

不同水温下柱状黄杆菌对草鱼感染力的研究

陈霞 卢伶俐 温周瑞* 叶嵘 李丹 李文华
湖北省水产科学研究所, 武汉 430071

摘要 通过注射攻毒的方式研究了不同水温 (15、20、25、30、35 °C) 条件下柱状黄杆菌 (*Flavobacterium columnare*) 对草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 感染力的影响。研究结果显示, 在相同的试验条件下, 不同水温条件下柱状黄杆菌对草鱼的致病性不同, 15 °C 组草鱼的死亡率仅 5%, 其他各试验组死亡率均在 45.5% ~ 68.8%, 其中 25 °C 和 30 °C 组死亡率最高; 水温继续升高到 35 °C 时, 死亡率开始下降。这一结果与天然条件下流行病学的调查结果相吻合, 可为该病防控措施的制定提供依据。

关键词 水温; 柱状黄杆菌; 细菌性烂鳃病; 草鱼

草鱼烂鳃病是危害淡水养殖鱼类较为严重的病害之一^[1], 其发病原因大致可分为 3 类^[2]: 一类是由寄生虫引起的, 如粘孢子虫、斜管虫、鳃隐鞭虫、车轮虫、指环虫、中华蚤等; 另一类是鳃霉菌引起的鳃霉病; 第三类是由细菌引起, 常称为细菌性烂鳃病^[3]。这三类病对草鱼都危害甚大, 其中尤以细菌性烂鳃病最为严重。此病发病季节长, 流行范围广, 全国各地养殖场都有不同程度发生^[4], 特别是鱼种饲养阶段, 常因此病给养殖者带来巨大的经济损失。随着对草鱼细菌性烂鳃病研究的深入, 现已确定其病原体为柱状黄杆菌 (*Flavobacterium columnare*)^[5-6], 这种细菌也曾被称为柱状屈挠杆菌 (*Flexibacter columnaris*)^[7-8]、柱状噬纤维菌 / 柱状纤维粘细菌 (*Cytophaga columnaris*)^[9-10] 等, 而此前细菌性烂鳃病病原菌一直定名为鱼害粘球菌 (*Myxococcus piscicola*)^[3]。

柱状黄杆菌广泛存在于土壤和淡水环境中, 是一种危害较严重的致病菌^[11-12], 可致鳊、鳙、草鱼、青鱼、鲤、斑点叉尾鮰、加州鲈^[13-17] 等出现不同的感染症状, 如烂鳃、体表溃疡、出血等, 并导致高死亡率, 每年因此造成巨大的经济损失。据报道, 柱状黄杆

菌的感染力与环境因素^[18-20] 有密切的关系, 尤其雨后气温上升阶段容易发病。然而, 很少见有关于水温对草鱼烂鳃病影响的系统研究。因此, 本文以草鱼为研究对象, 探讨不同水温条件下柱状黄杆菌对草鱼的感染力, 以期阐明水温与草鱼细菌性烂鳃病的关系, 为了解该病的流行病学规律及制定防控对策提供参考依据。

1 材料与方法

1) 试验材料。柱状黄杆菌 (*Flavobacterium columnare* G4) 由中国科学院水生生物研究所提供。供试的草鱼种购自英山县, 体重为 (60 ± 5) g, 经至少 2 周的室内 (10 ~ 15 °C) 驯养后用于试验, 每天投喂适量的饲料。所有试验均在塑料水族箱 (70 cm × 50 cm × 45 cm) 中进行, 每个箱 (水的体积为 40 L) 中放入试验鱼 10 ~ 14 尾, 人工充氧, 每 2 d 用曝气后的自来水将箱中的水置换约 2/3。对于 20 °C 以上的试验, 采用人工加热的方式在 3 d 内使水温逐渐上升, 到达目的温度以后, 试验前再进行 5 d 的适应。注射攻毒以后不再投喂饵料。

2) 人工感染。

收稿日期: 2017-04-17

基金项目: 公益性行业科研专项——水产养殖气象保障关键技术 (GYHY201006029-02)

