

鳖穿孔病的病原研究

孙佩芳 蔡完其 吴建农 何 刚

(上海水产大学, 200090)

摘 要 鳖穿孔病是我国养鳖业的主要疾病之一,其发病对象主要是稚鳖。从垂死的鳖体中分离到 M-II-3、M-5、M-I-3 和 M-II-2 四株细菌。经人工感染试验均对健康稚鳖表现出较强的致病力,出现与自然病鳖相同的症状。由此证实这四菌株是鳖穿孔病的病原菌。对菌体形态特征、培养特性和生理生化反应的鉴定证明致病菌为嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)和普通变形菌(*Proteus vulgaris*)。

关键词 鳖,穿孔病,嗜水气单胞菌,普通变形菌

鳖是名贵的营养与药用水产品,八十年代以来我国养鳖业迅猛发展,与此同时鳖病也日趋严重,鳖穿孔病就是其中之一。其主要症状为:稚鳖行动迟缓;食欲减退;背腹部、裙边和四肢出现白点,呈疮痂状,揭去疮痂可见深的洞穴,严重者洞穴内有出血现象;肠充血,肝灰褐色,肺褐色,脾肿大变紫,胆汁墨绿色。对于鳖穿孔病的致病原因,曾有人报导为嗜水气单胞菌[川崎义一,1982;蔡完其,1985、1995]。本文先从患穿孔病的稚鳖分离到菌株,继而进行人工感染试验和细菌学鉴定,以确定致病病原,为防治提供可靠依据。

1 材料与方 法

1.1 病原菌分离

病鳖分别于 1994 年 7 月间采自上海市佳马特种水产养殖场。垂死病鳖体重为每只 25 克左右,均具穿孔病症状。选用清水洗净病鳖体表,在无菌操作下,用 75% 酒精棉球擦试体表上的点状疮痂,以无菌镊子挑开疮痂,用接种环挑取洞穴中内容物少许,于营养琼脂平板划线分离。然后打开腹腔,取血和肝组织少许,作同上分离。置 28℃ 孵育箱中培养 24h,待平板上出现形态一致的优势菌落,先取单个菌落进一步划线纯化,如此反复,直致获得纯培养, M-II-3、M-5、M-I-3、M-II-2 四菌株。然后转接到营养琼脂斜面保存,供试验用。

1.2 人工感染试验

将上述四菌株分别接种于营养琼脂斜面,置 28℃ 孵育箱中培养 16~18h,用无菌生理盐水洗下菌苔,制成菌悬液,以 MCF3 号管分别测得菌液浓度均为 9×10^8 CFU/ml。取 25 克左右健康鳖进行腹腔注射,每菌株各注射 3 只鳖,剂量分别为 0.1、0.2 和 0.3ml。对照组中注射生理盐水,每只剂量同上。用不同菌株感染的鳖置于不同水族箱中,于 $(24 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 水温中饲养。然后再重复感染一次,方法同上。试验组共用鳖 24 只,对照组共用鳖 6 只。

1.3 病原菌的分类鉴定

病原菌生物学性状的测定按照《一般细菌常用鉴定方法》[中国科学院微生物研究所细菌分类组, 1978]、Popoff[1984]和 Penner[1984]等方法进行。鉴定菌株均经营养琼脂斜面于 28℃ 恒温培养, 16~18h 活化后再进行菌体形态学观察及生理生化试验。

2 结果

2.1 细菌的致病性

试验组中, M-II-3、M-5、M-I-3 和 M-II-2 四菌株对稚鳖均有较强的致病力, 发病或死亡率为 100%, 发病鳖的症状与自然病鳖症状一致。对照组鳖均健康活泼, 无任何症状。由此证实上述四菌株为鳖穿孔病的病原菌。

2.2 病原菌的分类鉴定

M-II-3 和 M-5 二菌株均为革兰氏阴性短杆菌, 分散排列, 少数成对或短链状。极生单鞭毛(图 1), 无荚膜, 无芽孢。于 28℃ 恒温培养 24h 营养琼脂平板表面菌落圆形, 略隆起, 光滑湿润, 浅黄褐色, 中心色深。在血琼脂平板上有明显乙型溶血。肉汤培养基中均匀混浊, 表面沿管壁有微量环状生长, 逐渐呈少量薄膜状, 一摇即散。氧化酶阳性, 不发酵肌醇, 对弧菌抑制剂(0/129)不敏感, 发酵葡萄糖产气, 发酵蔗糖、甘露醇及阿拉伯糖。不发酵纤维二糖、乳糖。水解七叶苷, 利用精氨酸、组氨酸。精氨酸双水解酶、赖氨酸脱羧酶阳性, 鸟氨酸脱羧酶和苯丙氨酸脱氨酶阴性(见表 1)。这与 Popoff[1984]对嗜水气单胞菌描述一致。

