

点状气单胞菌引起虹鳟感染症及其病原学机制的初步研究*

殷 战 徐 伯 亥

(中科院水生生物研究所, 武汉 430072)

马 涛

(山西省水产研究所, 太原 030006)

提 要

对山西省朔县省虹鳟试验场 1987 年 8 月在亲鱼中爆发的一次流行病进行了病原菌分离、培养、毒力试验和详细的生理生化测定, 确定点状气单胞菌为其病原菌。并对该菌胞外产物的致病性进行了研究, 通过测定其溶血活性、酪蛋白酶活性、对鱼致死性以及对其引起的组织病理学变化的观察, 初步确定了胞外产物与该菌侵袭力的相关性。

关键词 点状气单胞菌, 虹鳟, 胞外产物, 组织病理

虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 是世界上广泛养殖的一种优良品种, 深受消费者欢迎。我国适于养殖虹鳟的地方很多, 但由于起步较晚, 对于其养殖和防病技术还尚未深入研究, 目前产量还很低。在国外, 研究和报道虹鳟的病害很多, 其中对点状气单胞菌 (*Aeromonas punctata*) 所引起的虹鳟出血性败血症也有大量的报道, 并对点状气单胞菌的致病机制也作了较深入地研究^[6,15]。国内, 王德铭先生在 1959 年就对点状气单胞菌引起的青、鲩鱼肠炎病进行了研究^[1]; 由于国内有关虹鳟的细菌性疾病工作还刚刚开展, 目前还未见点状气单胞菌引起虹鳟病害的报道。

1987 年夏, 山西省虹鳟试验场亲鱼爆发了一次较为严重的流行病, 其主要症状是: 体色发黑; 肛门充血; 尸检可见其腹水; 肝脏充血肿大并常伴出血点; 脾脏充血肿大; 肠壁充血发炎; 剪开肾脏可见较严重的液化坏死。对其进行病原菌分离, 人工感染试验以及病原菌的鉴定, 确定该病由点状气单胞菌 (*A. punctata*) 感染所致。还通过对环境和饲养情况的观察, 找出其流行的外部条件。另外, 作者还进行了该病的组织病理学和病原胞外产物 (Extracellular products, ECP) 的初步研究, 确定了该病的一些病理学变化及其与致病因子间的相关性, 获得了病原侵袭力机制方面的一些初步结论。

* 本文得到倪达书先生的悉心指导, 特此深表谢忱。
1989 年 11 月 1 日收到。

材料和方法

材料来源 从山西朔县省虹鳟试验场获得病鱼 20 多尾，从肝、脾等处分离病菌以及将肝、脾、肾等组织固定用以进行病理观察。并从该场进口长期存放的鱼粉中分离菌株。参考菌株取已鉴定菌株。用作感染试验及病理观察的健康虹鳟、草鱼分别取自该虹鳟试验场未发病池及本所鱼池。

分离及鉴定方法 病菌分离采用文献 [2] 所叙述的方法。另取进口鱼粉 1.0g，溶于 10ml 无菌水中，取 0.1ml 涂布于普通肉汤琼脂平板，对平板菌落计数并挑取菌落。按文献 [9] 进行生理生化试验及细菌 DNA 碱基成分的测定以热变性温度法测定 G+Cmol% 值。

毒力试验方法 将所分离的菌株，于 28℃ 培养 18h，按 MacFland 氏浊度管稀释成一定浓度的菌悬液^[1]，腹腔注射，观察病程。

ECP 的提取、浓缩、保存及特性测定 方法与报道 [11] 方法所叙相同。采用普通肉汤培养基和推荐的适于点状气单胞菌生长的一种合成培养基^[9]。

ECP 对鱼体毒力的测定 胞外产物溶液以腹腔注射感染病程 4d。以灭菌未接种培养液的浓缩液作为对照，并在注射前以 0.22μm 微孔滤膜除菌并作无菌检测。ECP 溶液 60℃ 水浴 30min，再测定上述各项活性指标。

组织病理学观察 取殃胚解剖，将其肝、脾、肾组织块浸入 Bouin 氏固定液中过夜后，转入 70% 酒精中保存。常规石蜡切片，H·E 染色。以健康虹鳟组织块切片作为对照。ECP 人工腹腔注射感染草鱼后 48h，取肝、脾、肾及注射处肌肉等组织如上述方法操作，以无菌浓缩培养液注射草鱼的各相应组织作对照。

