

一种新的对虾病原菌——雷氏普罗威登斯菌

战文斌 周丽 陈章群 俞开康 孟庆显

(青岛海洋大学, 266003)

摘要 本文从患败血病的中国对虾体内分离到多株细菌, 其中三株经人工感染证实为病原菌, 又经40多项形态、生理、生化特性测试, 鉴定为雷氏普罗威登斯菌(*Providencia rettgeri*), 其主要特性为杆状, 革兰氏阴性, 周生鞭毛, 运动, 无自然游动现象, 兼性厌氧, 苯丙氨酸脱氨酶、柠檬酸盐利用、吲哚、甲基红反应均阳性, 发酵甘露醇、肌醇、甘露糖产酸。赖氨酸、鸟氨酸脱羧酶、精氨酸双水解酶、VP反应均阴性。生长最适温度、NaCl、pH范围分别为25℃—30℃、0.5%—1.5%、7.0—9.0。对羧苄青霉素、先锋霉素5号、氯霉素、SMZ+TMP、氟哌酸、链霉素等极为敏感。雷氏普罗威登斯菌引起对虾败血病在国内外尚属首次报道。

关键词 中国对虾, 雷氏普罗威登斯菌, 对虾败血病

在1993年7—8月份的对虾暴发性流行病发生期间, 山东省昌邑县下营镇养殖公司养殖的中国对虾发生了严重的细菌性败血病, 从垂死的对虾血淋巴液中分离到多株细菌, 其中三株经人工感染试验证实其致病力很强, 经鉴定为雷氏普罗威登斯菌。目前国内已见报道的对虾细菌性病原主要是几种弧菌(*Vibrio* spp.)^[3,5,6,7,10,11], 其次是气单胞菌(*Aeromonas* spp.)^[8]及普通变形菌(*Proteus vulgaris*)^[4], 由雷氏普罗威登斯菌引起对虾败血病的报道在国内外尚属首次。

1 材料与方法

1.1 病原菌的分离

取濒死对虾5尾, 先用灭菌海水将病虾体表洗净, 再用70%的酒精棉球将头胸甲背部与腹部的连接处附近反复擦拭消毒, 最后从关节处穿刺自围心窦取血淋巴, 划线接种于2216E、TSA多个平板培养基上, 25℃恒温培养24小时后, 挑取形态一致的优势菌落, 进一步划线纯化, 直至获得纯培养后, 移入斜面保存。

1.2 病原菌人工感染试验

收稿日期: 1995—09—19。

※国丽萍, 1991。一种由气单胞菌 *Aeromonas sobria* 引起的越冬亲虾败血病的研究。青岛海洋大学硕士学位论文。

※樊海平, 1993。由气单胞菌引起的中国对虾败血病的研究。青岛海洋大学硕士学位论文。

取健康虾(体长 7—9cm)为人工感染用虾,分若干试验组及对照组,每组虾 10 尾,分别养于玻璃缸中(盛海水 100L),每日换水一次,充气,投饲,试验水温 26—27℃, pH 8.0—8.5,连续观察 4—8 天。试验设二个重复。

1.2.1 注射感染 将培养 24 小时的试验菌,用灭菌生理盐水制成药 2×10^7 Cells/ml 的菌悬液,在对虾的第三腹节处肌肉注射 0.1ml/尾,对照组注射同量 0.85% 的灭菌生理盐水。

1.2.2 创伤感染 将试验虾剪掉几片鳃和二片侧叶,放养在试验菌浓度为 2×10^5 Cells/ml 的海水中,对照组放养在不加菌的海水中。

1.2.3 菌浴感染 将试验虾放养在试验菌浓度为 2×10^5 Cells/ml 的海水中,对照组放养在不加菌的海水中。

1.3 病原菌的分类、鉴定

1.3.1 形态学观察 分别将菌种接种于 2216E 固体平板、斜面及液体培养基上,25℃ 培养 24~48 小时后,观察菌落及菌体形态。对培养 16~18 小时的幼菌进行革兰氏染色,单染色,鞭毛染色,芽孢染色等,并将幼菌经 2% 磷钨酸磷酸缓冲液(pH 6.5)负染,用 H-7 000 型透射电子显微镜(TEM)观察菌体形态。

