

梭鱼出血性败血病病原菌研究*

梁德海 王新成

(中国科学院海洋研究所)

王文兴 宋庆云

(国家海洋局第一海洋研究所)

对于出血性败血病病原菌的研究,淡水鱼类(如鲤鱼、鲢鱼)开展较多,而海水鱼方面报道甚少。有关梭鱼出血性败血病病原菌的研究迄今为止尚未见报道。1995 年,河北省许多梭鱼养殖场发生大面积梭鱼出血性败血病,其症状为:病鱼体表、鳍严重斑状充血,体表有些地方出现溃疡、疤痕,剖检见肝脏肿大,脾及肠粘膜充血。梭鱼出血性败血病易传染,加之目前缺少有效的防治方法,因此,死亡率极高,造成损失大,严重影响了梭鱼养殖业的健康发展。为了防治梭鱼出血性败血病,作者对该病的病原菌进行了分离培养,并对其生理、生化特性进行了测定,目前从病鱼中分离到一株致病菌株,经鉴定属于运动性气单胞菌中的嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*),该菌主要特征为菌体短杆状,革兰氏染色阴性,极端单生鞭毛。

一、材料和方法

1. 试验鱼来源

病鱼来源于河北省黄骅市歧口梭鱼养殖场,健康梭鱼来源于同一养鱼场,个体均重 160g,暂养在充氧、循环水的水族箱中。

2. 病原菌分离

选取典型症状的濒死病鱼,清水冲净,75%酒精棉球擦拭体表,再用无菌生理盐水淋洗,无菌纱布吸干水份,置紫外灯下照射 20min。无菌操作从病鱼的充血溃烂处、肝、肾、脾、肠等组织分别取材,接种于糊精一品红培养基平板,28℃ 培养 24h(汤伏生等,1995),挑取单个红色湿润菌落,测定氧化酶。再将氧化酶阳性菌菌点种于 RS 琼脂(陆承平,1992),24h 后挑取黄色菌落在普通营养琼脂平板上作纯化培养,得到一菌株,定名为 9501 菌株。

3. 9501 菌株的致病性试验

(1)人工感染试验 取健康梭鱼为人工感染用鱼,分为 3 个试验组和对照组,并设

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 3769 号。

收稿日期:1999 年 4 月 5 日。

平行组。每组 15 尾,分别饲养于 0.5m^3 水族箱中,预养 24h 后,采用肌肉注射、创伤和菌浴三种方法进行人工感染试验。每天换水一次,并充气投饵。试验水温控在 $22\text{--}23^\circ\text{C}$, $\text{pH}7.3\text{--}7.5$ 。

a. 注射感染:将分离的菌株置于普通营养琼脂斜面,温度为 28°C 培养 24h 后用无菌生理盐水洗下,稀释成 $6 \times 10^6 \text{Cell/mL}$ 的菌悬液,腹腔注射 0.1mL/尾 ,对照组注射等量的无菌生理盐水,然后分置水族箱中常规饲养、观察。

b. 创伤感染:将梭鱼背部消毒后用灭菌针头划痕,伤口长约 2mm ,再将其在上述菌液中浸泡 24h,然后转入灭菌清水中饲养,浸浴感染一周,对照组在创伤后放入灭菌清水中饲养。

c. 非损伤菌浴:将试验鱼放在 $6 \times 10^6 \text{Cell/mL}$ 的同上菌液中浸泡 24h,再转入无菌清水中饲养,对照组不浸菌放养在无菌清水中。

(2) 半致死剂量(LD_{50})测定 用无菌生理盐水将分离的菌株肉汤培养物(18h)作连续 10 倍稀释,稀释度为 $10^{-1}\text{--}10^{-7}$,用平板法进行细菌计数,然后将 $10^{-2}\text{--}10^{-6}$ 每一稀释度的菌悬液接种 15 尾健康梭鱼(每尾 0.1mL),置水族箱中常规饲养、观察,计算半致死量。

4. 免疫试验

(1) 疫苗制备 9501 菌株纯培养接种在普通营养琼脂平板上,温度为 28°C ,18h 后用无菌生理盐水洗下培养物,加福尔马林使其最终浓度(V/V)为 0.3% , 56°C 恒温水浴灭活(24h),取样接种于营养琼脂斜面, 28°C 培养,检查确认无存活菌后,稀释成 1.5×10^6 备用。

