

美国红鱼“腐皮病”病原的初步研究*

纪荣兴¹ 胡石柳² 邹文政¹ 张坤宁¹

(¹集美大学水产学院 厦门 361021)

(²集美水产学校 厦门 361012)

提要 从有典型“腐皮病”症状的美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*)中分离到一株优势菌。人工感染菌液浓度为 10^8 CFU/mL时,可致健康美国红鱼出现与自然发病相似的症状,且100%死亡,确认该分离菌为美国红鱼“腐皮病”的致病菌。该菌的主要生理生化特征为革兰氏染色阴性,0/129(150 μg)敏感,TCBS上生长呈黄色,氧化酶阳性,伏-普二试验阴性,葡萄糖产酸不产气,蔗糖发酵阳性,甘露糖发酵阳性,阿拉伯糖发酵阳性,肌醇阴性,赖氨酸阴性,精氨酸阳性,鸟氨酸阴性,硝酸盐还原阳性,七叶灵水解阴性,ONPG阳性,有动力,在盐度0~60生长,80和100不生长,30~40℃生长,4℃、45℃不生长,鉴定该菌为河流弧菌(*Vibrio fluvialis*)。药敏试验表明,该菌对多粘菌素B、四环素、痢特灵敏感;对卡那霉素、链霉素、复方新诺明、呋喃妥因、庆大霉素、菌必治不敏感;对氟霉素、青霉素、氨苄青霉素、氟哌酸、环丙沙星、利福平中度敏感。

关键词 美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*),河流弧菌,生理生化特性,药敏试验

中图分类号 S941 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)07-0001-04

美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*)又名眼斑拟石首鱼、红拟石首鱼、红鼓鱼、黑斑红鲈、斑点尾鲈等。属鲈鱼目、石首鱼科、拟石首鱼属。原产于墨西哥中部至美国马萨诸塞州的大西洋沿岸水域,是美国的重要经济及游钓鱼类。我国于1991年引进,1995年开始生产性育苗和养殖,先后在浙江、福建等省沿海城市进行网箱养殖和池塘养殖获得成功。因其生长速度快,对环境适应性强,易于养殖且肉质鲜美,深受养殖业者欢迎。

2001年5月~10月,厦门海域网箱养殖美国红鱼发生一种疾病,死亡率在20%~30%左右,主要症状为:病鱼体色稍变黑,鱼体瘦弱,离群在水上层或表面独游,游动缓慢,对外界刺激不敏感,鱼体两侧,特别是靠近尾部有出血点,皮肤腐烂,严重的形成溃疡,背鳍、胸鳍、尾鳍的鳍条基部充血,有的鳍条腐烂,解剖内脏发现肝脏褪色,肠壁充血。当地渔民称之为“腐皮病”。为了防治该病、减少损失,作者对疾病的发病原因进行了研究。从有明显症状的病鱼上分离细菌,对健康的美国红鱼进行感染;对分离菌进行了生理生化特性研究;用快速鉴定结合常规方法对该菌进行鉴定;用多种常用药物对该分离菌进行了药敏试验。本文报告研究结果。

1 材料与方 法

1.1 试验鱼

病鱼取自厦门西海域网箱养殖的有明显腐皮病症状的病鱼;健康鱼体质量95~170 g,体长19~27 cm,购自未发病海区。

1.2 病原菌的分离

用常规无菌操作方法,从有明显症状的美国红鱼体表及肝脏取样划线于普通海水培养基平板上,置28℃培养箱中培养24 h,然后从平板上挑取优势单菌落,保存在普通海水培养基及TCBS培养基斜面上,或10%甘油无菌生理盐水中-80℃冰箱保存,备用。

* 福建省科技项目2000Z080和厦门市科委项目3502Z2000102号。

第一作者:纪荣兴,出生于1953年,副教授,目前在研课题:福建省自然科学基金项目“鲷鱼细菌病免疫预防的研究”;福建省科技项目“海水养殖鱼类弧菌病快速检测及防治的研究”。E-mail:rxji@jmu.edu.cn

