

文章编号: 1004 - 7271(2005)03 - 0242 - 06

## 鳗鲡溃烂病病原的分离与鉴定

郑芳艳<sup>1,2</sup>, 石存斌<sup>1</sup>, 潘厚军<sup>1</sup>, 吴淑勤<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东省水产动物免疫技术重点实验室, 广东 广州 510380;  
2. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

**摘要:**从广东深圳患溃烂病的病鳗肝脏分离到一株致病性细菌 AnGS020501。该菌的主要特征为:革兰氏阴性,端生鞭毛,TCBS 平板上生长,氧化酶阳性,葡萄糖发酵型,对弧菌抑制剂 O/129(50 $\mu$ g/片)敏感。通过常规细菌学方法和应用 ATB 细菌自动鉴定仪,鉴定该菌为创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)。人工感染实验结果证明,该菌是鳗鲡溃烂病的病原菌,对鳗鲡、罗非鱼、鲫、斜带石斑鱼和小鼠的半数致死量(LD<sub>50</sub>)分别为 2.69 $\times$ 10<sup>5</sup>、1.64 $\times$ 10<sup>5</sup>、4.23 $\times$ 10<sup>5</sup>、6.1 $\times$ 10<sup>6</sup>、1.56 $\times$ 10<sup>6</sup> CFU/g。该菌胞外产物对鳗鲡的 LD<sub>50</sub>为 1.02  $\mu$ g 蛋白/g 鱼体重。药敏试验结果表明:诺氟沙星、庆大霉素、四环素、多西环素及利福平等对该菌有显著的抑制作用。

**关键词:**鳗鲡;溃烂病;创伤弧菌

中图分类号:S 941.42 文献标识码:A

## Isolation and identification of pathogen from diseased *Anguilla anguilla*

ZHENG Fang-yan<sup>1,2</sup>, SHI Cun-bin<sup>1</sup>, PAN Hou-jun<sup>1</sup>, WU Shu-qin<sup>1</sup>

(1. Guangdong Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Techniques, Pearl River  
Fisheries Research Institute, Guangzhou 510380, China;

2. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** A bacterial strain AnGS020501 was isolated from the liver of *Anguilla anguilla* which was suffered from ulceration. It was a Gram-negative bacterium with a single polar flagellum. Oxidase reaction, fermentation of glucose and sensitivity to the vibriostatic agent O/129 were positive. The bacteria produced acid without gas from glucose. The strain AnGS020501 was identified as *Vibrio vulnificus* by analyzing its morphological, physiological and biochemical characteristics, with the help of ATB identification system. It was confirmed that this bacteria was the pathogen of *Anguilla anguilla* by artificial infection experiment. The LD<sub>50</sub> of the bacteria to *Anguilla anguilla*, tilapia, crucian carp, *Epinephelus coioides* and mouse was 2.69 $\times$ 10<sup>5</sup>, 1.64 $\times$ 10<sup>5</sup>, 4.23 $\times$ 10<sup>5</sup>, 6.1 $\times$ 10<sup>6</sup>, 1.56 $\times$ 10<sup>6</sup> CFU/g, respectively. The LD<sub>50</sub> of its extracellular products to *Anguilla anguilla* was 1.02  $\mu$ g protein/g fish weight. The strain AnGS020501 is sensitive to some antibacterial agents, such as norfloxacin, gentamicin, tetracycline, doxycycline, and rifampicin.

**Key words:** *Anguilla anguilla*; ulceration; *Vibrio vulnificus*

收稿日期:2004-10-19

基金项目:国家 863 计划项目(2001AA622050),广东省科技计划项目(2001B20501)

