

中华绒螯蟹苗期丝状细菌病病原 HL-1 的研究

万夕和¹, 李 筠², 张美如¹, 荆 燕¹, 裴鸿生¹, 纪伟尚², 徐怀恕², 许 璞¹

(1. 江苏省海洋水产研究所, 江苏 南通 226007; 2. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 从江苏省如东县中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 苗期暴发丝状细菌病的蚤状幼体分离得到丝状细菌 HL-1, 经感染试验证实其为中华绒螯蟹苗期丝状细菌病的病原。对 HL-1 的细胞形态、生理生化特征、致病性及药物敏感性研究表明, HL-1 为无色、不分枝的丝状体, 在固体培养基上形成指纹状菌落, 菌丝可断裂形成微生子, 在液体培养基中所形成的微生子可聚集成玫瑰花环样结构; HL-1 过氧化氢酶阳性, 几丁质酶阴性, 需氧, 鉴定为毛霉亮发菌 (*Leucothrix mucor*), 其生长的 pH 适宜范围为 5.0 ~ 10.0, 盐度最适范围为 10 ~ 40; 在常用的 32 种抗生素中, HL-1 仅对乙基西霉素高度敏感, 而对其他 31 种抗生素大多数具耐药性。

关键词: 丝状细菌病; 毛霉亮发菌; 中华绒螯蟹

中图分类号: S945

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2003)05-0392-06

随着中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 工厂化育苗集约化程度的不断提高, 养殖环境不断恶化, 苗期病害的频繁发生已经成为河蟹育苗产业发展的一大制约因素。而丝状细菌病 (filamentous bacterial disease) 是其中最为严重的疾病之一, 主要危害蟹卵、蚤状幼体、大眼幼体及幼蟹, 使卵停止发育, 幼体运动受阻, 蜕皮困难, 变态率下降, 最后窒息死亡, 现已成为中华绒螯蟹育苗业发展的主要障碍。

海水养殖动物的丝状细菌病多发生于苗期, 其病原主要是一些菌体细长呈丝状、通常附生于海洋动植物体表的细菌, 常见的有亮发菌属 (*Leucothrix* sp.) 和发硫菌属 (*Thiothrix* sp.), 以亮发菌属居多^[1]。迄今为止, 所报道的亮发菌有 2 种: 毛霉亮发菌 (*Leucothrix mucor*)^[2-3] 和嗜硫亮发菌 *Leucothrix thiophila*^[4]。近年来在人工海水育苗生产中, 该类丝状细菌引起的疾病越来越多^[5-7], 有关报道以虾类丝状细菌病的居多, 而蟹类丝状细菌病的研究较少, 中华绒螯蟹的丝状细菌病更鲜有研究报道^[8]。本研究从江苏省如东县 3 个育苗场苗期发病的中华绒

螯蟹体表分离并筛选到 2 株典型的丝状细菌, 并对其中的 HL-1 菌株进行了细胞形态特征、生理生化特性、对苗期蟹幼体的致病性以及药物敏感性等研究 (另一株的研究结果另文报道)。

1 材料和方法

1.1 实验菌株

菌株 HL-1 来源于江苏如东县中华绒螯蟹苗期暴发丝状细菌病的 3 个育苗场。

1.2 分离方法

选取具有典型丝状细菌病症状的中华绒螯蟹蚤状幼体, 将样品用无菌海水多次冲洗, 直接接种于 Hoarld^[9] 平板上, 待长出有指纹状菌落时, 用无菌解剖刀小心切取纯菌丝并接种于另一平板, 分离纯化得到丝状细菌 HL-1 株。

1.3 致病性

以 HL-1 对正常的中华绒螯蟹 V 期蚤状幼体进行感染试验, 采用菌浴感染方式, 设立实验组、平行组及对照组, 每组设实验动物 100 只, 置于 15 cm × 30 cm × 50 cm 的尼龙水槽中, 实验水体为 10 L, 所用海水盐度为 20。菌浴感染剂量为 10 L 水体中加入 1 mL OD 值 (566 nm) 为 0.537 的 HL-1 菌液。按常规饲养, 连续观察 5 d, 及时记录各组的症状及幼

收稿日期: 2002-11-25; 修订日期: 2003-04-12.