* 通讯作者

陈霞, 女, 1977 年生, 高级工程师, 研究方向: 水产养殖病害防治技术。

①菌液制备。将柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare* G4)致病菌株接种于 Shieh 琼脂培养基平板上^[21], 25 ℃培养 2 d。用无菌的生理盐水洗下菌苔, 在预试验的基础上, 将菌液浓度调整为 1×10^7 cfu/mL, 用于攻毒试验, 每尾注射 0.5 mL。各组间的死亡率采用 *t* 检验进行统计分析。

②试验设计。试验用水为经曝气的自来水, 试验设定 15、20、25、30、35 ℃共 5 个温度组, 每组 3 个平行, 分组情况见表 1。将 25 ℃条件下纯化培养制备的细菌菌液, 分别以 0.5 mL/尾的剂量经腹腔注射各试验组的草鱼种中, 分别放养于 5 个温度组的塑料水族箱中, 充气饲养, 在此期间不再投喂, 水温保持在(设置温度 ± 1) ℃。对照组的试验鱼用相同方法注射 0.5 mL/尾的无菌生理盐水, 同样条件饲养, 水温为 25 ℃。每天至少检查 2 次, 记录试验鱼的死亡量、死亡时间以及发病症状, 及时捞出死鱼, 连续观察和记录 7 d。

3)病死鱼的细菌分离及鉴定。为了证实试验鱼死亡是由攻毒用的柱状黄杆菌 G4 菌株所导致, 将试验箱中具有烂鳃症状或死亡的鱼解剖, 无菌条件下取其肝、肾组织接种于 Shieh 琼脂培养基上, 分离纯化出疑似柱状黄杆菌 12 株, 收集这些菌株用于 PCR 鉴定。

参照 Liu J 等^[22]的方法对所分离到的菌株进行分子鉴定。将 G4 菌株以及从人工感染试验中发病

和死亡鱼体内分离到的菌株(12 株)进行液体培养, 采用常规方法, 提取细菌基因组 DNA, 用于 PCR 扩增。扩增引物采用细菌通用引物, 将获得的扩增片段克隆, 并测序。将所获得的所有序列, 采用 DNASTar 软件进行比对分析。

4)水质分析方法。攻毒于 2017 年 3 月 21 日开始, 4 月 2 日结束, 期间 3 月 27 日采水样 1 次。水样的测定: pH 采用 YSI 6000 测定; 氨态氮(NH₄⁺)采用纳氏试剂比色法(GB 7479-87)测定; 亚硝态氮(NO₂⁻)采用萘乙二胺分光光度法(GB 7493-87)测定; 硝态氮(NO₃⁻)采用酚二磺酸分光光度法(GB 7480-87)测定; 总氮(TN)采用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法(GB 11894-89)测定; 总磷(TP)采用钼酸铵分光光度法(GB 11893-89)测定。

5)试验数据分析。采用 SPSS 18.0 软件进行数据统计分析。不同温度处理下营养盐浓度做单因素方差分析(One-way ANOVA), 通过 *t*-检验(平均值成对二样本分析)比较每一种处理条件下营养盐浓度的差异, 方差分析前先进行正态分布和方差齐性检验。以 $P < 0.05$ 作为差异显著水平。

2 结果与分析

1)人工感染试验结果。从表 1 可知, 在不同水温下, 柱状黄杆菌对草鱼的感染死亡率是不同的。研究结果显示: 低水温(15 ℃)下的草鱼基本不发

表 1 不同水温下 G4 人工感染草鱼种情况

试验箱号	试验组别 / ℃	菌株	试验鱼数 / 尾	死亡数 / 尾	死亡率 / %	各试验组平均死亡率 / %
1	15	G4	10	0	0	3.3
2		G4	10	1	10	
3		G4	10	1	0	
4	20	G4	11	6	55	45.5
5		G4	11	5	45	
6		G4	11	4	37	
7	25	G4	12	9	75	68.8
8		G4	10	6	60	
9		G4	10	7	70	
10	30	G4	12	6	50	57.6
11		G4	11	7	63	
12		G4	10	6	60	
13	35	G4	13	7	54	50
14		G4	11	6	55	
15		G4	14	6	43	
16	25	无菌生理盐水	10	0	0	0
17	25	无菌生理盐水	10	0	0	
18	25	无菌生理盐水	10	0	0	

