

豹纹鳃棘鲈致病性哈维氏弧菌的 分离鉴定与系统发育分析

徐晓丽 邵蓬 李灏 任涵玮 张勤

天津市水产技术推广站, 天津 300221

摘要 为探明养殖豹纹鳃棘鲈体表溃疡症的病因,从患病豹纹鳃棘鲈血液及内脏、体表溃疡处分离到2株优势菌,其中编号为1031的菌株经人工感染证实能够引起被感染鱼的死亡,为引起该豹纹鳃棘鲈溃疡病的病原菌。采用形态学、生理生化特性鉴定,结果表明菌株1031与弧菌属的基本特征相符,分别基于16S rDNA序列及热激蛋白60基因(*hsp60*)序列构建的系统发育树将菌株1031与哈维氏弧菌聚为一支,置信度均为97%,以1031为模板特异性扩增哈维氏弧菌*toxR*基因,也得到了预期382 bp的核酸片段。综合以上结果,最终确定此次豹纹鳃棘鲈体表溃疡症的病原为哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)。药敏结果显示,该菌株仅对氟苯尼考、庆大霉素(120 μ g)、菌必治敏感,对诺氟沙星、恩诺沙星、阿奇霉素、强力霉素等均不敏感。

关键词 哈维氏弧菌; 豹纹鳃棘鲈; 16S rDNA; *hsp60*; *toxR*

中图分类号 S 941.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)04-0112-07

豹纹鳃棘鲈(*Plectropomus leopardus*)又名花斑刺鳃鲈、七星斑、东星斑等,属鲈形目、鲈科、石斑鱼亚科、鳃棘鲈属,主要分布于印度洋、太平洋的热带海域,在海南东岸和南部海域也有少量分布。该鱼肉质鲜美,营养丰富,含有20余种人体所需微量元素及维生素,具很高的营养价值,且价格昂贵,市场空间广阔。豹纹鳃棘鲈主要栖息于珊瑚礁区,过去多依赖于从国外进口海洋捕捞的商品鱼,2009年海南水产研究所及中国水产科学院南海水产研究所先后成功繁育出豹纹鳃棘鲈鱼苗,成为我国海水养殖新品种。目前,该鱼主要在台湾、香港、海南、广东、福建及山东沿海地区养殖,2012年豹纹鳃棘鲈在天津试养成功,正逐渐成为天津工厂化海水养殖的又一优良鱼种。

豹纹鳃棘鲈的人工育苗虽已成功,但还未能满足大规模养殖的需要。目前,对豹纹鳃棘鲈的研究多集中于苗种人工繁育技术的完善、生殖调控技术及生态因子如温度、盐度、光照等对其孵化、仔鱼成活和生长的影响^[1-2]。本研究针对天津市某工厂化养殖园区豹纹鳃棘鲈出现腹水、体表皮肤溃疡进而大批量死亡的具体情况,取患病鱼体进行病原分离、

鉴定,筛选病原的敏感药物,以揭示诱发该病的病原,并为该病的有效防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验鱼来源

患病豹纹鳃棘鲈取自天津盛亿水产养殖有限公司,病鱼体长10~15 cm,体质量20~30 g,养殖水温20℃。感染试验用健康豹纹鳃棘鲈购自天津海发海珍品股份有限公司,体长(13±3) cm,体质量(29±3) g,于60 L水族箱中暂养1周后用于试验。饲养期间充气泵增氧,日投饵2次,每日吸污,换水1/2,保持水温20℃,盐度1.5‰。

1.2 病鱼检查及细菌分离培养

取濒死病鱼与正常鱼同时对其体表及内部解剖病理进行观察比较,确定该病的典型症状。取症状明显的患病豹纹鳃棘鲈鳃、体表粘液及患病组织在显微镜下排查寄生虫和真菌。抽取病鱼血液制作血涂片染色观察,同时,在无菌条件下从病鱼的血液、腹水、脾、肾、体表上分离细菌,划线接种于TCBS平板、2216E平板及血平板上,于28℃恒温培养24 h,挑取形态一致的优势菌落再次划线分离,纯化获得

