

养殖欧洲鳗鲡脱粘病的研究

樊海平 黄晓泓 徐娟儿

(福建省淡水水产研究所, 福州 350002)

摘要 1996年6月~10月,对养殖欧洲鳗鲡的脱粘病进行了病原菌分离、人工感染、病原菌生理、生化特性和药物敏感性的测定,观察其病理组织变化。结果认为病原菌为革兰氏阴性、具动力的弧状菌;氧化酶、过氧化氢酶、甲基红反应、吲哚试验、V-P反应阳性;对O/129敏感、非O1群霍乱血清凝集阳性;还原硝酸盐;耐盐范围0~6;对氯霉素、四环素、壮观霉素等敏感。鉴定该病原菌为非O1群霍乱弧菌。主要病理变化为肝细胞肿胀、核固缩,肝脏、肾脏组织内形成坏死病灶区,肠、胃发炎,肠粘膜层坏死、脱落,部分心肌纤维坏死。

关键词 欧洲鳗鲡,脱粘病,非O1群霍乱弧菌,病原菌

我国大陆自1992年开始引进少量欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)进行试养,其规模在逐年发展,现在福建、广东等主要养鳗省份已具有一定规模,养殖量约占总养鳗量的50%,并不断向内陆省份如江西、广西等地发展。欧洲鳗鲡养殖过程中的病害发生十分严重,给养殖者带来了巨额的经济损失。现已发现的主要疾病有寄生虫病,如指环虫病、小瓜虫病、车轮虫病等;真菌病,如水霉病、鳃霉病;细菌性疾病,如爱德华氏菌病、赤鳍病、赤点病等^[5],烂尾病^[4],红头病^{[2][7]}等。1995年、1996年,福建省养殖欧洲鳗鲡广泛流行一种疾病,其主要症状为:病鳗不摄食、体弱,易吊挂于饵料台,体表具圆形或椭圆形粘脱落斑,随病情的发展,脱粘病灶处溃疡、发炎,鳃丝水肿、顶端充血、溃烂,内脏炎症严重。主要流行于夏、秋高温季节,常引起大批死亡。本研究目的是查明该病病原菌,并寻找有效的治疗方法。

1 材料与方法

1.1 病原菌的分离

1996年6月,福建省福清市瑞丰水产养殖公司养殖的欧洲鳗鲡暴发脱粘病,病鳗平均规格为50g左右,症状典型。取病鳗,首先用无菌生理盐水冲洗病灶3遍,然后用无菌接种环自病灶处取样后于普通培养基平板划线接种,30℃培养24h后,选取形态、色泽一致的优势菌落于普通培养基平板重复划线纯化,将纯培养物转接至普通斜面培养基上,石蜡低温保存,供人工感染、细菌学鉴定及药敏试验用。

1.2 人工感染试验

收稿日期:1997-01-23

取体重为 13g 左右的健康欧洲鳗鲡,于水族箱暂养 5d,暂养期间不投饵、连续充气,水温保持在 26~28℃ 之间,每日换水 1/2,稳定后供人工感染用。将于 30℃ 培养 24h 的斜面培养物用无菌生理盐水洗下,制成一定浓度的菌悬液。注射感染,用无菌注射器于低温麻醉后的鳗鲡背鳍基部行肌肉注射,每尾注射菌悬液 0.5ml;创伤感染,先用无菌解剖刀划破体侧皮肤,和浸浴感染的试验鳗均于菌悬液中浸浴 2h 后,移至清洁水饲养。各试验组用鳗 6 尾,并设独立对照组。试验条件保持不变,观察记录试验结果 7d。对注射感染后出现典型症状的病鳗,自病灶处重复分离细菌,纯化后用注射感染方法重复人工感染。

1.3 病原菌的鉴定

病原菌的生物学性状,按照文献[1]介绍的方法测试,根据 Baumann P 等^[9]分类方法鉴定至种。

1.4 病原菌对药物的敏感性试验

所用药敏纸片噻嗪酸和尼福康由日本三鹰制药株式会社制造,其余为北京天坛药物生物技术开发公司制造。用普通培养基平板,涂布法接种细胞进行琼脂扩散法试验,每个平皿贴药敏纸片 4 张,每种药物设重复纸片,于 30℃ 培养 24h 后测量抑菌圈的直径(mm),对照现代实验诊断学手册^[3]结果解释标准,检查病原菌对药物的敏感程度。用对倍稀释法测定最敏感药物中 1 种的 MIC 和 MBC 值。

