

# 中华鳖穿孔病的病原研究

王高学

王英珍

(西北农业大学动物科学与动物医学学院, 陕西杨凌 712100) (天津市畜牧兽医研究所, 天津 300112)

**摘要** 对陕西省西安、咸阳和宝鸡等地区养殖的鳖穿孔病病原菌进行了分离鉴定, 在分离出的 6 种菌株中, 经过人工感染试验, 其中 9401, 9402, 9403 和 9405 菌株对健康幼鳖表现出较强的致病力, 出现与自然病鳖相同症状; 对小白鼠感染试验, 4 种菌株均能致死。由此说明这 4 种菌株为穿孔病的病原菌。对菌体形态特征、培养特性和生理生化反应的鉴定, 证明致病菌为嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila* Stamier) 和普通变形杆菌 (*Proteus vulgaris* Hauser)。

**关键词** 中华鳖, 穿孔病, 嗜水气单胞菌, 普通变形杆菌

**分类号** S947.12

中华鳖穿孔病是养殖鳖中常见病害之一, 具有发病率高、传染性强、死亡率大等特点, 一旦发生, 往往造成巨大经济损失。对穿孔病的研究, 最早是川崎义一<sup>[1]</sup>和蔡完其<sup>[2]</sup>的报道, 他们认为嗜水气单胞菌是致病菌; 有的学者认为, 致病菌是气单胞菌和产碱菌<sup>[3]</sup>, 但孙佩芳等<sup>[4]</sup>认为, 致病菌是嗜水气单胞菌和普通变形杆菌。本文针对发生在陕西省内养鳖场的穿孔病进行了病原菌的研究, 确定了发病的原因, 为有效地防治该病发生提供了理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验用鳖

病鳖来源主要是 1994 年 8 月~ 1995 年 10 月间采自西安、咸阳、宝鸡等地的养殖场, 所用材料全部为症状明显的活病鳖或即将死亡的病鳖, 有稚鳖、幼鳖和成鳖类型。

### 1.2 病原的分离

首先对病鳖洗净, 进行涂片镜检。具体方法是, 先取病鳖脓肿结节处病料进行涂片, 经革兰氏染色, 表现为大量革兰氏染色阴性的球杆菌、中等大杆菌及小杆菌。另外, 也有革兰氏染色阳性球菌和杆菌。然后, 对病菌再进行分离培养。在无菌操作下, 取病灶洞穴中内容物或病灶与健康组织交界处脓血液少许, 接种于绵羊血琼脂平板和普通琼脂平板上, 于 37℃, 100 mL L<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub> 温箱和普通温箱中 (28℃ 下) 培养 24 h, 挑取单菌落进一步划线纯化, 如此反复, 直至获得纯培养 9401, 9402, 9403, 9404, 9405 和 9406 6 个菌株, 然后进行致病力试验和细菌学鉴定等。

### 1.3 人工感染试验

将分离纯化的 6 种菌株先分别接种于营养琼脂斜面上, 置 30℃ 孵育箱中培养 16 h 左

右,再用无菌生理盐水洗下菌苔,制成菌悬液,并对其进行活菌平板计数,然后分别对小白鼠和健康鳖接种,同时设置生理盐水对照组。每组试验用小白鼠或体重 70~100 g 幼鳖 3 只,每只小白鼠或每只鳖试用剂量 0.2 mL,对照组生理盐水剂量与之相同。对各种不同菌株接种的小白鼠和对照组单独饲养,幼鳖也置于不同的水族箱中,在 25℃ 水温下,投喂鲜鱼肉饲养。这样的试验需再重复感染一次,方法同上(见表 1)。

表 1 6种菌株注射感染试验

菌株号	菌液浓度 / 10 <sup>9</sup> 个·mL <sup>-1</sup>	死亡数 / 试验数	人工感染小白鼠	人工感染幼鳖
9401	1.6	3/3	30~52 h 全部死亡	3~5 d 发病或死亡
9402	1.7	3/3	30~52 h 全部死亡	3~6 d 发病或死亡
9403	1.5	3/3	20~30 h 全部死亡	3~5 d 发病或死亡
9404	1.7	0/3	7~8 d 健康正常	7~8 d 健康正常
9405	1.4	3/3	20~30 h 全部死亡	3~5 d 发病或死亡
9406	1.6	0/3	7~8 d 健康正常	7~8 d 健康正常
对照组	生理盐水	0/3	健康正常	健康正常

