

鲟源致病性豚鼠气单胞菌的分离及其生长特性

曹海鹏^① 杨先乐^{①*} 王玉洁^② 李圆圆^①

(^①农业部渔业动植物病原库 上海水产大学 上海 200090;

^②中国热带农业科学院环境与植物保护所 海南 儋州 571737)

摘要: 从患细菌性败血综合征的杂交鲟 (*Huso huso* ♀ × *Acipenser ruthenus* ♂) 肝和达氏鳇 (*H. dauricus*) 腹水中共分离出4株优势菌,经人工回归感染实验测定了其致病性,并通过ATB细菌鉴定仪对致病菌株进行了鉴定,此外,研究了致病菌株的生长特性。实验结果表明,菌株XL₂-T对杂交鲟和达氏鳇具有致病性。经鉴定,菌株XL₂-T为豚鼠气单胞菌(*Aeromonas punctata caviae*);其在无菌营养肉汤中摇床振荡培养时的生长曲线0~1.5 h为生长延迟期,1.5~28 h为对数生长期,28~32 h为稳定期,32 h以后为衰亡期;其最适生长温度为25~30℃,最适生长pH为7,在NaCl含量范围0~10%、沙拉沙星浓度范围0~40 μg/ml下均能够生长,但NaCl、沙拉沙星对其生长具有较大的抑制作用。

关键词: 杂交鲟;达氏鳇;细菌性败血综合征;豚鼠气单胞菌;生长特性

中图分类号:Q93-337 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2007)06-01-06

Isolation and Growth Characteristics of Pathogenic *Aeromonas punctata caviae* from Sturgeons

CAO Hai-Peng^① YANG Xian-Le^{①*} WANG Yu-Jie^② LI Yuan-Yuan^①

(^① Aquatic Pathogen Collection Center of Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090;

^② Environment and Plant Protection Institute, CATAS, Danzhou Hainan 571737, China)

Abstract Four strains of domain bacteria were isolated from the liver of Hybrid Sturgeons, *Huso huso* (♀) × *Acipenser ruthenus* (♂) and ascites of Kaluga Sturgeons, *H. dauricus*. Their pathogenicity was determined by artificial infection test. The pathogenic strain was identified by ATB bacteria identification instrument, and its growth characteristics was also studied. The results indicated that strain XL₂-T was pathogenic to Hybrid Sturgeons and Kaluga Sturgeons, and was identified as *Aeromonas punctata caviae*. Its growth curve in the sterile liquid culture medium was as follows: lag phase 0–1.5 h, log phase 1.5–28 h, stationary phase 28–32 h, and decline phase after 32 h. Its best growth conditions were 25–30 °C and pH 7, and it could grow in culture medium with 0–10% NaCl and 0–40 μg/ml sarafloxacin, but NaCl and sarafloxacin had some inhibitory effects on its growth.

Key words: *Huso huso* (♀) × *Acipenser ruthenus* (♂); *H. dauricus*; Bacterial septicaemia syndrome; *Aeromonas punctata caviae*; Growth characteristics

基金项目 国家科技支撑计划资助项目(N0.006BAD03B0506),上海市重点学科建设资助项目(Y1101),上海市教育委员会E-研究院建设资助项目(E03009);

* 通讯作者, E-mail: xlyang@shfu.edu.cn;

第一作者介绍 曹海鹏,男,助教,主要从事水产动物病害防治研究与微生态制剂研发, E-mail: caohai peng19810818@yahoo.com.cn。

