

淡水养殖鱼类暴发性传染病 致病细菌的研究*

徐伯亥 殷战 吴玉深 蔡桃珍

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

提 要

于 1990—1991 年的 5—10 月间, 从湖北、湖南、河南和广东 4 省的 9 种淡水养殖鱼类的发病鱼脾、肝、肾中分离的 93 株细菌为材料, 经 100 多个表型特征和细菌 DNA 中 G+C mol% 遗传型特性测定等研究结果, 可归属为产气单胞菌属中的运动性嗜中温产气单胞菌和弧菌属中的河弧菌。按照国际细菌命名法规优先律应为点状产气单胞菌 *[Aeromonas punctata (Zimmermann) nom. rev.]*; 而河弧菌与以前所描述的生物变种 I、II 型不同: 在 43°C 能生长; 发酵水杨酸产酸; 利用 D-葡萄糖酸钙、腐胺; 不能利用戊二酸, D-葡萄糖醛酸; 从 D-葡萄糖产气; DNA 中的 G+C mol% 为 47(Tm), 鉴定为河弧菌生物变种 III (新生物变种 *Vibrio fluvialis Biovar III. Biovar nov.*)。

关键词 暴发性传染病, 淡水养殖鱼类, 产气单胞菌, 弧菌

近年来, 我国发生了席卷全国的淡水养殖鱼类暴发性传染病, 其流行面之广、被感染的鱼种类之多、死亡率之高和持续时间之长, 在我国实为罕见。因为被感染和死亡的鱼主要涉及历来少病易养、产量高著称的主要养殖对象鲢、鳙鱼, 所以其影响显得尤为突出, 从而引起了水产工作者的极大关注。病鱼征象, 多以体侧呈点状或斑块状充血和鳃盖、头、眼眶、嘴、鳍基、内脏充血发炎为主要特征; 有的可见口腔、肌肉、鳃盖内外表皮也充血, 每条病鱼的表现不尽相同。1978 年印度的帕尔(Pal)和特里帕施(Tripathi)^[1]曾作过白鲢红斑病的报道, 但未作病原的分离和鉴定。国内正在组织对该病的攻关, 陆续有报道出现^[2-5], 但因时间和地区的差异, 其结果不尽相同。

本文系对湖北等 4 省, 9 种淡水养殖鱼中所分离到的致病细菌的研究报告。作者希望本研究结果能对该病及其致病菌的探讨有所裨益。

材料和方法

1. 材料来源 鲢、鳙等 9 种淡水养殖鱼类, 系于 1990—1991 两年的 5—10 月间采自湖北、湖南、河南和广东 4 个省的 26 个养殖场, 用 TSA 培养基, 选取具有典型征象的病鱼进行分离。分离部位脾、肝和肾。

* 国家自然科学基金和“八五”攻关资助项目。
1992 年 8 月 5 日收到。

2. 细胞形态和动力 在营养琼脂固体和液体培养基上,于28℃培养24h的培养物,进行动力测定,测量大小和电镜观察。

3. 生理、生化等表型特性测定 除另有说明外,所有菌株均培养于28℃。发酵、氧化试验在Hugh-Leifson培养基中,用1%葡萄糖以溴麝香草酚蓝为指示剂;精氨酸双水解酶试验用Thornley培养基;精、赖、鸟氨酸脱羧酶试验用Falkov法进行;弹性蛋白酶Elastinase用Popoff方法^[6],其他方法见文献^[7-10]。

4. 细菌DNA中的碱基成分测定 采用苯酚氯仿混合法提取DNA,DNA中碱基成分测定和计算,采用热变性温度法,按照Owen et al (1979)在0.1SSC%G+C=50.9+2.44(Tm未知菌-Tm大肠杆菌B株)方法进行计算^[11]。

5. 0/129敏感性试验 2,4二氨基-6,7二异丙基嘌呤(0/129弧菌抑制剂)购自日本;含10μg和150μg的滤纸片购自中国药品生物制品检定所,用平板和试管法进行。

