

皱纹盘鲍幼鲍溃烂病病原菌的研究

叶 林 俞开康 王如才

(青岛海洋大学, 266003)

刘立洋 邹锋钢 梁永江 陈 刚

(山东荣成筑荣水产有限公司)

摘 要 从患有溃烂病的皱纹盘鲍幼鲍体上,分离到一种致病性细菌。经人工感染试验,证实该菌为皱纹盘鲍幼鲍溃烂病的病原菌。显微镜观察该细菌为革兰氏阴性,极生1~3根鞭毛,能运动的杆菌,大小为 $0.7\sim 0.8\times 2.3\sim 2.8\mu\text{m}$ 。经细菌分类试验鉴定,该菌生长最适温度为 $20\sim 30^{\circ}\text{C}$,最适pH值 $5.5\sim 8.5$ 。该菌在培养基B上产生蓝色的荧光素。能利用葡萄糖产酸不产气,果糖、D-半乳糖、甘露糖、木糖、阿拉伯糖、海藻糖发酵反应阳性,不能发酵乳糖、麦芽糖、鼠李糖、蔗糖,可分解山梨醇、肌醇、肌苷。过氧化氢酶、脲酶、氧化酶、及明胶液化反应阳性;能利用柠檬酸,不还原亚硝酸盐,不产生吲哚和硫化氢,MR和V.P.试验阴性。初步鉴定该病原菌为荧光假单胞杆菌。还进行了病原菌药敏试验,该菌对卡那霉素、庆大霉素、恶喹酸敏感,这些药物可作为防治该病的首选药。

关键词 皱纹盘鲍幼鲍,溃烂病,病原菌

随着鲍养殖业的发展,鲍病的发生也日益严重。国外科学工作者先后对鲍的一些细菌、寄生虫病进行了研究报道^[1]。国内鲍病研究基本处于起始阶段。1995年,刘金屏等报道了皱纹盘鲍脓疱病的病原菌研究^[2],查清了引起皱纹盘鲍脓疱病的病原为河流弧菌,提出了预防、治疗该病的方法、手段。但是,国内外主要研究海上养殖成鲍的病害,而对工厂化养成过渡期的幼鲍疾病研究还未见报道。目前,在我国工厂化过渡养殖过程中,幼鲍溃烂病常年发病。据不完全统计,该病造成的幼鲍死亡率可达40%~60%。发病幼鲍一般在0.5~2.5厘米大小,病鲍的足部肌肉溃烂,运动减慢,附着能力减弱,不摄食,直至最后死亡。从病鲍足部分离到三种细菌。为证实这些细菌的病原性,进行了病原菌的分离纯化和人工感染试验,并进行了病原菌的细菌鉴定和药敏试验。

1 材料和方法

1.1 病鲍来源 患溃烂病的幼鲍采自山东荣成筑荣水产有限公司幼鲍饲养车间。采后立即进行细菌分离工作。

收稿日期:1996-12-10。

1.2 细菌分离 用 70% 的酒精将濒死患鲍足部溃烂处表面擦拭消毒, 然后用灭菌的细菌接种环, 在患鲍腹足溃烂处, 取深部组织液。而后, 在 2216E 海水培养基平板上划线。于 25℃ 培养 48 小时后, 选取优势菌落重复划线分纯, 并纯化细菌置 25℃ 培养箱保存以备试验用。

1.3 人工感染试验 取健康幼鲍(2~2.5 厘米)放养于 0.05 立方米塑料桶中。每桶为一组, 盛海水 40 升, 放幼鲍 20 个。水温 21~25℃, 连续充气, 每天换水一次, 进行观察记录。连续八天。

1.3.1 浸浴感染 将分离纯化的细菌经无菌生理盐水稀释计数后加入桶内制成所需浓度 1×10^7 。将幼鲍浸浴 24 小时后, 再移入清洁海水中饲养。

1.3.2 创伤感染 用消毒后的小针头, 轻轻刺破幼鲍腹足, 放入 1×10^7 浓度的菌液中, 浸浴 24 小时后, 移至清洁海中饲养观察。

1.3.3 病原菌重复分离与感染 取感染组中出现典型症状的病鲍, 进行细菌重分离。分离细菌纯化后, 用浸浴方式进行重复感染。

1.4 病原菌的确定 将第一次分离到的三种可疑菌进行感染试验。发现只有 9601 细菌株引起幼鲍发病。从感染试验中典型病鲍体上分离到的 96011 细菌与 9601 外观相同(经实验证明为同一种细菌)。重复感染后幼鲍发病。因而确定 9601 与 96011 为致病菌。

