2026, 66(2): 850-866
CSTR: 32112.14.j.AMS.20250678
DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20250678

微生物学报
Acta Microbiologica Sinica
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

Research Article 研究报告

线纹海马体表溃烂病细菌的分离鉴定及致病性分析

刘飞龙[1,2,3]，邹文政[1,2,3*]，李忠琴[1,2,3*]，黄璇璇[1,2,3]，蔡鸿娇[1,2,3]，林茂[1,2,3]

1 集美大学 水产学院，海水养殖生物育种全国重点实验室，福建 厦门
2 农业农村部东海海水健康养殖重点实验室，福建 厦门
3 福建省水产病害防治技术研发中心，福建 厦门

刘飞龙, 邹文政, 李忠琴, 黄璇璇, 蔡鸿娇, 林茂. 线纹海马体表溃烂病细菌的分离鉴定及致病性分析[J]. 微生物学报, 2026, 66(2): 850-866.
LIU Feilong, ZOU Wenzheng, LI Zhongqin, HUANG Xuanxuan, CAI Hongjiao, LIN Mao. Isolation, identification, and pathogenicity analysis of bacteria associated with skin ulceration in *Hippocampus erectus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(2): 850-866.

摘　要：线纹海马(*Hippocampus erectus*)是我国具有重要经济价值的主要养殖海马种类。在密集养殖环境下细菌性疾病频发，其中体表溃烂病是危害线纹海马养殖的主要疾病之一。溃烂病主要由弧菌属细菌引起，但其病原组成的复杂性和多样性尚未完全明确。【目的】鉴定福建漳州地区养殖线纹海马溃烂病的分离菌，解析其致病性、耐药谱及毒力特征，为疾病防控提供科学依据。【方法】从患体表溃烂病的海马病灶和内脏组织中分离病原菌，通过形态观察、生理生化检测、16S rRNA 基因系统发育分析、回归感染以确定致病菌的种属；采用培养法检测分离菌株的溶血性、酪蛋白酶活性及盐度耐受性；通过 PCR 扩增确定 10 种毒力基因；采用纸片扩散法测试其对 30 种抗菌药物的耐药性；以斑马鱼为模型进行人工感染，确定半数致死量(LD_{50})。【结果】从患病海马各部位共分离出 15 株优势菌，其中 3 株(HCE003、HCE070、HCE098)均呈 β 溶血，总耐药率达到 50.0%−56.7%。HCE003 携带 *vvh*、*pPHDD1* 和 *hlyAch* 毒力基因，HCE070 和 HCE098 携带 *hlyA*、*trh*、*hlyAch* 和 *vhh* 毒力基因，初步判定为强致病株，分别鉴定为弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)、海藻希瓦氏菌(*Shewanella algae*)和轮虫弧菌(*Vibrio rotiferianus*)。这 3 株菌在盐度 15‰ 下可正常增殖，回归感染可引发线纹海马体表溃烂；人工腹腔感染斑马鱼的半致死浓度 LD_{50} 分别为 1.71×10^5、3.68×10^5、2.51×10^6 CFU/mL。【结论】本研究在罹患溃烂病线纹海马中分离到具有多重耐药性及高毒力的弗氏柠檬酸杆菌和海藻希瓦氏菌，表明线纹海马溃烂病的致病菌除了已报道的弧菌，非弧菌属病原菌也可共同诱发海马体表溃烂，为海马养殖疾病防控及开发对应药物提供科学理论依据。

关键词：线纹海马；体表溃烂；致病菌；毒力基因；半致死量

资助项目：国家重点研发计划(2020YFD0900102)；福建省科技计划农业引导性(重点)项目(2021N0014)
This work was supported by the National Key Rrsearch and Development Program of China (2020YFD0900102) and the Agricultural Guiding (Key) Project of the Fujian Provincial Science and Technology Program (2021N0014).
*Corresponding authors. E-mail: LI Zhongqin, zhqinli@jmu.edu.cn; ZOU Wenzheng, wzhzou@jmu.edu.cn
Received: 2025-09-04; Accepted: 2025-11-03; Published online: 2025-11-20

Isolation, identification, and pathogenicity analysis of bacteria associated with skin ulceration in *Hippocampus erectus*

LIU Feilong[1,2,3], ZOU Wenzheng[1,2,3*], LI Zhongqin[1,2,3*], HUANG Xuanxuan[1,2,3], CAI Hongjiao[1,2,3], LIN Mao[1,2,3]

1 State Key Laboratory of Mariculture Breeding, College of Fisheries, Jimei University, Xiamen, Fujian, China
2 Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Xiamen, Fujian, China
3 Fujian Provincial Research and Development Center for Aquatic Disease Prevention and Control Technology, Xiamen, Fujian, China

Abstract: The lined seahorse (*Hippocampus erectus*) is a major cultured seahorse species with significant economic value in China. Bacterial diseases frequently occur in intensive aquaculture environments, among which skin ulceration is one of the most detrimental diseases affecting *H. erectus* farming. Skin ulceration is mainly caused by *Vibrio* spp., while the pathogen complexity and diversity remain unclear. **[Objective]** This study identified dominant bacterial strains from ulcerative lesions of *H. erectus* in Zhangzhou, Fujian and characterized their pathogenicity, antibiotic resistance profiles, and virulence traits, aiming to provide a scientific basis for disease prevention and control. **[Methods]** Bacteria were isolated from ulcerated and internal tissue samples of diseased seahorses. Species identification was performed *via* morphological observation, physiological-biochemical tests, 16S rRNA gene phylogenetic analysis, and reinfection of seahorses. The isolates were cultured for the measurement of hemolytic activity, caseinase production, and salinity tolerance. Ten virulence genes were detected by PCR. The susceptibility of the isolates to 30 antibiotics was tested *via* the disk diffusion method. Artificial infection was performed with zebrafish as a model to determine the median lethal dose (LD_{50}). **[Results]** Fifteen dominant strains were isolated from various tissue samples of diseased seahorses. Among them, three strains (HCE003, HCE070, and HCE098) exhibited β-hemolysis and high overall antibiotic resistance rates (50.0%–56.7%). HCE003 carried *vvh*, *pPHDD1*, and *hlyAch*, while both HCE070 and HCE098 carried *hlyA*, *trh*, *hlyAch*, and *vhh*. HCE003, HCE070, and HCE098 were preliminarily identified as highly pathogenic strains and were further characterized as *Citrobacter freundii*, *Shewanella algae*, and *Vibrio rotiferianus*, respectively. The three strains were capable of growing normally at the salinity of 15‰. Artificial challenge tests demonstrated that they could induce skin ulceration in *H. erectus* upon reinfection. The median lethal doses of HCE003, HCE070, and HCE098 in zebrafish were 1.71×10^5 CFU/mL, 3.68×10^5 CFU/mL, and 2.51×10^6 CFU/mL, respectively. **[Conclusion]** This study is the first to report the isolation of multidrug-resistant and highly virulent *C. freundii* and *S. algae* from *H. erectus* with skin ulceration, indicating that non-*Vibrio* pathogens can also contribute to skin ulceration in seahorses.

These findings provide scientific support for the development of targeted disease management strategies and therapeutic agents in seahorse aquaculture.

Keywords: *Hippocampus erectus*; skin ulceration; pathogenic bacteria; virulence gene; median lethal dose

海马(*Hippocampus* spp.)以其独特的外形和生殖方式备受关注，同时兼具重要的药用、营养和观赏价值。全球海马交易量巨大，在传统中医药领域占据重要地位。然而，过度捕捞、海洋污染及栖息地破坏等因素致使过去几十年间野生海马种群数量急剧下降。自 2004 年《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES)[1]将所有已知海马物种纳入附录 II 以来，人工养殖的海马已成为满足市场需求、保护野生资源的关键途径。原产于美洲大西洋西岸的线纹海马(*Hippocampus erectus*)被引入中国后，因其生长迅速、成活率高、抗病力强等优势，迅速成为国内主要养殖品种之一。然而，随着养殖规模不断扩大，密集且相对封闭的养殖环境也导致海马疾病频发，其中细菌性疾病是主要原因，给产业带来了巨大的经济损失。

海马的体表溃烂病主要由弧菌属(*Vibrio* sp.)成员引发。Alcaide 等[2]研究发现，从患病的库达海马中分离鉴定出哈维氏弧菌；李营等[3]也在患表皮溃疡病的海马中鉴定出哈维氏弧菌；Balcázar 等[4]从患病海马中分离到溶藻弧菌；刘文军等[5]在线纹海马中、温水秀等[6]在库达海马中分离鉴定出副溶血弧菌；Jiang 等[7]在库达海马中、李海东[8]在日本海马的研究中分别报道出创伤弧菌和坎氏弧菌。此外，Balcázar 等[9]研究发现，分枝杆菌属新种 *Mycobacterium hippocampi* 也可导致海马尾部腐烂。由此可见，线纹海马养殖中暴发的体表溃烂病其病原菌组成可能存在复杂多样性，并非仅限于已报道的弧菌属。