作者简介:郑芳艳(1978-),女,湖南邵东人,硕士研究生,专业方向为水产动物免疫学。

通讯作者:吴淑勤(1956-),女,福建厦门人,研究员,主要从事鱼类病害研究。Tel: 020-81616813, E-mail: sqwxm@163.net

弧菌广泛分布于海水和底质中,是海水养殖品种的主要病原菌,给海水养殖造成巨大的经济损失<sup>[1-5]</sup>。创伤弧菌作为一种重要的致病性弧菌,广泛分布在沿海地区,受到广大水产工作者的重视<sup>[4-6]</sup>。国内对鳎鱼弧菌病的研究尚少见,对由创伤弧菌引起鳎鱼溃烂病尚未见报道。2002年5月,深圳某养殖场实验基地鳎鱼流行发生溃烂病。从具有明显病症的鳎鱼肝脏等处分离一优势菌株 AnGS020501,并对该菌的形态、生理生化、致病性及药物敏感性等进行了初步研究,旨在有效防治该病提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

病鱼:2002年5月取自深圳某养殖场实验基地患溃烂病鳎鱼,病鱼表现为体表溃烂,鱼体两侧有出血点,腹部、肛门红肿、出血。

试验动物:(1)鳎鱼:体重  $22 \pm 2$  g 及  $11 \pm 0.8$  g 两批,均购自广东顺德某养殖场;(2)鲫:体重为  $9 \pm 1$  g,购自珠江水产研究所良种基地;(3)罗非鱼:体重为  $12 \pm 1$  g,购自珠江水产研究所良种基地;(4)斜带石斑鱼:体重  $3.1 \pm 0.2$  g,购自深圳大鹏某育苗场;(5)小鼠:购自广东省医学实验动物中心,  $20 \pm 2$  g。所有试验动物暂养一周后用于实验。

### 1.2 病原菌的分离

从有明显症状的鳎鱼体表及肝脏取样,在 TSA 平板上作划线分离,置 28 °C 培养 24 h,然后从平板上挑取优势单菌落进行纯培养后,转接到斜面培养基上,冷冻干燥、-20 °C 保存备用。

### 1.3 回归感染试验

从患病鳎鱼分离的 AnGS020501 菌株于斜面培养 24 h,用无菌生理盐水洗脱,制成细菌悬液 ( $1.8 \times 10^9$  CFU/mL),腹腔注射鳎鱼 ( $22 \pm 2$  g),每尾 0.2 mL,对照组注射等量无菌 PBS。观察细菌感染结果并从具有明显病症的鱼体内再次分离细菌。

### 1.4 病原菌的鉴定

#### 1.4.1 形态观察

取 TSA 斜面上新鲜培养物,经革兰氏染色后用普通光学显微镜观察。菌落形态观察在 TSA 平板上,经 28 °C 培养 24 h 后进行。对培养 12 h 的菌体经 3% 磷钨酸缓冲液负染约 30 s,透射电镜观察。

#### 1.4.2 生理生化特性试验

细菌生理生化特征试验按文献<sup>[7,8]</sup>的方法进行;并通过 API 系统 ATB Expression 细菌自动鉴定仪,使用 ID32E 试剂条进行鉴定。

### 1.5 菌株 AnGS020501 对几种鱼类及小鼠的毒力试验

通过人工感染比较该菌对鳎鱼 ( $22 \pm 2$  g)、鲫、罗非鱼、斜带石斑鱼及小鼠的毒性与致病性。用无菌 PBS 对菌株悬液 ( $1.8 \times 10^9$  CFU/mL) 作连续 5 倍稀释,然后用  $5^0 \sim 5^{-4}$  稀释度的细菌悬液分别皮下注射小白鼠 (0.2 mL/只)、腹腔注射鳎鱼 (0.2 mL/尾),鲫、罗非鱼、斜带石斑鱼 (各 0.1 mL/尾)。对照组注射等量无菌生理盐水。试验期间水温 25 °C ~ 26 °C。连续观察 1 周并记录试验动物的死亡数,按 Reed&Muench 法<sup>[9]</sup> 计算半数致死量 ( $LD_{50}$ )。

### 1.6 菌株 AnGS020501 胞外产物 (ECP) 对鳎鱼的毒性

将分离纯化的菌株 AnGS020501 接种 TSB (加 1.0% NaCl), 28 °C 摇床培养 24 h,离心去菌体,上清即为粗提 ECP, Bradford 法<sup>[10]</sup> 测蛋白含量。将 ECP 浓缩至 800  $\mu$ g/mL 后,2 倍比稀释腹腔注射鳎鱼 ( $11 \pm 0.8$  g),每尾 0.1 mL,对照组注射等量生理盐水,每组 5 尾,连续观察 1 周并记录死亡情况,按 Reed&Muench 法<sup>[9]</sup> 计算 ECP 对鳎鱼的  $LD_{50}$ 。