收稿日期:2007-05-15, 修回日期:2007-09-19

鲟鱼是地球上最古老的鱼种之一,素有“活化石”之称,其肉味鲜美,营养丰富,具有较高的经济价值。我国湖北宜昌、仙桃、大连瓦房店、北京小汤山等地先后建立了鲟鱼繁育基地。近年来黑龙江、北京、大连、湖北、广东等许多省市成功地开展了鲟鱼的人工养殖^[1]。然而,由于集约化程度过高,日常管理不严密等诸多原因,疾病发生逐渐增加,给鲟鱼养殖业造成了巨大的经济损失。豚鼠气单胞菌(*Aeromonas punctata caiae*)是危害我国淡水养殖业的重要致病菌,可引起水产养殖动物的多种疾病,如鲤鱼(*Cyprinus carpio*)出血病^[2]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)皮肤溃烂病^[3]、欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)败血症^[4]等,但从现有资料来看,其引起鲟鱼疾病的报道较少见到。2005年12月,云南省华宁县鲟鱼养殖场暴发了细菌性败血综合征,其特点是发病快、死亡率高,主要危害杂交鲟(欧洲鳗(*Huso huso*)(♀)×小体鲟(*Acipenser ruthenus*)(♂))和达氏鳇(*H. dauricus*)的幼鱼与成鱼。本实验从自然发病的鲟鱼体内分离到一株致病性菌株,经鉴定为豚鼠气单胞菌,并对其在不同因素(温度、pH、盐度、抗菌药)条件下的生长特性进行了研究,以期丰富豚鼠气单胞菌的生物学特性,并为豚鼠气单胞菌疫苗的制备提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 病鱼来源 患病杂交鲟和达氏鳇于2006年4月采自云南省华宁县鲟鱼养殖场,体长40~60 cm,体重400~500 g。

1.2 致病菌的分离与鉴定

1.2.1 致病菌分离 选取具有典型自然发病症状的濒死杂交鲟和达氏鳇,用75%酒精表面消毒后常规无菌操作取其肝、肾、性腺等少许病灶组织及腹水。分别于TCBS和普通营养琼脂平板上划线分离,25℃恒温培养18~24 h后纯化细菌,然后转接到斜面培养基上,于4℃冰箱保存备用。

1.2.2 致病菌的人工回归感染实验 选取健康的杂交鲟和达氏鳇(体长约20~30 cm,体

约300~400 g),进行人工回归感染实验。用无菌生理盐水分别洗下培养基斜面上各分离菌株的菌苔,用麦氏比浊法测定并调节菌悬液浓度为 6.0×10^7 cells/ml。然后分别为杂交鲟、达氏鳇进行胸鳍基部注射,每尾注射0.8 ml菌悬液,对照组注射相同剂量的无菌生理盐水。连续14 d观察鱼的症状及死亡情况,发现死鱼及时捞出,解剖检查其内脏器官的病变情况,同时对回归感染发病濒死的杂交鲟、达氏鳇内脏组织进行常规细菌再分离。每组实验鱼(杂交鲟和达氏鳇)各10尾,水温为18~22℃。

1.2.3 致病菌的鉴定 将原致病菌株接种于普通营养琼脂平板,25℃培养18~24 h后挑取单菌落混于生理盐水中,用API/ATB光电比浊仪测量并配成0.5 ml/L cFarland的菌悬液,用ATB细菌鉴定仪进行鉴定。

1.3 致病菌生长特性的测定

1.3.1 致病菌液体菌种的制备 把致病菌株接种到斜面培养基上,30℃培养18 h后,接种到无菌营养肉汤中,在30℃、180 r/min条件下振荡培养18 h后即成为液体菌种。

1.3.2 致病菌生长曲线的测定^[5] 将液体菌种1 ml接种到100 ml无菌营养肉汤中,在30℃、180 r/min条件下振荡培养,分别在0、0.5、1.5、4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48 h取样,测定致病菌株的OD₅₆₀值。以培养时间为横坐标,OD₅₆₀值为纵坐标,绘制致病菌株的生长曲线。

1.3.3 温度对致病菌生长的影响^[5] 取液体菌种1 ml接种到100 ml无菌营养肉汤中,分别于15、25、30、35、40℃条件下培养,转速为180 r/min。28 h后取样测定各温度下致病菌株的OD₅₆₀值。以培养温度为横坐标,OD₅₆₀值为纵坐标绘制曲线^[5]。

