

鳗鲡肝肾病病原菌的研究*

卢全章 朱心玲

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

提 要

近年来, 在广东潮州各养鳗场, 每年3—5月和10—12月, 广泛流行一种危害严重的鳗鲡肝肾病, 给鳗鲡养殖业造成严重损失。本文记述了该病的症状, 重点研究鳗鲡肝肾病的病原菌。作者从患肝肾病的病鳗肝脏、肾脏和胃液中分离到10株致病菌。根据分离株的形态、培养、生化特性, 8株致病菌特性一致, 鉴定为迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda* Ewing et Mcwhorter)。另外两株菌特性相同被鉴定为运动性 *Aeromonas* sp.。研究结果阐明了鳗鲡肝肾病主要是由 *E. tarda* 引起的爱德华氏菌病, 部分病例是由 *E. tarda* 和运动性 *Aeromonas* 菌引起的并发症。*E. tarda* 是鳗鲡肝肾病的病原菌。

关键词 肝肾病, 爱德华氏菌病, 鳗鲡, 迟钝爱德华氏菌

在我国东南沿海各省鳗鲡养殖场, 普遍流行一种细菌性鳗病, 当地渔农称之为鳗鲡肝肾病。从白仔到成鳗都有发生, 尤以黑仔和养成期发病率较高, 发病严重的鳗池, 死亡率高达50%以上。在广东潮州地区, 主要发生于3—5月和10—12月。通常情况下, 每年因该病的流行约损失5—10%的鳗鱼。1989—1990年我们调查研究了潮州各养鳗流行的鳗鲡肝肾病。本文的目的是研究该病的病原菌。

1 材料和方法

病鳗和试验用鳗鱼, 取自广东省潮州市水产发展总公司各养鳗场。该公司鳗苗主要来自汕头韩江口和江苏省。白苗在温泉鳗种场培育到黑仔或稚鳗后, 分到各养鳗场饲养。病原菌分离用培养基为TSA培养基(日本制药株式会社产品)和SS琼脂培养基(杭州微生物试剂厂)。从病鳗肝脏、肾脏和胃液中取材在平板上划线分离, 经培养后挑选单个菌落进行纯培养, 获得纯培养菌株, 供人工感染试验和鉴定用。

1.1 人工感染方法 腹腔注射感染, 将分纯的菌株置28℃培养18—20h的斜面培养物, 用0.85%的无菌生理盐水洗下, 稀释成一定浓度, 注射一定量的菌液到健康鳗鱼的腹腔内。浸泡感染, 将28℃, 18—20h的平板培养菌苔, 用无菌生理盐水(或无菌水)洗下配成含1.5亿/ml的菌悬液, 然后将健康鳗鱼放入配好的菌液中浸泡1h, 弃去菌液, 把试验鳗

* 1991年10月15日收到; 1993年9月20日修回。

鱼放入水族箱中饲养观察发病情况。

1.2 生化试验 采用 API 20E system 和常规方法^[1]。药物敏感试验用试管稀释方法

2 步骤和结果

2.1 鳗鲡肝肾病症状

病鳗症状主要表现在鳗鱼前腹部肝区部位肿大,严重时肝区腹部皮肤软化、溃烂穿孔、肝脏露出。肾脏部位和肛门有时也会出现明显的红肿,按压腹部可从肛门流出带红色的粘稠状液体。皮肤和鳍条往往有不同程度的充血现象。解剖检查,肝脏症状最明显,其次是肾脏,主要表现为肝、肾肿大、瘀血、有白色脓溃病灶。有时,脾脏也肿大,胃肠充血,或有少量的腹水。有的病鳗除肝肾症状外,胃肠(特别是胃)充满白色粘稠状液体,胃积液膨大导致病鳗腹部膨胀。

