

[文章编号] 1000-2782(1999)04-0071-04

大鲵赤皮病病原分离鉴定及防治试验

王高学¹, 白占涛², 张向前², 张联丽¹

(1. 西北农业大学动物科学与动物医学学院, 陕西杨陵 712100)

(2. 延安大学生物系, 陕西延安 716000)

摘 要 对人工养殖大鲵发生的“赤皮病”病原菌进行了分离培养、人工感染试验, 鉴定出该病的致病菌为 I 型荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)。发病大鲵表现症状为全身肿胀, 呈充血发炎的红斑块和化脓性溃疡。菌株对链霉素、氯霉素、氟哌酸、庆大霉素、“鱼病康-1”均高度敏感。伤口涂抹氯霉素软膏和肌肉注射硫酸庆大霉素治疗发病大鲵, 每天剂量为 $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 7 d 后完全治愈, 治愈率为 93.4%。养殖中饵料加入“鱼病康-1”, 可防治该病的发生。

关键词 大鲵; 赤皮病; 病原; 荧光假单胞菌; 防治技术

[中图分类号] S947 **[文献标识码]** A

大鲵 (*Andrias daridianus*) 俗名娃娃鱼, 属两栖纲有尾目, 为国家二级保护动物。大鲵的人工养殖是近年来新开展的项目, 关于其养殖技术和疾病防治的研究还是一个新课题。目前, 有关大鲵的疾病国内外尚未见报道。在 1997 年 4~7 月, 陕西石泉和河南西峡两县养殖大鲵都发生了“赤皮病”。发病大鲵表现症状为全身肿胀、充血, 呈溃疡性红斑块, 死亡率高, 经济损失很大。本文记述的是有关“赤皮病”病原菌的鉴定及防治技术的资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1997 年 4 月 5 日由陕西石泉大鲵养殖场送垂死病鲵 1 尾、死鲵 1 尾; 1997 年 7 月 10 日在河南西峡大鲵养殖场获得病鲵 2 尾、死鲵 1 尾。健康大鲵 1 尾由西峡养殖场提供, 质量 117 g, 健康鲤鱼由柔谷渔场提供, 平均质量 210 g。

1.2 病原菌的分离与鉴定

病原菌的分离培养 以无菌操作方法, 用 $750 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 酒精对病灶周围消毒, 取其深部组织、血液和肝、肾、脾、肺、肠等内脏组织在普通营养琼脂平板上划线。在 28°C 下培养 24 h 左右, 挑取形态基本一致的单个菌落, 再进行纯培养。

病原菌致病性试验 将获得的纯培养菌株分别接种于营养琼脂斜面上, 28°C 下培养 16 h 左右, 用无菌生理盐水洗下菌苔, 制成 $14 \sim 16$ 亿个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 菌悬液做致病性试验。1 尾大鲵肌肉注射 0.3 mL 菌悬液, 并做体表创伤感染; 5 尾鲤鱼每尾腹腔注射 0.6 mL 菌

[收稿日期] 1999-03-05

[作者简介] 王高学 (1965-), 男, 讲师

悬液,无菌生理盐水作对照,同时,用另 5 尾鲤鱼作体表创伤感染试验,方法是用灭菌注射器及 12 号针头吸取菌悬液,在鲤鱼体表鳞片下皮肤处刺破划短线,并轻推注菌液,接完种后,将鲤鱼分别养殖于 28℃ 的水簇箱中,投喂颗粒饵料。1 尾大鲈置于 20℃ 水簇箱,投喂幼蛙。记录试验结果。

病原菌的鉴定 菌种鉴定按 Krieg 等方法^[1],各项生理生化反应均在 28℃ 条件下进行。

1.3 药敏试验

用纸片扩散法。抗生素纸片购于北京天坛生物技术开发部,含药量 10 mg° L⁻¹。“鱼病康 -I”纸片系作者用新研制的纯中药渔药制成,含药量为 10 mg° L⁻¹。

