

鳃弧菌 W-1 对花鲈鱼苗致病性的初步研究

肖 慧,唐学玺,陈吉祥,张培玉,蔡恒江

(中国海洋大学 海洋生命学院,山东 青岛 266003)

摘要:为研制和生产鲈鱼苗疫苗提供依据,采用人工感染试验方法测试了花鲈(*Lateolabrax japonicus*)烂尾、出血病病原菌 W-1 菌株(鳃弧菌 *Vibrio anguillarum*)对花鲈苗的半致死浓度(LD₅₀)及不同保存条件下的 W-1 菌株的致病力。试验结果表明:W-1 菌浴感染花鲈苗的半致死浓度为 $2.5 \times 10^{7.5}$ 个/mL,针刺后菌浴感染花鲈苗的半致死浓度为 2.5×10^7 个/mL;该病原菌为一条件致病菌,创伤感染是主要的致病途径;常温多次传代、15、-20 和 -80 等不同保存条件下 W-1 菌株的致病力均很强,但常温多次传代保存的菌株致病力比其他 3 种方法保存的菌株致病力稍差一些。

关键词:花鲈(*Lateolabrax japonicus*)苗;鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*);人工感染;半致死浓度(LD₅₀)
中图分类号:S941.42 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3096(2008)03-0036-04

花鲈(*Lateolabrax japonicus*)在分类学上属鲈形目、鲈科、鲈属,主要分布于黄海和渤海沿岸海域,是名贵经济鱼类之一。在鲈鱼苗期,病害问题日益严重,给渔民带来严重经济损失。1997 年 4 月从鲈鱼苗体内已成功分离出病原菌鳃弧菌 W-1,其感染致病力达 80% 以上^[1]。本研究在此基础上,测试了 W-1 菌株对鲈鱼苗的半致死浓度,探索了不同保存温度下 W-1 菌株的致病力,以期为进一步研制生产鲈鱼苗疫苗提供理论基础和试验依据。

1 材料与方 法

1.1 菌株

鲈鱼苗出血、烂尾病病原菌鳃弧菌 W-1 菌株(1997 年 4 月分离)及常温多次传代(每月在斜面培养基上传代一次,共传了 11 次)、15 (在培养好的斜面上覆盖一层无菌石蜡油并将试管口用封口膜密封)、-20 和 -80 等温度保存 1 a 后的 W-1 菌株。

采用 2216E 培养基。配方:蛋白胨 5 g,酵母膏 1 g,磷酸高铁 0.01 g,琼脂 20 g,陈海水 1 000 mL, pH 7.6~7.8。培养温度为 25。

菌株保种液为含 15% 甘油的 2216E 液体培养基。

1.2 花 鲈

试验用花鲈为山东省莱州大华水产养殖场暂养的捕自莱州湾的海捕花鲈鱼苗,体长 3~5 cm,体质量 2 g 左右。

1.3 病原菌的条件致病性及致病途径试验

对试验花鲈鱼苗(已暂养 7 d)采用无菌针头穿

刺腹部肌肉和剪掉部分尾鳍 2 种方法进行创伤,同时设不经菌浴的对照组和不经创伤及菌浴处理的对照组,水温控制在 18~20,20 L 海水中通气,按常规投喂换水饲养,连续观察 7 d。

1.4 半致死浓度(LD₅₀)测定

将 48 h 培养的 W-1 菌液(2216E 斜面培养,用无菌生理盐水振荡后稀释)稀释成 $10^9 \sim 10$ 个/mL 等 9 个浓度。每个浓度取 50 尾花鲈苗,菌浴或腹部针刺后菌浴 0.5 h,然后分为两个平行组,每组 25 尾,分别置于 11 L 小塑料桶(装水 8 L)通气饲养。用不加处理的花鲈苗作为对照。根据各组死亡率和存活率绘制曲线,并用直线内插法计算其 LD₅₀^[2]。

1.5 不同保存条件下病原菌 W-1 的致病力

测定了常温多次传代、15、-20 和 -80 等温度保存 1 a 后的 W-1 菌株对鲈鱼苗的致病力。感染浓度为 10^9 个/mL。感染方法为菌浴法和针刺后菌浴法两种。

收稿日期:2005-06-20;修回日期:2008-01-03

基金项目:教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-05-0597);国家 863 计划项目(2007AA09Z416);农业部公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx07-046)

