

## 嗜水气单胞菌对中华鳖致病力的研究\*

杨先乐

(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)

柯福恩 周剑光 艾晓辉

(中国水产科学研究院长江水产研究所,荆州 434000)

**摘要** 嗜水气单胞菌菌株 T3、40142G、51613-1、706C、RTL531、R402L、RK1119 等分别从患有红底板、腐皮、洞穴及其它症状的病鳖中分离。银鲫对 T3 与 40142G 的易感性最强,而中华鳖(与小白鼠、青蛙等一样)稍差。各嗜水气单胞菌菌株中, T3 的致病力最强,其致病性随水温升高而增强,随其连续传代而减弱。该菌在用橡皮塞密封的试管中 4℃ 存放时, 400 d 内致病力基本保持稳定。

**关键词** 中华鳖,嗜水气单胞菌,致病力

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是一种危害中华鳖(*Trionyx sinensis*)的严重致病菌,它能导致鳖的红脖子、红底板、出血性肠道坏死、洞穴、疖疮、出血、腐皮、白斑、白点等多种病症<sup>[1~7]</sup>,使鳖养殖业蒙受较大的损失。

对引起鳖病的嗜水气单胞菌的研究,大多集中于病原分离、病理描述、敏感药物筛选以及防治方法等方面<sup>[1,6~9]</sup>,而对其致病力的研究却较少涉及。为了探讨其嗜水气单胞菌的致病机理,给鳖嗜水气单胞菌疫苗的研制提供依据,本文对该菌的不同来源,对不同的动物,在不同的温度下以及不同存放方式等多种条件下的致病力进行了探讨。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 试验动物** 试验鳖(30 g)和银鲫(20 g)由长江水产研究所试验场提供,小白鼠(15~20 g, ICR 小鼠)购于湖北省职工医学院动物房,青蛙(20 g)购于自由市场。以上动物(除小白鼠外)均经过 5~7 d 暂养,证明健康无病后进行试验。

收稿日期:1998-02-16

\* 国家自然科学基金(编号:39570565)和农业部“九五”重点项目(编号:渔 95-A-96-03-04)资助。

**1.1.2 菌种** T3、40142G、51613-1、706C、RTL531、R402L、RK1119 等分别由本实验室从患红底板、腐皮、穿孔、疖疮、肠道出血性坏死症、红脖子、白斑、烂爪病的病鳖分离,经鉴定均为嗜水气单胞菌; MT3 为感染小白鼠后的 T3 复壮株。培养基为 BHI 肉汤琼脂,培养温度为 28℃。

**1.2 致病力的测定** 将新培养的菌株斜面用 0.8% 的生理盐水洗下后,用麦氏比浊管和显微镜直接计数等相结合的方法准确测定其菌含量。然后按倍比稀释作 5 个不同稀释度,每个稀释度以腹腔注射的方式感染试验动物 5 只(尾),每只(尾)0.2~0.5 ml。按 Reed ~ Muench 法计算半数致死量 LD<sub>50</sub>。

(1)分别用 T3、40142G 感染中华鳖、银鲫等动物各 5 只(尾),比较对它们的致病力。

(2)用 T3 等不同来源的嗜水气单胞菌株同时感染银鲫 5 尾,比较各株的致病力。

(3)分别将 T3 株感染的银鲫(5 尾)养殖在 30、25、20、15、10℃ 以下的水温条件下,比较不同水温对 T3 株致病力的影响。

(4)将 T3 株连续传代后比较传代对其致病力的影响。

(5)将同批传代的 T3 斜面若干支,分别以棉花塞(有氧)和橡皮塞(无或少氧)封口 2 种方式存放于

37、28、20、4℃的不同温度下。每间隔一定时间取出2支,洗下后以 $1.5 \times 10^8$  CFU/尾剂量攻击银鲫4尾,另1支复苏后以同样的剂量攻击银鲫4尾,分别测定复苏与否该株的致病力,以确定不同存放温度与方式对T3株致病力的影响。

