

南方九孔鲍鲍苗掉板病原菌的药敏测定*

王 志¹ 蔡俊鹏^{1**} 杨洪志² 徐 丽¹

(华南理工大学轻工与食品学院 广州 510640)¹ (深圳市龙岗区水产研究所 深圳 518117)²

摘要: 为提高鲍鱼育苗的成活率, 对分离自广东汕尾一养殖场鲍苗掉板池中(包括水、藻膜和变白鲍苗)的、经回归感染试验证明为致病菌的菌株进行了鉴定和药物敏感性测定。API 鉴定表明, 这些致病菌株由 *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* 等组成, 其中弧菌 17 株, 约占总分离菌株的 50%, 而溶藻弧菌则为弧菌的优势菌株, 有 11 株, 约占弧菌总数的 70%。药敏结果显示, 绝大多数菌株对链霉素、红霉素和庆大霉素敏感; 相反, 四环素和新生霉素则对它们没有作用或不敏感。

关键词: 鲍苗掉板, 弧菌, 病原菌, 药物敏感性

中图分类号: Q939.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2005) 03-0030-04

Studies on the Antibiotic Susceptibility of Pathogens Caused Massive Death of Post Larvae of Abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*) *

WANG Zhi CAI Jun-Peng** XU Li

(College of Food Science and Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510640)

YANG Hong-Zhi

(Longgang Institute for Aquatic Research, Shengzhen 518117)

Abstract: In order to enhance the survival rate of abalone larvae, antibiotic susceptibility tests were performed on the bacteria isolated from whitened postlarvae, biofilm and the pond water of abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*) and proven to be virulent pathogens by challenge tests. API tests indicated that the isolates were mainly comprised of *Vibrio alginolyticus*, *vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, the total *Vibrio* number of which was seventeen and made up about 50% of the total population. Among vibrios, *Vibrio alginolyticus* was the dominant strain (11 isolates) and made up 70%. Antibiotic susceptibility tests demonstrated that while majority isolates exhibited relatively high sensitivities toward streptomycin, erythromycin and gentamycin, they nevertheless displayed resistance to tetracycline and novobiocin. Results clearly indicated that streptomycin, erythromycin and gentamycin could be potentially used to suppress vibrio growth and hence improve abalone postlarval survival rate.

Key words: Massive death of abalone postlarvae (*Haliotis diversicolor supertexta*), *Vibrio*, Pathogens, Antibiotic susceptibility test

随着鲍鱼养殖业的发展, 集约化程度的提高, 各种病害越来越频繁发生并愈演愈烈^[1]。1996~1997 年间, 广东省汕尾鲍鱼养殖场爆发严重的鲍鱼病害。1999 年 2 月汕头 4 个鲍鱼养殖场的鲍鱼相继发生大规模死亡^[2]。1999 年 2~4 月, 福建东山县 20 多个鲍鱼养殖场先后发病, 直接经济损失达 3,000 多万元。同年 12 月, 病害再度流行,

* 广东省自然科学基金重点项目 (No. 020964)

华南理工大学“高水平大学建设”苗子项目 (No. 321-D76020)

** 通讯作者 Tel: 020-87538286, E-mail: febjpc@scut.edu.cn

收稿日期: 2004-08-05, 修回日期: 2004-11-17

损失更加惨重^[3-5]。2000 年初, 汕尾再次遭受病害袭击, 11 家鲍鱼养殖场有 9 个发病^[6], 发病区之广和严重程度之高给鲍鱼养殖业造成了巨大损失, 制约着鲍鱼养殖业的发展。

成鲍病害的问题尚未得到解决, 鲍苗掉板的问题又出现了。自 2002 年后半年开始, 育苗成为九孔鲍养殖中的“瓶颈”, 问题出现在从附板到 20d 鲍龄这段时间, 常有大量鲍苗变白, 进而掉板死亡。以前偶尔才出现的问题如今频频发生, 而且每次导致鲍苗死亡的数量也是前所未有的。偶尔也有育苗较为成功的情况, 但鲍苗存活率仍低于以往的平均水平。这不仅给养殖场造成极大的经济损失, 而且给九孔鲍养殖提出了一个迫切需要解决的难题。

在从汕尾一养殖场鲍苗掉板池中已分离筛选到 100 多株菌的基础上, 通过回归感染实验、毒力因子分析等, 获得 35 株有致病能力的菌株, 也即鲍苗掉板的病原菌。在此基础上, 本文对其进行了种类鉴定, 并对常用抗生素的敏感性进行了研究, 以便为生产服务。

1 材料与方法

1.1 样品的采集

实验所用样品为 2003 年 8 月份从广东汕尾一鲍鱼养殖场掉板鲍苗池中采集得到。从鲍苗掉板池中直接用灭菌三角瓶从养殖池采集水样, 将水样进行适当梯度稀释。同时从挂板上刮取适量藻膜, 包括变白的鲍苗放入研钵中, 先加入 1mL 稀释液, 研磨 10min 后再加入 9mL 稀释液摇匀, 继续做适度稀释。