作者简介:肖慧(1973-)女,湖南益阳人,博士研究生,主要从事海洋生态学研究;唐学玺,通讯作者,电话:0532-82032952, E-mail: tangxx@ouc.edu.cn

2 结果

2.1 人工感染试验

剪尾和腹部针刺两种创伤感染方法均可使鱼感

表 1 人工感染试验结果

Tab. 1 Results of the challenge test

感染方法	菌株感染浓度(个/mL)	试验鱼数量(尾)	发病鱼数量(尾)	死亡鱼数量(尾)	死亡率(%)
针刺后菌浴	2.5×10^8	15	14	14	93.3
针刺后不菌浴	0	15	0	0	0
剪尾后菌浴	2.5×10^8	15	5	5	33.3
剪尾后不菌浴	0	15	0	0	0
对照	0	15	0	0	0

注:所用菌株为 W-1

2.2 半致死浓度测定试验

实验结果表明,低浓度下病原菌的致病力并不强,创伤能提高致病力。具体试验结果见图 1、图 2 和表 2。

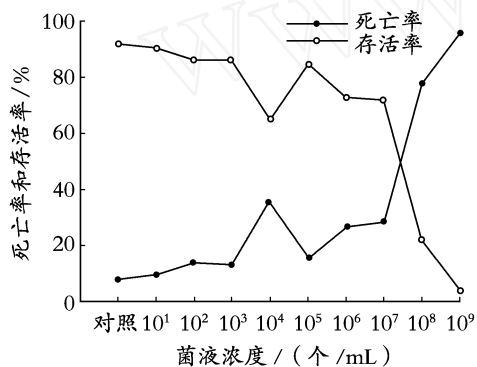


图 1 菌浴组鲈鱼苗的半致死浓度

Fig. 1 The LD₅₀ of seaperch fry challenged with bacterial immersion

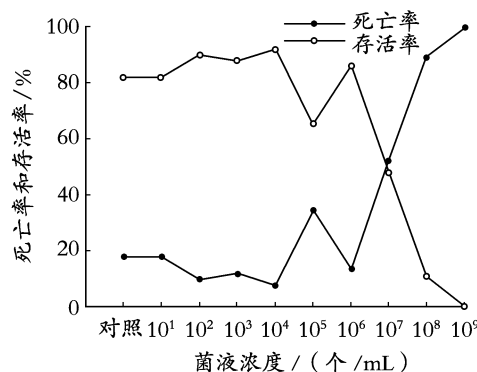


图 2 针刺后菌浴组鲈鱼苗的半致死浓度

Fig. 2 The LD₅₀ of seaperch fry challenged with bacterial immersion after abdominal puncture

染发病。病鱼表现出与自然发病鱼相同症状,先是体色变深,游泳能力减弱,进食减少或不进食,创伤部位红肿发炎,眼睛充血,尾鳍、背鳍溃烂,最终死亡。试验结果见表 1。

对鱼苗单纯菌浴感染浓度低于 10^7 个/mL 时,死亡率很低,达 10^7 个/mL 时,死亡率仅平均为 28%,达 10^8 个/mL 时,死亡率平均为 79%(对照组死亡率为 8%);针刺后菌浴浓度达 10^7 个/mL 时,死亡率高于不经创伤菌浴组,平均为 52.1%,达 10^8 个/mL 时,死亡率平均为 89.2%(对照组死亡率为 18%)。

根据图 1、图 2 用内插法分别算出用 W-1 菌浴感染花鲈苗的 LD₅₀ 为 $2.5 \times 10^{7.5}$ 个/mL;针刺后菌浴感染花鲈苗的 LD₅₀ 为 2.5×10^7 个/mL。

表 2 不同浓度的 W-1 菌株感染花鲈苗的死亡率

Tab. 2 The mortality of immersion-infected seaperch fry at different concentrations

菌株浓度 (个/mL)	死亡率(%)		存活率(%)	
	菌浴组	针刺后菌浴组	菌浴组	针刺后菌浴组
对照	8.0	18.0	92.0	82.0
10	9.6	18.0	90.4	82.0
10^2	14.0	10.0	86.0	90.0
10^3	13.5	12.0	86.5	88.0
10^4	35.3	8.0	64.7	92.0
10^5	15.4	34.5	84.6	65.5
10^6	26.9	14.0	73.1	86.0
10^7	28.0	52.1	72.0	47.9
10^8	78.0	89.2	22.0	10.8
10^9	96.0	100	4.0	0

