

虾夷马粪海胆黑嘴病的初步研究*

李太武¹ 徐善良¹ 王仁波² 许淑芬² 苏秀榕¹

(¹ 宁波大学 315000)

(² 大连太平洋海珍品有限公司 116041)

提要 对虾夷马粪海胆“黑嘴病”进行了初步的研究。经分离、纯化后鉴定黑嘴病的病原菌为坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus* Bredemann et Warner)。同时报道了该菌为革兰氏阳性杆菌,大小为(0.6~0.7) μm×(0.8~1.0) μm。可在1%~7% NaCl 中生长,最适盐度2~3;最适 pH 为7~8;生长温度为8~26℃,最适生长温度为15℃。该菌对磺胺甲基异恶唑、复方新诺明和头孢噻肟等抗生素敏感,可用之治疗。

关键词 虾夷马粪海胆,黑嘴病,坚强芽孢杆菌,抗生素

虾夷马粪海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)属于棘皮动物门,海胆纲动物。原分布于日本北海道等海域,最适水温15~16℃。体形类似于马粪海胆,但个体较大,棘刺棕黄色,较长。雌雄异体,其雌性生殖腺特别发达,是生产海胆酱的最好原材料,也是目前出口创汇的海珍品之一。1990年由大连水产学院引进黄海海域。目前已开始大面积养殖,其产品远销世界各地。近几年来由于海洋污染比较严重,而且海胆对栖息环境的变化不适应等因素使其抗病力下降,自1997年开始出现“黑嘴病”。所谓“黑嘴病”是病海胆围口膜变黑,病情恶化时不能摄食、附着,而且棘刺逐渐脱落后死亡。该病初期无任何异常,但仔细观察可发现海胆摄食能力逐渐减弱。其死亡率很高,经济损失十分严重。为了有效防止该病的继续传播,本文对其病原等方面进行了较系统的研究,并提出可采用抗生素进行治疗。

1 材料与方 法

1.1 实验海胆、药片和试剂

正常和病海胆取自大连太平洋海珍品有限公司,药敏纸片购于北京医药研究所,实验所用化学试剂购于大连市化学试剂公司,均为分析纯。

1.2 病原菌的分离及回复实验

将患病的海胆用70%酒精和无菌水各冲洗3次,无菌解剖取出生殖腺、肝胰腺、口器、血淋巴等器

官用无菌水冲洗3次,玻璃匀浆器研磨,10倍液体稀释法接种于牛肉膏琼脂培养基中,在17℃培养2~4d后观察记录菌落形态。挑取单菌落经纯化后接牛肉汤液体培养至对数期,一部分加15%甘油后,-70℃保存备用^[1,2];另一部分以5000 r/min,离心5 min后,沉淀用无菌海水稀释成浓度为 2×10^7 个/ml的菌液。将上述菌液加入养殖的虾夷马粪海胆水槽中,使其浓度为 2×10^6 个/ml。以加入同等量的无菌水为对照组,每天观察并记录发病和死亡情况。

1.3 病原菌的生物学特性研究

各项生理生化性质测定均按照Sneath 1986年的《一般细菌常用鉴定方法》和Gordon 1983年的《芽孢杆菌属》^[3]相关内容施行。盐度、温度和pH值对该病原菌生长的影响,均采用1%的蛋白胨水培养;温度和pH值对其病原菌生长的影响需在培养基中加2% NaCl。

1.4 病原菌对抗菌药物的敏感实验

用MH(Mueller Hinton)培养基,纸片扩散法按Kirby-Bauer法要求制备菌液,判断结果^[3,4]。标准菌株为大肠埃希氏菌 ATCC25922。

