

斑点叉尾 套肠症的病原学初步研究

刘金玉^{1,3} 杨五名^{1,3} 李爱华^{1,2} 何广文⁴

(1. 中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072; 2. 大连水产学院辽宁省省级高校水生生物学重点实验室, 大连 116023; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100039; 4. 宜昌市水产科学研究所, 宜昌 443001)

摘要: 本研究从 2 例垂死的患败血症并肠套叠的斑点叉尾 血液、肝脏及脑组织中分离到 2 种类型的致病性细菌菌株, 经对细菌进行形态观察、生理生化测试和 16S rDNA 序列分析, 分别鉴定为嗜水气单胞菌和荧光假单胞菌; 攻毒实验证实它们确为斑点叉尾 病鱼的病原。根据药敏实验的结果, 及时对病区斑点叉尾 进行治疗, 连续用药 3—5 d 发病的叉尾 即停止死亡。根据研究结果, 文章对斑点叉尾 肠套叠发生的原因进行了分析, 提出了不同的观点。

关键词: 斑点叉尾 ; 嗜水气单胞菌; 荧光假单胞菌; 肠套叠

中图分类号: S941.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2008)06-0824-08

斑点叉尾 (*Ictalurus punctatus*, 以下简称叉尾) 亦称沟鲶, 属于鲶形目 (Siluriformm) 科 (Ictaludae) 鱼类的一种。由于该鱼具有生长快、食性广、易饲养、肉质鲜美、起捕率高等优点, 20 世纪 80 年代引入我国后, 经过十多年的研究和推广养殖, 目前已成为我国重要的水产养殖经济鱼类之一。

然而随着养殖规模的扩大, 集约化养殖的推行及水环境条件的日益恶化, 近几年来叉尾 各种疾病的发生与流行, 对叉尾 养殖业的威胁正在日益加剧。其病害包括病毒病、细菌病、真菌病及寄生虫病等各种类型, 其中细菌病因常常造成鱼类的大量死亡而倍受国内外学者的关注^[1,2]。目前, 国内外发现的叉尾 病原菌大致包括^[1,3-6]: 爱德华氏菌 (*Edwardsiella ictaluri*)、柱状黄杆菌 (*Flavobacterium columnaris*)、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、链球菌 (*Streptococcus*) 等。

近年来在全国许多地区发生了一种称为“肠套叠”的疾病, 症状除了有出血性败血症外, 最大的特点就是患病 鱼的肠道出现收缩、套叠、脱肛等现象, 严重时甚至可见肠断裂的情况。肠套叠是指部分肠管及肠系膜套入邻近肠腔所致的一种绞窄性肠梗阻。该病主要发生于春夏两季, 甚至 10 月份也可

以发生, 已经连续几年在我国造成了叉尾 大批死亡, 严重地威胁着叉尾 养殖业的健康发展。国内有学者从四川地区的病鱼中分离嗜麦芽芽单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*), 因此认为叉尾 “肠套叠”就是由这种细菌引起^[7]。但也有学者分析认为, 肠套叠可能不是一种独立的疾病, 而是 鱼中容易出现的一种症状。不过, 到目前为止, 还没有从“肠套叠”斑点中分离到其他细菌的正式报道。因此, 对于此病的发病原因尚无定论。

其实, 早在 1988 年在美国就有类似疾病 (肠断裂的叉尾) 的报道^[8], 并且从病鱼器官中分离到嗜水气单胞菌、假单胞菌 (*Pseudomonas* spp.)、温和气单胞菌 (*Aeromonas sobria*) 和柱状黄杆菌等多种细菌, 不过有关这些分离细菌与疾病之间的因果关系并没有证据建立起来。此病主要发生在冷水或凉水水域中 (水温 12—19℃), 在这点上与我国的情形有点不同。

近年来, 我们在叉尾 疾病的诊治过程中也遇到了很多套肠症病例, 获得了与上述国内学者不一样的研究发现。希望我们的研究结果能有助于认识叉尾 的这种疾病, 继而有助于更好的防治。

收稿日期: 2008-01-08 修订日期: 2008-07-26

基金项目: 辽宁省省级高校水生生物学重点实验室开放课题 (KJHB-06-02); 国家自然科学基金项目 (No. 30670112); 国家科技支撑计划 (No. 2005019 和 No. 2006BAK02A22) 资助

作者简介: 刘金玉 (1984—), 女, 山东菏泽人; 硕士生; 主要研究方向为鱼类微生物学。E-mail: liujinyu5134@sina.com

通讯作者: 李爱华, Tel: 027-68780053; E-mail: liuhu@ihb.ac.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料 本研究所采用的病鱼来自两个养殖地区: 湖北省宜都清江中网箱养殖和武汉市牛山湖渔场网箱养殖的叉尾。平均体重分别为 500g 和 350g 左右。发病时间分别为 2006 年 5 月和 2007 年 4 月。两起病鱼的症状有相似之处, 主要有眼睛、鳃盖、胸鳍、腹鳍之基部与头部均充血, 肛门出血, 尾柄出现红肿, 在部分病鱼中发现有典型的肠套叠现象。本研究中的细菌从患有肠套叠、但肠道未断裂的病鱼血液、肝脏和脑组织中分离到。发病水域的溶解氧、非离子氨以及亚硝酸盐都处于安全浓度范围。

