

中华绒螯蟹细菌性病原的分离和鉴定

陆宏达 金丽华

(上海水产大学渔业学院, 200090)

范丽萍 薛 美

(上海市崇明县水产技术推广站, 202150)

摘 要 对上海市崇明县、江苏省太仓市等地养殖的中华绒螯蟹以出现大量腹水为主要症状的病蟹进行细菌分离, 经人工感染、生理生化试验和菌种鉴定, 引起河蟹腹水病的致病菌为嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)和拟态弧菌(*Vibrio mimicus*)。药敏试验结果表明, 这两种致病菌都对环丙沙星、诺氟沙星和氯霉素高度敏感, 这些药可作为防治该病的首选药物。

关键词 中华绒螯蟹, 嗜水气单胞菌, 拟态弧菌, 抗菌药物

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)(以下简称河蟹)大规模养殖是近几年发展起来的, 在养殖过程中, 河蟹出现一种疾病, 病蟹主要症状表现为腹腔内出现大量腹水, 有些地方称该病为“河蟹腹水病”, 这种病死亡率较高, 造成较大经济损失。从濒临死亡的病蟹中分离到 3 株致病菌, 其中 2 株为嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*), 1 株为拟态弧菌(*Vibrio mimicus*)。嗜水气单胞菌和拟态弧菌引起养殖河蟹患病在国内外均未见报道, 本文有关致病细菌及其对抗菌药物敏感性的研究结果将有助于对养殖河蟹的疾病进行预防和治疗。

1 材料和方法

1.1 实验材料

病蟹主要采自上海市崇明县和江苏省太仓市的发病蟹塘, 病蟹大约 10g ~ 100g, 大小不一。

1.2 细菌分离

病蟹用清水洗刷干净后, 用 75% 的酒精棉球将病蟹的外壳以及步足外表擦拭, 进行体表消毒。用灭菌针筒从蟹第三步足基部抽取血淋巴液然后迅速将 1 ~ 2 滴的血淋巴液注滴到营养琼脂平板上进行划线分离; 同时还进行内脏组织致病细菌分离, 病蟹体表经 75% 酒精消毒后, 打开蟹的甲壳, 用无菌镊子取少许肝胰腺组织或心脏组织在营养琼脂平板上划线分离。在 28 °C 恒温培养箱中培养 18 ~ 24 小时, 分纯后接种于斜面培养基上保存, 供试验用。

1.3 人工感染试验

1.3.1 人工感染河蟹

将健康蟹分别暂养在水族箱(70cm×40cm×50cm)中驯养近一星期,水温在25℃左右,充气泵充气,每天换水1/2~1/3,蟹的大小为80g左右。试验菌在28℃培养18~24小时后用生理盐水洗下,用麦氏比浊管法及血球计数板计数后,将细菌数量稀释成约 10^8 个/mL,然后用0.5 mL的灭菌针筒将细菌悬液从健康蟹的第三步足基部注射到蟹胸部,每只健康蟹注射0.1 mL。对照蟹在相应的部位每只注入0.1 mL的无菌生理盐水。

1.3.2 人工感染异育银鲫

异育银鲫与河蟹在相似的水环境下饲养,异育银鲫的大小为200g左右,每尾异育银鲫背部肌肉注射菌浓度约为 10^8 个/mL的菌悬液0.5mL。对照组异育银鲫在相应的部位每尾注射0.5mL的无菌生理盐水。从人工感染试验发病的河蟹和异育银鲫发病的病体中再进行细菌分离培养,进行生理生化试验,观察再分离到的细菌是否与人工感染时所用的细菌一致。

1.4 致病菌的鉴定

致病菌的生理生化特性的测定及菌种鉴定按照中国科学院微生物研究所细菌分类组[1978],陈长怡等[1990]和Holt等[1994]所述方法进行。菌体鞭毛采用银染色方法染色后进行观察。

