

文章编号:1005-8737(2000)02-0126-03

·研究简报·

牛蛙红腿病病原研究

Study on pathogen of 'Red-Leg' disease in bullfrogs

胡成钰,洪一江

(南昌大学 生命科学与食品工程学院,江西 南昌 330047)

HU Cheng-yu, HONG Yi-jiang

(College of Life Science and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

关键词:牛蛙;红腿病;病原体;不动杆菌;嗜水气单胞菌

Key words: bullfrog; Red-Leg disease; pathogen; *Acinetobacter claceticus*; *Aeromonas hydrophila*

中图分类号:S947.2

文献标识码:A

红腿病是牛蛙养殖过程中危害性最大的一种疾病,该病传染性强,死亡率高,典型病症为头腹部和腿内侧皮肤出现红点、红斑、肿胀,部分蛙趾指充血或溃烂,不活跃,不吃食。剖检可见腹腔有腹水,肝、脾、肾肿大,肠内空虚,出血发炎。自 Emerson 等首次定名红腿病以来^[1],已从蛙中分离到气单胞菌、粪产碱菌、假单胞菌等几种细菌^[2-4]。Glorioso 等认为嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)可能是其主要病原体,病毒、真菌和厌氧菌与红腿病无关^[2,3]。肖克宇等^{①②}认为不动杆菌属细菌是其致病菌,气单胞菌、假单胞菌与红腿病无关。笔者对牛蛙红腿病蛙进行病原的分离和鉴定,确认该病的病原体为不动杆菌(*Acinetobacter claceticus*)和嗜水气单胞菌。

1 材料和方法

1.1 试验动物

红腿病牛蛙于1995年6月、11月,1996年6月、11月分别取自江西省德安县、永修县、南昌县等5个牛蛙养殖场。健康牛蛙购自市场和江西省农业科学院牛蛙养殖场。

1.2 病原菌分离

将有典型症状的濒死蛙洗净体表,常规法消毒,无菌法

从肌肉、心脏和肝脏划线接种于营养琼脂平板,培养纯化后转接到普通营养琼脂斜面备用。

1.3 人工感染试验

分离纯化菌经培养后,用无菌生理盐水洗下菌苔,制成菌悬液,测定活菌数为 $9 \times 10^{11} \text{ L}^{-1}$ 。将2种细菌的菌液分别肌注、口服、浸泡接种于健康牛蛙。将感染蛙置于 $(26 \pm 2)^\circ\text{C}$ 水族箱中,每日正常投喂饵料,观察记录发病死亡情况。

1.4 病原菌的形态、生理特性测定

按参考文献[5]和《伯杰氏系统细菌学》进行。

2 结果

2.1 病原菌分离鉴定

从病蛙心血、肌肉和肝脏分离、纯化到的菌落形态和运动性具有不同特性的两类细菌中,各取一代表性菌株用于试验,菌株代号为A-I和A-II。A-I为革兰氏阴性短杆菌 $(0.5 \sim 0.8) \times (0.8 \sim 1.77) \mu\text{m}$,多单个存在,无鞭毛,不运动,无荚膜和芽孢,平板培养24 h菌落为圆形,边缘整齐,表面光滑,乳白色,半透明,直径为 $0.9 \sim 1.6 \mu\text{m}$ 。A-II菌株亦为革兰氏阴性短杆菌,极生鞭毛,无荚膜和芽孢,平板培养24 h,菌落圆形,浅黄色,直径 $2 \sim 3 \mu\text{m}$ 。根据菌株A-I和A-II的生物学特性,分别被鉴定为不动杆菌和嗜水气单胞菌,见表1。

2.2 致病性试验

肌注、口服和浸泡3种途径接种2种病原菌的牛蛙均发生红腿病症状并死亡,其中以肌注感染发病死亡最快,创伤浸泡次之,口服感染最弱。结果见表2~4。

收稿日期:1999-02-01

基金项目:江西省科委重点资助项目(950133)

作者简介:胡成钰(1964-),男,江西南昌人,南昌大学生物系副教授,硕士,从事细胞生物学研究。

①肖克宇,资道荣,等.牛蛙红腿病病原菌的致病力及生物学特性的研究[J].鱼类病害研究,1992,14(3):26-37.

