

文章编号: 1004-7271(2003)03-0233-05

## 大黄鱼体表溃烂症病原菌的鉴定

张庆华<sup>1</sup>, 瞿小英<sup>1</sup>, 郑岳夫<sup>2</sup>, 熊清明<sup>1</sup>, 杨先乐<sup>1</sup>

(1. 上海水产大学渔业学院, 上海 200090; 2. 象山县渔业技术研究所, 浙江 象山 315700)

**摘要:** 从网箱养殖的患体表溃烂症的大黄鱼心、肝、肾、脾等组织分离到 8 株细菌, 大黄鱼人工感染试验表明分离菌株 XS01 为致病菌。对该菌株进行形态、生理生化试验鉴定为费氏弧菌(*Vibrio fischeri*)。药敏试验结果表明, 该菌株对磺胺甲基异恶唑等 13 种药物敏感, 对氨苄青霉素等 8 种药物不敏感。进行了该菌株对温度和盐度的耐受性试验, 认为该菌有较广的温度和盐度适应范围。

**关键词:** 大黄鱼; 体表溃烂症; 费氏弧菌

中图分类号: S941.42 文献标识码: A

### Classification for one pathogen isolated from skin-ulcer *Pseudosciaena crocea*

ZHANG Qing-hua<sup>1</sup>, QU Xiao-ying<sup>1</sup>, ZHENG Yue-fu<sup>2</sup>, XIONG Qing-ming<sup>1</sup>, YANG Xian-le<sup>1</sup>

(1. Fisheries College, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

2. Institute of Fisheries and Technology of Xiangshan, Zhejiang Province 315700, China)

**Abstract:** Eight strains were isolated from the skin-ulcer disease of *Pseudosciaena crocea* in 2000 in Xiangshan Area of Zhejiang Province. Strain XS01 was confirmed to be the pathogen of the disease by artificial infection test. According to the results of morphological features, physiological and biochemical characteristics that were very similar to those of *Vibrio fischeri*, the XS01 were identified as *Vibrio fischeri* (*V. fischeri*). Meanwhile, its sensitivity to 25 chemotherapeutants was detected. The results showed that ampicillin(AMP) and other 7 kinds of antibiotic had no inhibitory activity to strain XS01, and it was sensitive to sulfamethoxazolun(SLZ) and other 12 kinds of antibiotic. Finally, based on the results obtained, strain XS01 has broad expanse of tolerance of salt and temperature.

**Key words:** *Pseudosciaena crocea*; skin-ulcer; *Vibrio fischeri*

大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)肉味鲜美, 是海产名贵优质鱼类。近年来, 江苏、浙江、福建、广东等省的养殖规模逐年上升, 与此同时, 相应的鱼病发生也日益频繁, 以体表溃烂为典型症状的病害尤为严重, 已严重威胁到大黄鱼养殖业的持续发展。该病的主要症状为: 体表溃疡。发病早期大黄鱼失去食欲, 游动缓慢, 体色发黑, 平衡失调, 腹部朝天受惊后回旋狂游, 中期上下颌、鳃盖、眼球、尾柄及各鳍基部充血,

收稿日期: 2003-02-27

基金项目: 农业部水产种质资源与养殖生态开放实验室课题(KFT-2000-2), 农业部重点科研项目(渔95-B-00-01)

作者简介: 张庆华(1972-), 女, 河北沧州人, 硕士, 讲师, 主要从事水产动物疾病的研究。Tel: 021-65710526, E-mail: qhzhang@shfu.