1.3.4 pH对致病菌生长的影响^[5] 取液体菌种1 ml分别接种到pH为3、5、7、9、11的100 ml无菌营养肉汤中,30℃、180 r/min条件下振荡培养28 h后取样,测定各pH下致病菌株的OD₅₆₀值。以初始pH为横坐标,OD₅₆₀值为纵坐标绘

制曲线^[5]。

1.3.5 盐度对致病菌生长的影响^[5] 取液体菌种1 ml 分别接种到含NaCl(%)0、1、2、4、8、10的100 ml 无菌营养肉汤中,30℃、180 r/min 条件下振荡培养28 h 后取样,测定各NaCl 含量下致病菌株的OD₅₆₀ 值。以NaCl 含量(%)为横坐标、OD₅₆₀ 值为纵坐标绘制曲线^[5]。

1.3.6 抗菌药对致病菌生长的影响^[5] 取液体菌种1 ml 分别接种到含沙拉沙星0、2、5、10、20、40 μg/ml 的100 ml 无菌营养肉汤中,30℃、180 r/min 条件下振荡培养28 h 后取样,测定各沙拉沙星浓度下致病菌株的OD₅₆₀ 值。以沙拉沙星浓度(μg/ml)为横坐标、OD₅₆₀ 值为纵坐标绘

制曲线^[5]。

2 结 果

2.1 致病菌的分离与鉴定

2.1.1 致病菌的分离纯化 从自然发病的杂交鲟肝、达氏鲤腹水中分别分离纯化出2 株优势菌,分别命名为XL₂-R、XL₂-T、HF₃-R、HF₄-R。其中,菌株XL₂-T 在TCBS 平板上生长的菌落特征为:圆形、中央隆起,初为蓝色后转为黄色,菌落表面光滑湿润、边缘整齐;菌株XL₂-T、XL₂-R、HF₃-R、HF₄-R 在普通营养琼脂平板上生长的菌落特征均为:圆形、中央隆起、淡黄色、菌落表面光滑湿润、边缘整齐(图1)。

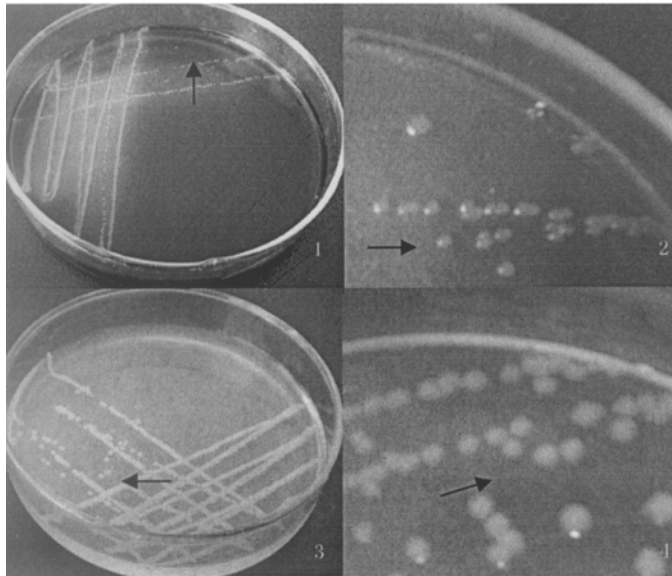


图1 分离菌株的菌落

Fig. 1 Colony of the isolated bacteria

1. 菌株XL₂-T 在TCBS 平板上形成的菌落照片;2. 菌株XL₂-T 在TCBS 平板上形成菌落的放大照片;3. 菌株XL₂-T 在普通营养琼脂平板上形成的菌落照片;4. 菌株XL₂-T 在普通营养琼脂平板上形成菌落的放大照片。

1. The colony of strain XL₂-T on TCBS plate ;2. The magnified colony of strain XL₂-T on TCBS plate ;3. The colony of strain XL₂-T on nutrient agar plate ;4. The magnified colony of strain XL₂-T on nutrient agar plate .

