

草鱼细菌性烂鳃病原的研究*

何君慈 邓国成

(珠江水产研究所)

提要 从患细菌性烂鳃病的草鱼病灶分离得滑动细菌 M_{165} , 经多次水中感染(及反复分离、再感染), 能使草鱼及多种池塘鱼类显症、死亡。 M_{165} 的生物学特性与鱼害粘球菌相似, 但不能用 Dworkin 法快速诱生小孢子。该菌 DNA 碱基比为 35.3%, 与粘球菌有明显差异, 采用柱状屈桡杆菌学名 *Flexibacter columnaris* (Davis) Leadbetter。

主题词 草鱼烂鳃病、柱状屈桡杆菌

前 言

细菌性烂鳃病是养殖鱼类的一大病害, 在我国四大家鱼中, 以草鱼和青鱼受害最为严重。广东省每年 3—11 月都有此病流行, 它经常与肠炎病、出血病和赤皮病并发, 构成塘鱼养殖的严重威胁。

国外对此病在 20 年代已有描述^[1-6], 但未分离成功。其后美国、日本相继有人从事此病的研究^[9-12], 分得致病菌, 定名为柱状粒球粘菌 *Chondrococcus columnaris* (Davis) Ordal et Rucker。1974 年伯杰氏 (Bergey's) 细菌鉴定手册第八版改为柱状屈桡杆菌 *Flexibacter columnaris*^[16]。最近我国台湾省发表的有关报导也沿用此名^[8]。

我国科学院水生生物研究所, 1975 年发表《草鱼烂鳃病的研究 I. 细菌性病原的研究》一文, 认为该所分离的病原菌具子实体, 而不同于柱状屈桡杆菌, 并定名为鱼害粘球菌(新种) *Myxococcus piscicola* Lu, Nie & Ko, Sp. nov. 此后国内(除台湾省外)有关记载均采用此学名。

笔者 1979 年从事此项研究, 并从病鱼分离得滑动细菌 20 多株。经感染、筛选从中选出致病力最强的菌株 M_{165} 。

材 料 与 方 法

材料取自本所试验场及附近生产队。选取患明显烂鳃病的草鱼和金鱼 200 多尾, 观察、分离、筛选。

1. 分离方法 以无菌手续直接从病灶取样, 于普通肉汤琼脂和含胰蛋白胨 0.05%

* 本文承中山医学院微生物学教研组白施恩教授及本所钟麟研究员审阅。DNA 碱基比由中山大学生化教研组梁意昭讲师指导, 77 届毕业同学测定; 并蒙广州微生物研究所惠借测定仪器。又承军事医学科学院林万明、郭兆彪同志测定、核实, 特此一并致谢。

的平板上划线分离,置 28°C 恒温培养 2 天。挑取单个菌落,移种肉汤琼脂和 0.5% 胰蛋白胨平板,培养 24 小时后镜检。已分纯的接种扩大,24 小时后人工感染。

2. 感染方法 选用全长 9—14cm 健康草鱼,感染前经 1% 盐水浸泡半小时。分别通过三条途径感染:(1)肌肉注射。于背鳍基每尾注射菌液 0.2ml,放水族箱观察;(2)水中感染。在清水中加入 24 小时培养的菌液,使其含菌浓度为 2—6 万个/ml,放入健康试验鱼;(3)涂鳃。以棉籤蘸取菌苔,直接涂布鳃瓣,放入水族箱观察。

感染过程,水温保持在 19—35°C 范围内,并以空气压缩机向水体压送空气,使水体含氧量始终保持 8mg/L 左右。

3. 菌种保存 用含糖 10% 的脱脂奶作保护剂,经真空冷冻干燥后,放冰箱(5—10°C)保存。

4. 生理生化测定 基本按科学院水生生物研究所鱼病研究室报导方法进行^[1]。

5. 小孢子诱发 基本按 Dworkin M. & S. M Gibson 方法^[17]。在液体培养达对数生长阶段加入甘油和硫酸镁,使其最终浓度达 0.5M 和 0.008M,2 小时后观察。

6. 提取 DNA 及测定碱基比 按林万明等报导方法^[4,6,7]。用 SDS 溶菌,以 Unican SP8—250 型紫外分光光度计自动扫描记录;用半导体点温计直接测量比色杯中样品的温度,并以 25°C 时的吸光率校正;以大肠杆菌对照检查测定值;缓冲液采用 ISSC,按公式 $G-C = (T_m - 69.3) \times 2.44$ 计算。

