

团头鲂细菌性败血症病原菌 分离鉴定及致病力研究*

田甜¹ 胡火庚^{1,2} 陈昌福^{1**}

1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2. 江西省水产技术推广站, 南昌 330046

摘要 对江西省南昌县某水产养殖场出现的以“体表局部出血、溃疡, 肠系膜充血、出血, 腹腔内有大量积水”为主要症状的团头鲂细菌性败血症进行了研究。从病死及濒死团头鲂的病灶中分离到大量菌株, 通过对其进行形态观察、生理生化特性鉴定、回归感染试验和药敏试验, 结果将这些菌株鉴定为嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)和温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*); 2种致病菌均能导致团头鲂死亡, 并出现与自然条件下相似的症状; 4个分离菌株对万古霉素、丁胺卡那、妥布霉素、卡那霉素、头孢拉定、头孢哌酮、先锋霉素V、氧哌嗪青霉素、氟哌酸等9种药物敏感; TTF-15菌株对先锋噻肟, TTF-004、TTF-013和TTF-015等3个菌株对头孢唑肟, TTF-013菌株对四环素处于中介敏感; 而4个分离菌株对庆大霉素、头孢氨噻三嗪、复达欣和复方新诺明等4种药物显示耐药性。

关键词 团头鲂; 嗜水气单胞菌; 温和气单胞菌; 药敏试验

中图分类号 S 943.119.42 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)03-0341-05

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)是我国重要的人工养殖淡水鱼类之一。该鱼具有肉质鲜美、养殖成本比较低的特点, 在我国不少地区已经得到广泛养殖。然而, 近年来随着集约化养殖程度的提高, 团头鲂受各种传染性病害危害也越来越严重, 成为制约团头鲂集约化养殖的主要因素。团头鲂可能遭受多种细菌性传染病的危害, 因此, 分离鉴定团头鲂细菌性传染病病原、研究病原细菌致病能力、测定致病菌株对药物的敏感性, 对团头鲂细菌性病害的有效防控显得尤为重要。

2008年9月, 江西省南昌县某水产养殖场的团头鲂出现了以“体表出血、溃疡、肠道和肠系膜充血、出血, 肝脏发白, 腹腔积水严重”为主要症状的传染病。笔者从自然发病的团头鲂体内分离得到大量菌株, 经人工回归感染试验, 证实几个分离菌株具有较强致病力; 对具有致病力的菌株完成了生理生化特性鉴定和药物敏感性测定, 以期丰富团头鲂细菌性疾病的病原资料, 并为该病的防控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 病鱼来源及症状观察

2008年9月, 江西省南昌县某水产养殖场的团头鲂成鱼和鱼种出现大批死亡, 取该渔场发病鱼塘里濒死的团头鲂观察, 记录其症状, 并剖检典型病鱼, 记录其病理变化。

1.2 病原菌分离和纯化

选取具有典型症状的濒死病鱼, 在无菌条件下从濒死鱼的体表溃疡部、鳃丝、肝脏、脾脏、肾脏、腹水中分离细菌, 同时分别在BHI(Difco)琼脂平板上划线分离细菌。将平板置于28℃培养, 待长出菌落后, 挑选优势菌株进一步纯化。

1.3 病原菌形态观察

将分离纯化后的细菌培养物分别接种于BHI(Difco)琼脂平板上, 28℃培养箱中恒温培养48h后观察菌落形态。将纯化后的细菌进行革兰氏染色, 于显微镜下(1 000×)观察菌体形态及染色特性。

1.4 菌株致病力测定

将纯化培养的15个菌株在BHI琼脂平板上培

收稿日期: 2010-02-22; 修回日期: 2010-04-28

* 国家“973”项目(2009CB118700)和农业公益性行业科研专项经费项目(200803013)资助

** 通讯作者, E-mail: chenchangfu@mail.hzau.edu.cn

田甜, 女, 1984年生, 硕士研究生, 研究方向: 水产动物疾病与免疫, E-mail: cocotian1234@webmail.hzau.edu.cn.