现有研究多聚焦于单一或少数几种已知致病弧菌，对线纹海马体表溃烂病的致病菌种属，特别是非弧菌属潜在致病菌的系统性分离、鉴定及致病性评估相对缺乏。此外，对病原菌株的耐药谱系、关键毒力因子及其致病机制的研究尚不深入，导致高效防控策略的制定存在局限性。因此，本研究通过全面分离鉴定线纹海马体表溃烂的优势培养菌，评估其溶血性、耐药性、致病性等关键表观生化特征，再利用分子生物学方法鉴定菌种并检测相关毒力基因，进而通过人工感染试验全面评估分离菌株的致病性，探讨不同致病菌的潜在致病机制及其对海马养殖业的威胁，以期为开发特定抗菌药和有效防控技术提供科学理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验用鱼

患病线纹海马取自福建漳州线纹海马养殖场；斑马鱼购自厦门市鱼都水族馆。本研究所有动物实验获得集美大学科技伦理委员会批准，编号为 20240315010。

1.1.2 培养基

硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖(thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose, TCBS)、LB 肉汤、大豆酪蛋白琼脂培养基、NaCl、2216E 液体培养基、琼脂粉，青岛海博生物技术有限公司。

1.1.3 主要试剂

抗菌药物药敏纸片，杭州微生物试剂有限公司；草酸铵结晶紫染色液、碘液、95% 乙醇、番红、血琼脂平板，常德比克曼生物科技有限公司；GYZ-lle 肠杆菌科细菌生化编码鉴定管、GYZ-9V 弧菌科细菌生化编码鉴定管，杭州滨和

微生物试剂有限公司；细菌基因组 DNA 提取试剂盒、DNA marker (2 000 bp)、4S Green Plus 无毒核酸染料，生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 细菌的分离纯化

取患溃烂病的线纹海马置于洁净工作台上，用无菌生理盐水冲洗海马体表。在无菌条件下用接种环蘸取溃烂处组织，划线于 TCBS 和 2216E 琼脂平板上；解剖取其内脏，用无菌生理盐水冲洗后，置于 1 mL 无菌生理盐水的离心管中研磨，取上清液 100 mL 涂布平板，30 ℃培养 24 h，观察细菌形态及其生长情况。挑取不同菌株进行 2−3 次纯化培养后，划线接种于斜面，用 40% 甘油生理盐水分装后置于−80 ℃超低温冰箱保存备用。

1.3 细菌药敏测试

利用 K-B 纸片琼脂扩散法[10]对从海马病灶和内脏组织分离的优势菌进行抗菌药物敏感试验。依据美国临床和实验室标准协会(CLSI)[11]的“抗菌药物敏感性试验执行标准”，对 8 类共 30 种抗菌药物的敏感度进行判定，耐药率计算如公式(1)所示。

$$\text{耐药率}=(\text{菌株耐受抗菌药物的数量}/\text{受试抗菌药物的数量})\times 100\% \quad (1)$$

1.4 细菌溶血活性测定

吸取 2 μL 的菌悬液(1.00×10^9 CFU/mL)点种在血琼脂平板上，以金黄色葡萄球菌为阳性对照，30 ℃培养 24 h 后观察结果。若在血平板上观测到溶血圈，则表明该菌具有溶血活性。通过上述试验，筛选出具有一定耐药性、携带溶血素相关基因的菌株。

1.5 细菌酪蛋白酶水解试验

将高压灭菌后的大豆酪蛋白琼脂培养基冷却至 50 ℃左右，加入无菌脱脂牛乳，混匀，使其终浓度为 10%，然后倒平皿。将培养好的菌液用 PBS 重悬后得到菌悬液，吸取 2 μL 滴加至平皿中，以枯草芽孢杆菌为阳性对照，大肠杆菌为阴性对照，30 ℃培养 48 h 后观察菌落周围是否有透明圈，并计算水解指数，计算方法如公式(2)所示。

$$\text{水解指数}=\text{透明圈直径}/\text{菌落直径} \quad (2)$$

1.6 细菌形态观察

观察纯化后单菌落的形态，包括菌落形状、颜色、大小等，并进行革兰氏染色镜检。具体操作如下：先在平板上挑取单菌落于载玻片上的生理盐水中，酒精灯下热固定；滴加草酸铵结晶紫染色液静置 1 min，水洗至流出的水无色；滴加碘液静置 1 min，水洗去除多余碘液；将载玻片倾斜，滴加 95% 乙醇脱色，约 45 s，水洗至流出的水无色立即停止；最后滴加番红静置 1 min，水洗，自然晾干。将载玻片放置在 100 倍油镜下镜检。

1.7 细菌的生理生化鉴定

依据细菌生化编码鉴定管说明书，分别挑取新鲜单菌落接种于生化鉴定管中，30 ℃培养 18−24 h，参照《伯杰细菌鉴定手册》[12]和《常见细菌系统鉴定手册》[13]进行生理生化指标鉴定。

1.8 细菌的分子生物学鉴定

基因组 DNA 提取采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒，操作步骤严格遵循试剂盒说明书。以提取的细菌总 DNA 为模板，选用细菌通用引物 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG)和 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT)[14]对 16S rRNA 基因进行扩增，引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 反应和测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。测序结果提交至 NCBI 数据库进行 BLAST 同源序列比对，利用 MEGA 11[15]软件构建基于细菌 16S rRNA 基因的系统发育树，采用邻接法(neighbor joining method)进行系统发育树分析。

1.9 毒力基因 PCR 扩增

参考相关文献，选择 10 个毒力相关基因(表 1)：毒性质粒复制起点基因 *pPHDD1*[16]；溶血性相关基因 *dly*[17]、*hlyApl* 和 *hlyAch*[18]；磷脂

表1 毒力基因的PCR引物

Table 1 PCR primer sequences for virulence genes

Target genes	Forward sequences (5′→3′)	Reversed sequences (5′→3′)
pPHDD1	TGGAATAACTATGAGTAACA	CATTACCAAAACATCTACAT
dly	CCTATGGGACATGAATGG	GCTCTAGGCTAAATGAATC
hlyApl	GCTATAAATGAATAAGAAAA	TTGAAGCTAACTCAAAAA
hlyAch	AATGTTTCTTTCCGTTGGGC	CCGGAGTTCCACCAGTAAAT
plpV	TCTCATAATAGCAGTAATCT	TTACTAAGCAGAATCCAGCC
vhh	GATTGGGAATGGGCAGAAAA	GGAATCGCCATTGTGATGC
hlyA	GGCAAACAGCGAAACAAATACC	CTCAGCGGGCTAATACGGTTTA
tdh	CCACTACCACTCTCATATGC	ATACGAGTGGTTGCTGTCATG
trh	CAGTTTGCTATTGGCTTCG	CAGAAAGAGCAGCCATTG
vvh	GCTATTTCACCGCCGCTCAC	CCGCAGAGCCGTAAACCGAA

酶活性相关基因 *plpV*[18]；溶血素基因 *vhh*[19]、*hlyA*[20]、*tdh*[21]、*trh*[19]、*vvh*[22]，以细菌基因组DNA为模板进行PCR检测。PCR反应条件：94 ℃预变性5 min；94 ℃变性30 s，HCE003采用60 ℃退火30 s，HCE070和HCE098则以55 ℃退火30 s，72 ℃延伸1 min，共35次循环；72 ℃终延伸7 min；4 ℃保温10 min。PCR扩增产物采用1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测，判断分离菌株是否携带相关毒力基因。

1.10 细菌的盐度适应性

培养好的菌悬液采用平板菌落计数法计算初始菌浓。配制不同浓度梯度的人工海水，盐度分别为0.5‰、5‰、10‰、15‰、20‰，分别取100 μL菌悬液接入其中，30 ℃共孵育3 h后，经平板计数算出相对存活率，计算方法如公式(3)所示。

$$\text{相对存活率}=(\text{终末菌落数}-\text{初始菌落数})/\text{初始菌落数}\times 100\% \quad (3)$$

1.11 回归感染

取40尾体质量为(1.86±0.23) g，体长为(8.10±0.45) cm的健康线纹海马，随机分为4组，分别腹腔注射[23] 50 μL菌株HCE003、HCE070、HCE098菌悬液和PBS溶液，持续观察14 d，对感染后出现病症的海马重新分离和鉴定病原菌。

1.12 半数致死量(LD_{50})测定

选取体质量为(0.22±0.02) g的健康斑马鱼，随机分为5组，分别采用腹腔注射10 μL菌悬液(1.00×10^8、1.00×10^7、1.00×10^6、1.00×10^5 CFU/mL)，对照组注射10 μL PBS溶液。菌株HCE003攻毒试验每组15条(n=3)，菌株HCE070和HCE098每组30条(n=3)。每天记录各组斑马鱼的活动状态和死亡数量，持续观察7 d，直到不再出现新增死亡。最后，采用改良寇氏法[24]计算其半致死量(LD_{50})。

