

香港地区养殖平鲷的病原菌 (溶藻胶弧菌)研究

VIBRIO ALGINOLYTICUS, A PATHOGEN OF *SPARUS SARBA* CULTURED IN HONG KONG

李 军 冯 娟 刘 旭 李秋凤 徐怀恕

(青岛海洋大学海洋生命学院, 266003)

LI Jun, FENG Juan, LIU Xu, LI Qiu-Feng, XU Huai-Shu
(College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qingdao, 266003)

胡应劭

(香港中文大学生物系, 沙田)

Norman Y S Woo

(Department of Biology, The Chinese University of Hong Kong, Shatin)

关键词 平鲷, 溃疡病, 溶藻胶弧菌

KEYWORDS *Sparus sarba*, Ucler disease, *Vibrio alginolyticus*

平鲷 (*Sparus sarba*) 是香港居民喜欢食用的珍贵海产品之一, 在香港附近海域有大面积的人工网箱养殖。近年来, 随着海水污染程度的加剧以及生态平衡的破坏, 鱼类细菌性疾病的危害日益严重, 给这一经济鱼种的养殖造成巨大损失 [Woo 等 1995]。迄今报道的鱼类主要致病菌已达数十种 [殷 战和徐伯亥 1995, Austin 和 Austin 1987], 其中海水鱼弧菌病最为常见, 如鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 可侵染世界范围内的大多数海水鱼引起弧菌病, 其主要症状是鳍条出血及体表发炎 [Austin 和 Austin 1987]; 溶藻胶弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 能引起鲷科鱼类体表溃疡、烂鳍 [Austin 和 Austin 1987]; 在我国也有关于创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*) 所致石斑鱼体表溃烂病的报道 [刘秀珍等 1994]。

1996~1997 年, 香港网箱养殖的海鲷流行体表溃疡病, 且发生大规模的爆发性死亡。本文主要报道了病原菌的分离、鉴定及其致病性等研究结果。

1 材料与方法

1.1 标准菌株

沙蚕弧菌 *Vibrio neresis* (1. 1623), 河川弧菌 I *Vibrio fluvialis* (I) (1. 1608), 溶藻胶弧菌 (1. 1607), 坎普氏弧菌 *Vibrio campbellii* (1. 1596), 河川弧菌 II *Vibrio fluvialis* (II) (1. 1611), 副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolyticus* (1. 1614), 嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila* (1. 927), 飘浮弧菌 *Vibrio natriegens* (1. 1584) 和 哈维氏弧菌 *Vibrio harveyi* (1. 1593) 等 9 株标准菌株购自中国科学院微生物研究所菌种保藏中心。

收稿日期: 1997-07-07

1.2 病鱼

具有明显溃疡症状的发病平鲷,采集自香港海水鱼养殖场。

1.3 病原菌的分离

无菌操作取病鱼的病灶组织2~3g,置于无菌匀浆器中加2mL无菌生理盐水匀浆,取匀浆进行10倍系列稀释。取0.1mL涂布2216E及TCBS平板;或者直接挑取溃烂组织于上述两种平板上直接划线,经28℃培养1~2天,挑取优势单菌落,划线分离纯化2~3次以获得纯种。

1.4 人工感染试验

取无发病史的健康平鲷(80~100g),先于实验室水泥池(200 000L)暂养1周,然后转移至玻璃水族箱(500L),每5条鱼为1组,通气喂养,水温保持在18℃~20℃。人工感染后,连续观察7天。

1.4.1 注射感染

将培养24h的试验菌,用无菌生理盐水(0.85% NaCl)制成约 2.5×10^7 CFU/mL和 2.5×10^9 CFU/mL的菌悬液,肌肉注射感染,0.2mL/尾,同时设注射无菌生理盐水的对照组。

1.4.2 创伤感染

以无菌针对试验鱼体表进行穿刺创伤,创伤后的鱼置于 2.5×10^7 CFU/mL和 2.5×10^9 CFU/mL的菌悬液中浸泡感染5min,同时设不经菌浴的对照组,然后放置于水族箱中喂养观察。

