

# 大黄鱼假单胞菌病的初步研究

刘家富, 余祚溅, 林永添, 陈洪清, 谢文秋

(宁德市水产技术推广站试验场, 福建 宁德 352100)

**摘要:** 从网箱养殖的患病大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 的脾、肾内分离到 2 株优势菌 BP-1, BS-2 经人工感染试验, 证实所分离的 2 株菌均为大黄鱼的致病菌。经形态、生理、生化等几项指标鉴定, 该 2 株菌均为假单胞菌属 *Pseudomonas* 的细菌。药物敏感试验结果表明, 氟哌酸、庆大霉素、乙基西梭霉素、妥布霉素、丁胺卡那霉素、氟喹酸、环丙沙星、四环素、多粘菌素等 17 种药物对该 2 株菌均有明显的抑制作用。

**关键词:** 大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 病原菌, 假单胞菌 (*Pseudomonas*)

中图分类号: 4649 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2004)02-0005-03

随着大黄鱼养殖业的迅速发展, 病害的发生日益频繁, 各种新的致病菌不断地被发现。目前已有许多学者对引起大黄鱼腐败假单胞菌、哈维氏弧菌<sup>[1]</sup>、副溶血弧菌<sup>[2]</sup>、溶藻弧菌<sup>[3,4]</sup>等细菌性疾病先后进行了报道。2002 年 3~4 月, 福建省宁德市三都湾内的青山、渔坛等海域网箱养殖的大黄鱼发生了内脏白点病, 主要危害 20~200 g 的鱼种。病鱼体表无明显的症状, 仅下颌及鳃盖充血发红, 解剖观察, 脾脏、肾脏有大量白点, 直径 1~2 mm, 肠道有炎症。此病目前发病率不高, 但大黄鱼一旦感染此病, 在自然状态下死亡率可达 70%~80%。作者对引起大黄鱼内脏白点病的病原菌进行研究, 以期为大黄鱼疾病的诊断和防治提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 病鱼来源

2002 年 3~4 月取自福建省宁德市三都镇青山海域网箱养殖的大黄鱼。

### 1.2 病原菌的分离

无菌操作, 取症状典型病鱼的脾、肾在牛肉膏蛋白胨培养基上划线分离, 置 28℃ 生化培养箱中恒温培养 24 h, 挑取形态一致的优势菌落, 进一步划线纯化, 经纯化培养后保存在斜面培养基上, 供进一步试验备用。

### 1.3 人工感染试验

感染用大黄鱼为宁德市水产技术推广站试验场网箱养殖的健康鱼种, 体质量为 100~200 g。将试验

鱼在 2 m<sup>3</sup> 的实验池内暂养稳定后, 进行感染试验。分离菌株在 28℃ 恒温培养 24 h, 用 0.85% 无菌生理盐水洗下菌苔, 稀释成所需浓度的菌悬液 (采用活菌平板计数法计菌悬液浓度), 进行腹腔注射感染, 每尾注射 0.5 mL; 对照组 1 注射等量的无菌生理盐水, 对照组 2 不注射。每 7 尾一组, 每日记录死亡情况, 发现死鱼立即收集。试验期间水温为 20.2℃, 质量密度为 1.020, 不投饵, 连续充气, 日换水量 50%。

### 1.4 菌株再分离

用同上细菌分离方法, 对人工感染出现症状的病鱼进行菌株再分离。

### 1.5 病原菌的分类鉴定

病原菌理化特性的测定和鉴定按一般细菌常用鉴定方法<sup>[5]</sup>和伯杰细菌鉴定手册<sup>[6]</sup>的方法进行。并应用法国梅里埃公司 VITEK32 全自动微生物分析系统 (NFC 测试卡) 进行综合分析鉴定。

### 1.6 药物敏感试验

用纸片法在牛肉膏蛋白胨培养基上测定待测菌

收稿日期: 2002-09-19, 修回日期: 2003-03-18

基金项目: 福建省科学技术委员会和水产厅联合下达的“大黄鱼养殖产业化——病害防治技术研究”项目

作者简介: 刘家富 (1940-), 男, 福建连江人, 高级工程师, 长期从事大黄鱼等海水鱼类增养殖技术研究, 电话: 0593-2828155, E-mail: nd2828155@163.net