病或发病率较低(平均为 3.3%);当水温升高到 20 ℃时,柱状黄杆菌对草鱼便开始显现出较强的感染力,平均死亡率达到 45.5%(36.4%~54.5%);当水温为 25 ℃时,试验鱼平均死亡率最高,为 68.8%;当水温继续升高到 30 ℃,草鱼死亡率出现下降,为 57.6%;水温 35 ℃时,死亡率继续下降,为 50%(42.9%~53.8%)。人工感染发病的草鱼其主要症状表现为病鱼在水中行动缓慢,反应迟钝,体色发黑。肉眼观察,鳃丝发白腐烂,鳃丝末端黏液增多,鳍条末端发白缺损。解剖病鱼,肛门红肿,腹部腹水,腹部肌肉充血。

2)病原菌的分离鉴定。从明显发病鱼的肝、肾组织分离纯化致病菌 12 株,经 PCR 检测,基因扩增,其分离菌株与 G4 标准菌株相似性达 99%~100%,确定该致病菌株为柱状黄杆菌菌株。因此,可以确认,草鱼鱼种是由柱状黄杆菌引起的烂鳃病而死亡。从对照组的试验鱼中未分离到柱状黄杆菌。

3)试验期间的水质情况。如图 1 所示,试验用水 pH 值范围都在 7.1~7.9,统计结果显示试验期间 pH 变化没有显著差别($P>0.05$);总氮浓度随着试验的进行逐渐升高,随着温度变化先增加再减小,变化范围在 1.6~4.2 mg/L;总磷浓度变化范围为 0.4~1.1 mg/L;氨氮浓度变化在 0.1~0.5 mg/L;硝态氮浓度变化在 0.5~0.9 mg/L;亚硝酸盐浓度变化在 0.04~0.12 mg/L。各指标虽然都有波动,但都不显著,均符合养鱼水质标准。

3 讨论

水温是影响水环境中各种理化反应和微生物活动的重要因素,温度越高,沉积物与水体之间的各种化学反应就越剧烈,同时微生物活动加强,促进生物扰动、厌氧转化和矿化作用^[23]。因此各种形态氮磷浓度与温度均成正相关,且水温高的试验组水质较差,可能与残饵和鱼的排泄物的腐败分解有关^[24]。

