

文章编号: 0529-6579 (2000) S-0214-04

万氏对虾非 0—1 群霍乱弧菌病的病原研究^{*}

杨燕忠, 吴松浩

(汕头 动植物检疫局, 广东 汕头 515041)

摘 要: 1998 年 6 月和 1999 年 6 月澄海和汕头养殖的万氏对虾 (*Penaeus vannamei*) 分别患病出现死亡, 病虾呈浅红色, 行动呆滞. 从病虾体内分离到 5 株细菌, 革兰氏阴性短杆菌, 生化特性与霍乱弧菌几乎一致, 但霍乱红反应阴性, 与霍乱弧菌 0 多价血清不发生凝集, 经鉴定为非 0—1 群霍乱弧菌. 药物试验表明: 菌必治、氟派酸、氯霉素等药物对该病原菌有很显著的抑制效果.

关键词: 万氏对虾 (*Penaeus vannamei*); 非 0—1 群霍乱弧菌; 致病性; 生物学性状; 药物; 敏感性

中图分类号: S945.4 **文献标识码:** A

1998 年 6 月中旬广东省澄海市六合围养殖场的万氏对虾 (*Penaeus vannamei*, 又称凡纳对虾, 俗称南美白对虾) 患病出现死亡, 死亡高峰出现在发现死虾后的第 4~5 天, 1 周内几乎死完. 病虾行动呆滞, 大部分虾体表呈浅红色, 小部分虾黄鳃或眼球肿胀以至溃烂, 个别出现红鳃, 未发现虾壳上有白斑, 1999 年 6 月上旬汕头市牛田洋养殖场养殖的万氏对虾也患病, 并出现上述相似的症状, 虾体呈浅红色, 附肢和尾扇变红, 部分褐斑或烂尾, 个别烂眼, 患病率 20%~30%, 成活率 10% 左右. 为弄清该病的病原, 进一步研究防治的对策, 我们对分离菌株进行了细菌学鉴定、人工感染试验及抗菌药物的筛选.

1 材料与方法

1.1 病原菌分离及培养

1998 年的病虾, 体长 7~8 cm, 用接种环沾取其肝胰脏接种于 TCBS 琼脂平板上 30 °C 培养 24 h 后, 分离到 9961 菌株; 用 $\varphi=70\%$ 的酒精棉球拭擦溃烂的尾扇后, 剪取溃烂部分于弧菌增菌液中 30 °C 隔夜培养, 然后用接种环沾取增菌液接种于 TCBS 琼脂平板, 分离到 9962 和 9963 菌株.

1.2 分离菌的鉴定

按文 [1, 2] 介绍的方法进行, 将分离菌株分别接种于 TSI 斜面上纯培养, 然后转接微量生化管 30 °C 培养 24~48 h 后观察结果.

^{*} 收稿日期: 1999-09-15

1.3 人工感染试验

试验用虾取自潮阳市洪洞海珍品养殖场养殖的健康万氏对虾, 体长约 11 cm, 试验在容量为 60 L 的圆形塑料桶中进行, 每桶饲养 5 尾, 饲养用海水取自该场砂滤的天然海水, 盐度 16‰, 水温约 25 ℃, 连续曝气. 观察 1 周, 每天 2 次记录对虾的活动情况和发病死亡情况, 并移去死虾.

(1) 注射感染试验. 用接种环挑取少量分离菌株于弧菌增菌液中 30 ℃ 隔夜培养, 浓度约 9×10^9 个/mL, 使用注射器将细菌培养液注入受试虾第 3 和 4 腹节间的肌肉中, 每尾注射 0.02 mL. 对照虾在相同部位注入 0.02 mL 灭菌的弧菌增菌液.

(2) 浸泡感染试验. 用浓度约为 9×10^9 个/mL 细菌培养液加入试验组的饲养水中, 每升海水加细菌培养液 0.2 mL, 每 2 天加 1 次, 连续加 2 次. 对照组不加菌液.

(3) 创伤感染试验. 试验组细菌浓度和添加方式与浸泡试验相同. 对照组不加菌液. 用 $\varphi=70\%$ 酒精棉拭擦尾扇后, 剪去一侧尾扇的 1/3, 分别放入试验组和对照组中饲养观察.

(4) 抗菌药抑菌试验, 以常规纸片法进行. 将分离菌分别在弧菌增菌液中 30 ℃ 培养 8 h 后涂布于水解酪蛋白琼脂平板上, 贴上药敏纸片 30 ℃ 培养 18 h 后, 测量抑菌圈直径.

2 结 果

2.1 分离菌的鉴定

所有分离菌株都是革兰氏阴性短杆菌, 菌体弯曲, 单个, 不形成芽孢. TCBS 平板于 30 ℃ 培养 24 h, 菌落圆形, 略隆起, 直径 2 mm 左右, 9861、9961、9962 和 9963 生长为黄色, 9862 生长为绿色. 分离菌株存在氧化酶、过氧化氢酶等酶类, 不存在尿素酶、精氨酸双水解酶等酶类, 对弧菌抑制剂 (O/129) 和新生霉素敏感, 呈呼吸型和发酵型, 其特性 (表 1) 与霍乱弧菌 (*V. cholerae*) 几乎一致, 但霍乱红反应阴性, 与霍乱弧菌 O 多价诊断血清不发生凝集. 因此, 这 5 株菌的分类位置应属非 O—1 群弧菌霍乱 [*V. cholerae* (non—01)].