株对药物的敏感性。每皿 5 片, 28 °C 培养 24 h 观测有无抑菌圈及其直径大小。供试验的 34 种药敏纸片购自上海市疾病预防控制中心。

## 2 结果

### 2.1 病原菌的分离及人工感染试验

表 1 人工感染试验结果

Tab.1 Results of artificial infection experiment

菌株号	菌液浓度 (个/mL)	试验鱼数 (尾)	注射剂量 (mL)	死亡数(尾)				死亡尾数/ 试验尾数	发病尾数/ 试验尾数
				1 d	2 d	3 d	4 d		
BP-1	1.0 × 10 <sup>7</sup>	7	0.5	1	4	1	1	7/7	7/7
	1.0 × 10 <sup>8</sup>	7	0.5	0	4	3	0	7/7	7/7
	1.0 × 10 <sup>9</sup>	7	0.5	2	2	3	0	7/7	7/7
BS-2	1.0 × 10 <sup>7</sup>	7	0.5	0	2	3	2	7/7	7/7
	1.0 × 10 <sup>8</sup>	7	0.5	0	3	4	0	7/7	7/7
	1.0 × 10 <sup>9</sup>	7	0.5	2	2	3	0	7/7	7/7
对照 1	生理盐水	7	0.5	0	0	0	0	0/7	0/7
对照 2	自然海水	7	-	0	0	0	0	0/7	0/7

从人工感染的病鱼的脾、肾等组织内均分离到优势菌, 它们的菌落特征、菌体形态及理化性状与从自然发病鱼体分离的原菌株完全一致。

### 2.3 病原菌的鉴定

经形态、生理生化特征鉴定(表 2), BP-1, BS-

表 2 2 株菌的生理生化特性

Tab.2 The physiological and biochemical characteristics of two strains

测定项目	BP-1	BS-2
G 染色	-	-
氧化酶	+	+
O/F 试验	O	O
双糖铁	- / - H <sub>2</sub> S (-)	- / - H <sub>2</sub> S (-)
动力	+	+
41 °C 生长	-	-
硝酸盐	+	+
精氨酸双水解酶	+	+
木胶糖	+	+
靛基质	-	-
乳糖	-	-
淀粉	-	-
麦芽糖	-	-
尿素酶	-	-
明胶酶	-	-
乙酰胺酶	-	-

注: “+”阳性反应; “-”阴性反应

分别从患病大黄鱼的脾和肾内分离到 2 株优势菌 BP-1 和 BS-2 经人工感染试验证实这 2 株菌对健康的大黄鱼均具有极强的致病作用(表 1), 感染 4 d 后, 发病率和死亡率均为 100%, 且人工感染症状与自然发病症状相同, 即脾和肾内都出现明显的白点。

### 2.2 菌株再分离

2 的特征基本相同, 菌落圆形、灰白、不透明、大小约 1.0 mm, 菌体短杆状, 革兰氏阳性, 有动力, 葡萄糖氧化分解, 氧化酶阳性, BP-1, BS-2 均可确定为假单胞菌属 *Pseudomonas* 的细菌。应用法国梅里埃公司 VITEK32 全自动微生物分析系统(NFC 测试卡)进行综合分析鉴定(表 3)。BP-1 为铜绿假单胞菌 *P. aeruginosa*, 概率为 92%; BS-2 鉴定为门多萨假单胞菌 *P. mendocina*, 概率为 61%。

### 2.4 药物敏感试验

采用纸片法测定 BP-1, BS-2 两株致病菌对 34 种抗菌药物的敏感性(表 4), BP-1, BS-2 的抗菌谱基本相同, 都对其中的四环素、妥布霉素、氟哌酸、乙基西羧霉素、丁胺卡那霉素、氟喹酸、庆大霉素、环丙沙星、多粘菌素等高度敏感。

## 3 讨论

从自然发病的大黄鱼脾和肾内分离到 2 株优势菌 BP-1, BS-2, 经人工感染试验证实这 2 株菌对健康的大黄鱼具有致病作用, 且有较强的毒力。菌株 BP-1、BS-2 经过形态和生理生化特性测定和仪器分析结果, 参照文献[6]所描述的假单胞菌属的属性, 均可鉴定为假单胞菌属 *Pseudomonas* 的细菌。其中 BP-1 经仪器分析鉴定为铜绿假单胞菌 *P. aeruginosa*, 概率为 92%; BS-2 经仪器分析鉴定为门多萨假单胞菌 *P. mendocina*, 概率不高(61%), 仅供

**表3 VITEK32全自动微生物分析系统(NFC测试卡)分析结果**

**Tab.3 Analysis result by VITEK - 32 autocontrol micro-bial analyse system(NFC Test Card)**

分析项目	BP-1	BS-2
AZE	-	-
HIS	-	-
ITA	+	+
BUT	+	+
MTR	-	-
SEB	-	-
ALA	+	+
HEP	+	+
ASP	-	-
MNE	-	-
SUB	-	-
NAG	-	-
CIT	+	+
SUC	-	-
PRP	+	+
ADI	-	-
NAA	+	-
GAL	-	-
TRE	-	-
PRO	+	+
GLC	+	+
INO	-	-
GLU	+	+
XYL	-	-
LAT	+	+
MAN	-	-
MLT	-	-

