

文章编号: 1000-0615(2000)05-0467-05

剑尾鱼在检测细菌毒力方面的应用

潘厚军, 吴淑勤, 李凯彬, 黄志斌, 石存斌

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380)

摘要: 用18株从鱼类所分离的细菌攻毒剑尾鱼, 结果显示细菌对剑尾鱼的毒力与回归感染或攻毒敏感鱼的毒力结果较为一致, 另外, 用剑尾鱼感染病原菌的适宜途径为背肌注射, 与原代比较, 近交高代剑尾鱼个体之间对病原菌的反应较为一致, 感染后死亡时间相对集中。水生实验动物剑尾鱼在检测鱼类细菌的毒力方面有较好的应用前景。

关键词: 剑尾鱼; 细菌毒力; 检测

中图分类号: S94 文献标识码: A

Application of *Xiphophorus helleri* to detection of virulence of fish pathogenic bacteria

PAN Hou-jun, WU Shu-qin, LI Kai-bin, HUANG Zhi-bin, SHI Cun-bin

(Pearl River Fisheries Research Institute, CAFS Guangzhou 510380, China)

Abstract: Swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) were infected with 18 strains of fish bacteria. The result showed that the sensitivity of swordtail fish to the strains was coincident with that of the fishes from which the strains of bacteria were isolated or other sensitive fishes. It occurred notably stair-changes of dead rates to strong, medium strong and weak virulence strains. The appropriate route of swordtail fish infected with pathogenic bacteria was injection in the dorsal muscle. The individual difference of the high generation swordtail to the pathogenic bacteria was less than the primary generation. And it had shorter time from the first infected fish to death to the last one of the same group. The research suggests that the purebred swordtail fish have good prospects as an aquatic laboratory animal in detection of the virulence of fish pathogenic bacteria.

Key words: *Xiphophorus helleri*; virulence of fish pathogenic bacteria; detection

在鱼病的诊断中, 需经常分离细菌, 为了验证细菌是否有毒力, 常规的方法是进行回归感染, 即找到与染菌鱼同一个品种的鱼作为实验材料, 用分离的细菌进行人工攻毒。对于一些常见的养殖品种, 如白鲢、鳊鱼、草鱼等材料容易找到, 但这些实验用鱼有时背景不清, 隐性感染病原或营养状况不好, 实验时容易死亡而影响实验结果。对于一些名贵或较新的养殖品种, 有时很难找到合乎要求的实验鱼。剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)作为水生实验动物的培育对象, 其体型较小, 繁殖周期短, 便于在实验室内饲养管理, 是作为标准实验动物的好材料。为了探讨水生实验动物剑尾鱼在细菌毒力检测方面的应用, 我们进行了此实验。

收稿日期: 1999-03-21

资助项目: 农业部“九五”重点渔业科研计划项目(渔95-B-96-02-01-04)

作者简介: 潘厚军(1968-), 女, 湖南省宁乡县人, 助理研究员, 理学学士学位, 主要从事鱼病学研究。Tel: 020-81501592. E-

mail: phj001@163.net

1. 材料与方法

1.1 实验鱼类

剑尾鱼(原代或近亲繁殖第12代), 体长5~7cm, 体重2.0~3.8g, 为本课题组养殖。东北鲫, 体长6.6~8.0cm, 体重3.6~5.6g; 麦鲮, 体长6.0~7.8cm, 体重2.8~5.0g; 泥鳅, 体长13.5~15.2cm, 体重13.8~16.2g; 鳊, 体重50~75g; 鳙, 体重8~10g。均取自珠江水产研究所良种基地。经水族箱暂养一星期, 确认健康无病后用于实验。

1.2 菌株

从鱼类分离的细菌菌株共18株, 其中6株菌, 由上海水产大学、水生生物研究所等单位惠赠或购买; 另12株菌, 由珠江水产研究所水生经济动物病害防治研究中心从东北鲫、麦鲮、鳊、泥鳅等病鱼中分离。详见表1。