鳃丝发白且有大量黏液,后期背鳍和尾鳍糜烂呈“扫帚”状,体表皮肤有淤点或淤斑,出现不规则的红斑区,尤以腹部和尾柄最为明显。严重时,皮肤肌肉出血,腐烂形成出血性溃疡。肛门红肿,挤压腹部有黄色粘液流出。解剖可见腹腔有大量腹水,肝脏土黄色或发白有出血斑点和血丝,脾肿大,暗红色,肠道充血,肠内有黄色粘液。

关于大黄鱼细菌性疾病的研究,目前已有林克冰<sup>[1,2]</sup>、林星<sup>[3]</sup>、王军<sup>[4]</sup>、鄢庆彬<sup>[5]</sup>等报道由溶藻弧菌、哈维氏弧菌、副溶血弧菌和腐败假单胞菌引起福建沿海地区养殖的大黄鱼疾病。本文报道从浙江象山地区网箱养殖患体表溃烂病大黄鱼的组织中分离鉴定出的一株病原菌的研究结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验鱼

病鱼 2000年7-9月取自浙江象山网箱养殖患体表溃烂病大黄鱼。

健康鱼 取自浙江象山大黄鱼网箱养殖基地,暂养于泡沫箱(45cm×45cm×24.5cm)中,充气、加热,水温控制在 $28\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ,隔一天更换一半涨潮后的新鲜海水,试验前暂养7d。

### 1.2 病原菌的分离

无菌操作剪取症状典型病鱼的心、肝、肾、脾等组织在2% NaCl普通营养琼脂、TCBS平板上划线分离,28℃恒温培养24~48h,挑单菌落,经纯化培养后保存于斜面,4℃保存备用。

### 1.3 人工感染试验

菌株XS01在28℃恒温培养24h,用0.85%无菌生理盐水洗下菌苔,稀释成 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 稀释度,菌液浓度分别为 $2.3\times 10^9$  CFU/mL、 $2.5\times 10^8$  CFU/mL、 $2.0\times 10^7$  CFU/mL、 $1.9\times 10^6$  CFU/mL(采用平板活菌计数法),对体重 $15\pm 5\text{g}$ 的健康大黄鱼背部肌肉注射感染,每尾0.3mL,对照组注射等量的无菌生理盐水。每组10尾,对濒临死亡或刚死亡不久的鱼立即进行剖检,并做细菌分离培养。

### 1.4 病原菌的鉴定

#### 1.4.1 形态学

将菌株分别接种于2% NaCl普通营养琼脂和TCBS平板,28℃恒温培养24~48h,观察菌落形态。对培养16~18h的幼龄菌进行革兰氏染色,油镜下观察菌体形态特征。对照菌株为大肠杆菌和金黄色葡萄球菌。另取XS01菌株18h培养物,置于无菌水中自由扩散2min,上载样铜网膜,染色后透射电镜下观察菌体形态及鞭毛。对照菌株用中国水产科学研究院东海水产研究所郑国兴研究员赠送的创伤弧菌(*V. Vulnificus*)和副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)。

#### 1.4.2 理化特性试验

按照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[6]</sup>及伯杰氏细菌鉴定手册(第九版)<sup>[7]</sup>的方法进行,运动性试验采用半固体琼脂穿刺法。

### 1.5 药敏试验

将药敏纸片(上海市卫生防疫站)贴于培养基表面,28℃恒温培养48h,测量抑菌圈直径。

### 1.6 病原菌对盐度和温度的耐受性试验

按照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[6]</sup>并参照战文斌等<sup>[8]</sup>的方法进行。不同NaCl浓度的试管分别在4℃、18℃、37℃恒温静置培养24h,然后用2000型分光光度计(波长540nm)测OD值。

## 2 结果

### 2.1 分离结果

共获得 8 株菌株,编号为 XS01 ~ XS08。本文主要报道其中的一株菌株 XS01 的研究结果。

### 2.2 人工感染试验结果

菌株 XS01 对大黄鱼有很强的致病性,在  $2.3 \times 10^9$  CFU/mL ~  $1.9 \times 10^6$  CFU/mL 的浓度下每尾鱼 0.3mL 肌肉注射,原液和  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  稀释度的死亡率分别为 100%、100%、90%、80% (表 1)。发病大黄鱼均表现体表溃烂等典型症状。

