

鳗鲡赤鳍病病原菌的分离鉴定和 耐药性的研究*

陈会波 林阳东 翁燕玲 王 励
(汕头大学, 515063) (汕头鳗鱼养殖研究所, 515061)

提 要

从汕头地区5个养鳗场的患赤鳍病的病鳗中均分离到病原菌是嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila* (chester) stanier), 将有毒力的87株病原菌对养鳗场常用抗菌剂进行耐药性试验, 结果表明, 4种抗菌剂的MIC、MIC₉₀和耐药率分别是: 土霉素109.3μg/ml、50.0μg/ml和78.8%; 氯霉素123.3μg/ml、63.0μg/ml和90.7%; 复方磺胺甲基噁唑(TMP/SMZ)720/3600μg/ml、126/630μg/ml和42.5%; 痢特灵79.7μg/ml、63.0μg/ml和65.5%。4种被测抗菌剂的平均MIC分别是对照敏感菌株的109.3, 102.7, 72和26.6倍。上述试验结果显示了由于滥用药物的严重后果

关键词 嗜水气单胞菌, 鳗鲡, 赤鳍病

汕头地区鳗鲡(*Anguilla japonica* Temminck et schlegel)养殖业已有20多年的历史, 近年来得到迅速的发展, 已经成为出口创汇的重点产业之一。但由于采用高密度养殖方法, 而又缺乏防治病害的科学措施, 也未对鳗鲡病原菌进行较深入的研究, 以致鳗鲡的发病率和经济损失日趋严重。赤鳍病是鳗鲡的一种常见病, 目前治疗赤鳍病的药物有土霉素、氯霉素、呋喃类和磺胺类等药物, 由于多年反复使用这些药物, 使病原菌产生了耐药性, 严重影响药效并使成鳗增加药物残留量, 降低了产品质量。国外报道过鳗鲡赤鳍病^[1], 为了更好地诊断和防治鳗鲡赤鳍病, 评价目前常用药物的疗效和筛选较安全、有效的代替药物, 对本地区鳗鲡赤鳍病病原菌进行分离、鉴定和耐药性研究是很有必要的。

材 料 与 方 法

1989年1—3月先后从汕头地区5个养鳗场获取赤鳍病症状明显的活病鳗25尾。

试验药物 土霉素, 华北制药厂生产, 粉剂; 氯霉素, 浙江温州制药厂, 针剂; 复方磺胺甲基异噁唑, 天心制药厂, 针剂; 痢特灵, 华北制药厂, 粉剂。

病原菌的分离 用75%酒精擦洗病鱼体表, 以无菌操作切开腹腔, 取少量致病组织放入盛有适量无菌生理盐水和玻璃珠的三角烧瓶中, 置摇床摇动15min, 作平板划线后于

* 本文承蒙中国科学院水生生物研究所潘金培研究员审阅, 特此致谢。
1990年2月28日收到。

28℃ 培养 24—48h, 选取典型菌落接种斜面。将培养好的斜面再次纯化后, 采用真空干燥贮存备用。分离培养基: 胰蛋白胨 10g, 牛肉膏 5g, 氯化钠 5g, 琼脂 14g, 水 1 000ml, pH 7.2—7.4, 15 磅高压灭菌 20min, 冷却至 45℃ 倾注平板或摆成斜面, 经确证无菌后贮于 4℃ 冰箱备用。

毒力试验 采用腹腔注射法, 将试验菌接种斜面, 于 28℃ 培养 17—18h, 用无菌生理盐水洗下纯培养物并稀释成含菌量为 1×10^9 个/ml 的菌悬液(活菌计数法), 吸取菌悬液 1ml 注入 8 个月龄(体重 150—200g) 的健康成鳗的腹腔内(试验鳗在注射或浸泡前置水族箱观察 5 d 以确证无病), 然后移入水温为 16—20℃ 水族箱中观察。浸泡法是用相同浓度的菌悬液浸泡鳗鲡 30min, 务使鳗体浸入菌液内, 然后移入 16—20℃ 的水族箱中观察。

形态观察和生理生化试验 采用毒力试验中症状明显的 A-01 和 A-74 两株菌的 18—24h 培养物, 按报道方法进行革兰氏染色、鞭毛染色等形态观察和生理生化试验^[1-3]。

