

花鲈弧菌病原菌(哈维氏弧菌)的分离与鉴定

王保坤, 余俊红, 李 筠*, 纪伟尚, 徐怀恕

(青岛海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘 要:1999年4~5月, 山东省青岛市胶南海区网箱养鱼场花鲈(*Lateolabrax japonicus*)幼鱼发生暴发性传染病, 死亡率达50%。从具有明显症状的病鱼的病灶组织分离到1株优势菌SF-1, 经人工感染和从人工感染发病的花鲈再分离的SF-3菌株的再感染试验结果表明, 所分离的菌株为此次花鲈烂尾病的致病菌。经形态、生理生化等64项特征指标鉴定, SF-1和SF-3均为哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)。药敏试验结果表明, 头孢噻肟、头孢三嗪、头孢孟多、呋喃妥因、氯霉素、氧哌嗪青霉素、磺胺类、复方磺胺、三甲氧苄氨嘧啶、多粘菌素E等10种药物对该菌株有明显的抑制作用。

关键词:花鲈; 哈维氏弧菌; 药敏试验

中图分类号:S943.211

文献标识码:A

文章编号:1005-8737(2002)01-0052-04

弧菌病是危害海水养殖鱼类最严重的疾病之一, 可以感染多种鱼类并造成大量死亡^[1~4]。其中, 哈维氏弧菌已逐渐成为水产动物, 包括无脊椎动物(如虾)和脊椎动物(如鱼)养殖的一大杀手^[5~8], 因而越来越引起水产养殖工作者的重视。1999年4~5月, 山东省青岛市胶南小口子网箱养鱼场养殖的花鲈(*Lateolabrax japonicus*)幼鱼发生大量死亡, 病鱼的主要症状为体表发白、游动迟缓、厌食、尾部严重溃烂(有的尾鳍已完全烂掉)。从具有明显发病症状的病花鲈的尾、肠、鳃等病灶部位分离到1株优势菌SF-1, 经人工感染试验再分离到1株优势菌SF-3。本文对这2株菌的致病性、形态、生理生化特征及药物敏感性进行研究, 旨在有效防治弧菌病的暴发提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 病鱼

取自山东青岛胶南小口子网箱养鱼场, 为养殖

期间发病的花鲈幼苗。

1.2 病原菌的分离

无菌操作挑取患病花鲈病灶部位, 以平板稀释涂布法进行细菌分离, 培养基为2216E和TCBS^[9]。28℃培养24h后, 挑取优势菌落, 在2216E平板上划线纯化。将纯化后的菌株置于15%甘油中, 并保存于-80℃冷冻箱中备用。

1.3 感染试验

试验用花鲈为海捕健康幼鱼, 体重15~20g, 体长10~15cm。将幼鱼在3m×3m×1.5m的水泥池中暂养7d后, 分组饲养在50L的试验桶中(盛40L沙滤海水), 每组25尾, 设2个平行组。将待检菌株斜面培养24h后, 用无菌生理盐水(0.85% NaCl)洗下, 制成菌悬液, 肌肉注射, 注射菌液浓度为 5.0×10^4 、 5.0×10^5 、 5.0×10^6 、 5.0×10^7 、 5.0×10^8 cfu/ml, 每尾注射0.1ml, 对照组注射等量的无菌生理盐水。每天正常投喂鱼粉, 日换水量为水体的1/2, 水温24~26℃。

1.4 菌种鉴定

对待测菌的64项形态、生理生化特征进行测试。供试菌株在2216E培养基上活化后分别接种于各测试培养基。除耐盐性试验、TCBS培养基生长和唯一碳源试验外, 其他培养基均以陈海水配制,

收稿日期:2001-04-12。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870581);国家重点基础研究发展规划“973”资助项目(G1999012004)。

作者简介:王保坤(1976-), 男, 青岛海洋大学硕士研究生。

* 责任作者

测定方法参照有关文献进行^[9~13]。同时还用 BI-OLOG 鉴定方法^[14]对鉴定结果进行确证。

1.5 药敏试验

用纸片法在普通 2216E 固体培养基平板上测定待测菌株对药物的敏感性。28 ℃ 培养 24 h, 观测有无抑菌圈及其直径大小, 根据抑菌圈直径判断标准^[9,15]判断待测菌株对药物的敏感性结果。药敏纸片为上海市医学化验所产品^[9,15]和 OXOID 公司产品。

2 结果

2.1 病原菌的分离及感染试验

从具有明显发病症状的花鲈的病灶组织分离到 1 株优势菌 SF-1, 经人工感染试验证实, 该菌株对健康花鲈具有明显的致病作用(见表 1), 且人工感染症状与自然发病症状相同, 即体色变浅, 游泳能力减弱, 摄食量减少或不进食, 注射部位红肿发炎, 背鳍溃烂, 最终死亡。从人工感染发病的花鲈的病灶部位再分离的优势菌株 SF-3, 其形态、生理生化特征与 SF-1 相似, 经再次感染试验确证, 所分离的菌株 SF-1 为此次花鲈弧菌病的病原菌。

