

罗非鱼温和气单胞菌病的病原研究和药敏试验

蔡完其, 孙佩芳

(农业部水产增殖生态、生理重点开放实验室 上海水产大学, 上海 200090)

摘 要:从患病濒死尼罗罗非鱼肝脏分离到 99-5-A 和 99-7-28 菌株。经细菌学鉴定均为温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)。用这 2 菌株对尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼及尼罗罗非鱼(尼罗罗非鱼♀×奥利亚罗非鱼♂)进行人工感染, 均可使其致病。发病鱼症状与自然病鱼症状一致, 呈出血性败血症。再分离菌株的各种特性与原分离菌株相同, 确认这 2 菌株皆为温和气单胞菌。采用纸片扩散法, 用 35 种药物对上述 2 菌株进行药物抑菌试验, 其中, 丁胺卡那霉素、庆大霉素、多粘菌素、妥布霉素、氯霉素、氨基糖苷类效果最佳; 99-5-A 菌株对呋喃妥因敏感, 但 99-7-28 菌株对其耐药; 99-7-28 对复方新诺明敏感, 而 99-5-A 菌株对其则无反应。

关键词:罗非鱼; 温和气单胞菌; 药敏试验

中图分类号: S965.125

文献标识码: A

文章编号: 1005-8738(2002)03-0243-04

随着罗非鱼养殖业的发展, 疾病危害日益严重, 尤其是温和气单胞菌引起的出血性败血症可贯穿于整个养殖过程, 尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*), 奥利亚罗非鱼(*O. aureus*)和尼罗罗非鱼(尼罗罗非鱼♀×奥利亚罗非鱼♂)均会感染此病, 特别在越冬期间, 由于放养密度过大, 换水少, 水质差, 加之温度不易控制, 温差大等, 使鱼抗病力显著降低, 极易患病。而在越冬后, 将鱼种长途运输到各地放养时, 更易发病, 且来势凶猛, 有时 2 d 内便可死光。患病鱼的主要症状表现为反应迟钝、摄食量减少, 直至拒食; 吻、眼眶、鳃盖、鳍及肌肉等部位充血、出血; 内脏发生各种病变, 胆囊明显肿大, 呈墨绿色, 肝呈暗褐色, 有的鱼肠呈紫红色。总之, 病鱼呈败血症状。本研究对分离到的菌株进行鉴定并采用纸片扩散法进行药敏试验, 以进一步探讨该病防治方法。

1 材料和方法

1.1 鱼样品

患病濒死尼罗罗非鱼于 1999 年采自青岛和广

东某罗非鱼养殖场。健康的尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼及尼罗罗非鱼由上海水产大学鱼类种质资源试验站提供, 体重约 40 g。

1.2 病原菌分离

在无菌操作下剪取濒死病鱼肝脏, 经无菌生理盐水漂洗后, 在营养琼脂平板表面划线分离, 28 ℃ 培养 24 h, 待平板上出现形态一致的优势菌落时, 选取单菌落进一步划线纯化, 直至获得纯培养 99-5-A 和 99-7-28 菌株, 转接营养琼脂斜面保存、备用。

1.3 人工感染

将上述 2 菌株分别接种于营养琼脂斜面, 28 ℃ 培养 16~18 h, 用无菌生理盐水洗下菌苔, 制成菌悬液, 以 MCF2 号管测得菌液浓度为 6×10^8 CFU/mL, 10 倍稀释后(菌液浓度为 6×10^7 CFU/mL)腹腔注射健康鱼样。2 种菌株每种鱼各 5 尾, 注射剂量为 0.2 mL/尾, 试验组鱼分置于各水族箱中, 28 ℃ 水温饲养。对照组鱼注射生理盐水, 注射剂量同上。

1.3 病原菌鉴定

病原菌生理学性状测定参照《一般细菌常用鉴定方法》^[1], 并按照 Popoff 氏^[2]方法对气单胞菌属的分类鉴定至种。

1.4 病原菌药物敏感试验

采用纸片扩散法^[3], 在无菌操作下, 将含药纸片(购自上海卫生防疫站中国腹泻病控制上海试验

收稿日期: 2001-07-10.

基金项目: 国家“九五”科技攻关资助项目(96-008-01-02).

