

加州鲈鱼(*Micropterus salmoides*)细菌性 烂鳃、烂嘴病原菌的研究

邓国成 姜 兰 许淑英 李焕林

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广州 510380)

摘 要 本文报道从患细菌性烂鳃、烂嘴的加州鲈鱼(*Micropterus salmoides*)病灶中分离到滑动粘细菌 F₅、F₂₅, 经多次水中感染(包括再分离和再感染), 能使健康的加州鲈鱼及多种池塘鱼类致病、死亡。根据其生物学特性及质粒 DNA 电泳分析, 两株菌属同一个种, 定名为柱状纤维粘细菌(*Cytophaga columnaris*)。

关键词 加州鲈鱼, 烂鳃病, 烂嘴病, 柱状纤维粘细菌

有关柱状纤维粘细菌(*Cytophaga columnaris*)引起鱼类烂鳃及皮肤性疾病。国外文献早年就有记载^[4], 但未分离成功。其后美国、日本相继有人从事此病的研究^[5,6], 分得致病菌, 定名为柱形粒球粘菌(*Chondrococcus columnaris* (Davis) Ordal & Rucker), 1974 年伯杰氏(Bergey's)细菌鉴定手册第八版将之改为柱状屈挠杆菌(*Flexibacter columnaris*)。其后各国发表有关的报道也沿用此名, 1989 年伯杰氏(Bergey's)细菌鉴定手册第九版^[7]又作了修改, 列称为柱状纤维粘细菌(*Cytophaga columnaris*)。

国内对柱状纤维粘细菌引起鱼类疾病曾有报道^[1,2], 并从患烂鳃病的草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)中分离出此菌。

加州鲈鱼是 80 年代从国外引进的名特优新品种, 近年来细菌性烂鳃、烂嘴病已构成池塘、网箱养殖的一大病害, 池塘死亡率高达 60%, 此病的研究国内外尚未见有报道。

笔者从病鱼病灶中分离得病原菌 40 多株, 并对其中毒力最强的菌株 F₅(从烂鳃病灶分离)和 F₂₅(从颌齿端表皮糜烂处分离)进行了研究。

材 料 与 方 法

(一)材料来源

材料取自广东省的南海、顺德、中山、佛山、肇庆、花都、珠海市斗门县以及新丰江水库等

收稿日期: 1995-02-27。

地的池塘、网箱的发病鱼,挑选患明显烂鳃、烂嘴的加州鲈鱼 30 多尾进行观察、分离、筛选。

用作感染试验的健康加州鲈鱼均为本课题组自繁自育。

(二) 分离方法

以无菌手续直接从病灶取样,于胰蛋白胨培养基(胰蛋白胨 0.05%,酵母膏 0.05%,牛肉膏 0.02%,醋酸钠 0.02%,琼脂 1.5%,pH7)平板上划线分离,置 28℃ 恒温培养 2—3 天后,根据菌落特征挑取单个菌落接到 0.5% 胰蛋白胨平板上,24h 后镜检,已分离纯的菌种接种到 0.5% 胰液液体中培养,24h 后开始人工感染和其它方面的观察。

(三) 感染方法

(1) 浸泡感染:在已知水量的水族箱中加入一定量的菌液,使其含菌浓度 10 万菌/毫升左右,然后放入健康的试验鱼,观察其发病情况。

(2) 肌肉注射:每尾注射剂量(规格 8cm)相当于 3 号比浊管(MCF)0.3ml 菌液,放水族箱观察。

(四) 生理生化测定

基本依照 Pacha(1968)及水生生物研究所鱼病研究室列之方法^[1]进行各项生化试验。

(五) 质粒 DNA 含量电泳分析

质粒 DNA 分离参照《生物技术》DNA 重组技术(1)——小量快速提取质粒 DNA 的方法^[3]。琼脂糖凝胶浓度为 1.5%,缓冲液 0.5×TBE, pH 8, 电流 6mA, 电压 20V, 电泳时间 10—12h。