1.3 培养基

营养琼脂: 上海生物制品研究所生产, 用于细菌的扩大培养和再分离培养。

1.4 实验条件

实验在装水容量40L的圆柱形白色塑胶桶或1m×0.5m×0.5m水族箱中进行。实验期间, 水温为25~28℃, pH7.2~7.5, 溶氧>5.0mg·L⁻¹, 总硬度(以CaCO₃计)66.0~73.1mg·L⁻¹, 总碱度(以CaCO₃计)57.0~59.2mg·L⁻¹, 氨氮<0.35mg·L⁻¹, 亚硝酸盐氮<0.01mg·L⁻¹。

1.5 实验方法

1.5.1 剑尾鱼人工感染致病菌适宜途径探讨

嗜水气单胞菌JY1和爱德华氏菌E895205在营养琼脂上28℃培养24h, 用生理盐水配成一定浓度的菌悬液注射或浸泡, 或直接用菌苔涂抹攻毒剑尾鱼。实验分组为: 背肌注射菌液不同浓度组; 鱼体刮鳞与不刮鳞浸泡菌液组; 刮鳞与不刮鳞涂菌于表皮组和棉签涂菌于鳃组。

对照组分为: 注射生理盐水组; 生理盐水涂鳃组; 仅刮鳞不感染细菌组和空白组。

人工感染后第16h, 每组取剑尾鱼2尾, 从肝脏(L)和肌肉(M)再分离细菌并参照文献[8-10]进行鉴定, 探讨各种不同的感染方式是否能分离到原攻毒菌。

1.5.2 剑尾鱼与其他实验鱼对几种菌株的敏感性比较

18株实验菌株在营养琼脂上28℃培养24h, 用生理盐水配成一定浓度的菌悬液, 背肌注射攻毒剑尾鱼和菌所分离的鱼品种(或敏感鱼)。注射剂量剑尾鱼每1g体重注射0.01mL, 为0.02~0.04mL·尾⁻¹, 麦鲮、东北鲫0.05mL·尾⁻¹, 泥鳅、鳙0.10mL·尾⁻¹, 鳊0.20~0.30mL·尾⁻¹。观察试验鱼发病时间、症状, 记录死亡数。

表1. 实验菌株来源、种类及所分离的鱼品种

Tab. 1 The origin, species and the fish species from which isolated of the test bacteria strains

菌名	菌株编号	分离鱼种	来源	参考文献
嗜水气单胞菌(Ah)	D-11-1	异育银鲫	上海水产大学	[1]
	89-7-14	异育银鲫	上海水产大学	[1]
	SI78-3-3	鲢	水生生物研究所	[2]
	JY1	东北鲫	本中心	
	JY2	东北鲫	本中心	
	JY3	东北鲫	本中心	
	LY1	鳊	本中心	
	GY1	鳊	本中心	
	NQ1	泥鳅	本中心	
	JWY1	剑尾鱼	本中心	
苏伯利气单胞菌(As)	N-1-2	异育银鲫	上海水产大学	[1]
	CR79-1-1	草鱼	水生生物研究所	[3]
	GY2	鳊	本中心	
浙江爱德华氏菌(S)	E895205	鳙	浙江水产学院	[4]
类志贺邻单胞菌(P _s)	GY3	鳊	本中心	
革兰氏阳性菌(G ⁺)	GY4	鳊	本中心	
腐败假单胞菌(P _p)	NQ2	泥鳅	本中心	
弗劳地柠檬酸杆菌C _f	JWY2	剑尾鱼	本中心	

1.5.3 原代与近交第12代剑尾鱼对细菌的敏感性比较

用嗜水气单胞菌 JY1 和爱德华氏菌 E895205 攻毒原代和近交第 12 代剑尾鱼, 方法同 1.5.2, 比较原代与近交高代剑尾鱼对病原菌的敏感性差异。

2. 结果

2.1 人工感染致病菌适宜途径探讨

表 2 为各种不同方法对剑尾鱼人工感染 JY1 (Ah)和 E895205(E)的结果(水温 25~26℃)。其中注射生理盐水组和仅刮鳞不感染细菌的对照组剑尾鱼正常, 生理盐水涂鳃的对照组 6 尾中死亡 1 尾。背肌注射、刮鳞浸泡、刮鳞涂表皮、鳃涂抹菌苔等方式, 均能使剑尾鱼感染病原菌 JY1 和 E895205。

