

文章编号:1000 - 0615(2004)06 - 0703 - 06

## 鲈细菌性类结节病的病原及血液病理研究

金 珊, 王国良, 赵青松, 陈惠群, 陈寅儿

(宁波大学海洋与水产系, 浙江 宁波 315211)

**摘要:**2002 年 5 月从患细菌性类结节病的濒死鲈体内分离到一株细菌 02517-1, 经人工感染试验及 API 20E 系统鉴定, 认为该病原菌为嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)。血液生理生化指标检测显示, 与健康鱼相比, 患病鱼的红细胞、白细胞、血糖、蛋白质、尿素、胆固醇等显著下降, 而谷丙转氨酶 ALT、谷草转氨酶 AST、乳酸脱氢酶 LDH 等血清酶类活性增强, 说明经嗜水气单胞菌感染后, 鲈在营养物质代谢、抗病力、消化、呼吸、排泄等方面的生理功能受到严重损害。药敏实验结果表明: 复方新诺明、卡那霉素、庆大霉素、氟哌酸等 4 种化学治疗剂及地榆、乌梅、木瓜、五味子等 4 种中草药对该种病原菌有较强的抑菌作用。

**关键词:** 鲈; 类结节病; 嗜水气单胞菌

中图分类号: S941.42

文献标识码: A

## Pathogenic and hemopathological studies on the bacterial pseudotuberculosis of *Lateolabrax japonicus*

JIN Shan, WANG Guo-liang, ZHAO Qing-song, CHEN Hui-qun, CHEN Yin-er

(Department of Oceanography and Fisheries, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract:** One strain of bacteria 02517-1 was isolated from *Lateolabrax japonicus* with the bacterial pseudotuberculosis in May 2002. After the pure culture, the bacteria were used to infect the health *Lateolabrax japonicus* in three ways: abdominal cavity injection (0.3mL/nos), wound soaking, and soaking. The concentration of bacterial suspension was determined by both McF and live bacterial counting technique. The physiological saline was substitute for bacterial suspension in the control. The concentration of soaking was  $1.52 \times 10^4$  Cells  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>. The result showed that the strain of bacteria 02517-1 had powerful pathogenicity and the mortality of healthy fish was 100%. According to Bergey's, manual of systematic bacteriology and API 20E system identification, the pathogen of *Lateolabrax japonicus* was identified as *Aeromonas hydrophila*. Serums were extracted from the blood of both diseased fish and healthy fish, and the blood biochemical and physiological indices were determined by Olympus biochemical automatic instrument. The results showed that, compared with healthy ones, the number of red blood cells, white blood cells, glucose, total plasma protein, ureanitrogen and cholesterin in diseased fish all decreased remarkably, while serum enzymes of ALT, AST, LDH increased. These results indicated that many important physiological functions such as digestion, breath, excretion, metabolism and disease resistance were seriously impaired after *Lateolabrax japonicus* infection. The result of antibiotic sensitivity test showed that four chemotherapeutants (compound sulfamethoxazole, kanamycin, gentamycinum, norfloxacin)

收稿日期: 2003-09-02

资助项目: 浙江省自然科学基金资助 (396269)

作者简介: 金珊 (1964 - ), 女, 浙江天台人, 副教授, 硕士, 主要从事微生物学及水产动物病害控制研究. Tel: 0574 - 87600916, E-mail: Jinshan@nbu.edu.cn

and four Chinese herbal medicines (sanguisorba, armeniaca, chaenomeles, schisandra) were most effective against the pathogenic bacteria.

