

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00360

南方鲇幼鱼细菌性败血症病原与组织病理

朱成科¹, 周晓扬¹, 张其中^{1,2}

1. 水产科学重庆市市级重点实验室, 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 淡水生物生殖与发育教育部重点实验室, 西南大学 生命科学学院, 重庆 400715;
2. 暨南大学水生生物研究所, 广东 广州 510632

摘要: 从天然患病南方鲇(*Silurus meridionalis* Chen)幼鱼的肝脏中分离获得 1 株优势菌, 命名为 SCL1。用该菌株人工感染健康南方鲇幼鱼, 发现菌株 SCL1 的感染致死率高, 且患病症状与自然发病症状一致。再从人工感染的患病鱼肝脏中分离病原菌, 再次感染健康南方鲇幼鱼, 其症状与自然发病症状一致, 确认分离菌株为南方鲇“败血症”的致病菌。该菌株形态学、生理生化特征和 16S rDNA 基因序列显示其为嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)。药敏试验结果表明, 该菌对土霉素、链霉素、氧氟沙星、氟哌酸、卡那霉素和庆大霉素高度敏感, 而对青霉素钠、麦迪霉素、罗红霉素、甲氧苄啶、乙酰螺旋霉素不敏感。组织病理研究显示患病南方鲇肝组织严重坏死, 肝细胞排列紊乱, 部分肝细胞核肿胀、崩解; 脾脏细胞间界限不清, 细胞核膨大, 核内染色质疏松; 肾小管上皮细胞肿胀, 肾小囊腔间隙增大, 可见该菌主要损伤南方鲇幼鱼肝、肾和脾。本研究旨在为南方鲇细菌性败血症的诊断与防治提供科学依据。[中国水产科学, 2011, 18(2): 360–370]

关键词: 南方鲇; 败血症; 嗜水气单胞菌; 16S rDNA; 组织病理

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)02-0360-11

南方鲇(*Silurus meridionalis* Chen)俗称大口鲇、河鲇, 隶属于鲇形目(Siluriformes)、鲇科(Siluridae)、鲇属(*Silurus*)。主要分布于长江流域、珠江流域及闽江流域, 是中国特有肉食性重要经济鱼类^[1-2]。其肉质细嫩鲜美, 营养价值高^[3], 个头大, 适应性强, 生长快。自 1985 年人工驯养繁殖成功以来, 南方鲇养殖业发展迅速。随着集约化养殖规模的扩大和密度的提高, 养殖环境日益恶化, 各种细菌性疾病和寄生虫病频繁发生^[4-5], 给南方鲇养殖业带来严重经济损失。其中细菌性疾病是最普遍的一类疾病, 有关南方鲇细菌性病原主要有豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*)^[4]、普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)^[6]和柱状屈挠杆菌

(*Flexibacter columnaris*)^[7]已有报道。

自 1986 年报道鱼类细菌性败血症暴发以来, 至今该病已在全国 20 多个省、市、自治区广泛流行, 传播迅速, 发病率和致死率高, 造成严重损失。危害的种类包括异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)^[8]、鲤(*Cyprinus carpio*)^[9]、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)^[10]、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙(*Aristichthys nobilis*)^[11]、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)^[12]、翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*)^[13]、斑鳢(*Channa maculata*)^[14]、西伯利亚鲟(*Acipenser baeri*)^[15]、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[16]、石鲈(*Kareius bicoloratus*)^[17]和鳖(*Trionyx sinensis*)^[18]等, 主要症状为全身性出血、溶血,

收稿日期: 2010-06-17; 修订日期: 2010-08-20.

基金项目: 重庆市重大科技攻关项目(CSTC, 2005AB1009); 三峡库区生态环境教育部重点实验室基金资助项目; 重庆市科技攻关计划项目(CSTC, 2010AC1116).

作者简介: 朱成科(1981-), 男, 博士研究生, 主要从事水生动物疾病及免疫研究. E-mail: zhuck2003@163.com

并列第一作者: 周晓扬.

通讯作者: 张其中, 男, 教授. E-mail: zhangqzdr@126.com

组织器官发生病变,尤以实质性脏器严重,呈败血症症状^[19]。致病原为细菌,主要有嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)^[8, 14, 18]、温和气单胞菌(*A. sobria*)^[8, 10]、鲁氏耶尔森氏菌(*Yersinia ruckeri*)^[11]、迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)^[16]和杀鲑气单胞菌(*A. salmonicida*)^[17]等。可见,尽管症状相似,但是由于宿主和地域差异,其病原不同。近年来,南方鲇幼鱼频繁暴发一种以充血为主要特征的疾病,鱼腹部膨大,充血;腹腔内有溶血腹水,肠黏膜有充血和出血症状,与上述已报道的淡水鱼类细菌性败血症发病症状一致,故将这种疾病定名为南方鲇“败血症”,其传染性强,发病率15%~40%,死亡率45%~80%。鉴于鱼类“败血症”的病原菌种类具有多样性,引起南方鲇“败血症”的病原还需研究鉴定后,才能确定,这正是本研究要解决的问题。

本研究从患病南方鲇的内脏分离出一株优势菌,经回归感染证实了该菌株是病原菌。根据形态特征、自动鉴定系统给出的生理生化结果以及16S rDNA序列同源性分析,对该病原菌进行了综合鉴定,同时还对其进行了药敏试验和病理分析,旨在为该病的诊断与防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验用鱼 患病南方鲇幼鱼:2008年5月取自重庆市北碚区某养殖场,体质量(19.5 ± 1.9) g,全长(10.7 ± 1.6) cm;健康南方鲇取自重庆市合川区南方鲇国家级原种场,体质量(22.0 ± 1.6) g,全长(12.3 ± 1.3) cm。实验鱼用塑料袋充氧运回实验室,于水族箱暂养5 d,暂养期间不投饵,连续充气,水温(24 ± 1)℃,稳定1周后供人工感染用。

1.1.2 主要试剂与仪器

(1)试剂:胰蛋白胨(Tryptone)、酵母粉(Yeast extract)、琼脂糖(Agarose)购自上海生工生物技术公司;Taq酶、dNTP、PMD-19T载体、DNA Marker DL2000 购自大连宝生物工程(TaKaRa)有限公司;琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒购自BioFlux公司;引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