用于攻毒试验的叉尾 由湖北省水产所提供, 体重均为 (18 ± 3) g 草鱼由中科院水生生物研究所关桥养殖场提供, 体重均为 10g 左右, 实验前在流水水泥池中驯养两周, 证实健康无病后, 用于实验。实验期间采用塑料水族箱放养, 水温控制在 25°C 左右。药敏纸片和水解酪蛋白琼脂培养基购自杭州微生物试剂公司, BHI TSA 和 TSB 培养基均购自美国 BD 公司, *Taq* polymerase 购自上海申能博采生物科技公司, dNTP 及 pMD18-T 载体均购自 TaKaRa 公司, DL2000 marker 购自北京博大泰克生物基因技术公司。

Aeromonas hydrophila (XS91-4-1) 和 *Pseudomonas fluorescens* (56-12-10) 由本实验室分离并保存^[8], 在本研究中用作参考菌株进行细菌的生理生化特征分析。培养基选用 BHI 或 TSA (固体) 或 TSB (液体), 培养温度为 $28-30^{\circ}\text{C}$ 。

1.2 实验方法

1.2.1 细菌分离 对于来自湖北宜都清江的样品, 从患套肠症的叉尾 尾柄处无菌操作抽取血液约 0.5—1 mL, 涂布于 TSA 平板, 菌株号记为 YDCC-5-1。对于来自武汉牛山湖的样品, 从患套肠症的叉尾 血液和脑组织进行分离, 两株细菌分别记为 0704CCB_r 和 0704CC_l。平板倒置, 于 28°C 培养。24h 后, 平板上菌落形态、大小和颜色基本一致。从菌落中随机挑取单菌落接种至 TSB 液体培养基中, 振荡, 28°C 培养 20h 后将培养物浓缩, 并用 15% 甘油 + 新鲜 TSB 保存于 -20°C , 待进一步鉴定。

1.2.2 形态与生理生化鉴定 形态染色按常规涂片革兰氏染色, 油镜下进行观察, 并制作扫描电镜照片^[10]。生理生化反应测定参照《常见细菌系统鉴定手册》^[11] 和《伯杰氏细菌鉴定手册》(第九版)^[12] 所述方法进行。

1.2.3 药敏试验 参照文献方法进行药敏试验^[13-14] 采用纸片扩散法将药敏纸片贴于涂布有浓度约为 5×10^6 CFU/mL 菌液的水解酪蛋白琼脂培养基平板上, 30°C 培养过夜后观察抑菌圈大小 (直径小于 13mm 判为有抗性, 大于 17mm 判为敏感, 13—17mm 判为中度敏感)。按照文献方法进行, 所使用的抗生素及含量如下: 氨苄青霉素 ($10\mu\text{g}$ /片)、杆菌肽 (0.04U /片)、克拉霉素 ($15\mu\text{g}$ /片)、强力霉素 ($30\mu\text{g}$ /片)、先锋霉素 V ($30\mu\text{g}$ /片)、强力霉素 ($30\mu\text{g}$ /片)、氯霉素 ($30\mu\text{g}$ /片)、红霉素 ($15\mu\text{g}$ /片)、庆大霉素 ($10\mu\text{g}$ /片)、克拉霉素 ($15\mu\text{g}$ /片)、氯霉素 ($30\mu\text{g}$ /片)、链霉素 ($10\mu\text{g}$ /片)、氧哌嗪青霉素 ($100\mu\text{g}$ /片)、利福平 ($5\mu\text{g}$ /片)、丙氟哌酸 ($5\mu\text{g}$ /片)、复方新诺明 ($1.25/23.75\mu\text{g}$ /片)、妥布霉素 ($10\mu\text{g}$ /片)、呋喃妥因 ($300\mu\text{g}$ /片)、新霉素 ($30\mu\text{g}$ /片)、四环素 ($30\mu\text{g}$ /片)、诺氟沙星 ($10\mu\text{g}$ /片)、氟苯尼考 ($30\mu\text{g}$ /片)。

1.2.4 PCR 扩增及 16S rDNA 序列测定 引物序列及退火温度 (表 1)。其中 U8 f/U 1492r 为 16S rDNA 通用引物, A16SF/R 为气单胞菌 16S rDNA 特异性引物, Psf/r 为假单胞菌 16S rDNA 特异性引物, 均由 Invitrogen 公司合成。反应体系: $50\mu\text{L}$ 体系中包含 PCR Buffer ($10 \times$) $5\mu\text{L}$, dNTP (10mmol/L) $4\mu\text{L}$, Primers (F/R, $10\mu\text{mol/L}$ each) 各 $1\mu\text{L}$, *Taq* polymerase 1.25U , 以 $1\mu\text{L}$ 菌液作模板, 其余以双蒸水补足。利用 BioRad PTC-100 PCR 仪扩增, 扩增程序为 94°C 预变性 2min , 接着 30 个循环: 94°C 变性 30s 退火 30s 72°C 延伸 90s 最后 72°C 再次延伸 10min 。其中, A16SF/R 每个循环的延伸时间为 30s Psf/r 每个循环的延伸时间为 60s 。

