

鳗鲡气单胞菌病一新种

A NEW SPECIES OF AEROMONAS AS PATHOGEN IN EELS

王广和 王 坚

(海安县卫生防疫站, 江苏省 226600)

钱晓明 朱永祥 王建明 陆仁海

(南通龙洋水产有限公司, 江苏省 226634)

WANG Guang-He, WANG Jian

(Haian County Hygiene and Antiepidemic Station, Jiangsu Province 226600)

QIAN Xiao-Ming, ZHU Yong-Xiang, WANG Jian-Min, LU Ren-Hai

(Nantong Longyang Aquatic Products Company Limited, Jiangsu Province 226634)

关键词 鳗鲡, 病原体, 海安气单胞菌

KEYWORDS Eel, Pathogen, *Aeromonas Haian*

1995 年 2 月到 1997 年 2 月, 从病鳗的内脏中多次检出一种国际新的气单胞菌——海安气单胞菌, 对其生物学特性和病原性意义进行了较详细的研究, 并且探讨了治疗该鳗病的有效药物与使用浓度。

1 材料与方方法

1.1 材料

鳗鲡病料分别取自海安县三个养殖场的濒死鳗鲡。实验动物鳗鲡主要来自南通龙洋水产有限公司, 每尾体重为 10~15 g 小白鼠购自南通医学院动物室, 每只体重为 16~20 g。培养基、分离用的血平板、麦康凯平板、普通平板及气单胞菌液体培养基 M₁、M₂ 均自配, 生化鉴定管为浙江省军区后勤部卫生防疫所产品, 1% 红血球取自海安人民医院血库, 药敏纸片为浙江省军区后勤部卫生防疫所提供, 治疗试验药物主要来自南通龙洋水产有限公司, 中草药购自海安中药店。

1.2 方法

细菌分离培养: 从发病严重的鳗鲡中, 无菌操作分别取肝、肾、血、肠、胃水病料划线接种于血平板、麦康凯平板, 置 28℃ 有氧温箱和厌氧培养箱内培养 18~24h 取单个菌落转种普通平板留种作为菌种鉴定和试验用。

细菌鉴定: 按照 Kriegl 1984 和何晓青和宋天锡 1989 中气单胞菌属特性为依据, 同时用嗜水气单胞菌标准株对照。DNA 中 G+ Cmol% 含量测定由中国科学院微生物研究所完成。

细菌致病性: 细菌数测定, 取血平板 95-72 菌株 18h 培养物接种于 10 mL 气单胞菌培养基 M₁, 28℃ 培养 18h 然后用 M₁ 培养基作 10 倍递增稀释, 以倾注平板法测定每 mL 中的细菌数。

小白鼠 LD₅₀ 测定: 将上述 95-72 菌的 18h 培养物用 M₁ 作 6 个 10 倍递增稀释, 每个稀释度腹腔注射 6 只小白鼠, 每只 0.2mL, 另设 M₁ 对照, 观察一周, 记录发病死亡情况, 按 Reed-Muech 法计算 LD₅₀。

鳗鲡 LD₅₀ 测定: 将上述 95-72 菌的 18h 培养物用 M₁ 作 6 个 10 倍递增稀释, 每个稀释度腹腔注射健康鳗鲡 6 尾, 每尾 0.2mL, 分别放入 25℃ 水温盆内暂养, 观察一周, 按 Reed-Muech 法计算 LD₅₀。

溶血价测定: 将上述 95-72 菌接种于 M₂ 培养基, 置 28℃ 180r/min 振荡培养 18h, 经 4 000r/min 离心 30min, 取上清液用 PBS 在 96 孔微量反应板上作倍比稀释, 然后加入等量 1% 人的“O”型红细胞, 置 37℃ 温箱作用 1h, 放入 4℃ 冰箱过夜, 以 50% 的红细胞溶解的最高稀释度为溶血价。

药敏试验: 定性试验, 运用 K-B 纸片扩散法, 按判断标准判结果。抗生素最小抑菌浓度测定, 按韩文瑜等 [1992] 的稀释法测定, 选用水产常用药物测定对海安气单胞菌的 MIC。中草药最小抑菌浓度测定, 将中草药先用 10 倍水浸泡 3h, 然后煎火煮 0.5h, 灭菌后作为原液, 再用 MH 作 2 倍递增稀释, 同时接种试验菌, 以最高稀释度管无混浊细菌生长为该药物的最小抑菌浓度。

2 结果

2.1 致病菌的分离

1995 年 2 月到 1997 年 2 月, 从三个养鳊场的病鳊内脏器官中共检出 8 株菌(表 1)。

表 1 菌株来源

Tab. 1 Sources of the bacterial strains

菌株编号	分离时间	地点	器官	鳊重(g)	池水温(℃)
海安 95-72	1995-02	A 场	胃水	510	25~28
海安 95-73	1995-02	A 场	肠液	510	25~28
海安 95-173	1995-12	B 场	肝	125	24~26
海安 95-174	1995-12	B 场	肾	125	24~26
海安 95-178	1995-12	B 场	肠液	125	24~26
海安 96-109	1996-12	C 场	肝	115	26~28
海安 96-110	1996-12	C 场	肠液	115	26~28
海安 97-14	1997-02	B 场	肝	210	25~28