养 48 h 后,用无菌生理盐水洗下菌苔,并调整菌液浓度至 1.0×10^7 cfu/mL,即为测试菌株致病力的活菌液。

选择无外伤、游动活泼,平均体质量 55.0 g 左右的团头鲂作为供试鱼,在每个 56 cm×45 cm×42 cm 水族箱中放养 10 尾,充气饲养。每天换水 1 次,早、晚各投喂 1 次配合饲料。试鱼经过预备饲养 7 d 后,采用肌肉注射或浸泡的方式进行人工感染,注射法按每尾 0.3 mL 活菌液接种;浸泡法则首先用解剖刀刮去供试鱼身体两侧和尾柄部位的少量鳞片后,以浓度为 1.0×10^7 cfu/mL 活菌液充气浸泡 30 min。试验共分为 32 个组,每组 10 尾,其中 30 组为试验组,注射和浸泡法感染各为 15 组。注射接种的对照组试验鱼经胸鳍基部注射 0.3 mL 无菌生理盐水,浸泡接种的对照组则用相同方法制造鱼体创伤后,继续在未添加活菌的水族箱中充气处理 30 min。试验期间不再投喂饲料,控制水温 (26 ± 2)℃。人工感染结束后连续观察 14 d,记录试验鱼的发病症状和死亡情况,并对死亡鱼体进行解剖和致病菌的再分离,验证试验鱼的死亡是否由人工感染菌株引起的。

1.5 生理生化试验

根据人工感染试验并结合革兰氏染色的结果,选择致病力强的菌株,参照文献[1-3]中的方法进行菌株的种类鉴定。

1.6 供试菌株的测定药物敏感性

药敏试验根据全国临床实验室标准委员会(National Committee for Clinical Laboratory Standards,

NCCLS)推荐的 K-B 琼脂法进行,即将菌液浓度调整至 $4.7\times 10^7\sim 4.7\times 10^8$ cfu/mL,在无菌条件下于 15 min 内用灭菌棉签蘸取菌悬液,均匀涂于待检菌株相应的固体培养基平板。用无菌镊子取待测药敏纸片(广州新源微生物试剂有限公司),将其紧贴于琼脂表面,并将该平板置于 28℃ 培养箱中培养 24 h,记录各药敏纸片的抑菌圈直径(mm)。根据药敏纸片生产厂家推荐的抑菌范围解释标准判断试验结果。

2 结果与分析

2.1 病鱼症状

发病团头鲂成鱼体长大多在 17~22 cm,鱼种体长 9~12 cm。外观可见病鱼均表现出无食欲、游动缓慢、反应迟钝、呼吸困难、背部发黑、腹部膨大、眼球突出、肛门红肿,体表部分呈现块状出血、溃疡,解剖后可见肠道和肠系膜充血、出血,肝脏发白,腹腔严重积水。

2.2 病原菌形态

取病鱼的病灶部位进行病原分离,并且在 BHI 琼脂培养基上培养 24~48 h 后,出现一些特征为光滑、圆整、微凸、乳白色的菌落,还有一些菌落除具有表面光滑、圆整、边缘整齐等相似特征外,菌落颜色为淡黄色。

2.3 菌株的致病力

用所分离的 15 株菌对正常团头鲂进行人工感染的试验结果如表 1 所示。由表 1 可以看出,对正常团头鲂注射或者浸泡感染 TTF-002、TTF-004、

表 1 分离菌株不同感染方法对团头鲂的致病力

Table 1 Virulence of isolates on bluntnose black bream (*Megalobrama amblycephala*) by different infected method

菌株 Strains	浸泡 Immersion			注射 Injection		
	死亡率 Mortality	存活时间 Surviving time/h		死亡率 Mortality	存活时间 Surviving time/h	
TTF001	5/10	77~156		10/10	72~334	
TTF002	10/10	76~335		10/10	48~203	
TTF003	0/10	—		1/10	65	
TTF004	10/10	67~322		10/10	98~259	
TTF005	3/10	96~223		8/10	72~209	
TTF006	0/10	—		2/10	35~78	
TTF007	0/10	—		1/10	46	
TTF008	1/10	302		1/10	87	
TTF009	2/10	69~245		3/10	46~219	
TTF010	0/10	—		1/10	57	
TTF011	3/10	65~157		9/10	27~168	
TTF012	2/10	29~243		2/10	52~187	
TTF013	10/10	125~306		10/10	48~221	
TTF014	0/10	—		1/10	65	
TTF015	10/10	212~243		10/10	78~210	
对照 CK	0/10	—		1/10	55	

