

人工养殖点带石斑鱼弧菌病病原菌的分离及鉴定*

陈晓燕 胡超群 陈 偿 张吕平 任春华

(中国科学院南海海洋研究所 广州 510301)

提要 广东、海南两省多个海水网箱养殖场养殖的点带石斑鱼(*Epinephelus malabaricus*)发生严重的弧菌病，从海南三亚和广东深圳的发病鱼病灶上分离到2株致病性细菌VAL02和VAL00，经人工回接感染实验证明这2株菌引起点带石斑鱼弧菌病，VAL02对点带石斑鱼苗的半致死量是 2.25×10^5 cfu/g。经形态及生理生化特征分析，鉴定出VAL02及VAL00均为溶藻弧菌。应用药敏纸片法研究了22种化学疗剂对VAL02及溶藻弧菌标准株的生长抑制作用，发现VAL02对氯霉素、氟哌酸、卡那霉素和乙酰螺旋霉素等产生耐药性，对复方新诺明和环丙沙星等敏感。

关键词 点带石斑鱼(*Epinephelus malabaricus*)，弧菌病，溶藻弧菌，药敏性

中图分类号 S943 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)06-0068-05

点带石斑鱼(*Epinephelus malabaricus*)是广东、海南、福建等省份广泛养殖的海水名贵食用鱼类。近几年，人工养殖的石斑鱼常发生溃疡病，发病的鱼大量死亡，使养殖者蒙受了极大的经济损失。从2000年5月到2001年5月，在广东省的深圳、珠海、阳江、湛江、海南省的三亚和陵水等地海水网箱养殖场的调查发现，夏天，养殖的石斑鱼均有不同程度的溃疡症发生，且不易控制。发病鱼的症状为：鱼体表有溃疡，腮、鳍等充血，腹腔积液，肝严重肿大，肾、脾等脏器毛细血管充血，为典型的弧菌病症状。在濒死鱼病变部位取样，分离纯化得到优势菌株。细菌鉴定实验发现这些菌株大部分是溶藻弧菌，人工感染实验结果证实溶藻弧菌就是点带石斑鱼弧菌病的病原菌。

1 材料和方法

1.1 病原菌的分离

2000年6月，深圳市南澳网箱养殖的点带石斑鱼发生了溃疡病，石斑鱼在1个月内死亡数目超过80%；2001年3月，海南三亚红沙网箱养殖的点带石斑鱼苗发生了弧菌病，在1周时间内鱼苗全部死亡。用清水洗净病鱼，75%酒精棉球擦拭体表，无菌生理盐水淋洗，用无菌纱布吸干水份，置紫外灯下照射20 min后，用无菌的细菌接种环，在溃疡深处及鱼腹内病变部位取样，接种于2216E培养基(含5%蛋白胨，3%牛肉膏，1%酵母膏和2%NaCl)斜面上，室温中培养24~48 h，挑取优势菌落在TCBS平板上划线培养，

挑取单菌落转接于2216E培养基斜面上待用。

1.2 感染试验

1.2.1 人工感染实验

2001年6月在本所大亚湾实验站进行感染实验，实验所用鱼苗为质量10~20 g的健康点带石斑鱼鱼苗。感染前先于养殖池中驯养3 d。养殖水温26~28℃，盐度29.5~31.2，pH值为8.1~8.3，连续充气，每天投喂小杂鱼两次，换水1次。

从海南红沙分离的VAL02号菌株采用背肌注射(表1、表2)、腹腔注射(表4)和创伤浸泡(表3)的感染方式^[1]进行感染，该菌对点带石斑鱼的半致死量按照文献[2]的方法计算。从深圳南澳分离的VAL00号菌作腹腔注射感染(表4)。细菌浓度计算方式为：将菌液做系列稀释，倾注平板培养后计算活菌数。注射感染剂量为0.1 mL/尾，对照组每尾鱼注射0.1 mL灭菌0.9%NaCl。

* 国家重点基础研究专项经费G1999012003号和中国科学院知识创新工程项目KSCX2-1-0406号。

第一作者：陈晓燕，出生于1966年，博士，工程师，从事海洋生物病害研究。通信地址：518000，深圳市华侨城荔新村12栋201户。E-mail:cxy2052-cn@sina.com

收稿日期：2002-04-28；修回日期：2002-08-31

1.2.2 病原菌再分离及鉴定

在感染实验中有充血症状且濒死的鱼病灶处取样，于TCBS平板上反复划线纯化得到单菌落，将再分离菌株与原菌株一起做细菌菌种鉴定。再分离的VAL02号菌做第2次背肌注射感染实验。

