

中国对虾糠虾幼体病原菌 (非 01 群霍乱弧菌)的研究

王立平 张晓华 刘 镁 段爱梅

(山东省海洋药物科学研究所, 青岛 266003)

宋晓玲

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

徐怀恕

(青岛海洋大学, 266003)

摘 要 本文对中国对虾糠虾幼体的一种病原菌——非 01 群霍乱弧菌作了研究报道。这种病的症状是病虾运动能力差、趋光性弱、镜检发现肠道肿胀。从垂死病虾中分离到 5 株细菌, 经感染健康糠虾幼体得到与病虾相同症状。5 株细菌的 47 项形态及生理生化特性与霍乱弧菌相同, 但不被 01 群霍乱弧菌多价血清凝集。血清学分型结果均为不同的 VBO 血清型 VBO 5, 14, 26, 47, 56。用 DNA 霍乱 CT 基因探针菌落原位杂交及小鼠肠结扎法测肠毒素, 表明菌株有强毒力。分离菌株对小鼠的 LD_{50} 为 1.58×10^8 个/只。

关键词 中国对虾, 糠虾幼体, 非 01 群霍乱弧菌, 弧菌病

近几年, 在育苗期间糠虾幼体死亡率可高达 70~90%, 甚至达 100%, 死亡的主要原因是海洋弧菌感染所致^[1]。但分离和鉴定这些病原或确定其病原性方面的研究却不多。

1988 年—1989 年, 崂山区蚬港和上马镇对虾养殖场的几个育苗池出现中国对虾糠虾幼体大量死亡现象。40 m³ 的育苗池一夜之间损失 900~1 750 万尾, 存活率仅为 5%。镜检发现病虾幼体肠道及血液中有大量细菌, 且肠道肿胀。我们自垂死病虾体内分离到 5 株细菌, 经鉴定均为非 01 群霍乱弧菌 *Vibrio, cholerae* (non-01)。几年的研究表明, 非 01 群霍乱弧菌是对虾育苗期间糠虾幼体大量死亡的主要原因之一。非 01 群霍乱弧菌作为苗期对虾致病菌是国内首次报道。

1 材料和方法

1.1 病原菌的分离

将病虾幼体用无菌海水冲洗数次, 置灭菌的玻璃研磨器内匀浆, 用接种环挑取匀浆液在

收稿日期: 1995-11-15。

海水营养琼脂平板划线,置 26℃ 培养箱培养 48 h,挑取形态一致的单个菌落,进一步划线纯化以获得纯培养。

1.2 人工感染实验

1.2.1 苗期糠虾幼体浸浴感染 实验用水是用煮沸消毒、过滤后的新鲜海水。取健康活泼、趋光性强的幼体(M_2)置于大烧杯中(盛有海水 2 000 ml)预养 24 h。投喂微粒饵料(市售),每日 4~6 次。实验菌株于海水营养琼脂斜面培养 24 h,培养温度为 26℃。以无菌生理盐水制成菌悬液,用 AODC 法计数,然后将菌液加入实验水体中,使水中实验菌浓度为 1.5×10^8 个/ml。每天换水两次,换水量为 1/3,连续充气增氧。对照组饲养在相同条件下,不加菌液。

1.2.2 养成期幼虾肌肉注射感染 基本处理同上。幼虾体长为 5~7 cm,实验水体为 10 升,注射部位为第二腹节,菌量为 4.0×10^7 个/尾,对照组注射无菌生理盐水 0.02 ml/尾。

1.3 分离菌的鉴定

1.3.1 分离菌的生物学性状测定 按照《一般细菌常用鉴定方法》^[2]和 Furniss 等^[8]的方法进行。菌落形态的观察在营养琼脂平板及 TCBS 琼脂平板上培养两天后进行。细菌形态的观察是取固体斜面的新鲜培养物,经革兰氏染色后,用光学显微镜观察;或经负染后,经电子显微镜观察。除耐盐性实验、TCBS 培养基生长实验,培养基均以含盐量为 2.5% 的陈海水配制。接种后在 26℃ 温箱中培养。

