

鳊鱼细菌性病原的分离鉴定及致病性初步研究

黄志坚 何建国* 翁少萍 曾 慷

(中山大学生命科学学院生命科学与技术系 广州 510275)

侯可挺 黄伟平 罗均任 陈炯恒

(广东省南海市水产局 南海 528200)

摘要 对广东省各地区患病的鳊鱼进行病原分离,通过细菌学鉴定和应用 VITEK-AMS-60 鉴定系统,并以有关的标准菌株为对照,初步鉴定为温和气单胞菌 (*Aeromonas sobria*)、少动假单胞菌 (*Pseudomonas paucimobilis*)、脑膜脓毒性黄杆菌 (*Flavobacterium meningosepticum*)、施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*)、美人鱼弧菌 (*Vibrio damsela*)、鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) 等 6 种菌。经过进一步比较各菌株特性和人工感染等试验,证明这 6 株菌对鳊鱼有不同程度的致病性,而以温和气单胞菌的致病力最强。

关键词 鳊鱼,细菌,致病性

分类号 S941 文献标识码 A 文章编号 0253-2654(1999)-04-0241-06

THE ISOLATION AND PRELIMINARY IDENTIFICATION OF PATHOGENIC BACTERIA FROM THE DISEASED MANDERIN FISH

Huang Zhijian He Jianguo* Weng Shaoping Zeng Kang

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

Hou Keting Huang Weiping Luo Junren Cheng Jiongheng

(Nanhai Aquatic Bureau, Nanhai 528200)

Abstract Bacterial disease of Mandarin fish occurred recently in Nanhai city (Guangdong province). Several bacterial

* 通讯作者

1998-05-11 收稿, 1998-10-30 修回

strains were isolated. They were identified to be *Aeromonas sobria*, *Pseudomonas paucimobilis*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Pseudomonas stutzeri*, *Vibrio damsela* and *Acinetobacter Iwoffii* with the help of VITEK-AMS-60 identification system. According to artificial fish infection tests, it was considered that *Aeromonas sobria* could be the major pathogen.

Key words Mandarin fish, Bacterium, Pathogenicity

鳊鱼 (*Siniperca chuatsi*) 在分类学上隶属于鲈形目鲈亚目, 俗称桂花鱼、胖鳊、季花鱼等。因与海产石斑鱼同科且外形相似, 又誉为“淡水石斑”^[1], 是闻名遐迩的名贵水产鱼类。随着鳊鱼养殖规模的扩大, 疾病造成的危害也日益严重, 特别是近年来, 鳊鱼的细菌性疾病猖獗, 呈爆发流行之势。患细菌性疾病的鳊鱼外表多无明显症状, 鳃丝有的出血, 腐烂, 分开, 有的带泥, 粘液多; 剖检可见到肝脏呈花肝, 红褐色, 有的有出血点, 肝叶尖端呈黑紫色, 肾出血, 充血, 脾肿大, 有的胃肠道充血, 有少量腹水。关于鳊鱼疾病病原的研究有少量报道, 发现有病毒^[2,3]、细菌^[4,5]以及寄生虫^[6]等病原。近年来我们在广东省各地进行流行病学调查, 从病鳊鱼分离了6种新的鳊鱼细菌, 并研究生理生化特性和致病性。

1 材料与方法

1.1 材料

鳊鱼: 来源于广东省南海市各养殖场。健康鳊鱼均重130~170g。饲喂于实验室水泥池一周无异常后用于感染试验。

罗非鱼: 来源于中山大学水产养殖基地, 均重22~28g。饲喂于实验室水泥池一周无异常后用于感染试验。

小鼠: 来源于中山大学药系, 均重18~22g。饲喂7d无异常后进行致病力试验。

1.2 方法

1.2.1 细菌分离: 取不同来源的濒死鳊鱼, 以无菌操作取肝、肾、脾、腹水、胃肠组织等, 然后用接种环在普通营养琼脂平板上划线接种, 于28℃下培养18~24h, 在平板上出现较多形态一致的菌落, 选取单个菌落进行纯化, 以供鉴定和感染试验用。