2 结果与分析

2.1 分离菌株的16S rRNA基因鉴定与溶血性

从体表溃烂的线纹海马划线培养，经不同培养基分离纯化后共得到15株优势菌。测定各菌株的溶血性(表2)，初步判定每株菌的致病性强弱。其中，菌株HCE041、HCE047、HCE048、HCE050、HCE055、HCE056、HCE058在溶血平板上的菌落周围有不透明溶血环，表现为α溶血(不完全溶血)；菌株HCE003、HCE052、HCE053、HCE070、HCE098在溶血平板上的菌落周围有透明溶血环，表现为β溶血(完全溶血)；菌株HCE043、HCE044、HCE046在溶血平板上无透明溶血环，表现为γ溶血(不溶血)。

表2 体表溃烂线纹海马分离菌株的溶血性和16S rRNA基因鉴定结果

Table 2 16S rRNA gene identification and hemolysis of isolated strains from *Hippocampus erectus* with skin ulceration

Strain number	Hemolysis	Identification result	Isolation sites
HCE003	β溶血β-hemolysis	弗氏柠檬酸杆菌*C. freundii*	溃烂处Ulcerated area
HCE041	α溶血α-hemolysis	哈维氏弧菌*V. harveyi*	溃烂处Ulcerated area
HCE043	γ溶血γ-hemolysis	哈维氏弧菌*V. harveyi*	腹腔积液Peritoneal effusion
HCE044	γ溶血γ-hemolysis	哈维氏弧菌*V. harveyi*	腹腔积液Peritoneal effusion
HCE046	γ溶血γ-hemolysis	弧菌属*Vibrio* sp.	肝脏Liver
HCE047	α溶血α-hemolysis	弧菌属*Vibrio* sp.	肝脏Liver
HCE048	α溶血α-hemolysis	肺炎克雷伯氏菌*Klebsiella pneumoniae*	肝脏Liver
HCE050	α溶血α-hemolysis	肺炎克雷伯氏菌*K. pneumoniae*	肠道Intestines
HCE052	β溶血β-hemolysis	创伤弧菌*Vibrio vulnificus*	肾脏Kidney
HCE053	β溶血β-hemolysis	弧菌属*Vibrio* sp.	肾脏Kidney
HCE055	α溶血α-hemolysis	弧菌属*Vibrio* sp.	卵巢Ovaries
HCE056	α溶血α-hemolysis	肺炎克雷伯氏菌*K. pneumoniae*	卵巢Ovaries
HCE058	α溶血α-hemolysis	肺炎克雷伯氏菌*K. pneumoniae*	溃烂处Ulcerated area
HCE070	β溶血β-hemolysis	海藻希瓦氏菌*S. algae*	溃烂处Ulcerated area
HCE098	β溶血β-hemolysis	轮虫弧菌*V. rotiferianus*	溃烂处Ulcerated area

2.2 分离菌株的耐药性

药敏试验结果显示(表3)，分离的15株菌对8类30种抗菌药物呈现出不同的耐药性。总耐药率最高的3株菌依次是HCE070、HCE003和HCE098，分别为56.7%、50.0%和46.7%。HCE003和HCE070对青霉素类的耐药率均为80.0%，对头孢类的耐药率均为57.1%；而HCE048和HCE050则对头孢类药物敏感；对多肽类100.0%耐药的有HCE003、HCE043、HCE047、HCE052、HCE056和HCE070；对氨基糖苷类耐药率最高的是HCE046，为75.0%，其次是耐药率为50.0%的HCE041和HCE053，HCE003和HCE070则对其敏感；对大环内酯类100.0%耐药的有HCE041、HCE044、HCE046、HCE048和HCE055，HCE043、HCE052和HCE053则对其敏感；对四环素类100.0%耐药的有HCE003、HCE070和HCE098，对四环素类33.3%耐药的有HCE047和HCE050，其余菌株均对四环素不敏感；对喹诺酮类耐药率最高的有HCE003、HCE043、HCE046、HCE050、HCE052、HCE053、HCE058、HCE070和HCE098，均为33.3%，其余菌株的耐药率均为16.7%；除HCE043、HCE046和HCE058对磺胺类药物敏感外，其余菌株均100.0%耐药。

2.3 三株分离菌的菌落形态和显微特征

从体表溃烂的海马患处分离并经过药敏试验和溶血活性试验，筛选出β溶血、总耐药率高于45.0%的3株分离菌HCE003、HCE070和HCE098进行后续研究。3株菌在添加2% NaCl的LB固体培养基上形成的菌落均为圆形、表面隆起、边缘整齐、有臭味。HCE003和HCE098菌落为乳白色，直径约1.80−2.10 mm和3.00−3.10 mm；HCE070菌落为淡黄色，直径约2.20−2.80 mm。3株菌经革兰氏染色显示均为阴性菌。

2.4 三株分离菌的酪蛋白酶水解活性

如图1所示，在大豆酪蛋白琼脂平板上培养后观测透明圈大小可知，HCE003无透明圈，

表3　体表溃烂线纹海马分离菌株对8类抗菌药物的耐药率

Table 3　Resistance rate of isolated strains from *Hippocampus erectus* with cutaneous ulcer to eight kinds of antibacterial drugs

菌株编号 Strain number	总耐药率 Total drug resistance rate (%)	青霉素类 Penicillin class (5 species)	头孢类 Cephalosporins (7 species)	多肽类 Polypeptides (2 species)	氨基糖苷类 Aminoglycosides (4 species)	大环内酯类 Macrolides (2 species)	四环素类 Tetracyclines (3 species)	喹诺酮类 Quinolones (6 species)	磺胺类 Sulfonamides (1 specie)
HCE003	50.0	80.0	57.1	100.0	0.0	50.0	100.0	33.3	100.0
HCE041	33.3	60.0	14.3	50.0	50.0	100.0	0.0	16.7	100.0
HCE043	30.0	40.0	28.6	100.0	25.0	0.0	0.0	33.3	0.0
HCE044	26.7	20.0	14.3	50.0	0.0	100.0	0.0	16.7	100.0
HCE046	36.7	40.0	14.3	50.0	75.0	100.0	0.0	33.3	0.0
HCE047	33.3	40.0	14.3	100.0	25.0	50.0	33.3	16.7	100.0
HCE048	23.3	40.0	0.0	50.0	0.0	100.0	0.0	16.7	100.0
HCE050	30.0	40.0	0.0	50.0	25.0	50.0	33.3	33.3	100.0
HCE052	30.0	40.0	28.6	100.0	0.0	0.0	0.0	33.3	100.0
HCE053	33.3	40.0	28.6	50.0	50.0	0.0	0.0	33.3	100.0
HCE055	30.0	40.0	14.3	50.0	25.0	100.0	0.0	16.7	100.0
HCE056	26.7	40.0	14.3	100.0	25.0	50.0	0.0	16.7	100.0
HCE058	26.7	40.0	14.3	50.0	25.0	50.0	0.0	33.3	0.0
HCE070	56.7	80.0	57.1	100.0	0.0	50.0	100.0	33.3	100.0
HCE098	46.7	60.0	28.6	50.0	25.0	50.0	100.0	33.3	100.0

✉ actamicro@im.ac.cn, ☎ 010-64807516

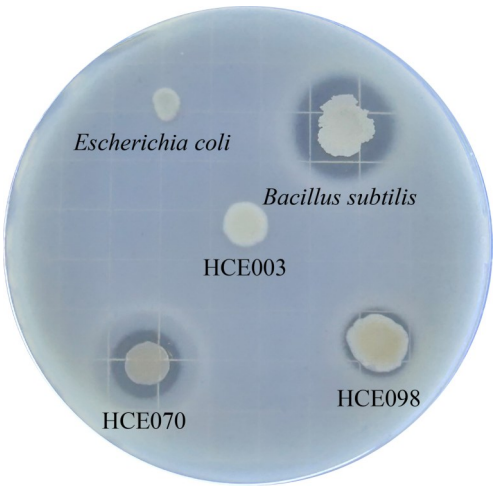

图1 三株分离菌的水解活性

Figure 1 Hydrolytic activity of three pathogenic strains.

HCE070 和 HCE098 有透明圈，水解指数分别为 1.62 和 1.28，说明 HCE070 和 HCE098 能分泌酪蛋白酶，且 HCE070 水解能力强于 HCE098。

2.5 三株分离菌的生化鉴定

利用 GYZ-lle 肠杆菌科细菌生化编码鉴定管检测 HCE003 为柠檬酸杆菌属弗氏柠檬酸杆菌(*C. freundii*) (表 4)；利用 GYZ-9V 弧菌科细菌生化编码鉴定管检测 HCE070 为希瓦氏菌属海藻希瓦氏菌(*S. algae*)，HCE098 为弧菌属轮虫弧菌(*V. rotiferianus*) (表 5)。

表4 菌株HCE003生理生化特征

Table 4 Physiological and biochemical characteristics of HCE003

Character	HCE003	*Citrobacter freundii*
Urease	+	+
Adonitol	−	−
Sorbitol	−	−
Malonate	−	−
Lysine	−	−
Ornithine decarboxylase	−	−
Indole production	−	−
VP test	−	−
Citrate	+	+

+：阳性；−：阴性。

+: Positive; −: Negative.