## 2 结果

### 2.1 对不同动物的致病力

用T3和40142G菌株感染中华鳖等动物,一般2~5 d即出现死亡,除了中华鳖可呈现红底板(T3株)及爪、嘴、表皮溃烂(40142G)症状外,其它动物(包括中华鳖)均有腹腔积水,肌肉充血,腹部红肿等现象。相比之下,对银鲫的致病力最强,在28℃左右时, $LD_{50}$ 仅为 $0.92 \times 10^6$  CFU/尾(T3)与 $1.5 \times 10^6$  CFU/尾(40142G);青蛙次之,分别为 $3.23 \times 10^6$ 与 $8.8 \times 10^6$  CFU/只;中华鳖为 $16.80 \times 10^6$ 与 $30.0$

$\times 10^6$  CFU/只,与小白鼠基本相当(分别为 $15.90 \times 10^6$ 与 $47.0 \times 10^6$  CFU/尾)。

### 2.2 不同来源菌株的致病力

表1是从不同症状的病鳖所分离到的嗜水气单胞菌对银鲫致病力的比较。其中T3菌株的毒力最强;经小白鼠复壮后的MT3株的毒力比T3增强了3.38倍;从疔疮病与红脖子病分离到的706C与R402L致病力最弱,分别为T3的1/3和1/2。

### 2.3 水温与致病力

在不同的水温条件下,T3株对银鲫的致病力有较大区别。水温30℃时, $LD_{50}$ 最低为 $0.94 \times 10^6$  CFU/尾;水温下降后,其致病力相应减弱,25℃为 $1.30 \times 10^6$  CFU/尾,20℃为 $18.0 \times 10^6$  CFU/尾,15℃时达 $168.9 \times 10^6$  CFU/尾;水温在10℃以下时,不会出现急性死亡的现象。

表1 不同来源的嗜水气单胞菌对银鲫致病力的比较

Table 1 Comparison of virulence to Prussian carp among strains isolated from diseased turtles

菌株名称 strains	MT3	T3	RTL531	RK1119	40142G	51613-1	706C	R402L
来源 resources	T3复壮 T3R	红底板 RAS	出血性肠道坏死 HIN	白斑 FRC	红脖子 RN	穿孔 C	烂爪 UC	疔疮 F
*半数致死量/ ( $\times 10^6$ CFU/ind) $LD_{50}$	0.21	0.92	1.06	1.26	1.50	2.12	3.20	4.74

\*水温28℃左右 The water temperature about 28℃

T3R --- T3 Rejuvenator; RAS --- Red Abdominal Shell; HIN --- Hemorrhage Intestinal Necrosis; FRC --- Fair Spot Complexion; RN --- Red Neck; C --- Cavern; UC --- Ulcerate Claw; F --- Furuncle

### 2.4 传代与致病力

T3菌株连续传代后,它对银鲫的致病力会逐步

下降。开始时下降幅度不大,从第20代起急剧下降,到第40代已不再有急性致死现象(图1)。

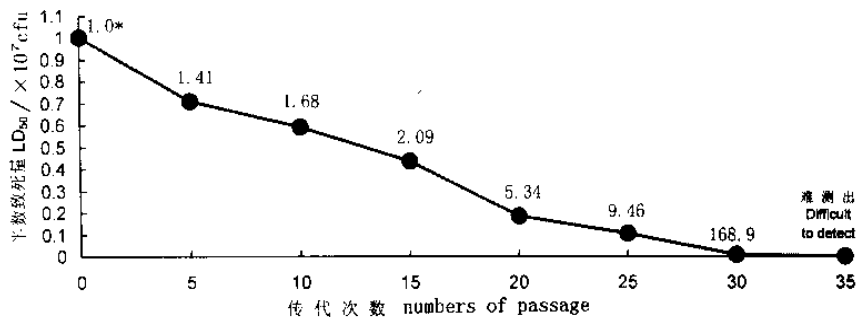


图1 连续传代对T3株致病力的影响

Fig.1 Influence of continuous passage upon the virulence of strain T3

### 2.5 不同存放方式与致病力

用普通棉塞于37℃存放的T3菌株对银鲫的致

病力在1.5 d后开始下降,第3 d后, $1.5 \times 10^8$  CFU/尾剂量的T3菌株对其基本失去致病力;复苏盲传感

染也只能维持到第 8 d。用橡皮塞存放, 剂量为  $1.5 \times 10^8$  CFU/尾的 T3 菌株失去致病力的时间分别为第 6 d(直接感染)和第 15 d(盲传后感染)(图 2)。28℃棉花塞存放的可延长到第 16 d(直接感染)和 34 d(盲传后感染);橡皮塞存放的可达 30 d(直接感

