

弗氏柠檬酸杆菌对河蟹致病性的研究

李 华¹ 邢殿楼¹ 白国福² 李向晖

(1. 大连水产学院农业部海洋水产养殖生态学重点开放实验室, 大连 116023;

2. 盘锦市水产研究所, 盘锦 124010)

摘要: 首次报道了弗氏柠檬酸杆菌对河蟹的病原性、并导致其病理变化, 药物对该菌的敏感试验及生产中药物治疗效果。从垂死的病蟹肝胰腺中分离得到可疑病菌, 经人工感染试验证实此菌导致健康蟹发病死亡。该菌可导致河蟹的肝胰腺、鳃等发生病理变化, 最终引起败血症而死亡。通过 16 种药物对该菌的敏感试验, 筛选出有效药物, 应用于生产中取得了较好疗效。

关键词: 中华绒螯蟹; 柠檬酸杆菌; 病原性; 药敏试验; 防治

中图分类号: S968、25 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000- 3207(2001)03- 0217- 07

近年来河蟹(*Eriocheir sinensis* H. Milne- Edwards) 养殖规模的不断扩大, 集约化程度的不断提高, 各种疾病日趋严重, 给养殖生产带来了严重损失。关于河蟹幼体和仔蟹期的疾病有文献报道^[1-4], 但成蟹疾病研究不多, 徐一枝等报道了成蟹寄生虫病, 卢敬让对镉中毒后的河蟹鳃组织病理变化进行了研究。任元先、刘维民在综述文章中对弧菌病、腐壳病、黑鳃病、烂肢病、水肿病的症状和应急防治技术进行了描述^[5-8]。关于成蟹细菌病的病原确定, 组织病理及防治方法等系统性研究未见报道。现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料来源 病蟹采集于盘锦市盘山县某养殖场, 健康蟹购于兴隆台农贸市场, 体重为 70—120g。健康蟹在室内暂养 7d, 无异常反应备用。

1.2 病原菌分离 无菌解剖濒死病蟹, 取肝胰腺、心脏、肌肉直接在普通营养琼脂平板上划线分离, 30℃ 恒温箱中培养 24h。从优势菌落中分别选取单菌落, 经纯化转移至营养琼脂斜面, 冷藏保存备用。肝胰腺分离的优势菌株编号为 9773, 肌肉分离菌为 9774。

1.3 菌悬液的制备 将 9773、9774 菌株分别接于新鲜营养琼脂斜面, 经 30℃ 恒温培养 18—20h, 用无菌生理盐水洗下菌苔, 制成菌悬液浓度为 $2.0—5.6 \times 10^9$ CFU/mL 备用。

1.4 试验组设计 采用肌肉注射和浸泡感染两种方法。注射组分 4 个, 注射量依次为: 0.5mL、0.3mL、0.1mL、0.05mL/ 只蟹, 对照组注射等量无菌生理盐水。从人工感染病蟹

收稿日期: 1999- 11- 20; 修订日期: 2000- 05- 08

基金项目: 辽宁省海洋水产厅招标项目资助

作者简介: 李 华(1958—), 女, 吉林省龙井市; 学士、副教授; 主要从事水产动物疾病。中国科学院微生物研究所蔡妙英研究员帮助鉴定菌种, 在此表示衷心的感谢。李向晖现在北京万泉庄渔场工作

体内分离出细菌, 以此做感染源再进行感染试验, 如此重复两次。注射部位是第二或第三步足基节与底节连接的薄膜处。浸泡组: 把菌悬液倒入试验盆中, 使菌液浓度达到 1.6×10^6 CFU/mL。健康蟹放入菌悬液中饲养 16h 后, 将蟹移至清水继续饲养并观察。

1.5 试验条件 饲养用水为曝气后的自来水, 水温波动于 15—21℃之间。气泵充气, 每日定点投喂 3 次。

1.6 病原菌鉴定 按照文献^[9]进行病原菌的培养特征观察和生理生化特征测定, 参照文献^[10,11]方法鉴定至种。

1.7 药敏试验 用纸片琼脂扩散法^[12]进行。药敏纸片购自中国腹泻病控制上海试验研究中心。

1.8 组织切片制备 取自然发病蟹、感染病蟹、健康蟹的心脏、肝胰腺、鳃、胃、肠, 经波恩液固定, 石蜡包埋, 常规切片, H. E 染色, Olympus 显微镜观察并照相。

