

白皮病病原的研究*

黄惟颢 董济海 陈月英

(浙江省淡水水产研究所, 湖州)

在白皮病鱼的患部组织, 镜检观察到了堆聚群集的粘细菌。用从患部组织分离到的 B_{76-7-1} 等 8 株粘细菌的菌悬液分别浸养或浸洗夏花鱼种, 试验鱼表现出与自然发病鱼相同的病症。这些菌株的人工感染是成功的。我们认为 B_{76-7-1} 等 8 株粘细菌菌株是白皮病的致病菌。

B_{76-7-1} 菌株在分类上属于鱼害粘球菌 (*Myxococcus piscicola*)。

防治鱼害粘球菌引起的烂鳃病的药物及方法原则上可用于白皮病的防治。

一九六四年至一九六五年, 在浙江省鱼病调查中首次发现浙江存在白皮病。以后在吴兴县继续发现该病。一九七六年六月至九月, 吴兴县有三口夏花鱼种塘发生了白皮病。白皮病的病原至今公认为是白皮假单胞菌 (*Pseudomonas dermoalba*)^[1,2,3]。但是我们在一九七六年把患白皮病病鱼的病灶组织在相差显微镜下观察时, 看到的是与引起烂鳃病的鱼害粘球菌 (*Myxococcus piscicola*) 相似的粘细菌, 纯度之高可以与纯培养相比, 在盖玻片下的液体中泳动的杆菌为数甚少。这个意外的发现促使我们对白皮病的病原菌重新做了研究。

材料和方法

(一) 材料来源

1. 在吴兴县溪西公社新墩大队渔场小二和尚塘、吴兴县鱼苗鱼种管理委员会的曹家塘、本所六号塘等鱼塘中挑选呈现典型白皮病症状的夏花草鱼、夏花鲢鱼共 6 尾, 进行了病原分离。

2. 鱼害粘球菌 G_4 菌株由中国科学院水生生物研究所赠给。冰冻真空干燥后保存于安瓿瓶。

(二) 病原菌的分离

取病变部位的粘液在相差显微镜下观察, 每次观察到的菌体几乎是单纯的一类, 因此, 就用接种环直接蘸取病变部位的粘液在平板上划线。使

用的初分离培养基和纯培养的培养基均按分离鱼害粘球菌的配方^[1]。26℃培养 48 小时后, 在解剖镜下观察菌落形态, 选择边缘呈假根状的粘细菌菌落, 挑出进行纯培养。

(三) 生化测定与血清学试验

生化测定参照中国科学院水生生物研究所鱼病研究室介绍的项目和方法进行^[1]。

血清学试验的抗原、抗血清制备和玻片交叉凝集方法详见《从淡水鱼分离的粘细菌血清学研究》一文^[1]。

(四) 人工感染试验

供试验的鱼健康, 其中鲢鱼全长 1—1.5 寸, 草鱼全长 1 寸, 停食暂养一天。试验在室内白糖瓷脸盆内进行。每盆盛过滤水 5 升。水温 23—27℃。

试验菌接种在胰肠肉汤液里, 26℃ 经 45 小时培养, 菌液浓度约 1 亿细胞/毫升。

本文于 1980 年 6 月 3 日收到。

* 本文承中国科学院上海植物生理研究所白永延同志和中国科学院水生生物研究所倪达书同志审阅。照片由本所陈旭华同志拍摄。在此一并致谢。

1) 目前国内的鱼病著作中把 *Pseudomonas dermoalba* 译为白皮极毛杆菌。但 *Pseudomonas* 一词在国内的微生物专著中都已译为假单胞菌属。因此, 本文把“白皮极毛杆菌”一律改写为“白皮假单胞菌”。

2) 黄惟颢、陈月英、董济海:《从淡水鱼分离的粘细菌的血清学研究》, 一九七九年全国鱼病会议资料汇编, 1979 年。

1. 加菌浸养感染: 每盆加菌液 50 毫升, 水中菌液浓度约为 0.01 亿细胞/毫升。然后放入试验鱼, 观察其发病情况, 对照组放鱼不加菌。

2. 菌液浸洗感染: 把试验鱼在菌液内浸洗 7 分钟, 移养于盛有过滤水的白糖瓷盆中, 观察其发病情况。对照组的鱼不经菌液浸洗。

结 果

(一) 病原菌的分离和性状

曹家塘患白皮病的鲢鱼病灶上分离到 B_{76-6-1} 、 B_{76-6-2} 、 B_{76-6-3} 、 B_{76-6-4} 等 4 株; 六号塘患白皮病的草鱼病灶上分离到 B_{76-7-1} 、 B_{76-7-2} 、 B_{76-7-3} 等 3 株, 小二和尚塘患白皮病的鲢鱼病灶上分离到 B_{76-7-4} 株, 共 8 株粘细菌。