②肖克宇,资道荣,等.牛蛙红腿病的流行病学及防治对策的初探[J].鱼类病害研究,1994,16(1):6-8.

表 1 A-I、A-II 菌株和不动杆菌、嗜水气单胞菌生理生化特性的比较

Table 1 Characteristic Comparison of A-I with *A. culeouaceticus* and A-II with *A. hydrophila*

项目 Item	A-I	不动杆菌(对照) <i>A. culeouaceticus</i>	A-II	嗜水气单胞菌(对照) <i>A. hydrophila</i>
运动性 Moving	-	-	+	+
鞭毛 Flagellum	-	-	单鞭毛	单鞭毛
氧化酶 Oxidase	-	-	+	+
过氧化氢酶 Catalase	+	+	+	+
尿素酶 Urease	-	V	-	-
硝酸盐还原 Nitrate reducing	-	-	+	+
明胶液化 Gelatin liquefing	-	-	+	+
M.R	-	-	+	+
V.P	-	-	+	+
H ₂ S	-	-	+	+
柠檬酸盐(西蒙氏) Citricite	-	-	-	-
吲哚 Indole	-	-	+	+
L-精氨酸利用 L-arginine	+	-	+	+
L-组氨酸利用 L-histidine	-	-	+	+
精氨酸脱羧酶 Arginine decarboxylase	-	-	+	+
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-	-	+	+
苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deacylase	-	-	-	-
葡萄糖氧化发酵(O/F) Glucose oxideferment	O	O	F	F
阿拉伯糖 Arabinan	-	-	+	+
蔗糖 Sucrose	-	-	+	+
甘露糖 Mannitol	-	-	+	+
麦芽糖 Maltose	-	-	+	+
七叶苷 Aesculin	-	-	+	+
水杨苷 Salicin	-	-	+	+
乳糖 Milk suger	-	-	-	-
纤维二糖 Cellobiose	-	-	-	-
鼠李糖 Rhamnose	-	-	-	-
山梨糖 Sorbitol	-	-	-	-
肌醇 Myoinositol	-	-	-	-

注:对照用菌购自中科院水生生物研究所。Control bacteria was brought from Institute of Hydrobiology.

表 2 A-I、A-II 菌株肌注感染

Table 2 Injecting effect of A-I and A-II

菌株 Strain	接种菌数/L ⁻¹ Bacteria nos.	蛙体重/g Body weight	接种后死亡数/(只·d ⁻¹) Death nos. after injection					死亡数/试验数 Death/Test
			1	2	3	4	5	
A-I	2 × 10 ¹¹	50~55	0	2	3	1	0	6/6
	1 × 10 ¹¹	50~55	0	0	2	2	2	6/6
A-II	2 × 10 ¹¹	50~55	0	1	2	3	0	6/6
	0.5 × 10 ¹¹	50~55	0	1	1	4	0	6/6
对照 Control	0	50~55	0	0	0	0	0	0/6

注:对照组注射无菌生理盐水。Frogs in control injected with physiological saline.

表 3 A-I、A-II 菌株口服感染

Table 3 Effect of A-I and A-II by oral

菌株 Strain	接种菌数/L ⁻¹ Bacteria nos.	蛙体重/g Body weight	接种后死亡数/(只·d ⁻¹) Death nos. after injection								死亡数/试验数 Death/Test
			1	2	3	4	5	6	7	8	
A-I	1 × 10 ¹²	40~45	0	0	0	1	3	1	1	0	6/6
A-II	1 × 10 ¹²	40~45	0	0	0	1	1	3	1	0	6/6
对照 Control	0	40~45	0	0	0	0	0	0	0	0	0/6

注:对照组口服无菌生理盐水。Frogs in control taking physiological saline.

表 4 A-I、A-II 菌株的浸浴感染

Table 4 Soaking effect of A-I and A-II

菌株 Strain	菌液浓度/L ⁻¹ Soaking consistency	菌浴时间/h Soaking time	蛙体重/g Body weight	接种后死亡数/(只·d ⁻¹) Dead nos. after injection								死亡数/试验数 Death/Test
				1	2	3	4	5	6	7	8	
A-I	创伤 Trauma 1×10^{11}	12	40~50	0	0	0	1	1	2	1	0	5/5
	不创伤 No-trauma 1×10^{11}	12	40~50	0	0	0	0	0	1	0	0	1/5
A-II	创伤 Trauma 1×10^{11}	12	40~50	0	0	0	1	1	1	2	0	5/5
	不创伤 No-trauma 1×10^{11}	12	40~50	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
对照 Control	0	12	40~50	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

注:对照组为不创伤清水浸浴。Frogs in control is soaking in water without trauma.

