

孙敏秋. 网箱养殖大黄鱼内脏白点病的早期干预效果分析[J]. 渔业研究, 2019, 41(3): 241-246.

网箱养殖大黄鱼内脏白点病的早期干预效果分析

孙敏秋

(福建省水产技术推广总站, 福建 福州 350002)

摘要: 在2016年大黄鱼内脏白点病病原菌耐药性普查工作的基础上, 筛选出盐酸恩诺沙星和盐酸土霉素2种大黄鱼源假单胞菌的敏感性药物, 首次在国内针对大黄鱼内脏白点病开展早期干预治疗试验, 显著降低了该病的发病率及因该病引起的死亡率, 其中, 又以盐酸恩诺沙星的抗菌效果更为明显。本次试验以期探索早期防治大黄鱼内脏白点病的有效方法, 在降低发病率的同时, 指导养殖户科学用药, 为保障渔药减量行动、节约渔药成本等打下基础。

关键词: 大黄鱼内脏白点病; 盐酸恩诺沙星; 盐酸土霉素; 早期干预治疗

中图分类号: S942.2+6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-5601(2019)03-0241-06

大黄鱼内脏白点病又称内脏结节病, 是近年来养殖大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 的主要病害, 在各个大黄鱼养殖地区均广泛流行。一旦发病, 累计死亡率可达50%以上, 严重影响了大黄鱼的养殖产量。近些年, 针对该病的研究主要集中在病原的分离鉴定、组织病理学及致病机理^[1-2]等方面。已确定大黄鱼内脏白点病的病原为假单胞菌, 一些研究认为是其中的变形假单胞菌 (*Pseudomonas plecoglossicida*)^[3-7], 另一些报道则认为是恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)^[1,8-9]。研究表明: 该病临床症状主要体现在患鱼的肝脏、肾脏、脾脏等内脏有大量肉眼可见白色结节^[10]。该病的发生与水温变化密切相关^[11]。许斌福等^[12]对大黄鱼内脏白点病的流行病学调查研究发现, 在宁德地区, 内脏白点病主

要在每年10月初至次年5月的低温期流行, 其中, 3月初至4月中下旬(水温14~18℃)为发病高峰期, 主要危害50~150 g的网箱养殖大黄鱼。以往的研究虽已提出一些防治该病的初步建议^[6,13], 但出现结节后药物治疗效果不佳。本研究旨在通过流行病学观察, 在确定大黄鱼内脏白点病病原和敏感药物的基础上, 在发病早期通过药物干预治疗, 以期达到提高治愈率的目的。

1 材料与方法

1.1 试验用鱼

2018年1月分别在福建省宁德市三都澳的大湾海区渔排(以下简称渔排1)和官井洋海区渔排(以下简称渔排2)开展早期治疗试验。其中, 渔排1的试验大黄鱼规格为75~100 g, 共

收稿日期: 2019-04-11

基金项目: 2019年福建省水生动物疫病监测项目。

作者简介: 孙敏秋(1986-), 女, 硕士, 主要从事水生动物病害防控工作及技术研究。

Tel: 0591-87878928. E-mail: minqiusun@sina.com.

计 45 000 尾；渔排 2 的试验大黄鱼规格为 60 ~ 100 g，共计 213 000 尾。

1.2 样品采集

试验期间，除记录试验大黄鱼的发病和死亡情况数据外，在 2 月、4 月及 5 月，分别从 2 个渔排的 6 个网箱中进行随机采样和解剖观察，每个样品采集 5 ~ 10 尾。

1.3 解剖观察内脏白点出现情况

用无菌手术剪剖检样品鱼体腹部，观察脾脏、肾脏甚至肝脏有无大量白点或白色结节，并统计每个样品出现内脏白点症状的概率：

内脏白点出现率/% = 患内脏白点症状的鱼尾数/每个样品采集的鱼尾数 $\times 100\%$

1.4 细菌的分离与培养

全程无菌操作，用接种环从样品鱼的肝、肾、脾等部位取样划线分离至 TSA (1% NaCl) 和 TCBS 平板培养基，于 $(28 \pm 2)^\circ\text{C}$ 恒温培养 24 h，挑取优势单菌落若干个进行再划线分离纯化培养。

