

赵彦华,刘洪岩,孙梦玲,等. 养殖沙塘鳢烂鳃症病原研究及最适治疗药物的筛选[J]. 江苏农业科学,2018,46(9):171-173.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.09.040

# 养殖沙塘鳢烂鳃症病原研究及最适治疗药物的筛选

赵彦华,刘洪岩,孙梦玲,史杨白,薛 晖

(江苏省淡水水产研究所,江苏南京 210017)

**摘要:**近年来,在沙塘鳢养殖过程中出现大量暴发的烂鳃症,病鱼症状主要表现为行动迟缓,脾脏肿大,头部皮肤和鳃部溃烂较为严重,肠道出血;采集江苏省沙塘鳢主要养殖基地病料,分离病原菌,通过显微镜观察,运用生理生化指标鉴定及 16S rDNA 同源性分析等方法,对从肠道及鳃部分离的病原菌进行了鉴定;其形态特征及生理生化指标符合嗜水气单胞菌的特点,GenBank 中同源系列检索结果显示,该菌与嗜水气单胞菌的 16S rDNA 序列同源性高达 99%;药物敏感性试验显示该菌对诺氟沙星的敏感性最高,人工感染选择诺氟沙星进行治疗,治疗效果较好。

**关键词:**沙塘鳢;烂鳃症;病原菌;嗜水气单胞菌

**中图分类号:** S943 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)09-0171-03

沙塘鳢属(*Odontobutis*)别称沙乌鳢、蒲鱼、土布鱼、沙鳢、虎头鱼等,隶属于鲈形目(Perciformes)鰕虎鱼亚目(Gobioidae)塘鳢科(Eleotridae),主要分布于长江中下游、钱塘江、闽江等水系<sup>[1]</sup>;沙塘鳢多生活于湖泊、河沟的静水区或近岸浅水区,是一类小型底栖肉食性鱼类<sup>[2]</sup>。该鱼因味道鲜美、营养丰富、肉质细腻又少刺而广受人们喜爱。近年来,随着市场需求的不断增长,沙塘鳢的人工养殖规模不断扩大,并且已经在多个省市的养殖区开展了混养和套养;然而养殖规模的增大远不及市场需求的增长,在生产该鱼苗种过程中,生产单位不注重该鱼种质资源管理,导致养殖成鱼发生生长速度变慢、病害增加等种质退化现象<sup>[3]</sup>。沙塘鳢种质的退化以及养殖水质的恶化导致了沙塘鳢抗病力的下降,尤其是细菌性疾病的大量暴发,2016 年 7 月在江苏南京和扬中沙塘鳢养殖基地沙塘鳢暴发烂鳃症,死亡率高达 80%,给养殖户造成了极大的损失。

笔者所在课题组多次赶赴发生病害的南京和扬中养殖基地采集病料,从采集回的病鱼的鳃部和肠道等多处组织中分离细菌经培养获得 2 株形态高度一致的病原菌,并对其进行了传统生理生化指标检测以及 16S rDNA 同源性分析,结果表明 2 株病原菌均为嗜水气单胞菌。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料采集

患病沙塘鳢采集于南京及扬中等地的养殖基地,采集时间为 2016 年 7—8 月,体长为 6~9 cm,体质量为 6~12 g;健康的沙塘鳢采集自江苏省淡水水产研究所沙塘鳢繁育基地,平均体长为 7 cm,平均体质量为 8 g。

收稿日期:2016-12-05

基金项目:江苏省科技计划现代农业项目(编号:BE2015368)。

作者简介:赵彦华(1986—),女,山东威海人,硕士,研究实习员,主要从事水产病害研究。Tel:(025)86581554;E-mail:njzhaoyanhua@163.com。

通信作者:薛 晖,硕士,研究员级高级工程师,主要从事水产病害研究及防控。Tel:(025)86581554;E-mail:jsxuehui@163.com。

### 1.2 病鱼症状及解剖观察

选取症状明显的患病沙塘鳢,观察并记录病鱼可见的体表特征,用消毒乙醇进行体表消毒,严格按照实验室无菌操作方法,剪开其腹部,观察其腹腔内肝脏和肠道情况。

### 1.3 病原菌分离及显微镜镜检

选取典型症状病鱼的鳃部及肠道进行划线接种,接种于普通琼脂平板培养基,28℃恒温培养 48 h,挑取形态特征一致的病原菌进行划线分离纯培养 3 次,随后将分离到的病原菌接种于肉汤培养基 4℃保存。将上述纯培养后的细菌挑取单个菌落,进行细菌涂片,干燥固定后用革兰氏染色法进行镜检,观察细菌形态及染色特性。

