

养殖牙鲆细菌性病原分离与鉴定^{*}

莫照兰 陈师勇 谭训刚 徐永立 张培军

(中国科学院海洋研究所)

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是我国北方沿海地区的重要经济养殖品种,目前已形成工厂化生产规模。随着养殖密度的增加以及海水污染程度的日益严重,养殖牙鲆出现了各种疾病(曲凌云等, 2000; Mo Zhaolan et al., 2001),造成了巨大的经济损失。

1999~2000年,山东省荣成、威海、青岛胶南及黄岛地区养殖牙鲆大面积发病,疾病发生时间多在每年的6~11月,病鱼多为3~10月龄。本文作者对以上牙鲆发病地区进行了临床病症的调查,并进行了病原的分离和初步鉴定。

一、材料与方法

1. 材料

(1) 病鱼 取自山东省荣成市寻山、邱家集团、青岛胶南大珠山镇和黄岛发电厂牙鲆养殖场。

(2) 健康牙鲆鱼 由寻山、邱家养鱼场提供,实验前置于水温19~22℃的水池暂养20d左右。

2. 方法

(1) 细菌分离 采集症状典型且濒临死亡的病鱼,取病灶及内脏组织分别在2216E海水营养琼脂及TCBS琼脂培养基上进行细菌分离。

(2) 人工感染实验 分离纯化的菌株在2216E斜面25℃培养18h,然后用无菌海水洗下培养物并稀释,制成菌悬液,置4℃备用。将暂养的健康牙鲆分成若干试验组(12.1±2.3g, 9.3±2.5cm),每组牙鲆6尾,于腹部肌肉注射0.2mL菌悬液,对照组注射同等体积的无菌海水。实验水温20~22℃。定时观察记录,取濒死鱼的病灶、内脏器官进行细菌再分离,同时检查病变情况。

(3) 病原菌鉴定 用API20NE(Biomerieux Vitek, France)和BIOLOG细菌鉴定系统对细菌进行生化测试和结果分析。

(4) 抗生素敏感实验 将培养24h的细菌以无菌生理盐水制成菌悬液

^{*} 中国科学院海洋研究所调查研究报告第4214号。

国家重点基础研究专项资助项目, G1999012003号。

收稿日期: 2001年4月10日。

($10^7 \sim 10^8$ cells/mL), 取 0.1 mL 菌悬液涂抹于 2216E 平板。将抗生素纸片 (6 mm) 贴于平板表面, 在 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温下培养 48 h 后观测抑菌圈大小 (药敏纸片购自上海伊华临床医学科技公司)。

二、结 果

1. 病鱼症状

水温较高季节疾病发生较频繁, 病鱼主要有以下三种症状:

- (1) 出血症 病鱼上下颌、鳃盖、眼眶周围及鳍基明显充血, 严重者肌肉、肝、肾充血, 脾肿大, 消化道后段出血。
- (2) 溃烂症 病鱼鳍条、皮肤出血, 鱼体侧或尾柄处脱鳞, 由脱鳞处逐渐溃烂成深洞, 胃幽门严重出血。
- (3) 腹水症 病鱼外观眼球突出, 腹部膨胀。剖解时腹腔充满清亮液体, 肠道臃胀、充满脓性分泌物, 肠壁变薄透明, 肝脏弥漫性充血、质脆, 脾和肾肿大。

2. 病原分离和人工感染试验

从患病牙鲆分离纯化的菌株, 经人工感染实验证实 12 株菌可使健康牙鲆患病死亡, 其中从出血症病鱼中分离到 5 株菌, 从溃烂症和腹水症病鱼中各分离到 4 株和 3 株。感染发病鱼的症状与自然发病鱼症状基本一致, 并且从病死的牙鲆体内均又分离到原接种菌。由表 1~3 可看出, 感染出血症和溃烂症病原的牙鲆发病时间较短, 在 1~5 d 内外观出现病症, 其中感染出血症病原 M7 和溃烂症病原 M3 的牙鲆发病时间最短, 均为 12 h; 而感染腹水症病原的牙鲆发病时间较长, 发病时间一般在 9~12 d。各菌株对牙鲆的致病力也不相同, 注射浓度在 $10^8 \sim 10^9$ cfu/mL 时, 有 9 株菌 (TWL1, YL1, B17, M7, An1, M3, M4, ED1, ED2) 可使 100% 牙鲆死亡; 在 $10^7 \sim 10^8$ cfu/mL 浓度时, M7 和 M3 可使牙鲆 100% 死亡, 其余菌株引起的死亡率在 33%~67%。