1.5 分离菌的鉴定

1.5.1 形态学观察

分离纯化后接种于 TSA (1% NaCl) 和 TCBS 平板， $(28 \pm 2)^\circ\text{C}$ 恒温培养 24 h，此时观察菌落颜色、形态、透明度等菌落特征。

1.5.2 分离菌株的 16S rRNA 基因序列分析

采用 16S rRNA 特异性通用引物进行 PCR 扩增（目标片段约 1 500 bp），上游引物 P1：5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3'；下游引物 P2：5' - TACGGTTACCTTGTTACGACTT - 3'（上海生工生物工程公司合成）。提纯分离菌基因组 DNA 作为 PCR 模板，PCR 反应体系为：94℃ 预变性 5 min，94℃ 变性 30 s，55℃ 退火 1 min，72℃ 延伸 1 min，30 个循环，72℃ 延伸 10 min。反应后各取 5 μL PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。阳性克隆菌液送去测序（上海尚亚生物技术有限公司），所得序列通过软件 NCBI BLAST 进行比

对分析。

1.6 药物敏感试验

1.6.1 供试药物

选择的供试药物均为目前我国农业农村部以及国外允许使用的水产用抗菌药物。所有实验室内使用的药物均由全国水产技术推广总站提供。

1.6.2 最低抑菌浓度（MIC）的测定

参照《水生动物致病菌药敏试验操作规程》，采用液体培养基稀释法，全程无菌条件下，将供试药物浓度配制成 200 $\mu\text{g/mL}$ 的最高测定浓度（前期工作中的病原菌耐药性普查试验的最高测定浓度为 1 024 $\mu\text{g/mL}$ ），再用 TSB（胰蛋白胨大豆肉汤）培养基按 2n 倍比依次稀释成 11 个浓度梯度，另设 1 个空白对照组，后依次接入 1:1 体积的浓度为 10^6 cfu/mL 的待测菌悬液，于 $(28 \pm 2)^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养 24 h，每种供试药物做 2 个平行，观察实验结果。

1.7 治疗

在 2—4 月的 3 个月间检出致病菌后，根据细菌分离和药敏试验结果，选择盐酸恩诺沙星、盐酸土霉素口服开展治疗试验。2 个海区的渔排各设置 3 个试验网箱，依次为盐酸恩诺沙星药物试验组、盐酸土霉素药物试验组和空白对照组。

按饲料量 0.3% 将药物溶解于水，均匀泼洒至颗粒饵料表面，静置吸收后投喂。连续给药 5 d，试验组其余时间及空白对照组全程投喂未拌药物的相同饵料。

2 结果与分析

2.1 病原菌耐药性普查

在 2016 年的低温期间，分别在宁德蕉城、福安、福鼎、霞浦等地采集患内脏白点病的大黄鱼，从其肝、肾、脾等器官共分离获得大黄鱼源假单胞菌 21 株。通过开展 13 种抗菌药物敏感试验，测得 21 株大黄鱼源假单胞菌的 MIC 值（表 1），根据国家兽药标准，进而筛选获得大黄鱼源假单胞菌对盐酸多西环素、盐酸土霉素和盐酸恩诺沙星的敏感性均较高。

表 1 21 株大黄鱼源假单胞菌对 13 种抗菌药物的敏感性

Tab. 1 Sensitivity of 21 strains of *Pseudomonas* spp. from *L. crocea* to 13 antibacterial agents