表 1 XS01 株人工感染试验结果

Tab.1 The results of artificial infection of strain XS01

组别	试验尾数	菌液浓度	注射剂量 (mL)	感染后死亡数及死亡时间														死亡尾数	死亡率 (%)
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
试验	10	原液	0.3	7	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	100
	10	$10^{-1}$	0.3	4	3	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	10	100
	10	$10^{-2}$	0.3	3	1	1	0	2	0	0	0	0	1	0	1	0	0	9	90
	10	$10^{-3}$	0.3	3	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	8	80
对照	10	生理盐水	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	—	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

### 2.3 分离菌株的形态和生理生化特征

菌株 XS01 在 2% NaCl 普通营养琼脂培养基 48h 的菌落呈圆形,表面光滑,边缘整齐,直径 1.5mm 左右;在 TCBS 培养基上的菌落绿色,直径约 2.5 ~ 3.0mm。革兰氏染色阴性,短杆状,极生鞭毛,能运动,菌体大小为  $0.5 \sim 1.0 \times 1.5 \sim 2.0 \mu\text{m}$  (图 1)。精氨酸双水解、明胶酶、淀粉酶和 V-P 反应阴性。氧化酶、接触酶和脂酶阳性。发酵乳糖,蜜二糖和蔗糖,与费氏弧菌 (*Vibrio fischeri*) 的生化指标基本相符 (表 2)。

### 2.4 分离菌株的药敏试验结果

该菌株对磺胺甲基异恶唑 (SLZ)、氧哌嗪青霉素 (PIP)、复方新诺明 (SMZ)、乙基西酰霉素 (NET)、奥格门丁 (AOA)、丁胺卡那霉素 (AKM)、羧苄青霉素 (CAR)、多黏菌素 B (Polymyxin B)、氟喹酮 (OFL) 等 13 种药物敏感;对阿莫西林 (Amoxicillin)、氨苄青霉素 (AMP)、头孢哌酮 (CPF)、甲氧苄氨嘧啶 (TMP)、苯唑青霉素 (OXA)、O/129 等 8 种药物不敏感,对其他 4 种药物中度敏感 (表 3)。

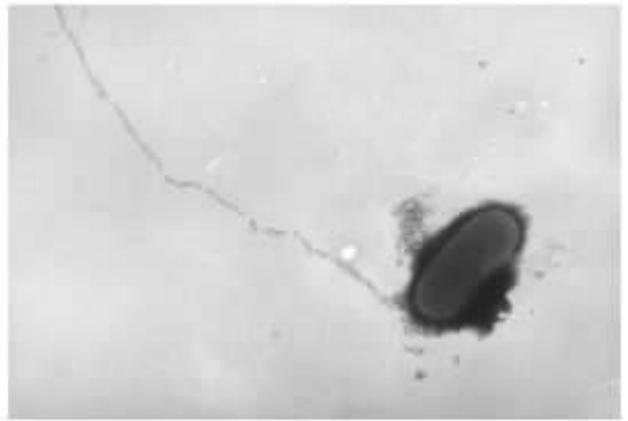


图 1 菌株 XS01 电镜照片 ( $\times 10000$ )