1.5 病原菌生物学性状的测定 按照中国科学院微生物研究所细菌分类组^[3], 陈奖励等^[4], Noel R. Krietg^[5], Philipp Gerhardt^[6] 进行分类鉴定。最后, 由中国科学院微生物研究所运用美国 Biology Microstation System 进行菌种核实鉴定。

1.6 病原菌药敏试验 选用上海市医学化验研究所出品的药敏试纸, 进行病原菌药物敏感试验。

2 结果

2.1 人工感染试验结果 经创伤感染, 浸浴感染, 幼鲍发病死亡率分别为 80%, 40%。重复感染, 病鲍死亡率为 25%。见表 1~表 3。

表 1 分离菌株创伤感染幼鲍

Table 1 Pathogenicity of isolation bacteria to Juvenile abalone by muscle trauma

菌 种 Different bacteria	菌液浓度 Bacteria Density	稚鲍感染后经过的天数及死亡数								死亡鲍/ 试验鲍 Death No/Test No	死亡率 Death rate	症状出现率 Rate of diseased
		The number of days and dead abalones										
		1	2	3	4	5	6	7	8 天数			
9601	$1.2 \times 10^7/1$	0	2	1	4	3	3	2	1	16/20	80%	100%
9602	$1.2 \times 10^7/1$	0	0	0	0	0	0	0	0	0/20	0	0
9603	$1.2 \times 10^7/1$	0	0	0	0	0	0	0	0	0/20	0	0
对照 (Control)	清洁海水 water	0	0	0	0	0	0	0	0	0/20	0	0

试验水温(Water temperature of experiment): 23~25℃

试验水温(Water temperature of experiment): 23~25℃

2.2 分离到的致病菌的主要生理生化性状 对分离到的菌株, 进行了生理生化指标以及多

种糖类的发酵试验的测定,初步鉴定该病原菌为荧光假单胞杆菌(*Pseudomonas fluorescens*)。结果见表4,表5。

表2 分离菌株浸浴感染幼鲍

Table 2 Pathogenicity of isolation bacteria to Juvenile abalone by immersion

菌 种 Different bacteria	菌液浓度 Bacteria Density	稚鲍感染后经过的天数及死亡数 The number of days and dead abalones								死亡鲍/试验鲍 Death No/Test No	死亡率 Death rate	症状出现率 Rate of diseased
		1	2	3	4	5	6	7	8			
		天数										
9601	2×10 ⁷ /l	0	0	0	1	2	2	2	1	8/20	40 %	40 %
9602	2×10 ⁷ /l	0	0	0	0	0	0	0	0	0/20	0	0
9603	2×10 ⁷ /l	0	0	0	0	0	0	0	0	0/20	0	0
对照 Control	清洁海水 water	0	0	0	0	0	0	0	0	0/20	0	0

试验水温(Water temperature of experiment): 22~25℃

试验水温(Water temperature of experiment): 22~25℃

表3 重复分离菌株浸浴感染幼鲍

Table 3 Pathogenicity of reisolation bacteria to Juvenile abalone by immersion

菌 种 Different bacteria	菌液浓度 Bacteria Density	稚鲍感染后经过的天数及死亡数								死亡鲍/试验鲍 Death No/Test No	死亡率 Death rate	症状出现率 Rate of diseased
		The number of days and dead abalones										
		1	2	3	4	5	6	7	8			
96011	2×10 ⁷ /l	0	0	0	1	1	1	1	1	5/20	25%	45%
对照 Control	清洁海水 water	0	0	0	0	0	0	0	0	0/0	0	0

试验水温(Water temperature of experiment): 21~24℃

试验水温(Water temperature of experiment): 21~24℃

2.3 分离到的病原菌对一些药物的敏感性试验 为了预防、治疗幼鲍溃烂病,对病原菌进行了药物敏感试验。试验表明,卡那霉素、呋喃唑酮及恶喹酸的抑菌效果较好,可作为防治该病的首选用药。结果见表6。