**Key words:** *Lateolabrax japonicus*; pseudotuberculosis; *Aeromonas hydrophila*

鲈 (*Lateolabrax japonicus*, 又称花鲈, 日本真鲈) 是我国沿海及河口的名贵经济鱼类。由于其生长快、个体大、肉质丰富、营养全面等优点, 自 1995 年以来一直是浙江省海水网箱养殖的主要品种之一。2002 年 4 月至 7 月期间, 在浙江奉化、象山等养殖海区相继发生鲈大量死亡的现象, 由于死亡的鲈皆为 1 龄以上, 因此损失极为惨重。病死鱼症状与流行于日本等国的由杀鱼巴斯德氏菌 (*Pasteurella piscicida*) 引起的鲟、香鱼等的类结节病<sup>[1]</sup>病症相似, 主要表现为肝、肾、脾等脏器出现大量结节样白点, 而国内没有具体类似病例的报道, 故暂称为鲈类结节病。为了尽快搞清此病的病原及致病机理, 找到有效的防治方法, 作者以典型症状的病鱼作为材料, 对其病原、血液病理及防治药物进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

病鱼取自浙江宁波象山黄僻岙养殖海区, 体重 500 ~ 1200g。健康鱼取自浙江宁波宁海薛岙养殖海区, 体重 450 ~ 600g。

### 1.2 病原菌的分离

取发病症状典型的濒死病鱼, 用 70% 酒精棉球反复擦拭消毒病鱼的腹部和体表, 用无菌剪刀剖开腹腔, 无菌操作取病鱼血液、肝、头肾、肾、脾等组织小块, 划线接种于海水配制的普通营养琼脂培养基和 IP 培养基<sup>[2]</sup>上。26℃ 恒温培养 24 ~ 48h 后, 挑取形态特征一致的优势菌进行纯培养, 转接斜面保存备用。

### 1.3 人工感染试验

用 60cm × 50cm × 40cm 水体的玻璃缸, 每缸放养体重 500g 左右的健康鲈 10 尾, 连续充气, 暂养 1d 后分别进行腹腔注射 (每尾 0.3mL)、创伤浸泡和浸浴感染试验<sup>[3]</sup>。试验菌株培养 18 ~ 24h, 菌悬液细菌量按 McF 浊度管结合活菌计数方法确定。对照组以同量无菌生理盐水代替试验菌液。

### 1.4 病原菌鉴定

纯培养的细菌经 26℃ 培养 18 ~ 24h 后, 作革

兰氏染色及鞭毛染色, 进行细菌形态观察, 生理生化特性应用法国生物梅里埃 (Biomérieux) 公司的 API 20E 细菌鉴定系统 (API System) 和编码手册进行, 并参照文献<sup>[4, 5]</sup>进行测定其它指标。

### 1.5 血液生理指标测定

用肝素抗凝后的血液测定各项生理指标, 具体方法参照文献<sup>[6 - 8]</sup>。

### 1.6 血液生化指标测定

用 5mL 针筒尾静脉取血, 全血制备血清, 于 4℃ 下放置 2h, 经 5000r · min<sup>-1</sup> 离心分离, 收集血清, 当天测定完成。所有生化指标均在奥林巴斯 (Olympus) 生化自动分析仪上完成。

### 1.7 药敏试验

以涂布法接种病原菌于平板培养基上, 贴上药敏纸片 (直径 6mm), 26℃ 恒温箱培养 24h 后, 测抑菌圈直径。所用化学药剂药敏纸片购于杭州天和微生物试剂有限公司, 中草药药敏纸片自制<sup>[9]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 病鱼症状

发病初期病鱼体色稍变黑, 离群独游或静止在网箱底部, 食欲减退, 行动迟缓, 鱼体瘦, 表面无其它明显症状, 解剖观察, 肠充血严重, 略硬, 肾脏大, 肝偶有白斑块。随着病情加重, 体表有轻微的出血现象, 鳃色淡, 肛门红肿, 解剖观察发现肝组织脆、糜烂, 有许多 1mm 左右的小白点, 头肾、肾、脾肿大, 白点也很多。肠壁加厚, 发黄, 略硬, 肠充血严重。一般体表呈现出出血症状后, 在 1 ~ 7d 内便死亡。