16S rDNA 序列测定操作按照《分子克隆实验指南》^[15] 进行: 将 1.5kb PCR 产物回收纯化, 连接至 PMD18-T 载体中, 转化 *E. coli* (DH5 α) 感受态细胞, 将阳性克隆送至上海联合基因公司测序。将得到的 16S rDNA 序列做 BLAST 比对, 再利用 The ribosomal database project (RDP-II) 进行分析。

1.2.5 攻毒实验 采用腹腔注射菌液法攻毒。对于 YDCC-5-1, 利用健康叉尾 进行攻毒, 实验分成两组: 第一组浓度为 3×10^7 CFU/mL, 每尾 0.3mL ; 第二组浓度为 3×10^6 CFU/mL, 每尾 0.3mL , 每组 6 尾。对于 0704CCB_r 和 0704CC_l 利用健康草鱼进行攻毒, 设一空白对照组。菌液浓度至 1×10^8 CFU/mL, 每尾注射 0.2mL ; 空白对照组每尾注射 0.2mL 无菌 PBS ($\text{pH} 7.4$), 每组 6 尾。每个试验组的鱼单

独喂养(每日换水 1 次, 鱼死后马上捞出), 腹腔注射后连续观察 10d.

表 1 用于分析的引物序列及退火温度

Tab.1 Primers for DNA amplification and their annealing temperatures

引物 Primers	引物序列 Sequences	退火温度 Annealing temperature (℃)
U8f/U1492 ^[5]	5'-AGAGTTGATCMTGGCTCAG-3'	54
	5'-TACG GYTACCTGTTACGACTT-3'	
A16SF/R ^[16]	5'-CGGAGTGCCTTCGGGAATCAGA-3'	59
	5'-TCACCGCAACATTCGATTIG-3'	
Psf/I ^[17]	5'-GGTCTGAGAGGATGATCAGT-3'	62
	5'-TTAGCTCCACCTCGCGC-3'	

2 结果

2.1 形态特征

YDCG-5-1在 TSA 生长的菌落为浅黄色, 呈圆形, 中央凸起, 边缘湿润有光泽; 菌体直, 短杆状, 两端圆, 大小为 (0.3—1) μm × (1—3.5) μm, 单个或成对排列, 细胞外形(图 1); 革兰氏染色呈阴性。0704CCBr 和 0704CCl在 TSA 生长的菌落为浅黄色, 圆形, 边缘整齐、湿润, 直径 0.5—1.5mm; 菌体为杆状, 两端钝圆, 部分菌体呈微弯曲, 大小为 (0.3—0.7) μm × (1—4) μm, 细胞外形(图 1); 革兰氏阴性细菌。

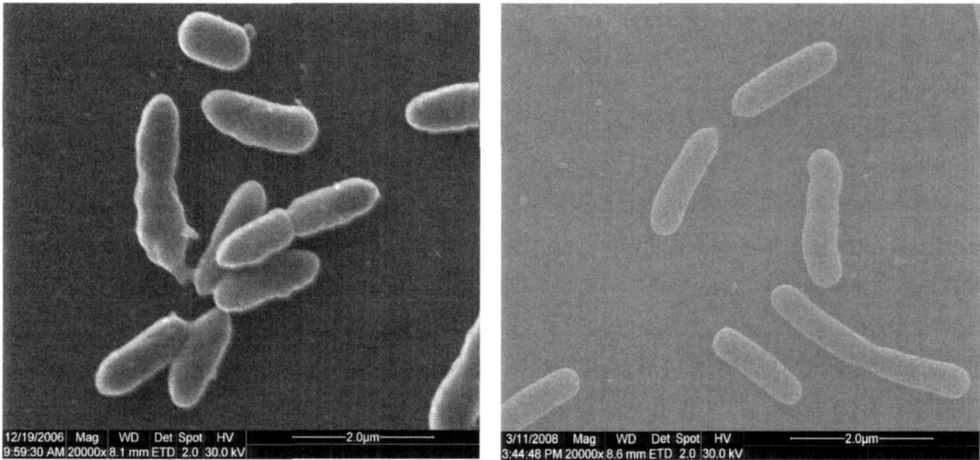


图 1 YDCC-5-1(左)及 0704CCBr(右)的扫描电镜照片(×20000)

Fig.1 Scanning electron microscopy (SEM) photographs of strainsYDCC-5-1(left) and 0704CCBr (right) (×20000)

2.2 生理生化特征

参照《常见细菌系统鉴定手册》和《伯杰氏细菌鉴定手册》(第九版)进行各项生理生化特性比较,

将菌株 YDCG-5-1鉴定为嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*), 将菌株 0704CB r和 0704C l鉴定为荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluoresces*) (表 2)。

