

一种新的对虾病原菌(普通变形菌)*

许 兵 纪伟尚 徐怀恕

(青岛海洋大学, 266003)

提 要 1989 年 9 月青岛崂山区上马镇养虾场部分虾池中流行红腿病。自垂死病虾体内分离出多株细菌, 其中二株经感染健康成虾得到与病虾相同症状, 证明所分离菌是对虾红腿病病原菌。经 63 项形态及生理生化特性鉴定为普通变形菌(*Proteus vulgaris* Hauser)。中国对虾养成期红腿病系由条件致病菌所致, 其作用部位在对虾血淋巴并引起血淋巴混浊、变稀、凝固能力下降。该病的实质是由于细菌侵入对虾循环系统而导致的败血症。

关键词 中国对虾, 条件致病菌, 普通变形菌, 红腿病, 败血症

对虾细菌性病害是当前对虾养殖业发展的主要障碍之一, 其中红腿病为对虾养成期的多发病、常见病。1989 年 9 月青岛崂山区上马镇养虾场部分虾池发生对虾红腿病流行, 每日清晨在 1.67 公顷(合 25 亩)池四周可拾到死虾百余尾。我们自垂死病虾体内分离出多株细菌, 其中二株经鉴定为普通变形菌(*Proteus vulgaris* Hauser), 感染实验表明对养成期中国对虾具较高致死率。肠杆菌科细菌导致的对虾红腿病报道国内尚属首次。

材 料 与 方 法

1. 病原菌的分离 在池边捞取濒死之红腿病虾放入冰瓶, 带回室内, 用 70% 酒精棉球擦抹头胸甲与第一腹节连接处, 用接种针挑取心脏块(或蘸取血淋巴)在海水营养琼脂平板划线, 整个过程在 2 小时内完成, 置室温(25—28°C)培养 48 小时, 挑取形态一致的单个菌落, 进一步划线纯化。获得纯培养后移入斜面保存。

2. 病原菌感染实验

(1) 浸浴感染 向自然海水中加入 NaClO 溶液(使有效氯含量达 6ppm, 并加入适量 $KAl(SO_4)_2$ 搅拌均匀后静置过夜, 吸除沉积物, 加适量 $Na_2S_2O_5$ 消除残氯并调节海水 pH 至 7.0 左右。取健康成虾(体长 10—12cm)置于实验桶中(盛有海水 75 升)预养 24—36h。实验期间对虾投喂经消毒处理海水清洗并预养 12 小时以上的活沙蚕。实验菌株于海水营养琼脂斜面室温培养 24 小时, 以无菌生理盐水制成菌悬液, 用血球计数板计数, 然后将菌液加入实验水体中, 使水中实验菌浓度约为 5×10^4 细胞/ml, 每天吸污两次, 换水一次, 换水量约为 3/4, 并补加菌液, 以维持实验菌浓度, 连续充气增氧。

(2) 注射感染 基本处理同上, 实验水体约 100 升, 注射部位为第四腹节, 菌量为 2×10^8 细胞/尾虾, 对照组注射无菌生理盐水 0.04ml/尾虾。

3. 病原菌分类、鉴定 按照《一般细菌常用鉴定方法》^[1]并参考 West 和 Colwell (1984)^[11]、Fur-

* 青岛市科委资助项目 丁明宇、李霞同志参加部分工作。本研究得到青岛市崂山区上马镇水产办公室和育苗场的同志大力协助, 美国马里兰大学 R. R. Colwell 博士提供部分帮助, 特此一并致谢。

收稿年月: 1991 年 8 月; 同年 12 月修改。

niss 等(1978)^[1]等方法进行。鉴定实验菌株均经 2216E 斜面培养 18—24 小时活化。除耐盐性实验、TCBS 培养基生长和唯一碳源实验,培养基均以含盐量为 2% 的陈海水配制。唯一碳源实验基质浓度为 0.1%,基础培养基按照 West(1980)^[1]配制。 β -半乳糖苷酶(ONPG)实验按照麦克法丁方法^[2]进行。O/129 敏感性实验用平板点种法,配制含 O/129 10 μ g/ml、150 μ g/ml 二种 2216E 平板,采用自制多点接种器接种细菌,25 $^{\circ}$ C 培养 48 小时,观察细菌生长情况。

