高。仅毛芝娟等^[16]和童国忠等^[17]进行了创伤浸泡感染,前者无死亡,后者有不同程度死亡。根据作者以往研究^[18]和本研究结果分析,对于各种鱼类而言,高浓度细菌经肌肉直接进入体内容易造成全身出血性症状,死亡迅速;较低浓度感染时可出现注射点的局部溃疡伴有全身出血,并且该类症状不具有病原特异性。本研究在创伤浸泡感染组所有实验鱼划伤部位均出现与自然发病完全相同的症状,内脏也出现不同程度的出血,但无死亡。原因可能是红鳍东方鲀体表组织较厚,皮肤及黏液抵抗力较强,当表层被刮伤后,细菌黏附并水解表皮下层及皮下组织,造成局部溃疡,然后再向组织深部逐渐扩散,只有病程发展到极晚期,病原菌扩散导致内脏受损严重时才发生死亡。在肌肉注射感染组,肌肉注射部位出现严重的组织液化,内脏出血严重,甚至肝脏发生液化,出现死亡。但其体表完整,无自然发病的典型表皮溃疡病灶,说明病原菌对深部组织的分解能力更强,在体内具有很强的扩散能力,比经体表侵入迅速。红鳍东方鲀是肉食性鱼类,在自然状态下,有相互咬噬的特性,容易造成体表的创伤,因此当环境中病原微生物大量存在时,可通过伤口造成局部感染。由于该鱼类表皮比较坚韧厚实,病程迁延时间较长,如果在感染早期注意控制环境,进行体表净化,合理使用药物完全能够控制该病的扩散。有关哈氏弧菌对红鳍东方

鲀皮肤组织和肌肉组织的分解能力及该病的致病机理正在进一步研究中。

对 14 种常用抗菌药物的敏感性实验结果表明, H-06091 菌株对复方新诺明、呋喃妥因、链霉素、环丙沙星、利福平等 6 种药物高度敏感,对红霉素、氟哌酸、氟喹酸、庆大霉素、阿米卡星等 5 种药物中度敏感,对四环素、青霉素 G2 种药物低度敏感;而对氨苄青霉素和氯霉素等 2 种药物不敏感。实验选用抗菌素的种类较多,有一些为禁用药物,如红霉素、氯霉素、环丙沙星,目的为研究 H-06091 菌株的药物敏感性,其他为可用药物,供临床参考。目前在养殖过程中误用、滥用抗生素和消毒剂等,加剧了水体中微生态环境的失衡,导致耐药性菌株的出现。但是合理选择和使用有效的抗生素仍是目前和近期内控制疾病主要方法,不能一概否定。

哈氏弧菌是条件致病菌,广泛存在于水体中,当水质恶化、气候变化、鱼鳞脱落、皮肤损伤、营养不良、鱼体抗病性弱或发生寄生虫病时,极易感染哈氏弧菌。生产上应以预防为主,注意水质条件,加强营养提高鱼体抵抗力。根据红鳍东方鲀的生长特性,应采用合理的养殖密度,尽量减少体表的损伤。在病情发生的初期,尤其要注意患病个体的隔离措施,正确治疗患病个体,有效保护未发病个体。

参考文献:

- [1] 刘振勇,张国民,谢有佳,等. 红鳍东方鲀中华拟德氏吸虫病的组织病理学观察 [J]. 集美大学学报, 2006, 11 (1): 24-27.
- [2] 杜佳垠. 红鳍东方鲀链球菌病. [J]. 河北渔业, 2003, 127 (1): 30-31.
- [3] 杨鸾劫,陈辉,贺艳辉,等. 温室养殖暗纹东方鲀毛霉菌的鉴定、致病性和病理学的研究 [J]. 中国水产科学, 2006, 13 (2): 269-276.
- [4] 杨鸾劫,陈辉,方苹,等. 工厂化养殖暗纹东方鲀致病菌的分离和鉴定 [J]. 湛江海洋大学学报, 2005, 25 (4): 18-21.
- [5] 李槿年,魏梅芳,于道平,等. 暗纹东方鲀“脱粘病”病原菌的分离鉴定 [J]. 水利渔业, 2001, 21 (5): 42-43.
- [6] 周凯,郑国兴. 暗纹东方鲀的一种病毒性疾病 [J]. 水利渔业, 2005, 25 (5): 96-97.