M-I-3 和 M-II-2 二菌株均为革兰氏阴性短杆菌, 有明显多形性, 分散排列, 少数成对或短链状, 周生鞭毛(图 2), 无荚膜, 无芽孢。于 28℃ 恒温培养 24h 营养琼脂平板表面有泳动现象, 不发光, 不产生色素。肉汤培养基中均匀混浊生长。氧化酶阴性, 苯丙氨酸脱氨酶阳性, 发酵葡萄糖产气。发酵蔗糖、麦芽糖。不发酵纤维二糖、阿拉伯糖及乳糖。精氨酸双水解酶、赖氨酸脱羧酶和鸟氨酸脱羧酶均为阴性。液化明胶等(见

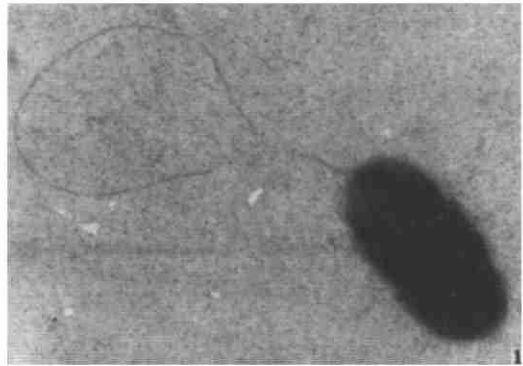


图 1 M-II-3 菌株电镜照片($\times 14000$)
Fig. 1 Electron micrograph
of strain M-II-3($\times 14000$)

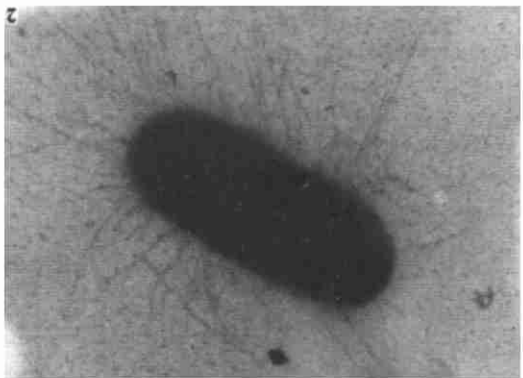


图 2 M-II-2 菌株电镜照片($\times 22000$)
Fig. 2 Electron micrograph of strain M-II-2($\times 22000$)

表1)。这与 Penner[1984]中对普通变形菌的叙述一致。

表1 M-II-3、M-5、M-I-3和M-II-2

四菌株的生理生化特性与嗜水气单胞菌、普通变形菌*的比较

Table 1 Comparison of M-II-3、M-5、M-I-3 and M-II-2 Strains and *A. hydrophila* *P. Vulgaris* respectively in physio-biochemical characteristics

鉴定项目	菌名					
	M-II-3	M-5	嗜水气单胞菌	M-I-3	M-II-2	普通变形菌
氧化酶	+	+	+	-	-	-
35~37℃营养肉汤中生长	+	+	+	+	+	+
葡萄糖氧化发酵试验(O/F)	F	F	F	F	F	F
葡萄糖产气	+	+	+	+	+	+
乳糖	-	-	-	-	-	-
麦芽糖	+	+	+	+	+	+
蔗糖	+	+	+	+	+	+
阿拉伯糖	+	+	+	-	-	-
纤维二糖	-	-	-	-	-	-
鼠李糖	-	-	-	-	-	-
七叶苷	+	+	+	+	+	+
水杨苷	+	+	+	-	-	-
甘露醇	+	+	+	-	-	-
山梨醇	-	-	-	-	-	-
肌醇	-	-	-	-	-	-
丙二酸盐	-	-	-	-	-	-
柠檬酸盐(西蒙氏)	-	-	-	-	-	-
H ₂ S产生(TSI)	+	+	d	+	+	+
从半胱氨酸产生H ₂ S	-	-	-	-	-	-
L-组氨酸利用	+	+	+	-	-	-
L-精氨酸利用	+	+	+	-	-	-
精氨酸双水解酶	+	+	+	-	-	-
赖氨酸脱羧酶	+	+	+	-	-	-
鸟氨酸脱羧酶	+	+	+	-	-	-
苯丙氨酸脱氨酶	-	-	-	-	-	-
脲酶	-	-	-	+	+	+
明胶液化	-	-	-	+	+	+
V、P	+	+	+	+	+	+
M、R	+	+	+	-	-	-
在含1%胨水中产生吲哚	-	-	-	+	+	+
抑菌抑制剂(0/129)	+	+	+	+	+	+
(10 ⁴ g/ml)	R	R	R			
150 ⁴ g/ml	R	R	R			

* Popoff[1984]; Penner[1984]。

综上所述,根据四菌株的形态特征,培养特性和生理生化反应鉴定结果 M-II-3 和 M-5 二菌株均为嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila* stanier), M-I-3 和 M-II-2 二菌株为普通变形菌(*Proteus Vulgaris* Hauser)。

