

# 鲑点石斑鱼细菌病原的分离鉴定和致病性\*

黄志坚, 何建国

(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

**摘要:** 对海南省三亚地区网箱养殖的发病鲑点石斑鱼 (*Epinephelus fario*) 进行病原分离, 通过常规细菌学鉴定和应用 ATB 半自动鉴定系统及 VITEK-AMS-60 自动微生物鉴定系统, 并与有关的标准菌株为对照, 鉴定为溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)。小鼠毒性实验和不同方式感染鲑点石斑鱼实验的结果表明, 该菌对小鼠有极强的毒力, 不同感染方式感染鲑点石斑鱼表现不同程度的致病性。同时测定了溶藻弧菌对小鼠和鲑点石斑鱼的 LD<sub>50</sub> 分别为  $3 \times 10^5$  个/mL 和  $2 \times 10^7$  个/mL。进一步比较溶藻弧菌对青石斑鱼 (*Epinephelus owoara*)、真鲷 (*Pagrosomus major*)、平鲷 (*Rhabdosargus sarba*)、黑鲷 (*Sparus aurata*)、红鳍笛鲷 (*Lutjanus erythropterus*)、黄斑蓝子鱼 (*Siganus oramia*) 等一些常见海水养殖鱼类的致病性, 该菌能导致不同海水养殖鱼类死亡并表现一定程度的症状。

**关键词:** 鲑点石斑鱼; 溶藻弧菌; 致病性

中图分类号: S941 文献标识码: A 文章编号: 0529-6579 (2002) 05-0064-04

石斑鱼 (*Epinephelus* sp.) 为暖水性礁栖鱼类, 广泛分布于印度洋和太平洋的热带、亚热带海域, 是驰名世界的海鲜珍品之一。鲑点石斑鱼 (*Epinephelus fario*) 又称为芝麻斑石斑鱼, 是石斑鱼的主要养殖品种之一。细菌病是石斑鱼养殖中的主要病害之一, 严重时死亡率高达 70%~80%, 造成巨大的经济损失。作者从患病石斑鱼分离多株致病菌, 鉴定为溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*), 并研究该菌对小鼠和鲑点石斑鱼的毒力和致病性, 同时比较研究该菌对常见海水养殖鱼类的致病性。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

Va-1 至 Va-7 菌株系从患病鲑点石斑鱼分离, Va-8 菌株、Va-9 菌株、Va-11 菌株、Va-13 菌株分别为西班牙马拉加大学 Dr. Morinigo, 美国伊利诺伊大学 Wei dong Zhou, 日本名古屋大学 Mr. Michio Homma 和日本东京大学海洋研究所 Mr. Kazuhio Kogure 赠送, Va-10 菌株和 Va-12 菌株分别购于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC) 和中国医学细菌保藏中心 (CMCC)。

### 1.2 患病鲑点石斑鱼

来源于海南省三亚南海水产研究所热带水产研究开发中心和广东省惠州市广东省大亚湾水产增殖种苗培育中心。

### 1.3 实验鱼

鲑点石斑鱼及青石斑鱼 (*Epinephelus owoara*)、真鲷 (*Pagrosomus major*)、平鲷 (*Rhabdosargus sarba*)、黑鲷 (*Sparus aurata*)、红鳍笛鲷 (*Lutjanus erythropterus*)、黄斑蓝子鱼 (*Siganus oramia*) 等其他海水养殖鱼类来源于广东省惠州市广东省大亚湾水产增殖种苗培育中心。健康鱼均质量为 30~40 g, 饲喂于圆形塑料水族箱 (约 30 L) 中, 充氧, 上覆盖纱网, 7 d 无异常后用于感染试验。

### 1.4 小鼠

来源于广东省医学实验动物中心, NIH 纯系, 18~22 g, 雌雄各半。饲喂 7 d 无异常后进行致病力试验。

### 1.5 鉴定仪器

1.5.1 自动微生物鉴定系统 采用广东省老年医学研究所实验中心的美国自动微生物鉴定系统 (VITEK-AMS-60), 鉴定板为美国进口 J132K 革兰氏阴性菌种鉴定卡 (GNI)。

