

菲牛蛭细菌性疾病的病原检验及药物防治

张彬^{1,2}, 李浩华², 林强³, 汪波⁴, 梁万文¹, 吕军仪²

(1. 广西水产研究所, 广西南宁 530021; 2. 中山大学 生命科学学院, 广东 广州 510275; 3. 中国科学院 南海海洋研究所, 广东 广州 510301; 4. 北京师范大学 珠海分校, 广东 珠海 519085)

摘要: 对菲牛蛭(*Hirudinaria manillensis* Lesson, 1842) 暴发性细菌性疾病的流行情况、临床症状、病原菌形态、生理生化特性、药物敏感性、病蛭的组织切片显微病理观察, 病原 16S rRNA 基因分子鉴定以及 4 种中草药物对该病的治疗效果进行综合研究。结果表明, 病原菌为嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) 和奇异变形杆菌(*Protues mirabilis*)。该病可由这 2 种菌单独或共同引发。2 种菌的人工感染和再感染重复性好、致病性强, 发病死亡率均超过 80%。药物敏感试验表明, 2 株病原菌均对氨基青霉素、庆大霉素、新霉素和环丙沙星敏感, 而用板蓝根和陈皮药浴治疗病蛭效果较好, 治愈率可达 80%。组织病理观察表明, 患病部皮肤表皮角质层溃烂、脱落, 肌肉发生溃疡、腐烂, 肌纤维断裂、溶解、坏死, 唾液腺排列混乱, 部分出现断裂。上述结果表明这 2 种病原菌对菲牛蛭均具有较强的致病性。[中国水产科学, 2009, 16(6): 878-890]

关键词: 菲牛蛭; 奇异变形杆菌; 嗜水气单胞菌; 16S rRNA; 组织学

中图分类号: Q94

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2009)06-0878-13

菲牛蛭(*Hirudinaria manillensis* Lesson, 1842), 是环节动物门、蛭纲、真蛭亚纲牛蛭属的一个种, 俗称“金边蚂蟥”, 主要分布于亚洲东南部, 在中国分布颇广, 福建、台湾、广东、广西和海南等省区的水田、水沟或池塘均可发现。其唾液腺分泌物及体内均含有水蛭素(Hirudin)、水蛭透明质酸酶(Hyaluronidase, Hase)以及前列腺素(Prostaglandins)等生物活性成分, 可以用来治疗败血休克、动脉粥样硬化和心脑血管病^[1]。随着对其药用价值的开发, 养殖区域和规模不断扩大, 高密度人工养殖条件下菲牛蛭疫病时有发生, 导致较大的经济损失^[2]。

目前在水蛭病害研究领域, 国外相关报道较少, 仅见几种水蛭寄生虫(如锥体虫和纤毛虫)病害^[3-4], 以及几种有机污染物对水蛭影响^[5-6]的报道; 国内学者张晓君和贺顺连等^[2,7]对宽体金线蛭(*Whitmanea pigra* Whitman)的病害防治进行了初步探讨, 覃国森

等对菲牛蛭养殖中病害防治的有效药物进行了研究^[8], 而对于菲牛蛭的疫病病原及其防治药物的研究尚未见报道。

2006年3月广州安圣药源生物开发有限公司菲牛蛭养殖基地发生暴发性疫病, 作者进行了病原分离、鉴定及药物防治等方面研究工作, 以期建立该疫病的灵敏检验技术和高效防治方法提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 病例检验

2006年3-5月, 广州安圣药源生物开发有限公司水蛭养殖基地繁殖饲养的1龄菲牛蛭(体质量 $2.87 \text{ g} \pm 0.98 \text{ g}$)发生暴发性疫病, 菲牛蛭出现大面积死亡。在对发病菲牛蛭进行发病情况和临床症状的现场调查后, 取病蛭病变部位做涂片革兰氏染色镜检, 并在此基础上进行病原菌的分离与鉴定。

收稿日期: 2009-03-03; 修订日期: 2009-05-25.

基金项目: 广州市海珠区科技计划项目[重要药源动物—水蛭(菲牛蛭)苗种繁育与工厂化生产关键技术(2006AA10A402)].

作者简介: 张彬(1980-), 男, 博士, 主要从事水产病害及药源动物繁养殖研究. E-mail: zb-415@tom.com

通讯作者: 吕军仪, 教授. Tel: 020-84115521; E-mail: lvjunyi@mail.sysu.edu.cn

1.2 细菌分离与纯培养

取病变症状典型的濒死菲牛蛭3尾,无菌操作,取病灶处肌肉(无菌操作刮去表层后暴露深层肌肉)剪烂,接种环接种于淡水营养琼脂培养基^[9],28℃恒温培养24~28h,做细菌分离;菌落形态观察用EMB培养基、血平皿,由广州环凯微生物科技有限公司生产。待分离细菌后,分别挑取形态、色泽一致的优势菌落,在平板上划线纯化3次,获得纯培养后,用15%~20%的甘油保存于-80℃冰箱备用。

1.3 细菌鉴定

1.3.1 病原菌形态观察 分别将病原菌接种于普通营养琼脂平板、EMB琼脂平板,28℃恒温培养24~28h后,观察菌落及其形态。对培养14~18h的幼龄菌进行革兰氏染色。并以大肠杆菌(-)和枯草杆菌(+)对照观察其形态特征。将培养18~24h的菌经2.5%的戊二醛洗脱、固定后,用1%的磷钨酸染色,在JEM-1200EX透射电子显微镜观察菌体形态特征、菌体表面结构与鞭毛形成情况。

1.3.2 生理生化性状测定 用广州环凯微生物科技有限公司生产的菌种鉴定管测定主要生理生化特征,严格按照实验说明及要求进行,并人工补充其他的生理生化实验。

1.3.3 病原菌的分子鉴定 细菌DNA制备,16S rRNA基因的PCR扩增,16S rRNA基因的序列测定,16S rRNA基因序列分析与系统发育树构建参考文献[2]。通过NCBI的BLASTn和应用clustalw、phyip等软件进行序列分析与比较。以经上述表型性状鉴定及系统发育学分析结果,参照《伯杰氏细菌鉴定手册》第9版^[10],进行供试菌的种属判定。

1.4 人工感染实验

实验用水为曝气2d的自来水,水温18℃左右,实验前将健康菲牛蛭在44cm×30cm×15cm的箱体中暂养1周,随后分组进行实验。采用注射感染方式进行人工感染,每组10条菲牛蛭,设实验组和对照组,每天换水1次,实验期间不投喂。将分离到的纯培养菌株接种到普通营养琼脂培养基上,培养24h后,用无菌水洗下,用比浊法测定菌液浓度。稀

