

由二种气单胞菌引起的中国对虾 败血病的研究*

樊海平 孟庆显 俞开康

(青岛海洋大学水产学院, 青岛 266003)

提 要 于1992年7月—1993年3月,用分离病原菌、注射感染、浸浴感染、创伤感染、投喂感染、重复分离病原菌,测定病原菌生理生化特性和对药物敏感性,观察病理变化研究气单胞菌引起的中国对虾败血病。结果表明,病原菌为嗜水气单胞菌和豚鼠气单胞菌,它们的最适生长温度、盐度、pH 分别为30℃, 35和8,两种菌对氯霉素、氟哌酸和复方新诺明均敏感,病虾主要病变为鳃、肢鳃和鳃盖内膜部分或全部坏死变黑,心脏和消化道粘膜下层血细胞浸润聚积形成结节,肝胰腺坏死。

关键词 气单胞菌 中国对虾 败血病

细菌性疾病是中国对虾养成期危害最为严重的疾病之一。引起对虾疾病的主要细菌有弧菌 (*Vibrio* spp.)、假单胞菌 (*Pseudomonas* spp.)、气单胞菌 (*Aeromonas* spp.) 和丝状细菌 (*Leucothrix* spp.) 等。Lightner (1977) 报道了气单胞菌、弧菌、假单胞菌及藻类综合作用引起的对虾疾病,但至今尚未由气单胞菌单独引起对虾疾病的报道。本文报告由二种气单胞菌引起养成期中国对虾的败血病。

1 材料与方 法

1.1 病虾的来源与症状 病虾于1992年7月上旬取自黄岛水产增殖站和青岛海洋大学太平角试验场的中国对虾 (*Penaeus chinensis*)。病虾体长8—10cm,体色加深,部分肢鳃和鳃盖内膜发黑,鳃丝坏死变黑,有时甲壳伴有斑点状溃疡。显微镜观察发现鳃及体表污物附着少,鳃丝水肿或顶端愈合、腐烂,严重者鳃丝全部坏死,血液凝固慢,血液及肝胰脏内有活动细菌。消化道内含有少量食物。

1.2 病原菌的分离与纯化 取病虾各5尾,行体表清洗、消毒后用无菌接种针进行心脏穿刺,在2216E平板培养基上反复划线,于25℃培养48h,选择优势菌落重复划线分离,获得纯培养后转接到2216E斜面培养基,于15℃保存,备用。

1.3 人工感染试验 取已暂养稳定的健康虾(8—10cm)于0.6m³的玻璃缸中,每缸放水0.4m³。每缸为一组,放虾6尾,共18组。水温为20—24℃,pH值7.8—8.5,连续充气,每天换全部水一次,每天观察记录死亡虾数,连续观察7d。

1.3.1 注射感染 将培养24h的病原菌,用无菌生理盐水洗下,制成不同浓度的菌悬液,使9201和9211菌的浓度梯度分别为 4.8×10^8 , 4.8×10^7 , 4.8×10^6 cell/ml 和 $3.2 \times$

* 硕士学位论文。樊海平,男,出生于1967年5月,硕士,现工作于福建省淡水水产研究所(福州),350002。陈世阳教授、徐怀恕教授、周惠民教授和陈驹研究员对本文提出修改意见,谨志谢忱。
收稿日期:1993年5月15日,接受日期:1994年1月10日。

10^7 , 3.2×10^7 , 3.2×10^6 cell/ml, 用无菌注射器从经过局部消毒的虾腹部进行肌肉注射, 每尾注射 0.1ml, 对照组注射等量的无菌生理盐水。

1.3.2 创伤感染 用消毒剪剪去二组虾的一角尾扇, 另二组剪去 1—2 片鳃丝。9201 菌浓度为 5.6×10^8 cell/ml, 9211 菌为 4.7×10^9 cell/ml, 感染组于菌液中浸浴 12h 后移到清洁海水饲养, 对照组未经菌液浸浴。

1.3.3 浸浴感染 9201 菌浓度为 5.6×10^8 cell/ml, 9211 菌为 4.7×10^9 cell/ml, 健康虾浸浴 24h 后将虾移至清洁海水饲养。对照组未经菌液浸浴。

1.3.4 投喂感染 每 1ml 菌液(浓度约为 10^{10} — 10^{12} cell/ml) 与 2g 饵料混合均匀, 静态吸附 10min 后投喂, 每缸每天投喂 2 次, 每次每缸 1g, 连续投喂 9d, 对照组投喂未混合细菌的饵料。

