

越冬期淡水白鲢发病之病原细菌的研究*

黄文芳 王文彬

(华南师范大学生物系 广州 510631)

摘要 从越冬期淡水白鲢病鱼的肝脏内分离纯化到一细菌菌株 CBZHG4, 用 $n(\text{cell}) = 10^5 \sim 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 的菌液浓度在腹腔注射试验鱼后 48 h 内全部死亡, 证实为病原菌. CBZHG4 经 API 20NE 系统鉴定为嗜水性气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*), 对卡那霉素多种抗生素和呋喃类药物敏感, 对青霉素类、先锋霉素等抗生素、磺胺类药物和 0/129 不敏感. 表 2 参 2

关键词 淡水白鲢; 病原菌; 嗜水性气单胞菌

CLC S941.42

STUDY ON THE PATHOGENIC BACTERIA OF DISEASED *COLOSSOMA BRACHYPOMUM* IN WINTER

HUANG Wenfang & WANG Wenbin

(Department of Biology, South China Normal University, Guangzhou, 510631 China)

Abstract Strain CBZHG4, isolated from the liver of diseased *Colossoma brachypomum*, was determined as the fish pathogen. Following intraperitoneal injection of $n(\text{cell}) 10^5 \sim 10^6 \text{ mL}^{-1}$, fish developed clinical disease, with 100% mortalities within 48 h. Pathogen CBZHG4 was identified to be *Aeromonas hydrophila* using API 20 NE rapid identification system. By sensitivity testing on drugs, CBZHG4 was sensitive to many antibiotics, such as kanamycin and furane, but not sensitive to some antibiotics, e.g., penicillin, cephalixin, sulphadiazin and 0/129. Tab 2, Ref 2

Keywords *Colossoma brachypomum*; pathogen; aeromonas hydrophila

CLC S941.42

淡水白鲢, 学名短盖巨脂鲤 (*Colossoma brachypomum*). 原产于南美亚马孙河, 是热带和亚热带食用与观赏兼备的经济鱼类之一. 我国自引进养殖以来, 淡水白鲢已产生了显著的经济效益和社会效益.

淡水白鲢有很强的抗病能力. 在原产地未见有鱼病报道, 在我国长江流域, 6~9 月份的养殖过程中也很少发生过鱼病. 但水温在 15~20℃ 时, 幼鱼易患小瓜虫病、白皮病、指环虫病等. 有时因小瓜虫病和白皮病等造成大批鱼种死亡. 在越冬期间还发现淡水白鲢感染斜管虫病、车轮虫病、鳃鞭毛虫病、细菌性烂鳃病、变形虫病. 当越冬池中的椎实螺繁生或带入大量的剑水蚤时, 可导致感染口吸虫病和九江头槽绦虫病, 往往造成大批鱼死亡^[1].

华南师大生物系鱼类研究室越冬池中的淡水白鲢, 近二三年来越冬初期水温降至 20℃ 以下时, 大批鱼种死亡, 且亲鱼也有少数死亡. 检查病鱼体表和腮, 发现有许多单细胞藻类, 还有少量车轮虫和斜管虫, 皮肤溃烂处长有水霉. 镜检肝、脾和肾脏发现有大量细菌. 为了弄清楚淡水白鲢越冬大批死亡原因, 作者进行了病原菌的分离和一系列的细菌学实验分析, 现将结果报道如下.

1 材料与方法

1.1 病原菌的分离

病鱼为华南师大学生物系鱼类研究室越冬池的淡水白鲢鱼种(体重 10 g 以下)和亲鱼(体重 3 500 g 左右)。细菌培养基为牛肉膏蛋白胨固体培养基。

用 70% 酒精对病鱼体表消毒,然后用无菌剪刀剖开病鱼胸骨腔,暴露内脏。用无菌接种针从肝、脾和肾各取一小块组织分别接种于斜面培养基,置于 27~28℃ 温箱中培养 18~24 h,长出斜面培养物;取一环斜面培养物置于装有玻璃珠的无菌瓶生理盐水中振荡打散后,用 0.85% 生理盐水进行稀释,然后涂布于平板培养基上,置于恒温箱中培养 18~24 h,挑取典型菌落分别接种于斜面培养基上培养好后置于 4~8℃ 冰箱中保存备用。