1.3.2 生化特性测试 从自然患病虾中分离 3 株菌,人工感染虾中分离 3 株菌,共 6 株菌。按照《一般细菌常用鉴定方法》^[1]和《普通细菌学方法手册》^[8]并参考 West^[13]、Furniss 等^[9]的方法进行。

1.3.3 生理特性测试 分别配制不同 NaCl 浓度(梯度为 0.5%)和不同 pH(梯度为 1)的 2216E 液体培养基,等量分装于试管中,灭菌后,每管加入等量的幼菌菌悬液(对照管加入菌悬液后,立即加入一滴浓盐酸将菌杀死),于 25℃ 培养 24 小时,用 721 型分光光度计(波长 560nm)测 OD 值。另配制含 NaCl 1%, pH 7.6 的 2216E 液体培养基,同上方法分装试管、灭菌、接种,分别于 4℃、10℃、20℃、30℃、35℃、37℃、42℃ 静置培养 24 小时后测 OD 值。

1.3.4 药物敏感试验 本试验所用 26 种药敏纸片是由上海松江精益试剂仪器厂生产的。试验采用涂布法接种,药敏纸片(直径 6mm)贴于培养基上,25℃ 培养 48 小时后测抑菌圈直径。

2 结果

表 1 肌肉注射感染试验结果

Table 1 Results of infection test by intramuscular injection

菌株号 No. of colony	细菌数量(Cells/尾) Cells/shrimp	试验尾数 Test NO.	死亡尾数 Death No.				死亡尾数/试验尾数 Death No./Test No.
			1	2	3	4 (d)	
9301	2×10^6	10	1	3	5	1	10/10
9306	2×10^6	10	2	3	4	1	10/10
9311	2×10^6	10	1	4	5	0	10/10
对照 Control	0	10	0	0	0	0	0/10

2.1 人工感染试验

采用肌肉注射、创伤后菌浴和菌浴三种方法进行人工感染,结果(表 1、2、3)表明分离菌株是中国对虾的致病菌。感染虾表现出与自然患病虾相同的症状:体色变暗,肌肉松不透明,活力差,鳃丝肿胀,不摄食,胃内无食物,血淋巴内有细菌,不凝固,血细胞数量明显减少。

表 2 创伤感染试验结果

Table 2 Results of infection test by wounding

菌株号 No. of colony	细菌浓度(Cells/ml) Cells density	试验尾数 Test NO.	死亡尾数 Death No.							死亡尾数/试验尾数 Death No./Test No.
			1	2	3	4	5	6	7	
9301	2×10^5	10	0	0	1	1	2	3	3	10/10
9306	2×10^5	10	0	1	0	3	2	3	1	10/10
9311	2×10^5	10	0	0	2	1	3	3	1	10/10
对照 Control	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0/10

表 3 菌浴感染试验结果

Table 3 Results of infection test by dipping

菌株号 No. of colony	细菌浓度(Cells/ml) Cells density	试验尾数 Test NO.	死亡尾数 Death No.								死亡尾数/试验尾数 Death No./Test No.
			1	2	3	4	5	6	7	8	
9301	2×10^5	10	0	0	0	1	2	1	3	0	10/10
9306	2×10^5	10	0	0	1	0	2	3	1	1	10/10
9311	2×10^5	10	0	0	1	1	2	1	1	2	10/10
对照 Control	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10

2.2 病原菌的分类、鉴定

对 6 个菌株(3 株从自然患病虾分离, 3 株从人工感染虾分离)进行了 40 多项形态及生理生化的测定(表 4), 分离菌与伯杰氏系统细菌学手册(9 版)^[12]中对雷氏普罗威登斯菌的