收稿日期:2002-09-09;修回日期:2003-01-19

1.3 人工感染试验

感染方式为肌肉注射感染。实验分3个组同时进行,分别为菌液浓度 10^8 CFU/mL组, 10^7 CFU/mL组和无菌生理盐水组。先将保存于斜面中的细菌接种于平板,28℃培养24h后用无菌生理盐水洗下,制成菌悬液,用分光光度计560nm计数,配成 10^8 CFU/mL, 10^7 CFU/mL两个浓度,每尾注射0.2mL菌液,对照组注射等量无菌生理盐水。感染后每天投喂颗粒饲料,日换水量1/3,每天下午吸污。每天观察、记录鱼的活动情况,连续观察14d。试验时水温在24~31℃。

按上述方法从人工感染发病鱼体上再分离、再感染。

1.4 病原菌鉴定

用浙江省军区后勤部卫生防疫检验所生产的弧菌科细菌生化微量鉴定管和中国腹泻病控制上海试剂供应研究中心的SWF-微量生化鉴定板进行鉴定。同时参考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》^[1]和周德庆主编《微生物实验手册》^[2]中的实验方法观察菌落的培养和形态特征,做氧化酶试验,七叶灵水解试验,革兰氏染色试验,鞭毛染色试验,0/129(150μg)敏感试验,不同盐度下、不同温度下的生长测试;按照《伯杰氏细菌鉴定手册》^[3]和Bergey's Manual of Systematic Bacteriology^[4]鉴定。

1.5 药敏试验

药敏试验采用纸片法,选用了生产上常用的15种药物进行试验。按试验操作要求先将细菌进行培养,用无菌生理盐水洗下后吸取0.2mL菌液于海水培养基平板上均匀涂布,贴上药敏试纸,于28℃生化培养箱中培养16h,然后观察有无抑菌圈产生,并记录抑菌圈直径。再根据抑菌圈直径比照判断标准得出药敏试验结果。药敏试纸购自浙江省军区后勤部卫生防疫检验所。

2 结果

2.1 病原菌的分离

从美国红鱼病鱼上共分离到6株菌,分别标记为MH-1、MH-2、MH-3、MH-4、MH-5、MH-6,其中MH-2、MH-3、MH-4、MH-5的菌落形态,色泽,大小均相似,光学显微镜下菌体的形态,大小也相似,革兰氏染色均为阴性,取MH-3作为试验用菌,其余保存备用。

2.2 人工感染试验

用MH-3菌株对健康美国红鱼进行注射感染,当

注射菌液浓度为 10^7 CFU/mL时死亡率为20%~75%,注射菌液浓度为 10^8 CFU/mL时,死亡率为100%。结果见表1。

表1 分离菌MH-3感染试验结果

Tab.1 Result of challenge tests of isolated strain MH-3

菌名	菌液浓度 (CFU/mL)	注射剂 量(mL)	注射鱼 数(尾)	死亡鱼 数(尾)	死亡率 (%)
MH-3	10^7	0.2	10	2	20
MH-3	10^8	0.2	10	10	100
MH-3	10^7	0.2	8	6	75
MH-3	10^8	0.2	10	10	100
对照	生理盐水	0.2	10	0	0

人工感染后发病鱼的主要症状为:体色变黑,离群独游,游动缓慢,对外界刺激不敏感,鱼体两侧有出血点,皮肤腐烂,背鳍、胸鳍、尾鳍的鳍条基部充血,肝脏褪色,肠壁充血。与自然发病的症状基本相同。重复感染试验结果相似。据此可确认该分离菌MH-3为致病菌。

2.3 分离菌的鉴定结果

分离菌的菌落大而扁平,近圆形,湿润,黄色,边缘有缺刻;其主要生理生化特征为:革兰氏染色阴性,氧化酶阳性,伏-普二试验阴性,葡萄糖产酸不产气,TCBS上生长黄色,蔗糖发酵阳性,甘露糖发酵阳性,阿拉伯糖发酵阳性,肌醇阴性,赖氨酸阴性,精氨酸阳性,鸟氨酸阴性,硝酸盐还原阳性,七叶灵水解阴性,ONPG阳性,0/129(150μg)敏感,有动力,在盐度0~60生长,80和100不长,30℃、40℃生长,4℃、45℃不生长。结果见表2。

