

• 研究简报 •

## 鲫腐皮病病原菌的初步研究

温海深<sup>\*\*</sup> 刘振琦 马国文

(内蒙古哲里木畜牧学院)

**摘 要** 作者对鲫腐皮病的病因及病原菌进行了初步研究。结果表明：在水温为 18.1~31.0℃时，病程为 48~120 h；随着水温的升高感染力加强，二者呈显著正相关， $r = 0.958$  ( $n = 5$ )；经对病原菌进行分离培养，生理生化反应测定，初步认为是点状产气单胞菌点状亚种 (*Aeromonas punctata* Sub. *punctata*)。

**关键词** 腐皮病；鲫鱼；病原菌

**中图分类号** S941.1

## A Preliminary Study on the Pathogenic Bacteria of “Rotten Skin” Disease of Crucian Carp *Carassius auratus*

Wen Haishen Liu Zhenqi Ma Guowen

(Zhe Limu Animal Husbandry College of

Inner Mongolia Autonomous District, TongLiao, 028042)

**Abstract** The preliminary studies on the cause and pathogenic bacteria of the “rotten—skin” disease of crucian carp had been carried out. The results showed that the diseased course in 48—120 h under 18.1—31.0℃ of water temperature. The correlationship between water temperature and infectiuity was signifieantly positive ( $r = 0.958$ ,  $n = 5$ ). The isolated culture and determination of reaction in physiology and biochemistry showed that the pathogenic bacteria was *Aeromonas punctats sub. punctata*.

**Key words** “rotten—skin” disease; crucian carp; pathogenic bacteria

- 
- 收稿日期：1993-03-15
  - 温海深：1963年生，男，讲师，通辽市 028042  
本文初稿承蒙中国科学院水生生物研究所徐伯亥先生审阅，谨此致谢

鲫是北方天然水体的主要经济鱼类之一,在渔获中占有重要地位。保持鲫良好的生存环境,防止疾病的危害,是鲫增殖的重要措施之一。1990~1991年,由于内蒙古东部地区春季水库水位大幅下降,鲫大量感染鲤锚头鲩(*Lernaea cyprinaces*),感染率为60%~70%,虫体脱落后,继发细菌感染,产生腐皮病,导致部分鲫鱼死亡,造成一定经济损失。关于鲫腐皮病引起死亡的病例在国内外未见报道。作者记录和研究了1<sup>+</sup>龄鲫鱼(*Carassius auratus*)的发病过程,病原菌的鉴定,旨在为淡水鱼类腐皮病的诊断和防治提供理论依据,同时也为鲫鱼的增殖提供防病措施。

## 1 材料与方法

### 1.1 病程观察

将初患病鱼置于不同的水温下(18.1℃,23.1℃,25.6℃,28.0℃,31.0℃)的水槽中,试验水源为室内毒力试验疫水,对照组用水为消毒自来水。每组受试鱼类6尾,保持充足的溶解氧,详细记录病鱼活动情况和病灶恶化程度。有一组病鱼观察结束时全部死亡。观察结果用感染力定量的描述水温与病程的关系<sup>[1]</sup>。

### 1.2 材料来源与处理方法

病鱼来自内蒙古吐尔基山水库和东五家子水库,发病症状典型。取菌部位为:病灶肌肉、肝、肾和脾等内脏器官。无菌操作及细菌的培养方法按常规方法进行<sup>[2,3,4]</sup>。

### 1.3 重复感染方法

#### 1.3.1 注射感染

将培养18h(28.0℃)的平板培养物,用0.85%的生理盐水冲下,稀释成一定浓度,在试验鱼腹腔及肌肉注射0.3ml(约1.0亿个菌/ml),置于最适温度下观察。