耐药性试验 采用两倍稀释法测定各株病原菌对 4 种供试药物的最低抑菌浓度, 同时测定中国科学院微生物研究所保存的嗜水气单胞菌 AS1.927 菌株的 MIC 作对照。除复方磺胺甲基异噁唑采用无胨肉汤培养基外, 其他药物均用普通肉汤培养。土霉素和痢特灵粉剂配制后应过滤除菌。

结 果

1. 毒力试验

从 25 尾病鳗中分离的菌株经毒力试验有明显毒力的病原菌共 87 株, 表 1 列出 10 株病原菌的毒力试验结果。主要症状是: 鳗鲡感染 1 d 后, 臀鳍局部充血, 运动缓慢, 不时排出粘性粪便; 2d 后各鳍的充血明显扩大, 症状加重; 3—4d, 臀鳍、胸鳍和背鳍明显充

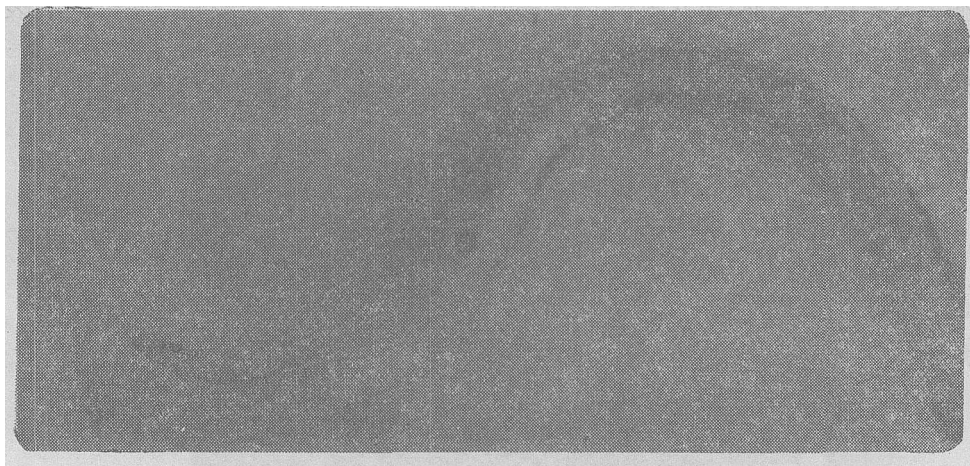


图 1 人工感染病原菌的鳗鲡赤鳍病症状

Fig.1 The symptoms of red fin disease of an eel artificially infected by pathogens

血, 肛门红肿, 体表充血, 腹部尤其明显, 背部及两侧体表呈现斑纹状, 解剖可见肠胃道红肿充血, 肝脏局部淤血, 部分鱼胆汁溢出胆囊, 部分症状严重者死亡(图 1)

表 1 10 株病原菌对健康成鳗毒力试验结果

Tab. 1 Toxicity tests of 10 pathogens on healthy eels

菌株 Strains	鳗鱼数 Number of eels	发病程度 Incidence		备注 Remarks
		腹注 Abdominal injection	浸泡 Immersion	
A-01	3	++ ++ ++	++ ++ +	++表示有明显症状并死 +表示有明显症状但不死亡 -表示无症状, 无死亡
A-02	3	+ + +	+ + +	
A-16	3	++ ++ ++	+ + +	
A-17	3	+ + +	+ + +	
A-38	3	++ ++ ++	++ ++ ++	
A-39	3	++ ++ ++	+ + +	
A-54	3	+ + +	+ + +	
A-55	3	+ + +	+ + +	
A-73	3	+ + +	+ + +	
A-74	3	++ ++ ++	++ ++ ++	
对照 Control	3	- - -	- - -	

2. 细菌培养形态及生理生化特性

病原菌 18—20h 培养物为单个或成双的短杆菌, 直径 $0.5-0.7 \mu\text{m}$, 长 $1.0-2.2 \mu\text{m}$, 中轴直, 两端圆形, 极生单鞭毛(图 2)。革兰氏染色阴性, 琼脂平板菌落圆形, 中央微凸, 表面光滑, 边缘整齐, 略带乳白色, 培养 24h 菌落直径为 $1-1.3\text{mm}$, 48h 后增至 $4-5\text{mm}$ 。琼脂斜面生长丰满, 线形, 扁平突起, 表面光滑、湿润, 边缘整齐, 略带乳白色。半固体培养基穿刺生长良好, 念珠状、生长到底, 表面部分生长。肉汤培养生长较好, 混浊均匀、表面有膜, 振摇即散成碎片。