结 果

(一) 人工感染实验

采用浸浴法和肌肉注射法将所分离菌株对健康成虾进行感染实验,结果表明分离菌株对养成期中国对虾具致病性(表 1、2)。感染致死的对虾头胸甲腮甲部呈黄色,步足、游泳足及尾扇呈红色,血淋巴变稀薄、混浊,血凝能力下降,空胃,呈典型的红腿病症状。需要说明的是浸浴法感染实验进行了二次,第一次以盛海水 75 升的圆底玻璃钢桶进行,结果列于表 2。浸浴实验过程中发现患病死亡的对虾多有损伤,或额角不全或触角折断。实验组存活的对虾体表无明显损伤,额角、触角均齐全。对照组中虽有对虾额角及触角不全,但仍健康活泼,正常摄食。由虾池中病虾分离病原菌时也多次注意到对虾体表有损伤,尤其对虾死亡后过夜检查,体表损伤部位呈明显黑色斑块。第二次浸浴感染实验以盛水 100 升的长方形玻璃钢水槽进行,实验三天未见对虾死亡。检查对虾体表无损伤,表明

表 1 分离菌株肌肉注射法感染中国对虾的观察
Table 1 Observations of *Penaeus orientalis* challenged with the bacterial isolates by intramuscular injection

菌株号	细菌数量 (cells/尾)	实验虾数 (尾)	死亡 虾 数 (尾)				死亡数/总数
			12	24	36	48(小时)	
DB 14	2×10^7	11	1	9			10/11
DB 3b	2×10^7	10		2	4	2	8/10
对 照	0	10					0/10

表 2 分离菌株浸浴法感染中国对虾的观察
Table 2 Observations of *Penaeus orientalis* challenged with the bacterial isolates by immersion

菌株号	细菌数量 (cells/ml)	实验虾数 (尾)	死亡 虾 数 (尾)						死亡数/总数
			1	2	3	4	5	6(日)	
DB 14	5×10^4	7	1		1	1		1	4/7
DB 3b	5×10^4	5	1	1					2/5
对 照	0	7							0/7

(1) West, P. A., 1980. *Ecology and taxonomy of the genus Vibrio*. University of Kent at Canterbury, England.

虾体受损不利于对虾抵抗病原菌的侵染。注射感染实验中 DB14 菌株致死率较高,待 48 小时实验结束时,存活的一尾虾也已呈现红腿症状,空胃、运动缓慢。人工感染实验证明 DB14、DB3b 二株菌均为对虾红腿病病原菌,DB14 菌株致病力大于 DB3b 菌株。

(二) 病原菌的分类、鉴定

对 DB3b、DB14 菌株及其注射法感染后自病虾重新分离出的 DB14r 菌株进行了 63 项形态学及生理生化特性的鉴定(见表 3)。分离菌株与文献[8]中对普通变形菌(*Proteus vulgaris* Hauser)的描述一致。主要表现为革兰氏阴性短杆菌、周生鞭毛,固体培养基表面具泳动现象,不发光,不产色素。过氧化氢酶阳性,氧化酶阴性,甲基红反应阳性、VP 反应阴性,精氨酸双水解酶、精氨酸脱羧酶、赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶均为阴性,苯丙氨酸脱氨酶阳性,发酵葡萄糖产酸产气,发酵蔗糖、水杨苷产酸,不发酵纤维二糖、阿拉伯糖、鼠李糖、乳糖、棉子糖产酸,明胶酶阳性,淀粉酶阴性, β -半乳糖苷酶阴性。分离菌株生长需要生长因素,这也与手册中描述一致。在只含无机盐类并添加一种有机质为唯一碳源生长时,三株细菌均不生长,包括以不含氨基酸的酪蛋白水解物为基质的阳性对照。当添加几种维生素后(每升基础培养基中含胱氨酸 50 μ g,硫胺素 100 μ g,维生素 H 0.1 μ g,维生素 B₆ 200 μ g,泛酸 100 μ g,菸酸 100 μ g,维生素 B₂ 200 μ g,肌醇 500 μ g,维生素 B₁₂ 2.0 μ g)阳性对照即能正常生长。所分离的变形菌不具嗜盐性而具较广大的耐盐性。