2.2 病原菌的分离筛选

1989—1990 年在潮州枫溪、温泉、古巷、花园和南门等养鳗场,从 7 尾患肝肾病的病鳗内脏中分离筛选了 11 株菌(表 1),从菌落和菌体特征的初步观察,上述菌株大致可归为三类:即 ED901、ED902、ED903、ED907、ED891、ED892、ED893、ED894 等菌株为一类,菌落细小、圆形、灰白色,菌体短杆、能运动、革兰氏阴性;ED904 菌株为另一类,菌落与前一类相似,菌体杆状,运动活跃、革兰氏阴性;ED905、ED906 两株菌为一类,菌落圆形、灰白色、中等大小,菌体短杆、革兰氏阴性、运动活跃。

表 1 菌株来源

Tab.1 Sources of bacterial strains studied

菌株 Strains	分离时间 Date of isolation	分离地点 Locality of isolation	病鳗体重(g) Body weight of eel	分离脏器 Organs isolated	水温(℃) Water temp.
ED891	1989.3.18	枫 溪	125	肾	19
ED892	1989.3.21	温 泉	2	肝	24
ED893	1989.3.21	温 泉	2	肝	24
ED894	1989.3.25	古 巷	50	肝	19
ED901	1990.3.31	花 园	143	肝	20
ED902	1990.3.31	花 园	143	肾	20
ED903	1990.4.1	枫 溪	125	肝	20
ED904	1990.4.1	枫 溪	125	胃	20
ED905	1990.4.1	枫 溪	125	胃	20
ED906	1990.4.1	枫 溪	125	肝	20
ED907	1990.5.6	南 门	90	肝	27

ED903、ED906、ED904、ED905 等 4 株菌是从同一尾患肝肾病的病鳗内脏中分离到的,前两株来自病鳗肝脏,后两株来自病鳗胃液。在肝脏分离平板中 ED903 类型菌落占绝对优势,与 ED905 相同的 ED906 类型菌落占少数。在胃液分离平板中,ED904 和

ED905 两类菌落的数量相当。

2.3 人工感染

将分离的 11 株菌作腹腔注射人工感染试验。从表中可见,除 ED904 未能感染致病外,其他各菌株均能使健康鳗鱼在 1—3d 内致病死亡。其症状除少数因急性发病而表现不够明显外,大多数病鳗症状与自然发生的肝肾病鱼症状相同。从 ED891、ED901 和 ED905 人工感染的病鳗肝脏中又分别分离到 ED891-1、ED901-1 和 ED905-1。其菌落菌体和生理生化特性均分别与原菌株完全相同。重分离到的三株菌再分别进行感染,均能使健康鳗鱼发生与原菌株感染相同的症状(表 2)。由此表明其致病性与原菌株相同。

表 2 腹腔注射感染试验

Tab.2 Infection experiments with intraperitoneal injection

菌株 Strains	试验鳗鲡 Eels		注射剂量 Injected dose (Cells / Fish)	水 温 Water temp. (℃)	感染死亡尾数 Number of deaths post infection
	鱼数 / 公斤 No. fish / kg	注射鱼数 No. fish injected			
ED891	20	10	1.8×10^8	24 ± 0.5	10
ED891-1	25	5	1.8×10^8	25 ± 0.5	5
ED892	25	5	1.8×10^8	25 ± 0.5	5
ED893	25	5	1.8×10^8	25 ± 0.5	5
ED894	20	5	1.8×10^8	25 ± 0.5	5
ED901	182	5	6×10^7	21 ± 0.5	5
ED901-1	182	3	6×10^7	21 ± 0.5	3
ED901	18	6	6×10^7	26 ± 0.5	6
ED903	182	5	6×10^7	21 ± 0.5	5
ED904	182	4	6×10^7	21 ± 0.5	0
ED905	30	5	1.8×10^8	27 ± 0.5	5
ED907	182	4	6×10^7	21 ± 0.5	4
ED905-1	30	3	1.8×10^8	27 ± 0.5	3
ED906	30	3	1.8×10^8	27 ± 0.5	3

