

## 一例引起欧洲鳗鲡死亡的嗜水气单胞菌分离与鉴定

王 凡

(福建省水产技术推广总站, 福建 福州 350003)

**摘要:** 从患病欧洲鳗鲡内脏组织中分离获得 1 株菌 FZ01, 对该菌进行了形态学、药物敏感性试验、动物感染试验和血清型分析, 并进行了 VITEK 全自动微生物分析系统鉴定。结果显示: 该菌为革兰氏阴性短杆菌, 端圆, 散在, TCBS 琼脂上呈细小黄色菌落。VITEK 全自动微生物系统鉴定该分离株为致病性嗜水气单胞菌。动物感染试验证明, 对欧鳗和小白鼠均有一定的致病性,  $2 \times 10^7$  CFU 攻毒健康欧洲鳗, 48 h 内致死率达 100%; 药敏试验结果表明, 该菌对复方恩诺沙星、环丙沙星、四环素敏感, 但对复方新诺明、阿莫西林等多种药物不敏感。血清学试验显示该菌与福建省主要血清型 O: Ah10501 的菌体凝集价为 1:2<sup>7</sup>, 属福建省主要流行株。

**关键词:** 嗜水气单胞菌; 分离鉴定; 欧洲鳗鲡

中图分类号: S 943

文献标识码: A

### Isolation and Identification of a Pathogen from an Infected European Eel (*Anguilla Anguilla*)

WANG Fan

(Fujian Provincial Fishery Technical Extension Center, Fuzhou, Fujian 350003, China)

**Abstract:** The strain FZ01 was isolated from a diseased *Anguilla Anguilla* taken from a fish farm suffering from an outbreak of unknown pathogen. The virulence, morphological, physiological and biochemical characteristics and serotype of the FZ01 were investigated. Oxidase test, catalase test and a glucose fermentation test were done by A VITEK automatic microbiological identification analysis. The results showed that the strain FZ01 was pathogenic for both eel and mouse. The fatality rate of  $2 \times 10^7$  CFU for eel was 100% in 48 h. It was confirmed as the causative agent of the epidemic. FZ01 was Gram-negative bacilli, and the results showed that it was *Aeromonas hydrophila*. Tests of the pathogens susceptibility to antibiotics demonstrated its sensitivity to Enrofloxacin, tetracycline, and ciprofloxacin, but resistance to amoxicillin and sulfamethoxazole. Serologic tests showed that this strain's cell agglutination titer with the Fujian Province serotype O: Ah10501 was 1:2<sup>7</sup>. These results suggested that we should take full account of serotype features in disease control process, and select the appropriate drugs and immune agents.

**Key words:** *Aeromonas hydrophila*; isolation and identification; *Anguilla anguilla*

嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila* 隶属弧菌科 *Vibrionaceae*, 气单胞菌属 *Aeromonas*, 是气单胞菌属的模式菌种, 普遍存在于淡水、污水、淤泥、土壤及人类、畜禽粪便中, 对水产动物、畜禽和人类均有致病性, 是一种典型的人—兽—鱼共患病病原菌<sup>[1-3]</sup>。20 世纪 80 年代中后期, 该菌引起的鱼类疾病在我国大面积流行<sup>[4]</sup>。由其导致的细菌性败血症或皮肤溃疡等局部感染, 在水温高的夏季可造成暴发流行, 是我国养鱼史上危害鱼类种类最多、流行地域最广、流行季节最长、造成损失最大的一种急性传染病<sup>[5-6]</sup>。2009 年 2 月, 福建某养鳗场发生欧洲鳗鲡死亡, 死亡欧鳗体表无明显的症状, 鳃部有轻微的出血, 胆囊严重肿大, 肝脏轻微肿大; 脾和肾无明显病变; 肠无出血, 剖开发现肠

内无食物残渣。本实验室从患病欧鳗组织中分离出一株细菌, 对其进行了形态特征、致病性试验、生理生化鉴定、血清型分析以及药敏特性等研究, 以期为该病的治疗和预防提供科学依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

