

中华鳖疔疮、红脖子、赤斑病并发症 的病原研究

周剑光 杨先乐* 艾晓辉

(中国水产科学研究院长江水产研究所, 荆州 434000)

(农业部水产增殖生态、生理重点开放实验室, 上海水产大学, 200090)*

摘 要 从患疔疮、红脖子、赤斑病并发症的病鳖肝脏分离到多株细菌, 其中一株经人工感染证实为病原菌, 又经 30 多项形态、生理、生化特性测试, 鉴定为嗜水气单胞菌, 其主要特性为短杆状($0.36 \sim 0.71 \mu\text{m} \times 1.0 \sim 1.4 \mu\text{m}$), 革兰氏阴性, 极端单鞭毛, 无荚膜, 不产生芽孢, 具运动性, ONPG 反应、精氨酸双水解酶、吲哚、V-P 反应、明胶酶、氧化酶、七叶灵均阳性, 发酵葡萄糖、甘露醇、蔗糖和 D-阿拉伯糖产酸, 赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶、柠檬酸盐利用、 H_2S 、脲酶、吲哚丙酮酸 (IPA) 均阴性。对银鲫的 LD_{50} 为 $9.17 \times 10^5 \text{CFU/尾}$, 对小白鼠的 LD_{50} 为 $1.59 \times 10^7 \text{CFU/只}$ 。生长最适温度、盐度和 pH 值范围分别为 $25^\circ\text{C} \sim 35^\circ\text{C}$ 、 $5 \sim 15$ 、 $6.5 \sim 7.5$ 。对环丙沙星、氟喹酮、丁胺卡那霉素、氯霉素、强力霉素、四环素、卡那霉素、氨基南、乙基西羧霉素、头孢呋新、氧哌嗪青霉素、头孢噻肟、头孢三嗪、头孢噻甲羧肟等药物高度敏感。

关键词 中华鳖, 疔疮病, 红脖子病, 赤斑病, 病原, 嗜水气单胞菌

近年来, 随着我国鳖养殖业的迅猛发展, 其各种疾病不断发生, 常引起大批死亡, 给养殖户造成巨大的经济损失。中华鳖的疔疮、红脖子、赤斑病并发症, 是一种严重危害成鳖和亲鳖的暴发性传染病, 死亡率可达 $20\% \sim 30\%$ 以上。其外部主要症状为背腹甲及四肢基部出现疔疮, 内有米状物, 严重者疔疮溃烂成洞穴; 颈脖红肿充血, 伸缩困难; 腹甲出现多个大小不一的红斑, 并逐渐溃烂。孙其焕和肖克宇 [1988], 杨臣和曹生福 [1988], 肖克宇等 [1991], 孙佩芳等 [1996], 杨广等 [1998] 分别对鳖的赤斑病、红脖子病、疔疮病、穿孔病和红底板病的病原进行了初步研究, 其病原均为嗜水气单胞菌。对于中华鳖的疔疮、红脖子、赤斑病并发症的病原研究, 目前尚未见专门报道。我们自 1993 年以来, 从病原菌的分离、生理生化特性、致病性及致病力等方面开展了对该病的研究工作, 证明嗜水气单胞菌是该病的主要病原。

1 材料与方法

1.1 实验材料

被检病鳖, 取自湖北省荆沙地区中华鳖养殖场 (户) 患疔疮、红脖子、赤斑病并发症的濒死病鳖; 银鲫, 本课题组自养夏花鱼种, 体重 $5 \sim 10\text{g/尾}$; 小白鼠, 荆州市职工医学院实验动物组提

