

文章编号: 0529-6579 (2000) S-0255-05

假单胞菌引起罗氏沼虾黄鳃、黑鳃病的研究^{*}

陶保华, 石和荣, 黄俊文, 王 刚

(广东省农业科学院兽院研究所水产中心, 广州 510640)

摘 要: 对高密度养殖条件下患细菌病的罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 作了初步研究, 病虾症状为: 食欲下降, 黄鳃或黑鳃、断须、断腿, 有的甲壳上有黄色或黑色的斑块, 取上述典型症状的病虾鳃部和肝胰腺组织进行细菌分离、纯化和保种, 经鉴定, 该病原菌为恶臭假单胞菌和铜绿假单胞菌. 将分离菌进行回接感染, 发现有很强的致病作用, 且产生与自然发病相似的症状, 从再感染的病虾体内分离的细菌经鉴定也为恶臭假单胞菌 (*P. putida*) 和铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*), 由此可认为它们是此次发病的病原菌. 药敏实验发现, 铜绿假单胞菌对环丙沙星、氟哌酸氯和庆大霉素的敏感性较强; 恶臭假单胞菌对庆大霉素、环丙沙星、卡那霉素、强力霉素和新生霉素较为敏感.

关键词: 罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*); 症状; 黄鳃或黑鳃; 病原; 恶臭假单胞菌 (*P. putida*); 铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*)

中图分类号: S945.4 文献标识码: A

细菌病是罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 养殖中的常见病害之一, 尤其在高密度的精养模式下暴发更为严重和频繁. 目前有报道认为致病细菌有弧菌、假单胞菌、气单胞菌和莫格球拟酵母等多种^[1,2], 为控制细菌病的暴发, 必须对病原的种类和生理特性有较为详细的了解. 为此, 本文对高密度养殖罗氏沼虾发生的细菌病进行了调查, 并对分离的病原菌作了鉴定及药物敏感性实验, 以便为虾的防病养殖打下基础.

1 材料与方法

1.1 细菌分离

1.1.1 病虾来源及症状 本实验所用的病虾取自珠海市斗门县罗氏沼虾养殖场. 患病虾体长在 7~10 cm 之间, 其症状为: 病虾沿虾池边缓慢游动, 摄食率下降, 鳃部变黄, 严重的虾鳃部变黑, 触须和步足烂掉, 部分病虾的甲壳上伴有黄色或黑色的斑块.

1.1.2 细菌的分离和培养 捞取上述典型症状的病虾, 擦干体表后用 75% 的酒精消毒, 分别取鳃部和肝胰腺组织于普通营养琼脂 (pH=7.2) 平板划线培养 36 h, 挑取形态、大小一致的单个菌落反复划线分离, 将纯的分离菌于斜面保存, 分别记为 DM1 和 DM2.

^{*} 基金项目: 广东省农业科学院攻关资助项目

收稿日期: 1999-09-15

1.2 分离菌的回接感染与再分离

1.2.1 回接感染实验 将上述分离菌于 $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后, 用无菌生理盐水洗下菌苔, 配成 10^8 个/mL 的菌悬液. 用无菌注射器自健康罗氏沼虾第二腹节基部作肌注感染, 注射剂量为 0.1 mL/尾, 对照组注射等量生理盐水. 同时将稀释菌液配成 10^7 个/mL 终浓度作浸泡感染, 对照组为不加菌悬液. 每个实验组用虾 10 尾, 观察实验虾的发病情况. 实验虾体长 8~10 cm, 实验用水簇箱 $100\text{ cm}\times 40\text{ cm}\times 60\text{ cm}$, 在实验前经二氯异腈脲酸钠消毒, 水深 40 cm, 水温 $27\sim 29\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7.2$. 实验期间用水 24 h 连续充气, 每日早晚各投饵 1 次, 投饵量为实验虾体质量的 3%, 每天吸污、换水, 换水量为 30%, 实验周期为 7 d.

1.2.2 细菌的再分离 从上述感染实验组中取症状明显的濒死虾, 按 1.1 中方法进行细菌的分离, 纯化和保种.

1.3 病原菌的鉴定

1.3.1 形态观察 将病原菌接种于普通营养培养基平板 ($\text{pH}=7.2$) 上 $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 观察菌落的形态特点. 同时将培养 18 h 的病原菌作革兰氏染色, 并将稀释菌液作磷钨酸负染, 于日产 JEOL 透射式电镜下观察并拍照.

1.3.2 生理生化特性测定 按文献 [3, 4] 所示方法进行测定.

