

文章编号: 0529-6579 (2000) S-0278-05

网箱养殖石斑鱼暴发性溃疡病病原菌 分离、鉴定及致病性研究^{*}

朱传华¹, 何建国², 黄志坚²

(1. 南海水产研究所热带水产研究开发中心, 海南省三亚 572018;

2. 中山大学生命科学学院)

摘 要: 调查了 1996~1998 年海南省各地网箱养殖石斑鱼暴发性溃疡病的病症、流行特点, 通过细菌学常规鉴定和人工感染以及重复感染试验, 初步确认病原菌为溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*), 并研究其生理生化特性。

关键词: 石斑鱼属 (*Epinephalus*); 溃疡病; 溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)

中图分类号: S941.42 **文献标识码:** A

石斑鱼属鲈科 (Serranidae)、石斑鱼亚科 (Epinephelinae)、石斑鱼属 (*Epinephalus*), 其肉质丰富, 肉味鲜美, 营养丰富而全面, 是海产名贵鱼类。我国网箱养殖石斑鱼已有近 20 年的历史, 浙江、福建、广东、广西、海南等沿海地区均有相当规模的网箱养殖, 在广东、海南主要养殖的品种有鲑点石斑鱼 (*E. fario*, 俗称芝麻斑石斑鱼)、青石斑鱼 (*E. awoara*) 等。近年来由于大规模集约化网箱养殖, 改变了苗种原来生活的环境生态、营养条件、生活习性, 养殖密度高, 网箱养殖石斑鱼疾病日益严重, 其中溃疡病 (ulceration disease) 是一种常见病和多发病^[1~3]。我国许多学者对网箱养殖石斑鱼病害作了较广泛的研究, 本文主要报道海南省网箱养殖石斑鱼暴发性溃疡病的症状、流行特点, 并对其病原的生物学特性进行初步研究。

1 材料和方法

1.1 材 料

石斑鱼来源于海南省各地区养殖网箱, 均质量 60 g, 全长 15 cm。暂养在高 50 cm, 直径 40 cm 的白色塑料桶中, 加入经沙过滤的育苗海水, 密度为 1.024 kg/L, pH 8.0~8.2, 控制水温为 29~30 °C, 连续充气。暂养 10 d 无异常后用于人工感染试验。

1.2 方 法

1.2.1 病原菌分离 无菌操作取患溃疡病的石斑鱼的病灶部位和肝、肾、脾、胃肠等组织, 接种于普通营养琼脂平板, 28 °C 培养 18~24 h, 选取单个菌落进行纯培养, 以供人

^{*} 收稿日期: 1999-09-15 通讯联系人: 何建国。

工感染和细菌学常规鉴定。

1.2.2 人工感染试验和回归试验 将分离菌接种于普通营养琼脂斜面, 28℃培养 18~24 h, 用无菌 PBS 液洗下成悬液, 参照麦氏比浊管调整菌液浓度 9×10^8 个/mL, 分别采用浸浴、人工创伤侵浴、肌肉注射 3 种不同方法感染健康石斑鱼, 同时用无菌 PBS 液处理的石斑鱼作对照。

1.2.3 细菌学常规鉴定 参照有关文献^{4~6}进行细菌学常规鉴定, 并与标准菌株的有关生物学特性进行比较。

2 结 果

2.1 石斑鱼溃疡病病症

网箱养殖石斑鱼溃疡病的明显特征是鱼体全身性多处大面积深度溃粒烂, 大部分患病鱼病发前体表完好无损, 摄食和游动正常, 病症不明显, 病发时患病鱼体表首先出现许多小白斑, 直径 2~3 mm, 此时病鱼食欲下降, 行动迟缓, 温游于网箱水面, 或在网箱网壁附近, 随后白斑扩大成疮, 鳞片脱落, 体表溃烂, 溃烂面积扩大, 直径可达 20~30 mm, 出现肌肉坏死和鱼骨可见等病状。部分患病鱼出现鳍条全部烂掉的病症。在感染后期, 未死亡患病鱼溃疡部位由白色转为红色, 并有血浆样物渗出, 此病症表示, 即使患病鱼鳍条烂掉仍有 90% 的机会自愈存活。网箱养殖的鲢点石斑鱼和青石斑鱼苗种和商品鱼均暴发流行溃疡病, 病发 4~7 d 死亡率 90% 以上, 10% 左右的患病鱼在病发 7 d 后自愈。

2.2 石斑鱼溃疡病流行特点

石斑鱼溃疡病的暴发和流行与季节有关, 每年 4 月~11 月是海南省三亚市网箱养殖的石斑鱼溃烂病流行季节。现将 1996~1998 年内养殖石斑鱼溃疡病的流行情况总结如下。

1996 年 4 月海南省几天内临高、文昌、万宁、陵山、三亚等所有港湾网箱养殖的鲢点石斑鱼暴发溃疡病, 并导致鲢点石斑鱼大量死亡, 感染率 80%~100%, 发病后 4~7 d 死亡率 90%, 到 1996 年 5 月病情自行好转, 10% 的患病鱼 7 d 后可自行恢复健康。而在同一个网箱混养的青石斑鱼、鲷科鱼类、鲳鱼等不论大小均不发生此病。

