

文章编号:1005-8737(2000)03-0089-04

中华绒螯蟹“腹水病”及“抖抖病”并发病原的研究

沈锦玉,尹文林,钱冬,刘问,曹铮,沈智华,吴颖蕾,张念慈

(浙江省淡水水产研究所,浙江湖州313001)

摘要:于1998~1999年对中华绒螯蟹主要细菌性疾病“腹水病”、“抖抖病”并发病原进行研究。结果表明:经细菌学鉴定6株病原菌,其中5株为嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*),1株为拟态弧菌(*Vibrio mimicus*),用细菌人工感染蟹,其LD₅₀为 $8.88 \times 10^3 \sim 1.42 \times 10^5$ CFU/只;6株细菌对13种药物的敏感性有明显差异。

关键词:中华绒螯蟹;细菌性疾病;嗜水气单胞菌;拟态弧菌;腹水病;抖抖病
中图分类号:S945 **文献标识码:**A

近年来随着中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)养殖规模的扩大,养殖年份的增加,各种疾病不断出现,特别是“抖抖病”及其并发病、“腹水病”等病毒和细菌性疾病,危害较大^[1]。据笔者调查,一般养殖蟹平均死亡率达30%~40%,有的养殖场高达80%,且危害性逐步增大,这与杨先乐、魏泽能等的调查基本一致^[2,3]。对中华绒螯蟹病毒性“抖抖病”已有报道^[4-6],但尚未见生产中存在的“抖抖病”并发病的报道。有关中华绒螯蟹细菌性疾病的研究,仅陆宏达等^[7]对中华绒螯蟹腹水病进行了研究,认为腹水病是由气单胞菌和弧菌感染引起的。黄琪琰^[8]认为甲壳溃疡病综合症的病因是一种弧菌,遗憾的是没有回接试验的结果。另外,国外资料报道^[9-14]蓝蟹存在多种病毒、细菌。

有鉴于此,1998年以来,我们对中华绒螯蟹腹水病、“抖抖病”并发病进行了病原分离、特性测定、分类鉴定、药物敏感试验及动物感染试验等研究,为认清中华绒螯蟹疾病的类型、减少养殖场由于不明病因而滥用药物的现象以及为生产上的蟹病防治提供帮助。

1 材料与方法

1.1 病蟹的来源、主要疾病及症状

病蟹来自浙江湖州、绍兴、桐乡、嘉兴及江苏等多家蟹养殖场。主要疾病及症状为:①腹水病:该病5~11月均有发生,高峰期7~9月。危害对象主要是1龄幼蟹到成蟹,外表无明显的症状,在腹甲与背甲连接处肿胀,部分蟹全身性浮肿,濒临死亡时大多爬至岸边或水草上,运动迟缓,不吃食,有的病蟹口吐黄水。解剖症状,打开背甲时有大量淡黄色腹水,肝呈黑色或淡黄色,鳃呈棕色,病蟹胃肠壁无明显症状,肠内有少量的食物,有的肠内充满淡黄色粘液。死亡率高达80%。②“抖抖病”并发病:发病率及死亡率均较高,且传染迅速,发病急,一旦发病用药物较难控制。主要危害1龄幼蟹到成蟹,同一池塘中蟹的死亡次序往往从大到小。病蟹有或无抖抖的症状。病蟹死亡前爬上岸,对外界反应的敏感性降低,运动迟缓,不吃食或很少吃食,有的蟹腹部朝上。肝呈黄色,肠道无食物。

1.2 病原分离

从患病蟹的肝、血、肌肉等组织进行细菌分离,所用培养基为普通营养肉汤。

1.3 细菌分类鉴定

纯培养的细菌经28~30℃、18~20 h 平皿培养

收稿日期:2000-03-06

作者简介:沈锦玉(1963-),女,浙江人,浙江省淡水水产研究所副研究员,从事水产病害研究。

物作革兰氏染色,进行细菌形态观察,生理生化特性测定参照 API 20E 系统进行^[15]。

1.4 药物敏感试验

药物纸片购自浙江省军分区后勤部,共 13 种抗菌药物,参照纸片法抗菌药物敏感试验操作标准进行^[16]。

1.5 人工感染试验

试验用蟹购自湖州市某养蟹场,体重 30~50 g,暂养 1 周后,进行试验。

1.5.1 细菌感染试验 用不同来源,不同病的患病蟹分离出的 34 株细菌分别制成的菌液进行感染试验。所用菌液浓度为 3×10^6 、 3×10^5 、 3×10^4 /ml。每组 5 只蟹,第 3 步足基部注射菌液 0.2 ml/只,对照组注射无菌生理盐水,剂量同试验组。饲养水温 26~28℃。按 Reed 和 Muench 氏法计算 LD₅₀。

