

西藏裂腹鱼类出血病病原的初步研究

旦增旺久, 强巴央宗, 刘海平, 德吉巴卓, 吴 洪

(西藏农牧学院动物科学学院, 西藏 林芝 860000)

摘要:拉萨裸裂尻鱼(*Schizopygopsis youngusbandi* Regan)、拉萨裂腹鱼(*Schizothorax waltoni* Regan)和异齿裂腹鱼(*Schizothorax o'connori* Lloyd)来源于雅鲁藏布江米林江段,采集自西藏林芝地区八一镇农贸市场,规格250~300 g。从裂腹鱼病鱼的肌肉、肠道、肝脏、肾脏等组织中共分离到12种细菌。用病鱼匀浆组织的超微(0.2 μm)过滤悬液和12种细菌悬液感染健康的裂腹鱼,发现超微过滤悬液未导致出血病,3种细菌悬液具有较强的致病力,病鱼有典型的出血病症状,死亡率87%、100%和100%。革兰氏染色后镜检观察,该3种菌株均为革兰氏阴性杆菌,少数成对或短链状,菌种未鉴定。

关键词:裂腹鱼类;出血病;病原;西藏

中图分类号:S941.42 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2012)06-0124-04

裂腹鱼类(Schizothoracinae fishes)隶属鲤形目(Cypriniforme)、鲤科(Cyprinidae)、裂腹鱼亚科(Schizothoracinae),特产于亚洲高原地区,具有重要经济价值和科研价值(陈毅峰和曹文宣,2000)。青藏高原是裂腹鱼类分布最为集中的地区(马宝珊等,2011)。裂腹鱼类也是青藏高原及邻近地区的主要鱼类资源,具有重要的驯养开发价值(代应贵和肖海,2011)。西藏高原是青藏高原的核心部分,水系沟渠纵横,湖泊星罗棋布,裂腹鱼类占西藏鱼类总数的54.9%,不论在种类还是数量上都占有绝对优势(张春光,1996)。

随着西藏的经济发展及旅游人口数量的逐渐增多,人们对野生鱼类的过度需求导致过度捕捞现象越来越严重。另外,水电建设工程、生活污水和垃圾排放等活动的影响,使得鱼类栖息环境不断恶化(陈锋和陈毅峰,2011)。原有水域生态环境的变化导致西藏鱼类的病害逐渐增多,同时也造成西藏裂腹鱼类种群数量的锐减。2009年西藏雅鲁藏布江中下游发生的死鱼事件,无论是对渔业生态系统还是渔业资源来说,损失颇大。2011-2012年,观察到林芝地区八一镇农贸市场来自雅鲁藏布江米林江段的裂腹鱼有全身体表充血、出血、眼球突出和腹部膨胀的典型症状,死亡率40%~80%。到目前为止,还没有关于西藏裂腹鱼类疾病方面的相关报道。

本研究通过对拉萨裸裂尻鱼(*Schizopygopsis youngusbandi* Regan)、拉萨裂腹鱼(*Schizothorax waltoni* Regan)和异齿裂腹鱼(*Schizothorax o'connori* Lloyd)3种西藏特有裂腹鱼出血病典型病鱼的采集、病原体的分离和人工感染试验,以找出此病的病原,为西藏特有鱼类的保护和开发提供科学依据和理论基础。

1 材料和方法

1.1 裂腹鱼

患病和健康裂腹鱼均从西藏林芝地区八一镇农贸市场采集,来源于雅鲁藏布江米林江段,规格250~300 g。患病鱼用于病原分离和鉴定。健康鱼放养在82 cm × 62 cm × 60 cm水族箱中,9尾/箱,总共18箱;充气饲养,每天换水3次,早、晚各投喂1次配合饲料;试验期间水温控制在10~18℃;健康鱼经预饲养7 d确认无病后,用于人工感染试验。

1.2 病菌悬液的制备

将病鱼的肌肉、肠道、肝脏、肾脏等匀浆制成组织悬液,10℃下10 000 r/min离心25 min,取上清液稀释至1:10,0.1%双抗4℃处理过滤液,经超微(0.2 μm)细菌滤器过滤后获得无菌滤液。将无菌滤液涂布于普通营养琼脂培养基上,35℃培养24 h后确认该滤液无菌。另取超微过滤悬液加入1/10体积氯仿(CHCl₃)剧烈振荡后,离心除去脂肪和蛋白质用于感染试验。超微过滤悬液经70℃水浴灭活3 h后作为对照。