### 2.2 病原菌的致病性

从具有明显症状的病鱼中分离到 1 株菌株 02517-1, 经人工感染试验证实, 该菌对健康鲈有明显的致病作用, 3 种感染方式均可使健康鲈发病, 死亡率均为 100% (表 1)。发病鱼症状与自然感染鱼相似, 从发病鱼的血液、肝、脾、头肾、肾等组织中又可以分离到与试验菌株形态、特征、理化性状完全一致的菌株, 表明分离菌株是鲈类结节病的病原菌。

表 1 人工感染试验结果  
Tab.1 Results of artificial infection test

感染方式 infected way	细菌数量 (cells mL <sup>-1</sup> ) bacteria numbers	试验尾数 (ind) no. of fish	死亡尾数 no. of dead fish												死亡率 (%) mortality
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
腹腔注射 abdominal cavity	4.36 ×10 <sup>7</sup>	10	0	1	1	2	1	3	1	1	0	0	0	0	100
对照 control	生理盐水	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
创伤浸泡 wound	1.52 ×10 <sup>4</sup>	10	1	0	0	2	1	0	1	1	1	2	0	1	100
对照 control	海水	10	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
浸浴感染 soaking	1.52 ×10 <sup>4</sup>	10	0	1	1	1	1	0	2	0	2	1	1	0	100
对照 control	海水	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

2.3 病原菌鉴定

实验结果表明,02517-1 菌株为革兰氏阴性短杆菌,单个散在或成双相连,极生单鞭毛,能运动,无芽孢。在海水普通营养琼脂培养基平板上培养 24h,菌落呈圆形,淡乳黄色,直径 1~2mm,中央稍隆起,边缘整齐,表面光滑,半透明。发酵葡萄糖产酸产气,发酵七叶苷、水扬素,甲基红试验、氧

化酶、接触酶等阳性。API 20E 快速鉴定结果见表 2,查阅编码手册以及相关资料,可知所分离病原菌为嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)。

2.4 患病鲈血液生理指标的变化

测定健康鲈和患病濒死鲈的各项血液生理指标见表 3,结果表明患病鱼的各项血液生理指标均发生了显著变化。

表 2 02571-1 菌株 API 20E 系统鉴定结果  
Tab.2 The identification results of 02571-1 strains by API 20E

试验项目 item	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
试验菌反应 reaction	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+
数值 number	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
被试菌编码 coding	3			0			0			7			1			2			6		
查码 check code	3007126					嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>										97.6%					

注: + 阳性, - 阴性 Notes: + positive, - negative

表 3 健康鱼与患病鱼的血液生理指标的比较  
Tab.3 Comparisons of blood physiological indices between healthy and diseased fish

项目 Pitem	健康鱼 healthy fish	病鱼 diseased fish	P
红细胞数 RBC(10 <sup>12</sup> L <sup>-1</sup> ) red blood cell	3.02 ± 0.35	2.13 ± 0.27	<0.001
白细胞数 WBC(10 <sup>6</sup> L <sup>-1</sup> ) white blood cell	27.61 ± 0.35	24.26 ± 0.43	<0.001
血红蛋白 Hb(g L <sup>-1</sup> ) hemoglobin	97.00 ± 6.50	55.30 ± 5.60	<0.001
血细胞比容 HCT (%) haematocrit	41.50 ± 1.50	35.13 ± 3.45	<0.05
血沉 ESR( $\frac{1}{2}$ mm h <sup>-1</sup> ) erythrocyte sedimentation rate	1.46 ± 0.10	2.85 ± 0.23	<0.001
脆性 EOB (g %) fragility	0.30 ± 0.02	0.38 ± 0.02	<0.001

## 2.5 患病鲈血液生化指标的变化

健康鱼和患病鱼的血液生化指标值见表4, 病鱼的11项主要血液生化指标值均呈现明显的病理变化。特别是血清酶类, 显著高于正常值。

## 2.6 药敏试验

02517-1菌株对15种化学药剂及15种中草

药的敏感程度见表5, 其中复方新诺明、庆大霉素、卡那霉素和氟哌酸等4种化学药剂及五味子、地榆、乌梅和木瓜等4种中草药对病原菌有较强的抑菌作用, 可作为预防和治疗鲈类结节病的药物。