(2)仪器:SW-CJ-1F超净工作台(苏净集团安泰公司);YSEI-150L生化培养箱(重庆市永生实验仪器厂);DU730核酸蛋白测量仪(Beckman Coulter公司);ABI 9700 PCR扩增仪(Applied Biosystems公司)。

1.2 培养基配制

普通肉汤液体培养基:牛肉膏 5.0 g;蛋白胨 10.0 g; NaCl 5.0 g; K_2HPO_4 0.8 g,加蒸馏水至1 000 mL。普通肉汤固体培养基是在液体培养基基础上按照溶液体积添加2%(W/V)琼脂粉。培养基经121℃灭菌20 min,4℃保存备用。

1.3 病原菌的分离

在无菌条件下,用70%酒精棉球对典型患病的南方鲇幼鱼体表擦试消毒后,用无菌剪刀剪开鱼腹部,从其肝、肾和脾分别取样接种于已灭菌普通肉汤琼脂平板上,置28℃培养24 h,挑取形态一致的单个优势菌落,在普通肉汤固体培养基平板上再次划线直至获得单菌落,将其转接斜面长出菌苔后于4℃保种备用,同时将纯化后的菌落划线接种于琼脂固体培养平板上,于28℃培养24~28 h,观察菌落颜色及特征。

1.4 人工感染试验

将健康南方鲇幼鱼放入室内水族箱中,先暂养1周,再试验,每天定时投饵,实验期间水温控制在(24 ± 1)℃,日换水量大约为总体积的1/3。

将分离的优势菌株接种于普通肉汤固体培养基上,28℃培养24 h,用无菌生理盐水洗下,参照麦氏比浊法将菌悬液稀释成 1.0×10^5 CFU/mL、 1.0×10^6 CFU/mL、 1.0×10^7 CFU/mL、 1.0×10^8 CFU/mL、 1.0×10^9 CFU/mL。每尾鱼腹腔注射接种0.2 mL菌悬液,对照组每尾鱼注射0.2 mL 0.65%无菌生理盐水。每天正常投喂饵料,通气换水,并观察记录发病及死鱼情况。取具有自然发病症状的人工感染鱼,在无菌条件下进行细菌再分离培养,按上述方法再次人工感染正常南方鲇幼鱼,并从具有自然病状的鱼分离纯化细菌病原,将分离到的细菌进行生理生化鉴定,若与最初人工感染的细菌为同种细菌,则说明所分离纯化的细菌为病原菌。

1.5 生理生化特征检测

将病原菌接种在普通肉汤琼脂培养基平板上, 观察菌落形态、大小, 参照文献[20]对细菌进行革兰氏染色, 在光学显微镜下观察。采用美国 DADE Behring 公司生产的 MicroScan 4 微生物鉴定系统, 按照产品使用说明书对所得细菌测定生理生化指标。

1.6 细菌最适生长温度、盐度和 pH 测定

参照文献[21]配制不同盐度梯度 $w(\text{NaCl})(0 \sim 14.0\%)$ 和 $\text{pH}(1.0 \sim 14.0)$ 的普通肉汤液体培养基, 接种细菌, 在摇床恒温(28°C)振动(180 r/min)培养 24 h, 752 分光光度计 600 nm 测定菌液 OD 值。将接种细菌的液体普通肉汤培养基 [$w(\text{NaCl})=0$, $\text{pH} 7.0$] 置于不同温度($3 \sim 47^\circ\text{C}$)下恒温培养 24 h, 752 分光光度计在 600 nm 波长测定菌液 OD 值。

1.7 16S rDNA 序列测定和分析

1.7.1 SCL1 DNA 提取 挑取病原菌 SCL1 单菌落接种在普通肉汤液体培养基中, 于 28°C 、 200 r/min 震荡培养 24 h, 取 2 mL 菌液以 $5\,000 \text{ r/min}$ 离心 4 min, 弃上清液, 用于提取总 DNA。按照 Sambrook 的酚-氯仿法提取制备 DNA^[22]。琼脂糖电泳检测所提 DNA 质量。

1.7.2 PCR 扩增和测序 采用 16S rDNA 的通用引物 fD1/rD1^[23], 正向引物 fD1: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3', 对应于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的 16S rDNA 序列的第 8~27 碱基位置; 反向引物 rD1: 5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3' 对应于 *E. coli* 的 16S rDNA 序列的第 1 492~1 510 碱基位置。PCR 反应体系 50 μL , 包括 2 μL DNA 模板 (50 ng/ μL), 5 μL 10 $\times$ PCR Buffer, 3 μL MgCl_2 (25 mmol/L), 1 μL dNTP (2.5 mmol/L), 0.4 μL Taq 酶 (5 U/ μL), 正反向引物各 1 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), 用灭菌双蒸水补足至 50 μL 。扩增条件为: 95°C 预变性 3 min, 之后进行 30 个循环 (94°C 30 s, 53°C 30 s, 72°C 90 s), 最后 72°C 延伸 10 min, 扩增产物经 1.0% TBE 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。使用纯化胶试剂盒, 参照使用说明进行 PCR 产物回收纯化。

克隆与测序: 采用 TaKaRa 公司的 pMD 19-T

载体与适量纯化目的片段在 4°C 连接过夜。转化到 100 μL 感受态细胞中, 经蓝白斑筛选, 挑取白色单菌落, 经 PCR 鉴定, 挑选有插入目的片段的阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司用 ABI 3730 自动测序仪测序。

1.7.3 系统发育树构建 将菌株 SCL1 的 16S rDNA 序列与 GenBank 中的已知核酸序列进行 Blast 比对, 收集与该菌株同属的其他菌株 16S rDNA 序列信息, 采用 DNA star 5.0 和 MEGA 3.1 软件进行序列同源性和系统发育树构建。

1.8 药敏试验

抗菌药物药敏纸片购于杭州微生物有限公司, 药敏试验采用扩散法 (K-B 法) 进行^[24]。将细菌浓度调为 $1.0 \times 10^7 \text{ CFU/mL}$, 均匀涂布在普通肉汤琼脂培养基上, 将药敏纸片贴于琼脂培养基上, 28°C 培养 24 h, 测量其抑菌圈直径 (平行重复 3 次), 所有检测重复 3 次, 以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm \text{SD}$) 表示。