(六) 菌种保存

28℃ 培养 24h 后,用含糖 10% 的脱脂牛奶洗下,经真空冷冻干燥后,放冰箱 7℃—10℃ 保存。

(七) 药物敏感性试验

采用纸片法和试管法筛选敏感药物,测定细菌敏感性纸片分别由浙江省军区后勤部卫生防疫站,杭州微生物试剂厂生产。

结 果

(一) 病原性试验

从 1992 年开始,先后从 30 多尾患明显烂鳃、烂嘴病的加州鲈鱼病灶中分离得病原菌 40 多株,经人工浸泡感染,所分离的大部分菌株都不同程度使健康的加州鲈鱼致病、显症、死亡。其中 F₅ 和 F₂₅ 菌株毒力最强(见表 1),又从 F₅、F₂₅ 感染发病的加州鲈鱼病灶中再重新分离得柱状纤维粘细菌和再感染健康鱼,同样显示强的致病性,能使健康的加州鲈鱼烂鳃、唇端表皮发炎、糜烂以及在鳍条、体表粘附有大量的坏死细胞和粘细菌混合物,与自然发病鱼相似,而注射感染除注射部位红肿发炎外,没有出现上述的症状。

以 F₅ 为代表再进一步感染其它池养鱼类,也能感染草鱼、金鱼、鳊鱼、鳙鱼、斑点叉尾鮰等多种鱼类并有不同程度的致病性(见表 2)。

又从 F₅、F₂₅ 菌株人工感染显症鱼的病灶中挑取少许组织块在显微镜下观察,可见到大量成“柱子”的粘细菌,与观察自然发病鱼的病灶活菌一致(见图 1—2)。

表 1 F_5 、 F_{25} 菌株感染加州鲈鱼情况Table.1 The state of *Micropterus Salmoides* infected in water by F_5 , F_{25}

菌号 Bacteria number	试验日期 Experimental date	试验鱼规格 (厘米) Experimental fish size(cm)	死亡鱼数/实验尾数 Die of disease/Total	感染后症状 Symptom after infection
F_5	1992.9.3	7-10	5/5	22h 死 5 尾, 烂鳃及唇端表皮、体表、鳍条附着许多粘细菌。 5 fish died at 22hrs. gills rotted and lip, body surface, fin rays with many pathogenic bacteria.
	1993.5.7	18-19	5/5	24h 死完, 症状同上。 All fish died at 24hrs, symptom is the same.
	1995.5.10	18-19	4/5	22h 死 4 尾, 症状同上。 4 fish died at 22hrs, symptom is the same.
F_{25}	1994.8.10	7-8	5/5	26h 死完, 烂鳃及唇端表皮发炎、糜烂, 鳍、体表附有许多粘细菌。 All fish died at 26hrs, gills rolled and lip inflamed, gill and body surface with many pathogenic bacteria.
	1994.8.15	8	5/5	24h 死完, 症状同上。 All fish died at 24hrs, symptom is the same.
	1994.8.25	7-8	5/5	28h 死完, 症状同上。 All fish died at 28hrs, symptom is the same.
F_{5-1}	1992.8.20	18	5/5	28h 死完, 鳃丝及唇端, 体表、鳍条附有许多粘细菌。 All fish died at 28hrs, gill filaments, lip, body surface and fin rays with many pathogenic bacteria.
F_{25-1}	1994.8.29	5-7	5/5	24h 死 5 尾, 烂鳃及唇端表皮发炎, 体表附有许多粘细菌。 5 fish died at 24hrs, gills rotted and lip inflamed, body surface with many pathogenic bacteria.
	1994.8.30	5-7	5/5	28h 死完, 症状同上。 All fish died at 28hrs, symptom is the same.

注: 1. F_{5-1} , F_{25-1} 是从 F_5 和 F_{25} 菌株人工感染显症后再分离的菌株。

2. 以上试验每次均有对照, 对照鱼正常。

Notes: 1. F_{5-1} , F_{25-1} were reisolated bacteria from the fish being infected.