结果与讨论

1. 毒力试验

1987 年 8 月，山西省朔县省虹鳟试验场的亲鱼爆发较为严重的病害，在当时水温为 18℃ 以上的十多天里，平均每天死鱼一百多尾。从病鱼内脏分离到细菌，初筛后，毒力较强的有 SS87-10-4, SS87-4-5。用 SS87-4-5 再感染虹鳟导致发病的殃胚上重分离到 Rss87-4-5[®]、Rss87-4-5[®]；鱼场当时投喂的是进口经长期存放的鱼粉，其中亦存在大量细菌，计数表明数量为 80—100 万个菌/g 鱼粉，从中依菌落形态与分离病原的一致性挑取若干菌株。用上述菌株对虹鳟进行毒力试验（表 1），从中可见从鱼体中分离的 SS87-10-4, SS87-4-5, Rss87-4-5[®], Rss87-4-5[®] 都具有较强的毒力，而且感染产生的病症均与鱼场中病鱼症状相似；从鱼粉中分离的 FP87-4, FP87-5 也具一定毒力。

2. 细菌形态及生理生化反应

选用 SS87-10-4, SS87-4-5, Rss87-4-5[®], Rss87-4-5[®], FP87-4, FP87-5 进行细菌形态及生理生化反应的观察测定，表明这六株菌性状一致，现以 Rss87-4-5[®] 为代表叙述：

表 1 菌株对虹鳟毒力试验
Tab. 1 Artificial infection tests with several isolates on the rainbow trout

菌株 Strain	试验鱼体长 Size of fish (cm)	试验鱼尾数 No. of tested fish	平均水温 Water temperature (°C)	菌液浓度 Dilution of bacterium (McF)	注射剂量 Dose per fish (ml)	死鱼尾数 No. of death	症状 Symptom
SS87-10-4	6	5	19	3	0.3	5	体色发黑、肝有血丝、脾肿大、肠壁充血
	5	5	18	1	0.3	5	
	5	5	23	3	0.1	5	
SS87-4-5	6	5	18	3	0.3	4	体色发黑、肝有血丝、脾肿大、肠壁充血
	6	5	18	3	0.3	5	
	5.5	5	23	3	0.1	4	
Rss87-4-5②	6	5	18	3	0.3	5	体色发黑、肝有血丝、脾肿大、肠壁充血
	6	5	18	3	0.3	5	
Rss87-4-5③	6	5	18	3	0.3	5	体色发黑、肝有血丝、脾肿大、肠壁充血
	6	5	18	3	0.3	5	
FP87-4	5.5	5	23	3	0.1	5	体色发黑、肝有血丝、脾肿大、肠壁充血
	5.5	5	23	3	0.1	4	
FP87-5	5.5	5	23	3	0.1	2	体色发黑、肝有血丝、脾肿大、肠壁充血
	5.5	5	23	3	0.1	2	

注: McF 系 McFarland 浊度管

菌体为短杆状, $0.6-0.7 \times 1.8-2.0 \mu\text{m}$, 中轴直, 具运动力, 无芽孢、荚膜; 草兰氏染色阴性, 其形态特征见电镜照片(图 1)。菌株的主要生理生化特征及其与《伯杰氏系统细菌学手册》^[14]中嗜水气单胞菌 (*A. hydrophila*) 标准性状对比的情况见表 2, 表中可见其与 *A. hydrophila* 性状一致。

