

# 大肠埃希氏菌引起的虹鳟鱼病的初步研究

徐伯亥 李伟 葛蕊芳

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

马涛

(山西省虹鳟鱼试验场, 朔县 038501)

## 提 要

1988年, 山西省虹鳟鱼试验场的二龄虹鳟发生一种流行病, 病鱼典型症状为: 体色发黑, 鳃丝苍白或粉红, 肛门及有的鳍条充血, 内脏肠、肝、脾等充血和出血。

病原菌为革兰氏阴性, 杆状,  $0.9-1.2 \times 2.3-4.5 \mu\text{m}$ , 周鞭毛, 能运动, 周身还有菌毛 (Pili)。能还原硝酸盐为亚硝酸盐; 氧化酶阴性; 葡萄糖发酵并产气, 甲基红和靛基质试验阳性; V-P 试验阴性; 不产生尿素酶, 苯丙氨酸脱氨酶和硫化氢; 不利用丙二酸钠, 不液化明胶; 在 KCN 培养基和枸橼酸盐琼脂上不生长; 发酵蔗糖、麦芽糖、甘露醇、水杨苷、山梨醇、阿拉伯糖、棉子糖; 不发酵卫矛醇、侧金盏花醇、肌醇、乳糖, 纤维二糖、 $\alpha$ -甲基-D 葡萄糖苷; 微发酵木糖和鼠李糖; 赖氨酸脱羧酶和精氨酸双水解酶反应阳性; 鸟氨酸脱羧酶阴性; 该菌 DNA 中  $G+C$  mol % 为 51.04 (Tm)。

据上所述, 该菌属于大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 其特性和对鱼的致病性不同于以前所报道的肠杆菌科中的鱼类致病菌。

**关键词** 虹鳟、病原细菌, 大肠埃希氏菌, 动物流行病

作为鱼类病原菌, 肠杆菌科 (Enterobacteriaceae) 中, 已有详细描述的约 5 个种, 它们是美洲链爱德华氏菌 (*Edwardsiella ictaluri*), 迟纯爱德华氏菌 (*E. tarda*), 雷氏变形菌 (*Proteus rettgeri*) 和鲁克耶尔森氏菌 (*Yersinia ruckeri*) 及福建爱德华氏菌 (*E. fujianensis*)<sup>[1]</sup>。此外, 弗氏柠檬酸细菌 (*Citrobacter freundii*)、欧文氏菌 (*Erwinia sp*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 和粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)<sup>[1,2]</sup> 等也曾有过报道。但是, 埃希氏菌属 (*Escherichia*) 的细菌作为鱼类病原菌, 至今国内外尚未见过报道。

本文拟将所分离到的这一细菌的研究结果, 包括细菌形态特征、理化特性、生物学特性和遗传性状、以及药物筛选和治疗方法加以总结, 旨在探求防治措施和方法, 以防其再次爆发和流行。

\* 国家基金项目; 吴玉深、蔡桃珍参加部分工作; 电镜照片由本所胡强拍摄; 工作中得到山西省水利厅李振泉、连义明、谢占清及本所路景舒大力支持, 特致谢意。

1990年6月4日收到。

## 材料和方法

### (一) 材料来源

病原菌分离自山西省虹鳟鱼试验场发病虹鳟的肝、脾、肾。

### (二) 生理、生化特性测定

采用爱德华和爱文(Edwards & Ewing, 1972)的方法<sup>[3]</sup>。

### (三) 病原菌 DNA 中碱基成份的测定

采用热变性温度法<sup>[4,5]</sup>。

### (四) 熔解温度(Tm)的测定和 G+C mol% 的计算

依各温度和相对吸光度绘成 DNA 热变性曲线, 热变性曲线中点对应温度为 Tm 值, 将 Tm 值代入在 0.1 SSC 溶液中的公式:

$$G+C = (Tm - 53.9) \cdot 2.44 \text{ 计算。}$$

### (五) 药物筛选和治疗

采用二倍试管稀释法和药物拌饵投喂。

## 步骤和结果

经人工感染初筛后, 择其毒力最强的 RT 88-4-2(以下简称 88-4-2)菌株, 及其感染后重分离的菌株 R-1, R-2, R-3 作为代表进行下列各种试验。

