

# 乌鳢出血性败血症病原研究

张海宾

(信阳师范学院生物系,河南信阳 464000)

**摘要:**从患病死亡的乌鳢体内分离出一种革兰氏阴性短杆菌,对其形态特征、培养特征、生理生化反应,凝集反应,药敏实验,动物回感实验,确认该菌为嗜水气单胞菌,其对卡那霉素、环丙沙星较敏感。

**关键词:**乌鳢;出血性败血症;嗜水气单胞菌

**中图分类号:**S941 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-1278(2005)02-0081-02

乌鳢(*Channa argus*)又称黑鱼、乌鱼、才鱼,属鳢科鱼类,是一种凶猛的名贵鱼种,其肉味鲜美,口感细腻,蛋白质含量高,骨刺少,在医学上具有滋补、活血、收敛等作用,对伤口的愈合有很好的效果。同时乌鳢具有生长速度快、产量高等特点,因此近年来乌鳢的人工养殖规模越来越大。随着人工养殖规模和密度的扩大,乌鳢的疾病日趋增多,乌鳢细菌性出血性败血症是对乌鳢养殖危害较为严重的病害。本试验对乌鳢细菌性出血性败血症病原进行了初步研究,现将结果报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

病鱼采自河南省信阳市某乌鳢养殖户池塘之中,其外表症状为:鳃盖、鳍充血,体表有红色小血斑,直径约为1 mm,并伴有断尾、烂鳍等现象,解剖后发现病鱼肌肉、肠道充血,肝脏肿大。

### 1.2 病原的分离、培养与鉴定

**1.2.1 病毒的分离** 无菌采取病鱼的肝胰、肾、脾,加入含双抗的Hanks液,制成1:1的匀浆,高速离心,去上清液,分别接种于成单层的FHM、EPC和CEF细胞,37℃培养,盲传3代,观察细胞病变。将病毒细胞培养物铜网上吸附,用2%磷钨酸负染,电镜观察。

**1.2.2 细菌的分离培养** 用75%的酒精棉球擦洗病鱼体表,在无菌条件下解剖病鱼,并用无菌手术刀刺破其肌肉、肌道、肝脏病部,按无菌操作方法用接种环挑取病料,接种在普通琼脂平板上,置于37℃恒温培养24~48 h。选取形态、色泽一致占优势的菌株进行纯化培养,观察菌落特征。取培养物涂片进行革兰氏染色,置于油镜下观察细菌形态。

**1.2.3 生理生化实验** 取培养物于无菌条件下分别接种于生化反应管上(细菌生化微量鉴定管由浙江省军区后勤部卫生防疫检验所提供),36±1℃条件下培养3 d,每天观察其颜色变化。

### 1.2.4 凝集反应

**1.2.4.1 抗原的制备** 吸取灭菌生理盐水5 mL,注入分离菌株的斜面培养基上将菌苔洗下,然后用毛细吸管吸

取,注入小试管中,向小试管中滴加甲醛使终浓度0.3%~0.4%,不断摇动进行杀菌,30 min后将该溶液稀释至含细菌 $2.3 \times 10^8$ 个/mL。将稀释好的菌液悬液接种于普通琼脂平板上,37℃培养24~48 h,观察有无细菌生长,如无细菌生长,放入冰箱贮存备用。

**1.2.4.2 免疫血清的制备** 用无菌注射器抽取以上纯培养物抗原(抽前摇匀),按表1所列日程与剂量对家兔(购于信阳西关菜场)实施耳静脉注射。第16日采血,并在无菌条件下迅速将所得血液注入一支无菌大试管中,尽量放成最大斜面,凝固后放入4~6℃的冰箱中,使其自然析出血清,离心沉淀,用无菌毛细吸管取上层血清,装入灭菌细口瓶中,加适量硫柳汞,用蜡封瓶口,贴上标签,放入冰箱备用。

表1 注射日程及所用剂量

日程	菌液注射剂量/mL
第1日	0.2
第2日	0.4
第3日	0.6
第6日	2.0

**1.2.4.3 玻片凝集反应** 取一块无菌载玻片,一端滴加一滴1:10上述免疫血清,另一端滴加一滴无菌生理盐水,用无菌接种环从嗜水气单胞菌(菌种购于武汉大学)琼脂平板上挑取少许细菌,混入一端生理盐水中,并搅匀;同法挑取少许细菌放入血清中搅匀,让玻片略为摇动后,静置于室温中1~3 min后观察反应现象。

### 1.3 动物回感实验

健康的乌鳢购自信阳西关菜市场,尾重80~120 g,放入水族箱中养殖几天,取生长良好的鱼分组做感染实验。

**1.3.1 注射感染** 用75%酒精棉球对鱼泄殖腔和后腹鳍之间部分进行消毒。然后用无菌注射器吸取已配制好的 $1.15 \times 10^8$ 个/mL菌液,进行腹腔注射,每尾注射0.2 mL,对照组每尾注射0.2 mL生理盐水,观察发病情况。

