

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*

郑国兴

(东海水产研究所)

提要 本文对养殖对虾所患的一种弧菌病作了研究报告。这种病的病原是非01群霍乱弧菌。这是一种菌体短的无芽孢杆菌,弧状,单个,有时联成S状。以一根单极毛运动,鞭毛有外鞘。草兰氏染色阴性。生化反应和已知的01霍乱弧菌基本相同,但不被01霍乱弧菌多价血清凝集。这种病的症状是行动呆滞,时而浮头或在水面上翻滚;眼球肿胀,由黑变暗以至溃烂仅留眼柄,随着病情加重全身肌肉发白。一般在一周内死亡。

主题词 非01群霍乱弧菌、对虾、弧菌病

1983年7—10月,上海市奉贤县对虾养殖场,养殖对虾发生了一起当地称为“瞎眼病”的流行症。病虾行动呆滞,匍匐于水草上或池边水底,时而浮头,在水面上旋转翻滚;眼球肿胀,由黑变褐,以至溃烂,严重者只剩下眼柄(见图1);随着病情加重,全身肌肉发白,一般大多在一周内死亡,少数存活者,也往往失去了眼球,不少成了“独眼龙”。

经细菌学检查病虾的眼球上和心脏血淋巴中分别分离到细菌的纯培养,经人工感染得到与自然感染病虾的相同症状,并能从人工感染病虾的眼球上分离到同一种细菌。细菌的形态,生理生化特性与霍乱弧菌 *Vibrio cholerae* 相同,但不为01霍乱弧菌多价血清所凝集,故确认为非01群霍乱弧菌 *Vibrio cholerae*(non-01),简称 NCV⁽¹⁾。

非01群霍乱弧菌广泛分布于自然界中,也能经常从人的粪便中分离到,引起腹泻的报告也不少^[4,7,11,12]。1979年日本的室贺清帮等报导了非01群弧菌是香鱼 *Plecoglossus altivelis* 的致病菌^[10]。

弧菌病是对虾养殖的主要病害,国外已报导的对虾弧菌病原菌主要有副溶血性弧菌

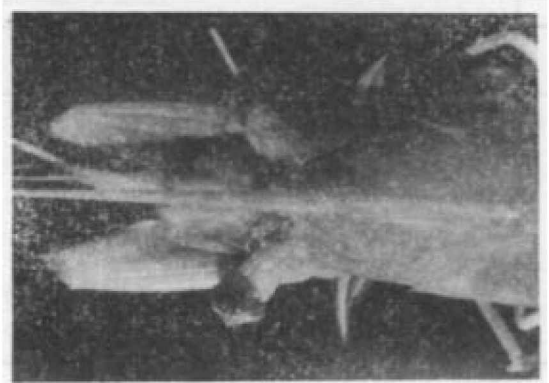


图1 病虾头部,示眼球病变
Fig. 1 Head of diseased shrimp; showing pathological changes of eyeball

* 国家海洋局第一海洋研究所王文兴同志对本文提出修改意见;国家海洋局第二海洋研究所吴友吕同志帮助拍摄电镜照片;本所金凤娣同志帮助拍摄病虾照片。特此致谢。

(1) NCV 是 non-cholera vibrio 的缩写,根据“伯捷氏细菌鉴定手册”第8版和 Furniss 等人的分类,属于霍乱弧菌 *Vibrio cholerae*,但不被01霍乱弧菌抗血清凝集。

Vibrio parahaemolyticus、溶藻性弧菌 *Vibrio alginolyticus* 和鳃弧菌 *Vibrio anguillarum* 等^[2,3,8,9,12]。非 O1 群霍乱弧菌作为对虾致病菌,在国内外尚未见有报导。

材料与方 法

1. 细菌的分离与生物学性状的测定

试验用菌是 1983 年 9 月和 10 月从上海市奉贤县对虾养殖场垂死的中国对虾 *Penaeus orientalis* Kishiouye 中分离得到的,试验菌的来源见表 1。除 9014 菌取自于心脏血淋巴液外,其余均取自病虾眼球。从心脏血淋巴液中分离细菌的方法是:首先用 70% 的酒精棉球在病虾头胸甲的心区上反复擦拭,进行体表消毒,然后用灭菌的针筒作心脏穿刺抽取血淋巴液,迅速注于含有 1% NaCl 的营养琼脂平板上,以涂平板法接种。眼球的取样的方法是:用灭菌镊子摘取病虾眼球,以无菌生理盐水反复冲洗数次,然后直接在营养琼脂平板上划线分离。将接种后的琼脂平板于室温(约 25°C—30°C)中培养 2—3 天,选取形态一致的单个菌落重复划线分离以获得纯培养。

表 1 试验菌株的来源。

Table 1 Source of isolation.