作者简介: 蔡完其(1939-), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事水产动物病理、病害防治、抗性研究。

研究中心)分别置于接种了 99-5-A 和 99-7-28 菌株的营养琼脂平板上,每种药设 2 个重复,28 ℃ 培养 16~18 h,根据该中心的药敏试验判断标准书,确定病原菌对不同药物的敏感程度。

2 结果

2.1 细菌致病性

99-5-A 和 99-7-28 菌株对 3 种罗非鱼均有致病性。99-5-A 菌株人工感染后的死亡率分别为,尼罗罗非鱼 100%,奥利亚罗非鱼 100%,尼罗罗非鱼 60%;99-7-28 菌株人工感染的死亡率分别为,尼罗罗非鱼 100%、奥利亚罗非鱼 100%、尼罗罗非鱼 60%。发病鱼症状与自然病鱼症状基本一致,再分离菌株经细菌生物学性状鉴定,其特性各自与 99-5-A 和 99-7-28 菌株相同。对照组均健康活泼,无任何症状。由此证实 99-5-A 和 99-7-28 菌株为罗非鱼温和气单胞菌病的病原。

2.2 病原菌鉴定

2.2.1 形态特征和培养特性 99-5-A 与 99-7-28 菌株均为革兰氏阴性杆菌,分散排列,少数成对或短链状、无芽孢、无荚膜、极生单鞭毛(图 1)。28 ℃ 培养 24 h,营养琼脂平板上菌落呈圆形、光滑湿润、边缘整齐、半透明、浅黄褐色、中心色深、无水溶性色素。营养肉汤培养基中呈均匀混浊生长,表面略有薄膜,沿试管壁有微量环状生长,一摇即散。

2.2.2 生理生化反应 见表 1。由表 1 可知,其生理生化反应除能利用组氨酸外,均与温和气单胞菌一致。

综上所述,2 菌株的形态特征、培养特性和生理生化反应鉴定结果均与 Popoff^[3]对温和气单胞菌的描述基本一致,故 99-5-A 与 99-7-28 菌株均为温和气单胞菌(*A. sobria*)。

2.3 药敏试验

用 35 种药物对 99-5-A 与 99-7-28 菌株进行药物抑菌试验,测量抑菌圈直径,计算平均值。将其对照“上海卫生防疫站中国腹泻病控制上海试验研究中心”的药敏试验判断标准书,发现这 2 菌株对 7 种药物(丁胺卡那霉素、庆大霉素、多粘菌素、妥布霉素、氟哌酸、氯霉素、氨基南)最敏感;99-5-A 菌株对呋喃妥因敏感,但 99-7-28 菌株对其耐药;99-7-28 菌株对复方新诺明敏感,而 99-5-A 菌株对其则无反应。

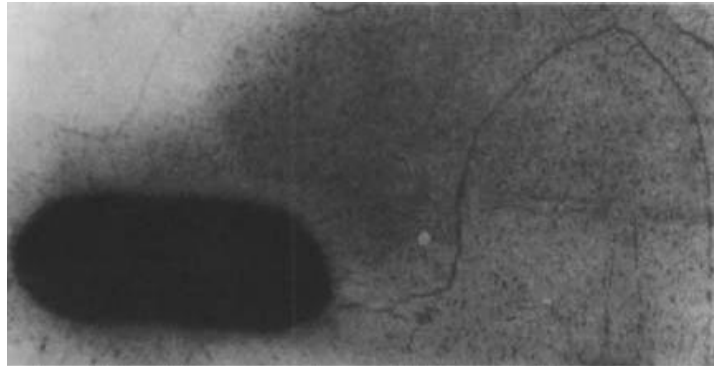
表 1 99-5-A 和 99-7-28 两菌株与温和气单胞菌生理生化特性比较

Table 1 Physio-biochemical characteristics of 99-5-A, 99-7-28 strains vs those of *Aeromonas sobria*