1.5.2 半自动微生物鉴定系统 采用法国生物梅里埃公司的 ATB 半自动微生物鉴定系统, 鉴定条为 GN ID32。

### 1.6 鲑点石斑鱼细菌病病原分离

取不同来源的濒死鲑点石斑鱼, 用酒精消毒体表, 以无菌操作取病鱼病灶、肝、肾、脾、腹水、胃肠组织等, 无菌剪刀剪一小缺口或将组织剪碎后

\* 收稿日期: 2002-03-04

基金项目: 国家“863”计划基金资助项目 (2001AA622020); 广东省科技厅资助项目 (A3050201)

作者简介: 黄志坚 (1970年生) 男, 博士; 通讯联系人: 何建国; E-mail: isbr05@zsu.edu.cn

用无菌匀浆器匀浆。然后用接种环在 TSA + NaCl ( $\rho=1\%$ ) 琼脂平板上划线接种, 于 28 °C 下培养 18 ~ 24 h, 在平板上出现较多形态一致的菌落, 选取单个菌落进行纯化, 以供鉴定和感染试验用。同时接种 TCBS 琼脂培养基以进行初步鉴定。

### 1.7 致病力检测

将菌株接种于 TSA + NaCl ( $\rho=1\%$ ) 琼脂斜面, 28 °C 培养 18 ~ 24 h, 用无菌 PBS 液 (pH 7.2) 洗下制成悬液, 参照麦氏比浊管调整菌液浓度成 MCF3 管 ( $9 \times 10^8$  个/mL), 然后腹腔注射小白鼠, 采用不同方式感染鲑点石斑鱼, 并用肌肉注射方式感染其他海水鱼类, 剂量为 0.4 mL/尾 (只)。对照组注射无菌 PBS 液 (pH 7.2)。注射后消毒小白鼠体表, 置于鼠笼中喂养。

鲑点石斑鱼和其他海水鱼类置水族箱 (约 30 L) 中饲养, 充氧, 水温控制在 27.3 ~ 32.4 °C, 盐度 27.8 ~ 35.3 g/L, pH 8.11 ~ 8.56, 溶解氧 5.51 ~ 6.73 mg/L。逐日观察, 记录发病及死亡情况。

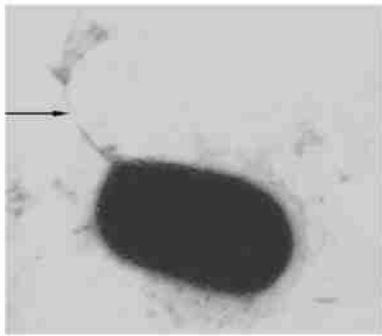


图 1 溶藻弧菌菌体形态 (示鞭毛) ( $\times 20\ 000$ )

Fig 1 The shape and flagellum of *Vibrio alginolyticus* under electron microscope  
箭头: 示鞭毛

### 1.8 对小鼠、鲑点石斑鱼 LD<sub>50</sub>的测定

将一定浓度的菌液梯度稀释, 分别感染小鼠和鲑点石斑鱼, 按 Reed Muench 方法计算 LD<sub>50</sub>。

### 1.9 病原菌回收和重复感染

选取致病力较强的 Va 3 菌株感染鲑点石斑鱼, 从发病鱼分离得到 Va 3-1, 再将 Va 3-1 感染健康鲑点石斑鱼, 以证实其致病性。

### 1.10 病原菌细菌学常规鉴定

参照文献<sup>[1-3]</sup>, 按常规鉴定方法测定菌株的生理生化特性和糖醇发酵特性, 同时以标准菌株为对照进行系统鉴定。

### 1.11 鉴定系统鉴定

将选取菌株接种 TSA + NaCl ( $\rho=1\%$ ) 培养基, 用 VITEK AMS 60 自动微生物鉴定系统和生物梅里埃公司的 ATB 半自动微生物鉴定系统鉴定。

## 2 结果

### 2.1 病原菌培养特性

在不同来源病鱼的不同组织分离到较多细菌, 通过平板划线纯化, 比较 Va-1 至 Va-7 各菌株的菌落特点及主要的生物学特性, 选取 Va-1, Va-2, Va-3 菌株供试验用。