病原菌对葡萄糖和麦芽糖代谢发酵和呼吸, 同时产酸产气; 硝酸盐还原亚硝酸盐; 在

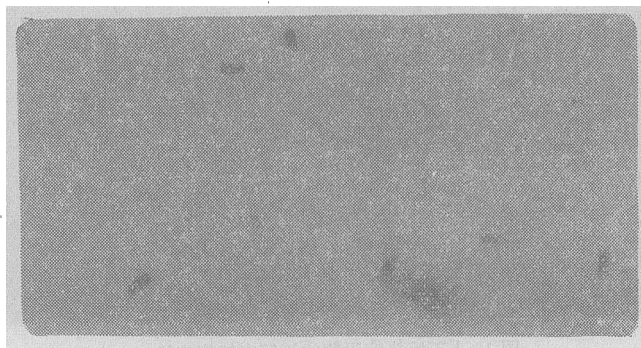


图 2 鳗鲡赤鳍病原菌的极生单鞭毛

Fig. 2 The single polar flagellum of the red fin disease pathogens in eels

含 7.5% 氯化钠营养液中不生长;对弧菌素(0/129)不敏感;不产生水溶性褐色素;不发酵甜醇、鼠李糖、木糖、肌醇、阿东醇、丙二酸盐、粘酸盐、蜜三糖、纤维二糖、乳糖和山梨醇;果胶酶、DNA 和 RNA 酶,吐温 80 脂酶、连四硫酸还原酶、氧化酶和过氧化氢酶阳性;水解淀粉;液化明胶;赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶、色氨酸和苯丙氨酸脱氨基酶和脲酶试验阴性;发酵半乳糖、水扬苷、蔗糖、甘露醇、海藻糖、甘油和糊精;不降解肌醇、丙二酸盐、粘酸盐和 D-酒石酸盐;ONPN、吲哚和 V-P 试验阳性;水解七叶苷;在 KCN 培养基中能生长;能利用 L-组氨酸、L-精氨酸和 L-阿拉伯糖;能从半胱氨酸产生 H_2S 气体;能以 D-核糖、D-半乳糖、D-葡萄糖、D-麦芽糖、D-海藻糖、D-葡萄糖酸盐、琥珀酸盐、延胡索酸盐、DL-甘油酸盐、甘油、D-甘露醇、L-天门冬氨酸盐和 L-谷氨酸盐作唯一的碳源。

表 2 和表 3 总结了 A-01 菌株部分生理生化特性,并与运动气单胞菌群和嗜水气单胞菌模式种的特征进行比较。根据病原菌的形态、毒力试验和生理生化特性,对照伯杰氏分类系统细菌学手册的部分内容,证实分离到的病原菌是嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*(Chester) Stanier)^[4]。

表 2 A-01 菌株与运动气单胞菌群特性的比较

Tab. 2 Comparison of the characteristics of strain A-01 and motile *Aeromonas* species

特 性 Characteristics	运动气单胞菌群 Motile <i>Aeromonas</i> species	A-01 菌株 Strain A-01
氧化酶	+	+
硝酸盐还原亚硝酸	+	+
赖氨酸脱羧酶	d	-
鸟氨酸脱羧酶	-	-
精氨酸脱氢酶	+	+
色氨酸苯丙氨酸脱氨基酶	-	-
脲酶	- ^b	-
水解淀粉、明胶、DNA 和 RNA	+	+
吐温 80 脂酶	+	+
Simmon's 柠檬酸盐琼脂	d	+
Christensen's 柠檬酸盐琼脂	d	+
无 NaCl 的蛋白胨水中生长	+	+
ONPN 试验	+	+
发酵麦芽糖、半乳糖和海藻糖	+ ^b	+
发酵纤维二糖、乳糖和山梨醇	d	-
发酵卫矛醇、鼠李糖和肌醇	-	-
木糖、蜜三糖和阿东醇	-	-
降解丙二酸、粘酸盐和 D-酒石酸盐	-	-
发酵甘油	d	+
连四硫酸盐还原酶	d	+

+ 阳性 (Positive); - 阴性 (Negative); d 部分菌株阳性, 部分阴性 (Positive in some strains while negative in others); b 有异常菌株 (With abnormal strains)