2. To contrast, the control fish groups were designed in every experiment, all control fish were healthy.

表 2 F₅ 浸泡感染各种鱼的情况Table 2 The states of different fish infected by F₅

试验日期 Experimental date	感染鱼种类 Fish species	体长(厘米) Length (cm)	死亡鱼数/感染鱼数 die of disease/Total	感染后症状 Symptom after infection
1992.9.16	草 鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	12	5/5	20h 死完, 烂鳃。 All fish died at 20hrs, gills rotted.
1993.4.27	鳗 鱼 <i>Anguilla</i>	20	4/5	18h 死 1 尾, 22h 死 3 尾, 鳃、鳍条、 体表附有许多病原菌。 1 fish died at 18hrs, 3 fish died at 22hrs, gills, fin rays and body surface with many pathogenic bacteria.
1993.5.10	加州鲈鱼 <i>Micropterus salmoides</i>	18	5/5	24h 死完, 烂鳃及体表附有许多病 原菌。 All fish died at 24hrs, gills rotted and body surface with many pathogenic bacteria.
1993.5.10	斑点叉尾鮰 <i>Ictalurus punctatus</i>	14	3/5	24h 死 3 尾, 鳃、体表附有许多病 原菌。 3 fish died at 24hrs, gill and body surface with many pathogenic bacteria.
1993.5.7	鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	5	5/5	24h 死完, 烂鳃。 All fish died at 24hrs, gills rotted.
1993.8.2	鲮 <i>Simiperca chautsi</i>	14	2/3	20h 死 2 尾, 烂鳃。 2 fish died at 20hrs, gills rotted.
1992.12.8	金 鱼 <i>Crassius auratus</i>	5	3/3	20h 死完, 烂鳃。 All fish died at 20hrs, gills rotted.
1993.5.7	红剑鱼 <i>Xiphophorus helleri</i>	4	5/5	24h 死完。 All fish died at 24hrs.



图1 自然发病鱼活菌(×400)

Fig.1 Bacteria of diseased fish in natural environment (×400)



图2 人工感染显症后的 F_5 活菌(×400)

Fig.2 Bacteria F_5 of diseased fish in artificial infection (×400)

根据以上的试验,我们认为 F_5 、 F_{25} 菌株是引起加州鲈鱼烂鳃和烂嘴病的致病菌。

(二)病原菌特征

1. 形态特征

以 F_5 为代表说明,具特有的柔韧、可屈挠的特性,菌体细长,粗细基本一致,无鞭毛,两端圆,革兰氏阴性,在 0.5% 液体培养基培养 18h 负染电镜观察,大小约 $0.5 \times 6 - 12$ 微米。(见图 3)。

液体培养有团聚的特性,在培养 24h 后,可看到液体表面有一层粘状的菌膜,摇碎菌膜时,往往粘在培养瓶壁上。若菌体从胰脏液中挑出放在载玻片上观察,能看到缓慢的滑行。

菌体培养到 4 天以后开始老化, 缩短, 有些缩成球状而衰老死亡。



图 3 F_5 单个菌体透射电镜观察($\times 5800$)

Fig.3 Observe the single bacterium of F_5 by transmission EM ($\times 5800$)

菌落黄色, 最初与琼脂的颜色相似, 粗看不易发现, 当培养 36h 后, 渐现淡黄色, 以后随培养日龄的增加而菌落扩大, 菌层增厚, 颜色变深黄, 单个菌落的轮廓像一朵菊花, 中央较厚, 边缘象树根一样向四周扩散(见图 4)。有时从液体培养的菌接入固体培养的平板中可见有单个或多个成堆疣状突起, 将该疣突及菌苔分别接到 0.5% 胰酶液体, 又重新长出细菌。菌落的大小与培养基中的胰蛋白胨和琼脂含量有相关关系(见图 5-6)。

2. 生长条件及生理生化特性

生理特性: 最适温度为 25°C — 28°C , 35°C 可生长, 5°C 以下不生长, pH 范围 6.5—8, 好氧, 培养基中 NaCl 含量超过 0.5% 不生长。

生化特性: 本菌具有不分解琼脂、纤维素及几丁质等特点(见表 3), 为方便比较, 同时表中列出柱状屈挠杆菌(*Flexibacter columnaris*)作比较。



图 4 F_5 单个菌落形态($\times 80$)

Fig.4 Single colony morphology of F_5 ($\times 80$)

