

斜带石斑鱼病原菌(哈维氏弧菌)的分离与鉴定

陈献稿, 吴淑勤, 石存斌, 李宁求

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东广州 510380)

摘要:从患病斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)肝脏组织分离到 EcGY020401 菌株, 经人工感染、回归感染实验证实为致病菌。通过 API 系统和菌体常规形态特征、培养特性和生理生化反应指标测定以及 16S rRNA 测序分析等综合鉴定, EcGY020401 菌株为弧菌属哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*), 其半致死剂量 LD_{50} 为 2.7×10^6 CFU/g 鱼体重。药敏试验结果表明, EcGY020401 菌株对利福平、四环素、喹诺酮类及头孢曲松等抗生素较为敏感。

关键词:斜带石斑鱼; 哈维氏弧菌; 16S rRNA

中图分类号: Q959.48 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2004)04-0313-05

斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)俗称青斑, 属鲈科(Serranidae)、石斑鱼亚科(Epinephelinae)、石斑鱼属(*Epinephelus*), 肉质鲜美, 营养丰富, 经济价值较高, 为海水名贵鱼类。Wong 等^[1]报道鳃弧菌、创伤弧菌引起石斑鱼弧菌病; 刘秀珍等^[2]报道海水网箱养殖石斑鱼分离出创伤弧菌; 朱传华等^[3]调查了海南省海水网箱养殖石斑鱼暴发性溃疡病的病症, 认为病原菌为溶藻弧菌。到目前为止, 我国只有台湾 Yü 等^[4]报道从中分离到哈维氏弧菌, 大陆地区尚未见斜带石斑鱼弧菌病报道。本研究通过对广东省阳江市东平镇海水网箱养殖场患病斜带石斑鱼体内分离到病原菌并对其致病性及抗药性进行分析, 旨在为我国鱼类弧菌病的防治机理提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

1.1.1 患病斜带石斑鱼 2002年4月, 取自广东省阳江市东平镇某鱼排养殖斜带石斑鱼发生溃疡病, 发病率80%, 症状为体表溃疡, 无力侧卧于网箱底部, 下颌充血。

1.1.2 健康斜带石斑鱼 50尾, 购自深圳市大亚湾某养殖场, 体重9.46~10.32 g, 饲养在直径2.1 m玻璃钢桶中, 水深1.5 m, 充气, 每天投喂新鲜小杂鱼, 吸污, 暂养7 d。

1.2 病原菌分离

无菌条件下, 从患病石斑鱼肝脏等部位取样, 在 TCBS 平板上划线分离, 28℃恒温培养24 h, 挑取优势菌的单菌落在 TSA 平板上再次划线分离, 获得纯培养的 EcGY020401 菌株, 转接到 TSA 斜面培养基于4℃保存备用。

1.3 半致死剂量 LD_{50} 的测定

挑取 EcGY020401 单菌落接种于 TSA 培养基斜面, 28℃恒温培养24 h, 用无菌生理盐水(0.85% NaCl)洗下菌苔, 制成菌悬液, 用比浊器(意大利产品)测定结合平板计数法调整浓度为 1.0×10^9 CFU/mL, 然后2倍稀释到 1.25×10^8 CFU/mL。健康斜带石斑鱼分组饲养在100 L桶中(盛80 L沙滤海水), 每组5尾, 腹腔注射上述浓度的菌悬液, 剂量各0.1 mL, 对照组注射等量的无菌生理盐水, 重复2次。水温24~26℃, 海水盐度35, 充气, 连续观察并记录14 d内死亡数, 应用 Reed-Muench 法^[5]计算 LD_{50} 。

公式: $\log_2 LD_{50} = a + bx$, 其中 a 为较低稀释度的负对数(紧接高于50%的死亡率); b 为距离比例, 等于高于50%的死亡率减去低于50%的死亡率的差; x 为稀释系数的负对数。