资助项目: 江苏省科技厅应用基础研究项目 (BJ-2000046).

作者简介: 万夕和 (1971-), 男, 硕士, 助理研究员, 从事水生经济动物病害防治技术研究.

体的发病情况。

1.4 形态学特征及几种特征性试验

1.4.1 形态学研究 采用 Hoarld 培养基、Pringsheim 培养基、谷氨酸钠培养基、2216E 培养基^[10-11],对 HL-1 进行培养,通过光学显微镜(NIKON C-LP)、扫描电子显微镜(JSM-T300)进行细胞形态学研究。

1.4.2 嗜氧性 采用焦性没食子酸法^[11]进行分析。

1.4.3 过氧化氢酶、几丁质酶 按文献[11-12]所介绍方法进行。

1.4.4 pH、温度、盐度对丝状细菌生长的影响 在不同 pH、温度、盐度等条件下对丝状细菌 HL-1 进行液体培养,分别测定波长 566 nm 处各培养物的吸光值,比较不同 pH、温度、盐度对丝状细菌生长的影响。

1.5 药敏试验

参照文献[13],用纸片法在谷氨酸钠平板上测

定丝状细菌 HL-1 对 32 种药物的敏感性,观察抑菌圈的有无,并测定其大小,根据规定标准判定菌株敏感度(药敏试纸为上海卫生防疫站产品)。

2 结果

2.1 致病性

自育苗池中选取健康的中华绒螯蟹 V 期蚤状幼体在试验水槽中按常规暂养 1 d 后,再将 1 mL 纯培养的 HL-1 菌液(OD_{556} 为 0.537)接种到试验水体为 10 L 的试验槽中,24 h 后发现试验组中的幼体体表均长有丝状细菌。丝状细菌的附生使幼体活动力下降,变态时间延长,与自然发病的幼体具有同样的症状,并导致部分幼体死亡,试验组幼体死亡数与对照组有显著差异。从发病幼体体表再分离得到与接种菌相同的丝状细菌,详细结果见表 1。感染试验结果表明,HL-1 为中华绒螯蟹幼体丝状细菌病的病原菌。

表 1 丝状细菌 HL-1 感染中华绒螯蟹幼体的试验结果

Table 1 Results of artificially infected healthy *Eriocheir sinensis* larvae by HL-1

时间 Time	试验组 Trial group			对照组 Control		
	症状 Symptom	变态率 Metamorphosis rate	累计死亡率 Accumulated mortality	症状 Symptom	变态率 Metamorphosis rate	累计死亡率 Accumulated mortality
第 1 天 Day 1	100% 幼体体表被丝状细菌附着,附着情况轻微,丝状细菌较短。	0	1%	正常 Normal 无丝状细菌 No bacteria	0	0
第 2 天 Day 2	幼体附生的丝状细菌数量增多,长度变长,有的开始缠绕在幼体体表,幼体运动力下降。	0	2%	正常 Normal	0	2%
第 3 天 Day 3	丝状细菌附生的情况较严重。	0	19%	正常 Normal	26%	4%
第 4 天 Day 4	丝状细菌附生严重,变态后幼体体表未见丝状细菌附着。	22.4%	24%	正常 Normal	100%	4%
第 5 天 Day 5	变态后幼体有新丝状细菌附生。	97.2%	29%	正常 Normal	100%	7%

2.2 形态学特征

HL-1 菌株在 Hoarld、Pringsheim 以及谷氨酸钠培养基上均可生长,形成典型的指纹状菌落(图 1),有的菌丝平行生长,菌丝形如蛇形,单个菌丝生长时可见有环状结构形成(图 2)。在含 1% 谷氨酸钠的无菌海水平皿中静置培养 2 d,平皿的底部出现小草样结构的菌丝生长。菌体无色,不分枝,随着时间的延续菌丝不断生长,最长的可达 1 cm,营养旺盛时许多菌丝往往缠绕生长形成团状。丝状体可断裂成

