

## 研究报告

## 黄鳍鲷弧菌病病原特性及其全菌苗的研究\*

丁 燊<sup>1</sup> 徐 刚<sup>2</sup>(中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)<sup>1</sup>(湛江海洋大学水产学院 湛江 524025)<sup>2</sup>

**摘要:** 自湛江市发病养殖黄鳍鲷分离一株致病菌。对该菌的基本特征、药物筛选、灭活全菌苗等进行了研究。结果表明该病原菌为溶藻弧菌, 且对四环素、土霉素、氯霉素、氟哌酸、氧氟沙星等药物敏感, pH6.0 比 pH8.4 时灭活效果好, 加入福尔马林可以提高灭活效果; 全菌苗能够提高鱼体的免疫能力, 减少攻毒时的死亡率。

**关键词:** 黄鳍鲷, 溶藻弧菌, 全菌苗, 免疫

**中图分类号:** S965.231 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 02-0001-05

# THE STUDY OF PATHOGENIC BACTERIA AND WHOLE CELL VACCINE ON SPARUS LATUS VIBRIO DISEASE

DING Yu XU Gang

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

(Fisheries College of Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524025)

**Abstract:** Physiological and biochemical characteristics, drug sensitivity of pathogenic bacteria isolated from the diseased *Sparus latus* in Zhanjiang, Guangdong, and inactivated whole cell vaccine were studied. The results show that the isolated strain is *Vibrio alginolyticus* and is highly sensitive to tetracycline, gentamycin, chloramphenicol, and so on. But it is not sensitive to erythromycin and penicillin K. It also shows that the pathogen is inactivated more easily at pH6.0 than at pH8.4 when formalin is used. The whole cell vaccine can strengthen *Sparus latus*'s immune function and lessen their death rate when fish are infected by the *Vibrio alginolyticus*.

**Key words:** *Sparus latus*, *Vibrio alginolyticus*, Whole cell vaccine, Immunity

黄鳍鲷 (*Sparus latus*) 是一种养殖规模较大的海产经济鱼类, 由于养殖规模的扩大以及环境因子的影响, 其疾病也相继出现。本文对黄鳍鲷弧菌病病原的基本特性和全菌苗的免疫效果进行研究, 以期对这种疾病加以控制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

病鱼, 来源于湛江市特呈岛浮置网箱发病濒死黄鳍鲷。试验用鱼, 购自湛江市原民享市场 (300 ~ 400g/尾), 健康无损伤, 大小较一致。

\* 湛江海洋大学自选课题资助 (No.97008)

收稿日期: 2003-03-27, 修回日期: 2003-06-30

## 1.2 病原分离纯化与人工感染

用无菌操作的方法自病灶取样培养,经划线分离纯化,接种于斜面上保存备用。通过腹腔注射( $4.5 \times 10^8$  菌/尾)正常黄鳍鲷进行人工感染(水体 pH7.2, 温度  $22^\circ\text{C} \sim 30^\circ\text{C}$ ),筛选病原菌<sup>[1]</sup>。

## 1.3 病原菌的鉴定

采用海水异养培养基,参考文献[2~5]所列方法将病原菌鉴定至种。

## 1.4 盐度和 pH 值对病原菌的影响

盐度 (pH7.6) 设立  $0 \text{ mol L}^{-1}$ 、 $0.34 \text{ mol L}^{-1}$ 、 $0.51 \text{ mol L}^{-1}$ 、 $0.68 \text{ mol L}^{-1}$ 、 $1.02 \text{ mol L}^{-1}$ 、 $1.36 \text{ mol L}^{-1}$ 、 $1.70 \text{ mol L}^{-1}$ 、 $2.04 \text{ mol L}^{-1}$ 、 $2.38 \text{ mol L}^{-1}$  等 9 个梯度; pH ( $0.51 \text{ mol L}^{-1}$  NaCl) 设立 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 等 11 个梯度。