**欧洲鳗鲡:** 患病欧鳗体长约 20 cm, 体表有大量黏液, 鳃部有轻微出血, 试验组健康欧鳗取自福建某鳗鲡养殖场。

**小白鼠:** 6 周龄左右, 体重 18~22 g, 购自福建省疫控中心。

**试验材料:** 标准菌株和不同血清型嗜水气单胞菌 O 抗血清由福建省农业科学院生物技术研究所

惠赠。

## 1.2 试验方法

1.2.1 病原分离及形态鉴定 无菌条件下, 用接种环取病鳗肝、腹水、肾、心脏、鳃和肠样品, 划线普通琼脂平板。27℃恒温培养 24 h<sup>[7]</sup>。挑取形态特征一致的优势单菌落, 划线平板进行纯培养 2 次, 并分别接种于 TCBS 和麦康凯选择培养基, 培养 12~18 h。挑单菌落进行革兰氏染色, 普通显微镜下观察进行初检<sup>[8]</sup>。

1.2.2 药敏试验 采用常规药敏纸片法<sup>[9]</sup>。挑取单菌落, 接种营养肉汤, 28℃震荡培养 24 h, 形成均一浑浊状。用生理盐水将菌液浓度稀释至  $OD_{600} \approx 0.5$ , 涂布琼脂平板, 贴上药敏片, 29℃培养 24 h 观察。测定抑菌圈直径, 根据《兽医化验技术》<sup>[10]</sup>判断分离菌株对药物的敏感程度<sup>[11]</sup>。

1.2.3 动物感染试验 将分离菌划线营养琼脂, 27℃恒温培养 24 h, 取单菌落于营养肉汤恒温振荡培养, 离心去上清。

(1) 分离菌对欧鳗的致病性。用新鲜营养肉汤重悬菌体, 将菌液稀释成  $4 \times 10^7 CFU \cdot mL^{-1}$  浓度, 取 0.5 mL 腹腔注射 4 只 30 g 左右健康欧洲鳗, 对照组注射无菌营养肉汤, 连续观察 48 h<sup>[7]</sup>。

(2) 分离菌对小白鼠的致病性。用新鲜营养肉汤重悬菌体, 将菌液稀释成 3 个浓度梯度 ( $3 \times 10^5$ 、 $3 \times 10^6$ 、 $3 \times 10^7 CFU \cdot mL^{-1}$ ) 进行毒力测定, 每个浓度梯度取 0.5 mL, 腹腔注射 6 只 20 g 左右的健康小白鼠, 对照组注射无菌营养肉汤, 连续观察 36 h<sup>[7]</sup>。

1.2.4 生化鉴定 试验取纯化的菌悬液, 稀释到一定的浊度, 根据革兰氏染色结果, 采用 VITEK 32 微生物自动分析仪鉴定细菌类型。

1.2.5 血清凝集试验  $0.01 mol \cdot L^{-1}$  PBS (pH 7.4) 垂悬分离菌, 分光光度计测  $OD_{600} = 1.007$ 。取 10  $\mu L$  菌液与同体积倍比稀释的各种兔抗嗜水气单胞菌 O 抗原血清混匀, 37℃水浴反应 0.5 h, 进行微孔凝集试验。

## 2 结果与分析

### 2.1 分离菌培养及形态特性

分离纯化出的细菌在普通琼脂平板上生长良好, 形成表面光滑、湿润、中央凸起、肉色、直径为 1 mm 左右的菌落。在 TCBS 琼脂上长出了细小黄色菌落, 麦康凯培养基上为红色菌落。在营养肉汤中浑浊生长。革兰氏染色镜检发现, 该菌属革兰氏阴性短杆菌, 端圆, 散在, 无芽孢。将该菌命名

为 FZ01。

### 2.2 药敏试验

FZ01 对复方恩诺沙星、四环素、环丙沙星敏感, 而对青霉素、阿莫西林和复方新诺明等药物中等敏感或不敏感。结果见表 1。

表 1 分离菌株药敏试验结果

Table 1 The antibiotic sensitivity of the isolate

药物	敏感性	药物	敏感性
复方恩诺沙星	敏感	罗红霉素	不敏感
环丙沙星	敏感	痢特灵	中等敏感
四环素	敏感	丁胺卡那霉素	中等敏感
庆大霉素	中等敏感	恩诺沙星	中等敏感
氨苄青霉素	不敏感	阿莫西林	不敏感
青霉素	不敏感	复方新诺明	不敏感

### 2.3 动物感染试验

2.3.1 分离菌对欧鳗的致病性 欧洲鳗鲡在注射  $2 \times 10^7 CFU$  分离菌 FZ01 后 36 h, 开始逐渐出现溃疡、腹部膨胀、体表片状出血等现象。48 h 后, 试验组欧鳗全部死亡, 对照组正常 (表 2), 证明分离菌 FZ01 具有致病力。