收稿日期: 2013-09-03

基金项目: 天津市科技支撑计划项目(12ZCZDNC00900)

徐晓丽,工程师。研究方向: 水产动物病害与免疫学。E-mail: xiaolixu1983@gmail.com

通信作者: 张勤,研究员。研究方向: 水产养殖技术。E-mail: sczhangqin@eyou.com

纯培养的菌株,转接到 TSB 培养基中培养过夜,加 20% 甘油冻存于 -80°C 保存备用。

1.3 人工感染试验

将分离纯化的 2 株优势菌接种于新鲜的 TSB 培养基, 28°C 培养 20 h, 用无菌 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)调整菌悬液浓度分别为 9×10^8 、 9×10^7 、 9×10^6 、 9×10^5 、 9×10^4 cfu/mL, 用于感染试验。

感染试验采用腹腔注射的方式进行, 取健康豹纹鳃棘鲈 60 尾, 分 2 个试验组, 进行上述 2 株菌的感染试验。每一试验组分 6 个单元, 各 5 尾鱼, 其中 5 个单元的试验鱼用于腹腔注射不同浓度的菌悬液, 注射剂量为每尾 $100\text{ }\mu\text{L}$, 另 1 个单元的试验鱼注射同等剂量无菌 PBS 作为对照。

注射后连续观察 14 d, 期间每天正常饲养并换水, 记录豹纹鳃棘鲈的发病症状和死亡情况, 按照改良的寇氏法计算半数致死量, 并从人工感染的濒死鱼中, 取症状典型的鱼再次进行细菌分离、纯化及鉴定。

1.4 病原菌的鉴定

1) 形态、菌落特征及生理生化鉴定。培养菌接种于 TCBS 和 2216E 平板上, 观察其形态和菌落特征, 并制备菌悬液滴片后进行革兰氏染色镜检; 生化特性参照文献[3-4]所列的相应属、种鉴定的各项生理生化指标, 用生化鉴定管(购自杭州天和微生物有限公司)测定菌株的胞外蛋白酶活性、硝酸盐还原酶活性、水解酶活性、单一碳源生长等生理生化特性, 并参照《伯杰氏细菌学鉴定手册》进行分类。

2) 16S rDNA 基因序列的 PCR 扩增和序列测定。挑取纯化后的菌株单菌落于 DEPC 水中, 煮沸后瞬时离心取上清作为 PCR 反应的模板。采用通用引物 B27F: $5'-\text{AGAGTTTGATCATGGCTCAG}-3'$ 和 1492R: $5'-\text{CTACGGTTACCTTGTTACGAC}-3'$ 扩增分离菌株 1031 的 16S rDNA 序列。反应体系为 $50\text{ }\mu\text{L}$, 反应条件为 94°C 预变性 4 min; 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 80 s, 35 个循环; 72°C 延伸 10 min。PCR 产物回收后, pMD-19T 载体连接后转化至感受态细胞 DH-5 α , 挑取阳性克隆送至天津华大基因科技有限公司进行测序。

3) 热激蛋白 *hsp60* 基因序列的 PCR 扩增和序

列测定。*hsp60* 基因序列的扩增参照李宁求等^[5]的方法进行, PCR 产物回收后直接送至天津华大基因科技有限公司进行测序。

4) 分离菌株的 PCR 鉴定。分离菌株的 PCR 鉴定采用特异性引物扩增哈维氏弧菌 *toxR* 基因^[6], 扩增结束后取 $5\text{ }\mu\text{L}$ PCR 产物进行琼脂糖电泳, 观察结果。

5) 16S rDNA 和 *hsp60* 基因序列分析与系统发育树的构建。将测序所得分离菌的 16S rDNA 和 *hsp60* 基因序列提交至数据库中进行 Blast 分析, 从中选取与所得菌株同源性较高的菌株的基因序列, 采用 Clustal X 软件比对后, 分别以 16S rDNA 和 *hsp60* 为遗传标记, 用系统发育分析软件 Mega 5.1 基于邻接法(Neighbor-joining, NJ 法)构建系统发育树, Bootstraps 重复检验 1 000 次。