2.6 三株分离菌的毒力基因检测

对分离菌株 HCE070、HCE003、HCE098 进行 PCR 检测，结果显示 HCE003 携带 *vvh*、*pPHDD1* 和 *hlyAch* 毒力基因；HCE070 和

表5 菌株HCE070、HCE098生理生化特征

Table 5 Physiological and biochemical characteristics of HCE070 and HCE098

Character	HCE070	*Shewanella algae*	HCE098	*Vibrio rotiferianus*
Glucose (gas)	−	−	−	−
Arginine dihydrolase	−	−	−	−
Lysine decarboxylase	−	−	+	+
Ornithine decarboxylase	−	−	+	+
VP test	−	−	+	+
Growth in 6% NaCl	+	+	+	+
Mannitol	−	−	−	−
Sorbitol	−	−	−	−
Citrate	−	−	−	−
Sucrose	−	−	−	−
Urease	+	−	−	+
Indole production	−	−	+	+

+：阳性；−：阴性。

+: Positive; −: Negative.

HCE098 均携带 *hlyA*、*trh*、*hlyAch* 和 *vhh* 毒力基因(图 2)。

2.7 三株分离菌分子生物学鉴定与系统发育树

对 3 株分离菌(HCE003、HCE070 和 HCE098)进行 16S rRNA 基因测序，分别获得长度为 1 478、1 481 和 1 488 bp 的基因序列。将序列上传至 NCBI，登录号分别为 PP989673.1、PP980561.1、PQ524991.1。通过 BLAST 比对，HCE003 与弗氏柠檬酸杆菌的相似度高达 99.66%；HCE070 与海藻希瓦氏菌的相似度高达 99.93%；HCE098 与轮虫弧菌的相似度高达 99.86%。

利用 MEGA 11 软件构建系统发育树，结果如图 3 所示。菌株 HCE003 与布氏柠檬酸杆菌(*C. braakii*)、穆氏柠檬酸杆菌(*C. murliniae*)同属柠檬酸杆菌属，与巴斯德克雷伯菌(*K. pasteurii*)、武汉肠杆菌(*Enterobacter wuhouensis*)距离较远，而与弗氏柠檬酸杆菌处于同一进化分支，经分析判定菌株 HCE003 为弗氏柠檬酸杆菌；菌株 HCE070 与印度希瓦氏菌(*S. indica*)、赤利克希瓦氏菌(*S. chilikensis*)和鲤鱼希瓦氏菌(*S. carassii*)同属希瓦氏菌属，与海绵副希瓦氏菌(*Parashewanella spongiae*)同属于希瓦氏菌科，与巴斯德克雷伯菌(*K. pasteurii*) 距离较远，而与海藻希瓦氏菌处于同一进化分支，经分析判定菌株 HCE070 为海藻希瓦氏菌；菌株 HCE098 与坎贝弧菌、哈维氏弧菌同属弧菌科，与水生弧菌(*V. aquaticus*)、中华华西杆菌(*Huaxiibacter chinensis*)距离较远，与轮虫弧菌处于同一进化分支，经分析判定菌株 HCE098 为轮虫弧菌。

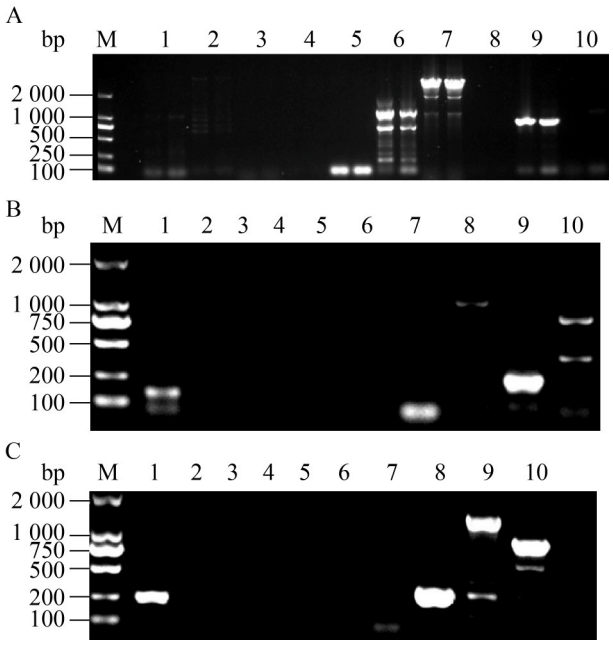

图2 毒力基因PCR扩增结果

Figure 2 PCR amplification results of virulence genes. A: Strain HCE003; B: Strain HCE070; C: Strain HCE098. Lane M: DL2000 DNA marker; Lane 1: *hlyA*; Lane 2: *plpV*; Lane 3: *dly*; Lane 4: *hlyApl*; Lane 5: *tdh*; Lane 6: *vvh*; Lane 7: *pPHDD1*; Lane 8: *trh*; Lane 9: *hlyAch*; Lane 10: *vhh*.

2.8 三株分离菌的盐度适应性

将 3 株分离菌分别以初始菌浓为 2.75×10^5、2.91×10^5、4.20×10^5 CFU/mL 接种到不同浓度的人工海水中，三者的存活率各不相同(表 6)。菌株 HCE003 在盐度 0.5‰−20.0‰ 下都能存活并有一定程度的增殖。菌株 HCE070 在盐度 0.5‰ 下存活率仅为 37.46%；盐度≥5‰ 时均能存活，且存活率随盐度升高呈现先升后降的趋势。菌株 HCE098 在盐度≤0.5‰ 时无法存活；当盐度≥10‰ 时可增殖，但增殖程度随盐度增大而降低。

2.9 三株分离菌的回归感染

人工回归感染后，起初在感染部位出现白点；随后病灶逐渐扩大、加深，表皮及皮下组织坏死、溃烂，严重时可深达骨骼；患病海马浮于水面，躯体呈 C 字形，尾部不能正常卷曲(图 4)，与自然发病症状一致。从回归感染的海马病灶处分离得到的菌株，经重分离鉴定后确认分别为弗氏柠檬酸杆菌、海藻希瓦氏菌、轮虫弧菌。

2.10 半数致死量(LD_{50})

对健康的斑马鱼进行腹腔注射 HCE003、HCE070、HCE098 3 株菌，其累计死亡率如图 5

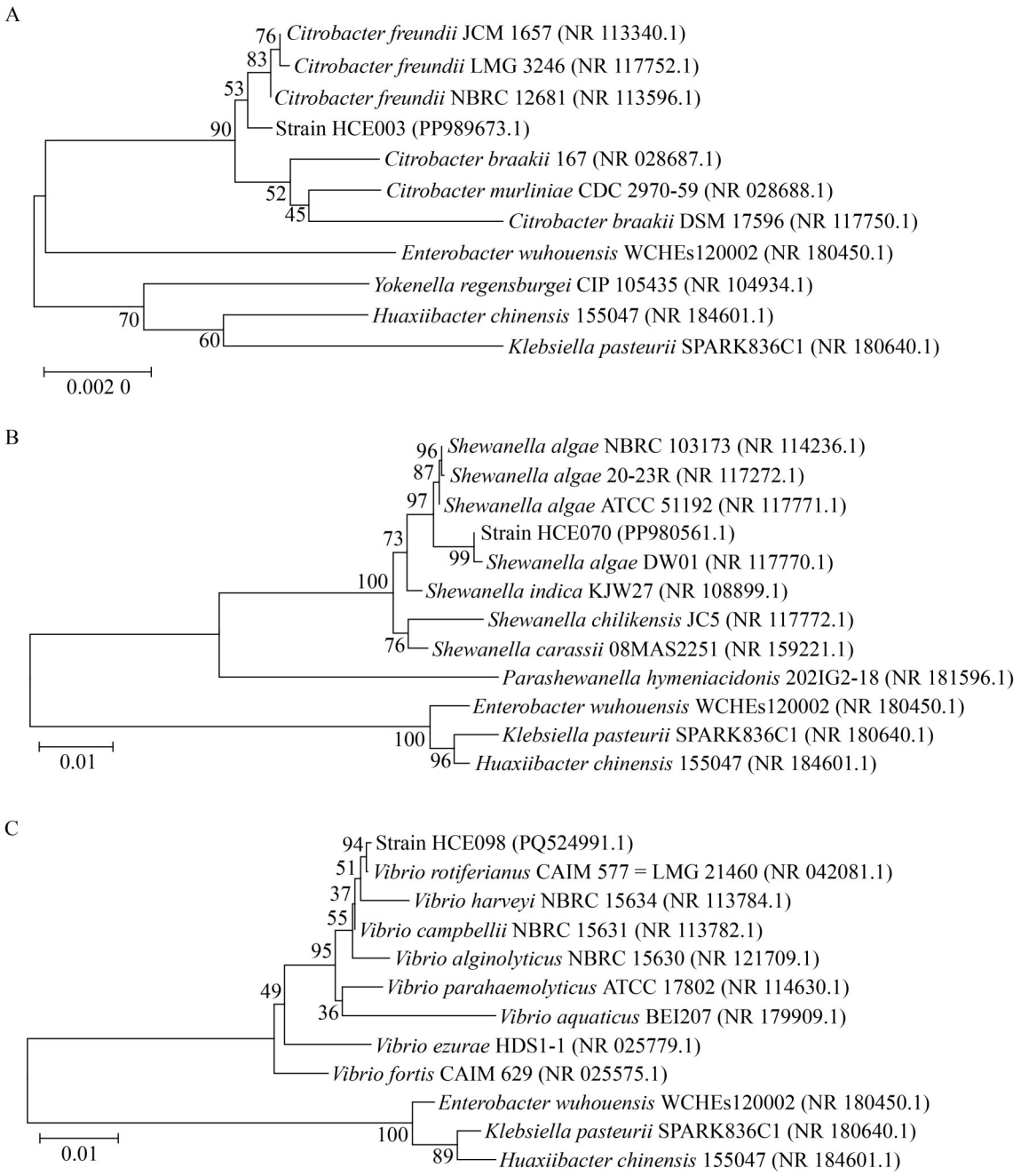

图3 基于16S rRNA基因序列构建的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree analysis based on 16S rRNA gene sequences. A: Strain HCE003; B: Strain HCE070; C: Strain HCE098. The serial number is GenBank accession number; Branch numbers are bootstrap values; Scale in the lower left corner of the picture is distance.

