

鳗鲡烂尾病病原菌的研究

卢全章 韩先朴

(中国科学院水生生物研究所)

摘要 鳗鲡烂尾病是鳗鲡养殖中的一种常见病,主要流行于夏季。在日本报道了由柱状屈挠杆菌引起的鳗鲡烂尾病。本文记述了用 TYE 培养基从广东潮安养鳗场病鳗中分离到的另外一种引起烂尾病的病原菌,并研究了该病原菌的致病作用,生物学和生理生化特性,鉴定为点状产气单胞杆菌(*Aeromonas punctata*)。该菌对青霉素、新生霉素、磺胺嘧啶不敏感,而对呋喃唑酮、土霉素、氯霉素、合霉素和金霉素等敏感。

1979年7月上旬,广东省潮安县鱼苗新场5号鱼池养殖的鳗鲡在选别过池时,部分鱼体因受伤而感染,10天内死亡近400尾,约40公斤(占总放养量的5%)。病鱼主要症状是尾鳍和尾柄肌肉充血或溃烂,所以称为烂尾病。少数病鱼的嘴部和躯干部充血或糜烂,还有少数病鱼的肾脏、肝脏出现炎症。

以前若林久嗣等^[3,4]报道过柱状屈挠杆菌(*Flexibacter columnaris*)引起鳗鲡的烂尾病。这次用显微镜检查病灶部位时未发现有屈挠杆菌而是一种短杆菌。我们分离出这种菌,并且观察和研究了该菌的生物学、生理生化特性,鉴定为点状产气单胞杆菌(*Aeromonas punctata*),现将结果报告如下:

材料和方法

一、分离方法 分离时采用 TYE 培养基。成份如下:胰胨1%,酵母膏0.5%,食盐0.5%,琼脂1.8%,pH调至7.2—7.4(液体不加琼脂)。

用接种环在患病鱼病灶的边缘刮取少量组织在平板上划线分离,于28℃左右培养24小时后在平板上出现的菌落形态基本一致。挑取单个菌落,转接斜面供人工感染及鉴定用。

二、人工感染 材料鱼取自该场养殖的健康鳗种,体重10克左右,体长20厘米左右。

注射感染: 每尾背部肌肉注射,28℃培养18—20小时,湿菌重0.1毫克(2毫克/毫升 ×

0.05毫升),注射后养在试验缸内。用同样方法注射同样剂量的死菌作对照。

浸泡感染: 用镊子刮去尾部粘液,造成轻度损伤,然后分成两部分:一部分在每毫升9亿的菌液中浸泡30分钟后再养在清水中,另一部分直接养在清水中作对照。

三、形态学、生物学、生物化学特性的观察

采用 TYE 培养基于28℃培养24小时观察菌落菌体形态,用一般鞭毛染色法观察鞭毛的情况。

生长条件:

温度: 每支试管液体培养基中接种一铂金铈培养24小时的菌液,分别在4—45℃培养48小时后观察有无菌落生长及生长程度。

盐分: 在分别含有百分之0, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 7.0, 10盐分的培养基中,每支试管接种培养24小时菌液一铂金铈,28℃培养后观察有无生长及生长程度。

pH 值: 在 pH 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, ……的液体培养基中,分别接种培养24小时的菌液一铂金铈,观察有无生长及生长程度。