3 讨论

3.1 本实验对分离到的致病菌进行了创伤和浸浴感染试验,且感染成功。试验结果表明,创伤感染的幼鲍死亡率较高,达80%。浸浴感染幼鲍死亡率较低,为40%。这说明,该致病菌主要侵袭途径是经幼鲍伤口而发生感染。感染稚鲍都有明显的溃烂症状,说明分离到的细菌为该病的致病菌。本次人工感染试验,未进行投饲感染试验和细菌注射感染试验。这是因为考虑到,幼鲍的摄食量较低,投喂饵料量不易掌握,如投喂人工合成饵料很易败坏水质,造成较大的试验误差。因而在人工感染试验过程中,只是投喂少许新鲜海藻。而用细菌注射的方法来进行人工感染,作者认为说明不了问题。因为即使一些环境中常在的危害不大的细菌大量进入生物体内也可造成生物体的异常。

3.2 荧光假单胞菌,是广泛存在于淡水、海水中的一种致病性的病原菌。它可引起草鱼、青鱼^[5]的烂鳃病,罗非鱼的细菌感染症^[8],也可感染鲢^[9]、鳊^[10]、鲫^[10]等海水鱼类,引起体表

皮肤出血发炎、糜烂和溃疡。该菌可常年引起水生动物发病, 无明显的流行季节^[4]。该菌引起幼鲍的溃烂病, 尚属国内外首次报道。

表 4 分离菌株的性状

Table 4 The physiology and biochemistry characteristics of the pathogenic bacteria

测定项目 Experiment items	分离菌株 9601 Pathogenic bacteria	测定项目 Experiment items	分离菌株 9601 Pathogenic bacteria
革兰氏染色 Gram stain	-	丙二酸盐利用 Malonate utilize	+
运动性 Swimming motility	+	过氧化氢酶 Catalase	+
细菌直径(um) Bacteria diament	0.7~0.8	淀粉酶 Amylase	-
细菌长度(um) Bacteria length	2.3~2.8	脲酶 Urease	+
极生鞭毛 Polar flagella	1~3	明胶酶 Gelatinase	+
生长适宜温度℃ Sutable growth temperature	20~30	脂酶 Lipase	+
生长适宜酸碱度 pH Sutable growth pH	5.5~8.5	氧化酶 Oxidase	+
荧光反应 Fluorescence test	产生蓝色荧光色素	几丁质酶 Chitinase	+
H ₂ S 产生 H ₂ S Production	-	0/129 敏感性 Suseptibility to 0/129	-
V-P 反应 Voges Proskauer reaction	-	葡萄糖酸盐氧化 Gluconate oxidase	+
甲基红反应 Methyl red test	-	精氨酸双水解 Arginine dihydrolase	+
吲哚反应 Indole test	-	苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase	-
柠檬酸盐利用 Citrate utilization	+	鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	-
纤维素水解 Cellulolytic	-	TWEEN 40 利用 Tween 40	+

表 5 分离菌株对糖类的发酵试验

Table 5 Carbohydrate fermentation tests of the pathogenic bacteria

葡萄糖	+	鼠李糖	-
Glucose		Rhamnose	
乳糖	-	蜜二糖	-
Lactose		Melibiose	
果糖	+	D- 树胶糖醇	-
Levulose		D- arabitol	
D- 半乳糖	+	木糖醇	-
D- galactose		Xylitol	
蔗糖	-	阿拉伯糖	+
Surcose		Arabinose	
麦芽糖	+	岩藻糖	-
Maltose		Fucose	
甘露糖	+	蕈糖	+
Mannose		Trehalose	
纤维二糖	-	山梨醇	+
Cellobiose		Sorbitol	
葡萄糖发酵	+	肌醇	+
Glucose ferment		Inositol	
木糖	+	卫矛醇	-
Xylose		Dulcitol	
氨基葡萄糖	+	肌苷	+
Glucosaminic		Inostiol	

