

月鳢肠炎病的病原分离与鉴定

雷爱莹

(广西水产研究所 南宁 530021)

提要 本文对月鳢肠炎病进行了病原分离鉴定、人工感染和药敏试验,确认豚鼠气单胞菌为此肠炎病的病原菌。

关键词 月鳢 肠炎病 豚鼠气单胞菌

月鳢俗称七星鱼,其肉质细嫩鲜美,无肌间刺,蛋白质含量高,既有食用价值又有药用价值。近年来,随着月鳢养殖的迅速发展,病害频繁出现,而国内关于月鳢病害方面的报道甚少。肠炎病是月鳢养殖中流行广、危害大的一种疾病,笔者对此病进行了病原分离鉴定、人工感染试验和药敏试验,确定豚鼠气单胞菌为月鳢肠炎病的病原菌,现将有关试验情况报告如下:

一、材料和方法

1. 试验用病鱼的来源

病鱼取自南宁、柳州两地区月鳢养殖场的自然发病池,选取有典型症状的濒死病鱼作为试验材料。病鱼主要症状为:体色发黑、离群独游、游动缓慢、食欲减退、腹部膨大,肛门红肿或红烂;解剖后发现腹腔内积有淡黄色腹水,肠道呈紫红色。

2. 病原菌的分离和鉴定

在无菌条件下,用75%酒精消毒病鱼体表,以无菌接种环从肌肉和肝脏等内脏器官挑取病料,分别划线接种于普通营养琼脂平板、血平板和TCBS培养基上,置28℃恒温箱中培养24小时后,选取形态、色泽一致占优势的菌落重复划线分离,获得纯培养。然后按照《一般细菌常用鉴定方法》(中科院微

生物研究所细菌分类组著)和《病原细菌检验技术》(韩文瑜等著)进行生物学性状测定,根据Krieg和Holt(1984)的分类法鉴定至种。

3. 人工感染试验

试验鱼在水族箱中暂养一天,然后选取健壮、无病症表现、个体大小相近者,随机取样分组,供人工感染试验用。所用菌均为在斜面培养基上培养24小时后,用无菌生理盐水洗脱、稀释至所需浓度的菌悬液。

(1) 注射感染

用75%酒精棉球在鱼体侧消毒后,用灭菌注射器将浓度为 9×10^8 个/ml的菌悬液对鱼体进行肌肉注射,每尾鱼注射0.1ml,对照组注射0.1ml的无菌生理盐水。

(2) 口服感染

用无菌生理盐水洗脱培养24小时的病原菌,每1ml菌悬液(含菌量 3×10^9 个/ml)与5g饵料均匀混合,静止吸附10分钟后投喂,每天投喂2次,每缸每次5g,并及时吸去残饵,对照组的饵料不加菌悬液。

(3) 病原菌的重复分离和重复感染

从肌肉注射感染病的试验鱼中,选取症状明显的濒死病鱼,用其脏器分离病原菌单株,挑取与原感染试验形态相一致的纯培养菌株,经肌肉注射做重复感染试验。

(4) 病原菌对药物的敏感性试验

采用药敏纸片扩散法进行。将培养 18~24 小时的细菌以无菌生理盐水 4ml 制成菌悬液,取 0.1ml 涂于普通营养琼脂平板,将药敏纸片贴于平板表面,室温放置半小时后,再置于 28℃ 恒温箱中培养 24 小时,记录纸片周围抑菌圈直径。

二、结果

1. 人工感染试验

试验结果见表 1、表 2、表 3。由表 1 的注射感染试验可以看出,死亡开始于注射 12 小时后,死亡高峰出现在注射 18~24 小时,48 小时后除 1 尾鱼存活外,其余全部死亡。从肌肉注射感染的试验鱼体中均能分离到纯培养状态的单株,选取与原病原菌形态相一致的单株,再经肌肉注射进行重复感染试验,也出现相同的症状,并使健康鱼死亡(见表 2)。由表 3 可以看出,口服感染试验也得到与肌肉注射感染试验相同的结果,但发病和死亡的出现推迟,死亡高峰出现在感染后的第 2 天,死亡现象可一直延续到第 6 天。对照鱼行动活泼,反应敏捷,未出现任何症状。

表 1 分离菌株肌肉注射感染月鳢的观察

菌号	试验鱼 (尾)	经感染后不同时间内的存活数 (尾)				死亡率 (%)
		12	24	36	48(h)	
N ₁	8	8	4	0	0	100
N ₂	8	8	5	2	1	87.50
N ₃	7	7	2	1	0	100
对照	5	5	5	5	5	0