1.5.2 组织滤液感染试验 用同批病蟹的肝、心、

鳃、胃、肠、肌肉等组织 10 倍稀释的匀浆液,经高速台式离心机以 6 000 r/min 离心 5 min 及 10 000 r/min,离心 10 min,再经 0.25 μm 微孔滤膜过滤除菌滤液,第 3 步足基部注射 0.2 ml/只,每组 4 只,对照组注射无菌生理盐水,剂量同试验组,水温同上。

2 结果

2.1 病原菌分离结果 经分离培养,有的病例分离到的细菌,菌落形态单一,色泽一致,但有的病例细菌菌落色泽不一致或多种形态。挑选菌落形态一致、占优势菌落及菌落形态或色泽不一致的菌落,进行纯培养,保存。共挑选 34 菌株。

2.2 人工感染试验

2.2.1 细菌感染结果 有的菌株毒力较弱,LD₅₀>10⁷ CFU/ml,认为不是致病菌;毒力较强且具有代表性的菌株 6 株,其感染试验结果见表 1。

表 1 细菌对健康蟹的感染试验

Table 1 Challenge test of bacteria isolated from diseased crabs

菌株号 Strain No.	菌株来源 Source	死亡时间/h Death time	细菌感染浓度/(CFU·只 ⁻¹) Bacteria concentration				LD ₅₀ /(CFU·只 ⁻¹)
			6×10 ⁵	6×10 ⁴	6×10 ³	对照 Control	
CL99816	湖州 Huzhou	4~22	5	4	1	0	8.88×10 ³
		22~136	-	1	1	0	
		死亡率/% Mortality	100	100	40	0	
CL99909	江苏 Jiangsu	4~22	5	2	2	0	1.42×10 ⁵
		22~136	-	0	0	0	
		死亡率/% Mortality	100	20	20	0	
CL99916	绍兴 Shaoxing	4~22	5	2	0	0	8.88×10 ⁴
		22~136	-	0	0	0	
		死亡率/% Mortality	100	40	0	0	
CL99920	嘉兴 Jiaxing	4~22	5	2	0	0	8.88×10 ⁴
		22~136	-	0	0	0	
		死亡率/% Mortality	100	40	0	0	
CL99817	桐乡 Tongxiang	4~22	0	0	0	0	8.88×10 ⁴
		22~136	5	2	0	0	
		死亡率/% Mortality	100	40	0	0	
CH99817	桐乡 Tongxiang	4~22	0	0	0	0	3.38×10 ⁴
		22~136	5	3	1	0	
		死亡率/% Mortality	100	60	20	0	

2.2.2 组织滤液感染结果 从患“腹水病”病蟹分离到上述菌的同批蟹组织滤液感染蟹时,不引起健康蟹发病或死亡。但从“抖抖病”并发病的蟹组织感染健康蟹,14 d 陆续发病,病蟹步足发生颤抖,不久即死亡。

2.3 细菌分类鉴定结果

经 18~20 h 平皿培养细菌,进行氧化酶、O/F

试验,氧化酶阳性及发酵型菌株为气单胞菌,该菌株较多,表 2 为代表菌株的部分生化性状。

这 6 株菌均为革兰氏阴性,短杆状,能运动,在普通琼脂平皿上,菌落圆形,微凸,表面光滑,边缘整齐,肉色,结合表 2 的生理生化特性。这 6 株菌鉴定结果:CL99816 属拟态弧菌(*Vibrio mimicus*),其余 5 株属嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)。

表 2 细菌生理生化特性(API 20E)

Table 2 Physio-biochemical characteristics of six strains by API 20E

项目 Item	菌株号 Strain No.					
	CL99816	CL99909	CL99916	CL99920	CL99817	CF99817
氧化酶 OX	+	+	+	+	+	+
O/F	F	F	F	F	F	F
产气 Gas	+	+	+	+	+	+
β-半乳糖苷酶 ONPG	+	+	+	+	+	+
精氨酸 Arg	-	+	+	+	+	+
赖氨酸 Lys	+	+	+	+	+	+
鸟氨酸 Orn	+	-	-	-	-	-
柠檬酸利用 Cit	+	+	+	+	+	+
硫化氢 H ₂ S	-	-	-	-	-	-
脲酶 Ure	-	-	-	-	-	-
色氨酸 Trp	-	-	-	-	-	-
吲哚 Ind	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	+	-	-	-
明胶酶 Gel	+	+	+	+	+	+
葡萄糖 Glu	+	+	+	+	+	+
甘露醇 Man	+	+	+	+	+	+
肌醇 Ino	-	-	-	-	-	-
山梨醇 Sor	-	-	-	-	-	-
鼠李糖 Rha	-	-	-	-	-	-
蔗糖 Sac	-	-	+	-	-	-
蜜二糖 MII	-	-	-	-	-	-
苦杏仁甙 Amy	-	+	+	-	-	-
阿拉伯糖 Ara	-	+	-	-	-	-
半固体 Mob	+	+	+	+	+	+

注: + 阳性, - 阴性, F 发酵, Fermentation.