### 1.4 溶血性试验

将分离到的细菌培养的上清液加入到微量血凝板上,然后分别加入等量不同动物的 1%红细胞,于 37℃恒温培养箱放置 1 h,观察结果。

### 1.5 生理生化指标检测

将分离纯化后得到的病原菌接种于各种生化试剂,具体操作参照文献[4]进行,以微量发酵管法进行葡萄糖产气、V-P、甘露醇、水杨苷、七叶苷、硫化氢、阿拉伯糖、肌醇、蔗糖的生化试验;常规法分别进行运动性、鸟氨酸脱羧酶试验。氧化酶测定用试纸法,变红者判为阳性。

### 1.6 序列同源性分析

**1.6.1 DNA 模板的制备** 挑取典型的单个菌落,稀释至 50 μL 的去离子水中,沸水浴 5 min,然后 4℃12 000 r/min 离心 15 min,上清即为模板 DNA。

**1.6.2 PCR 扩增** 按照广谱细菌 16S rDNA 扩增引物进行 PCR 扩增,扩增引物为正向 27F:5'-AGTTTGATCMTGGCTCAG-3',反向 1492R:5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'进行扩增。PCR 反应体系(25 μL)含:2.5 μL 10×PCR 缓冲液(含 Mg<sup>2+</sup>),1 μL 10 mmol/L 4×dNTP,10 μmol/L 正向和反向引物各 0.5 μL,0.2 μL *Taq* DNA 聚合酶(5 U),0.5 μL 模板,加入去离子水至 25.0 μL。PCR 反应条件为:94℃预变性 4 min;94℃变性 15 s,55℃退火 45 s,72℃延伸 1 min,30 个循环;72℃延伸 10 min。PCR 扩增产物由上海生工生物工

程技术有限公司进行纯化和测序。

1.6.3 序列分析 测序后在 GenBank 数据库中分别输入 2 株病原菌测得的 16S rDNA 序列并进行 Blast 比对。

1.7 人工感染试验

将健康的沙塘鳢置于水族箱暂养 7 d,水族箱规格为 1 100 cm×500 cm×700 cm,水温控制在 28 ℃,日换水量为 40%,按时投喂鲜活虾苗并及时清理水族箱,设置 4 个试验组和 1 个对照组,每组 6 尾鱼,通过试验“1.3”节至“1.5”节发现所得菌株各项指标均一致,因而挑选其中 1 株 Y-S01(从鳃部分离获得)为代表菌株进行试验,将肉汤培养细菌原液倒入水族箱中,用灭菌枪头将沙塘鳢体表皮划伤后,放入水族箱中,保证划伤部位接触到病原菌,每次换水后补加细菌 1 次;对照组沙塘鳢则采用同样的方法将皮肤划伤后,放入等量体积的无菌肉汤培养基,正常饲养。通过连续 14 d 观察试验组和对照组,记录沙塘鳢症状及发病时间,取发病沙塘鳢鳃部和肠道等部位进行病原菌的分离及鉴定。

1.8 药敏试验及最适药物筛选

选取水产上常用抗生素,按照常规纸片进行试验,培养温度为 28 ℃,参照文献[5]的标准进行结果判定。依据药敏试验结果,挑选出药敏性较高的药物对试验组发病鱼进行分组治疗。

2 结果与分析

2.1 病鱼症状及解剖情况

病鱼表现出摄食量减少、游动迟缓、常静止不动漂浮于水面上,体表和肠道都出现不同程度的出血,鳃部和头部溃烂,肝脏呈现土黄色,发病后死亡率极高。

2.2 病原菌分离及显微镜镜检

从病鱼鳃部及肠道采集分离得到 2 株细菌,分别编号为:Y-S01 和 Y-C01,2 株细菌经普通琼脂培养后得到形态、大小及颜色高度一致的菌落,在普通琼脂培养基上菌落呈现肉色或灰白色,形态为圆形,边缘光滑,中央凸起。2 株病原菌经革兰氏染色后,均呈现红色,形态一致,病原菌均呈现两端钝圆的短杆状,单个或呈对排列,显微镜下拍照(图 1)。