表 1 RT 88-4-2 及其分离株对鱼体的人工感染试验

Tab. 1 Artificial infection of RT 88-4-2, R-1, R-2 and R-3 strains on fish

菌号 Bacterium	试验次数 Experi- mental No.	试验鱼 Test fish			平均水温 Average water temperature	感染剂量 Dose (McF, ml)	注射部位 Injecting position	死/活 Death/ survival	对照死/活 Death/ survival in control	症状 Symptom
		种类 Type	大小 Size (cm)	数量 Number						
RT 88-4-2	1	虹鳟鱼 Rainbow trout	3—4	13	14.2	3(0.05)	腹腔 Abdomen cavity	13/0	0/13	肛门, 肝, 肠等发炎 Anus, intestine, liver and spleen congestion
	2		3—4	10	13.1	3(0.05)		10/0	0/10	
	3		3—4	10	15.1	3(0.05)		9/1	0/10	
	4		4—5	10	15.4	3(0.10)		10/1	0/10	
	5		4—5	10	15.4	3(0.10)		9/1	0/10	
	6	丁鱥 Tinca	5—6	10	15.3	3(0.10)	肌肉 Muscle	10/0	0/10	肌肉及内脏发红 Muscle and viscera reddening
	7		5—6	10	16.5	3(0.10)		9/1	0/10	
	8		7—10	10	16.5	3(0.75)		9/1	0/10	
R-1	9	虹鳟鱼 Rainbow trout	4—5	10	16.1	3(0.10)	腹腔 Abdomen cavity	10/0	0/10	肛门, 肝, 肠等发炎 Anus, intestine, liver and spleen congestion
R-2	10		4—5	10	16.1	3(0.10)		8/2	0/10	
R-3	11		4—5	10	16.1	3(0.10)		10/0	0/10	

### (一)人工毒力试验

结果列于表1,从表中可见:88-4-2 及其重分离的 R-1、R-2、R-3 等菌株以 McF3 号管的浓度、每尾 0.05—0.1ml 的剂量(约含 5000 万左右活、死菌),可使虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)和丁鱥(*Tinca tinca*)发病(5 天之内死完),出现与天然发病时相似的症状。

### (二)细菌形态和培养特性

菌体直,杆状,大小为  $0.9—1.2 \times 2.3—4.5 \mu\text{m}$ ,革兰氏阴性,无芽胞,周鞭毛、能运动,有菌毛(Pili)(图 1);在普通培养基上生长良好;最适生长 pH 中性偏碱,pH 5.5 以下及 pH 10 以上不生长;4℃能生长,42℃不生长,65℃半小时可杀死。



图 1 RT 88-4-2 电镜照片( $\times 7000$ )

Fig. 1 Electron micrograph of RT 88-4-2 ( $\times 7000$ )

### (三)在三糖铁(TSI)琼脂和 Kligler 铁(KI)琼脂上的初步鉴别<sup>[3]</sup>。

结果见表2 和表3。从此两表可以看出。此菌在三糖铁(TSI)和 Kligler 铁琼脂培养基上的反应。相似于埃希氏菌属、志贺氏菌属和沙门氏菌属等属的反应。

表 2 三糖铁琼脂培养基中的反应

Tab. 2 Reaction of bacterial strains in the TSI agar medium

菌株 Strain	斜面 Slant		底层 Basilar layer		产气 Gas production		产硫化氢 H <sub>2</sub> S production	
	18—24 (h)	40—48 (h)	18—24 (h)	40—48 (h)	18—24 (h)	40—48 (h)	18—24 (h)	40—48 (h)
RT 88-4-2	K	K	A	A	+	+	-	-
R-1	K	K	A	A	+	+	-	-
R-2	K	K	A	A	+	+	-	-
R-3	K	K	A	A	+	+	-	-

A=酸性 Acid, K=碱性 Base

表 3 KI 铁琼脂中的反应

Tab. 3 Reaction of bacterial strains in the KI iron agar medium

菌株 Strains	斜面 Slant		底层 Basilar layer		产气 Gas production		产硫化氢 H <sub>2</sub> S production	
	18—24 (h)	40—48 (h)	18—24 (h)	40—48 (h)	18—24 (h)	40—48 (h)	18—24 (h)	40—48 (h)
RT 88-4-2	A	A	A	A	—	—	—	—
R-1	A	A	A	A	—	—	—	—
R-2	A	A	A	A	—	—	—	—
R-3	A	A	A	A	—	—	—	—

