

文章编号:1005-8737(2001)02-0072-04

胡子鲇“吊头病”病原的研究

李桂峰¹, 李海燕², 毕英佐¹

(1. 华南农业大学 动物科学系, 广东 广州 510642; 2. 广州大学 生物系, 广东 广州 510530)

摘要:从患“吊头病”胡子鲇(*Clarias fucosus*)的肝、肠和腹水分离出病原菌,用浸泡法和投喂法进行感染试验,两种方法的死亡率都在80%以上。通过细菌学和应用全自动化微生物鉴定系统(VITEK-120)鉴定,结果表明,鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*)是胡子鲇“吊头病”的病原菌。用25种抗生素进行敏感试验表明,鲁氏不动杆菌对其中大部分药物敏感,如普乐健、链霉素、卡那霉素、庆大霉素等,但对四环素、红霉素、苯唑青霉素、头孢他定不敏感。

关键词:胡子鲇; 吊头病; 病原菌; 鲁氏不动杆菌; 抗生素
中图分类号:S941 **文献标识码:**A

胡子鲇(*Clarias fucosus*)俗称塘虱鱼,鲇形目、胡子鲇科。近几年南方各省饲养胡子鲇的规模不断扩大,需要大量的种苗,但在胡子鲇种苗生产过程中经常出现“吊头病”,尤其在每年6~9月份发病较多,危害很大。由于目前国内对胡子鲇种苗阶段的病害研究较少,对胡子鲇种苗阶段的“吊头病”的研究尚未见报道。有鉴于此,1999年以来对胡子鲇种苗期“吊头病”的病原、药物敏感试验等进行研究,以期为该病的防治方法提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料来源

胡子鲇病鱼及健康鱼均采自广东省新兴县洞口镇都吉村,体长2~3 cm,体重0.8~1.2 g。健康的胡子鲇饲养1周,无异常者用于感染试验。

1.2 细菌分离

参见文献[1,2],从病鱼的腹水、肠、肝分离到多株细菌,分别命名为CA-1、CI-1和CL-1。选取其中形态一致,占绝对优势的菌落接种到斜面上,经分离纯化后接种于普通斜面培养基上,在27~28℃培养

18~24 h,待用。

1.3 人工感染试验

1.3.1 浸泡感染 用无菌生理盐水将上述斜面上的纯培养菌洗下,向容器内加入水并分别接种CA-1、CI-1和CL-1菌株,使溶液含菌浓度均为 $4 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$,各放入健康的胡子鲇20尾,观察发病的情况。另设不加菌液的对照组进行比较。容器为50 cm×40 cm×37 cm塑料水箱,水温28~30℃。

1.3.2 投喂感染 用无菌生理盐水的纯培养菌分别配成浓度为 $6.2 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ 的菌悬液,将草鱼碎肉放在菌悬液中浸泡5 min后投喂水箱中的20尾健康胡子鲇,连喂3 d,每天1次,每次投喂4 h后将残饵取出。另设不加菌液浸泡的草鱼碎肉投喂对照组进行比较。水箱规格与水温同1.3.1。

1.4 传代菌株分离与再感染

将浸泡与投喂感染后的发病鱼取出9尾,从其腹水、肠、肝中再分离细菌,分别命名为CA-1-1、CI-1-1和CL-1-1。方法同1.2。分别用CA-1-1、CI-1-1和CL-1-1通过浸泡法和投喂法感染健康胡子鲇。方法同1.3.1和1.3.2。

1.5 细菌鉴定方法

1.5.1 染色与观察 将1.2及1.4中斜面培养物做革兰氏染色(用大肠杆菌与葡萄球菌作对照)^[2],

收稿日期:2001-01-17

基金项目:国家重点科技攻关计划专题资助项目(98-015-01-06)