许多微生子(图 3),在液体培养中,这些微生子会聚集形成玫瑰花环样结构(图 4)。多次平板划线后 HL-1 可在平板上形成单个菌落,单菌落为隆起、圆形、乳白色。

2.3 生理生化试验

HL-1 为革兰氏阴性,过氧化氢酶阳性,几丁质酶阴性,需氧。HL-1 生长的 pH 适应范围为 5.0 ~ 10.0,最适范围为 7 ~ 8.5;HL-1 在 25 °C 时生长旺盛,在 15 °C 和 35 °C 时生长较慢,在 10 °C 和 40 °C 时

不能生长;适宜生长的盐度范围为 10 ~ 40(图 5 ~ 7)。

2.4 药敏试验

利用纸片法测定了丝状细菌 HL-1 对 32 种常用

抗菌药物的敏感性(见表 2)。结果发现,HL-1 仅对乙基西梭霉素高度敏感,对青霉素类抗生素、链霉素、新霉素、多粘菌素 B、新生霉素、哌拉西林等 8 种抗菌药物中度敏感,对其他 23 种抗菌药物不敏感。

表 2 不同抗菌药对丝状细菌 HL-1 的敏感试验结果
Table 2 Sensitivity of HL-1 strain to different chemotherapeutants

药敏纸 Drug	Dosage/ ($\mu\text{g} \cdot \text{disc}^{-1}$)	抑菌圈直径/mm Diameter	药敏纸 Drug	Dosage/ ($\mu\text{g} \cdot \text{disc}^{-1}$)	抑菌圈直径/mm Diameter
氨苄青霉素 Ampicillin	10	16.5**	新生霉素 Novobiocin	30	15.0**
头孢呋新 Cefuroxime	30	7.6*	氟哌酸 Norfloxacin	30	2.0*
羧苄青霉素 Carbenicillin	100	15.8**	杜晶折霉素 Leucomycin	15	4.3*
头孢克肟 Cefaclor	30	5.0*	克林霉素 Clindamycin	30	2.0*
头孢三嗪 Ceftriaxone	30	9.7*	吡哌酸 Pipemidic	30	4.0*
头孢噻肟 Cefotaxime	30	8.6*	氟喹酸 Ofloxacin	5	6.2*
青霉素 G Penicillin G	10	15.5**	丁安卡那 Amikacin	30	8.9*
头孢唑啉 Cefazolin	30	7.9*	利福平 Rifampin	30	5.8*
乙基西梭霉素 Netilmicin	30	18.2***	卡那霉素 Kanamycin	30	8.7*
头孢拉定 Cefradine	30	6.5*	哌拉西林 Piperacillin	100	13.9**
链霉素 Streptomycin	30	12.7**	SMZ Sulfamethoxazole	300	4.0*
新霉素 Neomycin	30	16.3**	优力欣 Unasyn	20	5.0*
万古霉素 Vancomycin	30	13.7*	庆大霉素 Gentamicin	10	5.8*
呋喃妥因 Nitrofurantoin	300	2.0*	萘啶酸 Nalidixic acid	30	4.5*
多粘菌素 B Polymyxin B	300IU	10.3**	麦迪霉素 Medomycin	30	6.6*
复方新诺明 SXT	25	2.0*	壮观霉素 Spectinomycin	100	4.0*

注:***高度敏感,**中度敏感,*不敏感
Note:*** Highly sensitive; ** Middledly sensitive; * Unsensitive.