1.5 药物敏感性试验

药敏试验采用药敏纸片法, 以无菌棉签蘸取 1.5×10^8 cfu/mL 菌液均匀涂布于平板, 将药敏纸片(购自杭州天和微生物试剂有限公司)均匀贴在平板上, 培养 24 h 后观察, 记录各药敏纸片的抑菌圈直径, 并按照药敏纸片抑菌范围解释标准判断试验结果。

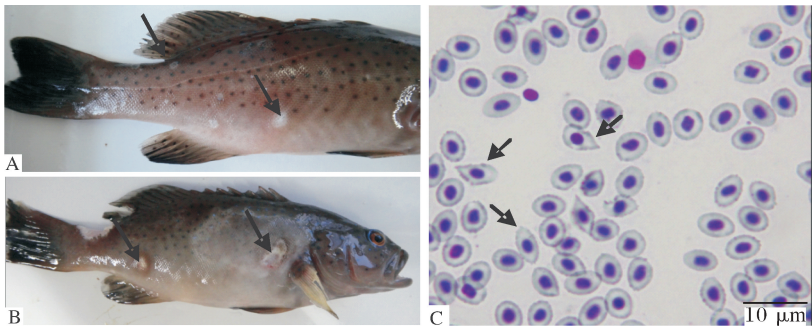
2 结果与分析

2.1 病鱼临床症状

患病豹纹鳃棘鲈不食, 游泳无力, 反应迟缓, 体表多处掉鳞形成大小不一的白点, 围绕鳞片缺损处体表发生溃烂, 鳍条溃烂缺损, 尾鳍症状尤其明显。有的病鱼腹部膨大, 解剖腹腔内有积水, 脾脏坏死硬化, 肝脏微黄色。血液涂片染色发现病鱼血液中白细胞增多, 有的红细胞形态改变, 出现尖头, 多数红细胞细胞膜上有细小缺损, 严重者似锯齿状(图 1)。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 病原菌的分离及其形态特征

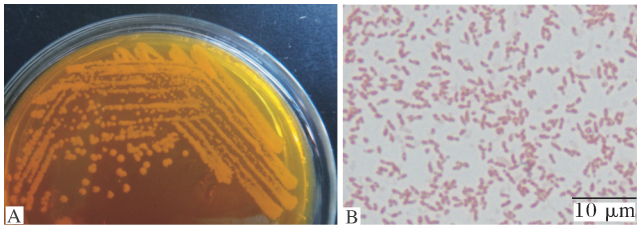
从患病豹纹鳃棘鲈血液、体表分离到优势菌 2 株, 经后续的人工感染试验证实菌株 1031 为引起该病的病原菌。菌株 1031 在 2216E 上形成圆形、边缘光滑整齐的白色菌落, 在 TCBS 培养基上形成边缘光滑整齐黄色菌落(图 2), 革兰氏染色呈阴性杆状, 菌体长约 $0.5\sim 2.0\text{ }\mu\text{m}$, 无荚膜或芽胞。



A:病鱼体表出现白点 White spot on the body surface of diseased fish; B:病鱼体表溃烂 Ulceration on the body surface of diseased fish; C:显微镜下病鱼血细胞形态改变 Deformability of hemocytes.

图 1 病鱼症状

Fig. 1 Symptoms of the diseased fish



A:菌株 1031 在 TCBS 培养基上形成边缘光滑整齐黄色菌落 On TCBS medium of 1031,bright yellow colonies; B:菌株 1031 的菌体形态 The cell morphous of 1031.

