

养殖对虾细菌性红体病的初步研究*

周永灿 张本 陈雪芬 钱家英

(海南大学农学院水产系 海口 570228)

提要 从海南琼山患红体病的养殖南美白对虾 (*Penaeus vannamei*) 的肝胰脏和肌肉中分离出 2 株细菌,经纯化培养后的人工感染结果表明,该 2 株菌均为引起对虾红体病的细菌性病原菌;根据对这 2 株菌的形态及生理生化特征检测结果,确定这 2 株菌分别为溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 和副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*)。药敏试验表明,氟霉素、链霉素和庆大霉素等 7 种抗生素对抑制这 2 种致病菌具有良好作用。

关键词 南美白对虾 (*Penaeus vannamei*), 红体病, 溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*), 副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*)

中图分类号 S945.1⁺2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)05-0061-05

2001 年在海南各地的南美白对虾 (*Penaeus vannamei*) 养殖中,普遍出现了一种被当地虾农称作“红体病”的暴发流行病,虽然不同地方乃至不同虾场出现的红体病在具体症状上存在一定的差异,但其基本症状相同,表现为身体全身性发红,独自在塘边游荡,对外界反应迟钝,摄食减少甚至停止摄食,肝胰脏肿大,肠胃空等。该病发生广,传播快,死亡率高,对海南对虾养殖危害极为严重,造成了巨大的经济损失。为此,作者对引起海南养殖南美白对虾红体病的病原进行了初步探讨,并对该病的防治药物进行了初步筛选。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

患红体病的南美白对虾于 2001 年 7 月取自海南省琼山市东营镇的某对虾养殖场,体长为 8~10 cm;健康南美白对虾取自海南京豪生物科技公司三江对虾养殖基地,体长 6~8cm,经检测不带白斑综合症杆状病毒 (WSSV) 后用于感染实验。

1.2 实验方法

1.2.1 病毒性病原的检测 取病虾先从外观和利用白斑病毒检测试剂盒检测是否带有病毒;再取病虾的鳃组织和肝胰脏等组织匀浆,3 000 r/min 离心 20 min 后取上清液以细菌滤器过滤,以滤液拌料投喂健康南美白对虾,观察 15 d 内的成活情况。根据检测结果确定病虾是否带有病毒性病原。

1.2.2 细菌分离与纯化培养 取典型患病对虾,以无菌操作分别从其肌肉、肝胰脏和肠道等部位取材,并分别于普通海水营养琼脂和海水 TCBS 培养基上划线接种,28 ℃ 培养 24 h 后,分别挑选不同的单菌落以普通营养琼脂进行纯化培养,并分别记录各种菌落的特征。

1.2.3 病原菌确定 将从患病对虾中分离的细菌分别以注射法和口服法对健康南美白对虾进行人工感染,每组 30 尾,每个实验重复 1 次。注射法为从对虾的第二腹节侧面注射浓度为 1×10^8 cfu/mL 的菌液 0.05 mL/尾,以注射等量的生理盐水作对照。口服感染法为将从病虾体内分离得到的细菌分别定量喷洒在商品饵料上制成菌饵,每克菌饵的含菌量为 1×10^8 cfu,每日足量投喂,连续投喂 3 d;对照组以相同的无菌商品饵料足量投喂。注射感染和口服感染的南美白对虾分别在水族箱内按常规方法养殖 15 d,观察记录各组成活情况,患病对虾进行细菌分离,根据感染症状和感染患病后的细菌分离结果确定病原菌。

* 教育部骨干教师基金项目 and 海南省百项农业新技术项目资助。

第一作者:周永灿,出生于 1968 年,博士,教授,主要从事水生生物病害研究,E-mail: zychnu@163.com

收稿日期:2002-03-01;修回日期:2002-05-16

1.2.4 病原菌的种类鉴定 对病原菌进行常规形态学检查,再用广东环凯微生物科技公司生产的细菌检测试剂盒检测其生理生化指标,根据形态观察和生理生化指标检测结果,查阅伯杰氏细菌鉴定手册^[1]确定细菌种类。

1.2.5 药物敏感试验 利用中国腹泻病控制上海试剂供应研究中心生产的药敏纸片对病原菌进行药敏检测,根据 28 ℃ 培养 24 h 后测量的抑菌圈大小确定其对各种药物的敏感性。

2 结果

2.1 患病对虾病毒性病原检测结果

现场取材的患病南美白对虾外观完整,全身性变红,肠胃空,肝胰脏微肿但颜色正常,头胸甲易剥离,但在剥离的头胸甲上未发现白斑症状。利用白斑病毒检测试剂盒检测结果也呈阴性。用细菌滤器过滤后的病虾组织液投喂健康南美白对虾后,经 15 d 养殖观察,对虾生长正常,成活率 100%。据此,该养殖场南美白对虾所患红体病的病原为非病毒性病原。