把病鱼患部粘液在初分离平板上划线, 26°C 培养, 第一天肉眼极难发现, 在解剖镜下也不易找到。这时看到的仅如尘埃状的一个小点, 颜色似琼脂。培养 2—3 天, 将培养皿对光较易发现。菌落稀薄透明淡黄白色, 扁平、中间比边缘稍厚, 常常形成若干不规则的马铃薯状突起, 边缘树根状细长弯曲, 向四周密集地伸延, 不定形。典型菌落酷似一朵盛开的狮头菊 (图版 I-1)。在初分离时, 由于该菌生长比杂菌慢, 且易与杂菌交结在一起而不易被发现。

在胰酪琼脂平板上培养, 一般能产生子实体。子实体色黄, 比菌落颜色要深, 在一个菌落上有时有多个。多数分布在菌落中间, 也有个别的长在菌落边缘。子实体肉眼观察为一个个单独的淡黄色小球。在解剖镜下观察顶面观, 大都圆形、椭圆形, 也有不规则形, 表面光滑, 折光性强, 突出于菌落之中 (图版 I-2)。在解剖镜下观察子实体的侧面观, 发现子实体的形状大都近似球冠 (图版 I-3), 也有近似圆台, 基部较大, 无收缩之柄, 突出于菌落之上。子实

体随培养时间的延长而增大, 大小不一, 直径 106—781 微米, 高 109—636 微米。恒温 26°C 平板接种培养, 长出的子实体从接种时算起, 10 天后衰亡。子实体压破涂片后可看到有折光性的圆形小孢子, 直径 1—2 微米。在胰酪液体培养时, 在气液交界的管壁上, 可看到子实体, 颜色较黄, 有折光性。在液体培养时能形成“柱子”。

菌体细长, 柔软而易弯曲, 滑行。胰酪肉汤 26°C 24 小时培养, 长短较一致, 约 2 微米, 通常为直形 (图版 I-4)。随着培养时间延长, 菌体长短参差不齐, 约 2—26 微米, 有的长达 30 微米以上, 弯曲如丝。粗细基本一致, 0.6—0.8 微米, 整个菌体粗细均匀。寄生在病灶组织上的菌体, 在相差显微镜下观察, 可以看到一端固着, 另一端呈描弧状缓慢往复摆动。可观察到滑行运动。菌体群集成堆, 从寄生组织向外突出, 形成圆球状或圆柱状, 宛如仙人球或仙人柱, 也有珊瑚状及星状的“柱子”。

菌体革兰氏染色阴性。

(二) 生化测定与血清学试验

生化测定与鱼害粘球菌 G_4 菌株同时进行, 结果见表 1。两者未见显著差异。

在不同的酸碱度、食盐浓度、温度条件下与 G_4 菌株同时进行生长情况的观察, 结果见表 2。两者未见显著差异。

本菌兼性好气生长, 摇床培养生长旺盛, 在厌氧条件下也能生长, 但比摇床培养的生长慢, 繁殖少。

血清学试验: 用 G_4 菌株制备的兔抗血清与 B_{76-7-1} 菌株发生凝集反应, 证明它们之间有共同的抗原物质“A”。

(三) 人工感染试验

对分离到的 8 株粘细菌全部进行了浸养感染试验, 结果见表 4。其中 B_{76-6-1} 、 B_{76-6-2} 、 B_{76-6-3} 、 B_{76-6-4} 、 B_{76-7-4} 等 5 株粘细菌还进行了浸洗感染, 结果见表 3。

表 1 生化测定结果*

结 果 菌 株	项 目	明胶液化	酪素水解	硝酸盐还原	过氧化氢酶产生	裂解死菌细胞			七叶灵水解	淀粉水解	几丁质消化	纤维素分解	枸橼酸盐利用	酪氨酸降解	胍基质反应	葡萄糖利用	硫化氢形成
						64 16 35	58 20 9	八叠球菌									
B ₇₆₋₇₋₁		+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G ₄		+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* “+”为阳性反应,“-”为阴性反应;

64-16-35 和 58-20-9 两株菌均为产生单胞杆菌属 (*Aeromonas*)。

表 2 生长条件现象结果*

结 果 菌 株	项 目	酸碱度 (pH)						食盐浓度 (%)							温 度 适 应		
		6	6.5	7	7.5	8	8.5	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	25—28℃	20℃以下	30℃	
B ₇₆₋₇₋₁		-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	生长良好	生长缓慢	虽能生长,但很快出现球质体。	
G ₄		-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	生长良好	生长缓慢	虽能生长,但很快出现球质体。	