菌株 Strain	MIC 值/($\mu\text{g/mL}$) MIC Value												
	氨苄西 林钠 Ampicillin sodium	硫酸 新霉素 Neomycin sulfate	红霉素 Erythro- -mycin	盐酸恩 诺沙星 Enroflox- -acin hydroch- -loride	诺氟 沙星 Norflox- -acin	盐酸多 西环素 Doxycyc- -line hydroch- -loride	盐酸 土霉素 Oxytetra- -cycline hydroch- -loride	氟苯 尼考 Florfen- -icol	甲砜 霉素 Thiamph- -enicol	磺胺 甲恶唑 Sulfameth- -oxazole	磺胺二 甲氧嘧啶 Sulfadime- -thoxyppy- -rimidine	磺胺间 甲氧嘧啶 Sulfamo- -nometh- -oxine	磺胺 嘧啶 Sulfadia- -zine
1	512	8	256	1	2	1	1	64	64	256	1024	256	32
2	128	2	512	1	2	1	1	64	128	256	1024	256	128
3	512	8	256	1	2	1	1	64	64	256	1024	256	32
... *													
19	128	2	128	1	1	1	1	64	64	512	1024	512	256
20	128	2	128	1	1	1	1	64	64	512	1024	512	256
21	128	2	256	1	1	1	1	64	64	1024	1024	1024	512

注：“*”为部分数据省略。
Note: * indicated partial data omitted.

2.2 病原菌的分离鉴定

2 月采集的大黄鱼样品经菌株分离和病原菌

鉴定分析，获得 6 株大黄鱼源假单胞菌（*Pseudomonas* spp.）（表 2）。

表 2 分离菌株信息表

Tab. 2 Information of isolated bacteria

序号 Serial number	采样时间 Collected time	分离部位 Isolated tissue	菌株种类 Bacterial species
1	2018 - 02 - 08	脾	假单胞菌属
2	2018 - 02 - 08	肝	假单胞菌属
3	2018 - 02 - 08	肾	假单胞菌属
4	2018 - 02 - 08	脾	假单胞菌属
5	2018 - 02 - 08	肾	假单胞菌属
6	2018 - 02 - 08	脾	假单胞菌属

2.3 药物敏感试验

通过测定该 6 株假单胞菌对 13 种抗菌药物的敏感性，测得药敏结果（表 3）与前期大黄鱼

源假单胞菌耐药性普查结果基本一致，进一步验证这 6 株菌为大黄鱼源假单胞菌。

表 3 6 株大黄鱼源假单胞菌对 13 种抗菌药物的敏感性
Tab. 3 Sensitivity of 6 strains of *Pseudomonas* spp. from *L. crocea* to 13 antibacterial agents

菌株 Strain	MIC 值/($\mu\text{g/mL}$) MIC value												
	氨苄西 林钠 Ampicillin sodium	硫酸新 霉素 Neomycin sulfate	红霉素 Erythro - mycin	盐酸恩 诺沙星 Enroflox - acin hydroch - loride	盐酸多 西环素 Doxycyc - line hydroch - loride	盐酸土 霉素 Oxytetra - cycline hydroch - loride	氟苯 尼考 Florfen - icol	甲砒 霉素 Thiamph - enicol	磺胺甲 恶唑 Sulfameth - oxazole	磺胺二甲 氧嘧啶 Sulfadime - thoxyppy - rimidine	磺胺间甲 氧嘧啶 Sulfamo - nometh - oxine	磺胺嘧啶 Sulfadia - zine	交沙霉素 Josam - ycin
1	>100	1.56	50	0.78	1.56	6.25	>100	50	>100	>100	>100	>100	50
2	>100	1.56	50	0.78	1.56	6.25	>100	50	>100	>100	>100	>100	50
3	>100	1.56	50	0.78	1.56	6.25	>100	50	>100	>100	>100	>100	50
4	>100	1.56	50	0.78	3.13	6.25	>100	50	>100	>100	>100	>100	50
5	>100	1.56	50	0.78	3.13	6.25	>100	50	>100	>100	>100	>100	50
6	>100	1.56	50	0.78	3.13	6.25	>100	50	>100	>100	>100	>100	50