**1.3.2 创伤感染** 将体表划伤的鱼放入实验缸中,加菌液制成所需浓度,对照组不加菌液,观察发病情况。

### 1.4 药敏实验

采用纸片扩散法,对纯培养物进行药敏实验(药敏片由浙江省军区后勤部卫生防疫检验所提供,30 μg/片),37℃培养24 h,测量药敏片周围抑菌圈直径的大小。

收稿日期:2004-07-09

作者简介:张海宾,1969年生,男,河南南阳人,讲师,主要从事鱼类病原病害防治研究。

## 2 结果

### 2.1 病原特性

从典型出血性败血症的患病鱼体内均未分离到病毒,但多数分离到细菌。

### 2.2 病原的形态

从病鱼肌肉、肠道、肝脏、病灶处分离到的细菌,为革兰阴性菌,短杆状有端生鞭毛,能运动,不能形成芽孢,在普通琼脂培养基上 37℃ 培养 24 h 形成乳白色、湿润圆形隆起、边缘整齐的菌落,其直径为 0.8~1.2 mm。

### 2.3 生化特性

该菌能发酵蔗糖、葡萄糖、水杨苷、甘露醇等,不能发酵肌醇蛋白胨水等。其生化特性见表 2。

### 2.4 凝集反应

分离免疫血清与嗜水气单胞菌混合在一起产生颗粒状或絮片状凝集,肉眼直接可见;嗜水气单胞菌与生理盐水相混合,不出现凝集。

### 2.5 动物回感实验

利用纯培养物稀释液注射健康鱼种,经对照观察,多

数鱼出现了自然感染相同的症状;创伤感染时产生了与自然感染相同的症状,详细结果见表 3。

表 2 病原菌的生化特性

物 质	肌肉	肠道	肝脏
氧化酶	+	+	+
O-F 管	F	F	F
6% NaCl	-	-	-
无盐蛋白胨	-	-	-
Arg 对照表	-	-	-
Arg 双水解酶	+	+	+
Lys 对照管	-	-	-
Lys 脱羧酶	+	+	+
肌醇	-	-	-
阿拉伯糖	-	+	-
甘露醇	+	+	+
蔗糖	+	+	+
蛋白胨水	-	-	-
V-P 管	+	+	+
葡萄糖(产气)	+	+	+
硝酸盐还原	+	+	+
水杨苷	+	+	+

表 3 动物回感实验结果

实验组别	实验数/ 尾	分组死亡情况/尾							死亡率/ %
		1	2	3	4	5	6	7	
注射感染	10	0	0	1	2	3	3	0	90
对照组	10	0	0	0	1	0	1	0	20
创伤感染	10	0	0	0	2	2	4	0	80
对照组	10	0	0	0	0	1	0	0	10

### 2.6 药敏实验

分离菌株对卡那霉素、环丙沙星、丁胺卡那霉素敏感;对青霉素类产生抗性,具体情况见表 4。

表 4 病原菌对药物的敏感性 mm

药物	肌肉	肠道	肝脏
青霉素	-	-	-
卡那霉素	22	22	21
环丙沙星	26	26	25
痢特灵	18	26	24
胺苄青霉素	-	-	-
庆大霉素	21	18	14
氯霉素	8	10	12
丁胺卡那霉素	22	21	18

## 3 讨论

从几组患病鱼体内均未分离到病毒,而分离到细菌,菌株为发酵型代谢,氧化酶阳性,属弧菌科细菌,按《弧菌科细菌生化鉴定编码册》第十代 GYZ-9V 系统进一步鉴定该菌株甘露醇、葡萄糖产气、水杨苷实验为阳性,6% NaCl 为阴性,由此可确认该菌为乌鳢出血性败血症病原之一,是否还有另外致病菌与该菌协同作用,尚待研究。

嗜水气单胞菌广泛存在于水体中,为养殖环境中固有的微生物种群,属条件致病菌,通常情况下可引起机体创伤感染,在机体抵抗力极低情况下引起败血症。乌鳢出血性败血症爆发原因是投喂变质或有毒饵料,鱼类代谢废物积累,导致条件致病菌,嗜水气单胞菌大量繁殖,

从而引发败血症的发生。一方面血管受损而引起出血或广泛出血;另一方面,血液流经的脏器也发生不同程度损害,病鱼由于缺氧导致全身衰竭而死亡,有时少数鱼会出现肉眼看不见症状的死亡,这是由于这些鱼体质弱,病原菌侵入多,毒力强所引起的急性败血症,这种情况在人工感染及自然发病中均有发现。

败血症是近年来水产养殖中广泛流行的疾病。雷爱莹等<sup>[1]</sup>报道了月鳢的败血症病原是嗜水气单胞菌;此病的防治方法尚待进一步研究,以下几点对预防该病有积极意义:①强化外部环境管理,加强水质管理,不投放变质或不洁饵料;定期换水,定期清除部分池底淤泥;定期泼撒药物,防止水体中致病菌数量过多;防止水温过高。②提高鱼体抵抗力,防止寄生虫对鱼体组织破坏。我们在试验过程中发现,多数野生乌鳢体上寄生一种红色肉眼可见的线虫,虫体直径为 1 mm 左右,长 10~20 mm,多寄生在乌鳢背鳍、腹腔鳍基间,尾鳍中则较少。在人工感染实验过程中发现,凡是带有这种寄生虫的鱼比其它鱼易于发病,从发病到出现伤残的时间间隔比其它鱼要短,并且这种寄生虫越多,发病率就越高,这可能由于该虫寄生于鱼体,破坏鱼体表组织,导致鱼体抵抗力下降,病菌易于侵入并大量繁殖而造成的。

#### 参考文献:

- [1] 雷爱莹,黄伟坚,秦爱珍. 月鳢败血症病原(气单胞菌)的研究[J]. 淡水渔业, 1999, 29(4): 16~19.

(责任编辑 万月华)