

· 研究简报 ·

## 鲫腐皮病病原菌的初步研究

温海深\*\* 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 correlation between water temperature and infectivity was significantly positive ( $r = 0.958$ ,  $n = 5$ ). The isolated culture and determination of reaction in physiology and biochemistry showed that the pathogenic bacteria was *Aeromonas punctata* 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,鲫大量感染锚头蚤(*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 °C 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

鲤锚头蚤脱落后, 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 /°C	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 (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 /°C	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, 鲫腐皮病原菌与防治方法研究。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				
	接种方法与剂量/ml	观察时间/h	试验动物/只	结果	观察水温/℃	接种方法与剂量/ml	试验鱼数/尾	观察时间/h	结果
89-5-Ⅰ	注射 0.5	17.0	10	正常 未死	28.0	擦皮感染 浸泡 注射 0.3	10.0 10.0 10.0	48.0	无症状
89-5-Ⅱ	注射 0.5	17.0	10	死亡 8只	28.0	擦皮感染 浸泡 注射 0.3	10.0 10.0 10.0	48.0	有症状数 10.0 8.0 8.0
91-6-Ⅲ	注射 0.5	17.0	10	死亡 9只	28.0	擦皮感染 浸泡 注射 0.3	10.0 10.0 10.0	48.0	10.0 9.0 9.0
对照组	未注射	17.0	10	正常 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								试验鱼尾数
89-5-Ⅰ	浸泡 30 分钟后 置玻璃缸中观察	++++	+++	+++	++,	++++	+++	++	++	4
		+++	++++	++	+++,	++++	+++++	+++	+++	
91-6-Ⅲ	浸泡 30 分钟后 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-Ⅲ	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-Ⅲ 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 μg/片	48 h 抑(杀)菌圈直径 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1000~2000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48~120h,说明感染很快。最适感染水温为28~31.0℃(届时病程为48h),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。根据鲤锚头蚤对水环境变化较敏感的特性。在春季鲤锚头蚤大量繁殖季节,加大水库的放水量或注水(较小的水库),改变水环境,抑制锚头蚤的孳生,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. 白鬃豚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