1.5 病理组织变化的观察

取典型症状病鳗的各组织器官,10% 中性福尔马林固定,常规石蜡切片,切片厚度为 7~10μm, H. E. 染色,中性树胶封片,于 XSP-2C 型显微镜观察病理变化并照相。

2 结果

2.1 病原菌的分离与鉴定

自具典型症状病鳗的病灶处分离得到形态与色泽、大小几乎一致的菌落,几乎无杂菌生长,提取纯化后得菌株 960620;自人工感染后出现典型症状病鳗的病灶处分离、纯化得菌株 960625;从重复感染出现典型症状的病鳗病灶处分离、纯化得菌株 960626。菌落为圆型、透明,大小为 0.7~0.9mm,分离菌株的生理生化特性见表 1。根据 Baumann P 等分类系统,病原菌定名为非 O1 群霍乱弧菌(Non-O1 *Vibrio cholerae*)。

2.2 人工感染试验

注射感染组 24h 出现死亡 3 尾,死亡鳗头部上、下顎、胸鳍充血,针眼周围粘液脱落,并出现溃疡;至 72h 时死亡 5 尾,病鳗出现斑块状粘液脱落,肠胃充血、发炎,鳃盖充血;至试验结束时,试验组鳗鲡全部死亡。重复感染组 24h 出现死亡 2 尾,症状同注射组,72h 死亡 4 尾,试验结束时试验组鳗鲡全部死亡。创伤感染组至 48h 时出现死亡,至试验结束时,死亡 3 尾。死亡鳗鲡表现脱粘病症状,粘液脱落灶更明显,溃疡如注射组。浸浴感染组仅死亡 1 尾,死亡鳗鲡未出现脱粘症状,而表现为全身性细菌感染症状,如皮肤具出血点,鳃盖膜充血,轻压鳃部流出血色粘液等。对照组鳗鲡全部存活,活动正常,无外观异常症状表现。

2.3 病原菌对药物的敏感性试验

所分离到的非 O1 群霍乱弧菌对常规药物的敏感性不同:对氯霉素、四环素、壮观霉素、复方新诺明、喹诺酮类的诺氟沙星、噻嗪酸等敏感;对链霉素、呋喃唑酮、红霉素、强力霉素中度敏感;对氨苄青霉素、柱晶白霉素及阿洛西林耐药。病原菌对诺氟沙星的最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)值分别为 0.2mg/L 和 0.4mg/L。