1.2 培养基

异养细菌培养基用 2216E 佐贝尔海洋细菌培养基: 蛋白胨 5.0g, 酵母膏 1g, 磷酸高铁 0.01g, 琼脂粉 15g, 陈海水定容至 1,000mL, pH7.6~7.8。弧菌用 TCBS 培养基, 为广东环凯微生物科技公司产品。

1.3 细菌分离

取不同稀释度水样 0.1mL 加入到制好的平板培养基上 (9cm 培养皿), 用三角玻棒涂抹均匀, 每个稀释度做 3 个平行样, 连续做 3 个不同稀释度, 置 25℃ 条件下培养 (异养细菌培养 7d, 弧菌培养 2d) 后取出观察菌落, 并根据菌落的不同形态特征挑出代表性菌株, 接到斜面培养基上作种类鉴定。

1.4 回归感染实验

另文报道。

1.5 菌株鉴定

菌株纯化后, 根据菌株培养特征, 细胞形态, 革兰氏染色和氧化酶反应选择法国梅里埃公司 API 鉴定条, 检测生理生化反应^[7], 根据结果应用 API LAB 软件并参照《伯杰氏细菌鉴定手册》进行检索鉴定。

1.6 药敏试验

细菌药物敏感试验采用纸片法^[8,9], 药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司, 根据天和微生物试剂有限公司提供的判断标准进行结果判定。

2 结果与讨论

2.1 细菌的分类和鉴定

从鲍苗掉板池中分离到 100 多株菌。回归感染实验表明, 其中 35 株菌可使鲍苗掉板死亡, 证明它们为鲍苗掉板的病原菌 (结果另文报道)。细菌学研究揭示, 35 株菌的菌体均为杆状或短杆状。革兰氏染色表明, 除菌株 7 和 14 为阳性菌外, 其余均为革兰氏阴性菌。应用 API20E 细菌快速鉴定系统鉴定, 菌株由 *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus agglomerans*, *Klebsiella oxytoca*, *Aeromonas salmonicida* 等组成。其中弧菌 17 株, 约占总分离菌株的 50%, 而溶藻弧菌则为弧菌的优势菌株, 有 11 株, 约占弧菌总数的 70%。

2.2 35 株菌抗生素敏感性试验

采用纸片法, 对这 35 株病原菌进行了 15 种常用抗生素的敏感性测定。结果如图 1 和图 2 所示。

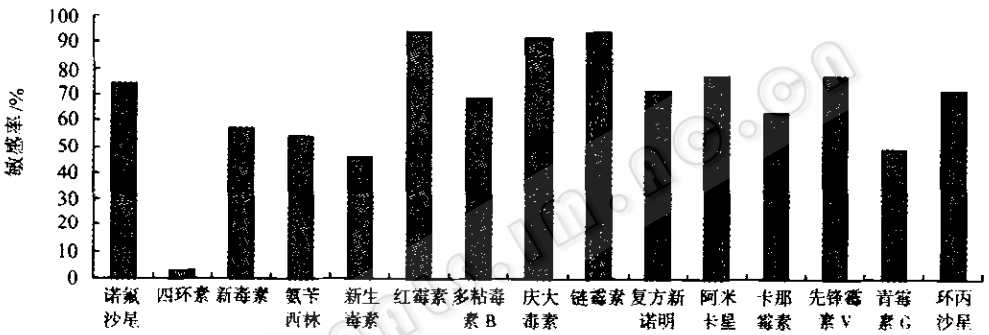


图 1 15 种抗生素对病原菌的敏感率

分离到的 35 株病原菌对 15 种抗生素的敏感性试验结果表明 (图 1), 15 种抗生素在一定程度上已失去了其应有的药性, 但其中的红霉素 (33/35 种), 链霉素 (33/35 种) 和庆大霉素 (32/35 种) 还是对超过 91.4% 的菌株有作用。阿米卡星和先锋霉素 V 对 77.1% 的菌株 (27/35 株), 诺氟沙星对 74.3% (26/35 株), 环丙沙星和复方新诺明对 71.4% (25/35 株) 有效。而对青霉素 G 而言, 对其敏感的菌株的比例则低至

