

注射鳖源致病性嗜水气单胞菌 ZHYYZ-1 引发中华鳖(*Trionyx sinensis*)稚鳖感染和致死的定量研究*

王志铮¹ 申屠琰^{1,2} 赵蓓蓓¹ 阮波¹

(1. 浙江海洋学院 舟山 316004; 2. 余姚市水产技术推广中心 宁波 315400)

提要 以 20 日龄中华鳖稚鳖为实验动物, 采用静水停食实验法, 在水温(27.4±1.3)、pH 7.1 条件下, 进行了注射鳖源嗜水气单胞菌 ZHYYZ-1 引发中华鳖稚鳖感染和致死的定量实验研究。结果表明: (1) 该菌为高致病性菌株, 异常排泄是该菌致稚鳖表露临床感染症状的重要标志; (2) 注射该菌引起稚鳖感染与致死具明显的剂量—时间效应, 随注射菌量递增依次出现不表露临床感染症状、表露临床感染症状而不出现死亡和大量死亡三种情形, 稚鳖表露临床感染和出现死亡的时间均随注射菌量增大而明显缩短, 绝大多数稚鳖表露临床感染和出现死亡的时限分别为 2h 和 48h; (3) 濒死稚鳖体内该菌的底限含量为 3.3×10^6 CFU/g, 稚鳖体内菌注射含量可控安全范围为(1.2—8.8)×10³CFU/g。

关键词 嗜水气单胞菌 ZHYYZ-1, 感染率, 死亡率, 中华鳖稚鳖

中图分类号 S912

中华鳖(*Trionyx sinensis*)隶属于爬行纲、龟鳖目、鳖科、鳖属, 具有很高的营养、经济和药用价值, 深受广大消费者青睐, 是当前我国最重要的淡水养殖品种之一。

众所周知, 探究病原生物引起养殖经济动物感染与死亡的过程和机制, 明晰两者间相互作用动态, 并以此找寻抑制水域环境及养殖经济动物体内病原生物数量密度的有效途径, 对于保障养殖经济动物的良好生存和繁衍具有重要现实意义。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是多种水生动物的原发性致病菌, 大量研究表明, 致病性嗜水气单胞菌既是引起养殖中华鳖暴发性死亡的主要病原, 也是养殖中华鳖细菌性疾病中经济损失最为严重的致病菌, 所涉病症达 15 种之多(赵明军等, 2003)。目前, 国内外有关鳖源致病性嗜水气单胞菌的研究多集中于生物学特征(张林等, 2009)、病原分离与鉴定(吴惠仙等, 2004; 赵小平等, 2005; 沈锦玉等, 2007)、病理观察(姚金水等, 1997)、毒力因子及致病力(叶巧真等, 1999; 杨先乐等, 1999)、病原检测(陈昌福, 1998; 邱德全等, 1998)

以及免疫防病(刘宗英等, 2005; 贾亚东等, 2007)等方面, 而有关其对中华鳖感染与致死效应的定量研究尚未见报道。鉴于此, 作者于 2009 年 7—8 月以自行分离的鳖源致病性嗜水气单胞菌 ZHYYZ-1 为实验菌, 开展了其对中华鳖稚鳖感染和致死特征的实验研究, 以期中华鳖逆境生理生态研究积累相关资料, 为中华鳖疾病防控和安全施治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验鳖 为购自宁波市明凤渔业有限公司中华鳖国家级良种场的 20 日龄中华鳖(*Trionyx sinensis*)稚鳖, 运回余姚市水产技术推广中心实验基地后立即移入规格为 1m×2m×1.2m 的简易网箱内, 选取肢体完整、反应灵敏、无伤病、规格相近的健壮个体作为实验对象(体重 4.56±0.88g), 驯养 5—7d 后备用。

1.1.2 实验菌 嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*), 菌株编号: ZHYYZ-1(GenBank 登录号:

* 宁波市农业科技重大攻关项目, 2007C10025 号。王志铮, 研究员, E-mail: wzz_1225@163.com

收稿日期: 2009-09-22, 收修改稿日期: 2010-02-10

GU563992), 由浙江海洋学院水产养殖实验室安全养殖分室提供。接种于普通营养琼脂培养基, 30 °C 恒温静置培养 24h 后用无菌生理盐水(0.85% NaCl)制成不同浓度的菌悬液, 现配现用。

