

中华鳖白底板病和红底板病细菌的分离鉴定及致病性

叶巧真 何建国 邱德全 陈健光 黄苑玲

(中山大学生命科学学院 广州 510275)

张邦杰 叶普仁 梁仁杰 潘 雷

(东莞市水产局 东莞 511700)

摘要: 从患白底板病和红底板病的病鳖中分离出 7 株细菌,应用一般细菌分离鉴定的方法和美国生物—梅里埃(Bio Merieux USA)公司 VITEK 全自动微生物鉴定系统进行鉴定,结果显示有 3 株嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、1 株温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)、1 株金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、1 株肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)和 1 株美人鱼弧菌(*Vibrio damsela*),其中金黄色葡萄球菌和美人鱼弧菌为在中华鳖中首次分离。生物毒性试验表明,7 株细菌均可致死小白鼠,除肺炎克雷伯氏菌外,其它 6 株菌对中华鳖均有一定的致病性。

关键词: 中华鳖,白底板病,红底板病,致病菌

中图分类号: S947.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)06-0407-07

收稿日期: 1999-06-21, **修回日期:** 1999-11-01

BACTERIA IDENTIFICATION AND THEIR PATHOGENESIS IN RED AND WHITE ABDOMINAL SHELL DISEASE OF *TRIONYX SINENSIS*

YE Qiao-Zhen HE Jian-Guo QIU De-Quan CHEN Jian-Guang HUANG Yuan-Ling

(School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

ZHANG Bang-Jie YE Pu-Ren LIANG Ren-Jie PAN Lei

(Dongguan Fisheries Research Institute, Dongguan 511700)

Abstract: Seven strains were isolated and identified from *T. sinensis* with red and white disease using traditional method and VITEK identification systems. These consist of 3 strains of *Aeromonas hydrophila*, one strain of *Aeromonas sobria*, one strain of *Staphylococcus aureus*, one strain of *Klebsiella pneumoniae* and one strain of *Vibrio damsela*. Both *S. aureus* and *V. damsela* are the first to be identified in *T. sinensis*. Toxic test showed that all strains were lethal to mice, 6 strains had pathogenesis to *T. sinensis* except the strain *K. pneumoniae*.

Key words: *T. sinensis*, Red and white abdominal disease, Bacteria, Pathogenesis

细菌病原对中华鳖的危害极大,种类繁多,据报道的致病菌有 14 种:假单胞菌、无色杆菌、嗜水气单胞菌、温和气单胞菌、豚鼠气单胞菌、普通变形菌、产碱菌、勒氏假单胞菌、枯草杆菌、副肠道杆菌、迟钝爱德华氏菌、小肠结肠炎耶尔新氏菌、脑膜炎败血性黄杆菌和奇异变形菌。其中引起红底板病的主要是气单胞菌,脑膜炎败血性黄杆菌也是引起此病的病原之一;白底板病则可由嗜水气单胞菌、迟钝爱德华氏菌、普通变性菌引起。红底板病和白底板病是近年来在全国范围内对养殖中华鳖危害极大的两种疾病,死亡率在 10%~50% 不等。本文着重对广东省东莞市和南海市患白底板病和红底板病中华鳖细菌病原进行分离鉴定及其致病性研究,研究结果将对这两种疾病的防治提供有价值的理论依据。

1 材料与方法

1.1 中华鳖来源及病鳖症状

健康中华鳖均由广东省东莞市水产局协助提供,患病中华鳖取自东莞市和南海市,重量 50~500g 不等。红底板病鳖腹甲局部或整片充血、溃疡、出血;口鼻充血、出血,脖子红肿充血;

内脏器官充血,呈败血症;肠空或有淤血块,便血。白底板病鳖体表通常完整无损,腹甲灼白;解剖无血,肌肉苍白无血色,内脏器官大多呈失血状;肠充血或苍白,内有血或淤血块,便血。

1.2 细菌的分离与鉴定

选取症状典型、濒死病鳖酒精消毒,无菌条件下进行解剖,剪取肝、脾、肾、小肠、大肠、肺、鳃样组织、心肌和体肌等组织,无菌 PBS 清洗,剪碎,匀浆,涂布于营养琼脂平板上,28℃ 培养 24h。挑取单菌落划线培养,连续划线培养至纯。