2.1.2 细菌人工回归感染实验 实验结果(表1)表明,菌株XL₂-T 对杂交鲟和达氏鲤具有致病作用,实验鱼发病和死亡症状与自然病症基本相同。经菌株XL₂-T 人工感染的鱼也呈现体表溃烂、腹腔积有大量腹水、生殖腺有出血点、

肠道内有黄色黏液等症状,而且从人工感染的病鱼的肝、肾等组织和腹腔内积水中又可分离到与实验菌株形态特征、理化特性一致的菌株,表明菌株XL₂-T 是鲟细菌性败血综合征的致病菌。

表1 分离菌株人工回归感染实验结果

Table 1 Results of artificial infection test of the isolated bacteria

注射菌株 Strain	实验鱼 Test fish	尾数 Number (ind)	菌液浓度 Concentration (cells/ml)	死亡尾数 Death number (ind)							死亡率 Death rate (%)
				2 d	4 d	6 d	8 d	10 d	12 d	14 d	
XL ₂ -R	杂交鲟	10	6.0 × 10 ⁷	0	0	0	0	0	0	0	0
XL ₂ -T	<i>Huso huso</i> (♀)	10	6.0 × 10 ⁷	1	4	8	8	8	8	8	80
HF ₃ -R	× <i>Acipenser ruthenus</i> (♂)	10	6.0 × 10 ⁷	0	0	0	0	0	0	0	0
HF ₄ -R		10	6.0 × 10 ⁷	0	0	0	0	0	0	0	0
对照 Control		10	生理盐水	0	0	0	0	0	0	0	0
XL ₂ -R	达氏鳇	10	6.0 × 10 ⁷	0	0	0	0	0	0	0	0
XL ₂ -T	<i>Huso dauricus</i>	10	6.0 × 10 ⁷	1	3	5	8	8	8	8	80
HF ₃ -R		10	6.0 × 10 ⁷	0	0	0	0	0	0	0	0
HF ₄ -R		10	6.0 × 10 ⁷	0	0	0	0	0	0	0	0
对照 Control		10	生理盐水	0	0	0	0	0	0	0	0

表2 ATB 细菌鉴定仪对菌株 XL₂-T 的鉴定结果Table 2 The identification of XL₂-T strain by ATB bacteria identification instrument

测定项目 Test item	结果 Result	测定项目 Test item	结果 Result	测定项目 Test item	结果 Result
氧化酶 (OX)	+	L- 丙氨酸 (ALA)	+	L- 岩藻糖 (FUC)	/
N- 乙酰葡萄糖胺 (NAG)	+	甘露醇 (MAN)	+	D- 山梨糖 (SOR)	-
D- 核糖 (RB)	+	D- 葡萄糖 (GLU)	+	L- 阿拉伯糖 (ARA)	+
肌醇 (INO)	-	水杨素 (SAL)	+	丙酸盐 (PROP)	-
蔗糖 (SAC)	+	D- 蜜二糖 (MEL)	-	羧酸盐 (CAP)	+
麦芽糖 (MAL)	+	2- 酮葡萄糖酸盐 (2KG)	-	戊酸盐 (VALT)	/
衣康糖 (ITA)	-	3- 羟基 丁酸盐 (3OHBU)	-	柠檬酸盐 (IT)	-
辛二酸盐 (SUB)	/	4- 羟基 苯甲酸盐 (p-OBE)	-	组氨酸 (HS)	+
丙二酸盐 (MNT)	-	L- 丝氨酸 (SER)	+	5- 酮基 葡萄糖酸盐 (5KG)	-
乙酸盐 (ACE)	+	L- 脯氨酸 (PRO)	+	糖原 (GLYG)	+
DL- 乳酸盐 (LAT)	+	鼠李糖 (RHA)	-	3- 羟基 苯甲酸 (m-OBE)	-

“+”表示阳性;“-”表示阴性;“/”表示无记录。

“+” means positivity; “-” means negativity; “/” means no records.