#### 1.3.2 浸泡感染

将上述纯培养物制成一定浓度,将试验鱼擦皮后浸于该菌液中,30min后取出,放在无菌水槽中观察。

#### 1.3.3 涂抹感染

用上述纯培养物直接涂于人工损伤的病灶处,置于最适水温下观察。以上每种感染途径均设对照组。

### 1.4 生理生化反应测定

测定内容按细菌鉴定常规方法进行<sup>[4,5,6]</sup>。

### 1.5 药物敏感试验

选择改良的K—B培养基<sup>①</sup>,按要求选取所需要的抗生素纸片,以及用消毒剂按使用

① 抗生素药物敏感试验,上海市医学化验所编,1983

浓度自制纸片, 贴在接种有病原菌的 K—B 培养基上, 置 28 ℃ 下培养 48 h, 测量抑(杀)菌圈直径。划分敏感程度。

2 结果

2.1 发病鱼症状

鲤锚头鳋脱落后, 受伤处发炎溃烂。随着病情发展, 病灶周围鳞片脱落, 炎区变大变深, 轮廓清晰呈圆形。病灶数以臀鳍基部上方和背鳍肌肉处最多。部分病鱼下颌联合处充血。尾鳍和背鳍不同程度地“蛀鳍”, 尤其是尾鳍。死亡的病鱼多数身体两侧均有病灶, 严重肌肌肉和骨骼外露。<sup>①</sup>

2.2 病程观察

病程和感染力的试验结果见表 1 和表 2。其中 感染力=(组内“+”数值和)÷供试鱼尾数。

表 1 在充足溶氧条件下水温对病鱼症状的影响

| 实验序号       | 开始观察时症状         | 平均体长/cm | 平均体重/g | 水温/℃ | 溶解氧/mg·L <sup>-1</sup> | 观察结束时症状          | 出现死亡时间/h |
|------------|-----------------|---------|--------|------|------------------------|------------------|----------|
| 1          | F+C+ (3 尾)      | 9.0     | 20.0   | 18.1 | 8.67                   | 变化不大 (未死)        | 观察结束     |
|            | B+T+ (3 尾)      | 8.5     | 13.0   |      |                        | B+++T+++ (未死)    | 观察结束     |
| 2          | F+C++T++ (2 尾)  | 9.7     | 23.5   | 23.1 | 8.63                   | F+++C+++T+++     | 120.0    |
|            | T++C+ (4 尾)     | 9.6     | 23.5   |      |                        | T+++C++ (未死)     | 观察结束     |
| 3          | F+T+ (4 尾)      | 10.8    | 28.0   | 25.6 | 8.98                   | F+++T++ (未死)     | 观察结束     |
|            | T+C++D+ (2 尾)   | 10.2    | 29.0   |      |                        | T+++C+++D+++     | 72.0     |
| 4          | F+D+C++B+ (1 尾) | 8.0     | 15.5   | 28.0 | 9.07                   | F+++D+++C++B++++ | 64.0     |
|            | D++C++ (5 尾)    | 8.7     | 18.0   |      |                        | D+++C+++         | 48.0     |
| 5          | B++C++ (3 尾)    | 8.6     | 16.0   | 31.0 | 9.00                   | B++++C+++        | 48.0     |
|            | F+C++D+ (3 尾)   | 8.5     | 16.5   |      |                        | F+++C+++D++      | 48.0     |
| 6<br>(对照组) | F+B++ (2 尾)     | 10.5    | 17.1   | 28.0 | 8.90                   | 变化不大 (未死)        | 观察结束     |
|            | B+C++ (4 尾)     | 11.2    | 17.6   |      |                        | 变化不大 (未死)        | 观察结束     |

1) B、C、D、F、T 分别表示侧线以下部位, 尾鳍、背鳍, 侧线以下部位和头部; +表示症状明显或“蛀鳍”; ++~++++表示症状加剧或“蛀鳍”严重; 溶解氧和水温均为观察期间平均值。

表 2 不同水温下的感染力<sup>1)</sup>

| 水温 /℃ | 每组供试鱼尾数 | 观察结束与开始时组内“+”差数数值 |   |   |   |   | 感染力  |
|-------|---------|-------------------|---|---|---|---|------|
|       |         | B                 | F | C | D | T |      |
| 18.1  | 6       | 1                 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0.33 |
| 23.1  | 6       | 0                 | 2 | 2 | 0 | 1 | 0.83 |
| 25.6  | 6       | 0                 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1.0  |
| 28.0  | 6       | 3                 | 2 | 1 | 1 | 0 | 1.17 |
| 31.0  | 6       | 2                 | 2 | 2 | 1 | 0 | 1.17 |