1.3 细菌鉴定实验

细菌生化鉴定微量测定管采用杭州天和微生物有限公司和法国梅里埃公司的产品。各项测试液均含有1%~3.5%的NaCl。测定时以溶藻弧菌标准株作为对照(购自中科院微生物研究所菌种保藏室)。

1.4 药敏试验

药敏试验按文献[3]的方法进行。所使用的药敏纸片及含2%NaCl的水解酪蛋白琼脂均购自杭州天和微生物有限公司。

1.5 细菌质粒的提取及鉴定

将活化的VAL02和VAL00菌种分别接种到200mL2.5%NaCl的营养培养基中，30℃培养24h，离心收集细菌用碱裂解法提取质粒^[4]。提取的样品作1%

的琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭染色，紫外灯下观察核酸条带。

2 结果

2.1 人工感染实验

不同浓度的VAL02号菌背肌注射感染石斑鱼鱼苗的结果见表1，当背肌注射的菌量为 1.9×10^5 时，7d观察时间内，鱼苗的累计死亡率为25%，计算得VAL02号菌的半致死量是 2.25×10^5 cfu/g。VAL02菌的二次感染实验及浸泡感染实验结果见表2、3，背肌注射的菌量为 5.2×10^5 时，7d鱼苗死亡率为67%，浸泡菌量为 1.8×10^6 时，鱼苗两天内死亡率为100%。死亡鱼苗腹腔积液，肠肿大充水，肝严重肿大，鳃、肾、脾等脏器充血，胸鳍或尾鳍有出血点，与网箱养殖的患病鱼苗的症状相似。VAL00号菌腹腔注射感染石斑鱼的实验结果见表4，给实验鱼苗腹腔注射 1.1×10^6 细菌数量的VAL02和VAL00，7d观察时间内，注射VAL02号菌的石斑鱼累计死亡率为50%，注射VAL00号菌的石斑鱼累计死亡率为33%，且死亡

表1 VAL02号菌背肌注射第1次感染实验结果

Tab.1 Results of juvenile malabar grouper, *Epinephelus malabaricus* Challenged with VAL02 for the first time

菌液浓度 (个/mL)	试验鱼数 (尾)	鱼苗死亡数(尾)							总死亡数 (尾)	死亡率 (%)
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d		
1.9×10^8	8	5	2	1					8	100
1.9×10^7	8	4	2	1	1				8	100
1.9×10^6	8	1	1	0	0	0	0	0	2	25
1.9×10^5	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1.9×10^4	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
对照	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表2 VAL02号菌背肌注射第2次感染实验结果

Tab.2 Results of juvenile malabar grouper, *Epinephelus malabaricus* Challenged with VAL02 for the second time

菌液浓度 (个/mL)	试验鱼数 (尾)	鱼苗死亡数(尾)							总死亡数 (尾)	死亡率 (%)
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d		
5.2×10^7	6	6							6	100
5.2×10^6	6	2	2	0	0	0	0	0	4	67
对照	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表3 VAL02号菌创伤病泡感染实验结果

Tab.3 Results of juvenile malabar grouper, *Epinephelus malabaricus* bathed in water with bacterium VAL02

菌液浓度 (个/mL)	试验鱼数 (尾)	鱼苗死亡数(尾)							总死亡数 (尾)	死亡率 (%)
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d		
1.8×10^7	9	9							9	100
1.8×10^6	8	3	5						8	100
对照	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表 4 VAL02, VAL00 号菌腹腔注射感染点带石斑鱼的结果

Tab. 4 Results of juvenile malabar grouper, *Epinephelus malabaricus* Challenged with isolated bacteria VAL02 and VAL00

细菌 编号	菌液浓度 (个/mL)	试验鱼数 (尾)	鱼苗死亡数(尾)							总死亡数 (尾)	死亡率 (%)
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d		
VAL02	1.1×10^7	6	2	1	0	0	0	0	0	3	50
VAL00	1.1×10^7	6	2	0	0	0	0	0	0	2	33
对照		6	0	0	0	0	0	0	0	0	0

鱼的症状与上面所描述的一样。

2.2 细菌鉴定

对分离的细菌进行了多项生理生化指标的检测和分析, 其结果见表 5。VAL02, VAL00 号菌的各项指

标与溶藻弧菌相符^[5], 最后鉴定为溶藻弧菌。从感染实验中出现溃疡症而死亡的病鱼病灶中取样, 用 TCBS 平板反复划线分离得到的优势菌株, 其生理生化指标, 与 VAL02, VAL00 号菌一致。

表 5 分离菌株的生理生化特征

Tab. 5 Physiological and biochemical characteristics of isolated bacteria of *Vibrio alginolyticus*

