

粘细菌的血清学研究

黄惟灏 陈月英 董济海

(浙江省淡水水产研究所,湖州)

从患烂鳃病、白头白咀病、白皮病和烂鳍病的青、草、鲢、鳙和鳊等鱼的病灶组织中分离到 11 株鱼害粘球菌 (*Myxococcus piscicola*), 从健康草鱼鳃上分离到非致病粘球菌 Cg27 菌株 (*Myxococcus* sp.), 将它们与已知种鱼害粘球菌 G4 菌株进行了血清学特性比较。发现鱼害粘球菌菌株之间存在共同的“A”抗原, 对其中 6 株菌的深入研究证明, 它们还存在特异抗原“B”和“C”, 据此将它们分为二个血清型。Cg27 菌株与鱼害粘球菌各菌株间不存在共同的抗原物质。用血清学方法可以较快地鉴别致病与非致病的粘细菌。

自 1922 年 Davis 首次描述粘细菌引起的鱼病以来^[1], 迄今已发现了四种致病粘细菌^[2,3]。我国还只发现一种, 即鱼害粘球菌^[4]。1973 年中国科学院水生生物研究所又从白头白咀病灶分离到致病粘细菌, 认为与鱼害粘球菌同隶属于粘球菌属 (*Myxococcus*), 惟其子实体有些不同^[4], 至今尚未定种^[5]。我们于 1975 年后亦从草、青、鲢、鳙鱼的烂鳃病、草鱼的白头白咀病、鲢鱼和草鱼的白皮病^[6]、鳊鱼的烂鳍病及烂鳃病的病灶分离到致病粘细菌即鱼害粘球菌, 而且还从越冬健康当年草鱼的鳃上分离到非致病粘细菌。

根据形态和生化反应鉴定粘细菌, 不仅要费较长的时间, 而且作为种间鉴定的基础——子实体的形态和有无也不稳定^[7]。血清学方法作为生物分类鉴定的手段有极高的鉴别能力, 即使在亲缘相近的变种之间, 抗原性仍然是特异的, 已广泛地被应用。国外在一些鱼病病原菌的鉴定和鱼病的诊断上, 已应用了这种方法^[8,9]。对粘细菌的鉴定和其引起的鱼病诊断上, 也在进行探索^[10,11]。

本文报道试用血清学方法, 对致病的

和非致病的粘细菌进行抗原分析, 以期为菌种鉴定、血清分型和鱼病诊断进一步提供依据。

材料和方法

(一) 菌种和培养基

菌种: Cg9 等 11 株菌是从各患不同疾病鱼的患部组织分离得到, 鉴定为鱼害粘球菌; Cg27 从健康草鱼鳃上分得, 无毒力, 初步鉴定与鱼害粘球菌, 同属于粘球菌属(上述菌株鉴定结果将另文发表)。鱼害粘球菌 G4 菌株由中国科学院水生生物研究所提供。

培养基: 固体和液体培养基按文献[2]配制, 其中胰陈的含量为 0.5%^[12]。

(二) 抗原制备

平板培养抗原: 将 24 小时 28℃胰陈液培养的菌液涂满整个胰陈琼脂平板表面, 28℃培养 30 小时左右, 刮下菌苔, 避免掺入琼脂, 加到盛有无菌生理盐水的匀浆器中进行匀浆, 以菌液均匀为度。菌液用普通滤纸过滤, 制成 10⁹ 细胞/ml 的菌悬液, 相当于麦氏 (McFarland) 标准浊度管第 3—

本文于 1981 年 8 月 17 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, 白永延同志对本项工作提出过许多宝贵意见, 在此一并致谢。

4 管之间。暂存冰箱备用(以下简称平板抗原液)^[11-13]。

液体培养抗原:细菌接种于胰胨培养液, 25℃ 摇床 70rpm, 24 小时培养。菌液经 4000 rpm 离心半小时至 1 小时, 收集菌体, 用无菌生理盐水(内含 0.5% 甲醛)洗 2—3 次。菌体匀浆后悬于无菌生理盐水中, 制成 1.2×10^{12} 细胞/ml 的菌悬液, 冰箱保存待用(以下简称液体抗原液)^[11-13]。