释成 10^8 CFU·mL⁻¹、 10^7 CFU·mL⁻¹、 10^6 CFU·mL⁻¹、 10^5 CFU·mL⁻¹ 4个浓度,每条菲牛蛭背部注射菌悬液0.1 mL,对照组注射等量的无菌生理盐水,人工感染后连续观察14 d。取实验组症状严重的病蛭进行细菌的再分离。观察其菌落特征、菌体形态及初步的生理生化反应,并进行重复感染(10^8 CFU·mL⁻¹)。

1.5 药物敏感实验

采用药敏纸片法(亦称K-B法),药敏纸片为杭州天和微生物试剂有限公司生产。用灭菌枪头吸取 1.5×10^8 CFU·mL⁻¹的菌悬液0.1 mL,涂布MH平板,无菌操作贴好药敏纸片(直径6 mm)后,设3个重复。于28℃培养24 h后观察并测量抑菌圈直径^[11]。参照文献[12]进行结果判定,以抑菌圈直径在16 mm及其以上判定为敏感、在10~15 mm判定为中度敏感、小于10 mm的判定为不敏感。

1.6 组织病理分析

取濒死的症状明显的病蛭,在Bouin氏固定液中固定8 h,于70%酒精保存,组织经酒精梯度脱水,TO透明,石蜡包埋,进行切片,切片厚度5~7 μm,苏木精-伊红染色后,用中性树胶封片,在显微镜下观察、拍照。另外取健康的菲牛蛭进行固定、切片,作为对照^[13]。

1.7 药物治疗实验

(1) 实验药物 中药材干品均购自广州市药材市场。称取三黄(黄连、大黄、黄柏质量比为4:3:6)、板蓝根、穿心莲、陈皮各60 g,切细研碎用纱布包好,分别注入400 mL双蒸水,浸泡30 min后煎煮,煮沸后用文火熬30 min,收集滤液,重复3次,合并3次滤液,浓缩至200 mL,最后定溶至500 mL(此时药液质量浓度为120 mg·mL⁻¹,其中三黄药液主含小檗碱和蒽醌类成分,板蓝根主含靛蓝和靛玉红,穿心莲主含穿心莲内酯,陈皮主含挥发油和黄酮类),置4℃冰箱保存作为药物母液备用。

(2) 实验方法 设置上述4种药物处理组,每个处理通过预实验确定6个质量浓度梯度(0 mg·mL⁻¹、0.24 mg·mL⁻¹、0.48 mg·mL⁻¹、0.96 mg·mL⁻¹、1.92 mg·mL⁻¹和3.84 mg·mL⁻¹),每组3次重复。实验用

病蛭为发病初期,身体有轻微变形,尚有摄食能力个体。采用食品级泡沫箱(45 cm×30 cm×13 cm),每个箱内注入4 L经充分曝气的自来水,各浓度梯度配制完成后随机放入30尾病蛭。连续用药3次,每隔2天更换药液一次,共浸药浴6 d,第7天统计治愈数和存活数,进行数据处理。实验时间为2006年4月18至25日,期间水温为(21.87±3.98)℃。所用药液使用药物母液现配现用,于避光条件下进行,以防止药物降解、失效或毒性增强而对菲牛蛭产生毒害作用。

(3)数据分析 实验数据统计分析采用SPSS.11.5分析软件,不同实验组及其重复组数据之间的多重比较采用ANOVA中的最小因子法(LSD)以及Duncan法处理。

2 结果与分析

2.1 病发症状

调查发现,此次病害暴发,导致菲牛蛭大面积死亡,发病率40%以上,死亡率高达30%。发病症状一致,均表现为发病初期水蛭体虚无力,体表灰暗无光泽,条纹变的不明显;食欲下降,头部缢缩,前后吸

盘扭曲变形,失去吸附能力;吐血,身体肿胀,呈硬结块状,体形为圆柱状,无法游动。发病后期,肛门外突肿大,解剖发现嗦囊内黏膜脱落,发炎充血,轻压病蛭腹部则溢出黑褐色腐臭液体,部分病蛭身体后部出现腐烂。对病蛭进行水浸片检查,发现病灶处有大量的杆状细菌。

2.2 菌株分离鉴定与分类地位分析

2.2.1 病变组织中的细菌分离 取病蛭病灶组织,直接做抹片后经革兰氏染色镜检,结果发现革兰氏染色均为阴性,并分离到6株细菌。菌株0601(图1)、0603和0605菌落形态、大小、色泽一致,在普通营养琼脂培养基中,菌落呈圆形、淡黄色、表面光滑、有光泽、边缘整齐、半透明、不产生色素;菌体形态为革兰氏阴性短杆状,单个或成对排列,菌体大小(0.3~1.0)μm×(1.0~3.0)μm,极端单鞭毛,运动活泼,无荚膜,不产生芽孢。菌株0602(图2)、0604和0606菌落形态、大小、色泽一致,在普通营养琼脂培养基上呈淡黄色、半透明;菌体形态一致,为革兰氏染色阴性球状、球杆状或短杆状,多数成对排列或连接成短链状,菌体大小为(0.8~1.5)μm×(0.4~0.7)μm;周生鞭毛,

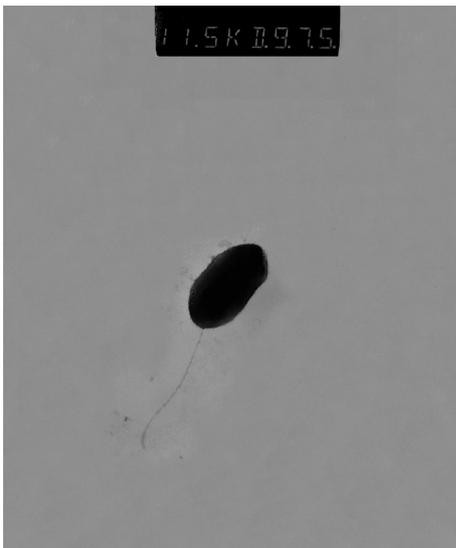


图1 分离菌株0601的菌体形态(单个)
负染,电镜观察,×11 000

Fig. 1 Morphological trait of the isolated strain 0601 (single)
Negative staining, electron microscope observation, ×11 000

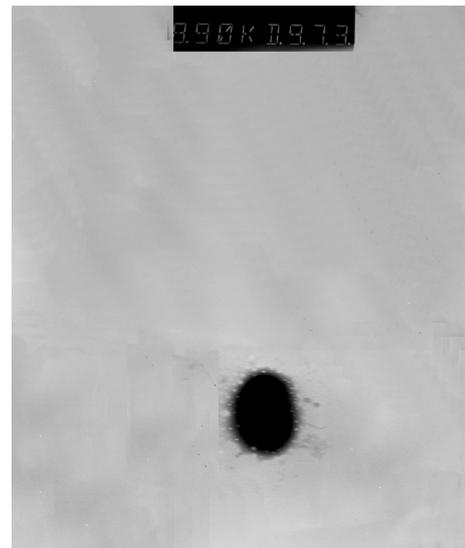


图2 分离菌株0602的菌体形态(单个)
负染,电镜观察,×3 900

Fig. 2 Morphological trait of the isolated strain 0602 (single)
Negative staining, electron microscope observation, ×3 900