表4 健康鱼与患病鱼的血液生化指标的比较

Tab.4 Comparisons of blood biochemical indices between healthy and diseased fish

n = 6

项目 item	健康鱼 healthy fish	病鱼 diseased fish	P
谷丙转氨酶 ALT(U L <sup>-1</sup> ) glutamic pyruvic transaminase	5.00 ±3.26	47.00 ±8.37	<0.001
谷草转氨酶 AST(U L <sup>-1</sup> ) glutamic oxalacetic transaminase	28.00 ±16.58	193.00 ±9.43	<0.001
乳酸脱氢酶 LDH(U L <sup>-1</sup> ) lactic dehydrogenase	244.00 ±57.41	593.00 ±89.17	<0.001
总蛋白 TP(g L <sup>-1</sup> ) total protein	33.60 ±6.51	20.10 ±7.38	<0.05
尿素 BUN(μmol L <sup>-1</sup> ) urea nitrogen	1.63 ±0.73	0.81 ±0.25	<0.05
肌酐 Cr(μmol L <sup>-1</sup> ) creatinine	14.00 ±2.10	18.00 ±1.07	<0.05
总胆固醇 CHO(mmol L <sup>-1</sup> ) total cholesterol	6.92 ±1.62	3.23 ±2.22	<0.05
血糖 GLU (mmol L <sup>-1</sup> ) blood glucose	14.28 ±3.36	3.27 ±1.93	<0.001
钾 K <sup>+</sup> (mmol L <sup>-1</sup> ) potassium	1.20 ±0.76	2.40 ±0.45	<0.05
钠 Na <sup>+</sup> (mmol L <sup>-1</sup> ) sodium	186.30 ±11.86	155.10 ±7.52	<0.001
氯 Cl <sup>-</sup> (mmol L <sup>-1</sup> ) chloride	192.90 ±15.28	130.20 ±6.57	<0.001

## 3 讨论

### 3.1 鱼类结节病的病原及感染途径

鱼类结节病主要流行于日本、美国、英国和挪威等国, 是鲈鱼养殖业中危害严重的一种疾病, 它的病原是杀鱼巴斯德氏菌 (*Pasteurella piscicida* Pelcyar), 黑鲟、真鲷、鲈、香鱼等也都曾受到感染<sup>[1]</sup>。而我国梅广海等<sup>[10]</sup>曾报道由嗜水气单胞菌引起的罗非鱼类结节病的病例, 国内有关海水鱼类类似病例的报道至今未见。本研究通过对鲈结节样病变的脏器进行病原分离、鉴定及人工感染试验, 认为本次浙江发生的鲈类结节病的病原为嗜水气单胞菌。

嗜水气单胞菌广泛分布于淡水及土壤中, 对鱼类、两栖类、爬行类、哺乳动物及人类均有致病

性, 尤其对淡水鱼类的危害最为严重<sup>[11,12]</sup>, 由于它是人和动物的共同病原, 所以该菌已引起人类的高度重视。目前有关该菌引起海水鱼类疾病的报道极少<sup>[13]</sup>, 而由该菌引起鲈疾病的报道尚属首次。嗜水气单胞菌能产生多种毒力因子, 如溶血素、细胞毒素和肠毒素等, 同时对上皮细胞也具有极强的粘附性和侵袭性, 其感染鱼类主要引起败血症<sup>[11,12]</sup>。结果表明, 该菌对鱼类致病的传播不仅可以通过体表伤口感染, 还可以经口感染。

### 3.2 病鱼血液病理及其死亡原因

与健康鱼相比, 病鱼红细胞脆性、沉降率显著上升, 由于新生红细胞脆性小, 衰老红细胞脆性大, 再加上红细胞、白细胞、血红蛋白、血细胞比容等显著下降, 说明血液中新红细胞比率减少, 血细胞趋于老化, 造血机能受到抑制, 肾、脾等造血