(三) 抗血清制备

参考 Király 等介绍的方法^[10-14], 将平板抗原液注射家兔耳边静脉。每隔三天注射一次。第一次注射 1ml。第二、第三次各注射 2ml。第四次注射 4ml。最后一次注射后的第六天取得血清样品, 用试管凝集法(操作见下文的试管凝集试验)测定抗体的效价。如果效价高于 1:1280, 则自颈动脉采血。分离血清, 加等量(体积/体积)灭菌甘油防腐, 分装于血清小瓶, 置普通冰箱保存。如果效价不到 1:1280, 则再注射一次 4ml 平板抗原液。

(四) 凝集试验

试管凝集试验: 按常规方法进行。抗血清用倍比稀释法稀释。当一系列稀释一半的组合完成时加入等量(体积/体积)菌悬液(平板抗原液)于各管, 混匀后置于 52℃ 的水浴中 2 小时, 然后在 4℃ 下静置 18 小时后观察结果^[11]。

玻片凝集试验: 按常规方法进行, 用平板抗

原液。

(五) 吸收试验

1.2ml 抗血清液(浓度 1:1)加入 0.6ml 无菌生理盐水、1.2ml 液体抗原液, 混匀后置 52℃ 水浴 1 小时, 4℃ 冰箱静置 3—4 小时, 离心半小时(4000 rpm), 取上清液, 与吸收抗原(用平板抗原液)作玻片凝集试验, 以测定其是否吸收完全, 直至全部移去对该抗原的凝集素为止。以此吸收血清与同源抗原及有关抗原作凝集反应, 以测定其是否存在未被吸收的抗体。无菌生理盐水加抗原作为空白对照^[12, 14-17]。

结 果

Cg6、Cg9、Cg12、Cg13、Cg15、Cg16、G4 的抗血清分别与各菌株之间的玻片交叉凝集反应结果如表 1。

表 1 表明, 所测定的菌株, 除 Cg27 外, 均互有交叉凝集反应。Cg27 则不与任一菌株有凝集反应。

为了进一步证明玻片交叉凝集反应的结果, 又做了试管交叉凝集反应, 结果见表 2。

表 2 表明, 各菌株的抗血清分别与各菌株发生不同程度的交叉凝集反应。为证实各菌株是否同一血清型, 设计了下列交叉凝集试验, 结果如表 3。

表 1 玻片交叉凝集反应结果*

Table 1 Cross agglutination reactions on slides

抗原 Antigen 抗体 Antibody	Cg4	Cg6	Cg9	Cg12	Cg13	Cg16	Cg17	Cg78-1	G4	A5	B76-7-1	Cg11	Cg27
Cg6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Cg9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Cg12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Cg13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Cg15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Cg16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
G4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
生理盐水 Physiological saline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* “+”阳性反应 positive reaction; “-”阴性反应 negative reaction

表 2 试管交叉凝集反应滴度

Table 2 Cross agglutination reactions in test tubes

效价 Titer 抗原 Antigen 抗体 Antibody	Cg6	Cg9	Cg12	Cg13	Cg16	G4
Cg6	1280	320	320	640	640	160
Cg9	320	1280	160	640	640	640
Cg12	1280	640	1280	1280	640	640
Cg13	1280	320	640	2560	640	1280
Cg16	1280	160	160	1280	1280	640
G4	1280	1280	640	2560	1280	2560
0.85% 生理盐水 Physiological saline	0	0	0	0	0	0

表 3 表明, Cg6、Cg12、Cg13 抗体分别被 Cg6、Cg12、Cg13 的抗原全部吸收, 故可证明 Cg6、Cg12、Cg13 菌株的抗原全部相同。表 3 还表明, Cg6、Cg12、Cg13 抗体分别被 Cg9、G4 抗原全部吸收, 这表明 Cg9、G4 菌株与 Cg6、Cg12、Cg13 菌株的抗原相同, 但是, Cg9、G4 抗体分别被 Cg16 抗原吸收后与 Cg6、Cg12、Cg13、Cg9、G4 抗原反应, 观察不到凝集现象, 而 Cg6、Cg12、Cg13 抗体被 Cg16 抗原吸收后仍然能观察到与 Cg6、Cg12、Cg13、Cg9、G4 抗原起凝集反应, 故证明 G4、Cg9 菌株与 Cg6、Cg12、Cg13 菌株除具有共同的抗原外, 还有一部分的抗原略有差异。为了证明 Cg9、G4 菌株与 Cg6、Cg12、Cg13 菌株的抗原有差异的部分是量还是质的差别, 设计了 G4 及 Cg9 抗血清分别被 Cg16 菌株吸收后各自以较高的浓度再分别与 Cg6、Cg12、Cg13、Cg9、G4 菌株以及 Cg16 菌株的试管凝集反应试验, 结果见表 4。