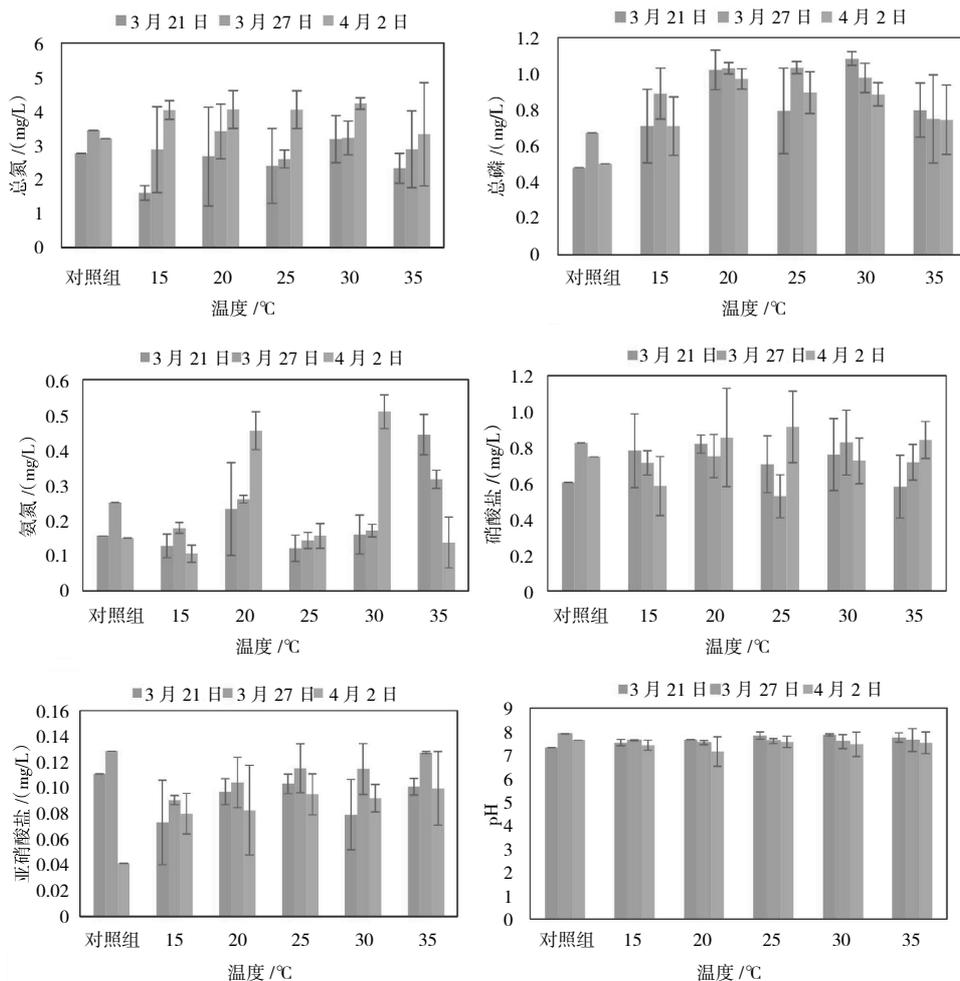


图 1 试验期间主要水质指标浓度变化

注:图中数据为平均值,误差线为标准差线。

养殖水体中无机态氮主要有溶解的氮气、氨氮、硝酸盐氮和亚硝酸盐氮。本研究中硝酸盐和亚硝酸盐通量随时间变化情况较一致,说明二者具有较好的同源性^[25-26]。本研究中无机态氮主要以氨氮的形态存在,这是因为一方面草鱼排泄物主要是氨,随着温度的升高,排氨率也随之升高^[27];另一方面由于试验在充氧条件下进行,硝化作用为主导。

水温对草鱼烂鳃病的发生也有一定的影响,水温的变化引起致病菌的生长与繁殖加速,随着鱼体抵抗力的减弱,从而引起草鱼烂鳃病的发生。本研究表明,在不同水温下,柱状黄杆菌对草鱼的感染力显著不同。水温 15 ℃时草鱼基本不发病,而 20 ℃左右时死亡率较高,所以此温度(或此温度上下)可视为草鱼烂鳃病发病的临界温度;水温 25 ~ 30 ℃时草鱼的死亡率最高,为草鱼细菌性烂鳃病的最适流行温度,这一结果与其流行病学的调查结果相吻合。

此研究结果对于鱼类养殖防病治病有一定的指导意义,在水产养殖中,从水温发生变化到鱼病的发生有一个过程,可以通过气象的预测预报,及时做好鱼病的防控工作。如在低温与发病季节,通过改善水质与养殖环境、投放药物抑制病原菌的增殖、补充新水或换水、增加鱼体免疫力与抵抗力等方法,预防和减少草鱼烂鳃病等相关疾病的发生。