表 4 分离菌株的特性

Table 4 Characteristics of the isolated bacteria

鉴定项目 Characteristics	分离菌株(6 株) Isolations (6 colonies)	<i>P. rettgeri</i> ^[1]
形状 Shape	直杆状 Straight rods	直杆状 Straight rods
大小 Size (μm)	0.7×1.6	$0.6 \sim 0.8 \times 1.5 \sim 2.5$
鞭毛着生 Flagella	周生 Peritrichous flagella	周生 Peritrichous flagella
革兰氏染色 Gram - staining	-	-
运动性 Motility	+	+
泳动 Swarming	-	-
NaCl 胨水中生长: Growth in peptone borth with NaCl:		
0% NaCl	+	NR ⁽²⁾
1% NaCl	+	NR
2% NaCl	+	NR
3% NaCl	+	NR
4% NaCl	-	NR
生长: Growth at:		
4℃	-	NR
10℃	+	NR
37℃	+	NR
42℃	-	NR
吲哚反应 Indole production	+	+
甲基红反应 Methyl red test	+	+

(续表 4) (Table 4- continued)

鉴定项目 Characteristics	分离菌株(6株) Isolations (6 colonies)	<i>P. retzgeri</i>
V.P. 反应 Voges - Proskauer reaction	-	-
柠檬酸盐利用 Utilization of sodium citrate	+	+
TSI 产 H ₂ S TSI H ₂ S production	-	-
脲酶 Urease	+	+
氧化酶 Oxidase	-	-
硝酸盐还原 Nitrates reduced to nitrites	+	+
苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase	+	+
脂肪酶 Lipase	-	-
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	-	-
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-	-
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	-	-
0/129 抑制: 10 μ g	-	NR
Inhibition by 0/129		NR
Phosphate: 150 μ g	+	
明胶液化(20 $^{\circ}$ C) Gelatin liquefaction	-	-
发酵产酸: Acid production from:		
葡萄糖 Glucose	+	+
甘露醇 Mannitol	+	+
肌醇 Inositol	+	+
甘露糖 Mannose	+	+
海藻糖 Trehalose	-	-
利用: Utilization of:		
乳糖 Lactose	-	-
蔗糖 Sucrose	+	d ⁽³⁾
阿拉伯糖 L - arabinose	+	-
棉子糖 Raffinose	-	-
鼠李糖 L - rhamnose	+	d
麦芽糖 Maltose	-	-
木糖 D - xylose	+	d
蕈糖 Mucate	-	-
蜜二糖 Melibiose	-	-
天门冬氨酸 Aspartate	+	NR
胱氨酸 Cystine	+	NR
谷氨酸 Glutamate	+	NR

注: (1)伯杰氏系统细菌学手册(9版)中对 *P. retzgeri* 的描述⁽¹²⁾。

(2)手册中没有记载。

(3)26~74% 为阳性。

描述一致,主要特性为直杆状,0.7 \times 1.6 μ m,革兰氏阴性,周生鞭毛(图1),具运动性,无自然游动现象,兼性厌氧,苯丙氨酸脱氨酶阳性,赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶、精氨酸双水解酶均阴性,氧化酶阴性,利用柠檬酸盐,吲哚、甲基红反应均阳性,V.P.反应阴性,甘露醇、肌醇、甘露糖产酸。分离菌株的生长最适 NaCl 范围为 0.5~1.5%,最适 pH 范围 7.0~9.0,最适温度范围 25~30 $^{\circ}$ C。