用 ED901 菌株进行浸泡感染,也能使健康鳗鱼致病,但发病时间达 3—7d,发病率较低。将 ED901 菌注入背部肌肉,也能使健康鳗鱼感染发病,其症状主要表现在注射部位皮肤软化,肌肉坏死,病菌扩散侵入内脏,导致全身性感染而死亡。从病亡鳗鱼的肝脏能分离到与 ED901 菌相同的致病菌。

2.4 病原菌的形态和培养特性

以 ED901 为代表的一类菌株,在 TSA 平板上 28℃ 培养 24h, 菌落直径为 0.6—1mm, 培养 48h 才达到 1.5mm。在 SS 琼脂平板上菌落中央出现黑点。在普通培养基上能生长。菌体短杆状、28℃ 培养 24h 菌体大小多数为 0.6—0.8 × 1—1.4 μm, 革兰氏染色阴性, 有周鞭毛、能运动, 无荚膜, 无芽孢, 兼性厌气。此类菌株生长温度范围为 12—42℃,

4℃以下或43℃以上不能生长,适宜生长温度为20—35℃,在12℃和42℃生长较慢。pH范围5.5—9.0,适宜pH为6.0—8.0。该菌在含0—4%NaCl的TSA培养基中能生长,但在4%NaCl中生长即显著变慢,当NaCl浓度达到5%时就不能生长。

ED905菌株在普通培养基和TSA培养基上生长良好、菌落呈灰白色。在TSA琼脂平板上28℃培养24h,菌落直径达2—3mm。在SS琼脂平板上生长良好、菌落呈淡红色。该菌菌体直、单个或两个或数个相连,革兰氏阴性短杆菌,28℃培养24h菌体大小多数为0.5—0.6×1—1.3μm,无荚膜、无芽孢,运动活跃,兼性厌气。在液体培养中为极端单鞭毛,在斜面培养基有的菌体可见侧鞭毛。该菌在8—42℃均能生长,在4℃以下或45℃以上不能生长、适宜温度为20—35℃。适宜pH6—8.5。在含0—3%NaCl的TSA培养液中能生长,在4%NaCl中不能生长。ED906与ED905的形态培养特性相同。

2.5 生理生化特性

三类菌株的生理生化特性的测定结果见表4和表5。各菌株都能发酵葡萄糖产酸产气。在试验过程中,我们用若林久嗣^[6]从日本病鳗中分离并鉴定为*Edwardsiella tarda*的菌株同时进行了比较试验。结果表明,ED901为代表的8株菌的生理生化特性与*E.tarda*相同(表3,4)。

表3 分离菌株的生化特性

Tab.3 Biochemical characteristics of isolated strains

特性 Characteristics	ED901 等8株	ED901-1 ED891-1	E.tarda ^[6]	ED904	ED905 ED906	ED905-1
精氨酸脱氨酶	—	—	—	—	+	+
赖氨酸脱羧酶	+	+	+	—	+	+
鸟氨酸脱羧酶	+	+	+	—	—	—
尿素酶	—	—	—	—	—	—
氧化酶	—	—	—	—	+	+
过氧化氢酶	+	+	+	+	+	+
β-半乳糖苷酶	—	—	—	+	+	+
枸橼酸利用	—	—	—	—	+	+
硫化氢试验	+	+	+	+	+	+
KCN试验	—	—	—	+	+	+
吲哚丙酮酸试验	—	—	—	—	—	—
吲哚试验	+	+	+	+	+	+
V.P.试验	—	—	—	—	+	+
美红试验	+	+	+	+	+	+
明胶液化	—	—	—	—	+	+
硝酸盐还原	+	+	+	+	+	+
丙二酸盐利用	—	—	—	+	+	+
O-F试验	F	F	F	F	F	F