1.2.2 致病力检测: 将选取菌接种于营养琼脂斜面, 28℃培养18~24h, 用无菌生理盐水(0.85%)洗下成悬液, 参照麦氏比浊管调整菌液浓度成MCF3管(9×10^8 个/mL)或以活菌计数, 然后用4号针头腹腔注射鳊鱼、罗非鱼、小鼠等, 剂量为0.4mL/尾(只)。同时设注射无菌生理盐水的鳊鱼、罗非鱼、小鼠作对照组。注射后鳊鱼、罗非鱼置水池中饲养, 水温控制在25℃~28℃。逐日观察, 记录发病及死亡情况。

1.2.3 病原菌回收和重复感染: 选取致病力较强的菌株接种于营养琼脂斜面, 28℃培养18~24h, 用无菌生理盐水洗下成悬液, 并稀释至 7.2×10^8 个/mL菌液浓度, 然后用4号针头腹腔注射感染健康鳊鱼, 每尾注射0.4mL。注射后的鳊鱼置水池中饲养, 水温控制在25℃~28℃。从患病鳊鱼分离出病原菌, 再将其感染健康鳊鱼, 以证实其病原性。

1.2.4 病原菌鉴定: 参照文献[7~10]进行细菌学鉴定, 并将鉴定菌的生物学特性与有关标准菌的生物学特性作比较。

1.2.5 鉴定系统鉴定: 选取菌接种于普通营养琼脂平板, 28℃培养18~24h, 用美国自动微生物鉴定系统(VITEK-AMS-60)鉴定, 鉴定板为美国进口J132K革兰氏阴性菌种鉴定卡(GNI)。

2 结果

2.1 病原菌分离

在不同来源病鱼的不同组织分离到较多细菌, 通过平板划线纯化, 比较各菌株的菌落特点及主要的生物学特性, 选取9株菌供试验用(见表1)。

2.2 对小鼠的毒力

感染的小鼠表现为竖毛, 扑伏不动, 呼吸困

表1 菌株来源

菌株编号	分离时间	分离部位
NG-1	1997.7.10	肠
NG-2	1997.7.8	肾
NG-3	1997.7.8	肝
NG-4	1997.9.4	肝
NG-5	1997.9.5	肝
NG-6	1997.9.5	肾
NG-7	1997.9.16	肝
NG-8	1997.9.16	肝
NG-9	1997.9.16	肾

难。不同菌株表现为不同程度的毒力,小鼠死亡时间多在24h内,观察1周。其中以NG-7、NG-9菌株对小鼠的致病力最强,NG-1、NG-3菌株的致病力次之。其他菌株的致病力较低,对照组小鼠仍健壮。

2.3 对鱼的致病性

用9株菌分别感染罗非鱼、鳊鱼,表现为不同程度的致病力。其中以NG-7菌株感染的鳊鱼症状最为明显,在24h内先后死亡,与自然发病的病鱼症状一致,致病力最强。NG-9菌株感染的鱼多在24~48h内先后死亡。其余菌株感染的鱼多在24h后出现症状,48h后先后死亡,有些鱼在1周内仍存活。对照组的罗非鱼、鳊鱼不表现任何症状。

2.4 病原菌菌体形态、培养特性和生物学特性

经过筛选比较,选取9株菌进行细菌学鉴定。其中NG-1菌株与NG-3菌株、NG-2菌株与NG-4菌株、NG-6菌株与NG-8菌株分别表现为相同的生物学特性。

2.4.1 NG-1、NG-3菌株: NG-1、NG-3菌株性状基本一致,为革兰氏阴性杆菌,两端钝圆,单个或成双排列,具单鞭毛,能运动,无芽孢。在普通营养琼脂培养基上生长良好,菌落形态一致,表面光滑,湿润,边缘整齐,浅灰色,半透明,微隆起,为化能异养菌,呼吸代谢。氧化酶、接触酶阳性,能分解葡萄糖、甘油、木糖、阿拉伯糖、山梨醇、蔗糖等。其生理生化特性与

