

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171221003

http://www.yykxjz.cn/

王凯, 王印庚, 姜勇, 张正, 于永翔, 廖梅杰. 一株感染深水网箱养殖许氏平鲷的病原菌分离与鉴定. 渔业科学进展, 2019, 40(1): 119-126

Wang K, Wang YG, Jiang Y, Zhang Z, Yu YX, Liao MJ. Isolation, identification, and biological characteristics of a pathogenic bacterial strain from cage-cultured black rockfish (*Sebastes schlegelii*). Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(1): 119-126

一株感染深水网箱养殖许氏平鲷的 病原菌分离与鉴定*

王 凯^{1,3} 王印庚^{1,2} 姜 勇⁴ 张 正^{1,2①} 于永翔^{1,2} 廖梅杰^{1,2}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋
渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 上海海洋大学水产与生命学院
上海 201306; 4. 青岛国家海洋科学研究中心 青岛 266071)

摘要 2016 年 7 月, 山东省长岛县深水网箱养殖许氏平鲷(*Sebastes schlegelii*)暴发严重皮肤溃疡症。作者对病鱼进行病原菌分离。通过形态学观察、常规生理生化试验、*gyrB* 和 16S rDNA 基因克隆测序等方法对分离菌株进行鉴定。在病灶溃疡处分离到一株绝对优势菌 BZ01, 该菌株在 TSB 固体培养基上呈半透明菌落, 在 TCBS 选择性培养基上菌落呈绿色。透射电镜观察为短棒状, 具有单根极生鞭毛。人工回接感染证明, 该菌株对许氏平鲷具有较强的致病力, 可以引起皮肤溃疡等症状, 且与自然感染症状一致, 其 LD₅₀ 为 2.07×10⁶ CFU/ml。通过 *gyrB* 和 16S rDNA 基因序列测定并构建系统发育树显示, 菌株 BZ01 与弧菌属同源性最高, 并在系统发育树中与轮虫弧菌(*Vibrio rotiferianus*)聚为一枝, 结合形态及生理生化表型测定结果, 将该菌株鉴定为轮虫弧菌(*V. rotiferianus*)。药敏试验结果显示, 该菌株对四环素类、喹诺酮类、香豆素类、肽酰转移酶类高度敏感, 而对大环内酯类、多肽类、磺胺类、β-内酰胺类、氨基糖苷类中度敏感或不敏感。

关键词 许氏平鲷; 皮肤溃疡; 轮虫弧菌; 耐药性

中图分类号 S947 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)01-0119-08

许氏平鲷 (*Sebastes schlegelii*) 属鲷形目 (Scorpaeniformes)、鲷科 (Scorpaenidae)、平鲷属 (*Sebastes*), 又称“黑鲷”、“黑石鲷”、“黑头”, 在我国主要分布于黄渤海区域。因其肉质鲜美, 生长速度快, 耐低温, 可在我国北方海域自然越冬, 成为北方海水网箱养殖的主要鱼类品种之一(常青等, 2009; 顾中华等, 2015)。山东省长岛县大钦岛周边是我国北方大型深水网箱养殖的最大集中地, 养殖的主要品种

就是许氏平鲷。经过 20 年余的发展, 随着该海区深水网箱养殖规模不断扩大, 疾病的发生也越来越频繁, 成为影响养殖成活率的关键因素。特别是近几年来, 该海区养殖的许氏平鲷疾病呈现了传染速度快、死亡率高突出特点, 已经严重影响了正常的养殖生产。

2016 年 7~9 月, 大钦岛周边海域深水网箱养殖的许氏平鲷再次发生大规模的疾病, 引发了较为严重的死亡现象。病鱼的主要临床症状表现为: 表皮出现

* 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(20603022017004)和长岛县科技计划项目共同资助[Special Scientific Research Funds for Central Non-profit Institutes, Yellow Sea Fisheries Research Institutes (20603022017004); Project for Science and Technology Development of Changdao County]. 王 凯, E-mail: wang2311577871@163.com

① 通讯作者: 张 正, 副研究员, E-mail: zhangzheng@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-12-21, 收修改稿日期: 2018-01-12

明显创伤性溃疡, 鳍条溃烂, 个别病鱼眼球突出、溃烂。本研究通过现场采集发病鱼样品, 对病鱼体表病灶和肠道、肝脏、肾脏等内脏器官进行了病原菌分离, 通过人工感染实验验证其致病性, 并对病原菌的形态特征、生化特性、分类地位及药物敏感性等进行了分析, 以期为防控该病提供借鉴和参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用病鱼取自山东省长岛县大钦岛周边深水网箱, 具有典型的皮肤溃疡等临床症状。人工感染用鱼购自威海某育苗场, 体重(37.1±5.0) g。