表 1 人工感染试验结果

Table 1 Results of challenge tests of SF-1 strain by muscle injection

感染剂量/(cfu·ind ⁻¹) Challenge dose	试验鱼/尾 Test nos.	死亡鱼/尾 Dead nos.	死亡率 Mortality
5.0×10 ³	25×2	0	0
5.0×10 ⁴	25×2	2	0.04
5.0×10 ⁵	25×2	34	0.68
5.0×10 ⁶	25×2	49	0.98
5.0×10 ⁷	25×2	50	1
对照 Control	25×2	0	0

2.2 细菌鉴定

经形态、生理生化特征鉴定(见表 2), SF-1 和 SF-3 的特征基本相同, 菌体呈短杆状、极生单鞭毛、有侧毛、不泳动、不产色素、革兰氏阴性、未见发光, 对弧菌抑制剂 O/129 敏感(150 μg/ml), 发酵葡萄糖, 氧化酶和过氧化氢酶均呈阳性, 符合弧菌属的典型特征。对照《伯杰氏细菌鉴定手册》(第九版)^[16], 参照有关文献^[11,12], 这 2 株菌应为弧菌属中的哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)。又经 BIOLOG 鉴定, 确证为哈维氏弧菌(*V. harveyi*)。

表 2 菌株 SF-1、SF-3 细菌分离物的形态特性及生理生化特征鉴定结果

Table 2 Results of morphological, physiological and biochemical characteristics of isolates SF-1 and SF-3 strains

项目 Item	SF-1	SF-3	项目 Item	SF-1	SF-3	项目 Item	SF-1	SF-3	项目 Item	SF-1	SF-3
革兰氏染色	-	-	过氧化氢酶	+	+	肌醇	-	-	亮氨酸	-	-
鞭毛染色	m	m	氧化酶	+	+	甘露糖	+	+	腐胺	-	-
泳动现象	-	-	O/F	F	F	棉子糖	-	-	蔗糖	+	+
发光现象	-	-	柠檬酸盐利用	+	+	鼠李糖	-	-	木糖	-	-
O/129 敏感 (10 μg)	-	-	硝酸盐还原	+	+	蔗糖	+	+	酶的产生:		
O/129 敏感 (150 μg)	+	+	V-P 反应	-	-	甘露醇	+	+	藻酸酶	-	-
TCBS 生长	黄	黄	甲基红反应	+	+	乳糖	-	-	淀粉酶	+	+
4℃ 生长	-	-	吲哚产生	+	+	水杨素	+	+	几丁质酶	+	+
15℃ 生长	-	-	硫化氢产生	-	-	山梨醇	-	-	脂酶(Tween 80)	+	+
28℃ 生长	+	+	精氨酸双水解酶	-	-	唯一碳源:			明胶酶	+	+
37℃ 生长	+	+	精氨酸脱羧酶	-	-	γ-氨基丁酸	-	-	卵磷脂酶	+	+
42℃ 生长	-	-	赖氨酸脱羧酶	+	+	纤维二糖	+	+	酪蛋白酶	+	+
0% NaCl 生长	-	-	鸟氨酸脱羧酶	+	+	L-瓜氨酸	+	+	脲酶	-	-
3% NaCl 生长	+	+	苯丙氨酸脱氨酶	+	+	乙醇	-	-	ONPG 反应	-	-
6% NaCl 生长	+	+	葡萄糖产气	-	-	D-葡萄糖酸盐	+	+	青霉素抗性	+	+
8% NaCl 生长	+	+	糖醇发酵产酸:			葡萄糖醛酸	-	-	色素	-	-
10% NaCl 生长	-	-	阿拉伯糖	-	-	谷氨酸	+	+			

注: m—极生单鞭毛 Monotrichous; “-”—阴性 Negative; “+”—阳性 Positive。

2.3 药敏试验

采用纸片法测定致病菌株对 33 种抗菌药物的

敏感性(见表3、4), SF-1、SF-3的抗菌谱基本相同, 都对其中12种敏感(表3), 对21种有耐药性(表4), 敏感程度略有差异。头孢噻肟、头孢三嗪、呋喃妥因、氯霉素、氧哌嗪青霉素、磺胺类、复方磺胺、头孢孟多、三甲氧苄氨嘧啶、多粘菌素E等10种药物对该病原菌有显著的抑制作用。这2株菌抗菌谱的相似性, 也为进一步证明这2株菌属同1个种提供了证据。