表 5 药敏实验结果

Tab. 5 The results of antibiotic sensitivity test

化学治疗剂 chemotherapellants	含药量( $\mu\text{g}$ 或 IU/片) drug contents	抑菌圈(mm) inhibitory rings	中草药 chinese herbal medicines	抑菌圈(mm) inhibitory rings
强力霉素 doxycycline	30	8	威灵仙 clematis	20
复方新诺明 compound sulfamethoxazole	25	25	连翘 forsythia	13
丁胺卡那霉素 amikacin	30	13	白芍 paeonia	13
四环素 tetracycline	30	9	黄芪 astragalus	15
磺胺甲基异恶唑 sulfamethoxazole	10	8	五味子 schisandra	35
克林霉素 clindamycin	2	9	石榴皮 punica	20
庆大霉素 gentamicin	10	20	大青叶 isatis	14
麦迪霉素 midecamycin	30	11	地榆 sanguisorba	25
妥布霉素 tobramycin	10	0	地丁 corydalis	12
红霉素 erythromycin	15	18	公丁香 eugenia	15
氨苄青霉素 ampicillin	10	8	木瓜 chaenomeles	24
头孢孟多 cefamandole	30	8	乌梅 armeniaca	27
头孢氨卡 cefalexin	30	10	黄芩 scutellaria	16
卡那霉素 kanamycin	30	23	大黄 rheum	14
氟哌酸 norfloxacin	10	21	板兰根 isatis	11

组织已遭到损坏。而血沉上升表明红细胞叠连性增加,不利于通过毛细血管,使血液循环发生障碍,从而使鱼体处于严重贫血状态,氧的运输及抵抗疾病的能力大大下降。ALT、AST、LDH 等血清酶类主要分布于机体的肝、肾、心、肌肉等组织细胞中,它们参与并控制着机体内的糖、蛋白质、脂类等的物质代谢,在正常情况下血清中这些酶活性低且相对恒定,而病鱼血液生化指标测定显示 ALT、AST、LDH 等血清酶类活性显著提高,血糖、蛋白质、胆固醇等下降,说明病鱼的肝、肾、心、肌肉等组织,尤其是肝脏组织已发生广泛而严重的病变,组织细胞溶解,同时也说明了骨骼肌、心肌等肌纤维部分损伤、坏死,机体呈现各种物质代谢功能障碍,这一点与病鱼症状符合。血清中的尿素、肌酐、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Cl}^-$  等的含量是肾功能的指标,它们发生了显著变化,说明鱼体肾单位滤过及

重吸收功能失调,肾功能衰竭。综上所述,鲈经嗜水气单胞菌感染后,在其产生的多种毒力因子的作用下,患病鱼的肝、肾、脾等功能器官受到了严重损害,从而使病鱼在营养物质代谢、消化、呼吸、排泄等方面产生功能障碍,最终导致鱼体死亡。

### 3.3 防治方法

由药敏试验可知,复方新诺明、庆大霉素、卡那霉素、氟哌酸、乌梅、地榆、木瓜、五味子等对该病的病原菌有一定的抑制作用,但是由于经常使用药物,不仅污染水体使病原菌产生抗药性,同时对人体也会产生许多不利影响。作者通过实地考察分析认为,本次鲈细菌性类结节病的成因是多方面的,生活污水和非健康养殖行为是该病流行的主导因素,因此,建议防治该病应注重改善养殖环境,采用合理的养殖密度,投喂新鲜、优质饲料,尤其是注意防止生活污水污染养殖环境;此外,还