1.2 实验方法

1.2.1 病原菌分离纯化与形态观察 现场采集具有典型症状的病鱼带回实验室进行病原学检验。解剖前, 取病鱼的黏液、病灶、鳃等组织制成水浸片, 观察是否有明显寄生虫及霉菌。无菌解剖后取病灶、肠、肝、肾等组织用 2.5%戊二醛固定液处理, 透射电镜观察是否有病毒侵染。取病灶、肠、肝、肾等组织用 1.5%灭菌生理盐水人工匀浆, 适当稀释后分别涂布于 TSB 和 TCBS 琼脂培养基上, 28℃培养 24 h 后计数观察, 观察优势菌情况并进行分离、纯化培养, 纯化后的菌株用 20%甘油生理盐水保存于-80℃冰箱备用。

1.2.2 人工感染实验 将分离纯化的优势菌接种于 TSB 琼脂培养基上, 28℃培养 24 h, 用 1.5%灭菌生理盐水冲洗菌苔, 经分光光度法和平板计数法测定其菌悬液浓度为 5.2×10^9 CFU/ml。用生理盐水对该菌悬液进行梯度稀释后分别制成 5.2×10^8 、 5.2×10^7 、 5.2×10^6 、 5.2×10^5 CFU/ml 的菌悬液用于感染试验的注射菌液。取健康许氏平鲉 140 尾, 分为 7 组, 即 5 个实验组、1 个阴性对照组和 1 个空白对照组, 每组 20 尾。实验组从背部肌肉注射(王晓冉等, 2017) 0.1 ml 的菌液, 阴性对照组注射等量的 1.5%灭菌生理盐水, 空白对照组不做处理。饲养条件为 160 L 塑料桶, 水温控制在 17~19℃。注射后观察记录鱼的症状和发病死亡情况, 对病鱼及时进行病原菌分离和鉴定。

1.2.3 病原菌理化特性研究 将病原菌接种于 TSB 和 TCBS 琼脂培养基上, 观察菌落形态和大小。对细菌进行革兰氏染色观察, 同时, 用 2.5%戊二醛固定液处理, 透射电镜下观察细菌形态。在无菌条件下挑取单一纯菌落制备菌悬液, 用常规的生理生化试剂盒(青岛海博生物技术有限公司)对病原菌进行理化特性测定。

1.2.4 菌株 gyrB 和 16S rDNA 基因序列测定和系统发育树分析 挑取单菌落于 50 μ l 去离子水中反复吹打, 99℃金属浴 10 min, 12000 r/min 离心 1~2 min, 取上清液作 PCR 模板。gyrB 基因序列的 PCR 扩增引物为 UP-1 (正向引物): 5'-GAAGTC ATCATGACC-GTTCTGCA(C/T)GCAGGAGGCAA(A/G)TTCGA-3'和 UP-2r (反向引物): 5'-AGCAGGGTACGGATGTGC-GAGCCATCGAC (A/G)TCGGCGTCCGTCAT-3'。16S rDNA 基因序列的 PCR 扩增引物为 27F (正向引物): 5'-AGA GTT TGA TC(C/A) TGG CTC AG-3'和 1492R (反向引物): 5'-RGGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'。PCR 反应体系 50 μ l, 包括 2 μ l DNA 模板, 5 μ l 10 \times PCR Buffer, 4 μ l dNTP (2.5 mmol/L), 0.5 μ l TaqDNA 酶(5 U/ μ l), 正反向引物各 0.8 μ l (10 μ mol/L), 用灭菌双蒸水补足至 50 μ l。扩增条件为: 94℃预变性 5 min, 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min 20 s, 30 个循环, 72℃延伸 10 min, 4℃保存。扩增产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳纯化, 使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收产物。

取回收的产物用 pMD18-T 载体连接, 混匀后加入 Solution I, 16℃金属浴中连接 6 h 以上。将连接产物转化到感受态细胞 DH-5 α 中, 挑选有插入目的片段的阳性克隆送上海生工生物工程股份有限公司测序。将 gyrB 和 16S rDNA 基因序列通过 NCBI 的 Blast 检索系统进行序列同源性分析, 从中分别选取与所获的序列同源性较高的菌株的 gyrB 和 16S rDNA 基因序列, 用 Mega 6.0 采用邻接法(Neighbor-joining method)获得系统发育树, 并通过 Bootstrap 法(1000 次重复)检验。

1.2.5 药物敏感性实验

采用纸片扩散法对菌株进行药物敏感性测试。抗菌纸片采用杭州天和微生物试剂公司的药敏纸片试剂盒, 将抗菌纸片贴于涂满菌液的 MH 琼脂培养基上, 28℃培养 18~24 h 后, 参考陈建国等(2017)记录菌株对抗菌药物的敏感性。