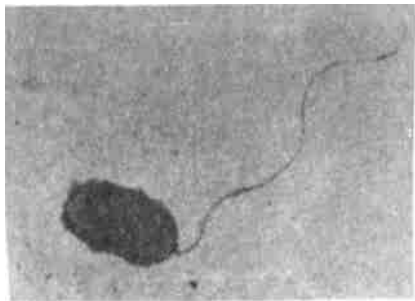
1.3.3 药敏实验 以纸片法在普通营养琼脂平板上进行药敏试验. $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 24 h, 观察抑菌圈有无与大小.

1.3.4 最低抑菌浓度 (MIC) 和最低杀菌浓度 (MBC) 的测定 按常规的倍比稀释法测定药物对实验菌株的最低抑制浓度和最低杀菌浓度. 将抗菌素原液加入含普通营养培养基的试管内, 使抗菌素浓度为 $128\text{ }\mu\text{g/mL}$, 倍比稀释至所需管数, 将培养 18 h 的实验菌液 0.1 mL 加入含一定浓度抗菌药物的培养基中, 混合均匀, 经 $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 24 h, 肉眼观察, 以能抑制细菌生长的最低浓度为 MIC, 继续培养 48 h, 以无菌生长的最低浓度为 MBC.

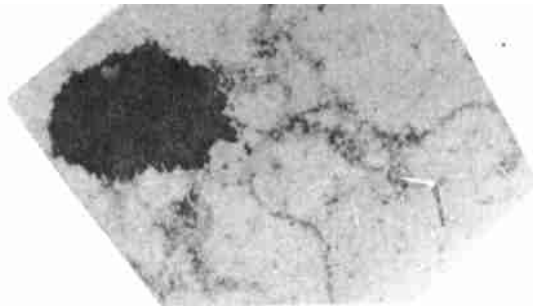
2 结 果

2.1 分离菌的特征及生理生化特性

菌株 DM1 在普通营养琼脂平板上长出圆形、微凸起、绿色半透明的潮湿菌落, 菌落大小约 $2.0\sim 3.5\text{ mm}$. 革兰氏染色阴性 (G^-), 短杆状, 无芽孢, 大小约为 $(0.5\sim 0.7)\text{ }\mu\text{m}\times (1.5\sim 2.5)\text{ }\mu\text{m}$, 菌体两端为圆弧形, 电镜下观察该菌为端生单鞭毛 (见图 1). 菌株 DM2 在普通营养琼脂平板上长出边缘整齐、圆形、扁平、白色透明的潮湿菌落. 菌落大小约 $1.0\sim 2.0\text{ mm}$. 革兰氏染色阴性 (G^-), 短杆状, 无芽孢, 大小约为 $(0.6\sim 1.0)\text{ }\mu\text{m}\times (1.5\sim 3.0)\text{ }\mu\text{m}$, 菌体两端为圆弧形, 电镜下观察该菌为端生多鞭毛 (见图 2).



1 菌株 DM1 形态的电镜照片 ($\times 8\text{ }000$)



2 菌株 DM2 形态的电镜照片 ($\times 10\text{ }000$)

DM1 和 DM2 及回接感染后的再分离菌均为革兰氏阴性短杆菌，极生单或多鞭毛，有动力，发酵葡萄糖产酸不产气，氧化酶反应阳性，不利用乳糖、阿拉伯糖、蔗糖、能利用枸橼酸盐；可还原硝酸盐（见表 1）分别参照国际细菌分类命名委员会规定，DM1 和 DM2 的鉴定结果为铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）和恶臭假单胞菌（*P. putida*）。

表 1 病原菌的形态及生化特性

测定项目	DM1	DM2	测定项目	DM1	DM2	测定项目	DM1	DM2	测定项目	DM1	DM2
特征菌落颜色	绿	乳白	ONPC 反应	—	—	精氨酸	+	+	麦芽糖	—	+
革兰氏染色	—	—	尿素分解	—	—	色氨酸	—	—	甘露糖	—	V
大小/ μm	0.5~0.7× 1.5~2.5	0.6~1.0× 1.5~3.0	H ₂ S	—	—	乙酰胺	+	—	木糖	—	+
形态特征	短杆状	短杆状	硝酸盐还原	+	—	三氯新敏感性	+	+	棉子糖	—	—
鞭毛染色	端生单鞭毛	端生多鞭毛	枸橼酸盐利用	+	+	耐受多粘菌素 B	—	—	七叶苷	—	—
芽孢染色	—	—	丙二酸盐利用	+	—	植物尿蓝母	—	—	蔗糖	—	—
溶血实验	β		硝酸盐产气	+	—	葡萄糖氧化	+	+	甘露醇	+	—
运动	+	+	阳性生长控制	+	+	葡萄糖发酵	—	—	鼠李糖	—	—
色素产生	+	+	氧化酶	+	+	阿拉伯糖	—	—	香豆醇	—	—
5℃生长	—	V	赖氨酸	—	—	肌醇	—	—	山梨醇	—	—
42℃生长	+	—	鸟氨酸	—	—	侧金盏花醇	—	—	乳糖	—	—

