

白暨豚腐皮病致病细菌的初步研究

徐伯亥 熊木林

(中国科学院水生生物研究所)

提 要

对白暨豚腐皮病致病细菌的分离、培养、毒力试验和详细的生理生化测定,初步确定 I 型荧光极毛杆菌为其病原菌。又对该细菌进行了药物抑菌试验,筛选出几种较为有效的药物。

白暨豚 (*Lipotes vexillifer* Miller) 是一种淡水豚类,它主要分布于长江中下游的干流中^[3],为现存的一种珍稀动物。把白暨豚从比较开阔的长江转移到水泥池中,进行人工饲养,要能适应水温变化大,溶氧较低和无显著流速等生活环境,保证平安无事,是比较困难的。由于这些生态环境发生了变化,破坏了长期以来它所适应的水体环境的平衡关系,便对白暨豚的健康起着不利影响。在中国科学院水生生物研究所内水泥池中饲养的白暨豚,在人工饲养条件下,患有一种细菌性疾病——腐皮病。此病在每年的秋、冬两季,特别是在水温较低的冬季,经常发病。发病时,患处皮肤腐烂,掺杂着斑点或块状病灶,大小不一,形态各异,从头部吻端直至尾部,以及各鳍上都有发现。

有关白暨豚腐皮病致病细菌的研究,至今尚未见过报道。作者曾在倪达书教授的指导下,在水生所白暨豚研究组的同志大力协助下,于1981年3月6日和1982年1月2日,先后两次对白暨豚腐皮病的致病细菌进行了分离、培养、致病性和分类鉴定研究,初步确定 I 型荧光极毛杆菌 (*Pseudomonas fluorescens* biotype I) 为其病原菌。

材 料 与 方 法

(一) 材料来源 两年来,我们用3种培养基,直接从白暨豚体表病灶处,进行了两次细菌分离,共获得24株细菌。毒力试验用的健康材料鱼,取自本所鱼池;小白鼠购自武汉市职业病防治所。标准菌株1.33和1.55来自中国科学院微生物研究所;荧光极毛杆菌的抗血清由美国东方鱼病研究室赠送。

(二) 分离方法 分离时使用的3种培养基:

1. 普通营养琼脂: 成份中的蛋白胨为多肽(日本产);琼脂为琼脂粉,日本进口分装。
2. 酪蛋白(casein)培养基: 酪蛋白15克(德国产),多肽5克,NaCl 5克,琼脂粉15克,蒸馏水1,000毫升, pH7.2—7.4, 蒸气灭菌15磅30分钟。
3. 粘细菌培养基: 胰蛋白胨(tryptone, 英国产),酵母膏0.5克,牛肉膏0.2克,醋酸钠0.2克,琼脂粉15克,蒸馏水1,000毫升, pH7.2—7.4, 高压蒸气灭菌15磅30分钟。

分离时,直接从病灶处取菌,在上述平板培养基上划线,置 28℃ (以下若无说明,一般均采用此培养温度)培养 1—3 天,挑取单个菌落,分纯接种到斜面培养基上,经 18—24 小时培养后,吸入 0.85% 无菌生理盐水,做成菌悬液,保存于 4℃ 冰箱中备用。或冷冻真空干燥保存,做实验时再从冷冻管中取出。

(三) 毒力试验方法 由于这是一种体表病,所以采用的方法与《鲢、鳙鱼打印病致病细菌的研究》一文中所叙述的方法相同^[4]。

(四) 试剂的制备和应用 除《鲢、鳙鱼的打印病致病细菌的研究》^[4]一文中所述及者外,根据其致病菌的特性不同,尚有下列增补:

1. 糖类发酵试验^[9]: 采用软琼脂穿刺法。穿刺前仔细检查有无溶解于培养基中的空气,或将琼脂煮沸后,待重新凝固后使用。用的是 Hugh & Leifson 培养基。

2. 蛋黄反应试验^[7]: 无菌条件下取卵黄加等量的生理盐水,摇匀后,取 5 毫升上述悬液加入到融化的、约 50—55℃ 的 100 毫升肉汁胨琼脂中,混合均匀后倒入培养皿内。过夜后,采用点种的方法接种。培养 18—24 小时观察结果。