1.5 药敏试验

将致病菌稀释成悬液后,均匀涂布于营养琼脂培养基平板上,然后用购自上海市卫生防疫站的药敏纸片贴在平板上,在28℃恒温培养箱中培养24小时观察抑菌圈大小。

2 结果

2.1 病蟹症状

病蟹行动缓慢,反应迟钝,腹腔内出现大量腹水,肠中无食,心脏肿大,心跳乏力,临死前蟹腹向上不能自行翻身,所采集的病蟹中少部分病蟹步足有时出现抖动现象。

2.2 细菌的分离和人工感染

不同地区发病河蟹塘中,从病蟹上分离到3株菌,经人工感染试验,都可使健康河蟹和异育银鲫发病死亡,具较强的毒力。结果见表1和表2。人工感染后的病蟹与自然发病蟹表现为相应的症状,主要症状为腹腔内出现大量腹水,心脏肿大,临死前反应迟钝等病症,但人工感染后的病蟹不出现步足抖动现象。人工感染后死亡的大多数异育银鲫出现鳃盖、鳍基部、眼眶周围、口腔严重充血,腹部也有明显的充血现象,肛门红肿,腹部膨大,腹腔内有腹水,肝脏、肾脏、脾脏肿大,肠充血。少数死亡的异育银鲫出现的症状程度较轻,有的不明显,这可能是由于超急性感染导致病鱼尚未出现明显症状而死亡的缘故。从人工感染的病蟹上和异育银鲫上再分离出的细菌与人工感染时采用的感染细菌的菌落形态、菌体特征以及生理生化反应是完全一致的。对照组蟹和异育银鲫均未出现病症。

表 1 3 株菌人工注射感染河蟹试验

Tab. 1 The artificial injecting infections of *E. sinensis* with three strains

| 菌株 | 感染菌浓度 (个/mL) | 剂量 (mL) | 死亡数/ 试验数 | 感染后死亡顺序和时间 | | | | |
|--------|-----------------|------------|----------|------------|-----|-----|-----|-----|
| | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 961018 | 10 ⁸ | 0.1 | 5/5 | 25h | 36h | 38h | 42h | 53h |
| 970621 | 10 ⁸ | 0.1 | 5/5 | 24h | 24h | 27h | 31h | 34h |
| 970724 | 10 ⁸ | 0.1 | 5/5 | 18h | 23h | 24h | 24h | 27h |
| 对照组 | 生理盐水 | 0.1 | 0/5 | 30 天内均成活 | | | | |

表 2 3 株菌人工注射感染异育银鲫试验

Tab. 2 The artificial injecting infections of allogynogenetic crucian carps with three strains

| 菌株 | 感染菌浓度 (个/mL) | 剂量 (mL) | 死亡数/ 试验数 | 感染后死亡顺序和时间 | | | | |
|--------|-----------------|------------|----------|------------|-----|-----|-----|---|
| | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 961018 | 10 ⁸ | 0.5 | 4/4 | 24h | 23h | 31h | 32h | |
| 970621 | 10 ⁸ | 0.5 | 4/4 | 25h | 27h | 34h | 35h | |
| 970724 | 10 ⁸ | 0.5 | 4/4 | 14h | 15h | 15h | 20h | |
| 对照组 | 生理盐水 | 0.5 | 0/4 | 30 天内均成活 | | | | |

2.3 细菌的鉴定

2.3.1 菌体形态和培养特征

菌株 961018 和 970621 均为革兰氏阴性杆菌, 菌体短杆状, 大小为 $0.5 \sim 1.0 \times 1.1 \sim 1.7 \mu\text{m}$, 无芽胞和荚膜。绝大多数菌体为单个, 少数为双个相连, 极生单鞭毛。2 株菌在营养琼脂平板上 28°C 培养生长良好, 24 小时左右菌落大小约为 $1 \sim 1.5 \text{ mm}$, 菌落圆形扁平, 边缘整齐, 灰白色。菌株 970724 为革兰氏阴性短杆菌, 大小为 $0.4 \sim 0.8 \times 0.8 \sim 1.4 \mu\text{m}$, 无芽胞和荚膜, 极生单鞭毛, 单个或双个相连, 菌体直或稍弯。菌株在营养琼脂平板上 28°C 培养生长良好, 24 小时左右菌落大小约为 $0.8 \sim 1.4 \text{ mm}$, 菌落圆形, 中间稍高, 边缘较整齐, 乳白色。

