

皱纹盘鲍(*Haliotis discus*)脓疱病的研究

刘金屏 聂丽苹 李太武

(辽宁师范大学, 大连 116022)

丁明进 宋协民 赵蓉

(大连水产养殖公司 116023)

摘要 1993年夏季,大连水产养殖公司槽式养殖的鲍(*Haliotis*)发生脓疱病,死亡率高达50—60%。经分离纯化得9301和9302二个菌株。镜检结果表明,两个菌株均为极生单鞭毛的革兰氏阴性短杆形细菌。在人工感染试验中,健康鲍足肌分别注射两个菌株的菌液,感染率均高达100%。病症与自然发病的完全相同。因此,证明9301和9302菌株即为脓疱病的病原菌。药敏试验表明,两个菌株对氯霉素、复方新诺明高度敏感,对氟哌酸中表敏感。它们的MIC值分别为1.56微克/毫升、3.12微克/毫升、6.25微克/毫升。联合药敏试验表明,氯霉素与复方新诺明或氟哌酸、复方新诺明与氟哌酸联合后的FIC指数均大于0.5而小于1。因此,它们之间的作用均属累加作用。

关键词 皱纹盘鲍, 脓疱病, 药敏试验

皱纹盘鲍(*Haliotis discus*)味道鲜美,市场价格高。大连市自1986年采用槽式工厂化养鲍以来,取得了极为可观的经济效益。但随着养殖业的发展,致使近海水域渐趋富营养化,加之工业、生活污水的排放污染,使水质更加恶化,赤潮频频发生,严重危害了养殖业的发展。近几年来,养殖的鱼、虾、贝、鲍疾病大量发生^[1,2],经济损失惨重。1993年盛夏期间,大连水产养殖公司及市内其它养鲍厂的鲍发生脓疱病,因此病致死的鲍总量达60吨左右,直接经济损失达2,000余万元。

有关鲍的脓疱病,国内尚无详细研究的文献报导。脓疱病的病症是在鲍的足部肌肉上出现微隆起的白色疱,疱破裂后流出白色浓汁并留下2—5毫米的深孔。此时鲍的附着力减弱,直至身体翻转死亡。镜检脓汁发现其中除有少量鲍的组织细胞外,只有一种具有运动能力的杆形细菌。为证实其病原性,进行了病原菌的分离纯化和人工感染试验,同时,针对病原菌进行了药物筛选,找到了有效防治药物(菌株的分离鉴定工作正在进行中)。

材 料 和 方 法

(一)病原菌的分离

1. 培养基 改良肉浸汤琼脂(其中氯化钠增至2%)。改良胰酪琼脂(水改用陈海水)。
2. 病鲍来源 患脓疱病的鲍采自大连水产养殖公司海珍品养殖场生产槽。采后2小时内进行分离工作。
3. 分离培养 先用70%消毒酒精擦拭足部肌肉表面(重点在脓疱部位),然后用灭菌的解剖剪剪破病灶,立刻用灭菌吸管吸出脓汁进行稀释,然后培养在上述两种培养基平板上。置 $18 \pm 1^\circ\text{C}$ 温箱中培养2—7天后观察记录菌落形态,并挑取优势单菌落进行平板划线纯化后接入肉浸汤琼脂斜面试管内和制成冷冻真空干燥安瓿保存。同时对纯化后菌株进行革兰氏染色、运动性观察和电镜观察照像。

(二)人工感染试验

1. 菌液制备 取在肉浸汤琼脂斜面上经 $18 \pm 1^\circ\text{C}$ 、24小时培养的9301、9302菌株(经上述分离纯化并编号)用灭菌的海水分别洗下菌苔,并经离心洗涤后制成 2×10^4 个/毫升和 4×10^8 个/毫升菌液。
2. 健康鲍来源 试验用健康鲍为体长4—4.5厘米(体重10—13克),运动、摄食正常,肉眼观察无病症。采自大连水产养殖公司海珍品养殖场的生产槽。采后置试验用16升水体的玻璃水族箱中暂养三天(饲养期间海水24小时流动、水温 $18 \pm 2^\circ\text{C}$),按生产常规投喂人工饲料。暂养后按试验要求分组,每组十只鲍,置一水族箱内的波纹板上,仍以 $18 \pm 2^\circ\text{C}$ 流水饲养。
3. 试验分组和感染方法 9301和9302两个菌株均按下述三个方法进行感染处理:

第一组肌肉注射感染 先将鲍足部肌肉表面用70%消毒酒精擦拭消毒后用微量注射器浅层肌肉注射 2×10^4 个/毫升的菌液0.01毫升。注射后的鲍在空气中放置五分钟后再放回海水中。对照组只注射灭菌的生理盐水。

第二组口服感染 将人工饲料用菌液(4×10^8 个/毫升)浸泡15分钟后投入波纹板上。对照组的饲料经灭菌的生理盐水浸泡后投入。投入的饲料量均同于常规生产。

第三组创伤感染 先将健康鲍的足肌表面消毒后用灭菌的微量注射器刺破一深1毫米左右的伤口后放入水中。随即将菌液(4×10^8 个/毫升)倒入水中,使成 2×10^3 个/毫升。对照组的鲍也如上述方法刺破足肌,但水中不加菌液,只加同量的灭菌生理盐水。

上述各试验组在处理后的静水养殖12小时再流水养殖和观察7天,记录感染和死亡鲍的数目。

(三)病原菌对抗菌药物的敏感试验

1. 培养基 MH(Mueller-Hinton)肉汤和MH琼脂(其中水改用海水,测定磺胺类药物时不加胨)。
2. 菌液制备 纸片扩散法按Kirby-Bauer法^[3]要求制备。试管稀释法和联合药敏试验用菌液,是先取一环已纯化的试验菌接种于1毫升MH肉汤培养基中, 35°C 培养6小时(此时菌液浓度每毫升相当于9亿),再用MH肉汤按1:1000稀释供用。菌株以9301为代表菌株。
3. 试验方法 用Kirby-Bauer纸片扩散法^[3]测定病原菌对十一种抗菌药物的敏感度(对照标准菌株为大肠埃希氏菌ATCC25922)。结果判定是量取各药物的抑菌环直径后,按Kirby

—Bauer 方法的解释标准确定敏感、中度敏感、耐药的药物。药敏纸片购自大连大学医学院专科学校卫生检验教研室。

根据敏感度测定结果,选择二种敏感药物和一种中度敏感药物,用试管两倍稀释法^[3]测定其最小抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration; MIC)和最小杀菌浓度(Minimum bactericidal concentration; MBC)。

将所选定的二种敏感药物和一种中度敏感药物排列组合成三个联合药物组(二种药物为一个联合药物组),用微滴方阵稀释法^[4](或液体试管棋盘法)测定各联合药物之间的关系。即通过观察单独药敏管和联合药敏管的抑菌情况,确定单药时和联合时各药的 MIC 值,然后按方法中所规定的公式计算各联合药物组的 FIC(Fractional inhibitory combination)的指数(Indices)。根据指数的大小判定联合药物的关系。按规定, FIC 指数 < 0.5 的两药间为协同作用; $0.5 \sim 1$ 为累加作用; $1 \sim 2$ 为无关作用; > 2 为拮抗作用。

结 果

(一)病原菌分离

通过对培养基平板上的菌落观察发现,两种培养基平板上均只有一种优势菌落,分别挑取纯化后得两个菌株,编号为 9301 和 9302 菌株。经对菌体的光镜、电镜观察和革兰氏染色结果证实,其均为革兰氏阴性、极生单鞭毛的短杆形细菌(图 1)。

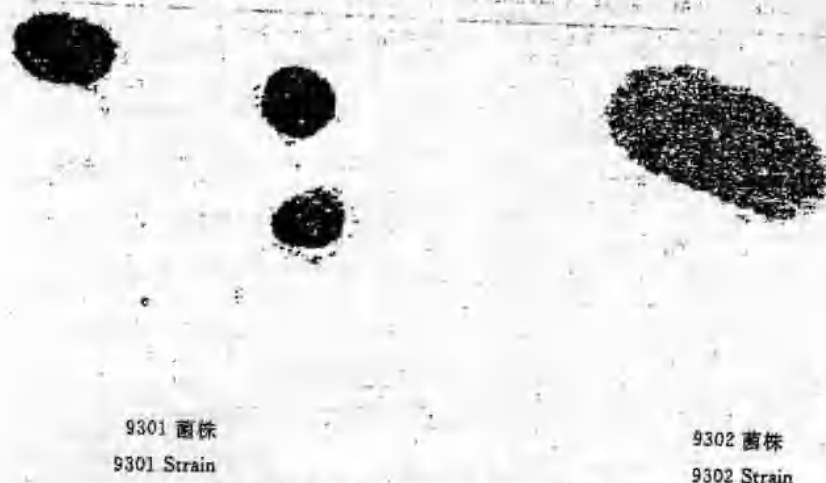


图 1 9301 和 9302 菌株的电镜照片($\times 30,000$)

