

北京地区鲤科鱼暴发性传染病的病原研究*

马志宏 陈慧英 丁文

(北京市水产科学研究所, 北京 100075)

摘要 本文报道了北京地区从自然患暴发性传染病的鲢、鳙、鲤鱼体上分离到16个菌株,其中有8株菌致病力明显,特别是SC96-1-1和SC96-2-4等菌株,能使受试鱼感染显症和致死,仅需6~24h,其发病率达100%。经对该菌进行形态、生理生化特性测定及分类鉴定后,确认该菌是一种革兰氏阴性菌,为具有运动力的短杆菌,有如下特点:氧化酶和V-P反应均呈阳性,发酵葡萄糖产酸、产气,发酵甘露醇,不发酵肌醇,不分解脲素。并证实北京地区暴发性传染病病原为嗜水产气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)。该结果为进一步防治北京地区鲤科鱼暴发性传染病提供了科学依据。

关键词 传染病, 鲤科鱼, 嗜水产气单胞菌, 北京

Study on the pathogen of epidemic septicemia occurred in Cyprinoid fishes in Beijing, China/MA Zhi-Hong, CHEN Hui-Ying, Ding Wen

Abstract This paper reported sixteen bacterial strains isolated from fishes naturally infected by epidemic septicemia (including silver carp, bighead carp and common carp). Of them, eight evidently caused disease, especially SC96-1-1 and SC96-2-4 caused deadly disease and the incidence is up to 100% during 4~24 hours. All isolates were determined in growth, physiological characteristics and classification. The results showed that they shared following characteristics: gram-negative rod, motile, oxidase positive, V-P positive, glucose and mannitol fermentative, but not inositol fermentative, not urea decomposite. These features indicated that the pathogen of epidemic septicemia occurred in Beijing belonged to *Aeromonas hydrophila*. This result provides scientific basis for the prevention and cure of this infectious disease.

Key words infectious disease, Cyprinoid fishes, *Aeromonas hydrophila*, Beijing

Author's address Beijing Institute of Fisheries Sciences, Beijing 100075

1989年以来,淡水养殖鱼类的主要暴发性传染病在广东、福建、上海、江苏、北京、天津等十多个省市广泛流行,这是一种急性传染病,危害鲫鱼、团头鲂、鲢鱼、鳙鱼和鲤鱼等多种淡水鱼类,是我国养鱼史上危害鱼的种类最多、危害鱼的年龄范围最大、流行地区最广和流行季节最长的一种鱼病。北京地区发病季节在4月~10月,主要发病地区是朝阳、通县、房山和大兴等,发病鱼的种类主要是鲢、鳙、鲫、鲤鱼。其典型症状是吻端、口腔、眼眶严重充血发红,腹部及身体两侧呈点状或斑状充血,鳍基部出血发红,尤以胸鳍、腹鳍、臀鳍和尾鳍严重。剖开腹腔,充满腹水,呈粉红色或淡黄色透明液;肝、脾、肾脏充血严重,有的病鱼肌肉充血,呈深红色。如今各地都在对该地区的暴发性鱼病病原进行研究。据报道中国科学院武汉水生生物研究所徐伯亥等认为致病细菌可归属为2个种——点状产气单胞菌(*Aeromonas punctata*)和河弧菌(*Vibrio fluvialis*)^[1]。而上海水产大学孙其焕等认为该病原菌在上海市郊是温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)及嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)^[2]。本文对北京地区的鲢鱼、鳙鱼和鲤鱼的暴发性传染病的病原菌做了细致研究。其结果报道如下:

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病鱼材料来源 从通县徐辛庄渔场、大兴渔场等发病点现场收集发病“殃胚”鱼,以及1~2龄鲢鱼、鳙鱼和鲤鱼为主要病鱼材料。对照供试鱼取自本所试验池培育的当年鲢鱼、鲤鱼,均无发病史,鱼体全长为10~17 cm。试验在0.24 m³的水族箱中进行,保证溶氧充分,水温控制在20~27℃之间。