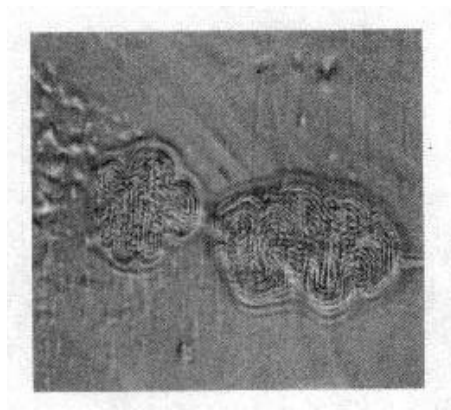


图 1 HL-1 在 Pringsheim 平板上生长形成的指纹状菌落, × 200
Fig. 1 "Thumbprint" colony of *Leucothrix mucor* HL-1 growing on the the Pringsheim solid medium, × 200

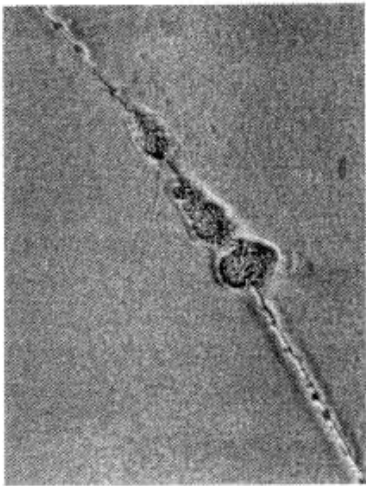


图 2 HL-1 单根菌丝在固体培养基形成的环状生长, × 400
Fig.2 Single filament of *Leucothrix mucor* HL-1 growing on the solid medium, × 400

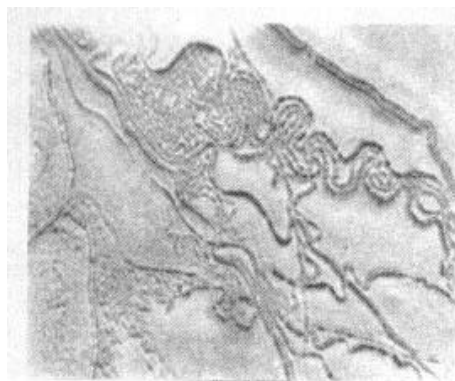


图3 HL-1 菌丝体在固体培养基上断裂产生的微生子, $\times 80$

Fig. 3 Gonidia produced by *Leucothrix mucor* HL-1 on solid medium, $\times 80$

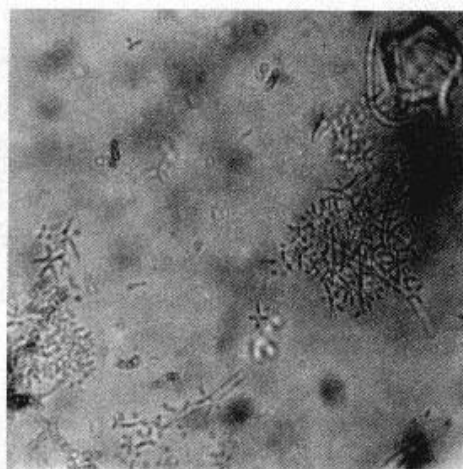


图4 HL-1 的微生子在液体培养基中形成的玫瑰花环样的结构, $\times 200$

Fig. 4 Rosette formation in a single microscopic field of gonidia of *Leucothrix mucor* HL-1 in liquid culture, $\times 200$

3 讨论

丝状细菌病的病原菌通常是海洋中几种常见的、仅附生于海洋动植物体表^[14-16]的丝状细菌,一般不侵入体内。常见附生于海洋动物体表的丝状细菌有异养性的亮发菌属(*Leucothrix* sp.)和自养性的发硫菌属(*Thiothrix* sp.),以亮发菌属居多^[1]。从江苏如东县中华绒螯蟹苗期体表分离得到的菌株 HL-1 为无色、不分枝的丝状细菌,在固体培养基上

形成指纹状菌落,菌丝可断裂形成微生子,微生子在液体培养基中可形成玫瑰花环样结构。根据伯杰氏细菌鉴定手册(第 IX 版),HL-1 具有典型亮发菌属的特性,属亮发菌属的毛霉亮发菌(*Leucothrix mucor*)^[2,9,17-19]。