* 农业部重点资助项目 95A960402 号。

收稿日期:1999-04-28;修回日期:1999-05-25

表 1 坚强芽孢杆菌的药物敏感实验^①Tab.1 The drug sensitivity test of *Bacillus firmus*

药物	纸片含药量 (μg)	抑菌环直径 (mm)	敏感度
磺胺甲基异恶唑(Sulfamethoxazole)	300	31	S
复方新诺明(Cotrimoxazole)	25	28	S
头孢噻肟(Cefotaxime)	30	26	S
头孢三嗪(Ceftriaxone)	30	23	S
壮观霉素(Spectinomycin)	100	23	S
头孢噻甲羧肟(Ceftazidime)	30	19	S
阿奇霉素(Azithromycin)	15	19	S
呋喃妥因(Nitrofurantoin)	300	18	S
乙基西梭霉素(Netilmicin)	30	17	S
头孢呋新(Cefuroxime)	30	19	MS
环丙沙星(Ciprofloxacin)	5	13	MS
诺氟沙星(Norfloxacin)	10	13	MS
妥布霉素(Tobramycin)	10	13	MS
罗美沙星(Lomefloxacin)	10	13	MS
氧氟沙星(Ofloxacin)	5	13	MS
甲氟哌酸(Pefloxacin)	10	15	R
新霉素(Neomycin)	30	14	R
丁胺卡那霉素(Amikacin)	30	14	R
头孢唑啉(Acefazolin)	30	13	R
克拉霉素(Clarithromycin)	15	12	R
头孢哌酮(Cefoperazone)	75	12	R
头孢氨苄(Cefradine)	30	12	R
利福平(Rifalexin)	5	12	R
链霉素(Streptomycin)	10	11	R
庆大霉素(Gentamicin)	10	11	R
头孢噻吩(Cephalothin)	30	10	R
柱晶白霉素(Leucomycin)	15	9	R
头孢拉啶(Cefradine)	30	2	R
吡哌酸(Pipemidic acid)	30	2	R
氯霉素(Chloramphenicol)	30	1	R
新生霉素(Novobiocin)	5	0	R
羧苄青霉素(Carbenicillin)	100	0	R
强力霉素(Doxycycline)	30	0	R
四环素(Tetracycline)	30	0	R
抗菌肽(Bacitracin)	0.04IU	0	R
卡那霉素(Kanamycin)	30	0	R
青霉素(Penicillin)	10IU	0	R
哌拉西林(Piperacillin)	100	0	R
氯洁霉素(Clindamycin)	2	0	R
交沙霉素(Josamycin)	15	0	R
氨卡青霉素(Ampicillin)	10	0	R
麦迪霉素(Midecamycin)	15	0	R
去甲万古霉素(Norvancomycin)	30	0	R
乙酰螺旋霉素(Acetylspiramycin)	15	0	R

^①敏感度为坚强芽孢杆菌对所用药物的反应程度。“S”为作用明显;“MS”为作用不明显;“R”为无作用。

2 结果

2.1 形态特征及致病性

该病原菌为革兰氏阳性杆菌,大小为(0.6~0.7) μm ×(0.8~1.0) μm ,有中生芽孢,胞囊不膨大。在加入浓度为 2×10^6 个/ml 该菌的海水养殖的虾夷马粪海胆,一周内陆续死亡,其症状与原病海胆相同,围口膜变黑,棘刺脱落后不久死亡。

2.2 生化特性

生化特性为:该病原菌为接触酶阳性,氧化酶阴性,胞内无 PHB 颗粒,在 7% NaCl 中生长, pH5.7 不生长,也不产生乙酰甲基甲醇,能将硝酸盐还原成亚硝酸盐,不能在厌氧培养基上生长,能水解淀粉,对葡萄糖和木糖产酸,而对阿拉伯糖和甘露醇不产酸,鉴定为坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)。

2.3 生理学特性

2.3.1 盐度对生长的影响

本文报道的坚强芽孢杆菌是海水株,不同浓度的 NaCl 对其生长有不同的影响,无 NaCl 不生长。其范围为 1%~7%,最适生长盐度范围为 2%~3%。

2.3.2 温度对病原菌生长的影响 生长温度范围 8~26℃,最适温度 15℃。

2.3.3 pH 值对病原菌生长的影响 该菌的 pH 值范围 6~13,最适为 7~8。

2.4 药敏实验结果

经用 44 种抗生素检测了坚强芽孢杆菌的药敏性(表 1),从中筛选出了磺胺甲基异恶唑、复方新诺明、头孢噻肟等敏感和中度敏感药物 15 种。

3 讨论

3.1 少见的病原菌

坚强芽孢杆菌在自然界中的代表似乎是稀少的,少见的文献报道和较少的代表菌株使人们觉得这个菌是一个被忽视的种,它还有一些性质至今未查清。而海水株坚强芽孢杆菌引起养殖动物的疾病以前未见报道。由于其有芽孢存在,加之它的生长温度幅度极大,最高温度为 40~50℃;最低温度为 5~20℃,所以防治皆难。