2.2 分离菌对罗氏沼虾的致病性

在 10⁸ CFU/mL 浓度下，DM1 菌引发健康虾发病死亡的时间在 7~10 h，24 h 内完全死亡；DM2 菌引发健康虾发病时间在 10 h，并伴有轻微黄鳃，48 h 内全部死亡；浸泡感染的均无一死亡（表 2）。感染虾患病症状与自然发病的症状基本相似：虾烦躁不安，停止摄食，鳃部变轻微黄色，严重者侧卧箱底，不久即死亡。但在整个实验过程中，所有感染均无黑鳃现象。其死亡情况见表 2。

表 2 分离菌人工感染罗氏沼虾后的感染虾数量¹⁾

组别	感染后时间										
	7 h	10 h	16 h	20 h	24 h	36 h	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d
肌注 DM1 组	1	3	5	8	10						
肌注 DM2 组	0	1	3	5	7	8	10				
肌注对照组	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
浸泡 DM1 组	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
浸泡 DM2 组	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
浸泡对照组	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

1) 各实验组加入罗氏对虾 10 尾

2.3 病原菌对药物的敏感性及 MIC、MBC 测定

2 株病原菌对药物的敏感性见表 3。由表 3 可知，在 15 种测定药物中，对 DM1 的抑圈大于 20 mm 的有 3 种，分别氯霉素、环丙沙星及氟哌酸；对 DM2 的抑菌圈大于 20 mm 的有 5 种，分别为环丙沙星、庆大霉素、卡那霉素、新生霉素及强力霉素，然后分别用它们

表 3 2 株致病菌抗药性测定结果

抗菌药物	抑菌圈大小/mm		抗菌药物	抑菌圈大小/mm	
	DM1	DM 2		DM1	DM2
氯霉素	20	18	红霉素	9	14
新生霉素	8. 5	23	卡那霉素	6	24
四环素	16	13	庆大霉素	19	38
氟哌酸	37	16	多粘菌素 B	15	18
链霉素	12	13	呋喃妥因	6	8. 5
强力霉素	9	25	呋喃唑酮	7	14
青霉素 G	6	7. 5	磺胺甲基 异恶唑	6	7
环丙沙星	38	24			

对 DM1 和 DM2 菌进行 MIC 和 MBC 测定(表 4).

表 4 试验药物对 DM1 和 DM2 的 MIC 和 MBC 测定结果 $\mu\text{g/mL}$

致病菌	项目	氟哌酸	环丙沙星	庆大霉素	氯霉素	新生霉素	卡那霉素	强力霉素
DM1	MIC	2	1	2	8			
	MBC	4	2	8	32			
DM2	MIC		2	1		8	2	4
	MBC		8	4		32	16	16

由表 4 DM1 栏可知,不同药物的 MIC 与 MBC 相差较大,环丙沙星对 DM1 的 MIC 为 1 $\mu\text{g/mL}$,为所用试验药物的最低值,氯霉素对该菌的 MIC 为 8 $\mu\text{g/mL}$,为所用试验药物的最高值.由此可以看出,药物的抗菌能力大小依次是环丙沙星、氟哌酸、庆大霉素、氯霉素,除氯霉素外,均匀药敏实验的结果一致.

由表 4DM2 栏可知,庆大霉素对 DM2 的 MIC 为 1 $\mu\text{g/mL}$;为所用试验的最低值,新生霉素对该菌的 MIC 为 8 $\mu\text{g/mL}$,为所用试验药物的最高值.由此可以看出,药物对恶臭假单胞菌的抗病能力大小依次是庆大霉素、环丙沙星、卡那霉素、强力霉素、新生霉素,这与药敏实验的结果一致.

