

一种新的中国对虾弧菌病原菌 ——产气弧菌^{*}

战文斌 周 丽 俞开康 陈章群 孟庆显

(青岛海洋大学水产学院, 青岛 266003)

提要 于1993年8月,从山东省昌邑县下营镇患败血病的中国对虾血淋巴内分离到多株细菌,其中2株人工感染证实为病原菌;经50多项形态、生理、生化特性测试鉴定为产气弧菌 *Vibrio gazogenes*,其主要特性为:革兰氏阴性,弧状,极生单鞭毛,产生红色素,氧化酶呈阳性,精氨酸双水解酶、赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶均为阴性,淀粉酶、明胶酶为阳性,硝酸盐还原阴性,利用木糖、水杨苷、山梨醇发酵葡萄糖产气,利用柠檬酸盐为阳性。生长最适温度在25—30℃,最适NaCl在1.0%—2.0%(W/V),最适pH在7.5—8.5。对柱晶白霉素、先锋霉素5号、新生霉素、四环素、洁霉素、羧苄青霉素、麦迪霉素等极为敏感。产气弧菌引起中国对虾败血病在国内外属首次报道。

关键词 中国对虾 产气弧菌 败血病

已报道的对虾弧菌病原有非01霍乱弧菌(*Vibrio cholerae* non-01)等10种(宋春华等,1991;许兵等,1992;孟庆显,1991;郑国兴等,1986,1990;Lightner et al.,1992,1993)。本文报道的是一种新的中国对虾弧菌病原,产气弧菌(*Vibrio gazogenes*)。

1 材料和方法

1.1 病原菌的分离

在1993年7—8月份的对虾暴发性流行病的发生期间,山东省昌邑县下营镇养殖公司养殖的中国对虾(*Penaeus chinensis*)发生了严重的细菌性败血病。取濒死中国对虾6尾,先用灭菌海水将病虾体表洗净,再用70%的酒精棉球将头胸甲背部与腹部的连接处附近反复擦拭消毒,最后从关节处穿刺自围心窦取血淋巴,划线接种于2216E, TSA平板培养基上,于25℃恒温培养24h,挑取形态一致的优势菌落,进一步划线纯化,直至获得纯培养后,移入斜面保存。

1.2 病原菌人工感染试验

取体长在7—9cm的健康虾,为人工感染用虾,分若干试验组和对照组,每组10尾,养于玻璃缸中,内盛海水100L,每日换水一次,充气,投饵,采用肌肉注射、创伤后菌浴和菌浴3种方法进行人工感染试验。试验水温在26—27℃,pH在8.0—8.5,

^{*} 国家“八五”应急攻关项目,85-21-03-02号。战文斌,男,出生于1960年9月,副教授,现在日本东京水产大学。

收稿日期:1994年9月26日,接受日期:1996年5月6日。

连续观察 5—8d。试验设 2 个重复。

1.2.1 注射感染 将培养 24h 的试验菌, 用灭菌生理盐水制成 2×10^7 cell /ml 的菌悬液, 在中国对虾第三腹节处肌肉注射 0.1 ml / 尾, 对照组注射同量 0.85% 的灭菌生理盐水。

1.2.2 创伤感染 将试验虾剪掉几片鳃和 2 片侧叶, 放养在试验菌浓度为 2×10^5 cell /ml 的海水中, 对照组放养在不加菌的海水中。

1.2.3 菌浴感染 将感染虾放在试验菌浓度为 2×10^5 cell /ml 的海水中, 对照组放养在不加菌的海水中。

1.3 病原菌的分类、鉴定

1.3.1 形态学观察 分别将菌种接种于 2216E 固体平板、斜面及液体培养基上, 于 25℃ 培养 24—48h 后, 观察菌落及菌体形态。对培养 16—18h 的幼龄菌进行革兰氏染色、单染色、鞭毛染色、芽孢染色等, 并将幼龄菌经 2% 磷钨酸磷酸缓冲液 (pH=6.5) 负染, 用 H-7000 型透射电子显微镜 (TEM) 观察菌体形态。

1.3.2 生化特性测试 从自然患病虾中分离 2 株菌, 人工感染虾中分离 3 株菌, 共 5 株菌。按照《一般细菌常用鉴定方法》¹⁾ 和厦门大学生物系微生物学教研室 (1989) 制定方法, 并参考 West 等 (1984) 的方法进行。