运动活泼,无荚膜,无芽胞。上述菌体形态特征和鞭毛电镜观察结果如图 1、图 2 所示。

2.2.2 细菌纯培养 随机取每条尾被检菲牛蛭的肌肉深层处组织分离菌的各 1 个菌落做纯培养,分别按分离地和分离日期及株数进行编号,置 4 ℃ 冰箱保存供鉴定用。

2.2.3 纯细菌形态特征 上述纯培养菌株形态特征分别与在病变组织中的相同。

2.2.4 纯细菌的理化和生长特性 菌株 0601、0603、0605 和 0602、0604、0606 理化性状和生长特性分别

一致,表中以菌株 0601 和 0602 作为各代表菌株,其理化和生长特性分别见表 1 和表 2。菌株 0601、0603 和 0605 对盐度有较强的适应性,对酸碱度适应力一般,在 pH5.5~8.5 间生长良好;革兰氏阴性菌,能运动,氧化酶反应阳性,葡萄糖氧化发酵。菌株 0602、0604 和 0606 的生长温度范围为 10~40 ℃,最适生长温度是 25~32 ℃;可生长的盐度范围是 0~40,最适盐度是 20~30;可生长的 pH 范围是 5.0~8.5,最适 pH 为 7.2~7.5;革兰氏阴性菌,能运动,氧化酶反应阴性,葡萄糖氧化发酵。

表 1 分离菌株 0601 和 0602 生理生化特征

Tab. 1 Physiological and biochemical characteristics of the isolated bacterium 0601 and 0602

生理生化特征 Physiological and biochemical characteristics	菌株 0601 Strain 0601	嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophilia</i>	菌株 0602 Strain 0602	奇异变形杆菌 <i>Protues mirabilis</i>
氧化酶 Oxidase	+	+	-	-
葡萄糖发酵 Glucose fermentation	+	+	+	+
葡萄糖产气 Glucose gas	+	+	+	+
甘露醇 Mannitol	+	[+]	-	-
蔗糖 Sucrose	+	+	+	+
水杨苷 Salicin	+	+	-	-
6% NaCl Sodium chloride	-	-	-	-
精氨酸脱羧酶 Arginine decarboxylase	+	…	-	-
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-	-	+	+
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	+	d	-	-
枸杞酸盐 Barbarum salt	-	d	-	…
木糖 Xylose	-	-	+	-
山梨醇 Sorbitol	-	-	-	-
侧金盏花醇 Adonitol	-	-	-	…
棉子糖 Raffinose	-	-	-	…
产 H ₂ S H ₂ S production	+	+	+	+
尿素酶 Urase	-	-	+	+
苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase	-	-	+	+
吲哚 Indole	+	+	-	d
动力 Mobility	+	+	+	+
VP 反应 Voges-Proskauer reaction	+	+	+	+
MR Methyl red test	+	+	+	+
葡萄糖酸盐 Gluconate	…	…	-	-

注:“+”表示阳性;“-”表示阴性;[+]表示 76%~89% 阳性;“d”表示某些菌株阳性;“…”表示未描述。

Note:“+” means positive;“-” means negative; [+] means 76%~89% positive;“d” means several positive strains;“…” means not described.

表 2 分离菌株 0601 和 0602 的生长特性
 Tab. 2 Growth characteristics of the isolated bacterium 0601 and 0602

生长条件 Growth condition	菌株 0601 Strain 0601	嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	菌株 0602 Strain 0602	奇异变形杆菌 <i>Protues mirabilis</i>
NaCl	0%	+	-	+
	1%	+	+	+
	2%	++	+	++
	3%	+	+	+
	4%	+	+	+
	5%	-	-	-
	6%	-	-	-
pH	4.0	-	-	-
	5.0	-	-	+
	5.5	+	+	+
	7.0	++	++	++
	8.0	+	+	++
	8.5	+	+	+
	9.0	+	+	-
T	9.5	-	-	-
	5 °C	-	-	-
	10 °C	+	+	+
	20 °C	+	+	+
	30 °C	++	+	++
	35 °C	+	++	+
	40 °C	(+)	+	(+)
45 °C	-	-	-	

注:(+)表示生长缓慢;“+”表示生长一般;“++”表示生长良好;“-”表示不生长。

Note:(+) means slow growth;“+” means normal growth;“++” means growth better;“-” means no growth.

2.2.5 16S rRNA 基因序列与系统发育分析 将菌株 0601、0602 作为代表菌株进行 16S rRNA 基因序列扩增。系统发育分析结果(图 3)表明,菌株 0601 与嗜水气单胞菌的关系最近,菌株 0602 与奇异变形杆菌的关系最近(图 4)。

2.2.6 菌株种类判定 综合以上菌落菌体形态、理化生长特性、代表菌株 16S rRNA 基因序列和系统发育学分析结果,上述菌株分为 2 类,可将其判定为气单胞属(*Aeromonas*)的嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)和肠杆菌科(Enterobacteriaceae)的奇异变形杆菌(*Protues mirabilis*)。

2.3 人工感染实验

感染菌株 0601 后的水蛭在病变早期体内有大量黏液排出体外,体表无光泽,吐血;病变后期,后吸

盘失去吸附能力,运动困难,身体肿胀,手触摸有柔软浮肿的感觉,接种部位溃疡,有的身体出现不同程度的变形。取上述感染病死的菲牛蛭,以其深层肌肉为材料做抹片后,经革兰氏染色镜检,结果均发现有大量在形态特征上表现与所用感染菌相一致的细菌。分离到菌株 0607,培养的纯菌落,分别做同前面一致的一些理化特性指标,结果其菌落特征、初步的生理生化反应与自然发病的水蛭中分离到的菌株 0601 一致。用菌株 0607 再次感染健康菲牛蛭,结果与 0601 菌株完全一致,发病死亡率为 100%。感染菌株 0602,体表分泌大量的黏液,活力差,吐血,体后部出现不同程度的变形,身体肿胀,后吸盘失去吸附能力,与自然发病的症状基本相同。取上述感染病死的菲牛蛭,以其深层肌肉为材料做抹片后,经革兰