主要参考《一般细菌常用鉴定方法》^[1]一般细菌鉴定方法,辅于美国生物-梅里埃(Bio Merieux USA)公司 VITEK 全自动细菌分析仪进行鉴定。

1.3 电镜负染观察

新鲜培养菌, PBS 稀释到一定浓度,滴于覆盖有 Formvar 膜的铜网上,静置 5min,吸去残液,4% 磷钨酸(PTA, pH7.2)负染 1min,吸去残液,自然干燥。在 JEM100CXII 透射电子显微镜下观察拍照。

1.4 生物毒性实验

1.4.1 制备液: (1)菌悬液制备:挑取单菌落,移

种斜面, 28℃ 培养 24h。PBS 或无菌水洗下菌苔, 比浊菌数约 10^9 个/mL, 制成菌悬液。再采用活菌平板计数法计算出菌悬液较为精确的浓度, 具体方法为: 菌悬液用 PBS 作 10 倍稀释到 10^{-6} 、 10^{-7} , 取 100 μ L 涂平板, 28℃ 培养 24h, 计数。(2) 菌胞外分泌物 (ECP) 的制备: 菌接种于合成培养基中, 28℃ 振荡培养 24h。培养物 8,000r/min 离心 8min, 取上清液经 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 经培养无菌即可使用。(3) 2% 红细胞悬液的制备: 参照文献 [2] 进行。

1.4.2 小白鼠毒性试验: 小白鼠体重 18~22g, 购自中山大学药理系。每组 5 只, 分别腹腔注射 0.4mL 菌悬液和 ECP, 以注射 PBS 组作为对照。

1.4.3 中华鳖人工感染试验: 100g 左右中华鳖, 每组 3 只。分别腹腔注射 0.4mL 菌悬液和肌肉注射 0.2mL 病毒组织匀浆过滤液, 以注射 PBS 组作为对照。

1.4.4 溶血实验: 用牙签挑取新鲜幼稚菌, 于 28℃ 培养 24h, 观察记录结果。

1.4.5 菌外分泌物的溶血价测定: 参照文献 [3] 进行。

2 结果

2.1 细菌的分离与鉴定

2.1.1 细菌的分离: 从患病中华鳖中分离出 7 株菌, 其来源见表 1。

表1 分离菌株的来源

菌株编号	分离时间	送检地	鳖体重 (g)	病鳖症状	菌侵染组织	供鉴定菌株 (来源)
Ah961004	1996/10/12	东莞	130	白底板	肝、脾、肾、肺、心	鳃
Ah960916	1996/10/17	东莞	400	红底板	肝、脾、肾、肺、心、鳃	肝
Sa970505	1997/05/05	东莞	125	白底板	脾、肾、肺、鳃、小肠	小肠
Kp970506	1997/05/05	东莞	125	白底板	脾、肾、肺、鳃、小肠	小肠
As970510	1997/05/10	东莞	80	白底板	胃	胃
Ah970516	1997/05/16	南海	200	红底板	肝、肾、肺、胃、小肠	小肠
Vd970519	1997/05/16	南海	200	红底板	肝、肾、肺、胃、小肠	肝