1.1.3 养殖用水 为经 48h 自然曝气的自来水, 水温(27.4±1.3) °C, pH 7.1, 水质符合 NY 5051-2001 无公害食品淡水养殖用水水质(中华人民共和国农业部, 2001)要求。

1.2 实验方法

经预备实验, 确定实验菌 ZHYYZ-1 注射部位(稚鳖左下肢近上方的腹面空腔)、注射量(0.1ml)、注射浓度设置范围(下限为稚鳖 96h 不表露临床感染的注射浓度上限, 上限为 1.0×10^9 CFU/ml)和实验时间(临床感染率与致死率观察统计时限为 96h, 存活个体体内菌含量测定时限为 48h)。以注射等量无菌生理盐水(0.85% NaCl)为空白对照组, 等比梯度法设置若干注射浓度组, 60cm × 80cm × 60cm 白色塑料箱为实验容器(实际实验容积 20L), 每个梯度设 6 个重复, 每个重复各放实验鳖 10 只(其中 3 个重复组用于累计临床感染率、死亡率的统计以及濒死个体体内菌含量的测定; 另 3 个重复组用于存活个体体内菌含量的时序测定, 观测时间依次为实验开始后 0.5h、1h、2h、4h、8h、16h、24h、48h, 每组每次随机测定存活稚鳖 1 只), 日换水率 100%, 连续观察实验鳖的活动情况, 以出现异常排泄为临床感染评判依据, 以身体僵直、碰触无反应为死亡评判标准, 记录各实验个体的临床感染症状表露时间和死亡时间, 及时取出死亡个体。体内菌含量测定方法为: 纱布擦净体表后称取体重 W (g), 75% 酒精体表消毒, 无菌操作取内脏及腹腔内积液, 低温研磨后, 用无菌生理盐水冲洗 3 次以上, 将其全数移入带刻度的试管内定容至 10ml, 充分混匀后用活菌计数法得总菌量 M (CFU), 据此, 求得体内菌含量 $m = M/W$ 。

1.3 数据处理

根据实验菌对中华鳖稚鳖感染与致死效应实验结果, 借助 SPSS17.0 分别建立临床感染概率单位与菌注射浓度对数、实验时间对数之间, 死亡概率单位与菌注射浓度对数、实验时间对数之间的数学模型, 并在 R 相关系数($P < 0.01$ 为显著水平)和 F 值($P < 0.05$ 为显著水平)可靠性检验的基础上, 分别求出该实验菌 2h 半数临床感染注射浓度值和 48h 半数死亡注射浓度值。参考生态毒理学中急性毒性实验药物安全质

量浓度计算公式(周永欣等, 1989), 本研究将稚鳖体内实验菌注射含量的可控安全范围设定为:

$$SD_{\text{上限}} = \frac{0.1 \times (48hLC_{50} \times V)}{\bar{W}};$$

$$SD_{\text{下限}} = \frac{0.1 \times (2hIC_{50} \times V)}{\bar{W}}$$

式中, $SD_{\text{上限}}$ (CFU/g)和 $SD_{\text{下限}}$ (CFU/g)分别为实验菌注射含量可控安全范围的上、下限值, $48hLC_{50}$ (CFU/ml)和 $2hIC_{50}$ (CFU/ml)为中华鳖稚鳖 48h 半数死亡的菌注射浓度值和 2h 半数临床感染的菌注射浓度值, V (ml)为注射量, \bar{W} 为实验稚鳖平均体重。

2 结果与分析

2.1 中华鳖感染与死亡症状

实验 40min 内, 菌注射浓度 1.0×10^8 CFU/ml 组的绝大多数个体即出现头颈部向外伸直并弯曲, 咽部节律性鼓缩, 四肢绷紧不动, 碰触极为敏感等症状, 并伴有较为明显的快速排泄现象; 1h 左右, 菌注射浓度 1.0×10^7 CFU/ml 组个体全数表露较为明显的快速排泄现象, 部分个体还伴有咽部轻微节律性鼓缩; 2h 许, 菌注射浓度 1.0×10^6 CFU/ml 组绝大多数个体出现较轻微的临床感染症状, 感染率达 80%, 之后便再无临床感染症状个体出现。期间, 1.0×10^5 CFU/ml 组个体活动情况与对照组相似, 有的在水层中缓慢游动, 有的匍于容器底部, 且均无排泄行为。