## (四) 细菌 DNA 中 G+C mol% 的测定

DNA 样品的纯度为  $260 \text{ nm} : 230 \text{ nm} : 280 \text{ nm} = 1.0 : 0.474 : 0.553$ , 基本符合天然 DNA 的  $260 \text{ nm} : 230 \text{ nm} : 280 \text{ nm} = 1.0 : 0.450 : 0.515$  的比例关系。其热变性曲线如图 2 所示。T<sub>m</sub> 值为 74.82。将 T<sub>m</sub> 值代入公式  $G+C = (74.82 - 53.9) \times 2.44$ , 得出  $G+C = 51.04 \text{ Mol\%}$ 。此结果与“伯杰氏系统细菌学手册第九版”中对埃希氏菌属, 志贺氏菌属和沙门氏菌属等相近属的描述相符<sup>[6,7]</sup>(表 4)。

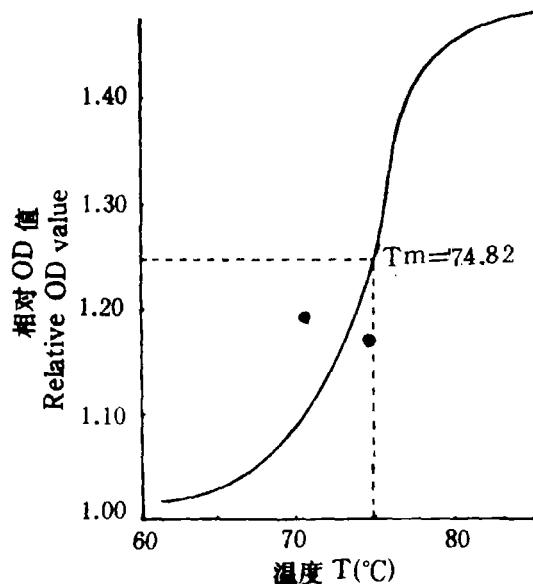


图 2 DNA 热变性曲线

Fig. 2 DNA heat-denaturation curve

## 表 4 RT 88-4-2 与肠杆菌科有关属 DNA 中 G+C Mol% 的比较

Tab. 4 Comparison of G+C Mol% in the DNA of 88-4-2 and other closely related genera

菌属 Genera	RT 88-4-2	埃希氏菌属 <i>Escherichia</i>	志贺氏菌属 <i>Shigella</i>	沙门氏菌属 <i>Salmonella</i>
G+C Mol%	51.04	48—52	49—53	50—53

表 5 88-4-2 菌株与肠杆菌科相近各属的生化特性比较

Tab. 5 Biochemical characteristics of the 88-4-2 strain and other closely related genera

菌属 Genera	88-4-2	艾希氏菌属 <i>Escherichia</i>	志贺氏菌属 <i>Shigella</i>	沙门氏菌属 <i>Salmonella</i>
动力 Motility	+	+/-	-	+
苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase	-	-	-	-
VP	-	-	-	-
靛基质 Indole	+	+	+/-	-
H <sub>2</sub> S	-	-	-	+
枸橼酸盐 Citrate	-	-	-	+
明胶 Gelatin	-	-	-	+/-
尿素酶 Urease	-	-	-	-
KCN	-	-	-	-
葡萄糖 Glucose	+	+	+	+
阿拉伯糖 Arabinose	+	+	d	+
鼠李糖 Rhamnose	w	d	d	+
木糖 Xylose	w	+	d	+
麦芽糖 Maltose	+	+	d	+
乳糖 Lactose	-	+	-	d
蔗糖 Sucrose	+	d	-	-
棉子糖 Raffinose	+	d	d	-
甘露醇 Mannitol	+	+	d	+
山梨醇 Sorbitol	+	+	d	+
卫矛醇 Dulcitol	-	d	d	d
侧金盏花醇 Adonitol	-	-	-	-
肌醇 Inositol	-	-	-	d
水杨苷 Salicin	+	d	-	-
葡萄糖胺 Glycosamine	+	+	-	-
醋酸钠 Acetate	+	+	-	-
赖氨酸 Lysine	+	+	-	-

注:“+/-”大多数菌株阳性,少数阴性,Most strains positive, but a small number negative; “d”反应不同, different reactions; “w”弱反应 weak reaction.