注: 试用剂量均为 0.2 mL。

#### 1.4 病原菌的鉴定

病原菌生理生化特性的测定和菌种鉴定按中国科学院微生物研究所细菌分类组<sup>[5]</sup> Popoff 和 Pener<sup>[6]</sup> 等方法进行。各项生化反应均在 30℃ 条件下进行。

## 2 结果与分析

#### 2.1 细菌的致病性

人工感染小白鼠和幼鳖试验证实, 9401、9402、9403 和 9405 菌株均有较强的致病力, 发病或死亡达 100%, 发病病鳖症状与自然病鳖症状基本相同; 而 9404 和 9406 菌株试验组经一周后, 小白鼠和鳖均健康活泼, 无任何症状, 说明该菌无致病力。所做的对照组均健康正常(见表 1)。

#### 2.2 病原菌的分类鉴定

关于菌株 9401 和 9402 均为革兰氏阴性的中等大杆菌或球杆菌, 有明显多形性, 分散排列, 少数成对或短链状, 周生鞭毛, 无荚膜, 无芽孢。于 37℃, 100 mL·L<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub> 温箱或普通温箱(28℃)中经 24 h 培养, 在营养琼脂平板表面、绵羊血琼脂平板和鳖血琼脂平板上, 呈现灰白色, 扁平, 具波纹状中等大菌落, 培养久之呈迁徙样生长; 对 9401 和 9402 菌株分别进行生理生化反应(表 2), 与 Penner<sup>[6]</sup> 中对普通变形杆菌的描述是相同的。

9403 和 9405 两菌株均为革兰氏阴性小杆菌或球杆菌, 分散排列, 少数成对或 2~3 个菌排列成短链状, 极生单鞭毛, 无荚膜, 无芽孢。于 37℃, 100 mL·L<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub> 温箱或普通温箱(28℃)中经过 24 h 培养, 在营养琼脂平板表面、绵羊血平板和鳖血平板上, 呈现圆形, 多量半透明, 灰白色, U 溶血, 稍隆起的中等偏小菌落; 肉汤培养基中均等混浊, 培养久之可见上部有菌环生长, 底部有少量沉淀物; 对 9403 和 9405 两菌株分别进行的生理生化反应(表 2), 与 Popoff<sup>[6]</sup> 对嗜水气单胞菌描述基本一致。