Pseudomonas paucimobilis 相同。

2.4.2 NG-2、NG-4菌株: 革兰氏阴性杆菌,在普通营养琼脂平板上生长较好。以单极生鞭毛运动,为专性需氧菌。氧化酶阳性,能分解葡萄糖、果糖、麦芽糖、甘露醇产酸。其生物学特性与 *Pseudomonas stutzeri* 相同。

2.4.3 NG-5菌株: 革兰氏阴性杆菌,大小约为 $2.0 \times 1.2 \mu\text{m}$,形态多为球状或球杆状,可单个存在或成对排列。无芽孢。为专性需氧菌,在普通培养基上生长良好。菌落常呈圆形,光滑,边缘整齐,灰白色。氧化酶阴性,接触酶阳性,吡啶、 H_2S 、M.R.V.P反应均为阴性。不产生苯丙氨酸脱氨酶、赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶和精氨酸双水解酶。不分解糖类。其特性与 *Acinetobacter lwoffii* 相同。

2.4.4 NG-6、NG-8菌株: 革兰氏阴性菌,形态多样,多为球杆状、梭杆状或棒杆状。有单条或多条无鞘的极生鞭毛,运动较活泼。为兼性厌氧菌,化能有机营养型。氧化酶阳性,对O/129敏感,枸橼酸利用阴性,能利用硝酸盐,发酵葡萄糖、半乳糖、麦芽糖。其生理生化特性与 *Vibrio damsela* 相同。

2.4.5 NG-7菌株: 革兰氏阴性杆菌,两端钝圆,菌体大多呈杆状,也有稍呈弯曲状者,无芽孢和荚膜。菌体大小为 $0.5 \times 1.3 \sim 1.8 \mu\text{m}$,多数单个,少数双个排列,单极生鞭毛,多为无鞘的结构,运动较活泼。在普通营养琼脂平板上经 28°C 培养18~24h,菌落形态一致,淡黄褐色,半透明,菌落圆形,直径 $0.10 \sim 0.15 \text{cm}$,边缘整齐,中央稍隆起,表面湿润,有光泽,强烈 β 溶血(羊血)。为兼性厌氧菌,最适宜生长温度 $25^\circ\text{C} \sim 28^\circ\text{C}$,在 $4^\circ\text{C} \sim 10^\circ\text{C}$ 能生长, 43°C 不生长。在无NaCl胨水中生长良好,pH生长范围为 $5.5 \sim 10$ 。对O/129不敏感。为化能异养型,呼吸和发酵代谢,氧化酶阳性,接触酶阳性,发酵葡萄糖产酸产气,不发酵肌醇等。NG-7菌株生理生化及糖醇发酵特性如表2.3。

2.4.6 NG-9菌株: 革兰氏阴性杆菌,两端钝圆,大多不运动,无芽孢。在普通营养琼脂平

表2 NG-7菌与 *A. sobria* 的生理生化特性比较

项目	NG-7	<i>A.sobria</i>
革兰氏染色	G ⁻	G ⁻
氧化酶	+	+
接触酶	+	+
动力性	+	+
O/F	F	F
M.R.	+	+
V.P.	-	-
吲哚	+	+
硝酸盐还原	+	+
淀粉水解	+	+
ONPG	-	+
H ₂ S	- (+)	-
脲酶	+	D
精氨酸双水解酶	+	+
苯丙氨酸脱氨酶	-	-
色氨酸脱氨酶	-	-
精氨酸脱羧酶	+	-
赖氨酸脱羧酶	-	d
鸟氨酸脱羧酶	-	d
O/129(150μg)	-	-
液化明胶	+	+
可作唯一碳源的氨基酸		
精氨酸	-	-
组氨酸	-	-
亮氨酸	+	+
天冬氨酸	+	+
谷氨酸	+	+