7. 药物敏感试验 采用纸片法,试管稀释法和鱼体法。

结 果

(一) 病原性试验

先后从患烂鳃病的草鱼及金鱼的病灶、体表及鳍条上,分离得滑动细菌 20 多株,真细菌 50 多株。人工感染结果;真细菌只能通过注射方法,使草鱼致死。死鱼注射部位红肿溃烂,但不显烂鳃症状。而滑动细菌大多能在水中直接感染健康草鱼,使其发病、显症、死亡。故细菌性烂鳃病的主要病原为滑动细菌。见表 1。

以上试验设两组对照:一组为不加菌的自来水,另一组为该菌液体培养 24 小时后的除菌滤液。其用量与试验菌液浓度相当。结果对照鱼均正常。

通过多次人工感染及反复分离、感染,证明 M_{100} 为其中致病力最强的菌株。该菌的含菌量达 2—6 万个/ml 时,能使当年草鱼或一冬龄草鱼致病、死亡。同时对池塘中的鲢、鳙、鲮、鲫、罗非鱼、黄尾密鲷、纹唇鱼及鳊鲂等具有不同程度的致病性。见表 2、表 3。

从 M_{100} 感染发病的草鱼病灶,可以重新分得致病滑动细菌;再感染,同样可见鳃丝呈现白斑点,粘液增多,鳃丝骨弯曲变形,鳃瓣、体表及鳍条粘附大量坏死细胞及滑动细菌的混合物,和自然界烂鳃病鱼的症状相似。

M_{100} 菌悬液与自然界单一烂鳃病鱼的血清有凝集反应。

(二) 病原菌的特性

1. 形态特征 M_{100} 具有滑动细菌一般特有的柔韧、可屈挠的特性。菌体细长,大小

表 1 真细菌及滑动细菌感染草鱼的情况
Table 1 The state of grass carp infected by true bacteria and gliding bacteria

试验日期 Experimental date	菌号 ⁽¹⁾ No. of bacteria	不同感染方法的死亡率 ⁽²⁾ Mortality by different infected methods			感染后的症状 Symptoms after infection
		注射感染 Injection	涂鳃感染 smearing gills	水中感染 infected in water	
1979.5.28	M ₃₄	5/5	4/5	8/10	注射部位红肿; 鳃丝粘液多并出现白斑和黄色菌团; 鳍条、眼眶、咀边有坏死细胞及细菌粘附。 Injected position swollen; gill filaments produced slime, white speckles and yellow bacteria masses; the fin rays, orbits and mouth with necro-cells and bacteria
1979.10.18	M ₁₅₇	0/10	10/10	10/10	
1979.10.31	M ₁₅₅	0/5	5/5	5/5	
1979.12.3	M ₁₈₇	0/5		4/5	
1979.12.24	M ₁₉₇	0/5		5/5	
1979.8.1	E ₃₁	5/5	0/5	0/5	注射部位红肿, Injected position swollen
1979.8.1	E ₃₅	5/5	0/5	0/5	
1979.8.27	E ₂₀	3/5	0/5	0/5	
1979.9.4	E ₁₀₁	5/5	0/5	0/5	
1979.9.18	E ₁₂₇	5/5	0/5	0/5	

(1) M——滑动细菌(gliding bacteria); E——真细菌(true bacteria)。

(2) 死亡鱼数/试验鱼数(dead fish/testing fish)。

表 2 不同规格草鱼经 M₁₆₅ 感染的情况⁽¹⁾
Table 2 The states of grass carp in different size infected by M₁₆₅⁽¹⁾