表露临床感染症状后, 各实验组个体一般都静匍于容器底部, 无攀爬行为, 受外界刺激后菌注射浓度 1.0×10^8 CFU/ml 组绝大多数个体反应较为迟钝且活动能力也明显变弱, 而菌注射浓度 1.0×10^7 CFU/ml 组则与对照组基本相近; 7h 后, 菌注射浓度 1.0×10^8 CFU/ml 组陆续出现死亡个体, 大多因身体极度虚弱安静而亡, 少部分个体濒死前出现头颈部向外伸直、弯曲, 躯体左右摆动, 四肢划动等极为明显的挣扎症状, 约持续 1—2min 后, 头颈部回缩, 四肢自然伸展, 对外界刺激尚有微弱反应, 30min 左右即出现死亡, 至实验 17h 前全数死亡; 28h 后, 菌注射浓度 1.0×10^7 CFU/ml 组个体因极度虚弱而开始陆续出现死亡, 无濒死前挣扎过程, 至 48h 死亡率已达 70%, 53h 后便再无死亡个体出现。实验期间, 对照组和菌注射浓度 1.0×10^6 CFU/ml 组个体均未出现死亡, 活力基本无变化。解剖观察发现, 死亡个体内脏与正常稚鳖无明显差异。

表 4 注射感染下濒死中华鳖稚鳖体内的实验菌含量

Tab.4 Concentrations of experimental bacteria in impending death juvenile *T. sinensis* after injection

菌注射浓度 (CFU/ml)	数量(只)	濒死个体体内实验菌含量(CFU/g)		
		范围	均值	95%置信区间
1.0×10^9	30	$4.6 \times 10^6 - 2.5 \times 10^7$	$(1.4 \pm 0.5) \times 10^7$	$(1.0 - 1.7) \times 10^7$
1.0×10^8	30	$1.8 \times 10^6 - 1.1 \times 10^7$	$(5.1 \pm 2.3) \times 10^6$	$(3.5 - 6.7) \times 10^6$
1.0×10^7	24	$1.6 \times 10^6 - 7.0 \times 10^6$	$(4.4 \pm 1.4) \times 10^6$	$(3.3 - 5.6) \times 10^6$

3 讨论

3.1 稚鳖对实验菌 ZHYYZ-1 注射攻毒的应答特征

综合各观察结果,发现稚鳖对 ZHYYZ-1 注射攻毒的应答特征表现为:(1)异常排泄是稚鳖表露临床感染症状的重要标志;(2)ZHYYZ-1 注射攻毒引发稚鳖感染与死亡具有明显的剂量效应。 1.0×10^5 CFU/ml 组稚鳖不表露临床感染症状, 1.0×10^6 CFU/ml 组绝大多数表露临床感染症状但不出现死亡, 1.0×10^7 CFU/ml 及以上组均表露临床感染症状,除 1.0×10^7 CFU/ml 组尚有极少数个体存活外,其余均死亡(表 1、表 2),这一特征与三疣梭子蟹口服感染 WSSV 出现携带、发病与死亡三种状态相似(王忠发等,2008);(3)绝大多数稚鳖表露临床感染症状和出现死亡的时间分别为 2h 内和 48h 内,最长时间分别为 126min 和 3150min(表 1、表 2),体内菌含量最低值分别为 7.8×10^4 CFU/g 和 1.6×10^6 CFU/g,同时, 1.0×10^6 CFU/ml 组个体 16h 后体内菌含量较注射 0.5h 后低一个数量级, 1.0×10^5 CFU/ml 组 24h 后体内菌含量开始稳步下降,表明 24h 后实验菌已不对低注射浓度组个体的感染与致死构成威胁(表 3);(4)经统计,濒死稚鳖体内实验菌的底限含量为 3.3×10^6 CFU/g(表 4);(5)体质差异对稚鳖感染与致死情形有一定影响,主要表现为同一浓度梯度组个体表露临床感染症状时间和死亡时间的差异上。