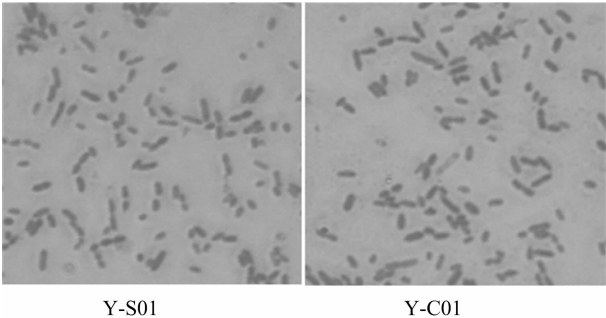


图1 细菌革兰氏染色结果

2.3 溶血性试验

分别选取等量的人 O 型、绵羊、小鼠、鸡、鸭以及鲫鱼红细胞,2 株细菌均能造成血细胞溶血,溶血程度见表 1。

表 1 溶血试验结果

菌株	人 O 型	绵羊	小鼠	鸡	鸭	鲫鱼
Y-S01	++	+	++	+	+	++
Y-C01	+	+	+	+	+	++

注:“+”表示溶血程度。

2.4 生化指标检测

分别将 2 株病原菌进行生化试验,试验结果见表 2。根据生理生化反应结果,可以初步判定分离得到的 2 株细菌为嗜水气单胞菌。

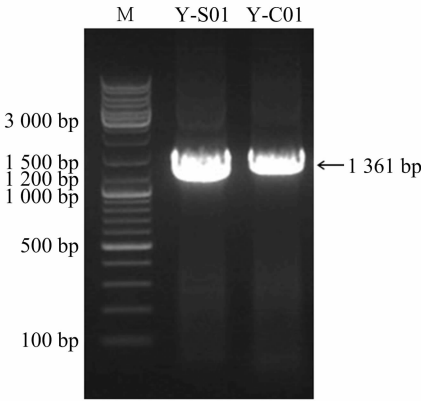
表 2 生化试验结果

项目	结果	
	Y-S01	Y-C01
葡萄糖	(+)	(+)
甘露醇	+	+
水杨苷	+	+
七叶苷	+	+
硫化氢	-	-
阿拉伯糖	+	+
肌醇	-	-
蔗糖	+	+
运动性	+	+
鸟氨酸脱羧酶	-	-
氧化酶	+	+
V-P	+	+

注:“+”表示产酸,“-”表示不发酵,“(+)”表示产酸产气。

2.5 16S rDNA 序列同源性分析

从患病沙塘鳢的肠道和鳃部分离的菌株 PCR 结果见图 2。GenBank 中同源序列检索结果显示,2 株细菌与嗜水气单胞菌属的 16S rDNA 序列自然聚类,与 2 株分离菌相似度最高的 8 个结果均同属于嗜水气单胞菌属;另根据病原菌的显微镜镜检以及生化试验结果,最终确定分离到的 2 株菌均为嗜水气单胞菌。



M—DNA maker; Y-S01—鳃部分离获得的菌株; Y-C01—肠道分离获得的菌株

图2 2 株病原菌 PCR 结果

2.6 人工感染

人工感染后,沙塘鳢于试验 6 d 首次出现死亡,死亡高峰期感染的 9 d 和 10 d,至 14 d 试验结束时,试验组死亡率分别为 70%、80%、75%、75%,症状与采集病鱼相似,对照组沙塘鳢生长正常(表 3),在病鱼鳃部和肠道等处再次分离病原菌,通过柯赫氏法则验证。

2.7 药敏试验及最适药物筛选

选取青霉素、卡那霉素、链霉素、诺氟沙星、庆大霉素、氯霉素等一共 6 种药敏试验片,分别采购自上海医学化验所及北京天坛药物生物技术开发中心,药敏结果见表 4。结果表明,抑菌效果最好的为诺氟沙星,选取诺氟沙星对人工感染发

表 3 沙塘鳢人工感染结果

组别	感染鱼尾数 (尾)	死亡尾数 (尾)	症状	死亡率 (%)
试验组 1	20	14	游动迟缓,头部及鳃部溃烂,腹部肿胀,肠道出血	70
试验组 2	20	16	游动迟缓,头部及鳃部溃烂,腹部肿胀,肠道出血	80
试验组 3	20	15	游动迟缓,头部及鳃部溃烂,腹部肿胀,肠道出血	75
试验组 4	20	15	游动迟缓,头部及鳃部溃烂,腹部肿胀,肠道出血	75
对照组	20	0	无明显症状	0

表 4 药敏试验判定标准与结果

抗生素	判定标准(抑菌圈直径)			结果判定	
	耐药(R)	中度敏感(M)	敏感(S)	Y - S01	Y - C01
青霉素	≤10	11 ~ 15	≥16	12 (M)	14 (M)
卡那霉素	≤10	11 ~ 15	≥16	15 (M)	16 (M)
链霉素	≤10	11 ~ 15	≥16	12 (M)	14 (M)
诺氟沙星	≤12	13 ~ 16	≥17	22 (S)	24 (S)
庆大霉素	≤10	11 ~ 15	≥16	13 (M)	11 (M)
氯霉素	≤10	11 ~ 15	≥16	11 (M)	11 (M)

病且未死亡的病鱼进行治疗,治疗方法按照药物使用说明书进行,4 个试验组发病的沙塘鳢投药 3 d 后病鱼精神转好,7 d 体表症状消失,进食较活跃,可以判定诺氟沙星对此次沙塘鳢的发病有较好的治疗效果。