1) B、F、C、D、T 含义与表 1 相同

2.3 毒力与重复感染试验

1989~1991 年将获得的 3 株可疑纯培养物, 用小白鼠做毒力试验, 用鲫鱼做重复感染试验, 结果见表 3。

① 温海深, 鲫腐皮病病原体与防治方法研究。鱼类病害研究, 1990, 12 (3): 8~11

表 3 三种菌株的毒力与第一次感染试验<sup>1)</sup>

| 试验菌株   | 小白鼠毒力试验        |            |            |          | 鲫鱼第一次感染试验  |                |           |            |              |
|--------|----------------|------------|------------|----------|------------|----------------|-----------|------------|--------------|
|        | 接种方法<br>与剂量/ml | 观察时间<br>/h | 试验动物<br>/只 | 结果       | 观察水温<br>/℃ | 接种方法<br>与剂量/ml | 试验鱼数<br>尾 | 观察时间<br>/h | 结果           |
| 89-5-Ⅰ | 注射<br>0.5      | 17.0       | 10         | 正常<br>未死 | 28.0       | 擦皮感染           | 10.0      | 48.0       | 无症状          |
|        |                |            |            |          |            | 浸泡             | 10.0      |            |              |
|        |                |            |            |          |            | 注射             | 10.0      |            |              |
|        |                |            |            |          |            | 0.3            |           |            |              |
| 89-5-Ⅱ | 注射<br>0.5      | 17.0       | 10         | 死亡<br>8只 | 28.0       | 擦皮感染           | 10.0      | 48.0       | 有症状数<br>10.0 |
|        |                |            |            |          |            | 浸泡             | 10.0      |            | 8.0          |
|        |                |            |            |          |            | 注射             | 10.0      |            | 8.0          |
|        |                |            |            |          |            | 0.3            |           |            |              |
| 91-6-Ⅲ | 注射<br>0.5      | 17.0       | 10         | 死亡<br>9只 | 28.0       | 擦皮感染           | 10.0      | 48.0       | 10.0         |
|        |                |            |            |          |            | 浸泡             | 10.0      |            | 9.0          |
|        |                |            |            |          |            | 注射             | 10.0      |            | 9.0          |
|        |                |            |            |          |            | 0.3            |           |            |              |
| 对照组    | 未注射            | 17.0       | 10         | 正常<br>未死 | 28.0       | 未处理            | 10.0      | 48.0       | 无症状          |

1) 所用试验菌液浓度均为 1.0 亿个/ml。

通过初次感染认为 89-5-Ⅱ 和 91-6-Ⅲ 有毒性，重新分离用浸泡感染方法进行再感染，结果见表 4。

表 4 病原菌株第二次感染试验

| 试验菌株   | 接种途径 <sup>1)</sup>   | 发病鱼数及症状 |      |     |       |      |       |      |     | 试验<br>鱼尾数 |
|--------|----------------------|---------|------|-----|-------|------|-------|------|-----|-----------|
| 89-5-Ⅱ | 浸泡 30 分钟后<br>置玻璃缸中观察 | ++++    | +++  | +++ | ++，   | ++++ | +++   | ++   | ++  | 4         |
|        |                      | +++     | ++++ | ++  | +++，  | ++++ | +++++ | +++  | +++ |           |
| 91-6-Ⅲ | 浸泡 30 分钟后<br>置玻璃缸中观察 | ++++    | +++  | +++ | +++，  | +++  | +++   | ++++ | +++ | 4         |
|        |                      | ++      | +++  | ++  | ++++， | ++++ | +++   | ++++ | ++  |           |
| 对照组    | 未处理                  | 无症状     |      |     |       |      |       |      |     | 4         |

1) 菌液浓度同表 1，处理方法为擦皮浸泡。

2.4 病原菌的培养特性，个体形态和生理生化反应测定结果

根据毒力和重复感染试验，认为 89-5-Ⅱ 和 91-6-Ⅲ 菌株为病原菌。两者的培养特性和个体形态相同。将该菌接种到普通肉汤培养基中，置恒温箱内培养 48 h (28 ℃)，培养基轻度浑浊，表面有灰白色菌膜，一摇即碎，底部稍有絮状沉淀。琼脂平板划线培养 24 h (28 ℃)，菌落较小 (1.0~1.4 mm)，圆形微凸，湿润，表面光滑。边缘整齐，灰白色。革兰氏染色阴性，短杆状，两端钝圆，多数二个相连。着色均匀，无芽胞无荚膜，大小为 0.6~0.7 μm×0.7~1.2 μm，极端单鞭毛。以 91-6-Ⅲ 菌株为例，进行生理生化反应测定，并与有关菌株相应项目对比，其结果见表 5。