(2) 疫苗注射 人工感染健康梭鱼 20 尾,3d 后 10 尾肌肉注射疫苗 0.5mL ,另 10 尾肌肉注射生理盐水 0.5mL 作对照。另选 20 尾健康梭鱼,每尾肌肉注射 0.5mL 疫苗,观察一周后,取其中 10 尾进行人工感染。

5. 9501 株的鉴定

(1) 细菌形态观察 用培养 18h 肉汤培养物作革兰氏染色,并测大小。

(2) 生理、生化特性测定 氧化酶用纸片法(韩文瑜等,1992)运动性测定用半固体穿刺法,G+C 含量测定采用热温度变性法,其他项目则采用 API20 系统(API system 法国)、微量生化反应管系统(上海市医学检验所)和 J. F. 麦克法丁(林万明,1980),West (1984),Fumiss(West, *et al.*, 1984)所述方法进行。

二、结 果

1. 细菌分离培养 9501 菌株接种营养琼脂平板培养后,长出的纯培养的细菌菌落圆形,微凸,表面光滑,不透明,边缘整齐,中间略隆起,菌落可随时间延长而增大,在 $4\text{--}40^\circ\text{C}$ 均可生长,在人血琼脂平板上产生清晰的 β 溶血。

2. 9501 株致病试验 病原菌 9501 菌株的致病试验结果见表 1。

表 1 9501 菌株的人工感染致病试验结果

分组	感染方法	受试鱼数(尾)	发病时间(d)	死亡时间(d)
1	注射感染	15	3	6
2	创伤感染	15	7	18
3	菌浴感染	15	N	P
4	对照组	15	N	P

注:N、P 分别表示在 30d 的试验期内未能使鱼发病和死亡。

由表 1 可以看出,腹腔注射纯 9501 菌株的 15 尾健康鱼 3d 内均发病,6d 内全部死亡,其症状及剖检与自然病例类似,取发病鱼内脏平板划线能分离到与 9501 株一致的细菌,而注射无菌生理盐水的对照组则无异常。

创伤感染 9501 菌株的 15 尾健康鱼在一周内先后发病,18d 左右全部死亡,其症状及剖检亦与自然病例类似,其内脏平板划线亦能分离到与 9501 菌株一致的细菌。

菌浴感染 9501 菌株的 15 尾健康鱼,在 30d 的试验期内未能使其发病和死亡。

半致死量测定中,梭鱼接种 9501 菌株后,3d 左右出现典型症状,并陆续死亡,连续观察,记录死亡数,按 Reed-Muench 法计算出 9501 菌株梭鱼的 LD_{50} 为 5.6×10^8 个菌。

3. 细菌鉴定 9501 菌株为革兰氏阴性的短杆菌,单个或成双,两端钝圆,大小为 $0.6 \times 1.4 - 2.0 \mu m$ 单极生鞭毛,兼性厌氧,无荚膜和芽孢,作直线穿梭状运动;热温度变性法测得 C+G 含量为 60%;其他的生化特征见表 2。

表 2 9501 菌株与嗜水气单胞菌生理生化特性比较

试验项目	9501 菌株	嗜水气单胞菌	试验项目	9501 株	嗜水气单胞菌
氧化酶	+	+	VP	+	+
过氧化氢酶	+	+	H ₂ S	+	+
O/F 试验	F	F	甘露醇	+	+
葡萄糖产气	+	+	水杨素	+	+
O/129	-	-	组氨酸利用	+	+
七叶苷水解	+	+	精氨酸利用	+	+
蔗糖发酵	+	+	阿拉伯糖利用	+	+

4. 免疫试验 20 尾健康梭鱼人工感染 3d 后,先后发病,肌肉注射生理盐水的 10 尾对照组鱼全部死亡;而肌肉注射疫苗的 10 尾病情发展缓慢,7d 内无一死亡,但 15d 后相继死亡。

