

翘嘴鲮烂鳃病原的研究

黄文芳 李海燕 张剑英

(华南师范大学生物系 广州 510631)

摘要 从患典型烂鳃病的翘嘴鲮 (*Siniperca chuatsi*) 鳃上分离到 6 个菌株, 从中筛选出毒性最强的 SC-3、SC-6 两菌株。通过生物学特性观察、生理生化特性分析和致病力测试的结果, 认为 SC-3、SC-6 为柱状屈挠杆菌 (*Flexibacter columnaris*), 是翘嘴鲮烂鳃病的病原菌。药物敏感试验表明, SC-3 对多种抗生素、呋喃类药物敏感而对磺胺噻唑不敏感。

关键词 翘嘴鲮, 烂鳃病, 柱状屈挠杆菌

分类号 S.941 **文献识别码** A **文章编号** 0253-2654(1999)-04-0246-05

1998-05-04 收稿, 1998-11-06 修回

THE PATHOGEN of BACTERIAL GILL DISEASE IN MANDARIN FISH *SINIPERCA CHUATSI*

Huang Wenfang Li Haiyan Zhang Jianying

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

Abstract The six strains of bacteria were isolated from the rotted gill of diseased mandarin fish. Among the six strains, we found out two strains of high virulence: SC-3 and SC-6 strains. According to the biological features, physiological-biochemical analysis and pathogenicity detection of the SC-3 and SC-6, the two strains were identified to be *Flexibacter columnaris*, the pathogen of the rotted gill disease of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). By sensitivity testing to drugs, SC-3 was sensitive to many antibiotics, and furane but not to sulfadiazole.

Key words Mandarin fish, Rotted gill disease, *Flexibacter columnaris*

近年来,广东省大力发展名优鱼类新品种的养殖,翘嘴鳊鱼就是其中一种。随着人工养殖规模不断扩大,预防措施没有跟上,使疾病也越来越严重,其中细菌性烂鳃病是严重危害(人工养殖)翘嘴鳊的疾病之一。由于这种病的流行,往往引起养殖的翘嘴鳊大批死亡,给养殖户造成巨大的经济损失。本文应用细菌学方法对翘嘴鳊烂鳃病的病原进行了分离纯化和分类鉴定,并对病原进行了药物敏感试验。

1 材料与方 法

1.1 材 料

病鱼材料取自华南师范大学鱼类研究室(简称鱼类室)养殖的患烂鳃病的当年翘嘴鳊(体长6~11cm)。翘嘴鳊鱼苗来自广东南海市水产种苗场,饵料鱼由广州白云区太和镇及增城市新塘镇养殖场提供。人工感染用的翘嘴鳊和草鱼由本校鱼类室提供, LK-20肠杆菌科细菌生化鉴定条由永康生物工程有限公司生产,药物试纸为美国Sigma公司生产。

1.2 方 法

1.2.1 病原菌的分离纯化:分离纯化培养基采用普通肉汤琼脂和胰酪琼脂两种培养基。分离时取病灶(鳃丝)组织一小块,置于干净的小烧

杯或载玻片上,加入数滴水或蒸馏水。用接种环蘸液,在平板培养基上划线,或者用接种环直接从病灶上取材于平板上划线。将平板置25℃~27℃的培养箱中培养。根据菌落特征,挑取单个菌落进行再划线分离纯化,直至镜检确认为纯化为止,取菌落接种到斜面培养基上培养后保存备用。

1.2.2 人工感染:将纯化的菌株分别接种到普通肉汤琼脂斜面培养基或胰酪液体培养基中,液体培养基置于HZQF全温振荡培养箱中,速度为200r/min振荡,在27℃下恒温培养28~24h以后,将斜面菌种或液体菌种配制成 $6 \sim 9 \times 10^5$ cell/mL的菌悬液后。把健康的翘嘴鳊放入菌液中浸泡5min,然后把鱼连同菌液一起置于规格为50×40×37cm的塑料水族箱中。水温保持在22~27℃范围内,用HGI50充气增氧机向水体不断充氧气。在感染过程中,不投饵料鱼,不断观察发病情况和做好记录,另设不加菌液的对照组进行比较。从感染发病的病鱼病灶上重新分离细菌。

1.2.3 病原菌的鉴定:革兰氏染色以大肠杆菌(GN)和枯草杆菌(GP)为对照染色;氧化酶(或细胞色素氧化酶)的测定采用kovacs氏法^[1];过氧化氢酶的测定、硫化氢产生、明胶液化、耐盐

试验,均参照文献[2]进行;吡啶试验、硝酸盐还原试验、分解七叶灵、丙二酸盐利用试验,均采用细菌生化鉴定条检测;分解纤维素、枸橼酸盐利用、淀粉水解、分解酪氨酸、分解酪蛋白、分解几丁质、葡萄糖利用、溶解大肠杆菌细胞的能力等实验均参照文献[3]方法进行;还原刚果红、pH值测定、类胡萝卜素的测定参照文献[4]方法进行。