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

鉴定项目	DB 14	DB 14r	DB 3b	普通变形菌 ⁽¹⁾
形态特征				
形态、排列	杆状、散生	杆状、散生	杆状、散生	杆状、散生
大小(μ m)	1.1 \times 0.6	1.1 \times 0.6	1.1 \times 0.6	(1.0-3.0) \times (0.4-0.8)
革兰氏染色	-	-	-	-
芽孢染色	-	-	-	-
鞭毛着生	周生	周生	周生	周生
培养特征				
TCBS 生长	黄色	黄色	黄色	NR ⁽²⁾
需要生长因素	+	+	+	+
0% NaCl 胨水	+	+	+	+
3% NaCl 胨水	+	+	+	NR
6% NaCl 胨水	+	+	+	NR
8% NaCl 胨水	+	+	+	NR
10% NaCl 胨水	+	+	+	NR
4 $^{\circ}$ C 生长	+	+	+	NR
10 $^{\circ}$ C 生长	+	+	+	NR
37 $^{\circ}$ C 生长	+	+	+	+
42 $^{\circ}$ C 生长	+	+	+	NR
色素产生	-	-	-	-
泳动现象	+	+	+	+
发光现象	-	-	-	-

(续表 3)

鉴定项目	DB 14	DB 14r	DB 8b	普通变形菌
生理生化特征				
硝酸盐还原	+	+	+	+
尿素分解	+	+	+	+
H ₂ S 产生	+	+	+	+
VP 反应	-	-	-	-
甲基红反应	+	+	+	+
吲哚反应	+	+	+	+
过氧化氢酶	+	+	+	+
氧化酶	-	-	-	-
精氨酸双水解酶	-	-	-	-
精氨酸脱羧酶	-	-	-	-
赖氨酸脱羧酶	-	-	-	-
鸟氨酸脱羧酶	-	-	-	-
苯丙氨酸脱氨酶	+	+	+	+
柠檬酸盐利用	+	+	+	-
0/129 敏感性 10 μ g/ml	-	-	-	NR
150 μ g/ml	+	+	+	NR
葡萄糖产气	+	+	+	+
葡萄糖产酸	+	+	+	+
蔗糖	+	+	+	+
水杨苷	+	+	+	+
蜜二糖	-	-	-	-
纤维二糖	-	-	-	-
甘露糖	-	-	-	-
阿拉伯糖	-	-	-	-
山梨醇	-	-	-	-
鼠李糖	-	-	-	-
乳糖	-	-	-	-
棉子糖	-	-	-	-
淀粉酶	-	-	-	-
明胶酶	+	+	+	+
卵磷脂酶	+	+	+	NR
几丁质酶	-	-	-	NR
脂肪酶(Tween 80)	-	-	-	+(玉米油)
ONPG 反应 ⁽³⁾	-	-	-	-
唯一碳源				
果糖	-	-	+	NR
纤维二糖	-	-	-	NR
棉子糖	-	-	-	NR
木糖	+	+	+	NR
海藻糖	-	-	-	NR
阿拉伯糖	-	-	-	NR
半乳糖	+	+	-	NR
蜜二糖	-	-	-	NR
甘油酸盐	-	-	-	NR
腐胺	-	-	-	NR

(续表3)

鉴定项目	DB 14	DB 14r	DB 8b	普通变形菌
葡萄糖醛酸盐	-	-	+	NR
熊果苷	-	-	+	NR
丁酸钠	-	-	-	NR
甘氨酸	-	-	-	NR
组氨酸	-	-	-	NR
天门冬氨酸	+	+	+	NR
葡萄糖胺	-	-	-	NR
r-氨基丁酸	-	-	-	NR