供, 体重 15~20g/尾。

1.2 病原菌的分离培养

无菌操作取病鳖的肝脏划线接种于普通肉汤平皿, 置 28℃ 恒温箱培养 18~24h, 挑取优势单菌落进一步划线分离纯化, 供人工感染与鉴定用。

1.3 人工感染试验

首次人工感染试验: 将分离纯化的菌株接种到肉汤斜面, 28℃ 恒温培养 18h, 用 0.85% 无菌生理盐水洗下菌苔, 采用比浊法将浓度稀释成 3×10^8 个/mL。对 200~300g 健康中华鳖后肢基部注射及采用背甲划痕接种菌悬液 0.5mL, 设对照组注射无菌盐水 0.5mL。饲养于 59cm × 44cm × 33cm 水族箱内, 底铺一层 5cm 厚的细沙, 水温 (25 ± 1)℃, 定时观察记录发病及死亡情况。

人工再感染试验: 对出现典型症状的病鳖, 从肝组织重复分离细菌, 挑取呈优势且与人工感染所用菌株相似的单菌落, 纯化后再次作人工感染试验, 方法同上。

1.4 对银鲫与小白鼠半数致死量的测定

细菌数测定: 将 28℃ 恒温培养 18h 的新鲜培养物, 接种于 100mL 营养肉汤培养基, 置 30℃ 130 r/min 振荡培养 19h 和 28h, 将细菌培养物用营养肉汤培养基作不同稀释度, 以倾注平皿法测定每毫升细菌数。

对银鲫半数致死量 (LD₅₀) 测定: 将 30℃、130 r/min 振荡培养 19h 的培养物, 用营养肉汤按 2 倍稀释作 5 个不同稀释度。每个稀释度腹腔注射 4 尾 5~10g 健康银鲫, 每尾 0.2mL, 置 59cm × 44cm × 33cm 水族箱饲养, 水温 25~26℃, 设营养肉汤注射作对照。饲养观察 7 天, 按 Reed-Muench 法计算 LD₅₀。

对小白鼠 LD₅₀ 测定: 方法同上。19h 培养物, 用营养肉汤按 4 倍稀释作 5 个不同稀释度。每个稀释度腹腔注射 4 只 15~20g 小白鼠, 每只 0.2mL, 设营养肉汤作对照。观察 7 天, 按 Reed-Muench 法计算 LD₅₀。

1.5 病原菌的鉴定

菌落形态: 将纯培养物划线接种于普通肉汤平皿, 28℃ 培养 24~48h, 观察菌落形态、大小、颜色等。

染色镜检: 将纯培养物分别涂片作革兰氏、鞭毛、芽孢和荚膜染色, 镜检, 观察细菌染色特性及大小。

生理生化实验: 参照徐迪诚和蔡妙英 [1994], 中国科学院微生物研究所细菌分类组 [1978] 的方法进行。

1.6 病原菌对温度、pH 值和盐度的耐受性试验

试验用培养基为澄清的营养肉汤 (经两次过滤和灭菌), 每管 5mL, 用直针接种新鲜培养的试验菌液, 培养 1~7 天, 肉眼观察菌悬液混浊度。所设温度梯度为 2、3、4、5、10、15、20、25、28、35、37、41、42℃, pH 值梯度为 5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、11, 盐度梯度为 0、5、15、30、

35、40 和 45。

1.7 病原菌在不同高温条件下的致死时间试验

将病原菌接种于营养肉汤试管中, 适温培养生长良好后, 放入不同温度的水浴锅内, 处理一定时间后取出, 无菌操作接种平皿, 置 28℃培养 24h 后, 观察平皿长菌情况。

1.8 药敏试验

将幼龄菌液均匀涂布于肉汤平皿上, 帖上药敏试纸, 28℃恒温培养 24h 后观察并记录结果。药物敏感试纸购自上海卫生防疫站全套 51 种药物敏感试纸。

2 结果

2.1 病原菌的分离与鉴定

细菌的分离培养: 被检病鳖肝脏组织在普通肉汤平皿生长出大量细菌, 菌落圆形、边缘整齐、稍凸起、乳白色、不透明、湿润、有光泽、中等大小, 28℃培养 24h, 直径约 2~3mm。