作者简介:李桂峰(1963-),男,博士,副教授,从事水产动物病害研究。

再进行细菌形态观察。

1.5.2 病原菌鉴定 参照文献[2~4]进行细菌学鉴定,并将鉴定结果与有关细菌的标准生理生化特性相对照。

1.5.3 鉴定系统鉴定 将细菌培养在血琼脂平板上,用法国-生物梅里埃公司生产的全自动化微生物鉴定系统(VITEK-120)鉴定。

1.6 药物敏感试验

药物纸片共 25 种抗菌药物,其中 24 种购自上海伊华医学科技有限公司;普乐健(Florfenicol)由广州惠华动物保健品有限公司生产提供。

2 结果

2.1 感染病鱼死亡率

经浸泡法与投喂法感染发病的胡子鲇,次日下午开始出现“吊头病”症状,即胀肚(腹水)、白须、吊头(鱼体垂直悬浮于水面)、鳍基和腹部充血、体发黑、断须、体瘦头大、尾部出现异样等。随着时间的推移,病鱼逐渐增加。8 d 后,除对照组外,以上述两种方式感染的鱼全部出现“吊头病”的症状,发病率均为 100%,患病鱼 3 d 后开始死亡,浸泡组死亡率分别为 CA-1 90%、CI-1 75%、CL-1 80%;而投喂组的死亡率分别为 CA-1 80%、CI-1 80%、CL-1 85%。

2.2 传代菌株与再感染死亡率

经观察与革兰氏染色分析发现,从人工感染发病鱼腹水、肝、肠分别分离出的 CA-1-1、CL-1-1、CI-1-1 3 个菌株分别与 CA-1、CL-1、CI-1 菌株的特征一致。再感染试验结果,健康胡子鲇 8 d 内全部出现“吊头病”症状,均在出现症状 3 d 后开始死亡,死亡率达 80%~85%,而对照组则无感染症状出现。

通过以上的人工感染及重复分离再感染,证明 CA-1、CL-1、CI-1 是胡子鲇“吊头病”的致病菌。

2.3 细菌分类鉴定

2.3.1 形态特征 CA-1、CL-1、CI-1 均为革兰氏阴性菌,短杆状,大小为(1.5~2.5) μm ×(1.0~1.5) μm 。以成对或短链占优势。无鞭毛、无荚膜、无芽孢。在普通培养基上生长良好。在平板上的菌落圆形、表面光滑、湿润、中央微凸、乳白色、透明、边缘整齐。

2.3.2 细菌学鉴定 CA-1、CL-1、CI-1 的接触酶为阳性;氧化酶、吲哚、 H_2S 、肌醇、乙酰甲基甲醇、葡萄

糖氧化、七叶树素、枸橼酸盐反应均为阴性;不产生苯丙氨酸脱氨酶、赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶、精氨酸双水解酶;不溶化明胶、不产酸、不分解糖类。生理生化特性与鲁氏不动杆菌一致。

2.3.3 微生物自动鉴定系统鉴定 经 VITEK-120 全自动微生物鉴定系统鉴定,CA-1、CL-1、CI-1 3 株菌均为鲁氏不动杆菌^[3](表 1),与细菌学鉴定结果一致。

表 1 全自动微生物鉴定系统测定结果

Table 1 Results of the whole automatic microbial identification system

| 项目 Item | CA-1 | CL-1 | CI-1 |
|--------------------------|------|------|------|
| DP-300 | - | - | - |
| 葡萄糖氧化 OFG | - | - | - |
| 阳性生长控制 GC | + | + | + |
| 醋硫胺 ACE | - | - | - |
| 七叶树素 ESC | - | - | - |
| 植物尿酵母 PLI | - | - | - |
| 尿素 URE | - | - | - |
| 枸橼酸盐 CIT | - | - | - |
| 丙二酸钠 MAL | - | - | - |
| 苯丙氨酸 TDA | - | - | - |
| 多肽杆菌素 PXB | - | - | - |
| 乳糖 LAC | - | - | - |
| 麦芽糖 MLT | - | - | - |
| 甘露醇 MAN | - | - | - |
| 木糖 XYL | - | - | - |
| 棉实糖 RAF | - | - | - |
| 山梨醇 SOR | - | - | - |
| 蔗糖 SUC | - | - | - |
| 肌醇 INO | - | - | - |
| 福寿草醇 ADO | - | - | - |
| 香豆酸 COU | - | - | - |
| 硫化氢 H_2S | - | - | - |
| β -半乳糖苷酶 ONPG | - | - | - |
| 鼠李糖 RHA | - | - | - |
| 阿拉伯糖 ARA | + | + | + |
| 葡萄糖发酵 GLU | - | - | - |
| 精氨酸 ARG | - | - | - |
| 赖氨酸 LYS | - | - | - |
| 鸟氨酸 ORN | - | - | - |
| 氧化酶 OXI | - | - | - |
| TLA | - | - | - |
| 在 41℃ 的生长情况 | 不生长 | 不生长 | 不生长 |
| Growth at 41℃ | No | No | No |