2 结果

2.1 病原菌分离与人工感染

从患典型烂鳃病的翘嘴鲌病灶上分离纯化到 SC-1, SC-2, SC-3, SC-4, SC-5 和 SC-6 6 个菌株,经人工浸泡翘嘴鲌后,发现 SC-3 和 SC-6 短时间内能感染健康翘嘴鲌发病显症,死亡率 100%,而其它 4 个菌株 SC-1、2、4、5 也能造成 33.3%~66.6% 不同程度的死亡,但症状不太明

显。对照组无死亡。

从 SC-3 和 SC-6 菌株感染发病的病鱼烂鳃上取粘液在显微镜下检查,可以看到许多群集的滑动细菌。从人工感染的病鱼鳃部重新分离纯化到 SC-3-1 和 SC-6-1 菌株,再感染翘嘴鲌,结果显症,死亡 100%。用 SC-3、SC-3-1、SC-6 和 SC-6-1 菌株感染草鱼夏花,发现草鱼在短时间内全部发病死亡。但不表现烂鳃,而是从背鳍到尾鳍之间体表发白、鳞片脱落。对照组无死亡。

SC-3、SC-3-1、SC-6 和 SC-6-1 感染期翘嘴鲌发病症状基本相似。症状主要表现在鳃瓣上,鳃丝末端膨大、弯曲、发白。鳃小片肿胀、混乱、腐烂,腐烂部位多出现在鳃丝的远端,坏死细胞、细菌与粘液以及泥沙杂物混在一起,形成粘液团块,粘附于鳃丝的周围。人工感染发病症状与自然发病症状基本一致,只是自然发病

表1 SC-3、SC-6生理生化试验结果

生物学特性及生理生化反应	菌		株		
	SC-3	SC-6	M165 ^[5]	柱状嗜纤维菌 ^[6]	柱状屈挠杆菌 ^[7]
运动	曲折	曲折			
革兰氏染色	-	-	-	-	-
群集	+	+	+	+	+
氧化酶	+	+		+	+
细胞色素氧化酶	+	+		+	+
H ₂ O ₂ 酶	+	+	+	+	+
产生硫化氢	+	+	±	+	+
产生吡啶	-	-	-	+	-
还原硝酸盐	-	-	-	-	-
分解明胶	+	+	-	-	+
分解纤维素	-	-	-	-	-
利用枸橼酸	-	-	-	-	-
分解淀粉	-	-	-	-	-
分解酪氨酸	-	-	-	-	-
还原刚果红	+	+		+	+
分解酪蛋白	+	+	+		+
分解几丁质	-	-	-		-
葡萄糖利用	-	-			-
丙二酸盐利用	-	-			-
分解七叶灵	-	-	-	-	-
溶菌试验(大肠杆菌)类胡萝卜素	+	+			

的某些病鱼可观察到鳃盖上一圆形的较透明区域,而人工感染的鱼则未发现。根据这些结果分析,认为SC-3、SC-6是翘嘴鳊烂鳃病的致病菌。

2.2 病原菌的生物学特征

SC-3、SC-6具有滑动细菌一般特有的柔韧、可屈挠的特性。菌体细长,大小为 $4\sim 8\times 0.5\mu\text{m}$ 。一般在固体培养基上较短,在液体培养基上的菌体较长。无鞭毛、无微孢囊、无荚膜,以滑行运动,革兰氏染色阴性。在胰酪琼脂平板上生长良好。在 $25^{\circ}\text{C}\sim 27^{\circ}\text{C}$ 下培养 $2\sim 3\text{d}$ 后,菌落稀薄平铺在培养基表面,边缘不整齐呈假根状,中央较厚,向四周扩散。在解剖镜下观察,菌落呈菊花状。菌落最初与培养基颜色相似,36~48h后变成淡黄色、黄色至深黄色。生

长旺盛。液体略浑浊,液面覆盖一层淡黄色菌膜,菌膜逐渐变厚,不易破碎,聚集成团块。在 $\text{pH}6.5\sim 8.0$ 生长良好,在 $\text{pH}8.5$ 以上或 $\text{pH}6.0$ 以下则生长不良。培养基中 NaCl 浓度为 $0.4\%\sim 0.6\%$ 时,生长良好,而超过 0.7% 时不生长。液体振荡培养生长旺盛,静止培养生长缓慢;穿刺接种,仅在穿刺表面上生长。其生理生化及主要的生物学特性如表1。