根据试验结果对照弧菌科细菌生化鉴定编码册及《伯杰氏细菌鉴定手册》,鉴定该菌为河流弧菌(*Vibrio fluvialis*)。

2.4 药敏试验结果

分离菌对15种抗菌药物的敏感性如表3。

结果显示多粘菌素B、四环素、痢特灵对分离菌MH-3有显著的抑制作用,而其它药物对该菌无抑制作用或作用不明显。

3 讨论

弧菌病是海水鱼类的常见病^[5-7],近年来随着美国红鱼的大量养殖,有关美国红鱼的养殖技术研究,病害防治研究和营养需求研究有不少报道^[8],但有关

表 2 分离菌 MH-3 的生理生化特征

Tab.2 The physiological and biochemical characteristics of isolated strain of MH-3

项目	MH-3	河流弧菌	项目	MH-3	河流弧菌	项目	MH-3	河流弧菌
氧化酶	+	+	精氨酸	+	+	动力	+	+
葡萄糖	+	+	鸟氨酸	-	-	革兰氏染色	-	-
V-P	-	-	盐度 0	+	+	0/129(150 μg)	S	S
M.R	+	+	盐度 30	+	+	TCBS	Y	Y
蔗糖	+	+	盐度 60	+	+	生长 4 °C	-	-
甘露糖	+	+	盐度 80	-	-	生长 30 °C	+	+
阿拉伯糖	+	+	盐度 100	-	-	生长 40 °C	+	+
肌醇	-	-	硝酸盐还原	+	+	生长 45 °C	-	-
赖氨酸	-	-	七叶灵水解	-	-			
鞭毛染色	+	+	ONPG	+	+			

“+”:阳性;“-”:阴性;“S”:敏感;“Y”:黄色;河流弧菌查自文献[3]。

表 3 药敏试验结果

Tab.3 Results of drug sensitivity tests

试验药物	判断标准			试验结果		试验药物	判断标准			试验结果	
	耐药	中介	敏感	抑菌环 (mm)	敏感 度		耐药	中介	敏感	抑菌环 (mm)	敏感 度
多粘菌素 B	≤8	9~11	≥12	20	敏感	利福平	≤16	17~19	≥20	17	中度
四环素	≤14	15~18	≥19	22	敏感	红霉素	≤15	16~20	≥21	18	中度
痢特灵	≤14	15~16	≥17	19	敏感	呋喃妥因	≤14	15~16	≥17	0	耐药
氯霉素	≤12	13~17	≥18	12	耐药	卡那霉素	≤13	14~17	≥18	0	耐药
青霉素	≤28		≥29	16	耐药	链霉素	≤11	12~14	≥15	0	耐药
氨基青霉素	≤28		≥29	10	耐药	庆大霉素	≤12	13~14	≥15	7	耐药
氟哌酸	≤12	13~16	≥17	13	中度	复方新诺明	≤10	11~15	≥16	0	耐药
环丙沙星	≤15	16~20	≥21	20	中度						

病害研究的报道中, 尚未见到对弧菌引起疾病的研究, 本分离菌用人工感染可使健康美国红鱼发病死亡, 且疾病症状与海区网箱养殖美国红鱼自然发生的腐皮病的症状相似, 可以证实该菌为美国红鱼腐皮病的病原菌。

病原菌的鉴定主要采用弧菌科细菌生化微量鉴定管、发酵性革兰氏阴性杆菌分类鉴定板进行。该方法简便、快速, 适用于基层生产单位, 但将病原菌较准确地鉴定到种尚需做一些补充实验, 我们在做了微量鉴定的基础上, 根据文献 [3] 又做了一些在分类鉴定上具有重要意义的补充实验。例如: 做了氧化酶试验, 七叶灵水解试验, 革兰氏染色试验, 鞭毛染色试验, 糖发酵试验, M.R 试验, TCBS 生长试验, 0/129(150 μg) 敏感试验及不同盐度下的生长测试和不同温度下的生长测试, 并观察菌落的形态特征, 增强了鉴定结果的准确性。根据实验结果鉴定该分离菌为河流弧菌