从表 4 可以看出, Cg9、G4 与 Cg6、Cg12、Cg13 菌株之间的差异部分是抗原物质含量多少的不同, 在 Cg9、G4 菌株里含量较少, 在 Cg6、Cg12、Cg13 菌株里含量较多。

表 3 和表 4 表明, Cg16 抗体被 Cg6、Cg9、Cg12、Cg13、G4 抗原吸收后, 还剩有抗体可与 Cg16 抗原起凝集反应, 反过来, Cg6、Cg12、Cg13、Cg9、G4 抗体被 Cg16 抗原吸收后也还剩有抗体能与 Cg6、Cg12、Cg13、Cg9、G4 抗原起凝集反应, 故证明 Cg16 菌株与 Cg6、Cg12、Cg13、Cg9、G4 菌株具有共同的抗原物质之外, 还分别具有特异的抗原物质。

根据表 3、4 设计了抗原分析, 结果表明: G4、Cg9、Cg6、Cg12、Cg13、Cg16 菌株具有共同的抗原物质“A”; Cg16 菌株还具有抗原物质“C”; Cg6、Cg9、Cg12、Cg13、G4 菌株还具有抗原物质“B”, 只是 Cg9、G4 菌株内“B”的含量比 Cg6、Cg12、Cg13 菌株内要少。因此, 这些菌株的抗原式分别是: Cg16 菌株为“AC”; Cg6、Cg12、Cg13、Cg9、G4 菌株为“AB”。另外, Cg4、Cg11、Cg15、Cg17、Cg78-1、A5、B76-7-1 菌株, 由于未做交叉吸收凝集试验, 故仅知它们具有抗原物质“A”。Cg27 菌株具有抗原物质“D”。

讨 论

在所有鉴定的菌株中, 致病株之间共同抗原的存在证明它们是相似的。但是这

表 3 交叉吸收凝集反应滴度 (1)

Table 3 Agglutination titers of cross absorption (1)

抗血清 Antigen	鉴定抗原 Identifying antigen 吸收 抗原 Absorbing antigen	Cg6	Cg9	Cg12	Cg13	Cg16	G4
Cg6	Cg6	0	0	0	0	0	0
	Cg9	0	0	0	0	0	0
	Cg12	0	0	0	0	0	0
	Cg13	0	0	0	0	0	0
	Cg16	1:40	1:20	1:20	1:40	0	1:40
	G4	0	0	0	0	0	0
Cg12	Cg6	0	0	0	0	0	0
	Cg9	0	0	0	0	0	0
	Cg12	0	0	0	0	0	0
	Cg13	0	0	0	0	0	0
	Cg16	1:20	1:20	1:160	1:160	0	1:20
	G4	0	0	0	0	0	0
Cg13	Cg6	0	0	0	0	0	0
	Cg9	0	0	0	0	0	0
	Cg12	0	0	0	0	0	0
	Cg13	0	0	0	0	0	0
	Cg16	1:160	1:80	1:160	1:160	0	1:80
	G4	0	0	0	0	0	0
Cg16	Cg6	0	0	0	0	1:80	0
	Cg9	0	0	0	0	1:160	0
	Cg12	0	0	0	0	1:80	0
	Cg13	0	0	0	0	1:80	0
	Cg16	0	0	0	0	0	0
	G4	0	0	0	0	1:80	0
Cg9	Cg6	0	0	0	0	0	0
	Cg9	0	0	0	0	0	0
	Cg12	0	0	0	0	0	0
	Cg13	0	0	0	0	0	0
	Cg16	0	0	0	0	0	0
	G4	0	0	0	0	0	0
G4	Cg6	0	0	0	0	0	0
	Cg9	0	0	0	0	0	0
	Cg12	0	0	0	0	0	0
	Cg13	0	0	0	0	0	0
	Cg16	0	0	0	0	0	0
	G4	0	0	0	0	0	0

表 4 交叉吸收凝集反应滴度 (2)
Table 4 Agglutination titers of cross absorption (2)

抗血清 Antisera	吸收 抗原 Absorbing antigen	鉴定抗原 Identifying antigen	Cg6	Cg12	Cg13	Cg9	G4	Cg16
Cg9	Cg16		1:16	1:8	1:16	1:8	1:8	0
G4	Cg16		1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	0

