

弧菌 I 组中淡水亚组弧菌引起的虹鳟鱼病*

徐伯亥 李伟 葛蕊芳

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

朱秉仁

(山西省虹鳟鱼实验场, 朔县 038500)

提要 于1985—1986年,以山西省虹鳟鱼实验场的虹鳟病鱼(7—12cm)为材料,进行鱼病研究。从病鱼肝、脾、肾中分离出致病细菌,经分类鉴定为鳗弧菌生物变种 III (新生物变种),隶属于弧菌 I 组中的淡水亚组弧菌。对该菌进行的药物筛选的抑菌试验表明: 62.5 μ g/L 的强力霉素和 100 μ g/L 的鱼安(主要成分为氯代尿酸)有效,同时结合采用井水温度低于自流泉水的措施,此病可得到控制。

弧菌主要是咸水和河口鱼类的一种广泛流行的致病菌,然而,在世界各地淡水养殖的虹鳟 *Salmo gairdneri* 中也有发现。已有不少学者先后研究了虹鳟的弧菌病^[7,9,10,12-14]。在我国,有关弧菌引起的淡水虹鳟鱼病,仅杜佳垠作过一些描述¹⁾。本文系对山西省虹鳟实验场虹鳟鱼种由弧菌致病的研究报告。

一、材料和方法

1. 材料

虹鳟系于1985年采自山西省虹鳟实验场的鱼池中。选取具有典型病症的病鱼进行分离。分离部位为脾、肝、肾。

2. 细胞形态和动力

在普通营养琼脂上,于20 $^{\circ}$ C培养24h的培养物进行动力测定,测量大小,电镜观察。

3. 毒力试验

采用20 $^{\circ}$ C培养24h的斜面培养物,按 McF 浊度管配成一定浓度的菌悬液,以人工腹腔注射的方法感染鱼体。

4. 生理、生化特性测定

生理、生化试验中使用的培养基,试剂的制备与应用等试验方法,除另有说明外,所有菌株均于20 $^{\circ}$ C培养。以 Moeller 方法测氨基酸脱羧酶。以日本产试剂作弧菌抑制剂(0/129)的敏感试验。其他见文献[1],[6],[11]。

* 国家自然科学基金项目。本研究得到李振泉、连义明、武克敬、丁建华、贾泌贤、谢占清、路景舒和朱才宝的大力支持和帮助,特志谢忱。蔡桃珍,吴玉深参加部分工作。

收稿日期: 1988年9月7日。

1) 杜佳垠,1981。虹鳟弧菌病研究 I 发生与病症。鱼病简讯 12: 18—19。

5. 细菌 DNA 中碱基成分的测定

采用苯酚氯仿混合法提取 DNA。DNA 样品纯度的检查,以基本符合纯天然 DNA 的吸光度 (A) 的比例 $A_{260}:A_{230}:A_{280} = 1.0:0.450:0.515$ 为准。细菌 DNA 碱基成分的测定和计算,采用热变性温度法。根据 Mandel 等^[8,2],在 0.1SSC 溶液中的公式 $G + C = (Tm - 53.9)2.44$,计算出 DNA 中 G + C mol%。溶解温度 (Tm) 值的测定,见文献[2]。

6. 药物敏感性试验

青霉素配制 100 单位原液,链、氯、金、土霉素等配制 1000 μg 原液,中草药以煮沸和高压灭菌制备。所有药物均用二倍稀释法测定抑菌浓度。

二、步骤和结果

从病鱼内脏中所分离到的细菌,经初筛后,以毒力较强的 SGS 85-3-2 和 SGL 85-4-2 (以下简称 85-3-2 和 85-4-2) 为代表,进行下列试验。

1. 致病力

(1) 对虹鳟鱼的致病力 85-3-2 和 85-4-2 两株菌的毒力试验表明,其毒力都是比较强的(表 1)。但是 85-4-2 菌株到翌年毒力有所下降。

表 1 85-3-2 和 85-4-2 两菌对虹鳟的人工感染试验结果^①

Tab. 1 Artificial infection test with 85-3-2 and 85-4-2 strains on *Salmo gairdneri*

菌号	试验次数	尾数	日期 (年 月)	死/活比	对照与 死/活比	症状	备注
85-3-2	1	10	1985.8	10/0	0/10	体色发黑,鳃 略白,肝、肠发 炎	跳出一条 跳出一条
	2	10	1985.8	9/0	0/10		
	3	10	1985.8	9/0	0/10		
	4	10	1986.7	10/0	0/10		
	5	5	1986.7	5/0	0/5		
85-4-2	1	10	1985.8	10/0	0/10	体黑,鳃略 白,肝、肠等内 脏发炎	跳出一条
	2	10	1985.8	9/0	0/10		
	3	5	1986.7	5/0	0/5		
	4	5	1986.7	4/1	0/5		
	5	5	1986.7	5/0	0/5		