3. 精氨酸双水解酶试验 (arginine dihydrolase): 培养基为蛋白胨 0.1%, NaCl 0.5%, K_2HPO_4 0.03%, 琼脂 0.3 克, 0.4% 酚红溶液 0.25 毫升, L-精氨酸 HCl 1 克(上海产), 蒸馏水 100 毫升, pH7.2。30℃ 培养观察至 7 天。

4. 脱氮作用试验^[10]: 培养基为普通牛肉汁胨培养液 100 毫升, KNO_3 1 克。接种后加液体石蜡隔绝空气, 同时以封蜡的不含 KNO_3 的培养基做对照。培养 1—7 天, 观察含有 KNO_3 的培养基中是否有生长和是否产生气泡。

5. 脓青素 (pyocyanin) 的测定方法^[2]: 培养基为 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2%, K_2HPO_4 0.04%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001%, 甘油 1%, 蛋白胨 2%, 蒸馏水 100 毫升。接种于 37℃ 培养。培养 2—3 天后, 用三氯甲烷和 1N 硫酸测定脓青素。

6. 果聚糖的产生 (levan production): 培养基为营养琼脂加 2—4% 蔗糖 (广州化学试剂厂, 分析纯)。在此培养基上, 以粘液状菌落的出现为果聚糖产生阳性。

7. 弧菌抑制剂 (O/129) 的敏感试验: 弧菌抑制剂由日本江草周三教授赠送, 为吸入 O/129 的滤纸片。

8. 荧光色素的产生: 用 King 等人的 B 种培养基^[2], 其中的蛋白胨为多胨 (日本), 以斜面培养基接种细菌, 在 28℃ 培养 24—28 小时, 观察结果。

(五) 药物试验方法 细菌对抗菌素的敏感试验。抗菌素原液配制: 青霉素为每毫升含 100 单位; 链霉素、金霉素、氯霉素和土霉素的配制每毫升含 1,000 微克。原液置 4℃ 冰箱中保存, 一周内用完, 超过一周则重新配制。二倍稀释抗菌素, 每管加 18 小时培养物 (McF. 3) 0.1 毫升, 培养 18 小时后, 记录结果。

步骤与结果

(一) 毒力试验 经分纯后的细菌, 接种到斜面培养基中, 置 28℃ 培养 18 小时后, 用 0.85% 无菌生理盐水洗下, 稀释成 3 号 (McF. 3) 的浓度 (每毫升水中相当于 9 亿菌), 用 0.3—0.5 毫升从腹腔注入鱼体, 进行初步筛选。表现有毒力的菌株则进一步进行浸泡和

涂抹试验。经试验后,发现大部分菌株都有一定毒力,而 W81-11 菌株毒力较强,故对此菌进一步进行了人工感染试验(表 1)。从表 1 可以看到:被用作人工感染试验的草鱼、鲢鱼、鳙鱼、罗汉鱼、鲫鱼等均可获得感染。水温 13—35℃ 时都可发病,所产生的症状在温度较低时,比温度高时要明显;在同样温度下,浸泡感染的症状要比涂抹感染的明显;水温超过 30℃ 时,感染后症状很快消失。

用同样方法对小白鼠的感染,均未获得阳性结果。可能是因为这种细菌本身在 37℃ 时生长就很微弱,而小白鼠的体温则为 37.5—38℃,因此不易感染。

(二) 细菌形态、培养特性及生理生化测定 经人工感染试验表明,有毒力的菌株,大多为氧化葡萄糖的类型,其中产生荧光色素的占 50% 以上。在这里我们以 1981 年所分离到的 W81-11 和 1982 年分离到的 W82-16 两株菌为代表,描述如下:

细菌形态:短杆状,中轴直行,在指数生长期时其大小为 $0.4-0.5 \times 0.9-2.6$ 微米,两侧弧形,两端圆形、单个或成对排列;有运动力,极生 3—5 根鞭毛(图 1);无芽孢;菌体染色均匀,革兰氏染色阴性。