图 2 菌株 1031 的菌落和菌体形态

Fig. 2 Colony and cell morphology of the strain 1031

2.3 人工感染试验结果

以分离到的菌株 1031 感染豹纹鳃棘鲈,在感染 4 d 后鱼开始出现死亡,感染后的试验鱼不食,活力减弱,感染 7 d 后试验鱼皮肤开始有白点,溃烂、出血,有的有腹水,抽取濒死病鱼的血液涂片染色,血细胞严重变形,12 d 后注射浓度为 9×10^8 cfu/mL 的试验鱼全部死亡,而对照组及另一试验组不表现出任何症状,无一死亡(表 1)。从感染发病的鱼体

血液及体表溃烂处分离细菌,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菌株 1031 相同,再次感染豹纹鳃棘鲈,也导致其死亡,表明所分离菌株 1031 对豹纹鳃棘鲈具有致病性。根据试验鱼的死亡结果,按改进寇氏法^[7]计算菌株 1031 对豹纹鳃棘鲈(29 g)的半数致死量为 7.15×10^5 cfu/尾。根据 Santos 等^[8]对鱼类致病病毒力的划分标准,可判定菌株 1031 具有较强的毒力。

表 1 菌株 1031 人工感染试验结果

Table 1 Results of artificial infection of strain 1031

分组 Group	试验鱼尾数 Test No.	菌液浓度/(cfu/mL) Bacterial concentration	注射剂量/mL Dose	死亡鱼尾数 Death No.	死亡率/% Mortality
1031	5	9×10^8	0.1	5	100
	5	9×10^7	0.1	4	80
	5	9×10^6	0.1	4	80
	5	9×10^5	0.1	3	60
	5	9×10^4	0.1	2	40
对照组 Control	5	无菌 PBS	0.1	0	0

2.4 生理生化特征

常规生理生化指标鉴定结果显示,菌株 1031 不溶血,氧化酶、接触酶均阳性;不水解七叶灵、精氨酸、淀粉;VP 试验阴性,赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶、脲酶阳性, β -半乳糖苷酶阴性,对 O/129 (150

μg)敏感,发酵葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、甘露糖、甘露醇、纤维二糖等,不发酵阿拉伯糖、山梨糖、蜜二糖、乳糖等,无盐胨水中不生长(表 2)。根据生化特性,初步判定菌株 1031 为哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)。

表 2 菌株 1031 和哈维氏弧菌的生理生化特征的比较¹⁾

Table 2 Comparison of physiological and chemical characteristics of strain 1031 and *V. harveyi*

鉴定项目 Items	1031	哈维氏弧菌 ^[4,9] <i>V. harveyi</i>	鉴定项目 Items	1031	哈维氏弧菌 ^[4,9] <i>V. harveyi</i>
运动性 Motility	+	+	鸟氨酸脱羧酶	+	v
氧化酶反应 Oxidase	+	+	Ornithine decarboxylase		
过氧化氢酶 Catalase	+	+	精氨酸双水解酶	—	—
甲基红 Methyl red test	+	+	Arginine dihydrolase		
氧化发酵实验 O/F Test	F	F	产酸 Acid from:		
V. P. 反应 Voges-Proskauer	—	—	蔗糖 Sucrose	+	v
柠檬酸盐 Citrate	+	v	葡萄糖 Glucose	+	d
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	麦芽糖 Maltose	+	+
七叶灵 Esculin	—	ND	甘露糖 Mannose	+	v
明胶酶 Gelatinase	—	+	甘露醇 Mannitol	+	+
吲哚产生 Indole production	+	+	阿拉伯糖 Arabinose	—	—
脲酶 Urease	+	v	半乳糖 Galactose	+	d
O/129(150 μg)敏感	+	+	纤维二糖 Cellobise	+	+
O/129(150 μg) Sensitivity			核糖 D-Ribose	+	+
淀粉酶 Amylase	—	ND	乳糖 Lactose	—	—
无盐脉水生长	—	—			
Grow at 0 % NaCl			肌醇 Inositol	—	ND
3%氯化钠生长	+	+			
Grow at 3 % NaCl			蜜二糖 Melibiose	—	—
6%氯化钠生长	+	+			
Grow at 6 % NaCl			山梨糖 Sorbose	—	—
7%氯化钠生长	—	+			
Grow at 7 % NaCl			果糖 Fructose	+	ND
β-半乳糖苷酶	—	—			
β-Galactosidase			水杨素 Salicin	+	v
赖氨酸脱羧酶	+	+			
Lysine decarboxylase					

1) +: 阳性反应 Positive; —: 阴性反应 Negative; F: 发酵型 Fermentation; d: 11%~89% 菌株为阳性 11%~89% of the strains are positive; ND, 没有可提供的数据 No data; v: 菌株间不稳定的反应 Variable for 26%~74% of the test.