表 1 从出血症病鱼分离的菌株人工感染实验结果

菌 株	感染浓度 /(cfu/mL)	剂量 /mL	鱼数 /尾	感染后死亡时间						发 病 时 间	死 亡 数 (实验数)
				1	2	3	4	5	6		
YE1	3.1×10^8	0.2	6	5	5	7	8	9	> 14	2d	5(6)
	3.1×10^7	0.2	6	8	10	> 14	> 14	> 14	> 14	5d	2(6)
TWL1	3.7×10^8	0.2	6	2	2	3	4	6	6	1d	6(6)
	3.7×10^7	0.2	6	4	7	10	10	> 14	> 14	2d	4(6)
YL1	4.4×10^8	0.2	6	5	6	7	8	8	9	3d	6(6)
	4.4×10^7	0.2	6	6	9	> 14	> 14	> 14	> 14	3d	2(6)
B17	2.6×10^8	0.2	6	2	3	3	4	7	7	1d	6(6)
	2.6×10^7	0.2	6	4	4	7	12	> 14	> 14	3d	4(6)
M7	2.9×10^8	0.2	6	1	2	2	2	3	4	12h	6(6)
	2.9×10^7	0.2	6	3	3	5	6	6	6	1d	6(6)
对照	/	0.2	6	> 14	> 14	> 14	> 14	> 14	> 14	/	0(6)

表 2 从皮肤溃烂症分离的菌株人工感染实验结果

菌 株	感染浓度 / (cfu/mL)	剂量 /mL	鱼数 /尾	死亡时间						发 病 时间	死 亡 数 (实验数)
				1	2	3	4	5	6		
A n1	3. 2× 10 ⁸	0. 2	6	2d	2d	4d	6d	7d	8d	2d	6(6)
	3. 2× 10 ⁷	0. 2	6	4d	6d	7d	9d	> 14d	> 14d	3d	4(6)
M 3	5. 1× 10 ⁸	0. 2	6	18h	18h	18h	1d	1d	1d	12h	6(6)
	5. 1× 10 ⁷	0. 2	6	1d	1d	3d	4d	4d	4d	18h	6(6)
M 4	5. 4× 10 ⁸	0. 2	6	1d	1d	2d	2d	2d	3d	18h	6(6)
	5. 4× 10 ⁷	0. 2	6	4d	5d	8d	> 14d	> 14d	> 14d	2d	3(6)
M 6	4. 5× 10 ⁸	0. 2	6	3d	3d	4d	7d	9d	> 14d	2d	5(6)
	4. 5× 10 ⁷	0. 2	6	6d	9d	> 14d	> 14d	> 14d	> 14d	3d	2(6)
对照	/	0. 2	6	> 14d	> 14d	> 14d	> 14d	> 14d	> 14d	/	0(6)

表 3 从腹水症分离的菌株人工感染实验结果

菌 株	感染浓度 / (cfu/mL)	剂量 /mL	鱼数 /尾	死亡时间/d						发 病 时间/ d	死 亡 数 (实验数)
				1	2	3	4	5	6		
ED1	5. 3× 10 ⁸	0. 2	6	7	7	12	13	16	17	10	6(6)
	5. 3× 10 ⁷	0. 2	6	8	10	17	> 21	> 21	> 21	12	3(6)
ED2	4. 7× 10 ⁸	0. 2	6	5	6	7	10	14	> 21	9	5(6)
	4. 7× 10 ⁷	0. 2	6	10	14	14	> 21	> 21	> 21	9	3(6)
ED3	5. 8× 10 ⁸	0. 2	6	4	7	10	14	15	15	9	6(6)
	5. 8× 10 ⁷	0. 2	6	10	12	13	16	> 21	> 21	10	4(6)
对照	/	0. 2	6	> 21	> 21	> 21	> 21	> 21	> 21	/	0(6)