表 2 分离菌株 TTF-002、TTF-004、TTF-013 和 TTF-015 的形态、生理和生化特性 ¹⁾						
Table 2 Morphological, physiological and biochemical characterization of the TTF-002, TTF-004, TTF-013 and TTF-015 strains						
项目 Items	菌株 Strains					
	TTF-002	TTF-004	TTF-013	TTF-015	<i>A. hydrophila</i> ²⁾	<i>A. sobria</i> ³⁾
革兰氏染色 Gram stain	—	—	—	—	—	—
吲哚产生 Indole production	+	+	—	—	+	—
MR 试验 MR reaction	+	+	—	—	+	—
VP 试验 Voges-Proskauer	—	—	+	+	—	+
柠檬酸盐 Citrate(simmons)	d	d	d	d	d	d
硫化氢产生 H ₂ S production	+	+	+	+	+	+
脲素水解 Urea hydrolysis	—	—	—	—	—	—
苯丙氨酸酶 Phenylalanine	—	—	—	—	—	—
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	d	d	d	d	d	d
精氨酸双水解酶 Arginine decarboxylase	+	+	+	+		+
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	—	—	—	—	—	—
运动性 Motility	+	+	+	+	+	+
明胶液化 Gelatin hydrolysis	+	+	+	+	+	+
KCN 生长 KCN growth	+	+	+	+	+	+
丙二酸盐利用 Malonte utilization	—	—	—	—	—	—
D-葡萄糖产酸 D-glucose(acid)	+	+	+	+	+	+
D-葡萄糖产气 D-glucose(gas)	+	+	+	+	+	+
侧金盏花糖醇产酸 Adonitol(acid)	—	—	—	—	—	—
L-阿拉伯糖 L-arabinose(acid)	+	+	—	—	+	—
纤维二糖产酸 Cellobiose(acid)	—	—	—	—	—	—
卫矛醇产酸 Duletol(acid)	—	—	—	—	—	—
丁四醇产酸 Erythritol(acid)	—	—	—	—	—	—
D-半乳糖 D-galactose(acid)	+	+	+	+	+	+
丙三醇产酸 Glycerol(acid)	+	+	+	+	+	+
乳糖产酸 Lactose(acid)	d	d	d	d	d	d
麦芽糖产酸 Maltose(acid)	+	+	+	+	+	+
D-甘露醇产酸 D-mannitol(acid)	+	+	+	+	+	+
D-甘露糖产酸 D-mannose(acid)	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]
蜜二糖产酸 Melibiose(acid)	—	—	+	+	—	+
鼠李糖产酸 Rhamnose(acid)	—	—	—	—	—	—
L-鼠李糖产酸 L-rhamnose(acid)	—	—	—	—	—	—
水杨苷产酸 Salicin(acid)	+	+	—	—	+	—
D-山梨醇产酸 D-sorbitol(acid)	—	—	—	—	—	—
蔗糖产酸 Sucrose(acid)	+	+	+	+	+	+
海藻糖产酸 Trehalose(acid)	+	+	+	+	+	+
D-木糖产酸 D-xylose(acid)	—	—	—	—	—	—
七叶苷水解 Esculin hydrolysis	+	+	+	+	+	+
粘多糖产酸 Mucate(acid)	—	—	—	—	—	—
醋酸盐利用 Acetate utilization	d	d	d	d	d	d
脂肪酶(玉米油) Lipase(corn oil)	d	d	d	d	d	d
氧化酶 Oxidase	+	+	+	+	+	+
ONPG	+	+	+	+	+	+
0%食盐生长 0% NaCl growth	+	+	+	+	+	+
1%食盐生长 1% NaCl growth	+	+	+	+	+	+
6%食盐生长 6% NaCl growth	—	—	—	—	—	—
0/129 敏感性 0/129 sensitivity	—	—	—	—	—	—

1) “—”:0%~10%的阳性 0%~10% positive; “+”:90%~100%阳性 90%~100% positive; “d”:26%~75%阳性 26%~75% positive; “[+]”: 76%~89%阳性 76%~89% positive; “ONPG”: O-硝基苯-β-D 吡喃半乳糖苷酶 O-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside. 2)、3)《伯杰氏系统细菌学手册》(第九版)数据 Dada from“ Bergey’s manual of systematic bacteriology” 9th.