表 5 病原菌株的生理生化反应及与相关菌株的比较

| 培养基种类               | 点状产气单胞点状亚种 <sup>[6]</sup> | 91-6-Ⅱ | ST-78-3-3 <sup>[5]</sup> |
|---------------------|---------------------------|--------|--------------------------|
| 葡萄糖发酵               | +                         | +      | +                        |
| 氧化酶试验               | +                         | +      | +                        |
| 葡萄糖                 | +                         | +      | +                        |
| 乳糖                  | +                         | (+)    | +                        |
| 麦芽糖                 | +                         | +      | +                        |
| 蔗糖                  | d                         | (+)    | +                        |
| 鼠李糖                 | 0                         | —      | —                        |
| 阿拉伯糖                | d                         | —      | 0                        |
| 棉子糖                 | 0                         | —      | —                        |
| 木糖                  | —                         | —      | —                        |
| 甘露醇                 | d                         | +      | +                        |
| 侧金盏花醇               | 0                         | —      | 0                        |
| 卫茅醇                 | —                         | —      | —                        |
| 山梨醇                 | —                         | —      | —                        |
| 肌醇                  | —                         | —      | —                        |
| 七叶树苷                | d                         | —      | 0                        |
| 水杨苷                 | 0                         | —      | 0                        |
| V. P 反应             | —                         | —      | —                        |
| M. R 反应             | 0                         | +      | +                        |
| H <sub>2</sub> S 产气 | +                         | d      | +                        |
| 尿素分解                | —                         | —      | +                        |
| 硝酸盐利用               | +                         | +      | +                        |
| 柠檬酸盐利用              | —                         | —      | +                        |
| 明胶穿刺                | +                         | +      | +                        |
| 可做唯一氮源氨基酸           |                           |        |                          |
| L-精氨酸               | +                         | +      | +                        |
| 鸟氨酸                 | 0                         | +      | +                        |
| 组氨酸                 | +                         | +      | +                        |
| 谷氨酸                 | +                         | +      | +                        |
| 丝氨酸                 | +                         | +      | +                        |

注：+为阳性；（+）为阳性较弱；—为阴性；d为菌株而异；0为未做该项试验。

病原菌为兼性厌氧，pH 范围为 3~11，最适生长温度为 25~30 ℃。用 91-6-Ⅱ 菌株做培养皿抑（杀）菌试验，结果见表 6。

表 6 某些药物对病原菌的培养皿抑（杀）效果

| 药物种类   | 纸片含药量<br>μg/片 | 48 h 抑（杀）菌圈直径<br>d/mm | 敏感程度划分 |      |    |
|--------|---------------|-----------------------|--------|------|----|
|        |               |                       | 不敏感    | 中度敏感 | 敏感 |
| 丁胺卡那霉素 | 10.0          | 18.0                  |        |      | V  |
| 氯林可霉素  | 2.0           | 14.0                  |        | V    |    |
| 链霉素    | 10.0          | 10.0                  |        | V    |    |
| 氯霉素    | 30.0          | 22.0                  |        |      | V  |
| 万古霉素   | 30.0          | 11.0                  |        | V    |    |
| 磺胺嘧啶   | 300.0         | 28.0                  |        |      | V  |
| 呋喃妥因   | 300.0         | 20.0                  |        |      | V  |
| 高锰酸钾   | 20.0 (ppm)    | 14.0                  |        | V    |    |
| 漂白粉    | 1.0 (ppm)     | 15.0                  |        |      | V  |
| 福尔马林   | 0.13 (%)      | 14.0                  |        | V    |    |
| 升汞     | 0.1 (%)       | 14.0                  |        | V    |    |