2.5 16S rDNA 和 hsp60 基因序列分析及系统发育树构建

rDNA、hsp60 基因序列分析及 toxR 基因扩增结果, 判定菌株 1031 为哈维氏弧菌。

对菌株 1031 进行了 16S rDNA 和 hsp60 基因序列的测定及 toxR 基因的特异性扩增,PCR 扩增产物电泳结果如图 3 所示。菌株 1031 的 16S rDNA 基因序列经通用引物扩增后得到长度为 1 500 bp 的核酸序列,Blast 同源性检索发现其与哈维氏弧菌(*V. harveyi* ATCC 14126T)同源性较高,相似性为 99.8%,从中选取亲缘关系相近序列进行系统发育学分析,结果表明菌株 1031 与哈维氏弧菌聚为一支(图 4),置信度为 97%;将菌株 1031 的 hsp60 基因序列(约为 530 bp)翻译成氨基酸序列提交至 NCBI 数据库进行 Blast 分析,发现该序列与哈维氏弧菌仅有 1 个碱基的差异,基于 hsp60 基因构建的系统发育树(图 5)显示,菌株 1031 与哈维氏弧菌聚为一支,置信度为 97%;采用特异性引物扩增菌株 1031 的 toxR 基因,得到了预期的 382 bp 的核酸片段(图 3)。综合菌株 1031 的形态、生化特征和 16S

