

陈尚坤, 胡亚琦, 杨健, 等. 三亚地区石斑鱼养殖场养殖模式、水质特征及病原感染现状调查 [J]. 畜牧与兽医, 2026, 58 (10): 77-84.

Chen S K, Hu Y Q, Yang J, et al. Survey of farming patterns, water quality and pathogens in grouper farms in Sanya [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2026, 58 (10): 77-84.

三亚地区石斑鱼养殖场养殖模式、水质特征及病原感染现状调查

陈尚坤^{1,2}, 胡亚琦^{1,2}, 杨健^{1,2}, 冯世源^{1,2}, 许媛媛^{1,2*}

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210014;

2. 南京农业大学三亚研究院, 海南 三亚 572100)

摘要: 旨在了解海南三亚及其周边地区石斑鱼疾病流行态势。选择具有代表性的乐东黎族自治县 (简称乐东县) 及东方市规模化养殖场, 开展养殖模式、水体水质以及鱼群病原感染现状调查。现场调查显示: 乐东县养殖场存在总氮超标、部分重金属含量偏高问题, 病鱼池水体浑浊, 患病东星斑出现褪色、活力下降等症状, 病鱼解剖未见肉眼可见脏器病变, 无明显虫体及虫卵; 东方市循环水养殖系统水质整体优良; 两养殖场养殖密度均处于较高水平。病原学调查结果显示: 在三亚市乐东县的东星斑样本中检测到神经坏死病毒 (NNV), 乐东县的老虎斑样本以及东方市的东星斑样本中均检测到创伤弧菌。在三亚市周边规模化石斑鱼养殖场中, 27 份鱼组织样本中 NNV 的检出率为 22.22%, 高于创伤弧菌, 表明其在当地养殖环境中可能存在重要的流行趋势。进一步鉴定结果表明, 所检测到的 NNV 为 RGNNV 基因型。本研究结果为海南三亚周边地区制定有效的石斑鱼疾病管理策略、保障石斑鱼养殖产业的可持续发展提供了重要科学依据。

关键词: 石斑鱼; 流行病学调查; 神经坏死病毒; 创伤弧菌; 基因分型鉴定。

中图分类号: S943 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2026)10-0077-08

Survey of farming patterns, water quality and pathogens in grouper farms in Sanya

CHEN Shangkun^{1,2}, HU Yaqi^{1,2}, YANG Jian^{1,2}, FENG Shiyuan^{1,2}, XU Yuanyuan^{1,2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210014, China;

2. Sanya Institute of Nanjing Agricultural University, Sanya 572100, China)

Abstract: This study aimed to investigate the epidemiological prevalence of grouper diseases in Sanya, Hainan and its surrounding areas. Epidemiological surveys and pathogen identification of common viral and bacterial diseases were conducted in representative large-scale grouper farms in Ledong Li Autonomous County and Dongfang City. The on-site survey showed that the fish farm in Ledong County had total nitrogen levels exceeding the standard limit and relatively high levels of some heavy metals; the water in the pond holding diseased fish was turbid, and the diseased *Epinephelus staroides* showed discoloration and reduced vitality. At necropsy, no grossly visible lesions in the internal organs were observed in the diseased fish, and no obvious parasites or parasitic eggs were found. The water quality of the recirculating aquaculture system in Dongfang City was generally excellent. The stocking densities of both farms were relatively high. The results of the etiological investigation were results as follows: nervous necrosis virus (NNV) was detected in *E. staroides* samples from Ledong County, Sanya, while *Vibrio vulnificus* was identified in both *E. fuscoguttatus* samples from Ledong County and *E. staroides* samples from Dongfang City. Among the 27 fish tissue samples collected from large-scale grouper farms around Sanya, the detection rate of NNV was 22.22%, which was higher than that of *V. vulnificus*, indicating an important epidemic trend of NNV in the local aquaculture environment. Further identification confirmed that the detected NNV belonged to the RGNNV genotype. The results of this study provided an important scientific basis for formulating effective grouper disease management strategies and ensuring the sustainable development of the grouper aquaculture industry in the areas surrounding Sanya, Hainan.

Keywords: grouper; epidemiologic investigation; nervous necrosis virus; *Vibrio vulnificus*; identification of viral genotype

收稿日期: 2025-10-18; 修回日期: 2026-07-24

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32272963)

第一作者: 陈尚坤, 男, 硕士

* 通信作者: 许媛媛, 博士, 教授, 主要从事动物疫病精准诊断技术和综合防控技术方面的研究, E-mail: xuyuanyuan@njau.edu.cn。

石斑鱼是鮨科石斑鱼属的重要经济鱼种，全球已鉴定种类逾 400 种，我国大陆沿海分布约 45 种^[1-2]。据统计，我国石斑鱼养殖年产量已突破 10 万 t，产业规模超百亿元^[3]。海南省作为我国石斑鱼养殖核心区，已在乐东黎族自治县（简称乐东县）和东方市等地形成了东星斑和老虎斑等高附加值品种的规模化养殖，2022 年养殖产量达 65 437 t，占全国总产量的 31.8%，成功推动了区域产业发展^[4]。然而，随着石斑鱼养殖规模的扩大，相关疾病问题也日益凸显，尤其是每年春末至夏秋季高温期，各类传染性疾病呈现暴发态势，对产业造成重大经济损失^[5]。