2.4 早期治疗效果

2.4.1 发病情况和死亡率

至 6 月 30 日止, 渔排 1 的盐酸恩诺沙星组、盐酸土霉素组的大黄鱼基本未发生内脏白点病, 各组死亡率也仅是正常损耗率, 而空白对照组大

黄鱼因该病的死亡率达 6.00%; 渔排 2 的盐酸恩诺沙星组也未有内脏白点现象, 盐酸土霉素组则偶尔有零星内脏小白点发生, 但基本无该病造成的死亡, 而空白对照组因该病的死亡率达到 7.00% (表 4)。

表 4 各试验组大黄鱼因内脏白点病导致的死亡率
Tab. 4 The death rate of *L. crocea* caused by the visceral white - spots disease in each groups

地点 Test site	死亡率/% Death rate		
	盐酸恩诺沙星组 Enrofloxacin hydrochloride group	盐酸土霉素组 Oxytetracycline hydrochloride group	空白对照组 Control group
渔排 1 Fish raft No. 1	0.40	0.46	6.00
渔排 2 Fish raft No. 2	0.43	0.39	7.00

2.4.2 解剖症状观察

解剖观察 2 月 (用药前)、4 月 (用药期间) 和 5 月 (停药后) 分别从渔排 6 个网箱采集的大黄鱼, 解剖结果如表 5 所示, 用药后, 2 个渔排的盐酸恩诺沙星组和盐酸土霉素组的大黄

鱼均未见到内脏白点现象, 但在 4 月渔排 2 和 5 月 2 个渔排的空白对照组的大黄鱼中均观察到不同程度的内脏白点现象, 计算其内脏白点出现率分别为 66.7%、25.0% 和 50.0%。

表5 解剖观察结果
Tab.5 Anatomical observation

采样地点、时间 Collected site and time		病理解剖情况(内脏白点出现率/%) Pathological type(occurrence rate of visceral white spots)		
		盐酸恩诺沙星组 Enrofloxacin hydrochloride group	盐酸土霉素组 Oxytetracycline hydrochloride group	空白对照组 Control group
渔排 1 Fish raft No. 1	2月 Feb.	—	—	—
	4月 Apr.	—	—	—
	5月 May	—	—	脾脏现小白点(25.0%) Small white spots in spleen
渔排 2 Fish raft No. 2	2月 Feb.	—	—	—
	4月 Apr.	—	—	肾脏白点(66.7%) White spots in kidney
	5月 May	—	—	脾脏白点(50.0%) White spots in spleen

注:“—”表示解剖未观察到内脏白点现象(内脏白点出现率为0%)。

Note:—indicated no visceral white spots(occurrence rate of visceral white spots was 0%)。

3 结论与讨论

目前,大黄鱼内脏白点病的治疗普遍存在滞后性,即鱼体出现白点或结节症状后才开始用药,导致治疗效果不甚理想。本研究根据前期大黄鱼内脏白点病流行病学调查和病原菌耐药性普查结果,确定盐酸土霉素和盐酸恩诺沙星两种针对大黄鱼源假单胞菌的敏感性药物(由于盐酸多西环素与盐酸土霉素均属四环素类药物,两者具有相似的抗菌谱,综合考虑选择了盐酸土霉素),预计一旦发现鱼体感染了假单胞菌,就立刻开展药物干预治疗试验,并跟踪分析治疗效果。试验证明,在鱼体感染了致病的假单胞菌,但还未形成内脏结节时,即刻开展口服盐酸恩诺沙星和盐酸土霉素的治疗,会显著降低大黄鱼内脏白点病的发病率及因该病导致的死亡率,达到了提高治愈率的目的。且从总体试验结果来看,盐酸恩诺沙星对大黄鱼源假单胞菌的抑制作用较盐酸土霉素会更明显。综上所述,治疗时间应是提高大黄鱼内脏白点病治愈率的关键因素,即把握药物治疗时间,开展早期干预对有效控制该病的病情具有重要意义。但在此需要注意的是,在使用抗菌药物治疗控制大黄鱼内脏白点病的同时,应严格遵循休药期规定,例如盐酸恩诺沙星的休药期一般为500度日,以确保水产品的质量