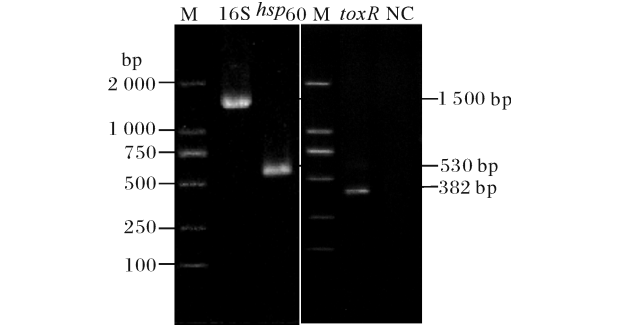


图 3 菌株 1031 16S rDNA、hsp60 及 toxR 基因 PCR 产物琼脂糖电泳图

Fig. 3 Agarose electrophoresis of 16S rDNA, hsp60 and toxR PCR products

2.6 药敏试验结果

在所试验的 23 种抗生素中,菌株 1031 对氟苯尼考、庆大霉素(120 μg)、菌必治 3 种抗生素敏感,

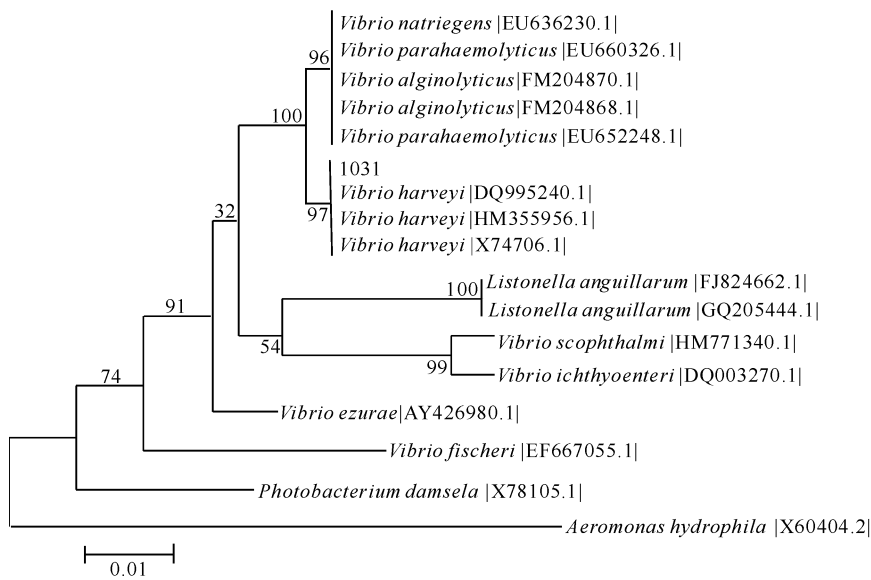


图 4 以 16S rDNA 基因构建的哈维氏弧菌系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of *V. harveyi* based on 16S rDNA genes

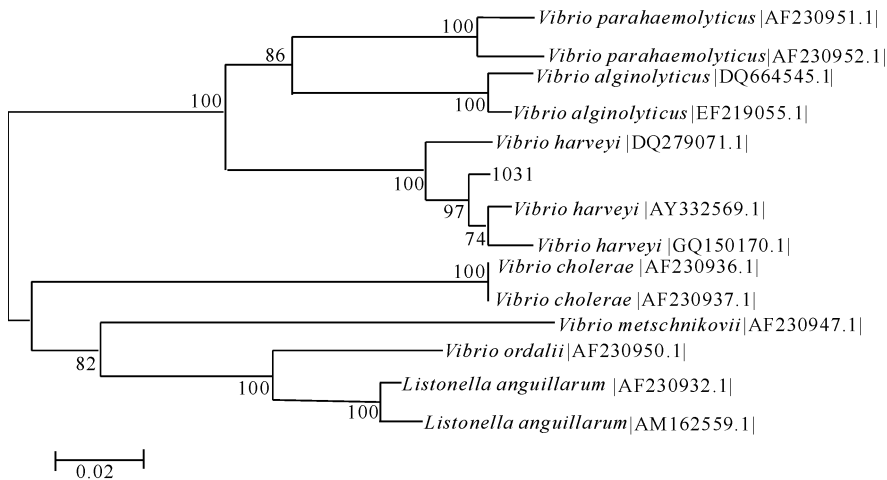


图 5 以 *hsp60* 基因构建的哈维氏弧菌系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of *V. harveyi* based on *hsp60* genes

表 3 菌株 1031 对抗菌药物的敏感性¹⁾

Table 3 Sensitivity of strain 1031 to antimicrobial agent

抗菌药物 Drug	每片剂量/ μg Dosage	敏感性 Sensitivity	抗菌药物 Drug	每片剂量/ μg Dosage	敏感性 Sensitivity
罗红霉素 Roxithromycin	15	R	链霉素 Streptomycin	300	R
强力霉素 Doxycycline	30	R	左氟沙星 Levofloxacin	5	R
恩诺沙星 Enrofloxacin	5	R	阿奇霉素 Azithromycin	15	R
磺胺异恶唑 Sulfafurazole	300	R	诺氟沙星 Norfloxacin	10	R
利福平 Rifampicine	5	R	四环素 Tetracycline	30	R
呋喃唑酮 Furazolidone	100	R	庆大霉素 Gentamicinum	120	S
氟苯尼考 Florfenicol	75	S	痢特灵 Furazolidone	300	R
杆菌肽 Bacitracin	0.04 U	R	丁胺卡那霉素 Amikacin	30	R
先锋Ⅳ Cefalexin Ⅳ	30	I	菌必治 Rocephin	30	S
O/129	150	S	复方新诺明 SMZ+TMP	75	R
万古霉素 Vancomycin	30	R	哌拉西林 Piperacillin	100	R

1) S 表示敏感 Sensitive; R 表示抗性 Resistant; I 表示中度敏感 Intermediate.