1.4 病原菌的重复分离与感染 按上述细菌分离纯化法从注射感染出现病症的虾分离细菌进行重复注射感染, 菌液浓度 92011 (由 9201 菌注射感染虾分离) 为 2.3×10^8 , 2.3×10^7 , 2.3×10^6 cell/ml; 92111 菌(由 9211 菌注射感染虾分离) 为 2.7×10^8 , 2.7×10^7 , 2.7×10^6 cell/ml。

1.5 病原菌的鉴定 病原菌鉴定按中国科学院微生物研究所细菌分类组(1978)和菲利浦(1989)进行, 根据 Krige (1984) 分类系统鉴定至种。

1.6 病原菌对温度、盐度和 pH 的耐受试验 于 2211E 液体培养基(每管 5ml) 中加 1 ml 培养 24h 的菌悬液,(对照组另加一滴浓盐酸将细菌杀死), 静止培养 24h 后, 用 721 分光光度计测定培养液的 O.D. 值 ($\lambda = 560\text{nm}$)。所设温度梯度为 3.5, 8, 10, 20, 30, 40, 50℃; 盐度梯度为 0, 5, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100; pH 梯度为, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12。

1.7 药物敏感性试验 所用每片含药物 10 μg 的 20 种药敏试纸从上海生物制品公司购得, 其余为自制, 每片含药物 50 μg 。二氯异氰尿酸、鱼乐消毒剂、漂白粉用打洞法, 每洞(直径 5mm) 放药物 50 μg , 每个平板贴纸片 4 片或打洞 2 个, 每种药物 2 个重复, 采用密划线法接种细菌, 于 25℃ 培养 36h, 测量抑菌圈直径。

1.8 药物治疗试验 取病虾饲养于玻璃缸, 每缸 6 尾为一组, 共 4 组。二组分别投喂含氯霉素或氟哌酸均为 2‰ 的药饵, 另二组除投喂氯霉素药饵外, 于水中连泼洒 3d 防消散, 浓度分别为 0.5×10^{-6} mg/L 和 0.3×10^{-6} mg/L。每天投饵换水一次, 连续饲养 12d。

1.9 病理变化的观察 取自然病虾和人工感染病虾的各组织器官, 分别用 Bouin 液和 FAA 液固定, 常规石蜡切片法, H.E. 染色后观察病理变化, 并拍照。

2 结果

2.1 病原菌的分离与纯化结果 从所取病虾均能分离到细菌, 形态与色泽一致的菌落占绝对优势, 选择的优势菌有 2 种形态, 得 2 个菌株, 分别为 9201 和 9211。

2.2 人工感染与重复分离、感染结果 注射感染, 当两种菌浓度均为 10^8 cell/ml 时, 死亡率均为 100%; 当菌液浓度为 10^7 cell/ml 时, 死亡率均为 83.3%; 当菌液浓度为 10^6 cell/ml 时, 两种菌引起的死亡率有所差异。创伤感染中尾扇创伤引起的死亡率比鳃创伤引起的死亡率低。浸浴感染虽然两种菌液的浓度不同, 但均能引起 16.7% 的死亡率。投喂感染引起的死亡率均为 66.7%。重复分离细菌得到与感染菌株相同的菌株, 重复感染结

果进一步证实了所分离菌为病原菌。人工感染与重复感染结果列于表 1。

表 1 人工感染与重复感染结果

Tab. 1 The results of artificial infection and reinfection to *Penaeus chinensis*