① 实验鱼体长均在 8—10cm;感染剂量均为 McF 3 号管,0.3ml;平均水温均在 18℃。

(2) 对其他鱼的致病力 85-3-2 菌对白鲢、花鲢、草鱼等均有毒力。当水温在 22℃ 以上时,可使试验鱼于 24h 内全部死光。若将菌液浓度降至 McF 1 号管,注射 0.1ml (相当于 30×10^6 菌/ml),仍能使鱼死亡。

2. 二龄虹鳟的血清学分析

1985 年病后幸存的虹鳟,体内是否形成抵抗此菌的抗体,这对病原菌的确定,是重要的参考依据。对二龄虹鳟血清学的测定(表 2)表明:二龄虹鳟体内存在与 85-3-2 和 85-4-2 两菌的相对应的抗体。可以说明以前曾受过该菌的感染,而主要是由 85-4-2 菌的感染。

表 2 二龄虹鳟抗血清对 85-3-2 和 85-4-2 两菌的凝集效价

Tab. 2 Agglutinating titer of yearling *Salmo gairdneri* antisera to 85-3-2 and 85-4-2 strains

菌号	抗血清					
	一号鱼		二号鱼		三号鱼	
	凝集程度	效价	凝集程度	效价	凝集程度	效价
85-3-2	±	1:80	±	1:80	±	1:40
85-4-2	+++	1:640	+++	1:320	+++	1:640

表 3 85-4-2 菌株与其它几种弧菌的主要性状的比较

Tab. 3 Comparison of chief characteristics of 85-4-2 with *V. anguillarum*, *V. metschnikovii*

性状	85-4-2	I 型鳗弧菌	II 型鳗弧菌	梅氏弧菌 <i>V. metschnikovii</i>
Thornley 培养基	+	+		+
赖氨酸脱羧酶	-	-		d
鸟氨酸脱羧酶	-	-		-
葡萄糖产气	+	-	-	-
L-阿拉伯糖产酸	+	+	-	-
肌醇产气	-	d	-	d
水杨苷产气	+	-	-	-
蔗糖产酸	+	+	-	+
山梨醇产酸	+	+	-	-
V-P	+	+		+
ONPG 水解 ^①	+	+		d
43°C 生长	+	-		d
0/129 抑制剂 ^②	10μg	R	S	S
	150μg	S	S	S
在 NaCl 中生长	6%	-	d	+
	8%	-	-	d
七叶灵水解	-	-		d
NO ₃ ⁻ 至 NO ₂ ⁻	+	+	-	-
G + C mol%	44.65	44-46		44 46

① ONPG: 邻硝基酚 β-D 半乳糖苷;

② 0/129: 2,4 二氨基-6-7 二异二丙基喋啉。d. 反应不同; R. 不敏感; S. 敏感; + 阳性反应; - 阴性反应。表 4 同。

表 4 85-4-2 与弧菌属第 I,II,III 群和副溶血弧菌的性状比较

Tab. 4 Comparison of characteristics of 85-4-2 with group I, II, III and *V. parahaemolyticus*

性 状		类 群				
		85-4-2	I	II	III	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>
群集运动		-	-	-		+
生长温度 (°C)	5	+	+	-	d	-
	30	+	+	+	-	+
	37	+	d	+	-	+
	42	+	-	-	-	+
NaCl (%)	0	+	d	-	-	-
	0.5	+	+	+	-	+
	6.0	-	d	-	-	+
	7.0	-	-	-	-	+
0/129: 150µg		S	S	d	d	d
V-P		+	+	-	-	d
2,3-丁二醇脱氢酶		+	+	-	-	d
β-半乳糖苷酶		+	+	d	d	d
脲酶		-	-	-	-	d
精氨酸水解		+	+	+	+	-
几丁质分解		-	d	d	d	d
赖氨酸脱羧酶		-	-	-	-	+
精氨酸脱羧酶		+	+	-	-	d
鸟氨酸脱羧酶		-	-	-	-	+
蔗糖产酸		+	+	d	d	d
水杨苷		+	-	-	-	d