6. 血清学分析 XS91-4-1和WY91-24-3两株菌的抗体从兔中获得,抗原的制备用福尔马林灭活并离心。

7. 对鱼的致病性 采用28℃培养18h的培养物。接种细菌量按McF浊度管结合活菌计数确定,以腹腔注射和鱼体擦伤与不擦伤同时浸泡感染方法。

结 果

1. 所有不同来源菌株的分类鉴定

来自4省各养殖场的106株细菌,经毒力试验,择其毒力强者用于分类鉴定研究。93株细菌的研究结果见表1。从表1中可看出:两年来的5—10月整个高温(20—30℃)季节,从罹病鱼体上所分离到的致病细菌,经分类鉴定后可归属为两个种——点状产气单胞菌*Aeromonas punctata*和河弧菌*Vibrio fluvialis*。

2. 表型特征和DNA中G+C mol%

所有被鉴定为上述两种细菌的菌株,性状颇为一致,现将这两种菌以XS91-4-1和WY91-24-3菌株为代表,分别描述于后:

XS91-4-1菌株: 菌体直,短杆状,两端圆0.5—1.0×1.0—1.8μm,单个或成对相

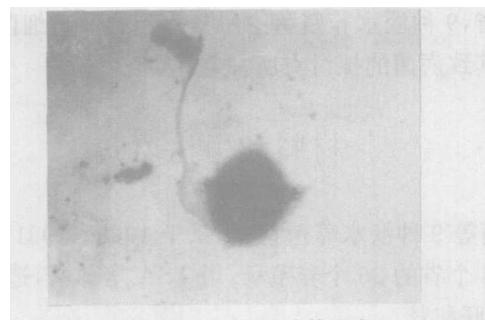


图1 菌株XS91-4-1形态电镜照片(×11,000)

Fig. 1 Electron micrograph of the XS91-4-1 with flagellum. ×11,000

联,革兰氏染色阴性,无荚膜和芽孢,以极端单鞭毛运动。(图1)。

表1 用于研究的细菌菌株

Tab. 1 Strains of used bacteria

来 源 Source	宿 主 Host	分离时间、细菌名称及代号(time of isolation and number)			
		1990(5—10月)		1991(6—10月)	
		点状产气单胞菌 <i>A. punctata</i> (<i>A. hydrophila</i>)	河弧菌 <i>V. fluvialis</i>	点状产气单胞菌 <i>A. punctata</i> (<i>A. hydrophila</i>)	河弧菌 <i>V. fluvialis</i>
武汉余家湖	团头鲂 鲢 鱼	MA90-2-2,MA90-2-3	MA90-1-3,MA90-1-1 YS90-1-1,YS90-1-2 YS90-2-1,YS90-2-2		
武汉沙湖 水生所	团头鲂 鲫 鱼	MA90-3-3,MA90-3-1 GC90-3-2,GC90-3-3	MA90-4-1,MA90-4-3 GC90-2-1,GC90-2-2 GC90-4-1,GC90-4-3		
	鲢 鱼 团头鲂	DSC90-2-1,DSC90-2-2	SSC90-1-1,SSC90-1-2		WY91-24-1,WY91-24-2 WY91-24-3,WY91-24-4 WY91-24-5,WY91-24-6 WY91-24-7,WY91-24-8 WY91-24-9
湖南长沙	鲢 鱼	NSC90-3-1,NSC90-3-2 NSC90-4-1,NSC90-4-2 NSC90-1-1,NSC90-1-2	NSC90-2-1,NSC90-2-2		
	团头鲂 鲫 鱼	NMA90-1-1,NMA90-1-2 NGC90-1-1,NGC90-1-2			
湖北沙市	鲢 鱼	JSC90-1-3,JSC90-2-1			
湖南岳阳	白 鲫 鲤 鱼	JGC90-1-1,JGC90-1-3 NGC90-2-2,NGC90-2-3			
广东顺德 湖北孝感	土鲮鱼 鲢 鱼	NSC90-7-2,NSC90-7-3		GC91-1-2,GC91-1-5 XSC91-4-1,XSC91-4-2 XSC91-4-3,XSC91-4-4 XSC91-4-5,XSC91-4-6 XSC91-4-7,XSC91-4-8 XSC91-4-9 XC91-5-3 HC91-7-6,HC91-7-7	
湖北黄石 湖北武汉	鲤 鱼 鲫 鱼 鲢 鱼 鳙 鱼		SC90-1-1,SC90-1-3		WB91-2-1,WB91-2-2 WB91-2-3,WB91-2-4 WB91-2-5,WB91-2-6 WB91-2-7,WB91-2-8 WB91-2-9
	鲤 鱼		GC90-6-1,GC90-6-2 GC90-4-1,GC90-4-3		
河南商丘	团头鲂 鲢 鱼	MA90-5-1,MA90-5-3 HSC90-1-2,HSC90-1-3 HSC90-2-2,HSC90-2-3			
湖北阳新	鳊 鱼		YP91-10-5		
湖南衡阳	白 鲫 鲢 鱼 银 鳊		YWC91-11-2,YWC91-11-3 HS91-13-3,HS91-22-1 HX91-19-2,HX91-19-3		