1.3.3 生理特性测试 分别配制不同 NaCl 浓度和不同 pH 的 2216E 液体培养基, 等量分装于试管中, 灭菌后, 每管加入等量的幼龄菌悬液 (对照管加入菌悬液后, 立即加入浓盐酸将菌杀死), 于 25℃ 培养 24h, 用 721 型分光光度计 (波长 560nm) 测 O. D 值。另配制含 NaCl 15%, pH=7.6 的 2216E 液体培养基, 同上方法分装试验、灭菌及接种, 分别于 4, 10, 20, 30, 35, 40, 45℃ 静置培养 24h 后测 O. D 值。

1.3.4 药物敏感测试 本试验所用 26 种药敏纸片是由上海松江精益试剂仪器厂生产的。试验采用涂布法接种后, 将药敏纸片 (直径 6mm) 贴于培养基上, 于 25℃ 培养 48h 后测抑菌圈直径。

2 结果

2.1 人工感染试验结果

结果 (表 1) 表明, 分离菌株是中国对虾的致病菌。感染虾表现出与自然患病虾相同的症状: 体色暗红, 鳃区发黄, 游泳足微红, 体表有损伤, 体表、鳃、附肢上粘有污物, 胃内无食物, 血淋巴中有细菌, 血细胞数量明显减少, 血液不凝固, 肝胰腺萎缩, 淋巴器官肿大。

2.2 病原菌的分类鉴定结果

对 5 个菌株进行 50 多项形态及生理生化的测定, 结果见表 2。分离菌主要特性为弧状, 极生单鞭毛 (图 1), 革兰氏阴性, 无泳动现象, 不发光, 产生红色素, 氧化酶显阴性, 精氨酸双水解酶、赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶均为阴性, 淀粉酶、明胶酶为阳性, 硝酸盐还原为阴性, 利用木糖、水杨苷、山梨醇发酵葡萄糖产酸产气, 柠檬酸盐利用为阳性。分离菌株的生长最适温度范围为 25—30℃, 最适 NaCl 范围为 1.0%—2.0%,

1) 中国科学院微生物研究所细菌分类组, 1987, 一般细菌常用鉴定方法。

最适 pH 范围为 7.5—8.5。

表 1 肌肉注射感染、创伤感染、菌浴感染试验结果

Tab.1 Results of infection test by intramuscular injection, wounding, dipping in *Penaeus chinensis*

菌株号	细菌数量 (cell/尾)	试验虾数 (尾)	死亡虾数(尾)								死亡数 / 试验数
			1	2	3	4	5	6	7	8	
肌肉注射感染	93703	2×10^8	10	2	1	3	4				10 / 10
	93708	2×10^8	10	1	1	4	3	1			10 / 10
	对照	0	10	0	0	0	0	0			0 / 10
创伤感染	93703	2×10^8	10	0	1	0	2	2	4	1	10 / 10
	93708	2×10^8	10	0	0	2	1	4	3	0	10 / 10
	对照	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0 / 10
菌浴感染	93703	2×10^8	10	0	0	0	1	0	1	2	6 / 10
	93708	2×10^8	10	0	0	0	1	1	0	3	7 / 10
	对照	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0 / 10

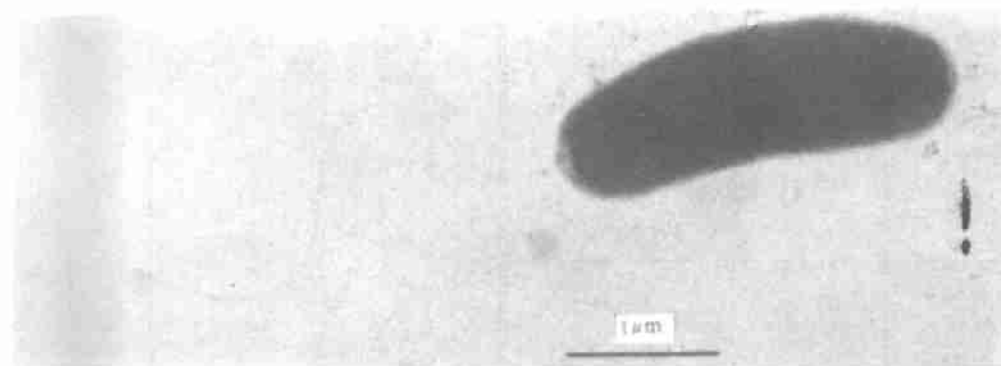


图 1 从败血病中国对虾分离出的产气弧菌的透射电镜照片(负染)($\times 20\,000$)