O—F 试验: 采用 Hugh—Leifson 方法。在好气和嫌气条件下培养,观察有无产酸产气。

细胞色素氧化酶: 用1%盐酸二甲基对苯二胺溶液和 α-萘酚酒精溶液试验进行检查。

吲哚试验: 接种于蛋白胨水中培养后,用

Kovacs 方法检查。

美红试验: 接种在葡萄糖蛋白胨水中, 培养 2—4 天, 用美红试剂检查。

乙酰甲基甲醇试验: 用 Voges—Proskauer 方法。

H₂S 试验: 用醋酸铅培养基。

利用柠檬酸盐: 用柯萨尔柠檬酸盐培养基。

抗菌素抑菌试验: 用试管稀释法。先把药物溶解在相应的溶液中, 然后再稀释到培养基中。

步骤与结果

一、病原菌的分离

先后从烂尾病病灶分离到 7 株菌, 经人工感染后证实, 有 ET-2-1, ET-2-2, ET-3-1, ET-5-1, 4 株菌有毒力。

二、人工感染

把分离到的 4 株菌分别定量注射到鱼体, 结果如表 1。鱼体注射部位充血、腐烂, 鳍充血, 最后死亡。后来我们把健康的鳊鱼分别放在这 4 株菌的每毫升含 9 亿的菌液中浸泡 30 分钟, 使之感染, 但未获得成功。为此, 我们用镊子刮去鳊鱼尾部的粘液, 人为地造成轻度损伤, 然后再放入同样浓度的菌液中浸泡感染 30 分钟, 感染获得成功; 被感染的症状与自然发病症状相类似(见表 2)。并从人工注射感染的鳊鱼肾脏分离到 ET-2-1a, 该菌的特性与 ET-2-1

表 1 背部肌肉注射人工感染鳊鱼

菌号	水温 °C	发病尾数*/试验尾数	发病率	症状记录
ET-2-1	27—28	5/5	100%	22小时内死亡 4 尾, 注射部位充血腐烂, 鳍条充血, 其中一尾的腹部、下腭、口腔、肝脏均发炎。
ET-2-2	27—28	2/5	40%	21小时后死亡 2 尾, 注射部位充血, 鳍条充血。
ET-2-3	27—28	0/5	0	鱼正常
对照	27—28	0/5	0	鱼正常
ET-2-1	27—29	8/10	80%	死亡 5 尾, 注射部位肌肉腐烂。3 尾感染后转为慢性, 注射部位红肿隆起。
ET-2-1a**	27—29	10/10	100%	死亡 9 尾, 注射部位肌肉腐烂, 1 尾转为慢性炎症。
对照	27—29	0/10	0	鱼正常
ET-3-2	29	4/5	80%	死亡 4 尾, 注射肌肉腐烂, 1 尾无症状。
ET-5-1	29	2/4	50%	死亡 1 尾, 存活 3 尾中 1 尾有症状。
对照	29	0/5	0	鱼正常

* 发病数包括有明显症状的死亡数和未死亡数。

** 是从 ET-2-1 感染发病的鳊鱼肾脏中重新分离到的菌株。

完全一致。这说明该菌大量侵入肌肉深层后, 虽然病症表现在局部, 但是病菌可侵入内脏。在人工感染过程中, 也发现有少数个体虽然也出现病症, 注射部位红肿、隆起, 但并未死亡, 可慢

慢自愈。在自然感染和浸泡感染病鳊中, 一般从内脏分离不到致病菌。

三、菌株的生物学和生理生化特性

我们先后从烂尾病病灶分离到 7 株菌, 经

表2 损伤浸泡感染试验*

菌号	水温℃	发病尾数 试验尾数	感染率 (%)	感染症状
ET-2-1	28—32	3/5	60	病鳃尾部充血、腐烂
ET-5-1	28—32	3/4	75	病鳃尾部充血、腐烂
ET-2-1a	28—32	3/5	60	病鳃尾部充血、腐烂
对照	28—32	0/5	0	正常
ET-2-1	29—31	5/5	100	病鳃尾部充血腐烂
ET-3-2	29—31	5/5	100	病鳃尾部充血腐烂
ET-5-1	29—31	2/5	40	病鳃尾部充血腐烂
ET-2-10	29—31	5/5	100	病鳃尾部充血腐烂
对照	29—31	2/5	40	病鳃尾部充血腐烂
ET-2-1	29	5/5	100	病鳃尾部充血腐烂
ET-3-2	29	4/5	80	病鳃尾部充血腐烂
ET-5-1	29	2/5	40	病鳃尾部充血腐烂
对照	29	0/5	0	正常

* 将尾部损伤的鳊鱼放入每毫升含菌9亿的菌液中,浸泡感染30分钟,然后移入清水中饲养,部分尾部损伤鳊鱼直接移入清水饲养作为对照。

人工感染后,对其中有毒力的4株菌 ET-2-1, ET-2-2, ET-3-1, ET-5-1 的特性进行了详细观察,结果这四株菌的特性完全一致,获得纯培养。现以 ET-2-1 为代表将其特性叙述如下:

菌体杆状、两端钝圆,单个或数个联在一起,革兰氏阴性,有动力,极端单鞭毛。菌体大小 $1.2-1.3 \times 0.6-0.8 \mu$ 。

在 TYE 琼脂平板上菌落圆形,表面光滑,边缘整齐,突出,乳白色。28℃ 培养 24 小时菌落直径 2mm 左右,不产生色素。琼脂穿刺:呈钉子形,生长良好,均匀混浊,有少许沉淀,表面有菌膜,易脆。

马铃薯:生长中等,菌台为淡银灰色。

菌体在 5—42℃ 均能生长,43℃ 不生长,适宜温度 25—37℃;在含 0—3% 食盐的培养基中生长发育良好,在 4% 食盐中不能生长;在 pH 5.5—10 的范围内生长, pH 5 以下和 10.5 以上不生长,适宜 pH 6—9.5。

糖发酵试验:发酵型,产气。利用葡萄糖、麦芽糖、甘露糖、甘露醇、半乳糖、淀粉、糊精、甘油产酸产气。乳糖、马皮苷、左阿糖中产酸不产气。不发酵木糖、鼠李糖、棉子糖、水杨苷、卫茅糖。

吲哚试验阳性,美红试验阴性。V—P 试验阴性,不还原硝酸盐,蛋白胨水产氨,不分解尿素,石蕊牛乳中产酸胨化,第四天后产碱,氧化酶阳性,过氧化氢酶阳性,精氨酸脱羧阳性,赖氨酸和鸟氨酸脱羧阴性。

兔血琼脂: B 溶血。

药物敏感试验结果表明,该菌对青霉素、新生霉素和磺胺噻唑不敏感。对呋喃唑酮、氯霉素、土霉素、合霉素、金霉素等敏感。我们曾用 0.5 ppm 浓度的呋喃唑酮进行过一次大池治疗试验,效果良好。

根据以上特性与 Conroy (1964)^[9], 徐伯亥等氏(1980)^[2] 文献中所叙述的相比较,基本一致,该菌应属于 *Aeromonas punctata* (点状产气单胞杆菌)。

讨 论

一、分类位置 根据 Bergey's Manual 第八版记载^[8], *Aeromonas* 属列有三种,即 *A. hydrophila*, *A. punctata* 和 *A. salmonicida*, 其中 *A. salmonicida* 是不运动的,产生褐色色素,37℃ 不生长,与另外两个种显然不同。但是, *A. hydrophila* 与 *A. punctata* 的特性相差不大,亚种仅 2,3-丁二醇脱氢酶有明显不同, *A. hydrophila* 各亚种均为阳性, *A. punctata* 均为阴性。

McCarthy (1973)^[10] 曾对 *Aeromonas* 属 90 多个菌株 (*A. salmonicida* 除外)进行了详细的研究和比较,提出了新的见解。认为 *A. punctata* 是个正确的名称,而 *A. formicans*, *A. liquefacies* 和 *A. hydrophila* 是同物异名。根据优先律也应如此。我们分离得到的鳊鱼烂尾病原菌的特性基本上符合 *A. punctata* subsp. *punctata*。

Conroy 氏 (1964)^[9] 从金鱼烂尾病中分离得到 *A. punctata* subsp. *caviae*, 徐伯亥等 (1980)^[2] 从鲢鳊打印病中分离到 ST-78-3-3, 王德铭 (1963)^[11] 曾从泥鳅的腐皮病中分离到一种菌(后来定名为 *Bacterium misgurnum*), 现将这几种菌的主要特性列表比较见表 3。

表3 几个菌株特性的比较

特性	ET-2-1	<i>A. punctata</i> subsp. <i>caviae</i>	ST-78-3-3	<i>B. misgurnum</i>
明胶穿刺	液化	液化	液化	不液化
利用柠檬酸盐	+	-	+	-
吲哚反映	+	+	+	-
发酵葡萄糖	产酸产气	产酸	产酸产气	-
发酵麦芽糖	产酸产气	产酸	产酸产气	-
乳糖	微产酸	-	产酸产气	-
蔗糖	产酸产气	产酸	产酸产气	-
甘露糖	产酸产气	产酸	产酸产气	-
水杨甙	-	-	-	+
鼠李糖	-	-	-	-
卫茅糖	-	-	-	-
产生乙酰甲基甲醇	-	-	+	-
水解淀粉	+	+	+	+
产生胞胞素氧化酶	+	+	+	+
运动	运动	运动	运动	无运动