注: (1)伯杰氏手册(9版)中对普通变形菌的描述^[8]; (2)手册中没有记载; (3) β -半乳糖苷酶反应。

讨 论

(一) 对虾红腿病病原菌

中国对虾养成后期进入高温季节。农历八月十五大潮前,当地许多虾池换水困难,加上养殖密度过大及池底剩余饵料较多,水中有机质及池底硫化物含量增加,致使水质恶化,病害时有发生,其中以对虾红腿病较为普遍。一般认为对虾红腿病是由水生弧菌引起的。国内对红腿病病原菌的研究已经证明鳃弧菌^[9]、溶藻弧菌⁽²⁾、副溶血弧菌^(2,5)均可引起中国对虾红腿病的发生。副溶血弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌、河弧菌、哈维氏弧菌和雀鲷弧菌还可以引起长毛对虾(*P. penicillatus*)红腿病的发生^(4,5)。我们也从患红腿病中国对虾体内分离出溶藻弧菌、副溶血弧菌及坎贝氏弧菌,并经肌肉注射感染实验证明所分离菌株可引起养成期中国对虾发生红腿病(另文报道)。同时,我们还分离出肠杆菌科细菌——普通变形菌,并证实对虾单独感染变形菌也可发生典型的红腿病。变形菌是鱼类的条件致病菌,可引起爬行动物和鱼类鳍及头部的溃疡,侵染鳄鱼可导致心包炎和心脏周围积液^[8,20]。但变形菌侵染对虾导致红腿病发生的报道尚属首次。本研究结果说明,中国对虾养成期所患红腿病可由多种细菌引起,这些细菌多为条件致病菌,它们是水环境及水生动物体表微生物群落中的正常成员^[9,11]。Lightner (1988)指出看似健康、正常的对虾血淋巴中也可分离出细菌,尤其是弧菌,这往往是由于对虾密度过高以及对虾蜕皮等原因造成体表损伤,致使细菌进入对虾血淋巴,当它们数量很少时,对虾的免疫系统可以控制住

(2) 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, (30): 11—18.

(3) 宋春华, 1988. 中国对虾红腿病的研究. 青岛海洋大学水产学院.

(4) 黄维真等, 1991. 养殖对虾弧菌病病原菌的研究 I 首次分离和检出对虾弧菌病病原菌雀鲷弧菌 (*Vibrio damsela*). 第二届全国海洋与淡水微生物学、全国海洋生物工程学联合学术讨论会论文摘要集, 56.

(5) 方金瑞等, 1991. 养殖对虾弧菌病病原菌的研究 II 分离、检出副溶血弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌、河弧菌和哈维氏弧菌. 第二届全国海洋与淡水微生物学、全国海洋生物工程学联合学术讨论会论文摘要集, 57.

这些细菌,一旦环境条件恶化,对虾免疫力下降即发生疾病。除弧菌外,假单胞菌、黄杆菌和气单胞菌也可以从病虾中分离出来^[7]。我们认为普通变形菌引起的对虾红腿病可能是由于对虾蜕皮过程中或由于几丁质降解菌或机械损伤等原因造成的对虾外壳损伤后,变形菌侵入对虾体内,当环境恶化时而表现出来的疾病。病原菌的主要作用部位是血淋巴,红腿病是由于细菌侵入对虾循环系统而引起的败血症。

实验中还发现部分对虾游泳足虽然呈红色,但是头胸甲的腮甲部位并无黄色色素沉积。将此类对虾置于水槽中连续通气饲养几个小时,附肢红色消失,对虾摄食正常,镜检血淋巴看不到细菌,培养法也分离不出细菌。其它研究者也发现过这种现象⁽⁸⁾。推测此红腿症状并非由于细菌感染所致,而是由于池水条件不良,如溶解氧偏低等原因引起的生理性反应。

(二) 感染实验方法及存在的问题

在对条件致病菌的致病力及其大小以及侵入途径的判断中,感染方法是非常关键的。Lightner (1988)认为对健康对虾的感染实验很难成功,除非采用大菌量注射法以压倒对虾的免疫力^[7]。郑国兴等(1990)、宋春华⁽⁹⁾等分别将所分离的鳃弧菌、副溶血弧菌以浸浴法、创伤法和注射法感染对虾,均获阳性结果。创伤法和注射法致死率较为一致,浸浴法稍低。三种方法中对虾感染死亡的时间为浸浴法>创伤法>注射法。以浸浴法实验周期最长。我们所分离的普通变形菌以浸浴法对形体完整的养成期对虾无侵染力,但对因机械损伤、蜕皮等原因造成的触角、额角折断,甲壳有划痕损伤等形体不完美的对虾有一定致病力。用注射感染获得阳性结果。