2.1.2 菌体的形态特征: 7 株菌在普通营养琼

脂培养基上均可生长, 菌落均为圆形、中央凸

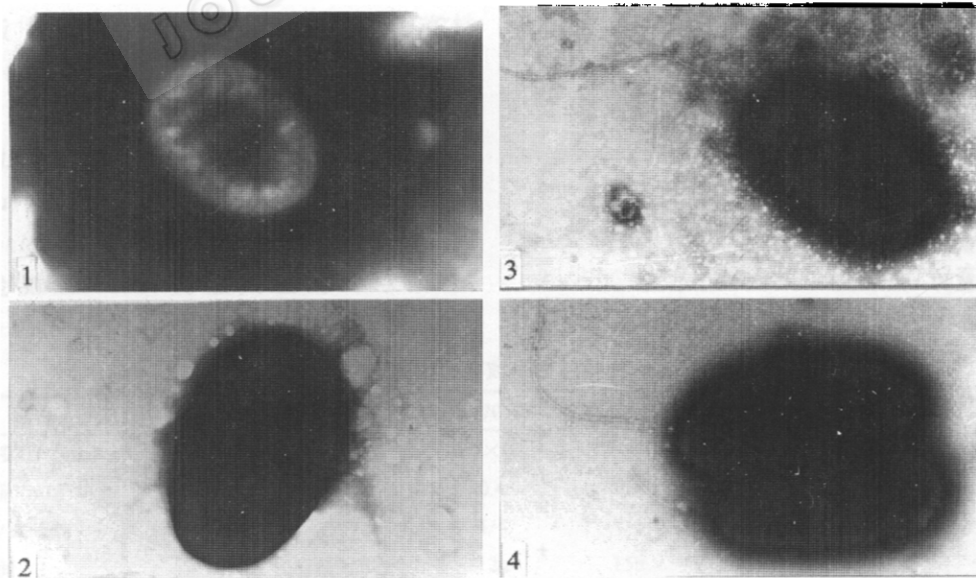


图1 4株菌电镜照片

1 Kp970506菌株($\times 27,000$), 2 Sa970505菌株($\times 27,000$),
3 Ah970516菌株($\times 20,000$), 4 Vd970519菌株($\times 20,000$)

起、表面光滑、湿润、有光泽、边缘整齐。Ah961004、Ah960916、As970510、Ah970516和Vd970519 5株菌极为相似,为半透明、乳黄色菌落,培养24h大小为1mm~2mm;菌体短杆

状,大小为(0.5~0.8) μm ×(1.0~1.5) μm ,有动力,均为端生单鞭毛、大多数周边有菌毛。Sa970505菌株为半透明、黄色菌落,大小为0.3mm~0.8mm;菌体呈球形,大小均匀,为

表2 6株菌株的生化特性与模式株的比较

生化特性	<i>A. hydro-</i> <i>phila</i>	961004	961916	970516	<i>A. sobria</i>	970510	<i>V. damsela</i>	970519	<i>K. pneu-</i> <i>moniae</i>	970506
革兰氏染色	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
氧化酶	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
O/F试验	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
葡萄糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
乳糖	d	-	-	-	-	-	-	-	d	-
麦芽糖	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
甘露醇	+	+	+	+	d	+	-	-	+	+
山梨醇	-	-	-	-	d	-	-	-	+	+
肌醇	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
侧金盏花醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
蔗糖	+	-	+	-	d	+	-	-	+	+
福寿苣醇	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
木糖	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
鼠李糖	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
棉子糖	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
阿拉伯糖	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
甘油	+	+	+	+	d	+	-	+	+	+
水杨酸	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
七叶苷	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
淀粉	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
糊精	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
ONPG	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
V. P.	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+
M. R.	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
精氨酸双水解酶	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
苯丙氨酸脱氨酶	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
色氨酸脱氨酶	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
鸟氨酸脱羧酶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
赖氨酸脱羧酶	d	-	-	-	+	-	d	-	+	+
脲酶	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
吲哚	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+
硫化氢	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
硝酸盐	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
柠檬酸盐	d	-	-	+	-	-	-	+	+	+
丙二酸盐	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
O/129	R	R	R	R	R	R	S	S	-	-

注: + 阳性反应, - 阴性反应, d 菌株间有差异, R 具抗性, S 敏感, 空白格为未测指标

0.5μm左右, 单个、成双或呈葡萄状排列, 无动力, 没有鞭毛。Kp970506 菌株为不透明的橙色菌落, 大小不一, 为 1.5mm~8mm; 菌体近乎球形, 大小为 0.3μm~0.6μm, 单个、成双或呈链状

排列, 无动力, 无鞭毛。各菌株在电镜下的形态见图 1。

2.1.3 细菌生化反应特性: 各菌株生化反应列于表 2、表 3。除菌株 Sa970505 为革兰氏阳性菌

表3 菌株Sa970505的生化特性与模式株的比较

生化特性	<i>S. aureus</i>	970505	生化特性	<i>S. aureus</i>	970505
革兰氏染色	+	+	接触酶	+	+
蛋白链基质		+	甘露醇	d	+
枯草杆菌素		-	棉子糖	-	-
奥普托欣		+	水杨素	-	-
半纤维素酶		-	山梨醇		-
6%氯化钠	+	+	蔗糖	+	+
10%胆汁	+	+	海藻糖	d	-
40%胆汁	+	+	阿拉伯糖	-	-
七叶苷	-	-	焦葡萄糖酸盐		-
淀粉	-	-	芽霉素		-
精氨酸	+	-	菊粉	-	-
尿素	+	+	蜜二糖		-
四氮杀茂红		+	松三糖	-	-
新生霉素	-	-	纤维二糖	-	-
葡萄糖	d	+	核糖	d	-
乳糖	d	-	木糖	-	-