3 讨论

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)广泛分布于池水、淤泥等自然环境中<sup>[6]</sup>,可以感染鱼、鳖、鳗、牛蛙及蚌等水生动物,也可以感染人造成败血症,感染水生动物主要引起暴发性出血,局部感染导致烂鳃、赤皮等症状;嗜水气单胞菌感染能够引起水产动物大量死亡,给水产养殖业造成经济损失。目前,尽管已有针对嗜水气单胞菌的疫苗<sup>[7]</sup>,但由于该菌存在不同血清型<sup>[8]</sup>,致使免疫保护效果差或不稳定,因此,目前防治嗜水气单胞菌主要采用抗菌药物治疗的方法为主。

传统的细菌鉴定方法是根据细菌的生理生化特性,按照细菌鉴定手册进行判断;但是传统的生理生化试验操作繁琐、耗时长且受主观因素影响较大<sup>[9]</sup>。目前,最常用的鉴定方法是通过分子生物学的手段进行鉴定<sup>[10-11]</sup>,但是目前尚有多种细菌的完整 16S rDNA 序列未被测定,给鉴定结果的准确性带来一定的影响,需要生化鉴定结果作为佐证<sup>[12]</sup>,同时同属不同种间的 16S rRNA 基因通常具有很高的同源性,因此适用于属及属以上分类单位的亲缘关系鉴定,对于亲缘关系较近的细菌常因分辨率不够而较难区分<sup>[13]</sup>。

本次试验结合传统的生理生化以及现代的分子生物学手段的方法来鉴定细菌,获得了较为准确的试验结果。对分离的细菌进行了药敏试验,选择出具有较好抗菌效果的抗菌药-诺氟沙星,并在实验室条件下给药,有着良好的治疗效果,对实际生产有着很高的参考价值。提高养殖沙塘鳢的产量,不仅仅要注重细菌病的防治,还要注重养殖模式的改变,虾、蟹池中混养沙塘鳢的生态养殖模式是当前水产养殖中发展养殖生产、规避养殖风险、提高养殖效益的一条必由之路<sup>[14]</sup>,通过虾、蟹和沙塘鳢混养,达到抗病、高产的目的。同时在沙塘鳢的养殖过程中,应及时做好嗜水气单胞菌病的防

治工作,一旦发现应及时隔离并对养殖塘口进行消毒,从源头上阻止该菌的传播。

参考文献:

[1] 伍汉霖,钟俊生. 中国动物志硬骨鱼纲鲈形目(五) 虾虎鱼亚目[M]. 北京:中国科学出版社,2008:150-152.

[2] 刘良国,杨春英,杨品红,等. 洞庭湖水系中华沙塘鳢的形态和核型研究[J]. 四川动物,2013,32(2):176-179.

[3] 丁严冬,藏雪,张国松,等. 河川沙塘鳢 4 个不同地理群体的形态差异分析[J]. 海洋渔业,2015,37(1):24-30.

[4] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:107-119.

[5] 赵静,杨汉春,查振树. 猪源大肠埃希氏菌对较新的 16 种抗生素敏感性[J]. 中国兽医学报,2000,20(5):459-461.

[6] 丁正峰,薛晖,边文冀,等. 养殖黄颡鱼腹水症病原研究[J]. 华中农业大学学报,2008,27(5):639-643.

[7] 范文辉,黄健,王秀华,等. 养殖大菱鲆溃疡症病原菌的分离鉴定及系统发育分析[J]. 微生物学报,2005,45(5):665-670.

[8] 钱冬. 引起鱼类暴发性流行的嗜水气单胞菌的血清型,毒力及溶血性[J]. 微生物学报,1995,35(6):4604-4664.

[9] 曹红峰,宋靖芳,李国庆,等. 中草药对嗜水气单胞菌 ST-3-3 抑菌作用的研究[J]. 中医药导报,2007,13(5):86-88.

[10] 吕睿,李博,宋凤敏,等. 解钾菌的分离、鉴定及解钾能力[J]. 江苏农业科学,2016,44(11):471-475.

[11] 邢芳芳,高明夫,胡兆平,等. 1 株高产 IAA 菌株的筛选、鉴定及对白菜的促生作用[J]. 江苏农业科学,2016,44(10):458-460.

[12] Kirov S M, Hudson J A, Hayward L J, et al. Distribution of *Aeromonas hydrophila* hybridization groups and their virulence properties in Australasian clinical and environmental strains[J]. Letters in Applied Microbiology,1994,18(2):71-73.

[13] Stackbrandt E, Goodfellow M. Nucleic acid techniques in bacterial systematics[M]. New York: Willey - Interscience, 1991: 115-175.

[14] 徐宇,史杨白,朱锡和,等. 虾蟹与沙塘鳢混养新技术[J]. 水产养殖,2014(8):38-40.