1.3.2 血清学分型 用中国药品生物制品检定所研制的 VBO 分型系统诊断血清,玻片凝集试验确定血清型。

1.3.3 霍乱毒素测定

1.3.3.1 DNA 霍乱 CT 基因探针菌落原位杂交^[3],用 ^{32}P 标记自显影法。

1.3.3.2 小白鼠肠结扎法 选健康小鼠,体重 15~18 g,分对照、试验两组,每组 3~4 只。试验组动物结扎肠道内注入 0.2 ml 弧菌培养液,对照组注入等量生理盐水。18 小时后肠段内有积液为阳性。

1.4 分离菌株毒性试验

选健康昆明种小鼠,体重 16~18 g,♀♂ 各半。随机分成 6 组,每组 5 只。用代表菌株 5011(VBO47)增菌后用比浊法将菌液稀释成每毫升含菌为 10^{10} 、 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 5 个浓度,每只注射 0.5 ml。对照组注射等量生理盐水。观察 5 天,记录小鼠死亡情况,用距离比例计算 LD_{50} 。

2 结果

2.1 人工感染实验

2.1.1 糠虾幼体浸浴感染 感染菌 6 小时后,糠虾幼体就开始有发病死亡现象,到第三天稳定下来。濒临死亡的幼体镜检发现肠道肿胀,一般没有食物,有食物的肠道同样也粗肿。用显微测微尺测头胸甲尖刺后 0.3 mm 处肠道宽度,受感染幼体肠道比正常肠道宽约 30 μ m。感染幼体肠道与该处体宽之比为 9/14,检查 7 尾幼体无例外(图 1)。幼体心脏、血液、肠道中有大量细菌,死亡率在 20% 左右(表 1)。对照组幼体肠道未见肿胀。

2.1.2 养成期幼虾肌肉注射感染 感染菌 4 小时后开始死亡,24 小时几乎全部死亡,5014 菌株组仅剩 2 尾,对照组因机械损伤致死一尾(表 2)。

表1 分离菌株浸浴法感染中国对虾糠虾幼体的观察

Table 1 Observations of shrimp larvae challenged with the bacterial isolates by immersion

菌株号 No. of strains	细菌数量 (个/毫升) No. of bacteria (Cells/ml)	实验虾数(尾) No. of shrimps in experiment	感染后的存活数 No. of survival shrimps	成活率(%) Survival rate(%)
5011	1.5×10^8	110	86	78.1
对照 Control	0	100	94	94.0

表2 分离菌株肌肉注射法感染中国对虾养成期幼虾的观察

Table 2 Observations of adult shrimp challenged with the bacterial isolates by intramuscular injection

菌株号 No. of strains	细菌数量 (个/毫升) No. of bacteria (Cells/ml)	实验虾数(尾) No. of shrimps in experiment	死亡虾数 1 2 3 4 5(日) No. of shrimp killed 1 2 3 4 5(days)					死亡数/总数 No. of shrimp killed/ No. of total shrimp
			1	2	3	4	5(days)	
5001	4×10^7	10	10	0	0	0	0	10/10
5011	4×10^7	10	10	0	0	0	0	10/10
5012	4×10^7	10	10	0	0	0	0	10/10
5013	4×10^7	10	10	0	0	0	0	10/10
5014	4×10^7	10	7	1	0	0	0	8/10
对照 Control	0	10	1	0	0	0	0	1/10

2.2 分离菌的鉴定

2.2.1 分离菌的生物学性状 5株分离菌(编号分别为5001, 5011, 5012, 5013, 5014)生物学性状基本相同(表3), 且与文献^[10]中对霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)的描述一致。主要表现为革兰氏阴性弧状菌, 无芽孢。在电镜下可见菌体一端有一单极鞭毛, 鞭毛有外鞘(图2)。在TCBS琼脂平板上呈黄色菌落。在无盐胨水中能生长, 在6% NaCl 胨水中生长缓慢, 8%胨水中不生长。能还原硝酸盐成亚硝酸盐。不产H₂S。VP反应、氧化酶反应阳性。精氨酸脱羧酶、苯丙氨酸脱氢酶阴性, 赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶阳性。发酵葡萄糖产酸不产气。发酵麦芽糖、蔗糖、甘露糖、甘露醇产酸, 不发酵水杨苷、苦杏仁甙、蜜二糖、卫茅醇、肌醇、阿拉伯糖、山梨醇、鼠李糖、乳糖、棉子糖产酸。不能与O1霍乱弧菌多价血清发生凝集反应。