菌株号 No. of strains	分离日期 Isolated date	病虾体长 Length of shrimp (cm)	分离部位 Sites of isolation
9021	1983.9.14	8.8	眼球 eyeball
9052	1983.9.14	9.0	眼球 eyeball
9008	1983.9.15	9.1	眼球 eyeball
9011	1983.9.15	9.1	眼球 eyeball
9013	1983.9.15	9.5	眼球 eyeball
9014	1983.9.15	9.3	心脏 heart
9031	1983.9.27	10.0	眼球 eyeball
9045	1983.10.9	10.6	眼球 eyeball

分离菌的生物学性状测定按“一般细菌常用鉴定方法”^[1]和 Furniss 等人介绍的方法^[4]进行,并按“伯捷氏细菌鉴定手册”第 8 版^[6]和 Furniss 等人的方法鉴定至种。

2. 人工感染试验

供人工感染试验的健康对虾取自本所养殖场的试验水池,试验对虾饲养在有机玻璃制的水族箱中(120×60×60cm),饲养用水是用当地经过滤的盐卤,再用经暴气的自来水稀释成盐度为 0.6% 左右盐水,它与当地养虾池塘盐度相近似。饲养水温 25°—30°C 左右。观察一周,每天两次记录对虾的活动情况和发病情况,并移去死虾。

(1) 浸养感染试验 取 18—24 小时细菌的斜面培养物,用生理盐水制成悬液,每毫升悬液约含细菌 10^{12} 个;然后将细菌悬液加入饲养健康虾的水族箱中,每升海水加细菌悬液 0.2 毫升,每日两次,连续加 3—4 天。对照组饲养在相同的条件下,不加菌液。

(2) 眼柄肌肉内接种 用接种针挑取少量 18—24 小时的斜面培养物于灭菌生理盐水中,制成细菌悬液,浓度约为 10^9 个/毫升;然后使用 0.5 毫升的注射器,将细菌悬液注入对虾眼柄的肌肉内,注射量为 0.02 毫升。对照虾在相同的部位注入 0.02 毫升灭菌生理盐水。

结 果

(一) 一般生物学性状

8 株分离菌的生物学性状几乎完全相同。菌体为短而无芽孢杆菌,弧状,(0.5—0.8) × (1.5—3.0)微米。单个,有时联成 S 形。以一根单极毛运动,鞭毛有外鞘〔图 2〕。革兰氏染色阴性。无明显色素。不发光。氧化酶,过氧化氢酶反应阳性,不产 H_2S (TSI)。能液化明胶。能还原硝酸盐成亚硝酸盐。赖氨酸脱羧反应阳性;精氨酸,鸟氨酸脱羧反应阴性(莫勒 Møeller 氏法)。在无 NaCl 的胨水中能生长,6% NaCl 的胨水中生长缓慢,7% NaCl 的胨水中不长。5°C 不长,42°C 生长良好。脲酶反应阴性。不能发酵肌醇。对弧菌抑制剂 O/129 (10 μg) 敏感。不能为 O1 霍乱弧菌多价血清凝集。上述及其它生物学特性及其与霍乱弧菌 *V. cholerae* 的比较见表 2 和表 3。表中霍乱弧菌引自“伯氏手册”第 8 版^[6]和 Furniss 等人^[8]的资料。

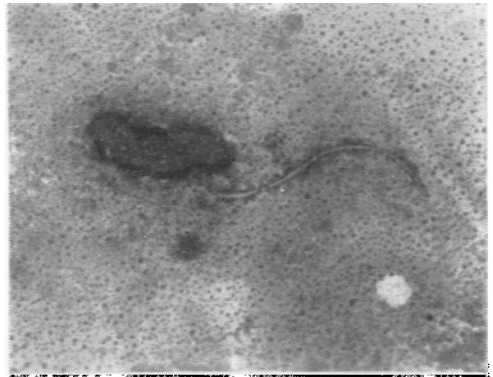


图 2 从病虾眼球分离的非 O1 群霍乱弧菌(9013)的电镜照片。负染, × 10,000
Fig. 2 Electron micrograph of non-O1 *Vibrio cholerae* (9013) isolated from eyeball of diseased shrimp. Negative stain; × 10,000