1.1.2 菌株 SC96-1-1和SC96-2-4菌株由本所鱼病室分离,AH-02菌株由天津市水产研究所馈赠,AH-30菌株由浙江省水产研究所馈赠,J-1菌株由南京农业大学馈赠。制备抗血清用的新西兰大白兔,购自中国科学院遗传所实验动物中心。

1.1.3 培养基 普通肉汤和营养琼脂为培养基。

1.2 方法

1.2.1 病原菌分离

从发病地点收集自然患暴发性传染病症状明显的殃胚鱼,经无菌操作,取其肝、肾、脾、肌肉、血液等接种于营养琼脂平板,进行划线分离,28℃培养24 h后,挑取典型单个菌落接种斜面,再通过平板划线分离获得纯培养。

1.2.2 细菌的致病性试验

1)将分离出的各菌株用腹腔注射方法进行毒力试验。将分离后的菌经28℃,24 h培养后,用0.85%生理盐水洗下稀释到MCF7号比浊管浓度,菌液浓度活菌计数为 2.1×10^9 个/ml,每尾注射0.2 ml,每组放5尾鱼,然后放入水族箱中观察,记录死亡时间、死亡症状、死亡数。同时设有注射无菌生理盐水的鱼体作对照。

取显症濒死的鱼体再进行菌的分离、纯培养,重复上述过程,再感染,共重复3次。从而筛选出强毒株。

2)不同感染途径的致病力比较。采用浸泡、注射接种感染途径。注射含菌的感染液,其含菌量为 2.1×10^9 个菌/ml,0.2 ml/尾;浸泡感染,其浸泡液菌量为 3×10^8 个菌/ml,浸泡5天,浸泡前将鱼体表面用刀子刮伤,观察鱼类死亡情况并做记录。

1.2.3 病原菌生物学性状观察

以强毒株为代表进行常规生物学性状观察,用培养18 h的肉汤培养物做革兰氏染色,用硝酸银法进行鞭毛染色^[3]。

1.2.4 菌种鉴定

生理生化特性测定:氧化酶试验用纸片法,O/F试验采用Hugh-Lefson法,运动性测定用半固体穿刺法,过氧化氢酶用试管法,糖发酵等采用微量发酵管,细菌均为18 h培养物。鉴定工作参照文献[3],并对照文献[4]。

1.2.5 血清学分析

各*A. hydrophila*菌株用LB培养液,37℃,24 h培养后,用0.5%福尔马林灭活,配成终浓度为5 mg/ml,置于4℃保存备用。SC96-1-1菌体65℃灭活1 h后,皮下多点免疫新西兰大白兔,10天后每隔一周耳静脉加强免疫,获满意效价后放血取血清,做凝集试验。玻板凝集法:SC96-1-1抗血清2倍稀释25 μl/孔,加入25 μl浓度为5 mg/ml抗原,充分摇匀,室温2 h,在4℃过夜,观察凝集反应。

2 结果

2.1 病原菌分离

所接种菌的营养琼脂平板经培养后,均长出几乎呈纯培养的细菌。菌落圆形,微凸,表面光滑,湿润,边缘整齐,半透明,有特殊气味。

2.2 致病性试验

2.2.1 从患病鱼体上共分离到了 16 株细菌,经回归试验,发现其中 8 株菌可使健康鱼死亡且呈现自然发病症状。主要表现为腹部红肿、鳍条发红、鳃盖充血、肛门红肿。将这 8 株菌再经回归试验,初步筛选出 96-2-3, SC96-1-1、SC96-2-4 和 bc96-2-1 等 4 株菌具较强的致病力(见表 1)。从表中可得到 SC96-1-1, SC96-2-4 菌株的毒力最强,分别注射了这 2 种菌的 5 条鱼

表 1 各菌株注射法毒力感染结果

Table 1 Result of infection of different strains in virulence by injection

致死时间 Death time(h)	菌 株 Strains							
	96-2-3	bc96-1-3	SC96-1-1	96-1-1	SC96-2-4	bc96-2-1	SC96-2-2	96-1-3
6			2		2	1		
12			2			1		
24	2	1	1		3	2		
48	3	1		1		1	2	1
72		1		2				2
Σ	5	3	5	3	5	5	2	3
试验鱼数 No. of fish	5	5	5	5	5	5	5	5
死亡率% Death rate	100	60	100	60	100	100	40	60