20 尾健康梭鱼在肌肉注射疫苗 3d 后,人工感染的 10 尾鱼在 10d 后发病,20d 后陆续死亡,未人工感染的 10 尾鱼 30d 内无任何异常。

三、结论与讨论

(1)根据上述 9501 菌株的形态和生理生化特性,对照《伯杰氏系统细菌学手册》的分

类方法,经鉴定作者认为应属于气单胞菌属的嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)。

(2)细菌分类学家研究表明,运动性气单胞菌包括嗜水气单胞菌、温和气单胞菌、凡隆气单胞菌、豚鼠气单胞菌、舒伯特气单胞菌、易损气单胞菌、简达气单胞菌等七种(杨正时,1990)。将9501菌株与上述七种运动性气单胞菌主要生理生化特性比较可见:9501株的生理生化特性与上述七种运动性气单胞菌类似,但却存在一定的差异,原因可能如下:①因不同的血清型所致;②与感染宿主不同有关。

(3)9501菌株人工感染健康鱼可致发病、死亡,并且从死亡鱼内脏可重新获得同样菌株,说明9501菌株可引起梭鱼出血性败血症。前人的研究表明,嗜水气单胞菌是鱼类出血性败血病的一种病原菌(陈怀青等,1991)。

(4)9501菌株对梭鱼半数致死量为 5.6×10^8 个菌,根据对鱼类致病菌毒力划分标准(Devesa, *et al.*, 1985),9501菌株为较强毒力株,这与出血性败血病鱼的死亡率极高有关。

(5)免疫试验结果表明,肌肉注射疫苗对防治嗜水气单胞菌侵入梭鱼体内有一定效果,但并不能根治。肌注疫苗后的梭鱼在20d左右便出现死亡,除疫苗的质量存在一定的问题外,后期的饲养管理也有欠缺。

(6)从病鱼生活的水环境可分离到9501菌株说明,水是该菌传播媒介之一。关于出血性败血病的发生与水质的关系已见诸报道,表明水体中的氨氮、亚硝酸盐含量与发病有关,水中氨氮含量过高是诱发该病的重要环境因子。因此,防治此病应着重改善养殖水环境,注意卫生,适量换水,应消灭水环境中可能存在的病原菌。特别是大批量、高密度饲养时,水环境因素更为重要。

参 考 文 献

- 中国科学院微生物研究所细菌分类组,1978,一般细菌常用鉴定方法,科学出版社,98—193。
- 汤伏生等,1995,鱼类细菌群落中的致病嗜水气单胞菌,水产学报,19(4):369—373。
- 陆承平,1992,致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述,水产学报,16(3):282—287。
- 陈怀青等,1991,黄鳝出血性败血症的病原,中国人兽共患病杂志,7(4):21—23。
- 杨正时,1990,气单胞菌分类学研究进展,中国人兽共患病杂志,6(1):49—52。
- 林万明译,1980,医学细菌生化试验鉴定手册,人民卫生出版社,1980。
- 韩文瑜等,1992,病原细菌检验技术,吉林出版社,10—110。
- Devesa S. *et al.*, 1985, First report of vibriosis in turbot (*Scophthalmus maximus*) cultured in northwestern Spain, In: Fish and shellfish Pathology, New York: Academic Press, 131—140。
- Furniss A. L. *et al.*, 1978 The vibrios, Public Health Laboratory Service Monograph Series NO. H, Her Majesty's stationery office, London。
- West P. A. *et al.*, 1984, Identification and description of vibriaceae—An overview, In: Vibrio in the environment, Edited by R. R. Colwell, John Wiley, New York, 285—363。

STUDY ON HEMORRAGIC SEPTICAEMIA IN MUGIL SO-LIUY BASILEWSKY*

Liang Dehai, Wang Xincheng

(*Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences*)

Wang Wenxing, Song Qinyun

(*The First Institute of Oceanology, State Oceanic Administration*)

ABSTRACT

This paper reported that a bacteria was isolated from the Mugil so-liuy Basilewsky of hemorrhagic septicaemia and confirmed pathogenetic bacteria by artificial infection. The strain was observed by morphological. TEM and this biochemical characteristics were also tested. According to Bergey's Manual of systematic Bacteriology this isolate was identified as *Aeromonas hydrophila*. The major characteristics of this strain were rod-shaped body, Gram-negative, monopolar flagellum. the biochemical characteristics of the strain were that oxidizing enzyme and Catalase was positive; Vp test was negative; glucose were fermented but gum sugar were not done; His decarboxylase and Arg decarboxylase were negative et al. else.

* Contribution No. 3769 from the Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences.