

# 中国对虾败血病原菌(气单胞菌) 的致病性与生物学性状

樊海平 孟庆显 俞开康

(青岛海洋大学, 266003)

**提 要** 本文从患败血病的中国对虾的血淋巴中分离到嗜水气单胞菌和豚鼠气单胞菌, 经人工感染试验证实为此败血病的病原菌。两种病原菌均为革兰氏阴性、极生单鞭毛能运动的短杆菌, 在 TCBS 上不生长, 对 O/129 不敏感, 在不含 NaCl 的基础培养基上能生长。氧化酶、过氧化氢酶阳性, 利用蔗糖、麦芽糖和淀粉产酸不产气, 利用果糖、甘露醇、半乳糖和密二糖产酸产气, 不发酵乳糖、肌醇、山梨醇、木糖、草糖等, 精氨酸双水解、色氨酸脱氨阳性。嗜水气单胞菌发酵葡萄糖产气、V-P 反应、柠檬酸盐利用、 $H_2S$  产生均为阳性; 而豚鼠气单胞菌的上述反应均为阴性。

**关键词** 中国对虾, 败血病, 嗜水气单胞菌, 豚鼠气单胞菌, 致病性, 生物学性状

在中国对虾养成期间, 细菌性疾病是危害最为严重的疾病。中国对虾在养成期的细菌病主要有以下几种: 由副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 引起的红腿病[孟庆显, 1991]; 由非 01 群霍乱弧菌 (*V. cholerae* non-01) 引起的烂眼病[郑国兴, 1986]; 由毛霉亮发菌 (*Leucothrix mucor*) 和硫丝菌 (*Thiothrix* sp.) 引起的丝状细菌病[孟庆显, 1991]; 由海弧菌 (*V. pelagius*) 和溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*) 引起的黑鳃、褐斑综合症(杨秀芳等, 1991)。气单胞菌广泛分布于淡水、污水、河口及海洋中, 为养殖环境中固有的微生物菌群, 在鱼类疾病研究中发现它们能引起多种鱼类的疾病, 而它们对虾类的致病性, 国外报道了溶藻弧菌与鳃弧菌 (*V. anguillarum*) 和气单胞菌 (*Aeromonas* spp.) 的合并感染导致美国海岸养殖褐对虾 (*Penaeus aztecus*)、白对虾 (*P. setiferus*) 的杂症[Sindeman, 1988], 国内国丽萍 (1991) 研究过由 *A. sobria* 引起的越冬亲虾的菌血病。本文对由嗜水气单胞菌 (*A. hydrophila*) 和豚鼠气单胞菌 (*A. caviae*) 引起的养成期中国对虾败血病的病原菌的致病性和生物学性状进行了研究。

## 一、材料和方法

**1. 试验用病虾的来源** 1992 年黄岛水产增殖站养虾场的养殖对虾在 7 月上旬发生败血病, 在短时期内大批死亡, 青岛海洋大学太平角试验场从黄岛水产增殖站买回的对虾

收稿日期: 1993—06—11。

(1) 杨季芳等, 1991。中国对虾养成期细菌性黑鳃、褐斑综合症的病原生物学研究。海水养殖病害防治技术资料汇编, 34—42。

(2) 国丽萍, 1991。一种由气单胞菌 *A. sobria* 引起的越冬亲虾菌血病的研究。青岛海洋大学硕士学位论文。

在暂养期间亦发生败血病而大批死亡。病虾体长 8—10cm, 主要外部症状为体色加深, 肢鳃和鳃盖内膜上有黑色斑块, 鳃局部或全部坏死发黑, 消化道内一般有食物。显微镜检查发现鳃丝水肿、腐烂或坏死发黑, 血淋巴凝固速度慢, 鳃和血淋巴内有活动细菌。取上述两种来源的病虾各 5 尾进行细菌分离。

**2. 细菌的分离** 先用无菌海水冲洗病虾体表三遍, 再用 70% 的酒精棉球反复擦洗头胸甲的心区及附近位置, 彻底清除表面污物后, 用灭菌的接种针从头胸部和腹部交界的关节处进行心脏穿刺, 将穿刺物在 2216E 平板培养基上划线, 于 25°C 培养 48 小时后, 选取形态、色泽一致占优势的菌落重复划线分纯, 然后将纯菌种转接至斜面培养基上保存, 供试验用。

**3. 人工感染试验** 置健康虾(体长 8—10cm)于 18m<sup>3</sup> 的水泥池中, 按日投饵量为虾体重的 10% 投饲饵料, 连续充气暂养 3 天。稳定后的虾于 0.6m<sup>3</sup> 的玻璃缸中进行感染试验, 每缸放水约 0.4m<sup>3</sup>, 缸上盖网片以防虾跳出。每缸为一组, 每组放虾 6 尾。水温 20—24°C, pH 8.0—8.5, 盐度为 30% 左右, 每天换全部水一次, 连续充气, 每天观察记录死亡虾数并及时清除死虾。注射感染、创伤感染、浸浴感染、重复感染的虾不投饵培养 7 天, 投饲感染虾培养 9 天。所用菌均为于斜面培养基上培养 24 小时后, 用无菌生理盐水洗脱, 稀释至所需浓度的菌悬液。

(1) 注射感染 用 70% 酒精棉球在虾第二、三腹节连接处偏侧部擦洗三遍后, 用灭菌注射器将不同浓度的菌悬液对虾体分别进行肌肉注射, 每尾虾注射 0.1ml, 对照组注射 0.1ml 的无菌生理盐水。

(2) 创伤感染 用消毒剪剪去一组虾的一角尾扇, 另一组剪去 1—2 片鳃丝, 试验虾放入玻璃缸中, 加菌液制成所需浓度, 浸浴 12 小时后, 将虾移至清洁海水中培养。对照组不加菌液。

(3) 浸浴感染 将菌液加到玻璃缸中制成所需浓度, 对照组不加菌液。放入试验虾 24 小时后, 将虾移至清洁海水培养。

(4) 病原菌重复分离与感染 用无菌接种针对注射感染后出现典型症状的病虾进行心脏穿刺分离细菌, 纯化后的菌种用同注射感染相同的方法对健康虾进行重复感染试验。

(5) 投饲感染 用无菌生理盐水洗脱培养 24 小时的病原菌, 每 1ml 菌悬液(含菌量为 10<sup>10</sup> 个/ml 左右)与 2g 饵料均匀混合, 静止吸附 10 分钟后投饲, 每缸每次 1g, 每天投饲 2 次, 并及时吸去残饵, 对照组用未混有菌的饵料投饲。

**4. 病原菌生物学性状的测定** 病原菌生物学性状的测定按照中国科学院微生物所细菌分类组[1978]、山东海洋学院(1987)和菲利浦, G. [1989 中译本]进行, 根据 Krieg 和 Holt [1984]的分类法鉴定至种。

(9) 山东海洋学院, 1987。水产微生物学实验指导, 5—127。青岛海洋大学水产系。

## 二、结 果

### (一) 人工感染试验

人工感染试验结果列于表1—5。由表1可以看出对9201菌,当菌液浓度为 $4.8 \times 10^8$ 个/ml时,第1天便全部死亡,死亡虾均表现为黑鳃症状;当菌液浓度为 $4.8 \times 10^7$ 个/ml和 $4.8 \times 10^6$ 个/ml时,死亡率分别为83.3%和66.7%,而且随菌液浓度的降低,其黑鳃症状表现率亦降低。对9211菌,当菌液浓度为 $4.8 \times 10^8$ 个/ml时,死亡率为100%,黑鳃症状表现率为83.3%;当菌液浓度为 $3.2 \times 10^7$ , $3.2 \times 10^6$ 和 $3.2 \times 10^5$ 个/ml时,死亡率分别为83.3%,50%和16.7%,黑鳃症状表现率亦随菌液浓度的降低而降低。上述两种菌的注射感染试验,随菌液浓度的降低,感染虾死亡时间拖后并延长。由表2(1组为尾扇创伤;2组为鳃创伤)可以看出,由鳃创伤感染率高,黑鳃症状表现明显;由尾扇创伤感染率低,感染虾不表现黑鳃症状,显微镜检查感染虾血淋巴中有活动细菌。由浸浴感染结果(表3)可以看出,当水中菌达一定值时,能使部分虾在短时间内受感染,但死亡虾和尾扇

表1 分离菌株肌肉注射法感染中国对虾的观察

Table 1 Observations of *P. chinensis* challenged with the bacterial isolates by intramuscular injection

