

中国对虾病原菌(鳃弧菌)的研究

郑国兴 沈亚林 李 何

(中国水产科学院东海水产研究所,上海)

提 要 1987年7~10月福建省平潭县对虾养殖场发生了一起严重的流行病。病虾活动力减弱,食欲下降,个体消瘦,头胸甲心区附近呈白色或浅桔红色,血淋巴液稀薄、混浊、不能凝固。因病虾步足、游泳肢及尾扇呈鲜红色,被称为“红腿病”。死亡率可高达90%以上。从五只垂死病虾的心脏血淋巴液中分离到细菌作纯培养,经肌肉注射和浸泡的人工感染方法,得到了与虾池中患病虾相同的症状。病原菌是革兰氏阴性短杆菌。以极生单鞭毛运动。发酵葡萄糖,产酸不产气。氧化酶、过氧化氢酶阳性。能还原硝酸盐成亚硝酸盐。精氨酸脱羧;鸟氨酸、赖氨酸不脱羧。V. P. 阳性。在42°C中不能生长。不能在无盐和含有8%NaCl的胨水中生长,但在含有3%和6%NaCl的胨水中生长良好。对弧菌抑制剂0/129敏感。经鉴定为鳃弧菌(*Vibrio anguillarum* Bergman)。

关键词 中国对虾,鳃弧菌,弧菌病

1987年7~10月,福建省平潭县的对虾养殖场发生了一起严重的流行病。发病严重的虾池,死亡率高达90%以上。病虾的症状是活动力明显减弱或沉底不动,个体消瘦,大多空胃,外表观察可看到头胸甲心区附近由原来的青色透明变为白色或浅桔红色,形状为三角形。由于病虾的步足、游泳肢及尾扇呈鲜红色,因此被称为“红腿病”。从病虾心脏抽取的血淋巴液混浊、稀薄、不能凝固。血培养可分离到细菌,经形态和生理生化特性的测定,被鉴定为鳃弧菌(*Vibrio anguillarum* Bergman)。肌肉注射及浸泡的人工感染试验得到了与虾池中患病虾相同的症状,并从人工感染的病虾的血淋巴液中重新分离到同种病菌,证实鳃弧菌是该流行病的病原菌。

美国的 Lightner 和 Lewis 曾报道鳃弧菌是白对虾(*Penaeus setiferus*)和褐对虾(*P. aztecus*)的病原菌^[9]。英国的 Delves-Broughton 和 Poupard 从实验室饲养的患病的中国对虾(*P. orientalis*)中分离到鳃弧菌^[4]。上田和北上也曾从养殖的日本对虾(*P. japonicus*)中分离到鳃弧菌^[2]。

我国养殖对虾弧菌病的研究,近年来也取得进展。叶孝经和王文兴报道了1983~1984年山东省即墨县养虾场中国对虾的流行性弧菌病,证实当地流行病主要是由溶藻性弧菌(*V. alginolyticus*)和副溶血性弧菌(*V. parahaemolyticus*)引起的^[1]。郑国兴在上海市奉贤县养虾场垂死的中国对虾溃烂眼球和心脏血淋巴液中,分离到非01群霍乱弧菌(*V. cholerae* non-01),证实该弧菌是河口低盐度养殖对虾的主要病原菌^[4]。本文则报道

收稿年月:1989年3月;同年9月修改。

(1) 叶孝经、王文兴,1986。中国对虾 *Penaeus orientalis* Kishinouye 流行性弧菌病的研究。海洋水产研究丛刊,第(80):11-18。