表3 对病原菌有抑制作用的化学药物

Table 3 Inhibitory activity of chemotherapeutants to SF-1 and SF-3

药品 Chemical	符号 Symbol	含药量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{disc}^{-1}$) Content	抑菌圈直径/mm Diameter of inhibitory zone	
			SF-1	SF-3
庆大霉素	GEN	10	13 ⁺	22 ⁺
呋喃妥因	NI	300	21 ⁺	17 ⁺
磺胺类	S3 *	300	20 ⁺	13 ⁺
头孢三嗪	CRO	30	25 ⁺	21 ⁺
复方磺胺	SXT	1.25/23.75	26 ⁺	26 ⁺
头孢孟多	MA *	30	19 ⁺	22 ⁺
多粘菌素	PB *	300IU	10 ⁺	12 ⁺
头孢噻肟	CTX	30	26 ⁺	22 ⁺
多粘菌素E	CT *	25	13 ⁺	11 ⁺
氯霉素	CMP	30	22 ⁺	33 ⁺
氧哌嗪青霉素	PIP	100	23 ⁺	25 ⁺
三甲氧苄氨嘧啶	W *	5	28 ⁺	19 ⁺

注: *—Oxoid公司产品 Oxoid sensitivity Discs; 其余为上海市医学化验所产品。+—中度敏感 Middlely sensitive; —高度敏感 Highly sensitive.

3 讨论

(1)从自然发病的花鲈体内分离到1株优势菌SF-1, 经人工感染试验证实该菌株对健康的花鲈幼鱼具有致病作用, 且感染症状与自然发病症状相同。从人工感染发病的花鲈体内分离到1株优势菌SF-3, 其形态特征和生理生化特征与SF-1基本相同。可以证明SF-1为此次花鲈暴发弧菌病的病原菌。

(2)菌株SF-1、SF-3的形态和生理生化特征测定结果与《伯杰氏细菌鉴定手册》第九版^[16]、West等^[11]所描述的哈维氏弧菌(*V. harveyi*)的特征最相近。此外, 该菌株经BIOLOG细菌快速鉴定系统鉴定为鲨鱼弧菌(*Vibrio carchariae*), 相似性水平为100%。鲨鱼弧菌最早由Grimes等报道, 是从美国水族馆发病死亡的鲨鱼体内分离出来的^[1], 之后又

有一些鱼类病原菌为鲨鱼弧菌的报道^[17,18]。根据其主要的生理生化特征和DNA杂交实验结果, 可判定其90%~94%DNA与哈维氏弧菌的标准菌株是同族关系, 因而《伯杰氏细菌鉴定手册》第九版^[15]将鲨鱼弧菌归属于哈维氏弧菌。由此, 我们认定所分离的菌株为哈维氏弧菌。

表4 病原菌对其不敏感的化学药物

Table 4 Chemotherapeutants to which SF-1 and SF-3 strains are not sensitive

药品 Chemical	符号 Symbol	含药量/($\mu\text{g}\cdot\text{disc}^{-1}$) Content
卡那霉素	KAN	30
妥布霉素	TOB	10
四环素	TET	30
万古霉素	VAN	30
氨苄青霉素	AMP	10
链霉素	STR	10
羧苄青霉素	CAR	100
氟派酸	NOR	10
头孢噻苄	CL *	30
头孢唑啉	CFZ	30
丁胺卡那霉素	AKN	30
头孢呋新	CFX	30
利福平	RIF	5
头孢唑酮	CFP	75
红霉素	ERY	15
头孢雷啶	CE *	30
头孢他啶	CTD	30
头孢甲氧霉素	FOX *	30
苯唑青霉素	OXA	1
Cinoxacin	CIN *	100
头孢唑啉	KZ *	30

注: *—Oxoid公司产品 Oxoid sensitivity Discs; 其余为上海市医学化验所产品。

(3)王国良等^[6]2000年报道了在浙江省发生的海水网箱养殖鲈鱼皮肤溃烂病, 发病一般从7月开始, 可延续到10月, 8~9月为高峰期。其症状主要为体表出现不同程度的溃疡斑, 所分离的病原菌鉴定为哈维氏弧菌^[6]。另有报道哈维氏弧菌能引起海水网箱养殖高体鲈的弧菌病^[19]。本文在山东沿海发病的养殖花鲈中又分离到哈维氏弧菌, 再次证实哈维氏弧菌已成为我国海水鱼类弧菌病的重要病原菌。

(4)2株病原菌对33种常用抗菌药物的敏感性检测结果表明, 试验菌株仅对头孢噻肟、头孢三嗪、头孢孟多、呋喃妥因、氯霉素、氧哌嗪青霉素、磺胺类、复方磺胺、三甲氧苄氨嘧啶、多粘菌素E等少数

