

鳗鲡弧菌病病原菌的分离与鉴定

韩先朴 卢全章

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

从患弧菌病的鳗鲡的肝脏分离到编号为 E-3-11、E-10-1 和 E-11-1 的三株菌。用此菌人工感染鳗鲡能出现相似的病症, 并从肝、肾又重新分离到这种菌, 证实为该病的病原菌。这些菌株的特性基本一致, 经鉴定为鳗弧菌 (*Vibrio anguillarum*)。

关键词 弧菌属; 鳗弧菌; 鳗鲡

弧菌病是鳗鲡的主要病害之一, 死亡率高, 危害严重。该病的病原菌对多种海水鱼、淡水鱼均有致病性, 因而引起人们的注意。

患弧菌病的鳗鲡, 其症状主要是: 皮肤点状出血发红, 腹部和下颌以及各鳍最为明显, 尤以胸鳍特别严重, 往往坏死糜烂; 肝脏、肾脏肿大, 肝脏呈土黄色, 点状出血; 有的病鱼腹腔中有腹水。

关于鳗弧菌的研究, 早在 1893 年 Canestrini 报道过意大利沿岸的海水池中的鳗鲡因患病躯干的皮肤和鳍条发红, 内脏出血而死亡。当时把它称为赤斑病 (Red pest), 其病原菌命名为鳗芽孢杆菌 (*Bacillus anguillarum*)。1909 年被更正为鳗弧菌 (*Vibrio anguillarum*), 随后, Schäperclaus (1927, 1934), Bruun 和 Heiberg (1932, 1935), Wolter (1960), Mattheis (1960), Ljunberg (1963), Lagarde 和 Chakroum (1965), Aker (1970), McCarthy (1976), Rodsaether 等 (1977)^[1] 相继报道过弧菌病。

国内迄今还未见有关鱼类弧菌病的研究报告。

1980 年 7—9 月, 我们在广东省饶平县东风埭养鳗场养殖的鳗鲡中发现了弧菌病, 并且对病原菌进行了分离和鉴定。

材料与方法

(一) 病原菌的分离

采用弧菌培养基 (简称 TYE 培养基), 其主要成分如下 (%): 蛋白胨 1, 酵母膏 0.5, NaCl 0.5, pH7.2—7.4, 15 磅 20 分钟灭菌。

以无菌操作剪下病鱼的肝脏一小块, 放在上述 TYE 平板近边缘处, 然后用接种环压一下肝块, 再作平板划线。25—28℃ 培养 24 小时后, 即可看到肝脏边缘和近肝脏的划线上长出一些形态基本一致的菌落。挑选单个菌落, 进行纯培养, 然后转接在斜面上备用。

(二) 病原的致病性试验

将分离得到的纯培养菌种在斜面上培养 18 小时后, 用无菌生理盐水洗下, 做成菌悬液。稀释成感染用浓度, 给体重 5—12g 的健康鳗鲡每尾背部肌肉注射 0.05ml, 同时设对照。被接种的鳗鲡与对照鳗鲡分别饲养在 25—30℃ 的清水中, 随时观察。同时测定每毫升菌悬液的活细菌数。

(三) 生理生化特性

依照参考文献[2, 3]的方法进行。

结 果

(一) 致病性

先后从三尾鳗鲡中分别分离到 E-3-

本文于 1983 年 2 月 7 日收到。

本工作在倪达书教授的指导下完成; 南昌市水产科学研究所王肇干同志参加部分工作; 东京大学农学部教授若林久嗣先生馈赠弧菌抑制素 0/129, 特此致谢。

表 1 几个菌株对鳗鲡的致病性

Table 1 Virulence of strains in the experimental infection of eels

菌 株 Strain	活细胞数/ml Number of the viable cell (cells/ml)	剂 量 Dose (ml)	鱼体重 Weight per fish (g)	鱼数(尾) Number of fish	
				试验数 Tested	死亡数 Death
E-3-11	7.5×10^8	0.05	5—12	5	5
E-3-14	7.5×10^8	0.05	5—12	5	5
E-3-16	7.5×10^8	0.05	5—12	5	5
E-10-1	7.3×10^8	0.05	5—7	5	3
E-10-1	3.0×10^8	0.05	5—7	5	2
E-11-1	7.5×10^8	0.05	5—7	5	5
E-11-1	3.0×10^8	0.05	5—12	5	1
对照 Control	灭菌水 Aseptic water	0.05	5—12	5	0