表 2 分离菌株与嗜水气单胞菌 (XS91-4-1)、荧光假单胞菌 (56-12-10)之间主要性状比较

Tab.2 Comparison of chief characteristics between isolates and*Aeromonas hydrophila* (XS91-4-1), *Pseudomonas fluoresces*(56-12-10)

	XS91-4-1	56-12-10	YDCC-5-1	0704CCBr	0704CCl
生长 Growth at					
4℃	-	+	-	+	+
41℃	+	-	+	-	-
生理特征 Physiological character					
运动性 Motility	+	+	+	+	+
荧光色素 Fluorescence pigment	-	+	ND	+	+
青脓素 Pyocyanin	-	-	ND	-	-
O/129敏感性 O/129 sensitivity	-	ND	-	ND	ND
生化特征 Biological character					
氧化酶 Oxidase	+	+	+	+	+
接触酶 Catalase	+	+	+	+	+

	续表				
	XS91-4-1	56-12-10	YDCC-5-1	0704CCBr	0704CCl
O / F Oxidation / Fermentation	F	O	F	O	O
阿拉伯糖发酵 Arabinose fermentation	+	ND	+	ND	ND
蔗糖发酵 Sucrose fermentation	+	-	+	-	-
甘露糖发酵 Mannitose fermentation	-	ND	-	ND	ND
M-R MethylRed	+	-	+	-	-
V-P Voges-Proskauer test	+	-	+	-	-
淀粉水解 Starch hydrolysis	+	-	+	-	-
七叶苷水解 Esculin hydrolysis	+	-	+	-	-
蔗糖产果聚糖 Levan formation from sucrose	-	-	ND	+	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	+	+	+
反硝化 Denitrification	-	+	-	-	-
吲哚产生 Indol test	+	-	+	-	-
Om脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-	-	-	-	-
Lys脱羧酶 Lysine decarboxylase	+	-	+	-	-
Arg双水解酶 Arginine double hydrolyase	+	+	+	+	+
明胶液化 Gelatin liquefaction	+	+	+	+	+
脂酶 Tween80 Esterase of Tween80	+	-	+	+	+
Cys产 H ₂ SH ₂ S production from cysteine	+	-	+	-	-
唯一碳源利用 Single carbon source utility					
葡萄糖 Glucose	+	+	ND	+	+
海藻糖 Trehalose	+	+	ND	+	+
肌醇 Inositol	+	+	ND	+	+
L-脯氨酸 L-proline	+	+	ND	+	+
蔗糖 Sucrose	+	-	ND	+	+
山梨醇 Sorbitol	+	+	ND	+	+

注: + 表示 90% 以上菌株为阳性; - 表示 90% 以上菌株为阴性; ND 未测
Note +, > 90% positive; -, > 90% negative; ND, not detected

2.3 药敏实验

结果见表 3 两地可能由于用药历史不同, 两地分离的细菌其耐药谱不完全相同。根据药敏实验结果, 建议宜都清江养殖场采用氟苯尼考进行治疗, 建议武汉牛山湖养殖场采用诺氟沙星治疗, 连续用药 3—5d, 发病的叉尾 即停止死亡。

2.4 16S rDNA 序列

Aeromonas hydrophila YDCC-5-1 株 16S rDNA 序列的 GenBank 登录号为 DQ837027; *Pseudomonas fluoresces* 0704CCBr 株和 0704CCl 株 16S rDNA 序列的 GenBank 登录号为 EU 335083 和 EU 335084。将这三株细菌的 16S rDNA 序列进行 BLAST 分析, 发现 YDCC-5-1 之 16S rDNA 序列与 GenBank database 中 *A. hydrophila* ATCC7966 比对所得总分最高, 相似度为 99%, 且两个可变区域的序列完全一致^[18]。0704CCBr 和 0704CCl 之 16S rDNA 序列与荧光假单胞菌的序列有 99% 以上的相似性 (结果未显示)。

2.5 攻毒试验

腹腔注射菌液 YDCC-5-1 后 24h 观察, 第一组死了 4 尾, 第二组死了 1 尾, 剩下的鱼连续观察 10d 未见死亡。病死鱼表现下列症状: 眼睛、鳃盖、胸鳍、腹鳍之基部与头部均充血, 肛门出血, 尾柄出现红肿, 死亡时间稍长眼部即出现白内障。这些症状和从宜都取回来的病鱼基本一样, 但未见肠套叠。从攻毒刚死的两尾叉尾 的肝脏中再次用接种环无菌接种划线至 TSA 平板 (名为 I₁、I₂), 同时以一尾健康叉尾 之肝脏接种物 (亦接种至 TSA 平板, 名为 H) 做对照, 30℃ 培养。次日见 H 平板上未长出菌, I₁、I₂ 平板上均长出浅黄色菌落, 且菌落形态均匀, 大小一致。从两平板上分别挑取一单克隆, TSB 液体培养后用菌液作模板 (以 YDCC-5-1 作对照), 用 A16SF/R 作引物分别做 PCR 检测。结果均扩出 356bp 大小的条带 (图 2), 证实 YDCC-5-1、I₁、I₂ 均为气单胞菌; 而根据 YDCC-5-1 的形态, 生理生化及 16S rDNA 序列特征, 将其鉴定为嗜水气单胞菌, 它