3. 培养特征及生理生化测试

经初步生理、生化鉴定, 分离菌株主要特征为革兰氏阴性杆菌, 其中 YE1、YL1、B17、M 3、M 4、M 6、M 7 对药物 0/ 129(2, 4—二氨基—6, 7—二异丙基喋啶, 150^μg/mL)敏感, H₂O₂ 和氧化酶反应阳性, 葡萄糖发酵或发酵作用不明显, 属弧菌属细菌。利用 API20NE 和 BIOLOG 细菌鉴定系统对细菌作进一步鉴定, 鉴定结果示于表 4。

4. 药物敏感性实验

表 5 是分离的病原菌对 18 种抗生素敏感实验结果。由表可看出, 50%以上的菌株对氯霉素、氟哌酸、丙氟哌酸、呋喃妥因、卡那霉素、丁氨卡那霉素、庆大霉素高度或中度敏感, 几乎所有的菌株对复合磺胺、磺胺异恶唑、链霉素、四环素、利福平和青霉素类抗生素不敏感。

表 4 分离病原菌鉴定结果

菌 株	鉴定方法	鉴定结果
YE1	API20NE	河流弧菌（ <i>Vibrio fluvialis</i> ）
YL1	API20NE	溶藻胶弧菌（ <i>Vibrio alginolyticus</i> ）
TWL1	API20NE	溶血巴士德氏菌（ <i>Pasteurella haemolyticus</i> ）
B17	BIOLOG	创伤弧菌（ <i>Vibrio vulnificus</i> ）
M7	API20NE	副溶血弧菌（ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ）
M3	BIOLOG	副溶血弧菌（ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ）
An1	BIOLOG	鳗弧菌（ <i>Vibrio anguillarum</i> ）
M6	BIOLOG	鳗弧菌（ <i>Vibrio anguillarum</i> ）
M4	BIOLOG	鲨鱼弧菌（ <i>Vibrio carchariae</i> ）
ED1	API20NE	爱德华氏菌（ <i>Edwardella</i> sp.）
ED2	API20NE	爱德华氏菌（ <i>Edwardella</i> sp.）
ED3	API20NE	爱德华氏菌（ <i>Edwardella</i> sp.）