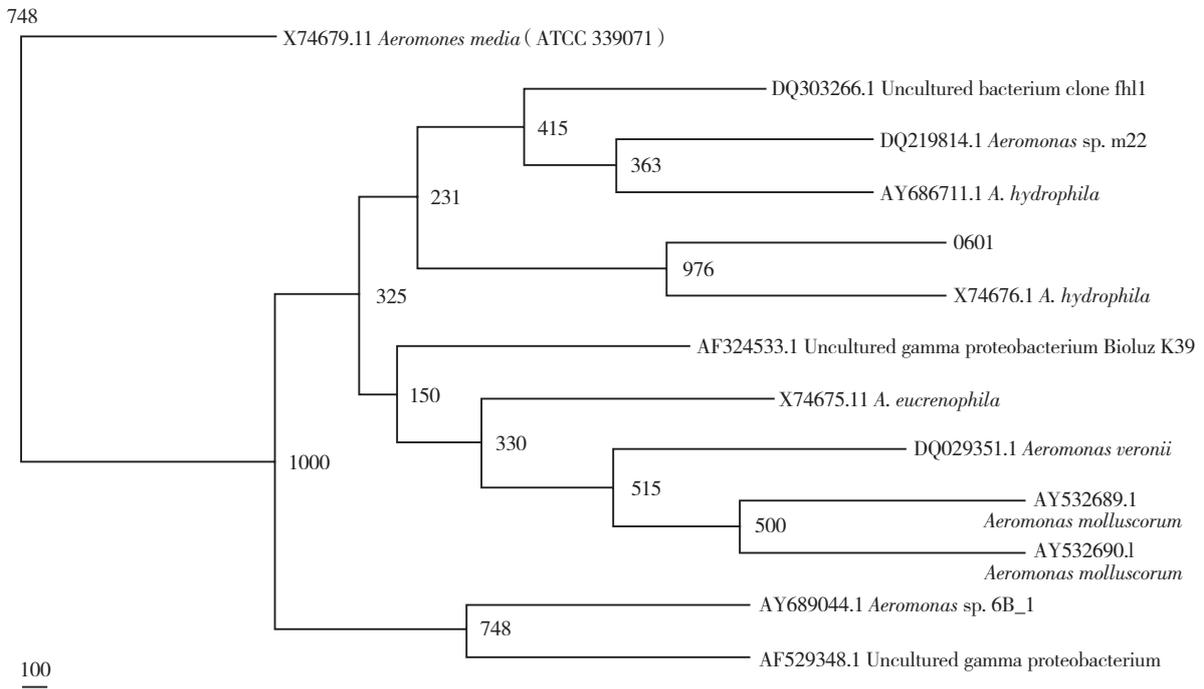


图3 根据 0601 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树
分支上的数字是 1 000 次重复检测的 bootstrap 值 .

Fig. 3 Phylogensis of bacterium 0601 based on 16S rRNA gene sequence
The figure on the branch is the bootstrap value.

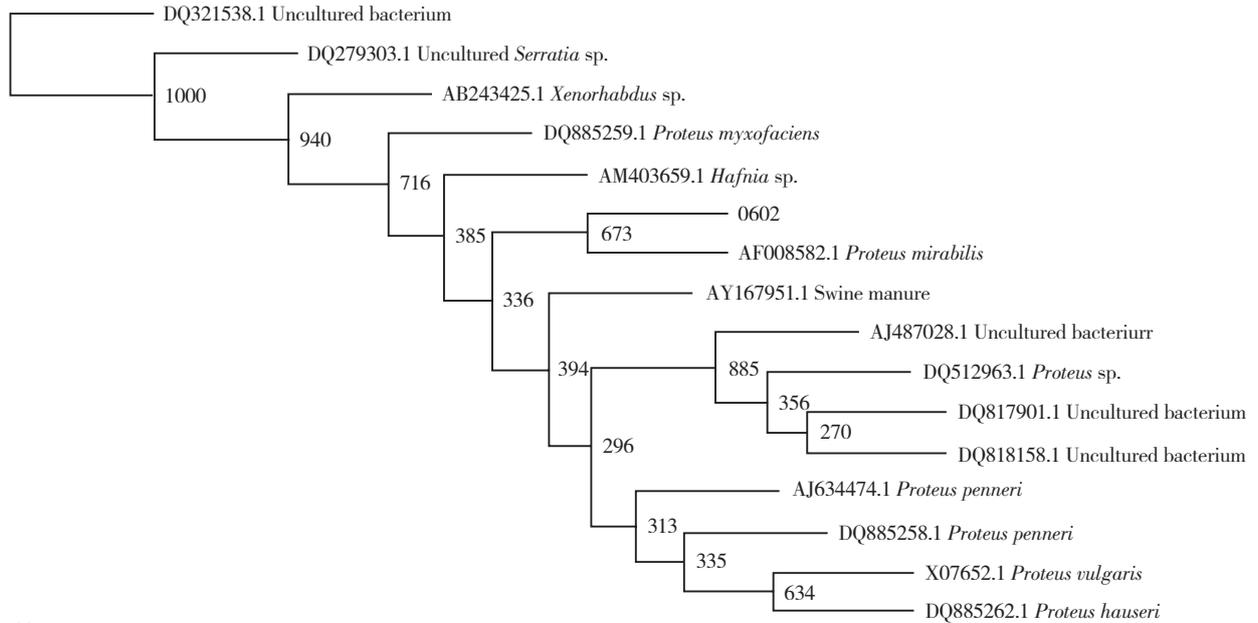


图4 根据 0602 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树
分支上的数字是 1 000 次重复检测的 bootstrap 值 .

Fig. 4 Phylogensis of bacterium 0602 based on 16S rRNA gene sequence
The figure on the branch is the bootstrap value.

氏染色镜检,结果均发现有大量在形态特征上表现与所用感染菌相一致的细菌。分离到菌株 0608,取培养的纯菌落,分别做 0602 菌株一致的一些理化特性指标,结果其菌落特征、初步的生理生化反应与自然发病的水蛭中分离到的菌株 0602 一致。重复感染结果与 0602 菌株完全一致,发病死亡率为 80%。

2.4 药物敏感实验

药敏实验结果见表 3,参照文献 [12] 的判定标准,在所测定的 17 种药物中,病原菌 0601 对氨曲南、庆大霉素、新霉素、氧氟沙星、环丙沙星、氯霉素敏感。病原菌 0602 对庆大霉素、氨曲南、链霉素、新霉素、卡那霉素、妥布霉素、环丙沙星敏感。

表 3 菌株 0601 和 0602 的抗生素敏感实验结果
Tab. 3 Antibiotic sensitivity test for bacterium 0601 and 0602