采用试管连续倍比稀释法^[24]进行病原菌对抗菌药物的最低抑菌浓度 (minimal inhibition concentration, MIC) 和最低杀菌浓度 (minimum bactericidal concentration, MBC) 测定。将抗菌药物浓度配制成 500 $\mu\text{g/mL}$, 放置 28°C 的恒温生化培养箱, 培养 24 h, 观察结果。无细菌生长的药物最高稀释管的浓度即为该种药物对该菌株的最低抑菌浓度 MIC。将上述各管在 28°C 继续培养至 48 h, 无细菌生长的最低浓度即相当于该药物对该菌株的最低杀菌浓度 MBC。

1.9 主要器官组织病理观察

分别取健康南方鲇幼鱼和自然发病南方鲇幼鱼的肝脏、脾脏、肾脏等器官, 用 Bouin's 液固定 48 h (中间换液), 70%、80%、90% 和 100% 酒精梯度脱水, 二甲苯: 酒精 (体积比 1:1), 二甲苯 (2 次) 透明, 石蜡包埋切片, 切片厚度为 6 μm , 酒精梯度复水, 苏木精-伊红染色, 酒精梯度脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封存后, 用 NIKON 80i 光学显微镜观察和拍照^[25]。

2 结果与分析

2.1 症状

养殖南方鲇患病幼鱼主要症状: 病鱼离群独

游, 食欲减退, 运动迟缓; 胸鳍、腹鳍基充血, 肛门红肿; 病情严重的病鱼腹部膨大, 受压有柔软浮肿感觉, 解剖可见腹腔内有淡红色腹水, 肠内食物少, 肠壁变薄, 肠黏膜有充血和出血现象。

2.2 人工感染试验

从濒临死亡的病鱼肝脏、肾和脾脏内分离得到 1 株优势菌, 命名为 SCL1, 人工感染实验结果见表 1。通过人工感染试验检测出菌株 SCL1 具有较强的致病力, 且出现病症与原自然发病症状一致。解剖人工感染病鱼, 发现肝、肾有出血点, 肠壁充血严重。并从人工感染濒死鱼的肝、脾等内脏实质器官中再次分离到优势菌株, 其菌落形态与 SCL1 一致, 为了便于叙述, 将其命名为 SCL2, 经人工感染再次复制出与原病鱼相同的症状。根据改良寇氏法计算出菌株 SCL1 的半致死浓度 LD_{50} 为: 2.94×10^6 CFU/mL^[26]。

2.3 病原菌形态特征

菌株 SCL1 在普通肉汤固体营养培养基平板上 28℃ 培养 24 h, 形成圆形、中央隆起、灰白色半透明、湿润、边缘光滑、整齐, 直径 2~4 mm 的菌落。在肉汤液体培养基中生长较好, 浑浊均匀, 菌液表面有膜, 振摇即成碎片。经革兰氏染色镜检该菌株为革兰氏阴性, 为单个或成双短杆菌, 两端钝圆。人工感染试验分离的菌株 SCL2 在普通肉汤固体营养培养基平板上 28℃ 培养 24 h 后, 菌落呈圆形、边缘光滑、直径 2~4

mm, 革兰氏染色阴性, 形态与菌株 SCL1 基本一致。

2.4 生化鉴定结果

对菌株 SCL1、SCL2 进行生理生化特征检测, 生理生化特征均显示为赖氨酸脱羧酶和氧化酶阳性, 苯丙氨酸脱氨酶和鸟氨酸脱羧酶阴性; 葡萄糖氧化发酵; 还原硝酸盐; 利用葡萄糖、蔗糖、水杨苷、阿拉伯糖、麦芽糖和、吡嗪、七叶苷; 不利用棉籽糖、肌醇、脲酶、枸橼酸盐、酒石酸盐、鼠李糖、侧金盏花醇、丙二酸盐、山梨醇和木糖。有关菌株 SCL1、SCL2 与嗜水气单胞菌生理生化特征比较见表 2。

2.5 最适生长盐度、温度和 pH

通过 752 分光光度计检测发现, 菌株 SCL1 的适合生长盐度为 0~4, 最适合生长盐度为 0(图 1); 适合生长的 pH 值为 4.0~10.0, 最适合生长 pH 为 7.0(图 2); 菌株 SCL1 在 $w(\text{NaCl})=0$, pH7.0 时, 适合生长温度 18.0~38.0℃, 最适合生长温度 23.0~33.0℃(图 3)。

2.6 16S rDNA 扩增结果与系统发育分析

为了进一步确定菌株 SCL1 的分类地位, 运用 PCR 技术扩增出 16S rDNA 片段, 经琼脂糖电泳检测表明片段大小约为 1 600 bp(图 4), 与预期结果相符。扩增片段经纯化、克隆和测序后显示不包括两端引物, 其大小为 1 496 bp, 已登录 GenBank(登录号为 GU295963)。菌株 SCL1 的测

表 1 分离菌株对南方鲂幼鱼人工感染实验结果

Tab.1 Results of healthy juvenile southern catfish infected with strains SCL1, SCL2

[illegible]

表 2 病原菌 SCL1、SCL2 生理生化特征
Tab.2 Physiological and biochemical characteristics of pathogenic bacterium strains SCL1 and SCL2

测定项目 item	SCL1	SCL2	嗜水气单胞菌** <i>Aeromonas hydrophila</i> **
形态 cell shape	杆状	杆状	杆状
革兰氏染色 gram stain	—	—	—
生长控制 growth control	+	+	+
氧化酶 oxidase	+	+	+
葡萄糖 glucose	+	+	+
棉籽糖 raffinose	—	—	—
肌醇 inositol	—	—	—
脲酶 urease	—	—	—
赖氨酸脱羧酶 lysine decarboxylase	+	+	d
苯丙氨酸脱氨酶 phenylalanine deaminase	—	—	—
枸橼酸盐利用 citrate utilization	—	—	—
酒石酸盐利用 tartrate utilization	—	—	—
葡萄糖氧化发酵 fermentation of glucose oxidation	+	+	+
蔗糖 sucrose	+	+	+
鼠李糖 rhamnose	—	—	—
侧金盏花醇 adonitol	—	—	—
H ₂ S 产生 H ₂ S production	—	—	+
水杨苷 salicin	+	+	+
丙二酸钠 sodium Malonate	—	—	—
山梨醇 sorbitol	—	—	—
阿拉伯糖 arabinose	+	+	+
麦芽糖 maltose	+	+	+
吲哚 indole	+	+	+
鸟氨酸脱羧酶 ornithine decarboxylase	—	—	—
七叶苷利用 esculine utilization	+	+	+
V-P 反应 Voges-Proskauer reaction	+	+	+
ONPG 水解 ONPG hydrolysis	+	+	+
木糖 xylose	—	—	—
硝酸盐还原 nitrate reduction	+	+	+

注：“—”：阴性；“+”：阳性；d：表示有的菌株阴性，有的阳性，同种细菌的不同菌落间有不同反应；“**”：理化特征来自文献 [27–28].