表 4 分离菌株利用糖类的特性

Tab.4 Carbohydrate utilization of isolated strains

试验项目 Items of test	ED901 等 8 株	ED901-1 ED891-1	E.tarda ^[6]	ED904	ED905 ED906	ED905-1
葡萄糖	+	+	+	+	+	+
甘露醇	-	-	-	+	+	+
肌 醇	-	-	-	-	-	-
山梨糖	-	-	-	+	-	-
鼠李糖	-	-	-	-	-	-
蜜二糖	-	-	-	-	-	-
蔗 糖	-	-	-	+	+	+
扁桃甙	-	-	-	-	+	+
L-阿拉伯糖	-	-	-	+	-	-
乳 糖	-*	-	-	+	+	+
蕈 糖	-	-	-	+	+	+
水杨苷	-	-	-	-	-	-
七叶灵	-	-	-	-	-	-
纤维糖	+	+	+	+	+	+

* 其中 ED893 为阳性

2.6 药物敏感试验

ED901 和 ED905 菌株对若干抗菌素及其他药物的敏感试验结果见表 5。此外, ED905 菌株对 0/129 弧菌抑制剂不敏感、无抑菌圈。

3 讨论

对所分离的 11 株菌进行了形态、培养和生理生化特性的比较研究。结果表明, ED901 等 8 株菌的特性相同为一个种类, ED905 和 ED906 两菌株的特性相同为另一个种类, 而 ED904 菌株则不同于前两类为单独一类。通过人工感染、再分离和再感染试验证实, 以 ED901 为代表的一类菌株和以 ED905 为代表的一类菌株均能使健康鳗鱼致病死亡, 且能复制出与自然发病鱼相类似的症状, 符合郭霍氏定律, 可确认它们是两种不同的病原菌。而 ED904 菌株则无感染致病能力, 可视为非致病菌。

ED901 等菌株感染鳗鱼, 其症状主要表现为肝肾肿大、瘀血, 慢性死亡时可见肝脏形成白色小溃疡病灶。此外, 少数也有胃肠肿胀积液、或轻度充血现象。ED905 菌株感染症状主要表现为胃肠充血、肿胀、积液, 也伴随有肝脏肿大瘀血现象, 但不出现白色溃疡病灶。关于 ED901 和 ED905 菌株的分类位置。ED901 菌株为革兰氏阴性直杆菌、周鞭毛、兼性厌气, 过氧化氢酶阴性、氧化酶阴性、还原硝酸盐至亚硝酸盐、发酵葡萄糖产酸产气。在合成培养基上生长慢、菌落小, 对鳗鲡致病等, 其特性与肠道菌科爱德华氏菌属 (*Edwardsiella*) 基本相符。伯杰氏细菌鉴定手册第九版中关于爱德华氏菌属^[7]中记载有三个种: *E. tarda*、*E. hoshinae* 和 *E. ictaluri*, 而 *E. tarda* 又分两个生物群。该属中种和生

表 5 ED901 和 ED905 菌株对抗菌药剂的敏感性

Tab.5 Sensitivity of ED901 and ED905 strains to antibiotics

抗菌素 Antibiotics	浓度 Concentration	ED901							ED905						
		100	50	25	10	5	2.5	1	100	50	25	10	5	2.5	1
土霉素	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+
四环素	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	+	+
青霉素	—	—	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
链霉素	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+
卡那霉素	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+
多粘菌素 B	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+
庆大霉素	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	+	+	+
氯霉素	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
呋喃唑酮	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
呋喃西林	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+
鱼腥草 BII 主药	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
三甲氧苄氨嘧啶	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	+	+	+	+
磺胺甲基异噁唑	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+
磺胺二甲氧嘧啶	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
磺胺胍	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
福尔马林	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

浓度单位: 抗菌素为 $1\mu\text{g}/\text{ml}$, 其他药为 $\mu\text{g}/\text{ml}$; + 表示生长, - 表示抑制生长。

表 6 *Edwardsiella* 属中种的鉴别特性及与 ED901 菌株的比较Tab.6 Comparisons in main characteristics of the species of genus *Edwardsiella* with ED901 strain