2 结果

2.1 病鱼检查

患病许氏平鲉初期摄食下降, 贴于网箱壁缓慢游动, 中后期躯体表面出现创伤溃疡, 鳍条略有溃烂。解剖病鱼发现肠壁透明, 有少量积水, 肝脏质地松散, 颜色较浅。黏液、病灶和鳃等器官组织水浸片检查未见寄生虫和真菌, 光学显微镜下观察无寄生虫和真菌; 透射电镜观察病灶、肠、肝、肾等组织无病毒粒子出现(图 1)。



图 1 患病许氏平鲈体表溃疡
Fig.1 The diseased *S. schlegelii* with skin ulcer

2.2 病原菌的形态观察

从病鱼病灶中分离出一株具有绝对优势的菌株, 命名为 BZ01。对 BZ01 进行分离纯化培养, 在 TSB 琼脂平板培养 18~24 h 后菌落呈半透明圆形, 表面光滑, 中央略隆起, 直径多在 2 mm 左右(图 2A), 同时菌落有明显臭味。在 TCBS 上该菌也可生长, 菌落圆形光滑、边缘整齐、隆起、呈绿色(图 2B)。革兰氏染色呈阴性, 短棒状(图 2C)。透射电镜观察, 菌株呈短杆状、两端钝圆, 具单根极生鞭毛, 菌体大小约为 $1.8 \mu\text{m} \times 0.8 \mu\text{m}$ (图 2D)。

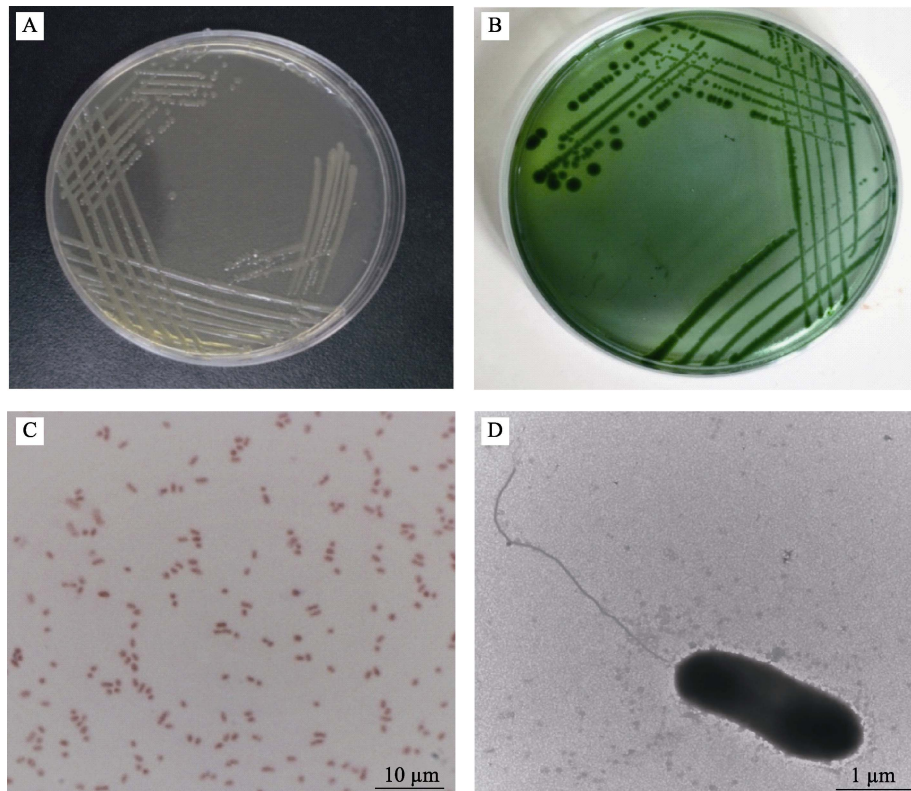


图 2 菌株的形态特征
Fig.2 Morphological characteristics of the strain

A: 菌株在 TSB 平板上的菌落形态; B: 菌株在 TCBS 平板上的菌落形态;

C: 革兰氏染色菌株形态; D: 透射电镜下菌落形态

A: Colonial morphology on TSB plate; B: Colonial morphology on TCBS; C: Strain was Gram-negative under light microscope; D: Strain morphology under transmission electron microscope (TEM)

2.3 致病性验证

感染试验共进行 12 d, 以注射结束后 24 h 计为 1 d, 以此类推。如图 3 所示, 5.2×10^9 、 5.2×10^8 、 5.2×10^7 、 5.2×10^6 CFU/ml 实验组的许氏平鲈均在注射菌液 2 d 后出现死亡。其中, 5.2×10^9 CFU/ml 组在第 3 天全部死亡, 5.2×10^8 CFU/ml 组在第 5 天全部死亡, 5.2×10^7 CFU/ml 组在第 7 天全部死亡。低浓度组