2.2.2 菌株分型 血清型分类结果均为不同的VBO血清分型系统——VBO 5, 14, 26, 47, 56(表4)。

2.2.3 霍乱肠毒素测定结果 DNA基因探针显示阳性, 原位杂交呈明显的斑点(图2.3), 表明菌株有强毒力。小白鼠肠结扎试验, 此菌株有明显的水肿积液, 盐水对照无反应(图4), 也表明该菌株有致病力。

2.3 分离菌株的毒性

表 3 分离菌株的特性
Table 3 Characteristics of isolated bacteria

鉴定项目 Characteristics	5001	5011	5012	5013	5014	霍乱弧菌 ⁽¹⁾ <i>Vibrio cholerae</i>
形态特征 Morphologic characteristics						
形态 Cell shape	弧状	弧状	弧状	弧状	弧状	弧状
革兰氏染色 Gram stain	-	-	-	-	-	-
芽孢染色 Endospore stain	-	-	-	-	-	-
鞭毛着生 Flagellation	单极生	单极生	单极生	单极生	单极生	单极生
培养特征 Culture characteristics						
TCBS 生长 Growth on TCBS	黄	黄	黄	黄	黄	黄
0% NaCl 陈水 0% NaCl	+	+	+	+	+	+
3% NaCl 陈水 3% NaCl	+	+	+	+	+	+
6% NaCl 陈水 6% NaCl	(+) ⁽²⁾	(+)	(+)	(+)	(+)	-
8% NaCl 陈水 8% NaCl	-	-	-	-	-	-
4℃ 生长 Growth at 4℃	-	-	-	-	-	-
30℃ 生长 Growth at 30℃	+	+	+	+	+	+
42℃ 生长 Growth at 42℃	+	+	+	+	+	+
56℃ 生长 Growth at 56℃	-	-	-	-	-	-
色素产生 Pigmentation	-	-	-	-	-	-
运动性 Motility	+	+	+	+	+	+
泳动现象 Swarming	-	-	-	-	-	-
生理生化现象 Physiological and biochemistic characteristics						
硝酸盐还原 NO_3 to NO_2	+	+	+	+	+	+
脲酶 Urease	-	-	-	-	(+)	-
H_2S H_2S	-	-	-	-	-	-
VP 反应 Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+
氧化酶 Oxidase	+	+	+	+	+	+
精氨酸脱羧酶 Arginine decarboxylase	-	-	-	-	-	-
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	+	+	+	+	+	+
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	+	+	+	+	+	+
苯丙氨酸脱氢酶 Phenylalanine dehydrogenase	-	-	-	-	-	NR ⁽³⁾
0/129 敏感性 $10\mu\text{g/ml}$ 0/129 ($10\mu\text{g}$)	+	+	+	+	+	+
葡萄糖产气 Glucose gas	+	-	-	-	-	-
葡萄糖产酸 Glucose acid	+	+	+	+	+	+
麦芽糖 Maltose	+	+	+	+	+	+
蔗糖 Sucrose	+	+	+	+	+	+
水杨苷 Salicin	-	-	-	-	-	-
苦杏仁甙 Amygdalin	-	-	-	-	-	NR
蜜二糖 Melibiose	-	-	-	-	-	-
甘露糖 Mannose	+	+	+	+	+	d ⁽⁴⁾
甘露醇 Mannitol	+	+	+	+	+	+
卫茅醇 Dulcitol	-	-	-	-	-	-
肌醇 Inositol	-	-	-	-	-	-
阿拉伯糖 Arabinose	-	-	-	-	-	-
山梨醇 Sorbose	-	-	-	-	-	NR
鼠李糖 Rhamnose	-	-	-	-	-	-
乳糖 Lactose	-	-	-	-	-	-
棉子糖 Raffinose	-	-	-	-	-	-
明胶酶 Gelatinase	+	+	+	+	+	+
脂肪酶 Lipase	+	+	+	+	+	+
(Tween 80) (Tween 80)	+	+	+	+	+	+
ONPG 反应 ONPG test	-	+	-	-	-	d
溶血(羊血球) Hemolysis	-	+	-	-	-	d
靛基质 Indole	+	+	+	+	+	+
用 01 霍乱弧菌抗血清凝集 Agglutinated by cholera 01 antiserum	-	-	-	-	-	d