试验日期 Experimental date	试验鱼规格 Experimental fish size		死亡率 ⁽²⁾ Mortality	感染后症状 Symptoms after infection
	鱼龄 Fish age (year)	体长 body length (cm)		
1979.10.31	1	12	5/5	14小时后全部死亡; 鳃丝呈现白斑点; 多粘液。 All fish died after infected for 14 hours; the gill filaments produced white speckles and a lot of slime.
1979.11.2	1	12	5/5	15小时后死2尾, 16小时死2尾, 22小时死1尾, 均烂鳃。 2 fish died after infected for 15 hrs. and 2 died after 16 hrs., 1 died after 22 hrs; the gill filaments of all were rotted.
1981.5.26	1	6	3/3	体表及鳍条均附有病原菌及坏死细胞。 The body surface and fin rays with pathogenic bacteria and necro-cells.
1981.6.25	1	12	5/5	20小时内全部死亡, 烂鳃。 All infected fish died within 20 hrs.; gills rotted.
1980.6.7	2	24	5/5	18小时内全部死亡, 烂鳃。 All infected fish died within 18 hrs.; gills rotted
1980.11.4	2	28	5/5	22小时内全部死亡 All infected fish died within 22 hrs.; gills rotted.
1981.10.31	2	28	5/5	18小时内全部死亡, 烂鳃。 All infected fish died within 18 hrs.; gills rotted.

(1) 每次试验均有同规格鱼对照, 对照鱼全部正常(To contrast the control fish groups were designed in every experiment, all control fish were healthy)。

(2) 死亡鱼数/感染鱼数(number of dead fish/number of experimental fish)。

表3 不同鱼类受 M_{165} 感染后的情况
Table 3 The states of different fish infected by M_{165}

试验日期 Experimental date	鱼类 Species	体长 Body length (cm)	死亡率 ⁽¹⁾ Mortality	感染后症状 Symptom after infection
1979.11.14	罗非鱼 <i>Tilapia mossambica</i>	12	2/2	感染后24小时死亡1尾,47小时死亡1尾。 1 fish died after infected for 28 hrs., other one died at 47 hrs.
1980.3.26	团头鲂×三角鲂杂交鱼 <i>Megalobrama amblycephala</i> × <i>M. terminalis</i>	20	2/2	22小时死1尾,29小时死1尾。 1 fish died after infected for 22 hrs., and other one died at 29 hrs.
1980.3.26	纹唇鱼 <i>Osteochilus vittatus</i>	7	2/2	36小时死1尾,50小时死1尾。 1 died at 36 hrs. other one died at 50 hrs.
1980.3.26	黄尾密鲴 <i>Xenocypris davidi</i>	16	1/1	20小时死亡。 Died at 20 hrs.
1980.5.27	草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	4—16	16/16	24小时死8尾;26小时死2尾,29小时死1尾,31小时死完。 8 fish died after infected for 24 hrs, 2 fish died at 26 hrs, 1 fish died at 29 hrs. other four fish died at 31 hrs.
1980.5.27	鲫鱼 <i>Carassius auratus</i>	7	6/6	29小时死1尾,40小时死完。 One fish died after infected for 29 hrs. other 5 fish died at 40 hrs.
1980.5.27	鲢 <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	24	2/2	25小时死1尾,31小时死1尾。 1 fish died at 25 hrs. other 1 died at 31 hrs.
1980.7.8	鳊 <i>Aris tichthys nobilis</i>	28	2/2	19小时死1尾,35小时死1尾。 1 fish at 19 hrs. and other at 35 hrs. was died
1980.7.8	塘鲺 <i>Rhodeus ocellatus</i>	4	2/2	19小时全部死亡。 All fish died at 19 hrs.
1981.5.25	鳊 <i>H. nobilis</i>	12	2/2	52小时全部死亡。 All fish died after infected for 52 hrs.
1981.5.27	鲮 <i>Cirrhina molitorella</i>	4—7	4/4	

(1) 死亡鱼数/感染鱼数(dead fish number/experimental fish number)。

约为 $0.5 \times (4 \sim 48) \mu\text{m}$ (见图1)。一般在病灶及固体培养基上较短,长度均一;在液体中培养的个体较长。液体培养2—3天后,有些横裂成杆状或缩成球形的球质体,最后球质体逐渐增多而衰老死亡。菌体没有鞭毛,但在湿润固体上可作鳍状滑行,有团聚的特性。革兰士染色阴性。

菌落黄色,扩散型,大小不一,中央较厚,显色较深,向四周扩散成较浅色的假根状(见图2)。有时在液体接入固体培养的平板中,可见单个或多个成堆的疣状突起。将疣状突起及菌苔分别接种于0.5胰胨平板上或0.5胰胨液体中,其结果表明,20日以内的疣状突起及菌苔均可长出滑动细菌。26日以上的疣状突起,均无新菌落长出。又以26日后的疣状突起接种于兔粪液中培养,结果同样无新菌落长出。