注: G 表示革兰氏阴性, + 表示阳性, - 表示阴性,

O 表示氧化, F 表示发酵, d 表示不定

板上生长较好, 菌落圆形, 不透明, 微隆起, 表面光滑, 边缘整齐, 产生浅淡黄色色素。为有机化能菌, 发酵作用不明显, 在含有碳水化合物培养液内反应一般不产酸也不产气。氧化酶、接触酶均为阳性, 能利用枸橼酸盐。其生理生化特性与 *Flavobacterium meningosepticum* 相同。

经过与标准菌株的有关生物学特性比较,

表3 NG-7菌与 *A. sobria* 的糖酵发酵特性比较

糖醇种类	NG-7	<i>A.sobria</i>
葡萄糖	+	+
蔗糖	+	+
甘露醇	+	+
甘油	-	-
乳糖	-	-
糊精	+	+
淀粉	-	-
肌醇	-	-
山梨醇	+	+
松三糖	+	+
山梨糖	-	-
水杨酸	- (-)	-
麦芽糖	+	+
半乳糖	+	+
海藻糖	+	+
阿拉伯糖	-	-
甘露糖	+	+
鼠李糖	-	-
棉子糖	-	-
木糖	-	-
卫矛醇	-	-
菊糖	-	-

参考有关文献 [4~10], 可初步鉴定 NG-1 和 NG-2 菌株为少动假单胞菌, NG-2 和 NG-4 菌株为施氏假单胞菌, NG-5 菌株为鲁氏不动杆菌, NG-6 和 NG-8 菌株为美人鱼弧菌, NG-7 菌株为温和气单胞菌, NG-9 菌株为脑膜脓毒性黄杆菌。

2.5 细菌自动鉴定系统测定结果

经 VITEK-AMS-60 自动鉴定系统测定, 结果 NG-1 菌株和 NG-3 菌株为少动假单胞菌, NG-2 菌株和 NG-4 菌株为施氏假单胞菌, NG-5 菌株为鲁氏不动杆菌, NG-6 菌株和 NG-8 菌株为美人鱼弧菌, NG-7 菌株为温和气单胞菌, NG-9 菌株为脑膜脓毒性黄杆菌, 与细菌学鉴定结果一致。详见表 4。

表4 细菌自动鉴定系统测定结果

GNI试卡内 每小池成分	NG-1	NG-2	NG-3	NG-4	NG-5	NG-6	NG-7	NG-8	NG-9
DP-300	-	-	-	-	-	-	-	-	-
葡萄糖氧化 (OFG)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
阳性生长控制 (GC)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
醋酰胺 (ACE)	-	-	-	-	-	+	-	+	-
七叶树素 (ESC)	-	-	-	-	-	-	-	-	+
植物尿酵母 (PLI)	+	-	+	-	-	-	+	-	+
尿素 (URC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
枸橼酸盐 (CIT)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
丙二酸盐 (MAL)	-	-	-	-	-	-	-	-	+
苯丙氨酸 (TDA)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
多聚杆菌素 (PXB)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
乳糖 (LAC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
麦芽糖 (MLT)	+	+	+	+	-	-	+	-	-
甘露醇 (MAN)	-	-	-	-	-	-	+	-	+
木糖 (XYL)	+	+	+	+	-	-	-	-	-
棉实糖 (RAF)	-	-	-	-	-	-	-	-	+
山梨醇 (SOR)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
蔗糖 (SUC)	-	-	-	-	-	-	+	-	+
肌醇 (INO)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
福寿草醇 (ADO)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
香豆酸 (COU)	-	-	-	-	-	-	-	-	+
硫化氢 (H ₂ S)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	-	-	-	-	-	+
鼠李糖 (RHA)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
阿拉伯糖 (ARA)	-	-	+	-	-	-	-	-	-
葡萄糖发酵 (GLU)	-	-	-	-	-	+	+	+	-
精氨酸 (ARG)	-	-	-	-	-	+	+	+	-
赖氨酸 (LYS)	-	-	-	-	-	-	+	-	-
鸟氨酸 (ORN)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
氧化酶 (OXI)	-	+	-	+	+	+	+	+	-
TLA	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3 讨论