抗菌药物 Antibiotic	剂量 / ($\mu\text{g} \cdot \text{disc}^{-1}$) Dosage	菌株 0601 Strain0601		菌株 0602 Strain 0602	
		抑菌圈直径 /mm Diameter of inhibitory ring	敏感性 Sensitivity	抑菌圈直径 /mm Diameter of inhibitory ring	敏感性 Sensitivity
青霉素 G Penicillin G	10	0	-	0	-
氨曲南 Aztreonam	30	35	++	37	++
链霉素 Streptomycin	10	10	+	17	++
庆大霉素 Gentamicin	10	19	++	17	++
新霉素 Neomycin	30	22	++	21	++
卡那霉素 Kanamycin	30	8	-	20	++
妥布霉素 Tobramycin	10	11	+	19	++
杆菌肽 Bacitracin	0.04	0	-	11	+
多粘菌素 B Polymyxin B	30	14	+	10	+
万古霉素 Vancomycin	30	12	+	0	-
红霉素 Erythromycin	15	15	+	0	-
氧氟沙星 Ofloxacin	5	24	++	9	-
环丙沙星 Ciprofloxacin	5	21	++	18	++
复方新诺明 SMZ/TMP Cotrimoxazole	23.75/1.25	20	++	0	-
四环素 Tetracycline	30	10	+	0	-
氯霉素 Chloromycetin	30	27	++	13	+
利福平 Rifampicin	5	12	+	11	+
新生霉素 Albamyacin	5	10	+	14	+

注:“++”表示敏感;“+”表示中度敏感;“-”表示不敏感。

Note:“++” means high level of sensitivity;“+” means middle level of sensitivity;“-” means no sensitivity.

2.5 组织病理分析

2.5.1 唾液腺 正常的唾液腺由唾液腺细胞组成,成束地埋在咽部发达的肌肉内,细胞完整,细胞间界限清晰(图版I-2,4)。病蛭的唾液腺细胞混乱地排列在咽部肌肉内,有的部分出现断裂,咽部无清晰可见的肌肉束,唾液腺细胞溶解(图版I-1,3)。

2.5.2 皮肤组织 正常的皮肤,表皮角质层完整,表皮细胞排列整齐(图版I-6),表皮内黏液细胞等结构正常,胞间界限清晰,胞核核质均匀分布,胞质无明显的变性情况(图版I-8)。病蛭皮肤的切片观察,发现表皮角质层脱落,表皮纤维上有大量黑色素沉着(图版I-5),表皮细胞排列疏松,不整齐,黏液腺细胞数量增多,胞浆内分泌泡扩大,胞质减少(图版I-7)。

2.5.3 肌肉组织 正常菲牛蛭横切面的组织切片中可清晰的看到环肌、斜肌、纵肌整齐的排列,肌肉组织肌纤维排列整齐、紧凑,肌细胞形态正常(图版I-10)。病蛭肌肉组织显得疏松,肌纤维疏松、肿胀,严重的肌纤维断裂、溶解,肌肉中的血体腔充血(图版I-9)。

2.5.4 血体腔和葡萄组织 健康菲牛蛭的血体腔分支正常,形态完整,内壁细胞清晰整齐(图版I-12、15)。病蛭的血体腔分支充血,内壁细胞肿大(图版I-11、16)。健康菲牛蛭的葡萄组织细胞完整、界限清晰(图版I-13),而病蛭的葡萄组织细胞裂解,模糊不清(图版I-14)。

2.6 中药制剂对病蛭的治疗效果

4种中草药对病蛭的治疗结果如表4所示。不同浓度板蓝根药液对病蛭治愈率影响显著($P<0.05$), $4\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $8\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下最高,分别为 $(96.67\pm 3.34)\%$ 和 $(94.44\pm 5.09)\%$,显著高于其他浓度处理组($P<0.05$);病蛭死亡率在各浓度板蓝根处理组间差异不显著($P>0.05$),均显著($P<0.05$)低于对照组的 $(77.78\pm 6.94)\%$ 。病蛭治愈率在陈皮不同浓度处理组间差异显著($P<0.05$),其中 $16\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $32\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组最高,分别为 $(80.00\pm 0.00)\%$ 和 $(74.45\pm 3.85)\%$,显著高于其他

浓度处理组($P<0.05$);死亡率在陈皮各处理组间差异不显著($P>0.05$),均显著($P<0.05$)低于对照组的 $(83.33\pm 12.02)\%$ 。穿心莲各浓度处理组间治愈率差异不显著($P>0.05$),最高治愈率在 $2\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下,仅为 $(7.78\pm 1.92)\%$;穿心莲各处理组间死亡率差异显著($P<0.05$),最高死亡率在 $32\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下,为 $(88.89\pm 10.18)\%$,高于对照组的 $(76.67\pm 6.67)\%$ 。三黄药液各处理组间治愈率差异显著($P<0.05$),其中 $4\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 组治愈率最高,为 $(40.00\pm 0.00)\%$,显著高于其他处理组($P<0.05$);病蛭死亡率在各浓度三黄处理组间差异不显著($P>0.05$),均显著($P<0.05$)低于对照组的 $(73.33\pm 5.77)\%$ 。

3 讨论

3.1 病原菌毒力及致病性

嗜水气单胞菌致病范围十分广泛,各种淡水鱼均可感染,表现为皮肤溃疡和患败血症急性死亡。在水温较高的季节,人工高密度养殖条件下嗜水气单胞菌引起的温水鱼发病情况尤为突出^[14]。研究发现,异育银鲫腹水病病原体为嗜水气单胞菌,它也可引起翘嘴鳊败血症、锦鲤溃疡症、牛蛙腹水病、鳖穿孔病和日本鳗鲡赤鳍病^[15]。关于水蛭病害方面的研究,仅有学者报道过嗜水气单胞菌引起的宽体金线蛭疾病^[2]。奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)营腐生生活,广泛分布于自然界,常见于污水、土壤与堆肥中,特别是腐烂动物的肌肉内,为条件致病菌,多为继发感染,如创伤感染、膀胱炎、婴儿腹泻、食物中毒等,偶尔可致人和畜禽腹泻。近年来,不断有各种禽类、鹿、熊猫、水貂、鹌鹑等多种动物感染奇异变形杆菌病的报道^[16]。奇异变形杆菌引起水生动物的疾病仅有国内学者报道的大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)溃烂症^[17]。目前国内外尚无该菌引起水蛭疾病的文献报道。本研究从发病菲牛蛭中检出这2种菌,并经以分离菌株作对健康蛭的感染实验证明了其原发病原学意义,进一步表明了该菌在水产养殖中的致病作用。

嗜水气单胞菌的致病性与其内在因素密切相关^[18],

表 4 4 种中草药制剂对病蛭浸浴治愈率
 Tab. 4 Comparison of curing rate among 4 types of Chinese traditional drugs on ill leeches