染)(图 3)。20℃同一剂量的 T3 株直接感染银鲫失去致病力的时间为 30 d(棉花塞)和 56 d(橡皮塞);4℃可分别达到 100 d 和 400 d 以上,但此种情况下菌株复苏盲传后仍具有致病力(图 4,5)。

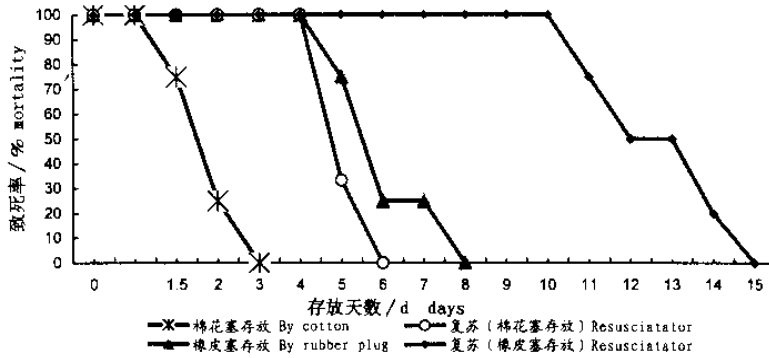


图 2 37℃存放下的 T3 菌株对银鲫致病力的变化

Fig.2 Variation of mortality of Prussian carp infected with strain T3 preserved at 37°C

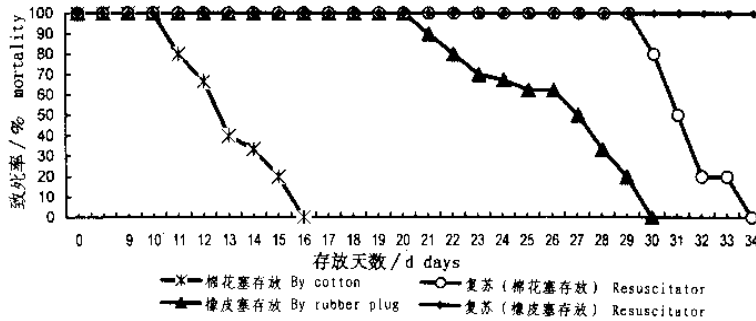


图 3 28℃存放下的 T3 菌株对银鲫致病力的变化

Fig.3 Variation of mortality of Prussian carp infected with strain T3 preserved at 28°C

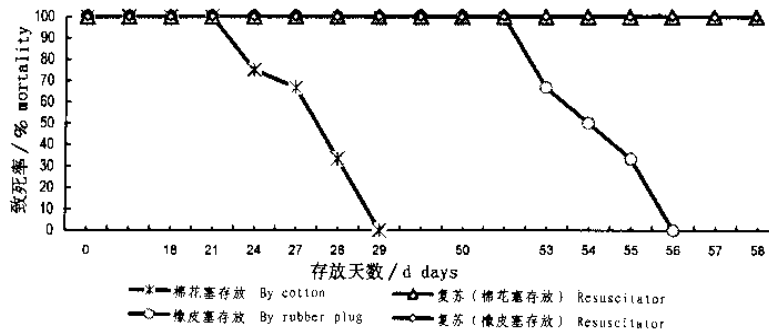


图 4 20℃存放下的 T3 菌株对银鲫致病力的变化

Fig.4 Variation of mortality of Prussian carp infected with strain T3 preserved at 20°C