表 2 分离菌株和点状产气单胞菌、豚鼠产气单胞菌及温和产气单胞菌之间主要性状比较

Tab. 2 Comparison of chief characteristics between isolates and *A. punctata* (*A. hydrophila*), *A. caviae* and *A. sobria*

性状 Characteristics	菌株 Bacteria	分离株 Isolates	点状产气单胞菌 <i>A. punctata</i> (<i>A. hydrophila</i>)	豚鼠产气单胞菌 <i>A. caviae</i>	温和产气单胞菌 <i>A. sobria</i>
37℃生长	+	+	+	+	+
运动性	+	+	+	+	+
液体培养基中产单鞭毛	+	+	+	+	+
液体培养基中产丛鞭毛	-	-	-	-	-
单或成对杆状	+	+	+	+	+
褐色水溶性色素	-	-	-	-	-
营养肉汤 37℃生长	+	+	+	+	+
1%蛋白胨水中产吲哚	+	+	+	+	+
七叶灵水解	+	+	+	+	-
KCN 肉汤生长	+	+	+	+	-
L-组氨酸和L-精氨酸利用	+	+	+	+	-
L-阿拉伯糖利用	+	+	+	+	-
蔗糖发酵	+	+	+	+	+
甘露醇发酵	+	+	+	+	+
水杨苷发酵	+	+	+	+	-
赖氨酸脱羧酶	-	+	-	-	+
肌醇分解	±	-	-	-	-
V-P 反应	+	+	-	-	d
葡萄糖产气	+	+	-	-	+
半胱氨酸产 H ₂ S	+	+	-	-	+
Mol%G+C	60.5-63	57-63	61-62	57-60	

在营养琼脂培养基上, 菌落圆, 表面光滑湿润, 边缘整齐, 质地软, 奶白色。最适生长温度 28℃—35℃, 最高和最低生长温度分别为 43℃ 及 5℃。细胞色素氧化酶和过氧化氢酶试验阳性; 葡萄糖氧化发酵测定为发酵型产酸产气; 还原硝酸盐为亚硝酸盐; 美红试验阴性; V-P、淀粉水解、β-半乳糖苷酶(ONPG)、七叶灵水解等试验均为阳性; 利用葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、水杨苷、甘露醇、果糖、海藻糖、甘油、淀粉、甘露糖、阿拉伯糖、肌醇、半乳糖、糊精、α-甲基-D-葡萄糖苷; 微利用山梨醇; 不利用木糖、鼠李糖、蜜二糖、纤维二糖、乙醇、赤藓糖醇、菊糖、卫茅醇、侧金盏花醇、棉子糖。靛基质、硫化氢、苯丙氨酸脱氨酶、精氨酸脱羧酶、精氨酸双水解酶、明胶液化试验为阳性; 尿素酶、赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶试验为阴性; 柠檬酸钠利用试验阳性; 利用 L-丙氨酸、L-丝氨酸、L-亮氨酸、L-组氨酸、L-酪氨酸、L-苏氨酸、L-精氨酸、L-鸟氨酸、L-谷氨酸、L-天门冬氨酸; 不利用 L-甘氨酸。氨态氮和硝态氮均可利用作唯一氮源; 吐温 80 水解、卵磷脂酶、酪蛋白水解试验阳性; KCN 肉汤生长试验阳性; 对弧菌抑制剂不敏感, 在 4% 或以下的 NaCl 中生长; 产生弹性蛋白酶; TCBS 培养基中黄色; DNA 中 G+C mol% 为 62.8。其主要性状与各作者所列^[12-14]的产气单胞菌中的三个嗜中温产气单胞菌的比较列于表 2。显示它们相似于点状产气单胞菌, 但此名称已被 1984 年的《伯杰氏分类系统细菌学手册》第一卷中不合理地废弃, 它和保留下来的