注: (1)伯杰氏手册(9 版)中对霍乱弧菌的描述^[10]; (2)括号表示反应迟缓; (3)手册中没有记载; (4)d- 有的菌株阳性, 有的菌株阴性

表 4 试验菌株来源及血清型

Table 4 Source and serotypes of isolated bacteria

菌株号 No. of strains	分离日期 Isolated date	对虾幼体发育期 Stage of shrimp larvae development	菌株非 01 群血清型 Serum type of <i>V. cholerae</i> non-01
5001	1988.5.24	M ₃	VBO5
5011	1989.5.9	M ₃	VBO47
5012	1989.5.20	M ₂	VBO56
5013	1989.5.20	M ₂	VBO14
5014	1989.5.204	M ₂	VBO26

5011 菌浓度为 5×10^8 个/只可完全致死小鼠,而菌液浓度为 5×10^7 个/只小鼠只有不适反应并无死亡,用距离比例计算 LD_{50} 为 1.58×10^8 个/只(表 5)。死亡小鼠腹腔解剖发现肠道渗出严重,肿胀充血,有的坏死。取其心、肝、脾、肺、腹腔液、肠液,接种至 TCBS 平皿上,菌落黄色,涂片染色均为 G,弧菌为同一菌感染所致。

表 5 试验菌株 5011 (VBO47) 毒性试验结果

Table 5 Results of virulence test of isolated bacteria(5011)

攻击菌剂量(个/只) Dose of bacteria (Cells/mice)	实验鼠数 (只) No. of mice	死亡鼠数(只) No. of mice killed	死亡数/总数 No. of mice killed/ No. of total mice
5×10^9	5	5	5/5
5×10^8	5	5	5/5
5×10^7	5	0	0/5
5×10^6	5	0	0/5
5×10^5	5	0	0/5
0	5	0	0/5

3 讨论

弧菌病是对对虾危害最大,造成损失最重的疾病之一,因为它可以影响到对虾的几乎所有发育期,在养殖条件下很容易发生暴发性流行^[1]。在养成期病虾中分离的弧菌有鳃弧菌^[4,7]、溶藻弧菌^[5]、副溶血弧菌^[5,11]、坎贝氏弧菌^[5]、非 01 群霍乱弧菌^[6]等。尽管普遍认为育苗期造成虾病流行的主要病原菌是海洋弧菌,但分离和鉴定这些病原或确定病原性方面的研究却不多。国内尚未见苗期对虾致病菌分离鉴定的报道。作者从患暴发性流行病的中国对虾糠虾幼体中分离到 5 株致病菌,经鉴定均为非 01 群霍乱弧菌。血清学分型结果为不同的 VBO 血清分型系统 VBO5, 14, 26, 47, 56。用 DNA 霍乱 CT 基因探针菌落原位杂交及小鼠肠结扎法测霍乱肠毒素,表明菌株有强毒力。VBO47, 56 血清型在水产养殖业是首次报道。

郑国兴曾于养成期对虾中分离到非 01 群霍乱弧菌^[6],其主要发病症状为“瞎眼”,发病较慢,一般在一周内死亡,但作者并未报道其血清型。本文作者从苗期对虾分离到的非 01 群霍乱弧菌有很强的致病力,一夜之间即可使 70~80% 以上的虾苗死亡,其主要发病症状为肠道肿胀。造成这种不同的原因可能是由于此致病菌对苗期对虾及养成期对虾有不同的致病机制,也可能是由于其血清型不同而致。非 01 群霍乱弧菌不仅危害人的健康^[12],也可

引起养殖动物疾病^[6],人虾互染造成恶性循环,应特别引起注意。

分离菌株的毒性试验表明,代表菌株 5011(VBO47)对小鼠的 LD_{50} 为 1.58×10^8 Cells / 只(表 5)。超过这个剂量可致小鼠全部死亡。养成期幼虾肌肉接种此剂量(按体重计算),可使其全部死亡(表 2)。本文作者用浸浴法感染健康对虾幼体,也可使幼体发病,但成功率仅为 20%。其主要原因可能是,浸浴感染要“病从口入”,而胃酸对细菌生长繁殖有一定影响(表 6),在 pH 4 以下菌不生长,粗测虾的胃液在 pH 5 以下,因此浸浴感染是难以成功的。浸浴感染之所以还有 20% 左右的死亡率,推测与幼体外皮损伤及蜕皮有关^[9]。当然育苗池中幼体大量死亡也与养殖环境相关,如大量投饵造成的微生物繁殖,水质变坏及细菌代谢产物、毒素等因素有关。