参 考 文 献

- [1] 黄小桃. 浅谈草鱼烂鳃病[J]. 中国水产, 1996(9): 24.
- [2] 中国淡水养鱼经验总结委员会. 中国淡水鱼类养殖学[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1973.
- [3] 湖北省水生生物研究所鱼病研究室. 草鱼烂鳃病的研究细菌性病原的研究[J]. 水生生物集刊, 1975, 5(3): 315-334.
- [4] 张晓君. 柱状噬纤维菌及鱼类烂鳃病[J]. 河北科技师范学院学报, 2004, 18(1): 67-70.
- [5] BERNARDET J F, SEGERS P, VANCANNEYT M, et al. Cutting a *Gordian knota*: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family *Flavobacteriaceae*, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978)[J]. Int J Syst Bacteriol, 1996, 46(1): 128-148.
- [6] 王良发, 谢海侠, 张金, 等. 我国淡水鱼类的柱形病与其病原菌柱状黄杆菌的遗传多样性 [J]. 水生生物学报, 2010, 34(2): 367-377.
- [7] 何君慈, 邓国成. 草鱼细菌性烂鳃病原的研究[J]. 水产学报, 1987, 11(1): 1-9.
- [8] 黄文芳, 李海燕, 张剑英. 翘嘴鳊烂鳃病原的研究[J]. 微生物学通报, 1999, 26(4): 246-250.
- [9] 邓国成, 姜兰, 许淑英, 等. 加州鲈鱼细菌性烂鳃、烂嘴病原菌的研究[J]. 中国水产科学, 1996, 3(4): 83-92.
- [10] 布坎南 R E, 吉本斯 N E, 等. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [11] WAGNER B A, WISE D J, KHOO L H, et al. The epidemiology of bacterial diseases in food-size channel catfish[J]. J Aquat Anim Health, 2002, 14(4): 263-272.
- [12] 李军华. 柱状黄杆菌嗜热菌蛋白酶基因的鉴定[D]. 南昌: 南昌大学, 2007.
- [13] 陈昌福, 史维舟, 赵桂珍, 等. 翘嘴鳊烂鳃病原菌的分离及初步鉴定[J]. 华中农业大学学报, 1995, 14(3): 263-266.
- [14] 王德铭. 鲢、青鱼烂鳃及赤皮病致病细菌的研究[J]. 水生生物集刊, 1958(3): 9-25.
- [15] 叶元土, 敖奇惠. 鲤鱼烂鳃病原菌的分离及其毒力研究[J]. 西南农业大学学报, 1994, 16(5): 497-499.
- [16] 邓国成, 姜兰. 加州鲈细菌性烂鳃、烂嘴病原菌的研究[J]. 中国水产科学, 1996, 3(4): 75-84.
- [17] 张林, 孟彦, 罗晓松, 等. 斑点叉尾鲷主要疾病及其防治概述[J]. 淡水渔业, 2007, 37(1): 76-79.
- [18] CHOWDHURY M B R, WAKABAYASHI H. Survival of four major bacterial fish pathogens in different types of experimental water [J]. Bangladesh J Microbiol, 1990(7): 47-54.
- [19] ALTINOK I, GRIZZLE J M. Effects of low salinities on *Flavobacterium columnare* infection in euryhaline and freshwater stenohaline fish [J]. J Fish Dis, 2001, 24(6): 361-367.
- [20] SUORNALAINEN L R, THIROLA M A, VALTONEN E T. Influence of rearing conditions on *Flavobacterium columnare* infection of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)[J]. J Fish Dis, 2005, 28(5): 271-277.
- [21] 黄锦炉, 汪开毓, 姜婷婷, 等. 柱状黄杆菌部分生物学特性的研究 [J]. 大连海洋大学学报, 2010, 25(6): 506-510.
- [22] LIU J Y, LI A H. First case of *Aeromonas schubertii* infection in the freshwater cultured snakehead fish, *Ophiocephalus argus* (Cantor) in China [J]. Journal of Fish Diseases, 2012 (35): 335-342.
- [23] 林艳, 刘亚丽, 段秀举, 等. 双龙湖底泥磷释放强度影响因素正交试验研究[J]. 资源环境与工程, 2006, 20(1): 78-81.
- [24] 温周瑞, 陈霞, 卢伶俐, 等. 不同水温条件下嗜水单胞菌对鲫感染力的研究[J]. 淡水渔业, 2013, 43(6): 56-60.
- [25] 朱爱美, 叶思源, 卢文喜. 鳌山湾沉积物间隙水营养盐的含量及其分布[J]. 江苏环境科技, 2006, 19(A02): 20-22.
- [26] 潘建明, 周怀阳, 李传语, 等. 夏季珠江口沉积物中营养盐剖面分布和界面交换通量[J]. 海洋学报, 2002, 24(3): 52-59.
- [27] 周洪琪, 潘兆龙, 李世钦, 等. 摄食和温度对草鱼氮排泄影响的初步研究[J]. 上海水产大学学报, 1999, (4): 293-297.