测试项目	VAL02	VAL00	溶藻弧菌标准株	测试项目	VAL02	VAL00	溶藻弧菌标准株
革兰氏染色	-	-	-	蛋白胨水	+		
短杆菌	+	+	+	麦芽糖发酵	-	-	-
极生鞭毛	+	+	+	甘露糖发酵	+	+	+
泳动性	+	+	+	甘露醇发酵	+	+	+
TCBS 上生长	黄	黄	黄色	半乳糖发酵	+	+	+
0/129 抑制 10 μg	+	+	-	肌醇发酵	-	-	-
0/129 抑制 150 μg	+	+	+	葡萄糖发酵	+	+	+
0% NaCl 生长	-	-	-	蔗糖发酵	+	+	+
3% NaCl 生长	+	+	+	阿拉伯糖发酵	-	-	-
6% NaCl 生长	+	+	+	纤维二糖发酵	+	-	-
8% NaCl 生长	-	+	+	山梨糖发酵	-	-	-
10% NaCl 生长	-	-	+	乳糖发酵	-	-	-
4℃ 生长	-	-	-	蜜二糖发酵	-	-	-
35℃ 生长	+	+	+	木糖发酵	-	-	-
40℃ 生长	+	+	+	山梨醇发酵	-	-	-
O/F 试验	+/-	+/-	+	水杨素发酵	-	-	-
精氨酸双水解酶	-	-	-	V-P	-	-	-
赖氨酸脱羧酶	+	+	+	丙二酸盐	-	-	-
鸟氨酸脱羧酶	-	-	+	硝酸盐还原	-	-	+
氧化酶	+	+	+	葡萄糖酸盐利用	-	-	+
明胶酶	-	-	+	七叶苷利用	-	-	-
淀粉酶	+	+	+	硫化氢产生	-	-	-
葡萄糖产气	-	-	-	醋酸盐利用	-	-	-
尿素	+	+	+	柠檬酸盐利用	+	+	+

2.3 药敏试验

VAL02 号菌的体外药敏试验结果见表 6, 该菌对复方新诺明、环丙沙星、新霉素和新生霉素敏感, 而对比较常用的化学疗剂如青霉素类和头孢类、氟哌酸和氯霉素则不敏感。比较溶藻弧菌标准株对相应化学疗剂的敏感性可以看到, 两个菌株都对青霉素类和头孢

类的抗菌素不敏感, 溶藻弧菌标准株对氟哌酸、氯霉素、卡那霉素和乙酰螺旋霉素敏感, 而 VAL02 对这些抗菌素产生了抗性。

2.4 溶藻弧菌质粒的检测

经碱法提取和电泳检测质粒 DNA, 发现 VAL02 和 VAL00 菌中均无质粒 DNA。

表 6 病原菌 VAL02 的药敏试验结果

Tab. 6 Sensitivities of pathogenic bacteria strain VAL02 of *Vibrio alginolyticus* to pharmaceuticals

药物名称及剂量(μg)	抑菌圈直径(mm)		药物名称及剂量(μg)	抑菌圈直径(mm)	
	VAL02	溶藻弧菌标准株		VAL02	溶藻弧菌标准株
复方新诺明(23.75)	21	22	四环素(30)	16.5	17
氨苄青霉素(10)	0	0	卡那霉素(30)	0	12
羧苄青霉素(100)	0	0	新霉素(30)	18	18
青霉素(10u)	0	0	新生霉素(30)	17	13
丁胺卡那(30)	11.2	12	麦迪霉素(30)	13	13
氟哌酸(10)	0	16	先锋V(30)	0	11
红霉素(15)	17	11	先锋VI(30)	0	0
氯霉素(30)	0	21	强力霉素(30)	15	
链霉素(300)	20.5	14	乙酰螺旋霉素(30)	0	15
庆大霉素(120)	19	15	特美汀(10)	17	
环丙沙星(5)	24	22	万古霉素(30)	0	0