1987年8月从福建省平潭岛饲养的中国对虾患病虾中分离到的鳃弧菌的生物学性状及致病性。鳃弧菌作为中国对虾的致病菌在我国属首次报道。

材 料 和 方 法

1. 病原菌的分离 试验用菌是1987年8月在福建平潭岛对虾养殖场垂死的中国对虾(*Penaeus orientalis*)的心脏血淋巴液中分离到的。方法是用80%的酒精棉球在病虾头胸甲中心区上反复擦拭,进行体表消毒,以1毫升的灭菌针筒作心脏穿刺,抽取淋巴液,然后将抽取的血淋巴液迅速注到含有2% NaCl的营养琼脂平板上,以涂平板法接种。接种后的平板在室温下(约28~30℃左右)培养48小时后,选取形态一致的单个菌落重复划线分离,获得纯培养。

2. 人工感染试验 人工感染试验采用肌肉注射和把细菌菌液添加到饲养水中两种方法。肌注感染法是用接种针挑取少许在30℃培养18~24小时的斜面培养物,用灭菌生理盐水制成细菌悬液,其细菌含量约为 10^8 个/毫升,然后用0.5毫升的灭菌针筒将细菌悬液注入到健康对虾腹部第4与第5腹节间的肌肉中,每尾注射0.02毫升。对照虾在相同部位注入0.04毫升灭菌生理盐水。将细菌菌液加入到饲养水中的感染方法是取在30℃下培养18~24小时的87-815号菌株的斜面培养物,用饲养海水制成悬液,然后添加到饲养有健康虾的水族箱中,每10升饲养海水加1支新鲜斜面的细菌培养物。对照组饲养在相同条件下,不加菌液。试验用虾取自上海郊外本所养殖试验场的池养中国对虾。试验前选取健康虾移入有机玻璃水族箱(120×60×60cm)中驯养两天,每个水族箱饲养体长8~10公分的对虾6~8尾。饲养用海水经砂、石过滤,盐度为26‰,水温控制在 $30 \pm 1^\circ\text{C}$,pH7.8~8.0。间隔充气,但不循环。每日投喂颗粒饵料两次。感染试验开始后,定时检查和记录对虾的活动情况和病状。当被感染的对虾失去平衡,侧翻于池底时,取出用1毫升针筒抽取心脏血淋巴液,测定血液凝固时间。

3. 分离菌的鉴定 分离菌株的鉴定按Skerman^[14]、Shewan & Veron^[15]和Furniss^[6]等人的方法鉴定至种。菌落形态的观察在营养琼脂平板上培养四天后和在TCBS(硫代硫酸钠-柠檬酸盐-胆盐)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,用电子显微镜观察。各项测定细菌生理生化的培养基都添加2% NaCl。接种后在 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 的恒温箱中培养。

结 果

1. 人工感染试验 将培养18~24小时的分离菌的细菌悬液注射到健康虾的腹部肌肉后,一般在2小时后即开始出现病状,首先是游泳肢的末端出现红色斑点,以后逐渐扩大到整个附肢,有时步足和尾扇也呈鲜红色。头胸甲中心区附近由原来的青色透明变为浅桔红色。病虾沉底,活动呆滞,随着病情的加重,逐渐失去平衡,最后侧翻于池底。此时,从垂死病虾心脏抽取的血淋巴液稀薄、混浊、长时间不凝固。死亡开始见于感染后12小时,死亡高峰出现在18~24小时,48小时后除1尾虾存活外,其余全部死亡(见表1)。从人工肌注感染后的病虾血淋巴液中重新分离到的87-815B菌株,将其菌液再注射到健康虾腹部肌肉内,也出现相同的症状,并使健康虾死亡。将分离菌的细菌悬液添加到饲养水中的感染试验,也得到与肌注感染试验相同的结果,但病症和死亡的出现推迟,死亡高峰出现在感染后的第二天和第三天,死亡现象可一直延续到第七天(见表2)。对照虾行动活泼、反应敏捷,未出现任何病状,从心脏抽取的血淋巴液,淡蓝色、透明、很快(不

表1 肌注分离菌对中国对虾感染试验的观察

Table 1 Observations of *Penaeus orientalis* challenged with the bacterial isolates by intramuscular injection