## 1.7 药敏试验

药敏试验采用纸片法。将菌悬液均匀涂布在 TSA 培养基表面,然后贴上药敏试纸(购自北京天坛生物技术开发公司),28 ℃培养 24 h,据《现代诊断学手册》<sup>[11]</sup>抑菌环直径  $d > 15 \text{ mm}$  为高度敏感、 $15 \text{ mm} > d > 10 \text{ mm}$  为中度敏感、 $d < 10 \text{ mm}$  为抗性,判断待测菌株对药物的敏感程度。

## 2 结果

### 2.1 回归感染试验

从鳗鲡病鱼肝脏分离到一株优势菌株 AnGS020501,通过腹腔注射方法确定其病原性。回归感染试验表明,该菌对鳗鲡有明显的致病作用,发病鱼的主要症状为:注射部位溃烂,鱼体两侧有出血点,腹部、肛门红肿、出血,肝脏发白、有出血点,与自然发病的症状基本相同。从回归感染发病死亡的鳗鲡体内再次分离细菌,获得与 AnGS020501 生化特性一致的菌株 AnGS020502。

### 2.2 分离菌株的形态和生理生化特征

AnGS020501 菌株革兰氏阴性,在 TSA 平板上 28 ℃培养 24 h,菌落直径 1~1.5 mm、圆形、隆起、半透明、灰白色、边缘整齐而有光泽。经透射电镜(见图 1)观察为端生鞭毛,微弯曲弧状。TCBS 平板上生长呈绿色,对弧菌抑制剂 O/129(50 $\mu\text{g}$ /片)敏感,氧化酶阳性,葡萄糖发酵型,符合弧菌属特征。参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[7]</sup>和《伯杰氏细菌鉴定手册》(第九版)<sup>[8]</sup>进行各项生理生化特性比较(表 1),菌株 AnGS020501、AnGS020502 的生理生化特性相同,与创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)最为接近(在所测定的项目中,仅精氨酸一项有差异)。接种菌株 AnGS020501 于 ID32E 试剂条培养后,ATB 细菌自动鉴定仪上读取的生化谱为:10475141070;鉴定结果为创伤弧菌(%id=99.4/T=0.38)。

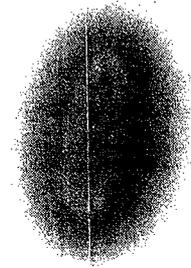


图 1 菌株 AnGS020501 透射电镜照片( $\times 14\ 000$ )  
Fig.1 Electron micrograph of AnGS020501( $\times 14\ 000$ )

表 1 鳗源菌株 AnGS020501、AnGS020502 的生理生化特性  
Tab.1 Biochemical characteristics of AnGS020501 and AnGS020502

鉴定项目	AnGS020501	AnGS020502	创伤弧菌	鉴定项目	AnGS020501	AnGS020502	创伤弧菌
革兰氏染色	-	-	-	乳糖	+	+	+
氧化酶	+	+	+	蔗糖	-	-	-
O-F 试验	OF	OF	OF	木糖	+	+	+
O/129(50 $\mu\text{g}$ )	S	S	S	蜜二糖	-	-	-
TCBS 生长	G	G	G	半乳糖	+	+	+
V-P 反应	-	-	-	麦芽糖	+	+	+
0% NaCl 生长	-	-	-	棉子糖	+	+	+
1% NaCl 生长	+	+	+	鼠李糖	-	-	-
3% NaCl 生长	+	+	+	纤维二糖	+	+	+
6% NaCl 生长	+	+	+	L-阿拉伯糖	-	-	-
8% NaCl 生长	+	+	+	葡萄糖,产气	-	-	-
10% NaCl 生长	-	-	-	山梨醇	-	-	-
4℃ 生长	-	-	-	间肌醇	-	-	-
28℃ 生长	+	+	+	甘露醇	+	+	+
42℃ 生长	+	+	+	鸟氨酸	-	-	-
硝酸盐还原	+	+	+	精氨酸	-	-	+
精氨酸双水解酶	-	-	-	柠檬酸盐	+	+	+
$\beta$ -半乳糖苷酶	+	+	+	半乳糖酸盐	-	-	-
水杨苷	-	-	-	葡萄糖酸盐	+	+	+