2.3.2 菌株的生理生化反应

菌株的生理生化反应见表 3。菌株 961018 和 970621 的葡萄糖氧化发酵测定为发酵型产酸产气, 无 NaCl 胨水中生长良好, 6% 及以上 NaCl 胨水中均不生长。菌株 961018 在柠檬酸盐利用上与《伯杰氏细菌鉴定手册》第九版 [Holt 等 1994] (以下简称手册) 上的嗜水气单胞菌不一样, 菌株 970621 在赖氨酸脱羧酶和 V. P. 反应上与手册中嗜水气单胞菌不一样, 其它主要生理生化反应完全一致。菌株 961018 和 970621 均属嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)。个别的生化反应不一致是由于不同地区分离到的菌株存在的差异所致。

菌株 970724 的葡萄糖氧化发酵测定为发酵型产酸, 但不产气, 对 O/129 敏感, V. P. 反应和酒石酸盐反应均为阴性, 对多粘菌素敏感。与手册中的拟态弧菌相比较, 菌株 970724 为拟态弧菌 (*Vibrio mimicus*)。

2.3.3 药敏试验

抗菌药物敏感性试验结果见表 4。2 株嗜水气单胞菌对环丙沙星、诺氟沙星和氯霉素高度敏感, 而对四环素、呋喃妥因、土霉素、庆大霉素、卡那霉素、痢特灵和复方新诺明中度敏感, 对麦迪霉素、氨苄青霉素和头孢孟多不敏感。

表 3 3 菌株和嗜水气单胞菌、拟态弧菌之间的生理生化反应比较

Tab. 3 The comparison of physiology and biochemistry of three strains with *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio mimicus*

| 测定项目 | 961018 | 970621 | 嗜水气单胞菌 | 970724 | 拟态弧菌 |
|---------------------------|--------|--------|--------|--------|------|
| O/F | F | F | F | F | |
| 吲哚 | + | + | + | + | + |
| 甲基红 | + | + | + | + | + |
| V. P. | + | - | + | - | - |
| 柠檬酸盐利用 | - | + | d | + | + |
| 动力 | + | + | + | + | + |
| 氧化酶 | + | + | + | + | + |
| 尿素水解(尿酶) | - | - | - | - | - |
| 色氨酸脱羧酶 | - | - | | | |
| 苯丙氨酸脱氨酶 | - | - | - | - | - |
| 赖氨酸脱羧酶 | + | - | d | + | + |
| 精氨酸双水解酶 | + | + | + | - | - |
| 鸟氨酸脱羧酶 | - | - | - | + | + |
| 明胶水解 | + | + | + | + | d |
| 丙二酸盐利用 | - | - | - | - | - |
| 葡萄糖产酸 | + | + | + | + | + |
| 葡萄糖产气 | + | + | + | - | - |
| 核糖醇 | - | - | - | - | - |
| L-阿拉伯糖 | + | + | + | - | - |
| 纤维二糖 | - | - | - | - | - |
| 半乳糖 | + | + | + | - | [+] |
| 甘油 | + | + | + | - | [-] |
| 肌醇 | - | - | - | - | - |
| 乳糖 | + | + | d | + | [-] |
| 麦芽糖 | + | + | + | + | + |
| 甘露醇 | + | + | + | + | + |
| 密二糖 | - | - | - | - | - |
| 水杨苷 | + | + | + | - | - |
| 山梨糖醇 | - | - | - | - | - |
| 蔗糖 | + | + | + | - | - |
| 木糖 | - | - | - | - | - |
| 酒石酸盐 | - | - | - | - | [-] |
| 七叶苷 | + | + | + | - | - |
| 硝酸盐还原 | + | + | + | + | + |
| β -半乳糖苷酶 | + | + | + | + | + |
| 0% NaCl | + | + | + | + | + |
| 1% NaCl | + | + | + | + | + |
| 6% NaCl | - | - | | + | d |
| 8% NaCl | - | - | | - | - |
| 0/ 129 | | | - | | + |
| 0/ 129(10 ⁴ g) | R | R | | S | |
| (150 ⁴ g) | R | R | | S | |
| 多粘菌素 | | | | + | [+] |