安全。

参考文献:

- [1] 邱杨玉,郑磊,毛芝娟,等. 大黄鱼(*Larimichthys crocea*)内脏白点病的病原分离和组织病理学观察[J]. 微生物学通报, 2012, 39(3): 361-370.
- [2] 张丹枫,安树伟,周素明,等. 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)内脏白点病的组织病理和超微病理分析[J]. 渔业科学进展, 2017, 38(4): 11-16.
- [3] Zhang J T, Zhou S M, An S W, et al. Visceral granulomas in farmed large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson), caused by a bacterial pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida* [J]. Journal of Fish Diseases, 2014, 37(2): 113-121.
- [4] 胡娇,张飞,徐晓津,等. 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)内脏白点病原分离鉴定及致病性研究[J]. 海洋与湖沼, 2014, 45(2): 409-417.
- [5] 张杰,毛芝娟. 大黄鱼内脏白点病病原杀香鱼假单胞菌及其毒力因子研究进展[J]. 浙江万里学院学报, 2015, 28(6): 69-76, 81.
- [6] 刘年锋,郭睿,江小斌,等. 福州地区大黄鱼变形假单胞菌的分离与鉴定[J]. 渔业研究, 2016, 38(1): 14-20.
- [7] Huang L, Zuo Y, Jiang Q, et al. A metabolomic investigation into the temperature-dependent viru-

- lence of *Pseudomonas plecoglossicida* from large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) [J]. Journal of Fish Diseases, 2019, 42 (3): 431–446.
- [8] 沈锦玉, 余旭平, 潘晓艺, 等. 网箱养殖大黄鱼假单胞菌病原的分离与鉴定 [J]. 海洋水产研究, 2008, 29 (1): 1–6.
- [9] 许斌福, 程海华, 池洪树, 等. 大黄鱼内脏白点病的病原分析与鉴定 [J]. 福建农业学报, 2015, 30 (7): 631–635.
- [10] 陈卓, 施慧, 谢建军, 等. 大黄鱼人工感染杀香鱼假单胞菌的病理形态学及病原分布的初步研究 [J]. 浙江海洋大学学报 (自然科学版), 2018, (6): 483–488, 493.
- [11] Huang L, Liu W, Jiang Q, et al. Integration of transcriptomic and proteomic approaches reveals the temperature – dependent virulence of *Pseudomonas plecoglossicida* [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2018, 8: 207.
- [12] 许斌福, 王凡, 陈永聪, 等. 宁德地区大黄鱼内脏结节病的流行病学调查 [J]. 福建畜牧兽医, 2017, 39 (1): 5–6.
- [13] 章霞, 柳敏海. 大黄鱼内脏白点病的诊断与防治 [J]. 科学养鱼, 2015, (7): 62.

Analysis on the effect of early intervention on visceral white – spots disease of cage – farmed large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)

SUN Minqiu

(Fujian Fishery Technical Extension Center, Fuzhou 350002, China)

Abstract: This paper explained the early intervention trial on the splanchnic white – spots disease of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) for the first time in domestic, based on the work of the survey of drug sensibility trials in 2016 and screening out two antibacterial agents that *Pseudomonas* spp. isolated from *L. crocea* were highly sensitive to enrofloxacin hydrochloride and oxytetracycline hydrochloride. It was effectively controlled by these two sensitive drugs, particularly enrofloxacin hydrochloride, then the incidence of the disease and mortality caused by it significantly decreased. This experiment was expected to explore effective methods for early prevention and treatment of visceral granulomas in farmed large yellow croaker, not only conducting farmers to use aquaculture drugs scientifically while the incidence was reducing, but also laying a foundation for ensuring the reduction of fishery drugs use and saving costs of the drugs.

Key words: visceral white – spots disease of *L. crocea*; enrofloxacin hydrochloride; oxytetracycline hydrochloride; early intervention