2.2 对 18 株菌的敏感性比较

2.2.1 人工感染病原菌的症状与致死时间比较

剑尾鱼人工感染各类病原菌与回归感染症状较为相似。如嗜水气单胞菌和温和气单胞菌回归感染, 出现注射部位红肿发炎、肌肉充血等症状; 攻毒剑尾鱼, 同样出现上述症状。与其他实验鱼比较, 剑尾鱼背肌注射病原菌后, 死亡时间相近, 也大多处在 16~48h 之间。

2.2.2 人工感染病原菌的敏感性比较

实验菌株背肌注射攻毒剑尾鱼和菌分离的鱼品种(或敏感鱼), 比较菌株对剑尾鱼和其他实验鱼的毒力。结果显示, 10 株嗜水气单胞菌和 3 株温和气单胞菌, 对剑尾鱼与菌分离鱼或敏感鱼的毒力较为吻合。JY3 和 CR-79-1-1 对东北鲫毒力较弱, 对剑尾鱼毒力亦较弱; 中等毒力菌株 JY2 对剑尾鱼毒力亦为中等; 另 10 株毒力较强的细菌对剑尾鱼毒力亦较强。5 株非气单胞菌类细菌(E895205, GY3, GY4, NQ2, JWY2), 其中从剑尾鱼分离的无毒的弗劳地柠檬酸杆菌 JWY2, 对东北鲫也无毒力; 从泥鳅分离的中等毒力菌株 NQ2, 对剑尾鱼毒力亦为中等; 另 3 株从鳊、鳊分离的菌对剑尾鱼毒力都较强, 与回归感染显示的毒力亦较为吻合(表 3)。

2.3 原代与近交第 12 代剑尾鱼对病原菌的敏感性比较

原代和近交第 12 代剑尾鱼, 用 JY1 (Ah)和 E895205(E)背肌注射攻毒。比较原代与近交高代剑尾

表 2 剑尾鱼经注射、浸泡、涂抹感染嗜水气单胞菌 (Ah)JY1 和爱德华氏菌(E)E895205 的情况

Tab 2 The results of swordtail infected with *Aeromonas hydrophila* (Ah) JY1 and *Edwardsiella zhejiangensis* sp. nov (E) E895205 by injecting socking or smearing

感染途径	菌株	菌液浓度 (ind·mL ⁻¹)	死亡数/实验数	是否分离到原攻毒菌
背肌注射	JY1	3.0×10 ⁷	6/6	是
	E895205	3.0×10 ⁷	4/6	是
刮鳞浸泡	JY1	3.0×10 ⁷	6/6	是
	E895205	3.0×10 ⁷	5/6	是
不刮鳞浸泡	JY1	3.0×10 ⁷	0/6	否
	E895205	3.0×10 ⁷	0/6	否
刮鳞, 菌涂表皮	JY1	平板上原菌苔	6/6	是
	E895205	同上	6/6	是
不刮鳞, 菌涂表皮	JY1	平板上原菌苔	0/6	否
	E895205	同上	0/6	否
菌涂鳃	JY1	平板上原菌苔	6/6	是
	E895205	同上	6/6	是

表 3 菌株对剑尾鱼与菌分离鱼或敏感鱼毒力比较

Tab.3 Comparison of the virulence of bacteria to swordtail and to the fishes from which the bacteria were isolated or other sensitive fishes

菌名	菌株编号	对菌分离鱼或敏感鱼毒力		对剑尾鱼毒力
		鱼品种	毒力	
嗜水气单胞菌(Ah)	D-II-1	东北鲫	强	强
	89-7-14	东北鲫	强	强
	ST78-3-3	东北鲫	强	强
	JY1	东北鲫*	强	强
	JY2	东北鲫*	中	中
	JY3	东北鲫*	弱	弱
	LY1	鲮*	强	强
	GY1	鳊*	强	强
	NQ1	泥鳅*	强	强
	#JWY1	东北鲫#	强	强
苏伯利气单胞菌(As)	N-1-2	东北鲫	强	强
	CR79-1-1	东北鲫	弱	弱
	GY2	鳊*	强	强
浙江爱德华氏菌(E)	E895205	鳊 鳊*	强	强
类志贺邻单胞菌(Ps)	GY3	鳊*	强	强
革兰氏阳性菌(G+)	GY4	鳊*	强	强
腐败假单胞菌(Pp)	NQ2	泥鳅*	中	中
弗劳地柠檬酸杆菌(Cf)	#JWY2	东北鲫#	无毒	无毒