- [7] 徐怀恕,杨学宋,李筠,等. 对虾苗期细菌病害的诊断与控制[M]. 北京: 海洋出版社,1999: 166-190.
- [8] 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: 353-398.
- [9] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社,1986.
- [10] 刘问,钱冬,杨国梁,等. 南美白对虾虾苗淡化期间发光病原研究[J]. 集美大学学报,2004,9(4): 300-304.
- [11] 周宸,陈月忠. 对虾发光病原菌的致病性及病理学观察[J]. 福建水产,2001(3): 52-57.
- [12] 范文辉,黄健,王秀华,等. 养殖大菱鲆溃疡症病原菌的分离鉴定及系统发育分析[J]. 微生物学报,2005,45(5): 665-670.
- [13] 陈献稿,吴淑勤,石存斌,等. 斜带石斑鱼病原菌(哈维氏弧菌)的分离与鉴定[J]. 中国水产科学,2004,11(4): 313-317.
- [14] 覃映雪,池信才,苏永全,等. 网箱养殖青石斑鱼的溃疡病病原[J]. 水产学报,2004,28(3): 297-302.
- [15] 王保坤,余俊红,李筠,等. 花鲈弧菌病原菌(哈维氏弧菌)的分离与鉴定[J]. 中国水产科学,2002,9(1): 52-55.
- [16] 毛芝娟,刘国勇,陈昌福,等. 大黄鱼溃疡病致病菌的初步分离与鉴定[J]. 安徽农业大学学报,2002,29(2): 178-181.
- [17] 童国忠,石亚素,薛超波,等. 舟山海水网箱养殖大黄鱼烂尾病病原菌及药敏分析[J]. 浙江海洋学院学报,2005,24(2): 118-121.
- [18] 王斌,孙岑,范薇,等. 养殖大菱鲆出血性败血症病原菌致病性研究及鉴定[J]. 大连水产学院学报,2006,21(2): 100-104.

Isolation and identification of bacteriosis pathogen from cultured *Fugu obscurus* with canker of skin

WANG Bin, YU Lan-ping, HU Liang, LI Yan, LIU Shuang-feng, JIANG Zhi-qiang

(Key Laboratory of Mariculture and Biotechnology of Ministry of Agriculture, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China)

Abstract: A bacterium strain with superior growth was isolated from cultured *Fugu obscurus* with canker of skin and numbered as H-06091. *Fugu obscurus* were challenged with strain H-06091 by two methods which were intramuscular injection and wounding and bacterium-marinating. The results confirmed that H-06091 could infect *Fugu obscurus* by the two pathways above. The infection rate was 100% by both pathways. The wounding and bacterium-marinating arose the same symptom as primary affection, but did not induce death to the fish. Intramuscular injection could conduce death. The mortality rate of 4×10^7 cell/mL bacterium intramuscular injection group was 50% and the mortality rate of 2×10^8 cell/mL injection group was 100%. The experiments of antibiotic sensitivity indicated that H-06091 was sensitive to Trimethoprim+Sulfamethoxazole, Nitrofurantoin, Streptomycin, Ciprofloxacin, Rifampicin, Erythromycin, Norfloxacin, Ofloxacin, Gentamicin, Amikacin, Tetracycline and Penicillin G. This bacterium revealed gram negative, oxidase positive, catalase positive, V-P test negative, nitrate reduction positive characteristics. According to the description of *The Identification Handbook On the System Of Common Bacterium*, the physiology and biochemistry characteristics indicated that H-06091 could be identified as *Vibrio harveyi*. The sequence of 16S rRNA gene of H-06091 strain was identical to *Vibrio harveyi* and the homogeneity is 99%. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(2): 352-358]

Key word: *Fugu obscurus*; *Vibrio harveyi*; bacterium identification

Corresponding author: WANG Bin. E-mail: wangbin@dlfu.edu.cn