目前,对虾的病原菌感染实验尚缺乏统一的标准,如实验对虾密度、感染前预养情况、实验用水的处理、通气条件、实验过程中的对虾喂养问题以及病原菌的培养条件、培养状态、细菌数量等。有时虽然使用同一种方法,但是细菌数量相差较大也会得出不同结论。如国丽萍⁽⁶⁾用不同浓度的 *Aeromonas sobria* 菌悬液注射感染对虾,当注射量为 1.05×10^7 细胞/尾虾时,实验虾一天内全部死亡,若注射量为 $1.05 \times 10^{4-5}$ 细胞/尾虾,第三天才出现死亡,至第六天死亡率仅为 20—40%;类似情况还有创伤感染实验中,对虾与细菌的接触时间等。解决好这些问题对于准确地判断分离菌株的致病性及其强弱,揭示病原菌侵染途径及致病机理,提高对虾细菌性病害的防治效果都是非常必要的。

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(京)。
- [2] 麦克法丁, J. E. (林万明译),1985。医学细菌生化试验鉴定手册。94—100,人民卫生出版社(京)。
- [3] 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。
- [4] Austin, B. & D. A. Austin, 1987. *Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish*. 196—224. Ellis Horwood Ltd, Halsted Press, Chichester.
- [5] Furniss, A. L. et al., 1978. *The Vibrrios*. Public Health Laboratory Service Monograph Series No. 11, Her Majesty's Stationary Office, London.
- [6] Grimes, D. J. et al., 1986. *Vibrrios as autochthonous flora of neritic sharks*. System. Appl. Microbiol.

(6) 国丽萍,1991。一种由气单胞菌 *Aeromonas sobria* 引起的越冬亲虾菌血病的研究。青岛海洋大学水产学院。

- 6: 221-226.
- [7] Lightner, D. V., 1988. Vibrio disease of penaeid shrimp. In: *Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture*. (eds. by Sindermann C. J. & D. V. Lightner), 42-47, Elsevier, Amsterdam.
- [8] Penner J. L., 1984. Genus *Proteus*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. 491-494, (ed. By J. G. Holt), Williams & Wilkins, Baltimore.
- [9] Sanders, J. L., et al., 1988. Bacteria of fish. In: *Method in Aquatic Bacteriology*, 115-142, (ed. by B. Austin), John Wiley & Sons, Chichester.
- [10] Shotts, E. B. et al., 1989. Bacterial pathogens of aquatic vertebrates. In: *Methods for the Microbiological Examination of Fish and Shellfish*. (ed. by B. & D. A. Austin), 164-186, Ellis Horwood Ltd., Chichester.
- [11] West, P. A. et al., 1984. Identification and classification of Vibrionaceae—An overview. In: *Vibrio in the environment*. 285-368, (ed. by R. R. Colwell), John Wiley & Sons Inc. New York.

PROTEUS VULGARIS: A NEW PATHOGEN IN PENAEUS ORIENTALIS

Xu Bing, Ji Weishang and Xu Huaishu

(Ocean University of Qingdao, 266003)

ABSTRACT During September 1989, an epizootic disease occurred in shrimp farms of Shangma Town, Laoshan, Shandong province. The disease was described as red leg disease, characterized by an expansion of chromatophores on the pereopods and pleopods, giving these appendages a reddish coloration, yellow pigmentation on the branchial region of cephalothorax and swimming activity reducing. The hemolymph drew from moribund shrimp was thin, turbid and unclottable. Two strains of bacteria were isolated from hemolymph of moribund shrimps. Challenge experiments showed that these isolates were some of the pathogens of the disease. The isolates were tested for 63 unit characters and classified as *Proteus vulgaris* Hauser. The bacteria were Gram negative short rods with peritrichous flagella. Organic growth factors required. Swarming growth developed on the surface of solid media. Growth occurred at 4°C to 42°C, and in 0% to 10% (w/v) sodium chloride. Catalase, indole, H₂S and phenylalanine deaminase were produced. Oxidase, β-galactosidase, arginine dihydrolase, lysine and ornithine decarboxylase were not produced. A positive result was recorded for methyl red test but not for Voges Proskauer reaction. Gelatin and lecithin were degraded, Nitrate was reduced. The bacteria produced gas from glucose, and acid from glucose, sucrose and salicin, but not from arabinose, cellobiose, mannitol, mannose, lactose, raffinose and rhamnose. *P. vulgaris* was first reported as the causative agent of shrimp disease.

KEYWORDS *Penaeus orientalis*, opportunistic pathogen, *Proteus vulgaris*, red leg disease, septicemia