表 5 病原菌的抗生素敏感实验结果

药敏实验	代号	含量 / (μ g/片)	YE1	TWL1	YL1	B17	M7	An1	M3	M4	M6	ED1	ED2	ED3
复合磺胺	SXT	23.75 /1.25	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	8(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)
磺胺异恶唑	SIZ	300	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	4(R)	0(R)	0(R)	6(R)	0(R)
氯霉素	CMP	30	13(I)	23(S)	8(R)	0(R)	13(I)	5(R)	0(R)	19(S)	21(S)	24(S)	21(S)	22(S)
氟哌酸	NOR	10	7(R)	11(R)	13(I)	10(R)	9(R)	16(I)	18(S)	17(S)	17(S)	19(S)	16(I)	15(I)
丙氟哌酸	CIP	5	15(R)	17(I)	16(I)	14(R)	16(I)	18(I)	18(S)	11(R)	18(I)	21(S)	19(I)	18(I)
卡那霉素	KAN	30	13(I)	17(I)	15(I)	4(R)	15(I)	7(R)	5(R)	9(R)	17(I)	19(S)	17(I)	16(I)
丁胺卡那霉素	AKN	30	13(R)	15(I)	18(S)	5(R)	13(R)	7(R)	2(R)	11(R)	16(I)	18(S)	18(S)	17(I)
四环素	TET	30	0(R)	4(R)	0(R)	0(R)	2(R)	0(R)	2(R)	3(R)	0(R)	19(S)	17(I)	19(S)
羧苄青霉素	CAR	100	0(R)	0(R)	0(R)	23(S)	0(R)	2(R)	5(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)
苯唑青霉素	OXA	1	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)
氨卞青霉素	AMP	10	0(R)	0(R)	0(R)	18(S)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)
红霉素	ERY	15	0(R)	0(R)	9(R)	0(R)	9(R)	9(R)	13(I)	15(I)	12(R)	19(I)	20(I)	20(I)
庆大霉素	GEN	10	8(R)	13(I)	15(I)	8(R)	13(I)	10(R)	13(I)	15(I)	16(I)	18(I)	15(I)	12(R)
呋喃妥因	NI	300	12(R)	14(I)	17(S)	13(S)	14(I)	15(I)	19(S)	14(I)	15(I)	21(S)	19(S)	16(S)
青霉素	P-G	10IU	0(R)	0(R)	0(R)	16(S)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)
利福平	RIF	5	8(R)	8(R)	8(R)	7(R)	10(R)	11(R)	10(R)	9(R)	12(R)	16(I)	17(I)	14(R)
妥布霉素	TOB	10	8(R)	13(I)	10(R)	8(R)	12(I)	14(I)	11(R)	9(R)	12(I)	12(I)	10(R)	9(R)
链霉素	STR	10	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	4(R)	5(R)	0(R)	3(R)	7(R)	0(R)	0(R)	6(R)

注: R(不敏感); I(中度敏感); S(敏感)。

三、讨 论

从发病牙鲆分离到的细菌经人工感染实验证实, 有 12 株可使健康牙鲆致病, 其中有 8 株为弧菌。弧菌是海水的正常菌群, 为条件致病菌, 其致病性取决于鱼体的生理状态及水环境的理化条件。牙鲆为冷水性鱼类, 在水温较高季节, 高密度养殖牙鲆容易处于应激状态, 同时海水中的弧菌大量繁殖, 病原菌乘虚而入, 容易爆发弧菌病。从人工感染浓度来看, 感染浓度较高时可导致细菌大量侵入牙鲆引起死亡; 然而也发现一些分离菌株以相当高的浓度感染, 但并未引起死亡, 说明牙鲆死亡的原因是致病菌造成的, 因此需要进一步确定条件致病菌和原发病原菌。在 Austin 等(1995)记录的 13 种由弧菌引发的鱼类疾病中, 鳃弧菌、副溶血弧菌、鲨鱼弧菌、创伤弧菌和霍乱非 O1 弧菌是常见的鱼类病原菌, 但他并未将溶藻胶弧菌(*Vibrio alginolyticus*)和河流弧菌(*Vibrio fluvialis*)列入鱼类病原菌范畴, 这两种菌是对虾和贝类常见病原(Lee et al., 1996; 李太武等, 1996)。在我们的人工感染实验中发现溶藻胶弧菌和河流弧菌可导致牙鲆死亡, 并且出现典型的败血症症状, 由局部感染扩散到内脏器官, 从感染致死牙鲆中也分离到原接种菌, 因此我们认为它们亦是牙鲆的病原。根据文献记载, 引起鱼类腹水症的病原有多种, 如豚鼠气单胞菌(樊海平等, 1999)和枸橼酸杆菌(舒新华等, 1998), 前者引起鱼发病的主要症状为败血症和腹腔积水, 后者则与本实验描述的牙鲆腹水症症状一致。在本文中引起牙鲆腹水症的病原是爱德华氏菌。在进行流行病学调查时发现, 感染爱德华氏菌的前期, 牙鲆外观症状不明显, 死亡率不高, 往往被忽略; 当出现外部症状时, 治疗已经很困难, 常导致牙鲆的大量死亡。巴士德氏菌病在海水鱼中普遍存在, 可感染香鱼、真鲷、红鲷、鲈鱼等养殖鱼类, 其慢性感染特征是肾和脾有白色结节; 急性感染特征是腮盖、鳍基出血, 有的出现皮肤色素沉着, 肝、脾、肾肿大和坏死。我们分离到的溶血性巴士德氏菌, 其感染牙鲆的症状与上述描述的急性感染特征相似, 严重的出现肌肉、消化道出血, 这些特征与弧菌病特征相似。以往报道的巴士德氏菌病的病原主要为杀鱼巴士德氏菌(Edward et al., 1995)。