注: +, 阳性; [+]: 大多数菌阳性; -, 阴性; [-]: 大多数菌阴性; d, 11~89%的菌为阳性; R, 不敏感; S, 敏感; O/F, 氧化/发酵。

拟态弧菌对环丙沙星、诺氟沙星、氯霉素和复方新诺明高度敏感, 对麦迪霉素、四环素、呋喃妥因、土霉素、庆大霉素、卡那霉素、痢特灵和头孢孟多中度敏感, 对氨苄青霉素轻微敏感。

表 4 3 株菌对抗菌药物敏感性试验

Tab. 4 Antibiotic sensitivity to three strains

| 药 物 | 菌株[平均抑菌圈大小(mm)] | | | 药 物 | 菌株[平均抑菌圈大小(mm)] | | |
|-------|------------------|--------|--------|-------|------------------|--------|--------|
| | 961018 | 970621 | 970724 | | 961018 | 970621 | 970724 |
| 麦迪霉素 | 7 | 11 | 16 | 四环素 | 21 | 20 | 22 |
| 环丙沙星 | 35 | 30 | 27 | 呋喃妥因 | 23 | 18 | 16 |
| 庆大霉素 | 20 | 17 | 16 | 土霉素 | 23 | 15 | 19 |
| 氨苄青霉素 | 7 | 11 | 10 | 卡那霉素 | 21 | 19 | 16 |
| 痢特灵 | 22 | 14 | 16 | 复方新诺明 | 16 | 15 | 25 |
| 头孢孟多 | 10 | 7 | 16 | 诺氟沙星 | 30 | 29 | 25 |
| 氯霉素 | 34 | 29 | 24 | | | | |

3 讨 论

从病蟹上分离到的 3 株菌经人工感染试验都可引起河蟹腹腔内出现大量腹水的主要症状, 但经人工感染的病蟹都不出现步足抖动现象。河蟹步足抖动现象是由一种病毒感染引起神经系统损害而出现的主要病症, 该种病毒病不造成河蟹腹腔出现大量腹水[陆宏达等 1999]。这些结果表明, 出现大量腹水是由分离到的 3 株细菌引起的, 这 3 株细菌是所谓“河蟹腹水病”的致病细菌, 其中菌株 961018 和 970621 为嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*), 菌株 970724 为拟态弧菌(*Vibrio mimicus*)。本实验采集的自然发病材料蟹中少部分病蟹既出现大量腹水又出现步足抖动症状, 是病毒和细菌混合感染的结果, 至于病毒和细菌哪一种是原发性感染, 哪一种是继发性感染有待于进一步研究。病毒或细菌单独感染都可引起河蟹死亡, 但出现的主要症状不同, 病毒引起河蟹的主要症状为步足出现严重抖动, 而本实验分离到的细菌引起河蟹的主要症状为腹腔内出现大量腹水。

嗜水气单胞菌可使许多淡水养殖的经济动物致病, 是一种常见的致病菌, 国内外均有许多报道, 可引起如鳖[陆宏达和金丽华 1996]、黄鳝[陈怀青和陆承平 1991]、斑点叉尾鮰[Ventura 和 Grizzle 1988] 和淡水鲤科鱼类[黄琪琰 1993] 等养殖的水产动物患病。拟态弧菌已在美国、墨西哥、新西兰、菲律宾、加拿大和孟加拉国等国家发现, 可使人 and 贝壳类等水产动物致病, 同时该菌也分布在水环境中[Davis 等 1981], 在我国, 尚未见引起水产动物致病的报道。这 2 种菌在病蟹上首次被分离到, 并经人工感染, 不仅使河蟹致病, 同时还可使异育银鲫致病, 异育银鲫产生的主要症状为严重充血, 有腹水, 肝、肾、脾肿大, 与黄琪琰[1993] 报道的主要淡水养殖鱼类暴发性流行病中的患病异育银鲫症状十分相似。

