

大黄鱼皮肤溃烂病病原的研究

纪荣兴, 邹文政, 李印龙

(集美大学 水产学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 从福建省厦门西海域某渔排养殖大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 患皮肤溃烂病的肝脏、肌肉分离到 2 株优势菌。人工感染试验证实其中 1 株为致病菌。该菌的主要生理生化特性为革兰氏阴性, 短杆状, 极生单鞭毛, 发酵葡萄糖, 氧化酶阳性, 赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶阳性, 精氨酸脱羧酶、水杨素、枸橼酸盐阴性, 不产生 H_2S , 利用葡萄糖、甘露醇产酸, 对 O/129 (10 μg) 不敏感。在含 0%, 10% NaCl 的普通培养基上不生长; 在含 2%, 4%, 6%, 8% NaCl 的普通培养基中生长; 在温度 30, 35, 40 $^{\circ}C$ 下生长良好, 但 4 $^{\circ}C$ 不生长。初步鉴定该病原菌为副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)。药敏试验表明, 该菌对卡那霉素、复方新诺明、链霉素等 10 种药物敏感, 对青霉素 G、氯霉素、利福平等 6 种药物不敏感。

关键词: 大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*); 生理生化特性; 副溶血弧菌; 药敏试验

中图分类号: S944 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2004)11-0057-04

大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 是中国主要的经济鱼类之一。近年来福建沿海地区大力发展大黄鱼的养殖, 带来了良好的经济效益, 但由于大黄鱼人工养殖规模不断扩大, 海水网箱设置过于密集, 养殖区域水质恶化严重, 以及大黄鱼经多代人工繁殖造成性状退化, 导致机体抵抗力下降等原因^[1,2], 大黄鱼疾病不断发生。近年来厦门地区网箱养殖的大黄鱼经常发生一种皮肤溃烂病, 其主要症状为: 体表褪色、呈浅黄色、有出血点, 头部、尾部皮肤溃烂, 病鱼的尾柄被严重腐蚀, 大多数病鱼都露出尾椎骨; 肌肉充血, 部分病鱼的身体一侧或两侧鳞片成片脱落, 下颌、鳍基部充血, 病鱼离群独游。解剖发现: 肝脏肿大、土黄色, 有腹水, 肠与腹部粘连。发病季节主要为 6 月上旬至 8 月下旬, 发病水温在 22~28 $^{\circ}C$ 之间。大黄鱼皮肤溃烂病的发生给养殖户带来了很大的经济损失。因此, 作者对该病的病原进行了初步研究, 旨在为养殖业者及鱼病防治工作者提供防治该病的参考依据。

1 材料和方法

1.1 供试大黄鱼

患病大黄鱼取自厦门西海域某大黄鱼养殖渔排, 平均体质量约 120 g。

健康大黄鱼购自厦门某渔排, 平均体质量 150 g, 暂养 1 周后, 选择活力好、体表无损伤者供人工感染

试验用。

1.2 病原菌分离

取症状明显的濒死大黄鱼, 以常规无菌操作方法, 从肝脏、病灶肌肉取样划线接种到普通培养基平板上, 于 30 $^{\circ}C$ 恒温箱培养 24 h 后, 挑取形态一致、占优势的单菌落进行纯化培养后, 保存在 4 $^{\circ}C$ 冰箱中备用。

1.3 人工感染实验

将已纯化的分离菌在普通培养基平板上培养 20 h 后, 用无菌生理盐水洗下菌苔, 配成浓度为 10^8 cfu/mL 的菌悬液, 对大黄鱼进行背部肌肉注射感染, 每条鱼注射菌悬液 0.3 mL, 同时设对照组, 每条大黄鱼注射生理盐水 0.3 mL, 注射后分别置海水池内饲养。试验期间水温控制在 25 $^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$, 适量投喂饲料, 连续观察 14 d, 每天记录发病症状和死亡情况。

按上述方法, 从人工感染濒死大黄鱼肝脏再次分离、纯化细菌, 配成浓度为 10^8 , 10^7 cfu/mL 的菌悬液, 再次进行人工感染试验, 方法与前述相同。

收稿日期: 2004-02-09; 修回日期: 2004-07-18

基金项目: 福建省科技资助项目 (2000z080); 厦门市科委资助项目 (35022000102)