Fig.1 Electron micrograph of *Vibrio gazogenes* isolated from septicaemic *Penaeus chinensis* (Negative staining, $\times 20\,000$) (by TEM)

2.3 药物敏感试验结果

分离菌株对 26 种药敏感试验结果见表 3, 其中对柱晶白霉素、先锋霉素 5 号、新生霉素、四环素、洁霉素、羧苄青霉素、麦迪霉素等极为敏感。

3 讨论与结语

产气弧菌过去称为产气贝内克氏菌(*Beneckea gazogenes*)(West et al., 1984), 伯杰细菌鉴定手册(第 8 版)(中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组, 1984)将

表 2 分离菌株的特性

Tab.2 Characteristics isolated bacteria from septicæmic *Penaeus chinensis*

鉴定项目	分离菌株特性	产气弧菌特性 ¹⁾	鉴定项目	分离菌株特性	产气弧菌特性 ¹⁾
形态			柠檬酸盐利用	+	+
形态	弧状	弧状	硝酸盐还原	-	-
大小(μm)	2.7×0.9	1.4— 2.6×0.5— 0.8	葡萄糖产气	+	+
单极毛	+	+	H ₂ S 产生	+	NR
革兰氏染色	-	-	吡噪反应	+	NR
芽孢染色	-	-	甲基红反应	+	NR
运动性	+	+	VP 反应	-	(-)
红色素	+	+	0 /129 10μg	-	(+)
培养			150μg	+	(+)
TCBS 生长	黄色	NR ²⁾	利用: 木糖	+	+
0%NaCl 胨水	+	(-) ³⁾	阿拉伯糖	+	+
3%NaCl 胨水	+	(+)	甘露糖	+	+
6%NaCl 胨水	+	(+)	半乳糖	+	+
8%NaCl 胨水	+	(-)	蔗糖	+	+
10%NaCl 胨水	-	(-)	草糖	-	NR
4℃ 生长	-	-	纤维二糖	+	+
20℃ 生长	+	+	密二糖	+	NR
30℃ 生长	+	+	乳糖	-	-
35℃ 生长	+	+	葡萄糖	+	+
40℃ 生长	+	+	果糖	+	+
45℃ 生长	-	-	麦芽糖	+	+
泳动现象	-	-	棉子糖	+	NR
发光现象	-	-	鼠李糖	+	-
生化			水杨苷	+	+
氧化酶	-	-	山梨醇	+	+
过氧化氢酶	+	NR	肌醇	+	-
淀粉酶	+	+	乙醇	-	-
明胶酶	+	+	丙氨酸	-	-
脂肪酶	-	+	谷氨酸	+	+
藻胶酶	-	-	亮氨酸	-	-
几丁质酶	-	-	半胱氨酸	-	NR
精氨酸双水解酶	-	-	胱氨酸	-	NR
赖氨酸脱羧酶	-	(-)	天门冬氨酸	+	NR
鸟氨酸脱羧酶	-	(-)			

1) 伯杰细菌鉴定手册(第9版)中对产气弧菌的描述; 2) 伯杰细菌鉴定手册(第9版)中没有记载; 3) 伯杰细菌鉴定手册(第9版)中没有记载, (1) — (3)均引自 Baumann 等(1984)和 West 等(1984)对产气弧菌的描述。+为阳性;-为阴性。

表3 分离菌株的药物敏感试验结果

Tab.3 Sensitivity isolated bacteria from septicæmic *Penaeus chinensis*
to 26 chemotherapeutants

药 品	抑菌圈直径 (mm)	药 品	抑菌圈直径 (mm)
丁胺卡那霉素	16	新霉素	17
庆大霉素	16	羧苄青霉素	26
链霉素	15	先锋霉素 I	0
青霉素 G	0	先锋霉素 4 号	0
妥布霉素	12	洁霉素	26
氯霉素	20	先锋霉素 6 号	10
呋喃妥因	0	苯唑青霉素	0
新生霉素	29	麦迪霉素	25
多粘素 B	10	氟哌酸	0
四环素	27	氨苄青霉素	0
SMZ+TMP	0	卡那霉素	12
痢特灵	20	先锋霉素 5 号	34
红霉素	15	柱晶白霉素	35