注射感染												
菌株	组别	菌液浓度 (cell/ml)	试验天数和对虾死亡数									死亡数(%)
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	
9201	1	4.8×10^8	6 ¹⁾	0	0	0	0	0	0	0	0	100
	2	4.8×10^7	2 ¹⁾ +1	1 ¹⁾	1 ¹⁾	0	0	0	0	0	0	83.3
	3	4.8×10^6	1 ¹⁾	0	0	1 ¹⁾	1 ¹⁾	1	0	0	0	66.7
9211	1	3.2×10^8	4 ¹⁾ +1	1 ¹⁾	0	0	0	0	0	0	0	100
	2	3.2×10^7	2 ¹⁾	0	1 ¹⁾	0	1 ¹⁾	1	0	0	0	83.3
	3	3.2×10^6	1 ¹⁾	1 ¹⁾	0	1	0	0	0	0	0	50
对照		0.85%生理盐水	1	0	0	0	0	0	0	0	0	16.7
创伤感染												
9201	1	5.6×10^8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	16.7
	2	5.6×10^8	0	0	1 ¹⁾	0	1 ¹⁾	0	0	0	0	33.3
9211	1	4.7×10^9	0	0	1	0	0	0	0	0	0	16.7
	2	4.7×10^9	0	1 ¹⁾	1 ¹⁾	0	0	1 ¹⁾	0	0	0	50
对照		0.85%生理盐水	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
浸浴感染												
9201		5.6×10^8	0	0	1	0	0	0	0	0	0	16.7
9211		4.7×10^9	0	0	0	0	1	0	0	0	0	16.7
对照		清洁海水	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
投喂感染												
9201			0	0	0	3 ¹⁾	1 ¹⁾	0	0	0	0	66.7
9211			0	0	1 ¹⁾	0	0	2 ¹⁾	1 ¹⁾	0	0	66.7
对照			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
重复感染试验												
92011	1	2.3×10^8	4 ¹⁾	0	1 ¹⁾	1 ¹⁾	0	0	0	0	0	100
	2	2.3×10^7	1 ¹⁾	1 ¹⁾	1 ¹⁾	0	0	0	0	0	0	50
	3	2.3×10^6	1 ¹⁾	0	0	1 ¹⁾	0	0	0	0	0	33.3
92111	1	2.7×10^8	0	3 ¹⁾ +1	1 ¹⁾	1 ¹⁾	0	0	0	0	0	100
	2	2.7×10^7	0	1 ¹⁾	3 ¹⁾	0	1 ¹⁾	0	0	0	0	83.3
	3	2.7×10^6	0	1 ¹⁾	2 ¹⁾	0	1 ¹⁾	0	0	0	0	66.7
对照		0.85%生理盐水	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

1) 鳃丝部分发黑。创伤感染结果中组别 1 为尾扇创伤;组别 2 为鳃创伤。

2.3 病原菌的鉴定结果 两种菌在 2216E 液体培养基上层形成菌膜。9201 及 92011 菌在 2216E 平板培养基上形成边缘整齐、半透明圆形菌落,直径为 10mm 左右,表面湿

润,质地粘稠,稍有异味。9211 及 92111 菌在 2216E 平板上除为乳白色和粘稠不如 9201 和 92011 菌外,其余特征与 9201 菌一致。9201 和 92011 菌大小为 $(0.8-1.2)\mu\text{m} \times (0.5-0.8)\mu\text{m}$; 9211 和 92111 菌大小为 $(1.0-1.6)\mu\text{m} \times (0.5-0.7)\mu\text{m}$ 。病原菌的鉴定试验结果见表 2。对照 Krieg (1984) 分类系统, 9201 和 92011 定为嗜水气单胞菌 (*A. hydrophila*); 9211 和 92111 定为豚鼠气单胞菌 (*A. caviae*)。

表 2 病原菌的生物学特征和生理生化特性

Tab. 2 The biological, biochemical and physiological characteristics of the bacteria isolated from the diseased prawn (*Penaeus chinensis*)

项目特征	9201	9211	项目特征	9201	9211
葡萄糖	⊕	+	密二糖	⊕	⊕
蔗糖	+	+	鼠李糖	-	-
乳糖	-	-	鞣糖	-	-
麦芽糖	+	+	山梨糖	-	-
果糖	⊕	⊕	L-树胶醛糖	-	-
淀粉	+	+	棉子糖	-	-
肌醇	-	-	木糖	-	-
甘露醇	⊕	⊕	山梨糖	-	-
半乳糖	⊕	⊕	卫矛糖	-	-
0/129 敏感性 (150ug)	-	-	TSI 发酵蔗糖	+	+
0/129 敏感性 (10ug)	-	-	水溶性色素	-	-
革兰氏染色	-	-	石蕊牛奶反应	碱	碱
运动性	+	+	NH ₄ ⁺ 或葡萄糖唯 一碳源或氮源	+	+
极生单鞭毛	+	+	致病性	+	+
无 NaCl 生长	+	+	过氧化氢酶	+	+
TCBS 上生长	-	-	淀粉酶	+	+
H ₂ S 产生	+	-	脲酶	-	-
葡萄糖发酵	+	+	卵磷脂酶	+	+
葡萄糖产气	+	-	明胶酶	+	+
V-P 反应	+	-	氧化酶	+	+
甲基红反应	+	+	脂酶	+	+
吲哚反应	+	+	几丁质酶	-	-
柠檬酸盐利用	+	-	凝固酶	+	-
硝酸盐还原	+	+	酪蛋白酶	+	-
水解纤维素	-	-	苯丙氨酸脱氨	-	-
丙二酸盐利用	+	+	精氨酸双水解	+	+
水解果胶	-	-	精氨酸脱羧	+	-
果聚糖产生	-	-	色氨酸脱氨	-	-
产氨试验	+	+	鸟氨酸脱羧	-	-
葡萄糖酸盐氧化	-	-	赖氨酸脱羧	+	-