从不同地区的病蟹上分离到 2 株嗜水气单胞菌对药物的敏感性不一致, 尤其菌株 970621 对药物土霉素、痢特灵比另一株嗜水气单胞菌相对产生较高的耐药性。据了解, 分离到该菌株的养蟹场, 常使用土霉素、痢特灵作为防病治病的药物, 因而出现该菌株对这两种药物有明显的耐药性。在使用抗菌药物防治河蟹的细菌性疾病时建议采用多种抗菌药物交替使用的方法, 同时不要滥用药物, 以减少致病细菌的耐药性, 达到有效地防治细菌性疾病的目的。

嗜水气单胞菌和拟态弧菌这两种河蟹致病菌都对环丙沙星、诺氟沙星和氯霉素高度敏感, 在防治该疾病时可作为首选药物。

嗜水气单胞菌和拟态弧菌不仅在病蟹体内存在,而且在外部水环境中也存在,在采用病蟹内脏组织分离细菌法时尽管用酒精棉球进行体外消毒,但无法消毒到鳃腔内部,当打开蟹甲壳时鳃腔内的细菌很容易污染内脏器官,会造成致病菌分离的错误。

上海水产大学渔业学院海水养殖专业 98 届学生孔祥谦参加了部分细菌生理生化反应试验。在采集实验材料病蟹过程中得到江苏省太仓市水产指导站徐秋菊和上海市崇明县水产技术推广站赵斌的帮助,在此一并致谢。

参 考 文 献

- 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 1978. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 98~194
- 陆宏达, 金丽华. 1996. 嗜水气单胞菌败血症的研究. 水产学报, 20(3): 223~234
- 陆宏达, 范丽萍, 薛美. 1999. 中华绒螯蟹小核糖核酸病毒病及其组织病理. 水产学报, 23(1): 61~68
- 陈长怡, 郁忠华, 薛季鸣. 1990. 发酵性革兰氏阴性杆菌分类鉴定编码手册. 上海市卫生防疫站. 1~85
- 陈怀青, 陆承平. 1991. 嗜水气单胞菌: 黄鳝出血性败血症的病原. 中国人兽共患病杂志, 7: 21~23
- 黄琪琰(主编). 1993. 水产动物疾病学. 上海: 上海科学技术出版社. 103~139
- Davis B R, Fanning G R, Madden J M, et al. 1981. Characterization of biochemically atypical vibrio cholerae strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. J Clinical Microbiol, 14 (6): 631~639
- Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, et al. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th Ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 190~195, 253~274
- Ventura M T, Grizzle J M. 1988. Lesions associated with natural and experimental infections of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). J Fish Dis. 11: 397~407

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF THE BACTERIAL PATHOGENS IN *ERIOCHEIR SINENSIS*

LU Hong-Da, JIN Li-Hua

(Shanghai Fisheries University, 200090)

FAN Li-Ping, XUE Mei

(Fisheries Technical Advice Station of Chongming County, Shanghai 202150)

ABSTRACT The Bacterial pathogens were isolated from the diseased *Eriocheir sinensis*, which were cultured in the ponds in Shanghai Municipality and Jiangsu Province. The main symptom of diseased *Eriocheir sinensis* was the appearance of ascites in its abdominal cavity. By the experiments of artificial infection, physiology and biochemistry, the pathogens were identified as *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio mimicus*. The results of drug sensitivity tests showed that Ciprofloxacin, Norfloxacin and Chloramphenicol were the most sensitive drugs.

KEYWORDS *Eriocheir sinensis*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio mimicus*, Drug