(*Vibrio fluvialis*)。

对病原菌进行了 15 种药物的敏感性检测, 结果表明, 仅少数几种药物对该菌有明显的抑制作用, 如: 多粘菌素 B、四环素、痢特灵。而其它的大部分药物对其不敏感或作用不明显, 这可能是生产上经常使用这些药物, 使细菌产生了耐药性。因此, 在防治该病时, 药物选择必须慎重, 切忌滥用抗生素。无根据地乱用药物只会加速该菌的耐药性, 破坏养殖环境微生物的平衡乃至破坏整个养殖环境。

从人工感染试验结果看出, 10⁸CFU/mL 浓度注射的美国红鱼死亡率是 100%, 而 10⁷CFU/mL 浓度注射的死亡率只有 20%~75%, 因此, 控制该菌在养殖水中的数量对防治腐皮病是有一定意义的。

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. 北京: 科学出版社, 1978. 98-193
- 2 周德庆主编. 微生物实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1983. 14-162
- 3 R E 布坎南, N E 吉本斯等编. 伯杰细菌鉴定手册(第八版). 北京: 科学出版社, 1984. 382-533
- 4 Krieg N R, Holt J G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 9th ed. Vol. I. Baltimore: The Williams and Wilkins Company, 1984. 516-548
- 5 Kusuda R, Salati F. Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan. Ann Rev Fish Dish, 1993(4): 69-85
- 6 常建波, 宫向红, 孙逢贤, 等. 养殖牙鲆弧菌病原菌初步研究. 海洋水产研究, 2001, 22(1): 37-41
- 7 吴后波, 潘金培. 海水网箱养殖高体鲷弧菌致病病原研究. 水产学报, 1997, 21(2): 171-174
- 8 侯俊利, 刘存歧. 美国红鱼对环境因子及营养的需求. 水产科技情报, 2000, 27(4): 175-178

PRELIMINARY STUDIES ON A PATHOGEN OF DERMATOSIS OF *Sciaenops ocellatus*

JI Rong-Xing¹ HU Shi-Liu² ZOU Wen-Zheng¹ ZHANG Kun-Ning¹

(¹Fisheries College of Jimei University, Xiamen, 361021)

(²Fisheries School of Jimei, Xiamen, 361012)

Received: Sep., 9, 2002

Key Words: *Sciaenops ocellatus*, *Vibrio fluvialis*, Physiological and biochemical characteristics, Drug sensitive test

Abstract

A strain of dominance bacterium was isolated from the affected *Sciaenops ocellatus*. Artificial infection test by injecting intramuscularly with a concentration 10^8 CFU/mL to health fish showed that the subjected fishes appeared similar symptoms as the naturally affected fishes did and dead 100%. It was proved that the isolated bacterium is a pathogen for *Sciaenops ocellatus*. The physiological and biochemical characteristics showed that the isolated organism was gram negative, motile; Voges-Prokauer test, INOS, lysine, ornithine, aesculin were negative; oxidase, arginine, nitrate reduction and ONPG were positive; acid was produced but gas was not from glucose and several other sugars; sensitive to 0/129 (150 μ g), grew on TCBS and showed yellow, grew on 0~60 Salinity but did not grow on 80 and 100, grew on 30~40 $^{\circ}$ C but did not grow on 4 $^{\circ}$ C and 45 $^{\circ}$ C. The isolated bacterium is identified as *Vibrio fluvialis*. The drug sensitive test showed that the isolated strain was sensitive to PolymyxinB, Tetracycline and Furazolidone, medium sensitive to Chloramphenicol, Penicillin, Ampicillin, Norfloxacin, Ciprofloxacin, Rifampin, and resistant to Kanamycin, Streptomycin, Trimethoprim/Sulfamethoxazole, Nitrofurantoin, Gentamicin, Ceftriaxone.

(本文编辑: 刘珊珊)