1.4 防治试验

对养殖场的病鲈,体表用氯霉素软膏涂抹的同时,肌肉注射硫酸庆大霉素(含量 2 mL : 0.04,山西晋新制药总厂),每天药量为 15 mg° kg⁻¹,连续用药 7 d;日常养殖时,定期在饵料中添加 10 g° kg⁻¹的“鱼病康 -I”(作者用 10 余味中药科学配制,提取有效成分而成),同时全池边洒“鱼虾安”(山西鱼虾安水产药业有限公司生产)或复方纯中药“菌态康”(作者新研制出的水产动物抗菌药物)进行水体消毒。

2 结 果

2.1 病原菌的鉴定

2.1.1 病原菌的致病性 对分离出的菌株进行致病性试验,9702 菌株(由河南西峡病鲈分离获得)具明显致病性。由表 1 知,注射和体表感染 1 尾大鲈,在 73 h 死亡。注射感染 5 尾鲤鱼,在 25~ 62 h 全部死亡,而对照组在 72 h 内正常,死亡大鲈和鲤鱼外观无明显症状,内部脏器有出血点,呈败血性坏死;体表创伤感染 5 尾鲤鱼,46 h 后相继在体表创伤之处出现充血发炎的红斑块,168 h 内共死亡 3 尾,病理检查结果与荧光假单胞菌引起的鱼类“赤皮病”症状完全相同。每次试验后再重新分离菌株,均获得与 9702 菌株相同的菌株。

表 1 9702 菌株感染致病性试验

感染方法	感染动物	菌液浓度 / (个° L ⁻¹)	死亡数 / 尾							死亡率 %
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	
体表创伤与注射	大鲈	1.46× 10 ¹²	0	0	0	1	0	0	0	100
注射感染	鲤鱼	1.52× 10 ¹²	0	1	2	2	0	0	0	100
注射对照	鲤鱼	生理盐水	0	0	0	0	0	0	0	0
体表创伤	鲤鱼	1.58× 10 ¹²	0	0	0	1	1	0	1	60

2.1.2 病原菌的鉴定 9702 菌株为革兰氏染色阴性的短杆菌,两端圆形,大小为 0.7~ 0.75 μm× 0.4~ 0.46 μm,单个或成对相连,有运动力,极端 1~ 3 根鞭毛,无芽胞。琼脂培养基上菌落呈灰白色,半透明,24 h 开始产生绿色或黄绿色的色素,弥漫培养基;在肉汤培养中均匀混浊,微有絮状沉淀,24 h 后表层有有色素;兔血琼脂呈 β 型溶血,其生理生化反应见表 2。由该病原菌的形态、生理生化特性与 Krieg 等^[1]和黄琪琰^[2]的结论,鉴定出 9702 菌株为 I 型荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)。

表 2 9702菌株生理生化试验

测定项目	9702菌株	荧光假单胞菌	测定项目	9702菌株	荧光假单胞菌
氧化酶	+	+	甘露糖	+	+
接触酶	+		枸橼酸盐	+	+
V° P反应	-	-	麦芽糖	-	-
甲基红试验	-	-	蔗糖	-	-
H ₂ S产生	-	-	乳糖	-	-
硝酸盐还原	-	-	甘露醇	-	-
吲哚反应	-	-	山梨醇	+	+
明胶液化	+	+	阿拉伯糖	+	+
石蕊牛奶	-	-	葡萄糖	+	+
精氨酸双水解酶	+	+	海藻糖	+	+
苯丙氨酸脱氢酶	+	+	肌醇	+	+
鸟氨酸脱羧酶	-		乙醇	-	-
丙酸盐	+	+	淀粉	-	-

2.2 药敏试验

试验结果表明, 9702菌株对链霉素、氯霉素、氟哌酸、庆大霉素、“鱼病康Ⅰ”抑菌圈直径大于 15 mm,属高度敏感;对四环素、呋喃唑酮抑菌圈 10~ 15 mm,为中度敏感;磺胺嘧啶、青霉素不敏感

2.3 病理学观察

解剖发现,腹水增多,肝脏肿大有出血点,肠组织糜烂、溃疡,各器官出血性坏死。用 40 g·L⁻¹的多聚甲醛固定大鲵组织,石蜡切片, H° E染色,光镜观察: 组织细胞出现肿胀、颗粒变形、玻璃样变和坏死崩解,大量红细胞变形、碎裂溶解,呈溶血性贫血,血液中白细胞极少,无白细胞浸润现象