3.2 实验菌 ZHYYZ-1 对稚鳖的感染与致死效应

基于稚鳖对实验菌 ZHYYZ-1 攻毒的应答结果,作者认为,致病菌毒力因子在生物内的累积情形是决定生物是否表露临床感染与出现死亡的重要因素。即:(1)临床感染症状表露与否及其表露时间长短取决于致病菌初始侵入量和机体的早期免疫力。若早期动员的免疫抗体量持续低于致病菌毒力因子的早期累积量时,生物便表露临床感染症状,反之则为隐性感染状态;若毒力因子的早期累积量越大,则引起生物表露临床感染症状的时间就越短,反之就较长;个体健康度越高,则免疫力越强,其表露临床感染症状

的时间也就相对较长,当致病菌注射量较低时甚至不表露临床感染症状。(2)生物体是否出现死亡,以及死亡时间的长短取决于致病菌初始侵入量和受试个体的健康度。随着实验时间的延长,若致病菌毒力因子累积量明显高于抗体的持续表达量,必将导致受试生物因体质及免疫力的明显下降而亡,反之则恢复原态而不出现死亡,同时,高健康度的个体因具较强的免疫力,其出现死亡的时间也就相对延长,当致病菌注射量相对较低时甚至仍可康复而不出现死亡。

由表 3 可见,本研究中各实验组个体体内菌含量在存活期间均未获得较明显的增长。与 Cristi 等(2004)认为细菌侵入机体内后大量繁殖,会夺取体内营养物质,使机体抵抗能力进一步下降,并引起更多的细菌侵入,同时大量繁殖的细菌会产生毒力因子,破坏机体,导致组织细胞溶解,促使死亡率明显增加的情形相异。笔者认为其原因主要为:(1) 1.0×10^7 CFU/ml 以下组稚鳖及 1.0×10^7 CFU/ml 组部分高健康度个体体内实验菌含量,因受机体免疫抗体的有力阻抗,故始终处于波动状态(表 3);(2)本研究中体内 ZHYYZ-1 菌含量只要达到并超过 3.3×10^6 CFU/g 时就会使受试生物处于濒死状态,仅是 1.0×10^7 CFU/ml、 1.0×10^8 CFU/ml、 1.0×10^9 CFU/ml 组注射 0.5h 后体内菌含量的 19.41 倍、18.33 倍和 4.92 倍(表 3、表 4),故无须大量繁殖。

3.3 稚鳖可控安全注射浓度范围的设置及实验菌 ZHYYZ-1 的致病性评价

由表 1 和表 2 可见,实验菌 ZHYYZ-1 注射攻毒对稚鳖的感染与致死情形,跟毒物对生物体的急性致毒效应一样,存在明显的剂量效应。故可参照生态毒理学中毒物急性毒性安全质量浓度计算公式设置介于不表露临床感染症状的菌安全注射浓度和不出现死亡的菌安全注射浓度间的稚鳖可控安全注射浓度范围,即导致生物体可能表露感染症状而不出现死亡的菌注射浓度范围,将其转化为菌含量,则为实验菌注射含量的可控安全范围。

致病性嗜水气单胞菌常见于自然水域中,因此,确定可作为安全养殖警戒范围的生物体内该菌菌量可控

安全范围将对稚鳖相关疾病的预警施治将起到良好的指示作用。鉴于实验菌注射攻毒引起稚鳖表露临床症状和出现死亡的主要时限为 2h 和 48h(表 1、表 2), 故其注射含量可控安全范围为 $\left[\frac{0.1 \times (2hIC_{50} \times 0.1ml)}{4.56g}, \frac{0.1 \times (48hLC_{50} \times 0.1ml)}{4.56g} \right]$ 。对表 1 和表 2 进行统计学分

析, 得表 5。由表 5 可见, 中华鳖稚鳖累计感染概率和死亡概率均与实验菌注射浓度对数及其表露时间对数之间存有良好的线性相关性, 经 R 检验和 F 检验表明方程有意义。按表中方程式可得 $2hIC_{50} = 5.5 \times 10^5$ CFU/ml, $48hLC_{50} = 4.0 \times 10^6$ CFU/ml, 两者与表 1、表 2 结果基本相符, 由此可得稚鳖体内的菌注射含量可控安全范围应为 $(1.2-8.8) \times 10^3$ CFU/g。