2.4 药物敏感试验

表 3 细菌对药物的敏感性试验

Table 3 Sensitivity of bacteria to antibiotics

菌株号 Strain No.	丁胺卡那 Amikacin	庆大霉素 Gentamycin	氟哌酸 NFX	四环素 TC	氯霉素 CP	红霉素 ER	链霉素 Streptomycin	强力霉素 Doxycycline	青霉素 G Penicillium G	痢特灵 NF	环丙沙星 CFS	先锋 V Cephazolin	复方新诺明 SMZ+TMP
CL99816	++	++	+++	+	+++	++	++	++	-	++	+++	++	+++
CL99909	++	++	+++	-	+++	+	+	+	+	+	+++	-	++
CL99916	++	++	+++	++	+++	++	+++	++	-	+	+++	-	+++
CL99920	+	-	++	-	+	+	+	++	+	++	+++	+	+
CL99817	+	++	+++	+	++	++	++	++	-	+	+++	-	++
CF99817	+	++	+++	+	+++	++	++	++	-	++	+++	-	++

注: +++ 高敏, Highly sensitive; ++ 中敏, Sensitive; + 低敏, Low sensitive; - 不敏感, Insensitive.

(2)气单胞菌是广泛存在于水体中的致病菌, 寄主范围广, 引起黄鳝、泥鳅、斑点叉尾鲷、中华鳖等水生动物疾病^[17~20]。从养殖蟹细菌性疾病的不同病例中都分离到气单胞菌, 说明气单胞菌也是河蟹疾病的主要病原, 并且在“抖抖病”引起的急性死亡及蟹腹水病中起着重要的作用。气单胞菌对于水产动物危害的广泛性值得我们进一步研究其致病机理, 特别是对于甲壳动物的分子致病机理。

对 6 株细菌的 13 种常用药物敏感性试验发现, 分离菌对药物的敏感性有较大差异。结果见表 3。

3 讨论

(1)“腹水病”及“抖抖病”是近年来中华绒螯蟹养殖的主要病害, 养殖蟹的死亡率可达 30% 以上, 高的可达 70%~80%。一般认为中华绒螯蟹“抖抖病”由病毒引起^[4~6]。笔者在典型“抖抖病”中华绒螯蟹中也观察到了病毒颗粒, 大量存在于鳃、胃、肠、肝胰腺等组织中, 用组织除菌滤液注射健康蟹, 可引起蟹死亡, 并呈现出典型的抖抖病症状¹⁾。但在实验中发现, “抖抖病”病蟹中不仅存在病毒, 还存在大量细菌, 能在几个小时至几天时间内使健康蟹死亡, 但没有“抖抖病”症状, 而用病蟹除菌组织滤液感染蟹则病程较长, 需十几天时间, 并表现出典型抖抖症状。同时在养殖场病例调查中也发现, 有些“抖抖病”发病过程中, 并未出现典型抖抖症状, 就发生大量死亡。因此, 认为是由于与病毒并发感染的细菌并发病, 在病毒感染的“抖抖”症状表现出来以前就因细菌感染而死亡。此外, 从中华绒螯蟹腹水病病例中分离到毒力较强的细菌, 同时组织过滤液不能复制疾病。可以认为, 细菌引起的感染是中华绒螯蟹“抖抖病”并发病及腹水病的主要因素。

(3)在养殖生产上, 养殖户反映使用药物无效, 原因很多。其中, 较重要的是滥用药物或不对症用药, 致使由病毒感染引起的疾病也用抗生素治疗, 故往往收不到效果。此外, 各养殖场发病的蟹, 有些症状不是很明显, 即使同一症状的各菌株对药物的敏感性也是有差异的。应结合病原分离、药物敏感试验, 选择敏感药物供生产实际应用。但对于中华绒螯蟹的病毒性疾病, 目前还缺乏有效的防治药物。应采取预防为主, 特别是要开展苗种的检疫, 并加强养殖水质的环境改良, 并适当服用增强蟹自身免疫

1) 沈锦玉, 等. 华中农学院报(待刊).