(5.2×10^5 CFU/ml 组) 在第 5 天开始出现死亡, 实验结束时累计死亡率为 65%。阴性对照组和空白对照组均无死亡。人工感染后实验鱼摄食量减少, 贴于桶壁缓慢游动、活力下降, 注射处出现红肿, 皮肤出现点状溃疡、出血, 后期溃疡创面逐渐扩大, 部分病鱼会出现腹水和白便现象, 与自然感染下症状一致, 而阴性对照组和空白对照组未出现任何异状。参考李长红等

(2009)的改良寇氏法,计算出菌株 BZ01 对许氏平鲉 12 d 的 LD₅₀ 为 2.07×10⁶ CFU/ml。

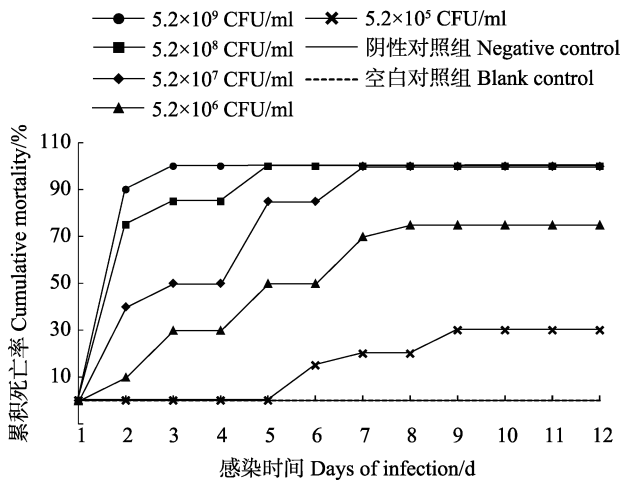


图3 菌株 BZ01 人工感染实验结果
Fig.3 The artificial infection results of the strain BZ01

2.4 病原菌理化特性和药物敏感性测定

菌株 BZ01 的理化特性结果见表 1。可利用葡萄糖、甘露醇和阿拉伯糖,不利用蔗糖和乳糖,氧化酶阳性,鸟氨酸水解酶和赖氨酸水解酶阳性,精氨酸双水解酶阴性,其理化特性与轮虫弧菌标准菌株 LMG21460^T 仅在密二糖和西蒙氏枸橼酸盐 2 个指标上有差异。

2.5 病原菌 gyrB 和 16S rDNA 基因序列测定和系统发育树分析

由引物 UP-1 和 UP-2r 扩增菌株 BZ01 的 gyrB 基因序列,获得有效基因序列长度为 1141 bp,通过 Blast 检索发现其与弧菌属同源性较高。其中,与轮虫弧菌 (*Vibrio rotiferianus*)同源性达 99%。从 NCBI 数据库中调取相似度最高的 10 个菌株的 gyrB 基因序列构建系统发育树,结果如图 4 所示,菌株 BZ01 与轮虫弧菌聚合,置信度为 100%。

表 1 菌株 BZ01 的生理生化特征
Tab.1 The biochemical reaction of the strain BZ01

项目 Items	BZ01	T	项目 Items	BZ01	T
0% NaCl	-	-	蜜二糖 Melibiose	-	+
1% NaCl	+	+	3% NaCl ONPG	-	ND
3% NaCl	+	ND	木糖 Xylose	-	ND
6% NaCl	-	-	鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	+	+
3%NaCl 葡萄糖 3%NaCl Glucose	+	+	赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	+	+
3%NaCl 蔗糖 3%NaCl Sucrose	-	-	精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	-	-
3%NaCl 阿拉伯糖 3%NaCl Arabionse	+	+	明胶 Gelatine	+	+
3%NaCl 乳糖 3%NaCl Lactose	-	-	西蒙氏枸橼酸盐 Simmons Citrate	+	-
山梨醇 Sorbitol	-	-	硫化氢产生 Hydrothion produce	-	ND
苦杏仁苷 Amygdalin	+	+	氧化酶 Oxydase	+	+
肌醇 Inositol	-	-	半固体琼脂 Motility Test Medium	+	ND
鼠李糖 Rhamnose	-	-	革兰氏染色 Gram staining	-	-

注: +: 阳性; -: 阴性; ND: 无记录; T: 轮虫弧菌 LMG21460^T (Gomez-Gil et al, 2003)
Note: +: Positive; -: Negative; ND: No record; T: *Vibrio rotiferianus* LMG21460^T (Gomez-Gil et al, 2003)

由引物 27F 和 1492R 扩增菌株 BZ01 的 16S rDNA 基因序列,获得有效基因序列长度为 1480 bp,通过 Blast 检索发现其与弧菌属序列同源性最高。其中,与轮虫弧菌 (*Vibrio rotiferianus*)、哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*)、坎氏弧菌 (*Vibrio campbellii*) 及需钠弧菌 (*Vibrio natriegens*) 序列均有较高相似度。从以上相似度最高的序列中选择 12 个菌株的 16S rDNA 基因序列构建系统发育树,结果如图 5 所示,菌株 BZ01 与轮虫弧菌聚合,置信度为 51%。