TTF-013 和 TTF-015 等 4 个菌株,均可以导致供试鱼 100% 的死亡;而利用 TTF-001、TTF-011 和 TTF-005 等 3 个菌株注射感染试验鱼,可以导致 80%~100% 的供试鱼死亡。其它菌株无论是注射还是浸泡接种,导致试验鱼的死亡率均比较低。浸泡方式的对照组试验期间无鱼死亡,注射感染的对

照组也只有 1 尾鱼死亡。
对试验组死亡鱼体的病理检查结果表明,浸泡法人工感染后试验鱼体表有皮肤溃疡,肌肉和尾鳍基部充血,而内部器官则无明显病灶,从人工感染到死亡的时间间隔比较长;注射法人工感染的试验鱼在注射部位出现皮肤溃疡,露出肌肉,所有鳍条基部

充血,部分鱼体的肠道、肝胰脏也出现点状充血现象。无论是注射还是浸泡法人工感染后死亡的大多数鱼体呈现出与自然条件下发病部分相同的症状。

2.4 生理生化特性

对 TTF-002、TTF-004、TTF-013 和 TTF-015 等 4 个分离菌株的形态和生化特性的测定结果归纳为表 2。由表 2 中所示结果可以看出,TTF-002 和 TTF-004 菌株的生化特性与嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)的生化特性一致,而 TTF-013 和 TTF-015 菌株的生化特性与温和气单胞菌(*A. sobria*)的生化特性一致。因此,TTF-002 和 TTF-004 两个分离菌株应当归属于 *A. hydrophila*;而 TTF-013 和 TTF-015 两个分离菌株应当归属于 *A. sobria*。

表 3 分离菌株 TTF-002、TTF-004、TTF-013 和 TTF-015 对常用抗生素的敏感性分析¹⁾
Table 3 The sensitivity of four isolated strains TTF-002, TTF-004, TTF-013 and TTF-015 to antibiotics

抗生素 Antibiotic	菌株 Strain			
	TTF-002	TTF-004	TTF-013	TTF-015
多肽类 Peptides				
万古霉素 Vancomycin	S	S	S	S
氨基糖苷类 Aminoglycosides				
丁胺卡那 Amikacin	S	S	S	S
庆大霉素 Gentamycin	R	R	R	R
妥布霉素 Tobramycin	S	S	S	S
卡那霉素 Kanamycin	S	S	S	S
β-内酰胺 Beta-lactams				
头孢拉定 Cefradine	S	S	S	S
头孢哌酮 Cefoperazone	S	S	S	S
先锋霉素 V Cefazolin V	S	S	S	S
氧哌嗪青霉素 Piperacillin	S	S	S	S
先锋噻肟 Cefotaxime	R	R	R	I
头孢氨噻三嗪 Ceftriaxone	R	R	R	R
苯唑青霉素 Oxacillin	S	S	S	S
头孢呋肟 Cefuroxime	R	I	I	I
复达欣 Ceftazidime	R	R	R	R
四环素类 Tetracyclines				
四环素 Tetracycline	R	R	I	R
喹诺酮类 Quinolones				
氟哌酸 Norfloxacin	S	S	S	S
磺胺类 Sulfonamides				
复方新诺明 Cotrimoxazole	R	R	R	R

1)R:耐药 Resistant; S:敏感 Sensitive; I:中介 Intermediate.

3 讨 论

A. hydrophila 和 *A. sobria* 均已经被证明能导致水产养殖动物发生严重的疾病^[4-6],由这 2 种致病菌所引起的暴发性传染病,具有发病急、传播快、波及范围广、感染鱼类种类多的特点,对我国水产养殖鱼类造成的损失较大^[7-10]。

2.5 药敏试验结果

分离菌株 TTF-002、TTF-004、TTF-013 和 TTF-015 的药敏试验结果见表 3。结果表明,在 17 种供试抗生素中,4 个分离菌株对万古霉素、丁胺卡那、妥布霉素、卡那霉素、头孢拉定、头孢哌酮、先锋霉素 V、氧哌嗪青霉素、氟哌酸等 9 种药物敏感;TTF-15 菌株对先锋噻肟,TTF-004、TTF-013 和 TTF-015 等 3 个菌株对头孢呋肟,TTF-013 菌株对四环素处于中介敏感;而 4 个分离菌株对庆大霉素、头孢氨噻三嗪、复达欣和复方新诺明等 4 种药物显示耐药性;TTF-002、TTF-004、TTF-013 等 3 个菌株对先锋噻肟,TTF-002 菌株对头孢呋肟,TTF-002、TTF-004 和 TTF-015 等 3 个菌株对四环素均显示出了耐药性。