2.2 细菌鉴定

所有 8 株细菌生化特性一致, 均为 G⁻ 杆菌, 单鞭毛、无荚膜、无芽胞, 在血平板上呈 β 溶血, 菌落圆形, 湿润, 整齐, 灰褐色, 有光泽。在普通平板上很快产生棕红色色素, 过 20 天后色素逐渐变为黑色, 进一步生化鉴定(表 2)。由表 2 可知, 该菌为 G⁻ 杆菌, 发酵葡萄糖产酸产气, 37℃ 生长, 有动力, 氧化酶与触酶均阳性, 对 O/129 抗性, 能在无盐胨水中生长, 肌醇阴性, 应归气单胞菌。但与其他的气单胞菌某些生化特性不同(表 3)。

表 2 海安气单胞菌的生化特性

Tab. 2 Biochemical characters of the strain *A. haian*

项目	结果	项目	结果	项目	结果	项目	结果
氧化酶	+	触酶	+	OF	F	O/129	R
37℃ 生长	+	动力	+	葡萄糖	⊕	赖氨酸	+
精氨酸	+	鸟氨酸	-	DNA	-	精氨酸双水解酶	+
硝酸盐还原	+	明胶	+	阿拉伯糖	-	水扬素	-
七叶苷	+	KCN	-	靛基质	-	H ₂ S	-
枸橼酸盐	+	尿素	-	蔗糖	+	甘露醇	+
甘露糖	+	肌醇	-	木糖	-	草糖	-
0% NaCl	+	3% NaCl	+	6% NaCl	-	丙二酸盐	-
苯丙氨酸	-	粘液酸	-	酒石酸盐	-	乙酰胺	-
醋酸盐	-	纤维二糖	+	鼠李糖	-	VP	+
山梨醇	-	山梨糖	+	侧金盏花醇	-	赤鲜醇	-
密二糖	-	阿拉伯醇	-	棉子糖	-	松二糖	-
松三糖	-	乳糖	-	菊糖	-	缩苹果酸	-
葡萄糖铵	+	麦芽糖	+	卫矛醇	-	ONPG	-
甲基红	+	亚硝酸盐产气	-	苦杏仁苷	-	G+Cmol%	55.88

注: + 阳性, - 阴性, F 发酵, R 抗性, ⊕ 产酸产气

2.3 细菌的致病性

细菌数测定, 95-72 菌株在气单胞菌 M₁ 培养基经 28℃ 培养 18 h, 细菌数为 9.5×10^8 个/mL。用 95-72 菌株测定小白鼠 LD₅₀, 结果为 3.9×10^6 。用 95-72 菌株感健康鳗鲡, 结果大多数鳗鲡发病死亡时间为 3~7 天, 症状与自然发病相似, 且从肝、肠病料中检出原攻击菌。对鳗鲡的 LD₅₀ 为 1.2×10^5 (表 4)。95-72 菌株在气单胞菌 M₂ 培养基上 28℃ 振荡培养 18h 的离心上清液对人的“O”型红细胞的溶血价为 1:32。

2.4 药敏试验

四株细菌对抗生素的敏感性结果见表 5。常用药物对海安气单胞菌的最小抑菌浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 结果见表 6。几种中草药对海安气单胞菌的最小抑菌浓度结果见表 7。

表 3 海安气单胞菌与其他气单胞菌特性比较

Tab. 3 Biochemical characters of *A. haian* compared with others

项目	嗜水	豚鼠	温和	杀鲑 亚种	无色 亚种	杀日本 鲑亚种	维隆	中间	舒伯特	简达	易损	嗜泉	海安
动力	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
水溶褐色素	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
赖氨酸	+	-	+	d	d	d	+	-	+	+	+	+	+
精氨酸双水解酶	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
鸟氨酸	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
甘露醇	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
肌醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37℃生长	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
靛基质	+	+	+	-	+	+	+	d	-	+	+	+	+
七叶苷	+	+	-	+	-	+	+	d	-	-	-	+	(+)
阿拉伯糖	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
水扬素	+	+	-	d	d	d	+	°	-	-	-	-	-
蔗糖	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
VP	+	-	d	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
葡萄糖产气	+	-	+	+	-	+	+	°	-	+	+	+	+

注: + 阳性, - 阴性, d 不定, ° 无资料, (+) 迟缓阳性

表 4 海安气单胞菌 95-72 鳗鲡半数致死量测定

Tab. 4 Determination of LD₅₀ of *A. haian* strain 95-72

稀释度	细菌数/尾	死亡数	生存数	累计总计			
				死亡	生存	死亡比例	死亡率%
10 ⁻¹	9×10 ⁷	6	0	16	0	16/16	100
10 ⁻²	9×10 ⁶	6	0	10	0	10/10	100
10 ⁻⁴	9×10 ⁵	3	3	4	3	4/7	57.1
10 ⁻⁵	9×10 ⁴	1	5	1	8	1/9	11.1
10 ⁻⁶	9×10 ³	0	6	0	14	0/14	0
	9×10 ²	0	6	0	20	0/20	0
M ₁ 对照	0	0	6	0	6	0	0