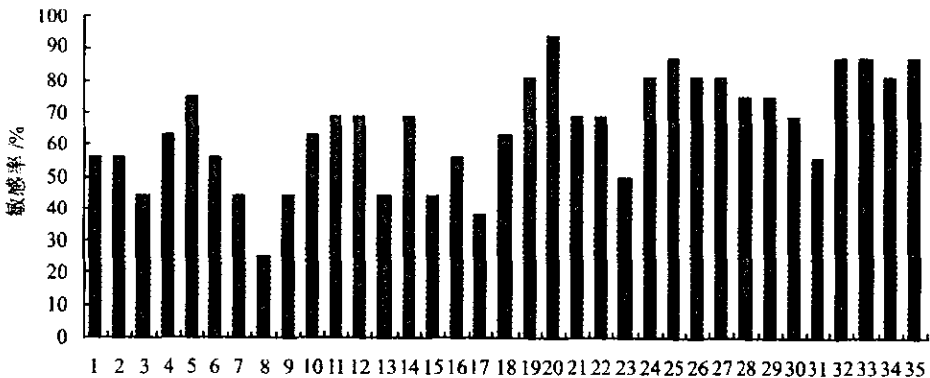


图 2 病原菌对 15 种抗生素的敏感率

48.9%。在这 15 种抗生素中,四环素的作用效果最差,除属于 *Serratia odorifera* 的第 20 号菌株外,所有的病原菌对其都不敏感,也即它对绝大部分试验的病原菌无效果。

另外,不同菌株对不同种类抗生素的敏感性也是有很大的差别的(如图 2 所示)。具有最宽敏感谱的为 20 号菌株,对 94% 的抗生素敏感;其次为第 25 号、32 号、33 号和 35 号菌株,它们对 15 种抗生素的敏感比例均为 87%;再次为菌株 19、24、26、27 和 34,它们对 81% 的所试抗生素(13/15 种)敏感。在分离的 35 株菌中,敏感谱最窄的是第 8 号菌株,其仅仅对 26% 的抗生素(4/15 种)敏感。而且,从图 2 中可以看出,有 22 株菌对 15 种抗生素的敏感谱在 60% 以上,过半的则有 28 株。

同时,结合敏感菌的种类及其对 15 种抗生素的敏感性可知,在这些具有较宽敏感谱的细菌中,有 47% 的细菌属于弧菌(13/28 株),分别属于 *Vibrio alginolyticus* (1、2、4、5、6、10、11、16、19 和 23) 和 *Vibrio parahaemolyticus* (21、25 和 26),它们对所用抗生素的敏感谱都在 50% 以上。其次为属于 *Shewanella putrefaciens* 的 5 株菌(12、24、27、28 和 34)。与其它细菌比较,所有弧菌均对红霉素敏感,而且超过半数的弧菌对庆大霉素(15/17 株),复方新诺明(11/17 株)和先锋霉素 V(8/17 株)敏感。在使用的 15 种抗生素中,诺氟沙星对所有的弧菌都没有作用,此外,针对青霉素、四环素、环丙沙星和新霉素有抗性的弧菌数分别为 12 株,11 株和 9 株。所以,针对鲍苗育苗环境种的致病弧菌,首选的抗生素为红霉素、庆大霉素、先锋霉素 V 和复方新诺明。

据 Anguiano-Beltrán 等(1998)的报道,*Vibrio alginolyticus* 是红鲍鲍苗的致病菌,而我们的研究也表明,该菌是南方九孔鲍鲍苗掉板池中的优势弧菌,是引发南方九孔鲍鲍苗掉板的主要病原菌之一。针对它和其它相关病原菌而进行用药,应该可以减缓鲍苗掉板的发生,确保鲍鱼育苗工作的正常进行。

3 小结

研究结果表明,四环素和新生霉素对致病菌已不具有敏感性;相反,红霉素、庆大霉素、链霉素和复方新诺明则对致病弧菌比较敏感,因此,针对育苗池中致病菌的首选抗生素是链霉素、红霉素、庆大霉素和复方新诺明;其他 11 种抗生素(青霉素、氨苄西林、新霉素、卡那霉素、多粘霉素、环丙沙星、诺氟沙星、先锋霉素 V、阿米卡星)均有一定敏感性,也可以继续使用,但是应该注意使用剂量,同时应采取联合用药的原则以降低致病菌的耐药性。否则,不但杀灭不了有害菌群,而且会使越来越多的细菌产生抗药性。

参考文献

- [1] 张朝霞,王 军,张蕉南,等. 台湾海峡, 2001, 20 (2): 193~200.
- [2] Anguiano B C, Searcy B R, Lizárraga P M. Diseases Aquatic Organisms, 1998, 33 (2): 119~122.
- [3] 马健民,马福恒,刘明清,等. 中国微生态学杂志, 1997, 9 (5): 24~26.
- [4] 徐晓津. 齐鲁渔业, 2000, 17 (2): 38~39.
- [5] 周永灿,潘金培. 水产学报, 1997, 21 (2): 171~174.
- [6] 黄汉泉,冯 波. 水产科技, 2000, 2: 3~4.
- [7] 倪纯治,叶德赞,林燕顺,等. 海洋学报(中文版), 1995, 17 (5): 124~129.
- [8] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001. 132~136.
- [9] 宋庆云,罗挽涛,王文兴,等. 黄渤海海洋, 1997, 15 (3): 26~30.