综合 gyrB 和 16S rDNA 基因序列鉴定结果,将菌株 BZ01 鉴定为轮虫弧菌。

2.6 药敏实验

对菌株 BZ01 进行 30 种抗菌药物的敏感性实验,结果显示,该菌株对菌必治、新霉素、四环素、氧氟沙星、氟哌酸、氟罗沙星、新生霉素、强力霉素、萘啶酸和氟苯尼考 10 种药物高度敏感,对美满霉素和头孢噻肟 2 种药物中度敏感,而对青霉素、吡哌酸、头孢他啶、链霉素、头孢氨苄、头孢拉定、先锋必、头孢唑啉、乙酰螺旋霉素、克拉霉素、阿米卡星、庆大霉素、阿奇霉素、卡那霉素、苯唑青霉素、氨苄青霉素、多粘菌素 B、复方新诺明 18 种药物耐药。

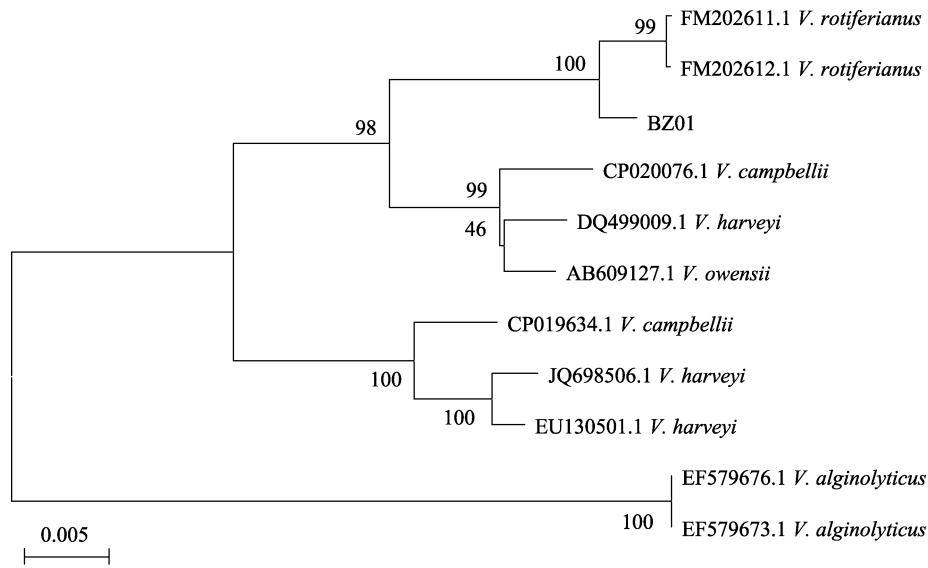
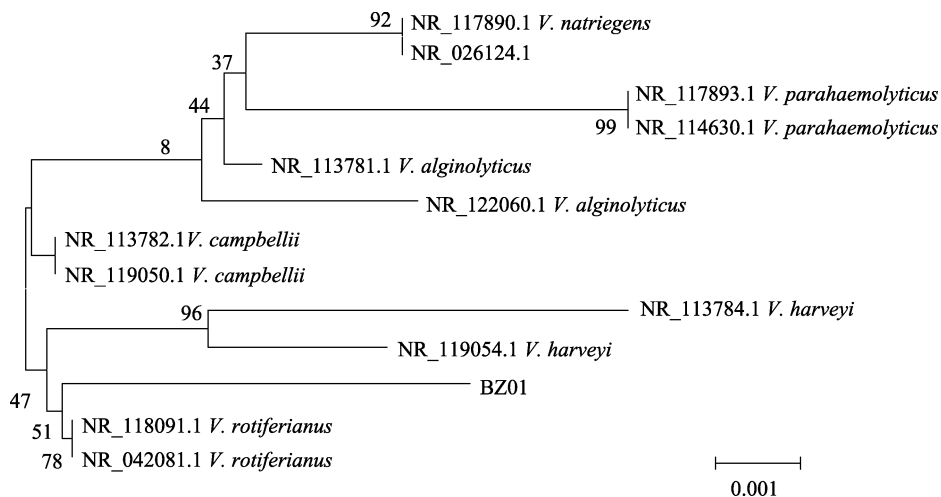
图 4 基于 *gyrB* 基因序列构建的系统发育树Fig.4 The phylogenetic tree based on *gyrB* gene sequence alignment