表 2 分离菌株与霍乱弧菌形态及生化特性的比较
Table 2 Morphological and biochemical characteristics of the isolate in comparison with those of *Vibrio cholerae*

特 性 Characteristics		分离菌株(8株) Present isolate (8 isolates)	霍乱弧菌 <i>Vibrio cholerae</i> (Bergey's Mannal)	霍乱弧菌 <i>Vibrio cholerae</i> (Furniss etc.) eltor & classical N. C. V. s	
生长在 TCBS 上	Growth on TCBS	黄 Y		黄 Y	黄或绿 Y/G
生长在 CLED 上	Growth on CLED	+	+	+	+
运动性	Motility	+	+	+	+
单极毛	1 polar flagellum	+	+	+	+
革兰氏染色	Gram stain	-	-	-	-
游动	Swarming	-	-	-	-
发光	Luminescence	-	-	-	-
色素	Pigment	-	-	-	-
O/F 试验	O/F test	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +

续表

特 性 Item	分离菌株(8株) Present isolate (8 isolates)	霍乱弧菌 <i>Vibrio cholerae</i> (Bergey's Mannal)	霍乱弧菌 <i>Vibrio cholerae</i> (Furniss etc.) eltor & classical N. C. V. s	
自葡萄糖产气 Gas from glucose	-	-	-	-
氧化酶 Oxidase	+	+	+	+
过氧化氢酶 Catalase	+	+	+	+
0/129(10μg)敏感性 0/129 (10μg)	+	+	+	+
甲基红 Methyl red	+	d*		
VP 反应 Voges-Proskauer	+	d	d	d
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	+	+
吲哚 Indole	+	+		
产 H ₂ S (TSI) H ₂ S (TSI)	-			
柠檬酸盐利用 Citrate utilization	+	+		
无 NaCl 胨水生长 Growth in 0% NaCl	+	+	+	+
3% NaCl 胨水生长 3% NaCl	+	+	+	+
6% NaCl 胨水生长 6% NaCl	(+)**		d	d
7% NaCl 胨水生长 7% NaCl	-	d		
8% NaCl 胨水生长 8% NaCl	-	-	-	-
5℃ 生长 Growth at 5℃	-	-		
37℃ 生长 37℃	+	+	+	+
42℃ 生长 42℃	+	d	+	+
精氨酸 Arginine	-	-	-	-
鸟氨酸 Ornithine	+	+	+	+
赖氨酸 Lysine	+	+	+	+
苯丙氨酸 Phenylalanine	-			
淀粉酶 Amylase	+	+	+	+
明胶酶 Gelatinase	+	+	+	+
卵磷脂酶 Lecithinase	+	+	+	+
酪蛋白酶 Casease	+	+		
脲酶 Urease	-	-		
脂酶(吐温-80) Lipase (Tween-80)	+	+	+	+
溶血 Hemolysis	+(羊血球) (sheep blood)	+(马血) (horse blood)		
被 O1 霍乱弧菌抗血清凝集 Agglutinated by cholera O1 antiserum	-	+	+	-

* d——有的菌株阳性,有的菌株阴性(some strains positive and some negative)

** 括号表示反应迟缓(shows the reaction slowly in brackets)

Y——yellow; G——green

表 3 分离菌株与霍乱弧菌对糖类的利用

Table 3 Carbohydrate utilization of the isolate and *Vibrio cholerae*

糖 类 Carbohydrate	分离菌株(8株) Present isolate (8 isolates)	霍乱弧菌 <i>Vibrio cholerae</i> (Bergey's Mannal)	霍乱弧菌 <i>Vibrio cholerae</i> (Furniss etc.) eltor & classical N. C. V. s	
葡萄糖 Glucose	+	+	+	+
果糖 Levulose	+	+		
半乳糖 Galactose	+	+		

续 表

糖 类 Carbohydrate	分离菌株 (8 株) Present isolate (8 isolates)	霍乱弧菌 <i>Vibrio cholerae</i> (Bergey's Manual)	霍乱弧菌 <i>Vibrio cholerae</i> (Furniss etc.) eltor & classical N. C. V. s	
麦芽糖 Maltose	+	+		
蔗糖 Sucrose	+	+	+	d
糊精 Dextrin	+			
甘露醇 Mannitol	+	+		
肝糖 Glycogen	+7/8			
甘露糖 Mannose	d4/8	d	+	d
山梨醇 Sorbitol	-1/8			
水杨苷 Salicin	-1/8	-		
纤维二糖 Cellobiose	-1/8		-	-
乳糖 Lactose	-	(+)		
阿拉伯糖 Arabinose	-	-	-	-
鼠李糖 Rhamnose	-	-	-	-
山梨糖 Sorbose	-			
棉子糖 Raffinose	-	-	-	-
木糖 Xylose	-	-	-	-
菊糖 Inulin	-			
乙醇 Ethanol	-		-	-
卫茅醇 Dulcitol	-	-		
肌醇 Inositol	-	-	-	-
七叶苷 Esculin	-	-		