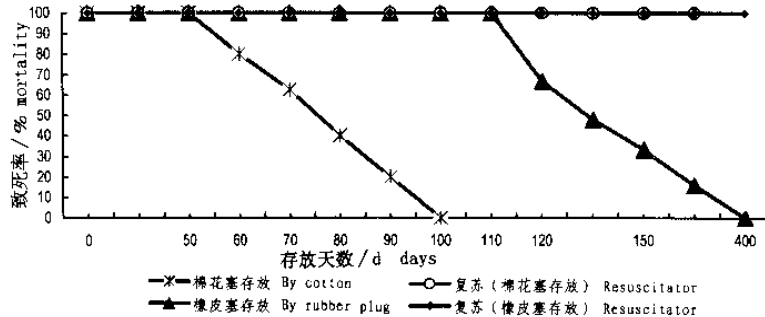


图5 4℃存放下的T3菌株对银鲫致病力的变化

Fig.5 Variation of mortality of Prussian carp infected with strain T3 preserved at 4°C

### 3 讨论

#### 3.1 嗜水气单胞菌致病特性

嗜水气单胞菌致病范围十分广泛<sup>[10-14]</sup>,它可导致多种水产动物患病,引起大量死亡<sup>[5,12,15,16]</sup>。从中华鳖的若干病症中均可分离到嗜水气单胞菌<sup>[1-4,6,8,9,17]</sup>。根据本研究结果,从红底板症状所分离到的嗜水气单胞菌菌株的致病力最强,而其它症状所分离到的菌株则相应较弱。我们认为,在中华鳖的某些病症中,如穿孔病、出血性肠道坏死症、疔疮病等,嗜水气单胞菌不是主要病原菌(体),它们在致病过程中只起协同、原发或继发作用,因而从这些症状中分离到的该菌致病力不一定很强;而另一些鳖病,如红底板病等,嗜水气单胞菌具有很强的致病力,则很有可能为主要致病菌。

嗜水气单胞菌可导致多种动物的交叉感染,成为人-畜-鱼的共患病<sup>[5,16]</sup>。本研究涉及的嗜水气单胞菌对银鲫、小白鼠和青蛙均可致病,有时还表现出很强的致病力,特别是经另一动物感染复壮后,其致病力会成倍增加。由此认为:①嗜水气单胞菌致病的中华鳖除了可引起中华鳖患病更大规模的暴发,还引起其它动物(甚至包括人类)致病的潜在危险。因此采取果断措施,焚毁病鳖是控制该病蔓延的一个重要措施;②由于嗜水气单胞菌中华鳖分离株对银鲫的致病力较强,所以在鱼鳖混养塘中,放养银鲫很有可能成为该病的一个传染源,易导致中华鳖此类疾病的发生;③由于银鲫来源方便,在进行中华鳖嗜水气单胞菌致病力及其相关的试验中,银

鲫是替代中华鳖作试验动物的较好材料。

#### 3.2 嗜水气单胞菌致病力

除了该菌株本身能产生多种毒力因子的内因外<sup>[5,13,15]</sup>,其外界环境条件也是不容忽视的因素。Grrobergeta(1978)认为高温能加速该菌的感染过程,Walters等(1980)的试验指出池水的氧气、二氧化碳、铵氮等浓度也可影响水生致病菌的感染率。本试验也进一步证明,高温状态下,中华鳖嗜水气单胞菌致病力很强,而温度在10℃以下时,就不会表现出致病现象。有的学者根据细菌致病力受水温影响这一现象,提出了通过调节水温来控制疾病发生的设想<sup>[11]</sup>,虽然此法在操作时存在一些难点和问题,但提示我们在疾病暴发的养鳖温室,适当降温可缓解疾病的发生,为有效的防治赢得时间,这也不失为一个被动的控制办法。

#### 3.3 连续传代方法制备疫(菌)苗

连续传代有时可使病原菌(体)的毒素基因丢失或发生变异而失去感染力<sup>[18]</sup>。本研究表明,连续传代的嗜水气单胞菌致病力也会逐步下降,尤其是在20代以后。这一结果提示我们,连续传代可否获得嗜水气单胞菌减毒菌株?另外,该菌在较高温度与有氧条件下存放时,致病力衰退速度明显加快。因此,在制备嗜水气单胞菌灭活菌苗时,选择适宜的温度和灭活方式,也是获得高效、安全菌苗的一个措施。