2.2 细菌分离与病原菌确定

以无菌操作分别从病虾肌肉、肝胰脏和肠道部位取材,并分别于普通海水营养琼脂和海水 TCBS 培养基上划线培养 24 h 后(28 ℃),在肌肉、肝胰脏和肠道内都分离到了大量细菌。根据菌落的形态,从肌肉和肝胰脏分离的细菌主要有 2 种,分别编号为 BX01-03 和 BX01-04,其中,肌肉内 BX01-03 占总菌落数的 30%、BX01-04 占 70%;在肝胰脏内 BX01-03 占 60%、BX01-04 占 40%。从肠道内虽然也分离到大量与 BX01-03 和 BX01-04 相同的菌落,但其它菌落数量也很多,在本研究中未作进一步分析。分别挑取从肌肉内分离的 BX01-04 和从肝胰脏内分离的 BX01-03 单菌落,于普通海水营养琼脂中再纯化培养 1 次后,分别以相同培养基扩大培养,以注射法对健康南美白对虾进行攻毒感染。注射感染的结果表明(表 1),以 BX01-03 和 BX01-04 分别对健康南美白对虾攻毒感染后,在 15 d 内均出现了大量死亡,死亡的对虾均表现出与患病对虾相同的红体症状;而对照组只有 1 尾对虾死亡,且该虾死亡的原因为脱壳时被其它对虾捕食所致。口服感染的结果表明(表 2),以分别喷有 BX01-03 和 BX01-04 的饵料连续投喂健康南美白对虾

表 1 BX01-03 和 BX01-04 对健康南美白对虾注射感染的结果

Tab. 1 Results of injected infection of BX01-03 and BX01-04 with *Penaeus vannamei*

菌号	组别	实验虾数 (尾)	菌液浓度 (cfu/mL)	注射剂量 (mL/尾)	感染后 15 d 内实验对虾数量(尾)		
					死亡数	红体但未死亡数	健康数
BX01-03	1	30	1×10^8	0.05	23	5	2
	2	30	1×10^8	0.05	25	5	0
BX01-04	1	30	1×10^8	0.05	26	3	1
	2	30	1×10^8	0.05	23	4	3
对照		30	生理盐水	0.05	1	0	29

表 2 BX01-03 和 BX01-04 对健康南美白对虾口服感染的结果

Tab. 2 Results of oral infection of BX01-03 and BX01-04 with *Penaeus vannamei*

菌号	组别	实验虾数 (尾)	细菌含量 (cfu/g)	投饵量 (g/d)	感染后 15 d 内实验对虾数量(尾)		
					死亡数	红体但未死亡数	健康数
BX01-03	1	30	1×10^8	10	12	13	5
	2	30	1×10^8	10	9	14	7
BX01-04	1	30	1×10^8	10	14	13	3
	2	30	1×10^8	10	17	12	1
对照		30	0	10	0	0	30

3 d 后,在 15 d 也先后出现了明显的红体症状,虽然其死亡率只有注射感染组的一半左右,但也有与死亡数量相当的实验对虾已出现明显红体症状,在实验结

束时,外表正常的健康对虾不到 20%。对各感染组刚死亡对虾的肌肉和肝胰脏进行细菌分离的结果也表明,从感染死亡的对虾中分离到的细菌的菌落形态与

感染菌株相同,说明这2株细菌都是南美白对虾红体病的致病菌。

2.3 BX01-03 和 BX01-04 的种类鉴定

海水 TCBS 培养基培养 24 h 后, BX01-03 和 BX01-04 的菌落直径为 3~5 mm, 但前者呈绿色, 后者呈黄色。在细菌形态和生理生化特征上 (表 3),

BX01-03 和 BX01-04 均为 G⁻ 菌, 并且在运动性、生长温度、0~8%NaCl 中生长情况、ONPG 试验以及对弧菌抑制剂的敏感性等方面都表现出相同的性状; 但在 10%NaCl 中生长、VP 反应、蔗糖和半乳糖的利用等方面两者却存在显著的不同。经查阅伯杰氏细菌鉴定手册^[1], 确定 BX01-03 为副溶血弧菌 (*Vibrio para-*