注: d——有的菌株阳性,有的菌株阴性; 分数——分母为试验菌株数,分子为阳性菌株数; (+)——反应迟缓

Notes: d——some strains positive, some negative; Fraction——no. of positive strains/no. of strains in experiment; (+)——delayed

(二) 人工感染试验

(1) 浸养感染 感染试验开始后的第二天到第三天,感病的对虾开始烦躁不安,不断

表 4 眼柄肌肉内接种感染试验结果

Table 4 Results of infection experiments. Test was performed by methods of intramuscular injection in the eyestalk.

菌株号 No. of strains	试验虾数 No. of shrimps in experiment	感染后日数 Days after infection							死亡数/试验数 No. of shrimp killed/ No. of shrimp infected
		1	2	3	4	5	6	7	
9011	3	1 ¹⁾	0	0	0	0	0	1*	2/3
9013	3	1	1	0	0	1*	-	-	3/3
9021	4	1	1*	0	0	0	2*	-	4/4
9031	3	2	1*	-	-	-	-	-	3/3
9045	3	0	1*	0	0	1*	1	-	3/3
对照 Control	3	0	0	0	0	0	0	0	0/3

1) 死亡数; *——肉眼观察可见眼球明显病变。

1) No. of killed shrimps; *——eyeball can be observed clear pathological changes by the naked eye.

地抖动眼柄;随后,浮头在水面上打转;腹部肌肉由无色透明逐渐变为白色不透明;眼球逐渐由黑色转为褐色,进而腐烂,萎缩。眼球在扫描电镜下可看到布满细菌(见图3),病虾大多在一周内死亡。一般浸养感染的成功率是10%左右。对照组的对虾活动正常,眼球在扫描电镜下观察、未见异常。

(2) 眼柄肌肉内接种 试验结果列于表4。24小时内死亡者,往往病症未能充分显露,眼球也未见明显病变。24小时后死亡者,病状与浸养感染的描述相似,大多数眼球可看到明显病变,甚至溃烂。

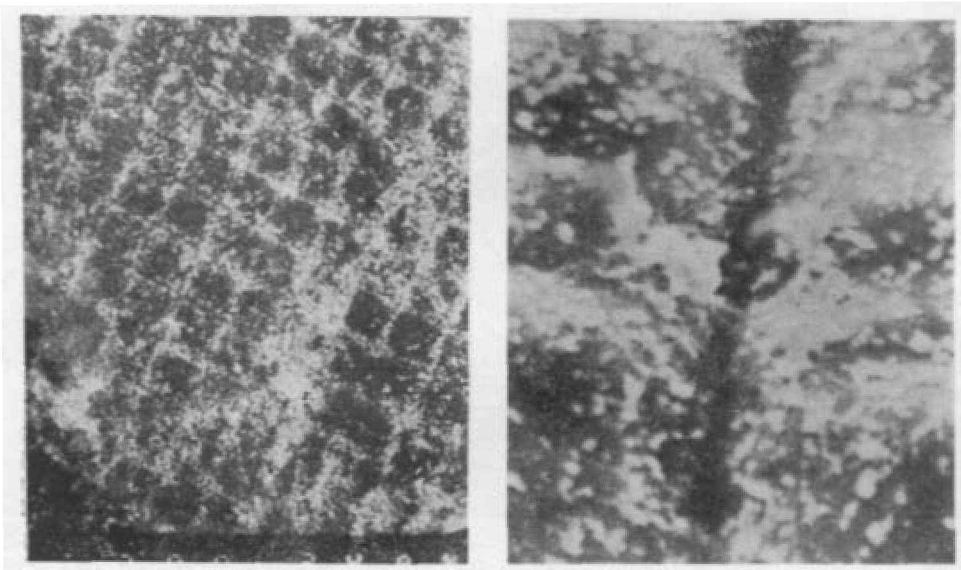


图3 病虾眼球扫描电镜照片(浸养感染第三天),
示眼球开始病变,复眼上布满细菌(左图 $\times 200$,右图 $\times 3,000$)