用诱发小孢子的 Dworkin-Gibson 法诱生细菌小孢子,结果2小时、4小时、6小时后



图 1 M_{165} 的菌体形态(1000x)

Fig1 Organism morphology of M_{165} (1000x)

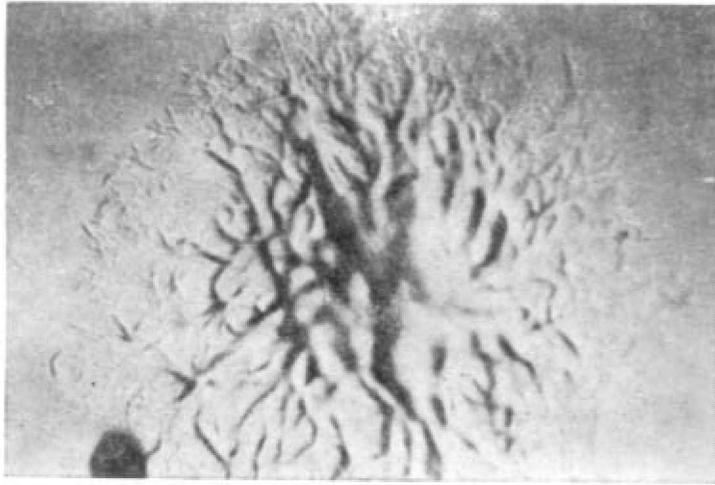


图 2 M_{165} 的单个菌落形态(80x)

Fig2. Single Colony morphology of M_{165} (80x)

观察均无小孢子产生。

2. 生长条件及生理生化特性 生长的最适温度是 28°C , 37°C 可生长, 但 5°C 以下不生长。培养基中 NaCl 含量超过 0.6% 不生长, pH 范围 6.5—8。好气。其生理生化特性见表 4。为方便比较, 表中同时列出鱼害粘球菌及柱状屈梭杆菌的特性。

3. DNA 中碱基比 M_{165} 的 DNA 在 ISSC 缓冲液中热变性温度 (T_m) 为 83.8°C 。G—C% = 35.3%。 M_{165} 的 DNA 热变性测定扫描和 M_{165} 的 DNA 热变性曲线, 见图 3 和图 4。

表4 M_{165} 的生化测定
Table 4 Biochemical determine of M_{165}

结果 Result	菌株 Bacteria species	M_{165}	鱼害粘球菌* <i>Myxococcus piscicola</i>	柱形屈绕杆菌 <i>Flexibacter columnaris</i>
试验名称 Test				
分解酪素 (Casein)		+	+	+
分解明胶 (Gelatin)		+	+	+
过氧化氢酶 (Catalase)		+	+	+
硝酸盐还原 (Nitrate)		+	+	-
硫化氢试验 (H_2S)		±	-	+
分解七叶灵 (Aesculin)		-	-	-
分解纤维素 (Cellulose)		-	-	-
分解几丁质 (Chitin)		-	-	-
分解酪氨酸 (Tyrosine)		-	-	-
分解淀粉 (Starch)		-	-	-
利用枸橼酸盐 (Citric acid)		-	-	-
吲哚试验 (Indol)		-	-	-
溶菌试验 (Bacteriolysis)		-	-	-
大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)		+	-	+
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphy aureus</i>)		-	-	-

* 鱼害粘球菌菌种由中国科学院水生生物研究所提供。

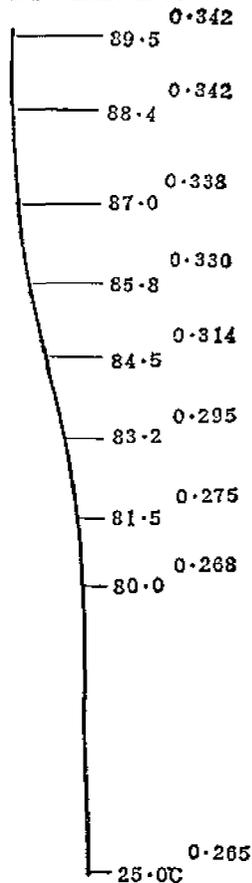


图3 M_{165} 的 DNA 热变性测定扫描
Fig3 Determinative scan of DNA thermal denaturation of M_{165} .