本研究从团头鲂成鱼和鱼种体内同时分离到了 *A. hydrophila* 和 *A. sobria*,这 2 种致病菌均可引起团头鲂鱼体出现以出血为特征的细菌性败血症。完成的 *A. hydrophila* 和 *A. sobria* 对抗菌素类药物耐药性分析发现,2 种致病菌均对万古霉素、丁胺卡那、妥布霉素、卡那霉素、头孢拉定、头孢哌酮、先锋霉素 V、氧哌嗪青霉素、氟哌酸等 9 种药物敏感;而

对庆大霉素、头孢氨噻三嗪、复达欣和复方新诺明等 4 种药物均显示耐药性，初步说明 2 种致病菌具有相似的药物感受性。但是，TTF-15 菌株对先锋噻肟，TTF-004、TTF-013 和 TTF-015 等 3 个菌株对头孢呋肟，TTF-013 菌株对四环素处于中介敏感；而 4 个分离菌株对庆大霉素、头孢氨噻三嗪、复达欣和复方新诺明等 4 种药物显示耐药性。除此之外，2 种致病菌的不同菌株还显示出对先锋噻肟、头孢呋肟和四环素具有不同的耐药性。

本研究结果证明，*A. hydrophila* 和 *A. sobria* 可能对团头鲂的鱼种与成鱼形成混合感染，但是，由于这 2 种致病菌对抗菌素的耐药谱并不完全相同，可能为该病的药物有效治疗带来一些困难，需要在团头鲂细菌性疾病的药物治疗过程中，注意选择对 *A. hydrophila* 和 *A. sobria* 均显示敏感的药物。

参 考 文 献

[1] 中国科学院北京微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法[M]. 北京：科学出版社，1978：94-119.

[2] KRIEG N R,HOIT J G. Bergey’s manual of systematic bacteriology [M]. 9th ed. Baltimore:Williansand Wilkins Company, 1994:516-548.

[3] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京：科学出版社，2001：9-42.

[4] 陈怀青,陆承平. 家养鲤科鱼暴发性传染病的病原研究[J]. 南京农业大学学报,1991,14(4):87-91.

[5] 刘堂水,汪成竹,陈昌福. 斑点叉尾鲷细菌性病原的分离与鉴定[J]. 华中农业大学学报,2006,25(5):550-554.

[6] 贾亚东,汪成竹,陈昌福. 中华鳖对嗜水气单胞菌粗脂多糖(LPS)的免疫应答[J]. 华中农业大学学报,2007,26(2):228-232.

[7] 胡大雁,钱冬,刘问,等. 嗜水气单胞菌 BA-ELISA 的建立及在病原检测中的应用[J]. 华中农业大学学报,2008,27(1):80-85.

[8] 陈爱平. 2005 年中国水产养殖病害监测报告[J]. 科学养鱼, 2006(8):48-49.

[9] 陈昌福. 抗菌渔药的使用问题与水产品质量安全[J]. 饲料工业,2009,30(4):1-5.

[10] KOZINSKA A. Dominant pathogenic species of mesophilic aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland [J]. Journal of Fish Diseases,2007,30:293-301.

Identification and Pathogenicity of Bacterial Pathogens Isolated in an Outbreak of Bacterial Disease of Bluntnose Black Bream, *Megalobrama amblycephala*

TIAN Tian¹ HU Huo-geng^{1, 2} CHEN Chang-fu¹

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
2. Jiangxi Aquaculture Technology Promotion Stations, Nanchang 330046, China

Abstract This paper reported the fulminant haemorrhagic disease of bluntnose black bream(*Megalobrama amblycephala*) in Jiangxi, China. The typical symptoms of the disease included: decay in the end of dorsal and caudal fins; congestion and hemorrhage in skin; muscle and intestines with ascites. Two kinds of bacteria were isolated from the sick bluntnose black bream with typical syndrome and were proved to be its pathogen by artificial challenge. The pathogens were identified as *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by morphological observation and biochemical test. The antibiotic sensitivity analysis showed that vancomycin, amikacin, tobramycin, kanamycin, cefradine, cefoperazone, cefazolin, piperacillin and norfloxacin were sensitive to *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria*; *A. hydrophila* and *A. sobria* were resistant to gentamycin, ceftriaxone, ceftazidime and cotrimoxazole.

Key words *Megalobrama amblycephala*; *Aeromonas hydrophila*; *Aeromonas sobria*; antibiotic sensitivity analysis