Fig. 1 Electronic micrographs showing the 9301 and 9302 strains ($\times 30,000$)

(二)人工感染试验

人工感染试验结果列表 1—3。

1. 由表 1 可见,肌肉注射感染的,无论是 9301 还是 9302 菌株,注射后第二天就有一半以上的鲍染病。到第 7 天 10 只鲍全部染病,其中 9 只死亡,感染率达 100%,死亡率达 90%。染病鲍的病症与自然感染的完全相同。再次镜检脓汁和细菌分离所得细菌的形态、特征和革兰氏染色性质与 9301、9302 菌株亦完全相同。对照组到第 6 天才出现一只鲍染病(讨论中将说

明)。

表 1 菌株肌肉注射感染鲍的试验

Table 1 The effects of strains on *H. discus* infection by muscular injection

组别 Group	菌液浓度 Bacteria centration (Cell/ml)	试验鲍数 No. of Haliotis	水温 Water temp (℃)	鲍在不同时间染病和死亡数 No. of infected Haliotis mortality in different days							感染率 Infection (%)	死亡率 Mortality (%)	
				天数 Days	1	2	3	4	5	6			7
9301	2×10 ⁴	10	18±2	染病 Infected	0	7	1	1	0	0	1	100	90
				死亡 Death	0	0	0	4	3	1	1		
9302	2×10 ⁴	10	18±2	染病 Infected	0	6	1	2	1	0	0	100	90
				死亡 Death	0	0	0	5	1	2	1		
对照 Control	生理盐水 Normal saline	10	18±2	染病 Infected	0	0	0	0	0	1	0	10	0
				死亡 Death	0	0	0	0	0	0	0		

2. 口服感染的无论是试验组还是对照组, 7 天内均未见有染病和死亡的(表 2)。

表 2 菌株口服感染鲍的试验

Table 2 The effects of strains on *H. discus* infection by oral route

Table 2 The effects of salinity on the infection of Haliotis													
组别 Group	菌液浓度 Bacteria concentration (Cell/ml)	试验鲍数 No. of Haliotis	水温 Water temp (℃)	鲍在不同时间染病和死亡数 No. of infected Haliotis and mortality in different days							感染率 Infection (%)	死亡率 Mortality (%)	
				天数 Days	1	2	3	4	5	6			7
9301	4×10 ⁸	10	18±2	染病 Infected	0	0	0	0	0	0	0	0	0
				死亡 Death	0	0	0	0	0	0	0		
9302	4×10 ⁸	10	18±2	染病 Infected	0	0	0	0	0	0	0	0	0
				死亡 Death	0	0	0	0	0	0	0		
对照 Control	生理盐水 Normal saline	10	18±2	染病 Infected	0	0	0	0	0	0	0	0	0
				死亡 Death	0	0	0	0	0	0	0		

3. 两个菌株通过创伤感染, 均在实验的最后 2 天才出现少数鲍染病, 感染率为 20—30%, 并脓疱病灶就在足肌被刺伤的部位上。对照组在第 6 天也出现 1 只染病的, 病灶亦在被刺伤的部位上(表 3)。

表3 菌株创伤感染鲍的试验

Table 3 The effects of strains on *H. discus* infection by applying it on the wound

组别 Group	菌液浓度 Bacteria concentration (Cell/ml)	试验鲍数 No. of Haliotis	水温 Water temp (℃)	鲍在不同时间染病和死亡数 No. of infected Haliotis and mortality in different days							感染率 Infection (%)	死亡率 Mortality (%)	
				天数 Days	1	2	3	4	5	6			7
9301	2×10 ³	10	18±2	染病 Infected	0	7	1	1	0	2	1	30	10
				死亡 Death	0	0	0	4	3	0	1		
9302	2×10 ³	10	18±2	染病 Infected	0	6	1	2	1	1	1	20	0
				死亡 Death	0	0	0	0	0	0	0		
对照 Control	生理盐水 Normal saline	10	18±2	染病 Infected	0	0	0	0	0	0	0	10	0
				死亡 Death	0	0	0	0	0	0	0		

(三) 药敏试验

1. 敏感度试验结果列于表4, 9301 和 9302 两个菌株对 11 种抗菌药物的敏感程度表现一致。对氯霉素、复方新诺明和庆大霉素敏感; 对氟哌酸、土霉素、红霉素、痢特灵中度敏感; 对氨苄青霉素、头孢菌素、卡那霉素、链霉素不敏感(或耐药)。