在病毒性疾病方面，石斑鱼虹彩病毒病与病毒性神经坏死病构成主要威胁。前者由石斑鱼虹彩病毒（grouper iridovirus, GIV）引发，根据国际病毒分类委员会分类标准，主要包含蛙病毒属（*Ranavirus*, GIV-R）和巨大细胞病毒属（*Megalocytivirus*, GIV-M）两大类群^[6]。石斑鱼感染 GIV 后，典型临床症状表现为体色黑化、游动迟缓直至昏睡，病程进展迅速，感染群体 1 周内死亡率可达 90% 以上^[7-8]。后者病原为乙型野田村病毒属的神经坏死病毒（nervous necrosis virus, NNV），依据宿主特异性可分为 4 种基因型：条斑星鲷型（BFNNV）、红鳍东方鲀型（TPNNV）、拟鲈型（SJNNV）及赤点石斑鱼型（RGNNV）^[9-10]。该病以中枢神经系统损伤为特征，病鱼呈现角膜浑浊、垂直螺旋游动等神经症状。幼鱼感染后呈现 100% 致死率，因缺乏典型体表病变而具有较强隐蔽性^[11-12]。

细菌性病原方面，弧菌病与链球菌病构成主要生物安全威胁^[13]。弧菌中，副溶血弧菌（*Vibrio parahaemolyticus*）和创伤弧菌（*V. vulnificus*）通过水体传播引发表皮溃疡、鳍基出血及多组织炎症，流行病学调查显示其所致疾病占比达 66.7%，平均致死率 50%^[14]。链球菌病则以无乳链球菌（*Streptococcus agalactiae*）为主要病原，常与爱德华菌（*Edwardsiella*）形成混合感染，临床表现为运动失衡、内脏出血及肝脾肿大等典型败血症特征，致死率介于 50% ~ 70%^[15-17]。

本研究聚焦海南省石斑鱼主养区，选取乐东县与东方市具有代表性的规模化养殖场进行常见流行病学感染病原检测与鉴定分析，为阐明海南地区石斑鱼主要传染病的流行规律和构建区域性疫病防控体系提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

LB 肉汤培养基（上海生工生物工程股份有限公

司）；TCBS 培养基、3% 氯化钠碱性蛋白胨水、PNCC 增菌液（青岛海博生物技术有限公司）；TRIzol 总 RNA 抽提试剂（碧云天生物技术有限公司）；Evo M-MLV 反转录试剂预混液、SYBR® Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒、PCR Master Mix 试剂盒（湖南艾科瑞生物工程有限公司）。

针对石斑鱼 GIV MCP 基因^[18-19]（分型 GIV-R 与 GIV-M）及神经坏死病毒（NNV）RNA1、RNA2 基因序列（GenBank ID: KJ541747、NC008041）完成引物设计（表 1）。用于检测细菌 16S rRNA^[20]、副溶血弧菌 *tlh*（GenBank ID: MH047289）、创伤弧菌 *vvhA*（GenBank ID: HQ878436）、无乳链球菌 *sip*（GenBank ID: M34670）的引物信息见表 2。引物由上海生工生物科技有限公司合成。用超纯水稀释到 10 μmol/L 作为储存液，-20 ℃ 保存。

表 1 病毒性病原检测所用引物信息

基因名称	引物序列（5'→3'）	大小/bp
GIV-R	F: ATGACTTGTACAACGGGT	1 392
	R: TTACAAGATAGGGAACCCCAT	
GIV-M	F: TCATTGTCATCATCATGTCTGC	1 362
	R: AGACACACGGGGCAATC	
NNV RNA1	F: GCGATCTTGCTCGTCATTACC	237
	R: AGTCCTAGCCACTTTGCG	
NNV RNA2	F: ACTGGATTGGACGTGGGAC	736
	R: TGCCAGCATTTCCAGCAAAC	

表 2 细菌性病原检测所用引物信息

基因名称	引物序列（5'→3'）	大小/bp
16S rRNA	27 F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1 500
	1492 R: TACGGCTACCTTGTACGACTT	
<i>tlh</i>	F: GACATTACGTTCTTCGCCGC	109
	R: CACCGAGTGCAACCACTTTG	
<i>vvhA</i>	F: CCGCCGGTACAGGTTGGCGCA	519
	R: CGCCACCACTTTCTGGGCC	
<i>sip</i>	F: CAGATACGACGTGGACAGCA	182
	R: AGCAGCATTTGTTGCTGCTG	

1.2 主要仪器

多参数水质检测仪（厦门盘天生物科技有限公司）；LightCycler 96 实时荧光定量 PCR 仪（瑞士罗氏集团）；分析天平（北京赛多利斯科学仪器有限公司）；高速冷冻离心机（德国艾本德股份公司）；水平琼脂糖电泳系统（北京市六一仪器厂）；凝胶成像分析仪（北京信诺莱伯仪器有限公司）；PCR 仪（赛

默飞世尔科技(中国)有限公司)。

1.3 现场调查

对海南三亚及其周边地区乐东县和东方市的 2 个具有代表性的较大规模石斑鱼养殖基地开展养殖情况调查。调查内容包括:(1) 养殖模式分析:记录养殖池水循环模式(如循环水或流水式)、主养品种(东星斑、老虎斑等)及密度;(2) 水质参数检测:采用多参数水质检测仪测定养殖水体 pH 值、溶解氧(DO)、总磷(TP)、总氮(TN)等指标,检测方法依据 GB 11607—89《渔业水质标准》及《水和废水监测分析方法》(第 4 版);(3) 鱼类健康状态观察:观察养殖群体摄食行为、体表完整性(溃疡、出血等)、异常游动(螺旋式或失衡状态)及死亡情况。

1.4 样本采集与溯源

遵循“养殖池分层抽样+单池唯一标识”原则,确保所有样本来源可精准追溯,具体采集方案如下:

(1) 鱼组织样本(共 27 份)。乐东县石斑鱼养殖场样本(18 份):随机选取 2 个东星斑幼鱼养殖池、2 个老虎斑幼鱼养殖池及 1 个病鱼隔离池,其中健康养殖池每池采集 3 份样本,病鱼隔离池采集 6 份样本,每份样本均由单尾鱼的脑、眼、肝、脾、肾组织各 100 mg 混合匀浆制备而成(6 份病鱼样本对应 4 尾患病幼鱼、2 尾患病成鱼,健康样本均为幼鱼)。东方市石斑鱼养殖场样本(9 份):随机选取 2 个东星斑幼鱼养殖池、1 个老虎斑幼鱼养殖池,每池随机采集 3 份样本,每份样本均由单尾幼鱼的脑、眼、肝、脾、肾组织各 100 mg 混合匀浆制备而成。鱼组织样本迅速置于-80℃冻存。

(2) 水样(共 15 份)。乐东县(9 份)和东方市(6 份)的养殖水样,均与鱼组织样本来源池及养殖水源区相对应。水样于 4℃冷藏条件下运输。

1.5 样本鱼体检查

体表检查:记录样本鱼体长、体重,观察体色异常、鳃丝充血/肿胀、体表溃疡及寄生虫附着情况。

解剖学检查:无菌操作剖检鱼体,肉眼观察肝、脾、肾等内脏器官的形态、色泽、出血点及腹腔积液,记录组织增生、坏死或寄生虫包囊等病变情况。

1.6 病毒性病原检测与鉴定

RNA 提取:取病鱼脑、眼、脾、肾及肝组织样本各 100 mg,液氮研磨后加入 1 mL TRIzol 裂解液,室温静置 5 min。依次加入 0.2 mL 氯仿震荡混匀,4℃12 000 g 离心 15 min,取上清液与 0.5 mL 异丙醇沉淀 RNA。沉淀经 75%乙醇洗涤后溶解于 20 μL DEPC 水,测定浓度及纯度。

cDNA 合成:使用 Evo M-MLV 反转录试剂盒,取 2 μL 上述提取的总 RNA 与 2 μL 5×Evo M-MLV RT

Master Mix 混合,用无核酸酶水补足至 10 μL。反应程序:37℃15 min(逆转录)→85℃5 s(酶灭活)→冰浴终止。

PCR 反应体系 10 μL:5 μL 2×PCR Master Mix, 0.2 μL 10 μmol/L 正、反向引物,1 μL cDNA 模板,无核酸酶水补足。扩增程序:94℃30 s 预变性;98℃10 s 变性、55℃30 s 退火、72℃1 min 延伸,共 35 循环;72℃终延伸 2 min;4℃保存。

每批次 PCR 扩增均同步设置阴性和阳性对照。阴性对照以等体积的无核酸酶水替代 cDNA 模板;阳性对照以本实验室前期保存的、经测序确认为 GIV 和 NNV 阳性的组织核酸提取物为模板。

采用 TAE 电泳缓冲液配制 2%的琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL 核酸染料)进行电泳分析。电泳后在凝胶成像仪上观察结果。将出现阳性目的条带的 PCR 产物委托北京擎科生物科技股份有限公司进行核酸测序。

基因分型鉴定:利用 NCBI 数据库中 BLAST 软件对测序得到的序列进行同源基因的搜索,并将本试验得到的 NNV RNA2 序列与 GenBank 中的其他 NNV 病毒一起构建系统进化树,进行基因分型鉴定。

1.7 细菌性病原检测

1.7.1 病原菌分离培养

TCBS 培养基分离检验。用接种环蘸取组织样品及水样,无菌条件下分别划线接种于 TCBS 培养基,37℃培养 24 h,观察菌落的生长特性,选取形状、色泽和大小一致的优势单菌落,将其挑取并接种于 1 mL 3%氯化钠碱性蛋白胨水中,37℃、180 r/min 振荡培养至对数生长期用于培养副溶血弧菌,同时无菌条件取 0.5 g 鱼鳃、鱼肠组织或 1 mL 水样,分别加入到 1 mL PNCC 增菌液中,28℃、180 r/min 振荡培养至对数生长期用于培养创伤弧菌。

LB 培养基分离检验。用含 75%酒精棉球对鱼体表面擦拭消毒,无菌条件下取出发病石斑鱼的肠道、肌肉、肝脏、肾脏、脾脏等组织样品,置于 2 mL 无菌离心管中并编号。同时取出不同水样,置于 2 mL 无菌离心管中并编号。用接种环蘸取组织样品及水样,无菌操作下分别划线接种于 LB 平板,37℃条件下培养 24 h,观察菌落的生长特性。用无菌棉拭子选取形状、色泽和大小一致的优势单菌落,将其接种于 1 mL LB 液体培养基,37℃、180 r/min 振荡条件下培养至对数生长期。所有鱼的解剖和细菌接种均在生物安全柜内完成。

1.7.2 DNA 提取

取 1 mL 增菌培养液于 1.5 mL 离心管中,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,加入 200 μL 无菌水,

混匀后于恒温金属浴中 95 ℃ 裂解 10 min，12 000 r/min 离心 5 min，取上清液进行 PCR 检测。

1.7.3 PCR 检测

普通 PCR 检测。采用 PCR 进行细菌 16S rRNA 基因检测。反应体系及程序参考 1.6 进行。将出现阳性目的条带的 PCR 产物委托北京擎科生物科技股份有限公司进行核酸测序。

实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测。采用 qPCR 进行副溶血弧菌、创伤弧菌、无乳链球菌检测。采取 20 μL 的反应体系，加入 SYBR Green Pro Taq HS Premix 10 μL，上、下游引物各 0.2 μL，待测 DNA 模板 2 μL，用无核酸酶水补足至 20 μL。采用三步法 PCR 扩增反应：95 ℃ 预变性 30 s；95 ℃ 变性 30 s，66 ℃ 退火 30 s，72 ℃ 延伸 40 s，40 个循环。