图 5 基于 16S rDNA 基因序列构建的系统发育树

Fig.5 The phylogenetic tree based on 16S rDNA gene sequence alignment

3 讨论

山东省长岛县作为中国北方最大的深水网箱养殖基地,在冷水性鱼类尤其是许氏平鲈的网箱养殖中占有极其重要的地位。但近年来随着养殖规模的不断扩大,加之当地渔民传统作业生产中大量使用冰鲜杂鱼饵料,致使水中有害微生物逐渐增多,疾病频繁暴发,给当地渔业发展造成巨大的经济损失。其中,细菌性疾病更以其高传染率和死亡率成为限制行业发展的关键因素。目前,已报道的可对许氏平鲈致病的细菌主要有 β -溶血性链球菌(*β -hemolytic streptococcus*) (Masahiro *et al*, 1986) 格氏乳球菌(*Lactococcus garvieae*) (Kang *et al*, 2004)、杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*) (Han *et al*, 2011)、哈维氏弧菌(*Vibrio*

harveyi) (孟鹏等, 2010; Won *et al*, 2008)、海分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*) (绳秀珍等, 2011)、鳃利斯顿氏菌(*Listonella anguillarum*) (王庚申等, 2012)等。

本研究从患有皮肤溃疡症的许氏平鲈体表病灶分离到一株绝对优势菌,通过回归感染试验,验证该菌对许氏平鲈具有较强的致病力,人工感染后的许氏平鲈表现出体表溃疡等与自然感染相同的症状。经细菌形态特征、生理生化、*gyrB* 和 16S rDNA 基因序列比对分析等多种方法将该菌株鉴定为轮虫弧菌。国外有关轮虫弧菌的报道始见于 2003 年,由 Gomez-Gil 等(2003)在褶皱臂尾轮虫中分离得到,此后陆续出现有关于该菌的报道(Chowdhury *et al*, 2011; Labbate *et al*, 2011)。近几年来,国内分别在养殖半滑舌鳎(陈政强等, 2012)、南美白对虾(金春英, 2013)和线纹

表2 菌株 BZ01 对抗菌药物的敏感性测试
Tab.2 The drug sensitivity test of strain BZ01

药物 Drugs	药片浓度 Concentration ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	抑菌圈 Diameter of inhibition/mm	敏感度 Sensit- ivity	药物 Drugs	药片浓度 Concentration ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	抑菌圈 Diameter of inhibition/mm	敏感度 Sensit- ivity
青霉素 Penicillin	10	0	R	克拉霉素 Clarithromycin	15	8	R
菌必治 Ceftriaxone	30	18	S	阿米卡星 Amikacin	30	10	R
新霉素 Neomycin	30	21	S	庆大霉素 Gentamycin	10	11	R
头孢他啶 Ceftazidime	30	10	R	阿奇霉素 Azithromycin	15	13	R
吡哌酸 Pipemidic	30	12	R	新生霉素 Novobiocin	30	25	S
四环素 Tetracycline	30	20	S	卡那霉素 Kanamycin	30	0	R
氧氟沙星 Ofloxacin	5	20	S	美满霉素 Minocycline	30	20	I
链霉素 Streptomycin	10	14	R	强力霉素 Doxycyclin	30	19	S
氟哌酸 Norfloxacin	10	23	S	苯唑青霉素 Oxacillin	1	0	R
头孢氨苄 Cefalexin	9	14	R	氨苄青霉素 Ampicillin	10	0	R
头孢拉定 Cefradine	30	10	R	多粘菌素 B Polymyxin B	300U	0	R
先锋必 Cefoperazone sodium	75	11	R	头孢噻肟 Cefotaxime	30	16	I
头孢唑啉 Cefazolin	30	0	R	氟苯尼考 Florfenicol	30	21	S
氟罗沙星 Fleroxacin	5	28	S	复方新诺明 Paediatric compound sulfamethoxazole tablets	25	13	R
乙酰螺旋霉素 Acetylspiramycin	30	0	R	萘啶酸 Nalidixic acid	30	21	S

注: S 为高敏, I 为中敏, R 为耐药

Note: S: Susceptible; I: Intermediate; R: Resistance

海马(杨求华, 2017)中发现了轮虫弧菌。感染该菌的半滑舌鳎主要症状为体表溃烂、尾部出血。患病南美白对虾主要症状为体表发红、肌肉白浊、鳃部变黄溃烂。而患病纹线海马主要症状为腹部凹陷, 尾部呈 L 形, 尾末端表皮脱落、溃烂等。但轮虫弧菌感染游泳性鱼类发病的案例尚未见报道。值得一提的是, 本研究得到的轮虫弧菌在 TCBS 培养基上菌落为绿色, 说明其不发酵蔗糖, 因此, 不能采用 TCBS 培养基对其进行定性鉴定。从 16S rDNA 和 *gyrB* 基因序列系统发育树上看, 根据 16S rDNA 基因序列建立的发育树置信度普遍较低, 菌株 BZ01 与轮虫弧菌(NR04281.1) 置信度为 51%, 远低于 *gyrB* 基因序列系统发育树的置信度。因此, 在区分亲缘关系较近的种类时, *gyrB* 基因序列更为适合做分类研究(王晓冉等, 2017)。