2.1.3 致病菌的鉴定 实验结果(表2)表明,菌株 XL₂-T 为豚鼠气单胞菌。

2.2 致病菌的生长特性

2.2.1 致病菌的生长曲线 实验结果表明,0~1.5 h 为生长延迟期,1.5~28 h 为对数生长期,28~32 h 为稳定期,32 h 以后为衰亡期(图2)。

2.2.2 温度对致病菌生长的影响 实验结果(图3)表明,豚鼠气单胞菌 XL₂-T 在温度 15~40 °C 范围内均能生长,其中豚鼠气单胞菌 XL₂-T 的最适生长温度范围为 25~30 °C。在 15~30 °C 范围内,随着温度的升高,豚鼠气单胞菌

XL₂-T 培养液的 OD₅₆₀ 值逐渐增大,在 30 °C 时达到最大值;当培养温度大于 30 °C 时,豚鼠气单胞菌 XL₂-T 培养液的 OD₅₆₀ 值逐渐降低,培养温度为 40 °C 时,豚鼠气单胞菌 XL₂-T 培养液的 OD₅₆₀ 值最低,仅为 30 °C 时的 69.95%。

2.2.3 pH 对致病菌生长的影响 实验结果(图4)表明,豚鼠气单胞菌 XL₂-T 在 pH 3~11 范围内均能够生长,其中豚鼠气单胞菌 XL₂-T 的最适生长 pH 为 7。在培养基初始 pH 范围为 3~7 时,豚鼠气单胞菌 XL₂-T 培养液的 OD₅₆₀ 值随着 pH 的升高而急剧增加,当培养基初始 pH 为 7 时达到最大值 2.219;当培养基初始 pH 大

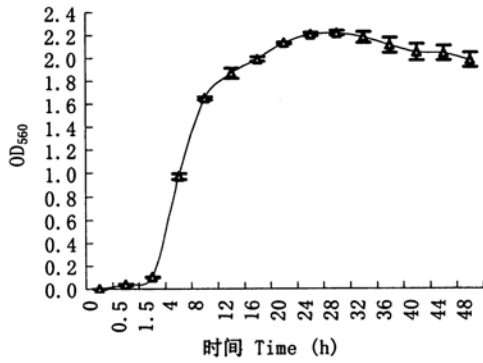


图2 豚鼠气单胞菌XL₂-T的生长曲线

Fig. 2 The growth curve of *Aeromonas punctata caviae* strain XL₂-T

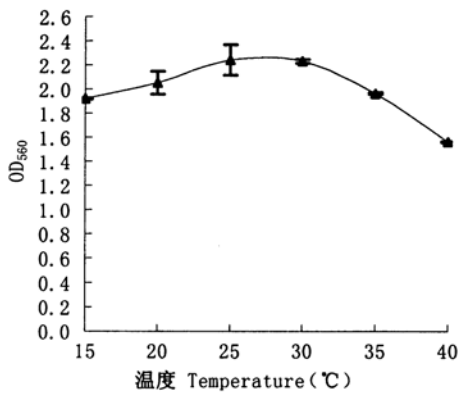


图3 温度对豚鼠气单胞菌XL₂-T生长的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the growth of *Aeromonas punctata caviae* strain XL₂-T