2 结果

2.1 症状 病蟹不吃食, 活动力较差, 病重者伏于池边或趴底不动, 对外界反应迟钝, 最终足抽搐而死。打开背甲, 肝胰腺、鳃、肌肉轻度水肿, 部分肝胰腺和鳃组织呈腐烂状。人工感染河蟹死亡情况见表 1。

表 1 注射感染河蟹死亡情况
Tab. 1 Mortality of crab after artificial infection

菌株号 Number of strain	水温 (℃) Temperature	河蟹数 (只) Amount of crab	注射量 (mL) Injection dosage	不同时间蟹死亡数(只) Amount of crab in different hour after test				死亡率 (%) Mortality
				5h	16h	24h	36h	
9774	19—21	4	0.50	4	0	0	0	100
		4	0.30	4	0	0	0	100
		4	0.10	0	0	0	0	0
		4	0.05	0	0	0	0	0
生理盐水		4	0.30	0	0	0	0	0
9773	19—21	4	0.50	4	0	0	0	100
		4	0.30	4	0	0	0	100
		4	0.10	4	0	0	0	100
		4	0.05	0	1	3	0	100
生理盐水		4	0.05	0	0	0	0	0
9873	16—18	4	0.05	0	1	1	2	100
生理盐水		4	0.05	0	0	0	0	0
9973	15—17	3	0.05	0	0	2	1	100
生理盐水		4	0.05	0	0	0	0	0

9774 菌株注射 0.1mL 和 0.05mL 组及对照组死亡率为零, 而 9773 菌株毒力很强, 用 9773 菌株感染健康蟹从其死蟹肝胰脏分离出 9873 菌株, 再感染健康蟹, 获得 9973 菌株低浓度组 20h 时出现死亡高峰, 各组死亡率均为 100%。浸泡感染组的蟹经 7d 观察未感

染发病。

2.2 病原菌的鉴定 30℃恒温培育 24h, 在营养琼脂平板上菌落为圆形, 直径 1mm 左右, 灰白色, 表面光滑、湿润、半透明。镜下观察菌体为短杆状, 运动, 大小为 0.6—0.7×1.5—2.0μm。电镜下观察菌体周生鞭毛。革兰氏染色阴性, 对葡萄糖 O/F 测定为发酵产酸产气, 接触酶阳性, 氧化酶阴性, 可归肠杆菌科。该菌柠檬酸盐利用阳性, 硫化氢阳性, 脲酶阳性, ONPG 阳性。精氨酸双水解酶阴性, 鸟氨酸和赖氨酸脱羧酶阴性, 苯丙氨酸脱氨酶阴性, 吡哌啉阴性, V-P 反应阴性, 明胶阴性。对葡萄糖、甘露醇、肌醇、山梨醇、鼠李糖、蔗糖、密二糖和阿拉伯糖产酸, 但对苦杏仁苷不产酸。Api 系列测定: 1614772(脲酶 70%), %id= 99.8, 定名为弗氏柠檬酸杆菌[*Citrobacter freundii* (Braak) Werkman et Gillen]^[10, 11]。

2.3 药敏实验 药敏实验结果见表 2。16 种所试药物中该菌对庆大霉素、氟嗉酸、丁胺卡那霉素、链霉素、氟哌酸、呋喃妥因等 6 种药物敏感, 对环丙沙星、呋喃唑酮、土霉素等 3 种药物中度敏感, 对 7 种药物不敏感。

表 2 9773 菌株药敏实验结果
Tab. 2 The result of medicinal sensitive tests

药名 Drugs	抑菌圈直径(mm) Diameter of inhibitory bacterial rings	敏感度 Sensitivity
环丙沙星	20	M
复方新诺明	0	R
庆大霉素	28	S
头孢呋新	0	R
氟哌酸	17	S
四环素	0	R
链霉素	18	S
氨苄青霉素	0	R
头孢拉定	0	R
呋喃唑酮	16	M
卡那霉素	12	R
土霉素	17	M
呋喃妥因	17	S
氯霉素	0	R
丁胺卡那霉素	18	S
氟嗉酸	26	S