所示。对照组斑马鱼在 7 d 内存活良好，无死亡。3 株分离菌均表现出浓度依赖性效应，死亡率随菌液浓度升高而增加。HCE003 腹腔注射斑马鱼后，1.00×10^8 CFU/mL 攻毒组 24 h 内死亡率达 60.00%，48 h 累计死亡率达 73.33%，在 5 d 内全部死亡；1.00×10^7 CFU/mL 攻毒组

表6　分离菌在不同海盐浓度下的相对存活率

Table 6　The relative survival rate of isolated strains in different sea salt solutions

Salinity (‰)	Relative survival rate (%)		
	HCE003	HCE070	HCE098
0.5	100.73	37.46	0.00
5.0	123.64	219.93	85.71
10.0	105.45	309.28	180.95
15.0	105.45	615.12	115.48
20.0	145.45	347.08	125.00

在第 6 天全部死亡；1.00×10^6 CFU/mL 和 1.00×10^5 CFU/mL 攻毒组在 7 d 内的累计死亡率分别为 73.33% 和 53.33%，计算得 HCE003 的 LD_{50} 为 1.71×10^5 CFU/mL。HCE070 攻毒菌浓为 1.00×10^8 CFU/mL 时斑马鱼在 5 d 内全部死亡；1.00×10^7 CFU/mL、1.00×10^6 CFU/mL、1.00×10^5 CFU/mL 攻毒组的斑马鱼 7 d 内的累计死亡率分别为 83.33%、63.33% 和 46.37%，计算得 HCE070 的 LD_{50} 为 3.68×10^5 CFU/mL。HCE098 攻毒菌浓为 1.00×10^8 CFU/mL 时斑马鱼在 6 d 内全部死亡，其他浓度组感染进程较为缓慢，低菌浓组(1.00×10^5 CFU/mL) 7 d 内的累计死亡率仅为 13.33%，计算得 LD_{50} 为 2.51×10^6 CFU/mL。3 种菌株 LD_{50} 值的 95% 置信区间无重叠，表明其毒力差异显著($P<0.05$)。

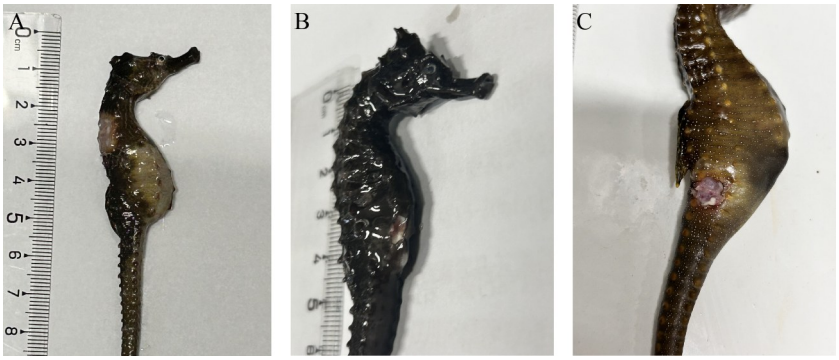

图4　感染后线纹海马的症状

Figure 4　The clinical signs of infected *Hippocampus erectus*. A: Strain HCE003; B: Strain HCE070; C: Strain HCE098.

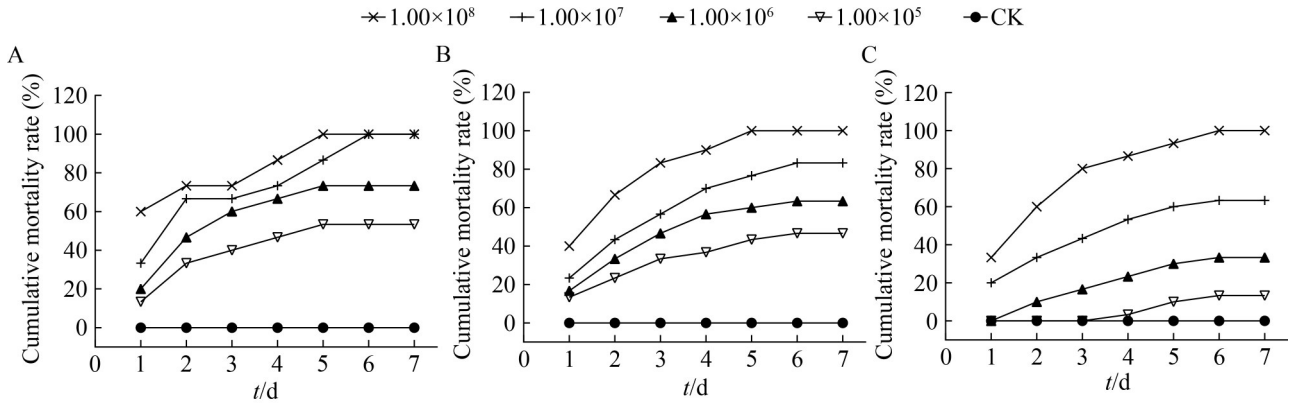

图5　感染后斑马鱼的累计死亡率

Figure 5　Cumulative mortality rate of *Danio rerio* infected by isolated strains. A: Strain HCE003; B: Strain HCE070; C: Strain HCE098. CK: Sterile PBS.

3 讨论

3.1 三株分离菌的宿主来源及海马感染特征

本研究从不同体表溃烂病的海马中分离到弗氏柠檬酸杆菌、海藻希瓦氏菌、轮虫弧菌，扩充了海马细菌性病原库。

弗氏柠檬酸杆菌作为人-兽-鱼共患的条件致病菌，其宿主范围和致病表型的多样性已得到广泛证实。黄莉萍[25]从患病黄颡鱼中分离出一株弗氏柠檬酸杆菌，该菌可导致鱼体溃烂、鳃丝腐烂等症状；刘乃瑜等[26]发现的鳖源弗氏柠檬酸杆菌则引发中华鳖底板泛红、背甲溃疡。尽管这些宿主均为淡水生物，但其体表溃烂的主要症状与本研究中海马的病症高度相似，且盐度适应性试验结果显示，HCE003 在盐度 0.5‰−20.0‰ 下也能生存繁殖，表明该菌可能通过保守的致病机制破坏宿主体表屏障。

海藻希瓦氏菌为革兰氏阴性菌，极生单鞭毛、可运动，广泛分布于海水环境中[27]，是一种重要的条件致病菌。已报道该菌主要来源于海水鱼类，如半滑舌鳎[28]、红拟石首鱼[29-30]，但其在海马中的感染特征呈现病灶深度特异性，回归感染后 HCE070 可轻易破坏海马体表，病灶深达骨骼，而半滑舌鳎感染仅表现为表皮浅层溃烂。这一差异与 HCE070 的酪蛋白酶活性直接相关，其水解指数达 1.62，显著高于 HCE098 (1.28)，该酶可高效降解海马皮肤中占比 60% 的I型胶原。同时，HCE070 在盐度 15‰ 下相对存活率高达 615.12%，远高于其他盐度组，表明其已完全适应当地的盐度环境，具备大规模流行的潜力。

轮虫弧菌最早由 Gomez-Gil 等[31]从褶皱臂尾轮虫中分离出并由此得名。高杨[32]在患溃烂病的海蜇中分离出轮虫弧菌；金春英[33]从患病南美白对虾中分离出轮虫弧菌，病症表现为反应迟钝、食欲减退、体表发红、肌肉白浊、鳃部变黄溃烂；陈政强等[34]从患严重皮肤溃烂的半滑舌鳎中分离出一株菌，经鉴定为轮虫弧菌。轮虫弧菌虽为已报道的海马尾部溃烂病原[35]，但本研究菌株 HCE098 具有感染部位拓展特征，其不仅从海马体表溃烂处分离得到，还表现为全身多处表皮坏死，推测与该菌携带的 *trh* 毒力基因有关，该基因可增强细菌在海马体表的定殖能力，使其突破表皮局限扩散至全身[19,21]。