嗜水产气单胞菌是同物异名。

WY91-24-3菌株为革兰氏染色阴性,兼性厌气,菌体直或稍弯,藉助极端单鞭毛运动

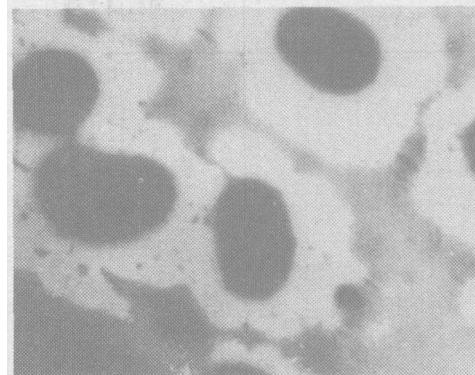


图2 菌株 WY91-24-3 形态电镜照片($\times 11,000$)

Fig. 2 Electron micrograph of the WY 91-24-3 with flagellum. $\times 11,000$

的短杆菌,大小为 $0.4-0.9 \times 1.2-1.9$ C(图2)。在营养琼脂上,菌落呈圆形,表面光滑湿润,微凸,边缘整齐,质地软,奶白色。在4%NaCl或以下中生长,6%不生长;43℃以上及5℃以下不生长,最适生长温度28—32℃;对弧菌抑制剂无论是在液体培养基中还是滤纸片,均是 $10\mu\text{g}$ 不敏感; $150\mu\text{g}$ 敏感。存在细胞色素氧化酶和过氧化氢酶;利用柠檬酸盐作为唯一碳源;还原硝酸盐为亚硝酸盐;产生硫化氢和靛基质;存在 β -半乳糖苷酶、明胶酶、脂酶(吐温80);不存在脲酶;利用D-果糖、D-半乳糖、D-葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、L-阿拉伯糖、水杨苷、甘露醇、海藻糖、丙三醇、淀粉、甘露糖、糊精、 α -甲基-D-葡萄糖苷;微利用乳糖、D-山梨醇;不利用肌醇、D-木糖、L-鼠李糖、蜜二糖、纤维二糖、菊糖、卫茅醇、侧金盏花醇、棉子糖。M-R试验阴性;V-P试验阳性;七叶灵水解试验阳性;精氨酸双水解酶试验阳性;苯丙氨酸脱氨酶试验阳性;弹性蛋白酶试验阴性;淀粉酶水解试验阳性;酪蛋白水解试验阳性;在TCBS培养基上黄色;DNA中G+C mol%为47;腐胺利用试验阳性;D-葡萄糖酸钙利用试验阳性;D-葡萄糖醛酸利用试验阴性;戊二酸利用试验阴性;发酵葡萄糖产气,L-阿拉伯糖产酸,蔗糖产酸。

根据以上特性,该菌的分类位置应属弧菌属中的河弧菌,但与以前已经描述^[13]的河弧菌I、II生物型性状不同(表3),作者认为可以作为河弧菌生物变种III(新生物变种)。

3. 血清学试验

XS91-4-1和WY91-24-3两菌株之间,不产生凝集。

4. 致病性试验

表1所列举的从4省不同养殖场罹病鱼体中所分离到该93株菌,均具有很强毒力。当水温28℃—32℃时,McF1号管的1/100万(活菌计数100—300个菌)通过腹腔注射,可使试验鱼1—2d之内全部死完,并症状明显。在同样剂量下接种鱼体,随水温下降而延缓。20℃以下虽死鱼但症状不明显;15℃以下死鱼很少,甚至不发生死亡。将菌直接倒入缸中,在鱼体损伤和不损伤的情况下,损伤鱼体感染率均为100%;而未损伤鱼体,其感染率只有20—40%,这里还可能包含肉眼不易觉察的损伤。