1997 年 4~11 月, 溃疡病在网箱养殖的鲢点石斑鱼苗种间暴发流行, 较大个体鲢点石斑鱼较少发生此病, 1996 年患溃疡病自愈的鲢点石斑鱼没有一例发生此病。与 1996 年暴发的溃疡病不同之处为网箱养殖的青石斑鱼也暴发溃疡病, 并且其致病性与青石斑鱼的大小有关。体质量低于 250 g 的青石斑鱼患溃疡病死亡率 70%; 体质量 250~300 g 的青石斑鱼患溃疡病死亡率 20%。病症与鲢点石斑鱼溃疡病症状相同。除鲢点石斑鱼外, 同一养殖区或混养的其他鱼类不发生溃疡病。

1998 年 4~9 年, 溃疡病主要在鲢点石斑鱼鱼苗和青石斑鱼间暴发流行, 患病死亡率 90%~100%。1998 年养成石斑鱼较少发生此病。

2.3 病原菌的分离与鉴定

从 1996~1998 年患溃疡病鲢点石斑鱼病灶分离了 3 株细菌 (F-9601, F-9701, F-9801), 经形态和生理生化鉴定, 3 株细菌均为溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)。分离的 3 株溶藻弧菌形态和生理生化特征如下。结果见表 1。

2.3.1 菌落形态 该菌为兼性厌氧菌, 在普通琼脂、TCBS (硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖) 培养基以及海水琼脂培养基上生长良好, 能游动。在普通营养琼脂平板上形成

圆形、隆起、半透明或不透明、灰白色或黄褐色、边缘整齐、湿润、有光泽的菌落，在 TCBS 琼脂平板培养基上形成黄色菌落。

表 1 3 株分离菌株与溶藻弧菌标准菌株的生物学特性的比较

性状	F-9601	F-9701	F-9801	溶藻弧菌	性状	F-9601	F-9701	F-9801	溶藻弧菌
运动性	+	+	+	+	精氨酸双水解酶	—	—	—	
氧化酶	+	+	+	+	赖氨酸脱羧酶	+	+	+	+
接触酶	+	+	+	+	鸟氨酸脱羧酶	+	+	+	+
M. R	+	+	+	+	硝酸盐还原	+	+	+	+
V. P	+	+	+	+	0% NaCl 生长	—	—	—	—
吡哌	+	+	+	+	1% NaCl 生长	+	+	+	+
H ₂ S	+	+	+	+	6% NaCl 生长	+	+	+	+
O/ 129	+	+	+	+	7% NaCl 生长	+	+	+	+
阿拉伯糖	—	—	—	—	甘露醇	+	+	+	+
纤维二糖	—	—	—	—	水杨素	—	—	—	—
半乳糖	—	—	—	—	甘油	+	+	+	+
麦芽糖	+	+	+	+	蔗糖	+	+	+	+

2.3.2 菌体形态及染色特性 本菌大小为 (0.5~0.7) μm×2.0 μm，菌体弯曲，两端钝圆，单个或两个在一起。菌体一端有鞭毛，无荚膜，有形成芽孢。革兰氏染色阴性。

2.3.3 培养特性 生长食盐浓度范围 0.5%~8%，在 5%~6% NaCl 蛋白胨水中生长最为旺盛，但在无盐蛋白胨水中不生长。生长温度范围 10~45℃，适宜生长温度 20~37℃，在 5℃和 50℃不发育。于 pH 5~12 范围均能生长，适宜 pH 6~10。

2.3.4 生化性状 氧化酶、接触酶试验均为阳性，M. R 试验、V. P 试验阳性，产吡哌，还原硝酸盐为亚硝酸盐。发酵葡萄糖产酸不产气，赖氨酸脱羧阳性。对弧菌抑制剂 (O/129) 和新生霉素 (5 μg) 敏感。

2.4 病原菌回归感染

患有患病记录的体长 13~15 cm 鲑点石斑鱼共 10 尾，在平均温度为 29℃，海水盐度为 23‰的条件下养殖 1 周，摄食和游动正常。5 尾鲑点石斑鱼用 F-9601 细菌 (1×10⁶ 个/mL) 浸泡感染 24 h 后，吸去含 F-9601 细菌的海水，换新鲜海水；5 尾鲑点石斑鱼不经处理，养殖在水簇箱中。受 F-9601 菌株感染的 5 尾鱼第 4 天出现溃疡病病症，第 5 天开始死亡，第 7 天死亡率为 100%。对感染组死亡鱼进行病原菌分离和鉴定，确认为溶藻弧菌，与 F-9601 菌株相同，说明受 F-9601 菌株感染的实验鱼其死亡是由 F-9601 菌株所致。对照组实验鱼在 15 d 的观察时间里没有出现病症和死亡。