3.2 三株分离菌的耐药性

纸片扩散法结果显示，弗氏柠檬酸杆菌 HCE003 对 30 种抗菌药物呈典型多重耐药(multidrug antibiotic resistance, MAR)表型：对青霉素类耐药率为 80.0%；对三代头孢菌素中的头孢他啶和头孢哌酮敏感，对头孢曲松呈中介，与肖双燕等[36]牛蛙源菌株一致，表明可能存在诱导型 AmpC β-内酰胺酶表达。该基因在低浓度头孢类药物诱导下可高表达，导致中介表型向耐药表型转化[37]。对四环素类 100.0% 耐药，可能与养殖业四环素滥用及可移动 *tet* 基因传播相关[38]。对氨基糖苷类全部敏感，与鳖源[26]、鳌虾源菌株[39]一致，这可能与当地海马养殖中氨基糖苷类药物使用率低相关；但大口黑鲈源菌株弗氏柠檬酸杆菌对庆大霉素呈中介[40]，反映宿主栖息地或养殖用药习惯对耐药性的影响。根据农业农村部公告，诺氟沙星、氧氟沙星禁止用于食用动物。尽管 HCE003 对诺氟沙星和氧氟沙星敏感，但其敏感结果仅反映当前漳州地区海马养殖环境中无该类禁用药物的选择压力，并不建议采用这 2 种药物。

海藻希瓦氏菌的耐药机制表现为高度保守。对青霉素类耐药率为 80.0%，这可能源于染色体携带的 blaOXA 酶对 β-内酰胺环的水解作用[41]；HCE070 对氨基糖苷类全部敏感，这与张继挺等[30]报道的美国红鱼部分一致，海藻希瓦氏菌细胞膜上缺乏氨基糖苷类转运蛋白，药物无法进入胞内发挥作用，与弗氏柠檬酸杆菌的敏感机制形成本质差异[42]；对磺胺类 100.0% 耐药，可能与 *sul* 基因有关[28]，该基因编码的二氢蝶酸合成酶变体可抵抗磺胺类药物的竞争性抑制[43]；

对诺氟沙星、氧氟沙星的敏感性与 HCE003 相似，均呈敏感，但二者属农业农村部 2292 号公告禁用药物，即使敏感也严禁用于海马养殖。

轮虫弧菌的耐药谱可能与宿主特异性相关。HCE098 对青霉素类全部耐药，与 β-内酰胺酶对不同青霉素类药物的水解效率差异有关；但对三代头孢敏感(头孢他啶/头孢哌酮)，为合规治疗提供额外选项；对四环素类和磺胺类 100.0% 耐药，与杨求华等[35]海马源菌株一致，也反映了养殖中四环素类和磺胺类药物的滥用[44]；对喹诺酮类全部敏感，仅环丙沙星可作为海马的备选药物，但要遵守用药规范[33]；对氨基糖苷类的耐药率为 25.0%，对其中的庆大霉素和丁胺卡那敏感，仍可作为首选合规药物。

3.3 三株分离菌的致病性

本研究分离到养殖海马的新致病菌弗氏柠檬酸杆菌与海藻希瓦氏菌，为海马体表溃烂病病原多样性提供新依据。研究表明弗氏柠檬酸杆菌的致病性与其携带的编码黏附定殖因子、尿素酶系统及外膜蛋白等毒力基因密切相关[45-46]。尿素酶基因簇(*ure*)可通过水解尿素产氨，改变宿主组织微环境的 pH 值，导致细胞损伤[47]；外膜蛋白(如 *ompX*)能够介导细菌黏附宿主细胞，并抵抗补体系统杀伤[48]。前期基于弧菌属毒力基因(*vvh*、*pPHDD1*、*hlyAch*)预筛的结果，与从患体表溃烂病海马中分离的弗氏柠檬酸杆菌的实际鉴定结果存在偏差。经测序验证，这些扩增产物实为非特异性条带，表明跨属毒力基因检测存在局限性。其中 *vvh* 可编码穿孔毒素，直接破坏宿主细胞膜，这与 HCE003 的 β 溶血表型高度吻合，可能也是其引发海马体表上皮细胞坏死的重要原因。*hlyAch* (溶血相关基因)作为溶血素家族成员，可协同 *vvh* 增强溶血活性，加剧宿主组织的氧化应激与炎症反应。*pPHDD1* (毒性质粒复制起点基因)的存在则暗示该菌株可能携带毒性质粒，为毒力基因的稳定表达与传递提供载体，与 *vvh*、*hlyAch* 协同作用，突破海马薄黏液层与无鳞表皮屏障。通过斑马鱼腹腔注射模型，本研究发现分离株 HCE003 的 LD_{50} 为 1.71×10^5 CFU/mL，该值高于肖双燕等[36]报道的牛蛙源菌株 NFCF-02 (LD_{50}=3.12×10^6 CFU/mL)和李晓英等[49]报道的棘腹蛙源菌株 CQWU201501 (LD_{50}=2.14×10^7 CFU/mL)。这种毒力差异可能与宿主特异性相关，海马体表无鳞片覆盖且黏液层薄，*vvh* 介导的膜穿孔效应更易直接损伤表皮细胞；其肠道短直且缺乏胃部缓冲，*pPHDD1* 质粒相关毒力因子可能更快引发肠道黏膜炎症，而两栖类宿主的皮肤黏液与消化道屏障更能抵抗此类攻击，进一步表明 HCE003 对硬骨鱼类的侵袭力具有宿主适应性优势。

海藻希瓦氏菌是一种致病性海洋细菌，其对鱼类的 LD_{50} 范围为 10^6–10^7 CFU/mL。本研究的分离株对斑马鱼的 LD_{50} 为 3.68×10^5 CFU/mL，毒力高于韩卓然[50]报道的半滑舌鳎源 LD_{50} (1.1×10^6 CFU/mL)、张继挺等[30]报道的对美国红鱼的创伤感染 LD_{50} (3.4×10^6 CFU/mL)和陈偿等[29]报道的对红拟石首鱼注射感染 LD_{50} (2.6×10^7 CFU/尾)，这一强毒力特征与本研究检测到的 *hlyA*、*trh*、*hlyAch* 和 *vhh* 毒力基因簇密切相关。*hlyA* (RTX 溶血素基因)可编码重复毒素单元，通过形成细胞膜孔道导致细胞溶解，与 Tamez 等[41]报道的胶原酶协同作用，胶原酶降解海马皮肤胶原纤维后，*hlyA* 介导的溶解效应可直接作用于皮下组织，加速溃烂深度扩展；*trh* 虽最初发现于副溶血弧菌，但其在 HCE070 中的存在可增强毒素稳定性；*vvh* 与 *hlyAch* 的协同表达则进一步强化溶血能力，也解释了 HCE070 的 β 溶血性。

轮虫弧菌的致病力在不同宿主中呈现显著差异，其毒力强弱与菌株来源、宿主免疫状态及毒力因子表达密切相关。杨求华等[35]报道的海马病原株 HM-10 的 LD_{50} 为 1.51×10^6 CFU/mL，

王凯等[44]分离自许氏平鲉皮肤溃疡的 BZ01 株 LD_{50} 为 2.07×10^6 CFU/mL。该菌对无脊椎动物尤其是幼虫的毒力增强，如 Revilla 等[51]从扇贝幼虫分离的 SA-10GR 株对牡蛎和扇贝幼虫的 LD_{50} 低至 10^4 CFU/mL (24 h 死亡率≥86%)，陈政强等[34]报道的半滑舌鳎病原株 BV1 对鱼类的 LD_{50} 为 6.7×10^3 CFU/mL，凸显宿主特异性对毒力的影响。本研究菌株 HCE098 对斑马鱼的 LD_{50} 为 2.51×10^6 CFU/mL，与文献报道的其他鱼类宿主相比属中等水平，这一特征可能与本研究检测到的 *hlyA*、*trh*、*hlyAch* 和 *vhh* 毒力基因的表达调控相关。*hlyA* 与 *hlyAch* 的组合可解释轮虫弧菌胞外产物(extracellular products, ECP)的蛋白酶与溶血活性，杨求华等[35]和 Revilla 等[51]证实轮虫弧菌的 ECP 损伤效应依赖溶血素与蛋白酶的协同，可降解组织并破坏细胞膜。本研究中 HCE098 的酪蛋白酶水解指数(1.28)虽低于 HCE070 (1.62)，但 *hlyA* 介导的溶解效应可弥补蛋白酶活性的不足，共同降解海马体表黏液蛋白；*trh* 基因的存在则可能增强其在海马体表的定植能力，*trh* 介导的耐热毒素可在创伤部位持续积累。

4 结论

本研究在养殖线纹海马体表溃烂病灶中鉴定出弗氏柠檬酸杆菌和海藻希瓦氏菌 2 种新致病菌。分离菌株(HCE003、HCE070、HCE098)呈现较强致病性(感染斑马鱼 LD_{50} 数量级 10^5–10^6 CFU/mL)与多重耐药性(总耐药率 50.0%–56.7%)，尤其对青霉素类、四环素类、磺胺类普遍耐药。研究结果揭示了病原多样性及耐药风险，建议防控中优先选用庆大霉素等敏感药物，并在养殖过程中关注非弧菌病原的监测。本研究丰富了海马溃烂病的病原库，为精准诊断和防控提供了关键病原学依据；所揭示的新型高毒力、多重耐药菌株的流行对海马养殖业的生物安全体系构建提出了新的挑战和要求。

作者贡献声明

刘飞龙：负责实验的安排、开展，数据处理，撰写初稿；邹文政：关键实验问题的指导；李忠琴：提供研究思路，论文审阅与修改；黄璇璇：协助实验进行、数据分析；蔡鸿娇：协调实验顺利开展；林茂：提供实验场所及仪器。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

[1] Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. Seahorses and other members of the family Syngnathidae (decision 12.54): report of the working group[R]. Johannesburg, South Africa: Twentieth Meeting of the Animals Committee, 2004.