Va 菌株在 TSA + NaCl ( $\rho=1\%$ ) 培养基上生长旺盛, 可形成湿润、光滑、圆形、混浊的菌落, 大小约 1 ~ 2 mm。在 TCBS (硫代硫酸盐/柠檬酸盐/胆盐/蔗糖) 培养基上形成约 2 mm 大小的黄色菌落。生长  $\rho$  (NaCl) 为 0.5% ~ 12% 范围, 但在无盐蛋白胨水中不生长。生长温度范围 10 ~ 45 °C, 在 5 °C 和 50 °C 不发育。于 pH 5 ~ 12 范围均能生长, 最适 pH 6 ~ 10。

### 2.2 病原菌菌体形态和生物学特性

经过筛选比较, 选取 Va-1、Va-2、Va-3 菌株以及 Va-8 至 Va-13 菌株进行细菌学鉴定。Va 菌株为革兰氏阴性菌, 直或弯曲, 单个或偶尔联成 S 形或螺旋形, 通常在固体培养基上以单极生鞭毛运动 (图 1), 在液体培养基中以丛生或侧生多鞭毛运动。没有荚膜, 不形成芽孢。其生理生化特性和糖醇发酵特性见表 1。经鉴定为溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)。

### 2.3 细菌鉴定系统测定结果

ATB 半自动鉴定系统和 VITEK-AMS 60 自动鉴定系统测定的结果与细菌学鉴定结果一致, 也为溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)。

### 2.4 对小鼠的毒力

在一周的感染试验期内, 感染的小鼠表现为竖毛, 匍匐不动, 呼吸困难。不同菌株表现为不同程度的毒力, 其中以 Va-3、Va-10、Va-12 菌株对小鼠的致病力最强, 小鼠死亡率达 100%, 其他菌株表现为不同程度的致病力, 小鼠死亡率为 50% ~ 90%。对照组小鼠仍健活。

### 2.5 不同方式感染鲑点石斑鱼

Va-3 菌株不同方式感染鲑点石斑鱼, 在实验期内表现为不同程度的致病力。其中以肌肉注射方式感染的鲑点石斑鱼死亡率较高, 达 100%, 症状最为明显, 表现为背部肌肉溃烂, 烂尾, 胸鳍腹鳍基部出血, 眼球突出, 混浊, 腹部膨胀, 有腹水, 肝脏灰白, 肾脏充血, 多在一周内死亡, 与自然发病的病鱼症状一致, 致病力最强。其次是腹腔注射和划痕浸泡感染方式, 死亡率为 80%, 未划痕浸泡感染和口服感染组也有一定的致病力, 死亡率分别为 40% 和 60%。对照组的鲑点石斑鱼没表现任何症状。

表 1 Va 菌株的生理生化特性

Tab 1 The physical and biochemical characteristics of the experiment strains

项目	Va-1	Va-2	Va-3	Va-8	Va-9	Va-10	Va-11	Va-12	Va-13	项目	Va-1	Va-2	Va-3	Va-8	Va-9	Va-10	Va-11	Va-12	Va-13
革兰氏染色	G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup>	精氨酸双水解酶	-	-	-	-	-	-	-	-	-
氧化酶	+	+	+	+	+	+	+	+	+	苯丙氨酸脱氨酶	-	-	-	-	-	-	-	-	-
过氧化氢酶	+	+	+	+	+	+	+	+	+	赖氨酸脱羧酶	+	+	+	+	+	+	+	+	+
动力性	+	+	+	+	+	+	+	+	+	鸟氨酸脱羧酶	+	+	+	+	+	+	+	+	+
O/F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	O/129 (150 $\mu$ g)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M/R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	液化明胶	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V.P	+	+	+	+	+	+	+	+	+	柠檬酸利用	-	-	-	-	-	-	-	-	-
吲哚	+	+	+	+	+	+	+	+	+	葡萄糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+
硝酸盐还原	+	+	+	+	+	+	+	+	+	蔗糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	甘露醇	+	+	+	+	+	+	+	+	+
淀粉水解	+	+	+	+	+	+	+	+	+	乳糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	肌醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-
脲酶	+	+	+	+	+	+	+	+	+	水杨素	-	-	-	-	-	-	-	-	-
麦芽糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	阿拉伯糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-
甘露糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+										