2.4 组织病理观察 对河蟹主要器官的病理观察结果表明, 自然发病蟹与人工感染病蟹的肝胰腺、鳃、心脏均发生不同程度的病变, 且二种病蟹的病变相似。

肝胰腺: 肝胰腺是病变最为严重的器官。病变主要发生在肝小管间结缔组织和肝小管上皮细胞, 前者病变重且早于后者。病变早期, 肝小管间结缔组织出现颗粒细胞浸润, 局部发生不同程度的解体而淡染(图版 I: 1)。此时, 只有个别肝小管的上皮细胞界限不清, 细胞核极性紊乱; 病情严重时肝小管间结缔组织坏死、解体(图版 I: 2), 其间还有许多

鲜红滴状物(图版 I: 3), 肝小管病变也加重, 多数上皮细胞与基底膜分离, 严重水变性, 细胞界限不清, 继而细胞核发生固缩, 碎裂, 最终溶解, 以致整个肝小管结构模糊、坏死(图版 I: 4)。

鳃: 鳃组织病变也较重。病初, 鳃轴、鳃丝及边缘管轮廓清晰, 鳃丝壁稍有增厚(图版 I: 5), 继而部分鳃丝炎性水肿(图版 I: 6); 病变严重时, 50—60% 的鳃丝组织发生肿胀、坏死, 甚至解体(图版 I: 7)。随病情加重, 鳃丝壁大量增厚, 中央腔变狭窄, 此时鳃轴内结缔组织部分解体(图版 I: 8)。

心脏: 心脏病变相对较轻。当病情较重时, 心肌纤维排列疏松, 横纹消失, 少量纤维发生断裂, 局部结构被破坏(图版 I: 9)。

其他: 病蟹的肠、胃组织结构基本正常, 无明显病理变化。

3 讨论

3.1 弗氏柠檬酸杆菌的病原性 弗氏柠檬酸杆菌为条件性致病菌, 广泛分布于自然界, 也可寄生于肠道。文献报道^[13-17], 某些毒力很强的菌株可导致人类患肠炎、脑膜炎、脑脓肿、败血症等。近年来临床上发现由该菌引起的感染常常较为严重。柠檬酸菌属中的柯氏柠檬酸杆菌可侵袭成年梅花公鹿患以腹泻和肛门毗开为特征的传染病^[18-19]。弗氏柠檬酸杆菌导致水产动物患病死亡的病例属首次报道。

经多次人工感染试验证实, 9773 菌株的毒力很强, 尤其将注射剂量降低到 0.05 mL/只蟹时, 感染蟹全部发病死亡, 死亡率 100%, 症状与自然发病蟹相同, 用病蟹体内分离出的该病菌再感染健康蟹, 也导致河蟹患病死亡; 组织病理结果显示, 自然发病蟹与感染病蟹的肝胰腺和鳃组织广泛变性和坏死, 其病理变化相似。因此, 可以确认弗氏柠檬酸杆菌是该病的病原。

浸泡感染试验不能使体表完整的成蟹发病。这表明只有当环境条件恶化, 水中病原菌大量繁生, 蟹体表受伤时, 病原菌可能通过伤口感染, 而且河蟹属底栖觅食种类, 当底质有大量病菌存在时, 河蟹可能通过摄食经口而入。因此, 做好养殖水域的水质、底质消毒是切断其感染途径的重要措施。