1.4.3 浸泡感染

将体表无损伤的健康试验鱼置于 2.5×10^7 CFU/mL和 2.5×10^9 CFU/mL的菌悬液中浸泡感染2h,同时设不经菌浴的对照组,然后放置于水族箱中喂养观察。

1.5 菌种鉴定

将所分离的病原菌和9株标准参考菌株一起参照有关文献进行菌种鉴定[Holt等1994, Lemos等1985, West等1983, West和Colwell 1984]和(Colwell 1984)。

1.6 数值分类分析

数值分类法聚类分析是在486微机上使用不加权的单联法进行的[张纪忠1990]。

2 结果

2.1 人工感染试验

采用肌肉注射、创伤后菌浴和菌浴三种方法进行人工感染,注射感染和创伤后菌浴感染均可使鱼感染发病,单纯的菌浴法不能使鱼感染发病。感染发病鱼表现出与自然发病鱼相同的症状:开始体色变深,行动迟缓,经常游出水面,摄饵量降低或不摄饵,感染部位和鳍末端充血、发炎,严重时鳍间组织逐渐散开,鳍条溃烂,鱼体表面感染部位发生溃烂,溃烂逐渐变成一深洞,最终死亡。且从感染发病鱼病灶组织重新分离出形态特征类似的细菌,说明所分离的细菌为海鲷的致病菌。

(1) Colwell R R. 1984. Characteristics and Method for Numerical Taxonomy (Manuscript).

2.2 病原菌的分离与鉴定

从发病鱼体共分离出6株致病菌,其生物学性状基本相同,菌体呈杆状或短杆状,极生单鞭毛,泳动,革兰氏阴性,不发光,TCBS平板上生长均呈黄色,O/129敏感($150\mu\text{g}/\text{mL}$),葡萄糖氧化发酵阳性(O/F实验+/+),氧化酶阳性,上述特性均为弧菌属细菌的典型特征,根据分离的6株菌和9株标准菌株的69项形态及生理生化特征,利用计算机进行数值分类分析,结果表明,所分离的6株菌与标准菌株溶藻胶弧菌聚为一类,相似性大于80%,另外,6株菌的形态特性和生理生化特征,参照Hlot等[1994],也可鉴定为溶藻胶弧菌。表明香港网箱养殖的海鲷体表溃疡病的病原菌为溶藻胶弧菌。

3 讨论

分离菌株特性同Hlot等[1994]所描述的溶藻胶弧菌的特性相类似,同常见的弧菌致病菌—河川弧菌、创伤弧菌、副溶血弧菌、哈维氏弧菌等均不同(表1),另外,数值分类分析结果表明所分离菌株中的溶藻胶弧菌的相似性大于80%,故可鉴定为弧菌属的溶藻胶弧菌。

表1 分离菌株与常见鱼类弧菌致病菌性状比较

Tab. 1 Comparison of the present isolates with other fish pathogenic *Vibrios*

特 征	分离菌株	河川弧菌 I	创伤弧菌	副溶血弧菌	溶藻胶弧菌	哈维氏弧菌
10%NaCl 生长	—	+	—	(+)	+	—
V. P 反应	+	—	—	—	+	V
ONPG 反应	—	+	V	—	—	—
柠檬酸盐利用	—	+	—	—	—	—
精氨酸双水解	—	+	—	—	—	—
精氨酸脱羧酶	—	+	—	—	—	—
鸟氨酸脱羧酶	—	—	—	+	V	—
阿拉伯糖产酸	—	+	V	(+)	—	—
蔗糖产酸	+	+	—	—	+	V
乙醇	—	(+)	—	+	+	—
丁二酸	+	—	—	+	+	+