菌株号	试验虾数 (尾)	经感染后的存活数				死亡数/试验数
		12	24	36	48(小时)	
87-801	6	6	2	0	0	6/6
87-812	7	7	5	2	1	6/7
87-815	7	7	5	0	0	7/7
87-815B*	6	6	5	1	0	6/6
对照	4	4	4	4	4	0/4

* 菌株 87-815B, 是以 87-815 菌株经肌注感染后的对虾血淋巴液中重新分离获得。

表2 在饲养水中添加 87-815 菌液感染中国对虾的观察

Table 2 Observations of *Penaeus orientalis* challenged with the bacterial isolate 87-815 by immersion

试验组	试验虾数 (尾)	经感染后的存活数					死亡数/试验数
		1	2	3	4	7(天)	
1	5	4	2	1	1	0	5/5
2	6	5	4	3	2	1	5/6
3	8	6	3	2	1	1	7/8
对照	4	4	4	4	4	4	0/4

超过 1 分钟)即凝固。

肌肉注射和将菌液加入饲养海水中的感染试验, 都证实分离菌可使中国对虾致病。其症状与福建平潭岛养虾场虾塘中病虾的症状相符。

2. 分离菌的鉴定 所有分离菌株都是革兰氏阴性短杆菌 ($0.4\sim 0.8\times 0.6\sim 2.0\mu$), 以极生单鞭毛运动。在添加 2%NaCl 的营养琼脂平板上的菌落形态 (30°C下培养 4 天后) 是圆形、湿润、全缘、半透明, 直径 2~3 毫米。细菌在 TCBS 琼脂平板上不生长。在 3%和 6%NaCl 的胨水中生长良好, 但在无盐蛋白胨水中和含有 8%NaCl 的胨水中不生长。细菌在 42°C中不长。所有菌株对弧菌抑制剂 0/129 敏感。根据细菌形态和生理生化特性的测定, 被鉴定为鳃弧菌。分离菌与鳃弧菌特性的比较列于表 3。表中鳃弧菌的特性引自 Shewan & Veron^[18]和 Furniss^[7]等人的资料。

讨 论

弧菌病是引起养殖的中国对虾死亡的主要疾病之一^[1]。实验证明鳃弧菌是福建沿海养虾场中国对虾“红腿病”的病原菌。但某些弧菌病的主要症状, 如全身肌肉变为白色而不透明, 旋转运动和弓背 (第三、四腹节弯曲) 等, 无论在养虾池中的病虾或人工感染试验的病虾都未观察到。这是因为不同种类的弧菌引起的弧菌病的症状不同之故。目前, 一些国外资料对弧菌病症状的描述是综合的, 较混乱。其病原包括鳃弧菌、溶藻性弧菌、

表3 分离菌株与鳃弧菌特性的比较

Table 3. Characteristics of the present isolates in comparison with *Vibrio anguillarum*

特 性	分离菌株(5株)	鳃弧菌 ^[12]	鳃弧菌 ^[6]
从葡萄糖产气	-	-	-
氧化酶	+	+	+
游动	-	-	-
发光	-	-	-
O/F 试验	+/+	+/+	+/*
O/129 10μg	+	+	+
150μg	+	+	+
5℃ 生长	-	+	-
30℃ 生长	+	+	+
37℃ 生长	-	V	V
42℃ 生长	-	-	-
无 NaCl 生长	-	+	-
6% NaCl 中生长	+	+	+
8% NaCl 中生长	-	-	V
10% NaCl 中生长	-	-	-
硝酸盐还原到亚硝酸盐	+	+	+
甲基红	+	V	-
VP 反应	+	V	+
吡啶	-	+	-
产硫化氢	-(TSI)	-	-
精氨酸-碱反应	+	+	+
赖氨酸脱羧酶	-	-	-
鸟氨酸脱羧酶	-	-	-
淀粉酶	+	+	+
酪蛋白酶	+	+	-
几丁质酶	-	-	+
明胶酶	+	+	+
卵磷脂酶	-	-	V
脂酶	+	V	V
脲酶	-	-	-
溶血	+(羊血)	V(马血)	-
发酵:			
阿拉伯糖	-	-	V
葡萄糖	+	+	+
甘露糖	+	+	+
棉籽糖	-	-	-
鼠李糖	-	-	-
水杨苷	-	-	-
蔗糖	-	+	+
肌醇	-	-	V
甘露醇	-	+	-
纤维二糖	-	-	-
果糖	+	-	-
乳糖	-	-	-
麦芽糖	+	-	-
木糖	-	-	-
阿东醇	-	-	-
卫矛醇	-	-	-
山梨醇	-	-	-
病原性	+	+	+