11、E-10-1 和 E-11-1 等三株菌。用 E-3-11 进行人工感染后,从人工感染的病鱼的肝脏再分离得到 E-3-14,从肾脏再分离到 E-3-16。这些菌对鳗鲡的致病性见表 1。当接种的菌液的活细胞数为 7.5×10^8 个/ml 时,被感染的鳗鲡在一天左右的时间内全部发病死亡。人工感染死亡的鳗鲡,胸鳍、腹鳍基部充血发红,肝、肾明显肿大,与自然发病鱼症状近似。而且,从人工感染的鳗鲡的肝、肾又重新分离到较纯的这种菌。当细菌浓度减少到 3×10^8 个活细胞/ml 时,被感染的鳗鲡不一定死亡,但仍出现明显的症状。试验重复两次结果一致。

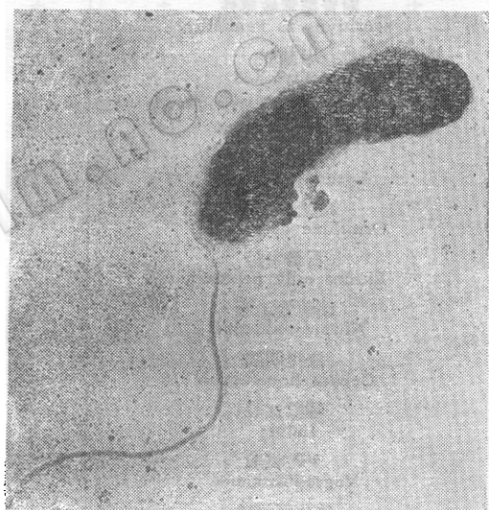


图 2 E-3-11 菌株菌体电镜照片 (13,800×)

Fig. 2 Electron micrograph of strain E-3-11

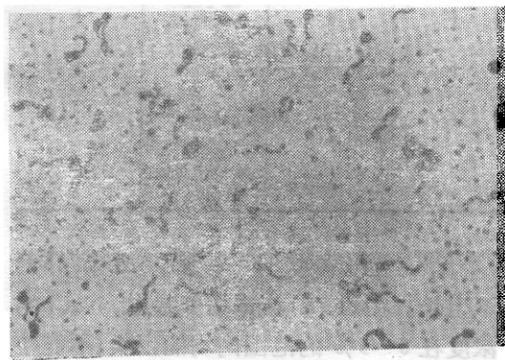


图 1 有极端单鞭毛的菌体(鞭毛染色, 1,000×)

Fig. 1 Cell with a polar flagellum

(二) 形态、生理生化特性

试验结果表明, E-3-11、E-3-14、E-3-16、E-10-1、E-11-1 等菌株的形态、培养特征及生理生化特性基本一致:

革兰氏阴性短杆菌,菌体直或稍弯曲,两端圆形,单个,很少出现双连或链条状,多形,大小为 $0.5-0.7 \times 1-1.5 \mu\text{m}$,一端单鞭毛(图 1、2),运动。