表 5 菌株的血清分型与分离的来源及时间
Table 5 Serotypes of Myxobacterium strains and sources and date of their isolation

血清型 Serotype	假定抗原 Postulated antigen	菌株 Strains	病 鱼 Infected fishes	病症 Symptom	分离日期 Date of isolation	地区 Place of isolation
I	AC	Cg16	夏花草鱼 Fry grass carp	烂鳃 Rotting gill	22 Sep. 1975	太湖 Linghu
II	AB	Cg9	三龄草鱼 3 year grass carp	烂鳃 Rotting gill	22 May 1975	太湖 Linghu
II	AB	G4	夏花草鱼 Fry grass carp	烂鳃 Rotting gill	Aug. 1972	湖北 Hubei
II	AB	Cg6	二龄鲢鱼 2 year silver carp	烂鳃竖鳞 Rotting gill Erected scales	41 May 1975	太湖 Linghu
II	AB	Cg12	发塘草鱼 Fingerling grass carp	白头白嘴 White head and white mouth	4 Jun. 1975	太湖 Linghu
II	AB	Cg13	二龄草鱼 2 year grass carp	烂鳃并发肠炎、赤皮 Rotting gill enteritis and red skin	6 Jun. 1975	太湖 Linghu
III	D	Cg27	越冬一龄草鱼 Overwintering one-year grass carp	健康 Healthy	11 Feb. 1977	太湖 Linghu
未定 Undefined	AX	Cg11	三龄草鱼 3 year grass carp	烂鳃并发肠炎 Rotting gill enteritis	3 Jun. 1975	太湖 Linghu
未定 Undefined	AX	Cg17	夏花草鱼 Fry grass carp	烂鳃并发肠炎 Rotting gill enteritis	22 Sep. 1975	太湖 Linghu
未定 Undefined	AX	Cg78-1	夏花鳊鱼 Fry bighead	烂鳃 Rotting gill	7 Aug. 1978	海盐县 Haiyan county
未定 Undefined	AX	B76-7-1	发塘夏塘鲢鱼 Fingerling silver carp	白皮 White skin	1 Jul. 1976	太湖 Linghu
未定 Undefined	AX	Cg4	二龄鳊鱼 2 year bighead	烂鳃并发竖鳃, 体表发炎 Rotting gill erected scales inflamed body surface	14 May 1975	太湖 Linghu
未定 Undefined	AX	A5	三龄鳊鱼 3 year eel	烂鳍 Rotting fin	25 Jul. 1978	太湖 Linghu

些致病株的抗原也不是完全相同。根据对 Cg9 等 6 株致病菌进行的交叉吸收凝集试验结果,可以把这六株菌划分为二个血清型,即 I(AC) 型,II(AB) 型(表 5)。不过这些致病株的形态和生化反应却相似,毒力上差异也不大(详细结果将另文发表),看来没有必要对这些菌株做进一步的亚分类。

湖北分离的 G4 与浙江菱湖分离的 Cg9 等同属一个血清型,菱湖分离的菌株在上述二个血清型里都有,看不出地理分布与血清分型有相应的联系(表 6)。这个原因是可以理解的。青、草、鲢、鳙四大家鱼,在 1958 年人工繁殖成功之前,鱼苗都从长江和珠江捞来。在江河里这些亲鱼将菌带到上游或下游,并通过鱼苗、鱼种的转运而传播。湖北和浙江的菱湖同属长江水系,以前鱼苗又都来自长江。Anacher 和 Ordal 对 352 株柱状曲挠杆菌(*Flexibacter columnaris*)的研究结果也表明,在同一个河系中血清分型并非是何限定的地理区域固有的^[11]。我们手头没有珠江的致病株,不能比较不同水系之间在血清型上的异同。

在这二个血清型中,每个型里都有自夏花草鱼分离的菌株。分自鲢鱼的菌株与分自草鱼的菌株同属一个型。分自烂鳃病的菌株并不集中在一个血清型里。白头白嘴病鱼中分离的菌株也不是独占一个血清型(表 6)。所以从这些结果来看致病株在危害对象,造成的病症上与血清型没有相应的联系,即这些菌株不存在专一性。

非致病株 Cg27 与致病株都不产生交叉凝集反应,证明不存在共同的抗原,划为血清型 III(D)。菌株形态和生化反应差异较大(详细结果另文发表)。我们认为非致病株 Cg27 是不同的种。