菌种	组别	菌液浓度 (个/ml)	对虾经过的天数及死亡数							死亡虾 试验虾	黑鳃虾 死亡虾	死亡率 (%)	黑鳃症状 表现率 (%)
			1	2	3	4	5	6	7				
9201菌	1	$4.8 \times 10^8$	6	0	0	0	0	0	0	6/6	6/6	100	100
	2	$4.8 \times 10^7$	2+1	1	1	0	0	0	0	5/6	4/5	83.3	80
	3	$4.8 \times 10^6$	1	0	0	1	1	1	0	4/6	3/4	66.7	75
9211菌	1	$3.2 \times 10^8$	4+1	1	0	0	0	0	0	6/6	5/6	100	83.3
	2	$3.2 \times 10^7$	2	0	1	0	1	1	0	5/6	5/5	83.3	100
	3	$3.2 \times 10^6$	1	1	0	1	0	0	0	3/6	2/3	50	66.8
	4	$3.2 \times 10^5$	1	0	0	0	0	0	0	1/6	0/1	16.7	0
对 照	0.85%生理盐水	1	0	0	0	0	0	0	1/6	0/1	16.7	0	

注: 本文表中对虾尾数印刷成黑体者,表示病虾有黑鳃症状。

表2 分离菌株浸浴法感染中国对虾的观察

Table 2 Observations of *P. chinensis* challenged with the bacterial isolates by wounding

菌种	组别	菌液浓度 (个/ml)	对虾经过的天数及死亡数							死亡虾 试验虾	黑鳃虾 死亡虾	死亡率 (%)	黑鳃症状 表现率 (%)
			1	2	3	4	5	6	7				
9201	1	$5.6 \times 10^8$	1	0	0	0	0	0	0	1/6	0/1	16.7	0
	2	$5.6 \times 10^8$	0	0	1	0	1	0	0	2/6	2/2	33.3	100
9211	1	$4.7 \times 10^9$	0	0	1	0	0	0	0	1/6	0/1	16.7	0
	2	$4.7 \times 10^9$	0	1	1	0	0	1	0	3/6	3/3	50	100
对 照		0	0	0	0	0	0	0	0	0/6	0/0	—	—

创伤感染一样,均没有表现黑鳃症状,而且用浸浴 24 小时的感染方法所得的感染率较低,均为 16.7%。对注射感染后具有典型症状的虾心脏穿刺分离细菌,得到与感染菌株形态相同的菌种,用它们进行重复感染试验结果显示(表 5)当菌液浓度达  $10^8$  个/ml 时,试验虾死亡率为 100%,且均有黑鳃症状显示,随着菌液浓度降低,试验虾死亡率降低而黑鳃症状表现并没降低。投喂感染试验在投喂 5—6 天便出现死亡,死虾均出现黑鳃症状,试

表 3 分离菌株浸浴感染中国对虾的观察

Table 3 Observations of *P. chinensis* challenged with the bacterial isolates by immersion

菌种	菌液浓度 (个/ml)	对虾经过的天数及死亡数							死亡虾 试验虾	黑鳃虾 死亡虾	死亡率 (%)	黑鳃症状 表现率 (%)
		1	2	3	4	5	6	7				
9201	$5.6 \times 10^8$	0	0	1	0	0	0	0	1/6	0/1	16.7	0
9211	$4.7 \times 10^8$	0	0	0	0	1	0	0	1/6	0/1	16.7	0
对照	清洁海水	0	0	0	0	0	0	0	0/6	0/0	—	—

表 4 重复分离菌株肌肉注射法感染中国对虾的观察

Table 4 Observations of *P. chinensis* challenged with the re-isolated bacteria by intramuscular injection

菌种	组别	菌液浓度 (个/ml)	对虾经过的天数及死亡数							死亡虾 试验虾	黑鳃虾 死亡虾	死亡率 (%)	黑鳃症状 表现率 (%)
			1	2	3	4	5	6	7				
92011	1	$2.3 \times 10^8$	4	0	1	1	0	0	0	6/6	6/6	100	100
	2	$2.3 \times 10^7$	1	1	1	0	0	0	0	3/6	3/3	50	100
	3	$2.3 \times 10^6$	1	0	0	1	0	0	0	2/6	2/2	33.3	100
92111	1	$2.7 \times 10^8$	1	1	2	0	0	0	0	4/6	3/4	66.7	75
	2	$2.7 \times 10^7$	0	1	3	0	0	0	0	5/6	5/5	83.3	100
	3	$2.7 \times 10^6$	0	3+1	1	1	0	0	0	6/6	5/6	100	83.3
对照		生理盐水	0	0	0	0	0	0	0	0/6	0/0	—	—

表 5 分离菌株投喂感染中国对虾的观察

Table 5 Observations of *P. chinensis* challenged with the bacterial isolates by feeding

菌种	对虾经过的天数及死亡数								死亡虾 试验虾	黑鳃虾 死亡虾	死亡率 (%)	黑鳃症状 表现率 (%)
	3	4	5	6	7	8	9					
9201	0	0	0	3	1	0	0	0	4/6	4/4	66.7	100
9211	0	0	1	0	0	2	1	0	4/6	4/4	66.7	100
对照	0	0	0	0	0	0	0	0	0/6	0/0	—	—