1.2 方法

1.2.1 人工感染 华南师范大学生物系鱼类研究室提供的健康淡水白鲢,体重 16.0 g。将分离到的四个菌株分别接种到普通肉胨斜面培养基上,于 27~28℃ 恒温培养 18~24 h,然后用 0.85% 的生理盐水配制成 $n(\text{cell}) = 10^5 \sim 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 菌液,采用腹腔注射方法注入健康淡水白鲢鱼种体内,每尾注射 0.1 或 0.2 mL。每组感染 5 尾,同时设一个对照组(CK,每尾注射 0.2 mL 生理盐水)。感染鱼分别置于规格为 50×40×37 cm 的塑料水族箱中,水温在 15~22℃ 范围,并以 HG150 充气增氧机向水体压送空气。在试验过程中,不投饵料,不断观察发病情况,做好记录。

1.2.2 病原菌鉴定 采用 API 20NE 非肠道的革兰氏阴性杆菌鉴定系统,API 20NE 生化试剂条由法国生物梅里埃(BioMerieux)公司生产。

1.2.3 药物敏感性试验 试验用的圆形药片为 Span 公司生产。先用玻璃刮把菌液均匀地涂布于平板培养基,然后把药片贴在平板上,置于 27~28℃ 生化培养箱培养 24 h,测量抑菌环直径。

1.2.4 CBZHG4 溶血试验 按照文献[2]的方法进行。

1.2.5 CBZHG4 免疫性测定 CBZHG4 接种在肉胨斜面培养基上 27~28℃ 下培养 18 h,用无菌 0.85% 生理盐水洗下配制成 $n(\text{cell}) = 10^9 \text{ mL}^{-1}$ 的菌悬液。将菌液分成三份,取一份菌液加入甲醛,使甲醛浓度为 $\varphi = 0.3\%$,并于 60℃ 水浴 1 h 把菌杀死为死菌抗原;另取一份菌液在 JY9Z-型超声波细胞粉碎机(中国宁波新艺科器研究所生产)下把菌体破碎为破碎菌体抗原;第三份菌液作为活菌抗原。每种抗原材料免疫 3 尾淡水白鲢(体重 500 g 左右),每尾从腹腔注射 0.5 mL 抗原菌液,并设生理盐水对照组。免疫接种 17 d 后采取断尾取血,血液经 10 000 r/min×20 min 离心,取血清盛于瓶中。血清经生理盐水稀释一定浓度后与一定浓度的抗原进行玻片凝集反应和沉淀反应测定。

2 结果

2.1 症状

2.1.1 自然发病 在越冬池初期,当水温下降至 20℃ 以下时,即有大批淡水白鲢鱼种发病死亡。病鱼的症状表现为在水面独游,有点摇摆。鱼体不变黑,不消瘦;皮肤、尾鳍基部未见出血点,鳃较正常,仅少数鱼鳃偶见有白色溃疡;肝、脾和肾外观上无异常,镜检时却发现有大量细菌存在。部分病鱼的头背、眼部周围和背鳍长有水霉。

2.1.2 人工感染 注射 CBZHG4 菌液 0.2 mL/尾鱼的试验鱼,发病较急,因而不到 48 h 即发病全部死亡。症状主要表现为皮肤、尾鳍基部有少数出血点;病鱼独游,鳃丝淡红少血;肝、脾和肾外观无异常,但镜检肝内可发现有大量细菌存在,经接种分离出细菌再感染同样使健康鱼发病。CK 鱼正常未发病,肝、脾和肾未发现和分离出细菌。

2.2 病原菌的分离与分类鉴定

2.2.1 病原菌的分离与人工感染 从 2 尾即将死亡的淡水白鲢鱼种的肝内分离到两个菌株(CBZHG4 和 CBZHG10);从淡水白鲢亲鱼病鱼的肝内分离到一个菌株(CBQG),从肾内分离到一个菌株(CBQS)。将四个菌株

