

文章编号: 1674-5566(2010)05-0631-04

光唇鱼赤皮病病原研究

张玉明¹, 周志明², 潘晓艺²

(1 浙江省新昌县水产技术推广中心, 浙江 新昌 312500;

2 浙江省淡水水产研究所, 浙江 湖州 313001)

摘要: 浙江新昌某养殖场的光唇鱼 (*Aerrossocheilus fasciatus*)爆发赤皮病,发生大量死亡,从患病鱼肝脏中分离到菌株 GCL100301,通过人工感染试验,确定该菌株为病原。通过生理生化和分子生物学鉴定,该菌株 GCL100301被鉴定为荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)。通过对该菌株的药物敏感试验,发现其对环丙沙星、新霉素敏感,对青霉素、复方新诺明、先锋 V、新生霉素、痢特灵和头孢噻吩完全耐药。研究结果为光唇鱼病害防治提供了理论依据。

关键词: 光唇鱼;赤皮病;荧光假单胞菌

中图分类号: S 943 **文献标识码:** A

Study on the pathogen of red-skin disease of *Aerrossocheilus fasciatus*

ZHANG Yu ming¹, ZHOU Zhiming², PAN Xiaoyi²

(1 Fisheries technical extension center of Zhejiang Xinchang County, Xinchang 312500, China;

2 Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries Huzhou 313001, China)

Abstract: Mass mortalities of *Aerrossocheilus fasciatus* with red-skin were occurred in Xinchang fishery farm, Zhejiang province in March 2010. The bacteria strain GCL100301 was isolated from liver of moribund *Aerrossocheilus fasciatus* and identified by the bacteriological and molecule biology method which were identified as *Pseudomonas fluorescens*. The strain was sensitive to Ciprofloxacin and Neomycin and resistant to Penicillin, SMZ+TMP, Cefazolin, Novobiocin, Furazolidone and Ceftofur. It would provide theoretical event for prevention and cure this disease.

Key words: *Aerrossocheilus fasciatus*; red-skin disease; *Pseudomonas fluorescens*

光唇鱼 (*Aerrossocheilus fasciatus*)俗称淡水石斑鱼、罗丝鱼等,隶属鲤形目、鲤科、鲃亚科、光唇鱼属,是一类在山涧溪流和江河中上游等急流环境中栖息的小型淡水鱼类,成鱼体长可达 15~20 cm,其体侧具有 6 条垂直条纹,体色鲜艳,具有较高经济价值^[1],且肉质细嫩,颇受消费者的青睐,是目前正在推广养殖的小型淡水鱼类,未见有疾

病的报道。

自 2008 年以来,在绍兴养殖的光唇鱼出现了较大规模的赤皮病。主要病症表现为活力降低、吃食减少、表皮常出现赤皮、微出血。发病高峰为 3—5 月,发病率 70%,死亡率 52%。该病给光唇鱼养殖业造成严重的经济损失。本文对患病光唇鱼赤皮病的病原菌进行了分析鉴定,并进行

收稿日期: 2010-04-27

基金项目: 绍兴市科学技术局项目 (2006A32010)

作者简介: 张玉明 (1963—),男,高级工程师,主要从事水产动物种苗繁育。E-mail: zym6886@163.com

了药物敏感性实验,为开展光唇鱼赤皮病的药物防治提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

病鱼取自浙江省新昌某光唇鱼养殖场,鱼重 25~30 g 健康鱼取自新昌沃洲鱼类开发研究所苗种基地,水池暂养备用。

1.2 病原菌分离

患病光唇鱼症状为表皮赤皮、微出血。取发病症状典型的濒死鱼,用 70% 的酒精棉球反复擦拭消毒体表,用无菌剪刀打开腹腔,无菌操作取肝脏、脾脏和肾脏等组织,划线接种于胰蛋白胨大豆琼脂 (TSA) 培养基平板上,20℃ 培养 24 h 后,挑取形态特征一致的优势菌落进行纯培养,转接斜面保存备用。