2.4 防治试验

对 2个养殖场内发病大鲵,采取如下方法进行治疗试验。首先在体表溃疡之处涂抹氯霉素软膏,同时肌肉注射硫酸庆大霉素,连续用药 7 d,每天用药量 15 mg·kg⁻¹,共对 211尾病鲵治疗,治愈 197尾,治疗过程中死亡了 14尾,治愈率达 93.4%。今后的养殖中,2场都采取了以防为主的方针,半年内再未发病,具体为: 每隔 10~ 15 d,水体用“鱼虾安”消毒 1次,同时在饵料中添加 10 g·kg⁻¹的“鱼病康Ⅰ”,连续投喂 2 d,并定期更换新水。注意在换水清池过程中,要防止损伤大鲵皮肤,以免诱发生病。

3 讨 论

3.1 病原菌的传播途径

通过感染试验及病理学研究,作者认为该病原菌主要通过体表或体表创伤入侵感染。所做的注射感染试验,只表现体内各脏器的明显病变,是出血性败血病,其体表无“赤皮”或溃疡症状。但体表创伤感染的大鲵和鲤鱼在创伤之处均有“赤皮”或溃疡病灶,内脏也具有败血性病变。由于荧光假单胞菌为条件致病菌,养殖中若长期不加新水,势必水质恶化,水体中病原菌大量繁殖,加之大鲵抵抗力降低,使病原菌极易侵入;另外,换水操作或池塘、躲藏台板粗糙而损伤大鲵体表,易使病原菌感染。

3.2 致病性与防治技术

荧光假单胞菌能引起热带鱼、鲑科鱼类和多种鱼类的败血病和赤皮病^[2,3]。鱼类多是在捕捞、运输和放养时,受损伤导致细菌感染,使体表出血发炎、鳞片脱落,发生赤皮病。荧光假单胞菌感染大鲵,多是体表受伤后,在损伤之处产生溃疡性红斑,严重者,进一步发展成败血病,使死亡率显著增大,往往发病后期很难治愈。荧光假单胞菌也可产生内毒素来损伤组织细胞^[4],为败血病的根源。从药敏试验知,链霉素、氯霉素、氟哌酸、庆大霉素和鱼病康 I 均高度敏感,因此,建议在今后可作为治疗该病的理想注射药物,依据王高等^[5]试验,硫酸庆大霉素一般每天用药量为 $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,发病较轻者,一般添加 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的“鱼病康 I”在饵料中,连续 4~6 d,治愈率达 90% 以上;同时,水体中用“鱼虾安”或“菌态康”全池遍洒,均能有效地防治该病。

[参考文献]

- [1] Krieg N R, Holt J G. Bergeys manual of systematic bacteriology [M]. 9 th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984.
- [2] 黄琪琰.水产动物疾病学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1993.
- [3] 黄琪琰. 中国水产动物疾病学研究进展 [J]. 水产学报, 1996, 20(1): 51~ 57.
- [4] 唐由凯, 吴文斋. 12 株荧光假单胞菌感染的试验研究 [J]. 中华传染病杂志, 1989, 7(3): 165~ 166.
- [5] 王高等, 王英珍. 中华鳖穿孔病感染途径与防治技术的研究 [J]. 西北农业大学学报, 1998, 26(5): 86~ 89.

Studies on the Red Skin Disease in *Andrias daridianus*

WANG Gao-xue¹, BAI Zhan-tao², ZHANG Xiang-qian², ZHANG Lian-li¹

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Northwestern

Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

(2. Department of Biology, Yan'an University, Yan'an, Shaanxi 716000, China)

Abstract This paper described the characters of pathogenic bacteria of red skin disease in *Andrias daridianus*. Acquired strains, which were isolated from naturally infected *Andrias daridianus* and identified by the Bacteriological method, were *Pseudomonas fluorescens*. These strains through infection test showed a higher pathogenicity with the symptoms of oedema, hyperaemia, ulcers, red scars in the body and most sensitive to *Streptomycinum*, *Chloramphenicolum*, *Norfloxacin*, *Gentamycinum* and “Yubing kang I”. 15 mg for per 1000 g body weight in 7 days. The total cure rate with injection of *geatamycin-isulfas* reached over 90%.

Key words *Andrias daridianus*; red skin disease; pathology; *Pseudomonas fluorescens*; prevention and treatment