于7时,豚鼠气单胞菌XL₂-T培养液的OD₅₆₀值逐渐降低,在培养基初始pH为11时达到最低,仅为pH为7时的20.91%。

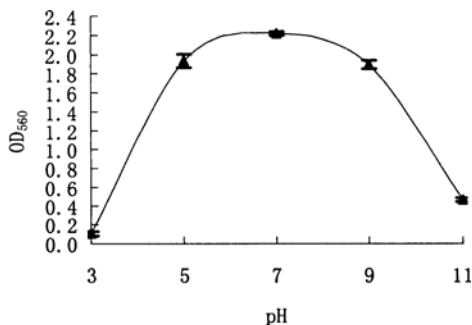


图4 pH对豚鼠气单胞菌XL₂-T生长的影响

Fig. 4 Effect of pH on the growth of *Aeromonas punctata caviae* strain XL₂-T

2.2.4 盐度对致病菌生长的影响 实验结果(图5)表明,豚鼠气单胞菌XL₂-T在NaCl含量0~10%范围内均能够生长,但随着NaCl含量的增加,其培养液的OD₅₆₀值逐渐降低。在NaCl含量范围为0~4%时,豚鼠气单胞菌XL₂-T培养液的OD₅₆₀值随着NaCl含量的增加而急剧下降,当NaCl含量为4%时,其培养液的OD₅₆₀值为0.032;而在NaCl含量范围为4%~10%时,豚鼠气单胞菌XL₂-T生长受到较大的抑制,生长速度趋于平缓。

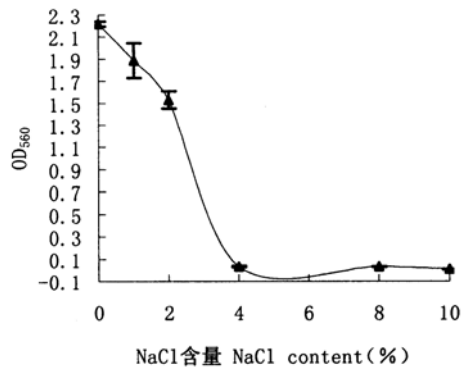


图5 盐度对豚鼠气单胞菌XL₂-T生长的影响

Fig. 5 Effect of salinity on the growth of *Aeromonas punctata caviae* strain XL₂-T

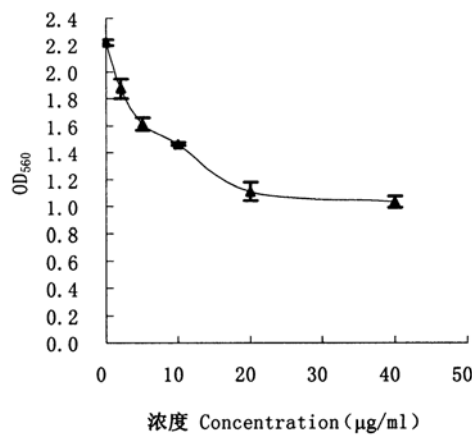


图6 沙拉沙星对豚鼠气单胞菌XL₂-T生长的影响

Fig. 6 Effect of sarafloxacin on the growth of *Aeromonas punctata caviae* strain XL₂-T

2.2.5 抗菌药对致病菌生长的影响 结果(图6)表明,豚鼠气单胞菌XL₂-T在沙拉沙星浓度0

~40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内均能够生长,但随着其浓度的增加,其培养液的 OD_{560} 值逐渐降低。当培养基中沙拉沙星浓度范围为0~20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,豚鼠气单胞菌 XL_{27}T 培养液的 OD_{560} 值随着沙拉沙星浓度的增加急剧下降;而当培养基中沙拉沙星浓度范围为20~40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,豚鼠气单胞菌 XL_{27}T 生长速度趋于平缓,沙拉沙星浓度为40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,豚鼠气单胞菌 XL_{27}T 培养液的 OD_{560} 值相当于其浓度为20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时的93.15%。

3 讨论

目前国内已有报道从患细菌性败血症的鲟鱼体内分离到嗜水气单胞菌^[6],但从患病鲟鱼体内分离到豚鼠气单胞菌的报道还未曾见到。本实验结果表明,健康的杂交鲟和达氏鳇在人工注射豚鼠气单胞菌 XL_{27}T 后,14 d 内死亡率均为80%,而且实验鱼发病症状与自然发病症状基本相同。从回归感染的病鱼体内再次分离到与原致病菌株形态特征、理化特性一致的菌株,由此证实豚鼠气单胞菌 XL_{27}T 是该病的致病菌株。