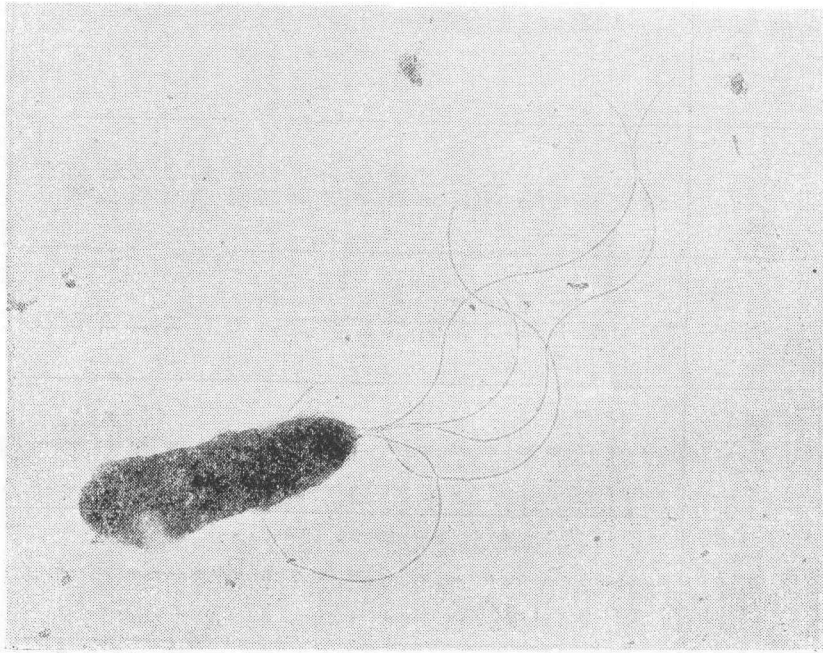


图 1 W81-11 菌的鞭毛($\times 16,700$)

Fig. 1 The flagella of W81-11 strain ($\times 16,700$)

琼脂平板菌落:圆形,直径 1—1.5 毫米左右,培养 48 小时后增至 3—4 毫米,表面光滑,湿润,微凸,边缘整齐,灰白色,半透明,奶油状,易乳化。

琼脂斜面培养:生长丰盛,线形,扁平高起,表面光滑、湿润,边缘整齐,灰白色,有时可见黄绿色荧光色素,弥漫整个斜面。在 King 等的 B 种培养基上培养,24 小时即产生扩散的黄绿色荧光色素。

琼脂穿刺:生长中等,沿穿刺线生长到底,表面生长丰盛。

明胶穿刺:层面形液化。

表 2 荧光极毛杆菌、恶臭极毛杆菌和 W81-11 等菌之间性状比较

Tab. 2 Comparison of characterics between *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* and W81-11 strain

特 性	荧光 极毛杆菌	恶 臭 极毛杆菌	W81-11	W82-16	1.33	1.55
明胶液化	+	—	+	+	+	+
蛋黄反应	+	—	+	+	+	+
海藻糖利用	+	—	+	+	+	+
肌醇利用	+	—	+	+	+	+
肌酸利用	—	+	—	—	—	—
马尿酸盐利用	—	+	—	—	—	—

表 3 荧光极毛杆菌、铜绿极毛杆菌和 W81-11 等菌之间性状比较

Tab. 3 Comparison of properties between *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* and W81-11 strain

特 性	荧光极毛杆菌	铜绿极毛杆菌	W81-11	W82-16	1.33	1.55
鞭毛	>1	1	>1	>1	>1	>1
产绿脓素	—	+	—	—	—	—
4℃生长	+	—	+	+	+	+
41℃生长	—	+	—	—	—	—
蛋黄反应	+	—	+	+	+	+
产生果聚糖	+	—	+	+	+	+
海藻糖	+	—	+	+	+	+
肌醇	+	—	+	+	+	+