作者简介: 纪荣兴 (1953-), 男, 福建厦门人, 副教授, 研究方向: 水产动物病害防治研究, 电话: 0592-6180580, E-mail: rxj@jmu.edu.cn

1.4 病原菌鉴定

按杭州天和微生物试剂有限公司提供的鉴定方法进行病原菌的生理生化特性测定, 参照《常见细菌系统鉴定手册》^[3]和《伯杰细菌鉴定手册》^[4](第八版)等所述方法进行分类鉴定。

1.5 药敏试验

采用纸片法对致病菌进行药敏试验, 即: 将培养 18~24 h 的细菌制成菌悬液, 均匀涂布于普通培养基平板上, 贴上药敏试纸, 于 30℃ 恒温培养 24 h 后, 测量、记录抑菌圈直径。每种药物试纸做一个平行样。依照敏感程度分为耐药、中度敏感、敏感。药敏试纸购自杭州天和微生物试剂有限公司。

表 1 分离菌感染试验结果

Tab. 1 Results of challenge test of isolated strains

菌株	感染后死亡数量										死亡数/ 试验数	死亡率 (%)
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	10 d	14 d		
GYL-0301	2	1	1	2	3	1	0	0	0	0	10/10	100
GYM-03A	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2/10	20
对照	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10	0

2.3 再感染试验

从人工感染濒死大黄鱼的肝脏分离到 GYL-0301R 菌, 经背部肌肉注射感染, 试验鱼在 9 d 内

表 2 再分离菌感染试验结果

Tab. 2 Results of challenge test of reisolated strain

菌株	注射量 (mL)	菌液浓度 (cfu/mL)	感染后死亡数量										死亡数/ 试验数	死亡率 (%)
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d		
GYL-0301R	0.3	10 ⁸	2	0	0	1	1	2	0	0	0	0	6/6	100
GYL-0301R	0.3	10 ⁷	1	0	0	0	0	1	1	1	2	0	6/6	100
对照	0.3	生理盐水	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/6	0

2.4 病原菌的鉴定

GYL-0301, GYL-0301R 菌均为革兰氏阴性短杆菌, 单个分散排列, 极生单鞭毛(见图 1), 无芽孢、无荚膜; 在普通培养基平板上菌落光滑、圆形、隆起、半透明、湿润。在 TCBS 上生长良好, 呈绿色, 菌落边缘不规则, 大小在 1.5~2.5 mm。

分离菌的主要生理生化特性为: 氧化酶阳性, 葡萄糖氧化发酵为发酵型, 赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶为阳性, 精氨酸脱羧酶、水杨素、枸橼酸盐(西蒙氏)阴性, 不产生 H₂S, 利用葡萄糖、甘露醇产酸, 对弧

2 结果

2.1 病原菌的分离

从病鱼的肝脏和病灶肌肉分别分离到 GYL-0301 菌和 GYM-03A 菌。

2.2 人工感染试验

用 GYL-0301 菌注射 10 h 后, 大黄鱼开始缓游于养殖池角落, 精神不振, 12 h 后开始出现死亡, 但死鱼无明显症状, 5 d 后症状明显且与自然发病鱼的症状相似, 死亡个体大多数症状为: 体表粘液较多, 头部、尾部皮肤出现溃烂, 体表有出血点; 解剖可见: 有腹水, 肝脏肿大、土黄色, 肠与腹部发生粘连。至第 6 d 试验大黄鱼 100% 死亡。GYM-03A 组不发病, 14 d 内死亡率为 20%; 对照组在 14 d 内未出现异常现象。人工感染试验结果见表 1。

全部死亡, 症状与首次人工感染时相似。对照组连续观察 14 d, 未出现死亡。实验结果见表 2。



图 1 分离菌 GYL-0301 电镜照片(×13 000)

Fig. 1 Electron micrograph of bacterium GYL-0301(×13 000)

菌抑制剂 O/ 129(10 μg) 不敏感。在含 0%, 10% NaCl 的普通培养基上不生长; 在含 2%, 4%, 6%, 8% NaCl 的普通培养基中生长; 在温度 30, 35, 40℃下生长良好, 4℃不生长。结果见表 3。

表 3 分离菌的生理生化特性试验结果

Tab. 3 Test results of physiological and biochemical characteristics of the isolated strains