从表3看出 ET-2-1 与 ST-78-3-3 菌株的特性基本一致。与 *A. punctata* subsp. *caviae* 不同的是: ①利用柠檬酸盐, Conroy 的菌株为阴性, ET-2-1 为阳性。根据 Pivnick, H. 和 L. R. Sabina 报道 (1957)^[11], *A. formicans* 中不仅菌株之间, 甚至同一菌株在不同时间对柠檬酸盐的利用也有差别, 这一特性极不稳定。② Conroy 菌株发酵葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、甘露醇时只产酸, 而 ET-2-1 产酸产气, 前者不发酵乳糖, 后者微发酵, 这样看来这两种菌的差别主要是产气不产气的问题, 这正是 *A. punctata* subsp. *punctata* 和 *A. punctata* subsp. *caviae* 两亚种的区别。 *B. misgurnum* 菌引起的病与此虽然相似, 但是两者的特性相差甚大, 是两种不同的病原菌。

二、人工感染问题 用菌液浸洗的方法不能使健康的鱼体感染发病, 而必须刮掉粘液造成轻度的损伤, 这是人工感染中经常碰到的问题, 值得深究而未解决的问题。 作者认为这可能是: ① 鱼体体表存在大量的粘液, 这些粘液除有机屏障作用外, 还有其自净作用。据报道^[2], 鱼类的粘液成份相类似, 主要由多糖和蛋白质组成, 其中包含着大量的溶菌和杀菌物质,

具有较强的非特异性免疫功能, 可以杀灭病原体。(2) 体表粘液中含有多种特异性抗体, 这些抗体是由体内分泌到粘液中去的, 粘液本身也具有特异性免疫功能。因此, 粘液作为抵抗病原体的天然屏障是非常有效的。 有人试验过, 如果不断地把泥鳅体表的粘液擦干净, 那么泥鳅在一昼夜内就会死亡^[6]。充分说明粘液的保护作用。(3) 鱼类生活在水环境中, 水环境中的细菌数量尽管变化很大, 但各种细菌“相”的比例变动不大, 它们形成了一个正常的微生物丛^[7]。也就是说鱼体体表有一个特定的微生物生态体系, 保持着生态平衡, 使病原体难以找到入侵的良机。

由于这些原因, 鱼类对细菌有很强的免疫能力, 一些鱼类致病菌只有当皮肤受到损伤或由于寄生虫等寄生而造成病菌的侵入条件, 或者鱼体受到病毒感染时, 才会引起病害。 即所谓的条件致病菌。

参 考 文 献

- [1] 王德铭 1963 泥鳅鳃病致病细菌的研究 水生生物学集刊 3: 47-53.
- [2] 徐伯文等 1980 陆鳞鱼打印病致病菌的研究 海洋与湖泊 11(1): 85-93.
- [3] 若林久嗣等 1970 养殖ウナギの *Chondrococcus columnaris* 感染症に関する研究——I 日本水産学会誌 36(2): 147-154.
- [4] 日本水産庁 1974 疫病診断指針 1 54 页.
- [5] 榎本則行等 1961 鱼体表面の粘液物質に関する研究——IV, V, VI. 日本水産学会誌 27(6): 606-616.
- [6] 绿書房編 1972 魚の病気及治療 第四版 25 页.
- [7] 若林久嗣等 1976 養鰻環境における疫病細菌の生態に関する研究——I 疫病研究 11(2): 63.
- [8] Buchanan, R. E. & N. E. Gibbons, 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 345-348.
- [9] Conroy, D. A., 1964. Tail rot in fish. *Nature*, 201 (4920): 732-733.
- [10] McCarthy, D. H., 1973. *Fish Disease Technical Reports No. 1*, Fish Disease Laboratories, Weymouth England.
- [11] Pivnick, H. and L. R. Sabina, 1957. Studies of *Aeromonas formicans* Crawford comb. nov. from soluble oil emulsions. *J. Bacteriol.* 73(2): 247-252.