1.4 病原菌的 API 系统鉴定

API(analytic products Inc)系统 ATB 鉴定仪细菌鉴定按照 ID 32E 试剂条说明书操作, 实验重复2次。

收稿日期: 2003-03-14; 修订日期: 2003-12-11。

基金项目: 国家“863”高新技术研究计划项目(2001AA622050)。

作者简介: 陈献稿(1970-), 男, 硕士, 从事水产动物医学研究, E-mail: xgchen@shfu.edu.cn

通讯作者: 吴淑勤, Tel: 020-80616813; E-mail: sqwxm@163.net

1.5 细菌学常规鉴定

细菌形态、生理生化特征试验按《常见细菌系统鉴定手册》^[6]方法进行。

1.6 细菌电镜观察

用无菌超净水离心洗2次菌体,悬浮,取1滴在铜网上,醋酸双氧铀染色,晾干,透射电镜观察。

1.7 16S rRNA 序列测定和分析

1.7.1 PCR 模板 DNA 的制备 将 EcGY020401 菌株接种在 TSA 培养基培养 24 h,收集菌体,用 Promega 公司的 Wizard Genomic DNA Purification Kit 提取细菌总 DNA。

1.7.2 16S rRNA 序列的 PCR 扩增与测序 扩增正向引物 P1:5' agagtttgatcctggctcag3';反向引物 P2:5' attcaccgtggcattctgac3'。PCR 反应体系(100 μ L):10X PCR 缓冲液 10 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 10 μ L, dNTP (各 10 mmol/L) 2 μ L, P1、P2 引物 (200 μ mol/L) 各 2 μ L, Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 1 μ L, DNA 模板 2 μ L, 去离子水 71 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,接着 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s;56 $^{\circ}$ C 复性 45 s;72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s;30 个循环,72 $^{\circ}$ C 温育 6 min。PCR 产物经 Roche High pure PCR product purification Kit 纯化,寄大连宝生物工程有限公司进行序列测定。

1.7.3 16S rRNA 序列分析与数据处理 采用 Vector NTI suit 6.0 软件将待检菌株的 16S rRNA 序列与从 GenBank 中获得的弧菌的 16S rRNA 序列进行多序列匹配排列,构建系统进化树。

1.8 药物敏感试验

以纸片法在 TSA 平板培养基上进行,28 $^{\circ}$ C 恒温培养 24 h 后观察抑菌圈有无和大小。药敏纸片购自北京天坛药物生物技术开发公司。

2 结果

2.1 致病性及 LD₅₀测定

健康斜带石斑幼鱼经腹腔注射 EcGY020401 菌株 1.0×10^8 CFU/尾后,第 2 天开始出现死亡,到第 3 天全部死亡;低浓度组感染后第 3 天,表现无力侧卧于桶底部,第 5 天出现尾鳍溃烂、体表溃疡与自然发病症状相似,而对照组注射无菌生理盐水后正常。从人工感染后发病鱼再分离到的菌株,注射 1.0×10^8 CFU/尾时,24 h 内全部死亡。因此,可确定 EcGY020401 菌株为斜带石斑鱼弧菌病的致病菌。

EcGY020401 菌株对斜带石斑 LD₅₀试验结果见表 1。经计算 LD₅₀ = 2.7×10^6 CFU/g 鱼体重。

表 1 斜带石斑 LD₅₀试验结果
Table 1 Results of LD₅₀ experiments to *E. coioides*

第 n 次 Time	稀释度 Diluted times	死亡数/尾 Number of death	存活数/尾 Number of survival	累计死亡数/尾 Accumulative number of death	累计存活数/尾 Accumulative number of survival	累计死亡率/% Accumulative mortality rate
1 First	2 ⁰	5	0	13	0	100.0
	2 ⁻¹	4	1	8	1	88.9
	2 ⁻²	3	2	4	3	57.1
	2 ⁻³	1	4	1	7	12.5
2 Second	2 ⁰	5	0	11	0	100.0
	2 ⁻¹	3	2	6	2	72.5
	2 ⁻²	2	3	3	5	37.5
	2 ⁻³	1	4	1	9	10.0

2.2 API 系统鉴定结果

经 API 系统 ATB 仪鉴定 2 次,结果基本一致(表 2)。生化谱均为 00471341070,确定 EcGY020401 菌株为弧菌属(*Vibrio* spp.)细菌。

2.3 病原菌常规鉴定结果

EcGY020401 菌株为革兰氏阴性。恒温培养 24 h,菌体在 TSA 斜面上形成的菌落直径 1~2 mm,圆

形,中心略隆起,表面光滑,半透明,不发光。经透射电镜观察(图 1)为极生单鞭毛,短杆状。TCBS 平板上生长呈黄色,0/129 (10 μ g/片、150 μ g/片)敏感;葡萄糖发酵型;不存在精氨酸双水解酶、赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶;需 Na⁺ 生长;42 $^{\circ}$ C 以上和 4 $^{\circ}$ C 以下不能生长;利用葡萄糖、蔗糖、纤维二糖、麦芽糖、阿拉伯糖、甘露糖等糖类;不利用木糖、鼠李糖、乳糖

等糖类。参照《常见细菌系统鉴定手册》第一版^[6], 比较了待测 EcGY020401 菌株和哈维氏弧菌与麦氏弧菌的模式株硝酸盐还原、纤维二糖、V-P 等 3 个

重要指标, 初步确认 EcGY020401 菌株为弧菌属哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)。EcGY020401 菌株形态、生理生化特性鉴定结果见表 3。