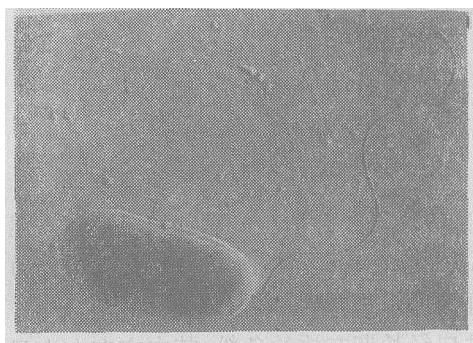


图 1 电镜观察 Rss87-4-5[®] 菌株形态及鞭毛
 $\times 10600$

Fig. 1 The flagellum of Rss87-4-5 strain
 $(\times 10600)$

定液于 60°C 保温 30min , 测定各特性的活性, 可表明 ECP 的溶血活性水浴后无变化, 具热稳定性; 后两者水浴后, 活性消失, 表明为热敏性。

4. 组织病理学观察

从组织切片观察可见正常组织: 肝细胞排列紧密有序(图版 I:1,3); 脾组织中有完

整的核, 胞质丰富, 呈嗜酸性。*A. hydrophila* 在脾组织中引起坏死性肉芽肿, 肉芽肿中心有干酪样坏死物。

3. ECP 特性

用菌株 Rss87-4-5[®] 制取的 ECP 浓缩液用以进行各项活性测定, 其溶血活性测定结果见表 3; 两次测定其酪蛋白酶活性表明原培养液中酪蛋白酶活性分别 2、2.5 个活性单位; 并且 ECP 也具有对草鱼的致死效应(表 4)。由表 4 可见 ECP 可引起与菌体感染相似的症状。将 ECP 测

表 2 Rss87-4-5[®] 菌株与嗜水气单胞菌形状比较Tab. 2 Comparison of properties between *A. hydrophila* and Rss87-4-5

性状 Character	菌株 Strain	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>		Rss87-4-5
端生单鞭毛	+	+	+	+
运动性	+	+	+	+
成簇、对、链排列	+	+	+	+
呈单个、对排列	+	+	+	+
灰褐色水溶性色素	-	-	-	-
在营养浸膏上 37℃ 生长	+	+	+	+
氧化酶	+	+	+	+
硝酸盐还原成亚硝酸盐	+	+	+	+
赖氨酸脱羧酶 (Moller's)	d	-	+	+
鸟氨酸脱羧酶 (Moller's)	-	-	-	-
精氨酸脱羧酶 (Moller's)	+	+	+	+
色氨酸、苯丙氨酸脱氨酶	-	-	-	-
脲酶	-	-	-	-
淀粉、明胶水解	+	+	+	+
七叶苷水解	+	+	+	+
半胱氨酸产 H ₂ S	+	+	+	+
Tween80 酯酶	+	+	+	+
L-组氨酸、L-精氨酸利用	+	+	+	+
在无 NaCl 培养液中生长	+	+	+	+
在 1% 培养液中产吲哚	+	+	+	+
在 KCN 肉汤中生长 (Moller's)	+	+	+	+
ONPG 试验	+	+	+	+
V.P. 反应	+	+	+	+
葡萄糖产气	+	+	+	+
发酵麦芽糖、半乳糖、海藻糖、水杨苷、蔗糖、甘露醇	+	+	+	+
发酵乳糖、纤维二糖、山梨醇	d	-	+	+
发酵卫矛醇、鼠李糖、肌醇、木糖、棉子糖	-	-	-	-
降解丙二酸盐	-	-	-	-
发酵甘油	d	-	+	+
G + C mol%	58—62	59.95		

注: + 阳性反应; - 阴性反应; d 不规则反应

表 3 ECP 溶血活性测定

Tab. 3 Hemolytic activity measured in the ECP solution of Rss87-4-5[®]

浓缩 ECP 的倍数 Multiple of ECP concentrate	ECP 浓缩液稀释倍数 Dilution of the ECP concentrate								对照 Control	原培养液中溶血活性单位数量范围 Range of activity units in cultures
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128		
15	+	+	+	+	+	+	-	-	-	2.1—4.2
8	+	+	+	+	+	w	-	ND	-	-4
29	+	+	+	+	+	+	+	-	-	2.2—4.4

注: + 完全溶血; - 不完全溶血; w 微溶血; ND 未测

表 4 ECP 对草鱼的人工感染试验

Tab. 4 Artificial infection tests with the ECP solution of Rss87-4-5® on grass carp

培养基 Medium	鱼均体重(g) Weight of fish	试验鱼数 No. of tested fish	水温(℃) Water tem- perature	ECP 浓缩倍数 Multiple of ECP concentrate	注射剂量 (ml) Dose per fish	死亡数 No. of death	症 状 Symptom
A	12.0	10	17	15	0.3×2	7	
B	11.0	5	17	15	0.3×2	5	
B	14.3	10	18	8	0.3×2	10	
B	9.5	15	22	21.6	0.3×2	12	体色发黑腹 水, 肝充血, 脾 肿大, 充血; 肠 膜充血

注: A 合成培养基 23°C; B 普通肉汤培养基

整的椭圆体结构(图版 I:5,7);肾小球、肾小管完整的结构(图版 II:9, 11) 和整齐而有序的肌肉纤维组织的排列(图版 II:13)。而观察病菌或 ECP 注射感染后的组织可见:肝细胞混浊肿胀,排列杂乱,胞间隙增大(图版 I:2,4);脾椭圆体结构遭到破坏,其网状纤维及含吞噬细胞的壁鞘溃散,常见附近血管中大量血细胞涌人(图版 I:6,8);肾小管上皮细胞混浊肿胀,并造成肾小管结构崩溃,形成空腔(图版 II:10,12);注射 ECP 处的肌肉组织可见纤维组织出现溃烂、松散,形成组织坏死(图版 II:15)。

从鉴定结果可见本次分离到的菌株生理生化特征较一致,且与嗜水气单胞菌 (*A. hydrophila*) 的描述一致^[14],点状气单胞菌与嗜水气单胞菌原是两个独立的种,由于许多学者通过研究认为此两者应为同物异名^[13],才在《伯杰氏系统细菌学手册》中将其合为嗜水气单胞菌,但我们认为点状气单胞菌报道在前^[8],故按优先律,该菌应为点状气单胞菌。

经观察,作为条件致病菌的点状气单胞菌^[3,4,6]所以引起朔县虹鳟试验场中鱼发病,是因为在爆发期间平均水温高达 18°C,达虹鳟养殖温度上限,高水温不仅对虹鳟产生“压迫”,降低其抗病能力,而且还给点状气单胞菌的生长提供了适宜的生长温度^[10];另外鱼场投喂的饲料进口后长期堆放,有些已腐败变质,含大量细菌,从中分离的 FP87-4、FP87-5,与此次流行致病菌同属一类,且具有一定毒力;病鱼体表无症状,而脾、肝等内脏的组织病变也属点状气单胞菌的肠道感染类型^[9]。这些观察均表明此次流行是由于鱼处于高温生理“压迫”状态下,体质及免疫机能处于较弱情况下,又投喂变质含菌饵料,致使条件致病菌 (*A. punctata*) 在其最适宜的生长条件下大量繁殖,从而导致这次由点状气单胞菌引起的虹鳟肠道感染病的爆发。

胞外产物 (ECP) 是细菌生长过程中分泌到体外的一个复杂的酶系,目前国外许多学者认为它是点状气单胞菌侵袭力的主要因子^[6,16]。据报道 ECP 中含有多种酶的活性^[6,11],但对 ECP 作用的详细机制目前仍是众说纷纭^[6,16]。作者通过对病原菌 ECP 的初步研究,由 ECP 对鱼的致死效应、病症的肉眼观察及组织病理与病原菌引起的相似性认为 ECP 是与点状气单胞菌致病性相关的,并根据其热敏性的致死力认为 ECP 中热稳定性的溶血素以及细菌培养过程中可能产生的脂多糖物质不是其主要致病因子;ECP 中蛋白酶是一个复杂的系统,尚不能认为此次所测的酪蛋白酶便是 ECP 中的主要因子,有关 ECP 具体作用机制还有待于今后的进一步工作。

对病鱼的组织病理切片观察可见肝、脾、肾等内脏器官均有显著的病变,并与江草周三等描述的点状气单胞菌引起的肠道感染类型的病理变化相似^[5,15]。将 ECP 注射草鱼,

对其引起病变的观察尤有意义，这表明 ECP 可引起与病原菌引起的相似的病理变化。Bach 等人（1978）在用点状气单胞菌感染沟鰕 (*Ictalurus punctatus*) 脾的组织病理电镜观察中，曾推测点状气单胞菌 ECP 可引起脾椭圆体结构的破坏^[7]，本实验成功地证实了这点，从而表明点状气单胞菌的 ECP 可以通过对鱼体脾脏，这一重要免疫器官的破坏，导致机体防御系统功能的削弱，从而增强病原在鱼体中生存和为害的能力。

参 考 文 献

- [1] 王德铭、葛蕊芳、吴兰彰、王银妙, 1959。鲩、青鱼传染性肠炎的研究 1. 肠炎致病细菌的研究。水生生物集刊,(3): 241—254。
- [2] 王肇巒、徐伯亥, 1985。尼罗罗非鱼腐皮病致病菌的研究。水产学报,9(3): 217—221。
- [3] 徐伯亥、熊木林、韩先朴、芦全章、葛蕊芳, 1987。二龄草鱼肠炎病的研究。水生生物学报,11(1): 73—82。
- [4] 徐伯亥、葛蕊芳、熊木林, 1988。二龄草鱼肠炎病发病机理。水生生物学报,12(4): 308—315。
- [5] 江草周三、稻田三朗、宫崎照雄, 1979。魚の病理組織學, 東京大學出版会。
- [6] Austin, B. and Austin, D. A., 1987. Bacterial fish pathogens, Diseases in Farmed and Wild Fish. Ellis Horwood Limited.
- [7] Bach, R., Chen, P. K. & Chapman, G. B., 1978. Changes in the spleens of the channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque) induced by infection with *Aeromonas hydrophilia*. *J. Fish Dis.*, 1: 205—217.
- [8] Eddy, B. P., 1962. Further studies on *Aeromonas* I. Additional strains and supplementary biochemical tests. *J. Appl. Bact.*, 25: 137—146.
- [9] Gerhardt, P., et al., 1981. Manual of Methods for General Bacteriology, American Society for Microbiology, Washington.
- [10] Groberg, W. J., McCoy, R. H., Pilcher, K. S., and Fryer, J. L., 1978. Relation of water temperature to infections of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), chinook salmon (*O. tshawytscha*), and steelhead trout (*salmon gairdneri*) with *Aeromonas salmonicida* and *A. hydrophila*. *J. Fish. Res. Board. Can.*, 35: 1—7.
- [11] Kanai, K. and Wakabayashi, H., 1984. Purification and some properties of protease from *Aeromonas hydrophila*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 50(8): 1367—1374.
- [12] Lallier, R., Bernard, F. and Lalonde, G., 1984. Difference in the extracellular products of the two strains of *Aeromonas hydrophila* virulent and weakly virulent for fish. *Can. J. Microbiol.*, 30: 900—904.
- [13] Popoff, M. and Veron, M., 1976. A taxonomic study of the *Aeromonas Hydrophila-Aeromonas punctata* group. *J. Gen. Microbiol.*, 94: 11—22.
- [14] Popoff, M., 1984. Genus. III, *Aeromonas*. P. 545—548. in J. G. Holt and Krieg, N. R. (eds). "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". 9th. ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- [15] Roberts, R. J., 1978. Fish Pathology. Bailliere Tindall, London.
- [16] Thune, R. L., Johnson, M. Graham, T. E. and Amborski, R. L., 1986. *Aeromonas hydrophila* B-haemolysin: purification and examination of its role in virulence in O-group channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish. Dis.*, 9: 55—56.

RESEARCH ON ENTEROCOLITIS OF RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) INFECTED WITH *AEROMONAS PUNCTATA* AND ITS AETIOLOGICAL MECHANISM

Yin Zhan Xu Bohai

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan 430072)

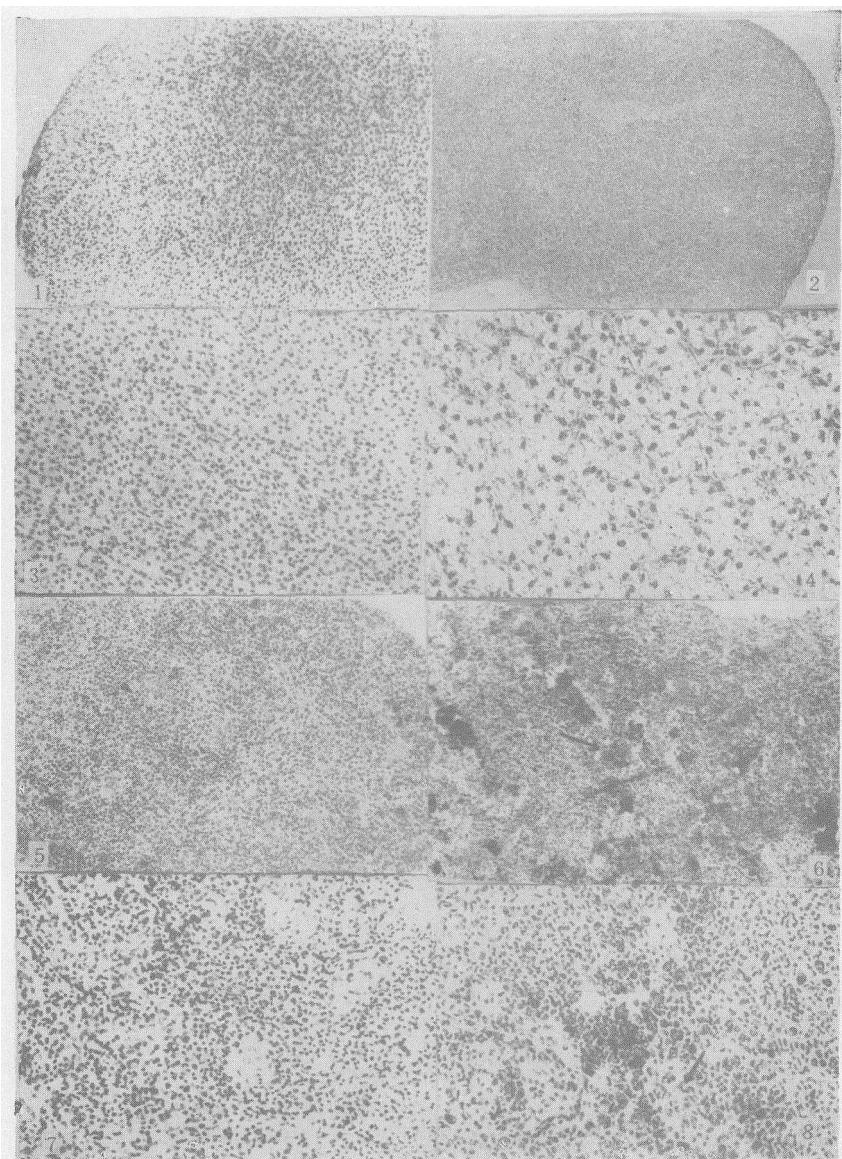
Ma Tao

(Shanxi Provincial Fisheries Research Institute Taiyuan 030006)

Abstract

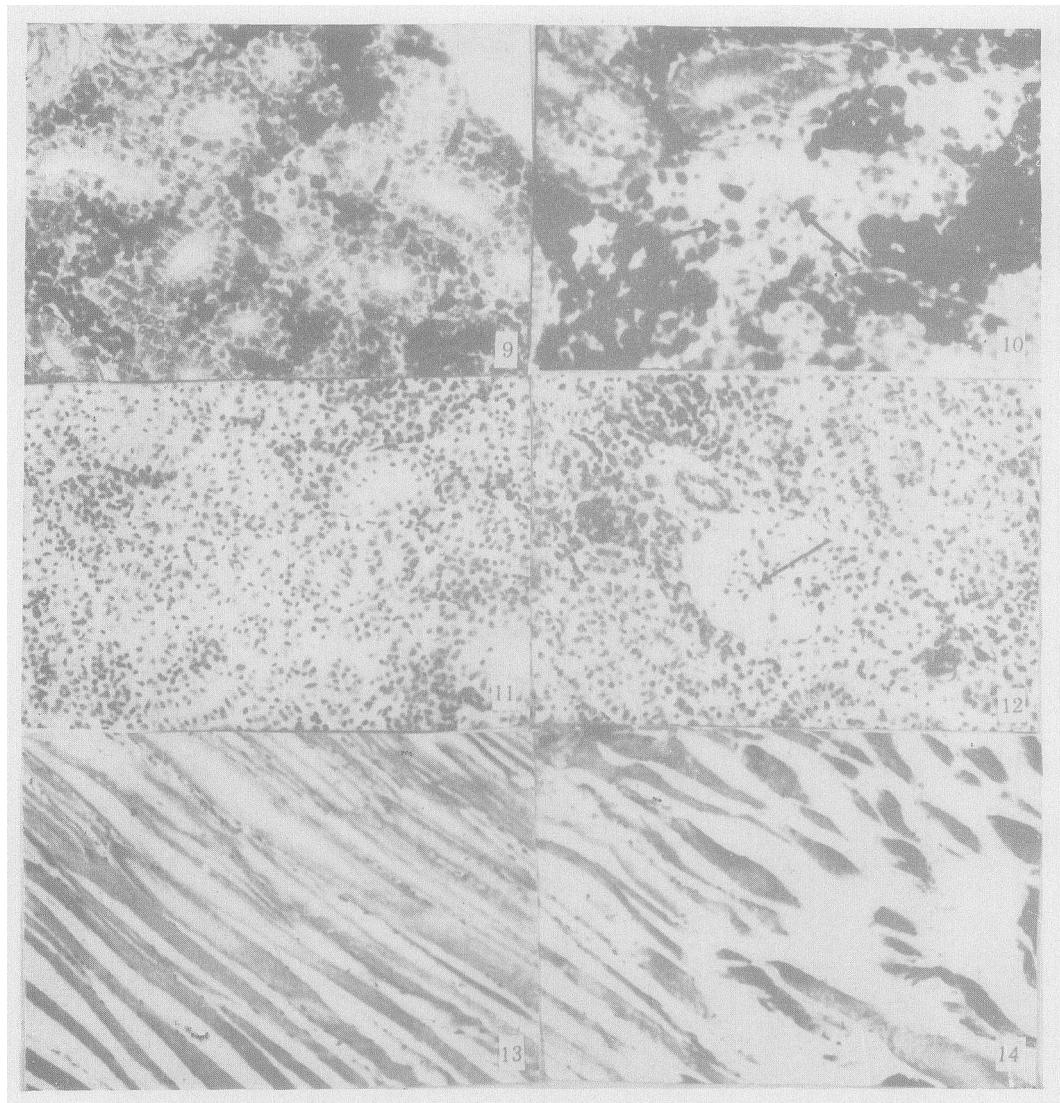
An epizootic outbreak in August, 1987, in adult rainbow trout reared in freshwater at Shuo County, Shanxi Province, was studied. According to the virulence tests and the biochemical characteristics of the bacterial isolates, the pathogens were assigned to *Aeromonas punctata*. The hemolytic activity, caseinase and the lethal activity for fish of the ECP of the isolates were measured. Observation was also made on the histopathological signs produced by the ECP. These observations indicated that the ECP of *A. punctata* may contribute to its invasive powers.

Key words *Aeromonas punctata*, Rainbow trout, ECP, Histopathology



1. 示正常虹鳟肝脏切片, $\times 196$; 2. 示病菌感染虹鳟肝脏切片, 可见肝细胞混浊、肿胀, $\times 196$;
3. 示正常草鱼肝脏切片, $\times 392$; 4. 示 ECP 感染草鱼肝脏切片, 可见肝细胞肿胀, $\times 392$; 5. 示
正常虹鳟脾脏切片, $\times 196$; 6. 示病菌感染虹鳟脾脏切片, 箭头所指为椭圆体结构的破坏情况,
 $\times 196$; 7. 示正常草鱼脾脏切片, $\times 196$; 8. 示 ECP 感染草鱼脾脏切片, 箭头所指为椭圆体结构
破坏情况, $\times 196$

1. Section of normal rainbow trout liver. $\times 196$; 2. Swollen hepatic cells of the liver of rainbow trout infected with *A. punctata*. $\times 196$; 3. Section of normal grass carp liver. $\times 392$; 4. Swollen hepatic cells of the liver of grass carp infected with the ECP of Rss87-4-5 strain. $\times 392$; 5. Section of normal rainbow trout spleen. $\times 196$; 6. Ellipsoidal necrosis (arrow) of the spleen of rainbow trout infected with *A. punctata*. $\times 196$; 7. Section of normal grass carp spleen. $\times 196$; 8. Ellipsoidal necrosis (arrow) of the spleen of grass carp infected with the ECP of Rss87-4-5 strain. $\times 196$



9.示正常虹鳟肾脏切片。 $\times 1120$; 10.显示病菌感染虹鳟肾脏切片。箭头所指为肾小管结构破坏情况。 $\times 1120$; 11.示正常草鱼肾脏切片。 $\times 1120$; 12.示 ECP 感染草鱼肾脏切片, 箭头所指为肾小管破坏情况。 $\times 1120$; 13.示健康草鱼肌肉组织切片, $\times 560$; 14.示 ECP 感染草鱼肌肉组织切片, 为注射部位肌肉组织溃烂坏死, $\times 560$

9. Section of normal rainbow trout kidney. $\times 1120$; 10. Destruction of the renal tubules (arrow) of the kidney of the rainbow trout infected with *A. punctata*. $\times 1120$; 11. Section of normal grass carp kidney. $\times 1120$; 12. Destruction of the renal tubules (arrow) of the kidney of grass carp infected with the ECP of Rss87-4-5 strain. $\times 1120$; 13. Section of normal grass carp muscle. $\times 560$; 14. Colliquative necrosis arround the injection site of the muscle of grass carp infected with the ECP of Rss-87-4-5 strain, $\times 560$