细菌形态: 细菌纯培养物涂片、染色、镜检, 结果为革兰氏阴性短杆菌。菌体两端钝圆, 大小为 0.36~0.71 μ m \times 1.0~1.4 μ m, 大部分单个, 少数成双排列, 无荚膜, 不产生芽孢, 极端单鞭毛, 具运动力。

生理生化实验: 根据生理生化特性鉴定结果, 组合编码为 3047126, 该菌株可能为嗜水气单胞菌或温和气单胞菌[徐迪诚和蔡妙英 1994], 补充七叶灵实验, 结果产黑褐色色素, 故该病原菌为嗜水气单胞菌(表 1)。

2.2 人工感染试验

2.2.1 首次人工感染试验

注射组中华鳖于 10h 左右出现精神不振、不钻沙现象, 以后活动减少, 不怕惊, 3 只鳖分别于 21、36 和 65h 死亡, 死亡症状为: 腹甲、四肢及颈脖充血发红, 肝脏肿大, 胃肠壁血管充血, 体腔内积液较多, 最后死亡的 1 只鳖背腹甲均出现疔疮症状。背甲皮肤划痕组, 3 只感染鳖于第 4、5、6 天先后发病, 死亡时间分别为第 4、10、12 天, 症状为: 划痕处先出现腐皮, 皮肤变白, 随后出现小白色突起, 进而发展成疮疤, 内有白色米状物, 严重的出现穿孔; 腹甲、颈脖和四肢皮肤充血发红; 肝脾肿大, 胃肠道及肝脏充血发红, 腹腔有大量积液。其症状与自然发病症状相似。对照组 15 天后仍一切正常(表 2)。

2.2.2 人工再感染试验

将人工感染试验死亡鳖肝脏分离的菌株再次感染健康鳖, 方法同上。其表现症状与人工感染相同, 与自然发病症状相似。

2.3 对银鲫、小白鼠半数致死量测定

2.3.1 细菌数

将 30℃、130r/min 振荡培养 19h 和 28h 的细菌培养物, 采用倾注平皿法测定其细菌数。19h 的细菌数为 7.0 \times 10⁹CFU/mL, 28h 的细菌数为 4.2 \times 10⁹CFU/mL, 前者明显高于后者。

表 1 分离菌株的生理生化特性

Tab. 1 Physiological and biochemical characteristics of the isolated bacteria

试验项目	观察结果	判断结果	应得数值	组合编码
ONPG 反应	培养基变黄色	+	1	
精氨酸双水解酶	培养基变红色	+	2	3
赖氨酸脱羧酶	培养基无变化	-	0	
鸟氨酸脱羧酶	培养基无变化	-	0	
柠檬酸盐利用	培养基未变蓝色, 有菌生长	-	0	0
硫化氢	培养基无变化	-	0	
脲酶	培养基无变化	-	0	
吲哚丙酮酸(IPA)	培养基无变化	-	0	4
吲哚	培养基加入 Kovacs' 试剂变红色	+	4	
V - P 反应	培养基加入 V - P 试剂变红色	+	1	
明胶酶	明胶液化	+	2	7
葡萄糖	培养基变黄色	+	4	
甘露醇	培养基变黄色	+	1	
肌醇	培养基无变化	-	0	1
山梨醇	培养基无变化	-	0	
鼠李糖	培养基无变化	-	0	
蔗糖	培养基变黄色	+	2	2
蜜二糖	培养基无变化	-	0	
苦杏仁糖	培养基无变化	-	0	
D-阿拉伯糖	培养基变黄色	+	2	6
氧化酶	10 秒钟内氧化酶纸条变紫红色	+	4	
接触酶	产生气泡	+		
七叶灵	培养基产黑褐色色素	+		补充试验
L-苯丙氨酸	培养基不变绿色	-		
甲基红	培养基变红色	+		