每批次细菌性病原 PCR 及 qPCR 检测均设立对照体系。阴性对照以等体积的无核酸酶水替代 DNA 模板；阳性对照分别以创伤弧菌标准株、副溶血弧菌标准株及无乳链球菌标准株的提取核酸为模板。

2 结果

2.1 现场调查情况

2.1.1 养殖模式调查

在乐东县石斑鱼养殖场中，养殖模式主要包括车间养殖和池塘养殖。车间养殖区域中，使用地下水作为老虎斑养殖区的水源，使用蓄水塔作为东星斑养殖区和病鱼养殖区的水源。池塘养殖主要依赖处理后的临近海域海水作为饲养水源，调查时并未投放石斑鱼进行饲养。

东方市石斑鱼养殖场的养殖模式为车间养殖，水源不详，采用工厂化循环水作为东星斑养殖区、老虎斑养殖区和育苗区的水源。在工厂化循环水系统中，

头水通过水管进入养殖池，在养殖池中循环利用，最后通过下水道排水系统处理废水。

2.1.2 养殖场水体水质调查

乐东县石斑鱼养殖场水质检测涵盖地下水、蓄水塔水、外塘水样品。结果显示，pH 值稳定在 7.53~8.35 之间，溶解氧浓度为 7.51~7.86 mg/L，总磷含量在 0.11~0.20 mg/L 范围内，总氮含量则偏高，达到 0.42~1.25 mg/L，其中蓄水塔水的总氮含量超过国家标准 1 mg/L 水平。此外，汞、镉、铅等重金属含量虽在较低范围内（汞：0.03~0.18 μg/L，镉：0.01~0.03 μg/L，铅：0.01~0.21 μg/L），但蓄水塔水中铅含量相对较高，地下水汞含量也偏高。

东方市石斑鱼养殖场的工厂化循环水系统水质检测涵盖头水、尾水、养殖池水。pH 值稳定在 7.40~7.70 之间，溶解氧浓度为 6.97~8.01 mg/L，总磷含量为 0.10~0.30 mg/L，总氮含量在 0.17~0.89 mg/L 内，均符合相关标准。汞、镉、铅等重金属含量也处于较低水平（汞：0.03~0.08 μg/L，镉：0.02~0.04 μg/L，铅：0.01~0.05 μg/L），但养殖池水中的重金属含量相对较高。总体水质优良。

2.1.3 鱼群观察

养殖场的养殖池内石斑鱼观察结果表明（图 1），2 个石斑鱼养殖场的健康鱼群养殖密度处于较高水平，乐东县车间养殖池的东星斑、老虎斑幼鱼估算密度约 300 尾/m³，成鱼约 80 尾/m³；东方市工厂化循环水养殖池的幼鱼估算密度约 350 尾/m³，池水清澈；鱼群活跃，鱼群处于较好的生长状态。乐东县养殖场存在患病鱼群，对病鱼的观察结果显示东星斑发病十分严重，所处池水呈现明显浑浊状态，鱼体褪色明显，活动性和群聚性差，但体表无明显溃烂现象，养殖池中的鱼群患病症状相对一致。

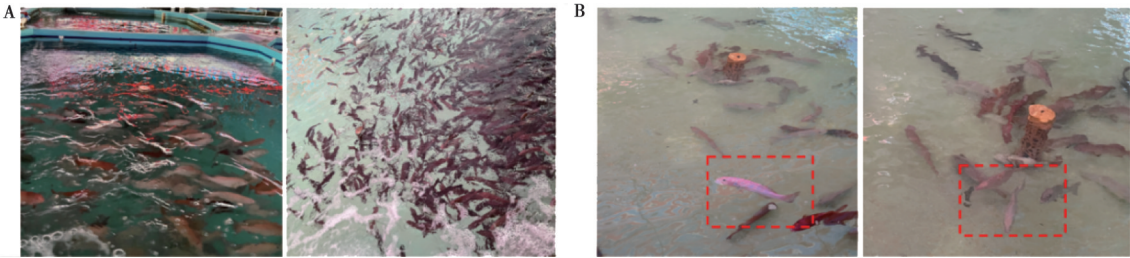


图 1 健康鱼群 (A) 和患病鱼群 (B) 观察结果

2.1.4 鱼体检查

对石斑鱼体表抽检结果显示（图 2），2 个养殖场的成年石斑鱼体长范围在 32.30~36.20 cm，体重范围在 307.64~625.86 g；幼年东星石斑鱼体长范围在 11.70~14.40 cm，体重范围在 19.88~33.97 g；幼

年虎斑石斑鱼体长范围在 16.67~18.80 cm，体重范围在 62.50~119.95 g。发病东星斑眼球浑浊外凸，体表褪色，部分鱼嘴和鳃呈开合状，发病老虎斑腹鳍背鳍充血发炎，呈典型感染症状。石斑鱼解剖后内部脏器未见明显肉眼可见症状，无明显虫体及虫卵。