9404 和 9406 菌株均为革兰氏染色阳性, 9404 为球菌, 多散在, 有短链, 呈少量透明。

光滑、隆起的小菌落。9406为短杆菌,单个或成链,菌落不透明,粗糙,白色和浅灰色。两菌株动物感染试验,均无致病力。

综上所述,从4菌株的形态特征、培养特性和生理生化反应鉴定结果为:9401和9402两菌株为普通变形杆菌;9403和9405两菌株为嗜水气单胞菌。

表 2 4种菌株的生理生化特性与普通变形杆菌、嗜水气单胞菌的比较

测定项目	菌 名					
	9401	9402	普通变形杆菌	9403	9405	嗜水气单胞菌
葡萄糖	⊕	⊕	⊕	⊕	+	⊕
O/F试验	F	F	F	F	F	F
乳糖	-	-	-	-	-	-
麦芽糖	+	+	+	+	+	+
蔗糖	⊕	⊕	+	-	-	+
甘露糖	-	-	-	-	-	-
蕈糖	-	-	d	-	-	-
木胶糖	-	-	-	+ W	+	-
阿拉伯糖	-	-	-	-	-	d
果糖	-	-	-	+	+	-
鼠李糖	-	-	-	-	-	-
单乳糖	-	-	-	+ W	+ W	-
山梨醇	-	-	-	-	-	-
棉实糖	-	-	-	-	-	-
侧金盏花醇	-	-	-	-	-	-
纤维二糖	-	-	-	-	-	-
甘露醇	-	-	-	+	+	+
山梨糖	-	-	-	-	-	-
水杨苷	-	-	-	+	+	+
肌醇	-	-	-	-	-	-
37°C, 20°C V. P	-	-	+	+	+	+
M. R	+	-	-	+	+	+
产生吲哚	+	+	+	+	+	+
硝酸盐还原	+	+	+	+	+	+
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 酶	-	-	-	+	+	-
H <sub>2</sub> S产生(TSI)	+	+	+	+	+	d
淀粉酶	-	-	-	-	-	-
柠檬酸盐利用	+	+	-	-	-	-
卵磷脂酶	-	-	-	-	-	-
氧化酶	-	-	-	+	+	+
脲酶	+	+	+	-	-	-
苯丙氨酸脱氨酶	+	+	-	+	+	-
精氨酸双水解酶	-	-	-	+	+	+
赖氨酸脱羧酶	-	-	-	+	+	+
鸟氨酸脱羧酶	-	-	-	+	+	+
明胶液化	+	+	+	-	-	-
无盐肉汤生长	-	-	-	+	+	+
20 g/L NaCl肉汤生长	-	-	-	+	+	+
50 g/L NaCl肉汤生长	-	-	-	+	+	+
70 g/L NaCl肉汤生长	-	-	-	-	-	-
0/129(10 mg/L)	-	-	-	R	R	R
0/129(15 mg/L)	-	-	-	R	R	R
0/129	+	+	+	+	+	+
27°C下运动性	-	-	-	+	+	-
37°C下运动性	-	-	-	-	-	-

注:“+”阳性反应;“-”阴性反应;“d”菌株间具差异;“R”具抗性;“+ W”阳性迟缓;“⊕”产酸产气

## 3 讨 论

### 3.1 引起水产动物的主要疾病

嗜水气单胞菌最早是 Sanarelli 于 1891 年分离出来的,它广泛分布于各种淡水之中,尤其有机物丰富的淡水中。这种菌在水产动物中,往往引起多种疾病的发生。象淡水养殖鲤科鱼类的打印病、疖疮病,多种淡水鱼类的暴发性败血症,软体动物三角帆蚌的蚌瘟和蛙类的红腿病。另外,嗜水气单胞菌也是鱼类肠道常在菌丛的成员,往往引起鱼类的肠炎病<sup>[7,8]</sup>。由气单胞菌属(*Aeromonas*)引起的鳖病较多,有赤斑病(孙焕其.鳖赤斑病病原研究.鱼病简讯,1988)红脖子病<sup>[9]</sup>、出血性败血症<sup>[10]</sup>、穿孔病<sup>[1]</sup>、疖疮病<sup>[11]</sup>、腐皮病<sup>[12]</sup>。一般鳖的许多疾病的发生,大多是以亲水气单胞菌为主的气单胞属的细菌,单独或混合感染或与其他细菌继发感染的结果。

普通变形杆菌广泛存在于许多动物的粪便、污水和土壤中,特别在腐烂的动物蛋白质内。普通变形杆菌在水产动物引起的疾病较少,主要有对虾红腿病<sup>[8]</sup>。另外,孙佩芳等<sup>[4]</sup>从鳖穿孔病中也分离到该菌,这与作者研究结果是一致的。

### 3.2 嗜水气单胞菌的致病性

据报道<sup>[8]</sup>,嗜水气单胞菌在鱼类暴发性败血症中,能分泌具有溶血性、肠毒性和细胞毒性的外毒素,也称 hec 毒素,hec 是淡水鱼类致病的主要因素;嗜水气单胞菌引起鱼类充血、出血和溶血,组织器官广泛发生变性、坏死和解体,腹腔内积有大量淡黄色至红色肝性腹水,肝功能、肾功能及胰功能发生障碍,最后由于肝昏迷和毒素使病灶处白细胞数量减少,无白细胞浸润现象。同样,嗜水气单胞菌引起的穿孔病,产生的病理现象与淡水鱼相同,对病鳖病理观察(另篇报道)发现,红血细胞膜脆性增加,各组织器官出现溶血性贫血,尤其肝、肾组织广泛出血、肿胀、坏死,白细胞数量减少。通过对 9403 和 9405 两菌株试验,出现明显的 U 型溶血,这证实,嗜水气单胞菌为穿孔病的主要致病菌。有人研究,普通变形杆菌往往引起对虾的败血症,而从穿孔病病鳖分离到 9401 和 9402 两菌株,通过对动物感染的病理学研究,出现的是与嗜水气单胞菌相同的致病结果,也发生败血症现象。