本实验证明了 G4、Cg9 等鱼害粘球

菌之间具有共同的抗原而非致病的粘细菌 Cg27 之间没有共同的抗原,不发生交叉凝集反应。Anacher 和 Ordal 证明柱状曲挠杆菌之间具有共同的抗原,发生交叉凝集,尽管存在不同的血清型^[11]。Pacha 和 Porter 证明柱状曲挠杆菌和嗜冷纤维粘细菌(*Cytophaga psychrophila*)之间没有共同的抗原,不发生交叉凝集反应,与非致病粘细菌之间也不存在共同的抗原,不发生交叉凝集反应^[10]。所以实验证明,血清学方法作为判定被分离的粘细菌是否是致病的,以及鉴定与鱼害球菌是否同种的一个手段是可以采用的。预示了作为鉴定粘细菌菌种的手段以及作为诊断粘细菌性鱼病的手段有它的发展前途。

参 考 文 献

- [1] Davis, H. S.: *U. S. Bur. Fisheries Bull.*, **38**: 261—280, 1922.
- [2] 湖北省水生生物研究所鱼病研究室: 水生生物学集刊, **5**(3): 315—334, 1975.
- [3] 正田宗生、若林久嗣、江草周三ら: 日本水产学会誌, **45**(4): 421—428, 1979.
- [4] 湖北省水生生物研究所第三室: 水生生物学集刊, **6**(1): 53—65, 1976.
- [5] 湖北省水生生物研究所第三室: 水生生物学集刊, **6**(2): 243—244, 1977.
- [6] 黄惟灏等: 微生物学报, **21**(4): 408—413, 1981.
- [7] Buchanan, R. E. et al.: *Bergeys Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., Baltimore, Md., U. S. A., 1974, pp. 76—78.
- [8] Канаев, А.: *Рыбоводство и Рыбловство*, **5**: 13—14, 1974.
- [9] 西村定一: 鱼病研究, **14**(4): 191—197, 1980.
- [10] Pacha, R. E. and S. Porter: *App. Micro.*, **16**(2): 1901—1906, 1968.
- [11] Anacher, R. L. and E. J. Ordal: *J. Bact.*, **78**: 25—32, 1959.
- [12] 坂口進: «植物免疫化学実験法», 本书翻译组: 植物免疫化学实验法, 上海人民出版社, 上海, 1976.
- [13] Kiraly, Z. et al.: *Methods in Plant Pathology*, Akademiai Kiado Budapest, 1970, 林传光译: «植物病理学方法», 科学出版社, 北京, 1976.
- [14] 武汉大学生物系微生物专业 70 级工农兵学员杀虫菌鉴定小组等: 微生物学报, **15**(1): 5—14, 1975.

- [15] 丁绍卿等: 微生物学报, 15(4): 341—347, 1975。
[16] 蔡宏道等: 《实用临床检验学》, 第四册, 上海卫

生出版社, 上海, 1957。

- [17] 山东医学院病原学教研室: 《致病微生物与寄生虫》, 人民卫生出版社, 北京, 1973。

SEROLOGICAL STUDIES OF SEVERAL STRAINS OF MYXOBACTERIA ISOLATED FROM FRESH WATER FISHES

Huang Weihao Chen Yueying Dong Jihai

(Zhejiang Institute of Fresh Water Fishery, Huzhou, Zhejiang)

Eleven strains of pathogenic myxobacteria have been isolated from focuses of infection on the fin, gill and skin of various fishes including the black carp (*Mylopharyngodon piceus*), grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*), silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), bighead (*Aristichthys nobilis*) and eel (*Anguilla japonica*) in Zhejiang province. Serological behaviors of these myxobacteria are compared with that of a pathogenic myxobacterium strain G4, which has been identified as *Myxococcus piscicola* and a non-pathogenic myxobacterium (Cg 27) which has been isolated by us from the gill of a healthy 2 years old grass carp. We

have found that the antisera of these new isolates can cross agglutinate themselves and with the strain G4. This indicates their close relationship with the species *Myxococcus piscicola*. These strains can be classified into two serological types. The correlations between the geographic distribution of the bacteria, the hosts of infection and the symptoms of disease have not been observed. There is no agglutination between non-pathogenic (Cg 27) and pathogenic strains (Cg 6 etc.) of myxobacteria and this property may be used as a means to distinguish pathogenic strains from non-pathogenic ones.