注: + 阳性; - 阴性; G 绿色; S 敏感; OF 氧化发酵型

### 2.3 菌株 AnGS020501 对几种鱼类及小鼠的毒力试验

人工感染试验结果表明, 菌株 AnGS020501 不但对鳗鲡, 对罗非鱼、鲫、斜带石斑鱼及小白鼠也有很强的毒力(表 2)。按 R-M 法计算该菌对鳗鲡、罗非鱼、鲫、斜带石斑鱼和小鼠的 LD<sub>50</sub> 分别为  $2.69 \times 10^5$ 、 $1.64 \times 10^5$ 、 $4.23 \times 10^5$ 、 $6.1 \times 10^6$ 、 $1.56 \times 10^6$  CFU/g。

表 2 菌株 AnGS020501 对几种鱼类和小鼠的人工感染试验

Tab.2 Results of challenge tests of the strain AnGS020501 to some fishes and mouse by intraperitoneal injection

菌液浓度 (CFU/mL)	不同感染对象的死亡情况(死亡数/试验数)				
	鳗鲡	罗非鱼	鲫	斜带石斑鱼	小鼠
$1.8 \times 10^9$	10/10	10/10	8/10	9/10	3/4
$3.6 \times 10^8$	7/10	8/10	8/10	7/10	2/4
$7.2 \times 10^7$	6/10	7/10	6/10	6/10	2/4
$1.44 \times 10^7$	3/10	5/10	4/10	4/10	1/4
$2.88 \times 10^6$	1/10	2/10	2/10	2/10	/
无菌生理盐水	0/10	0/10	0/10	0/10	0/4

### 2.4 菌株 AnGS020501 胞外产物对鳗鲡的毒性

鳗鲡注射 ECP 后病症表现为注射部位溃烂、出血, 腹部、肛门红肿、胸鳍基部变红。粗提 ECP 对鳗鲡的 LD<sub>50</sub> 为  $1.02 \mu\text{g}$  蛋白/g 鱼体重(表 3)。

表 3 菌株 AnGS020501 粗提 ECP 对鳗鲡的毒性试验

Tab.3 Toxicity test of crude ECP for *Anguilla anguilla*

剂量( $\mu\text{g}$ /尾)	试验数	死亡数	死亡率(%)
80	5	5	100
40	5	5	100
20	5	4	80
10	5	2	40
5	5	1	20
对照组	5	5	0

### 2.5 药敏试验

采用纸片法测定了该菌对 17 种药物的敏感性(表 4), 结果显示该菌对诺氟沙星、庆大霉素等 10 种药物非常敏感; 对卡那霉素等 5 种药物中度敏感; 对其它几种药物作用不明显。

表 4 菌株 AnGS020501 对抗菌药物的药敏试验

Tab.4 Results of drug sensitivity tests to the strain AnGS020501

药品	含量 ( $\mu\text{g}$ /片)	抑菌圈直径 (mm)	敏感性	药品	含量 ( $\mu\text{g}$ /片)	抑菌圈直径 (mm)	敏感性
四环素	30	22	S	头孢唑啉	30	17	S
痢特灵	300	14	M	诺氟沙星	10	32	S
利福平	5	23	S	头孢噻肟	30	20	S
头孢拉定	30	12	M	多西环素	30	25	S
卡那霉素	30	15	M	阿米卡星	30	15	M
庆大霉素	10	20	S	呋喃妥因	30	20	S
头孢曲松	30	15	M	去甲万古霉素	30	9	R
头孢西丁	30	17	S	磺胺甲基异噁唑	300	18	S