表3 WY91-24-3 和河弧菌之间性状比较

Tab. 3 Comparison of chief characteristics between WY91-24-3 and *V. fluvialis*

性状 Characteristics	菌株 Bacteria	WY91-24-3	河弧菌 I型 <i>V. fluvialis</i> I	河弧菌 I型 <i>V. fluvialis</i> I
精氨酸(Thornley)		+	+	+
赖氨酸脱羧酶		-	-	-
鸟氨酸脱羧酶		-	-	-
葡萄糖产气		+	-	+
L-阿拉伯糖产酸		+	+	+
肌醇产酸		-	-	-
水杨苷产酸		+	+	-
蔗糖产酸		+	+	+
V-P(24h)		+	-	-
ONPG 水解(24h)		+	+	+
生长于 43°C		+	d	-
0/129 10ug		R	R	R
150ug		S	S	S
NaCl 生长 0%		+	d	d
3%		+	+	+
6%		-	+	+
8%		-	d	d
七叶灵水解		+	d	-
氧化酶		+	+	+
硝酸盐还原		+	+	+
在 TCBS 上生长		Y	Y	Y
腐胺		+	d	+
戊二酸		-	-	-
D-葡萄糖醛酸		-	+	-
葡萄糖酸钙		+	+	+
mol%G+C		47	49-51	49-51

讨 论

1. 由 Popoff(1981)提出,并列入 1984 年《伯杰分类系统细菌学手册》第一卷中有动力的产气单胞菌有 3 种。与前版(1974)相比,废弃了点状产气单胞菌,而保留同物异名嗜水产气单胞菌;又把原来是点状产气单胞菌的豚鼠亚种(*A. punctata* subsp. *caviae*)上升为种。

早在 70 年代,美国一些学者便对《伯杰氏细菌鉴定手册》第八版(1974)中的产气单胞菌属,有动力的两个种和 5 个亚种的分类持有不同意见,麦卡锡(McCarthy, 1973)采用 80 个以上试验结果,加上免疫扩散血清学分析和肠道同功酶型,用计算机研究了 90 个已命名的有动力产气单胞菌后,认为点状产气单胞菌 [*A. punctata* (Zimmermann) Snieszko] 是正确名称。而嗜水产气单胞菌 [*A. hydrophila* (Chester) Stanier] 是同物异名。在此前后

的 Eddy(1962)^[14]和徐伯亥等(1980,1987),也持同样观点。对于 1984 年的伯杰氏手册中的有动力产气单胞菌列入的 3 个种,希克曼-布伦纳等(Hickman-Brenner F. W. et al) (1987)仍持有不同意见,认为“豚鼠产气单胞菌”的命名不合法,因同一模式株的“点状产气单胞菌”要早出现 46 年。按照国际细菌命名法规优先律,作者建议恢复点状产气单胞菌这一名称 [*Aeromonas punctata* (ex Zimmermann 1890) nom. rev.]。

2. 河弧菌自李氏等(Lee et al., 1981)报道以来,还没有看到该菌对鱼致病的报道,只是伯阿斯科等(Biosco et al., 1991)通过菌细胞中铁结合配位体(Siderophores)和胞外膜蛋白(Outer membrane protein)测定^[15]认为与其他致病弧菌等一样,对鱼有潜在致病的能力。作者分离到的细菌与河弧菌相似,但又无法归入已描述的 I、II 型生物变种中,因此,作者认为把它作为同种异型河弧菌生物变种 III(新生物变种)*Vibro fluvialis* biovar III. biovar nov. 还是比较合适的。