注: + 为阳性; - 为阴性。

表 2 人工感染试验结果

Tab. 2 Results of infection test

组别	数量(只)	接种量(mL)	接种菌数(个)	死亡数(只)	死亡时间
注射组	3	0.5	3.5×10^8	3	第 21、36、65h 各死 1 只
背甲划痕组	3	0.5	3.5×10^8	3	第 4、10、12 天各死 1 只
对照	3	0.5	0	0	-

2.3.2 对银鲫、小白鼠的 LD₅₀测定

对银鲫的 LD₅₀ 为 9.17×10^5 CFU/尾(表 3), 对小白鼠的 LD₅₀ 为 1.59×10^7 CFU/只(表 4)。

2.4 病原菌对温度、pH 值和盐度的耐受性

适宜温度为 20~37℃, 最适温度为 25~35℃, 低于 3℃、高于 42℃不生长; pH 值的适宜范围为 5.5~9.0, 最适范围为 6.5~7.5, pH 值低于 5.0、高于 10.0 时不生长; 盐度的适宜范围为 0~4.0%, 最适范围为 0.5%~1.5%, 高于 4.5% 时不生长。

表 3 分离菌株对银鲫毒性试验结果

Tab. 3 Results of virulence test of the isolated bacteria on Crucian carp

细菌稀释度	细菌数(CFU/尾)	注射鲫鱼死活数				死亡比例	死亡率(%)
		绝对数		累计数			
		死亡	生存	死亡	生存		
1/64	3.13×10^6	4	0	7	0	7/7	100
1/128	1.56×10^6	2	2	3	2	3/5	60
1/256	7.81×10^5	1	3	1	5	1/6	16.67
1/512	3.91×10^5	0	4	0	9	0/9	0
1/1024	1.95×10^5	0	4	0	13	0/13	0
营养肉汤对照	0	0	4	0	4	0/4	0

表 4 分离菌株对小白鼠毒性试验结果

Tab. 4 Results of virulence test of the isolated bacteria on mice

细菌稀释度	细菌数(CFU/尾)	注射鲫鱼死活数				死亡比例	死亡率(%)
		绝对数		累计数			
		死亡	生存	死亡	生存		
1/4	3.50×10^8	4	0	13	0	13/13	100
1/16	8.75×10^7	4	0	9	0	9/9	100
1/64	2.19×10^7	3	1	5	1	5/6	83.3
1/256	5.47×10^6	2	2	2	3	2/5	40.0
1/1024	1.37×10^6	0	4	0	7	0/7	0
营养肉汤对照	0	0	4	0	4	0/4	0

2.5 病原菌在不同高温条件下的致死时间试验

测定了病原菌在 42、45、50、60、70、80 和 100℃等 7 种温度下的最短致死时间(表 5)。

2.6 药敏试验

药物敏感试验表明,病原菌株对环丙沙星、氟喹酸、丁胺卡那霉素、氯霉素、强力霉素、四环素、卡那霉素、氨基曲南、乙基西羧霉素、头孢呋新、氧哌嗪青霉素、头孢噻肟、头孢三嗪、

头孢噻甲羧肟等 14 种药物高度敏感,可选用这些药物预防和治疗因嗜水气单胞菌引起的鳖病。另外,病原菌对壮观霉素、多粘菌素 B、呋喃妥因等 12 种药物中敏,而对磺胺甲基异噁唑、头孢拉定、氨基青霉素等 25 种药物不敏感。药物敏感试验结果见表 6。

3 讨论

1993~1995 年,从荆沙地区中华鳖养殖场患疔疮、红脖子、赤斑病并发症的病鳖肝脏分离到若干株细菌,经革兰氏、鞭毛染色、生理生化反应,判定其病原菌为嗜水气单胞菌。目前国内学者对鳖病病原的研究结果表明,嗜水气单胞菌是引起多种鳖病的共同病原[蔡完其 1985、1995、杨臣和曹福生 1988、凌天慧等 1991、杨广等 1998],但其生理生化反应往往有一些差别,