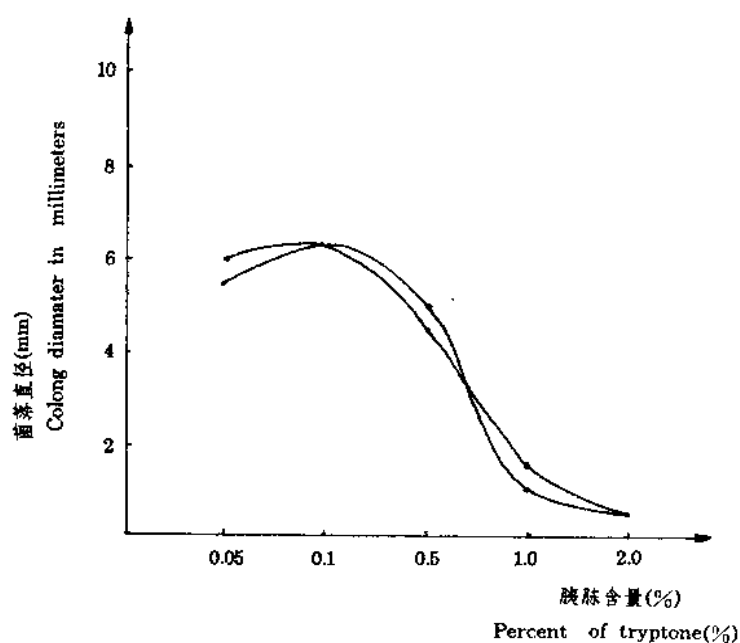


图5 胰胨含量不同,菌落变化情况

(琼脂 1.5%, 28℃ 观察 96h)

Fig.5 Effect of increasing tryptone concentrations on F_5 , F_{25}

(In 1.5% agar, at 28℃ for 96hrs)

表3 F_5 、 F_{25} 的生化测定Table 3 Biochemical determine of F_5 , F_{25}

试验名称 Test	菌株 Bacteria sprces	结果 Result	F_5	F_{25}	柱状屈挠杆菌 (<i>Flexibacter columnaris</i>)
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)			-	-	-
靛基质(吲哚试验)(Indol)			-	-	-
利用枸橼酸盐(Citric acid)			-	-	-
葡萄糖利用(产气)(Glycose)			-	-	-

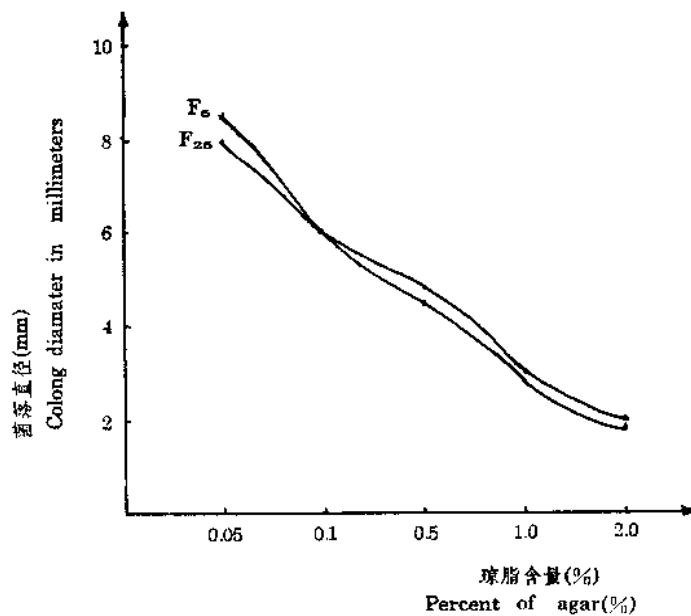


图6 琼脂含量不同, 菌落变化情况

(胰酶 0.5%, 28℃ 观察 96h)

Fig. 6 Effect of increasing agar concentrations on F₅, F₂₅

(In 0.5% tryptone, at 28℃ for 96hrs)

3. 质粒 DNA 含量分析

在电泳过程中以草鱼烂鳃病原菌 M₁₆₅ (*Flexibacter columnaris*) 作比较。以 λDNA/BstEII 为对照, 从图 7 的结果可以看出, F₅、F₂₅、M₁₆₅ 均只有一条染色体带, 且带的位置都一致, 说明它们不含任何内源质粒, 从多次提取的结果看 F₅、F₂₅ 的带不管在位置上还是在含量上均很一致, 两者应属同一个种。而 M₁₆₅ 的带虽与 F₅、F₂₅ 的位置一致, 但含量 (包括 DNA、RNA 和蛋白质) 均看出差别, 故推测 M₁₆₅ 与 F₅、F₂₅ 很可能存在个体间的差异, 是否如此, 有待再进一步进行分子杂交试验。

4. 药物敏感性试验

结果表明, F₅ 和 F₂₅ 均一致, 对多种抗菌素敏感, 红霉素抑菌效果最好, 最低有效剂量 0.04 微克/毫升, 其次是氟哌酸和洁霉素, 有效剂量为 0.06 微克/毫升 (见表 4)。