Beneckea 属附在 *Vibrio* 属内, 在第 8 版中弧菌属只记载了 5 种, 而在第 9 版中(Baumann et al., 1984) 记载了 20 种, 产气弧菌在这 20 种弧菌中又具有特殊的特性, 表现在: (1) 产生红色素, (2) 葡萄糖产气, (3) 硝酸盐还原阴性, (4) 氧化酶阴性, (5) 利用木糖、山梨醇、水杨苷。本研究从中国对虾病体上所分离鉴定的病菌与上述结果一致, 即为产气弧菌(*V. gazogenes*)。从人工感染结果表明, 产气弧菌系中国对虾败血病的致病菌。

参 考 文 献

- 宋春华等, 1991, 齐鲁渔业, 1: 9—13.
- 许 兵等, 1992, 水产学报, 16(2): 130—136.
- 孟庆显, 1991, 对虾疾病防治手册, 青岛海洋大学出版社(青岛), 40—92.
- 郑国兴等, 1986, 水产学报, 10(2): 195—202.
- 郑国兴等, 1990, 水产学报, 14(1): 1—7.
- Buchanan, R. E., Gibbons, N. E., 1974, 中国科学院微生物研究所“伯杰细菌鉴定手册”翻译组译, 1984, 伯杰细菌鉴定手册(第 8 版), 科学出版社(北京), 474—534.
- Gerhardt, P. (ed.), 1981, 厦门大学生物系微生物教研室译, 1989, 普通细菌学方法手册, 厦门大学出版社(厦门), 1—668.
- Baumann, P. et al., 1984, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1. ed. by Holt, G. J., Williams &

- Wilkins (Baltimore), pp. 518 — 538.
- Lightner, D. V. et al., 1992, Diseases in Asian Aquaculture I, ed. by, Shariff, M. et al., Fish Health Section Asian Fisheries Society (Bali, Indonesia), pp. 57 — 80.
- Lightner, D. V., 1993, Handbook of Mariculture, Vol.1, Crustacean Aquaculture, ed. by McVey, J. P., CRC Press (Boca, Raton), pp. 393 — 486.
- West, P. A. et al., 1984, *Vibrio* in the Environment, ed. by Colwell, R. R., John Wiley & Sons Inc. (New York), pp. 285 — 363.

VIBRIO GAZOGENES*, A NEW *VIBRIO* PATHOGEN FROM SEPTICEMIA OF *PENAEUS CHINENSIS

Zhan Wenbin, Zhou Li, Yu Kaikang, Chen Zhangqun, Meng Qingxian

(College of Fisheries, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003)

Abstract After cultivation at 25 °C in 2216E agar medium, two strains of *Vibrio gazogenes* were isolated from the blood of shrimp affected by epizootic septicemia. The shrimp, *Penaeus chinensis*, were collected from Xiaying Town, Changyi County, Shandong Province in August 1993. Artificial infections by injection, dipping and feeding methods proved that these isolates were some of the pathogens of the disease. The isolates were tested for more than 50 unit characters and according to Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 9th, were classified as *Vibrio gazogenes*.

The bacteria were gram negative, curved rods, with single polar flagellum, produced red pigment. Oxidase, arginine dihydrolase, lysine and ornithine decarboxylase tests were negative. Some of the other characteristics, such as production of gas from glucose, utilization of xylose, salicin and sorbitol, negative for nitrates reduced to nitrites, citrate utilization, positive for amylase, gelatinase and lipase production, sensitivity to O / 129, were also proved.

Optimum growth temperature, pH and salinity were 25 °C to 30 °C, 7.5 to 8.5 and 1.0% to 20% sodium chloride respectively.

These isolates were highly sensitive to Leucomycin, Cefazolin, Novobiocin, Tetracycline, Carbenicillin, Lincomycin and Medemycin. This is the first reported of *V. gazogenes* as a pathogen of shrimp disease.

Key words *Penaeus chinensis* *Vibrio gazogenes* Septicemia