表 5 分离菌株在不同高温条件下的致死时间

Tab. 5 Killed time of the isolated bacteria at different high temperature

温度(℃)	致死时间(秒)	温度(℃)	致死时间(分)
100	14~15	50	8~9
80	35~38	45	63~65
70	48~50	42	360~370
60	105~120		

说明嗜水气单胞菌可能存在多种不同的血清型,这也为对该病菌引起的鳖病的防治工作带来了困难,对于嗜水气单胞菌在分类上的多种生物型尚须进一步研究。

表 6 分离菌株的药物敏感试验结果

Tab. 6 Sensitivity of the isolated bacteria to the 51 chemotherapeutants

药物名称	抑菌圈直径(mm)	药物名称	抑菌圈直径(mm)	药物名称	抑菌圈直径(mm)
壮观霉素	15.0	强力霉素	24.0	优力欣	0
磺胺甲基异恶唑	0	羧苄青霉素	0	头孢呋新	24.0
多粘菌素 B	12.5	柱晶白霉素	0	头孢噻吩	0
环丙沙星	21.5	新生霉素	0	头孢哌酮	0
头孢拉定	0	吡哌酸	0	奥格门丁	0
呋喃妥因	17.0	复方新诺明	0	头孢孟多	0
氟喹酸	30.0	红霉素	12.0	头孢氨苄	0
氟哌酸	15.5	麦迪霉素	0	氧哌嗪青霉素	25.5
痢特灵	15.5	林可霉素	0	头孢噻肟	23.0
链霉素	14.0	利复平	14.5	头孢唑啉	0
新霉素	16.0	克林霉素	0	头孢三嗪	29.0
庆大霉素	12.0	四环素	27.0	头孢噻甲羧肟	27.0
妥布霉素	16.0	卡那霉素	20.0	苯唑青霉素	0
丁胺卡那霉素	20.0	万古霉素	0	亚硫霉素	0
氨基青霉素	0	氨基曲南	33.0	青霉素 G	15.0
氯霉素	30.0	头孢克洛	0	奈啶酸	0
杆菌肽	0	乙基西羧霉素	20.0	乙酰螺旋霉素	0

分离的病原菌人工感染健康鳖全部致死,对银鲫的 LD_{50} 为 9.17×10^5 CFU/尾,对小白鼠的 LD_{50} 为 1.59×10^7 CFU/只,说明该病原菌具有较强的毒力。我们 1995~1996 年从患赤斑病、红脖子病的病鳖体内分离到了若干株温和气单胞菌,经人工感染试验,证实其也是鳖的赤斑病、红脖子病的致病菌之一,但毒力低于嗜水气单胞菌,其对银鲫、小白鼠的 LD_{50} 分别为 2.7×10^6 CFU/尾和 1.29×10^8 CFU/只。王永坤等[1997a、b]的研究结果也表明,嗜水气单胞菌和温和气单胞菌是鳖暴发性传染病的重要病原体,但温和气单胞菌的毒力更强,这与我们的毒力结果相反,原因待查。

在人工感染病原菌试验时,一般先出现的症状是背腹甲出现疔疮,特别是在伤口或皮肤溃烂处最先发病,随后疔疮周围充血红肿,有的患处有轻微出血、腐皮,最后疔疮处溃烂穿孔,腹甲出现大块红斑,直至整个底板充血发红、颈脖红肿溃烂不能伸缩而死。是否因为疔疮病的暴发引起赤斑病、红脖子病的继发性感染发病,有待进一步查明。

鳖的疔疮、红脖子、赤斑病并发症,是一种严重危害成鳖和亲鳖的暴发性传染病,对该病的防治,除采用有效药物进行积极的治疗外,改善生态环境,提倡健康养鳖是一项积极的预防措施。另外,开展人工免疫也是一项重要手段。研究结果表明,通过人工接种疫苗后,鳖体可以获得一定的免疫力,攻毒后的保护率可以达到 70%~80%以上,显示出良好的前景。由于免疫学在水生动物上的应用尚处于起步阶段,还有许多问题需要解决,如何获得最佳的免疫效果,有待于进一步的探索。