药物种类 Herb medicine	指标 Index	药液体积分数 / (mL · L ⁻¹) Concentration					% ; n=3 ; $\bar{x} \pm SD$
		0 (对照) 0 (Control)	2	4	8	16	
板蓝根 <i>Radix Isatidis</i>	死亡率 Mortality	77.777 ± 6.938 ^a	11.110 ± 1.923 ^b	2.220 ± 1.923 ^b	0.000 ± 0.000 ^b	10.000 ± 8.819 ^b	7.777 ± 6.938 ^b
	治愈率 Curative	0.000 ± 0.000 ^a	64.446 ± 15.752 ^b	96.667 ± 3.335 ^c	94.443 ± 5.092 ^c	62.223 ± 10.716 ^b	57.777 ± 6.938 ^b
陈皮 <i>Cortex fraxini</i>	死亡率 Mortality	83.333 ± 12.018 ^a	5.557 ± 1.928 ^b	6.667 ± 3.335 ^b	6.667 ± 3.335 ^b	16.667 ± 11.548 ^b	22.220 ± 15.378 ^b
	治愈率 Curative	0.000 ± 0.000 ^a	55.553 ± 3.851 ^b	65.557 ± 5.092 ^c	63.333 ± 5.774 ^c	80.000 ± 0.000 ^d	74.447 ± 3.851 ^d
穿心莲 <i>Herba andrographitis</i>	死亡率 Mortality	76.667 ± 6.665 ^{ab}	45.557 ± 15.031 ^{bc}	42.220 ± 28.348 ^c	55.557 ± 13.879 ^{bc}	52.220 ± 21.686 ^{bc}	88.890 ± 10.183 ^a
	治愈率 Curative	0.000 ± 0.000 ^a	7.780 ± 1.923 ^c	6.667 ± 3.335 ^{bc}	4.443 ± 1.928 ^b	0.000 ± 0.000 ^a	0.000 ± 0.000 ^a
三黄 <i>Rhizoma coptidis</i> + <i>Radix et rhizoma rhei</i> + <i>Phellodendron anarense</i>	死亡率 Mortality	73.333 ± 5.774 ^a	12.223 ± 3.851 ^c	13.335 ± 1.852 ^c	18.890 ± 1.923 ^{bc}	20.000 ± 3.330 ^{bc}	30.000 ± 4.532 ^b
	治愈率 Curative	0.000 ± 0.000 ^a	28.890 ± 10.183 ^{cd}	40.000 ± 0.000 ^d	21.113 ± 9.624 ^{bc}	21.113 ± 5.092 ^{bc}	12.223 ± 3.851 ^b

注: 同一行具不同上标的字母表示差异显著 ($P < 0.05$).

Note: The different superscripts in the same row show significant difference ($P < 0.05$).

嗜水气单胞菌的外毒素是致病的主要因素,其致病因子包括溶血毒素、细胞毒素和肠毒素^[19]。从本研究中菲牛蛭的组织病理变化结果来看,该菌引起血体腔的广泛充血和出血,这可能与其强毒力的溶血毒素有关。肌纤维溶解、空泡变性等病理变化表明病原菌的细胞毒素对菲牛蛭的组织细胞有较强的毒力,能导致细胞器的崩解、死亡。因此,可以断定菲牛蛭疾病的发生与致病性嗜水气单胞菌的外毒素有关。

奇异变形杆菌无荚膜,具有许多细密的菌毛,而菌毛与细菌的致病性有密切关系,故推测该菌的侵袭力主要与菌毛有关(关于该菌产生的侵袭性酶未见文献报道)^[16]。另据文献报道,该菌既具内毒素又产外毒素,产生的外毒素种类包括细胞毒素和肠毒素^[17]。根据本研究结果可推断出该菌引发疾病的过程:首先奇异变形杆菌凭借发达的菌毛黏附于菲牛蛭皮肤损伤处的上皮细胞表面,大量生长繁殖并侵入表皮下各组织细胞,随后迅速侵入血液系统,随血液循环扩散至全身,在细胞内释放出各种毒素,使细胞破裂或溶解。但对于此过程中起主要作用的是内毒素还是外毒素,毒素使细胞破裂或溶解的具体机理等一系列问题还有待进一步研究。

3.2 病因分析

大量研究结果表明,养殖鱼类细菌性疾病大多由条件致病菌引起,即只有在养殖密度过高、管理措施不当、养殖水体的水质恶化、鱼体受伤、免疫力下降等情况下,因条件致病菌在水中大量繁殖,容易侵入抵抗力较低鱼体内才引起发病^[26]。本研究中,作为菲牛蛭致病菌的嗜水气单胞菌和奇异变形杆菌普遍存在于自然界,特别是在水质较差的水环境中。有文献报道,欧洲医蛭(*Hirudo medicinalis*)体腔内共生有多种嗜水气单胞菌^[20],在一定的条件下可引起水蛭发病。本研究所在的菲牛蛭养殖基地饲养密度过高,大量的代谢废物使水质恶化,氨氮、亚硝酸盐等严重超标,从而致使这2种条件致病菌大量繁殖,成为优势菌群而导致发病。实验中观察发现大部分养殖池存在菲牛蛭扎堆现象,蛭体相互碰撞、挤压而受损伤,并且养殖中的器具也容易使菲牛蛭身

体刮伤,同时投喂饵料过于单一,菲牛蛭缺乏全面的营养,抵抗力下降,这些均是导致菲牛蛭疾病大规模发生的潜在因素。综上所述,一方面由于养殖环境恶化,病原菌大量繁殖生长;另一方面蛭体表受伤或营养不足,导致自身免疫力下降,最终造成菲牛蛭细菌性疾病的暴发。可见,本次菲牛蛭细菌性疾病的诱发是多因子的综合作用,包括环境因子(非生物因子)和病原因子(细菌等生物因子)。