2.3.2 分离菌对小白鼠的致病性 感染结果表明, 腹腔注射细菌悬液后, 小白鼠表现为颤抖、毛竖、厌食。其中, 注射  $1.5 \times 10^7 CFU$  组小白鼠, 在注射 18 h 后全部死亡,  $1.5 \times 10^6 CFU$  和  $1.5 \times 10^5 CFU$  组也均在 24 h 后死亡 (表 3)。而空白对照组小白鼠正常。急性死亡后解剖发现小白鼠肝脾红肿、有腹水、肠壁增厚充血、胃肠道出血等症状。

表 2 分离菌对欧鳗的致病性试验

Table 2 Virulent tests of the isolate on healthy *Anguilla anguilla*

处理	注射菌数(CFU)	死亡数/试验数
FZ01	$2.0 \times 10^7$	4/4
空白对照	无菌营养肉汤 0.5 mL	0/4

表 3 分离菌株对小白鼠致病性试验

Table 3 Virulent tests of the isolate on healthy mouse

处理	注射菌数(CFU)	死亡数/试验数
FZ01	$1.5 \times 10^7$	6/6
FZ01	$1.5 \times 10^6$	6/6
FZ01	$1.5 \times 10^5$	5/6
空白对照	无菌营养肉汤 0.5 mL	0/6

## 2.4 生化鉴定

经 VITEK 32 微生物自动分析仪鉴定, 分离菌 FZ01 为嗜水气单胞菌的可能性为 99% (表 4)。

## 2.5 菌体凝集

菌体凝集试验结果表明, 分离菌 FZ01 只与福建省嗜水气单胞菌主要流行血清型 O : Ah10501<sup>[8]</sup> 和 O : ZN1 兔抗血清产生菌体凝集反应, 与其他兔抗血清无凝集 (表 5)。

表 4 分离菌株生化鉴定结果  
Table 4 Biochemical and physiological characteristics of the isolate

鉴定项目	反应结果	鉴定项目	反应结果	鉴定项目	反应结果
葡萄糖氧化(OFG)	+	阳性生长控制(GC)	+	DP3	+
醋硫胺(ACE)	-	七叶树素(ESC)	-	PLI	+
尿素(URE)	-	CIT	-	丙二酸盐(MAL)	-
色氨酸(TDA)	-	多膝杆菌素(PXB)	-	ONP	-
乳糖(LAC)	-	麦芽糖(MLT)	+	甘露醇(MAN)	+
木糖(XYL)	-	棉子糖(RAF)	-	山梨醇(SOR)	-
蔗糖(SUC)	-	INO	-	福寿昔醇(ADO)	-
香豆酸(COU)	-	硫化氢(H <sub>2</sub> S)	-	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)	+

表 5 分离菌与嗜水气单胞菌不同 O 抗原血清型菌体凝集试验结果

Table 5 The results of agglutination test with the isolate and different O-serogroups of *Aeromonas hydrophila*

O 抗原血清型	FM-1	WC-1	Ah10501	YT-1	CQ-1	CHS-3	ZN1
凝集效价	-	-	1 : 2 <sup>7</sup>	-	-	-	1 : 2 <sup>6</sup>

## 3 讨 论

本实验室从某鳗鲡养殖池的病鱼中分离到 1 株细菌, 经 TCBS 和麦康凯选择培养基、生化鉴定、动物感染以及血清凝集试验初步判定为嗜水气单胞菌。动物感染试验表明, 菌株 FZ01 是福建省的主要流行株, 该菌株除了对欧鳗外, 对小白鼠也具有较强的致病力, 表明该株菌应属冷血、温血动物共患病原菌, 须引起足够重视。

从药敏试验结果分析, 该菌对复方恩诺沙星、环丙沙星、四环素敏感, 但对其他抗生素药物敏感性比较低或不敏感。经调查发现, 该发病养殖场为一养鳗老场, 该分离菌对多种药物不敏感, 提示可能是养殖过程滥用药物从而导致该菌产生较强耐药性<sup>[12-13]</sup>。因此, 从长远出发, 避免长期、大量使用抗生素, 提倡健康养殖, 开发针对病原菌的新型疫苗和免疫制剂, 是防治嗜水气单胞菌病最根本的方法<sup>[14]</sup>。