就是宜都患出血性败血症及套肠症之叉尾 的病 原菌。

表 3 分离菌株的药敏试验结果
Tab 3 Result of drugs susceptibility test of three isolates

抗生素 Antibiotic	YDCC-5-1	0704CCBr	0704CC1
氨苄青霉素 Ampicillin	R	R	R
杆菌肽 Bacitracin	R	R	R
先锋霉素 V Cephadrin V	R	R	R
强力霉素 Doxycycline	M	S	S
克拉霉素 Clarithromycin	S	M	M
红霉素 Erythromycin	S	M	S
庆大霉素 Gentamicin	S	S	S
氯霉素 Chloramphenicol	S	R	R
链霉素 Streptomycin	S	S	S
氧哌嗪青霉素 Piperacillin	S	S	S
诺氟沙星 Norfloxacin	S	S	S
环丙氟哌酸 Ciprofloxacin	S	S	S
复方新诺明 Sulfamethoxazole / trimethoprim	S	S	S
妥布霉素 Tobramycin	S	S	S
呋喃妥因 Furazolidin	ND	R	R
新霉素 Neomycin	ND	S	S
四环素 Tetracycline	ND	S	S
利福平 Rifampicin	ND	R	R
氟苯尼考 Florfenicol	ND	S	S

注: R表示有抗性; S表示敏感; M表示中度敏感; ND未测
Note R, resistant S sensitive M, mid-sensitive ND, not detected

腹腔注射菌液 0704CCBr和 0704CC1后连续观察 10d 两实验组各死鱼 1尾, 对照组未见鱼死亡, 且外观正常。死鱼表现下列症状: 眼睛、腮盖充血, 眼睛外突, 腹部溃烂, 尾柄红肿, 肛门充血, 腹腔内有大量积水, 肠道内亦有积水, 肝脏呈土黄色。这和从牛山湖取回的病鱼症状基本一致, 但亦未见肠套叠。另外, 实验组未死的鱼眼睛明显外突。从攻毒刚死的两尾草鱼肝脏中再次无菌划线接种至 TSA 平板(分别记为 M₁、M₂), 同时以一尾对照组草鱼之肝脏接种物做对照(亦接种至 TSA 平板, 名为 N), 30℃培养过夜, 见 N 平板上未长出菌, M₁、M₂平板上均长出浅黄色菌落, 且菌落形态均匀, 大小一致。从 M₁、M₂上分别挑取一单克隆, 接种至 TSB 中 30℃培养, 用菌液作模板(以 0704CCBr和 0704CC1作对照), 用 Psf/r作引物进行 PCR 检测。结果均扩出 987bp 大小的条带(图 2), 证实 0704CCBr 0704CC1 M₁ M₂均为假单胞菌; 而根据 0704CCBr和 0704CC1的形态, 生理生化及 16S DNA 序列特征, 将其鉴定为荧光假单胞菌, 它就是武汉牛山湖患出血性败血症及套肠症之叉尾 的病原菌。

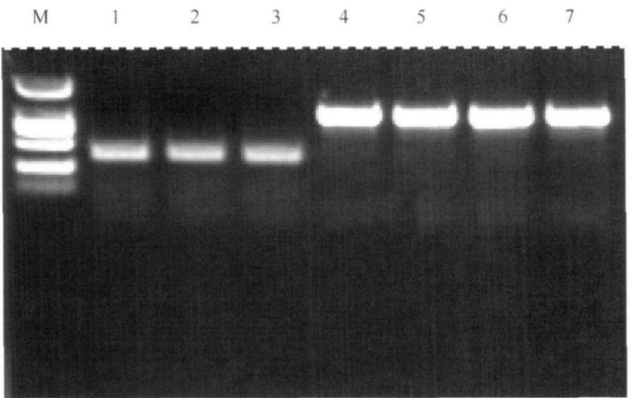


图 2 菌株 YDCC-5-1 I₁、I₂及 0704CCBr 0704CC1 M₁ M₂ PCR 结果电泳照片
Fig 2 Electrophoresis Photograph of PCR results YDCC-5-1 I₁ I₂ with Primer A16SF/R, 0704CCBr 0704CC1 M₁ M₂ with Primer Psf/r
The strains tested were: lanes 1, YDCC-5-1 2 I₁; 3 I₂; 4, 0704CCBr 5, 0704CC1 6 M₁; 7, M₂. Lane M is DL2000 marker