力的药物。

参考文献:

- [1] 杨先乐. 河蟹的主要疾病及其防治[J]. 水产科技情报, 1997, 24(5):236-237.
- [2] 杨先乐, 蔡完其. 中华绒螯蟹“抖抖病”流行情况初步调查[J]. 水产科技情报, 1998, 25(6):278-279.
- [3] 魏泽能. 河蟹颤抖病的流行病学调查[J]. 淡水渔业, 1999, 29(11):16-17.
- [4] 陆宏达, 范丽萍, 薛美. 中华绒螯蟹小核糖核酸病毒病及其组织病理学[J]. 水产学报, 1999, 23(1):61-68.
- [5] 何介华, 贺路, 曾令兵, 等. 中华绒螯蟹颤抖病病原的初步研究[J]. 淡水渔业, 1999, 29(3):10-114.
- [6] 陈辉, 薛仁宇, 贡成良. 中华绒螯蟹一种球状病毒颗粒的电镜观察[J]. 中国水产科学, 1999, 6(3):114-115.
- [7] 陆宏达, 金丽华, 范丽萍, 等. 中华绒螯蟹细菌性病原的分离和鉴定[J]. 水产学报, 1999, 23(4):381-386.
- [8] 黄琪琰, 金丽华, 陆宏达. 中华绒螯蟹甲壳溃疡及重金属离子偏高综合症的初步研究[J]. 上海水产大学学报, 1997, 6(1):1-4.
- [9] Johnson P T. Viral diseases of the blue crab, *Callinectes sapidus* [J]. Mar Fish Rev, 1978, 40(10):13-15.
- [10] Johnson P T, Farley C A. A new enveloped helical virus from the blue crab, *Callinectes sapidus* [J]. J Invertebr Pathol, 1980, 35:90-92.
- [11] Johnson P T. Bacterial infection in the blue crab, *Callinectes sapidus*: Course of infection and histopathology [J]. J Invertebr Pathol, 1996b, 35:90-92.
- [12] Fred A Phillips, James T Peeler. Bacteriological survey of the blue crab industry [J]. Applied Microbiology, 1972, 24(6):958-966.
- [13] Fishbein M, I J Melilman, J Pitcher. Isolation of *Vibrio Parahaemolyticus* from the processed meat of Chesapeake Bay blue crab [J]. Applied Microbiology, 1970, 20:176-178.
- [14] Sizemore R K, R R Colwell, H S Tubiash, et al. Bacterial flora of the hemolymph of the blue crab, *Callinectes sapidus*: Numerical taxonomy [J]. Applied Microbiology, 1975, 29(3):393-399.
- [15] Brooks K A, Jens M, Sodeman T M. A clinical evaluation of the API microtube system for identification of *Enterobacteriaceae* [J]. Am J Med Techn, 1974, 40:55-61.
- [16] 姜永新. 临床细菌检验与质量控制 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1987. 120-129.
- [17] 沈锦玉, 陈月英, 钱冬, 等. 浙江养殖鱼类暴发性流行病病原的研究 [J]. 科技通报, 1993, (6):397-401.
- [18] 樊海平, 孟庆显, 俞开康, 等. 由二种气单胞菌引起的中国对虾败血症的研究 [J]. 海洋与湖沼, 1995, 26(3):302-308.
- [19] 陈怀青, 陆承平. 嗜水气单胞菌: 黄鳍出血性败血症的病原 [J]. 中国人兽共患病杂志, 1991, 7(4):21-23.
- [20] 孙佩芳, 蔡完其, 吴建农, 等. 蟹穿孔病的病原研究 [J]. 水产学报, 1996, 20(2):120-124.

Studies on the pathogens of bacterial diseases of *Eriocheir sinensis*

SHEN Jin-yu, YIN Wen-lin, QIAN Dong, LIU Wen,
CAO Zheng, SHEN Zhi-hua, WU Ying-lei, ZHANG Nian-ci
(Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China)

Abstract: 'Hydroperitoneum disease' and 'trembling disease' are 2 kinds of bacteria diseases mainly happening in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* from juvenile to adult. From diseased crab the pathogens were isolated, which were *Aeromonas hydrophilia* and *Vibrio mimicus*. The results show that the LD₅₀ is $8.88 \times 10^3 \sim 1.42 \times 10^5$ CFU/crab for the juvenile with body weight 30~50 g, and the sensitivity of different bacteria to antibiotics is different.

Key words: *Eriocheir sinensis*; bacteria disease; *Aeromonas hydrophilia*; *Vibrio mimicus*; hydroperitoneum disease; trembling disease