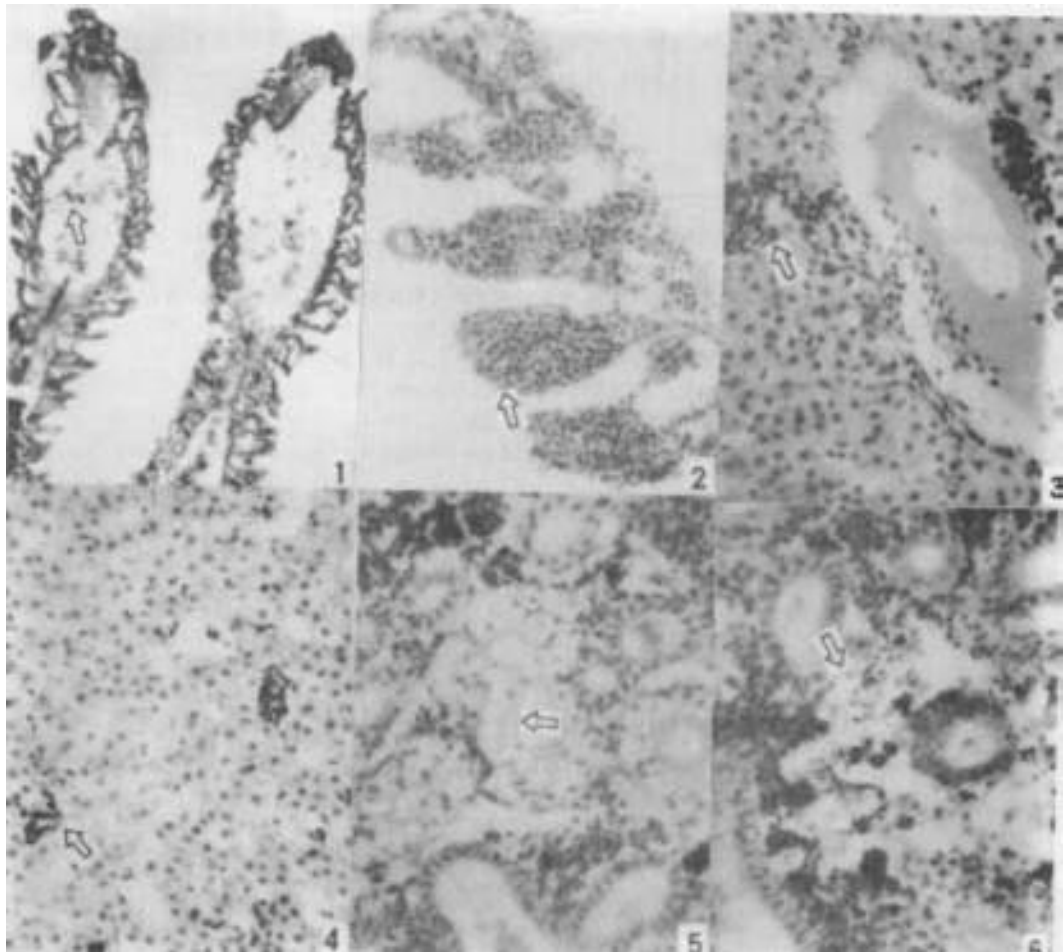
表 1 脱落病分离菌株的生理生化特性

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of the isolated bacteria from the diseased eel.

测定项目 Characteristics	菌株 Isolations			测定项目 Characteristics	菌株 Isolations		
	960620	960625	960626		960620	960625	960626
形态 Shape	弧菌	弧菌	弧菌	弧菌抑制剂			
革兰氏染色	-	-	-	Sensitivity to the vibrio static agent, O/129			
Gram - staining				10 μ g/片 disk	S	S	S
g 氏双糖铁:				150 μ g/片 disk	S	S	S
Kligler Iron Agar:				枸橼酸盐	+	+	+
斜面 Slant	-	-	-	Utilizaion of sodium citrate			
高层 Butt	+	+	+	赖氨酸脱羧酶	+	+	+
气体 Gas	-	-	-	Lysine decarboxylase			
H ₂ S	-	-	-	鸟氨酸脱羧酶	+	+	+
氧化酶 Oxidase	+	+	+	Ornithine decarboxylase			
动力 Motility	+	+	+	精氨酸双水解酶	-	-	-
O/F 试验	F	F	F	Arginine dihydrolase			
Oxidation - fermentation				甘露糖 Mannitol	-	-	-
接触酶 Catalase	+	+	+	蔗糖 Sucrose	+	+	+
硝酸盐还原 Nitrates	+	+	+	阿拉伯糖 Arabinose	-	-	-
reduced to nitrites				乳糖 Lactose	-	-	-
吡唑试验	+	+	+	纤维二糖 Cellulbiose	-	-	-
Indole production				水杨素 Salicin	-	-	-
甲基红反应				肌醇 Inositol	-	-	-
MR Methyl red test	+	+	+	七叶苷 Esculin	-	-	-
V - P 反应	+	+	+	明胶酶 Gelatinase	+	+	+
Voges - Proskauer reaction				尿素酶 Urease	-	-	-
耐盐性:				甘露醇 Mannitol	+	+	+
Growth in peptone				O1 群霍乱血清凝集	-	-	-
borth with NaCl:				Agglutinated by			
0% NaCl	+	+	+	cholera O1 antiserum			
3% NaCl	+	+	+	非 O1 群霍乱血清凝集	+	+	+
6% NaCl	+	+	+	Agglutinated by	(O51)	(O51)	(O51)
8% NaCl	-	-	-	cholera Non - O1 antiserum			
10% NaCl	-	-	-				

2.4 病理组织变化的观察

病鳗肝脏细胞肿胀,核固缩,部分肝细胞呈空泡样变性,肝实质组织中血管壁破裂,血细胞外渗(图版-3),血管周围的肝细胞最先变性,随病情发展,变性细胞被血细胞包绕,形成坏死结疖(图版-4)。肾小管上皮细胞相互融解,细胞呈玻璃样变性(图版-5),肾小管管腔萎缩。病情严重时,肾小管上皮细胞坏死(图版-6),形成脓状溃疡灶。心脏失血,部分心肌纤维萎缩,肌纤维坏死后色素沉积。肠道发炎,胃粘膜层脱落或肠、胃壁结缔组织积水,形成水肿,肠道肌肉组织血细胞浸润。鳃丝水肿,鳃丝上皮发炎(图版-2),鳃小瓣间相互融合。