Fig.1 The electron micrograph of strain XS01

表 2 分离菌株的形态特性和生理生化特征鉴定结果

Tab.2 Morphologic and biochemical properties of isolated strains

鉴定项目	XS01	费氏弧菌	鉴定项目	XS01	费氏弧菌
形态	杆状	杆状	精氨酸脱羧酶	-	/
革兰氏染色	-	-	赖氨酸脱羧酶	-	/
芽孢染色	-	-	鸟氨酸脱羧酶	-	/
鞭毛着生	+	+	0/129 抑制		
培养特征			10 $\mu$ g	-	/
O/F 试验	F	F	150 $\mu$ g	-	/
TCBS 生长	绿色	d	ONPG 反应	-	/
0% NaCl 生长	-	-	脲酶	-	/
3% NaCl 生长	+	+	脂酶	+	+
6% NaCl 生长	+	+	柠檬酸盐利用	+	d
8% NaCl 生长	-	-	水解淀粉	-	-
4 $^{\circ}$ C 生长	-	-	产硫化氢	-	/
30 $^{\circ}$ C 生长	+	+	葡萄糖产气	-	-
42 $^{\circ}$ C 生长	+	+	葡萄糖产酸	-	-
56 $^{\circ}$ C 生长	-	-	蔗糖	-	-
运动性	+	+	乳糖	-	-
泳动现象	-	-	阿拉伯糖	-	/
生理生化现象			鼠李糖	-	-
氧化酶	+	+	蜜二糖	-	-
接触酶	+	+	麦芽糖	-	/
硝酸盐还原	-	d	棉子糖	-	/
明胶液化(20 $^{\circ}$ C)	-	-	木糖	-	-
吲哚	-	/	肌醇	-	-
甲基红	-	/	山梨醇	-	-
V-P 反应	-	-	卫矛醇	-	/
吲哚丙酮酸	-	/	七叶树苷	-	/
精氨酸双水解酶	-	-	水杨苷	-	d

注: - 反应阴性; + 反应阳性; d 反应不定; / 文献中无记载

表 3 分离菌株的药物敏感性试验结果

Tab.3 Sensitivity of the isolated bacteria to the 25 chemotherapeutants

药品	药量(ug/片)	抑菌圈直径(mm)	药品	药量(ug/片)	抑菌圈直径(mm)
氨基青霉素	30	17	妥布霉素	10	17
甲氧苄氨嘧啶	5	0	头孢哌酮	75	0
丁胺卡那霉素	30	22	庆大霉素	10	17
乙基苄青霉素	30	27	苯唑青霉素	1	0
伏力欣	20	22	万古霉素	30	0
羧苄青霉素	100	18	多黏菌素 B	300	23
氧哌嗪青霉素	100	30	痢特灵	300	13
复方新诺明	25	30	新生霉素	30	12
奥格门丁	20	24	氯霉素	30	14
呋喃妥因	300	12	氟喹酸	5	22
磺胺甲基异恶唑	300	42	0/129	10	0
阿莫西林	10	0	0/129	150	0
氨基青霉素	10	0			

注 0~5mm 无作用; 6~15mm 弱作用; >15mm 强抑制作用

## 2.5 对盐度和温度的耐受性试验

菌株 XS01 在 4 $^{\circ}$ C 时, 1.5~2.0 盐度范围内生长速度最快, 2.0~3.0 盐度范围内生长速度明显下降, 其他盐度范围内生长十分缓慢; 18 $^{\circ}$ C, 在盐度为 5.0 时生长最好, 在盐度低于 3.0 时, 各温度下的生长差异不明显, 在 5.0~7.0 生长速度明显下降; 在 37 $^{\circ}$ C, 0.5~1.0 盐度范围内生长速度加快, 在 1.0~1.5 时生长速度减慢, 但在 0.5~2.0 生长均较好, 盐度高于 2.5 时, 生长略有影响, 可见该菌对温度和盐度适应范围较广(图 2)。

