

文章编号: 1000- 0615(2001)02- 0147- 04

恶臭假单胞菌引起的欧洲鳗鲡烂鳃病

樊海平

(福建省淡水水产研究所, 福建 福州 350002)

摘要: 从患烂鳃病的病鳗分离到多株细菌, 其中三株经人工感染证实为病原菌, 经生理、生化等测试鉴定为恶臭假单胞菌。其主要特征为革兰氏阴性、具动力的短杆菌; 氧化酶、过氧化氢酶、枸橼酸盐利用、精氨酸双水解酶阳性; 硝酸盐还原, 鸟氨酸脱羧酶、赖氨酸脱羧酶、明胶酶、尿素酶、V-P 反应、吲哚反应阴性。对氟哌酸、妥布霉素、卡那霉素、庆大霉素敏感。

关键词: 欧洲鳗鲡; 烂鳃病; 恶臭假单胞菌

中图分类号: S941.42^{*4} 文献标识码: A

Study on the gill-rot disease of *Anguilla anguilla* infected by *Pseudomonas putida*

FAN Hai-ping

(The Freshwater Fisheries Research Institute of Fujian Province, Fuzhou 350002, China)

Abstract: The bacterium strains were isolated from the gill-rot disease of the European eel (*Anguilla anguilla*). The isolate was proven to be the pathogen of the disease. By challenge test and identified to be the *Pseudomonas putida*. The bacteria are Gram negative motive short rods. The Physiological and biochemical characteristics were following: Oxidase, catalase, utilization of sodium citrate, Arginine dehydrolase positive, nitrites reduced to nitrites, ornithine decarboxylase, lysine decarboxylase, gelatinase, Urease, voges proskauer reaction negative. The bacterium is highly sensitive to Norfloxacin, Tobramycin, Kanamycin and Gentamycin.

Key words: *Anguilla anguilla*; gill-rot disease; *Pseudomonas putida*

欧洲鳗鲡养殖过程中, 细菌性疾病危害严重, 其中烂鳃病周年发生且发病率高。欧洲鳗鲡烂鳃病常与寄生虫病、真菌病并发, 因而给治疗带来了困难。鳗鲡烂鳃病病原主要有柱状屈挠杆菌、噬纤维菌等^[1-3]。本文报告了由恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)引起的欧洲鳗鲡烂鳃病。

1 材料与方法

1.1 病原菌分离

取检查鳃无寄生虫、真菌感染, 鳃丝溃烂的濒死病鳗, 用无菌生理盐水冲洗体表三遍, 解剖取出鳃, 经无菌生理盐水充分冲洗后, 捣烂鳃丝, 接种环取样于普通平板培养基划线, 30℃培养 24h 后, 挑取形态

收稿日期: 2000-09-25

基金项目: 农业部“九五”渔业重点科研资助项目(95-A-96-03-02)

第一作者: 樊海平(1967-), 男, 江苏武进人, 高级工程师, 主要从事水产养殖动物疾病的防治技术研究。Tel: 0591-3732007, E-mail:

fanhaiping@163.net

一致的优势菌落,进一步划线纯化,获纯培养后,移入斜面培养基,石蜡保存。

1.2 人工感染试验

取体重为 15g 左右的健康鳗,于水族箱暂养 5d,稳定后供人工感染用。暂养期间不投饵,连续充气,日换水 50%,水温保持 27℃。90L 水族箱放自来水 50L,曝气 24h 后,移入试验鳗,每箱 6 尾一组,不换水,连续充气,试验期间水温恒定 27℃。取 30℃ 培养 24h 的斜面培养物,用肉汤培养基洗下,并用肉汤培养基稀释制成 10^{12} cfu·mL⁻¹ 的菌悬液,根据设计浓度加入水族箱进行感染试验。同期进行创伤感染和浸浴感染,创伤感染用无菌解剖剪下一小片鳃丝。对照组不加菌液。每日记录死亡结果。对 MSO329-1 菌株感染出现症状的病鳗分离细菌并进行重复感染,分离细菌。

1.3 病原菌的分类鉴定

按照文献[4]、[5]介绍方法进行病原鉴定。对培养 16h 幼菌经 2% 磷钨酸磷酸缓冲液负染,透射电子显微镜观察。对照文献[6]、[7]鉴定至种。

1.4 药物敏感试验

所用 24 种药敏纸片由上海伊华临床科技公司制造。涂布法接种,药敏纸片贴于培养基,每皿 6 片,每种药物 2 片,30℃ 培养 24h 后测定抑菌圈直径,按 NCCLS 推荐标准评价^[8]。