## 1.5 药物试验

用纸片法<sup>[7]</sup>(纸片购自北京天坛药物生物技术开发公司)测定各种抗生素的抑菌作用,试管法测定消毒剂“益康露”(为季铵盐类消毒剂,深圳绿泽生物公司生产)的最低抑菌浓度和最低杀菌浓度。

## 1.6 病原菌的灭活条件研究

温度分别用  $65^\circ\text{C}$ 、 $55^\circ\text{C}$ 、 $46^\circ\text{C}$  (pH8.4 和 pH6.0), 福尔马林分别用 0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.1%、0.2%、1% 等浓度,处理后定时测定病原菌的活力。

## 1.7 免疫攻毒

将灭活的病原菌加入弗氏完全佐剂制成全菌苗免疫健康鱼(皮下注射  $200 \mu\text{L}$  菌苗,浓度为  $3.2 \times 10^7$  cpu  $\text{mL}^{-1}$ ),一周后加强免疫 1 次(剂量减半),两周后进行攻毒实验(每尾腹腔注射病原菌  $300 \mu\text{L}$ , 浓度  $3.0 \times 10^8$  cpu  $\text{mL}^{-1}$ , 水体 pH7.4, 温度  $15^\circ\text{C} \sim 18^\circ\text{C}$ ),记录死亡数,并测定血清、鳃组织、肝组织的溶菌活力和抗菌活力<sup>[8,9]</sup>。

# 2 结果

## 2.1 回接感染

通过毒性筛选得到一株病原菌(从 16 株菌中筛选出),将其对应的初分离菌株记为 HD01,回接感染重新分离的菌株记为 HD02。HD01 感染结果见表 1。发病症状为游

表 1 HD01 回接感染试验结果

分组	试验数(尾)	累积死亡数(尾)						死亡率(%)
		1d	2d	3d	4d	5d	6d	
实验组	9	0	3	0	6	6	6	66.7
对照组	9	0	0	0	0	0	0	0

动缓慢,反应迟钝,不摄食,腹部向上仰游,鱼死后弯曲柔软,与天然病鱼症状一致。同时 HD02 菌株通过感染也可以致病,症状也是完全一样的。

## 2.2 鉴定结果

形态学观察表明 HD01 和 HD02 均为短杆状,革兰氏阴性,极生单鞭毛,其生理生化鉴定见表 2。

## 2.3 盐度、pH 值对病原菌的影响

不同盐度和 pH 值条件下,病原菌生长情况见图 1、图 2。

表 2 分离菌株的生理生化特性

项目	HD01	HD02	项目	HD01	HD02
氧化发酵 (O/F)	+(F)	+(F)	H <sub>2</sub> S 产生	-	-
葡萄糖产酸	+	+	赖氨酸脱羧酶	+	+
葡萄糖产气	-	-	鸟氨酸脱羧酶	+	+
蔗糖	+	+	精氨酸双水解酶	-	-
鼠李糖	-	-	脲酶	-	-
麦芽糖	-	-	明胶液化	+	+
乳糖	-	-	TSI	+	+
阿拉伯糖	-	-	西蒙氏柠檬盐	-	-
纤维二糖	+	+	TCBS 生长	+(Y)	+(Y)
肌醇	-	-	42℃生长	+	+
甘露醇	+	+	0 mol L <sup>-1</sup> NaCl 生长	-	-
水杨苷	-	-	0.34mol L <sup>-1</sup> NaCl 生长	+	+
氧化酶	+	+	0.68mol L <sup>-1</sup> NaCl 生长	+	+
过氧化氢酶	+	+	1.02mol L <sup>-1</sup> NaCl 生长	+	+
硝酸盐还原	+	+	1.36mol L <sup>-1</sup> NaCl 生长	+	+
吲哚试验	-	-	1.70mol L <sup>-1</sup> NaCl 生长	+	+
甲基红	+	+	2.04mol L <sup>-1</sup> NaCl 生长	+	+
V.P.	+	+			