表 6 88-4-2、R-1、R-2、R-3 菌株和大肠艾希氏菌生理生化特性的比较

Tab. 6 Comparision of physiological and biochemical characteristics  
of strains 88-4-2, R-1, R-2 and R-3 and *Escherichia coli*

性状 Characteristic	88-4-2 R-1 R-2 R-3 希氏菌 <i>E. coli</i>	性状 Characteristic	88-4-2 R-1 R-2 R-3 希氏菌 <i>E. coli</i>
靛基质 Indole production	++ + + +	卫矛醇 Dulcitol	- - - - d
甲基红 Methyl red	++ + + +	水杨苷 Salicin	++ + + d
VP Voges-Proskauer	- - - - -	侧金盏花醇 D-Adonitol	- - - - -
枸橼酸盐 Citrate, Simmons	- - - - -	肌醇 Myo-Inositol	- - - - -
硫化氢 Hydrogen sulide	- - - - -	山梨醇 D-Sorbitol	++ + + +
尿素酶 Urease	- - - - -	阿拉伯糖 L-Arabinose	++ + + +
苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase	- - - - -	棉子糖 Raffinose	++ + + d
賴氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	++ + + (+)	鼠李糖 L-Rhamnose	w w w w (+)
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	++ + + (-)	麦芽糖 Maltose	++ + + +
动力 Motility	++ + + (+)	木糖 D-Xylose	w w w w +
水解明胶 Gelatin liquefaction(22℃)	- - - - -	海藻糖 Trehalose	++ + + +
氯化钾 KCN, growth in	- - - - -	纤维二糖 Celloolose	- - - - -
利用丙二酸盐 Malonate utilization	- - - - -	α-甲基-D葡萄糖苷 α-Methyl-D-Glucoside	- - - + -
葡萄糖产酸 D-Glucose, acid production	++ + + +	阿拉伯醇 D-Arabinol	- - - - -
葡萄糖产气 D-Glucose, gas production	++ + + +	脱氧核糖核酸酶 Deoxyribonuclease	- - - - -
乳糖 Lactose	- - - - +	硝酸盐还原 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	++ + + +
蔗糖 Sucrose	++ + + d	氧化酶 Oxidase	- - - - -
甘露醇 D-Mannitol	++ + + +	β-半乳糖苷酶 ONPG	++ + + +
甘露糖 D-Mannose	++ + + +	黄色色素 Yellow pigment	- - - - -

注: "w"弱阳性反应, Weakly positive reaction; "+"阳性反应, Positive reaction; "-"阴性反应, Negative reaction; "(+)"76—89%阳性, 76—89% positive; "(-)"11—25%阳性, 11—25% positive.

### (五)与相近各属理化特性的比较

结果见表 5, 由此表可见: 此菌理化特性相似于埃希氏菌属。

### (六)生理生化性状的种间比较<sup>[7]</sup>

结果列于表 6,从表中可以看出:①无论是原分离株 88-4-2,还是重分离株 R-1,R-2,R-3,它们的生理、生化性状都一致,并与大肠埃希氏菌(*E. Coli*)相似。

### (七)药物筛选和治疗试验

选用抗菌素类,呋喃类,磺胺类,中草药类等药物,在试管中做 88-4-2 的抑菌试验。结果氯霉素 0.125ppm 有抑菌效果;强力霉素,卡那霉素,庆大霉素等 0.25ppm 能抑菌。

1988 年 4 月 27 日,当该场死鱼数达 1200 尾/d 时,用强力霉素,氯霉素和土霉素,按 30—50mg/kg 量拌饵投喂,次日死鱼数增至 1600 尾/d,第 3d(29 日)下降到 900 尾/d,以后除 30 日稍有回升之外,一直下降,5 月 9 日全部停止死亡。效果较为显著,此期间,水温等其它因素无明显变化。

## 讨 论 与 结 束 语

肠道杆菌(*enteric bacilli*)是一大群生物学性状相似的革兰氏阴性杆菌。作者从山西省虹鳟试验场分离到的病原菌,经上述一系列试验和测定,与大肠埃希氏菌(*E. coli*)最为相近。

该病原菌 DNA 的 G+C Mol% 为 51.04(Tm),与埃希氏菌等 3 个属相符。亲缘关系相近的菌,其 G+C 含量百分比相同或相近,但 G+C 含量百分比相近或相同的菌,其亲缘关系并不一定相近,因为其 DNA 中碱基对的排列顺序有可能不同。要比较两种 DNA 中碱基对顺序的相同程度,需测定 DNA 的相关度。相关度的测定因缺标准菌株,目前尚无法进行。