Note: ‘—’: negative, ‘+’: positive, d: some strains are positive or negative. ‘**’ Data are from references 27 and 28.

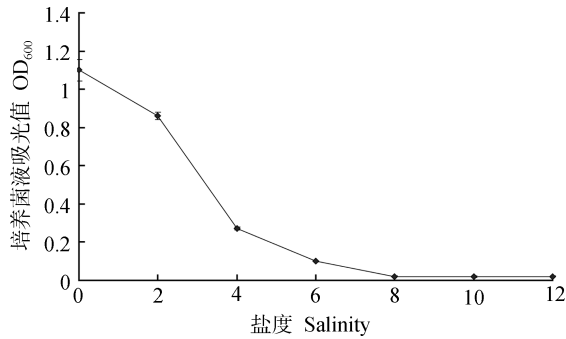


图 1 盐度对菌株 SCL1 生长的影响
Fig.1 Effects of salinity on growth of strain SCL1

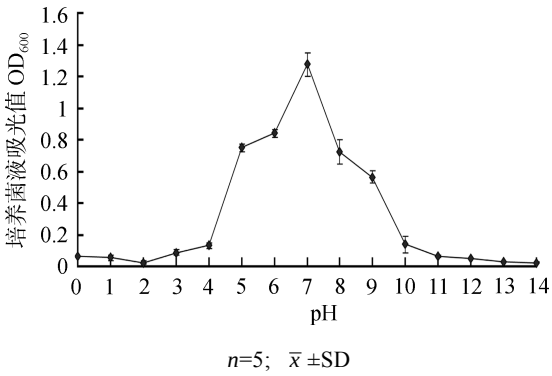


图 2 pH 对菌株 SCL1 生长的影响
Fig.2 Effects of pH on growth of strain SCL1

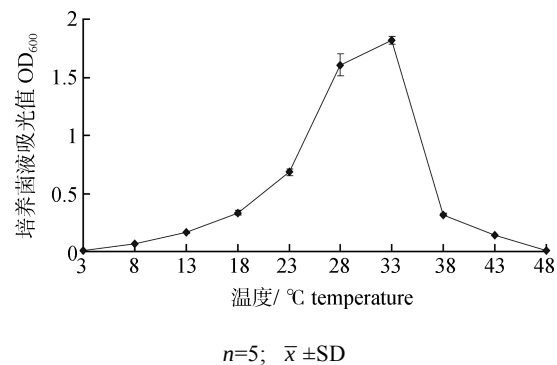


图 3 温度对菌株 SCL1 生长的影响

Fig.3 Effects of temperature on growth of strain SCL1

序结果与 GenBank 上下载的嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 的 16S rDNA 同源性最高, 为 98.7%~99.5%。系统进化树也显示 SCL1 与 *A. hydrophila* 聚为一簇(图 5)。

2.7 药敏实验

所选择的 14 种抗菌药物对嗜水气单胞菌株 SCL1 的抑菌结果见表 3。对该菌高度敏感的有土

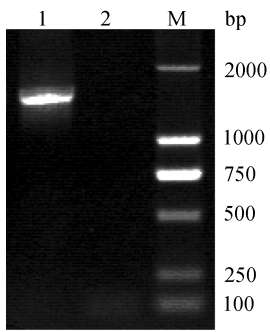


图 4 SCL1 菌株 16S rDNA PCR 扩增结果

1. SCL1; 2. 空白对照; M. DNA marker DL2000.

Fig.4 Result of 16S rDNA amplification of SCL1

1. 16S rDNA of strain SCL1, 2. Blank control, M. DNA marker DL2000.

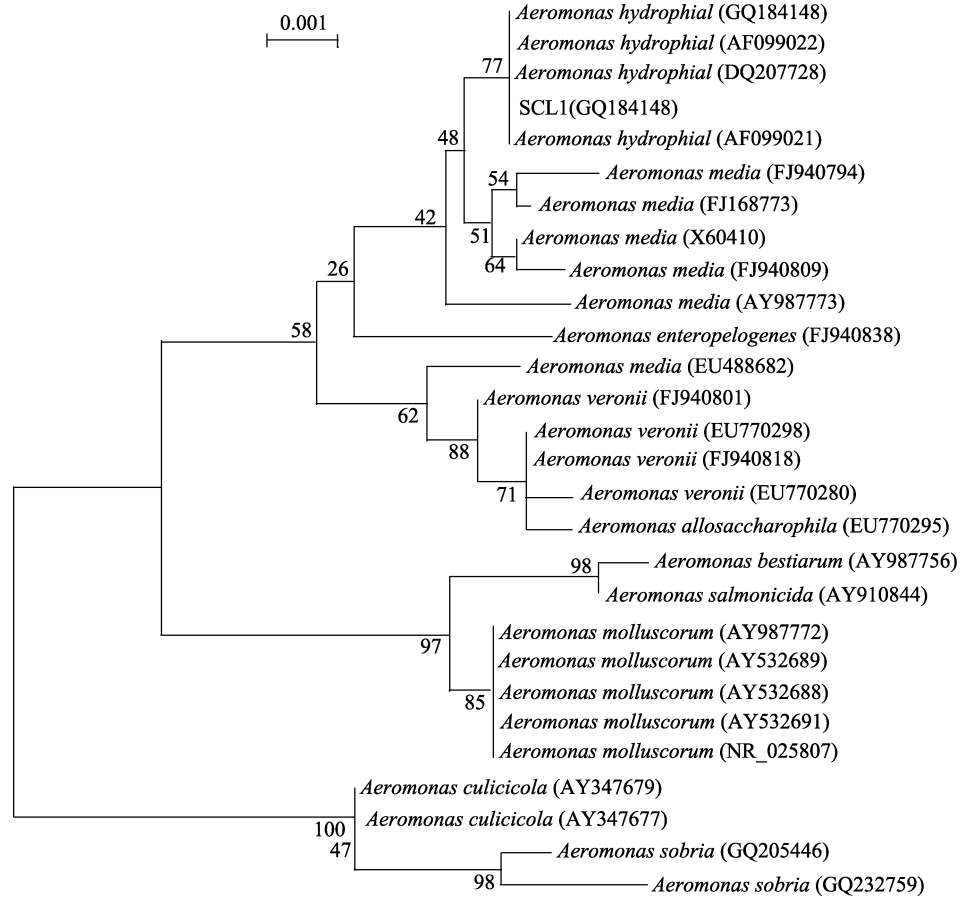


图 5 根据 16S rDNA 序列同源性构建的 SCL1 与气单胞菌属种类(菌株)系统进化树

节点数字表示 1 000 次重复检测的 bootstrap 值. 括号中为 GenBank 登陆编码.