## 2.6 感染常见海水养殖鱼类

用 Va-3 菌株采用肌肉注射方式感染鲑点石斑鱼、青石斑鱼、真鲷、平鲷、黑鲷、红鳍笛鲷、黄斑蓝子鱼等 4 科 7 种海水鱼类, 均具有较强的致病性。在 7 d 实验期内表现不同程度的致病性和感染症状, 大多体色较黑, 背部肌肉溃烂, 有的露出骨头, 尾柄处鳞片脱落, 烂尾, 胸鳍腹鳍基部出血, 眼球突出, 混浊, 腹部膨胀, 有腹水, 肝脏灰白, 肾脏充血 (表 2)。

## 2.7 对小鼠和鲑点石斑鱼的 LD<sub>50</sub>

不同浓度的 Va-3 菌液皮下注射感染小鼠和肌肉注射感染鲑点石斑鱼, 在 7 d 的试验期内表现不同的死亡率, 按 RM 方法计算 Va-3 对小鼠的 LD<sub>50</sub> 为  $3.2 \times 10^5$  个/mL, 对鲑点石斑鱼的 LD<sub>50</sub> 为  $2.1 \times 10^7$  个/mL。

## 2.8 回接感染结果

从 Va-3 菌感染的鲑点石斑鱼分离到 Va-3-1 菌, 用 Va-3-1 菌感染健康鲑点石斑鱼, 也表现较强的致病性, 死亡率为 100%, 表现典型的与自然发病一致的症状。经细菌学鉴定, Va-3-1 菌与 Va-3 菌的生物学特性一致, 为同一种菌。

## 3 讨论

(1) 从患病鲑点石斑鱼的不同组织分离到多株细菌, 从中筛选 7 株细菌 (Va-1 至 Va-7) 进行鉴定。用细菌学鉴定方法和自动鉴定系统 (VITEK-AMS 60) 及半自动微生物鉴定系统 (ATB) 测定, 并与标准菌株的生物学特性作对照, 确定为溶藻弧

菌。研究中测定菌株的生物学特性与有关文献报道的一致<sup>[2,3,4-8]</sup>。

表 2 Va-3 菌株感染常见海水养殖鱼类的实验

Tab 2 The experiment of infecting marine fishes with Va-3 strain

鱼类	注射剂量 ( $10^6$ 个 $\cdot$ mL <sup>-1</sup> $\cdot$ g <sup>-1</sup> )	死亡数 尾	实验数 尾	死亡率 %
鲑点石斑鱼	1.9	5	5	100
青石斑鱼	3.7	5	5	100
真鲷	2.2	4	5	80
平鲷	3.7	4	5	80
黑鲷	3.7	3	5	60
红鳍笛鲷	2.9	4	5	80
黄斑蓝子鱼	3.7	3	5	60
对照	无菌 PBS	0	5	0

(2) 溶藻弧菌是沿海地区食物中毒和散在性腹泻的重要病原菌, 广泛存在于世界各地海水和海产品中, 其数量居海水类弧菌之首<sup>[4]</sup>。早在 1973 年, Biake 就证实该菌对人类有致病作用, 主要是引起肠道外感染。同时许多学者曾报道溶藻弧菌也是许多水产动物的致病菌, 特别是海水养殖品种, 如中国对虾 (*Penaeus chinensis*)、日本对虾 (*P. japonicus*)、鲈鱼、尖吻鲈、真鲷、台湾地区的石斑鱼 (*Epinephelus malabaricus*)、赤点石斑鱼 (*E. akaara*)、黑鲷 (*Sparus aurata*)、鲮鱼 (*Mugil cephalus*)、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)、双壳贝类 (*bivalve molluscs*)、rotifer *Brachionus plicatilis* 等<sup>[5-8]</sup>。溶藻弧菌作为鲑点石斑鱼 (*Epinephelus fario*) 的致病菌的

报道较少,本研究从患病鲑点石斑鱼分离病原菌,研究对小鼠和鲑点石斑鱼的毒力和致病性,同时比较研究对常见海水养殖鱼类的致病性,经鉴定为溶藻弧菌。进一步证实了溶藻弧菌的确是鲑点石斑鱼的病原菌。