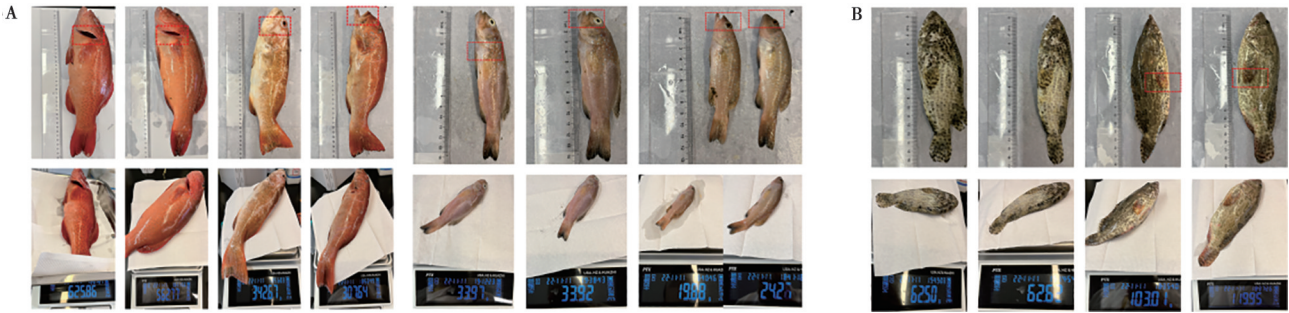


图 2 东星斑 (A) 和老虎斑 (B) 鱼体表面观察结果

2.2 病毒性病原检测

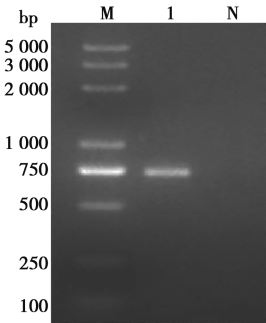
2.2.1 石斑鱼 GIV 的检测

采集样本之后，首先对石斑鱼常见病毒性疾病病原 GIV 进行检测，27 份来自石斑鱼的肝脏、肾脏、脾脏等组织样品及 15 份水样的检测结果显示，2 个养殖场均未检出 GIV（图略）。

2.2.2 石斑鱼 NNV 的检测

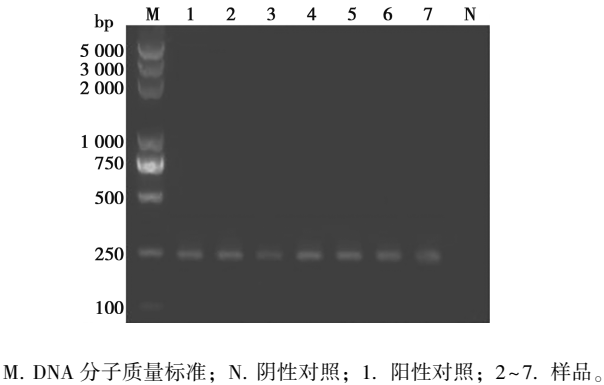
对 NNV 进行检测，27 份石斑鱼的脑部、眼部样本及 15 份水样的检测结果显示，2 个养殖场水样中均未检出 NNV；对鱼样检测结果显示（图 3），在乐东县东星斑养殖区病鱼养殖区的 4 条幼年东星斑、2 条成年东星斑中均检出 NNV，而东方市石斑鱼养殖场的样品中未检出 NNV，鱼样中 NNV 的检出率为 22.22%（6/27）。说明乐东县石斑鱼养殖场的养殖区域存在一定传播风险，且 NNV 主要在石斑鱼幼鱼中检出。

将测序所得基因序列与 GenBank 数据库的 4 种基因型 12 株 NNV 一起构建进化树的结果显示（图 5），待测毒株（NNV01）处于 RGNNV 基因型处于同一分枝上，系统发育关系最为密切，而与 BFNNV、SJNNV 和 TPNNV 等 3 种基因型亲缘关系较远。因此病鱼所感染的 NNV 属于 RGNNV 基因型。



M. DNA 分子质量标准；N. 阴性对照；1. 样品。

图 4 NNV RNA2 的 PCR 扩增结果

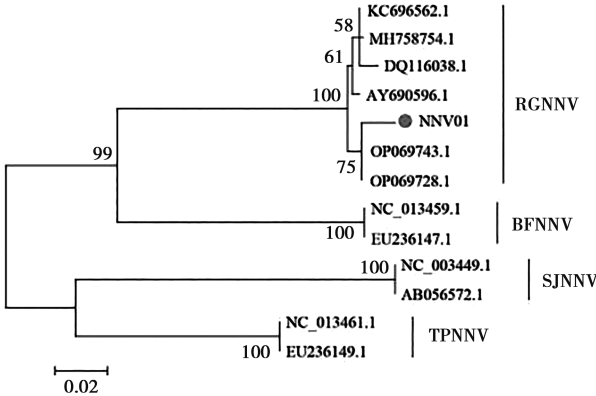


M. DNA 分子质量标准；N. 阴性对照；1. 阳性对照；2~7. 样品。

图 3 鱼样中 NNV 的检测结果

基因分型鉴定结果：通过筛选确定鱼样 PCR 结果中的阳性样品，进一步利用设计的 NNV RNA2 序列引物进行特异性扩增，结果显示从乐东县石斑鱼养殖场已检出 NNV 的一条幼年东星斑中扩增出目的片段（图 4）。

为了更加准确地对检测的 NNV 毒株进行分类，



注：• 为本试验分离株。

图 5 基因分型鉴定结果

2.3 细菌性病原检测

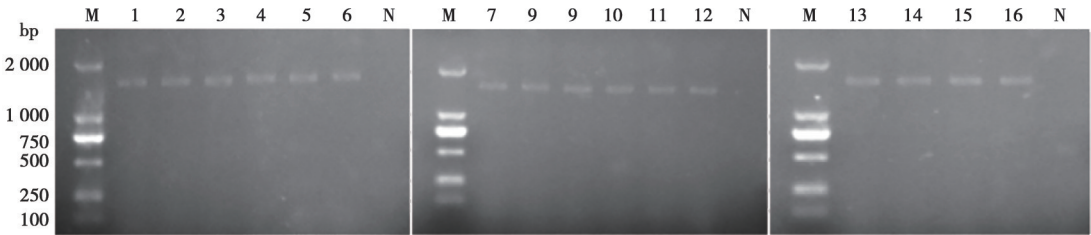
2.3.1 细菌 16S rRNA 基因检测

对采集的样本进行石斑鱼常见病毒性疾病病原检

测后，对石斑鱼感染细菌进行分离鉴定。对 20 份来自石斑鱼的肠道、体表黏液、肌肉和肝脏等组织样品及 15 份水样进行 TCBS 琼脂平板及 LB 琼脂平板培养，经过分离纯化，在 TCBS 琼脂平板上成功分离出 9 株优势菌株，在 LB 琼脂平板上成功分离出 7 株优势菌株。