注：+ 阳性，- 阴性，F 表示发酵性产酸，Y 表示颜色呈黄色

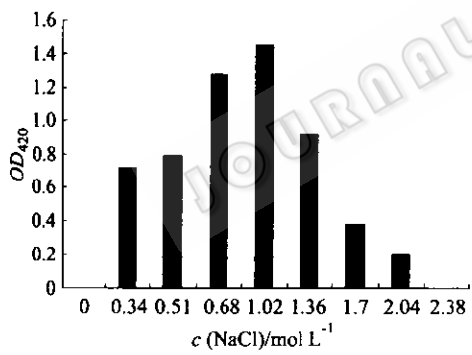


图 1 不同盐度下病原菌的生长

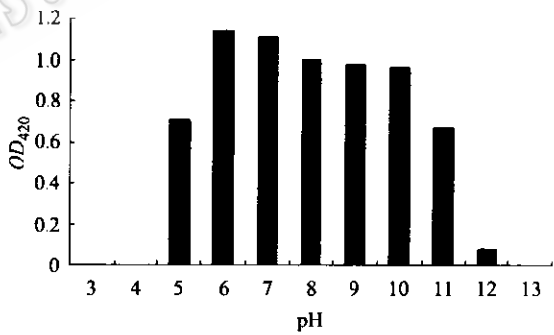


图 2 不同 pH 条件下病原菌的生长

2.4 药物试验

各种抗生素对病原菌的抑菌作用见表 3，消毒剂“益康露”对病原菌有较明显的作用，测定表明其最低抑菌浓度为  $0.17 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ，最低杀菌浓度为  $0.34 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ 。

2.5 灭活条件

pH8.4 条件下，65℃、55℃、46℃病原菌的灭活时间分别为 72h、85 h、94h；pH6.0 条件下，65℃、55℃、46℃病原菌的灭活时间分别为 30h、53h、57h；当 pH6.0，温度 65℃时，0.2% ~ 1.0% 福尔马林 12h 内可以灭活病原菌，0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05% 分别需 192h、168h、60h、48h、48h 能彻底灭活病原菌。

表 3 病原菌对抗生素的敏感性

药物名称	药物浓度 (μg/mL)	抑菌圈大小 (mm)	抑菌效果
乙酰螺旋霉素	30	11	R
先锋霉素 IV	30	12	R
氧氟沙星	30	30	S
头孢拉定	15	16	MS
四环素	30	27	S
氯霉素	30	35	S
土霉素	30	28	S
氟哌酸	10	30	S
交沙霉素	30	14	MS
庆大霉素	10	25	S
链霉素	10	18	MS
红霉素	15	12	R
青霉素	10 (U/mL)	12	R

注: S 敏感, MS 中度敏感, R 抗药

2.6 免疫结果

全菌苗免疫后可以提高保护率, 其结果见表 4, 溶菌活力 (相对酶活) 和抗菌活力测定结果见表 5。

表 4 免疫攻毒试验结果

分组	实验数 (尾)	累积死亡数 (尾)						死亡率 (%)
		1d	2d	3d	4d	5d	6d	
实验组	13	0	0	2	2	3	3	23.1
对照组	13	0	4	6	9	11	11	86.6

表 5 免疫指标测定

项目	分组	酶活 (X ± SD)		
		血清	鳃	肝
溶菌活力	实验组	0.231 ± 0.005	0.061 ± 0.001	0.029 ± 0.001
	对照组	0.217 ± 0.004	0.030 ± 0.003	0.025 ± 0.001
抗菌活力	实验组	0.259 ± 0.002	0.087 ± 0.002	0.058 ± 0.002
	对照组	0.238 ± 0.004	0.053 ± 0.001	0.052 ± 0.003

注: 酶活值为平均值, ± 标准误差 (N = 5), 鳃差异极显著 (P < 0.01), 肝差异显著 (P < 0.05), 血清不显著 (P > 0.05)