特性 Characteristics	99-5-A 菌株	99-7-28 菌株	温和气单胞菌 <i>A. sobria</i>
氧化酶 Oxidase	+	+	+
营养肉汤 35~37 ℃ Nutrient broth	+	+	+
葡萄糖产气 Gas from glucose	+	+	+
葡萄糖产酸 Acid from glucose	+	+	+
乳糖 Lactose	-	-	-
麦芽糖 Maltose	+	+	+
蔗糖 Sucrose	+	+	+
阿拉伯糖 Arabinose	-	-	-
纤维二糖 Cellobiose	-	-	d
海藻糖 Trehalose	+	+	+
鼠李糖 L-Rhamnose	-	-	-
水杨苷 Salicin	-	-	-
甘露醇 Mannitol	+	+	+
肌醇 Inositol	-	-	-
水解七叶苷 Esculin hydrolysis	-	-	-
甲基红测试 Methyl red test	-	-	-
伏基氏-普罗斯可尔测试 Voges-Proskauer test	+	+	+
1% 蛋白胨水中产吲哚 Indole production in 1% peptone water	+	+	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	+
产生 H ₂ S (TST) H ₂ S production (triple-sugar iron agar)	-	-	-
明胶液化 Gelatin hydrolysis	+	+	+
脲酶 Urease	-	-	-
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	+	+	+
L-精氨酸利用 L-Arginine utilization	-	-	-
L-组氨酸利用 L-Histidine utilization	+	+	-
弧菌抑制剂 O/129 test Vibrio inhibitor O/129 test			
10 μg/mL	R	R	R
150 μg/mL	R	R	R

注:d—同种细菌的不同菌株间有不同反应。The reactions are different among different strains of the same bacterium.

R—不敏感 Non-sensitive.

图1 99-5-A菌株($\times 14\ 000$)Fig.1 Electron micrograph of strain 99-5-A($\times 14\ 000$)

3 讨论

(1)99-5-A与99-7-28菌株在人工感染试验中均表现较强的致病力,可使尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼及尼奥杂交种均出现与自然病鱼相似的出血性败血症。从人工感染病鱼的体中分离到与原分离菌株相同的细菌,经菌体形态特征、培养特性和生理生化反应鉴定为温和气单胞菌。故确认温和气单胞菌是3种罗非鱼出血性败血症的致病菌。

(2)孙其焕等^[4]报道了温和气单胞菌引起的异育银鲫溶血性腹水病。叶雪平等^[5]报道了牛蛙温和气单胞菌病,体表常出现点溃烂斑等症状。在鳖类,王永坤等^[1]报道了温和气单胞菌引起的鳖红底板病、红脖子病。陈晓风等^[2]报道了鳖肝水肿病。孙佩芳等^[6]报道了鳖腐皮病。但尚未见到温和气单胞菌引起3种罗非鱼出血性败血症的报道。从已有报道及本研究可知,温和气单胞菌能引起鱼、蛙及鳖多种症状的疾病。其原因是否与温和气单胞菌多种血清型有关,有待于进一步探讨。

(3)温和气单胞菌广泛存在于水、土壤和水生动物中,属条件致病菌,其主要致病因子是产生各种溶血素和肠毒素^[7]。由王永坤等^[1]从温和气单胞菌对鲫鱼和小白鼠毒力试验、溶血素试验以及兔回肠肠毒素试验等结果可知,所分离的温和气单胞菌能产生溶血素、细胞毒素、肠毒素等多种毒力因素。这些毒素具有多种生物学活性,一旦条件适宜,温和气单胞菌便大量繁殖,其毒素可引起生物体广泛而复杂的病理变化。因此,在罗非鱼集约化养殖过程中,尤其越冬期间,控制水质和环境生态是防治该病的关

键之一。

(4)王永坤等^[1]曾对温和气单胞菌和嗜水气单胞菌做过致病力比较研究。结果表明,温和气单胞菌有致病力,且毒力比嗜水气单胞菌强。孙佩芳等^[6]对中华鳖进行人工感染和药物最低抑菌浓度(MIC)测定的结果与上述相似,但发现温和气单胞菌不同菌株间毒力差异较大,从患有温和气单胞菌病的中华鳖分离到的94-10-28和96-3-A菌株对鳖5号药的敏感程度(MIC)相差10倍左右。本研究中2菌株对7种药物的敏感性一致,但对呋喃妥因和复方新诺明的反应不一致,这是否与菌株各自的血清型有关,有待进一步研究。在疾病防治的实践中,为提高水产动物温和气单胞菌病的防治效果,应先行药敏试验。