肉汤培养: 生长丰盛, 均匀浑浊, 有菌膜, 摇之即散, 管里有少许沉淀, 有时产生色素。

葡萄糖的氧化发酵测定: 弱氧化产酸, 不产气。

碳水化合物利用: 从葡萄糖、半乳糖、鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、乳糖、水杨苷、丙三醇、肌醇、海藻糖、纤维二糖、左旋糖、麦芽糖、侧金盏花醇、山梨醇、蔗糖产酸不产气。其中乳糖、蔗糖、侧金盏花醇利用微弱; 不能利用棉子糖、赤鲜糖醇、阿糖醇、淀粉、糊精、卫矛醇、七叶灵、糖原、丙二醇和乙醇。

氧化酶和细胞色素氧化酶试验: 阳性; 过氧化氢酶试验: 阳性; 精氨酸双水解酶测定: 阳性, 产生果聚糖; 脱氮作用试验: W81-11 阳性; W82-16 阴性; 蛋黄反应试验: 阳性; 赖氨酸脱羧酶试验: 阴性; 柠檬酸盐试验: 阳性; 丙二酸盐试验: 阳性; 美红试验: 阴性; 乙醯基甲基甲醇试验: 阴性; 精氨酸、缬氨酸、丙氨酸: 阳性; 靛基质试验: 阴性; 尿素分解试验: 阴性; 葡萄糖酸盐试验: 阳性; 丙酸: 阴性; 丁酸: 阴性, 还原硝酸盐至亚硝酸盐; 甘氨酸: 阳性; 淀粉水解试验: 阴性; 蛋白胨水中产生氨; 石蕊牛乳中产碱, 蛋白胨化, 变清; 淀粉水解试验: 阴性。

pH5—10.5 中均能生长, pH 3 以下、11 以上均不生长。

适宜温度 20—25℃, 4℃ 生长, 41℃ 不生长, 37℃ 生长微弱。

表 4 试管中抗菌素等药物抑制 W81-11 菌试验
Tab. 4 The test of antibiotics and other medicines inhibiting W81-11 strain in test tube

浓度 (单位) 名称	500	250	125	100	62.5	50	31.25	25	15.625	12.5	10	6.25	3.12	1.98	1.56	0.99	0.78	0.39	0.19	0.10	0.05	0.025
新生霉素	+	+	+	+	+																	
青霉素	+	+	+	+	+																	
红霉素	-	-	-	-	-																	
四环素	-	-	-	-	-																	
氯霉素	-	-	-	-	-																	
强力霉素	-	-	-	-	-																	
卡那霉素	-	-	-	-	-																	
链霉素	-	-	-	-	-																	
土霉素	-	-	-	-	-																	
金霉素	-	-	-	-	-																	
合霉素	-	-	-	-	-																	
呋喃唑酮	+	+	+	+	+																	

“+” 生长; “-” 未生长

此菌与 Stanier 等^[17] 所提出的荧光群中的 3 个成员——荧光极毛杆菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、恶臭极毛杆菌 (*Pseudomonas putida*) 和铜绿极毛杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 以及与 1.33 和 1.55 等菌株的性状比较(表 2, 3), W81-11 和 W82-16 两菌株与荧光极毛杆菌所记录的性状, 以及与标准菌株 1.33, 1.55 两菌株的性状相一致。

这种细菌与美国东方鱼病研究室的荧光极毛杆菌的抗血清, 所进行的血清学反应为阳性, 产生凝集。

根据以上特性, 与 Buchanan 和 Gibbons^[6] 的《Bergey's 细菌鉴定手册》(第八版) 中所描述的, 以及 Stanier^[17]、Breed 等^[5]、Rhodes^[14, 15]、Park^[13]、Hendrie 和 Shewan^[8] 等文献中所述比较, 相似于 I 型荧光极毛杆菌 (*Pseudomonas fluorescens* biotype I), 相当于 A 型 (Stanier et al., 1966)。

(三) 药物筛选试验 考虑到白鲟豚是一种珍稀动物, 用抗菌素来治疗该病较为合适。因此在药物筛选上, 均以抗菌素为对象, 结果表明(表 4): 四环素族的四环素、氯霉素、土霉素和金霉素等广谱抗菌素, 对此菌都有较强的抑制能力。其中以金霉素最佳, 在每毫升水中含有 0.05 微克的金霉素, 就能抑制这种病菌生长。