1.3 细菌分离及悬液制备

将病鱼用无菌生理盐水冲洗体表后,在无菌条件下从病鱼的体表溃疡部、肝脏、肠道、肾脏和腹水

收稿日期:2012-11-07

通讯作者:强巴央宗,1965年生,女,藏族,教授,博士。E-mail: qbyz628@126.com

作者简介:旦增旺久,1989年生,男,藏族,硕士研究生。E-mail: wangjiu28@126.com

分别取样划线接种 TSA 培养基、普通营养琼脂平板,置于 28℃ 恒温培养箱内培养。待平板上长出形态一致的优势菌落后,挑取单个的优势菌落在 TSA 平板上再次划线进行纯化培养,经过多次纯化获得纯培养菌株。用无菌生理盐水洗下菌落,制成菌悬液,并将细菌浓度调为 3×10^7 CFU/mL 左右,供人工感染试验。

1.4 感染试验

向健康的裂腹鱼体内分别腹腔注射 0.3 mL 菌悬液(3×10^7 CFU/mL)、超微过滤悬液,对照组分别注射等量无菌生理盐水、超微过滤灭活悬液,将各组试验鱼置于相同条件的不同水族箱中饲养观察 2 周。

2 结果与分析

2.1 超微过滤悬液的人工感染

超微过滤悬液感染试验结果见表 1。试验初期出现少量非正常死亡, 试验开始 5d 后, 不再出现死亡。对照组成活率为 100%, 试验组则为 89%、78%、89% 和 78%。饲养 2 周后, 所有成活的鱼均未出现出血病症状, 表明此病并非病毒引起。

2.2 细菌的分离及人工感染

培养得到 12 种不同的菌珠(DWF-01 ~ DWF-012),进一步纯化培养后用于感染试验,结果见表 2。DWF-01 感染组供试鱼死亡率 87%,DWF-07 和 DWF-08 感染组供试鱼死亡率 100%;其他菌株感染组供试鱼死亡率均较低。

将 DWF-01、DWF-07 和 DWF-08 分别在 TSA 琼脂平板培养基上 28℃ 培养 24 ~ 48 h 后,3 种菌落均呈圆形、边缘整齐、光滑湿润、不透明、生长良好。采用革兰氏染色后镜检观察到,3 种菌株均为革兰氏阴性杆菌,少数成对或短链状。

人工感染 DWF-01、DWF-07 和 DWF-08 的裂腹鱼发病症状与自然条件下发病症状相同,主要表现为:鱼漂浮于水面,鱼体轻微变黑,上下颌、口腔、鳃盖、体表两侧、腹部及鳍基均充血发红,肛门红肿突出。尤其是感染 DWF-07 菌株的裂腹鱼在注射部位出现皮肤溃疡,时间越长,溃疡灶越大,露出肌肉,甚至糜烂;所有鳍条基部均充血,部分病鱼眼睛充血突出,鳃丝略发红呈淤血症状;对鱼体进行解剖发现肝脏点状出血肿大、胆肿大、胆汁呈淡黄色,肾肿大出血,鱼鳔出血,肠壁充血,肠内充满大量淡黄色或淡红色腹水并积有大量粘液,部分病鱼还出现肠道胀气症状。

表1 西藏裂腹鱼类超微过滤悬液感染试验

Tab.1 The artificial infection experiment of three Schizothoracinae fishes with the filtrated homogenate

[illegible]

表2 西藏裂腹鱼类细菌感染试验

Tab.2 The bacterial infection test in three Schizothoracinae fishes

[illegible]

3 讨论

3.1 西藏裂腹鱼类出血病病原

淡水鱼类出血病多为细菌性出血病,病原主要有鲁可氏耶尔森氏菌、嗜水气单胞菌和弧菌3种。目前国内很多淡水鱼类细菌性出血病大多由嗜水气单胞菌引起(陆承平,1992;钟蕾等,2010;方美娟等,2009;耿毅和汪开毓等,2004;于兰萍等,2010;汪开毓等,1992)。本研究发现,拉萨裸裂尻鱼、拉萨裂腹鱼、异齿裂腹鱼从人工感染 DWF-01、DWF-07 和 DWF-08 3 种菌株到死亡的时间间隔比较短,发病症状比较典型,与许多淡水鱼类出血性疾病症状的报道相一致(张德荣,2004;储卫华,2001;张玉和张秀军 2008;王春燕,2002;李焕荣等,2001)。经形态和染色特征、培养特性观察, DWF-01、DWF-07 和 DWF-08 3 种菌均是革兰氏阴性短杆菌,菌株有待鉴定。

3.2 西藏裂腹鱼类出血病病因

鱼病的发生都是外界环境、致病因子和鱼体自身在特定条件下相互作用的结果(李明锋,1997)。张德荣(2004)认为鱼类感染出血性疾病的主要原因是池塘淤泥过厚,淤泥中含有很多细菌,当池塘水温上升时,水中的有机质分解加快,水质恶化的速度增加,从而使鱼类感染此病的机率加大。通常认为鱼类出血性疾病的病原菌是条件性致病菌,是否致病取决于细菌、机体、环境三方面的相互作用(耿毅和汪开毓,2004)。从环境条件分析,鱼类的细菌性出血病在低温条件下不易引起鱼类发病,而高温条件下则易大量感染(范方玲,2010)。据调查,4~6月份为西藏裂腹鱼类细菌性出血病的发病季节,即发病水温为8~16℃,结合西藏当地实际情况,由于气候的转变,水温的变化可能造成裂腹鱼抗病能力下降而发生出血病。