从药敏实验结果来看, 此次分离的轮虫弧菌对不同类抗菌药物的敏感性不同。其中, 对四环素类(四环素、强力霉素)、喹诺酮类(氧氟沙星、氟哌酸、氟罗沙星、萘啶酸)、香豆素类(新生霉素)、肽酰转移酶类(氟苯尼考)高度敏感, 而对大环内酯类(克拉霉素、乙酰螺旋霉素、阿奇霉素)、多肽类(多粘菌素 B)、磺

胺类(复方新诺明)、 β -内酰胺类(青霉素、苯唑青霉素、氨苄青霉素、头孢他啶、头孢氨苄、头孢拉定、头孢唑啉、头孢噻肟、先锋必)、氨基糖苷类(链霉素、庆大霉素、卡那霉素、阿米卡星)中度敏感或不敏感。而在海马中发现的轮虫弧菌(杨求华等, 2017)对头孢类和氨基糖苷类敏感, 对四环素类和喹诺酮类耐药, 这与本次得到的轮虫弧菌药物敏感性不同, 这说明同种细菌不同菌株也会因养殖环境不同而表现不同的耐药性。因此, 养殖生产中应当合理筛选和使用抗菌药物, 既要达到理想的预防治疗疾病效果, 更要避免细菌耐药性的产生。

参 考 文 献

- Chang Q, Guan CT, Liang MQ, *et al.* Effects of feeding stimulants on feed intake and growth of *Sebastes schlegeli*. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(4): 1-7 [常青, 关长涛, 梁萌青, 等. 摄食促进物质对许氏平鲈摄食和生长的影响. *渔业科学进展*, 2009, 30(4):1-7]
- Chen JG, Chen C, Zhang TT, *et al.* Isolation and classification of exophthalmic disease-inducing pathogenic bacterium from *Ctrophistis striata*. *Progress in Fishery Science*, 2017,38(5):

- 32–40 [陈建国, 超陈, 李炎路, 等. 美洲黑石斑鱼 (*Centropristis striata*) “突眼症”的病原菌分离鉴定. 渔业科学进展, 2017, 38(5): 32–40]
- Chen ZQ, Yao ZX, Lin M, *et al.* Characterization of pathogenic bacteria *Vibrio rotiferianus* isolated from *Cynoglossus semilaevis* Günther. *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. 生物技术通报, 2012(6): 147–153]
- Chowdhury PR, Boucher Y, Hassan KA, *et al.* Genome Sequence of *Vibrio rotiferianus* Strain DAT722. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(13): 3381–3382
- Gomez-Gil B, Thompson FL, Thompson CC, *et al.* *Vibrio rotiferianus* sp. nov, isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53(1): 239–243
- Gu ZH, Fu ZR, Qian H, *et al.* Artificial breeding and related factors in Schlegel's rockfish *Sebastes schlegeli* in Tianjin. *Fisheries Science*, 2015, 34(8): 519–522 [顾中华, 傅志茹, 钱红, 等. 天津地区许氏平鲈人工育苗研究. 水产科学, 2015, 34(8): 519–522]
- Han HJ, Kim DY, Kim WS, *et al.* Atypical *Aeromonas salmonicida* infection in the black rockfish, *Sebastes schlegeli* Hilgendorf, in Korea. *Journal of Fish Diseases*, 2011, 34(1): 47–55
- Jin CY. Identification and characterization of pathogenic bacteria causing vibriosis in cultured American white shrimp (*Penaeus vannamei*). *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. 海洋环境科学, 2013, 32(5): 647–651]
- Kang S, Shin G, Shin Y, *et al.* Experimental evaluation of pathogenicity of *Lactococcus Garvieae* in black rockfish (*Sebastes Schlegeli*). *Journal of Veterinary Science*, 2004, 5(4): 387–390
- Labbate M, Boucher Y, Chowdhury PR, *et al.* Integration of a laterally acquired gene into a cell network important for growth in a strain of *Vibrio rotiferianus*. *BMC Microbiology*, 2011, 11: 253
- Li CH, Chen J, Shi YH, *et al.* Characterization of *Listonella anguillarum* as the aetiological agent of vibriosis occurred in cultured ayu (*Plecoglossus altivelis*) in Ninghai country, China. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(7): 931–937 [李长红, 陈炯, 史雨红, 等. 宁海地区香鱼弧菌病原菌鉴定. 微生物学报, 2009, 49(7): 931–937]
- Masahiro S, Shizuo A, Masanori K. A streptococcal disease of cultured jacobever *Sebastes schlegeli*. *Aquaculture Science*, 1986, 34(3): 171–177
- Meng P, Zhan WB, Sheng XZ. Identification and phylogenetic analysis of pathogen HV0811 isolated from the diseased *Sebastes fuscescens*. *Marine Sciences*, 2010, 34(5): 48–54 [孟鹏, 战文斌, 绳秀珍. 从患病黑鲷分离病原菌 HV0811 的鉴定及其系统发育分析[J]. 海洋科学, 2010, 34(5): 48–54]
- Sheng XZ, Meng P, Xu XL, *et al.* Identification and lipopolysaccharide antigenicity analysis of *Mycobacterium marinum* isolated from *Sebastes schlegeli*. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(10): 1524–1531 [绳秀珍, 孟鹏, 徐晓丽, 等. 从许氏平鲈体表分离海分枝杆菌的鉴定及其脂多糖的抗原性分析. 水产学报, 2011, 35(10): 1524–1531]
- Wang GS, Wang YG, Zhang Z, *et al.* Isolation, identification and pathogenicity of *Listonella anguillarum* from diseased cultured *Sebastes schlegeli*. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(8): 1290–1296 [王庚申, 王印庚, 张正, 等. 引起养殖许氏平鲈死亡的鳗利斯顿氏菌的分离鉴定及致病性. 水产学报, 2012, 36(8): 1290–1296]
- Wang XR, Chen SQ, Mo ZL, *et al.* Isolation and identification of *Aeromonas salmonicida* associated with furunculosis in cultured sablefish (*Anoplopoma fimbria*). *Progress in Fishery Science*, 2017, 38(5): 25–31 [王晓冉, 陈四清, 莫照兰, 等. 养殖裸盖鱼 (*Anoplopoma fimbria*) 疥疮病原菌的分离与鉴定. 渔业科学进展, 2017, 38(5): 25–31]
- Won KM, Park SI. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to cultured marine fishes in Korea. *Aquaculture*, 2008, 285(1): 8–13
- Yang QH, Zhen LY, Huang ZC, *et al.* Identification and characterization of pathogen *Vibrio rotiferianus*, a pathogen isolated from *Hippocampus erectus* with tail-rot disease. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(5): 1131–1140 [杨求华, 郑乐云, 黄种持, 等. 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. 中国水产科学, 2017, 24(5): 1131–1140]