特性 Characters	<i>E.tarda</i>		<i>E.hoshiniae</i>	<i>E.ictaluri</i>	ED901
	Wild Type	Biogroup I			
发酵糖产酸					
D-甘露醇	-	+	+	-	-
蔗糖	-	+	+	-	-
蕈糖	-	-	+	-	-
L-阿拉伯糖	-	+	[—]	-	-
四硫酸盐还原	+	-	+	-	-
丙二酸盐利用	-	-	+	-	-
吲哚产生	+	+	[—]	-	+
H ₂ S 产生	+	-	-	-	+
运动性	+	+	+	-	+

物群的鉴别特性以及与 ED901 菌株的比较见表 6。从表 6 可见, ED901 菌株的特性与 *E.tarda* 相符。此外, ED901 菌株与若林久嗣鉴定为 *E.tarda* 的菌株的生理生化特性相同(表 3 和表 4)。因此, 作者认为 ED901 菌株应归属于迟钝爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda* Ewing et McWhorter)。

ED905 菌株为革兰氏阴性短杆菌, 菌体直、单个、两个或数个相连, 无芽孢, 极端单鞭毛, 运动活跃, 兼性厌气, 发酵葡萄糖产酸产气, 还原硝酸盐至亚硝酸盐, 氧化酶阳性, 过氧化氢酶阳性, 对 0/129 弧菌抑制剂不敏感, 对鳗鱼致病等。其特性与气单胞菌属 (*Aeromonas*) 的性状符合。伯杰氏细菌鉴定手册第九版在 *Aeromonas* 属^[8]中记载有三个运动性种, 其主要鉴别特征及与 ED905 菌株的比较见表 7。从表 7 可见, ED905 菌株的特性与 *A. caviae* 明显不同, 而与 *A. sobria* 和 *A. hydrophila* 比较接近。但是, ED905 菌株 KCN 试验和精氨酸利用为阳性, 这与 *A. hydrophila* 相同而与 *A. sobria* 不同; ED905 菌株阿拉伯糖利用、七叶灵水解、水杨苷发酵均为阴性, 这又与 *A. hydrophila* 不同而与 *A. sobria* 相同。因此, 有关 ED905 菌株应归属哪一种或设立新种的问题还有待进一步研究。现可暂称为 motile *Aeromonas* ED905。

表 7 三种运动性 *Aeromonas* 菌的主要特性及与 ED905 菌株的比较

Tab.7 Comparisons in main characteristics of 3 motile species of the genus *Aeromonas* with ED905 strain

特 性 Characters	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. Sobria</i>	ED905
运动性杆菌(成对和单个)	+	+	+	+
液体培养基中极端单鞭毛	+	+	+	+
吲哚试验	+	+	+	+
V-P 试验	+	-	d	+
KCN 试验	+	+	-	+
精氨酸利用	+	+	-	+
L-阿拉伯糖利用	+	+	-	-
七叶灵水解	+	+	-	-
水杨苷发酵	+	+	-	-
蔗糖发酵	+	+	+	+
甘露醇发酵	+	+	+	+
肌醇发酵	-	-	-	-
发酵葡萄糖产气	+	-	+	+
硫化氢试验	+	-	+	+

迟钝爱德华氏菌比肠道菌科其他菌生长慢、菌落小。该菌广泛存在于动物中, 往往能从冷血动物及其环境, 特别是淡水中分离到, 是鱼类的一种重要致病菌。它不仅能引起鳗鲡的爱德华氏菌病 (Edwardsielliasis), 日本称之为“Paracolo”病^[6], 也能引起罗非鱼 (*Tilapia*)^[3]、鲻鱼 (*Mugil cephalus*)^[4] 的爱德华氏菌病。此外, 楠田理一等^[5]从日本鲷 (*Evynnis japonica*) 病鱼中分离到一种非运动性的 *E. tarda* 变种, 确认为日本鲷爱德华氏