讨 论

1. 所分离的菌株 F₅ 和 F₂₅ 与自然发病鱼的细菌一样, 在显微镜下观察, 容易看到群集成“柱子”的细菌。0.5% 胰蛋白胨培养 24h 后形成黄色的假树根状菌落, 不产生子实体。液体培养菌体长短均匀。生化反应显示不分解琼脂、几丁质、纤维素和酪氨酸。质粒 DNA 电泳图谱分析, 它们只有一条染色体带, 说明同属一个种。从形态、生理和生化反应以及致病性, 它们都与柱状屈挠杆菌 (*Flexibacter columnaris*) 相同。根据伯杰氏 (Bergey's) 细菌鉴定手册第九版, 本病的致病菌定名为柱状纤维粘细菌 (*Cytophaga columnaris*)。

图7 F_5 、 F_{25} 菌株质粒 DNA 电泳图谱(A- F_5 、B- F_{25} 、C- M_{165} 、D- Marker λ DNA/BstE II)Fig.7 Electrophoretic patterns of F_5 , F_{25} (A- F_5 、B- F_{25} 、C- M_{165} 、D- Marker λ DNA/BstE II)表4 F_5 、 F_{25} 菌株对药物的敏感性测定Table 4 Determine sensitivity of F_5 , F_{25} to different medicines

药名 Medicine	浓度 ppm									
	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.08	0.06	0.04	0.02
红霉素(Erythromycinum)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
氯霉素(Chloramphenicolum)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
复方新诺明(Sulfamethoxazol, Compositae)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
洁霉素(Lincornycinum)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
氟哌酸(Norfloxacin)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
强力霉素(Doxycyclini, Hydrochloridi)	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
四环素(Tetracyclinum)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
土霉素(Oxytetracyclinum)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
呋喃西林(Furancilinum)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
青霉素(Benzylpenicillinum)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

注: + 阳性; - 阴性 Notes: "+" positive, "-" negative

2. 实验表明, F_5 和 F_{25} 菌株不但能感染健康的加州鲈鱼, 也能感染草鱼、鳊鱼、斑点叉尾鲷、鳙鱼、鲤鱼以及观赏鱼, 显示不同程度的症状, 说明该菌对寄主没有专一性, 病原菌的侵袭部位也不固定, 可侵袭鳃瓣和体表, 这与(Davis)^[8]的实验报导是一致的。

3. 加州鲈鱼对柱状纤维粘细菌十分敏感, 从鱼种到成鱼均被感染, 引起烂鳃、烂嘴、颌齿表皮糜烂, 呈“白头白嘴”等症状。鱼种放养密度过大, 水质不良, 饲料质量差是引发此病的主要原因, 预防为主, 防重于治是防治该病的最好方法。

参 考 文 献

- [1] 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] 何君慈等, 1987. 草鱼细菌性烂鳃病病原的研究. 水产学报, 11(1): 1 - 8.
- [3] 刘伟民, 1991. DNA 重组技术(1)——小量快速提取质粒 DNA 方法. 生物技术, 1(2): 46.
- [4] Davis, H. S., 1992. A new bacterial disease of freshwater fish. Bull. Bur. Fish., Wash, 38: 261 - 280.
- [5] Ordal, E. J. and R.R. Rucker, 1944. Pathogenic Myxobacteria. Proc. Soc. Exp. Bio. Med., 56(1): 15 - 18.
- [6] Wakabayashi, H. and Syuzo Egusa, 1966. Characteristics of a myxobacterium, *Chondrococcus columnaris*, isolated from diseased Loaches, Bull. Japan. Sci. Fish., 32: 1015 - 1021.
- [7] Reichenbach H., 1989. Order I. Cytophagales. In: Holt, J. G. (ed) Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, PP. 2011 - 2082.
- [8] Davis, H. S., 1947. *Cytophaga columnaris* as a cause of fish epidemic. Tran. Amer. Fish.

A STUDY ON PATHOGENIC BACTERIA OF GILL ROTE AND MOUTH ROTE DISEASE OF *MICROPTERUS SALMOIDES*

Deng Guocheng Jiang Lan Xu Shuying Li Huanlin

(Pearl River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou, 510380)

ABSTRACT Two strains of *Cytophaga* F₅, F₂₅ were isolated from gill rote and mouth rote of *Micropterus salmoides*. They are capable of infections and even causing death to the fish as well as to other pond fishes through multi-infections in water. Physiological, biochemical and plasmid-DNA electrophoresis observation showed that F₅ and F₂₅ are same species and can be assigned to *Cytophaga columnaris*.

KEYWORDS *Micropterus salmoides*, Gill rote, Mouth rote, *Cytophaga columnaris*