3. 细菌形态和培养特性

(1) 菌体形态 短杆状, 大小为 $0.6-0.9 \times 1.2-1.6 \mu\text{m}$; 中轴直或稍弯, 两端圆, 两侧弧形; 单极生鞭毛, 无芽胞, 革兰氏染色阴性; 有运动力 (见图 1)。

(2) 培养特性 氧化酶和细胞色素氧化酶测定为阳性。过氧化氢酶测定为阳性。赖氨酸脱羧酶和鸟氨酸脱羧酶测定均为阴性。V·P 试验为阳性。2,3-丁二醇脱氢酶测定为阳性。0/129 弧菌抑制剂敏感性试验, $10 \mu\text{g}$ 不敏感, $150 \mu\text{g}$ 敏感。柠檬酸盐试验、美红试验、明胶液化试验、β-半乳糖苷酶试验及 Thornley 培养基培养试验, 均为阳性。

(3) 碳水化合物利用试验 利用葡萄糖、木糖、麦芽糖、糊精、甘露糖、淀粉、糖原、甘油、纤维糖、阿拉伯糖、山梨醇、水杨苷、甘露醇发酵, 产酸产气; 利用蔗糖、蕈糖发酵, 产酸不产

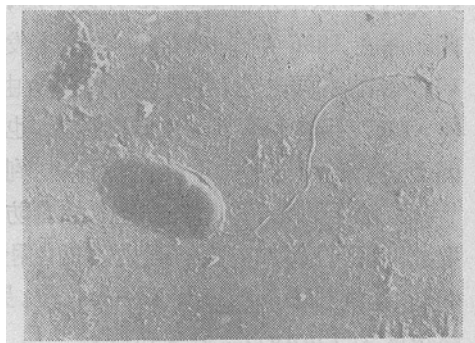


图 1 85-4-2 菌体电镜的照片

Fig. 1 Electron micrograph of strain 85-4-2 ($\times 20100$)

气;不利用菊淀粉、鼠李糖、卫矛醇、阿拉伯醇、七叶灵、肌醇、乳糖、棉子糖。

在 5℃, 43℃ 时均能生长。在无盐培养基中能生长, 在 6.0% 盐时不生长。

4. DNA 中 G + C mol%

85-4-2 菌株的 DNA 提取后, 测定其纯度为 $A_{260}:A_{230}:A_{280} = 1.0:0.441:0.500$, 基本符合天然 DNA 的吸光度比例。

T_m 值为 72.2。 $G + C = 44.65\text{mol}\%$ 。

将以上特性与文献[3]—[5]的鱼类细菌病原中有关弧菌中种的描述相比, 其特性大多与鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 相似。但是从山西省虹鳟实验场的淡水虹鳟中所分离到的这种弧菌, 由于它们具有发酵葡萄糖产气, 发酵水杨苷产酸; 对 150 μg 的弧菌抑制剂敏感; 在无盐培养基中能生长, 在含 6.0% 盐的培养基中不生长; 43℃ 时能生长等特性, 与 I 和 II 鳃弧菌生物变种 (*V. anguillarum* biovar I and II) 有所不同 (见表 3)。鉴于此, 我们将此类细菌定为鳃弧菌生物变种 III (新生物变种) *V. anguillarum* biovar III, biovar nov., 可归于 I 组淡水亚组弧菌 (见表 4)。

5. 药物筛选试验

筛选的药物包括抗菌素、磺胺类、呋喃类、氯代脲酸类和中草药等 30 多种。其中效果较好的有强力霉素和鱼安, 前者抑菌浓度为 62.5 $\mu\text{g}/\text{L}$, 后者为 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

三、讨论和小结

1. 所分离到的病菌, 与鳃弧菌 I 和 II 生物变种相比较, 性状较为相近, 因此, 将其列为鳃弧菌生物变种 III (新生物变种)。

2. 将此菌归于淡水亚组弧菌中之成员, 是根据日本 Riich KUSUDA 等^[10]的分类方法。许多弧菌的新种, 未定种, 亚种和型不断出现, 需要有一个方法来划清它们之间的关系, Riich KUSUDA 等的这一分类方法, 目前能起到一定作用。但为更明确起见, 还需进一步通过分子杂交来完善。

3. 山西省虹鳟实验场于 1985 年 6—9 月间, 当水温上升到 18℃ 以上时, 虹鳟鱼种开始发病, 至秋季水温降至 18℃ 以下后, 才逐渐好转, 显然该致病菌是一种对温度敏感的细菌。而在 1986 年同一时期, 该场未发现与 1985 年相同的疾病。分析其原因, 1986 年与 1985 年的不同之处, 主要在于鱼种池由泉水改为井水, 水温较低, 未能达到 18℃ 以上; 同样, 1987 年整个季节的水温均偏低, 也未出现此病。显而易见, 水温对该病是个极其重要的因素。利用这一生态现象, 可以达到较好的防病目的。