* “+”表示生长,“-”表示不生长。

表 3 夏花鱼种浸洗感染结果

菌 号	水温(℃)	试 验 鱼		发病尾数	感染一周内鱼体病变记录*
		类 别	尾数		
B ₇₆₋₆₋₁	24	草鱼	2	2	4 小时 30 分死 1 尾白皮、白背、白头。5 小时 30 分死 1 尾白皮。
		鲢鱼	4	4	1 小时死 4 尾, 体表无肉眼可见症状。
B ₇₆₋₆₋₂	24	草鱼	2	2	1 小时死 1 尾, 体表无肉眼可见症状。5 小时 30 分死 1 尾白皮、白背。
		鲢鱼	4	4	1 小时死 4 尾, 体表无肉眼可见症状。
B ₇₆₋₆₋₃	24	草鱼	2	2	4 小时 30 分死 1 尾白皮。5 小时 30 分死 1 尾白背、白头。
		鲢鱼	4	4	1 小时死 3 尾, 体表无肉眼可见症状。4 小时死 1 尾白皮。
B ₇₆₋₆₋₄	25.5	鲢鱼	4	4	55 分、1 小时 12 分、1 小时 20 分、1 小时 30 分各死 1 尾, 体表均无肉眼可见症状。
B ₇₆₋₇₋₄	25.5	鲢鱼	2	2	1 小时 40 分、6 小时 50 分各死 1 尾均白皮。
		鳊鱼	1	1	6 小时 20 分死 1 尾白皮。
		草鱼	2	2	6 小时死 1 尾白背。9 小时 50 分死 1 尾白皮。

* 白皮: 背鳍与臀鳍间的体表至尾鳍基部体表全变白色; 白背: 背鳍基部周围体表变白色; 白头: 嘴和额部周围体表变白色。

每批试验均设对照组, 试验结束, 对照组鱼健康, 无死亡。

试验日期: 1976 年 7 月 7 日和 8 日。

表 4 夏花鱼种浸养感染结果*

菌 号	水温(℃)	试 验 鱼		发病尾数	感染一周内鱼体病变记录
		类 别	尾 数		
B ₇₆₋₆₋₁	24	鲢鱼	4	4	1小时半死1尾, 体表无肉眼可见症状。4小时死2尾, 白皮、白背。4小时半死1尾, 白皮。
		草鱼	2	2	4小时死1尾, 白背、白皮。4小时半死1尾, 白皮。
	27	鲢鱼	5	5	3小时38分、4小时3分、4小时30分、4小时55分各死1尾, 均白皮。3小时41分死1尾, 白皮、白背。
B ₇₆₋₆₋₂	24	鲢鱼	4	4	4小时死4尾, 白皮、白背。
		草鱼	2	2	4小时死1尾白皮、白背。6小时死1尾白皮。
	27	鲢鱼	5	5	2小时53分、3小时38分、3小时52分各死1尾均白皮。3小时19分死1尾白皮、白背。3小时37分死1尾白背。
B ₇₆₋₆₋₃	24	鲢鱼	4	4	4小时死3尾、4小时30分死1尾均白皮。
		草鱼	2	2	4小时死1尾白皮、白背。5小时死1尾白皮。
	27	鲢鱼	5	5	2小时15分、2小时57分、3小时3分、3小时10分各死1尾均白皮。3小时20分死1尾白背、白皮。
B ₇₆₋₆₋₄	23	鲢鱼	5	5	1小时30分、4小时各死1尾均白皮。5小时死3尾白皮、白背。
		鲢鱼	5	5	2小时37分、3小时18分、3小时50分各死1尾均白皮。3小时17分、3小时21分各死1尾均白皮、白背。
B ₇₆₋₇₋₄	25.5	鲢鱼	4	4	4—5小时死2尾、5小时30分死1尾均白皮、白背。5小时50分死1尾白皮。
		草鱼	1	1	5小时30分死1尾白皮。
	27	鲢鱼	5	5	1小时53分、2小时4分、2小时33分、3小时35分、3小时36分各死1尾均白皮。
B ₇₆₋₇₋₃	27	鲢鱼	5	5	4小时、4小时1分、5小时59分各死1尾均白皮。4小时22分、4小时29分各死1尾均白皮、白背。
B ₇₆₋₇₋₂	27	鲢鱼	5	5	4小时30分、4小时37分、4小时49分各死1尾均白皮。3小时52分、4小时26分各死1尾均白皮、白背。
B ₇₆₋₇₋₁	27	鲢鱼	5	5	4小时30分、5小时30分、5小时57分、6—7小时各死1尾均白皮。5小时37分死1尾白皮、白背。