在 TYE 平板培养基上菌落淡黄褐色,

表 2 几个菌株的生化特性

Table 2 Biochemical characters of the strains

检查项目 Item of test	E-3-11	E-3-14	E-3-16	E-10-1	E-11-1
葡萄糖发酵 Fermentation of glucose	+	+	+	+	+
发酵葡萄糖产气 Gas from glucose	-	-	-	-	-
细胞色素氧化酶 Oxidase Cytochrome	+	+	+	+	+
过氧化氢酶 Catalase	+	+	+	+	+
尿素酶 Urease	-	-	-	-	-
0/129 敏感性 Sensitivity to 0/129	+	+	+	+	+
对新生霉素敏感性 Sensitivity to Novobiocin	+	+	+	+	+
对青霉素敏感性 Sensitivity to Penicillin	-	-	-	-	-
甲基红 Methyl Red	-	-	-	-	-
精氨酸脱羧 Arginine decarboxyl	+	+	+	+	+
赖氨酸脱羧 Lysine decarboxyl	-	-	-	-	-
鸟氨酸脱羧 Ornithine decarboxyl	-	-	-	-	-
石蕊牛奶 Litmus milk peptoniz	+	+	+	+	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	+	+	+
液化明胶 Gelatin liquefaction	+	+	+	+	+
吲哚试验 Indole	+	+	+	+	+
VP 试验 Voges-Proskauer	-	-	-	-	-
硫化氢试验 Hydrogen Sulphide	-	-	-	-	-
产氨 Ammonia reduction	+	+	+	+	+
利用柠檬酸盐 Citrate as sole C-source	+	+	+	+	+
水解淀粉 Starch hydrolysis	+	+	+	+	+
溶血试验(兔血) Hemolysis of rabbit blood	β	β	β	β	β

半透明,正圆形隆起,周围光滑、有光泽。
 β 溶血。

发酵葡萄糖、产酸不产气。对各种糖类的利用以及其他生理生化特性见表 2、3。

最适生长温度 18—37℃, 5℃ 和 45℃ 不生长。在 TYE 液体培养基中, NaCl 的浓度在 0—5% 的范围内均能生长,不能在 6% 的 NaCl 中生长,在不含 NaCl 的条件下生长不好。生长 pH 范围 5.8—10.5,

表3 几个菌株的糖发酵特性

Table 3 Utilization of carbohydrates of the strains

检查项目 Item of test	E-3-11	E-3-14	E-3-16	E-10-1	E-11-1
利用糖产酸 Acid from					
半乳糖 Galactose	+	+	+	+	+
葡萄糖 Glucose	+	+	+	+	+
甘露糖 Mannose	+	+	+	+	+
麦芽糖 Maltose	+	+	+	+	+
海藻糖 Trehalose	+	+	+	+	+
糊精 Dextrin	+	+	+	+	+
甘露醇 Mannitol	+	+	+	+	+
淀粉 Starch	+	+	+	+	+
蔗糖 Sucrose	+	+	+	+	+
糖原 Glycogen	+	+	+	+	+
甘油 Glycerin	+	+	+	w	w
纤维糖 Cellobiose	+	+	+	+	+
阿拉伯糖 Arabinose	-	-	-	-	-
肌醇 Inositol	-	-	-	-	-
山梨醇 Sorbitol	-	-	-	-	-
乳糖 Lactose	-	-	-	-	-
菊糖 Inulin	w	w	-	-	-
棉子糖 Raffinose	-	-	-	-	-
鼠李糖 Rhamnose	-	-	-	-	-
木糖 Xylose	-	-	-	-	-
戊五醇 Adonitol	w	w	w	w	w
水杨苷 Salicin	-	-	-	-	-

w: 弱阳性 (Weakly positive)。

在 pH5 以下或 pH11 以上不生长。几个菌株对抗生素的敏感性见表 4。

本菌与 Sakazaki(1967)、Evelyn(1971)、

Levin 等 (1972)、Hendrie 等 (1971), 在文献中记述的鳗弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 比较, 其特性基本一致, 所以应归属为鳗弧

表 4 几个菌株对抗生素的敏感性

Table 4 Sensitivity of the strains to antibiotics

抗 生 素 Antibiotics	E-3-11	E-3-14	E-3-16	E-10-1	E-11-1
链霉素 Streptomycin	+	+	+	+	+
青霉素 Penicillinum	-	-	-	-	-
新生霉素 Novobiocin	+	+	+	+	+
新霉素 Neomycin	-	-	-	-	-
多粘菌素 B Polymyxin B	w	w	w	w	w
土霉素 Terramycin	+	+	+	+	+
合霉素 Syntomycin	+	+	+	+	+
氯霉素 Chloramphenicol	+	+	+	+	+
四环素 Tetracyclinum	w	w	w	w	w
金霉素 Aurcomycin	+	+	+	+	+

“+”: 敏感 (Sensitivity); “-”: 不敏感 (Unsensitivity);