调查中发现, 在死亡率高的养殖池, 一些发病牙鲆既出现出血症状, 又出现溃烂症状, 体内可同时分离到 2~3 种细菌, 常见的是鳃弧菌和溶藻胶弧菌, 或溶藻胶弧菌、河流弧菌和副溶血弧菌。在进行单株菌的人工感染时, 死亡率不是很高, 症状不是非常明显, 说明自然发病期间的高死亡率是细菌混合感染的结果。本文作者认为, 只有确定原发性和继发性感染的病原, 才能进一步了解病原的感染途径。

分离到的病原菌对四环素、磺胺类、青霉素类抗生素等产生了耐药性, 据了解, 养鱼场经常使用这些抗生素作为防病治病的药物, 导致细菌产生耐药性, 是病原性细菌难以根除的原因之一。由此提示我们在防治牙鲆细菌性疾病时不要滥用化学药物, 以免增加病害控制的难度。预防细菌性疾病发生, 不仅要建立合理的管理措施, 如适当降低养殖密度, 使用新鲜饵料, 减少养殖过程中的机械损伤, 保证流水通畅, 而且还要开展疫苗的研制和推广应用工作, 以达到根本防治细菌性疾病的目的。

参 考 文 献

- 曲凌云、孙修勤、张进兴, 2000, 养殖牙鲆淋巴囊肿病毒的电镜观察, 青岛海洋大学学报, 30(2) II: 105~110.
- 李太武、丁明进、宋协民、相建海、刘瑞玉, 1996, 皱纹盘鲍脓疱病病原菌——河流弧菌- II 的抗药机制的初步研究, 海洋与湖沼, 27(6): 637~645.
- 舒新华、金理、肖克宇、贺顺莲, 1998, 乌鳢腹水病病原的分离和鉴定, 湖南农业大学学报, 24(4): 286~290.
- 樊海平、曾占壮、余培建、李志青, 1999, 由豚鼠气单胞菌引起的欧洲鳗鲡败血症, 水产学报, 23(3): 313~318.
- Austin, B., Austin, D. A., 1995, Vibrionaceae representatives, In: "Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish, Ellis Horwood Limited" (Laird, L. M. eds.), England 265~294.
- Edward, J., Noga, M. S., 1995, Pasteurellosis, In: "Fish Disease: Diagnosis and Treatment" (Linda, L. D. eds.), Mosby-Year Book, Inc., St. Louis Missouri 151.
- Lee K. K., Yu S. R., Yang T. L., 1996, Isolation and characterization of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, *Letters in Applied Microbiology*, 22: 111~114.
- Mo Zhaolan, Tan Xungang, Xu Yongli, Zhang Peijun, 2001, A *Vibrio anguillarum* strain associated with ulcerative skin in cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*, *Chinese Journal of Oceanology and Limnology Sinica*, 19(4): 319~326.

**BACTERIAL PATHOGENS ISOLATED FROM CULTURED
FLOUNDER, *PARALICHTHYS OLIVACEUS* ***

MO Zhaolan, CHEN Shiyong, TAN Xungang, XU Yongli, ZANG Peijun
(*Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences*)

Abstract

Study of bacterial diseases broken in the culture flounder (*Paralichthys olivaceus*) farms of Shandong Province showed the main symptoms of septicemia, skin ulcers and abdominal ascites. Twelve bacterial pathogens were proved to be pathogenic to healthy flounder by artificial infection. These pathogens were identified as *Vibrio* sp., *Pasteurella* sp. and *Edwardsiella* sp. by API20NE and BIOLOG bacterial identification systems. Over fifty percent of the pathogenic strains were sensitive to 7 of the 18 antibiotics.