对分离得到的细菌进行 16S rRNA 基因测序，选取分离纯化获得的 16 株优势菌株用于 PCR 扩增 16S rRNA 基因，均获得约 1 500 bp 的清晰条带（图 6）。经测序，与 NCBI 数据库菌株 16S rRNA 基因序列比

对分析 PCR 扩增产物结果，样本菌株与 NCBI 数据库菌株 16S rRNA 基因序列的同源性均超过 90%，分析结果显示从 TCBS 培养基分离所得 9 株优势菌株分别为霍氏肠杆菌（4 株），绿色气球菌（1 株），海洋罗斯氏菌（1 株），表皮葡萄球菌（1 株），阴沟肠杆菌（2 株）；从 LB 培养基分离所得 7 株优势菌株分别为不动杆菌（1 株）、潘托亚菌（2 株）、溶血性葡萄球菌（1 株）、表皮葡萄球菌（1 株）、巴氏葡萄球菌（2 株）。细菌 16S rRNA 基因检测结果显示并未发现致病菌。



M. DNA 分子质量标准；N. 阴性对照；1~16. 样品。

图 6 细菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增结果

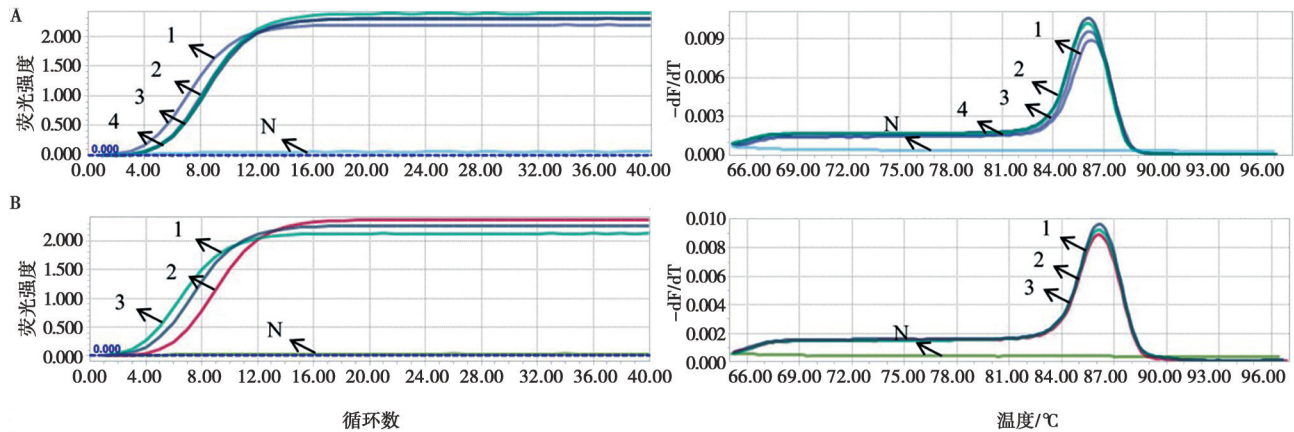
2.3.2 副溶血弧菌的检测

对 20 份来自石斑鱼的肠道、肌肉、肝脏、肾脏、脾脏等组织样品及 15 份水样及进行副溶血弧菌检测结果显示，2 个养殖场均未检出副溶血弧菌存在（图略）。

2.3.3 创伤弧菌的检测

对 20 份来自石斑鱼的鳃和肠组织样本及 15 份水样进行创伤弧菌检测。结果显示（图 7A），在乐东

县养殖场病鱼集中池中，从 2 条幼年老虎斑的肠组织样本中分别检测到创伤弧菌，在东方市养殖场的成年东星斑中也发现 1 条成年东星斑的肠组织阳性样本，其他鱼样均未检测出感染，鱼样的总体检出率为 15%（3/20）。对水样检测结果显示（图 7B），乐东县养殖场饲养病死幼年老虎斑和东方市饲养健康成年东星斑的养殖池水中均检测到创伤弧菌，水样检出率为 13.33%（2/15）。



A. 鱼组织样，其中 N 为阴性对照，1 为阳性对照，2~3 为幼年老虎斑肠组织，4 为成年东星斑肠组织；
B. 水样，其中 N 为阴性对照，1 为阳性对照，2 为病死幼年老虎斑养殖池水，3 为健康成年东星斑养殖池水。

图 7 创伤弧菌检测结果

2.3.4 无乳链球菌的检测

对 20 份来自石斑鱼的肠道、肌肉、肝脏、肾脏、

脾脏等组织样品及 15 份水样及进行无乳链球菌检测，结果显示，2 个养殖场均未检出无乳链球菌（图略）。

3 讨论

为深入了解海南三亚周边地区石斑鱼养殖场感染性疾病流行状况,本研究对具有代表性的三亚市乐东县和东方市规模化石斑鱼养殖场进行了流行病学调查,对 NNV 感染鱼样本进行了病毒基因分型鉴定。调查显示,乐东县的石斑鱼养殖场采用车间养殖和池塘养殖相结合的模式,而东方市则完全依赖于车间养殖,这一差异可能影响病原传播方式和养殖管理策略。两地养殖场的水质指标如 pH 值、溶解氧和总磷含量均符合国家标准,但乐东县养殖场的蓄水塔水中总氮含量较高,超过国家规定的 1 mg/L 标准。乐东县多样化的水源和养殖方式虽提供了柔性的养殖环境,但同时也可能增加了水质管理的复杂性,导致潜在的污染问题,这可能为 NNV 等病原的传播创造了条件。通过对采集样本进行石斑鱼常见感染性疾病病原检测,在乐东县东星斑样本中检测到 NNV,而乐东县的老虎斑样本和东方的东星斑样本中均检出创伤弧菌,NNV 检出率为 22.22%,高于创伤弧菌。这表明,NNV 可能是当地养殖场最主要的流行病原,基因分型结果显示为 RGNNV。这一结果表明,NNV 是当地石斑鱼主要的感染病原,且主要在幼鱼中检出。与先前研究一致,NNV 对幼鱼的感染率和致病性较高^[21],但由于采集样本较少,可能存在一定的局限性,有待后续扩大样本量进一步调查。