1.5 病理组织变化观察

取具典型症状病鳗的组织器官,用 10% 中性福尔马林固定,常规石蜡切片, H. E 染色,中性树脂封片, XSP-⊕型显微镜观察并照相。

1.6 治疗试验

于福建省的长乐、福清、莆田等地的发病养鳗场,首先清洗池底及池壁,大换水后,用福尔马林($20\sim 30$) × 10⁻⁶ + 味喃唑酮($3\sim 6$) × 10⁻⁶、氟哌酸($8\sim 12$) × 10⁻⁶或二氧化氯($0.2\sim 0.3$) × 10⁻⁶, 18~ 20h 换水,重复上述方法一次进行治疗,并同时于饵料中添加盐酸环丙沙星 0.8g 连续投喂 7~ 10d。

2 结果

2.1 人工感染

分离三个菌株,分别采用不同菌液浓度的创伤、浸浴感染(菌株 MSO329-1、2、3)及重复感染(菌株 MSO329-4)结果表明:分离菌株能使欧洲鳗致死,其致死量与浓度成正比(表 1)。说明所分离菌株为欧洲鳗致病菌。人工感染鳗表现为胸鳍及鳃孔周围充血发红,鳃丝充血,轻压鳃部流出血色粘液,鳃丝末端水肿、粘液细胞排列紊乱、脱落,体表脱粘,部分鳗臀鳍充血,这些症状与自然病鳗相同。

表 1 分离菌株人工感染试验结果

Tab.1 Result of infection test by isolated bacteria

菌株号	菌液浓度 (ind·mg ⁻¹)	试验尾数	组别	死亡数(尾)							死亡尾数/ 试验尾数
				1(d)	2(d)	3(d)	4(d)	5(d)	6(d)	7(d)	
MSO329-1	9.8 × 10 ⁶	6	1	0	0	0	0	0	1	1	2/6
	9.8 × 10 ⁶	6	2	0	0	0	0	0	1	0	1/6
	9.8 × 10 ⁷	6	1	0	0	1	0	1	1	1	4/6
	9.8 × 10 ⁷	6	2	0	0	0	0	0	1	1	2/6
	9.8 × 10 ⁸	6	1	1	0	1	1	0	0	1	4/6
	9.8 × 10 ⁸	6	2	0	0	0	0	0	1	1	2/6
	对照	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0/6
	对照	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0/6
MSO329-2	9.8 × 10 ⁶	6	1	0	0	0	0	1	0	1	2/6
	9.8 × 10 ⁶	6	2	0	0	0	0	0	0	1	1/6

(接上表)

菌株号	菌液浓度 (个/毫升)	试验尾数	组别	死亡数(尾)							死亡尾数/ 试验尾数
				1(d)	2(d)	3(d)	4(d)	5(d)	6(d)	7(d)	
MS0329- 3	9.8×10 ⁷	6	1	0	0	1	0	1	1	1	4/6
	9.8×10 ⁷	6	2	0	0	0	1	1	0	0	2/6
	9.8×10 ⁸	6	1	1	0	1	1	0	2	0	5/6
	9.8×10 ⁸	6	2	0	1	0	0	1	1	0	3/6
	对照	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0/6
	对照	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0/6
	4.2×10 ⁶	6	1	0	0	1	0	0	1	1	3/6
	4.2×10 ⁶	6	2	0	0	0	0	1	0	1	2/6
	4.2×10 ⁷	6	1	0	1	1	1	0	0	1	4/6
	4.2×10 ⁷	6	2	0	0	1	0	1	0	1	3/6
	4.2×10 ⁸	6	1	0	1	0	2	1	0	1	5/6
	4.2×10 ⁸	6	2	0	0	1	1	0	1	0	3/6
	对照	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0/6
	对照	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0/6
MS0329- 4	5.6×10 ⁶	6	1	0	0	0	1	1	0	1	3/6
	5.6×10 ⁶	6	2	0	0	0	1	0	1	0	2/6
	5.6×10 ⁷	6	1	0	0	0	1	0	1	1	3/6
	5.6×10 ⁷	6	2	0	0	0	0	1	0	1	2/6
	5.6×10 ⁸	6	1	0	1	0	2	1	0	1	5/6
	5.6×10 ⁸	6	2	0	0	1	0	1	1	0	3/6
	对照	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0/6
	对照	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0/6

注: 组别 1 为创伤感染; 组别 2 为浸浴感染。

2.2 病原体的分类鉴定

对 5 个菌株(3 株由自然病鳗分离, 2 株由人工感染鳗分离) 进行形态及生理生化测定(表 2)。病原菌为短杆状、具动力、多根鞭毛, 氧化酶、过氧化氢酶阴性, 硝酸盐还原、硝酸盐产气阴性, 吲哚反应、V-P 反应阴性, 发酵木糖、果糖、不发酵麦芽糖、乳糖、赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶阴性, 精氨酸双水解阳性。对照伯杰氏系统细菌手册, 病原菌鉴定为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)。

