

# 鳖“白板病”致病细菌的研究

陈晓凤 周常义 青 新

(集美大学水产学院, 厦门 361021)

**摘 要** 对福建省福清、莆田和厦门等地区养殖鳖的“白板病”病原菌进行了分离培养、菌种鉴定、人工感染及药敏试验等研究, 得知该病的致病菌主要为嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*), 同时还有迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)和普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)。

**关键词** 鳖, 白板病, 病原体, 嗜水气单胞菌, 迟缓爱德华氏菌, 普通变形杆菌

1994年初, 在福建省厦门、福清和莆田等地区, 发现鳖养殖中出现一种严重的传染性疾病, 该病主要发生在 100 g 以上的大规格鳖。病鳖外观身体较厚, 腹甲呈白色, 故名“白板病”; 肝肿大, 呈土黄色或青灰色; 胆肿大, 色淡绿; 肾贫血, 发白; 脾脏变小, 色黑或淡红色肿大; 鳖的整体呈现严重贫血状态。该病呈慢性死亡, 由于病鳖个体较大, 鳖本身价值高, 故损失严重。对该疾病的研究国内外尚未见报道, 本试验结果有助于对养殖上鳖病的防治。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验用鳖

试验用的患病鳖来自厦门、福清和莆田地区鳖养殖场; 健康鳖购自厦门某鳖养殖场。

### 1.2 病原菌的分离

将典型的“白板病”鳖体表消毒, 无菌方法从心、肝、肾和脾等组织取材, 在营养琼脂平板上进行划线分离, 置(30±0.5)℃恒温培养 24 h, 挑取单菌落移种斜面, 然后进行分离提纯供致病力试验和细菌学鉴定等。

### 1.3 人工感染试验

#### 1.3.1 除菌组织浆悬液人工感染试验

将病鳖的心、肝、肾和脾等组织无菌操作剪碎、研磨, 加 5 倍生理盐水, 用赛氏滤器过滤, 得除菌组织浆悬液。对体重 100 g 左右健康幼鳖 3 只, 各注射 0.5 mL 于后肢基部, 放于水族箱内饲养。饲养是用 40 cm×60 cm×40 cm 的水族箱, 底铺细沙面积约 30 cm×40 cm, 厚 5~7 cm, 水深 15 cm, 每日换水一次, 早晚各投喂幼鳖人工配合饲料一次, 水温控制在(30±0.5)℃。

#### 1.3.2 菌悬液注射人工感染试验

将分离纯化的菌株接种到营养琼脂斜面, 30℃恒温培养 16 h 左右, 用无菌生理盐水洗下菌苔, 配成菌悬液(菌悬液浓度采用活菌平板计数法计数), 对体重 100 g 左右健康幼鳖于后肢

基部注射 0.3 mL, 设对照组(注射生理盐水 0.3 mL)。每组放鳖 3 只于水族箱内饲养, 饲养方式同 1.3.1, 水温为 28~31℃。每隔 6 或 12 h 观察结果, 及时收集病鳖。

### 1.3.3 菌悬液浸泡人工感染试验

由于健康幼鳖来源不易, 故仅对注射人工感染试验中毒力较强的 2 个菌株进行浸泡人工感染。方法是將营养琼脂平板培养的幼龄菌水洗到无菌烧杯中, 再稀释到水族箱内, 菌悬液浓度以活菌平板计数法进行。每箱放入体重 100 g 左右健康幼鳖 3 只, 饲养方法同 1.3.1。

### 1.3.4 菌株再分离

从注射和浸泡感染濒死幼鳖的肝、肾和脾等部位, 同以上方法分离致病菌, 获得与人工感染试验所用菌株的菌落、菌体形态一致的纯培养。

### 1.3.5 菌悬液小白鼠人工感染试验

对体重 30 g 左右健康小白鼠腹腔注射 0.15 mL 菌悬液, 菌悬液的制备及浓度测定同 1.3.2, 设对照组(注射生理盐水 0.15 mL)。每组放小白鼠 5 只于笼内常规饲养。

## 1.4 病原菌的鉴定

病原菌的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[1978]和 Popoff 和 Veron[1976]等方法进行。各项生化反应均在(30±0.5)℃条件下进行。

## 1.5 药物筛选

采用药物敏感试纸进行。方法是將幼龄菌的菌苔调成菌悬液后, 均匀涂布于培养基平板上, 然后贴上含药物试纸, 恒温 30℃培养 24 h 后观察结果。药物试纸购自上海卫生防疫站。

## 2 结果

### 2.1 病原菌的分离

分离获得的菌株, 经人工感染试验证实 8 株菌可使鳖患病死亡, 这 8 株菌来源见表 1。

表 1 试验菌株的来源

Table 1 Resources of experimental strains

菌株号	分离日期	采样地点	病鳖重量	该菌出现且呈优势的部位	供鉴定菌株来源
940101	1994-01-22	厦门	约 100 g	肝、胆、脾、肾	肝
940401	1994-04-04	福清	约 250 g	肝、脾	肝
940402	1994-04-04	福清	约 250 g	肝、脾	脾
940403	1994-04-05	福清	258 g	肝、肺	肝
940407	1994-04-05	福清	258 g	肺	肺
940602	1994-06-29	莆田	475 g	肝、脾、肾、肺、肠	肝
940603	1994-06-29	莆田	475 g	喉	喉
940604	1994-06-29	莆田	475 g	肺	肺

注: 1994 年 4 月 4 日采样 250 g 左右福清病鳖, 因已近死亡等种种原因, 仅进行了肝、脾的分离

## 2.2 人工感染试验

### 2.2.1 除菌组织浆悬液人工感染试验

进行了三次除菌组织浆悬液人工感染试验,三次注射除菌组织浆悬液的鳖在30 d内均一切正常,未见病态及死亡,说明该病的病因与病毒无关。

### 2.2.2 菌悬液注射人工感染试验

菌悬液注射人工感染试验中诸菌株对鳖的毒力情况见表2。试验组鳖注射菌液后,最初出现鳖不能钻入沙中的病态,以后反应迟缓、逐渐死亡。由表2可以看出,人工感染呈急性死亡,死亡症状与自然病鳖基本一致。

表2 8株菌株注射感染试验

Table 2 The infectional experiments of injecting method with eight strains

菌株号	感染菌液浓度(个/mL)	剂量(mL)	死亡数/试验数	感染后发病死亡时间和发病程度
940101	$2.4 \times 10^9$	0.3	3/3	32~84 h 全部死亡 +++ +
940401	$1.8 \times 10^9$	0.3	3/3	5~12 h 全部死亡 +++ +++
940402	$2.4 \times 10^9$	0.3	3/3	8~12 h 全部死亡 +++ +++
940403	$1.7 \times 10^9$	0.3	3/3	8~10 d 全部死亡 +++ +++
940407	McF5 号管	0.3	3/3	15~24 h 全部死亡 +++ +++
940602	$2.6 \times 10^9$	0.3	3/3	15~24 h 全部死亡 +++ +++
940603	$2.5 \times 10^9$	0.3	3/3	15~10 d 全部死亡 +++ +
940604	$2.3 \times 10^9$	0.3	3/3	15 h 之内全部死亡 +++ +++
对照组	生理盐水	0.3	3/3	15 d 内正常

注:(1)试验鳖先在试验饲养条件下饲养3 d,无任何病态。(2)发病程度相对比较的划分表示为:肝呈青紫色或灰白色或稍肿大的深紫色花斑状;肾贫血;脾呈青紫色、体积缩小;腹腔具腹水,胃肠壁充血。其中+++表示以上各症状均表现严重,++表示以上各项症状均表现明显,+表示以上各项中某项表现明显,而一些病变则表现不明显。后期死亡鳖出现贫血症状,腹甲呈纯白色

### 2.2.3 菌悬液浸泡人工感染试验

菌悬液浸泡人工感染试验中2个菌株对鳖的毒力情况见表3。

表3 940401、940402 菌株浸泡人工感染试验

Table 3 The infecting experiments of immersing method with 940401 and 940402 strains

菌株号	饲养水体中菌液浓度(个/mL)	死亡数/试验数	感染后发病死亡时间和发病程度
940401	$4.1 \times 10^5$	3/3	3~6d 全部死亡 +++ +
940402	$3.2 \times 10^5$	3/3	3~7d 全部死亡 +++ +
对照组	清水	0/3	15d 内一切正常

注:同表2中注(1)、(2)

### 2.2.4 菌株再分离

从注射感染和浸泡感染濒死幼鳖的内脏肝、肾和脾等部位,均分离到极强优势菌。它们的菌落特征、菌体形态以及生理生化反应与从自然发病的病鳖上分离的完全一致。

### 2.2.5 菌悬液小白鼠人工感染试验

对小白鼠腹腔注射毒力试验结果(表4)表明,菌株940401、940402、940407、9400604对哺乳

动物也具有一定的毒性,其中菌株 940407 毒力最强;而菌株 940403, 940602 毒力较弱,菌株 940403, 940603 无毒。

## 2.3 病原菌的鉴定

### 2.3.1 菌体形态、培养特征

8 株菌均为革兰氏阴性杆菌,无芽孢、无荚膜。在营养琼脂上均生长良好,呈淡乳黄色,菌落半透明,表面湿润、具光泽,均无水溶性色素产生,除菌株 940407 以外,菌落均呈圆形、边缘整齐、中间略隆起;菌株 940407 菌落呈扩散状生长。在普通肉汤液体培养基上生长特征:30℃ 下 24 h 呈均匀混浊生长,表面沿壁有微量环状生长,48 h 后表面沿壁环状生长增加,呈少量薄膜状。30℃ 培养 24 h 菌落大小:菌株 940602 为 0.5 mm,其它 6 株菌为 1.2~1.5 mm;培养 48 h 菌落大小:菌株 940602 为 0.8 mm,其余 6 株菌为 1.8~2.5 mm。菌体大小:菌株 940407 为  $0.15 \mu\text{m} \times (0.2 \sim 0.3) \mu\text{m}$ ,菌株 940602 为  $0.5 \mu\text{m} \times (0.8 \sim 1.0) \mu\text{m}$ ,其它 6 株菌为  $(0.3 \sim 0.4) \mu\text{m} \times (0.5 \sim 0.8) \mu\text{m}$ 。鞭毛特征:菌株 940407 和菌株 940602 为周生鞭毛,其它 6 株菌均为极生单鞭毛。

表 4 小白鼠腹腔注射毒力试验

Table 4 Artificially infectious experiments on the injections given to mice

菌株号	感染菌液浓度(个/mL)	剂量(mL)	死亡数/试验数	再分离结果
940101	$3.5 \times 10^9$	0.15	1/5	
940401	$4.5 \times 10^9$	0.15	2/5	肝、肾均见此菌
940402	$4.9 \times 10^9$	0.15	3/5	肝、肾均见此菌
940403	$2.3 \times 10^9$	0.15	0/5	
940407	McF5 号管	0.15	4/5	肝、肾、心、脾均见此菌
940602	$3.0 \times 10^9$	0.15	1/5	
940603	$3.2 \times 10^9$	0.15	0/5	
940604	$4.4 \times 10^9$	0.15	2/5	
对照组	生理盐水	0.15	0/5	

注:再分离结果是指对注射发病濒死小白鼠进行常规细菌再分离的结果

### 2.3.2 菌株的生理生化反应

8 菌株生长温度范围为 22~39℃,在 9℃ 以下不生长,其中菌株 940602 在 15℃ 以下不生长,在 43℃ 也不生长。pH 生长范围为 5.5~10.0,其中 940602 菌株为 5.5~9.0。所有菌株在无 NaCl 的胨水中生长良好,菌株 940407 在 NaCl 含量为 7% 以内的胨水中可生长,在 9% 时则不生长,其余各菌株在 NaCl 含量为 3% 以内的胨水中可生长,5% 时不生长。8 菌株的生化及糖发酵特征如表 5。从表 5 可以看出,各菌株生理生化性状的差异,及其和模式的嗜水气单胞菌、迟缓爱德华氏菌、普通变形杆菌比较。940101、940401、940402、940403、940603、940604 六菌株均为嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*);菌株 940407 为普通变形杆菌(*Proteus vulgarius*);菌株 940602 为迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)。

## 2.4 药物筛选

8 株菌对药物的敏感程度不同,8 株菌均较敏感的药物有妥布霉素、丁胺卡那霉素、新霉

素、庆大霉素、氟哌酸;均较不敏感的药物有先锋霉素、麦迪霉素、洁霉素等。其中,菌株 940602 对大多数药物敏感,而菌株 940403、940604、940604、940407 对多数药物均不敏感。8 株菌对抗药物的敏感性详见表 6。

表 5 8 株菌株生理生化反应

Table 5 The biochemical characteristics of eight strains

测定项目	940101	940401	940402	940403	940603	940604	<i>A. hydrophila</i>	940407	<i>P. vulgaris</i>	940602	<i>E. tarda</i>
氧化酶	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
接触酶	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
动力	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S 双糖铁	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
O/F 试验	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
葡萄糖产酸	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
葡萄糖产气	+	+	+	+	+	+	+	+	+ 或 -	+	+
硝酸盐还原	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I(靛基质)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M.R.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V.P.	+	+ <sup>w</sup>	-	-	+ <sup>w</sup>	+	+	-	-	-	-
柠檬酸盐利用	-	+	-	+ <sup>2</sup>	-	+ <sup>w</sup>	d	-	d	-	-
尿素	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
丙二酸盐	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
七叶苷	+	+	+	+	+	+	+	-	d	-	-
淀粉	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
明胶	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
赖氨酸脱羧酶	+	+	+ <sup>2</sup>	+ <sup>2</sup>	+ <sup>2</sup>	+ <sup>2</sup>	+	-	-	+	+
鸟氨酸脱羧酶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
精氨酸双水解酶	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
葡萄糖酸盐		+ <sup>w</sup>						-	-	-	-
苯丙氨酸脱氨酶	+ <sup>w</sup>	+ <sup>w</sup>	+ <sup>w</sup>	-	-	-	-	+	+	-	-
甘露糖	+	+	+ <sup>2</sup>	+	+	+		-	-	-	-
蔗糖	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
L-阿拉伯糖	-	+	+	+	+	+	d	+	-	-	-
甘露醇	+	+	+ <sup>2</sup>	+	+	+	+	-	-	-	-
水杨素	+	+	+	+	+	+		-	d	-	-
麦芽糖	-	+	+	+	+	+		-	d	-	-
蔗糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
木胶糖	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
乳糖	-	+ <sup>5</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
肌醇、棉子糖、蜜二糖、侧金盏花醇、纤维二糖、卫茅醇、鼠李糖、山梨醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O/129 (10 μg)	R	R	R	R	R	R	R				
O/129 (150 μg)	R	R	R	R	R	R	R				
无盐肉汤生长	+	+	+	+	+	+	+				
3% 盐肉汤生长	+	+	+	+	+	+	+				
6% 盐肉汤生长	-	-	-	-	-	-	-				
8% 盐肉汤生长	-	-	-	-	-	-	-				

注:“+”阳性反应;“-”阴性反应;“d”菌株间具差异;“R”具抗性;“+<sup>w</sup>”阳性迟级;“+<sup>5</sup>”或“+<sup>2</sup>”阳性出现在第 5 天或第 2 天

### 3 小结与讨论

嗜水气单胞菌、普通变形杆菌和迟缓爱德华氏菌是引起厦门、莆田与福清地区蟹“白板病”

的致病菌。嗜水气单胞菌见于各地区采样病鳖;而普通变形杆菌仅见于福清地区采样其中一只病鳖肺部;迟缓爱德华氏菌则仅见于莆田地区鳖,但可在病鳖体内肝、肾和脾等多个部位分离到。说明嗜水气单胞菌是常见的引起该病的主要致病菌,迟缓爱德华氏菌是另一常见菌,而普通变形杆菌则出现较少。嗜水气单胞菌广泛存在于水体,也是淡水鱼类的致病菌[孙其焕 1991,徐伯亥 1993,殷 战 1992],对经济水产动物如鳊鲴[陈会波 1992]、牛蛙[陈晓凤 1995]同样具有致病力;迟缓爱德华氏菌是养殖鳊鲴的主要致病菌之一[韩先朴 1989,王国良 1993];而普通变形杆菌则较少出现在水产动物疾病中,本试验结果恰好与此情况相似。从对小白鼠的毒力感染试验中,如变形杆菌 940407 菌株对其具较强的毒力,而嗜水气单胞菌 940403、940603 菌株不具毒力,看出有的是冷血动物和温血动物的共患菌;而有的仅对冷血动物致病,说明不同菌株对不同动物具有不同的亲嗜性。

表 6 8 株菌对抗菌药物的敏感性

Table 6 Sensitivity of the eight strains to antibiotics

药物	菌 株							
	940101	940401	940402	940403	940407	940602	940603	940604
先锋霉素 5 号	+	+	+	+	+	+	+	+
妥布霉素	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
羧苄青霉素	+	+	+	+	+	+	+	+
多粘菌素 B	+	+	+	+	+	+	+	+
丁胺卡那霉素	++	++	++	++	+++	+++	++	++
新霉素	+++	+++	++	++	++	+++	+	+
链霉素	++	++	++	-	-	+	-	-
庆大霉素	+++	+++	+++	++	++	+++	++	++
氟哌酸	+++	+++	+++	++	++	+++	++	++
头孢拉定(先 6)	+	+	+	-	-	++	-	-
先锋霉素 I	-	-	-	-	-	+	-	-
四环素	-	-	-	++	+	++	+	+
氯霉素	+++	+++	+++	+	-	++	+	+
痢特灵	-	-	-	+	+	++	++	++
氨苄青霉素	-	-	-	-	-	++	-	-
青霉素 G	-	-	-	-	-	+	-	-
红霉素	+	+	+	++	+	+	++	+
洁霉素	-	+	+	-	-	-	-	-
磺胺甲基异噁唑 + TMP	-	-	-	-	-	+	-	-
麦迪霉素	+	+	+	-	-	-	-	-

注:“+++”表示高度敏感,“++”表示中度敏感,“+”表示敏感,“-”表示不敏感

鳖的“白板病”是近年来出现在养殖中的新疾病,特别是冬季加温的大棚内,分析病因,细菌的作用主要是,特别是细菌对肝、脾和肾的损害严重;另一方面,近年来鳖养殖中乱用药物,特别是抗菌素大剂量、长时间的应用对肝、肾、脾的损害严重,机体抵抗力减弱,更容易感染细菌而发病。另外,冬季加温饲养,燃料费用高,换水不易,水质恶化,水中有毒物质(如  $H_2S$ 、氨氮等等)含量高,不良环境的作用,亦是造成细菌感染的诱发因素。故对“白板病”的防治,应从改良水质,禁止乱用药物,并及时发现早期病鳖,给以有效药物进行治疗。我们建议“白板病”的治疗宜采用妥布霉素、丁胺卡那霉素、新霉素、庆大霉素和氟哌酸等药物。

本文承蒙福建马尾联合水产饲料公司资助经费,福建省卫生防疫站陈拱立主任鉴定致病菌种名,在此一并致谢! 青新同志系本院淡水养 95 届学生。

## 参 考 文 献

- 王国良等.1993.鳖鲍爱德华氏病病原菌及一新种.水产学报,17(3):224~228.
- 中国科学院北京微生物研究所细菌分类组.1978.一般细菌常用鉴定方法.北京:科学出版社.68~71,96~97,135~187.
- 孙其焕等.1991.异育银鲫溶血性腹水病病原的研究.水产学报,15(2):130~139.
- 陈会波等.1992.鳖鲍赤鳍病病原菌的分离鉴定和耐药性的研究.水生生物学报,16(1):40~46.
- 陈晓凤等.1995.牛蛙“肝肿大”病原的研究.厦门水产学院学报,17(2):32~37.
- 殷 战等.1992.点状气单胞菌引起虹鳟感染症及其病原学机制的研究.水生生物学报,16(3):230~235.
- 徐伯亥等.1993.淡水养殖鱼类暴发性传染病致病细菌的研究.水生生物学报,17(4):309~317.
- 韩先朴等.1989.鳖鲍爱德华氏病的研究.水生生物学报,13(3):259~264.
- Popoff M, Veron M.1976. A taxonomic study of the *Aeromonas hydrophila*-*Aeromonas punctata* group. J Gen Microbiol, 94:11~22.
- Krieg N R, Holt J G.1984. Bergey's manual of systematic bacteriology 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins.

## RESEARCH ON PATHOGEN OF WHITE ABDOMINAL SHELL DISEASE OF TURTLE

CHEN Xiao-Feng, ZHOU Chang-Yi, QING Xin

( Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021)

**ABSTRACT** A serious infectious white abdominal shell disease of turtle has been found in some areas in Fujian Province. Experiments of isolation, cultivation, identification, artificial infection and medicine sensitivity have been done. The pathogen of the disease is composed mainly of *Aeromonas hydrophila* but also of *Edwardsiella tarta* and *Proteus vulgaris*.

**KEYWORDS** Turtle, White abdominal shell disease, Pathogen, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarta*, *Proteus vulgaris*

## 欢迎订阅 1998 年《中国渔业经济研究》

《中国渔业经济研究》是在农业部渔业局、中国水产科学研究院、中国水产总公司直接领导下,国内外公开发行的全国性渔业经济学术刊物。设有专题报道、渔业发展战略、改革之窗、渔业生态经济、渔业资源经济、渔业技术经济、地方渔业专版、国外渔业、实用技术讲座、科技与经济信息等栏目。主要报道有关我国渔业经济发展的方针、政策、学术交流,以及水产科技方面的新动态、新成果、新信息和国外渔业经济。本刊还承办鱼用饲料、饲料添加剂、鱼药、苗种、渔业机械仪器、饲料机械等各类渔业商品广告和外商来华广告。彩色封页、设计新颖、价格合理,欢迎中外企业惠顾。

本刊为双月刊,16开本,每期定价为3.00元,全年收费18.00元。本刊国内统一刊号:CN11-3099/F;邮局发行代号:18-157;国际连续出版物号:ISSN1004-7603。

请读者到邮局办理1998年订阅手续或将款汇到本刊编辑部。编辑部地址:北京市永定路青塔村150号,邮政编码:100039;联系电话:(010)68673921;联系人:冯庚菲。