表 3 BX01-03 和 BX01-04 的生理生化特征

Tab.3 Physiological and biochemical characteristics of BX01-03 and BX01-04

测定项目	不同细菌的测定结果			
	BX01-03	副溶血弧菌	BX01-04	溶藻弧菌
革兰氏染色	-	-	-	-
运动性	+	+	+	+
氧化酶	+	+	+	+
TCBS 上生长	绿色	绿色	黄色	黄色
4℃ 生长	-	-	-	-
30℃ 生长	+	+	+	+
40℃ 生长	+	+	+	+
0% NaCl 生长	-	-	-	-
3% NaCl 生长	+	+	+	+
6% NaCl 生长	+	+	+	+
8% NaCl 生长	+	+	+	+
10% NaCl 生长	-	-	+	+
赖氨酸脱羧酶	+	+	+	+
鸟氨酸脱羧酶	+	+	+	+
精氨酸双水解酶	-	-	-	-
ONPG 试验	-	-	-	-
VP 反应	-	-	+	+
D-葡萄糖产气	-	-	-	-
硝酸盐还原	+	+	+	+
产生淀粉酶	+	+	+	+
产生明胶酶	+	+	+	+
产生酯酶	+	+	+	+
尿素	+ W	NR	+ W	NR
H ₂ S 产生	-	-	-	-
甘露糖	+	+	+	+ W
蔗糖	-	-	+	+
半乳糖	+	+	-	+ W
海藻糖	+	+	+	+
纤维二糖	+ W	-	+	+
木糖	-	-	-	-
L-阿拉伯糖	+	+ W	-	-
水杨素	-	-	-	-
肌醇	-	-	-	-
甘露醇	+ W	+	+	+
柠檬酸盐利用	+	+	+	+
0/129 敏感(10 μg)	R	R	R	R
0/129 敏感(150 μg)	S	S	S	S

注:“-”表示阴性;“+”表示阳性;“NR”表示未记录;“+ W”表示弱阳性;“R”表示抗性;“S”表示敏感。

haemolyticus); BX01-04 为溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*)。

2.4 药物敏感试验

利用纸片法测定了 24 种抗菌药物分别对 2 株病原菌的抑菌作用(表 4)。根据查阅不同抗菌药物抑

菌圈直径与其敏感性的判断标准, 在所测定的 24 种抗菌药物中, 有 10 种药物对从病虾体内分离的溶藻弧菌 (BX01-03) 高度敏感, 7 种药物对溶藻弧菌不敏感; 有 7 种药物对从病虾体内分离的副溶血弧菌

表 4 不同抗菌药物对病原菌 BX01-03 和 BX01-04 的抗菌活性

Tab.4 The antimicrobial sensitivity of the pathogens BX01-03 and BX01-04 on different kinds of antimicrobial agents

抗菌药物		BX01-03		BX01-04	
种类	含量($\mu\text{g}/\text{片}$)	抑菌圈直径(mm)	敏感性	抑菌圈直径(mm)	敏感性
青霉素	10IU/片	无	-	无	-
链霉素	10	17	++	17	++
红霉素	15	无	-	无	-
氯霉素	30	27	++	27	++
四环素	30	无	-	无	-
卡那霉素	30	16	+	17	+
丁胺卡那霉素	30	19	++	16	+
氨苄青霉素	10	13	+	无	-
羧苄青霉素	100	无	-	无	-
头孢哌酮	75	26	++	无	-
头孢呋新	30	16	+	16	+
头孢三嗪	30	25	++	22	++
头孢他啶	30	21	++	25	++
氨基南	30	无	-	无	-
阿齐霉素	15	无	-	无	-
氟哌酸	10	19	++	无	-
丙氟哌酸	5	17	+	15	+
氟嗉酸	5	12	+	无	-
克林霉素	2	无	-	无	-
庆大霉素	10	21	++	21	++
乙基四羧霉素	30	23	++	23	++
呋喃妥因	300	18	++	18	++
磺胺异恶唑	300	无	-	无	-
万古霉素	30	无	-	无	-

注:“-”表示不敏感;“+”表示中度敏感;“++”表示高度敏感。

(BX01-04)高度敏感, 13 种药物不敏感。其中, 对 2 株病原菌均高度敏感的药物有: 链霉素、氯霉素、头孢三嗪、头孢他啶、庆大霉素、乙基四羧霉素和呋喃妥因。

3 讨论

近年来,“红体病”是海南对虾养殖过程中最常见也是造成经济损失最严重的疾病之一。不过, 根据作者对该病的跟踪调查分析以及本文的研究结果, 作者认为, 养殖对虾的“红体病”其实是根据患病对虾出现红体症状而命名的一类疾病, 在对虾养殖过程中, 使养殖对虾产生红体症状的原因很多, 主要包括: (1) 对虾感染白斑综合症杆状病毒 (WSSV); (2) 对虾感染桃拉病毒 (TSV); (3) 对虾感染溶藻弧菌和副溶血