* 每批试验均设对照组。试验结束, 对照组鱼健康, 无死亡。
试验日期分别于1976年7月7日至15日内进行。

供试验的不论鲢鱼、鳙鱼还是草鱼, 不论用浸洗感染还是浸养感染, 死亡率都达100%, 大部分(60%)在4小时之内死亡, 最迟在10小时之内死亡, 试验鱼死亡时间

超过一个半小时的鱼100%呈现出白皮、白背、白头等与自然发病鱼相同的症状, 占全部死亡鱼的82%。在一个半小时之内死亡的鱼都不呈现与自然发病鱼相同的症

状,占全部死亡鱼的18%。

人工感染时呈现与自然发病鱼相同体表症状的鱼中,显示白皮症状的量多数,占69%;白背的少数,占29%;白头的个别,占2%。在一尾鱼上,这三种症状有单独存在,也有并发二种或三种的。

人工感染的鱼在死亡之前失去平衡,头部朝下,尾鳍朝上,与水面近似垂直,直至死亡。出现这种症状的鱼占注意记录了这一现象的试验鱼的93%。

(四) 白皮粘细菌的分类

B₇₆₋₇₋₁菌株与白皮假单胞菌在菌落、菌体以及生化等方面差异显著。白皮假单胞菌杆状,0.8×0.4微米,多数二个相连,极端单或双鞭毛,琼脂菌落呈圆形,边缘整齐,灰白色,24小时后产生黄绿色色素,发酵葡萄糖,产生胨基质,能利用枸橼酸钠,不还原硝酸盐^[4]。从上面列举的几项来看,白皮假单胞菌与B₇₆₋₇₋₁菌株是不同的种类。

B₇₆₋₇₋₁菌株的形态特征、生长条件、运动方式、生化特性、子实体着生形式及颜色都与鱼害粘球菌G₄菌株相似,血清学试验证明与G₄菌株有共同的抗原物质“A”,经人工感染证实有较强的致病力。我们认为B₇₆₋₇₋₁与G₄菌株是同一个种,即属鱼害粘球菌(*Mycococcus piscicola*)。

讨 论

王德铭氏指出“鲢、草鱼的白皮病也已分离到病原菌,经鉴定定名为白皮极毛杆

菌(*Pseudomonas dermonalba* n. sp)^[4]。但是未见有关人工感染方面的情况报道。据悉,当时用弄破试验鱼部体表的方法,获得人工感染成功的。而我們是在试验鱼体表完整的情况下,经过浸洗或浸养,呈现出与自然发病鱼相同的白皮病症状的。因此,我们认为鱼害粘球菌是白皮病的病原菌。如能在相同的条件下,以B₇₆₋₇₋₁菌株和白皮假单胞菌同时进行感染试验,当有更强的说服力。但由于白皮假单胞菌未能保存下来,也未重新分离,因此无条件进行试验。

人工感染中在一个半小时之内死亡的鱼都未呈现与自然发病鱼相同的症状。这可能是由于致死时间短促,病菌还来不及使感染鱼的体表形成明显的病变现象。

粘细菌分类鉴定的主要依据是子实体,但是子实体不稳定。对B₇₆₋₇₋₁的子实体不仅其有无非常参差不齐,而且其形状也具有可变性。与B₇₆₋₇₋₁菌株同时培养的G₄菌株也存在同样的情况。G₄菌株的子实体的侧面观大都近似球冠,也有近似圆台的(图版I-5—6)。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院水生生物研究所鱼病研究室:《鱼病防治手册》,科学出版社,北京,第87—89页,1975年。
- [2] 左文功、陈锦富:《常见鱼病防治手册》,农业出版社,北京,第25—26页,1979年。
- [3] 中国科学院水生生物研究所鱼病研究室:水生生物学集刊,5(3):315—334,1975。
- [4] 王德铭:微生物学报,9(2):150—156,1963。

STUDIES ON THE ETIOLOGY OF ALBODERMATOSIS —A DISEASE OF FRESH WATER FISH

Huang Weihae Dong Jihai Chen Yueying

(Zhejiang Institute of Fresh Water Fishery)

In the focus of infection of the fish suffered from albodermatosis, a dense cluster of myxobacteria is observed. Eight strains, including a prototype, B₇₈₋₇₋₁, of myxobacteria were isolated from the effected part in experimental infections of young fish given either a bath of, or cultured in myxobacterium suspension.

The symptoms of experimentally infected fish were identical to those of naturally infected ones. From these results, it was concluded that all these strains of myxobacteria are pathogens of aldodermatosis of fresh water fish. Systematically, the strain B₇₈₋₇₋₁ belongs to the genus *Myxococcus piscicola*.