表 2 不同感染途径对致死率的影响

Table 2 Effects of different infected methods on death rate

死亡时间 (小时) Death time	途 径 Method					
	注射 Injection		浸泡 Soak		对照 Contrast	
	鲢 ^①	鲤 ^②	鲢 ^①	鲤 ^②	鲢 ^①	鲤 ^②
6 h	2	1				
12 h	2	1				
24 h	1	3	1			
48 h			1			
72 h			2	3		
Σ	5	5	4	3	0	0
试验鱼数 No. of fish	5	5	5	5	5	5
死亡率% Death rate	100	100	80	60	0	0

注:① *Cyprinus carpio*;

② *Hypophthalmichthys molitrix*

生长旺盛,菌落形态基本一致,表面光滑、圆形、半透明,边缘整齐,一般直径为 2.0~3.2

在 24 h 之内全部死亡。可以认为,该致病菌是导致北京地区暴发性传染病发生的主要原因之一。另外,试验中发现从肾脏中分离到有毒力的菌株,分离率最高(90%),其次是肝脏(60%)。

2.2.2 不同感染途径的致病力比较

都以 SC96-1-1 菌为材料进行注射与浸泡感染试验。结果表明注射法致使鱼死亡时间要短于浸泡法。高浓度菌液注射时,6 h 之内死亡的鱼其症状不很明显;而浸泡法致鱼死亡,其病灶较明显。注射法致死率可达 100%,而浸泡法的致死率在 60%~80% 之间。结果详见表 2。

2.3 病原菌生物学性状观察

在营养琼脂培养基上 28℃ 经 24 h 培养,

mm。革兰氏染色阴性,无芽孢,硝酸银法鞭毛染色端生单鞭毛,具运动性,短杆状,两端钝圆。

2.4 生理生化特性

氧化酶和接触酶皆阳性,葡萄糖发酵型产酸并产气,发酵果糖、甘露醇和麦芽糖,不发酵肌醇、山梨糖、木糖,还原硝酸盐为亚硝酸盐,不分解脲素,其余的反应见表3。根据上述特征,按伯杰氏细菌系统分类手册^[4],可定名为嗜水产气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)。

表3 分离菌株和其它地区菌株之间主要特征比较

Table 3 Comparison of main characteristics between isolated strains and others

菌株 Strains 性状 Characteristics	对照株	SC96-1-1	SC96-2-4	AH-02	J-1	XS 91-4-1
	<i>A. hydrophila</i>					
运动性 Motility	+	+	+	+	+	+
单鞭毛 Single rod	+	+	+	+	+	+
氧化酶 Oxidase	+	+	+	+	+	+
接触酶 Catalase	+	+	+	+	+	+
37℃生长 Growth at 37℃	+	+	+	+	+	+
O/F 测定 Oxidation-Fermentation test (Hugh-leifson)	F	F	F	F	F	F
产酸 Acid from glucose	+	+	+	+	+	+
产气 Gas from glucose	+	+	+	+	+	+
V. P Voges-Proskause(24h)	+	+	+	+	+	+
M. R Methyl Red test	+	+	+		+	
在2.5%胨水中产H ₂ S H ₂ S production in peptone water	+	+	+	+	-	+
吲哚试验 Indole production	+	+	+		+	+
2,3-丁二醇脱氢酶 Butanediol dehydrogenase	+	+	+			
硝酸盐还原 Reduction of NO ₃ ⁻ to NO ₂	+	+	+			+
分解七叶灵 Esculin hydrolysis	+	+	+	+		+
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	+	+	+		+	+
精氨酸利用 Utilization of Arginine	+	+	+	+		+

表 3 (续) Table 3 (continued)