2.3 菌株不同保存条件对 W-1 致病力的影响

本试验采用菌浴法和针刺后菌浴法测定了不同

保存方法保存 1 a 后的 W-1 菌株的致病力。结果见表 3。

表 3 菌浴及针刺后菌浴法感染时各种保存条件下的 W-1 菌株对花鲈苗的致死率

Tab.3 The mortality of seaperch fry with immersion infection and immersion infection after abdominal puncture with W-1 stored in different conditions

保存条件	死亡率 (%)	
	菌浴组	针刺后菌浴组
对照	15.4	28
多次传代	84.0	100
15 保存	95.7	100
- 20 保存	92.3	100
- 80 保存	96.0	100

3 讨论

3.1 病鱼的症状

细菌性疾病是海水养殖鱼类中常见的危害较大的一类疾病,其中,弧菌病最常发生。弧菌病的症状随弧菌及鱼的种类不同而有差别^[3,4]。本试验中自然发病鱼和人工感染致病鱼主要症状为厌食,体色变黑,离群浮游,游动缓慢,体表严重充血,鳞片脱落,甚至皮肤溃疡,鳍条及基部充血,最终完全溃烂;解剖后发现肝脏、脾脏肿胀,肝脏色浅,肠道发炎;有些幼小的鱼苗感染发病后仅表现为厌食,体色加深,然后突然死亡,解剖内部组织观察不到异常。这些都符合弧菌病的基本症状^[3,5,6]。

3.2 病原菌的致病力和传播途径

Roberts^[4]认为某些弧菌是严重的水产鱼类致病菌,感染时发病率为 40% 以上,最高达 100%,尤以幼鱼为甚。本试验中从鲈鱼病鱼苗所分离的鳃弧菌 W-1 菌株,鲈鱼幼鱼及鲈鱼苗感染后死亡率很高,感染时死亡率大于 80%,最高可达 100%,说明该菌株毒力较强,也符合 Roberts 的有关描述。

创伤能提高弧菌的致病力^[7,8]。同等浓度下,创伤后菌浴组鱼苗的死亡率比单纯菌浴组鱼苗的死亡率要高。当感染浓度分别为 10^9 , 10^8 , 10^7 个/mL 时,创伤后菌浴组鱼苗死亡率最高分别为 100%, 89.2%, 52.1%, 而单纯菌浴组鱼苗最高分别为 96%, 78%, 28%。此外,根据图 1、图 2,用内插法得出单纯菌浴感染鱼苗时 LD_{50} 为 $2.5 \times 10^{7.5}$ 个/mL; 针刺后菌浴感染鱼苗时 LD_{50} 为 2.5×10^7 个/mL; 可见创伤后的 LD_{50} 比较低。由此可见,受创伤的鲈鱼

更易被鳃弧菌感染。

此外,本试验中比较了剪尾和腹部针刺两种创伤感染方法的致病力,发现针刺后菌浴感染组死亡率 (93.3%) 明显高于剪尾后菌浴感染组 (33.3%)。这很可能因为鳃弧菌主要经皮肤感染,针刺后病原菌更容易直接大量进入鱼体内,使鱼迅速感染,败血死亡。因此,在鲈鱼苗的运输或养殖过程中,应尽量避免鱼苗受伤,减少发病率。

3.3 弧菌的条件致病性

弧菌被认为是一种条件致病菌^[3,5,9]。海水养殖动物病害的发生与弧菌数量密切相关,超过一定阈值才会暴发弧菌病。在鱼体受伤或环境条件对鱼不利时,更容易侵入鱼体并引起疾病。同时,从发病海洋动物中所分离的弧菌,人工感染试验证实 Koch 法则时,往往需要接种较大量的细菌 (10^8 个/mL),才可以感染发病。

本试验结果与上述观点基本一致。人工菌浴感染试验表明:当感染浓度低时,感染组的死亡率与对照组相比,没有显著的变化;当菌浴感染浓度达 10^8 个/mL、创伤后菌浴感染浓度达 10^7 个/mL 时,死亡率迅速提高,均大于 50%;当浓度达 10^9 个/mL 时,致死率最高达 100%。

鱼苗自身健康程度的差异导致对弧菌病的抵抗力的差异。体质弱小的鱼苗更易被弧菌感染而发病。从试验结果可以看出,用不同来源的鱼苗进行感染试验时,对照组之间存活率差别很大,最高为 100%,最低为 82%;相同条件下感染组死亡率差别也很大,最高为 100%,最低为 78%。