3. 耐药性试验

将 87 株病原菌对土霉素、氯霉素、复方磺胺甲基异噁唑和痢特灵的最高抑菌浓度的数据进行归纳整理 (表 4)。总结了 5 个养鳃场病原菌对 4 种常用药物耐药性的数据 (表

5),并与敏感菌作了比较,结果表明各养鳗场赤鳍病病原菌耐药性已十分严重。

表3 A-01 菌株与 *A. hydrophila* 模式菌株特性的比较

Tab. 3 Comparison of the characteristics of strain A-01 and type strain *A. hydrophila*

特 性 Characteristics	嗜水气单胞菌(模式菌) Type species: <i>A. hydrophila</i>	A-01 菌株 Strain A-01
运动性	+	+
液体培养基中形成单鞭毛	+	+
液体培养基中形成丛生鞭毛	-	-
成对、链状、成簇的球杆菌	-	-
单个、成对的杆菌	+	+
产生水溶性的褐色素	-	-
在 37°C 肉汤培养基中	+	+
在含 1% 胨水中产生明胶	+	+
水解七叶苷	+	+
在 KCN 培养基中	+	+
利用 L-组氨酸和 L-精氨酸	+	+
利用 L-阿拉伯糖	+	+
发酵水杨苷	+	+
发酵蔗糖	+	+
发酵甘露糖	+	+
降解肌醇	-	-
V.P 反应	+	+
从半胱氨酸产生 H ₂ S	+	+
从葡萄糖产气	+	+

讨 论

1. 从病原菌对 4 种抗菌剂耐药性研究结果分析,病原菌对常用抗菌剂耐药性发展已十分严重。耐药率范围从 42.5—90.9%,平均总耐药率为 69.4%。从表 5 来看,4 种抗菌剂似乎失去了治疗作用。但病原菌对上述药物耐药程度相差较大,氯霉素的总耐药率达 90.7%,MIC₉₀ 是 500 μg/ml,是对照菌的 417 倍,似应停止使用。土霉素的 MIC₉₀ 是 250 μg/ml,在大多数养鳗场没有疗效。表 4 结果表明,4 种药物在各养鳗场差别也较大,有的药物效果较好,有的较差。值得注意的是,复方磺胺甲基异噁唑的耐药率看上去似乎较低,但因耐药指标定得高,MIC 的平均值太高,在正常投药量远远达不到抑菌浓度,因此疗效仍然不佳。

2. 毒力试验中使用的菌悬液浓度为 1×10^9 个/ml,这个数据是经过实验后确定的。因为菌悬液的浓度太高,毒力太大,腹注或浸泡后常使鳗鲡在 1d 左右时间死亡,外部症状表现不典型,而浓度太低,且发病时间较长,症状表现不典型,并且延长了试验时间。只有采用适当的浓度,才能获得较理想的实验结果。

3. 自然界耐药菌的起源是基因自发突变的结果,它与抗菌药物的使用没有关系,但在同一地点长时间反复使用抗菌药物,使敏感菌株被抑制而耐药菌却大量繁殖,加上耐药质粒具有传染性,高密度鳗鲡养殖是耐药基因传播的良好环境,因而使水产用药很容易出现

表 4 各养鳗场鳗鲡赤鳍病原菌耐药性

Tab. 4 The drug resistance of the pathogens of eel red fin disease from several eel farms

场别 Farm	药 物 Drug	菌株数 Number of strains	MIC ₅₀ *	MIC ₉₀ *	MIC 范围 MIC range μg/ml	平均 MIC Average MIC	耐药率** Percentage of resistant strains
A	土霉素	15	125	250	16—250	144.2	100%
	氯霉素	15	125	250	8—250	122.5	100%
	TMP/SMZ	15	500/2 500	1 000/5 000	4/20—2 000/10 000	619/3096	66.7%
	痢特灵	15	31.5	125	8—250	61.0	53.3%
B	土霉素	22	50.0	400	2—500	150	86.4%
	氯霉素	22	62.5	400	2—500	177.8	90.9%
	TMP/SMZ	22	30/150	1 000/5 000	2/10—1 000/5 000	233/1 164	18.2%
	痢特灵	22	63.0	125	4—500	106.1	86.4%
C	土霉素	16	125	250	1—500	141.3	68.8%
	氯霉素	16	63.0	500	8—500	214.9	100%
	TMP/SMZ	16	1 000/5 000	1 000/5 000	250/1 250—1 000/5 000	7 016/3 508	87.5%
	痢特灵	16	63.0	250	8—250	121.4	75.0%
D	土霉素	19	16.0	31.5	1—31.5	17.1	52.6%
	氯霉素	19	31.5	62.5	2—62.5	34.0	68.4%
	TMP/SMZ	19	16/80	5 00/2 500	2/10—1 000/5 000	318/1 590	31.6%
	痢特灵	19	16.0	63.0	2—63	22.8	38.8%
E	土霉素	15	32.0	200	4—500	97.1	90.1%
	氯霉素	15	63.0	63.0	16—125	59.1	100%
	TMP/SMZ	15	64/320	64/320	16/80—1 000/5 000	2 063/1 0320	70.0%
	痢特灵	15	125	125	8—500	135.8	73.3%