2.4 药物敏感试验

对 3 株鲁氏不动杆菌的药物敏感性实验结果表明,所用药物试纸对 3 株菌有相同的结果(表 2)。

表2 鲁氏不动杆菌对药物的敏感性
Table 2 Sensitivity of *Acinetobacter lwoffii* to drugs

| 药品名 Drug | 纸片药量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{disc}^{-1}$) | 敏感性 Sensitivity | 药品名 Name of drugs | 纸片药量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{disc}^{-1}$) | 敏感性 Sensitivity |
|--------------------------|---|--------------------|---------------------------------------|---|--------------------|
| 万古霉素 Vancomycin | 30 | +++ | 链霉素 Streptomycin | 10 | +++ |
| 羧苄青霉素 Carbenicillin | 100 | +++ | 妥布霉素 Tobramycin | 10 | +++ |
| 氟哌酸 Norfloxacin | 10 | +++ | 氧哌嗪青霉素 Piperacillin | 100 | +++ |
| 利福平 Rifampin | 5 | +++ | 复合磺胺 Trimethoprim/Sulfamethoxazole | 1.25/23.75 | +++ |
| 青霉素 Penicillin | 10IU | +++ | 氨苄青霉素 Ampicillin | 10 | +++ |
| 四环素 Tetracycline | 30 | - | 苯唑青霉素 Oxacillin | 1 | - |
| 头孢哌酮 Cefoperazone | 75 | ++ | 卡那霉素 Kanamycin | 30 | +++ |
| 丁胺卡那霉素 Amikacin | 30 | +++ | 头孢三嗪 Ceftriaxone | 30 | ++ |
| 头孢唑啉 Cefazolin | 30 | +++ | 头孢呋新 Cefuroxime axetil | 30 | ++ |
| 庆大霉素 Gentamycin | 10 | +++ | 头孢噻肟 Cefotaxime | 30 | ++ |
| 红霉素 Erythromycin | 15 | - | 氯霉素 Chloramphenicol | 30 | +++ |
| 呋喃妥因 Nitrofurantoin | 300 | + | 头孢他定 Ceftazidime | 30 | - |
| 普乐健(氟苯尼考) Florfenicol | 5 | +++ | | | |

注:+++ 高敏 Highly sensitive; ++ 中敏 Sensitive; + 低敏 Low sensitive; - 不敏感 Insensitive.

3 讨论

(1)“吊头病”是胡子鲇种苗生产的主要病害之一,该病多发生在水温 30°C 左右时的高温季节,死亡率50%以上,严重时可达80%~90%,病鱼主要在体长3 cm以下;病程较长,从开始出现症状到大部分种苗死亡需10 d左右,这种情况与本次人工感染结果一致。患病的胡子鲇除因死亡造成经济损失外,其丑陋外观也使其商品价值大打折扣。

(2)关于不动杆菌对鱼类的危害性在国外已有报道,认为其可引起暴发性传染病而对鲑造成严重危害^[5,6]。国内顾天钊等^[7]对引发鳃烂病的鲍氏不动杆菌进行了研究,结果表明,鲍氏不动杆菌可引起鳃暴发性死亡。但对鲁氏不动杆菌在养殖鱼类致病力方面的研究报道不多见。鲁氏不动杆菌是一种普遍存在于土壤和水中、常可分离自健康或生病的动物和人体上的一种致病菌。黄志坚等^[8]从患细菌病鳃身上分离到此菌,确定为鳃细菌病的一种病