(3) 以溶藻弧菌攻毒小鼠和用不同方式感染鲑点石斑鱼及其它7种海水鱼类,溶藻弧菌不同菌株对小鼠有着不同程度的较强毒力,存在着菌株间的差异,腹腔注射感染小鼠的LD<sub>50</sub>为 $3.2 \times 10^5$ 个/mL。选择强毒菌株Va-3以不同感染方式感染鲑点石斑鱼表现不同的致病力,皮下注射感染鲑点石斑鱼的LD<sub>50</sub>为 $2.1 \times 10^7$ 个/mL,回接感染证实溶藻弧菌是鲑点石斑鱼细菌病的主要病原。同时溶藻弧菌Va-3菌株对不同海水鱼类也表现较强的致病性,体现了溶藻弧菌感染宿主的广泛性,这与有关学者的报道一致<sup>5-9</sup>,证实了溶藻弧菌是主要海水养殖鱼类细菌性疾病的主要病原体。

(4) 在溶藻弧菌以不同方式感染鲑点石斑鱼的试验中,以肌肉感染方式的致病力最强,其他方式表现一定的致病力。在自然发病的鲑点石斑鱼中,病鱼多以背部肌肉溃烂,烂尾,胸鳍腹鳍基部出血,眼球突出,混浊,腹部膨胀,有腹水,肝脏灰白,肾脏充血为典型症状,这说明病原菌是在鱼体体质下降或鱼体受伤或相关病原的协同作用下,侵入鱼体,导致疾病的发生。关于溶藻弧菌的致病性及致病因子的研究,有待深入研究,以有效预防和控制暴发性疾病的流行。

## Isolation, Identification and Pathogenicity of the Bacterial Pathogen in *Epinephelus fario*

HUANG Zhi jian, HE Jian guo

(School of Life Sciences, Sun Yat-sen(Zhongshan) University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** Bacterial pathogens were isolated from diseased *Epinephelus fario* cultured in cage in Hainan Province, China. The bacteria were identified as *Vibrio alginolyticus* by normal bacterial identification method. It was further showed by comparison with the standard strains and with the help of VITEK AMS-60 identification system and ATB identification system. Experiments of mice toxicity and various methods of infecting *Epinephelus fario* were made by using this *Vibrio alginolyticus* strain isolated from diseased *Epinephelus fario*. It was shown that this strain has certain toxicity in mice and different pathogenicity in *Epinephelus fario* by using various infecting methods. The 50% lethal dose (LD<sub>50</sub>) values of *Vibrio alginolyticus* in mice and *Epinephelus fario* is  $3.2 \times 10^5$ /mL and  $2.1 \times 10^7$ /mL respectively. The pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* in some marine fishes is also compared.

**Key words:** *Epinephelus fario*; *Vibrio alginolyticus*; pathogenicity

### 参考文献:

- [1] 中科院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法[M]. 北京: 农业出版社, 1987.
- [2] KRIEG N R, HOLT J G. Bergey's manual of systematic bacteriology[M]. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984.
- [3] HOLT J G, KRIEG N G, SNEATH P H A, et al. Bergey's manual of determinative bacteriology[M]. 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994.
- [4] 林业杰, 陈亢川, 陈拱立, 等. 溶藻弧菌噬菌体的分离[J]. 微生物学报, 1993, 33(4): 285-289.
- [5] AUSTIN B, STOBI M, ROBERTSON P A W, et al. *Vibrio alginolyticus* the cause of gill disease leading to progressive low-level mortalities among juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L. in a Scottish aquarium[J]. J Fish Dis, 1993, 16: 277-280.
- [6] LIGHTNER D V. *Vibrio* disease of penaeid shrimp // SINDERHARM C J, LIGHTNER D V. Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture and fishes science[M]. Amsterdam: Elsevier, 1985: 42-47.
- [7] DELVES-BROUGHTON J, POUPARD C W. Disease problems of prawns in recirculation systems in the UK[J]. Aquaculture, 1976, 7: 201-217.
- [8] LEE K K. Pathogenesis studies on *Vibrio alginolyticus* in the grouper, *Epinephelus malabaricus* Bloch et Schneider[J]. Microb Pathog, 1995, 19: 39-48.
- [9] 何建国, 林鑫, 黄志坚. 海水鱼类溶藻弧菌致病性的初步研究[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 1998(增刊): 53-55.