“w”: 微抑制 (Weakly sensitivity)。

菌 (*Vibrio anguillarum*)。

讨 论

1. 1971 年 Hendrie 等^[4]提出把 *Vibrio anguillarum*、*Vibrio piscium* 和 *Vibrio ichthyodermis* 都合并统称为 *Vibrio anguillarum*。以后, 有些学者进行过比较和研究, 认为这三者的特性相近似, 是一种, 并且被《伯杰氏鉴定细菌学手册》第八版所采纳^[5]。本菌与 Sakazaki (1967) 报道的 NCMB 6 以及 Hacking 和 Budd (1971)、Levin 等 (1972)、Hendrie 等 (1971) 在文献中报道的^[6] *Vibrio anguillarum* 相比, VP 试验与 Levin 等报道的一致, 与其他报道的相反。糖发酵试验中, 甘露糖发酵与 Hacking 等报道的不一致, 与其他报告相同。淀粉发酵与 Sakazaki 的不一致, 与其他报告相同。肌醇发酵与 Evelyn 报告的不一致, 与其他报告相同。有的报告中, 对

弧菌抑制素 O/129 的敏感性、产生硫化氢、利用蔗糖等特性依菌株不同而异。一部分菌株为阳性, 另一部分是阴性。

此外, 还有些报告所记载的特性与本菌有差异。例如: Hacking 和 Budd 从淡水热带鱼上分离到的菌株对鸟氨酸、精氨酸和赖氨酸的脱羧这一点与本菌不同。大西、室贺报告的菌株对这些氨基酸全部都分解, 与本菌株不同。

以上这些差异的原因有二: 一是菌株间的差异, 一是由于试剂或实验手段不同而造成的人为因素。但这些差异不影响种的特性, 今后可以考虑分成若干生物型。

2. 一般认为鳃弧菌是条件致病菌, 并且广泛存在于海水及咸淡水中, 真正的淡水中是难以找到的。1971 年 Hacking 和 Budd 从淡水水槽的热带鱼和泥鳅中分离到鳃弧菌。这次我们分离到的鳃弧菌也是从淡水养殖池中分离到的, 这表明淡水中

确实存在鳗弧菌。

参 考 文 献

- [1] 江草周三: 魚の感染症, 恒星社厚生閣, 东京, pp. 101—120, 1978.
- [2] 徐伯亥等: 海洋与湖沼, 11(1): 85—95, 1980.
- [3] 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», 科学出版社, 北京, 1978.
- [4] Hendrie, M. S., Hodgkiss, W. and J. M. Shewan: *Int. J. Syst. Bact.*, 21: 64—68, 1971.
- [5] Buchanan, R. E. & N. E. Gibbons: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 341—343, 1974.
- [6] 室賀清希, 江草周三: 魚病研究, 8(1): 10—25, 1973.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *VIBRIO ANGUILLARUM* FROM EELS

Han Xianpu Lu Quanzhang

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan)

Cultured eels in freshwater pond along the coast of China are usually infected with vibriosis. During July to September 1980, vibriosis of eels was found at the Fish Farm of Raoping County in Guangdong Province. The strains E-3-11, E-10-1 and E-11-1 have been isolated from infected eels. The basic characteristics of three strains are all the same. The strain E-3-11 is regarded as representative.

When each healthy eel was inoculated by intramuscular injection of 0.05 ml of bacterial suspension containing alive cells 7.5×10^6 /ml, all eels died within a day or so. When the alive cells were injected with 3×10^6 /ml, the eels were not killed, but some symptoms similar to the infected fish occurring in nature appeared, such as hyperaemia in pectoral and ventral fins,

spotted haemorrhage at the liver, liver and kidney swollen.

The bacterium is short rod shaped, $0.5-0.7 \times 1.0-1.5 \mu\text{m}$, with rounded ends, straight or slightly curved, motile by a single polar flagellum, nonsporulating, and Gram-negative.

It is positive in fermentation of glucose, catalase and oxidase, sensitive to *Vibrio* static agent 0/129 and novobiocin. Therefore, it belongs to the genus *Vibrio* according to Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. When it is compared with other strains, this strain is similar to NCMB 6 reported by Sakazaki (1967) and belongs to *Vibrio anguillarum*.

Key words

Vibrio; *Vibrio anguillarum*; Eel