表 2 重复分离菌株肌肉注射感染月鳢的观察

菌号	试验 鱼数 (尾)	经感染后不同时间内的存活数 (尾)				死亡率 (%)
		12	24	36	48(h)	
N ₁ -B	6	6	4	2	1	83.33
N ₂ -B	6	6	3	1	0	100
N ₃ -B	5	5	2	0	0	100
对照	5	5	5	5	5	0

表 3 分离菌株口服感染月鳢的观察

菌号	试验 鱼数 (尾)	经感染后不同时间内的存活数 (尾)						死亡率 (%)
		1	2	3	4	5	6(天)	
N ₁	8	7	4	3	2	1	1	87.50
N ₂	8	6	3	2	1	1	0	100
N ₃	6	5	3	2	2	1	0	100
对照	4	4	4	4	4	4	4	0

2. 药敏试验

分离菌株对抗菌药物敏感性试验结果见表 4。分离菌株对环丙沙星、氯霉素、磺胺增效剂、氟哌酸(复方)、恩诺沙星高度敏感,对痢特灵、庆大霉素、丁胺卡那霉素、链霉素、红霉素、磺胺中度敏感,对青霉素、氨苄青霉素、苯唑青霉素不敏感。

3. 病原菌的鉴定

所有分离菌株都是革兰氏阴性,能运动的短杆菌。在普通营养琼脂培养基上形成圆形、湿润、表面光滑、边缘整齐、微凸、乳白色的菌落。细菌在 TCBS 琼脂平板上不生长,氧化酶、过氧化氢酶阳性,发酵葡萄糖产酸不产气。H₂S 产生, V-P 反应等为阴性。根据细菌形态和生理生化特性的测定,被鉴定为豚鼠气单胞菌。详细特征列于表 5。

表 4 分离菌株对抗菌药物的敏感度

抗菌药	氯霉素	磺胺增效剂	庆大霉素	链霉素	红霉素	痢特灵	氟哌酸(复方)	恩诺沙星	丁胺卡那霉素	青霉素	氨苄青霉素	磺胺	苯唑青霉素	环丙沙星
分离菌株	+++	+++	++	++	++	++	+++	+++	++	-	-	++	-	+++

三、讨论

1. 本试验从患肠炎病的月鳢中分离到豚鼠气单胞菌,此菌可引起健康鱼出现与自然病例相似的症状并导致死亡。同时,从死亡鱼体内可重新分离到同样的细菌,因此可以确定豚鼠气单胞菌是月鳢肠炎病的病原菌。

2. 豚鼠气单胞菌是条件致病菌,在水体及池底淤泥中大量存在。一般在条件良好,鱼体质健壮时,并不发病,而当条件恶化或鱼体抵抗力下降时,一旦感染,该菌就

在鱼体内大量繁殖,则可导致疾病暴发。外在条件变化是多种因素综合作用的结果,这些因素包括水体污染、溶氧太低、氨氮偏高、饲料变质、吃食不匀等等,并逐渐引起鱼体抵抗力下降,从而暴发疾病。同时病原体随病鱼及带菌鱼的粪便排到水中,污染饲料,经口感染。因此,在实际生产中,应坚持“以防为主、防重于治”的方针,不投喂不洁或发霉饲料,定期用本报告中具有高敏感作用的抗菌药物拌饵投喂。同时用二氧化氯等消毒剂定期进行鱼体和水体消毒,可减少月鳢肠炎病的发生。

表 5 分离菌株的特性

测定项目	分离菌株 (6株)
运动性	+
革兰氏染色	-
在 TCBS 上生长	-
在 37℃ 肉汤中生长	+
4℃ 生长	+
37℃ 生长	+
42℃ 生长	+
无 NaCl 胨水生长	+
3% NaCl 胨水生长	+
7% NaCl 胨水生长	+
10% NaCl 胨水生长	-
甲基红反应	+
V-P 反应	-
H ₂ S 产生	-
硝酸盐还原	+
吲哚反应	+
柠檬酸反应	-
脲酶	-
氧化酶	+
过氧化氢酶	+
淀粉酶	+

续表 5

测定项目	分离菌株 (6株)
精氨酸双水解	+
精氨酸脱羧	-
赖氨酸脱羧	-
葡萄糖产气	-
苯丙氨酸脱氨	-
鸟氨酸脱氨	-
发酵:	
葡萄糖	+
蔗糖	+
乳糖	-
麦芽糖	+
七叶苷水解	+
肌醇	-
甘露醇	-
鼠李糖	-
山梨醇	-
棉子糖	-
木糖	-
卫矛糖	-
阿拉伯糖	+
水杨苷水解	+