表 5 中华鳖稚鳖累计死亡率和感染率与注射菌浓度、表露时间的相互关系

Tab.5 The relationships between cumulative mortality and infection rate, bacterial concentration injected, and occurrence time of juvenile *T. sinensis*

组别	回归方程	k	df	R^2	F	R 检验	F 检验
感染组	$Z = 1.2561gx + 4.4471gt - 11.457$	2	13	0.803	26.440	$R_{0.05(2,13)} = 0.608$	$F_{0.05(2,12)} = 3.885$
死亡组	$Z = 2.1751gx + 6.4651gt - 31.713$	2	9	0.603	6.833	$R_{0.05(2,9)} = 0.697$	$F_{0.05(2,9)} = 4.256$

注: Z 为概率单位, x 为菌注射浓度, t 为实验时间; 感染组、死亡组菌注射浓度范围分别为 $(1.0 \times 10^5$ CFU/ml, 1.0×10^9 CFU/ml) 和 $(1.0 \times 10^6$ CFU/ml, 1.0×10^9 CFU/ml)

本研究中, 稚鳖半致死菌注射量为 4.0×10^5 CFU/只, 即半致死菌注射含量为 8.8×10^4 CFU/g, 按鳖的嗜水气单胞菌半数致死量(杨先乐等, 1995)和 Leung 等(1995)关于鱼的嗜水气单胞菌高毒株半数致死量和低毒株半数致死量的分析, 表明本实验菌 ZHYYZ-1 为高致病性菌株。嗜水气单胞菌具有多种毒力因子, 包括: 粘附素(adhesins, Aha)、侵袭素(invasions)、肠毒素(enterotoxins)、溶血素(hemolysin, AHH)、气溶素(aerolysin, AerA)、外膜蛋白(outermembrane proteins, OMP)等, 这些毒力因子在细菌的致病过程中起重要作用(Dorman, 1991; Mekalanos, 1992), 且各毒力因子在对机体致病作用的发挥上是相互协同的(Yu *et al.*, 2005; 于学辉等, 2007), 故作者认为实验菌 ZHYYZ-1 的高致病性应与其所含 Aha、AHH、AreA、OMP 等毒力基因(王志铮等, 2010)¹⁾有关。至于本研究中, 解剖观察致死个体内脏与正常稚鳖无明显差异的原因, 则有待于进一步研究。

致谢 承蒙余姚市水产技术推广中心提供实验场地和部分试验用具, 本校 2006 级水产养殖专业王海强、李佳佳、毛文举参与本研究部分实验工作, 谨致谢忱。

参 考 文 献

于学辉, 王远微, 汤 承等, 2007. 嗜水气单胞菌的研究进展. 西南民族大学学报(自然科学版), 33(3): 507—514

- 王忠发, 王志铮, 许文军等, 2008. 虾蟹混养塘中 WSSV 对三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)致死效应的定量研究. 海洋与湖沼, 39(2): 184—189
- 中华人民共和国农业部, 2001. NY 5051-2001 无公害食品淡水养殖用水水质. 北京: 中国标准出版社, 1—5
- 叶巧真, 何建国, 翁少萍等, 1999. 中华鳖白底板病和红底板病病毒及细菌的致病性. 淡水渔业, 29(8): 3—7
- 刘宗英, 姚 鹏, 陈昌福等, 2005. 高活性干酵母对中华鳖非特异性免疫功能和抗病力的影响. 华中农业大学学报, 24(2): 192—196
- 杨先乐, 柯福恩, 周剑光等, 1999. 嗜水气单胞菌对中华鳖致病力的研究. 中国水产科学, 6(1): 117—121
- 杨先乐, 贺 璐, 柯福恩, 1995. 鳖病研究的现状及其展望. 中国水产科学, 2(4): 78—85
- 吴惠仙, 薛俊增, 2004. 中华鳖出血性肠道坏死症病原及其药敏性. 中国兽医学报, 24(4): 343—345
- 邱德全, 何建国, 钟英长等, 1998. 免疫胶体金检测中华鳖抗毒素抗体和嗜水气单胞菌外毒素. 湛江海洋大学学报, 18(1): 1—4
- 沈锦玉, 潘晓艺, 余旭平等, 2007. 中华鳖白底板病病原的分析. 中国水产科学, 14(5): 815—822
- 张 林, 艾晓辉, 袁科平等, 2009. 中华鳖嗜水气单胞菌的生物学特性. 河南科技大学(自然科学版), 30(6): 75—78
- 陈昌福, 1998. 用直接荧光抗体法和细菌培养法对中华鳖体内的嗜水气单胞菌的检测. 华中农业大学学报, 17(3): 264—266
- 周永欣, 章宗涉, 1989. 水生生物毒性实验方法. 北京: 农业出版社, 1—157
- 赵小平, 汪官余, 郑永华等, 2005. 中华鳖“烂颈病”病因学的