从上述结果看,SC-3和SC-6两菌株的形态特征、生长条件和生理生化特性与文献[5]记载的柱状屈挠杆菌(*Flexibacter columnaris*)相似。

2.3 对药物敏感性

药物敏感试验结果(表2)表明,SC-3对多种抗生素,呋喃类敏感。27种药物中,仅对磺胺

表2 SC-3对药物的敏感性

药品名	纸片药量(μg)	敏感性	药品名	纸片药量(μg)	敏感性
卡那霉素	30	++	呋喃唑酮	100	++
羟氨苄青霉素	10	++	庆大霉素	10	++
氨苄青霉素	10	++	呋喃妥英	300	++
头孢羟氨苄	30	++	氧氟沙星(OF)	5	++
头孢氨苄	30	++	诺氟沙星(NF)	10	++
头孢噻肟	30	++	青霉素G	10U	++
头孢唑啉钠	30	++	链霉素	10	++
先锋IV	30	++	磺胺噻唑	300	-
头孢噻啶	30	++	四环素	30	++
氯霉素	30	++	奈啶酮酸	30	++
环丙沙星	5	++	皮斯沙星	5	++
氟唑西林	5	++	复方新诺明	25	+
强力霉素	30	++	丁胺卡那霉素	30	++
红霉素	15	++			

注: ++: 敏感, +: 中敏, -: 不敏感

噻唑表现不敏感,对其它26种药物均有不同程度的敏感。

3 讨论

从患烂鳃病的翘嘴鳊上分离到6个菌株,经人工感染后筛选出致病力最强的SC-3和SC-6两菌株;经人工感染后又重新分离到SC-3-1和SC-6-1两菌株,再次人工感染,证实SC-3

-1和SC-6-1同样使试验鱼致病死亡100%。分离菌株的人工感染发病症状与自然发病症状基本相同。根据以上事实,作者认为SC-3和SC-6的确是人工养殖的翘嘴鳊细菌性烂鳃病的主要病原菌。

SC-3和SC-6菌株具有滑动细菌一般特有的柔韧、可缠绕的特性,革兰氏染色阴性长杆菌,在胰酪琼脂培养基上菌落呈黄色有假根状,

能产生类胡萝卜素,未发现休眠孢子和微孢囊,不分解琼脂、纤维素和几丁质,菌体细胞无荚膜,寄生于鱼类。依据上述主要特点,查对《伯杰细菌鉴定手册》第八版^[5],认为翘嘴鲮烂鳃病致病菌 SC 3和 SC-6菌株应属于噬纤维菌目(Cytophagales),噬纤维菌科(Cytophagaceae),屈挠杆菌属(*Flexibacter*)的柱状屈挠杆菌(*F. columnaris*)。

有关鱼类细菌性烂鳃病的病原研究,国内外有较多的报道^[8-10]。中科院水生生物研究所正在研究草鱼细菌性烂鳃病时^[3],他们认为病原是鱼害粘球菌(*Myxococcus Piscicola*)。而何君慈等^[11]从草鱼烂鳃上分离的病原菌为柱状屈挠杆菌,陈昌福等^[6]认为引起翘嘴鲮细菌性烂鳃病的病原是柱状嗜纤维菌(*Cytophage columnaris*)。根据文献[5]记载,柱状噬纤维菌是柱状屈挠杆菌的同物异名。作者分离的 SC-3和 SC-6菌株的形态特征、运动方式、生理生化特性等与陈昌福等^[6]分离的病原菌比较,除了吡啶生成特征不同外,其它都相同;而与何君慈分离的柱状屈挠杆菌除了硝酸盐还原不同外,其它都相同。有关 SC-3和 SC-6菌株引起翘

嘴鲮烂鳃病的组织病理变化另文发表。

参 考 文 献

- [1] 张纪忠主编. 微生物分类学. 上海: 复旦大学出版社, 1990, 93~109.
- [2] 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, 135~193.
- [3] 湖北省水生生物研究所鱼病研究室. 草鱼烂鳃病的研究, 水生生物学集刊, 1975, 5(3): 315~334.
- [4] 周德庆. 微生物学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1983, 137~163.
- [5] RE. 布坎南. NE. 吉本斯等编. 中国科学院微生物研究所翻译《伯杰细菌鉴定手册》(第八版). 北京: 科学出版社, 1984, 81~134.
- [6] 陈昌福、史维舟、赵桂珍等. 华中农业大学学报, 1995, 14(3): 263~266.
- [7] 江草周三著. 鱼之感染症. 东京: 恒星社厚生阁, 1978, 1~300.
- [8] Farkas J. Aquaculture, 1985, 44: 1~10.
- [9] Kimura T, Wakabayashi H, Kudo S. Fish Pathology, 1978, 12: 233~242.
- [10] Wakabayashi H, Huh G J, Kimura N. International Journal of Systematic Bacteriology, 1989, 39: 213~216.
- [11] 何君慈, 邓国成. 水产学报, 1987, 11(1), 1~8.