对先锋 IV 中度敏感,对四环素、诺氟沙星、恩诺沙星、磺胺异噁唑,甚至一些广谱抗生素如阿奇霉素、强力霉素等均不敏感(表3)。

3 讨论

哈维氏弧菌是海水养殖鱼类比较常见的致病菌之一,由其引起的病害时有发生,流行于多个国家和地区,给水产养殖业造成了极大的损失。现已发现哈维氏弧菌能够感染大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)、半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)、花鲈(*Lateolabrax japonicus*)等^[10-14]多个海水养殖品种,引起被感染鱼类体表肌肉不同程度的充血溃烂、脾肾肿大或胃肠炎。但从患病豹纹鳃棘鲈血液及内脏中分离到病原菌,经生化鉴定和分子生物学鉴定判定其为哈维氏弧菌,并经感染试验证实,所分离到的菌株具有致病性,且属强毒株。本研究丰富了哈维氏弧菌的研究资料,也为豹纹鳃棘鲈疾病的防治提供参考。

16S rDNA 序列分析是目前细菌鉴定和系统发育分子遗传分析最常用的方法,但一般认为,16S rDNA 基因的水平转移及同一基因在不同进化分支中进化速度不同,比较适合属以上分类阶元的亲缘关系研究,而对属以下的分类单位,分辨率不足^[14]。*hsp60* 基因在系统进化中相对保守,且同时在不同种间具有足够的多态性,已广泛应用到细菌的分类鉴定领域^[15]。本研究中菌株 1031 基于 16S rDNA 序列和 *hsp60* 基因序列的系统发育分析结果一致,均将 1031 与哈维氏弧菌聚为一支,置信度均为 97%。还有一些学者基于哈维氏弧菌的 *toxR* 基因序列和 *vhh* 溶血素基因序列,发展了快速检测哈维氏弧菌的 PCR 方法^[16-18]。本研究中采用 Pang 等^[6]建立的基于 *toxR* 基因的 PCR 快速检测技术,得到预期大小的目的片段,进一步证实菌株 1031 为哈维氏弧菌。

相对于鳃弧菌或溶藻弧菌,各国学者对哈维氏弧菌致病性的认识较晚,对哈维氏弧菌病的防治报道较少,多以抗生素辅助免疫增强剂、改善养殖环境降低应激以及应用疫苗^[19]等措施来应对该病。生产中实际应用的主流方法还是使用抗生素,但长期使用某种抗生素会使病原菌产生对该抗生素的抗性,不同时期、不同地理株的哈维氏弧菌药物敏感性

不尽相同,因此,准确的对症施治还需要建立在分离菌株的药敏试验结果的基础上。本研究所分离菌株仅对氟苯尼考、庆大霉素(120 μg)、菌必治敏感,对水产常用的抗生素恩诺沙星、诺氟沙星等并不敏感,甚至对一些广谱抗生素如阿奇霉素、强力霉素均不敏感。然而调查中发现,该鱼养殖过程中并未使用过此类抗生素,可能因为抗生素大量使用污染水体环境,从而导致该现象的发生。这种抗生素抗性的不同也在一定程度上反映了在我国抗生素仍是水产养殖病害的主要防治措施。因此,开发应用疫苗、通过有益菌改善养殖环境、使用免疫增强剂等对环境友好的疾病控制方式,尤为重要,势在必行。