Fig.5 Phylogenetic tree of SCL1 and *Aeromonas hydrophila* based on 16S rDNA sequence

The number at each branch point is the percentage supported by bootstrap with 1 000 repetitions. Sequence accession numbers in GenBank are in brackets.

霉素、链霉素、氧氟沙星、氟哌酸、卡那霉素、庆大霉素 6 种; 中度敏感的有四环素、TMP 和利福平 3 种; 对青霉素钠、麦迪霉素、罗红霉素、甲氧苄啶、乙酰螺旋霉素 5 种药物有耐受性(表 3)。嗜水气单胞菌菌株 SCL1 对氧氟沙星高度敏感, MIC 和 MBC 分别为 0.23 mg/L 和 0.47 mg/L;对 TMP 敏感性最低, MIC 和 MBC 分别为 25.00 mg/L 和 20.00 mg/L(表 4)。

2.8 病理组织变化

南方鲇幼鱼主要受损器官为肝脏、脾脏和肾脏。健康南方鲇幼鱼肝细胞圆形或椭圆形, 排列紧密, 肝细胞质浓染成浅红色, 细胞核圆, 染成紫色(图版 I-1)。病鱼肝组织坏死, 肝细胞排列

紊乱; 肝细胞质疏松, 部分肝细胞核破裂溶解, 肝静脉血管壁模糊, 血管内红细胞胞核膨大, 染色质疏松, 部分红细胞胞膜破损, 出现溶血现象(图版 I-2)。

脾脏属于拟淋巴组织, 健康鱼体脾脏由被膜中的结缔组织伸入小叶内部, 彼此连结构成脾脏的支架。网眼中网罗着红细胞、淋巴细胞以及其他的细胞(图版 I-3)。病鱼脾脏组织坏死, 细胞间界限不清, 细胞核膨大, 核内染色质疏松(图版 I-4)。

健康南方鲇肾组织中肾单位清晰可辨, 肾小球和肾小囊结构清晰, 肾小管细胞结构清晰, 排列整齐有序(图版 I-5), 病鱼肾脏结构受损, 肾小

表 3 菌株 SCL1 对抗菌药物的敏感性
Tab.3 Sensitivity of the strain SCL1 to some antibacterial drugs

药物 drug	含药量/($\mu\text{g}\cdot\text{disc}^{-1}$) concentration	抑菌圈直径/mm diameters of inhibitory zone $n=5; \bar{x}\pm\text{SD}$	敏感性 sensitivity
土霉素 oxytetracycline	30	20.22 $\pm$ 3.56	S
链霉素 streptomycin	10	20.62 $\pm$ 2.04	S
氧氟沙星 ofloxacin	5	27.51 $\pm$ 3.56	S
氟哌酸 norfloxacin	10	26.23 $\pm$ 2.48	S
卡那霉素 kanamycin	30	24.11 $\pm$ 3.12	S
庆大霉素 gentamycin	10	23.30 $\pm$ 1.80	S
四环素 tetracycline	30	17.00 $\pm$ 1.96	M
TMP	23.75/1.25	11.44 $\pm$ 2.60	M
利福平 rifampicin	5	13.14 $\pm$ 2.86	M
青霉素钠 penicillin sodium	10IU	0	R
麦迪霉素 midecamycin	30	0	R
罗红霉素 roxithromycin	15	0	R
甲氧苄啶 trimethoprim	5	0	R
乙酰螺旋霉素 acetylspiramycin	30	0	R

注: “S”表示高度敏感; “M”表示中度敏感; “R”表示不敏感。
Note: S-High sensitive; M-Medium sensitive; R- Resistant.

表 4 敏感抗菌药物对病原菌的最小抑菌浓度和最小杀菌浓度
Tab. 4 MIC and MBC of different antimicrobial agents against the pathogen(SCL1)

			mg·L ⁻¹		
药物名称 drug name	MIC	MBC	药物名称 drug name	MIC	MBC
土霉素 oxytetracycline	1.17	2.34	链霉素 streptomycin	25.00	25.00
氧氟沙星 ofloxacin	0.23	0.47	氟哌酸 norfloxacin	0.98	0.98
庆大霉素 gentamicin	6.26	6.26	卡那霉素 kanamycin	9.38	18.75
四环素 tetracycline	0.47	0.94	利福平 rifampicin	15.60	15.60
TMP	25.00	50.00			

管上皮细胞结构模糊, 排列紊乱, 严重者致使管腔阻塞, 肾小囊腔间隙增大(图版 I-6)。

3 讨论

经人工感染试验证实, 从患败血症的南方鲇病鱼体内分离到优势菌(SCL1)对健康南方鲇有较强致病和致死作用, 且人工感染症状与自然发病南方鲇症状相同。另外, 从人工感染发病的南方鲇体内分离得到的优势菌株(SCL2), 其形态特征和生化特征与 SCL1 完全一致, 再次感染健康南方鲇复现了自然发病症状, 而对照组南方鲇不发病。以上结果符合柯赫法则(Koch's postulates), 证明菌株 SCL1 为本次研究的南方鲇细菌性败血症的致病菌。