参 考 文 献

- [1] Pal R N, Tripathi S D. Use of terramycin for fish diseases in Carp and Catfish culture in Indian waters. *J. Inland Fish. Soc. India.*, 1978, **10**:166—168.
- [2] 孙其焕、孙佩芳、金丽华、吴建农. 异育银鲫溶血性腹水病病原的研究. 水产学报, 1991, **15**(2):130—139.
- [3] 陈怀青、陆承平. 家养鲤科鱼暴发性传染病的病原研究. 南京农业大学学报, 1991, **14**(4):87—91.
- [4] 徐伯亥等. 鲢、鳙鱼一种新的传染病——*Yersinia ruckeri*, 一种新的鲢、鳙鱼病原菌. 科学通报, 1991, **8**:620—622.
- [5] 徐伯亥等. 鲢、鳙鱼流行性传染病的流行病学和细菌病因的初步研究. 水产科技情报, 1991, **18**(5):134—136.
- [6] Popoff M, Lallier R. Biochemical and serological characteristics of *Aeromonas* In: *Methods of Microbiology*. London & New York: Academic Press. 1984, **16**:127—145.
- [7] 徐伯亥、葛蕊芳、熊木林. 鲢鳙鱼打印病致病细菌的研究. 海洋与湖沼, 1980, **11**(1):85—93.
- [8] 徐伯亥、葛蕊芳、熊木林. 草鱼尾柄病及其与其它体表病关系的研究. 水生生物学报. 1986, **10**(1):39—51.
- [9] 徐伯亥. 熊木林、韩先朴、卢全章、葛蕊芳. 二龄草鱼肠炎病的研究. 水生生物学报, 1987, **11**(1):73—82.
- [10] Philipp Gerhardt. *Manual of Methods for General Bacteriology*. Washington: American Society for Microbiology 1981:417—450.
- [11] Owen K J, Hill L R. *Identification Methods for Microbiologists*. (2nd Ed). London & New York: Academic Press. 1979:277—296.
- [12] Austin B, Austin D A. *Bacterial fish pathogens; Disease in Farmed and Wild Fish*. Chichester: Ellis Horwood Limited, Halsted Press. 1987. 111—194, 263—296.
- [13] Baumann P, Furniss A L, Lee J V. In: Krieg, N. R. (ed.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1., Baltimore & London: Williams & Wilkins. 1984: 516—549.
- [14] Eddy B P. Further studies on *Aeromonas*. 1. Additional studies and supplementary biochemical tests. *J. Appl. Bact.*, 1962, **25**(2):137—146.
- [15] Biosco E G, Amaro C. Siderophores and related outer membrane proteins in *Vibrio* spp. which are potential pathogens of fish and shellfish *J. Fish Dis.*, 1991, **14**:249—263.

STUDIES ON THE TAXONOMY OF PATHOGENIC BACTERIA OF THE BACTERIAL HEMORRHAGIC SEPTICEMIA IN CULTURED FISHES IN FRESHWATER

Xu Bohai , Yin Zhan , Wu Yushen and Cai Taozhen

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan, 430072)

Abstract

Taxonomic studies were performed on ninety-three bacterial isolates from nine species of fish affected by the septicemia and reared in fresh water in Hubei, Hunan, Henan and Guangdong during the period from May to October of 1990 and 1991. Analysing more than one hundred phenotypic characters and mol% G+C of the bacterial deoxyribonucleic acids, these isolates were assigned either to motile mesophilic aeromonad in the genus *Aeromonas* or to *Vibrio fluvialis* in the genus *Vibrio*. In conformity with the Priority of the International Code of Nomenclature of bacteria, these motile mesophilic aeromonads should be *Aeromonas punctata* (Zimmermann) nom. rev. ; Another group of the pathogenic bacteria was similar to *Vibrio fluvialis* in most physiological and biochemical characteristics, but differs from the previously described *V. fluvialis* biovar I and biovar II in their growth at 43°C, acid production from salicin, utilization of D-gluconate and putrescine, inability to utilize glutarate and gluconate, gas production from D-glucose and 47 mol% G+C of the base compositions. Therefore, a new biovar, *Vibrio fluvialis* biovar III. biovar nov. is proposed.

Key words Bacterial hemorrhagic septicemia, Cultured fishes in freshwater, *Aeromonas*, *Vibrio*