验结束时累积死亡率为 66.7%。

## (二) 病原菌的生物学性状

对 9201、9211 菌株及注射感染后自病虾重新分离出的 92011 和 92111 菌株进行了形态及生理、生化特征测定。9201 和 92011 菌株与文献中对嗜水气单胞菌描述一致；9211 和 92111 菌株与文献中对豚鼠气单胞菌描述一致。9201 和 92011 菌在 2216E 平板培养基上 24 小时形成单个边缘整齐、半透明圆形直径为 1.0mm 左右的菌落，菌落中心略凸、表面湿润、质地粘稠、稍有异味。9211 和 92111 菌在 2216E 平板培养基上除为乳白色菌落和粘稠度不如前两株菌外，其余特征一致。四株菌均为革兰氏阴性，极生单鞭毛、能运动的短杆菌，9201 和 92011 菌大小平均为  $0.8-1.2 \times 0.5-0.8\mu\text{m}$ ，9211 和 92111 菌大小平均为  $1.0-1.6 \times 0.5-0.8\mu\text{m}$ 。四株菌均对 O/129 不敏感，氧化酶、过氧化氢酶阳性，发酵果糖、甘露醇、半乳糖、密二糖产气，发酵蔗糖、麦芽糖、淀粉不产气，不发酵乳糖、肌醇、山梨糖、木糖、卫矛糖和蕈糖等，具脂酶、明胶酶、淀粉酶，无脲酶、纤维素水解酶、几丁质酶，能还原硝酸盐，果聚糖产生、水解果胶、葡萄糖酸盐氧化、色氨酸脱氨阴性，精氨酸双水解、吡啶试验阳性。9201 和 92011 菌发酵葡萄糖产气，V-P 反应、柠檬酸盐利用、 $\text{H}_2\text{S}$  产生、凝固酶、酪蛋白酶反应阳性，石蕊牛奶反应为酸反应；而 9211 和 92111 菌发酵葡萄糖不产气，V-P 反应、柠檬酸盐利用、 $\text{H}_2\text{S}$  产生、凝固酶、酪蛋白酶反应为阴性，石蕊和 92011 定名牛奶反应为碱反应。详细特性列于表 6 和表 7。

根据病原菌的形态及生理、生化特性，对照 Krieg 和 Holt [1984] 的结论将 9201 为嗜水气单胞菌，9211 和 92111 菌定名为豚鼠气单胞菌。

表 6 分离菌株对糖类的发酵试验

Table 6 Carbohydrate fermentation tests of the bacterial isolates

糖 类	菌 株		糖 类	菌 株	
	9201和92011	9211和92111		9201和92011	9211和92111
葡萄糖	⊕	+	鼠李糖	-	-
蔗 糖	+	+	密二糖	⊕	⊕
乳 糖	-	-	蕈 糖	-	-
麦芽糖	+	+	山梨糖	-	-
果 糖	⊕	⊕	1-树胶醛糖	-	-
淀 粉	+	+	棉子糖	-	-
肌 醇	-	-	木 糖	-	-
甘露醇	⊕	⊕	山梨醇	-	-
半乳糖	⊕	⊕	卫矛糖	-	-

注：⊕表示产酸产气。

表 7 分离菌株的特性  
Table 7 Characteristics of isolated bacteria

测定项目	菌 株		测定项目	菌 株	
	9201和92011	9211和92111		9201和92011	9211和92111
在 TCBS 上生长	-	-	丙二酸盐利用	+	+
运动性	+	+	过氧化氢酶	+	+
极生单鞭毛	+	+	氧化酶	+	+
革兰氏染色	-	-	淀粉酶	+	+
水溶性色素	-	-	脲 酶	-	-
无 NaCl 胨水生长	+	+	卵磷脂酶	+	+
3%NaCl 胨水生长	+	+	明胶酶	+	+
6%NaCl 胨水生长	+	+	脂 酶	+	+
7%NaCl 胨水生长	+	+	几丁质酶	-	-
8%NaCl 胨水生长	+	+	凝固酶	+	-
10%NaCl 胨水生长	-	-	酪蛋白酶	+	-
4℃生长	+	+	葡萄糖产酸	+	+
37℃生长	+	+	葡萄糖产气	+	-
42℃生长	+	+	柠檬酸盐利用	+	-
O/129 敏感性(10μg)	-	-	葡萄糖酸盐氧化	-	-
O/129 敏感性(150μg)	-	-	TSI	发酵蔗糖	发酵蔗糖
硝酸盐还原	+	+	石蕊牛奶反应	碱反应	碱反应
纤维素水解	-	-	苯丙氨酸脱氨	-	-
H <sub>2</sub> S 产生	+	-	精氨酸脱羧	+	-
V-P 反应	+	-	精氨酸双水解	+	+
甲基红反应	+	+	色氨酸脱氨	-	-
果聚糖产生	-	-	鸟氨酸脱羧	-	-
水解果胶	-	-	赖氨酸脱羧	+	-
明胶反应	+	+			