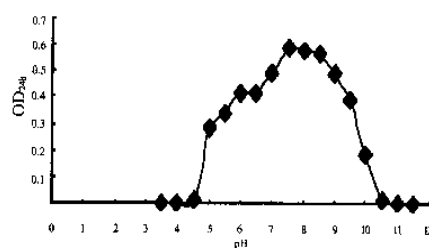


图5 pH 对毛霉亮发菌生长的影响

Fig. 5 Influence of pH to growth of *Leucothrix mucor* HL-1

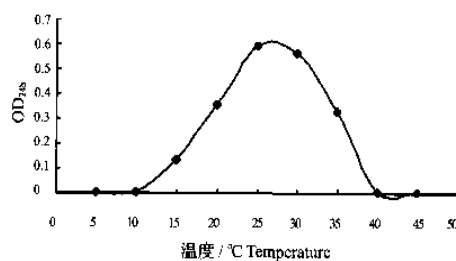


图6 温度对毛霉亮发菌生长的影响

Fig. 6 Influence of temperature to growth of *Leucothrix mucor* HL-1

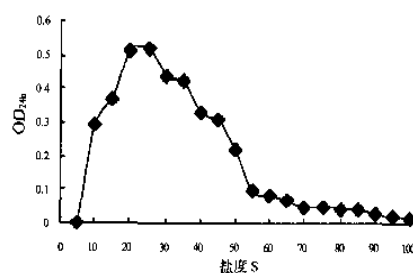


图7 盐度对毛霉亮发菌 HL-1 生长的影响

Fig. 7 Influence of salinity to growth of *Leucothrix mucor* HL-1

人工感染试验表明,HL-1 是中华绒螯蟹苗期幼体丝状细菌病的病原,对幼体有附生的特性。

该类丝状细菌对养殖鱼类、甲壳类动物的危害主要表现为:(1)附生于卵的表面^[6],影响孵化率;(2)附生于鳃部,造成呼吸困难而窒息死亡^[6,10];(3)附生于体表,影响运动,易沉于池底,停止发育,

蜕皮困难,造成大量死亡。对中华绒螯蟹的危害亦是如此。本实验通过电镜观察 HL-1 仅附生于中华绒螯蟹体表,未见伸至幼体内部的结构及明显的病理变化。该菌株的几丁质酶试验为阴性,亦证实其不会侵入体内,对蟹幼体所产生的危害是物理性的。

HL-1 对 32 种常用抗菌药物的敏感性实验结果表明,HL-1 仅对乙基西霉素高度敏感,对大部分抗菌药物耐受,因此,仅靠大量使用抗菌药物对该病进行控制,不仅难以奏效,实际上是一种严重浪费,而且会造成环境污染、药物残留、耐药性菌株增加、养殖环境中正常菌群的比例失调等各种危害,并形成恶性循环。附着性的丝状细菌多与养殖水环境状况有关,当养殖池底质污染时,大量污物堆积,容易产生大量丝状细菌^[20],因此丝状细菌病的发生也可以作为养殖水环境污染的一项指标。

对丝状细菌病的防治研究不能单从药物防治的角度去考虑,应该更多地从生态防治、生物修复(bioremediation)等方面进行研究。生物修复是 20 世纪 90 年代提出的一种新的技术措施^[21],即不提倡单靠药物将水环境中病原菌完全杀灭,这会造成水环境中正常菌群比例失调;主张利用或添加一些有益菌催化降解环境中的一些有机污染物进行生物修复,维持环境中的微生态平衡,以实现生态防治。近年来,国内外已开始尝试在养殖水体中施用一些有益菌(Probiotics)进行生态防治,以生物修复技术来改善养殖水质、控制病原微生物、提高养殖动物的抵抗力^[22-25]。这些有益菌均来自养殖水体或养殖动物体表、体内的正常细菌区系,不会对养殖动物造成危害。因此,以生态防治、生物修复技术进行苗期中华绒螯蟹丝状细菌病的防治,将是一条极具潜力的有效途径。

参考文献:

- [1] Brock J A, Lightner D V. Diseases of Crustacea, Diseases caused by microorganisms, Diseases of Marine Animals[M]. Hamburg: Biologische Anstalt Helgoland, 1990; 299-304.
- [2] Harold, Stanier. The genera *Leucothrix* and *Thiothrix*. *Bacteriol J*. Rev, 1955, 19; 49-58.
- [3] Grabovich M Y, Muntyan M S, Lebedeva V Y, et al. Lithoheterotrophic growth and electron transfer chain components of the filamentous gliding bacterium *Leucothrix mucor* DSM 2157 oxidation of sulfur compounds[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 178: 155-161.
- [4] Dultseva N M, Dubinina G A, Lysenko A M. Isolation of marine filamentous sulfur bacteria and description of the new species *Leucothrix thiophila* sp. nov[J]. *Microbiology*, 1996, 65; 79-87.
- [5] 黄琪炎. 水产动物疾病学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1993.
- [6] Lightner D V. Filamentous bacterial disease of penaeid shrimp. Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture[A]. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* 17 [C]. Amsterdam; Elsevier, 1988. 52-57.
- [7] Sadusky T J, Bullis R A. Experimental disinfection of lobster eggs infected with *Leucothrix mucor*[J]. *Biol Bull*, 1994, 187 (2); 254-255.
- [8] 万夕和,许 璞,裴鸿生,等. 中华绒螯蟹幼体丝状细菌的扫描电镜观察[J]. *浙江海洋学院学报*, 2001, 20(1): 14-17.
- [9] Brock T D. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* [M]. Baltimore; The William & Wilkins Company, 1989. 2 121-2 124.
- [10] 陈世阳,李八方,刘树青. 海洋丝状细菌的生态分布及对养殖对虾的危害性[J]. *海洋通报*, 1985, 3(5): 26-32.
- [11] 范秀容,沈 萍. 微生物学实验[M]. 北京:人民教育出版社, 1980.
- [12] 陈天寿. 微生物培养基的制造与应用[M]. 北京:中国农业出版社, 1995.
- [13] 许 兵,纪伟尚,张 鹏. 对虾病原菌抑菌药物的研究[J]. *青岛海洋大学学报*, 1993, 23 (2): 43-51.
- [14] Brock T D. The habitat of *Leucothrix mucor*, a widespread marine microorganism[J]. *Limnol Oceanogr*, 1966; 303-307.
- [15] Kelly M T, Brock T D. Warm-water strain of *Leucothrix mucor* [J]. *J Bacteriol*, 1969, 98 (3): 1 402-1 403.
- [16] Bland J A, Brock T D. The marine bacterium *Leucothrix mucor* as an algal epiphyte[J]. *Mar Biol*, 1973, 23; 283-292.
- [17] Brock T D, Conti S F. Electron microscope studies of *Leucothrix mucor*[J]. *Arch Mikrobiol*, 1969, 66; 79-90.
- [18] Kelly M T, Brock T D. Physiological ecology of *Leucothrix mucor* [J]. *J Gen Microbiol*, 1969, 59 (2); 153-162.
- [19] Brock T D. Knots in *Leucothrix mucor*[J]. *Science*, 1964, 144; 870-872.
- [20] 茅伯仲,孟庆显,俞开康. 虾类的疾病与防治[M]. 北京:海洋出版社, 1987.
- [21] Maden E L. Determining in situ biodegradation: Facts and Challenges[J]. *Environ Sci Technol*, 1991, 25 (10): 1 663-1 672.
- [22] 俞 勇,李会荣,李 筠,等. 益生菌制剂在水产养殖中的应用[J]. *中国水产科学*, 2001, 8(2): 92-96.
- [23] 李会荣,俞 勇,李 筠,等. 海洋有益菌的筛选与鉴定[J]. *高技术通讯*, 2001, 11(9): 18-22.
- [24] Ronen Z, Bollag J M. Feasibility of bioremediation of ground water polluted with alkylpyridines[J]. *Ground Water*, 1996, 34 (2); 194-199.
- [25] 堤裕昭. 鱼类养殖场直下堆积したヘドロ(有机汚泥)のイブガイによる浄化の試み[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1993, 59(8): 1 343-1 347.