大肠埃希氏菌(*E. coli*)是人和动物肠道中的正常菌丛,广泛存在于水,土壤、腐败物质上,有的致病,有的不致病。不致病的菌种,在一定条件下,如机体低抵抗力下降或菌侵入肠道外组织或器官时,也可致病,故为条件致病菌,与鱼类病原菌草鱼肠炎病的病原气单胞菌相似<sup>[8-10]</sup>。山西省虹鳟鱼实验场在饵料来源不足的情况下,为了确保亲鱼和幼鱼,对二龄虹鳟的投饵量加以控制,致使二龄鱼体质较差,抵抗力下降,导致疾病爆发。

对此病的控制,首先应管理好水源,保持水质清新,防止水中病原菌的大量增殖,同时加强饲养管理,若发病,可用 30—50mg/kg 的氯霉素,强力霉素,土霉素等拌饵投喂治疗。

对大肠杆菌的分类工作,作者缺乏经验,参考资料也不全,在血清学方面的工作做得很不够,仅凭形态和理化特性及碱基对含量百分比来进行比较,分类,可能还不够充分。只希望为今后的工作提供一些线索,旨在探求防治措施与方法,以防疾病的再次发生。

## 参 考 文 献

- [1] 韩先朴,李伟,陈光辉。鳗鲡爱德华氏病的研究。水生生物学报,1989,13(3):259—264。
- [2] Austin B, Austin D A. Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish. Ellis Horwood Limited, Chichester, 1987:196—224.
- [3] Edwards P R, Ewing L R. Identification of *Enterobacteriaceae*, 3rd. ed. Burgess Publishing Co. Minneapolis, Minn, 1972.
- [4] 林万明等。用热变性温度法测定细菌 DNA 中 G+C 含量。微生物学通报,1981,8(5):245—247。

- [5] Owen R J, Hill L R. The estimation of base compositions, base pairing and genome size of bacterial deoxyribonucleic acids. In: F. A. Skinner and D. W. Lovelock. Identification Methods for Microbiologists, 2nd ed. London & New York: Academic Press, 1979:277—296.
- [6] Buchanan R E and Gibbons N E, (ed). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. Baltimore: Williams, Wilkins Co., 1974: 293—296.
- [7] Krieg N R (ed). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. I, Baltimore: Williams and Wilkins Co., 1984: 408—420.
- [8] 王德铭等. 鳉、青鱼传染性肠类的研究 1. 肠炎病致病细菌的研究. 水生生物学集刊, 1959, (3): 241—254.
- [9] 徐伯亥等. 二龄草鱼肠炎病的研究. 水生生物学报, 1987, 11(1): 73—82.
- [10] 徐伯亥, 葛莲芳, 熊木林. 二龄草鱼肠炎病发病机理. 水生生物学报, 1988, 12(4): 308—315.

## ESCHERICHIA COLI AS A PATHOGEN IN RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)

Xu Bohai, Li Wei and Ge Ruifang

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan)

Ma Tao

(Rainbow Trout Experimental Hatchery of Shanxi Province, ShuoXian)

### Abstract

This paper describes the symptoms of an epizootic in yearling rainbow trout caused by *E. coli* and an epidemic in a fish farm in Shanxi Province. The acute infected disease was characterized by darkening of body colour, reddening of anus and some fins and anemia in gill filaments. Internally, the intestine, liver and spleen were congestive and hemorrhagic.

All bacterial isolates were Gram-negative. They were rod-like in shape with peritrichous flagella and fimbriae (pili), measuring  $0.9-1.2 \times 2.3-4.5 \mu\text{m}$ . The bacteria were mobile, oxydase negative, M. R. and Indol positive, V. P., and urease and phenylalanine deaminase negative. They could produce acid and gas from glucose and reduce nitrate to nitrite, but did not utilize sodium malonate. Tests on production of hydrogen sulfide, liquafaction of gelatin and growth in KCN medium were negative. Moreover, they fermented D-sorbitol, D-mannitol and L-arabinose, but could not ferment adonitol, lactose or cellobiose. The Mol% G+C of the DNA is 51.04(Tm).

The isolated organisms were identified as *Escherichia coli* and were different from any formerly established species of the family that act as causative agents of fish disease.

**Key words** *Oncorhynchus mykiss*, pathogenic bacterium, *Escherichia*, epizootic