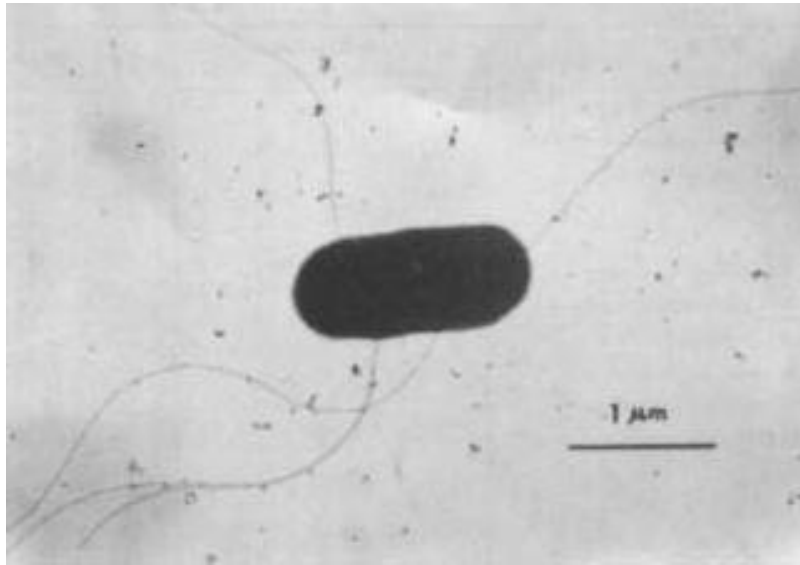


图 1 从病虾中分离出的雷氏普罗威登斯菌的电镜照片。 负染 × 20000

Fig. 1 Electron micrograph of *Providencia rettgeri* isolated from diseased shrimp. Negative strain. × 20000

2.3 药物敏感结果

对分离菌株就 26 种药进行了敏感试验(表 5), 其中对羧苄青霉素、先锋霉素 5 号、氟霉素、SMZ + TMP、氟哌酸、链霉素极为敏感。

表 5 分离菌株的药物敏感试验结果

Table 5 Sensitivity of the isolated bacteria to the 26 chemotherapeutants

药品 Medicines	抑菌圈直径(毫米) Diameter of inhibiting ring(mm)	药品 Medicines	抑菌圈直径(毫米) Diameter of inhibiting ring(mm)
丁胺卡那霉素 Amikacin	16	新霉素 Neomycin	15
庆大霉素 Gentamycin	14	羧苄青霉素 Carbenicillin	37
链霉素 Straptomycin	22	先锋霉素 I Cephalothin	21
青霉素 G Penicillin	0	先锋霉素 4 号 Cefalexini	0
妥布霉素 Tobramycin	14	洁霉素 Lincomycini	0
氯霉素 Chloramphenicol	32	先锋霉素 6 号 Cefradine	0
呋喃妥因 Nitrofurantion	0	苯唑青霉素 Oxacillin	0
新生霉素 Novobiocin	0	麦迪霉素 Medemycin	0
多粘菌素 B Polymxin B	15	氟哌酸 Noifloxacini	24
四环素 Tetracycline	10	氨苄青霉素 Ampicillin	0
SMZ + TMP	31	卡那霉素 Kanamycin	15
痢特灵 Furazolidonum	12	先锋霉素 5 号 Cefazolin	34
红霉素 Erythromycin	0	柱晶白霉素 Leucomycin	0

3 讨论

在伯杰氏手册(8 版)^[2]中尚未确定 *Providencia* 属, 但在 455 页的补充评注中, Fulton

提出将摩氏变形菌(*Proteus morganii*)并入摩根氏菌属(*Morganella*)中,无恒变形菌(*Proteus inconstans*)列为普罗威登斯菌属(*Providencia*)中。在伯杰氏系统细菌学手册(9版)^[12]中正式将普罗威登斯菌属列为肠杆菌科的第Ⅻ属,变形菌属列为第Ⅺ属,摩根氏菌属列为第Ⅹ属。关于这三个属的主要区别特性见表6。

表6 普罗威登斯、变形菌和摩根氏菌三属的区别特性

Table 6 Differential characteristics of the *Providencia*, *Proteus* and *Morganella*

特性 Characteristics	<i>Providencia</i>	<i>Proteus</i>	<i>Morganella</i>
泳动性 Swarming	-	+	-
H ₂ S 产生 H ₂ S production	-	+	-
明胶水解 Gelatin hydrolysis	-	+	-
脂肪酶 Lipase	-	+	-
柠檬酸盐利用 Utilization of citrate	+	d	-
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-	d	+
产酸: Acid production from:			
甘露糖 Mannose	+	-	+
麦芽糖 Maltose	-	d	-
以下五种醇一种以上产酸: Acid from one or more of the following polyhydric alcohols:			
肌醇 Inositol			
甘露醇 D-mannitol			
戊糖醇 Adonitol	+	-	-
阿糖醇 D-arabitol			
丁四醇 Erythritol			

Fulton^[2]提出将无恒变形菌并入普罗威登斯菌属后分成两个种,一是产碱普罗威登斯菌(*P. alcalifaciens*),二是斯氏普罗威登斯菌(*P. stuartii*)。在伯杰氏系统细菌学手册(9版)中又增加了雷氏普罗威登斯菌(*P. rettgeri*)。关于这三个种的主要区别特性见表7。