表4 9301 和 9302 菌株的药物敏感性试验

Table 4 The drug sensitivity test of 9301 and 9302 strains

药 物 Drugs	纸片含药量 Amount of drug in papers (μg)	抑菌环直径(mm) The diameter of ring for bacteria inhibited		敏 感 度 Sensitivity
		9301	9302	
复方新诺明 Cotrimoxazole	25	30.6	31	S
氯霉素 Chloramphenicol	30	30	30.8	S
庆大霉素 Gentamicin	10	15	16	S
氨苄青霉素 Benzyl penicillin	10	0	0	R
红霉素 Erythromycin	15	16	17	MS
痢特灵 Furazolidone	10	12	13	MS
头孢菌素 Cephalosporin	30	0	0	R
卡那霉素 Kanamycin	30	0	0	R
链霉素 Streptomycin	10	10	11	R
土霉素 tetracycline	30	17	18	MS
氟哌酸 Norfloxacin	10	16	15	MS

S, 敏感 Sensitivity R, 抗药 Resistant MS, 中度敏感 Moderate sensitivity

2. 根据敏感度测定结果选择了氯霉素、复方新诺明和氟哌酸三种药物, 分别测定了它们的 MIC 值为 1.56 微克/毫升、3.12 微克/毫升、6.25 微克/毫升; MBC 值分别是 3.12 微克/毫升、6.25 微克/毫升、12.5 微克/毫升(表5)。

表5 三种抗菌药物 MIC 和 MBC 值的测定

Table 5 The values of MIC and MBC of three antibacterial drugs

药 物 Drug	药 物 浓 度 Drug concentration (μg/ml)											对照* Control	MIC (μg/ml)	MBC (μg/ml)
	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.19	0.09			
氯霉素 Chloramphenicol			-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	1.56	3.12
复方新诺明 Cotrimoxazole		-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	3.12	6.25
氟哌酸 Norfloxacin	-	-	-	-	-	+	+	+	+			+	6.25	12.5

+ : 表示有菌生长 Indicated the growth of bacteria

- : 表示无菌生长 Non-bacteria growth

* : 不加药物 Control drug non-existent

3. 联合药敏试验结果(表6)表明,氯霉素与复方新诺明或氟哌酸,复方新诺明与氟哌酸三个联合药物组的 FIC 指数均大于 0.5 而小于 1。因此各联合药物之间的关系均可判定为累加作用。

表6 三种抗菌药物联合药敏试验

Table 6 The drug sensitivity test of three antibacterial drugs used in combination

组 别 Group	单药时的值(μg/ml) MIC of single drug			联合时的值(μg/ml) MIC of drugs used in combination			FIC 指数 Index of FIC
	A	B	C	MICA	MICB	MICC	
A+B	1.56	3.12		0.78	0.78		0.75
A+C	1.56		6.25	0.39		3.12	0.66
B+C		3.12	6.25		0.78	3.12	0.65

A: 氯霉素 Chloramphenicol B: 复方新诺明 Cotrimoxazole C: 氟哌酸 Norfloxacin

* FIC 指数公式: FIC 指数 = A 药联合时的 MIC/A 药单独时的 MIC + B 药联合时的 MIC/B 药单独时的 MIC

Formula Index of FIC = [MIC of drug A combination/MIC of drug A] + [MIC of drug B combination/MIC of drug B]

讨 论

根据肌肉注射和创伤感染实验结果可以确定,本实验所分离的 9301 和 9302 菌株即为鲍脓疮病的病原菌。在鲍的足肌上有伤口时,病原菌才侵入并在局部繁殖,致使足肌上形成脓疮,故而鲍失去附着力。口服感染则不能引发鲍发生脓疮病,而且鲍的运动和摄食正常。

应指出的是,创伤感染时的感染率明显低于肌肉注射组,出现感染的时间也晚四天。我们认为其原因可能是由于水环境中病原菌含量(2×10^3 个/毫升)低,鲍虽有伤口,但局部的菌量不足,接触时间又短(12 小时后流水饲养),因而构成侵染的机会就少。至于对照组出现个别鲍感染的现象,可能是由于实验期间海水中存在有相同的病原菌(实验用海水未经无菌过滤),恰巧肌肉注射和创伤感染的对照组的鲍足肌均刺有伤口,因此出现个别鲍染病也是符合实验的实际情况的。

单独药敏和联合药敏实验结果表明,氯霉素、复方新诺明、氟哌酸单用时的 MIC 值和联

(下转第 100 页)