3 讨论

从人工感染实验结果可以推测, VAL02 和 VAL00 是点带石斑鱼弧菌病的病原菌, 感染的鱼一般在两天内死亡, 表明这两株菌属于急性感染菌。对这两株菌的生理生化分析结果表明, 这两株菌为溶藻弧菌, 一种嗜温和嗜盐的机会致病菌。溶藻弧菌是海洋中广泛分布的一种细菌^[6]。西班牙养殖的鲈鱼和鲷鱼^[7]、澳大利亚养殖的尖吻鲈(*Lates calcarifer*)、日本养殖的真鲷(*Pagrus major*)^[8]及我国南方海域养殖的赤点石斑鱼(*E. akaara*)^[9]都曾患过由溶藻弧菌引起的弧菌病。Lee 曾报道 1991 年在台湾养殖的点带石斑鱼鱼苗中分离到一株毒性很强的溶藻弧菌 S3y^[10], 该菌对石斑鱼的致死量是 500 cfu/g, 其毒性比这次分离的 VAL02(半数致死量为 2.25×10^5 cfu/g) 强, 表明 S3y 与 VAL02 和 VAL00 的毒力有显著差异, 而这很可能是它们的外毒素毒力有差异。VAL02 的毒力与 1998 年分离自海南三亚的鮆点石斑(*Epinephelus fario*)^[11]、及分离自广东阳江的溶藻弧菌的毒力相近^[12]。对 VAL02 所作的药敏试验的结果显示, 该菌对青霉素类药、氟哌酸和氯霉素等化学疗剂有抵抗力, 而根据以往的报导及对溶藻弧菌标准株的药敏性检测结果, 溶藻弧菌对氯霉素是敏感的^[12,13], 表明 VAL02 的耐药性发生了变化, 有研究指出, 弧菌对化学疗剂的抵抗力主要来自其染色体^[13], 本文实验表明溶藻弧菌 VAL02 及 VAL00 不带质粒, 这提示 VAL02 的耐药性可能与质粒无关, 而很可能是其染色体发生了变化。

分离 VAL02 号菌和 VAL00 号菌的地区、海域不同, 但患病鱼的症状相似, 其病原菌均为溶藻弧菌, 这表明在广东、海南两省, 溶藻弧菌是人工养殖的点带石斑鱼弧菌病的重要病原菌。

参考文献

- 朱传华, 彭永红. F-9601^{*}细菌对石斑鱼的感染和免疫. 南海水产研究, 1996, 13: 52-56
- 张桥. 卫生毒理学基础(第三版). 北京: 人民卫生出版社, 2001. 113-114
- 娄永新, 王金良. 实用临床细菌学检验与进展. 天津: 天津科技翻译出版公司, 1993. 254-260
- 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南(第三版). 北京: 科学出版社, 1998. 26-27
- Peter H A. Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. 532-535
- Barbieri E, Falzano C. Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic *Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic coast. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(6): 2748-2753
- Rodgers C J, Furones M D. Disease problems in cultured marine fish in Mediterranean. Fish Pathology, 1998, 33(4): 157-164
- Iwata K, Tanohara Y, Ishibashi O. Studies on factors related to mortality of young red seabream (*Pagrus major*) in the artificial seed production. Fish Pathology, 1978, 13: 97-102
- 吴后波, 吴灶和, 潘金培. 海水网箱养殖赤点石斑鱼溃疡病致病菌研究, 热带海洋研究(五). 北京: 科学出版社, 1997. 91-95
- Lee K K. Protease and virulence of the extracellular products produced by *Vibrio carchariae* after growth on various media. Microb Pathog, 1995, 19: 39-48
- 何建国, 黄致坚. 海水鱼类溶藻弧菌致病性的初步研究. 华南师范大学学报(自然科学版), 1998(增刊): 53-55
- 冯娟, 陈毕生, 王江勇, 等. 海水网箱养殖石斑鱼体表溃疡病病原-溶藻弧菌的研究. 南海水产研究, 2001, 22: 49-52

研究报告 *R*EPORTS

- 13 Li J, Yie J, Foo RWT, et al. Antibiotic Resistance and
Plasmid Profiles of *Vibrio* Isolates from Cultured Silver Sea
Bream, *Sparus sarba*. Marine Pollution Bulletin, 1999, 39
(1-12): 245-249

CHARACTERISTICS OF PATHOGENIC BACTERIA OF VIBRIOSIS IN CAGED MALABAR GROUPER, *Epinephelus* *malabaricus*

CHEN Xiao-Yan HU Chao-Qun CHEN Chang ZHANG Lü-Ping REN Chun-Hua
(South China Sea Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, 510301)

Received: Apr., 28, 2002

Key Words: Grouper (*Epinephelus malabaricus*), Vibriosis, *Vibrio alginolyticus*, Sensitivities to chemotherapeuticant

Abstract

Cage-cultured groupers have suffered from severe ulcerative disease in Guangdong and Hainan Province in the last two years. Two pathogenic vibrios, strain VAL02 and VAL00 were isolated from outbreaks of vibriosis which caused death of malabar groupers, *Epinephelus malabaricus* in Sanya, Hainan Province in March 2001 and in Shenzhen, Guangdong Province in June 2000. They were identified as *Vibrio alginolyticus* on the basis of their characteristics and a number of biochemical tests. Strain VAL02's LD₅₀ was 2.25×10^5 cfu/g. It was sensitive to chemotherapeutics such as sulfamethoxazole and ciprofloxacin, and was resistant to penicillin, norfloxacin and chloramphenicol.

(本文编辑:刘珊珊)