马子行^[29]和陆承平^[30]认为符合革兰氏阴性, 氧化酶阳性, 葡萄糖产气, 并发酵甘露醇、阿拉伯糖、七叶苷或水杨苷和蔗糖, 鸟氨酸脱羧酶阴性等 6 个指标就可以判定为嗜水气单胞菌, 本研究所分离菌的生化试验结果符合嗜水气单胞菌的基本特性。结合《常见细菌系统鉴定手册》^[27]和《伯杰氏细菌鉴定手册》^[28]进行种类鉴定, 初步确定该病原菌为嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)。尽管 SCL1 的 H₂S 试验结果与嗜水气单胞菌标准株有差异, 但这种差异可能是同种细菌在不同地域或寄主上的菌株因地区、气候、水质条件及实验室培养条件等方面的不同而出现的差异^[31], 是适应性变化, 而非种间区别。16S rDNA 在进化中高度保守, 被称为细菌的“分子化石”, 在结构上分为保守区和可变区。可变区具有能区分种的特征核酸序列, 被认为是最适细菌系统发育和分类鉴定的指标^[32]。菌株 SCL1 的 16S rDNA 序列与 GenBank 中登录的嗜水气单胞菌(登录号 GQ184148) 16S rDNA 的一致性为 99.5%, 并且基于该序列构建的 SCL1 与气单胞菌属种类(*Aeromonas* spp.) 的系统发育树表明 SCL1 与嗜水气单胞菌各菌株聚为一支。因此, 进一步确认南方鲇幼鱼致病菌株 SCL1 为嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)。

嗜水气单胞菌在自然环境中广泛分布, 普遍存在于淡水、污水、淤泥和土壤中, 是水产养殖

动物的主要病原体之一^[33]。文献报道嗜水气单胞菌是宽体金线蛭(*Whitmania pigra*)溃烂病^[34]、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)细菌性败血症^[35]、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)肠炎病^[36]、日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)溃疡病^[37]、鳖(*Trionyx sinensis*)穿孔病^[38]等水产动物的病原菌。本研究用自然发病南方鲇幼鱼体内分离培养的细菌, 肌肉注射感染健康幼鱼, 出现了自然发病的临床典型症状, 表明所分离的菌株 SCL1 为南方鲇幼鱼的致病菌。菌株 SCL1 最适生长温度为 23~33℃, 与春、夏季养殖水体温度一致。该菌株对 pH 选择范围较广、对盐度耐受强、其生长环境广泛。野生状态下的南方鲇在天然水体抗病力很强, 但在人工养殖条件下, 由于管理不当、水环境污染等多种原因, 其抵抗力降低, 易发病。对患病养殖场调查发现存在放养密度过大、残饵等污染物清理不及时等问题, 这些都为嗜水气单胞菌提供了增殖和感染条件。

关于嗜水气单胞菌的致病因子, 目前已发现并得到认可的主要包括外毒素(exotoxin)、胞外酶(exoenzyme)和膜上黏附因子(adherent factor)等。其中外毒素包括溶血素(hemolytic toxin)、肠毒素(enterotoxigenicity)及细胞毒素(cytotoxicity)^[33]。陆承平^[30]研究证明, 致病性嗜水气单胞菌的各种毒素的毒性作用能够使肠道分泌物增加, 肠道积液, 红细胞裂解, 组织细胞溶解, 组织的渗透性增加, 杀伤白细胞, 损伤毛细血管, 引起败血症, 出血, 细胞毒素侵入肝、脾、肾等组织器官, 破坏组织细胞, 引起细胞变性, 组织崩溃, 形成炎症。Ventura 等^[39]对感染嗜水气单胞菌的斑点叉尾鲟的组织病理学观察, 发现炎症反应仅在消化道、皮肤和皮下肌肉中; Huizinga 等^[40]观察感染嗜水气单胞菌的黑鲈病变肝脏和肾脏, 发现病灶处无炎症细胞浸润。南方鲇幼鱼患病的主要症状为病鱼腹部膨大, 受压有柔软浮肿感觉, 肛门红肿, 腹腔内有溶血腹水, 肝、脾、肾肿大, 肠壁变薄, 肠黏膜有充血。病理切片表明内脏器官细胞被广泛破坏, 实质器官中以肝、肾细胞被破坏最为严重, 血管壁肿胀、受损, 血细胞受损, 发生溶血, 这些变化都表现出细菌性败血症的病理特征。这

与鲤(*Cyprinus carpio*)^[35]、异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)^[8]、翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*)^[13]和西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)^[15]败血症的表观症状和病理损伤基本相同,表明南方鲇幼鱼所患的为细菌性败血症。

药敏实验结果表明,嗜水气单胞菌 SCL1 对土霉素、链霉素、氧氟沙星、氟哌酸、卡那霉素、庆大霉素 6 种药物高度敏感,对四环素、TMP、利福平 3 种药物中度敏感,对青霉素钠、麦迪霉素等药物都具有耐药性。此结果可为指导南方鲇养殖生产中的疾病早期预防与治疗提供一定依据。这与从患病鲟(*Acipenser baerii*)^[41]、鳖(*Trionyx sinensis*)^[42]和香鱼(*Plecoglossus ativelis*)^[43]体内分离到的嗜水气单胞菌的药敏特性有所不同,可能是不同地方、不同环境中的菌株接触不同药物所产生的耐药性存在差异。因此,在选择药物防治嗜水气单胞菌引起的疾病时,应先进行药敏试验,以保证药物使用的有效性。

参考文献:

- [1] 丁瑞华. 四川鱼类志[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994.
- [2] 施白南. 嘉陵江南方大口鲇的生物学研究[J]. 西南师范学院: 自然科学版, 1980, 2: 45-52.
- [3] 陈定福, 何学福, 周启贵. 南方大口鲇和鲇鱼的含肉率及鱼肉的营养成分[J]. 动物学志, 1990, 25(1): 7-10.
- [4] 吉莉莉, 汪开毓, 肖丹, 等. 南方鲇溃疡综合症病原菌的分离与鉴定[J]. 淡水渔业, 2008, 38(2): 68-72.
- [5] 张其中, 蒋代康. 南方鲇的寄生虫病及防治[J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 1996, 21(6): 622-628.
- [6] 曹海军, 李永文, 雷雨, 等. 大口鲇致病菌的分离鉴定、系统发育分析及相关特性的研究[J]. 微生物学报, 2007, 47(1): 1-6.
- [7] 李春友, 金宝全, 樊振忠. 天津地区养殖南方大口鲇常见病记述[J]. 水利渔业, 2004, 24(4): 74-75.
- [8] 黄琪琰, 郑德崇, 刘丽燕. 异育银鲫溶血性腹水病的组织显微病理研究[J]. 水产学报, 1991, 15(3): 212-217.
- [9] 汪开毓, 冯泽光, 冯炳芳. 鲤鱼细菌性败血症的病原分离鉴定[J]. 四川农业大学学报, 1994, 12(2): 298-303.
- [10] 何丽君, 廖利坤, 袁金凤, 等. 团头鲂细菌性败血症的病原学研究[J]. 西南农业大学学报, 2006, 28(3): 483-486.
- [11] 徐伯亥, 殷战, 陈燕, 等. 鲢、鳊鱼一种新的传染病——*Yersinia ruckeri*, 一种新的鲢、鳊病原菌[J]. 科学通报, 1991, 82(8): 620-622.
- [12] 梁万文, 陈明, 余晓丽, 等. 斑点叉尾鲷肠败血症病原菌的分离与鉴定[J]. 四川农业学报, 2007, 20(5): 1124-1129.
- [13] 陈昌福, 李静. 翘嘴鲌细菌性败血症病原菌的分离及其致病力的研究[J]. 华中农业大学学报, 1996, 18(4): 170-173.
- [14] 陈昌福, 刘毅. 斑鳊细菌性败血症病原菌的分离与鉴定[J]. 中国兽医学报, 1998, 18(2): 144-146.
- [15] 赵凤岐, 曹谨玲, 刘青. 西伯利亚鲟败血症病理学观察与病原学研究[J]. 水生生物学报, 2009, 33 (2): 316-323.
- [16] 李筠, 颜显辉, 陈吉祥, 等. 养殖大菱鲈腹水病病原的研究[J]. 中国海洋大学学报, 2006, 36(4): 649-654.
- [17] 陈翠珍, 房海, 张晓君, 等. 石鲈细菌性败血症感染症及其病原细菌研究[J]. 水生生物学报, 2006, 30(5): 515-523.
- [18] 陆宏达, 金丽华. 鳖嗜水气单胞菌败血症的研究[J]. 水产学报, 1996, 20(3): 223-234.
- [19] 黄琪琰, 邓德崇, 金丽华, 等. 淡水鱼类细菌性败血症的组织亚显微病理及防治研究[J]. 上海水产大学学报, 1995, 4(1): 27-33.
- [20] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 第 3 版, 北京: 高等教育出版社, 2004: 28-35.
- [21] 黄文芳, 李小波. 丰产鲫细菌性败血症病原 CSS-4-2 的生长特性[J]. 微生物学通报, 2004, 31(1): 14-16.
- [22] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [23] Wiliam G W, Susan M B, Dale A P, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. J Bacteriol, 1991, 173 (2): 697-703.
- [24] 韩文瑜, 何昭阳, 刘玉斌. 病原细菌检验技术[M]. 吉林科学技术出版社, 1992.
- [25] 杜卓民. 实用组织学技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998.
- [26] 邹玉霞, 张培军, 莫照兰, 等. 大菱鲈出血病病原菌的分离和鉴定[J]. 高技术通讯, 2004, 14(4): 89-93.
- [27] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [28] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- [29] 马子行. 气单胞菌属的分类与鉴定[J]. 国外医学: 微生物学分册. 1992, 15 (1): 25-28.
- [30] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致病综述[J]. 水产学报, 1992, 16 (3): 282-287.
- [31] 李小波, 黄文芳. 丰产鲫细菌性败血症的研究 I——病原分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2003, 30 (5): 56-61.
- [32] 陈文新. 细菌系统发育[J]. 微生物学报, 1998, 38 (3):

- 240-243.
- [33] 于学辉, 王远微, 汤承, 等. 嗜水气单胞菌的研究进展[J]. 西南民族大学学报: 自然科学版, 2007, 33 (3): 508-514.
- [34] 张晓君, 房海. 宽体金线蛭嗜水气单胞菌感染的病原检验[J]. 微生物学通报, 2006, 33 (1): 46-52.
- [35] 汪开毓. 鲤鱼细菌性败血症的病理学研究[J]. 四川农业大学学报, 2004, 22 (3): 257-262.
- [36] 张晓君, 陈翠珍, 房海. 草鱼肠炎嗜水气单胞菌分离株的主要特性及系统发育学分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22 (4): 334-337.
- [37] 樊海平, 吴斌, 曾占壮, 等. 日本鳗鲡体表溃疡病病原菌的分离、鉴定及单克隆抗体制备[J]. 中国水产科学, 2009, 16 (2): 295-302.
- [38] 孙佩芳, 蔡完其, 吴建农, 等. 鳖穿孔病病原研究[J]. 水产学报, 1996, 20 (2): 120-124.
- [39] Ventura M T, Grizzle J M. Lesions associated with natural and experimental infections of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (rafinesque)[J]. J Fish Dis, 1988, 11 (5): 397-407.
- [40] Huizinga H W, Eseh G W, Hazen T C, et al. Histopathology of red-sore disease (*Aeromonas hydrophila*) in naturally and experimentally infected largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacepede)[J]. J Fish Dis, 1979, 2: 263-277.
- [41] 李圆圆, 曹海鹏, 邓璐, 等. 西伯利亚鲟嗜水气单胞菌致病菌的分离及其全菌苗的免疫效果[J]. 动物学杂志, 2008, 43 (6): 1-9.
- [42] 沈锦玉, 潘晓艺, 余旭平, 等. 中华鳖白底病病原的分析[J]. 中国水产科学, 2009, 14 (5): 815-822.
- [43] 张呈念, 史雨红, 李明云, 等. 一株引起香鱼出血病的嗜水气单胞菌的鉴定[J]. 水产科学, 2009, 28 (7): 170-173.

Pathogenic bacterium identification and histopathology of septicemia of juvenile southern catfish, *Silurus meridionalis* Chen