### 3.3 穿孔病发生的原因

嗜水气单胞菌和普通变形杆菌是条件致病菌,通过对陕西各地发生穿孔病的调查,一般发病的是条件较差的工厂化养殖场,绝大多数为塑料大棚、加温养殖水泥池。发病时间主要在每年的冬季进行加温养殖时期。通过对发病鳖池水环境检测,水中有机质丰富,含氮量增加,往往透明度在 20 cm 以下,水温多在 25~28℃,加之池水交换少,曝气能力差,长期不排池底污物与粪便,饲料浪费严重,水质极度恶化;如果棚内或室内温度低于池水温度,往往温差很大,鳖很少爬上水面,再者光照度不够,鳖不能晒盖杀菌,如果长期生活在水质恶化的环境中,鳖的抵抗力降低,增加对病菌的易感性。

研究发现,如果养殖池池底沙粒太粗,卵石不光滑,饲料台和晒背台水泥板粗糙,易造成皮肤受损,往往发生轻度腐皮病,在水质恶化的条件下,进而继发穿孔病。作者发现,在陕西许多养殖场,一旦发生腐皮病,技术人员采用药浴在短期内治愈,如果水质没有大的改观,紧接着便发生穿孔病。作者认为,穿孔病的致病菌嗜水气单胞菌和普通变形杆菌主要是通过受损的皮肤侵入体内,一旦鳖体质较弱,致病菌在体内大量增殖,便可引起疫病。

的发生。因此,鳖穿孔病的发生是致病菌和水环境因素综合作用的结果,在甲鱼养殖中,水环境的变化是决定穿孔病发生的外部因素。

### 参 考 文 献

- 1 川崎义一著;蔡兆贵译.甲鱼的习性和新的养殖法.长沙:湖南科学技术出版社,1986
- 2 蔡完其.鳖病防治.淡水渔业,1985(3): 30~ 31
- 3 齐彩霞,罗远忠,吴佩链,等.鳖穿孔病的病原菌及其防治的研究.淡水渔业,1995,25(4): 17~ 19
- 4 孙佩芳,蔡完其,吴建农,等.鳖穿孔病的病原研究.水产学报,1996,20(2): 120~ 124
- 5 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.北京:科学出版社,1978
- 6 Krieg N R, Holt J G. Bergey's manual of systematic bacteriology (9th ed). Baltimore: Williams and Wilkins, 1984
- 7 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
- 8 黄琪琰.中国水产动物疾病学研究进展.水产学报,1996,20(1): 51~ 57
- 9 杨 臣,曹生福,路长河,等.甲鱼“红脖子病”研究.兽医大学学报,1988,8(3): 250~ 254
- 10 凌天慧.甲鱼出血性败血症的调查研究.水产科技情报,1991,18(5): 144
- 11 肖克宇,王晓清,资道荣,等.鳖疔疮病原的分离与鉴定.湖南农学院学报,1991,11(3): 500
- 12 谭北平.中华鳖腐皮病及防治方法研究.水利渔业,1996,83(3): 26~ 27

## Pathology of the Covered Disease in Soft-Shelled Turtle (*Trionyx Sinensis*)

Wang Gaoxue<sup>1</sup> Wang Yingzhen<sup>2</sup>

(1 College of Animal Science and Veterinary Science, Northwestern Agricultural University, Yangling Shaanxi 712100)

(2 Tianjin Institute of Animal Science and Veterinary, Tianjin 300112)

**Abstract** This paper described the characters of pathogenic bacteria of covered disease in soft-shelled turtle in Shaanxi Province. 6 strains, 9401, 9402, 9403, 9405 and 9406 were isolated from the moribund soft-shelled turtles. 4 strains of them 9401, 9402, 9403 and 9405 through infecting tested have had a higher pathogenicity. They can seriously infect turtles with a similar characters to natural infectious case. On the other hand, 4 strains were lethal to a mouse. It proved that four strains were the pathogens of covered disease. According to the morphological features of the bacterium, cultural performances, and physiobiochemical reactions, these strains had been identified as *Aeromonas hydrophila* Stanier and *Proteus vulgaris* Hauser.

**Key words** *Trionyx sinensis*, covered disease, *aeromonas hydrophila*, *proteus vulgaris*