嗜水气单胞菌存在不同的血清型。已有的研究

表明, 气单胞菌的暴发和流行总是表现为一定的优势血清型<sup>[15-17]</sup>。而气单胞菌的优势血清型又与其寄生的宿主、宿主周边的环境条件都有一定的关系<sup>[18]</sup>。本试验通过菌体凝集试验证实分离菌 FZ01 与多种嗜水气单胞菌的 O 抗血清不发生反应, 而仅与福建省嗜水气单胞菌主要血清型 O : Ah10501 和 O : ZN1 发生反应。提示在嗜水气单胞菌疾病防治过程中, 应该充分考虑血清型的特点, 选择合适的药物和免疫制剂。

嗜水气单胞菌的分离鉴定, 常规方法是分离培养细菌并进行生化试验鉴定。本试验采用目前使用率较高的微生物自动分析仪, 鉴定结果为嗜水气单胞菌的可能性为 99%。因为各地菌株存在着差异, 因而采用的生化试验指标的结果也有一定的偏差<sup>[19]</sup>, 今后将对该菌的 16S rDNA 序列进行分析<sup>[20]</sup>, 明确该菌与其他嗜水气单胞菌的同源性及遗传进化关系, 进一步对该菌的流行情况和致病机理进行研究和探讨, 以便更科学地防治该菌引发的疾病。

## 参考文献：

[1] 翟国才. 嗜水气单胞菌的生物学特性与危害性 [J]. 内陆水产, 1997, (12): 21.

[2] 陈昌福, 史维舟, 赵桂珍, 等. 越南红鳍东方鲀病原菌的分离及初步鉴定 [J]. 华中农业大学学报, 1995, (3): 263—266.

[3] 熊焰, 王印, 汪开毓. 中华鳖细菌性传染病病原研究 [J]. 四川农业大学学报, 1997, (2): 270—273.

[4] 吴倩, 闫芳, 刘风波. 嗜水气单胞菌的研究进展 [J]. 畜禽业, 2010, (2): 28—31.

[5] 董传甫, 林天龙. 嗜水气单胞菌研究进展 [J]. 福建农业学报, 2003, (4): 243—248.

[6] 张玉芬, 亢喜刚, 张秀军, 等. 嗜水气单胞菌研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37 (26): 12389—12390.

[7] 董传甫, 林天龙, 俞伏松, 等. 鱼源气单胞菌的分离鉴定及血清学调查 [J]. 水利渔业, 2004, 24 (6): 78—81.

[8] 林天龙, 陈日升, 董传甫, 等. 欧鳗嗜水气单胞菌的分离、鉴定和特性分析 [J]. 福建农业学报, 2001, 16 (4): 35—40.

[9] 徐进, 罗晓松, 曾令兵. 黄颡鱼鮈爱德华氏弧菌的分离鉴定及其致病性研究 [J]. 淡水渔业, 2009, 6 (39): 47—53.

[10] 农业部职业培训教材编审委员会. 兽医化验技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1999.

[11] 华俊, 谢斌, 黄红梅, 等. 石龟嗜水气单胞菌的分离鉴定及药敏特性研究 [J]. 广西农业科学, 2010, 41 (3): 273—276.

[12] 宋铁英, 陈强, 郑在予, 等. 不同来源嗜水气单胞菌的抗菌素耐药性及耐药机制分析 [J]. 福建农业学报, 2007, 23 (2): 119—124.

[13] 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.

[14] 林居纯, 罗忠俊, 舒刚, 等. 嗜水气单胞菌临床分离菌对抗菌药物的耐药性调查 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37 (15): 7024—7025.

[15] CONSUUELO C, ALIXIA E T. O-Serogrouping and surface components of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei* pathogenic for eels [J]. FEMS Microbiology Letter, 1994, (117): 85—89.

[16] 钱冬, 陈月英, 沈锦玉, 等. 引起鱼类爆发性流行病的嗜水气单胞菌的血清型、毒力及溶血性 [J]. 微生物学报, 1996, 35 (6): 460—464.

[17] KHASHE S, HILL W, JANDA M J. Characterization of *Aeromonas hydrophila* strains of clinical, animal, and environmental origin expressing O: 34 antigen [J]. Clinical Microbiol, 1996, (33): 104—108.

[18] THOMAS L V, GROSS R J. Extended serogrouping scheme for motile, mesophilic *Aeromonas* spp [J]. Clinical Microbiol, 1990, 28 (3): 980—984.

[19] 马子行. 细菌鉴定中易犯的错误和分析 [J]. 上海医学检验杂志, 1990, 5 (4): 237—239.

[20] 卢洪洲, 汤一苇. 微生物基因诊断在临床微生物学中的地位和应用 [J]. 微生物与感染, 2007, 2 (4): 195—196.

(责任编辑: 柯文辉)