3.2 感染途径及防治

经初步观察,该菌是由受伤的管足处侵入体内,病状首先出现为围口膜变黑,经组织病理切片观察,围口膜上无明显之病灶。该菌可能破坏了口器中的肌肉组织,使海胆不能摄食,最终导致大批死亡。本课题组研究了该菌对 44 种抗生素的敏感性,其中 9 种药效明显,尤其是磺胺甲基异恶唑、复方新诺明、头孢噻肟等几种药,效果更佳。用药浓度以复方新诺明和头

孢噻肟较经济 ($25 \times 10^{-6} \sim 30 \times 10^{-6}$),而磺胺甲基异恶唑需 300×10^{-6} 左右才生效。从结果分析可见,芽孢杆菌与弧菌不同,它对环丙沙星、罗美沙星等新药有抗药性,而土霉素、青霉素、氯霉素等老牌抗生素对它也毫无作用。用抗生素防治只是权益之计,要彻底治疗该病需要研究更有效的方法,其抗药机制也有必要进一步的探讨。

参考文献

- 1 李太武、丁明进、宋协民等。海洋与湖沼,1996,27(6): 637~645
- 2 李太武、张健、丁明进等。南海研究与开发,1997,4: 21~27
- 3 李影林、查国章、陈拯等。临床微生物学及检验。北京:人民卫生出版社,1995。75~93
- 4 张颖悟、蓝鸿泰、郑家齐等。临床生物学(下)。大连:大连出版社,1990。640~662
- 5 Gordon, R. E. (蔡妙英等译)。The Genus Bacillus (芽孢杆菌属)。北京:农业出版社,1983。49~51,174~175

PRELIMINARY STUDIES ON THE BLACK MOUTH DISEASE OF SEA URCHIN, *Strongylocentrotus intermedius* (*Strongylocentrotidae* Echinoidea)

LI Tai-wu¹ XU Shan-liang¹ WANG Ren-bo² XU Shu-fen² SU Xiu-rong¹

(¹ Ningbo University, Ningbo 315000)

(² Dalian Pacific Seafood Company, Dalian 116041)

Received: Apr. 28, 1999

Key Words: *Strongylocentrotus intermedius*, Black mouth disease, *Bacillus firmus*, Antibiotics

Abstract

This paper reported the study of black mouth disease of *Strongylocentrotus intermedius*. The pathogen were isolated and purified from disease Sea Urchin of Dalian Pacific Seafood Company. They were gram positive rod bacteria, size (0.6-0.7) $\mu\text{m} \times$ (0.8-1.0) μm . There are gemma but no inflated sporosa in the cell. Catalase was positive and oxidase negative. There are no PHB granules in their cells. They grew in 1%~7% NaCl and pH 6-13 at temperature 8-26℃ but not grow in pH 5.7. They do not produce acetyl-methyl-carbind. They reduced nitrate to nitrite, fermented amyllum, glucose, xylose, arabinose and mannite, but glucose and xylose produced acid. They cannot grow in anaerobic medium. This bacteria was identified as *Bacillus firmus* Brede mann et Warner. The sensitivity of this bacteria to 44 kinds of antibiotics was also studied. They were sensitive to Sulfa methoxazole (the diameter of ring for bacteria inhibition (DRBI) was 31.0

mm) , Cotrimoxazol (DRBI was 28.0 mm) , cefotaxime(DRBI was 26.0 mm) , Ceftriaxone (DRBI was 23.0 mm) , Spectinomycin (DRBI was 23.0 mm) , Ceftazidime (DRBI was 19.0 mm) ; and resistant to Chloramphenicol , Gentamicin , Ampicillin , Streptomycin , Neomycin , Midecamycin , Cefradine , Cefalexin , Amikacin , Norvancomycin , etc . The results suggested that some kinds of antibiotics can be used to control this disease .



(本文编辑 : 李本川)