

网箱养殖青石斑鱼河流弧菌病研究

STUDIES ON VIBRIOSIS(*Vibrio fluvialis*) IN CULTURED *Epinephelus awoara*

鄢庆枇^{1,2} 苏永全¹ 王军¹ 池信才¹ 王德祥¹

(¹ 厦门大学海洋学系, 厦门大学亚热带海洋研究所 361005)

(² 集美大学水产养殖系 厦门 361021)

关键词 青石斑鱼, 弧菌病, 河流弧菌 I

随着养殖规模的扩大, 病害问题日益严重, 严重地制约着石斑鱼养殖业健康发展。刘秀珍等 1994 年报道创伤弧菌是石斑鱼的病害弧菌病的病原。本文作者对 1999 年夏季厦门市同安区琼头村网箱养殖石斑鱼的严重病害进行了研究, 试图能为养殖青石斑鱼 (*Epinephelus awoara*) 的病害防治提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验用鱼

患病石斑鱼取自同安区琼头村养殖网箱 (体重 97 ~ 245 g); 健康石斑鱼购自厦门火烧屿养殖网箱 (体重 81 ~ 114 g), 暂养备用。

1.2 病原菌的分离

将病鱼体表清洗消毒后, 用无菌操作方法从肝脏、肾脏部位及血液取材, 在营养琼脂平板和 TCBS 琼脂平板上划线分离, 30 °C 培养 24 h, 挑取优势菌落分别在营养琼脂和 TCBS 琼脂平板上划线分离培养数次, 获得纯培养物后接种到营养琼脂斜面备用。

1.3 人工感染试验

1.3.1 菌悬液 A_{550} 值标准曲线绘制

将已纯化的菌株接种到营养琼脂斜面, 30 °C 培养 24 h, 用无菌生理盐水洗脱菌苔, 制成菌悬液, 再用无菌生理盐水稀释成不同浓度。以无菌生理盐水为对照, 测定各浓度菌悬液在 550 nm 波长处的吸收值 A_{550} 。同时用平板计数法测定菌悬液的浓度, 以 A_{550} 值为纵坐标, 菌浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

1.3.2 菌悬液人工感染试验

1.3.2.1 注射感染 供试菌株经培养后, 制成菌悬液, 光谱法测定菌浓度, 稀释成 9×10^8 和 9×10^7

cfu/ml, 对试验鱼 (已暂养 7 d) 进行肌肉注射, 每尾注射 0.2 ml, 对照组每尾注射无菌生理盐水 0.2 ml。通气喂养, 连续观察 15 d。

1.3.2.2 浸泡感染 将制备好的菌悬液倒入饲养石斑鱼的水族箱中, 使海水中的菌浓度达到 10^5 cfu/ml, 通气喂养 15 d, 每天换水后加入一定量的菌悬液, 使海水中的菌浓度维持在 10^5 cfu/ml。

1.3.3 感染菌株的分离

从人工感染患病死亡的石斑鱼内脏部位和血液中, 同上法分离致病菌, 与人工感染试验所用菌株进行比较。

1.4 病原菌的鉴定

病原菌的形态及生理生化特征的检测和鉴定按文献 [5], SWF 生化板及相关文献 [4] 等方法鉴定。

1.5 药敏试验

将菌悬液均匀涂布于营养琼脂平板上, 然后贴上不同药物的药敏纸片 (购自上海市卫生防疫站), 30 °C 恒温培养 18 h 后检测抑菌效果。

2 结果与讨论

2.1 病症

1999 年 5 月中旬至 6 月, 在厦门地区持续高温天气下, 同安网箱养殖石斑鱼开始出现死亡, 从起初的每个网箱每天死亡 1 ~ 2 尾, 增加到二三十尾。现场检测发现: 病鱼活动能力下降, 摄食减少甚至不摄食, 有的体色变黑。解剖发现病鱼肝脏呈土黄色, 略有肿大, 胃肠内容物很少。

收稿日期: 2000-08-11; 修回日期: 2001-03-05

表 1 青石斑鱼人工感染试验结果

试验组别	菌株	感染方式	菌浓度 (cfu/ml)	剂量 (ml)	试验数 (尾)	死亡数 (尾)
1	TS-1	肌肉注射	1.0×10^9	0.2	5	5
2	TS-1	肌肉注射	1.0×10^8	0.2	5	3
3	TS-2	肌肉注射	1.0×10^9	0.2	5	5
4	TS-2	肌肉注射	1.0×10^8	0.2	5	2
5	TS-1	菌液浸泡	1.0×10^5	-	5	3
6	TS-2	菌液浸泡	1.0×10^5	-	5	3
7	对照组	肌肉注射	生理盐水	0.2	5	0
8	对照组	浸泡	自然海水	-	5	0