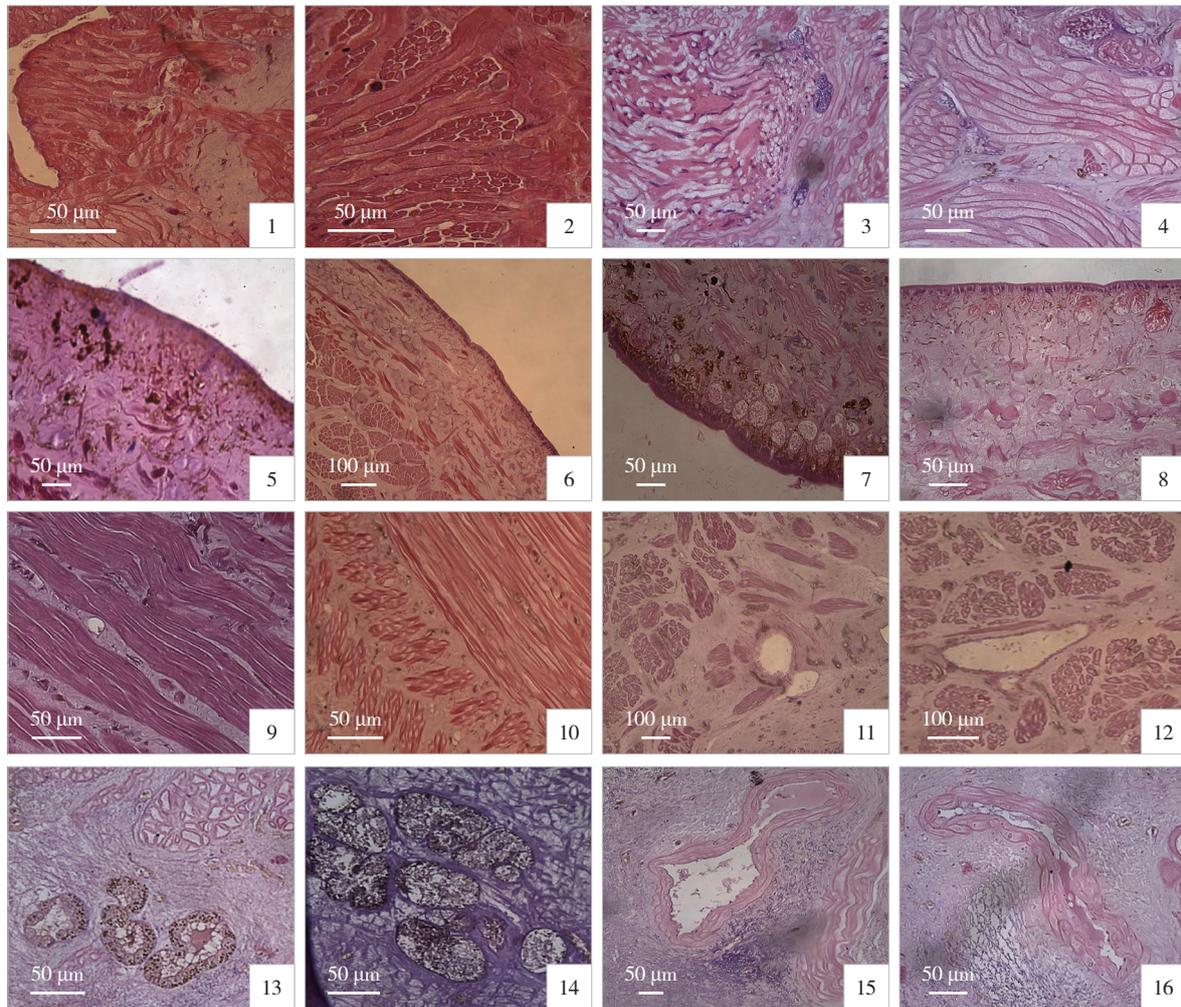
3.3 药物治疗

开发有保健和抗菌作用的中草药制剂是水产养殖过程中防病治病的重要措施。近几年来一直为众多的科研工作者和养殖者所重视。本研究中采用三黄(黄连、大黄、黄柏质量比为4:3:6)、板蓝根、穿心莲、陈皮4种中草药制剂对患病菲牛蛭进行治疗。结果表明板蓝根的治疗效果最佳,陈皮的治疗效果较好,三黄有一定治疗效果,而穿心莲无治疗效果,且对菲牛蛭有一定的毒害作用。陆彤霞^[21]和张海滨等^[24]曾报道,黄连、大黄和板蓝根等单独或复方配伍使用,防治鱼虾类育苗阶段的疾病效果很好。郭建坤等^[22]用大黄、黄柏、黄连和板蓝根等共研成粉末后配成药饵,治疗网箱养殖的虹鳟链球菌病,疗效很好。许美美等^[23]实验证实,黄柏、大黄和黄连对中国对虾“红腿病”的病原弧菌高度敏感,而穿心莲中度敏感。研究表明,板蓝根、陈皮和车前草等配伍,对鳗鲡弧菌病的防治有很好效果^[24]。本研究中三黄药液对病蛭具有一定的治疗效果,但疗效并没有其在鱼虾疾病中理想,可能是研究对象本身的免疫系统差异所致,具体原因有待探讨。本研究中板蓝根药液对病蛭治疗效果最佳。大量研究表明板蓝根具有抗内毒素作用^[25],本研究的治疗效果是否是其抗内毒素作用的直接体现,有待进一步探讨。陈皮药液对病蛭的治疗效果较好,与相关研究结果吻合,而穿心莲对病蛭无治疗效果,且具有明显毒性,可见菲牛蛭对穿心莲相当敏感,由于中草药的成分及机理一直没有十分明晰,因此在实际应用中建议采用多种药物的复合制剂进行治疗^[26]。

致谢: 本实验得到了广州市安圣药源生物开发有限公司吴川和龚元的大力帮助, 在此一并表示感谢。

参考文献:

- [1] 刘岱岳, 余传隆, 刘鹤华. 生物毒素开发与利用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 337-364.
- [2] 张晓君, 房海, 陈翠珍, 等. 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.
- [3] Hamilton P B, Stevens J R, Gidley J, et al. A new lineage of trypanosomes from Australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (Haemadipsidae) [J]. Intern J Parasitol, 2005, 35: 431-443.
- [4] Gouda H A. The effect of peritrich ciliates on some freshwater leeches from Assiut, Egypt [J]. J Invertebr Pathol, 2006, 93: 143-149.
- [5] Tonkopii V D, Zagrebina A O, Guneren E, et al. Aquatic animals as an alternative bio-objects in toxicology [J]. Poster Session 4F. Environmental, 1994, 4: 240.
- [6] Singhal R N, Davies R W. Effects of an Organophosphorus Insecticide (Temephos) on Gametogenesis in the leech *Hirudinaria manillensis* (Hirudinidae) [J]. J Invertebr Pathol, 1996, 67: 100-101.
- [7] 贺顺连. 灭虫灵、杀虫威、菌毒威对宽体金线蛭的急性毒性作用 [J]. 北京水产, 2001 (4): 40-41.
- [8] 覃国森, 周维官, 周维海, 等. 3种常用药物对菲牛蛭的急性毒性试验 [J]. 水利渔业, 2007, 27 (5): 99-101.
- [9] 陈绍铭, 郑福寿. 水生微生物实验法 [M]. 北京: 海洋出版社, 1985.
- [10] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, et al. Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th ed [M]. Baltimore: Williams & Wilkins, A Waverly Company, 1994.
- [11] 叶应抚, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程 [M]. 广州: 东南大学出版社, 1997: 553-562.
- [12] 张晓君, 房海, 陈翠珍, 等. 牙鲆病原迟钝爱德华氏菌的药物敏感性测定与分析 [J]. 水产科学, 2005, 24 (6): 15-18.
- [13] 谭恩光. 海南山蛭机能组织学研究 [J]. 中山大学学报, 2005, (4): 86-90.
- [14] 储卫华, 陆承平. PCR 扩增特异性 16S rDNA 和溶血素基因检测致病性嗜水气单胞菌 [J]. 水产学报, 2005, 29 (1): 79-82.
- [15] 孙其焕, 孙佩芳, 金丽华, 等. 异育银鲫溶血性腹水病原的研究 [J]. 水产学报, 1991, 15 (2): 130-139.
- [16] 虞德屏, 阳艳, 朱梦代, 等. 肉鸡奇异变形杆菌病的诊断与治疗 [J]. 中国家禽, 2005, 27 (10): 23.
- [17] 张庆华, 熊清明, 肖琳琳, 等. 大黄鱼溃烂症的一种致病菌—奇异变形杆菌 ZX502 菌株 [J]. 水产学报, 2005, 29 (6): 824-830.
- [18] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述 [J]. 水产学报, 1992, 16 (3): 282-288.
- [19] 邱德全, 何建国, 钟英长, 等. 嗜水气单胞菌的致病性和免疫性研究 [J]. 中山大学学报论丛, 1997 (Suppl): 98-108.
- [20] Eroglu C, Hokelek M, Guneren E, et al. Bacterial flora of *Hirudo medicinalis* and their antibiotic sensitivities in the Middle Black Sea Region Turkey [J]. Annals of Plastic Surgery, 2001, 47 (1): 70-73.
- [21] 陆彤霞. 中草药在水产育苗疾病防治中的应用 [J]. 科学养鱼, 2003 (1): 47.
- [22] 郭建坤, 杨雪珍, 景建江, 等. 中药治疗虹鳟鱼链球菌病报告 [J]. 淡水渔业, 1999, 29 (12): 27.
- [23] 许美美, 郭平. 药物对中国对虾“红腿病”病原菌的抑制作用 [J]. 水产科学, 1993, 12 (1): 11-15.
- [24] 张海宾, 杨桂芳. 12种中草药对嗜水气单胞菌杀伤能力的研究 [J]. 水产科学, 2006, 2 (1): 16-18.
- [25] 刘云海, 刘军民, 申正义, 等. 显色基质法检测板蓝根氯仿提取物的抗内毒素作用 [J]. 同济医科大学学报, 1995, 24 (1): 69.
- [26] 王海华. 中草药防治水产动物疾病及药理学研究进展 [J]. 中兽医杂志, 2004, 4: 37-41.



图版 I

1. 唾液腺混乱地排列在咽部肌肉内,部分出现断裂, HE; 2. 唾液腺成束的埋在咽部发达的肌肉内,细胞完整,胞间界限清晰, HE; 3. 唾液腺细胞溶解, HE; 4. 正常的唾液腺细胞, HE; 5. 表皮角质层脱落,表皮纤维上有大量的黑色素沉着, HE; 6. 表皮层基本完整,无脱落,环肌、斜肌、纵肌排列规则, HE; 7. 黏液腺细胞数量增多,胞浆内分泌泡扩大,胞质减少, HE; 8. 表皮内黏液细胞等结构正常,胞间界限清晰, HE; 9. 肌纤维断裂、溶解, HE; 10. 肌纤维排列整齐、紧凑,肌细胞形态正常, HE; 11. 血体腔分支充血, HE; 12. 血体腔分支正常, HE; 13. 葡萄组织细胞完整、界限清晰, HE; 14. 葡萄组织细胞裂解, HE; 15. 血体腔形态完整,内壁细胞完整, HE; 16. 血体腔内壁细胞肿大, HE.

Explanation of Plate I

1. Saliva gland formed confusedly in muscle of pharynx, and occurred rupture partly, H.E.; 2. Saliva gland was buried in powerful muscles of pharynx, cell integrity, and profile between cells distinctly, H.E.; 3. Cells of saliva gland lyse, H.E.; 4. Healthy cells of saliva gland, H.E.; 5. Epidermis hominess fall off, and plentiful melanin pigmentation in epidermis fibre, H.E.; 6. Surface cortex was basic integrity and no fall, loop muscle, inclined muscle and vertical muscle arranged regularly, H.E.; 7. Cells of mucous gland increased, incretion vesicle enlarged in cell plasm, cytoplasm decreased, H.E.; 8. Cells of mucous gland were common in cuticle, profile between cells distinctly, H.E.; 9. Muscle fibre ruptured and lysed, H.E.; 10. Muscle fibre arranged orderliness and tightness, shape of muscle cells was common, H.E.; 11. Embranchs of blood coelom were congested, H.E.; 12. Embranchs of blood coelom were natural, H.E.; 13. Grape histiocyte was integrity and finitude was clear, H.E.; 14. Grape histiocyte lysed, H.E.; 15. Shape of blood coelom was integrity, and wall cells were intact, H.E.; 16. Wall cells of blood coelom swelled, H.E..

Examination of bacterial pathogens isolated from the leech, *Hirudinaria manillensis* Lesson, 1842 and medication therapy

ZHANG Bin^{1,2}, LI Hao-hua², LIN Qiang³, WANG Bo⁴, LIANG Wan-wen¹, LU Jun-yi²

(1. Institute of Guangxi fisheries, Nanning 530021, China; 2. School of Life Sciences Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China; 3. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China; 4. Beijing Normal University, Zhuhai Campus, Zhuhai 519085, China)

Abstract: This study aimed to investigate bacterial pathogen of leech, *Hirudinaria manillensis* (L.) including the condition of episode, clinical symptoms, morphological feature of bacteria, physiological and biochemical characteristics and drug sensitive test. The experimental materials were selected from the leech farmed in Guangzhou Ansheng Pharmic Biology Development Co. Ltd. In addition, histopathological analysis was conducted, and the molecular identification was employed to study representative strains. Finally, four kind Chinese herb drugs treatment trial was designed to screen an effective and safe control method. The results showed that the disease was infected by *Aeromonas hydrophila* and/or *Protues mirabilis*, which showed high repeatability with artificial infection and reinfection, high pathogenicity and could lead to 80% of mortality. The two pathogens were sensitive to neomycin, gentamicin, ciprofloxacin and aztreonam, and the Radix Isatidis and Cortex Fraxini were the most effective medications, which could achieve 80 % of curative ratio. The result of histopathological analysis showed that the histological changes occurred mainly in skin, muscle and salivary gland of ill leech, which epidermal stratum corneum of skin ulcerated and fell off, muscle became ulcerated and rotted, muscle fibers were ruptured and lytic necrosis, and salivary glands ranged confusedly and appeared rupture partly. All of above indicated that the two kind pathogens had high virulence. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16 (6): 878–890]

Key words: *Hirudinaria manillensis*; *Protues mirabilis*; *Aeromonas hydrophila*; 16S rRNA; histological

Corresponding author: LU Jun-yi. E-mail: lvjunyi@mail.sysu.edu.cn