讨论和结束语

1. 两年来, 从白鲟豚腐皮病的病灶处所分离到的细菌, 经生理、生化特性测定多半属于荧光极毛杆菌, 大多具有一定毒力, 其中尤以 1981 年所分离到的 W81-11 和 1982 年所分离到的 W82-16 两株毒力最强, 性状相似。本文以它们为代表的特性描述, 相当于 I 型荧光极毛杆菌的特征, 所以我们初步认为 I 型荧光极毛杆菌是白鲟豚腐皮病的一种病原菌。

2. 荧光极毛杆菌是极毛杆菌属中具有代表性的鱼类致病菌, 它广泛存在于海水和淡水中, 在一定条件下可使养殖鱼类和野生鱼类致病^[1, 11, 12, 16, 18]。白鲟豚在人工饲养状况下, 体表感染的发生, 可能是由于不适应生态环境条件所发生的变化; 或是由于某些原因使体表受伤: 如寄生虫咬伤、碰伤、擦伤, 或太阳晒伤等, 此时细菌便趁机而入, 使其发病。

用这种荧光极毛杆菌, 对鱼体的人工感染试验表明: 就鱼的种类来看, 不论草鱼、鲢鱼、鳙鱼、鲤鱼、鲫鱼、罗汉鱼等均可被感染; 从感染方法来说, 无论是浸泡、注射、涂抹, 均可使鱼发病, 产生与白鲟豚所产生的相似的症状。但对小白鼠的感染, 不管是涂抹还是注射, 均不能感染。其原因可能是由于小白鼠体温为 37.5—38℃, 而该菌本身在 37℃ 时生长便很微弱, 白鲟豚虽是恒温动物, 但由于长期生活水中, 体表暴露于水, 受水的影响较大之故。

3. 荧光极毛杆菌所引起的白鲟豚腐皮病, 是一种体表疾病。对这种病的预防应与鱼类体表病一样: 网捕和搬运时要小心谨慎, 切勿损伤体表。平时要保持池水清新, 或每次换入经预先处理的新鲜水。发病后, 由于白鲟豚个体较大, 可采用金霉素、强力霉素以及其他四环素族的抗菌素, 用涂抹的方法进行治疗。

参 考 文 献

- [1] 王德铭, 1958. 鲢、青鱼烂鳃及赤皮病致病菌的研究. 水生生物学集刊, 1958: 9—25.
- [2] 中国科学院微生物研究所细菌分类组, 1978. 一般细菌常用鉴定方法, 科学出版社.
- [3] 陈佩薰、刘沛霖、刘仁俊、林克杰、G. 皮莱里, 1980. 长江中游(武汉—岳阳江段)豚类的分布、生态、行为和保护. 海洋与湖沼, 11(1): 73—84.
- [4] 徐伯亥、葛蕊芳、熊木林, 1980. 鲢鳙鱼的打印病致病细菌的研究. 海洋与湖沼, 11(1): 85—93.
- [5] Breed, R. S., Murray, S. G. D. and N. R. Smith, 1957. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 7th ed. Bailliere, Tindall and Cox, Ltd. London.
- [6] Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons (eds), 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8th ed. Williams and Wilkins, co. Baltimore.
- [7] Conn, H. J., 1957. *Manual of microbiological methods*. New York: McGraw-Hill p. 50.
- [8] Hendrie, M. S. and J. M. Shewan, 1979. The identification of *Pseudomonas*. In *Identification methods for microbiologists*. 2nd ed. London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco: Academic press.
- [9] Hugh, R. E. and E. Leifson, 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria *J. Bact.*, 60: 24—26.
- [10] Lizuka, H. and K. Komagata, 1963. An attempt at grouping of the genus *Pseudomonas*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 9: 73.
- [11] Li, M. F. and C. Flemming, 1967. A proteolytic *Pseudomonas* from skin lesion of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). I. Characteristics of the pathogenic effects and the extracellular proteinase. *Can. Jour. Microbiol.*, 13: 405—416.
- [12] Meyer, F. P. and J. D. Collar, 1964. Description and treatment of a *Pseudomonas* infection in white catfish. *Jour. Appl. Microbiol.*, 12(3): 201—203.
- [13] Park, R. W. A., 1962. A study of certain heterotrophic polarly flagellate water bacteria: *Aeromonas*, *Pseudomonas*, and *Comamonas*. *J. Gen. Microbiol.* 27: 121—134.
- [14] Rhodes, M. E., 1958. The cytology of *Pseudomonas* spp. as revealed by a silver-plating method. *J. Gen. Microbiol.*, 18: 639—648.
- [15] Rhodes, M. E., 1969. The characterization of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Gen. Microbiol.*, 21: 221—263.
- [16] Rucker, R. R., Earp, B. J. and E. J. Okdal, 1954. Infectious diseases of Pacific salmon. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 83: 297—312.
- [17] Stanier, R. Y., Palleroni, N. J. and M. Doudoroff, 1966. The aerobic *Pseudomonas*: a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.*, 43: 159—271.
- [18] Wolf, L. E., 1937. An air bladder disease in lake trout fingerlings. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 66: 359—363.