在本试验过程中,人工感染试验的死亡率有时不稳定。第一年和第二年的鲈鱼试验结果有些差异,同年试验组中也有反常现象。例如第一次人工感染试验中,针刺后不菌浴组死亡率为 0,而在半致死浓度测定试验中,针刺后不菌浴组死亡率为 18%,两组试验结果有一定差异。可能因为鲈鱼为海捕鱼苗,来源差异很大,加上由于养殖条件所限而驯养时间不同以及试验期间管理差异等原因。同时,也说明体质较弱、管理条件不好的鱼更容易感染发病。

3.4 不同保存条件下菌株的致病性

本试验测定了在常温下定期传代保存(每月传代一次,共传了 11 次)和 15 生化培养箱(保存期间未被污染,也未传代)、- 20、- 80 冷冻条件保存 1 a 后的 W-1 菌种的致病力。试验结果表明,在 15、- 20、- 80 冷藏条件下保存的菌株不易变异,感染效果很好。这 3 种方法保存 1 a 后的 W-1 菌株致病力均很强,差别不大,感染鱼的死亡率均在

90%以上,最高达100%;常温下经多次传代后的W-1菌株致病力相对低一些,但也达到了84.0%。这对下一步鳗弧菌疫苗研制中抗原的制备和保存具有指导意义。通常病原菌在体外人工培养基上连续多次传代后,毒力一般都逐渐减弱乃至失去毒力。但本实验中常温下经传代11次后菌株致病力仍较强,可能是因为该菌的致病性较强,传代次数不是很多,而且所用菌液浓度较高(10^9 个/mL)。在各种保存条件下的W-1菌株性状和致病力不发生改变的,最高保存期限,因试验期限所致,不能确定,仍有待进一步研究。

参考文献:

[1] 肖慧,李军,王祥红,等. 鲈鱼苗烂鳃,烂尾病原菌的研究[J]. 青岛海洋大学学报,1999,29(1):87-93.
 [2] 周永欣,张宗涉. 水生生物毒性试验方法[M]. 北京:中

国农业出版社,1989.112-114.
 [3] Austin B, Austin D A. Bacterial Fish Pathogens: Disease in farmed and wild fish[M]. U. K. Chichester: Ellis Horwood Limited. 1993. 265-314.
 [4] Roberts R J. 鱼病学教程[M]. 李跃祖,华鼎可译. 北京:中国农业出版社,1984. 215-217.
 [5] 孟庆显. 海水养殖动物病害学[M]. 北京:中国农业出版社,1996. 63-76.
 [6] 吴后波,潘金培. 弧菌属细菌及其所致海水养殖动物疾病[J]. 中国水产科学,2001,8(1):89-93.
 [7] 李军,冯娟. 香港地区网箱养殖平鲷病原菌(溶藻胶弧菌)的研究[J]. 水产学报,1998,22(3):275-278.
 [8] 刘秀珍,邹晓理. 海水网箱养殖石斑鱼病原菌研究[J]. 热带海洋,1994,13(1):7-9.
 [9] Valerie I, Roberts R J, Bromage N R. Bacterial Disease of Fish[M]. Oxford: Blackwell Scientific Publications,1993. 109-121.

Preliminary studies on the pathogenicity of *Vibrio anguillarum* W-1 in seaperch fry

XIAO Hui, TANG Xue-xi, CHEN Ji-xiang, ZHANG Pei-yu, CAI Heng-jiang

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

Received: Jun. 20, 2005

Key words: seaperch (*Lateolabrax japonicus*) fry; *Vibrio anguillarum*; artificial infection; lethal dose for 50% (LD₅₀)

Abstract: The lethal dose for 50% (LD₅₀) of *Vibrio anguillarum* W-1 in seaperch fry and the pathogenicity of strain W-1 stored in different conditions were investigated in this paper. The results showed that the LD₅₀ for seaperch fry with immersion infection was $2.5 \times 10^{7.5}$ cell/mL while the LD₅₀ for the seaperch fry challenged with immersion after abdominal puncture was 2.5×10^7 cell/mL. The pathogen W-1 was an opportunistic pathogen and injury was the main infection factor. In addition, the strain W-1 reproduced many times as well as the strain W-1 stored at 15, -20 and -80 had a strong pathogenicity to the seaperch fry.

(本文编辑:刘珊珊)