抗菌药物较敏感,对其中21种常见的抗菌药物并不敏感。因此,对有效治疗药物的正确选择是十分必要的,无根据地滥用或过度使用抗菌药物,不但不能起到防病治病的作用,反而造成养殖环境微生物自然区系平衡的破坏,以及环境中耐药性菌株的逐渐增多^[18]。

参考文献:

- [1] Austin B, Austin D A. Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish[M]. Third Edition. Chichester: Praxis Publishing, 1999. 237-241.
- [2] 肖慧,李军,徐怀恕,等.花鲈苗烂鳃、烂尾病原菌的研究[J].青岛海洋大学学报,1999,29(1):87-93.
- [3] 李军,冯娟,刘旭,等.香港地区养殖平鲷的病原菌(溶藻弧菌)研究[J].水产学报,1998,22(3):275-278.
- [4] 吴后波.海水网箱养殖鱼类弧菌病原菌快速诊断方法的初步研究[J].热带海洋,1997,16(4):99-103.
- [5] 李军,纪伟尚,徐怀恕,等.中国对虾幼体致病菌(哈维氏弧菌)的生物学特性及其药物敏感性研究[A].对虾苗期细菌病害的诊断与控制[C].北京:海洋出版社,1999.52-58.
- [6] 王国良,金珊,薛良义,等.海水网箱鲈鱼皮肤溃烂病及其病原菌的研究[J].黄渤海海洋,2000,18(3):85-89.
- [7] Zhang X H, Austin B. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids[J]. J Fish Dis, 2000, 23: 93-102.
- [8] 钟颖良,陈月忠,周宸.环境因子对发光细菌的生长及日本对虾仔虾感染死亡率的影响[J].中国水产科学,2001,8(1):41-45.
- [9] 徐怀恕,杨学宋,李筠.对虾苗期细菌病害的诊断与控制[M].北京:海洋出版社,1999.166-190.
- [10] 麦克法丁 J E. 医学细菌生化试验鉴定手册[M].北京:北京人民卫生出版社,1985.94-100.
- [11] West P A, Colwell R R. Identification and classification of Vibrionaceae - An Overview[A]. *Vibrio in the Environment*[M]. New York: John Wiley & Sons Inc, 1984. 285-363.
- [12] Mercedes A, Anicent R B. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species[J]. J Applied Bact, 1994, 76: 79-85.
- [13] 张纪忠.微生物分类学[M].上海:复旦大学出版社,1990.55-61.
- [14] 李筠, Vandenbergh J, 纪伟尚,等. Biolog GN 法对不同地区养殖对虾弧菌区系的比较研究[J]. 中国水产科学, 2000, 7(4): 52-55.
- [15] 许兵,纪伟尚,徐怀恕,等.对虾病原菌抑菌药物的研究[J].青岛海洋大学学报,1993,23(2):43-51.
- [16] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, et al. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9th ed.) [M]. London: Williams & Wilkins Press, 1994. 190-194, 259-271.
- [17] Bertone S, Gili C, Moizo A, et al. *Vibrio carchariae* associated with a chronic skin ulcer on a shark *Carcharhinus plumbeus* (Nardo) [J]. J Fish Dis, 1996, 19: 429-434.
- [18] Austin B, Austin D A, Farhat Z, et al. Diagnosis and control of bacterial fish pathogens with emphasis on *Vibrio harveyi* [J]. 青岛海洋大学学报, 1999, 29(3): 489-499.
- [19] 吴后波,潘金培.海水网箱养殖高体鳊弧菌病致病菌研究[J].水产学报,1997,21(2):171-174.

Isolation and identification of pathogen (*Vibrio harveyi*) from sea perch, *Lateolabrax japonicus*

WANG Bao-kun, YU Jun-hong, LI Yun*, JI Wei-shang, Xu Huai-shu

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China)

Abstract: Mass mortalities of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) occurred in Jiaonan fishery farms, Qingdao, Shandong Province from April to May 1999. The main syndromes of the diseased fish are rotting fins and rotting tails. One strain of bacteria SF-1 was isolated from the diseased sea perch, and another strain SF-3 was isolated from the diseased sea perch challenged by SF-1 by muscle injection. Most of the morphological characteristics of these two isolations are the same. They were identified as *Vibrio harveyi* by 64 test items physiological and biochemical characteristics. The sensitive test shows that among 33 chemotherapeutants, the pathogen are resistant to 21 and sensitive to chloramphenicol, ceftriaxone, cefotaxime, cefamandole, nitrofurantoin, trimethoprim, piperacillin, sulfonamides, sulfamethoxazole, and polymyxin E, etc.

Key words: *Lateolabrax japonicus*; *Vibrio harveyi*; chemotherapeutants sensitive test

* Corresponding author