注: V——反应不定。

副溶血性弧菌等多种弧菌,甚至还包括不同属的细菌,如气单胞菌属(*Aeromonas*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)的细菌等^[8]。而且未将不同种的致病菌与其产生的特有症状逐一区分开来。这是不十分合理的。

鳃弧菌是一种条件致病菌。根据 Lightner 和 Lewis 的报道,实验室里的人工感染试验,通常只采用肌肉注射法,其他感染方法很少获得成功^[9]。我们分离的鳃弧菌,对健康的中国对虾的感染试验,不仅采用肌注菌液的方法,而且还采用了浸泡法(将菌液加入到饲养海水中的方法),两法均获得成功。浸泡感染法的试验证明,疾病的传播途径是接触传染。高感染率可能是由两个原因造成的,一是我们分离到的鳃弧菌可能毒力较强;另一原因是中国对虾易被鳃弧菌感染。在平潭岛的对虾养殖场饲养了三种对虾——中国对虾(*P. orientalis*)、日本对虾(*P. japonicus*)和长毛对虾(*P. penicillatus*),但只有饲养中国对虾的虾塘患“红腿病”,而相邻的饲养日本对虾和长毛对虾的虾塘,在整个疾病流行期,都未发现任何“红腿病”的症状。中国对虾原生长于黄渤海,移居到南方养殖后,可能不适应当地的高温天气,八月份以后,当对虾长到 8.5 公分以上时,易于感染得病。

鳃弧菌是海水中的正常菌群^[10],也是海水鱼和淡水鱼的主要病原菌^[9,7,11]。细菌对 NaCl 的需求,随分离菌株的来源而变动。一般而言,从淡水鱼中分离的菌株能在无盐的培养基中生长,而从海水鱼中分离的菌株生长必须要有一定的盐度^[12]。我们的鳃弧菌是从海水养殖的对虾中分离到的,生长必须要有一定的 NaCl。这同“伯捷氏细菌鉴定手册”(Shewan, J. M. 和 M. Veron 撰写)所描述的不同^[13],但与 Furniss 等人的结果一致^[6]。鳃弧菌生长与温度的关系也随菌株而异^[9]。按 Shewan & Veron 的资料^[13],鳃弧菌能在 5°C 中生长。与此相反,我们分离到的鳃弧菌在 5°C 中却不能生长。这可能与我们的菌株来自我国的南方,并在夏季分离到有关。

在表 3 列出的各项特性中,我们分离的菌株在吡啶产生、蔗糖和甘露醇发酵等几个生化反应与 Shewan & Veron 的结果不同^[10]。上述提到的这几个生化反应也因菌株而异。Nybelin 根据它们的不同,把鳃弧菌分成生物型 A(蔗糖+、甘露醇+、吡啶+)和生物型 B(蔗糖-、甘露醇-、吡啶-)^[12];后来 Smith 又增加了生物型 C(蔗糖+、甘露醇+、吡啶-)^[14]。但是 Evelyn 对这种分型方法持不同的意见^[9],Mocarty 等人和江草周三也有相同的看法^[8,10],因为这些生化反应的结果是不定的。因此,我们对分离到的鳃弧菌未作进一步的生物型划分。