STUDIES ON THE PATHOGENIC BACTERIA OF THE "ROTTEN-SKIN" DISEASE OF CHINESE RIVER DOLPHIN (*LIPOTES VEXILLIFER*)

Xu Bohai and Xiong Mulin

(*Institute of Hydrobiology, Academia Sinica*)

Abstract

"Rotten-Skin" disease is a bacterial ailment of the Chinese River Dolphin (*Lipotes vexillifer*) which was captured and reared in a concrete pond. As the name signifies, rotten skin is characterized by the formation symptomatic of necrosis on the surface of the body.

The bacteria are short, straight, Gram-negative rods with rounded ends, measuring $0.4-0.5 \times 0.7-2.2$ microns. They occur singly or in pairs, and are actively motile by virtue of 3-5 polar flagella.

Cultures are capable of producing a yellow-green diffusible fluorescent pigment on the King B medium. Stratiform liquefaction of gelatin appears in 24 hrs (20°C). On the media containing 2-4% sucrose, colonies are slimy as a result of leaven formation. Litmus milk cultures become alkaline, peptonized and become clear.

Oxidative utilization on carbohydrates display in Hugh and Leifson's medium, e.g. producing weak acid but no gas. The same holds true in L-arabinose, xylose, galactose, lactose, salicin glycerol, mannitol, adonitol, inositol, sorbitol, cellobiose, and trehalose. Raffinose, sucrose, starch, propylene glycol, erythritol, dextrin, ethanol, aesculin, rhamnose, dulcitol and glycogen are not utilized.

The egg yolk, the oxidase reaction, saccharate, the arginine dihydrolase and the production of nitrites are positive. Tests with methyl-red and Voges-Proskauer reaction, and the formation of H_2S , are all negative. There is no capacity to denitrify. The optimal temperature for growth appears to be between $20-30^{\circ}\text{C}$. The strain will not grow at 41°C , but can grow at 4°C . Growth is weak at 37°C .

The healthy fishes were soaked or rubbed with 18-hr. culture, a symptom similar to that of the natural infection of the skin with *Pseudomonas fluorescens* was revealed. But the skin of white mice is unaffected by the bacteria. Although *Lipotes* is a homoiothermal animal, its skin is exposed to water, while the skin of white mice is in air and much warmer ($37.5-38^{\circ}\text{C}$).

According to above mentioned characters it fits well to the characteristics of *Pseudomonas fluorescens* Migula 1895, which was presented in Bergey's Manual 8th edition by Stanier. We consider that *Pseudomonas fluorescens* biotype I (biotype A of Stanier et al., 1966) is likely the causative agent for the "Rotten-Skin" disease of Chinese River Dolphin.

Key words: Chinese river dolphin (*Lipotes vexillifer* Miller), *Pseudomonas fluorescens*