注：“+”阳性反应；“-”阴性反应。

参考。对种的研究有待进一步进行。

假单胞菌是海水中的正常菌群，为条件致病菌，其致病性主要取决于鱼体的生理状态及水环境的理化条件。假单胞菌病在世界各地的温水性或冷水性的海、淡水鱼中都可能发生。在日本养殖的鲑鱼从稚鱼到成鱼都可发病<sup>[7]</sup>。还可引起欧洲鳗鲡烂鳃病<sup>[8]</sup>、暗纹东方鲀‘脱粘病’<sup>[9]</sup>等。

经药敏试验，2株病原菌对氟哌酸、庆大霉素、乙基西羧霉素、妥布霉素、丁胺卡那霉素等17种药物较敏感，对氯霉素、复方新诺明、痢特灵、磺胺甲甲基异恶唑、氨基青霉素等17种常见药物不敏感。在敏感药物中，目前大部分属禁用药物，因此在养殖过程中切勿滥用。此病应以预防为主，合理布局网箱密度，保持良好的水质，使用健康苗种，实施健康养殖。

参考文献：

[1] 林克冰,周宸,刘家富,等.海水网箱养殖大黄鱼病原菌研究[J].海洋科学,1999(4):58-62.

**表4 分离菌株对抗菌药物的敏感性**

**Tab.4 Sensitivity of the isolated strains to antibiotics**

药物	药量 ( $\mu\text{g}/\text{片}$ )	抑菌圈大小(mm)	
		BP-1	BS-2
新生霉素	30	-	-
羧苄青霉素	100	-	-
万古霉素	30	-	-
甲氧苄氨嘧啶	5	-	-
苯唑青霉素	1	-	-
四环素	30	18.0	19.0
阿莫西林	10	-	-
伏力欣	20~10	-	-
妥布霉素	10	20.5	22.0
氯曲南	30	11.2	12.0
克林霉素	2	-	-
呋喃妥因	300	-	-
氟哌酸	10	22.0	21.0
氧哌嗪青霉素	100	16.0	14.0
乙基西羧霉素	30	20.0	22.0
壮观霉素	100	13.0	15.2
氨基青霉素	10	-	-
复方新诺明	25	-	-
红霉素	15	10.0	11.0
丁胺卡那霉素	30	20.0	21.0
氟哌酸	5	20.0	20.5
庆大霉素	10	21.5	21.0
林可霉素	2	-	-
吡哌酸	30	17.0	17.0
强力霉素	30	15.5	14.0
环丙沙星	5	19.0	19.0
氯霉素	30	-	-
亚胺硫霉素	10	-	-
利复平	5	-	-
痢特灵	300	-	-
头孢唑肟	30	12.5	14.0
多粘菌素	300IU	17.8	19.5
琥珀红霉素	15	10.0	11.0

注：“-”表示无抑菌圈。

[2] 林星,肖懿哲.大黄鱼弧菌病的诊治[J].水产养殖,1998(4):29-30.  
 [3] 王军,苏永全,张朝霞,等.闽南地区养殖大黄鱼细菌性疾病的病原生物学研究[J].厦门大学学报.2001(1):85-91.  
 [4] 林克冰,周宸,刘家富,等.海水网箱养殖大黄鱼弧菌病的病原菌[J].台湾海峡,1999(3):342-346.  
 [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,1978.135-179.  
 [6] 布坎南 R E,吉本斯 N E,中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组译,伯杰细菌鉴定手册(第八版)[M].北京:科学出版社,1984.274-286.

(下转第80页)

(上接第 7 页)

- [7] 孟庆显. 海水养殖动物病害学[M]. 北京:中国农业出版社, 1996 68-69.
- [8] 樊海平. 恶臭假单胞菌引起的欧洲鳗鲡烂鳃病[J].

水产学报, 2001 (2): 147-150.

- [9] 李槿年, 魏梅芳, 于道平. 暗纹东方鲀“脱粘病”病原菌的分离鉴定[J]. 水利渔业, 2001 (5): 42-43.

## Studies on the *Pseudomonas* disease of large yellow croaker

LIU Jia-fu, YU Zuo-jian, LIN Yong-tian, CHEN Hong-qing, XIE Wen-qiu  
(the Experimental Farm of Fishery Extension Station, Ningde, 352100, China)

**Received:** Sep., 19, 2002

**Key words:** large yellow croaker, pathogen, *Pseudomonas*

**Abstract :** Artificial infection experiment on the two predominated strains BP-1 and BS-2, which were isolated from the spleen and kidney of diseased caged large yellow croaker, proved that the two strains were the pathogen. After physiological and biochemical experiments, it was found that both were *Pseudomonas*. The result of medicament sensitivity experiment indicated that seventeen types of medications such as Norfloxacin, Gentamicin, Tobramycin, Ciprofloxacin, Tetracyclin, Polymyxin, and so on, would cause significant bacteriostatic effect.

(本文编辑:刘珊珊)