菌病的致病菌。病鱼的主要症状是,病鱼头部和体侧皮肤形成出血性溃疡,脾脏和肾脏可见有许多小白点状的病灶。

韩先朴等^[2]从福建流行的鳗鲡爱德华氏菌病的病鳗中分离到 E86-205 等菌株,因能利用蔗糖、迅速利用纤维二糖、鸟氨酸脱羧酶阴性等,不同于 *E. tarda*,而定为福建爱德华氏菌 (*Edwardsiella fujianensis*) 新种。所记述的病鱼主要症状与本文描述的肝肾病基本相同。

本研究的结果说明,广东潮州流行的鳗鲡肝肾病主要是由 *E. tarda* 引起。在多数情况下,从病鳗肝肾中仅能分离到 *E. tarda* 致病菌,也就是说在多数情况下是由 *E. tarda* 致病菌单独感染的爱德华氏菌病。有时从病鳗的肝脏能同时分离到 *E. tarda* 和运动性 *Aeromonas* ED905 两种不同的致病菌,显然这是一种并发症。运动性 *Aeromonas* ED905,能侵入病鳗肝脏,引起肝脏病变,但大量的还是存在于胃肠道中,主要引起胃肠充血,粘膜肿胀、脱落、胃肠道贮积大量白色粘稠状液体,导致鳗鱼腹部臌胀。与爱德华氏菌病有区别。由运动性 *Aeromonas* ED905 引起的病,还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 中国科学院微生物研究所细菌分类组。一般细菌常用鉴定方法。北京:科学出版社。1978。
- [2] 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。
- [3] 江草周三。鱼病学[感染症、寄生虫病篇]。恒星社厚生阁。1983:97。
- [4] 楠田理一等。高知县兴津湾のボテ病魚かウ分離されに *Edwardsiella tarda* について。日本水产志,1976,42: 271—275。
- [5] 楠田理一等。养殖チダイかウ分離された病原性 *Edwardsiella* の性状について。日本水产志,1977,43(2): 129—134。
- [6] Hisatsugu W, Syuzo E. *Edwardsiella tarda* (*Paracolobactrum anguillimortiferum*) Associated with Pond-Cultured Eel Disease. Bull. Japan. Soc. Fish., 1973, 39(9): 931—936.
- [7] John J Farmer III, Alma C. M. Genus X. *Edwardsiella* Ewing and Mcwhorter 1965, 486—491, In N.R.Krieg and J. G. Holt (ed), Bergey's manual of Systematic bacteriology, Vol.I. Baltimore: The Williams & Wikins Co., 1984.
- [8] Michel P. Genus III. *Aeromonas* Kluyver and Van Niel 1936, 546—548, In N. R. Krieg and J.G.Holt (ed), Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol.I. Baltimore: The Williams & Wikins Co., 1984.

STUDIES ON THE PATHOGENIC BACTERIA OF THE LIVER-KIDNEY DISEASE OF EELS (*ANGUILLA JAPONICA*)

Lu Quanzhang and Zhu Xinling

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract

The liver-kidney disease of pond-cultured eels occurred mainly during periods from February to May and from October to December each year, and caused serious damage to the eel culturing industry in Chaozhou, Guangdong Province. The present paper describes symptoms of this disease and studied characters of its pathogenic organism. Ten strains of pathogenic bacteria were isolated from internal organs of diseased eels. On the bases of morphological and biochemical characteristics, 8 strains of the bacteria were identified as *Edwardsiella tarda*, other 2 as *Aeromonas* sp.

It is suggested that liver-kidney disease of pond-cultured eels in Chaozhou, Guangdong Province be mainly edwardsielliasis caused by *E. tarda*, but occasionally caused by *E. tarda* and a motile *Aeromonas* sp. Therefore, *E. tarda* is the pathogenic bacteria of the liver-kidney disease of the eels.

Key words Liver-kidney disease, Eel, *Edwardsiella tarda*, Edwardsiellosis.