1.3 病原菌的人工感染试验

在 60 cm×50 cm×40 cm 水体的玻璃缸中,每缸放养体重 20~25 g 的健康光唇鱼 10 尾,共计 90 尾,连续充气,暂养 5 d 后进行腹腔注射感染试验。感染浓度为 4×10^8 、 4×10^7 、 4×10^6 CFU/mL 剂量为 0.1 mL 对照组注射同量无菌生理盐水。连续 7 d 观察并记录试验光唇鱼死亡数,同时对人工回归感染发病濒死的试验光唇鱼进行病原菌再分离,观察再分离的菌株与原分离菌株在形态与理化特性等方面是否一致。

另采集自然发病、症状典型病光唇鱼的肝胰腺,按 1:10 添加灭菌生理盐水进行冻融研磨,10 000 r/min 离心,上清过 0.22 μm 滤膜,滤液对健康光唇鱼 (10 尾) 进行攻毒。

1.4 病原菌鉴定

1.4.1 菌株生理生化特性测定

纯培养的细菌经 20℃ 培养 48~72 h 后,依据《常见细菌系统鉴定手册》^[2] 和《Bergey's

Manual of Systematic Bacteriology》^[3] 对菌株进行生理生化特性测定和鉴定。

1.4.2 gyrB 基因鉴定

分子生物学操作参照文献 [4] 进行,引物采用 gyrB 基因通用引物^[5],gyrBF: 5'-ACAACTCCT ACAAGGTCTCCG-3' 和 gyrBR: 5'-TCAGCAGCA GGGTACGGATGT-3'。PCR 扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳并进行回收纯化,引物合成和测序由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.5 序列分析

待鉴菌株 gyrB 基因序列通过 NCBI 的 Blastn 检索系统进行序列同源性比对。

1.6 药敏试验

以涂布法接种病原菌于 TSA 培养基平板上,贴上药敏纸片 (直径 6 mm),20℃ 培养 48 h 后测抑菌圈直径。所用药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司。

2 结果

2.1 病原菌的分离与致病性试验

从自然发病的光唇鱼肝脏中分离到 1 株菌株,命名为 GCL100301 其 gyrB 序列 GenBank 登录号为: HM193858 同源性分析结果显示与荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 有 90% 的同源性。

经人工回归感染试验,7 d 内, 4×10^8 CFU/mL 浓度细菌对光唇鱼的致死性极强,死亡率高达 100%;经 4×10^7 CFU/mL 浓度细菌感染后,光唇鱼的死亡率达 75% (表 1)。试验病鱼也表现出了部分临床症状,而且从人工回归感染濒死的病鱼体内也可分离到与菌株 GCL100301 形态特征及理化特性一致的菌株。组织滤液对健康光唇鱼进行攻毒,20 d 内未发现死亡。说明该病的主要病原为荧光假单胞菌。

表 1 人工回归感染结果

Tab. 1 Results of artificial infection test of strain GCL100301

菌株	注射浓度 (CFU/mL)	鱼尾数	累计死亡尾数 (尾)							死亡率 (%)
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	
GCL100301	4×10^8	20	0	8	16	20	20	20	20	100
	4×10^7	20	0	6	14	15	15	15	15	75
	4×10^6	20	0	0	0	0	0	0	0	0
PBS	—	20	0	0	0	0	0	0	0	0

2.2 病原菌的鉴定

2.2.1 病原菌生理生化特征测定

GCL100301菌株在 TSA 平板上呈灰白色,表面湿润光滑,微隆起,边缘整齐,革兰氏染色阴

性。根据生理生化特性,该菌株与荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)的生理生化特性相符,初步鉴定为荧光假单胞菌(表 2)。

表 2 生理生化特性

Tab. 2 The results of biochemical experiment

项目	菌株		项目	菌株	
	GCL100301	<i>P. fluorescens</i>		GCL100301	<i>P. fluorescens</i>
氧化酶 OX	+	+	革兰氏染色 GOF	G-O	G-O
半乳糖苷酶 ONPG	-	-	明胶酶 GEL	-	+/-
精氨酸双水解酶 ADH	+	+	葡萄糖 GLU	-	+/-
赖氨酸脱羧酶 LDC	-	-	甘露糖 MAN	-	-
鸟氨酸脱羧酶 ODC	-	-	肌醇 INO	-	-
柠檬酸盐 CIT	+	+	山梨醇 SOR	-	-
H ₂ S	-	-	鼠李糖 RHA	-	-
脲酶 URE	-	-	蔗糖 SUC	-	-
色氨酸脱氨酶 TDA	-	-	蜜二糖 MEL	+	+/-
吡啶 IND	-	-	苦杏仁苷 AMY	-	-
VP	+	+/-	阿拉伯糖 ARA	-	+/-
生长温度			运动性	+	+
4℃	+	+	荧光色素	+	+
41℃	-	-			