表 6 pH 对非 01 群霍乱弧菌的影响
Table 6 Effect of pH on *Vibrio cholerae* (non - 01)

菌株号 No. of strains	pH 值 pH value							
	1	2	3	4	5	6	7	8
5001	-	-	±	+	+	+	0	+
5011	-	-	-	±	+	+	0	+
5012	-	-	-	-	-	-	0	+
5013	-	-	-	+	+	+	0	+
5014	-	-	±	+	+	+	0	+

* “-”不生长;“±”菌落很少;“+”生长;“0”未实验。

参 考 文 献

- [1] 薛清刚、王文兴,1992。对虾疾病的病理与防治,75-83。青岛海洋大学出版社。
- [2] 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。
- [3] 林万明,1991。核酸探针杂交实验技术,97-115。中国科学技术出版社。
- [4] 郑国兴、沈亚林、李何,1990。中国对虾病原菌(鳃弧菌)的研究。水产学报,14(1):1-6。
- [5] 许兵、纪伟尚、徐怀恕,1993。中国对虾病原菌及其致病机理的研究。海洋学报,15(1):98-106。
- [6] 郑国兴,1986。养殖对虾弧菌病致病菌-非 01 群霍乱弧菌的生物学性状与致病性。水产学报,10(2):195-203。
- [7] Delves - Broughton, J. and C. W. Poupard. 1976. Disease problems of prawns in recirculation systems in the U. K. Aquaculture, 7(3): 201-217.
- [8] Furniss, A. L., J. V. Lee and T. J. Donovan, 1978. The vibrios. Public health laboratory service monograph series, no. 11 her majesty's stationery office, London.
- [9] Lightner, D. V. and D. H. Lewis, 1975. A Septicemic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp. Mar. Fish Rev., 37(5-6): 25-28.
- [10] Bavmann P. et al., 1984. Genus *Vibrio*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. 1. 518-538, (ed By J. G. Holt), Williams and wilkins, Baltimore.
- [11] Vanderzant, C. Nickelson, R. and J. C. Parker., 1970. Isolation of *Vibrios parahemolyticus* from Cult coast shrimp. J. Milk Food Technol., 13(1): 161-162.
- [12] Wachsmuth, L. K., Morris, G. K. and J. C. Feeley, 1980. *Vibrio*. in E. H. Lennette, etc. ed., Manual of clinical microbiology, Third edition. American society for microbiology. Washington D. C. 226-234.

***VIBRIO CHOLERAE* (NON - 01), A PATHOGEN OF *PENAEUS CHINENSIS* LARVAE (*MYTIS STAGE*) DISEASE**

Wang Liping Zhang Xiaohua Liu Mei

(Institute of Shangdong Marine Materia Medica Qingdao 266003)

Song Xiaoling

(Yellow Sea Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

Duan Aimei Xu Huaishu

(Ocean University of Qindao, 266003)

ABSTRACT In this paper. *Vibrio cholerae* (non - 01), a pathogen of *Penaeus chinensis* larvae (mysis stage) disease was studied. The disease was characterized by swelling in intestine. Five strains of bacteria were isolated from the diseased shrimp larvae (in Mysis). The challenge experiments showed that these isolates were the pathogens of the disease. The isolates were tested for 47 unit characters and classified as *Vibrio cholerae*, but were not agglutinated by 01 anti-serum of *Vibrio cholerae*. Their serotypes were VBO5, 14, 26, 47 and 56 respectively. Detection of cholerae enterotoxin by the method of DNA CT gene hybridization and intestinal ligation of mice showed that the isolated bacteria had strong virulence.

KEYWORDS *Penaeus chinensis*, Shrimp larvae (Mysis 3), *Vibrio cholerae* (non - 01), Vibriosis