进行人工感染健康淡水白鲢,发现 CBZHG4 毒性最强,试验鱼 100% 致死,并从肝内再分离的细菌再感染同样发病。

2.2.2 病原菌的分类鉴定 形态特征:CBZHG4 菌株为革兰氏阴性短杆菌,大小为 $0.43 \sim 0.64 \times 0.85 \sim 1.8 \mu\text{m}$,单个菌体,少数菌体 2 个相连,有运动能力。在普通肉陈琼脂培养基平板上生长良好,27 ~ 30℃ 温度下培养 18 ~ 24 h 后即出现圆形、边缘整齐、表面中央隆起、乳白色的菌落,菌落直径大小为 1.2 ~ 2.5 mm。对罗非鱼鱼血有溶血作用。生理生化特性:把 CBZHG4 接种到法国 - 生物梅里埃公司生产的 API - 20NE 系统鉴定试剂条上,在 28℃ 下培养 24h,CBZHG4 菌株反应结果如表 1。根据 API - 20NE 试剂条反应结果译成编码为 7577755,查对 API - 20NE 编码手册,鉴定 CBZHG4 为嗜水性气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*),id = 99.3%。

表 1 CBZHG4 API 20 NE 反应
Table 1 Reactions on CBZHG4 to API 20 NE system

底物 Substrats	反 应/酶 Reactions/Enzymes	结 果 Results
KNO ₃	NO ₃ →NO ₂ or NO ₂ →NO ₃	+
色氨酸 Try	吡啉形成 Formation of indole	+
葡萄糖 Glucose	酸化 Fermentation	+
精氨酸 Arg	精氨酸双水解酶 Arg dihydrolase	+
脲素 Urea	脲酶 Urease	+
七叶灵 Esculin	水解(β-葡萄糖甙酶) Hydrolyse(β-glucosidase)	+
明胶 Gelatine	水解(蛋白酶) Hydrolyse(protease)	+
对硝基苯-β-D-吡喃半乳糖 P-nitro-phenyl-β-D-galactopyranoside	β-半乳糖甙酶 β-galactosidase	+
葡萄糖 Glucose	同化 Assimilation	+
阿拉伯糖 Arabinos	同化 Assimilation	+
甘露糖 Mannose	同化 Assimilation	+
甘露醇 Mannitol	同化 Assimilation	+
N-乙酰-葡萄糖胺 N-acety-glucosamine	同化 Assimilation	+
麦芽糖 Maltose	同化 Assimilation	+
葡萄糖酸盐 Gluconate	同化 Assimilation	+
癸酸 Capeate	同化 Assimilation	+
己二酸 Adipate	同化 Assimilation	+
苹果酸 Malate	同化 Assimilation	+
柠檬酸 Citrate	同化 Assimilaation	+
苯乙酸 Phenyl-acetate	同化 Assimilation	+
四甲基-对-苯撑二胺 Tetramethyl-p-phenylene diamine	细胞色素氧化酶 Cytochrome-oxydase	+

2.2.3 对药物敏感试验结果 CBZHG4 对 28 种药物敏感试验结果如表 2。从表 2 发现,CBZHG4 对 28 种药物中,有 17 种药物是敏感的;有 11 种药物是不敏感的,特别是先锋类、青霉素类和磺胺类药物。

2.2.4 免疫性 由于活菌抗原免疫注射试验鱼感染发病而很快死亡,未取血清。死菌抗原和破碎菌抗原免疫白鲢 17 天后断尾取血制备出血清进行凝集反应和沉淀反应试验。结果是 Ag(死菌)与 Ab(死菌)有较强的特异性凝集反应(滴定度 = 1:1289),与 Ab(破碎菌)和生理盐水无反应(-);Ag(破碎菌)与 Ab(破碎菌)、Ab(死菌)和生理盐水均无凝集反应(-);Ag(破碎菌)与 Ab(破碎菌)有特异性沉淀反应(滴定度 = 1:200)。