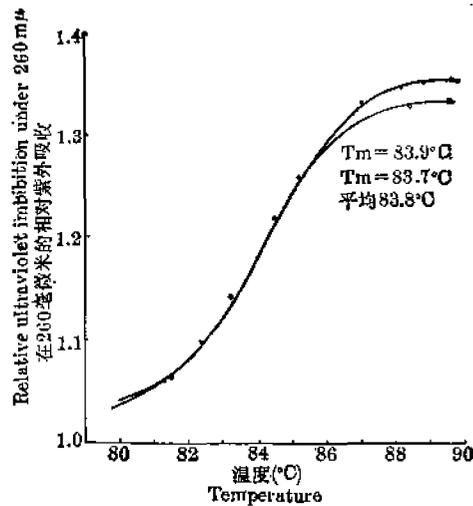


图4 柱状屈绕杆菌 M_{165} 的 DNA 热变性曲线
Fig4 Determinative curve of DNA thermal denaturation *Flexibacter columnaris* M_{165} .

4. 药物敏感试验 试验结果表明, $M_{1.65}$ 对多种抗菌素、呋喃类、磺胺类药物及中草药敏感, 其中红霉素 0.04 单位/ml, 氯霉素 0.1 单位/ml、青霉素和土霉素 0.2 单位/ml、呋喃西林 0.4ppm、磺胺噻唑 1ppm 对该菌均有抑制作用。对 1:5160 至 1:1280 的大黄、黄柏、乌柏、五倍子敏感。而对 20ppm 碳酸钠、敌克松、石灰和 5ppm 敌百虫不敏感。

讨 论

国外记载, 与鱼类疾病有关的滑动细菌均为噬纤维菌 (Cytophagaceae)^[9,11]。我国水生生物研究所, 又提出鱼害粘球菌新种 *Myxococcus piscicola* Lu, Nie & Ko, Sp. nov.^[11], 即以此菌具子实体和小孢子而别于噬纤维菌。此后国内 (除台湾省外) 有关细菌性烂鳃病的报导, 均沿用鱼害粘球菌学名^[2]。

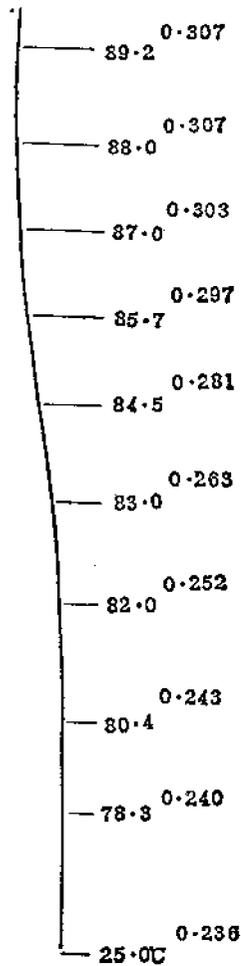


图5 鱼害粘球菌 G_4 的 DNA 热变性测定扫描
Fig5 Determinative scan of DNA thermal denaturation of *Myxococcus Piscicola G_4*.

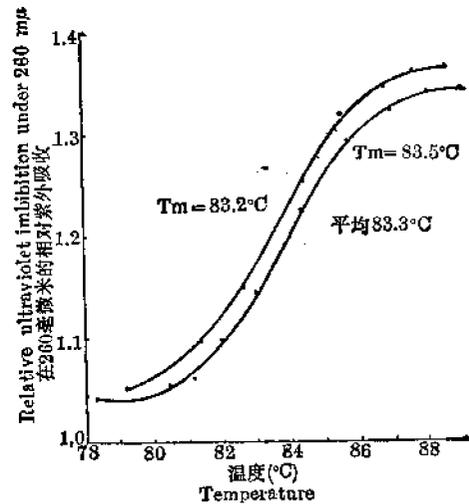


图6 鱼害粘球菌 G_4 的 DNA 热变性曲线
Fig6. Determinative curve of DNA thermal denaturation of *Myxococcus piscicola G_4*.