可以采用中草药进行预防和治疗。

### 参考文献:

- [1] Hua D K. The cage cultured technique of marine fish and its diseases prevention and cure [M]. Taiwan: Fish World Editorial, Fishery Press, 1999. 117 - 127. [华鼎可. 海水网箱养殖及疾病防治[M]. 台湾: 养鱼世界杂志社、水产出版社, 1999. 117 - 127.]
- [2] Jin S, Wang G L, Zhao Q S, *et al.* Medical study on provenion and cure for skin ulcer disease of marine cage-cultured searperch [J]. J Ocean in Taiwan Strait, 2000, 19 (2): 233 - 237. [金珊, 王国良, 赵青松, 等. 海水网箱养殖鲈鱼皮肤溃疡病的防治药物[J]. 台湾海峡, 2000, 19(2): 233 - 237.]
- [3] Jin S, Cai W Q, Wang G L, *et al.* Studies on the pathogenic bacteria diseases of cultured *Pseudosciaena crocea* [J]. J Zhejiang Ocean Univ, 2002, 21 (3): 225 - 231. [金珊, 蔡完其, 王国良, 等. 养殖大黄鱼细菌性疾病的病原研究[J]. 浙江海洋学院学报, 2002, 21(3): 225 - 231.]
- [4] Bacterium Classification Organize on the Microorganism of the Chinese Academy of Sciences. Method of common identification of bacteria [M]. Beijing: Science Press, 1978. 149 - 159. [中国科学院微生物所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法[M]. 北京: 科学出版社, 1978. 149 - 159.]
- [5] Krieg N R, Holt J G. Bergey's manual of systematic bacteriology (9th ed) [M]. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1984. 516 - 548.
- [6] Chen Q C, Yan D Y, Wu Z X, *et al.* Experiment of physiology [M]. Beijing: Science Press, 1995. [陈其才, 严定友, 吴政星, 等. 生理学实验[M]. 北京: 科学出版社, 1995.]
- [7] Zhou Y, Guo W Y, Yang Z G, *et al.* Research progress on blood indexes of fish [J]. J Shanghai Fish Univ, 2001, 10 (2): 163 - 165. [周玉, 郭文场, 杨振国, 等. 鱼类血液指标研究的进展[J]. 上海水产大学学报, 2001, 10(2): 163 - 165.]
- [8] Chen X Y. The fishes blood [J]. Journal of Chongqing Teachers College, 2000, 19 (3): 70 - 73. [陈晓耘. 鱼类的血液[J]. 重庆师专学报, 2000, 19(3): 70 - 73.]
- [9] Xu B, Ji W S, Zhang P, *et al.* Study on bacteriostasis drugs of pathogenic bacterium on shrimp [J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 1993, 23 (2): 43 - 51. [许兵, 纪伟尚, 张鹏, 等. 对虾病原菌抑菌药物的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1993, 23(2): 43 - 51.]
- [10] Mei G H, Zhu Y S, Cao G, *et al.* A preliminary study on the bacterial pseudotuberculosis of wintering tilapia [J]. Fisheries Science, 2002, 21 (4): 9 - 11. [梅广海, 朱永生, 曹格, 等. 越冬罗非鱼细菌性类结节病的初步研究[J]. 水产科学, 2002, 21(4): 9 - 11.]
- [11] Hu B, Chen Q. Research progress on pathogenic mechanism [J]. China Public Health, 1994, 10 (7): 320 - 321. [胡斌, 陈群. 气单胞菌致病机理的研究进展[J]. 中国公共卫生, 1994, 10(7): 320 - 321.]
- [12] Wang Z F, Xie H M, Zhang J. Reseach progress on *Aeromonas hydrophila* of aquatic animals [J]. Reservoir Fisheries, 2002, 22 (2): 18 - 19. [王增福, 谢红梅, 张静. 水产动物嗜水气单胞菌研究进展[J]. 水利渔业, 2002, 22(2): 18 - 19.]
- [13] Zhu L M, Wu Z Y, Zhang J, *et al.* Study on the pathogenic bacteria of the muscle ulceration of *Sparus latus* [J]. Journal of Zhanjiang Ocean University, 1998, 18 (2): 5 - 9. [朱丽敏, 吴泽阳, 张俊, 等. 黄鳍鲷细菌性溃疡病致病菌研究[J]. 湛江海洋大学学报, 1998, 18(2): 5 - 9.]