参 考 文 献

- [1] 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): 195-203。
- [2] 上田忠男,北上一男,1975。养殖クルマエビから分离された病原菌について。昭和 50 年度鹿儿岛水产试验场学業報告書,24-30。
- [3] 江草周三,1978。魚の感染症,101-128。恒星社厚生阁、東京。
- [4] Delves-Broughton, J. & C. W. Poupard, 1976. Disease problems of prawns in recirculation systems in the U. K. *Aquaculture*, 7(3): 201-217.
- [5] Evelyn, T. P. T., 1971. First records of vibriosis in Pacific salmon cultured in Canada, and taxonomic status of the responsible bacterium, *Vibrio anguillarum*. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 28(4): 517-525.

- [6] Furniss, A. L. *et al.*, 1978. The Vibrios. Public Health Laboratory Service Monograph Series 11. Her Majesty's Stationery Office, London.
- [7] Jevin, M. A. *et al.*, 1972. *Vibrio anguillarum* as a cause of disease in winter flounder (*Pseudopleuro nectesamericanus*). *Can. J. Microbiol.*, 18: 1595-1592
- [8] Lightner, D. V., 1977. *Vibrio* disease of shrimps. In: Disease Diagnosis and Control in North American (ed. by C. J., Sindermann). 19-26. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam—Oxford—New York.
- [9] Lightner, D. V. & D. H. Lewis, 1975. A septicemic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp. *Mar. Fish. Rev.*, 37(5-6): 25-28.
- [10] McCarty, D. H. *et al.*, 1974. *Vibriosis* in rainbow trout. *J. Wildl. Dis.*, 10(1): 2-7.
- [11] Muroga, K. & S. Egusa, 1967. *Vibrio anguillarum* from an endemic disease of Ayu in Lake Hamana. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 33(7): 636-640.
- [12] Nybelin, O., 1935. Untersuchungen über den bei Fischen Kranckeitserregenden Spaltpilz *Vibrio anguillarum*. *Medd. Undersök.-Anst. Sjötvattenfisk Stockholm*, No. 8: 5-62.
- [13] Shewan, J. M. & M. Veron, 1974. Genus *Vibrio*. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, eighth edition (ed. by R. E. Buchanan & M. E. Gibbons). 340-345. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- [14] Skerman, V. B. D., 1967. *A Guide to the Identification of the Genera of Bacteria*, second edition The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- [15] Smith, I. W., 1961. A disease of finnock due to *Vibrio anguillarum*. *J. Gen. Microbiol.*, 24: 247-252.
- [16] Vanderzant, C. *et al.*, 1970. Microbial flora of Gulf of Mexico and pond shrimp. *J. Milk Food Technol.*, 33: 346-350.

VIBRIO ANGUILLARUM AS A CAUSE OF DISEASE IN PENAEUS ORIENTALIS KISHINOUE

Zheng Guoxing, Shen Yalin and Li He

(East China Sea Fisheries Research Institute, Shanghai)

ABSTRACT From July to October in 1987 an epizootic disease occurred in the prawn farm of Pingtan island, Fujian Province. The acute infected disease was described as "red leg disease" locally, which was characterized by heart and nearby region becoming light orange, pleopods red and swimming activity reducing. The hemolymph drawn from heart of diseased shrimp was thin, turbid and unclottable. The mortality due to this disease was over 90% in shrimp stock. Five strains were isolated from hemolymph of moribund shrimps. Infection experiments ascertained that the bacterial isolates were the cause of the disease.

All bacterial isolates showed Gram-negative short rods with a single polar flagellum. They produced acid but no gas from glucose. Moreover, they were oxidase-positive and could not grow in peptone water lacking NaCl or containing 8% NaCl, or at 42°C. But they grew well in peptone water containing 3 or 6% NaCl. Test for the decarboxylation of lysine and ornithine were negative and arginine positive. All strains were sensitive to vibriostatic agent 0/129. The organisms were

identified as *Vibrio anguillarum*, which was first reported in China as the causative agent of prawn disease.