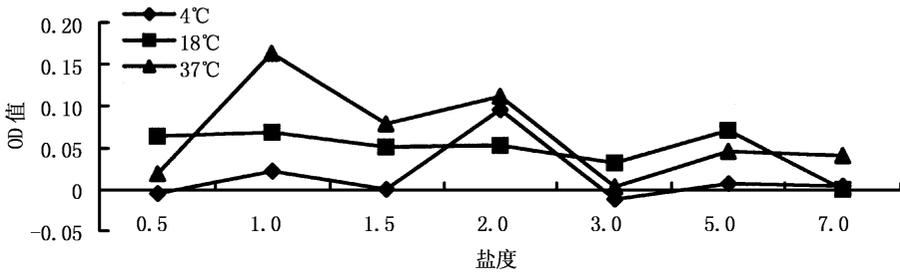


图2 菌株 XS01 的温度与盐度生长曲线

Fig.2 Growth curve of salt and temperature of strain XS01

### 3 讨论

从浙江象山网箱养殖患体表溃烂症大黄鱼中分离到 XS01 菌,经动物试验证明对大黄鱼有很强的致病性,是引起大黄鱼体表溃烂症的病原菌。该菌株形态特征及 35 项生理生化指标的测定结果,与《伯杰氏细菌鉴定手册》(第九版)中费氏弧菌(*Vibrio fischeri*)的描述极为一致。除文献中没有的关于费氏弧菌的生化反应外,该菌株仅 TCBS 培养基上的菌落特征、硝酸盐还原、柠檬酸盐利用、水杨苷四项指标与文献不同(文献中这四项生化反应结果不定),其他指标完全相同。因此,可初步将 XS01 鉴定为费氏弧菌。为了更加准确的对该菌的归属问题下一结论,正在对其进行 16S rRNA 方法鉴定。

同时分离的其它菌株也进行了同样的研究,人工感染试验结果表明:XS02 ~ XS08 菌株均有致病性,从形态和生理生化试验结果可初步将 XS02、XS04 和 XS05 菌株定为溶藻弧菌,XS03 和 XS06 菌株定为哈维氏弧菌,XS07 和 XS08 菌株定为副溶血弧菌,这几株病原菌之间相互作用情况的结果令人鼓舞(另文报道)。近年来,由弧菌引起的大黄鱼疾病屡见不鲜,经济损失巨大<sup>[1-5]</sup>,引起大黄鱼疾病的弧菌已公开报道的有溶藻弧菌、哈维氏弧菌和副溶血弧菌等,而由费氏弧菌引起的大黄鱼病害本文首次报道。再次验证和丰富了大黄鱼细菌性疾病研究的内容,为大黄鱼网箱养殖的防病及治疗提供了理论依据。

众所周知,弧菌是海水环境中的正常菌群,广泛分布在自然海区中,一般情况下不会引起养殖动物发病。但当养殖海域环境条件恶化,引起这些条件致病菌大量繁殖,而养殖动物免疫力低下时就会暴发弧菌病<sup>[9,10]</sup>。这一结果再次说明,大黄鱼的弧菌病理应受到广大养殖者和水产科技人员的高度重视。合理控制养殖密度,改善养殖水质环境,提高养殖动物免疫力等是控制大黄鱼弧菌病发生的关键所在。

黄艳平和邱军强硕士对本文的人工感染试验给予了很大帮助,在此深表谢意。

### 参考文献:

- [1] 林克冰,周 宸,刘家富,等. 海水网箱养殖大黄鱼病原菌研究[J]. 海洋科学,1999(4):58-62.
- [2] 林克冰,周 宸,刘家富,等. 海水网箱养殖大黄鱼弧菌病的病原菌[J]. 台湾海峡(自然科学版),1999,18(3):342-346.
- [3] 林 星,肖懿哲. 大黄鱼弧菌病的诊治[J]. 水产养殖,1998(4):29-30.
- [4] 王 军,苏永全,张朝霞,等. 闽南地区养殖大黄鱼细菌性疾病的病原生物学研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版),2001,40(1):85-91.
- [5] 鄢庆彬,王 军,苏永全,等. 网箱养殖大黄鱼弧菌病研究[J]. 集美大学学报(自然科学版),2001,4(3):191-196.
- [6] 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年,108-118.
- [7] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, et al. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th Edition[M]. USA:Williams & Wilkins, 1994.
- [8] 战文斌,周 丽,陈章群,等. 一种新的对虾病原菌—雷氏普罗威登氏菌[J]. 中国水产科学,1997,4(1):38-44.
- [9] Hilde Ktuse, Henning Sorum. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments[J]. Applied and environmental microbiology, 1994, 60(11):4012-4020.
- [10] Beatty K T, McGarvey DJ, Crier H J, et al. *Vibrio harveyi* an opportunistic pathogen of the common snook, *centropomus undecimalis* (Bloch) held in captivity[J]. Journal of fish disease, 1990, 13:557-560.