2.2.2 病原菌 *gyrB* 基因鉴定及序列分析

通过以 *gyrB* 基因的通用引物, GCL100301 基因组为模板扩增获得长度约 1 200 bp 左右的片段(图 1), 测序结果得到 1 114 bp 的 DNA 片段, GenBank 登录号为 HM193858。通过 NCBI 的 Blastn 检索系统进行基因序列同源性检索, 发现同源性排前 3 位的菌株都属于假单胞菌属 (*Pseudomonas* spp)。与荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、草莓假单胞菌 (*Pseudomonas fragi*) 和恶臭假单胞菌的同源性分别为 98%、91%、90%。结合生理生化结果, 菌株 GCL100301 与荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 具有高度相似性, 初步鉴定为荧光假单胞菌。

2.3 药敏结果

通过菌株 GCL100301 对 12 种药物的敏感性试验, 结果表明菌株 GCL100301 对环丙沙星、新霉素敏感, 对青霉素、复方新诺明、先锋 V、新生霉素、痢特灵和头孢噻吩完全耐药, 其余药物中度敏感。具体结果见表 3。

3 讨论

光唇鱼是我国一种较新的养殖品种, 自开始

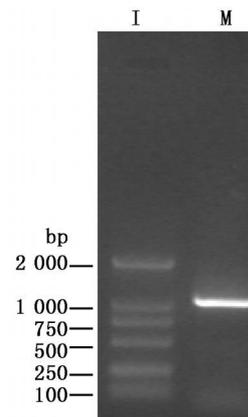


图 1 GCL100301 菌株 *gyrB* 基因扩增产物电泳图

Fig 1 The electrophoresis photograph of PCR amplification of *gyrB* gene from strain GCL100301

人工养殖以来, 疾病病原未有报道。本研究对光唇鱼赤皮病的病原进行了分离鉴定, 人工感染试验证实, 菌株的毒力很强, 导致光唇鱼患病死亡。因此认为荧光假单胞菌为该病的病原。对于鱼类来说, 荧光假单胞菌是常见的条件致病菌, 能够引发赤皮病。当鱼体因捕捞、运输、放养等人工操作或机械损伤、冻伤或被寄生虫寄生而受伤时病菌就会乘虚而入从而引发赤皮病。

荧光假单胞菌能引起食物(如牛奶)的污染, 还能引起人类疾病, 如皮肤病、假性菌血症、骨髓

表 3 菌株 GCL100301 的药物敏感性

Tab 3 The antibiotic sensitivity of strain GCL100301

药物	纸片含量 (μg /片)	抑菌圈 (mm)	药物	纸片含量 (μg /片)	抑菌圈 (mm)
青霉素 G	10	—	痢特灵	300	—
多粘菌素 B	30	13	新霉素	30	18
复方新诺明	23.75	—	头孢噻吩	5	—
庆大霉素	10	15	链霉素	10	13
先锋 V	30	—	氟哌酸	10	15
新生霉素	30	—	环丙沙星	5	18

炎和呼吸道感染等疾病^[6-12]。荧光假单胞菌还能感染海水鱼类和淡水鱼类^[13-14]。目前水产品养殖中由荧光假单胞菌引起的病害有皱纹盘鲍溃烂病、烂鳍病、罗非鱼假单胞菌病、草鱼赤皮病^[15]、斑点叉尾鲴套肠症^[16]、草鱼细菌性并发症和虾育苗“发光”病(虾荧光病)等。舒新华等发现荧光假单胞菌能感染牛蛙^[17];王高学等发现荧光假单胞菌能感染大鲵^[18]。印度的 Swain 报道荧光假单胞菌是印度鲤的常见病原菌^[19]。在克罗地亚荧光假单胞菌被认为是大马哈鱼的常见病原菌^[20]。