3 讨 论

1999 年 6~9 月,斗门县不少虾塘发生细菌病,其症状为黄鳃或黑鳃、断须、断腿,有的甲壳上有黄色或黑色的斑块.从病虾体内分离出的细菌经形态和生理生化鉴定为恶臭假单胞菌和铜绿假单胞菌.回归感染后的病虾出现了与自然发病相同的症状,且回归感染后的再分离菌经生理生化鉴定也为恶臭假单胞菌和铜绿假单胞菌,从而证实了恶臭假单胞菌和铜绿假单胞菌为此次发病的病原菌.

恶臭假单胞菌和铜绿假单胞菌广泛存在于水体和土壤中,被认为是一种条件致病菌^[3].在虾类,已有报道由该菌引起的虾类细菌病^[3].在人体中,铜绿假单胞菌可引起创伤感染、菌血症、肺炎、尿道感染和骨髓炎等;恶臭假单胞菌有自血液、伤口、胆汁、尿、痰中分离的报道,致成骨髓炎^[6],故应引起足够重视.

本实验通过药敏实验和 MIC 及 MBC 的测定发现,各种抗菌药物对 2 种病原菌的杀灭效

果以环丙沙星、氟哌酸和庆大霉素对铜绿假单胞菌较好; 而恶臭假单胞菌则对庆大霉素、卡那霉素、强力霉素、环丙沙星和氟哌酸较为敏感. 因此, 庆大霉素、环丙沙星和氟哌酸可作为这 2 种细菌防治的有效药物.

在罗氏沼虾的育苗和养殖过程中, 在发病季节的虾池水中经常可监测到大量的细菌^[7], 当养殖环境不利, 如养殖密度过高换水不畅等会使水体残饵及代谢废物大量聚集, 不仅给水体中细菌的生长提供了极好的营养条件, 还会激发潜伏在虾体内病原菌的增殖. 由此可见, 虾养殖业发展到今天, 由于过度提高放养密度以及残饵及虾体排泄物在池底的大量积累而未得到有效处理, 从而使虾处于不利的生存环境中, 如 DO 下降、氨氮、NO₂⁻ 及 H₂S 含量升高等, 从而引起虾免疫力下降, 降低了对入侵病原体的防御能力, 使条件致病菌变成致病菌. 因此, 在养殖生产中, 作好水质检测, 保持良好、稳定的水体环境, 对预防虾类细菌病的暴发起到极其重要的作用.

致谢: 本实验细菌鉴定得到了广州市卫生防疫站廖科长和黄斌先生的帮助, 细菌的电镜照片在中山大学生命科学学院电镜室卢忻英副教授和张勤奋教师的指导下完成, 在此一并呈谢.

参考文献:

- [1] 孙玉华, 孙其焕. 罗氏沼虾亲虾暴发性疾病病原的研究及防治[J]. 水产学报, 1998, 22(1): 56~60.
- [2] BROCK J A. Black spot disease of *Macrobrachium* [A]. In: SINDERMAN C J, LIGHTNER D V, eds Disease diagnosis and control in north American marine aquaculture[C]. 1988. 151~153.
- [3] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法[M]. 北京: 科学出版社, 1978.
- [4] 厦门大学生物系微生物学教研室译. 普通细菌学方法手册[M]. 1989.
- [5] 廖延雄. 兽医微生物实验诊断手册[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [6] 姜永新, 王金良. 实用临床细菌学检验与进展[M]. 天津: 天津科技翻译出版公司, 1993. 154~155.
- [7] 叶星, 祁宝伦, 潘德博. 广东罗氏沼虾育苗中幼体大量死亡原因初探[M]. 中国水产科学, 1998, 5(3): 119~121.

Studied on Yellow and Black Gills of *Macrobrachium rosenbergii* Caused by *Pseudomonas*

TAO Bao-hua^{*}, SHI He-rong, HUANG Jun-wen, WANG Gang

Abstract: This paper deals with characteristics of pathogenic bacteria that are found in this intensive cultured *Macrobrachium rosenbergii*. The symptoms of infected shrimps are anorexia, yellow or black gills, leg-broken and there are yellow or black spot on the shell of some prawns. The which bacteriological identification shows the isolated bacteria are *Pseudomonas aeruginosa* and *P. putida*. The pathogenicity of separated bacteria and the same infected symptoms are found after the separated bacteria infected prawns. Also the bacteria are separated and purified from the re-infected prawns. The re-isolated bacteria are also *Pseudomonas aeruginosa* and *P. putida* from which we can identify the bacteria are pathogen. The sensitivity to several antibiotic and medicines is also studied.

Keywords: *Macrobrachium rosenbergii*; symptom; yellow or black gills; pathogen; *Pseudomonas aeruginosa*; *P. putida*