在 260 毫微米的相对紫外吸收

Relative ultraviolet absorption at 260 μm

温度: Temperature

平均 Average

笔者自烂鳃病鱼分得病原菌 $M_{1.66}$ 以来,曾对该菌和鱼害粘球菌的形态特征、生长条件和生理生化特性,作了一系列比较测定。结果两菌和文献记载的柱状屈柄杆菌 *Flexibacter columnaris* (Davis) Leadbetter 相似。而作为分类鉴定标准的子实体和小孢子,同样存在不规律现象^[1]。以 Dworkin 等快速诱生小孢子方法诱导,均无小孢子发生。为说明它们的亲缘关系和分类位置,特提取了在生物性状遗传中起主导作用的物质——DNA,并测定了 DNA 中碱基比(G—C%)。结果表明, $M_{1.66}$ 和鱼害粘球菌分别为 35.3% 和 34.1%(见图 3—图 6)均符合噬纤维菌的屈柄杆菌范围,与粘球菌属(68~71%)有显著差异。同时,又根据两菌均具有类胡萝卜素、不分解琼脂、纤维素和几丁质,细胞无鞘而又寄生于鱼类等系列特点。故认为对细菌性烂鳃病病原菌采用柱状屈柄杆菌 *Flexibacter columnaris* (Davis) Leadbetter 学名为宜。

参 考 文 献

- [1] 湖北省水生生物研究所鱼病研究室,1975. 草鱼烂鳃病的研究 I, 细菌性病原的研究。水生生物学集刊, (5):315—334。
- [2] 陈月英等,1979. 从淡水养殖鱼上分离的粘细菌的菌种鉴定。全国鱼病技术总结暨经验交流会资料汇编。
- [3] 郭上卿等,1981. 鱼类滑动性细菌之鉴定与病原性之研究。养鱼世界, (8):35—46。
- [4] 周慧玲,1978. 北京棒状杆菌等五种细菌的 DNA 中 G—C 含量的测定。微生物学报, 18(2):134—139。
- [5] ——,1978. 细菌分类学中的碱基对测定法介绍。微生物学通报, 5(5):39—41。
- [6] 广东省水产研究所淡水研究室,1976. 几种草鱼病(赤皮、烂鳃、肠炎)的免疫试验。全国鱼病防治技术总结暨经验交流会资料汇编。
- [7] 林万明等,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):245—247。
- [8] 王大相编著,1977. 细菌分类基础,科学出版社。
- [9] Ordal, E. J. and R. R., Rucker 1944. Pathogenic Myxobacteria. *Proceeding of the society for experimental biology and medicine*. 56(1): 15—18.
- [10] Beebe, J. M., 1941. The morphology and Cytology of *Myxococcus Xanthus* N. Sp. *Ibid*, 42: 193—223.
- [11] Wakabayashi, H. and Syuzo Egusa, 1966. Characteristics of a myxobacterium, *Chondrococcus Columnaris*, isolated from diseased Loaches, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 32: 1015—1021.
- [12] Wakabayashi, H. K. Kira and Syuzo Egusa, 1970. Studies on Columnaris disease of Pondcultured Eels—I Characteristics and Pathogenicity of *Chondrococcus Columnaris* isolated from pond Cultured Eels, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 36(2): 147—155.
- [13] Pacha, R. E. and Sook Porter, 1968. Characteristics of *Myxolaeleria* isolated from the surface of freshwater fish. *App. Micro*, 16(12): 1901—1906.
- [14] Breed, R. S. S. G. D. Murray and Smith N. R., 1957, *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 7th ed, Bailliere, Tindall and Cox, Ltd, London.
- [15] Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons, (eds), 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8th ed, Williams, Co. Baltimore.
- [16] Pacha, R. E. and E. J. Ordal, 1970. Myxobacterial diseases of salmonids. A Symposium on disease of Fishes and Shellfish. *Am. Fish. Soc. Special Pub.*, (5): 243—257.
- [17] Dworkin, M. and S. M., Gibson 1964. A System for Studying microbial morphogenesis: Rapid formation of microcysts in *Myxococcus xanthus*. *Sci.*, 146(3641): 243—244.

A STUDY ON PATHOGENIC BACTERIA OF GILL ROTE DISEASE OF GRASS CARP

He Junci and Deng Guoqeng

(*Pearl River Fisheries Research Institute*)

ABSTRACT Gliding bacteria M_{165} was isolated from roted gill of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). It is capable of infections and even causing death to the fish as well as to other pond fishes through multi-infections in water. The biological characteristics of M_{165} resembles *Myxococcus piscisola*, but it could not quickly produce microspore by Dworkin's method. DNA (G + C) of the bacteria is 35.3%. Quite different from *Myxococcus*, it should belong to *Flexibacter columnaris*.

KEY WORDS Gill rote disease of grass carp, *Flexibacter columnaris* (Davis)
Leadbetter