3 结 论

YDCC-5-1 的菌落呈浅黄色, 革兰氏染色为阴性; 扫描电镜的结果虽未能拍摄到鞭毛(可能与细

菌的生长状态及细菌的处理方法有关),但从细胞大小及单个或成对排列来看,均符合气单胞菌属细菌的特征。根据它能发酵葡萄糖并产气,对 O/129 不敏感以及氧化酶和触酶反应同时为阳性^[16], YDCC-5-1 能与弧菌科细菌相区别; LDC, ODC 和 ADH 三个反应分别呈阳性、阴性和阳性,可以排除将其鉴定为以下种类的可能: *A. caviae*, *A. media*, *A. eucrenophila*, *A. sobria*, *A. veronii* biovar *veronii*, *A. encheleia*, *A. popoffii*。再根据其能利用七叶苷、乳糖、阿拉伯糖和蔗糖的特性,排除将其鉴定为 *A. jandaei*, *A. schubertii*, *A. trota*, *A. veronii* biovar *sobria* 和 *A. allosaccharophila* 的可能。而 *A. salmonicida* 多不具备运动性,故只剩下 *A. hydrophila* 和 *A. bestianum* 两个种类。再结合 16S rDNA 序列的 BLAST 结果,可将 YDCC-5-1 鉴定为嗜水气单胞菌 (*A. hydrophila*)。

菌株 0704CCBr 和 0704CC1 的菌落均呈浅黄色,革兰氏染色为阴性;扫描电镜拍摄到的细胞大小及形态均符合气单胞菌属细菌的特征,但同样未能拍摄到鞭毛。根据它呼吸代谢,不发酵,氧化分解葡萄糖,产生接触酶,还原硝酸盐,甲基红、V-P 阴性,不产生吲哚和 H_2S , 不产生赖氨酸脱羧酶和鸟氨酸脱羧酶,均符合假单胞菌属细菌的特征。根据它们在 4℃ 生长、41℃ 不生长、产生荧光色素、不产生青脓素、能从蔗糖产果聚糖、液化明胶、利用肌醇,排除将其鉴定为铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*)、菊苣假单胞菌 (*P. cichorii*)、施氏假单胞菌 (*P. stutzeri*)、门多萨假单胞菌 (*P. mendocina*)、产碱假单胞菌 (*P. alcaligenes*)、类产碱假单胞菌 (*P. pseudoalcaligenes*)、恶臭假单胞菌 (*P. putida*);再根据其氧化酶和精氨酸双水解酶阳性排除将其鉴定为丁香假单胞菌 (*P. syringae*) 和绿黄假单胞菌 (*P. viridiflava*);根据其不能利用硝酸盐产气,可以利用蔗糖、山梨醇排除将其鉴定为绿针假单胞菌 (*P. chloroaphis*) 和致黄色假单胞菌 (*P. aureofaciens*);再结合 16S rDNA 序列的 BLAST 结果,可将 0704CCBr 和 0704CC1 鉴定为 I 型荧光假单胞菌,其 16S rDNA 序列与 GenBank database 中荧光假单胞菌的序列有 99% 以上的相似性(结果未显示)。

菌株 YDCC-5-1,经培养后制成菌悬液,腹腔注射感染健康叉尾,所患症状与原始病鱼一致;且从攻毒得到的病鱼体内分离到的细菌能扩出和 YDCC-5-1 一样大小的片段 (356bp)。这证实嗜水气单胞菌 YDCC-5-1 就是宜都患败血症叉尾的病原。

菌株 0704CCBr 和 0704CC1 经 TSA 斜面培养后制成菌悬液,腹腔注射健康草鱼,病死鱼所患症状与原始病鱼基本一致;而且从攻毒得到的病鱼体内分离到的细菌能扩出和 0704CCBr、0704CC1 一样大小的片段 (987bp)。从攻毒实验结果可以看出 0704CCBr 和 0704CC1 对草鱼的毒力较低,这可能是因为草鱼比叉尾对菌株 0704CCBr 和 0704CC1 具有更强的免疫力。

此外,我们于 2007 年 11 月,从另外一例肠套叠叉尾血液中分离到一株细菌,根据其 16S rDNA 序列,初步鉴定为维隆气单胞菌 (*Aeromonas veronii*),但尚未进行生化反应鉴定。这进一步说明,叉尾的病因很复杂,常常是多种细菌混合感染,症状也不完全一致,肠套叠只是其中之一,而且不是在每尾病鱼中都出现,在实验室内似乎很难复制出典型的肠套叠症状。而且,在发病季节很难找到没有肠痉挛或肠套叠的真正健康叉尾。所以,文献中报道声称,可以复制出肠套叠症状需要进行仔细的推敲。

对于鱼类肠套叠发生的原因,国内外都缺乏真正的研究。在人的幼儿当中,肠套叠也是一种常见病,一般认为如果突然改变食物品种、添加辅食不当,环境、气候发生了改变,或者肠道发生了炎症、肿瘤、息肉等疾病,以及蛔虫扰乱、毒素刺激、驱虫药物使用不当和腹泻等,均可诱发肠蠕动的紊乱,而发生肠套叠。如果肠套叠症时间过长,肠子就要缺血坏死,甚至发生肠破裂、腹膜炎、败血症等严重症状。此时,发生各种细菌的感染就不足为奇。