2.3 药物敏感试验

结果见表 5。

表 5 A-I、A-II 菌株对抗菌药物的敏感性

Table 5 Sensitivity of antibacteria to A-I and A-II

抗菌素 Antibiotic	$\mu\text{g/ml}$	A-I	A-II
卡那霉素 Kanamycin	30	+++	+++
庆大霉素 Gentamycin	500	+++	+
链霉素 Streptomycin	10	+	++
氯霉素 Chloramphenicol	30	++	+++
土霉素 Terramycin	500	+++	++
四环素 Tetracycline	30	++	-
红霉素 Erythromycin	15	+++	-
诺氟沙星 Norfloxacinum	10	+++	+++
新霉素 Neomycin	30	++	++
青霉素 Penicillin	10	-	-
痢特灵 Furazone	50	+	++
磺胺嘧啶 Sulfonamide	50	-	-
磺胺甲基噁唑 Selectrin	300	-	-
呋喃新 Furacilinum	300	+	+++
妥布霉素 Tobramycin	10	++	+

注:“+++”为高敏 High Sensibility.“++”为中敏 Sensibility.
“+”为低敏 Low sensibility.“-”为耐药 Drug resistance.

3 讨论

(1)实验证实,分离菌株 A-I 为不动杆菌, A-II 菌株为嗜水气单胞菌。这 2 株菌是分离自具有相同红腿病症状的不同个体,人工感染实验均可单独引发牛蛙产生红腿病,虽然两者在毒力上略有差异,但无明显的区别,按郭霍氏关于病原菌的定律,它们两者都是牛蛙红腿病的病原体。

(2)人工感染证明,在一定条件下,引起牛蛙红腿病的不动杆菌和嗜水气单胞菌能通过肌注、口服、创伤体表等 3 种途径进入牛蛙体内,并使蛙发生典型的红腿病而死亡。在自

然养殖条件下,有时水体环境的活菌数会达到较高的水平。据实地观察,在管理不善的牛蛙养殖场,由于死蛙不能及时捞出,蛙池换水条件差,用死蛙作饵料等,使得水体中细菌数达到较高的水平,加之不分级饲养,蛙池粗糙,蛙体经常被创伤,都为病原体进入蛙体创造了条件。实验证明不动杆菌和嗜水气单胞菌都为条件致病菌,只有在蛙体受到创伤以后,牛蛙才会感染红腿病并引发死亡,而无创伤牛蛙浸泡一般不会发生死亡。不动杆菌是条件致病菌已有论述,而嗜水气单胞菌的致病范围十分广泛和复杂,它会引起软体动物、蛙类、鱼类、其它两栖类、爬行类、鸟类甚至哺乳动物等发生疾病^[6,7],故有些学者称其是“致病性嗜水气单胞菌”^[7]。

(3)药敏试验表明,对 2 种病原菌共同敏感的抗生素主要有卡那霉素、氯霉素、土霉素、诺氟沙星、新霉素。因此,可用这些抗生素防治牛蛙的红腿病。

参考文献:

- [1] Emerson H, Norris C. Red-leg, an infectious disease of frogs[J]. J Erupt Med, 1905, 7:32-58.
- [2] Glorioso R C, et al. Laboratory identification of bacterial pathogens of aquatic animals[J]. Am J vet Res, 1974, 35(3):447-450.
- [3] Glorioso R C, et al. Microbiological studies on septicemic bullfrogs[J]. Am J vet Res, 1974, 35(9):1241-1245.
- [4] Miles E L. Red-leg in tree frogs caused by bacterium alkaligenes[J]. J Gen Microbiol, 1950, 4:434-436.
- [5] 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. 53-194.
- [6] 汤伏生, 曾勇, 等. 鱼类细菌群落中的致病嗜水气单胞菌[J]. 水产学报, 1995, 19(4):369-373.
- [7] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致病鱼综述[J]. 水产学报, 1992, 16(2):282-288.