3 讨论

气单胞菌广泛存在于污水、土壤、鱼虾、爬行动物中, 过去总认为是爬行动物和两栖类的重要病原菌, 主要引起青蛙、蛇等动物疾病。现已证明它是人、兽、鱼共患病的重要成员[陆承平 1992]。本次从病鳗的肝、肾、肠、胃水等内脏中多次检出海安气单胞菌, 经同种动物复制, 发病死亡情况和剖检变化与自然发病相似, 本菌能产生强烈溶血素, 能使小白鼠很快死亡, 对鳗鲡的半数致死量为 1.2×10^5 , 表明毒力较强。结合流行病学调查

表 5 几个菌株对抗生素的敏感性

Tab. 5 Sensitivity of the strains to antibiotics (抑菌圈 mm)

抗生素	海安 95-72	海安 95-173	海安 96-109	海安 97-14	抗生素	海安 95-72	海安 95-173	海安 96-109	海安 97-14
氟哌酸	22	24	21	20	环丙沙星	27	25	27	25
菌必治	40	40	36	35	青霉素 G	0	0	0	0
氯霉素	20	21	20	18	红霉素	9	9	18	12
卡那霉素	10	10	18	9	二甲胺四环素	13	15	14	11
痢特灵	15	16	15	13	链霉素	19	20	22	20
复方新诺明	0	0	0	0	茶啉酸	0	0	0	0
西力欣	35	36	35	30					

表 6 几株菌对抗生素的最小抑菌浓度

Tab. 6 MIC of the strains to antibiotics ($\mu\text{g/mL}$)

药物	海安 95-72	海安 95-173	海安 96-109	海安 97-14	药物	海安 95-72	海安 95-173	海安 96-109	海安 97-14
氟哌酸	1.56	0.78	0.78	0.78	环丙沙星	0.78	0.78	0.39	0.78
痢特灵	6.25	6.25	6.25	12.5	氯霉素	3.13	3.13	3.13	6.25
庆大霉素	6.25	6.25	6.25	6.25	鳟鱼宁	50.0	50.0	50.0	50.0
先锋必	0.2	0.2	0.2	0.2	土霉素	200	200	100	200

表 7 几株菌对中草药的最小抑菌浓度

Tab. 7 MIC of the strains to herbs (mg/mL)

中草药	海安 95-72	海安 95-173	海安 96-109	海安 97-14	中草药	海安 95-72	海安 95-173	海安 96-109	海安 97-14
大黄	12.5	12.5	12.5	12.5	五倍子	0.39	0.78	0.39	0.78
紫背天葵	200	200	200	200	野菊花	50	25	100	50
连翘	25	25	25	50	金银花	200	200	200	200
紫花地丁	200	200	200	200	车前草	50	100	50	50
马齿苋	50	25	50	25	穿心莲	100	25	50	25
千里光	100	200	100	100					

和主要症状分析,认为海安三个养鳊场的鳊鱼发病死亡是由海安气单胞菌引起的。近几年来,随着养鳊业的迅速发展,鳊鱼细菌性疾病也日益加剧,常见的有嗜水气单胞菌引起的赤鳍病,腐败假单胞菌引起的赤点病,迟缓爱德华氏菌引起的肝肾病,柱状噬胞菌引起的烂鳃病,温和气单胞菌引起的烂尾病等[黄琪琰 1993]。暂未见到由海安气单胞菌引起的鳊鱼传染病,这在国内外属首次发现。此病某些症状与肠炎病、烂鳃病、赤鳍病相似,有的同时并发,如不弄清病源,容易造成错误诊断,应引起鱼病工作者的注意。

药物敏感试验表明,该菌对青霉素、红霉素、复方新诺明、茶啉酸、四环素等耐药,而常用的痢特灵效果也不好。根据最小抑菌浓度测定,选用氟哌酸进行治疗试验,采取五倍子泼洒同时饵料中拌加氟哌酸投喂取得了很好的效果,很快控制了本病的继续发生和发展。其使用药物浓度五倍子为 10^{-6} ,氟哌酸以每公斤饵料添加 2~3g 投喂为宜。

本工作得到江苏省淡水研究所郝淑英副研究员的支持与帮助,菌种经中国科学院微生物研究所蔡妙英教授复核鉴定,在此一并表示衷心感谢。

参 考 文 献

- 何晓青,宋天寿. 1989. 卫生防疫细菌检验. 北京: 新华出版社. 259~261.
- 韩文瑜,何昭阳,刘玉斌. 1992. 病原细菌检验技术. 吉林: 吉林科学技术出版社. 76~85.
- 陆承平. 1992. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病. 水产学报, 16(3): 282~288.
- 黄琪琰主编. 1993. 水产动物疾病学. 上海: 上海科学技术出版社. 119~124.
- Krieg N.R. 1984. Bergey's manual of systematics bacteriology. Williams, Wilkins, Baltimore. (1): 545~548.