测定项目	分离菌	再分离菌	副溶血弧菌*
	GYL-0301	GYL-0301R	(<i>Vibrioparah-aemolyticus</i>)
动力	+	+	+
氧化酶	+	+	+
O/ 129 (10 μg)	R	R	R
TCBS	G	G	G
鞭毛	+	+	+
赖氨酸脱羧酶	+	+	+
精氨酸脱羧酶	—	—	—
鸟氨酸脱羧酶	+	+	+
葡萄糖产气	—	—	—
蔗糖	—	—	—
甘露醇	+	+	+
水杨素(苷)	—	—	—
枸橼酸盐(西蒙氏)	—	—	—
0% NaCl	—	—	—
2% NaCl	+	+	+
4% NaCl	+	+	+
6% NaCl	+	+	+
8% NaCl	+	+	+
10% NaCl	—	—	—
4℃	—	—	—
30℃	+	+	+
35℃	+	+	+
40℃	+	+	+

注:“+”表示阳性;“—”表示阴性;“R”表示不敏感;“G”表示绿色;“*”根据《伯杰细菌鉴定手册》

从表 3 可看出, GYL-0301, GYL-0301R 菌株的主要生理生化特性与副溶血弧菌一致, 可初步鉴定为副溶血弧菌。

2.5 药物敏感试验

药物敏感试验表明 GYL-0301 菌对卡那霉素、复方新诺明、链霉素、庆大霉素、新霉素、红霉素、呋喃妥因、环丙沙星、氟哌酸、氯霉素敏感; 对氨苄青霉素、青霉素 G、利福平及麦迪霉素等药物不敏感。结果见表 4。

表 4 分离菌 GYL-0301 药物敏感试验结果

Tab. 4 Results of drug sensitivity test of isolated strain GYL-0301

药 物	判 断 标 准(mm)			试验结果 (mm)	敏感性
	耐药	中介	敏感		
氨苄青霉素	≤13	14~ 15	≥15	0	R
青霉素 G	≤20	—	≥29	0	R
四环素	≤14	15~ 18	≥19	15. 5	M
先锋霉素 V	≤14	15~ 17	≥18	13	R
利福平	≤16	17~ 19	≥20	16	R
卡那霉素	≤13	14~ 17	≥18	19	S
多粘菌素 B	≤8	9~ 11	≥12	9	M
复方新诺明	≤10	11~ 15	≥16	24	S
链霉素	≤11	12~ 14	≥15	20	S
庆大霉素	≤12	13~ 14	≥15	18	S
新霉素	≤12	13~ 16	≥17	17. 5	S
强力霉素	≤12	13~ 15	≥16	14	M
麦迪霉素	≤22	22~ 24	≥25	15	R
红霉素*	≤13	14~ 22	≥23	24	S
痢特灵*	≤14	15~ 16	≥17	14	R
呋喃妥因*	≤14	15~ 16	≥17	19	S
环丙沙星*	≤15	16~ 20	≥21	28	S
氯霉素*	≤12	13~ 17	≥18	30	S
氟哌酸*	≤12	13~ 16	≥17	26	S

注:“S”表示敏感;“M”表示中度敏感;“R”表示不敏感,“*”表示为禁用药物。

3 讨论

从患皮肤溃烂病的大黄鱼肝脏分离出的细菌, 回归感染健康大黄鱼, 当菌液浓度为 10⁸ cfu/mL 时, 受感染大黄鱼 6 d 内 100% 死亡, 菌液浓度为 10⁷ cfu/mL 时, 受感染大黄鱼 9 d 内 100% 死亡。感染初期死亡的鱼, 外观症状不明显, 感染 5 d 后, 大黄鱼出现了与自然发病相似的症状, 并最终死亡。证实了该分离菌为致病菌。经一系列生理生化试验, 鉴定该致病菌为副溶血弧菌。

弧菌是海水环境中的正常菌群, 广泛分布在自然海区中^[5,6], 一般情况下不会引起养殖动物发生疾病。但当大黄鱼在高密度养殖中, 残渣剩饵及排泄物不断积蓄, 败坏水质, 促进了养殖环境条件恶化, 使养殖动物抗病力降低、条件致病菌大量繁殖, 从而暴发各种疾病。近年来, 由副溶血弧菌引起的养殖动物疾病屡见不鲜, 并造成很大的经济损失^[5]。由副溶血弧菌