外, 其他菌株均为革兰氏阴性菌。根据所测定的生化反应, 与 1994 年《伯杰氏细菌鉴定手册》第九版^[4]相应模式菌株比较, 鉴定菌株 Ah961004、Ah960916 和 Ah970516 均为嗜水气单胞菌 (*A. hydrophila*); As970510 为温和气单胞菌 (*A. sobria*); Vd970519 为美人鱼弧菌 (*V. damsela*); Kp970506 为肺炎克雷伯氏菌 (*K. pneumoniae*)。利用 VITEK 全自动微生物鉴定系统检测 Sa970505 为金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*), 所测定的 30 种生化指标与模式株的同

源率达 99%。

2.2 生物毒性试验

2.2.1 小白鼠毒性试验: 小白鼠腹腔注射菌液毒性试验结果如表 4。注射 5min, 小白鼠开始反应迟钝, 不运动。最毒株当数 Ah960916、Ah961004 和 As970510, 注射 Ah960916 菌液组, 10min 开始出现死亡, 全部死亡延续 1.5h; Ah961004 菌死亡时间较一致, 1h 全部死亡; As970510 菌虽然菌液浓度较低, 但在 1.5h 时就开始出现死亡, 3h 内全部死亡。对照组小白鼠

表4 7株菌对小白鼠的毒性

菌株	Ah961004	Ah960916	Sa970505	Kp970506	As970510	Ah970516	Vd970519
菌液浓度(个/mL)	2×10 ⁹	2.5×10 ⁹	1.5×10 ⁹	2.8×10 ⁹	7.9×10 ⁸	3.2×10 ⁸	2.2×10 ⁹
注射剂量(mL)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
死亡数/试验数	5/5	5/5	4/5	4/5	5/5	5/5	5/5
死亡时间	1h	1.5h	12h	15h	3h	15h	3h

全部正常生长, 无死亡。

2.2.2 中华鳖细菌人工感染试验: 7 株菌菌悬液腹腔注射人工感染试验结果列于表 5。

实验结果显示, 不论是从患有红底板或是白底板病病鳖中分离出来的病原菌, 其人工感染试验均表现为红底板症状。用同剂量的以上各菌

表5 中华鳖细菌腹腔注射感染试验

菌株	菌悬液浓度 (个/mL)	注射剂量 (mL)	死亡数/试验数 (只)	死亡时间 (d)	病鳖症状
Ah961004	1.9×10^9	0.4	3/3	1~10	红底板
Ah960916	1.0×10^9	0.4	1/3	26	红底板
Sa970505	1.5×10^9	0.4	2/3	15~30	红底板
Kp970506	1.5×10^9	0.4	0/3	—	正常
As970510	1.8×10^9	0.4	2/3	17~22	红底板
Ah970516	2.3×10^9	0.4	2/3	25	红底板
Vd970519	2.0×10^9	0.4	1/3	29	红底板

株同时进行灌胃和肌肉注射人工感染,或是两种细菌进行混合感染,病鳖也均以红底板为主要病症。对照组的鳖正常生长,无上述病症。

2.2.3 细菌溶血试验: 7 株菌在 5% 绵羊血平板上生长,嗜水气单胞菌 Ah961004、Ah960916、Ah970516,温和气单胞菌 As970510 和金黄色葡萄球菌 Sa970505 均在血平板上产生清亮的β-溶

血圈;肺炎克雷伯杆菌 Kp970506 和美人鱼弧菌 Vd970519 则没有溶血圈产生。

2.2.4 菌胞外分泌物(ECP)的溶血价测定: 嗜水气单胞菌 Ah961004、Ah960916、Ah970516 和温和气单胞菌 As970510 菌株 ECP 溶血价测定结果列于表 6。

各菌株溶血能力不同,以 Ah970516 溶血价

表6 嗜水气单胞菌和温和气单胞菌的溶血价测定结果

红细胞来源	溶血价($\times 10^3$ HU/mg)			
	Ah961004	Ah960916	Ah970516	As970510
人	0.0014	1.27	4.515	3.47
猕猴	0.0131	2.21	6.06	3.95
大白鼠	0.4183	10.71	193.94	126.98
鲫鱼	0.4183	35.36	96.97	63.49