近年来,各学科相互渗透,不断地引入新的方法,促使细菌分类学突飞猛进。不仅相当一批原有的老菌名在分类的隶属上已经变动,而且涌现出大量的新分类单位。在水产养殖中,随着养殖规模的扩大,细菌引起的疾病越来越严重、复杂,有关细菌的名称较为混乱,不规范。

如我们在患病鳊鱼体内分离的6种细菌,同种异名现象较多。少动假单胞菌,现分类为少动鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas paucimobilis*),驼动鞘氨醇单胞菌;施氏假单胞菌也称为司徒茨假单胞菌,斯氏假单胞菌;脑膜脓毒性黄杆菌原属于黄杆菌属,现属于金黄杆菌属,故亦称脑膜脓毒性金黄杆菌(*Chryseobacterium meningosepticum*);温和气单胞菌属于气单胞菌属,美

人鱼弧菌曾称为海鱼弧菌,属于弧菌属;鲁氏不动杆菌,也称为路氏不动杆菌,洛非不动杆菌,属于非发酵菌群不动杆菌。本研究中各种细菌的鉴定名称均以《细菌名称》(第二版)为准^[8]。

经过不同地区病原的比较研究以及用9株分离菌株感染鳊鱼、罗非鱼、小鼠等试验,结果表明:温和气单胞菌对鳊鱼致病力强,可能是鳊鱼细菌性病的主要病原。同时少动假单胞菌和脑膜脓毒性黄杆菌两种菌也有较强的致病力,而其他3种菌也表现为一定的致病性。在调查中发现,鳊鱼细菌病较多,从患病鳊鱼个体可分离到不同种细菌,且这些细菌有些为合并感染,有些为单一感染,单一感染和合并感染也不会集中在某个菌种。我们所分离的6种菌均不同程度地对小鼠、罗非鱼和鳊鱼有致病性,应为其病原或合并感染病原。

有资料显示,上述6种菌在医学临床上可引起人类疾病,脑膜脓毒性黄杆菌能使牛蛙、鳖致病,温和气单胞菌是草鱼尾柄病、异育银鲫溶血性腹水病等鱼类疾病的病原,未见有这六种菌感染鳊鱼的报道。因此本研究中分离的6种

菌可能是鳊鱼细菌病的新病原。

参 考 文 献

- [1] 湖南省水产学会, 湖南省水产研究所主办. 淡水名贵水产养殖新技术. 《内陆水产》增刊, 1994, 86~91.
- [2] 吴淑勤, 李新辉, 潘厚军等. 水产学报, 1997, 第21卷增刊: 56~61.
- [3] 何建国, 翁少萍, 黄志坚等. 中山大学学报(自然科学版), 1998, 37(5): 74~77.
- [4] 陈昌福, 史维舟, 赵桂珍等. 华中农业大学学报, 1995, 14(3): 263~266.
- [5] 顾天钊, 陆承平, 陈怀宵. 微生物学通报, 1997, 24(2): 104~106.
- [6] Nie P. Folia Parasitologica (Ceske Budejovice), 1996, 43(4): 272~276.
- [7] 中国科学院微生物研究所细菌组编著. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978.
- [8] 蔡妙英, 卢运玉, 赵玉峰主编. 细菌名称(第二版). 北京: 科学出版社, 1996.
- [9] Holt JG, Krieg NG, Sneath PH A *et al.* *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9th ed). Baltimore: The Williams and Wilkins Co., 1994.
- [10] 李仲兴, 郑家齐, 李家宏主编. 诊断细菌学. 香港: 黄河文化出版社, 1992.