A pathogen HL-1 isolated from *Eriocheir sinensis* larvae with filamentous bacterial disease

WAN Xi-he¹, LI Yun², ZHANG Mei-ru¹, JING Yan¹, PEI Hong-shen¹, JI Wei-shang², XU Huai-shu², XU Pu¹

(1. Jiangsu Institute of Marine Fisheries, Nantong 226007, China;

2. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: The diseased *Eriocheir sinensis* larvae (zoea) were collected from three crab farms in Jiangsu Province during the outbreak period of filamentous bacterial disease in crab, and the filamentous bacterium strain HL-1 was isolated from the zoea of *E. sinensis* with typical symptoms of filamentous bacterial disease. The observation was made under microscope and the results showed that the strain HL-1 was colorless, unbranched and filamentous prokaryotic, and it could form a 'thumbprint' colony on solid substrates, and its gonidia could form 'rosette' in liquid substrates. Also, the strain was catalase positive, chitinase negative and aerobic. The optimum pH for the strain's growth was 5.0 - 10.0, and the optimum salinity was 10 - 40. The strain HL-1 was identified as *Leucothrix mucor*. The artificial infection results indicated that the *L. mucor* HL-1 was the pathogen of the filamentous bacteria disease in *E. sinensis* larvae. The sensitivities of strain HL-1 to 32 kinds of chemotherapeutants were tested that HL-1 is highly sensitive to netilmicin, mildly sensitive to ampicillin, carbenicillin, Penicillin G, streptomycin, neomycin, polymyxin B novobiocin and piperacillin, and unsensitive to the rest 23 kinds of chemotherapeutants.

Key words: filamentous bacterial disease; *Leucothrix mucor*; *Eriocheir sinensis*

欢迎订阅 2004 年《上海水产大学学报》

《上海水产大学学报》是上海水产大学主办的以水产科学技术为主的综合性学术刊物。主要反映各学科科研成果,促进学术与教学研究的交流与繁荣。主要刊载渔业资源、水产养殖和增殖、水产捕捞、水产品保鲜与综合利用、渔业水域环境保护、渔船、渔业机械与仪器、渔业经济与技术管理以及水产基础研究等方面的论文、调查报告、研究简报、综述与评述、简讯等,并酌登学术动态和重要书刊的评介等。

本刊为季刊,大 16 开,国内外公开发售。每期单价 6 元。全年定价 30 元(含邮费)。国际标准刊号:ISSN1004-7271,国内统一刊号:CN31-1613/S。国内邮发代号:4-604,国际发行代号:4822Q。读者可在当地邮局订阅,也可直接汇款至编辑部订阅。编辑部还有《上海水产大学学报》(1992-2001 年)全文检索光盘,定价 50 元(含邮费)。欢迎订阅。

编辑部地址:上海市军工路 334 号,上海水产大学 38 信箱,邮编:200090。联系电话:021-65710892,传真:021-65680965, E-mail: xuebao@shfu.edu.cn

《海洋渔业》杂志征订启事

《海洋渔业》杂志是中国水产学会和中国水产科学研究院东海水产研究所共同主办的中级水产科技期刊。主要刊登海洋渔业管理、资源开发与捕捞技术、远洋渔业、海水养殖与增殖、海洋资源与环境保护、水产品加工与保鲜技术等各类文章。

《海洋渔业》杂志国内外公开发售,国内统一刊号:CN31-1341/S,国际标准刊号:ISSN1004-2490。本刊为季刊,大 16 开 48 页,逢季中月 25 日出版。每期定价 5.50 元,全年 22.00 元。邮发代号:4-630,全国各地邮局(所)均可订阅;也可直接汇款到编辑部订阅。编辑部地址:上海市军工路 300 号,邮编:200090。联系电话:021-65680116, 021-65684690 转 8084。E-mail: haiyangyue!@tom.com