该菌毒性较强,海鲷被感染后死亡率很高,严重影响人工网箱养殖海鲷的产量,造成极大的经济损失。人工感染试验结果表明,弧菌病的传播不是经口,可能是鱼体受伤后,细菌通过创伤面进入体内,产生毒素,使病灶出血溃烂,造成败血死亡。国内关于人工网箱养殖石斑鱼弧菌病的致病机理研究中,也有类似的报道[刘秀珍等1994]。

弧菌主要可引起海产鱼类、虾和贝类等爆发弧菌病[Austin和Austin1987,Liu等1996,Pass等1987],发病的特点是病程短,规模大,危害严重,而且这些细菌往往都是水环境中的正常菌群,是条件致病菌,其致病性取决于宿主的生理状态及环境条件和海水中细菌数量、海水的理化物质等综合因素的影响[Beatty等1990,West等1983]。有关文献报道,活的哈维氏弧菌及其胞外产物(ECP)均对海洋动物有致病性,其外毒素中蛋白酶、磷脂酶、溶血素的活性很强,在对斑节对虾(*P. monodon*)的致病性中起了主要作用[Liu等1996]。从而推测香港网箱养殖海鲷体表溃烂病的流行是由于养殖海域环境条件恶化引起弧菌大量增殖,以及密集养殖(增加了海鲷碰撞受伤的可能性,恶化水质)而引起的。

由于长期大量使用抗菌素,养殖环境中的细菌往往对大多数抗生素产生抗药性,因此目前国内外一致认为对海洋生物的弧菌病应以预防为主,具体措施包括:控制环境污染,尽量避免有毒物质向养殖海域的排放而造成海鲷免疫力的下降;改善水体环境,维持一定量的藻类和有益微生物,保持养殖环境的生态平衡;合理控制养殖密度,避免外伤,防止缺氧等。

本研究由香港政府科研基金和淡水生态与生物技术国家重点实验室(FEBL 9711B2)及联合国教科文组织(UNESCO), 合同号 861.359.8(SC/RP/52-113401-BEJ)部分资助。冯娟, 现在广州南海水产研究所工作, 刘旭、李秋凤为本院 97 届本科毕业生, 特此致谢。

参 考 文 献

- 刘秀珍, 邹晓理, 莫小燕等. 1994. 海水网箱养殖石斑鱼病原菌研究. 热带海洋, 1: 7~9.
- 张纪忠. 1990. 微生物分类学. 上海: 复旦大学出版社. 55~61.
- 殷 战, 徐伯亥. 1995. 鱼类细菌性疾病的研究. 水生生物学报, 1: 8~12.
- Austin B, Austin D A. 1987. Bacterial fish pathogens; Disease in farmed and wild fish. Chichester: Ellis Horwood press.
- Beatty K T, McGarey D J, Grier H J, et al. 1990. *Vibrio harveyi* an opportunistic pathogen of the common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch), held in captivity. Journal of Fish Diseases, 13: 557~560.
- Holt G J, Kreg N R, Sneath P H A, et al. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9th ed). Baltimore: Williams and Wilkins Press.
- Lemos M L, Toranzo A E, Barja J L. 1985. Modified medium for the oxidation-fermentation test in the identification of marine bacteria. Applied and environmental microbiology, 49(6): 1541~1543.
- Liu P C, Lee K K, Chen S N. 1996. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. Letters in Applied Microbiology, 415: 14~12.
- Pass D A, Dybdahl R, Mannion M M. 1987. Investigations into the causes of mortality of the pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jamson), in Western Australia. Aquaculture, 65: 149~169.
- West P A, Lee J V, Bryant T N. 1983. Numerical taxonomy of strains of *Vibrio* species isolated from water and birds in Kent, England. J Appl Bacteriol, 55: 293~282.
- West P A, Colwell R R. 1984. Identification and classification of Vibrionaceae-an overview. In: Colwell R R, ed. "Vibrios in the environment". New York: John Wiley and Sons Press, 285~363.
- Woo N Y S, Ling J L M, Lo K M. 1995. Pathogenic *Vibrio* spp. in the seabream, *Sparus sarba*. Journal of Sun Yatsen University, (Supplement), 3: 192~193.