[2] ALCAIDE E, GIL-SANZ C, SANJUÁN E, ESTEVE D, AMARO C, SILVEIRA L. *Vibrio harveyi* causes disease in seahorse, *Hippocampus* sp.[J]. Journal of Fish Diseases, 2001, 24(5): 311-313.

[3] 李营, 王波, 张培玉, 刘洪展, 郑风荣, 王宗兴, 徐宗军, 赵超. 哈维氏弧菌引起的条纹海马表皮溃疡综合征的研究[J]. 水产学报, 2019, 43(5): 1298-1307.
LI Y, WANG B, ZHANG PY, LIU HZ, ZHENG FR, WANG ZX, XU ZJ, ZHAO C. Research on epidermis ulcer syndrome caused by *Vibrio harveyi* in *Hippocampus erectus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(5): 1298-1307 (in Chinese).

[4] BALCÁZAR JL, GALLO-BUENO A, PLANAS M, PINTADO J. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from captive-bred seahorses with disease symptoms[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2010, 97(2): 207-210.

[5] 刘文军, 尚东维, 于小涵, 崔培, 杨燕菁, 孙金辉. 线纹海马副溶血弧菌的分离鉴定及药物筛选[J]. 天津农学院学报, 2022, 29(1): 52-56, 60.
LIU WJ, SHANG DW, YU XH, CUI P, YANG YJ, SUN JH. Isolation, identification and antibiotic susceptibility testing of *Vibrio parahaemolyticus* from *Hippocampus erectus*[J]. Journal of Tianjin Agricultural University, 2022, 29(1): 52-56, 60 (in Chinese).

[6] 温水秀, 邱秦天, 宋月鹏, 黄柯菁, 金珊, 解家松, 赵青松, 徐永健. 养殖大海马烂皮病的病原分离鉴定及其致病性分析[J]. 农业灾害研究, 2021, 11(6): 136-141.
WEN SX, QIU QT, SONG YP, HUANG KJ, JIN S, XIE JS, ZHAO QS, XU YJ. Isolation, identification and pathogenic characteristics of bacterial pathogens from cultured *Hippocampus kuda* with skin ulcers[J]. Journal of Agricultural Catastrophology, 2021, 11(6): 136-141 (in Chinese).

[7] JIANG FY, YANG N, HUANG H, FENG HM, LI Y,

HAN BB. Short communication: recovery of *Vibrio vulnificus* from head ulceration in seahorse (*Hippocampus kuda*)[J]. Aquaculture International, 2020, 28(2): 653-660.

[8] 李海东. 日本海马白斑状皮肤溃烂病病原学及组织病理学研究[D]. 烟台: 鲁东大学, 2015.
LI HD. Etiology and histopathology study for white porphyritic ulcer disease of *Hippocampus japonicus*[D]. Yantai: Ludong University, 2015 (in Chinese).

[9] BALCÁZAR JL, PLANAS M, PINTADO J. *Mycobacterium hippocampi* sp. nov., a rapidly growing scotochromogenic species isolated from a seahorse with tail rot[J]. Current Microbiology, 2014, 69(3): 329-333.

[10] PATEL BJ, WEINSTEIN PM, ELIOPOULOS MG, JENKINS GS, LEWIS II SJ, LIMBAGO B, MATHERS JA, MAZZULLI T, PATEL R, RICHTER SS, SATLIN M, SWENSON MJ, TRACZEWSKI MM, TURNIDGE DJ, ZIMMER LB. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing[M]. 27th Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017: 42-44.

[11] 赵梦瑶, 陈静, 姚嘉赟, 袁雪梅, 黄雷, 彭先启, 张海琪. 罗氏沼虾源弗氏柠檬酸杆菌的分离鉴定及致病性分析[J]. 中国预防兽医学报, 2025, 47(2): 137-143.
ZHAO MY, CHEN J, YAO JY, YUAN XM, HUANG L, PENG XQ, ZHANG HQ. Isolation, identification and pathogenicity analysis of *Citrobacter freundii* from *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2025, 47(2): 137-143 (in Chinese).

[12] BRENNER DJ, KRIEG NR, STALEY JT. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Second edition Part B)[M]. Dordrecht Heidelberg London New York: Springer-Verlag, 2005: 56-65.

[13] 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: 364-399.
DONG XZ, CAI MY. Manual of Systematic and Determinative Bacteriology[M]. Beijing: Science Press, 2001: 364-399 (in Chinese).

[14] 蔺凌云, 潘晓艺, 姚嘉赟, 尹文林, 曹铮, 刘忆瀚, 沈锦玉. 光唇鱼源无乳链球菌的分离鉴定及遗传特征[J]. 微生物学报, 2021, 61(10): 3159-3172.
LIN LY, PAN XY, YAO YY, YIN WL, CAO Z, LIU YH, SHEN JY. Identification and genetic characterization of *Streptococcus agalactiae* isolated from *Acrossocheilus fasciatus* cultured in Zhejiang[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(10): 3159-3172 (in Chinese).

[15] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38(7): 3022-3027.

[16] TERCETI MS, VENCES A, MATANZA XM, DALSGAARD I, PEDERSEN K, OSORIO CR. Molecular epidemiology of *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* outbreaks in marine rainbow trout farms reveals extensive horizontal gene transfer and high genetic diversity[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2155.

[17] RIVAS AJ, BALADO M, LEMOS ML, OSORIO CR. The *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* hemolysins damselysin and HlyA are encoded within a new virulence plasmid[J]. Infection and Immunity, 2011, 79(11): 4617-4627.

[18] VENCES A, RIVAS AJ, LEMOS ML, HUSMANN M, OSORIO CR. Chromosome-encoded hemolysin, phospholipase, and collagenase in plasmidless isolates of *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* contribute to virulence for fish[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(11): e00401-17.

[19] 邓益琴, 徐力文, 张亚秋, 郭志勋, 冯娟. 我国华南沿海海水养殖鱼类病原菌美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damselae*)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.
DENG YQ, XU LW, ZHANG YQ, GUO ZX, FENG J. Analysis of virulence genes and antibiotic resistance of *Photobacterium damselae* isolated from marine fishes in coastal South China[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(11): 2606-2619 (in Chinese).

[20] SARAVANAN V, KUMAR HS, KARUNASAGAR I, KARUNASAGAR I. 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.

[21] JUN TD, OHASHI T, NISHIMURA N, SHIRASAKI Y, OZAKI H, FUKUSHIMA S, TAKANO J, NISHIBUCHI M, TAKEDA Y. 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.

[22] LEE JY, BANG YB, RHEE JH, CHOI SH. Two-stage nested PCR effectiveness for direct detection of *Vibrio vulnificus* in natural samples[J]. Journal of Food Science, 1999, 64(1): 158-162.

[23] 邹文政, 余建明, 蔡鸿娇, 李忠琴, 林茂, 王泽楠. 迟缓爱德华氏菌感染斑马鱼的模型构建及病理分析[J]. 微生物学报, 2023, 63(12): 4686-4697.
ZOU WZ, YU JM, CAI HJ, LI ZQ, LIN M, WANG ZN. Construction and pathological analysis of a zebrafish model infected with *Edwardsiella tarda*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(12): 4686-4697 (in Chinese).

[24] 尚琨, 曲凌云, 王玉芬, 王斌, 赵涵, 高萍, 刘欣. 患腹水病牙鲆病原菌分离、鉴定及病原菌的特性[J]. 水产学报, 2020, 44(2): 266-275.
SHANG K, QU LY, WANG YF, WANG B, ZHAO H, GAO P, LIU X. Isolation, identification and characteristics of pathogenic bacteria from *Paralichthys olivaceus* with ascites[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(2): 266-275 (in Chinese).

[25] 黄莉萍. 黄颡鱼源弗氏柠檬酸杆菌的分离鉴定及病理变化研究[D]. 重庆: 西南大学, 2020.
HUANG LP. Isolation, identification of *Citrobacter freundii* form *Pelteobagrus fulvidraco* and its pathological research[D]. Chongqing: Southwest University, 2020 (in Chinese).