表 6 病原菌对药物的敏感性

Table 6 Sensitivity to antibacterial agents of *Ps endomonas fluorescens*

药物名称	9601 抑菌效果	药物名称	9601 抑菌效果
Different antibacterial agents	Antibacteria effect of 9601	Different antibacterial agents	Antibacteria effect of 9601
氯霉素	+	磺胺 + TMP	-
Chloramphenicol		Cotrimoxazole	
氧哌嗪青霉素	-	卡那霉素	++
Piperacillin		Kanamycin	
庆大霉素	-	妥布霉素	-
Gentamycin		Tobramycin	
丁胺卡那霉素	++	四环素	+
Amikacin		Tetracycline	
呋喃唑酮	++	恶唑酸	++
Furazolidone		Oxolinic acid	
青霉素	-	链霉素	+
Penicillin		Streptomycin	
万古霉素	-	新霉素	-
Vancomycin		Neomycin	
氨苄青霉素	-	红霉素	...
Ampicillin		Erythromycin	
磺胺	-	苯唑青霉素	-
Sulfonamides		Oxacillin	

注: ++—敏感; +—中度敏感; ——抗性

Note: ++—Sensitive, +—Mid. Sensitive, ——Resistant.

3.3 经药物敏感性试验表明,该菌对卡那霉素、恶唑酸、呋喃唑酮等敏感,这些药物可作为预防和治疗该病的首选药物。在应用药物来进行预防该病的同时,还应注意幼鲍养殖的生态环境的调控。要对养殖用水的水质、水温、饵料的投喂情况进行监测,从而预防该病的发生。

参 考 文 献

- [1] 孟庆显,1988。鲍的疾病与防治。海洋源沼通报,(1):96-98。
- [2] 刘金屏等,1995。皱纹盘鲍脓疱病的研究。中国水产科学,78-84。
- [3] 中国科学院微生物研究所细菌分类组,1978。一般细菌常用鉴定方法。科学出版社(北京)。
- [4] 陈奖励等,1993。水产微生物学,387-392。农业出版社。
- [5] Noel R. Kriegt (1984) Bergey's Manual of systematic bacteriology volum 1:141-168。
- [6] Philipp Gerhardt, 1989。普通细菌学方法手册,509-543。厦门大学出版。
- [7] 王德铭,1958。草、青鱼烂腮及赤皮病致病菌的研究。水生生物学集刊,(1):9-25。
- [8] 宫下敏夫,1984。テイラウ病魚カヲ分离 Pseudomonas fluorescens Edwardsiella tarda 魚病研究,19(1):45-50。
- [9] 山本 淳,高桥一孝(1986) イワナカ分离された Pseudomonas fluorescens 魚病研究,21(4):259-260。
- [10] 江草周三(1985)。鱼病学,ゲリ他のにドラ病 恒星社厚生阁,138-140。

THE STUDY ON THE PATHOGENIC BACTERIA OF THE FETER DISEASE OF CULTURED JUVENILE DISCUS ABALONE

Ye Lin Yu Kaikang Wang Rucui

(Ocean University of Qingdao, 266003)

Liu Liyang Zou Fenggang Liang Yongjiang Chen Gang

(Shan dong Rong cheng city Zhu rong Fisheries Company)

ABSTRACT One kind of bacteria was separated from the fester disease juvenile discus abalone. It was verified that this bacteria was the pathogenic bacteria of the fester disease abalone by the artificial infection experiment. The pathogenic bacteria was a $0.7 \sim 0.8 \times 2.3 \sim 2.8$ μm , bacillus with 1~3 polar flagella and active swimming motility. It produced the green color fluorescence on medium B. It could ferment glucose, arabinose, D-galactose, mannose, D-trehalose, D-fructose, sorbitol, inosine and inositol, and could not ferment lactose, sucrose, maltose and rhamnose. For other biochemistry characters, the pathogenic bacteria could oxidize the undine, Oxidase, H_2O_2 and couldn't use the Sodium nitrite. The result of the Indole, H_2S , MR, V. P. experiment was all negative. This bacteria was verified as the *Pseudomonas fluorescens* by the physiology and biochemistry experiment. In order to prevent and cure this disease, the sensitivity to the antibacterial agencies experiment of the pathogenic bacteria was done. Some antibacterial agencies included Kanamycin, Oxolinic and Furaxone could be selected as the valid medicine to treat this disease.

KEY WORDS Fester disease, Juvenile discus abalone, Pathogenic bacteria