引起的大黄鱼疾病主要有败血病^[7]、溃疡病^[8], 本研究结果表明, 副溶血弧菌可引起大黄鱼皮肤溃烂病。

有文献报道副溶血弧菌已对多种药物产生耐药性^[3], 本研究亦证实了这一现象, 这与养殖户在大黄鱼网箱养殖中, 盲目用药不无关系。目前控制弧菌病的主要手段是应用抗菌药物治疗, 但药物本身具有很多副作用, 会使细菌产生耐药性, 给以后的治疗造成困难。长期盲目地大量用药, 不仅造成养殖成本高, 而且会造成环境污染, 危害人类健康。以防为主, 提高大黄鱼体质、保持良好的养殖环境, 才是预防弧菌病的根本途径。因此, 要合理控制养殖密度、改善水质环境、适当使用免疫增强剂提高鱼体的免疫力。在养殖过程中要加强日常管理, 平时要投喂新鲜、优质饵料, 发病季节合理使用药物, 定期对养殖区域和鱼体进行消毒, 并适当在饵料中添加抗菌素、维生素等, 一旦发病, 要正确诊断、对症下药, 及时给予综合治疗, 否则再敏感的药物也无济于事。

参考文献:

- [1] 金雄华, 黄志斌, 石存斌. 对大黄鱼细菌性疾病的研究[J]. 中国水产, 2001, 3: 49- 49.
- [2] 李清禄, 陈 强. 海水网箱养殖大黄鱼细菌性病原鉴定与感染治疗研究[J]. 应用与环境生物学报, 2001, 7 (5): 489- 493.
- [3] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 66- 127.
- [4] 布坎南 R. E, 吉本斯 N. E. 伯杰细菌鉴定手册 (第八版) [M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- [5] 鄢庆彬, 王 军, 苏永全, 等. 网箱养殖大黄鱼弧菌病研究[J]. 集美大学学报, 2001, 6 (3): 191- 196.
- [6] 高尚德, 陈旭仁, 吴以平. 中国对虾养成期间虾池水体和底质中细菌含量的变化[J]. 水产学报, 1994, 18 (2): 138- 142.
- [7] 许斌福, 林能锋, 杨金先, 等. 大黄鱼副溶血弧菌的分离、鉴定及致病力分析[J]. 福建农业学报, 2002, 17 (3): 174- 177.
- [8] 毛芝娟, 刘国勇, 陈昌福. 大黄鱼溃疡病致病菌的初步分离与鉴定[J]. 安徽农业大学学报, 2002, 29 (2): 178- 181.

Study on pathogen of “skin ulcer” disease of Large Yellow Croaker *Pseudosciaena crocea*

Ji Rong- xing, ZOU Wen- zheng, LI Yin- long
(Fisheries College of Jimei University, Xiamen 361021, China)

Received: Feb., 9, 2004

Key words: *Pseudosciaena crocea*; physiological and biochemical characteristics; *Vibrio parahaemolyticus*; medicine sensitivity test

Abstract: Two strains of bacteria were isolated from the liver and muscle of Large Yellow Croaker *Pseudosciaena crocea* cultured in a fishing row in the sea area of Xiamen, Fujian Province, which suffered from “skin ulcer” disease. It proved that one of the two isolated bacteria was pathogenic to healthy Large Yellow Croaker by artificial infection test. The main characteristics of the pathogenic isolated organism were Gram negative, short rod, pole growing flagellum, oxidase positive, and glucose fermented; lysine decarboxylase and ornithine decarboxylase were positive, arginine decarboxylase, salicin and citrate were negative, no H₂S, insensitive to O/ 129(10 μg) produced by glucose and mannite. The bacteria grew on the mediums which contain 2% , 4% , 6% or 8% NaCl but on 0% or 10%. They grew better at the temperature of 30 °C, 35 °C, 40 °C, but at 4 °C. The test results of physiological and biochemical characteristics showed that the isolated bacterium was identified as *Vibrio parahaemolyticus*. The drug sensitive test showed that the isolated strain was sensitive to kanamycin, Trimethoprim/ Sulfamethoxazole, streptomycin etc. but resistant to penicillin G, and Ampicillin rifampin etc.

(本文编辑: 刘珊珊)