参考文献

- [1] YOSEDA K, YAMAMOTO K, KIMIO A. Influence of light intensity on feeding, growth, and early survival of leopard coral grouper (*Plectropomus leopardus*) larvae under mass-scale rearing conditions[J]. *Aquaculture*, 2008, 279: 55-62.
- [2] FRISCH A, ANDERSON T. Physiological stress responses of two species of coral trout (*Plectropomus leopardus* and *Plectropomus maculatus*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2005, 140(3): 317-327.
- [3] 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.
- [4] HOLT J G, KRIEG N R, SNEATH P H A, et al. *Bergey's manual of determinative bacteriology* ninth edition [M]. Maryland: Williams & Wilkins, 1994.
- [5] 李宁求, 白俊杰, 吴淑勤. 斜带石斑鱼 3 种致病性弧菌的分子生物学鉴定[J]. *水产学报*, 2005, 29(3): 356-361.
- [6] PANG L, ZHANG X H, ZHONG Y, et al. Identification of *Vibrio harveyi* using PCR amplification of the *toxR* gene [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2006, 43(3): 249-255.
- [7] 邹玉霞, 张培军, 莫照兰, 等. 大菱鲆出血症病原菌的分离和鉴定[J]. *高技术通讯*, 2004, 14(4): 89-93.
- [8] SANTOS Y, TORANZO A E, BARJA J L, et al. Virulence properties and enterotoxin production of *Aeromonas* strains isolated from fish[J]. *Infection and Immunity*, 1988, 56(12): 3285-3293.
- [9] ALSINA M, BLANCH A R. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species [J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1994, 76(1): 79-85.
- [10] 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.
- [11] 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(6): 313-317.
- [12] 宋靖芳, 黄文芳, 张剑英. 牙鲆出血病病原的初步研究[J]. *微生物*

物学杂志,2004,24(2):51-53.

[13] 范文辉,黄捷,王秀华,等. 养殖大菱鲈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.

[14] 陈政强,姚志贤,林茂,等. 半滑舌鲷皮肤溃疡病病原研究[J]. 水产学报,2012,36(5):764-771.

[15] KWOK A Y C, CHOW A W. Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial *hsp60* gene sequences [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(1): 87-92.

[16] 张晓华,钟英斌,陈吉祥. 哈维氏弧菌的生物学特性、流行病学及检测技术[J]. 中国海洋大学学报,2007,37(5):740-748.

[17] CONEJERO M J U, HEDREYDA C T. PCR detection of hemolysin (*vhh*) gene in *Vibrio harveyi* [J]. J Gen Appl Microbiol, 2004, 50(3): 137-142.

[18] CONEJERO M J U, HEDREYDA C T. Isolation of partial *toxR* gene of *vibrio Harveyi* and design of *toxR*-targeted PCR primers for species detection [J]. Journal of Applied Bacteriology, 2003, 95(3): 602-611.

[19] AUSTIN B, AUSTIN D A, FARHAT Z, et al. Diagnosis and control of bacterial fish pathogens with emphasis on *Vibrio harveyi* [J]. J Ocean University Qingdao, 1999, 29(3): 489-499.

Identification and phylogenetic analyses of *Vibrio harveyi* islated from *Plectropomus leopardus*

XU Xiao-li SHAO Peng LI Hao REN Han-wei ZHANG Qin
Tianjin Fishery Technical Extension Station, Tianjin 300221, China

Abstract The aim of this study was to isolate the pathogens of ulceration on the body surface in *Plectropomus leopardus*. Two strains were isolated from the skin, blood, kidney and spleen of mortal *P. leopardus*. One strain coded 1031 could cause the mortality of healthy *P. leopardus* independently in artificially infected experiment and were proved to be pathogen to ulceration of *P. leopardus*. Based on the results of morphological observation, physiological and biochemical characteristic analysis, strain 1031 was identified as *Vibrio*. 16S rDNA gene sequence further proved that strain 1031 belonged to *V. harveyi*. Phylogenetic analysis based on 16S rDNA gene and *hsp60* gene indicated that strain 1031 showed the highest level of similarity to *V. harveyi* with bootstraps of 97%. The expected 382 bp-nucleic acid fragment of *V. harveyi toxR* gene was amplified using stain 1031 as a template. These results indicated that the pathogen of ulceration on the body surface in *P. leopardus* was *V. harveyi*. The antibiotic sensitivity analysis showed that strain 1031 was susceptible to florfenicol, gentamicinum (120 μg) and rocephin, but high resistant to norfloxacin, enrofloxacin, azithromycin, doxycycline, etc.

Key words *Vibrio harveyi*; *Plectropomus leopardus*; 16S rDNA; *hsp60*; *toxR*

(责任编辑:边书京)