表 2 API 系统细菌鉴定结果

Table 2 Results of bacterial identification by API system

项目 Item	第一次 First	第二次 Second	项目 Item	第一次 First	第二次 Second
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-	-	丙二酸 Malonate	-	-
精氨酸双水解酶 Arginine Dihydrolase	-	-	吲哚产生 Indole(Production)	+	+
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	-	-	N-乙酰-β-葡萄糖苷酶 N-Acetyl-β-Glucosaminidase	-	-
脲酶 Urease	-	-	葡萄糖 Glucose	+	+
L-阿拉伯糖醇 L-Arabitol	-	-	蔗糖 Sucrose	+	+
半乳糖酸盐 Galacturonate	-	-	L-阿拉伯糖 L-Arabinose	-	-
5-酮基-葡萄糖酸钠 5-KetoGluconate	-	-	D-阿拉伯糖 D-Arabinose	-	-
脂肪酶 Lipase	-	-	α-葡萄糖 α-Glucose	-	-
酚红 Phenol Red	+	+	α-半乳糖苷酶 α-Galactosidase	+	+
β-葡萄糖苷酶 β-Glucosidase	+	+	海藻糖 Trehalose	+	+
甘露醇 Mannitol	+	+	鼠李糖 Rhamnose	-	-
麦芽糖 Maltose	+	+	肌醇 Inositol	-	-
侧金盏花醇 Adonitol	-	-	纤维二糖 Cellobiose	+	+
PLE Palatinose	-	-	山梨醇 Sorbitol	+	+
β-葡萄糖醛酶 β-Glucuronidase	-	-	α-麦芽糖苷酶 α-Maltosidase	+	+
β-半乳糖苷酶 β-Galactosidase	?	-	L-天门冬素芳胺酶 L-Aspartic acid Arylamidase	-	-

注: “+” - 阳性; “-” - 阴性。

Note: “+” - positive, “-” - negative.

表 3 哈维氏弧菌与麦氏弧菌的形态学及生理生化性质比较

Table 3 Comparison of morphological, physiological and bio-chemical characteristics among strain EcGY020401, *V. harveyi* and *V. mestechnikovii*

鉴定项目 Item	EcGY 020401	<i>V. harveyi</i>	<i>V. mestechnikovii</i>	鉴定项目 Item	EcGY 020401	<i>V. harveyi</i>	<i>V. mestechnikovii</i>
革兰氏染色 Gram stain	-	-	-	赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	-	-	-
发光现象 Irradiance	-	d	-	精氨酸双水解酶 Arg-dihydrolase	-	-	-
氧化酶 Oxidase	±	+	-	鸟氨酸脱羧酶 Orn-dicarboxylase	-	ND	ND
鞭毛 Flagellum	m	m	m	蔗糖 Sucrose	+	d	+
O-F	F	ND	ND	葡萄糖产气 Glucose produce gas	+	-	-
O/129(10 μg)	±	ND	ND	甘露醇 Mannose	+	+	+
O/129(150 μg)	+	ND	ND	水杨素 Salicin	+	d	-
TCBS	Y	Y	Y	枸橼酸盐 Citrate	+	+	d
硝酸盐还原 Nitrate recovery	+	+	-	麦芽糖 Maltose	+	ND	ND
纤维二糖 Cellobiose	+	+	-	阿拉伯糖 Arabinose	+	d	-
V-P test	-	-	+	木糖 Xylose	-	-	-
4℃ Growth	-	-	-	甘露糖 Nabbise	+	+	d
30℃ Growth	+	+	+	鼠李糖 Rhamnose	-	-	-
35℃ Growth	+	+	+	乳糖 Lactose	-	-	d
42℃ Growth	-	ND	ND	β-半乳糖苷 β-Galactoside	-	ND	ND
0% NaCl	-	ND	ND	乙酰胺 Acetamide	-	ND	ND
1.5% NaCl	+	ND	ND	肌醇 Inositol	-	-	D
3% NaCl	+	ND	ND	乙醇 Ethanol	-	-	-
6% NaCl	+	ND	ND	阿拉伯糖 Arabitol	-	ND	ND
8% NaCl	+	ND	ND	苯丙氨酸 Benzedrinoacid	-	ND	ND
10% NaCl	+	ND	ND	H ₂ S	-	ND	ND

注: “m” - 极生单鞭毛, “F” - 发酵型; “±” - 不十分敏感; “ND” - 未测定; “d” - 有的阴性, 有的阳性, “+” - 阳性; “-” - 阴性。

Note: “m” - monotrichate, “F” - ferment type, “±” - not very sensitive, “ND” - not tested, “d” - sometimes positive sometimes negative, “+” - positive, “-” - negative.