注: “*” 示对应菌株分离的鱼品种; 2; “#” 示菌株从剑尾鱼分离。

鱼对病原菌的敏感性差异得知,原代与近交第12代剑尾鱼对两株病原菌的敏感性较为接近。但近交高代剑尾鱼感染JY1死亡时间集中在18~42h内;感染E895205死亡时间集中在18~48h内。而原代剑尾鱼感染病原菌后,实验组鱼个体死亡时间差别较大,感染JY1死亡时间18~72h;感染E895205死亡时间在18~90h(表4)。

表4 JY1和E895205感染原代与第12代剑尾鱼情况

Tab. 4 The states of the primary and the 12th generation swordtail infected by JY1 or E895205

菌株	感染剂量 (ind·g ⁻¹)	剑尾鱼	死亡数/ 实验数	鱼体死亡时间
JY1	3×10 ⁴	原代	1/6	24h内死亡
		第12代	2/6	18~24h内死亡
JY1	3×10 ⁵	原代	6/6	18~42h死4尾,42~72h死2尾
		第12代	6/6	18~42h内死亡
E895205	3×10 ⁵	原代	4/6	18~48h死3尾,另1尾约90h死亡
		第12代	4/6	18~48h内死亡
E895205	3×10 ⁶	原代	6/6	18~48h死5尾,另1尾约66h死亡
		第12代	6/6	18~48h内死亡

3 讨论

3.1 剑尾鱼在替代其他鱼类进行病原菌毒力检测方面应用的可行性

从表3结果,18株细菌攻毒剑尾鱼与菌分离的鱼品种(或敏感鱼),毒力结果较为一致。其中6株来源于上海水产大学、水生生物研究所等外单位的菌株(编号为D-II-1,89-7-14,ST78-3-3,N-1-2,CR79-1-1,E895205),与攻毒敏感鱼或回归感染的结果较为相近;与原单位所做的回归感染结果亦较为一致^[1-4]。除CR79-1-1外,另5株菌对剑尾鱼毒力都较强;而剑尾鱼对CR79-1-1不太敏感的原因是此株菌毒力较弱,据徐伯亥报道^[3],此菌是草鱼尾柄病的病原菌,用约9.0×10⁶ ind·g⁻¹体重的剂量尾鳍基部注射草鱼,10尾中有7尾出现症状,但未死亡,说明此菌毒力较弱。

本实验共测定了18株细菌的毒力,其中气单胞菌类13株,与攻毒菌分离的鱼品种(或敏感鱼)的毒力结果较为吻合,说明剑尾鱼在替代其他鱼类检测气单胞菌类细菌的毒力方面具有一定的使用价值。至于其他种类的病原菌,本实验所涉及的种类较多,但株数较少,仍有待进一步实验。

3.2 剑尾鱼检测鱼类病原菌毒力的适宜方法

本研究探讨了剑尾鱼人工感染病原菌的适宜途径。据表2结果,剑尾鱼通过注射、浸泡或涂抹等方式均能人工感染病原菌,且均能在染毒鱼的肌肉和肝脏中分离到原攻毒菌。但采用浸泡、表皮涂菌方式,需拔去几片鳞片,因剑尾鱼个体较小,拔鳞、鳃涂菌苔等操作均易损伤鱼体,特别是鳃涂菌苔方式。实验结果表明背肌注射是一种较佳的感染途径。

3.3 水生实验动物——纯系剑尾鱼应用在检测鱼类病原菌毒力方面的意义

实验动物(包括水生实验动物)是医学、生命科学的基础和重要支撑条件,是评价一个国家或地区的生命科学水平高低的重要标志之一。实验动物遗传背景均一,用于实验重复性好,可比性强^[11]。在我国,水生实验动物研究比陆生实验动物发展较为落后。但水环境污染、水体中药物的安全使用等迫切需要水生实验动物。剑尾鱼近交品系的研究成功,将填补我国水生实验动物研究的空白。