斑点叉尾可能是一种易于发生肠套叠的动物。现在的研究结果,还无法确定“肠套叠”或其他肠道病症到底是细菌感染的原因还是细菌感染的结果。Duborow 和 Hanson^[8] 分析认为,由于某些方面的原因,导致肠道血流减少,这时粘膜容易发生损伤,继而发生由胰蛋白酶等肠道蛋白酶类参与的肠粘膜自溶,导致肠道断裂、不规则收缩、套叠等现象,同时为继发感染创造了条件。目前为止,我们分离到的以及文献报道的与斑点叉尾肠套叠可能有关的细菌,包括气单胞菌、假单胞菌和嗜麦芽寡养单胞菌等都是鱼类肠道菌群的重要成员,这两种现象似乎有某种吻合性。如果这种吻合是真实的,那么细菌感染是肠套叠的结果的可能性就更大些,甚至可能互为因果关系。

伍莉等^[19] 的研究显示,饲料中即使添加适量的甜菜碱、喹乙醇和大蒜素都能显著增加叉尾肠道

蛋白酶的活性。这些添加剂的使用, 本来是用来促进鱼类生长的, 但在肠道出现损伤等情况下, 有可能加速肠粘膜的自溶。某些饲料添加剂的使用, 或其他饲料方面的因素在套肠症发生过程中的作用尚不得而知。

参考文献:

[1] Fan H P, Zhang J T. Channel catfish main diseases and their control [J]. *Fujian Fisheries*, 1994 (1): 70—74 [樊海平, 张继彤. 斑点叉尾 的主要疾病与防治. 福建水产, 1994, (1): 70—74]

[2] Wang K Y, Geng Y, Huang X L, *et al* Channel catfish infectious intussusception and control [J]. *Freshwater Fisheries*, 2006 **36** (6): 61—63 [汪开毓, 耿毅, 黄小丽, 等. 斑点叉尾 传染性套肠症及其防治. 淡水渔业, 2006, **36** (6): 61—63]

[3] Zhang L, Meng Y, Luo X S *et al* Channel catfish diseases and their control [J]. *Freshwater Fisheries*, 2007, **37** (1): 76—79 [张林, 孟彦, 罗晓松, 等. 斑点叉尾 主要疾病及其防治概述. 淡水渔业, 2007, **37** (1): 76—79]

[4] Yu P C, Xiong G Y, Jian S Q. Channel catfish familiar diseases and their control [J]. *Chinese Fishery*, 2006 **4**: 56—57 [虞鹏程, 熊国勇, 简少卿. 斑点叉尾 常见病害及防治技术. 中国水产, 2006 **4**: 56—57]

[5] Margarita G, Joan G, Antonio B, *et al* Identification of culturable bacteria present in haemodialysis water and fluid [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, **52** (1): 101—114

[6] Gehua W, Clifford G C, Chenyi L, *et al* Detection and Characterization of the Hemolysin Genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by Multiplex PCR [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, **41** (3): 1048—1054

[7] Wang K Y, Geng Y, Huang X L, *et al* Infectious Intussusception of Channel Catfish (ICC) [J]. *Modern Fisheries Information*, 2006 **21** (9): 3—8 [汪开毓, 耿毅, 黄小丽. 斑点叉尾 *Ictalurus punctatus* (R ifinesque) 传染性套肠症 (Infectious intussusception). 现代渔业信息, 2006 **21** (9): 3—8]

[8] Durbin R M and Hanson L. Severed intestine in channel catfish [J]. *Journal of Wildlife Diseases*, 1988 **24** (1): 146—149

[9] Xu B H, Yin Z, Wu Y S, *et al* Studies on taxonomy of pathogenic bacteria of the bacterial hemorrhagic septicemia in cultured fishes in freshwater [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1993, **17** (3): 259—266 [徐伯亥, 殷战, 吴玉深, 等. 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, 1993 **17** (3): 259—266]

[10] Ling D P, Yu Z. Cell ultrastructure and electron microscopy [M]. Shanghai Fudan University Press, 2004, 130—132 [凌诒萍, 俞彰. 细胞超微结构与电镜技术, 上海: 复旦大学出版, 2004, 130—132]

[11] Dong X Z, Cai M Y, *et al* Manual of systematic determination of familiar bacteria [M]. Beijing Science Press, 2001, 162—171, 353—386 [东秀珠, 蔡妙英, 等. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, 162—171, 353—386]

[12] Krieg N R, Holt J G. Bergey's manual of systematic bacteriology [M]. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994, 274—286, 482—486

[13] Zou L, Tang D, Liu W H, *et al* The separation appraisal and drugs susceptibility test of chicken *Escherichia Coli* disease etiology [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2007, **34** (2): 119—121 [邹玲, 唐栋, 刘文华, 等. 鸡大肠杆菌病病原的分离鉴定及药敏试验, 中国畜牧兽医, 2007, **34** (2): 119—121]

[14] Li A H, Cai T Z, Wu Y S *et al*. Investigation on drug resistance of fish bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila* in China [J]. *Microbiology*, 2001, **28** (1): 58—63 [李爱华, 蔡桃珍, 吴玉深, 等. 我国鱼类病原菌—嗜水气单胞菌的耐药性研究. 微生物学通报, 2001, **28** (1): 58—63]

[15] Jin D Y, Li M F. Molecular Cloning A Laboratory Manual (2nd ed) [M]. Beijing Science Press, 1998, 49—56 [金冬雁, 黎孟枫. 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 1998, 49—56]