原,并认为其对鳃的致病力较低。从我们在新兴县洞口镇近2年的调查及实验来看,鲁氏不动杆菌对3 cm以下的胡子鲇的致病力较强,对体长在5 cm以上的胡子鲇的致病力则较低,“吊头病”的发病率明显下降。这可能是由于其致病力在不同种的鱼和同种但不同规格的鱼体上存在差异,同时也与鱼体本身抵抗疾病的能力有关^[4]。有关问题尚待进一步研究。

(3)在胡子鲇种苗生产上,普遍反映用药作用不大,这与药物选择不当以及致病菌产生抗药性有关。根据病原分离及药物敏感试验,可在生产上使用敏感且不宜产生耐药性的动物专用抗菌药物如普乐健、卡那霉素、庆大霉素等。与此同时,还应加强水质管理,彻底消除生物饵料-水丝蚓(另文发表),以防病从口入,从而减少胡子鲇种苗的发病率。

致谢:本文在致病菌鉴定中得到广州市卫生防疫站易鸿先生的大力帮助,在此深表谢意。

参考文献:

- [1] 中国科学院水生生物研究所鱼病学研究室. 鱼病调查手册 [M]. 第 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 1981. 1-278.
- [2] 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 [M]. 北京: 科学出版社, 1978. 135-193.
- [3] 蔡妙英, 卢运玉, 赵玉峰. 细菌名称 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1996. 1-14.
- [4] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册 [M]. 第 8 版. 北京: 科学出版社, 1984. 604-607.
- [5] Roald S O, Hastein T. Infection with an acinetobacter-like bacterium in Atlantic salmon (*Salmo salar*) broodfish [A]. Fish Diseases, Third COPRAQ-Session [C]. Berlin: Springer-Verlag, 1980. 154-156.
- [6] Austin B, Austin D A. Bacterial fish pathogens disease in farmed and wild fish second edition [M]. New York: Ellis Horwood, 1993. 308-310.
- [7] 顾天钊, 陆承平, 陈怀青. 鲍氏不动杆菌 - 鳊鱼暴发性死亡的新病原 [J]. 微生物学通报, 1997, 24(2): 104-106.
- [8] 黄志坚, 何建国, 翁少萍, 等. 鳊鱼细菌性病原的分离鉴定及致病性初步研究 [J]. 微生物学通报, 1999, 26: 241-246.

The pathogenic bacteria of the 'erecting body' disease in catfish, *Clarias fuocus*

LI Gui-feng¹, LI Hai-yan², BI Ying-zuo¹

(1. Department of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. Department of Biology, Guangzhou University, Guangzhou 510530, China)

Abstract: 'Erecting body' disease is a kind of bacterial disease in catfish, especially within 3 cm of body length, with an infection rate exceeding 50%, causing great loss during breeding season. The pathogen was isolated from the liver, intestine and ascites of diseased fish, and artificially infected purely-cultured fish, showing positive. The bacterium has a short rod, sized $(1.5\sim 2.5)\mu\text{m} \times (1.0\sim 1.5)\mu\text{m}$, flagellumless, capsuleless, and no sporulation. The results of bacteriology identification show the pathogen is oxidase negative, catalase positive and gram negative in its stain reactions. The pathogen isolated is correspondent to the *A. lwoffii* in the characteristics of morphology, cultural characters as well as physiology and biochemistry reactions. Using 25 antibiotic drugs to test the sensitivities, the results show *A. lwoffii* is sensitive to most of them such as florfenicol, streptomycin, kanamycin and gentamycin, but not to tetracycline, ceftazidime, erythromycin and ceftazidime.

Key words: *Clarias fuocus*; 'erecting body' disease; Pathogenic bacteria; *Acinetobacter lwoffii*; antibiotic