1) 王志铮, 赵蓓蓓, 王忠发等, 2010. 四株鳖源致病性嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)的表型、分子鉴定及其毒力基因检测. 海洋与湖沼(待刊)

- 初步研究. 淡水渔业, 35(6): 44—46
- 赵明军, 朱芝秀, 王小英等, 2003. 中华鳖嗜水气单胞菌所致疾病研究. 中国饲料, (7): 26—27
- 姚金水, 陈家祥, 卢惠明等, 1997. 中华鳖嗜水气单胞菌感染的病理学观察. 福建农业大学学报, 26(1): 94—97
- 贾亚东, 汪成竹, 陈昌福, 2007. 中华鳖对嗜水气单胞菌粗脂多糖(LPS)的免疫应答. 华中农业大学学报, 26(2): 228—232
- Cristi L Galindo, Amin A Fadl, Jian Sha *et al*, 2004. *Aeromonas hydrophila* cytotoxic enterotoxin activates mitogen-activated protein kinases and induces apoptosis in *Murine macrophages* and human intestinal epithelial cells. J Biol Chem, 279(36): 37597—37612
- Dorman C J, 1991. DNA supercoiling and environmental regulation of gene expression in pathogenic bacteria. Infect Immun, 59(3): 745—749
- Leung K Y, Low K W, Lan T J *et al*, 1995. Interaction of the fish pathogen *Aeromonas hydrophila* with tilapia, *Oreochromis ureus* (Steindachner), pathocytes. J Fish Diseases, (18): 435—477
- Mekalanos J J, 1992. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. J Bacteriol, 174(1): 1—7
- Yu H B, Zhang Y L, Lau Y L *et al*, 2005. Identification and characterization of putative virulence genes and gene clusters in *Aeromonas hydrophila* PPD134/91. Appl Environ Microbiol, 71(8): 4469—4477

QUANTITATIVE ANALYSIS OF INFECTION AND LETHAL EFFECTS ON JUVENILE *TRIONYX SINENSIS* BY INJECTING PATHOGENIC *AEROMONAS HYDROPHILA* ZHYYZ-1

WANG Zhi-Zheng¹, SHEN Tu-Yan^{1,2}, ZHAO Bei-Bei¹, RUAN Bo¹

(1. Zhejiang Ocean University, Zhoushan, 316004; 2. Fishery Technology Extension Center of Yuyao, Ningbo, 315400)

Abstract Quantitative analysis of infection and lethal effects on juvenile *Trionyx sinensis* was studied in the standing water without feeding at (27.4 ± 1.3) by injecting pathogenic *Aeromonas hydrophila* named ZHYYZ-1, which was isolated from the same species of turtle. It was found that: (1) the bacteria strain isolated from the infected turtle was a pathogenic, leading to abnormal excretion; (2) the infection and lethal effects were dose- and time-dependent. There were 3 types of symptoms after the injection, depending on the increases of the amount of bacterial injected: no clinical infection, clinical infection but caused no death, clinical infection caused mass death; (3) the times when the young turtle showed clinical infection symptoms (2h) and death (48h) had a negative correlation with the increases of the amount of bacterial injected; (4) the lowest amount of pathogenic bacterial in impending death turtle was 3.3×10^6 CFU/g, and the safe range of bacterial number in a turtle was between 1.2×10^3 CFU/g to 8.8×10^3 CFU/g.

Key words *Aeromonas hydrophila* ZHYYZ-1, Infection rate, Mortality, Juvenile *Trionyx sinensis*