值得注意的是,本研究通过 qPCR 在肠道组织及水样中检出创伤弧菌,但 TCBS 平板分离结合 16S rRNA 测序并未获得弧菌菌株,仅分离得到霍氏肠杆菌、阴沟肠杆菌、葡萄球菌等优势菌群。造成该现象的原因:一是源于 2 种检测手段原理差异,分离培养仅能筛选可培养活菌,而 qPCR 可检测样本中全部靶标核酸;创伤弧菌阳性样本检出率偏低,且阳性均来自菌群复杂的肠道组织,杂菌竞争抑制容易造成目标菌难以形成可挑取单菌落。二是乐东养殖场蓄水塔总氮、部分重金属含量偏高,养殖密度高,且存在 NNV 感染引发鱼体应激,环境胁迫条件下创伤弧菌可能进入活的非可培养(VBNC)状态,仅保留核酸可被 qPCR 检出,丧失平板生长能力。三是 TCBS 培养基对创伤弧菌分离存在局限,后续可更换 mCPC 培养基并增加增菌步骤,提高该菌分离成功率。

RGNNV 是 NNV 中宿主谱最广、环境适应能力最强的基因型,其流行与养殖水温较高、鱼群密度较大等因素密切相关。已有研究指出,RGNNV 对石斑鱼幼鱼可造成近乎 100% 的致死率,且在 25~30 ℃ 的海水中仍保持较强感染力,这与本研究观察到的幼鱼高检出率及海南地区常年高温的养殖环境高度吻合。此

外,本研究中 RGNNV 仅在东星斑中检出,而在老虎斑中未见阳性,可能反映了不同石斑鱼种类对 NNV 感染的遗传或免疫差异性,这提示不同石斑鱼种类可能在遗传或免疫上存在差异,后续需要扩大样本量并开展宿主易感性试验进行验证^[4, 21]。

从防控角度看,目前尚未开发出对 NNV 有效的特效药物,采取的防控措施主要以预防为主,切断感染途径是其主要预防手段。研究表明,使用碘酒、次氯酸钠等消毒剂可以有效杀死附着在鱼体表面的 NNV^[22]。水质管理也是控制传播的关键。保持养殖环境的清洁,定期更换水体,控制水质参数(如温度、pH 值、溶解氧等)在适宜范围内,可以有效降低 NNV 的存活率^[23]。避免过度拥挤的养殖密度也可以从源头上杜绝 NNV 的侵袭,减少病毒传播风险。因此,加强对养殖环境的监控,尤其是对水质的管理和优化,有助于减少病原传播的风险。同时,加强病原诊断,及时隔离患病鱼群,有助于早期预防和控制石斑鱼的感染性疾病,提高养殖产量和经济效益。

本研究通过流行病学调查与病原鉴定,初步揭示了三亚周边地区石斑鱼养殖场主要流行病原的种类构成及其基因型特征,为该区域石斑鱼疫病的科学防控提供了基础数据支撑。然而,受研究周期、采样范围及试验条件等因素限制,本研究仍存在以下不足之处:其一,调查区域仅涵盖乐东县与东方市 2 个代表性养殖区,采集的组织样本和水样虽可在一定程度上反映局部病原流行状况,但样本数量和空间覆盖范围相对有限,研究结论的普适性与外推性有待进一步拓展验证;其二,养殖密度数据主要依赖现场目视估算,未能采用专业仪器进行精准量化测定,限制了养殖密度与病原流行特征之间关联分析的深度与精度,相关环境变量的定量化水平亟待提升;其三,本研究仅完成了创伤弧菌的分子鉴定,尚未开展人工感染试验以验证其致病性,未能完整遵循科赫法则完成病原-病害关系的因果链确认,因此所分离菌株是否为当地石斑鱼疫病的直接致病原,其致病力强弱及致病机制尚待后续试验系统阐释。

针对上述研究不足,后续研究拟从以下 4 个维度推进:一是拓展调查范围与样本规模,在三亚周边陵水、万宁等石斑鱼主养区布设多点位采样网络,开展大样本流行病学调查,以全面解析区域内石斑鱼病原的流行规律、地理分布及时空动态特征;二是引入高精度现场监测设备,对养殖密度、水质参数、养殖模式及季节变化等关键环境因子进行系统采集,采用多变量统计方法,系统评估养殖环境与 NNV、创伤弧菌流行之间的潜在关联,明确病原传播的主要驱动机制;三是开展创伤弧菌的人工感染试验及致病性验证

研究, 严格遵循科赫法则建立病原-病害因果关
系链, 同时针对不同石斑鱼品种 (如东星斑与老虎斑)
对 RGNNV 的宿主易感性差异开展比较研究, 从宿
主-病原互作角度解析其内在机制; 四是结合区域养
殖模式与环境特征, 开展 NNV 与创伤弧菌综合防控
技术体系研究, 制定适用于三亚周边石斑鱼养殖实际
的高效、精准疫病防控方案, 为区域石斑鱼养殖产业
健康可持续发展提供系统性科学依据与技术支撑。

4 结论

本研究对海南三亚周边地区具有代表性的乐东县
和东方市规模化石斑鱼养殖场开展了流行病学调查,
在石斑鱼养殖场检出 NNV 和创伤弧菌, 进一步分析
确认当地养殖场的主要流行病原为 NNV, 病毒基因
分型鉴定表明该 NNV 属于 RGNNV 基因型, 石斑鱼
养殖场存在较为严重的 NNV 感染风险。本研究结果
为海南地区石斑鱼病原感染制定有效的防控措施提供
了依据。

参考文献:

[1] Wu S X, Zeng Q F, Han W T, et al. Deciphering the population structure and genetic basis of growth traits from whole-genome resequencing of the leopard coral grouper (*Plectropomus leopardus*) [J]. Zool Res, 2024, 45 (2): 329-340.