注: S- 敏感; M- 中等敏感; R- 抗性

### 3 讨论

分离菌株的特性同文献<sup>[8]</sup>中所描述的创伤弧菌特性最接近(表 1),同常见的弧菌—副溶血弧菌、哈氏弧菌、溶藻弧菌、最小弧菌等不同<sup>[7,8]</sup>(表 5),故鉴定为弧菌属的创伤弧菌。

表 5 分离菌株与常见鱼类弧菌致病菌性状比较

Tab.5 Comparisons of the present isolate with other fish pathogenic *Vibrios*

项目	AnGS020501	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	哈氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	溶藻弧菌 <i>V. alginoliticus</i>	最小弧菌 <i>V. minicus</i>
0% NaCl 生长	-	-	-	-	+
10% NaCl 生长	-	+	-	+	-
42℃ 生长	+	+	D	-	ND
V-P 反应	-	-	D	+	-
纤维二糖	+	-	D	-	ND
L-阿拉伯糖	-	D	D	-	ND
蔗糖	-	-	D	+	ND
庚二酸盐	-	+	+	+	ND

注: + 阳性; - 阴性; D 有的种阳性,有的种阴性; ND 《伯杰氏细菌鉴定手册》(第九版)无记载

从人工感染实验中发现创伤弧菌 AnGS020501 菌株除对鳗鲡有很强的毒力外,对罗非鱼、鲫、斜带石斑鱼及小白鼠也很敏感,说明该菌株对淡水鱼、海水鱼、哺乳动物都表现出较强的致病性,体现了其感染宿主的广泛性。因此,罗非鱼、鲫等有可能做为名贵海水养殖动物的替代,用于相关的实验研究。

菌株 AnGS020501 胞外产物感染鳗鲡后表现的病症同自然发病、回归感染时所表现的主要症状相似。该菌的致病性是否由胞外产物引起还有待进一步研究。Biosca<sup>[12]</sup>研究了 13 株创伤弧菌胞外产物对鳗鲡的 LD<sub>50</sub>,范围在 1~10 μg 蛋白/g 鱼体重之间。菌株 AnGS020501 胞外产物对鳗鲡的 LD<sub>50</sub>仅为 1.02 μg 蛋白/g 鱼体重,表明其胞外产物对鳗鲡有极强的毒性。菌株 AnGS020501 胞外产物的毒性是由胞外蛋白酶、溶血素、细胞毒素等中的一种或几种决定,有待进一步研究。

创伤弧菌有 2 个生物型,生物 I 型及生物 II 型。其主要区别有:① 吡啶反应是两者生化特性唯一的区别,生物 II 型为阳性。菌株 AnGS020501 在 ID32E 试剂条上反应为阳性,表明创伤弧菌 AnGS020501 菌株可能为生物 II 型;② 生物 I 型菌株间血清型不同、生物 II 型菌株间血清型相同<sup>[12-14]</sup>。生物 I 型主要是人类的致病菌,也能感染养殖鱼类,澳大利亚养殖的尖吻鲈发生过由创伤弧菌生物 I 型引起的弧菌病,死亡率高达 80%。创伤弧菌生物 II 型是海水养殖动物的致病菌,也是人类的条件致病菌<sup>[15]</sup>,主要对鳗鲡致病,曾造成日本的鳗鲡、台湾地区养殖的鳗鲡、西班牙欧洲鳗鲡<sup>[13,14,16,17]</sup>的重大流行病,使西班牙养鳗业濒临崩溃。此外,还有报道创伤弧菌是石斑鱼<sup>[4]</sup>、军曹鱼<sup>[5]</sup>、罗非鱼<sup>[6]</sup>、对虾<sup>[17]</sup>等的病原菌。国内的研究还未见将创伤弧菌进行分型的报道,故有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 李 军,傅恩亭. 香港养殖海鲷弧菌致病菌药物敏感性及其耐药质粒研究[J]. 微生物学报, 1999, 39(5): 461-467.
- [2] 王保坤,余俊红,李 筠,等. 花鲈弧菌病原菌(哈维氏弧菌)的分离与鉴定[J]. 中国水产科学, 2002, 9(1): 52-55.
- [3] 朱传华,何建国,黄志坚. 网箱养殖石斑鱼暴发性溃疡病原菌分离、鉴定及致病性研究[J]. 中山大学学报增刊(自然科学版), 2000, 39: 278-281.
- [4] 刘秀珍,邹晓理,莫小燕,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.
- [5] 简纪常,吴灶和,陈 刚,等. 海水网箱养殖军曹鱼弧菌病原菌的分离及其特性[J]. 中国兽医学报, 2003, 23(4): 329-330.
- [6] Sakata T, Hattori M. Characteristics of *Vibrio vulnificus* isolated from diseased tilapia[J]. Fish Pathol, 1988, 23(1): 33-44.
- [7] 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. 106-119.
- [8] Krieg N R, Holt J G. Bergey's manual of systematic bacteriology(9th ed)[M]. London: The Williams and Wilkins Press. 1994. 259-271.
- [9] Reed L J, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints[J]. Am J Hygiene, 1938, 27: 493-497.