4. 除上述外, 对此病应采取综合防治方法, 特别要注意饵料和池塘的清洁卫生。若暴发此病, 可在饵料中拌以强力霉素, 用量为每公斤鱼, 每天 20—50mg [20—50mg/(kg·d)], 连续投喂药饵 6 天为一个疗程; 另外还可以用“鱼安”全池遍洒作外消, 使池水的最终浓度为 150 $\mu\text{g}/\text{L}$, 效果良好。

参 考 文 献

- [1] 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, 135—185 页。
[2] 林万明、郭兆彪、高树德等。1981。用热变性温度法测定细菌 DNA 中 G + C 含量。微生物学通报 8(5):

- 245—247。
- [3] Austin, B. and D. A. Austin, 1987. Bacterial Fish Pathogenesis: Disease in Farmed and Wild Fish Ellis Horwood Limited, Chichester, pp. 263—287.
- [4] Baumann, P., A. L. Furniss and J. V. Lee, 1984. Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 518—538.
- [5] Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons, 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (8th). Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 340—345.
- [6] Gerhardt, P., R. G. E. Murray, R. N. Costilow et al., 1981. Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, pp. 450—475.
- [7] Giorgetti, G. and G. Ceschia, 1982. Vibriosis in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in fresh water in Northeastern, Italy. *J. Fish Dis.* 5: 125—130.
- [8] Mandel, M., 1966. Deoxyribonucleic acid base composition in the genus *Pseudomonas*. *J. Gen. Microbiol.* 43(2): 273—293.
- [9] McCarthy, D. H., J. P. Stevenson and M. S. Roberts, 1974. Vibriosis in rainbow trout. *J. Wildl. Dis.* 10: 2—7.
- [10] Riich KUSUCA, Hiroshi SAKO and Kenji KAWAL, 1979. Classification of Vibrios isolated from diseased fishes I. On the morphological and biochemical properties. *Fish Pathology* 13(3): 123—137.
- [11] Roberts, M. S., N. R. Krieg, 1981. Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Microbiology, pp. 409—444.
- [12] Ross, A. J., J. E. Martin and V. B. Formerly, 1968. *Vibrio anguillarum* from an epizootic in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Bull. off. Zm. Epiz.* 69 1139—1148.
- [13] Rucker, R. R., 1959. *Vibrio* infections among marine and fresh water fish. *Prog. Fish-Cult.* 21: 22—25.
- [14] Saito, Y., M. Osturu, T. Furukawa, et al., 1964. Studies on an infections disease of rainbow trout. *Acta. Med. Biol.* 11: 267—295.

**VIBRIO GROUP I, FRESH WATER SUBGROUP AS A
CAUSE OF DISEASE IN RAINBOW TROUT,
SALMO GAIRDNERI**

Xu Bohai Li Wei Ge Ruifang

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

Zhu Bingren

(*Rainbow Trout Experimental Hatchery of Shanxi Province, Shuoxian County 038500*)

ABSTRACT

In 1985, a bacterial disease happened to the Rainbow trout fingerling (7—12cm) in the farm of Shuoxian county, Shanxi Province. Seven or eight hundred trout died every day during the peak period of death. The strains isolated from the liver, kidney and spleen of the diseased rainbow trout were shown to be the cause of the disease by infection experiment.

This bacterium is short rod shaped, with a little curved or straight axis and round ends, $0.6—0.9 \times 1.2—1.6 \mu\text{m}$, motile by a single polar flagellum, nonsporulating and Gram-negative. It's positive in fermentation of glucose, catalase, oxidase and arginine hydrolysis, sensitive to vibriostatic agent 0/129 with $150 \mu\text{g}$. Growth occurs in broth without salt (NaCl), but not in broth with 6.0% salt. The mol% G+C of DNA of this bacterium is 44.65(Tm). According to above and other characteristics of this strain and Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, it's considered to be a *Vibrio anguillarum* biovar, III, biovar, nov. belonging to *Vibrio* group I, fresh water subgroup that reported by Riich KUSUCA et al.

The tests of medical control of this bacterium indicated that a dosage of $62.5 \mu\text{g/L}$ Doxycycline and $100 \mu\text{g/L}$ Yu An is effective. Moreover, when the lower temperature well water is used to cultivate trout, this disease can be controlled.