[16] Abbott S L, Cheung W K W, Janda J M. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, **41** (6): 2348—2357

[17] Wilner E, Seidler R J, Gillevet P M, *et al* A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (*Sensu Stricto*) in environmental samples [J]. *Environmental Microbiology*, 1998 **64** (7): 2545—2553

[18] Yang W M, Li A H, Liu J Y, *et al* Isolation, identification and phylogenetic relationship of environmental strains of *Aeromonas* spp. isolated from Zhongshan area Guangdong Province [J]. *Microbiology*, 2007, **34** (4): 745—748 [杨五名, 李爱华, 刘金玉, 等. 广东中山地区气单胞菌环境株的分离、鉴定及系统发生关系. 微生物学通报, 2007, **34** (4): 745—748]

[19] Wu L, Chen P F, Luo S L, *et al* The different additives' influence on channel catfish's proteinase and amylase energy [J]. *Feeding Stuff Research*, 2002, **1**: 4—7 [伍莉, 陈鹏飞, 罗绍禄, 等. 不同添加剂对斑点叉尾 肠道蛋白酶、淀粉酶活力的影响. 饲料研究, 2002, **1**: 4—7]

PRELIMINARY STUDY ON THE ETIOLOGY OF CHANNEL CATFISH INTUSSUSCEPTION DISEASE

LIU Jin-Yu^{1,3}, YANG WU-Ming^{1,3}, LIANG Hua^{1,2} and HE Guang-Wen⁴

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072

2. Key Laboratory of Hydrobiology in Liaoning Province's Universities, Dalian Fisheries University, Dalian 116023

3. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039 4. Yichang Fisheries Research Institute, Yichang 443001)

Abstract Nowadays, a named “intussusception” disease in channel catfishes occurred in many latitudes of China. Besides haemorrhage symptom, the disease exhibit intestine shrinking, intussusception, rectocele phenomenon and so on. The disease mostly happened in spring and summer, sometimes in October, and it have resulted in so many channel catfish dead in China for years that menace the healthy culturing strictly. However, this disease has been analysed and studied by some domestic and international scholars, the undoubted nosogenesis has not been found now. Some scholars considered that intussusception disease was developed by *Stenotrophomonas maltophilia*, others deemed that it maybe not an independent one, only a familiar symptom in channel catfish. So far, formal coverage about other pathogenic bacteria in channel catfish has not been turned up. So, the etiology of channel catfish intussusception disease was studied preliminarily in this study through two kinds of diseased channel catfish suffered intussusception in China.

In this study, two kinds of pathogenic strains named YDCG-5-1, 0704CCBr and 0704CCl were isolated from the blood respectively, liver and brain of moribund channel catfish which suffered intussusception with integrated intestine collected from two different regions in Hubei Province. The two diseased fishes showed the similar symptom of haemorrhage eyes, operculum, pars cephalica, the base of pectoral fin and pelvic fin hyperaemia, anus hyperaemia and some suffered typical intussusception. The concentration of dissolved oxygen, union-ammonia and nitrite in the water areas of two diseases were all in margin of safety.

The isolate YDCG-5-1 was identified as *Aeromonas hydrophila* controlled by *Aeromonas hydrophila* (XS91-4-1), and the isolates 0704CCBr and 0704CCl were identified as *Pseudomonas fluoresces* controlled by *Pseudomonas fluoresces* (56-12-10), respectively, through morphological observation, physiological and biochemical tests and analysis of 16S rDNA sequence. The strains XS91-4-1 and 56-12-10 were isolated and preserved by this laboratory, used as control strains in physiological and biochemical tests. The isolate YDCG-5-1 was identical with *A. hydrophila* in morphological observation, physiological and biochemical tests and analysis of 16S rDNA sequence. Round colony, single thalli or bigeminal bacilliform and Gram reaction negative, positive for motility, oxidase, catalase, M-R and V-P reaction, fermented glucose, arabinose, sucrose and so on. 16S rDNA sequence of YDCG-5-1 was 99% similar to *A. hydrophila* ATCC 7966 in GenBank. The isolates 0704CCBr and 0704CCl grow at 4°C, not at 41°C, give birth to fluorescence pigment, oxidase and catalase, fermented glucose, utilize glucose, fucose, sucrose, L-proline only as carbon source, Gram reaction negative, which were all identical with *Pseudomonas fluoresces* combined with analysis of 16S rDNA sequence.

In addition, they were all proved to be pathogenic to experimental fish in the challenge testes. The two cases of channel catfish intussusception diseases were controlled by using antibiotics based on the drug sensitivity of these isolates. Thereinto, florfenicol was recommended to breed aquatics in Yiduqingjiang Hubei Province, and norfloxacin was commended to breed aquatics in Niushan Lake, Wuhan, Hubei Province, according as the result of the drug sensitivity of these isolates.

According to our study results, new viewpoint and speculation of channel catfish intussusception disease was discussed, however, the further study should be continued rapidly.

Key words *Ictalurus punctatus*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluoresces*, Intussusception