3 讨论

从以上试验结果看出,华南师大生物系鱼类研究室越冬池中淡水白鲢鱼种大批死亡的原因,主要是感染了 CBZHG4 这种嗜水性气单胞菌 (*Aer. hydrophila*) 发病而死亡。而这种细菌在肝内大量繁殖生长,而且毒性又强,同时淡水白鲢在水温下降至 20℃ 以下时抗病力减弱的情况下,因而造成大批鱼发病死亡。

从 CBZHG4 对药物敏感试验中发现,CBZHG4 对青霉素类、先锋霉素和磺胺类药物(表 2)具有耐药性,这一结果对淡水白鲢鱼病的防治具有参考价值。从免疫性试验结果发现 CBZHG4 具有较强的免疫性,可制成死菌疫苗免疫淡水白鲢来提高免疫能力,达到预防该病的发生,减少经济损失。

表 2 CBZHG4 对药物的敏感性
Table 2 CBZHG4 sensitivity to drugs

药品名称 Drugs	纸片药量 (<i>m</i> / μ g) Strength	抑菌环直径(<i>d</i> /mm) Diameter of zone of inhibition			CBZHG4
		耐药 Resistant ($\leq$)	中介 Intermediate (=)	敏感 Sensitive ($\geq$)	
卡那霉素 Kanamycin	30	13	14-17	18	25(S)
羟氨苄青霉素 Amoxycillin	10	13	14-17	18	0(R)
氨苄青霉素 Ampicillin	10	13	14-16	17	0(R)
头孢羟氨苄 Cefadroxil	30	14	15-17	18	0(R)
头孢唑啉 Cefazolin(先锋 V)	30	14	15-17	18	0(R)
头孢噻肟 Cefotaxime	30	14	15-22	23	35(S)
头孢唑啉钠 Cefuroxime sodium	30	14	15-17	18	32.5(S)
头孢氨苄 Cephalexin	30	14	15-17	18	0(R)
头孢噻啉 Cephaloridine	30	11	12-15	16	8(R)
氯霉素 Chloramphenicol	30	12	13-17	18	39(S)
环丙沙星 Ciprofloxacin	5	15	16-20	21	23.5(S)
氯唑西林 Cloxacillin	5	11	12-13	14	0(R)
强力霉素 Doxycycline	30	12	13-15	16	29(S)
红霉素 Erythromycin	15	13	14-22	23	20(I)
呋喃唑酮 Furazolidone	100	14	15-16	17	19(S)
庆大霉素 Gentamycin	10	12	13-14	15	25(S)
呋喃妥英 Nitrofurantoin	300	14	15-16	17	24(S)
氧氟沙星 Ofloxacin	5	12	13-15	16	26(S)
诺氟沙星 Norfloxacin(氟哌酸)	10	12	13-16	17	23(S)
青霉素 G Penicillin G	10	14	-	15	0(R)
链霉素 Streptomycin	10	11	12-14	15	25(S)
磺胺噻唑 Sulphadiazin	300	12	13-16	17	0(R)
四环素 Tetracycline	30	14	15-18	19	17(I)
萘啶酮酸 Nalidixic Acid	30	13	14-18	19	0(R)
皮沙星 Pefloxacin	5	12	13-16	17	17.5(S)
复方新诺明 Co-trimoxazole	25	10	11-15	16	23(S)
阿米卡星 Amikacin	30	14	15-16	17	26(S)
0/129	10	-	-	-	0(R)

参考文献

1 赵振山,高贵琴等编著.淡水白鲢养殖.北京:科学技术文献出版社.1995

2 Tang FS(汤优生),Zhu XY(朱晓燕),Zhang XZ(张兴忠). THE INFLUENCES OF COMMON CARP INTESINAL BACTERIA AND ITS AMYLASES ON THE HOST DIGESTION. *J Fisheries China* (水产学报). 1994,18(3):177 ~ 182