“-”代表采取浸泡感染,没有注射剂量。

2.2 病原菌的分离和回归感染

从病鱼的肝、肾和血液中分离出大量细菌,这些细菌在营养琼脂和 TCBS 琼脂上形成的菌落一致,从中挑选 2 株细菌,编号为 TS-1 和 TS-2。

用肌肉注射和菌液浸泡两种人工感染方法都能使石斑鱼发病,感染病鱼的症状表现与养殖网箱病鱼基本一致,都表现为体色变深、活动能力减弱、进食减少甚至不进食。解剖发现病鱼肝肿大,呈土黄色,从内脏中分离培养出大量细菌。人工感染的结果见表 1。

2.3 菌株再分离与鉴定

从人工感染患病即将死亡的石斑鱼的内脏和血

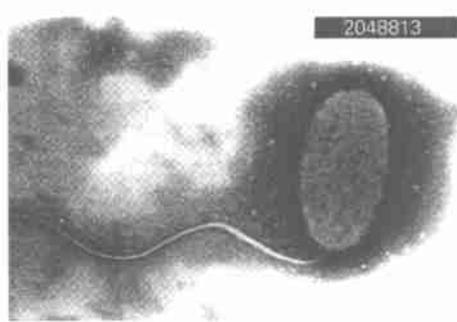


图 1 病原菌的电镜照片($\times 20\ 000$)

液中分离出大量细菌,这些细菌的菌落特征与人工感染所用菌株的菌落特征一致。

2.3.1 菌体的形态特征

电镜下观察到菌株 TS-1 和 TS-2 的菌体细胞呈短杆状或略有弯曲,在菌体的一端有单根鞭毛(图 1)。菌体细胞的大小为 $(0.5 \sim 0.9) \mu\text{m} \times (1.5 \sim 2.3) \mu\text{m}$ 。两株细菌皆无荚膜,无鞭毛,细胞分散排列。

2.3.2 菌株的生理生化特性

对菌株 TS-1 和 TS-2 进行了 42 项生理生化特性的测定,结果见表 2。从表 2 可以看出,菌株 TS-1 和 TS-2 的各项生化特性非常相似(超过 95%)。以上各项试验结果与《伯杰氏细菌鉴定手册》(第 9 版)对河流弧菌 I 的描述基本一致,而与其他弧菌有较大区别,因此确定这两株病原菌为河流弧菌 I。

2.4 药敏试验

应用药敏纸片法测定了病原菌对 50 种抗菌药物的敏感性,结果见表 3。

表 2 2 株病原菌的生理生化特性

菌株	TS-1	TS-2	河流弧菌 I
革兰氏染色	G-	G-	G-
游动现象	-	-	-
O/129 敏感(10 μg)	-	-	-
O/129 敏感(150 μg)	+	+	+
TCBS 上形成菌落	黄	黄	黄
4 $^{\circ}\text{C}$ 生长	-	-	d
30 $^{\circ}\text{C}$ 生长	+	+	+
40 $^{\circ}\text{C}$ 生长	-	-	-
0% NaCl 生长	-	-	d
3% NaCl 生长	+	+	+
6% NaCl 生长	+	+	+
8% NaCl 生长	-	(+)	d
10% NaCl 生长	-	-	-
氧化酶	+	+	+
赖氨酸脱羧酶	-	-	-
鸟氨酸脱羧酶	-	-	-
精氨酸双水解酶	+	+	+
H ₂ S	-	-	-
IND	-	-	-
VP	-	-	-
TDA	-	-	-
柠檬酸盐利用	+	+	+
甘露醇	+	+	+
纤维二糖	-	-	d
ONPG	+	+	+
硝酸盐还原	+	+	+
尿素	-	-	-
D-葡萄糖产气	-	-	-
LAC	-	-	-
SUC	+	+	+
酶的产生			
淀粉酶	+	+	+
明胶酶	+	+	+
脂酶	+	+	+
藻酸酶	-	-	-
几丁质酶	+	+	+
糖类利用			
木糖	-	-	-
阿拉伯糖	+	+	+
半乳糖	+	+	+
蜜二糖	-	-	-
甘露糖	+	+	+
海藻糖	+	+	+
水杨苷	+	+	+