为最高,Ah961004 为最低;各来源不同的红细胞对各菌株的溶血敏感性有很大的差别,以大白鼠最为敏感,鲫鱼次之,人是最不敏感的。

3 讨论

在患红底板病和白底板病的病鳖中分离到嗜水气单胞菌、温和气单胞菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯氏菌和美人鱼弧菌,这些菌均可使小白鼠致死,嗜水气单胞菌、温和气单胞菌、美人鱼弧菌和金黄色葡萄球菌单独或混合感染的结果均表现为以败血症为主的鳖红底板病,与菌的溶血作用有关。美人鱼弧菌在绵羊血平板上无β-溶血圈,仅说明绵羊红细胞对此菌不敏感,不排除对鳖红细胞有作用的可能。无论从红底板和白底板病的病鳖中分离的细菌回接感染均导致鳖红底板而无白底板,从一侧面表明我们所分离

的细菌可导致鳖红底板病,而鳖白底板病与病毒的单独或混合侵染有较大的关联^[5]。

肺炎克雷伯氏菌致死小白鼠而不致死鳖,说明小白鼠对此菌易感,而鳖则对此菌有一定的抵抗力。克雷伯氏菌是一类常见的条件致病菌,是人类呼吸道的正常菌群,也常见于人及动物的肠道内。孙佩芳^[6]提及肺炎克雷伯氏菌感染稚鳖,病理观察在肺、肝和肾等脏器有大量脓细胞聚集,外观症状类似穿孔病。我们所分离的此株菌类此菌似肺炎克雷伯氏菌肺炎亚种,临诊此菌与金黄色葡萄球菌混合感染中华鳖,在小肠和胰脏交界处形成孔洞。金黄色葡萄球菌是人类的一种常见致病菌,此菌可分泌多种胞外毒素和酶,如溶血素、肠毒素、血浆凝固酶等,可引起伤口化脓、中耳炎、骨髓炎、肺脓肿、脑膜炎、败血症及脓毒血症等。金黄色葡萄球菌所致水生动物疾病

是很少见的,同属的表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*)据报道可引起鱼类疾病^[7],作为鱼类病原的革兰氏阳性球菌多集中于链球菌属,如似马链球菌(*Streptococcus equisimilis*)、粪链球菌(*S. faecalis*)、缺乳链球菌(*S. agalactiae*)和海豚链球菌(*S. iniae*)。美人鱼弧菌,从患有皮肤溃疡病的美人鱼中分离出而得名^[8],也可引起人类伤口感染。

气单胞菌也是人兽共患病菌,常引起水产养殖动物的多种疾病,是鲑红底板病的主要病原。此属细菌大多可产生多种毒性胞外分泌物,如气溶素、肠毒素、蛋白酶等,与菌毛在内的多种粘附因子、侵袭因子、S-层蛋白、外膜蛋白和LPS协同作用,使宿主产生疾病。单独的致病因子强弱并不一定代表菌株本身致病性强弱,Lallier等^[9]从鱼中分离出一株强毒而一株弱毒的嗜水气单胞菌,弱毒株产生的溶血素比强毒株高20倍,提纯的溶血素对鱼无毒。我们的研究也表明气单胞菌溶血的强弱与菌株的致病性强弱不存在一一对应关系,菌株Ah961004不论是对鲑或小白鼠,表现出来的毒性是最强的,但其胞外分泌物的溶血价在四株气单胞菌中是最低的。Thune等^[10]认

为,这是由于蛋白酶的浓度太低不足以引起溶血素的毒性效应。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978.
- [2] 阿尔顿 G G, 琼斯 L M. 布氏菌病实验室技术. 北京: 科学出版社, 1975, 55.
- [3] Asao T, Kozaki S, Kato K *et al.* J Clin Microbiol, 1986, 24(2): 228~232.
- [4] Holt J G, Krieg N R. Bergen' Manual of Determination Bacteriology. 9th ed. Maryland: Williams & Wilkins Press, 1994.
- [5] 叶巧真, 何建国, 翁少萍等. 淡水渔业, 1999, 29(8): 3~7.
- [6] 孙佩芳, 蔡完其. 水产学报, 1996, 20(2): 120~123.
- [7] Kusuda R, Sugiyama A. Fish Pathol, 1981, 16(1): 15~24.
- [8] Love M, Teebken-Fisher D, Hose J E *et al.* Science, 1981, 214(4): 1139~1140.
- [9] Lallier R, Bernars F, Lalonde G. Can J Microbiol, 1984, 30(7): 900~904.
- [10] Thune R L, Graham T E, Riddle L M *et al.* Trans Ameri Fish Soc, 1982, 111(6): 749~754.