ZHU Chengke¹, ZHOU Xiaoyang¹, ZHANG Qizhong^{1, 2}

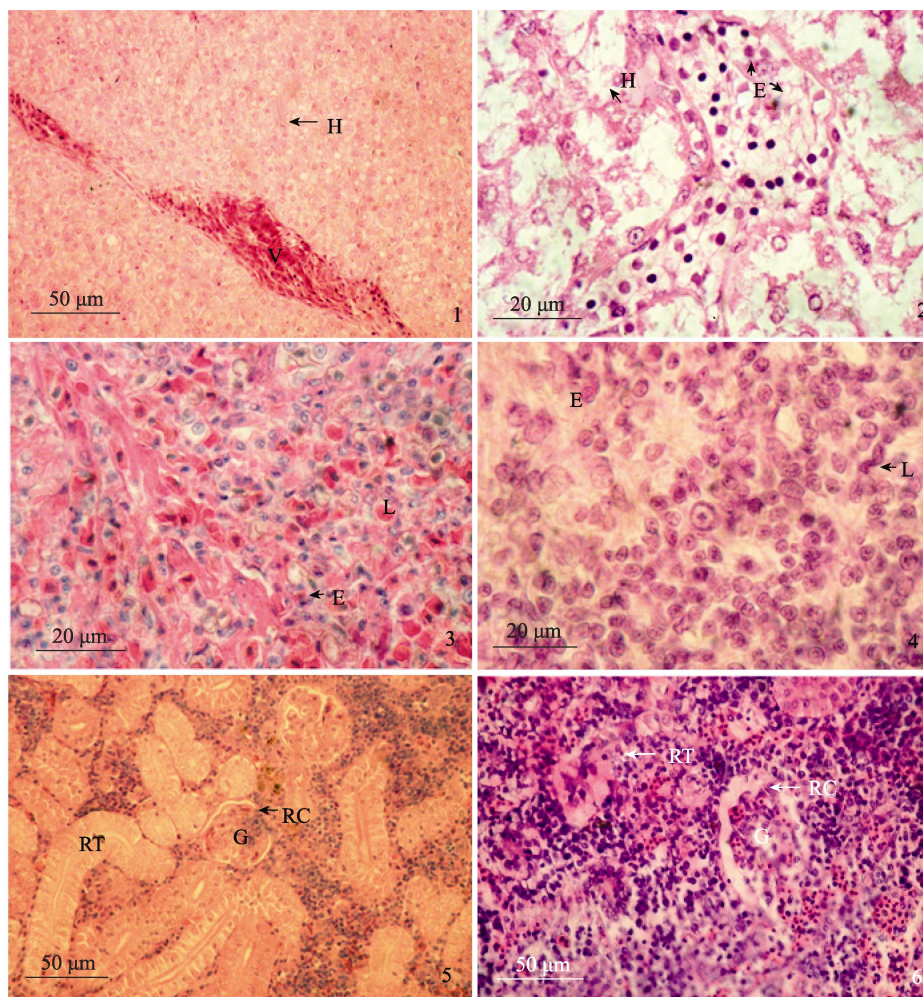
1. Key Laboratory of Aquatic Science of Chongqing, Key laboratory Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region (Ministry of Education), Key Laboratory of Aquatic Science of Chongqing, Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development (Ministry of Education), School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China;
2. Hydrobiology Institute of Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: The study focused on bacteriological and histopathological examination of septicemia in juvenile southern catfish, *Silurus meridionalis*, when the disease took place in the catfish farm in Chongqing. There were 15%-40% of cultured southern catfish suffering from the disease and the mortality rate was 45%-80%. The diseased individuals exhibited traits of hemorrhagic septicemia, and showed symptoms of emaciation, sluggishness, eye exophthalmia, and fin hemorrhages. The viscera symptoms of the diseased fish included ascites, liver swelling, and clear histopathological alterations in spleen and kidney. Histopathological examination revealed hydropic swelling of hepatocytes, degeneration and necrosis of renal tubular epithelia in kidney, tumidity in lymphocytes in spleen. One strain of a bacterial species was isolated from liver, kidney and spleen of diseased southern catfish with typical septicemia symptom, and was named SCL1. The challenge experiments were carried out with healthy juvenile southern catfish by means of injection with live SCL1 at the concentration of 1.0×10^9 CFU/mL. All individuals of the catfish injected with SCL1 died in a week, and the symptom of the challenged fish was similar to those of the naturally diseased fish, and the LD_{50} of SCL1 was calculated as 2.94×10^6 CFU/mL in the 22 g body weight southern catfish, while the catfish injected with 0.65% sterile solution in control group had no signs in 7 d post challenge. Therefore, SCL1 was the pathogenic bacterium strain, which was gram negative, rod-shaped, and the same as *Aeromonas hydrophila* in physiological and biochemical indexes except for H_2S production, and was further proved to be *A. hydrophila* by means of its 16S rDNA sequence, which was 99.5% identical with *A. hydrophila*. SCL1 and was sensitive to oxytetracycline, streptomycin, ofloxacin, norfloxacin, kanamycin, and gentamycin, but resistant to penicillin sodium, midecamycin, roxithromycin, trimethoprim, and acetylspiramycin.

This paper will be helpful to disease control and health management during Southern catfish farming.[Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(2): 360–370]

Key words: *Silurus meridionalis* Chen; septicemia; *Aeromonas hydrophila*; 16S rDNA; histopathology

Corresponding author: ZHANG Qizhong. E-mail: zhangqzdr@126.com



图版 I

1: 健康鱼的肝脏组织, 肝细胞(H)圆形或椭圆形, 排列紧密(箭头). 2: 病鱼的肝脏组织, 肝组织严重坏死, 细胞界限模糊, 肝细胞(H)崩解(箭头); 部分红细胞膜破损(箭头). 3: 健康鱼的脾脏组织, 脾脏淋巴组织充填大量红细胞(E)和淋巴细胞(L). 4: 病鱼的脾脏组织, 红细胞(E)、淋巴细胞(L)肿胀. 5: 健康鱼的肾脏组织, 肾小球(G), 肾小管(RT)结构清晰. 6: 病鱼的肾脏组织: 肾小囊腔(RC)的间隙增大(箭头); 肾小管(RT)上皮细胞坏死(箭头).

E: 红细胞; G: 肾小球; H: 肝细胞; L: 淋巴细胞; RC: 肾小囊; RT: 肾小管; V: 静脉.

Plate I

1: The liver of healthy southern catfish: the blood vessel is full of blood cells; hepatocytes ranking closely (arrow); 2: The liver from diseased southern catfish: tumidity, necrosis in hepatocyte (arrow); tumidity, damage in erythrocytes (arrow); 3: The tissue of spleen from healthy southern catfish: spleen is full of erythrocytes and lymphocytes; 4: The tissue of spleen from diseased southern catfish: tumidity in erythrocytes and lymphocytes; 5: The tissue of kidney from healthy southern catfish: the control group showing normal renal glomerulus and renal tubule; 6: The tissue of kidney from diseased southern catfish: expanded cavity of renal capsule, tumidity in renal tubule epithelia (arrow).

E: erythrocyte; G: glomerulus; H: hepatocyte; L: lymphocyte; RC: renal capsule; RT: renal tubular; V: vein.