组氨酸利用 Utilization of Proline	+	+	+	+	+
脲酶测定 Urease test	-	-	-	-	-
明胶水解 Gelatin hydrolase	+	+	+	+	+
氨基酸脱羧酶 Amino-acides decarboxylase					
L-精氨酸 Arginine	+	+	+		+
L-鸟氨酸 Ornithine	-	-	-	-	-
L-赖氨酸 Lysine	+/-	-	-	+	-
对弧菌抑制剂 0/129 Inhibition by 0/129phosphate				-	-
发酵 Fermentation of					
葡萄糖 D-Glucose	+	+	+	+	+
果糖 D-Fructose	+	+		+	+
麦芽糖 Maltose	+	+	+	+	+
海藻糖 Trehalose	+	+	+		+
卫矛醇 Dulcitol	-	-	-	-	-
肌醇 Inositol	-	-	-	-	-/+
山梨糖 Sorbos	-	-	-	-	
木糖 D-Xylose	-	-	-		-
甘露醇 D-Mannitol	+	+	+	+	+
半乳糖 D-Galactose	+	+	+	+	+
鼠李糖 L-Rhamnose	-	-	-	-	-
蔗糖 Sucrose	+	+	+	+	+
阿拉伯糖 L-Arabinose		-	-	+	+

注: AH-02:天津株 Tianjing strains; AH-30:浙江株 Zhejiang strains; J-1:南京株 Nanjing strains; SC96-1-1:北京株 Beijing strains; SC96-2-4:北京株 Beijing strains; XS91-4-1:武汉株 Wuhan strains; +:阳性 positive; -:阴性 negative; F:发酵 ferment

2.5 血清学分析

用 SC96-1-1 菌株制备兔抗血清,与北京地区分离菌株的凝集效价可高达 2^{10} 和 2^9 ,但与其它地区菌株凝集效价差异甚大,即与 AH-02、AH-30、J-1 菌株的凝集效价分别只是 2^3 、 2^4 和 2^1 (表 4)。此差异的出现,表明各地菌株在抗原组成上的不同,说明水气单胞菌血清型的多样性。

表 4 用 SC96-1-1 菌株制备的兔抗血清与其它地区菌株凝集反应结果

Table 4 Result of agglutinate reaction of rabbit antiserum from SC96-1-1 with other strains

菌株 Strains	凝集反应效价					Agglutinate reaction efficacy						
	1: 2	1: 4	1: 8	1: 16	1: 32	1: 64	1: 128	1: 256	1: 512	1: 1024	1: 2048	1: 4096
SC96-1-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
SC96-2-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
AH-02	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AH-30	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
J-1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
对照 Contrast	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注:AH-02:天津株 Tianjing strains; AH-30:浙江株 Zhejiang strains; J-1:南京株 Nanjing strains; SC96-1-1:北京株 Beijing strains; SC96-2-4:北京株 Beijing strains; +:发生凝集 Agglutinate; -:不凝集 Not agglutinate

3 讨论

从北京地区患暴发性传染病鱼体上分离到 16 株菌,其中 8 株细菌致病力明显,通过对其生物学性状的观察和生理生化特性的测定,确定为嗜水产气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*),可以认为它是引起北京地区暴发性传染病发生的主要致病菌,为有针对性地进行防治技术研究提供了科学依据。

嗜水产气单胞菌是暴发性流行病的主要病原,通过血清学分析试验,表明嗜水产气单胞菌北京菌株与其它地区菌株在血清型上存在着一定差异,应从血清学研究方面入手,进一步用血清学方法对各地的菌株进行比较研究,这有助于深入探讨嗜水产气单胞菌的抗原组成和结构,对深入了解不同血清型与毒性的关系,以及为制备覆盖面广、有效的疫苗提供依据。

致谢 本项目研究得到了中国科学院微生物研究所蔡妙英教授的大力支持和帮助,在此谨致谢意。

参 考 文 献

- 1 徐伯亥等. 淡水养殖鱼类暴发性传染病致病细菌的研究. 水生生物学报, 1993, 17(3): 259 ~ 265
- 2 孙其焕等. 异育银鲫溶血性腹水病原的研究. 水产学报, 1991, 15(2): 130 ~ 139
- 3 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. 科学出版社, 1978
- 4 Noel R, Krieg John, Holt G. Bergey's manual of systematic bacteriology. 1984, 428: 545 ~ 550