致谢:长江水产研究所周瑞琼,岳阳农校学生叶国安、李敏、张沙、毛爱民等参加部分工作,谨此一并致谢。

## 参 考 文 献

- 1 孙佩芳,蔡完其. 鳖穿孔病的病原研究. 水产学报, 1996, 20(2): 120~124
- 2 肖克宇, 王晓清, 资道荣. 鳖疔疮病原的分离与鉴定. 湖南农业学院学报, 1991, 17(3): 500~505
- 3 杨臣, 曹福生. 甲鱼红脖子病的研究. 兽医学报, 1988, 3: 250~254
- 4 杨先乐, 周剑光, 柯福恩. 中华鳖出血性肠道坏死症初报. 淡水渔业, 1996, 26(5): 26~28
- 5 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述. 水产学报, 1992, 16(3): 282~288
- 6 杨广海, 仲俊, 许金云, 等. 鳖“腐皮、疔疮”并发症综合防治技术的研究. 淡水渔业, 1992, 22(5): 38~39
- 7 虞蕴如, 等. 中华鳖出血性败血症病原体的分离鉴定与防治. 中国兽医科技, 1992, 22(10): 25~26
- 8 陆宏达, 金丽华. 嗜水气单胞菌败血症的研究. 水产学报, 1996, 20(3): 223~228
- 9 程天印, 鞠长征, 赵万鹏, 等. 稚鳖白斑病原体的研究. 水产科学, 1995, 14(4): 19~22
- 10 Havelaar A H et al. Typing of *Aeromonas* strain from patients with diarrhoea and from drinking water. J Appl Bacteriol, 1992, 72: 435~444
- 11 Hazen T C, et al. Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States. Appl Env Microbiol, 1978, 36: 731~738
- 12 Kirov S M, et al. Virulence characteristics of *Aeromonas* spp. in relation to source and biotype. J Clin Microbiol, 1986, 24: 827~834
- 13 Kozaki S, et al. Activities of *Aeromonas hydrophila* hemolysins and their interaction with erythrocyte membrane. Infect Immun, 1987, 55: 1594~1596
- 14 Knochel S, et al. Distribution and characteristics of aeromonas in food and drinking water in Denmark. Int J Food Microbiol, 1990, 10: 317~322
- 15 Dooley J, et al. Surface protein composition of *Aeromonas hydrophila* strain virulent for fish: identification of a surface assay protein. J Bacteriol, 1988, 170: 499~506
- 16 Sioutas S, et al. Carp erythrodermatitis (CE) due to an *Aeromonas hydrophila* infection. J Vet Med, 1991, B38: 186~194
- 17 Sugita H, Deguchi Y. Microflora in the gastrointestinal tract of soft-shelled turtle *Trionyx sinensis*. Bulletin of the Japanese Society of Science Fisheries, 1983, 49(2): 197~201
- 18 Cipriano R C, Starliper C E. Immersion and injection vaccination of salmonids against furunculosis with an avirulent strain of *Aeromonas salmonicida*. Prog Fish - cult, 1982, 44: 167~169

## Virulence of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased soft - shelled turtle, *Trionyx sinensis*

Yang Xianle

(Key lab. of Ecology and Physiology in Aquaculture, Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, 200090)

Ke Fuen Zhou Jianguang Ai Xiaohui

(Changjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000)

**Abstract** The strain T3, 40142G, 51613-1, 706C, RTL531, R402L, RK1119, etc, belonging in *Aeromonas hydrophila*, were isolated from soft-shelled turtles (*Trionyx sinensis*) contracted red abdominal shell, lucrative skin, cavern, and etc, respectively. Prussian carp were infected with strain T3 and 40142G more easily than turtle, mouse and frog. The virulence of T3 was the strongest of all. It increased as the water temperature rose and decreased as the passage lasted. The virulence could keep steady for 400d when the strain was preserved in hermetically sealed tube with rubber plug at 4℃.

**Key words** *Trionyx sinensis*, *Aeromonas hydrophila*, virulence