Fig. 3 Scanning electron micrograph of eyeball of diseased shrimp (three days post immersion cultured infection); showing pathological changes and numerous bacteria on the surface of compound eye (left: $\times 200$; right: $\times 3,000$)

讨 论

分离菌株的生物学性状和“伯捷氏细菌鉴定手册”及 Furniss 等人描述的霍乱弧菌的特征十分一致(见表2和表3),因此无论是按“伯捷氏细菌鉴定手册”第8版还是按 Furniss 等人对弧菌的分类,分离菌无疑是属于霍乱弧菌,但分离菌不被 O1 霍乱弧菌多价血清凝集,故应归入非 O1 群霍乱弧菌。

海伯尔格(Heiberg)根据甘露糖、蔗糖和阿拉伯糖发酵型式不同,将弧菌分为6个生化群;后来 Smiss 和 Goodner 又加进两个群^[9]。在我们的研究中,根据海伯尔格生化群,8株分离菌可分为两组;9011,9013,9021和9045为一组,它们发酵甘露糖和蔗糖,不发酵阿拉伯糖,所以属于 I 群;9008,9014,9031和9052为一组,发酵蔗糖,不发酵甘露糖和阿拉伯糖,所以应属于 II 群(见表5)。

从患病对虾上分离到的非 O1 群霍乱弧菌与以前国外学者报导的对虾弧菌病病原菌

表 5 分离菌株的海伯尔格生化群
Table 5 Heiberg groups of present isolate

菌株号 No. of strains	甘露糖 Mannose	蔗糖 Sucrose	阿拉伯糖 Arabinose	海伯尔格生化群 Heiberg group
9011	+	+	-	I
9013	+	+	-	
9021	+	+	-	
9045	+	+	-	
9008	-	+	-	II
9014	-	+	-	
9031	-	+	-	
9052	-	+	-	

副溶血性弧菌、溶藻性弧菌和鳃弧菌等不同。非 01 群霍乱弧菌能在无 NaCl 的脓水中生长,其它各菌都是嗜盐弧菌,不能在无 NaCl 脓水中生长,而适于生长在含盐量较高的环境中,副溶血性弧菌能生长在 8% NaCl 的脓水中,溶藻性弧菌甚至能在 10% NaCl 的脓水中生长。非 01 群霍乱弧菌与副溶血性弧菌的不同点还在于对 VP 反应的不同,前者是阳性,后者为阴性。非 01 群霍乱弧菌与鳃弧菌的区别,除了对精氨酸、赖氨酸和鸟氨酸脱羧反应相反外,非 01 群霍乱弧菌能在 42°C 条件下生长,而鳃弧菌不能在 42°C 下生长。非 01 群霍乱弧菌和其它对虾弧菌病原菌的区别见表 6。

表 6 非 01 群霍乱弧菌和其他对虾弧菌病原菌的区别
Table 6 Differentiation of Non-01 *Vibrio cholerae* and other pathogenic bacteria of vibrio disease in shrimps

特 性 Characteristics	非 01 霍乱弧菌 <i>V. cholera</i> N. C. V.	付溶血性弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	溶藻性弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	鳃 弧 菌 <i>V. anguillarum</i>
0% NaCl 脓水生长 Growth in 0% NaCl	+	-	-	-
6% NaCl 脓水生长 6% NaCl	(+)	+	+	d[87.0]
8% NaCl 脓水生长 8% NaCl	-	+	+	-
10% NaCl 脓水生长 10% NaCl	-	-	+	-
42°C 生长 Growth at 42°C	+	+	+	-
精氨酸 Arginine	-	-	-	+
赖氨酸 Lysine	+	+	+	-
鸟氨酸 Ornithine	+	+	-	-
阿拉伯糖 Arabinose	-	d[83]	-	d[64.0]
甘露糖 Mannose	d[50]	+	-	+
蔗糖 Sucrose	+	-	+	d[87.0]
VP VP	+	-	+	d[52.8]

注: 非 01 群霍乱弧菌是作者从患病对虾中分离到的 8 株细菌的试验结果; 其他弧菌引自 Sakazaki 和 Balows (1981) 的资料

d——不定; (+)——反应迟缓; 方括号内的数字是阳性反应的百分数

Date of *V. cholera* (NCV) from this study and date of other species of *Vibrio* cited from Sakazaki and Balows (1981)

d——+ or -; (+)——delayed; Figures in square brackets indicate percentages of positive reaction