表7 普罗威登斯菌种的区别特性

Table 7 Differential characteristics of the species of the genus *Providencia*

特性 Characteristics	<i>P. alcalifaciens</i>	<i>P. stuartii</i>	<i>P. rettgeri</i>
脲酶 Urease	-	d	+
产酸: Acid production from:			
肌醇 Inositol	-	+	+
甘露醇 D-mannitol	-	d	+
戊糖醇 Adonitol	+	-	+
阿糖醇 D-arabitol	-	-	+
丁四醇 Erythritol	-	-	d
海藻糖 Trehalose	-	+	-

参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所细菌分类组, 1987. 一般细菌常用鉴定方法. 科学出版社.
- [2] 布坎南, R.E., 吉布斯, N.E. 等编, 1984. 伯杰细菌鉴定手册(第八版). 科学出版社.
- [3] 宋春华等, 1991. 中国对虾红腿病致病菌之一弧菌的研究. 齐鲁渔业, 1:9—13.
- [4] 许兵等, 1992. 一种新的对虾病原菌(普通变形菌). 水产学报, 16(2):130—136.
- [5] 孟庆显, 1991. 对虾疾病防治手册. 青岛海洋大学出版社.
- [6] 郑国兴, 1986. 养殖对虾弧菌病致病菌—非O1群霍乱弧菌的生物学性状与致病性. 水产学报, 10(2):195—202.
- [7] 郑国兴等, 1990. 中国对虾病原菌(鳃弧菌)的研究. 水产学报, 14(1):1—7.
- [8] 厦门大学生物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.
- [9] Furniss A. L. et al., The Vibrios. Public Health Laboratory Service Monograph Series No. 11, Her Majesty's Stationary Office, London. 1978
- [10] Lightner D. V. et al., A review of some major diseases of economic significance in penaeid prawns/shrimps of the Americas and Indopacific. In: Diseases in Asian Aquaculture I, (ed by M. Shariff et al.), Fish Health Section Asian Fisheries Society. 1992, 57—80.
- [11] Lightner D. V., Diseases of cultured penaeid shrimp. In: Handbook of Mariculture, Vol. 1, Crustacean Aquaculture, (ed by J. P. McVey). CRC press. 1993, 393—486.
- [12] Penner J. L., Genus *Providencia*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1, 494—496, (ed by J. G. Holt). Williams & Wilkins, Baltimore. 1984.
- [13] West P. A. et al. Identification and classification of Vibrionaceae—An overview. In: Vibrio in the environment. 285—363, (ed by R. R. Colwell), John Wiley & Sons Inc. New York. 1984.

PROVIDENCIA RETTGERI*, A NEW PATHOGEN OF *PENAEUS CHINENSIS

Zhan Wenbin Zhou Li Chen Zhangqun Yu Kaikang Meng Qingxian
(Ocean University of Qingdao, 266003)

ABSTRACT Three strains were isolated from epizootic septicemia of *Penaeus chinensis*. The challenge test showed that these isolates were proved to be the pathogens of the disease. The isolates were tested for more than 40 unit characters, according to the Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 9th, and classified as *Providencia rettgeri*.

The bacteria are Gram negative, straight rods, with peritrichous flagella; swarming does not occur. Positive for phenylalanine deaminase. Oxidase, arginine dihydrolase, lysine and ornithine decarboxylase are negative. Acid production from inositol, mannitol, mannitose, but not from trehalose. Positive for nitrates reduced to nitrites, indole production, methyl red reaction. Citrate are utilized, negative for Voges Proskauer reaction.

Optimum growth temperature, pH and salinity range from 25°C to 30°C, 7.0 to 9.0, 0.5% to 1.5% (w/v) sodium chloride respectively.

These isolates were highly sensitive to Carbenicillin, Cefazolin, Chloramphenicol, SMZ + TMP, Noifloxacin, Straptomycin etc. *P. rettgeri* was first reported as a pathogen of shrimp disease.

KEYWORDS *Penaeus chinensis*, *Providencia rettgeri*, Penaeid septicemia