### 三、讨 论

1. 病原菌的传播途径 通过人工感染试验及病虾的病理组织学的研究(将另文发表),我们认为此两种病原菌主要经口传播,另外经体表创伤处或体表亦能入侵虾体。在发病的养虾池中,患此败血病病虾的尸体很难找见,而且在一周内全池虾数量迅速减少,说明死虾的尸体大多被健康虾摄食,经此途径把细菌传播给健康虾,从而使疾病在全池迅速蔓延。引起此败血病的最初原因可能与池塘的环境条件及虾体质有关。1992年6、7月份,北方少雨,养殖水体盐度升高,适于此两种菌的繁殖,使池水中含菌数增加,增加了对虾体的感染机会,在高盐条件下,虾体质减弱,鳃易受损伤,给这两种菌创造了入侵虾体的机会,部分虾被感染死亡后,尸体被健康虾摄食,细菌在对虾间迅速传播。

2. 黑鳃症状 本文中病虾有些表现有黑鳃症状,但它与对虾黑鳃病有本质区别。引起对虾黑鳃病的病因有多种,水质污染(重金属、酸、氨、亚硝酸盐等)[Anderson 和 Shariff, 1988]、食物中长期缺乏维生素 C、污浊生物附着(丝状细菌、固着类纤毛虫等)、镰刀菌等均能引起黑鳃病使对虾死亡。本文人工感染试验中,有些虾受细菌感染死亡,但并

没有显示黑鳃症状,病理组织观察亦发现引起虾死亡的原因是细菌性败血,对虾内脏器官受到损伤虾死亡,所以黑鳃只是本败血病的可能外部症状之一,而并不是真正的黑鳃病。

青岛海洋大学陈世阳教授、徐怀恕教授,中国科学院海洋研究所陈驷研究员,青岛医学院周惠民教授对本文提出修改意见,在此深表感谢。

### 参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物所细菌分类组,1978。一般细菌常用鉴定方法,111—198。科学出版社(京)。
- [2] 孟庆显,1991。对虾疾病防治手册,80—137。青岛海洋大学出版社。
- [3] 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—202。
- [4] 菲利浦,G。(厦门大学生物学系微生物学教研室译),1989。普通细菌学方法手册,507—552。厦门大学出版社。
- [5] Anderson, I. G. and M. Shariff, 1988. Pathological changes in the tiger prawn *Penaeus monodon* fabrienicus associated with cultured in brackish water ponds developed from potentially acid sulphate soils. *J. of Fish Disease*, 11: 113—123.
- [6] Krieg, N. R. and J. G. Holt, 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 9th ed. 545—548. *Williams Wilkins*, Baltimore.
- [7] Sinderman C. J. and D. V. Lightner, 1977. *Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture*, 80—86. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam—Oxford—New York.

## THE PATHOGENICITIES AND BIOLOGIC CHARACTERISTICS OF THE PATHOGENS (*AEROMONAS* SPP.) CAUSED THE SEPTICEMIA OF *PENAEUS CHINENSIS*

Fan Haiping, Meng Qingxian and Yu Kaikang

(Ocean University of Qingdao, 266003)

**ABSTRACT** This paper describes an epizootic septicemia of *Penaeus chinensis* infected by *Aeromonas hydrophila* and *A. caviae*. The bacteria were gram negative, short rods with a single polar flagellum, resistant to O/129, no salt requirement, not growth on TCBS, oxidase and catalase positive. Gas was produced from fructose, mannitol, galactose and melibiose, but not from sucrose, maltose and starch. The bacteria did not ferment lactose, inositol, sorbitol, xylose and trehalose dighdrate, arginine dighdrolase and tryptophan deaminase positive. Production gas from glucose, V-P reaction, citrate utilization and sulfide production were all positive for *A. hydrophila* but not for *A. caviae*.

**KEYWORDS** *Penaeus chinensis*, septicemia, *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, pathogenicity, biologic characteristics