### 3 讨论

#### 3.1 关于病原菌的命名

关于淡水鱼类腐皮病的研究在国内有报道,分离出来的病原菌不尽相同。唐士良等对鲢鳙鱼腐皮病及防治方法进行初步研究<sup>[7]</sup>,认为病原菌与腐败极毛杆菌(*Pseudomonas putida*)极相似;北京市水产站对鲢鳙该病进行研究<sup>①</sup>,认为病原菌是嗜水产气单胞菌嗜水亚种(*Aeromonas hydrophila sub. hydrophila*)。此后,徐伯亥等对鲢鳙鱼该病病原菌进行了深入研究<sup>[5]</sup>,根据细菌命名法则认为病原菌是点状产气单胞菌点状亚种(*Aeromonas punctata sub. punctata*)。关于有动力产气单胞菌的分类有争议。根据《伯杰细菌鉴定手册》(第八版)描述:气单胞菌属有三个种,即灭鲑产气单胞菌,嗜水产气单胞菌和点状产气单胞菌。前者的适宜生长温度为16~32.0℃,37℃致死。从表3中可见,笔者从鲫鱼体内分离得到的89-5-Ⅱ和91-6-Ⅲ菌株给小白鼠注射呈阳性结果,而小白鼠的体温是37.5~38℃,所以不可能是灭鲑产气单胞菌。而后二者的培养特性,菌体形态和生理生化反应极相似。1989~1991年我们所做的工作也证实了这一点<sup>②</sup>。有些学者认为上述两种菌株为同物异名<sup>[5,8]</sup>。从表4的生理生化反应测定中也可以看出,笔者从鲫鱼体上分离出来的病原菌与鲢鳙鱼打印病病原菌极相似,笔者同意以上学者的意见,将该病原菌定名为点状产气单胞菌点状亚种。

#### 3.2 病原菌的致病性

该菌株为条件病原菌,大量存在于天然水体中,根据我们选用的方法测定<sup>[9]</sup>,发病水库沿岸带细菌含量为1 000~2 000个/ml。从表1的试验中可知,对照组用水为自来水,病鱼病灶未恶化,表明病原菌来源于疫水。该菌株致病性大小与水温 and 鱼体的健康状况有密切关系。从表2中看出,水温梯度值与感染力之间呈显著正相关关系, $r = 0.958$  ( $n = 5, p < 0.01$ )。即鱼体被寄生虫侵袭受伤是细菌感染的先决条件,高温又加速了其感染过程。水温为18.1~31.0℃时,病程为48~120 h,说明感染很快。最适感染水温为28~31.0℃(届时病程为48 h),基本与该病原菌的最适生长温度相符。实际观察中,发病率最高的季节(6月下旬~7月下旬),水温接近最适感染温度的下限。

#### 3.3 有关该病的防治建议

从表5的药物敏感试验中可知,在所选择的12种抗生素和消毒剂中,在体外对该病菌有较好抑(杀)效果的药物有:磺胺嘧啶,呋喃妥因,氯霉素,丁胺卡那霉素,漂白粉。基于该病是大水面疾病,完全用药物防治难以奏效。应采用药物与生态结合的方法加以防治。根据鲤锚头鳋对水环境变化较敏感的特性。在春季鲤锚头鳋大量繁殖季节,加大水库的放水量或注水(较小的水库),改变水环境,抑制锚头鳋的孳生,降低鲫鱼的感

① 北京市水产站, 鲢鳙鱼打印病致病菌的分离及防治方法的初步试验。全国鱼病防治技术经验交流资料汇编, 1976, 93~96

② 刘振琦等. 嗜水产气单胞菌引起鲫鱼病的诊断. 哲里木畜牧学院学报, 1989, 2 (1): 47~49

染率。发病鲫鱼在沿岸带活动较多,尤其是水草茂盛的区域,在这些区域可以遍洒漂白粉等消毒剂,杀灭病原菌,达到避免受伤鲫鱼继发感染细菌的目的。

## 参 考 文 献

- 1 徐伯亥等. 白鲢腐皮病致病菌的初步研究. 水生生物学报, 1985, 9 (1): 59~67
- 2 河北水产学校主编. 鱼病学. 北京: 农业出版社, 1983. 281~284
- 3 中国科学院水生生物研究所编. 鱼病调查手册. 第 2 版. 上海: 上海科技出版社, 1981. 47~48, 86~90
- 4 中国科学院微生物研究所编. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978. 10~18
- 5 徐伯亥等. 鲢鳙鱼打印病病原菌的研究. 海洋与湖沼, 1980, 11 (1): 85~93
- 6 中国科学院微生物研究所翻译组. 伯杰细菌鉴定手册. 第 8 版. 北京: 科学出版社, 1984. 482~486
- 7 唐士良等. 鲢鳙鱼腐皮病及防治方法的初步研究. 水产学报, 1965, 2 (1): 33~51
- 8 Popff M, Verun M. Ataxonomic Study of the *Aeromonas hydrophila*—*Aeromonas punctata* group. Journal of General Microbiology, 1976, 94: 11~22
- 9 方学珍等. 高产鱼池中异养菌的初步研究. 水产学报, 1989, 13 (2): 101~109