⊕表示产酸产气。

2.4 病原菌对温度、盐度和 pH 的耐受性结果 两种病原菌对温度、盐度和 pH 的适宜范围及最适度一致。适宜范围分别为 8—40℃, 0—50 和 6—11; 最适度分别为 30℃,

35 和 8。

2.5 药物敏感性试验结果 结果见表 3。两种病原菌均对氯霉素、氟哌酸和复方新诺

表 3 病原菌对药物的敏感性

Tab. 3 The sensitivity of the pathogenic bacteria to drugs

药物名称 (10 μ g)	抑菌效果		药物名称 (50 μ g)	抑菌效果	
	9201	9211		9201	9211
痢特灵	+	+	螺旋霉素	-	-
链霉素	+	+	磺胺	+	+
庆大霉素	++	+	土霉素	-	-
复方新诺明	++	++	奎宁	-	-
新霉素	-	-	漂粉精	+	+
先锋霉素 II 号	-	+	吡嗪酸	+	+
柱晶霉素	-	+	交沙霉素	-	-
四环素	-	-	多菌灵	+	+
苯唑青霉素	-	-	鱼乐消毒剂	+	+
羧苄青霉素	++	+	磺胺嘧啶	-	-
红霉素	+	+	氟哌酸	++	++
青霉素 G	-	-	氯胺 T	-	-
洁霉素	+	+	防消散	+	+
氨苄青霉素	+	+	二氯异氰尿酸	+	+
妥布霉素	+	+	唑乙醇	+	+
丁胺卡那霉素	+	+	呋喃西林	+	+
先锋霉 V 号	-	-			
氯霉素	++	++			
麦迪霉素	-	-			

++ 敏感; + 中度敏感; - 不敏感。

明敏感。

2.6 药物治疗试验结果 用氯霉素和氟哌酸药

饵投喂病虾 12d, 病虾的死亡率均为 20%, 蜕皮率为 80%; 12d 后镜检存活虾的血淋巴, 未发现细菌。

氯霉素药饵和防消散水中泼洒合用, 当防消散浓度为 0.5×10^{-6} mg/L 时, 第 1 天便导致病虾全部死亡; 而当防消散浓度为 0.3×10^{-6} mg/L 时, 12d 内病虾全部存活, 12d 后镜检活虾的血淋巴, 未发现细菌。

2.7 病理变化观察结果 病虾鳃丝肿大, 有的鳃丝顶端愈合, 鳃血管内有大量细菌。病情严重时, 鳃丝顶部或整个鳃丝坏死发黑。肢鳃和鳃盖内膜, 由于血细胞浸润沉积死亡而形成黑色斑块。消化道粘膜层脱落, 粘膜下层血细胞浸润, 严重时形成结节。心脏表面膜部分坏死, 上皮组织与结缔组织间血细胞浸润, 肌纤维坏死, 形成结节。肝胰腺坏死。

3 讨论与结论

嗜水气单胞菌和豚鼠气单胞菌在海水及养殖池底泥沙中普遍存在, 当环境条件合适时, 它们迅速繁殖。1992 年 6—7 月, 北方雨量偏少, 养殖水体盐度、温度偏高, 这与本试验所得两种病原菌迅速生长所需条件相符, 因而病原菌在养虾池内大量繁殖而暴发虾病,

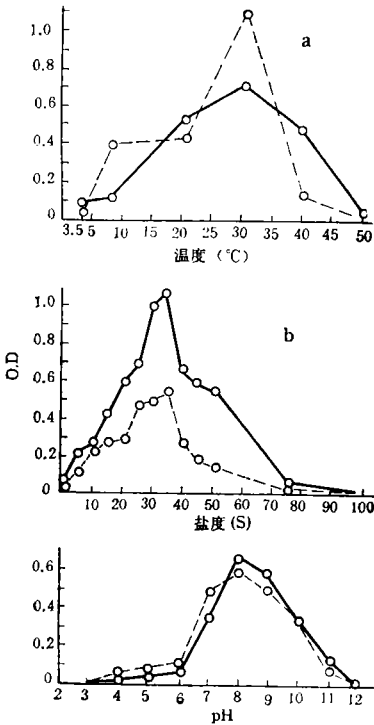


图 1 病原菌的生长与温度(a)、盐度(b)和 pH(c)的关系

Fig. 1 Relationship between reproduction of the pathogenic bacteria and the temperature(a), salinity(b) and pH (c)