Lightner 和 Lewis 将溶藻性弧菌和鳃弧菌的悬液以腹部肌肉注射法接种到褐对虾 *Penaeus aztecus*、白对虾 *P. setiferus* 和桃红对虾 *P. duorarum* 体内, 大多数健康虾在接种后 24 小时内死亡, 把上述细菌添加入饵料中, 作口服感染试验未获得成功。他们认为采用肌肉注射是查明细菌致病性的可靠方法; 弧菌病的传染途径不是经口传染, 可能是由于虾体外皮损伤或在脱皮时给细菌进入体内提供了一个特有的条件^[8]。我们把非 01 群霍乱弧菌悬液对健康虾作腹部肌肉内接种, 也多在 24 小时内死亡, 但其症状不明显, 后改用眼柄肌肉内接种, 24 小时后死亡者, 症状才比较显著, 肉眼可看出病虾眼球的明显病变, 甚至完全腐烂。将细菌悬液加入到饲养健康虾的水中, 可使健康虾得病。实验说明疾病是通过接触传染, 经水而传播。浸养感染的成功率约占 10% 左右, 与发病虾池的自然感染率大致相同, 可推测病菌侵入体内与脱皮有关。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] 孟庆显、俞开康, 1983. 对虾养成期间的疾病与防治. 海洋渔业, 5(3), 110-116.
- [3] 徐君卓, 1981. 对虾疾病的研究现状. 国外水产, (4): 19-25.
- [4] Aldova, E., etc., 1968. Isolation of nonagglutinable vibrios from an enteritis outbreak in Czechoslovakia. *Journal of Infectious Diseases*, 118: 25.
- [5] Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons., 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. 340-345.
- [6] Furniss, A. L., Lee, J. V. and Donovan, T. J., 1978. The Vibrios. Public Health Laboratory Service Monograph Series, no. 11. Her Majesty's Stationery Office, London.
- [7] Kenyon, J. F., etc., 1983. *Vibrio cholerae* (non-01) isolated from California coastal waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46(5): 1232-1233.
- [8] Lightner, D. V. and Lewis, D. H., 1975. A septicemic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp. *Marine Fisheries Review*, 37(5-6): 25-28.
- [9] Lightner, D. V., 1977. Shrimp diseases. in C. J. Sindermann ed. Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture. Elsevier Scientific Publ. Co. Amsterdam-Oxford-New York. 10-81.
- [10] Muroga, K., etc., 1979. Non-cholera vibrio isolated from diseased Ayu. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 45(7): 829-834.
- [11] Sakazaki, R. and A. Balows. 1981. The Genera *Vibrio*, *Plesiomonas*, and *Aeromonas*. in M. P. Starr, etc. ed. *The Prokaryotes, A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. Vol. II. 1272-1301.
- [12] Vanderzant, C., Nickelson, R. and J. C. Parker., 1970. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from Gulf coast shrimp. *J. Milk Food Technol.*, 33(1): 161-162.
- [13] Wachsmuth, I. 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.

IDENTIFICATION AND PATHOGENICITY OF *VIBRIO CHOLERAE* (NON-01) ISOLATED FROM DISEASED PENAEID SHRIMP

Zheng Guoxing

(The East China Sea Fisheries Research Institute)

ABSTRACT An epizootic, which is locally called "blind disease", occurred among the penaeid shrimp ponds at Fengxian county in Shanghai during July to October 1983. Eight strains were isolated from the eyeballs and hemolymph of moribund shrimp (*Penaeus orientalis* Kishinouye). It was demonstrated by injecting the bacterial isolates to the eyestalk and by infecting in immersion cultured that the strains were the cause of the epizootic.

The bacterial isolates were all gram-negative, short rods axis curved. Mortality was by a single polar flagellum. Oxidase was positive. The isolates were non-pigmented, non-lumined. Glucose was fermented without the production of gas. Hydrogen sulfide was not formed (TSI). Sucrose was fermented. Arabinose and inositol were not fermented. Fermentation test of mannose was not obvious. Lysine was decarboxylated in the Møller medium but neither arginine nor ornithine was. Growth took place in the peptone water without NaCl. All strains were sensitive to the vibriostatic agent 0/129 (10 μ g), and were not agglutinated by 0—1 antiserum of cholera vibrio. Thus the present isolates were identified as *Vibrio cholerae* (non-01).

KEY WORDS *Vibrio cholerae* (non-01), Vibriosis, Penaeid Shrimp, Penaeus.