[26] 刘乃瑜, 王至诚, 何宏港, 王卫民, 刘静霞, 罗毅. 鳖源柠檬酸杆菌属新种的分离鉴定与多位点序列[J]. 水产学

报, 2023, 47(3): 203-214.
LIU NY, WANG ZC, HE HG, WANG WM, LIU JX, LUO Y. Identification and multilocus sequence analysis of a novel species of *Citrobacter* isolated from diseased *Pelodiscus sinensis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2023, 47(3): 203-214 (in Chinese).
[27] HAU HH, GRALNICK JA. Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*[J]. Annual Review of Microbiology, 2007, 61: 237-258.
[28] 白和平, 刘畅, 张鹿, 张志强, 吴同垒, 高桂生, 史秋梅. 半滑舌鳎源海藻希瓦氏菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2022(18): 81-84, 142.
BAI HP, LIU C, ZHANG L, ZHANG ZQ, WU TL, GAO GS, SHI QM. Isolation, identification and drug sensitivity test of *Cynoglossus semilaevis*-derived *Shewanella algae*[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2022(18): 81-84, 142 (in Chinese).
[29] 陈偿, 胡超群, 陈晓燕, 张吕平. 新发现的红拟石首鱼溃疡病病原海藻施万氏菌的分离和分子鉴定[J]. 海洋与湖沼, 2003, 34(1): 1-8.
CHEN C, HU CQ, CHEN XY, ZHANG LP. Identification and characterization of *Shewanella algae* as a novel pathogen of ulcer disease of fish *Sciaenops ocellata*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2003, 34(1): 1-8 (in Chinese).
[30] 张继挺, 朱文渊, 王国良. 美国红鱼肾肿大症的病原及其致病性研究[J]. 宁波大学学报(理工版), 2013, 26(1): 6-11.
ZHANG JT, ZHU WY, WANG GL. Pathogeny and pathogenicity of kidney intumesce of *Sciaenops ocellatus*[J]. Journal of Ningbo University (Natural Science & Engineering Edition), 2013, 26(1): 6-11 (in Chinese).
[31] GOMEZ-GIL B, THOMPSON FL, THOMPSON CC, SWINGS J. *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(Pt 1): 239-243.
[32] 高杨. 海蜇病原菌轮虫弧菌的分离及鉴定[J]. 河北渔业, 2021(7): 5-6, 14, 47.
[33] 金春英. 南美白对虾弧菌病病原的分离和鉴定[J]. 海洋环境科学, 2013, 32(5): 647-651.
JIN CY. Identification and characterization of pathogenic bacteria causing vibriosis in cultured American white shrimp (*Penaeus vannamei*) [J]. Marine Environmental Science, 2013, 32(5): 647-651 (in Chinese).
[34] 陈政强, 姚志贤, 林茂, 常建波. 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, 28(6): 147-153.
CHEN ZQ, YAO ZX, LIN M, CHANG JB. Characterization of pathogenic bacteria *Vibrio rotiferianus* isolated from *Cynoglossus semilaevis* Günther[J]. Biotechnology Bulletin, 2012, 28(6): 147-153 (in Chinese).
[35] 杨求华, 郑乐云, 黄种持, 林琪, 陆振, 周宸. 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[J]. 中国水产科学, 2017, 24(5): 1131-1140.
YANG QH, ZHENG LY, HUANG ZC, LIN Q, LU Z, ZHOU C. Identification and characterization of pathogen *Vibrio rotiferianus*, a pathogen isolated from *Hippocampus erectus* with tail-rot disease[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(5): 1131-1140 (in Chinese).
[36] 肖双燕, 韦冬冬, 刘明珠, 黄静, 余庆, 蒙兰丽, 李鹏飞. 广西地区美国牛蛙源弗氏柠檬酸杆菌的分离鉴定、耐药性及组织病理[J]. 水产学报, 2024, 48(5): 118-130.
XIAO SY, WEI DD, LIU MZ, HUANG J, YU Q, MENG LL, LI PF. Isolation, identification, drug resistance and histopathology of *Citrobacter freundii* from bullfrog (*Rana catesbeiana*) in Guangxi[J]. Journal of Fisheries of China, 2024, 48(5): 118-130 (in Chinese).
[37] 李睿. β-内酰胺酶抑制剂抑酶机理的理论研究[D]. 济南: 山东大学, 2009.
LI R. Theoretical study on the inhibition mechanism of β-lactamase by inhibitors[D]. Jinan: Shandong University, 2009 (in Chinese).
[38] 蒋鑫鑫. 鱼源弗氏柠檬酸杆菌 *tet*(X4)耐药质粒的鉴定及影响其接合转移的因素研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2024.
JIANG XX. Identification of *tet*(X4) resistant plasmid from fish-derived *Citrobacter freundii* and the factors affecting conjugative transfer[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2024 (in Chinese).
[39] 刘张淮, 吴霆, 王家军, 朱春艳, 张荧荧, 孟庆国. 克氏原螯虾烂尾病病原的分离鉴定及其相关特性分析[J]. 水产科学, 2022, 41(1): 102-109.
LIU ZH, WU T, WANG JJ, ZHU CY, ZHANG YY, MENG QG. Isolation, identification and related characteristics analysis of pathogen isolated from red swamp crayfish *Procambarus clarkii* with tail-rotted disease[J]. Fisheries Science, 2022, 41(1): 102-109 (in Chinese).
[40] 孙威. 大口黑鲈源弗氏柠檬酸杆菌分离鉴定及检测方法的建立[D]. 扬州: 扬州大学, 2024.
SUN W. Isolation and identification of *Citrobacter freundii* from *Micropterus salmoides* and establishment of detection methods[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2024 (in Chinese).
[41] TAMEZ AM, McLAUGHLIN RW, LI J, WAN XL, ZHENG JS. Searching for putative virulence factors in the genomes of *Shewanella indica* and *Shewanella algae*[J]. Archives of Microbiology, 2021, 203(2): 683-692.
[42] 赵静. 球孢白僵菌氨基糖苷磷酸转移酶(Bbaph)与ABC转运蛋白(BbT1)的功能分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2013.
ZHAO J. Functional characterization of beauverua *Bassiana* aminoglycoside phosphotransferase (Bbaph) and ABC transforter protein (BbT1)[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013 (in Chinese).
[43] JIANG H, DONG YZ, JIAO X, TANG B, FENG T, LI P, FANG JH. *In vivo* fitness of *sul* gene-dependent sulfonamide-resistant *Escherichia coli* in the mammalian gut[J]. mSystems, 2024, 9(9): e0083624.
[44] 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鲉的病原菌分离与鉴定[J]. 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*)[J]. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(1): 119-126 (in Chinese).

[45] 苗珍, 李席席, 高晓建, 张双明, 姜姿妍, 陈启运, 童帅旗, 张晓君. 中华绒螯蟹病原弗氏柠檬酸杆菌的鉴定及其毒力基因检测[J]. 畜牧与兽医, 2020, 52(10): 85-90.
MIAO Z, LI XX, GAO XJ, ZHANG SM, JIANG ZY, CHEN QY, TONG SQ, ZHANG XJ. Identification and virulence genes detection of pathogenic *Citrobacter freundii* isolated from *Eriocheir sinensis*[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2020, 52(10): 85-90 (in Chinese).

[46] GUMA S, JIANG ZY, ZHANG YJ, WU CC, CHEN Z, XU JW, JIANG Q, ZHANG XJ, WANG CB, GAO XJ. The pathogenic characterization of *Citrobacter freundii* and its activation on immune related genes in *Macrobrachium nipponense*[J]. Microbial Pathogenesis, 2022, 169: 105682.

[47] GRAHL MVC, UBERTI AF, BROLL V, BACAICOA-CARUSO P, MEIRELLES EF, CARLINI CR. *Proteus mirabilis* urease: unsuspected non-enzymatic properties relevant to pathogenicity[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(13): 7205.

[48] ZHOU G, WANG YS, PENG H, LI SJ, SUN TL, LI CL, SHI QS, XIE XB. *ompX* contribute to biofilm formation, osmotic response and swimming motility in *Citrobacter werkmanii*[J]. Gene, 2023, 851: 147019.

[49] 李晓英, 罗洁, 杜孝田, 龙方伟, 胡凯, 徐敬明, 樊汶樵. 棘腹蛙“水肿病”病原的分离鉴定[J]. 动物医学进展, 2016, 37(8): 116-119.
LI XY, LUO J, DU XT, LONG FW, HU K, XU JM, FAN WQ. Isolation and identification of pathogenic bacteria caused “edema disease” in *Paa boulengeri*[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2016, 37(8): 116-119 (in Chinese).

[50] 韩卓然. 海藻希瓦氏菌对半滑舌鳎致病性及诱导肠道免疫相关基因差异表达研究[D]. 天津: 天津农学院, 2017.
HAN ZR. The pathogenicity and differential expression of immune-related genes from intestine of *Cynoglossus semilaevis* induced by the infection of *Shewanella algae*[D]. Tianjin: Tianjin Agricultural University, 2017 (in Chinese).

[51] REVILLA J, RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ S, SOLÓRZANO R, REYES G, BARJA JL. First draft genome sequence of *Vibrio rotiferianus* isolated from diseased larvae of the spiny rock-scallop *Spondylus limbatus* during hatchery outbreaks[J]. Microbial Pathogenesis, 2025, 205: 107617.