2216E 液体培养基, pH = 7.8 (c 除外); NaCl = 35 (b 除外); T = 25 $^{\circ}$ C (a 除外), 静态培养 24h。——嗜水气单胞菌; ----- 豚鼠气单胞菌。

说明环境因子是诱发该败血病的主要原因,因此,对水质因子及病原菌数量检测能预报本病的发生。

试验结果表明,病原菌主要经口传播,其次亦能由皮肤创伤处入侵虾体。在发生本病的养虾池内虾数量在短时期内迅速减少。而死虾尸体很难找见,说明死虾被健康虾摄食后,细菌在虾体间迅速传播,这与陆承平(1992)及 Ventura 等(1991)报道嗜水气单胞菌经口传播鱼病一致。

嗜水气单胞菌主要存在于淡水中,引起多种淡水养殖动物的疾病(Austin et al., 1987),而本文所分离到的嗜水气单胞菌在高盐条件下仍能良好生长,并能引起对虾疾病,这在国内外还是首次报道。嗜水气单胞菌具 R 质粒,因而对磺胺、四环素、链霉素及氯霉素产生抗药性(陆承平,1992),由此提示,在应用抗生素来控制嗜水气单胞菌引起的对虾疾病,应注意菌株对药物产生抗性,这部分工作还待进一步研究。

试验结果提示,根据体色加深,鳃丝水肿、腐烂坏死发黑,鳃盖内膜发黑,血液凝固慢,血淋巴中具活动细菌,体表及鳃污浊生物附着量少可诊断本病。

实验结果表明,以含氯消毒剂与抗生素药饵治疗该败血病时,应考虑到病虾鳃已受损伤,而有机氯对虾鳃具一定损害作用,浓度较高的药量易加速病虾的死亡,应根据池塘水质条件,应用低浓度的含氯消毒剂。

参 考 文 献

- 中国科学院微生物研究所细菌分类组,1978,一般细菌常用鉴定方法,科学出版社(北京),111—193。
陆承平,1992,致病性气单胞菌及其所致鱼病综述,水产学报,16(3): 282—288。
菲利浦, G., 厦门大学生物学系微生物学教研室译,1989,普通细菌学方法手册,厦门大学出版社(厦门),509—548。
Austin, B. and Austin, D. A., 1989, *Aeromonads*, In *Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish*, Ellis Horwood Limited (New York, Chichester, Brisbane, Toronto), pp. 111—177。
Krieg, N. R., 1984, Genus *Aeromonas*, In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9th, ed. by Holt, J. G., Williams Wilkins (Baltimore), pp. 545—548。
Lightner, D. V., 1977, Shrimp diseases, In *Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture*, ed. by Sindermann, C. J. and Lightner, D. V., Fisheries Scientific Publishing Company (Amsterdam, Oxford, New York), pp. 42—86。
Ventura, M. T., and Griggie, J. M., 1991, Evaluation of portal of entry of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish, *Aquaculture*, 65 (3/4): 205—214。

RESEARCH ON THE SEPTICEMIA OF *PENAEUS CHINE- NSIS* CAUSED BY TWO SPECIES OF *AEROMONAS*

Fan Haiping, Meng Qingxian, Yu Kaikang

(Fishery College, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003)

ABSTRACT

An epizootic septicemia of *Penaeus chinensis* was studied in 1982—1983 by isolating pathogens, injecting infection, immersing infection, wounding infection, feeding infection, re-isolating pathogens, testing the pathogens biochemical and physiological characteristics, testing the pathogenic bacteria's sensitivity to drugs, observing the pathological changes of ill prawn. The *Aeromonas hydrophila* and *A. caviae* that proved to be the pathogenic bacteria were optically grown in 2216E liquid medium at 30°C, 35 salinity, 8pH, and were sensitive to chloramphenicol, norfloxacin, SMZ-TMP. Necrosis occurred in part of or the whole gill, mastigobranchite, innermembrane of the cephalothorax heptopancreas. The digestive tract mucosa was destroyed and multiple nodules were formed in the heart and digestive tract submucosa.

Key words *Aeromonas* *Penaeus chinensis* Septicemia