* 试验菌株分别为 50% 和 90% 被抑制时的 MIC (MIC for 50% and 90% inhibitions)

** 耐药率的计算标准: 土霉素, MIC>6; 氯霉素, MIC>9; 痢特灵, MIC>25; TMP/SMZ, MIC>200/800 为耐药性菌株 (The standards for resistant strains are: Oxytetracyclin, MIC>6; Chloamphenicol, MIC>9; Furazolidone, MIC>25; TMP/SMZ, MIC>200/800)

表 5 5 个养鳗场鳗鲡赤鳍病原菌的耐药性

Tab. 5 Summary of the drug resistance of the pathogens of eel red fin disease in 5 eel farms

药 物 Drug	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC 范围 Range	平均 MIC Average	耐药率(%) Percentage of resistant strains	AS1.927 MIC
土霉素	50.5	250	1—500	109.3	78.8	1.0
氯霉素	63.0	500	2—500	123.2	90.7	1.2
TMP/SMZ	126/630	1 000/5 000	2/10—1 000/5 000	720/3 600	42.5	10/50
痢特灵	63.0	125	1—500	79.7	65.5	3.0

严重的耐药性。因此合理用药,有计划地交替使用药物,筛选多种水产用药,发展免疫诊断,免疫防治的新技术新方法可能是解决鳗鲡病原菌耐药性病害的有效途径。

参 考 文 献

- 〔1〕 杨履清, 1986. 微生物学及检验技术. 广东科技出版社。
〔2〕 李影林等, 1989. 临床医学检验手册. 吉林科学技术出版社。
〔3〕 王肇麟等, 1985. 尼罗罗非鱼腐皮病致病菌的研究. 水产学报, 9(3): 217—221。
〔4〕 Krieg, N. R. & Holt, J.G., 1984. Bergey's Manual of systematic bacteriology, Vol. 1. The Baltimore/London.
〔5〕 Shimizu, T. et al., 1969. Pathogenic properties of substance in the eel. *Bull. of the Japan. Soc. of Sci. Fisher.*, 35(1): 55—56.

ISOLATION, IDENTIFICATION AND DRUG RESISTANCE
OF THE PATHOGENS OF RED FIN DISEASE IN EELS

Chen Huibo

(Shantou University, 515063)

Lin Dongyang Weng Yanlin and Wang Li

(Institute of Eel Culture, Shantou, 515061)

Abstract

Pathogens were isolated from 25 eels suffering from red fin disease in the culture ponds of five eel farms. The isolated pathogen was proved to be *Aeromonas hydrophila*. Eighty seven strains were tested against oxytetracyclin, chloramphenicol, trimthoprim-sulfamethoxazole (TMP/SMZ) and furazolidone respectively to determine the MIC. The results showed high degrees of resistance of the pathogen to the four antimicrobial agents tested. The average MIC, MIC₅₀ and percentage of resistant strains for oxytetracyclin were 109.3 μ g/ml, 50 μ g/ml and 78.8% respectively; those for chloramphenicol were 123.2 μ g/ml, 63.0 μ g/ml and 90.7% respectively; those for TMP/SMZ were 720/3600 μ g/ml, 126/630 μ g/ml and 42.5% respectively; and those for furazolidone were 79.7 μ g/ml, 63.0 μ g/ml and 65.5% respectively. The average MIC for the four antimicrobial agents were 109.3, 102.7 and 26.6 times respectively the MIC of the sensitive control strains.

Key words *Aeromonas hydrophila*, Eel, Red fin disease