众多研究表明,豚鼠气单胞菌不同菌株的生化特性不尽相同。本实验分离的豚鼠气单胞菌 XL_{27}T 与鲫(*Carassius auratus*) 细菌性败血症致病菌——豚鼠气单胞菌 CSS-4-2 在肌醇和麦芽糖等生化特性方面不同^[7],与中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)“抖抖病”致病菌——豚鼠气单胞菌816X1 和816X2 在水杨素等生化特性方面也不同^[8],而且豚鼠气单胞菌 XL_{27}T 、CSS-4-2 816X1 和816X2 与豚鼠气单胞菌模式菌株也不完全符合^[7-9]。出现这些差异,可能是由于从不同寄主体内分离到的菌株在地区、气候、水质条件及实验室培养条件等方面的不同而产生的^[7]。

关于豚鼠气单胞菌的生长特性,安利国等^[10] 研究表明,从患竖鳞病的鲤分离到的豚鼠气单胞菌 RXY-1 的最适生长温度范围为25~

30 $^{\circ}\text{C}$,最适生长pH 范围为6~8,最适NaCl 含量范围为0.5%~1%;黄文芳等^[5] 从患细菌性败血症的鲫鱼体内分离的豚鼠气单胞菌 CSS-4-2 的最适生长温度范围为25~30 $^{\circ}\text{C}$,最适生长pH 为5~10,最适NaCl 含量范围为0~1%;本实验分离的豚鼠气单胞菌 XL_{27}T 的最适生长温度范围为25~30 $^{\circ}\text{C}$ 、最适生长pH 为7,对NaCl 极为敏感。由此可见,豚鼠气单胞菌 XL_{27}T 的最适生长温度与pH 与豚鼠气单胞菌 RXY-1 基本一致,但耐盐性与豚鼠气单胞菌 RXY-1、CSS-4-2 有所不同^[5,10],这可能与菌株差异有关。此外,本实验发现,豚鼠气单胞菌 XL_{27}T 虽然对沙拉沙星相当敏感,但其在40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 沙拉沙星浓度下依然能够生长,故沙拉沙星可以作为该病的预防药物,但作为该病的治疗药物是不太理想的。

参 考 文 献

- [1] 卢迈新,黄樟翰,肖学铮等. 主要养殖鲟鱼的生物学及其养殖前景. 大连水产学院学报, 2000, 15(4): 280~288.
- [2] 韩英,刘敏,姜艳平. 鲤鱼出血病病原的研究和药敏试验. 东北农业大学学报, 2005, 36(5): 593~597.
- [3] 丁雷,岳永生,宋憬愚. 虹鳟皮肤溃烂病的病原菌研究. 淡水渔业, 2002, 32(3): 28~30.
- [4] 樊海平,曾占壮. 由豚鼠气单胞菌引起的欧洲鳗鲡败血症. 水产学报, 1999, 23(3): 313~318.
- [5] 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. 微生物学通报, 2004, 31(1): 14~16.
- [6] 杨治国. 鲟鱼嗜水气单胞菌的分离. 淡水渔业, 2001, 31(5): 40~41.
- [7] 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. 微生物学通报, 2003, 30(5): 56~61.
- [8] 闻玉梅. 现代医学微生物学. 上海: 上海医科大学出版社, 1999: 266.
- [9] 徐海圣,黄立峰,王淑霞. 中华绒螯蟹豚鼠气单胞菌的分离和鉴定. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2001, 27(6): 677~681.
- [10] 安利国,傅荣恕,邢维贤等. 鲤鱼竖鳞病病原菌的生长特性和疫苗的制备. 山东师大学报(自然科学版), 1997, 12(1): 65~69.