岳阳市农业学校 98 届实习生张沙和李敏参加了本实验工作。

参 考 文 献

- 王永坤, 李智健, 朱国强等. 1997a. 甲鱼暴发性传染病的病原研究. 鱼类病害研究, 19(1/2): 18~24
- 王永坤, 李智健, 朱国强等. 1997b. 温和气单胞菌和嗜水气单胞菌致病力的比较研究. 鱼类病害研究, 19(1/2): 25~28
- 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. 北京: 科学出版社. 63~71, 111~192
- 孙其焕, 肖克宇. 1988. 鳖赤斑病的病原研究. 鱼病简讯, 10(3/4): 58~63
- 孙佩芳, 蔡完其, 吴建农等. 1996. 鳖穿孔病的病原研究. 水产学报, 20(2): 120~124
- 肖克宇, 王晓清, 资道荣. 1991. 鳖疔疮病的研究. 鱼类病害研究, 13(1): 11~15
- 杨 臣, 曹生福. 1988. 甲鱼“红脖子病”的研究. 中国人民解放军兽医大学学报, (3): 250~254
- 杨 广, 杨先乐, 陈昌福. 1998. 中华鳖红底板病病原的研究. 湖北农学院学报, 18(2): 130~133
- 徐迪诚, 蔡妙英. 1994. 革兰氏阴性杆菌新编码鉴定手册. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社. 14~642
- 凌天慧, 虞蕴如, 盛 竞等. 1991. 甲鱼出血性败血症的调查研究. 水产科技情报, 18(5): 144~145
- 蔡完其. 1985. 鳖病防治. 淡水渔业, (3): 30~31
- 蔡完其. 1995. 鳖穿孔病的防治. 水产科技情报, 22(4): 162

PATHOGEN OF THE FURUNCULOSIS, RED NECK AND RED SPOT COMPLICATING DISEASES OF *TRIONYX SINENSIS*

ZHOU Jian-Guang, YANG Xian-Le^{*}, AI Xiao-Hui

(Yangtze River Fisheries Institute, CAFS, Jingzhou 434000)

(Key Laboratory of Ecology and Physiology in Aquaculture of Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, 200090)^{*}

ABSTRACT One of strains were isolated from the liver of diseased soft-shelled turtle of furunculosis, red neck and red spot complicating diseases, which was proved to be the pathogen of the disease by the challenge test. The isolate was tested for more than 30 unit morphologic, physiological and biochemistic characteristics, and classified as *Aeromonas hydrophila*. It was short straight rods (0.36~0.71 μ m \times 1.0~1.4 μ m), Gram negative, single polar flagellum, neither capsule, nor spores but motible. ONPG test, arginine dihydrolase, indole production, Voges-proskauer reaction, gelatinase, oxidase and esculin were positive. Acid production from glucose, mannitol, sucrose and D-arabinose. Lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, utilization of sodium citrate, H₂S production, urease and indolylpyruvic acid (IPA) were negative. The LD₅₀ of the isolated bacteria on Crucian carp is 9.17×10^5 CFU, and the LD₅₀ on mice is 1.59×10^7 CFU. Optimum growth temperature, pH and salinity ranges from 25 °C to 35 °C, 6.5 to 7.5, and 5 to 15 sodium chloride, respectively. This isolate was highly sensitive to Ciprofloxacin, Ofloxacin, Amikacin, Chloramphenicol, Doxycycline, Tetracycline, Kanamycin, Aztreonam, Netilmicin, Cefuroxime, Piperacillin, Cefotaxime, Ceftriaxone and Ceftazidime, etc.

KEYWORDS *Trionyx sinensis*, Furunculosis disease, Red neck disease, Red spot disease, Pathogen, *Aeromonas hydrophila*