3.2 中华绒螯蟹弗氏柠檬酸杆菌病的组织病理学特征 河蟹的肝胰腺同其他十足目种类相似, 是由中肠突出的一对消化盲囊演变而成, 能分泌各种不同的酶, 是糖原、脂肪及钙的吸收与贮存的场所, 是全身代谢最旺盛的器官^[20]。以往研究表明^[21, 22], 无论是细菌还是病毒, 均可使对虾肝胰腺的肝小管上皮细胞及肝小管间的结缔组织发生不同程度的变性, 坏死乃至解体。作者认为, 当成蟹感染柠檬酸杆菌后, 肝小管间大量颗粒细胞浸润, 继而大片坏死, 溶解, 肝小管上皮细胞与基底膜分离, 多个肝小管发生自溶。由此可见, 虾、蟹等甲壳类动物的肝胰腺是易受各种病原侵袭的靶器官。

河蟹虽有循环系统, 但仍属开放式循环^[23]。这种循环系统, 给病原菌在蟹体内迅速扩散创造了条件。肝胰腺和鳃组织各自的病变特点, 证实了这一观点。肝小管内没有血管到达, 而在肝小管间结缔组织中有发达的血窦结构^[24], 故肝小管间的结缔组织病变重而发生早。鳃做为呼吸器官需要血液在其内快速流通, 鳃的各部分组织中有丰富的血管, 依次发生病变的顺序不明显。作者认为, 柠檬酸杆菌感染河蟹后引起败血症, 致使肝胰腺

物质合成、消化吸收及能量代谢功能的紊乱或丧失,进而破坏了整个机体的新陈代谢,同时鳃组织大面积肿胀、坏死,使病蟹呼吸困难,甚至窒息,最终导致病蟹死亡。

3.3 弗氏柠檬酸杆菌病防治 Rabin 认为蟹类的血细胞具有吞噬、凝固及合成糖原的作用^[25]。Bubel 认为血细胞通过吞噬作用或释放糖供细胞利用而起到保护作用^[26],应该说河蟹对病原菌有相当强的抵抗力。弗氏柠檬酸杆菌在自然界广泛分布,但只有在满足合适的发病条件时方可致病。该病恰好在一场大雨后暴发的,这场大雨不仅使陆上病原菌大量冲入池内,而且造成养殖水质环境急骤变化,有利于池内病原菌大量繁生,同时刺激河蟹产生“应激”反应,消耗大量能量,降低抵抗力,引发了疾病。因此,在养殖生产中,必须注意保持环境条件的稳定性,及时搞好环境消毒和公共卫生,这是预防蟹病的重要措施。

根据药敏实验结果,指导蟹农采用外泼漂白粉 1.5mg/L 杀灭池水中的病原菌,同时将氟哌酸按 1‰量拌饵投喂 5d,收到了良好的治疗效果。从药敏试验结果看,该菌株对一些常用药物如:氯霉素,新诺明等耐药,而且据文献^[15-18]报道,不同菌株对药物敏感性差别很大。因此,经过药敏实验有针对性的选择药物,及时把握治疗机会是取得疗效的关键。

参考文献:

- [1] 杨振久. 河蟹育苗中幼体暴发性传染病及其防治初报[J]. 淡水渔业, 1994, 24(3): 15—16
- [2] 贾述竟. 苗种钟形虫病的防治[J]. 水产科技情报, 1996, (3):
- [3] 赵立国. 河蟹早期蚤状幼体病害防治研究[J]. 水产科技情报, 1995, (6): 257—259
- [4] 姜静颖、邢殿楼, 等. 池塘养殖中华绒螯蟹幼蟹的一种球状病毒粒子的电镜观察[J]. 大连水产大学学报, 1996, 11(1):
- [5] 徐一枝. 河蟹蟹奴病的初步观察[J]. 淡水渔业, 1989, (2): 32—33
- [6] 卢敬让. 镉对中华绒螯蟹鳃组织及其显微结构的影响[J]. 海洋与湖沼, 1991, 22(6): 566—570
- [7] 任元先. 成蟹蟹病及其防治[J]. 科学养鱼, 1990(2): 25—26
- [8] 刘维明. 河蟹养殖阶段的病害及其防治[J]. 水产养殖, 1994, (1): 29—30
- [9] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法[M]. 北京: 科学出版社. 1978
- [10] Sneath P H. et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1: 1984, 458—461
- [11] 徐迪诚、蔡妙英. 革兰氏阴性杆菌新编码手册[M]. 哈尔滨: 黑龙江出版社. 1994: 341
- [12] 何长民. 应用微生物实验技术[M]. 兰州: 甘肃人民出版社, 1981: 288—292
- [13] 纪新梅. 小儿枸橼酸杆菌性肠炎 110 例临床分析[J]. 中华医院感染杂志, 1997, 7(2): 95
- [14] 孙晓春. 新生儿弗劳第枸橼酸杆菌脑膜炎并阻塞性脑积水 1 例[J]. 中国现代医学杂志, 1997, 7(1): 46
- [15] 刘明娟. 枸橼酸杆菌肠炎 26 例临床分析[J]. 实用儿科临床杂志, 1991, 6(3): 128—129
- [16] 黄子杨. 枸橼酸杆菌败血症 15 例报告[J]. 中华传染病杂志, 1989, 7(4): 235—236
- [17] 余德文. 弗劳地枸橼酸杆菌败血症 10 例报告[J]. 云南医药, 1991, 12(4): 348—349
- [18] 阎新华. 梅花鹿柯氏枸橼酸杆菌的分离鉴定及药敏测定[J]. 特产研究, 1993(2): 47—49
- [19] 严忠诚. 柯氏枸橼酸杆菌侵袭成年梅花公鹿的诊断[J]. 特产研究, 1994(2): 46—47
- [20] 堵南山. 甲壳动物学[M]. 北京: 科学出版社, 1987, 30—31
- [21] 李 霞. 正常和患红鳃黄鳃病的中国对虾肝胰腺组织学研究[J]. 大连水产学院学报, 1992, 7(1): 11—15
- [22] 李 华. 1993 年中国对虾暴发性流行病病虾肝胰腺组织病理研究[J]. 大连水产学院学报, 1995, 10(1): 22—27
- [23] 任淑仙. 无脊椎动物学[M]. 北京: 科学出版社, 1991, 154—155

- [24] 李太武. 三疣梭子蟹呼吸器官的组织学研究[J]. 大连水产学院学报, 1995, **10**(2): 18—24
- [25] Rabin H. Hemocytes, hemolymph and defence reaction in crustaceans [J]. *Res. J. Reviculoedothel. Soc.* 1970 (7): 195—207
- [26] Babel A. Histological and electron microscopical observation on the effects of different salinities and heavy metal ions on the gills of *Jeana nordmanni* [J]. *Cell and Tissue Res.* 1976, **167**: 65—95

STUDIES ON DISEASE OF MITTEN CRAB CAUSED BY CITROBACTER FREUDII

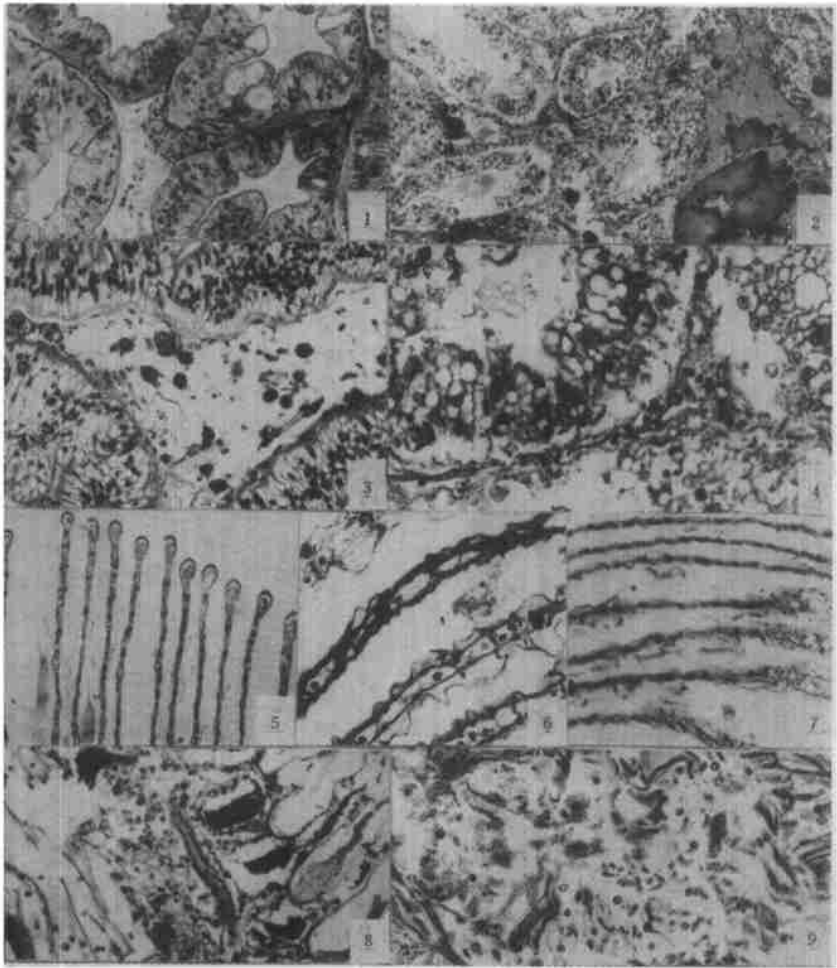
LI Hua¹, XING Diar lou¹, BAI Guo fu² and LI Xiang-hui