注:“-”表示阴性;“+”表示阳性;“(+)”表示弱阳性;“d”表示可变化,即有的菌株为阳性,有的为阴性。

表 3 病原菌对抗菌药物的敏感性

菌株	TS-1	TS-2
四环素*	M	M
氯霉素*	S	S
红霉素*	R	R
庆大霉素*	M	M
链霉素*	M	M
吡哌酸*	M	M
痢特灵*	M	M
青霉素 G*	-	-
氨苄青霉素*	-	-
磺胺甲基异恶唑*	S	S
林可霉素	M	M
丁胺卡那霉素	S	S
新生霉素	R	R
麦迪霉素	-	-
壮观霉素	S	M
妥布霉素	M	M
柱晶白霉素	R	R
新霉素	M	M
乙酰螺旋霉素	-	-
克林霉素	R	R
强力霉素	M	S
氟喹酸	S	S
萘啶酸	M	M
头孢拉定	R	R
头孢氨苄	R	R
头孢克洛	M	M
头孢孟多	M	M
头孢呋新	R	R
头孢三嗪	S	S
头孢哌酮	S	S
头孢噻吩	R	R
头孢噻肟	S	S
头孢噻甲羧肟	S	S
头孢唑啉	R	R
多粘菌素	R	R
利复平	R	R
杆菌肽	-	-
复方新诺明	S	S
氨基南	M	M
奥格门丁	R	R
环丙沙星	M	M
苯唑青霉素	R	R
羧苄青霉素	R	R
氧哌嗪青霉素	M	M
呋喃妥因	S	S
O/129(10 μg)	R	R
O/129(150 μg)	S	S
优力欣	R	R

注：“S”表示敏感；“M”表示中等敏感；“R”表示不敏感；“-”表示没有抑制作用；“*”为《渔药手册》中的药物。

由表 3 可知,病原菌对丁胺卡那霉素、氯霉素、氟哌酸等 11 种药物敏感,而麦迪霉素、乙酰螺旋霉素、青霉素 G 等 5 种药物对病原菌没有抑制作用。对于《渔药手册》^[3] 中的药物,两株病原菌只对氯霉素和磺胺甲基异恶唑两种药物敏感,青霉素和氨苄青霉素对病原菌没有作用,其他的渔用药物,如四环素、红霉素、链霉素、庆大霉素、吡哌酸、痢特灵等,病原菌均有一定的耐药性。两株病原菌的药敏结果基本相同,这也间接说明两株病原菌属于同一种菌。

弧菌是海水环境中的正常菌群,广泛分布在自然海区中,一般情况下不会引起养殖动物发生病害。但在养殖海域环境条件恶化引起这些条件致病菌大量繁殖,而养殖动物抗病力低下的情况下就会暴发弧菌病。Beatty K. T. 等 1990 年与 West P. A. 等 1983 年的研究表明病原菌的致病性取决于海水中细菌数量、养殖动物的免疫力及海水理化物质等环境条件的影响。现场调研得知:由于长期大量使用抗生素,会导致水体正常微生物菌群失调,也使养殖环境中的许多细菌对常用抗生素产生了抗药性,给疾病的治疗带来很大的困难。同时,长期使用抗生素给养殖动物内脏机能造成损伤,导致机体免疫力下降,这些都增加了细菌病暴发的可能性^[1]。因此,国内外学者一致认为对海洋生物的弧菌病应以预防为主^[2],具体措施如:合理控制养殖密度、改善水质环境,维持一定量的藻类和有益微生物,保持养殖环境生态平衡、合理使用抗生素等。

参考文献

- 1 潘连德,陈辉.水产科技情报,1998,25(4):169~173
- 2 肖慧,李军,王祥红等.青岛海洋大学学报,1999,29(1):87~93
- 3 农业部《渔药手册》编撰委员会.渔药手册.北京:中国科学技术出版社,1998.156~193
- 4 麦克法丁 J. E. 编,林万明译.医学细菌生化试验鉴定手册.北京:人民卫生出版社,1985.305~309
- 5 Holt J. G.. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins. 1994.518~538

(本文编辑:刘珊珊)