长期以来,受宗教信仰和生活习惯的影响,当地藏族人对野生动物有很强的保护意识,但对外来种的危害却不甚了解(陈锋和陈毅峰,2011),例如每年萨嘎达瓦节(藏历4月)和其他佛教的特殊日子,当地人会放生大量外来鱼类,放生的外来鱼类可能携带有出血病病原菌,西藏裂腹鱼感染后,在内外因子的作用下发生出血病。

志谢:感谢西藏高原生态研究所张惠娟博士提供帮助并对全文进行修改。

参考文献

- 陈毅峰,曹文宣.2000.裂腹鱼亚科鱼类[M].北京:科学出版社,273-388.
- 陈锋,陈毅峰.2011.拉萨河鱼类调查及保护[J].水生生物学报,34(2):279-285.
- 储卫华.2001.异育银鲫细菌性败血症病原与防治研究[J].水利渔业,21(1):40-41.
- 代应贵,肖海.2011.裂腹鱼类种质多样性研究综述[J].中国农学通报,27(32):38-46.
- 方美娟,林启存,陆红法.2009.季郎鱼细菌性败血症病原分离鉴定及抑菌试验[J].水产科学,28(12):717-719.
- 范方玲.2010.四川地区斑点叉尾鲴几种重要细菌性疾病病原检测及病原特性研究[D].成都:四川农业大学.
- 耿毅,汪开毓,吴麟等.2004.齐口裂腹鱼败血症的病原分离与鉴定[J].水利渔业,24(4):71-73.
- 李明锋.1997.生态防治鱼病的初步研究[J].江西水产科技,71(3):15-18.
- 李焕荣,催得风,张耳等.2001.锦鲤致病性嗜水气单胞菌分离和药敏实验[J].中国预防兽医学报,24(3):205-209.
- 陆承平.1992.致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述[J].水产学报,16(13):282-288.
- 马宝珊,谢从新,霍斌,杨学峰.2011.裂腹鱼类生物学研究进展[J].江西水产科技,128(4):36-40.
- 汪开毓,冯泽光,冯炳芳等.1992.鲤鱼嗜水气单胞菌病研究[J].鱼类病害研究,14(1):13-20.
- 王春燕.2002.异育银鲫细菌性败血症病原体的微生物学诊断及毒力、药敏实验[J].安徽农业科学,30(5):730-731.
- 于兰萍,王斌,李艳等.2010.大菱鲆出血性败血症病原菌的分离与鉴定[J].大连水产学院学报,23(5):335-339.
- 张春光,许涛清,蔡斌,叶恩琦.1996.西藏鱼类的组成分布及渔业区划[J].西藏科技,71:10-19.
- 张玉,张秀军.2008.鲤鱼细菌性败血症病原菌的药敏试验[J].安徽农业科学,36(30):13200-13201.
- 张德荣.2004.淡水鱼类出血病的原因和防治方法[J].渔业致富指南,(12):48.
- 钟蕾,刘大志,肖调义,等.2010.大鲵细菌性败血症病原分离及生物学特性研究[J].生物学杂志,27(4):11-14.

(责任编辑 张俊友)

Preliminary Etiological Studies of Hemorrhagic Disease in Tibetan Schizothoracine Fishes

Danzengwangjiu, Qianbayangzong, LIU Hai-pin, DEJI Ba-zhuo, WU Hong

(Department of Animal Science, Tibet Agriculture and Animal
Husbandry College, Linzhi 860000, P. R. China)

Abstract: This experiment was conducted to identify the etiology of hemorrhagic disease in three species of Schizothoracinae fishes (*Schizopygopsis younghusbandi*, *Schizothorax waltoni*, and *Schizothorax o'connori*) in Tibet. Fishes with hemorrhagic disease were obtained from Milin Section of Yarlung Zangbo River for pathogens isolation and artificial infection. 12 pathogenic bacteria were isolated from muscle, intestine, liver and kidney of the three species. Through artificial infection of health Tibetan Schizothoracinae fishes with the filtrated homogenate (0.2 μm) of diseased tissues and the 12 isolated bacteria, it was found that the filtrated homogenate did not reproduce the hemorrhagic disease, and 3 pathogenic bacteria showed strong pathogenicity to the health fish. The results suggested that the hemorrhagic disease was caused by bacterial pathogen in the three Schizothoracinae fishes. This could provide scientific evidence and theoretical basis to protection and exploitation of Tibetan Schizothoracine fishes.

Keywords: Schizothoracinae fishes; hemorrhagic disease; etiology; Tibet