- [10] 汪家政, 范明. 蛋白质手册[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 42 - 47.
- [11] 王淑娟. 现代诊断学手册[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1995. 511 - 525.
- [12] Biosca E G, Amaro C. Toxic and enzymatic activities of *Vibrio vulnificus* biotype 2 with respect to host specificity[J]. Applied and environmental microbiology, 1996, 62(7): 2331 - 2337.
- [13] Biosca E G, Amaro C, Esteve C, et al. First record of *Vibrio vulnificus* biotype 2 from diseased European eel, *Anguilla anguilla* [J]. Fish Diseases, 1991, 14: 103 - 109.
- [14] Belen F, Carmen A. Isolation of a new serovar of *Vibrio vulnificus* pathogenic for eels cultured in freshwater farms[J]. Aquaculture, 2003, (21)7: 677 - 682.
- [15] Amaro C, Biosca E G. *Vibrio vulnificus* biotype 2, pathogenic for eels, is also an opportunistic pathogen for humans[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62: 1454 - 1457.
- [16] Muroga JO K Y, Nishibuchi M. Pathogenic vibrio isolated from cultured eels. I. characteristics and taxonomic status[J]. Fish pathology, 1976, 11 (10): 141 - 145.
- [17] Song Y L, Cheng W, Shen C H, et al. Occurrence of *Vibrio vulnificus* infection in cultured shrimp and eels in Taiwan[J]. Nat Sci Counc Symp Ser (Taipei), 1990, 16: 172 - 179.

## 欢迎订阅 2006 年《中国水产科学》

《中国水产科学》是中国水产科学研究院主办的国家级学术期刊, 主要报道水产生物学基础研究、水产生物学病害及其防治、水产生物学营养及饲料、渔业生态保护及渔业水域环境保护、水产品保鲜与加工综合利用、水产资源、海淡水捕捞、水产养殖与增殖以及渔船、渔业机械与仪器等方面最新进展、最新成果、最新技术和方法。主要服务对象是科研、教学、科技管理人员以及大专院校师生。是反映水产科研创新成果的窗口和培养人才的园地。它面向水产业, 为水产业的持续发展和水产经济建设服务。

本刊为双月刊, A4 开本, 每期 140 页, 单月出版, 国内外公开发行人。国内定价 20 元/期, 全年 120 元(含邮费)。邮发代号: 18 - 250, 国内统一刊号: CN 11 - 3446/S, 国际标准刊号: ISSN 1005 - 8737, 国外代号 4639Q。全国各地邮电局(所)办理订阅手续(可破季订阅)。漏订或补订当年和过期期刊, 请直接向编辑部订阅。另备有少量合订本, 欢迎购买。

《中国水产科学》1994 - 2003 年光盘 (ISBN 7 - 89995 - 232 - 8/S·004) 已经出版发行, 每套定价 150 元。需要购买光盘的读者, 请将款通过邮局直接寄到编辑部, 款到寄盘, 同时开正式报销发票。欢迎广大读者与编辑部直接联系购买事宜。

编辑部地址: 北京市丰台区青塔村 150 号

邮政编码: 100039

联系电话: 010 - 68673921

传 真: 010 - 68673931

E-mail: jfishok@publica.bj.cninfo.net