(1. Dalian Fisheries University, Key Laboratory of Mariculture Ecology of

Ministry of Agriculture DALIAN 116023; 2. Panjin Institute of Fisheries)

Abstract: The paper deals with, pathogenicity and pathological changes induced of the Chinese river crab caused by *Citrobacter freundii*, medicinal sensitive tests of the pathogen and therapeutic effect of medicine in production. The pathogen was separated from hepatopancreas of moribund and diseased crabs. It was proved that this bacteria had caused the health crab infected and death through artificial infecting tests and the mortality was 100%. The pathogen was identified as *Citrobacter freundii* by the biological and biochemical determination. The pathogen could induce pathological changes of hepatopancreas and gill of river crab, and finally the septicemia and death. Effective medicine was screened through the medicinal sensitive tests to the pathogen of 16 kind of drugs, and curative effect was observed in production.

Key words: *Eriocheir sinensis*; *Citrobacter freundii*; Pathogenicity; Medicinal sensitive tests; Prevention and treatment



图版 I

1. 示初期局部肝小管间结缔组织淡染, 肝小管结构尚清楚, $\times 330$; 2. 肝小管间结缔组织大量坏死、解体及出血灶, $\times 250$; 3. 肝小管间结缔组织中许多鲜红滴状物, $\times 500$; 4. 肝小管上皮组织与基底膜分离, 上皮细胞逐步坏死, $\times 100$; 5. 病变较轻的鳃丝, $\times 250$; 6. 鳃丝炎性水肿, 上皮与角质膜增厚并分离, $\times 660$; 7. 鳃丝上皮细胞脱落, 中央腔裸露, 鳃丝广泛肿胀坏死, $\times 330$; 8. 示鳃轴中少量结缔组织解体, $\times 660$; 9. 部分心肌纤维横纹消失, 纤维断裂、解体, $\times 660$;

1. With light staining, the connective tissue among local ductus hepaticus during the initial stage was shown. The structure of ductus hepaticus was still clear, $\times 330$; 2. The connective tissue among ductus hepaticus was necrotized in a large number and disintegrated, and hemorrhage foci were appeared, $\times 250$; 3. Many bright red guttate substances were found in the connective tissue among ductus hepaticus, $\times 500$; 4. The epithelial cells of ductus hepaticus were separated from basement membrane, and epithelial cells were necrotized gradually, $\times 100$; 5. The gill filament with minor pathological changes was shown, $\times 250$; 6. Gill filament was found inflammatory edema, the thickness of epithelium and corneal membrane were increased and separated, $\times 660$; 7. The epithelial cells of gill filament were scaling off, central cavity was exposed, gill filament was swelling extensively and necrosis, $\times 330$; 8. A small amount connective tissue in gill axis was disintegrated, $\times 660$; 9. Part of striated veins in cardiac muscle fibril were disappeared, fibril was fragmented and disintegrated, $\times 660$.