浓度为 1×10⁶ 个/mL 浸浴和创伤感染 1996 和 1997 年患溃疡病自愈鲑点石斑鱼各 5 尾 (体长 25~27 cm)，在 15 d 观察时间内，F-9601 菌株 (1×10⁶ 个/mL) 肌注 0.1 mL 感染 1996 年患溃疡病自愈鲑点石斑鱼 5 尾，肌注感染后第 4 天出现溃疡病症状，第 7 天后自愈，没有死亡。在第 4 天病症出现时从溃疡部位分离到 1 株细菌，经鉴定为溶藻弧菌，此溃疡症由 F-9601 所致。在肌注感染 15 d，已经自愈的鲑点石斑鱼的溃疡部位分离不到细菌，对照组 5 尾鲑点石斑鱼在 5 d 的观察时间里没有出现病症和死亡。

3 讨论

弧菌是经济鱼、贝和甲壳类重要的病原菌,尤以副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)、创伤弧菌(*V. vulnificus*)、河弧菌(*V. fluvialis*)、鳃弧菌(*V. anguillarum*)等危害最严重,致海洋经济动物大量死亡^[7],在网箱养殖的石斑鱼中,弧菌与石斑鱼体表溃疡病有着直接的关系.受感染鱼在高温季节死亡率较高,是养殖石斑鱼的主要疾病^[2,3,8],主要表现受感染鱼体表和尾鳍、腹鳍、背鳍溃烂.

我们对海南三亚地区网箱养殖的暴发溃疡病的鲑点石斑鱼连续3年分离到的细菌进行了形态、生理生化鉴定,均为溶藻弧菌,在患病鱼溃疡处没有分离到其他细菌.利用1996年分离到的1株溶藻弧菌浸泡和肌肉注射健康的鲑点石斑鱼,复制出现网箱养殖鲑点石斑鱼溃疡病相同的症状,并由此分离到单一的溶藻弧菌,未分离到其他细菌,说明溶藻弧菌是1996~1998年海南三亚地区网箱养殖石斑鱼溃疡病的病原,且一般病程7d,死亡高峰在发病后4~7d,死亡率为90%左右.同时溶藻弧菌表现为广泛的致病性,最近我们在调查海水鱼细菌病中,在广东省中部和东部沿海网箱养殖患溃疡病的鱼类中,均分离到溶藻弧菌(另文发表).

溶藻弧菌广泛存在于海水中,海湾地区较多,在有些海湾是弧菌的优势种,其数量与海水温度、盐度和有机物质呈正相关^[9].本文的研究结果表明溶藻弧菌所致溃疡病也与受感染鱼的大小和体质有关,受感染鱼有10%可在受感染后7d自愈.

在3年的网箱养殖的鱼类溃疡病的调查中发现,一方面溶藻弧菌在不同时期表现的毒力不同,同时感染的宿主范围也不相同,其致病性除与受感染鱼的大小和种类有关外,其他原因有待进一步研究.

参考文献:

- [1] 朱传华,彭永红. F-9601 细菌对芝麻斑石斑鱼的感染与免疫[J]. 南海水产研究, 1996, 13: 52~56.
- [2] 华鼎可,蔡妙兰,余绍隆. 石斑鱼综合症的研究[J]. 海洋科学, 1992 5: 7~8.
- [3] 刘秀珍,等. 海水网箱养殖石斑鱼病原菌研究[J]. 热带海洋, 1994, 13(1): 81~86.
- [4] 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: 科学出版社, 1978. 135~194.
- [5] 刘恭植. 微生物和微生物学检验[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1987.
- [6] KRIGEN R, HOLT J G. Bergey's manual of systematic bacteriology[M]. The Willklns W Baltimore, 1984.
- [7] LIGHTNER D V. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for disease of cultured penaeid shrimp [M]. Baton Rouge Louisiana: World Aquaculture Society, 1996.
- [8] 张永嘉. 湛江茂名海区饲养石斑鱼的鱼病调查[J]. 海洋科学, 1990(4): 53~57.
- [9] 倪纯治,等. 有害生物大亚湾核电站附近海域弧菌的生态[A]. 见: 大亚湾海洋生态文集 II [C]. 北京: 海洋出版社, 1990. 442~449.

Identificatio and Pathogenicity of Pathogen of *Epinephalus fario* and *E. awoara* Ulceration Disease

ZHU Zhuan-hua^{*}, HE Jian-guo, HUANG Zhi-Jian

Abstract: Three strains of *Vibrio alginolyticus* isolated from *Epinephalus fario* and *E. awoara* ulceration disease were identified by biological, physiological and biochemical properties. We proved that *V. alginolyticus* is a pathogen of ulceration disease of *E. fario* and *E. awoara* by artificial infection and epidemiology research in Hainan.

Keywords: *Epinephalus*; ulceration disease; *Vibrio alginolyticus*

^{*} Tropical Fisheries Resarch and Development Centre, South China Sea Fisheries Institute, Sanya 572018, Hainan, China.