弧菌等病原菌; (4) 对虾同时感染病毒性病原和细菌性病原; (5) 养殖水体氨氮等毒性物质浓度过高等。因此, 在对“红体病”进行治疗时必须首先查清产生红体的原因, 并根据病因不同采用不同的治疗方法。其中, 对于由 WSSV 或 TSV 等病毒性病原引起的红体病, 由于迄今对这些病毒尚缺乏有确切疗效的治疗药物, 在生产上只能以预防为主; 对于由溶藻弧菌和副溶血弧菌等细菌性病原引起的红体病, 在生产上可以利用水体消毒结合口服抗菌药物加以控制; 而对于由水质因素引起的红体病, 则可采用换水或投放有益微生物制剂等措施来降低养殖水体中有毒成分的含量。

本文的感染实验结果表明, 从患病对虾中分离的

2株病原菌以注射法和口服法均可使健康对虾发生红体症状并出现大量死亡,因此,在该病的传染途径上,经口感染应是其传播的主要途径之一。由于对虾有同类相残的习性,一旦有少量对虾因各种原因感染病原而出现死亡后,健康对虾会吃食死亡对虾而加速传染,有时甚至因此而造成毁灭性死亡。因此,对于细菌性红体病的防治也同样要坚持“防重于治”和“早发现、早治疗”的原则,尽可能地将疾病控制于萌芽状态。

弧菌是对虾养殖中的常见病原,目前已报道的许多对虾疾病都是由弧菌引起,如:烂眼病、烂尾病、烂鳃病、甲壳溃疡病、黄鳃病、红腿病和荧光病等^[2-4]。由于引起这些疾病的病原大多都为条件致病菌,在对虾养殖中,对于这类由弧菌引起的疾病的预防,主要方法有改善养殖水质、在饵料中添加Vc和免疫多糖等免疫增强剂、定期水体消毒和消毒后投放有益微生物制剂等;一旦疾病发生,常用的有效治疗方法为使用抗生素等抗菌药物^[5,6]。本文的研究结果表明,用所筛选的抗菌药物对海南琼山和文昌等地发生的细菌性红体病以口服药饵结合水体消毒的方法进行治疗,取得了明显的疗效。不过,由于对细菌性红体病高度

敏感的氯霉素和呋喃妥因这2种抗生素最近已列入我国水产禁用药物,所以希望各养殖人员今后即使发生细菌性红体病也要坚决杜绝使用这2种药物,以保证养殖水产品安全以及推动整个水产养殖业的可持续发展。

参考文献

- 1 中国科学院微生物研究所. 伯杰氏细菌鉴定手册(第九版). 北京: 科学出版社, 1994. 96-243
- 2 胡超群, 陶宝华. 对虾弧菌病及其免疫预防的研究进展. 热带海洋, 2000, 19(3): 84-94
- 3 战文斌, 周丽, 俞开康. 一种新的中国对虾弧菌病原菌——产气弧菌. 海洋与湖沼, 1997(1): 21-26
- 4 张晓华, Robertson P, 冯娟. 中国对虾育苗池中哈维氏弧菌的检测. 青岛海洋大学学报, 1998(1): 70-74
- 5 王雷, 李光友, 毛元兴. 口服免疫型药物对养殖中国对虾病害防治作用的研究. 海洋与湖沼, 1994(5): 486-492
- 6 Larchford J W, Prayitno S B, Alabi A. The use of vaccines in the culture of penaeid prawns. J Shellfish Res, 1996, 15(2): 456

PRELIMINARY STUDIES ON THE RED BODY DISEASE IN *Penaeus vannamei*

ZHOU Yong-Can ZHANG Ben CHEN Xue-Fen QIAN Jia-Ying
(Fisheries Department, Hainan University, Haikou, 570228)

Received: Mar., 1, 2002

Key Words: *Penaeus vannamei*, *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, Red body disease

Abstract

Two specieses of bacteria were isolated from the hepatopancreas and muscle of the cultured *Penaeus vannamei* with red body disease. The results of the challenge experiment showed that these 2 bacteria were the pathogen of the red body disease. Based on the morphology and the physiological and biochemical characteristics, these 2 bacteria were identified as *Vibrio alginolyticus* and *V. parahaemolyticus*, respectively. These 2 pathogens were sensitive to 7 varieties of antimicrobial agents including chloromycetin, streptomycin and gentamicin.

(本文编辑:刘珊珊)