本实验探讨了剑尾鱼应用在鱼类病原菌毒力检测方面的可行性。本研究显示,我们选育的近交第12代剑尾鱼与原代比较,近交高代鱼不同个体之间对病原菌的反应较为一致,感染病原后,死亡时间相对集中。作者认为,将来提供的纯系剑尾鱼(近交20代)作为病原菌毒力检测的实验鱼类,可望

与陆生实验动物一样,结果重复性好,可比性强,实验结果将更为可靠。水生实验动物——剑尾鱼在鱼类病原菌的研究中,可望作为人工感染的替代模型,将具有较好的应用前景。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 徐伯亥,葛蕊芳,熊木林.鲢鳙鱼的打印病致病细菌的研究[J].海洋与湖沼,1980,11(1):85-93.
- [3] 徐伯亥,葛蕊芳,熊木林.草鱼尾柄病及其与其它体表病关系的研究[J].水生生物学报,1986,10(1):39-51.
- [4] 王国良,徐兴林,路正.鳊鲡爱德华氏病原菌及一新种[A].全国首届青年水产学术研讨会论文集[C],1995,458-463.
- [5] 张碧波,张立怀,秦贞奎,等.运动性气单胞菌的毒力及其致病性观察[J].鱼类病害研究,1998,20(1-2):9-12.
- [6] 贺路,左文功,蔡传奇,等.沙市地区暴发性传染病病原研究[J].淡水渔业,1992年第3期:13-15.
- [7] 蔡妙英,卢运玉,赵玉峰.细菌名称(第二版)[M].北京:科学出版社,1996,33-34,172,219,471,425.
- [8] 中国科学院北京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,1978,6-203.
- [9] 潘厚军,吴淑勤,黄志斌,等.细菌生化编码微量鉴定系统在鱼病诊断中的应用[J].中国水产科学,1995,2(5):87-93.
- [10] 中国科学院微生物研究所(译),伯杰细菌鉴定手册(第八版)[M].北京:科学出版社,1984,382-390,474-488.
- [11] 张业彬,吴白燕.实验动物在生物医学中的应用与选择[M].北京:科学出版社,1997,1-31.
- [12] Noel R John G H. Bergey, s Manual of Systematic Bacteriology, (9th Ed.)[M]. 1984,545-550.

湛江“海博会”紧锣密鼓筹备 南国港城欢迎八方宾客

令人瞩目的2000湛江海洋经济博览会,将于2000年11月25日至11月30日在美丽的南国港城湛江隆重举行。

近年来,湛江海洋经济发展取得可喜的成绩。举办“2000湛江海洋经济博览会,旨在抓住国家加快加入WTO步伐和西部大开发的机遇,展示海洋资源优势 and 沿海城市海洋经济发展成果,推动海洋资源的开发与利用,加快“蓝色产业”聚集带建设,营造海洋经济新热点,促进沿海城市与西部城市的经贸合作。去年,湛江市成功地举办了“两会”(西南经济区市长联席会第十三次会议和99湛江经贸博览会),今年的“海博会”,将是湛江增创新优势和推进二次创业的又一重大举措。“海博会”由湛江市人民政府主办,国家海洋局、广东省海洋与渔业局、科技部高技术计划海洋领域办公室、全国经协组织联合会、中国水产学会、中国水产流通与加工协会、中国宝石协会等协办。“海博会”的主题和亮点是“海洋经济”,围绕“海”字做文章。主要活动项目有:南海海洋资源综合开发战略高级研讨会;全国水产品暨水产新技术交易会;中国(湛江)珍珠节;海洋科技人才交流;滨海旅游招商推介;湛江海洋高新科技园招商;水产饲料推介;友好城市、港口合作;我国海洋大学联合办学;海洋沙滩排球赛等。届时将邀请国家有关部门、广东省有关部门、海洋水产科研机构和大专院校、国内外沿海城市涉海单位的领导和专家,以及国内外参展企业、客商等约5000多人出席。“海博会”还不仅仅限于海洋方面的内容,还将在主展场设置综合馆和山海厅,山海优势互补,共寻商机,共同发展。

联系电话:0759-3358056,3314547

联系人:柯玉莲,吴新舫