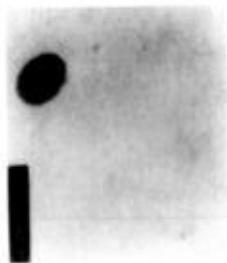


图1 菌株 EcGY020401 电镜照片 ($\times 10\ 000$)
Fig.1 Electron micrograph of *V. harveyi* ($\times 10\ 000$)

2.4 16S rRNA 序列分析

为了进一步确定 EcGY020401 菌株的分类学位置,测定了 EcGY020401 菌株的 16S rRNA 基因的部分序列,序列长度为 1 379 bp。将 EcGY020401 菌株的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 中已登录的海水弧菌属 16S rRNA 基因进行匹配排列,构建了系统进化树(图 2)。从进化树可以看出, EcGY020401 菌株应归为弧菌属的哈维氏弧菌。

2.5 药敏试验

利用纸片法测定 20 种抗菌药物作用,结果见表 4。除了去甲万古霉素、头孢西丁 2 种药外,其他 18 种药物对 EcGY020401 菌株均有抑制作用,其中利复平、四环素、沙星类及头孢曲松有较强抑制作用。

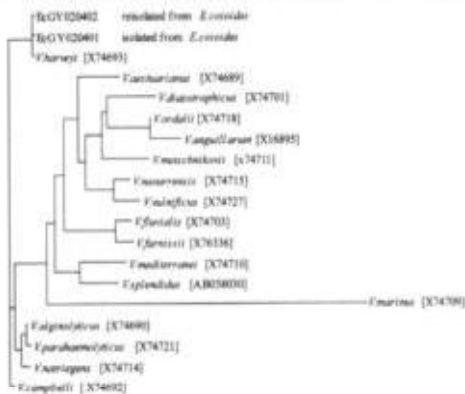


图2 16S rRNA 基因序列分析聚类结果
Fig.2 Results of 16S rRNA gene sequence analysis

表4 不同抗菌药物对致病菌的抗菌活性

Table 4 Antibacterial activities of different antimicrobial agents against the pathogen

抗菌药物 Chemical	含药量 Dose/($\mu\text{g} \cdot \text{disc}^{-1}$)	抑菌圈直径/cm Diameter	抗菌药物 Chemical	含药量 Dose/($\mu\text{g} \cdot \text{disc}^{-1}$)	抑菌圈直径/cm Diameter
利复平 RA	5	2.3	壮观霉素 SPT	100	1.0
头孢拉定 CED	30	1.5	阿米卡星 AN	30	1.4
诺氟沙星 NOR	10	2.8	强力霉素 DO	30	2.3
头孢噻肟 CTX	30	1.6	呋喃妥因 FT	300	1.9
磺胺甲异噁唑 SMX	300	2.7	头孢西丁	/	/
四环素 TE	30	2.8	头孢唑林 CZ	30	1.5
去甲万古霉素 NVA	30	/	伊诺沙星 ENO	10	2.5
头孢曲松 CRO	30	2.8	卡那霉素 K	30	0.9
庆大霉素 GM	10	2.0	氧哌嗪青霉素 PIP	100	0.8
多粘菌素 B CT	25	1.3	头孢孟多 MA	30	1.9

3 讨论

目前,16S rRNA 基因测序分析方法已被广泛用于鱼类细菌性疾病诊断^[7-9]。笔者通过 API 系统 ATB 仪试剂条、细菌学常规生理生化特征鉴定及 16S rRNA 基因测序分析,确定 EcGY020401 菌株为弧菌属的哈维氏弧菌。

近年研究表明,哈维氏弧菌感染海水养殖鱼类宿主。吴后波等^[10]报道从患病高体鲈病灶上分离到 2 株哈维氏弧菌;也有文献^[11-12]报道,从海水网箱养殖患病花鲈幼鱼病灶组织分离到哈维氏弧菌。

本实验表明,哈维氏弧菌 EcGY020401 菌株不发光,与有关文献报道^[13-14]的结果不一致。其原因

可能与种内不同个体之间差异有关。

哈维氏弧菌 EcGY020401 在盐度为 0 不生长,盐度 15~100 皆可生长,表明该菌为嗜盐菌。因此,在细菌常规鉴定时,生化管首先应配成适宜盐度。否则,细菌不生长将会产生假阴性结果直接影响鉴定试验准确性。

通过对 20 种药物的敏感试验,表明哈维氏弧菌 EcGY020401 对利复平、四环素、喹诺酮类及头孢曲松等抗生素较为敏感。这为斜带石斑鱼养殖临床合理用药、防止滥用药提供了依据。

参考文献:

- [1] Wong S Y, Ong B, Chua T E. Isolation, identification of causa-