[2] 谢瑞涛. 饲料脂肪与蛋白质对杂交石斑鱼 (褐点石斑鱼 ♀ × 清水石斑鱼 ♂) 生长及代谢的影响 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2021.

[3] Cai Y, Shi H, Zheng Y, et al. Long-term phellodendri cortex supplementation in the tiger grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*): dual effects on intestinal health revealed by transcriptome analysis [J]. Life, 2023, 13 (12): 2336.

[4] Thalib Y A, Razali R S, Mohamad S, et al. Environmental changes affecting physiological responses and growth of hybrid grouper-The interactive impact of low pH and temperature [J]. Environ Pollut, 2021, 271: 116375.

[5] Huang S, Zheng R, Kang Y, et al. Orange-spotted grouper IFN γ response to NNV or MSRV and its potential antiviral activities [J]. Fish Shellfish Immunol, 2024, 145: 109345.

[6] Xiao H, Liu M, Li S, et al. Isolation and characterization of a ranavirus associated with disease outbreaks in cultured hybrid grouper (♀ Tiger grouper *Epinephelus fuscoguttatus* × ♂ Giant grouper *E. lanceolatus*) in Guangxi, China [J]. J Aquat Anim Heal, 2019, 31 (4): 282-293.

[7] Wang C S, Chao S Y, Ku C C, et al. PCR amplification and sequence analysis of the major capsid protein gene of megalocytiviruses isolated in Taiwan [J]. J Fish Dis, 2009, 32 (6): 543-550.

[8] Ma H, Peng C, Su Y, et al. Isolation of a Ranavirus-type grouper iridovirus in mainland China and comparison of its pathogenicity with that of a Megalocytivirus-type grouper iridovirus [J]. Aquaculture,

2016, 463: 145-151.

[9] Nishizawa T, Furuhashi M, Nagai T, et al. Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene [J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63 (4): 1633-1636.

[10] Mao M, Jiang J, Xu J, et al. Cells and fugu response to capsid of BFNNV genotype [J]. Viruses, 2023, 15 (4): 988.

[11] Huang Y, Wu J, Lu Y, et al. Use of acoustic stimulus to determine behavioral changes in zebrafish after Cd exposure in a water quality warning system [J]. Sci Total Environ, 2024, 912: 168943.

[12] Liu J, Wang L, Zhang X, et al. Nervous necrosis virus induced vacuolization is a Rab5- and actin-dependent process [J]. Virulence, 2024, 15 (1): 2301244.

[13] Amalina N Z, Santha S, Zulperi D, et al. Prevalence, antimicrobial susceptibility and plasmid profiling of *Vibrio* spp. isolated from cultured groupers in Peninsular Malaysia [J]. BMC Microbiol, 2019, 19 (1): 251.

[14] 胡元庆, 陈锦芳, 肖芸, 等. 漳州水产养殖环境中副溶血弧菌的流行状况分析 [J]. 食品工业科技, 2021, 42 (8): 117-124.

[15] Tey Y H, Jong K J, Fen S Y, et al. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio vulnificus* in the aquacultural environments of Taiwan [J]. J Food Prot, 2015, 78 (5): 969-976.

[16] Delamare-Deboutteville J, Kawasaki M, Zoccola E, et al. Interactions of head-kidney leucocytes from giant grouper, *Epinephelus lanceolatus*, with pathogenic *Streptococcus agalactiae* strains from marine and terrestrial origins [J]. Fish Shellfish Immunol, 2019, 90: 250-263.

[17] Bowater R O, Forbes-Faulkner J, Anderson I G, et al. Natural outbreak of *Streptococcus agalactiae* (GBS) infection in wild giant Queensland grouper, *Epinephelus lanceolatus* (Bloch), and other wild fish in northern Queensland, Australia [J]. J Fish Dis, 2012, 35 (3): 173-186.

[18] Huang S M, Tu C, Tseng C H, et al. Genetic analysis of fish iridoviruses isolated in Taiwan during 2001-2009 [J]. Arch Virol, 2011, 156 (9): 1505-1515.

[19] Dong C, Weng S, Luo Y, et al. A new marine megalocytivirus from spotted knifejaw, *Oplegnathus punctatus*, and its pathogenicity to freshwater mandarinfish, *Siniperca chuatsi* [J]. Virus Res, 2010, 147 (1): 98-106.

[20] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. J Bacteriol, 1991, 173 (2): 697-703.

[21] Kim J O, Kim S J, Kim J O, et al. Distribution of nervous necrosis virus (NNV) in infected sevenband grouper, *Hyporhamphus septemfasciatus* by intramuscular injection or immersion challenge [J]. Aquaculture, 2018, 489: 1-8.

[22] 黄文, 陈偿, 赵哲, 等. 海水养殖鱼类病毒性神经坏死病防控技术研究进展 [J]. 渔业研究, 2016, 38 (5): 419-426.

[23] 唐绍林, 卢稀, 雷燕, 等. 笋壳鱼神经坏死病毒病的流行特点及防控建议, 有助降低发病率和死亡率 [J]. 当代水产, 2018, 43 (1): 84-85.