图版 Plate

1 × 200, 2 ~ 6 × 400

3 讨论

养殖欧洲鳗鲡的脱粘病主要流行于夏、秋 2 季的高温期,一般于选别后 3~5d 暴发,往往于 1~2d 内感染 30% 以上,并引起较高的死亡率。本病传染率强,一般一个池发病后,能传播至全场养殖池。分析其原因,可能为选别鳗鲡时造成紧迫,使鳗鲡粘液分泌增加,部分粘液脱落,病原菌乘机侵袭,于鱼体表繁殖形成圆形或椭圆形病灶;病原菌在适宜条件下大量繁殖,经各种途径于养殖池间传播,导致流行病暴发。

虽然药敏试验发现病原菌对多种抗生素敏感,但在实际生产中单独使用这些抗生素很难控制病情,这可能与浸浴条件下抗生素较难大量进入皮肤内部杀死病原菌有关。经过试验采用 4% 食盐 + 复合中药制剂 + 敏感抗生素药浴,每日换水 1/3,保持盐份,连续 3d 药浴

后改用有机碘 + 呋喃唑酮, 每日 1 次, 连续 2d 的治疗方法, 疗效有效率达 100%, 治愈率达 95% 以上。其中复合中药制剂为黄连、大黄、黄芩、五倍子及甘草的煎煮液。

非 O1 群霍乱弧菌存在于水体中, 毒力强, 引发鱼病与水温密切相关^[8]。因而本病主要流行于高温季节, 与本文结论一致。创伤弧菌引起的鳗鲡弧菌病早有报道, 主要发生于含盐养殖水体中, 所引起的主要症状为体表上形成溃疡病灶, 而非 O1 群霍乱弧菌引起的欧洲鳗鲡脱粘病首先表现为脱粘病灶, 后期才引起溃疡灶。

参 考 文 献

- [1] 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. 科学出版社, 1978. 111~193
- [2] 方宋正. 欧洲鳗鲡“红头病”. 科学养鱼, 1994, 11: 27
- [3] 王淑娟等. 现代实验诊断学手册. 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1995. 511~521
- [4] 陈汉水等. 欧洲鳗鲡养殖暴发烂尾病的诊断. 动植物检疫, 1995(2): 17~18
- [5] 赵文, 孙兆和. 精养条件下欧洲鳗的病害与防治. 国外水产, 1995(4): 20~24
- [6] 殷战, 徐伯英. 鱼类细菌性疾病的研究. 水生生物学报, 19(1): 76~83
- [7] 樊海平. 欧洲鳗鲡红头病的防治方法. 中国水产, 1995, 11: 21
- [8] Austin B, D A Austin. Bacterial fish pathogens disease in farmed and wild fish. Chichester: Ellis Horwood Limited. 1987, 280~281
- [9] Baumann P, A L Furniss, J V Lee. Genus vibrio. In: Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1 (ed. by N. R., Krieg & J. G. Holt). Williams & Wilkins Co, Baltimore. 1984. 518~538
- [10] Biosca E G, et al. First record of *Vibrio vulnificus* biotype 2 from diseased European eel, *Anguilla anguilla* L. J of fish dis, 14: 103~109

Research on the mucous sloughing disease of cultured eel, *Anguilla anguilla*

Fan Haiping Huang Xiaofeng Xue Juaner

(The Freshwater Fisheries Institute of Fujian Province, Fuzhou 350002)

Abstract An epizootic mucous sloughing disease of *Anguilla anguilla* was studied from June 1996 to October 1996 by isolating pathogen, infecting artificially and testing the biochemical and pyaiological characteristics of the pathogen and its sensitivity to drugs. The pathogen and the pathological changes of the ill were observed too. The Non - O1 *Vibrio cholera* was proved to be the pathogenic bacteria which was a kind of gram negative and fermentative vibrio. Its salt - resisting concentrations of growth are in the range 0% ~ 60%. Its oxidase, catalase, methyl red test, indole test, Voges - Proskauer reaction, sensitivity to O/129 and its nitrate reduction are positive. The pathogen is sensitive to chloramphenicol, tetracycline and spectinomycin. Focal necrosis was found in liver and kidney. The intestine was inflammatory and the necrotic tissue sloughed in the lumen. Part of the heart muscle fibres was necrotic.

Key words *Anguilla anguilla*, Mucous sloughing disease, Non - O1 *Vibrio cholerae*, Pathogen