作为淡水养殖中常见致病菌荧光假单胞菌,在实际养殖中的防治方法比较局限,常靠通过环境改良有益微生物使用间接抑制荧光假单胞菌的繁殖,或使用化学药物进行治疗。本研究分离的荧光假单胞菌对多种药物产生了耐药,仅对环丙沙星和痢特灵具有一定的敏感性,说明了化学药物疗法的潜在危险性。因此对荧光假单胞菌的有效和无公害防治将成为该病防治的重点。

参考文献:

- [1] 伍献文. 中国鲤科鱼类志(下卷)[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1977: 296—298.
- [2] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 188—189.
- [3] George M, Julia A, Timothy G, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd ed Vol 2 [M]. New York: Springer, 2005: 425—437.
- [4] 萨姆布鲁克, 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 387—392.
- [5] 邓国成, 江小燕, 叶星, 等. 草鱼出血病混合感染的嗜水气单胞菌的分离、鉴定与理化特性[J]. 微生物学通报, 2009, 36(8): 1170—1177.
- [6] Gilligan P H, Whittier S, Murray P R, et al. Manual of clinical microbiology [M]. Washington DC: American Society of Microbiology, 1995: 509—519.
- [7] Von Gmevenitz A, Weinstein J. Pathogenic significance of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* [J]. Yale J Biol Med, 1971, 44(3): 265.
- [8] Anderson M, Davey R. Pseudobacteremia with *Pseudomonas fluorescens* [J]. Med J Aust, 1994, 160(4): 233—234.
- [9] Murray A E, Bartzokas C A, Shepherd A J, et al. Blood transfusion-associated *Pseudomonas fluorescens* septicemia: is this an increasing problem [J]. J Hosp Infect, 1987, 9(3): 243—248.
- [10] Zervos M, Nelson M. Cefepime versus ceftriaxone for empiric treatment of hospitalized patients with community-acquired pneumonia [J]. Antimicrob Agents Chem, 1998, 42(4): 729—733.
- [11] Hessen M T, Ingeman M J, Kaufman D H, et al. Clinical efficacy of ciprofloxacin therapy for gram-negative bacillary osteomyelitis [J]. Am J Med, 1987, 82(4): 262—265.
- [12] Hsueh P R, Teng L J, Pan H J, et al. Outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bacteremia among oncology patients [J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(10): 2914—2917.
- [13] Newman D J, Cragg G M. Advanced preclinical and clinical trials of natural products and related compounds from marine sources [J]. Curr Med Chem, 2004, 11(13): 1693—1713.
- [14] Carvalho M F, Ferreira J R, Pacheco C G, et al. Isolation and properties of a pure bacterial strain capable of fluorobenzene degradation as sole carbon and energy source [J]. Environ Microbiol, 2005, 7(2): 294—298.
- [15] 柳富荣. 常见鱼病防治新技术——赤皮病 [J]. 湖南农业, 2007, (6): 17.
- [16] 刘金玉, 杨五名, 李爱华, 等. 斑点叉尾鲴套肠症的病原学初步研究 [J]. 水生生物学报, 2008, 32(6): 824—831.
- [17] 舒新华, 金燮理, 萧克宇, 等. 牛蛙腐皮——红腿病并发症致病菌研究 [J]. 生命科学研究, 1997, 1(1): 54—59.
- [18] 王高学, 白占涛, 张向前. 大鲵赤皮病病原鉴定及防治试验 [J]. 西北农业大学学报, 1999, 27(4): 71—74.
- [19] Swain P, Nayak S K, Sahu A, et al. High antigenic cross-reaction among the bacterial species responsible for diseases of cultured freshwater fishes and strategies to overcome it for specific serodiagnosis [J]. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2003, 26: 199—211.
- [20] Kapetanovic D, Vardic I, Kurtovic B, et al. Detection of the causative agent of furunculosis *Aeromonas salmonicida* in salmonids of the Krka River [J]. Vet Res Commun, 2008, 32: 131—135.