KEYWORDS *Penaeus orientalis*, *Vibrio anguillarum*, vibriosis

国际应用水产海洋学会议在加拿大圣约翰斯召开

1989年10月23—27日在加拿大纽芬兰圣约翰斯召开了国际应用水产海洋学会议。这次会议是在联合国教科文组织(UNESCO)的政府间海洋学委员会(IOC)、美国国家海洋大气局(NOAA)和加拿大气象海洋学会(CMOS)等机构倡议下,由加拿大政府渔业与海洋部(DFO)和Seaconsult有限公司共同承办。出席这次研讨会的有26个国家的专家学者共200余名。其中出席人数以东道国加拿大为最多,依次为美、苏两国。还有欧、亚、非、南美、大洋洲有关国家各有1—3名代表参加。此外,联合国粮农组织、联合国教科文组织政府间海洋学委员会的代表也出席了会议。

研讨会主要议题有:应用水产海洋学的科学基础、环境对鱼类集群的影响、实时海洋学资料的收集、海洋资料通讯、捕捞作业中海洋学应用资料的分析与结果、应用水产海洋学的试验与服务以及渔船和渔船队的调度决策。会议共收到有关论文80余篇。会议程序采用全体会议宣读、大组会宣读、墙报张贴、专题小组报告及相互讨论等多种形式。会议期间,在全体会议上所作的报告有:《水产海洋学服务科学基础的方向》(加拿大W. C. Legget 博士)、《加拿大应用水产海洋学的前景》(加拿大W. G. Doubleday 博士)、《渔业遥感为更好管理再生资源的一种手段》(美国J. J. Simpson 博士)、《应用水产海洋学在苏联》(苏联Y. V. Zonov 博士)、《渔业服务展望:评述渔业分析和预报服务的目的与需求》(美国T. Laevastu 博士)、《应用水产海洋学的试验:南太平洋新兴黄鳍金枪鱼渔业的发展》(美国R. M. Laurs 博士)、《日本应用水产海洋学的现状与未来》(日本T. Hirano 博士)、以及《海洋学资料通讯系统的新发展》(加拿大S. M. Show 博士)。在大组会上,我国台湾学者叶博士作了题为《太平洋亚北极表层水温与海洋红大麻哈鱼资源量的关系》和笔者作了题为《东海深海鱼类分布与环境条件的关系》的学术报告。

在会议期间有加拿大的生物声学(Biosonics)公司、海洋咨询(Seaconsult)公司、渔业改革中心、终极(Ultimateast)资料通讯公司、西姆兰特(Simrad)海洋公司、渔业与海洋部和通讯部,美国的产物声学(Biosonics)公司、罗佛斯(Roffer's)海洋预报服务中心与国家海洋大气局海洋服务处等18个单位参加展销。这些展品一方面结合生产实际,另一方面则普遍采用微机,看来目前应用水产海洋学在世界先进国家已进入电子计算机时代,这给笔者留下深刻的印象。

这次拥有全球应用水产海洋学(海洋渔场学)许多优秀代表出席的研讨会,首要的目的是依据海洋环境的科学知识,研讨怎样和在什么限度内来改进捕捞决策。相信通过这次会议将促进实时海洋学资料的生产者和捕捞作业应用海洋学者之间的技术交流与对话,同时也将促进全世界应用水产海洋学更迅速地发展。此次研讨会上所有的论文提要已分发给各国代表,其全文还须最后审定,不久将汇编成加拿大渔业与水生科学学报(*Can. J. Fish. Aquat. Sci.*)的专辑出版。而专题小组报告和会议情况等,则另编成国际应用水产海洋学会议的会议录出版。

(上海水产大学 沈金鳌)