3 讨论

(1)嗜水气单胞菌在水体中广泛分布,寄主范围广,软体动物三角帆蚌的蚌瘟,两栖动物蛙

的红腿病,多种淡水鱼类的暴发性败血症[陆承平,1992]、鳖红脖子病(杨 臣等,1988)、鳖赤斑病(孙其焕等,1988)和鳖出血性败血症[凌天慧等,1991]。其病原均为嗜水气单胞菌。

嗜水气单胞菌过去多认为是条件致病菌,近年来已有报导证明,同样是嗜水气单胞菌,从鱼体分离的致病菌株比从水中分离的菌株对鱼体皮肤粘液更有亲嗜性[Hazen,1982]。又有资料证明该菌也是人类急性胃肠道感染的病原菌之一[李仲兴,1986]。更多的研究者指出致病菌株能产生非致病菌株所不能产生的溶血素和肠毒素等外毒素。本试验的 M-Ⅱ-3 和 M-5 二菌株(嗜水气单胞菌)出现明显的乙型溶血。这可能就是使鳖致病死亡的主要原因之一。外界环境条件如水温、水质等固然对致病有影响,但细菌的内在因素往往起更主导的作用。作者认为,与其说嗜水气单胞菌是条件致病菌,不如说是致病性细菌。

(2)从患穿孔病的鳖体中分离到嗜水气单胞菌的同时,还分离到肠杆菌科细菌——普通变形菌,在国内尚未见有报导。普通变形菌广泛分布于污水中,是条件致病菌,可引起鱼类鳍和头部溃烂及引起对虾红腿病等。许 兵等[1992]报导该菌往往从对虾体表损伤部位入侵,进入血淋巴循环系统,引起败血症。本试验从病鳖体表病灶、血液和肝脏组织都分离到此菌,其感染途径可能与对虾红腿病相似。

(3)本试验中还发现,临床症状似穿孔病,经病理观察肺、肝及肾等脏器内有大量脓细胞聚集,人工感染试验稚鳖出现与自然病鳖相同症状,细菌学鉴定结果为肺炎克雷伯氏菌。从鳖腐皮病分离的病原,经细菌学鉴定为温和气单胞菌。在人工感染试验中病鳖除出现腐皮病症状外,后期还出现穿孔病症状。上述两种病原是否也是鳖穿孔病的病原,有待进一步探讨。总之,作者认为温室养鳖的环境极差,鳖穿孔病由多种细菌引起。

本试验得到上海水产大学孙其焕副教授帮助,周孝康、张 敏同志拍摄电镜照片,一并致谢。

参 考 文 献

- [1] 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,68~71,96~97,135~187。科学出版社(京)。
- [2] 许 兵等,1992。一种新的对虾病原菌(普通变形菌)。水产学报,16(2):130~135。
- [3] 李仲兴,1986。临床细菌学,230~232。人民卫生出版社(京)。
- [4] 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。
- [5] 凌天慧等,1991。甲鱼出血性败血症的调查研究。水产科技情报,18(5):144~145。
- [6] 蔡完其,1985。鳖病防治。淡水渔业,3:30~31。
- [7] 蔡完其等,1995。鳖穿孔病的防治。水产科技情报,22(4):162。
- [8] 川崎义一,1992。スツボン习性と农山渔村文化协会,82~83。
- [9] Hazen, T. C. et al., 1978. Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States. *APPI. Env. Microbiol.* 7:371~375。
- [10] Peneer, J. L., 1984. Genus proteus. In: *Bergey's Manual of systematic Bacteriology* (Ed by J. G. Holt), Vol. 1, 491~494. Williams & Wilkins, Baltimore.
- [11] Popoff, M. 1984. Genus III *Aeromonas*. In: *Bergey's Manual of systematic Bacteriology* (Ed by J. G. Holt), Vol. 1, 545~548. Williams & Wilkins, Baltimore.

(1)杨 臣等,1988。甲鱼“红脖子病”的研究。鱼病简讯,(3):53~57。

(2)孙其焕等,1988。鳖赤斑病的病原研究。鱼病简讯,(3):58~63。

PATHOLOGY OF THE CAVERNED DISEASE OF SOFT-SHELLED TURTLE

Sun Peifang, Cai Wanqi, Wu Jiannong and He Gang

(Shanghai Fisheries University, 200090)

ABSTRACT The caverned disease of soft-shelled turtle (*Amyda sinensis*) is one of the major diseases in turtle culture industry in China. This disease harms the juvenile turtle mostly. Four strains, M-II-3, M-5, M-I-3 and M-II-2 were isolated from the moribund soft-shelled turtles. Through the artificial infection all the strains tested have had a higher pathogenicity. They can seriously infect the healthy juvenile turtles with a similar characters to natural diseased ones. It proved that they were the pathogens of caverned disease. According to the morphological features of the bacterium, cultural performances, and physio-biochemical reactions, these strains had been identified as *Aeromonas hydrophila* stanier and *Proteus vulgaris* Hauser.

KEYWORDS Soft-shelled turtle, Caverned disease, *Aeromonas hydrophila*, *Proteus vulgaris*