表 2 分离菌株的特性

Tab. 2 The characteristics of the isolated bacteria

鉴定项目	分离菌株(5 株)	鉴定项目	分离菌株(5 株)
形状	短杆状	果糖	+
色素	灰白	麦芽糖	-
鞭毛	> 1	靛基质	-
革兰氏染色	-	V-P 反应	-
克氏双糖铁	- / -	尿素酶	-
氧化酶	+ *	枸橼酸盐	+
过氧化氢酶	+	乙酰胺酶	-
硝酸盐还原	-	明胶酶	-
硝酸盐产气	-	赖氨酸脱羧酶	-
葡萄糖	氧化	鸟氨酸脱羧酶	-
乳糖	-	精氨酸双水解	+
木胶糖	+		

*: 反应弱

2.3 药物敏感试验结果

对分离菌株进行 24 种药物敏感性试验(表 3), 其中氟哌酸、妥布霉素、卡那霉素、庆大霉素敏感, 氟

哌嗪青霉素、头孢三嗪、头孢呋新、链霉素中度敏感,其余药品不敏感。

2.4 病理组织变化

病鳗鳃丝粘液分泌增加,上皮细胞水肿,血细胞浸润鳃组织,溃烂并粘脏。肝脏水肿,肝细胞部分坏死。脾脏具结疔状坏死灶,病灶处,脾脏细胞死亡崩解,炎性细胞增加。肠道无食物,肠道壁充血,肠黏膜层脱落入肠管,炎性细胞浸润结缔组织。肾脏严重坏死,肾小管上皮细胞死亡分解,形成结疔状坏死灶,坏死灶由死亡肾组织、血细胞及细菌组成。心脏肌纤维局部坏死。

2.5 治疗

欧洲鳗烂鳃病的治疗应首先去除诱发因子,如寄生虫、真菌、水质条件,再进行病原菌的杀灭,方能彻底治愈。如果未去除诱发因子,易造成重复感染。发病前期,使用二氧化氯、福尔

马林等效果良好,而病情严重的情况下,应使用氟哌酸等敏感抗生素才能收到良好的治疗效果。由于烂鳃病发生时,内脏器官同时感染病原体,因而,内服敏感抗生素作为巩固治疗对疾病的完全康复十分重要。

3 讨论

欧洲鳗烂鳃病的发生,一般具其诱导因子,如寄生虫感染、真菌感染或水质恶化,导致鳃组织创伤或功能下降,使鳗对病原的抵抗能力下降而暴发烂鳃病。人工感染试验显示,创伤感染鱼体死亡率明显高于浸浴感染;菌液浓度升高,创伤感染及浸浴感染的死亡率升高。这说明本病原菌的条件致病性,当环境条件适于病原菌生长繁殖,鱼体对病原抵抗能力减弱时易受病原侵袭而暴发疾病;环境条件不适于病原菌生长繁殖及鱼体对病原抵抗能力强时,即使环境中具病原体的存在亦不易导致鳗病的暴发。

参考文献:

- [1] 韩先朴,郭继娥,陈光辉. 鳗鱼养殖技术问答[M]. 北京:科学普及出版社,1996.175-176.
- [2] Mail B, Suva F. Induction and development of bacterial gill disease in eel (*Anguilla japonica*) experimentally infected with *Flexibacter columnaris*: pathological in the gill vascular structure and in Cardiac performance[J]. *Aquac*, 1989, 78(1): 1-20.
- [3] Mellengaard S, Dalgaard I. Disease problems in Danish eel farms[J]. *Aquac*, 1987, 67: 139-147.
- [4] 中科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:农业出版社,1987.111-193.
- [5] 厦门大学生物学系微生物学教研室. 普通细菌学方法手册[M]. 厦门:厦门大学出版社,1989.527-553.
- [6] Palleroni N J. Genus *Pseudomonas*[A]. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 1[M]. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. 141-199.
- [7] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H, et al. *Bergey's manual of bacteriology*[M]. Baltimore: Williams and Wilkins, 1993. 155-190.
- [8] 王淑娟,周惠平,夏铁亦. 现代诊断学手册[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1995.511-525.

表3 分离菌株的药物敏感性试验结果

Tab.3 The sensitivity of the isolated bacteria to the chemical therapeutants

药品	敏感性	药品	敏感性
卡那霉素	S	丁胺卡那霉素	I
呋喃妥因	R	氯苄青霉素	R
氟哌酸	S	羧苄青霉素	R
苯唑青霉素	R	头孢哌酮	I
链霉素	I	头孢呋新	R
青霉素	R	头孢唑啉	R
氟哌嗪青霉素	I	氯霉素	R
利福平	R	头孢三嗪	I
复方新诺明	R	头孢他定	R
四环素	R	头孢噻肟	R
妥布霉素	S	红霉素	R
万古霉素	R	庆大霉素	S

注: S: 敏感; I: 中度敏感; R: 不敏感