3 讨论与结论

3.1 病原的分类地位

通过病原的分离纯化以及回接感染试验, 发病症状的比较, 说明 HD01 和 HD02 是黄鳍鲷的致病菌, 且它们完全是同一种菌。该病原菌呈短杆状, 革兰氏阴性, 极端单鞭毛, pH 适宜范围为 5 ~ 11, 盐度适宜范围是 0.34 ~ 1.36mol L<sup>-1</sup>, 42℃ 可以生长。氧化酶、V.P.、硝酸盐还原阳性, 葡萄糖发酵产酸不产气, 脲酶阴性等特征与弧菌属特征

一致。而精氨酸双水解阴性,赖氨酸脱羧酶阳性,蔗糖发酵产酸不产气,不能利用肌醇、鼠李糖、麦芽糖,对盐度的要求等特征与溶藻弧菌特征一致<sup>[5]</sup>。所以病原菌被鉴定为溶藻弧菌。

### 3.2 药物的影响

药敏试验结果表明,该病原菌对乙酰螺旋霉素、先锋霉素Ⅳ、红霉素、青霉素不敏感,对头孢拉定、交沙霉素、链霉素等中度敏感,对氧氟沙星、四环素、氯霉素、氟哌酸、庆大霉素、土霉素等敏感。说明可以用某些抗生素对该病进行紧急治疗,供实际生产参考,但作者不提倡滥用抗生素。

“益康露”是水产上常用的一种消毒剂,对某些病原菌有较好的消毒作用。“益康露”对该弧菌有一定的抑制作用,其最低抑菌浓度为  $0.17 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (原液稀释 400 倍),最低杀菌浓度为  $0.34 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (原液稀释 200 倍),表明该消毒剂对此病原菌效果不是特别理想,也不经济,使用时要谨慎,以免产生耐药性(尽管该消毒剂对其他病原菌有较好的杀灭作用)。

### 3.3 灭活与免疫

灭活实验表明 pH6.0 条件下比 pH8.4 条件下效果要好,加入一定量的福尔马林后可以改善灭活效果。我们可以采用适宜条件 pH6.0、65℃、0.2% 福尔马林来制备疫苗。

健康鱼经过免疫灭活全菌苗可以提高其免疫功能,攻毒时使死亡率大为减少,免疫组死亡率为 23.1%,对照组为 86.6%,对实际生产具有较大价值,但保护率还没达到 100%,使用条件和作用机制还需深入研究。同时溶菌活力、抗菌活力测定结果表明血清、鳃活力得到一定提高,尤其是鳃组织活力变化较大 ( $P < 0.01$ ),鳃可能对该病原的入侵通过溶菌抗菌起着重要的屏障作用;肝组织次之 ( $P < 0.05$ );而血清中酶活变化不显著 ( $P > 0.05$ ),看来血清主要通过体液免疫保护机体(体液免疫机制另文发表)。

**致谢** 徐刚为湛江海洋大学 99 届毕业生,参与了前期部分工作,特此感谢!

### 参考文献

- [1] 郑国兴. 水产学报, 1986, 10 (2): 195 ~ 202.
- [2] 樊海平. 水产学报, 1994, 18 (1): 32 ~ 38.
- [3] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978. 66 ~ 194.
- [4] 美国食品与药品管理局. 细菌学分析手册. 北京: 轻工出版社, 1986. 406 ~ 455.
- [5] Krig N R, Holt J G. Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore: the William & Wilkins Co, 1984. 545 ~ 548.
- [6] 郑国兴. 水产学报, 1991, 15 (2): 85 ~ 93.
- [7] 郑国兴. 水产学报, 1986, 10 (4): 433 ~ 439.
- [8] 廖伏初. 内陆水产, 1996, 8: 2 ~ 3.
- [9] 孙虎山, 李光友. 海洋科学, 1999, 5: 40 ~ 44.