参考文献:

- [1] 蔡完其,黄琪瑛.尼罗罗非鱼溃烂病的病理研究[J].水产学报,1986,10(3):261-271.
- [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,1978.68-71,135-194.
- [3] Popoff M. Genus III *Aeromonas* [A]. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, Vol 1 [C]. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. 545-548.
- [4] 孙其焕,孙佩芳,金丽华,等.异育银鲫溶血性腹水病病原的研究[J].水产学报,1991,15(2):130-139.
- [5] 叶雪平,顾金华,杨广智,等.牛蛙温和气单胞菌病原及防治[J].上海水产大学学报,2000,9(1):78-80.

1) 王永坤,李志健,朱国强,等.温和气单胞菌和嗜水气单胞菌致病力的比较研究[J].鱼类病害研究,1997,19(1-2):18-24.

2) 陈晓风,周常义.稚鳖“肝水肿症”病原及防治研究[J].鱼类病害研究,1997,19(1-2):40-46.

- [6] 孙佩芳, 蔡完其. 中华鳖温和气单胞菌病的病原研究[J]. 淡水渔业, 1998, 2(4): 3-5.
- [7] 何长民. 医用微生物学实验技术[M]. 兰州: 甘肃人民出版社, 1981. 290-291.

A pathogen study on disease caused by *Aeromonas sobria* in tilapias and drug sensitive test

CAI Wan-qi, SUN Pei-fang

(Key Laboratory of Ecology and Physiology in Aquaculture, Ministry of Agriculture,
Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Two bacterial strains, 99-5-A and 99-7-28, isolated from the liver of seriously diseased Nile tilapia were identified as *Aeromonas sobria* by bacteria certification. The healthy tilapias, including Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), blue tilapia (*O. aureus*), and their hybrids (Nile tilapia ♀ × Blue tilapia ♂), can be infected through artificial infection by these two strains. The disease characters in artificially infected fish are the same as those in naturally diseased fish, e.g. septicaemia. The characters of re-isolated strains are the same as the initially isolated strains, which confirms that the two strains are *Aeromonas sobria*. The testing results by paper extension methods for drug sensitive show that, among 35 antibiotics, amikacin, gentamicin, polymyxin, tobramycin, norfloxacinum, chloromycetin and aztreonam have the most inhibitive effects on the two strains, and strain 99-5-A is sensitive to furantoin but strain 99-7-28 is resistant to it; strain 99-7-28 is sensitive to sulfamethoxazolum but strain 99-5-A is not.

Key words: tilapias; *Aeromonas sobria*; drug test

2003 年《水产科学》杂志征订启事

《水产科学》杂志是由辽宁省水产学会主办的水产科技期刊, 1982 年创刊, 国内外公开发刊。本刊是中文水产、渔业类核心期刊和全国农业系统优秀期刊之一, 现已被俄罗斯《文摘杂志》、英国《动物学记录》、《国际农业与生物研究中心》、美国《剑桥科学文摘》等收录。是中国科学引文数据库、中国学术期刊综合评价数据库、《中国学术期刊(光盘版)》、中国期刊网和万方数字化期刊群全文收录期刊; 是《中国水产文摘》来源期刊之一。

《水产科学》主要刊载水产资源、海淡水捕捞、水产养殖与增殖、水产生物病害及防治、水产品保鲜与加工综合利用、渔船、渔业机械与仪器及水产基础科学等方面研究的新进展、新技术、新方法等。设有科学实验、实用技术、渔业管理、综述述评、问题探讨与建议、科普讲座、科技信息等栏目。读者对象为水产科技人员, 大中专院校水产、生物、环保等专业师生, 渔业行政企事业单位有关管理和技术人员, 以及广大知识渔民。

《水产科学》为双月刊, A4 开本, 56 页, 单月 25 日出版, 定价 5.00 元, 全年 30.00 元。邮发代号: 8-164。请读者到当地邮局订阅, 也可直接汇款至本刊编辑部订阅。本刊地址: 辽宁省大连市黑石礁街 50 号, 辽宁省海洋水产研究所《水产科学》编辑部, 邮编: 116023, 联系电话: 0411-4679512。还可以通过银行汇款, 开户银行: 工商银行大连星海支行, 帐号: 3400202309008900681。