(编辑 江润林)

Isolation, Identification, and Biological Characteristics of a Pathogenic Bacterial Strain from Cage-Cultured Black Rockfish (*Sebastes schlegelii*)

WANG Kai^{1,3}, WANG Yingeng^{1,2}, JIANG Yong⁴, ZHANG Zheng^{1,2①}, YU Yongxiang^{1,2}, LIAO Meijie^{1,2}

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 4. National Oceanographic Center, Qingdao 266071)

Abstract In July 2016, a severe disease outbreak occurred in offshore-cage cultured black rockfish (*Sebastes schlegelii*) in Changdao County, Shangdong Province, which resulted in significant mortality. The main symptom of diseased rockfish was skin ulcers on the body. In order to determine the cause of the disease, pathogenic bacteria were isolated from diseased fish and identified by various methods including morphological observation, traditional physiological and biochemical tests, and gyrB gene sequence alignment. A dominant bacterial strain was isolated from ulcerative skin and was marked as BZ01. The strain formed a subtransparent colony on TSB solid medium plate and a green colony on TCBS selective medium plate. Its shape was short and rod-like with a single polar flagellum when observed by transmission electron microscopy (TEM). An artificial infection experiment was carried out to verify its pathogenicity to black rockfish. The results demonstrated that this strain of BZ01 had strong pathogenicity to black rockfish and could cause death. The artificial infected black rockfishes showed the same symptoms as those of natural infection. The value of LD₅₀ was calculated as 2.07×10⁶ CFU/ml. Analysis of the gyrB gene sequence suggested that the strain of BZ01 was most closely related to *Vibrio*. In gyrB gene sequencing, it clustered into *Vibrio rotiferianus* in the phylogenetic tree with 100% confidence. Based on these results, this strain was identified as *V. rotiferianus*. At the same time, the drug sensitivity test showed that this strain of BZ01 was highly sensitive to tetracyclines (tetracycline, doxycycline), quinolones (norfloxacin, ofloxacin, fleroxacin, nalidixic acid), coumarin (streptonivicin), and peptidyl transferase (florfenicol), while medium sensitive or resistant to macrolides, peptides, sulfonamides, β-lactams, and aminoglycosides. This is the first report that *V. rotiferianus* could infect offshore-cage cultured rockfish in China, which would provide an effective reference for disease control in cultured *S. schlegelii*.

Key words *Sebastes schlegelii*; Skin ulcer; *Vibrio rotiferianus*; Drug resistance

① Corresponding author: ZHANG Zheng, E-mail: zhangzheng@ysfri.ac.cn