2.2 人工感染试验

试验结果见表 2. 注射感染后 8 h 对虾开始侧倒, 9 h 后开始出现死亡, 大多数在 24 h 内出现死亡, 未能显露病症. 24 h 后死亡者, 虾体表微红, 未出现褐斑、烂眼、烂尾现象. 浸泡感染 48 h 后才出现死亡, 虾体表呈浅红色, 附肢和尾扇变红, 后期出现褐斑、烂尾症状. 创伤感染尾扇水肿较明显, 虾体浅红, 未发现其它症状.

2.3 抗菌药抑菌试验

抑菌试验结果见表 3. 从表 3 可见, 大多数实验药物对分离菌株有很好的抑菌作用, 抑菌圈直径大于 30 mm 的有 5 种, 占 38.5%; 抑菌圈直径在 20~30 mm 之间的有 6 种, 占 46.2%; 青霉素 G 的抑菌效果最差.

表 1 分离菌株的特性与霍乱弧菌的比较¹⁾

菌株号	9861	9862	9961	9962	9963	霍乱弧菌	菌株号	9861	9862	9961	9962	9963	霍乱弧菌
革兰氏染色	—	—	—	—	—	—	七叶苷	—	—	—	—	—	—
弧状	+	+	+	+	+	+	西蒙氏枸橼酸盐	+	+	+	+	+	d
TCBS 上生长	Y	G	Y	Y	Y		硝酸盐还原	+	+	+	+	+	+
运动性	+	+	+	+	+	+	无盐胨水	+	+	+	+	+	+
O/F 试验	F	F	F	F	F	F	3%NaCl 胨水	+	+	+	+	+	+
葡萄糖产气	—	—	—	—	—	—	6%NaCl 胨水	W+	W+	W+	W+	W+	W+
葡萄糖	+	+	+	+	+	+	10%NaCl 胨水	—	—	—	—	—	—
蔗糖	+	+	+	+	+	+	精氨酸双水解酶	—	—	—	—	—	—
甘露糖	+	+	+	+	+	D	赖氨酸脱羧酶	+	+	+	+	+	+
麦芽糖	+	+	+	+	+	+	鸟氨酸脱羧酶	+	+	+	+	+	+
果糖	+	+	+	+	+	+	尿素酶		—	—	—	—	—
半乳糖	+	+	+	+	+	+	氧化酶	+	+	+	+	+	+
海藻糖	+	+	+	+	+	+	接触酶	+	+	+	+	+	+
纤维二糖	—	+	—	—	—	—	淀粉酶	+	+	+	+	+	+
乳糖	—	—	—	—	—	—	明胶酶	+	+	+	+	+	+
阿拉伯糖	—	—	—	—	—	—	MR	—	—	—	—	—	d
棉子糖	—	—	—	—	—	—	VP	—	—	—	—	—	d
木糖	—	—	—	—	—	—	吲哚	+	+	+	+	+	+
鼠李糖	—	—	—	—	—	—	H ₂ S (TSI)	—	—	—	—	—	—
蜜二糖	—	—	—	—	—	—	新生霉素	+	+	+	+	+	+
甘露醇	+	+	+	+	+	+	O/ 129 (10 g)	+	+	+	+	+	+
肌醇	—	—	—	—	—	—	O/ 129 (150 g)	+	+	+	+	+	+
山梨醇	—	—	—	—	—	—	霍乱 O 血清凝集	—	—	—	—	—	+
卫矛醇	—	—	—	—	—	—	霍乱红	—	—	—	—	—	
水杨苷	—	—	—	—	—	—							

1) 参考文献 [2]

表 2 人工感染试验结果

菌株号	感染方式	感染的时间/ d							死亡数	试验数
		1	2	3	4	5	6	7		
9861	注射	3	0	1	0	0	0	0	4	5
9862		3	1	0	0	0	0	0	4	5
9861+ 9862		3	1	0	0	0	0	0	4	5
对照		0	0	0	0	0	0	0	0	5
9861+ 9862	创伤	0	1	1	0	1	1	0	4	5
对照		0	0	0	0	0	0	0	0	5
9861+ 9862	浸泡	0	0	1	1	0	0	0	2	5
对照		0	0	0	0	0	0	0	0	5

表 3 不同抗菌药对分离菌株的抑菌直径

菌株号	9861	9862	9961	9962	9963	菌株号	9861	9862	9961	9962	9963
新生霉素	14	16	23	28	26	庆大霉素	22	24	25	24	26
菌必治	30	31	30	32	30	新霉素	20	23	25	25	27
青霉素 G	15	14	14	15	12	呋喃唑酮	20	22	25	27	27
链霉素	23	24	23	22	25	氟哌酸	31	32	33	32	32
氯霉素	30	32	34	33	34	氟嗟酸	30	31	32	31	31
四环素	29	28	29	28	27	复方新诺明	31	31	33	33	32
红霉素	21	22	22	23	22						

3 讨 论

弧菌是对虾养殖的主要致病菌，危害较严重，国内已报导的对虾弧菌病病原菌主要有副溶血弧菌（*Vibrio parahaemolyticus*）、溶弧菌（*V. alginolyticus*）、鳃弧菌（*V. anguillarum*）、非 0—1 群霍乱弧菌[*V. cholerae* (non-01)]、海弧菌（*V. pelagius*）等^[3~7]，研究对象多为中国对虾。郑国兴等^[5,6]报道过非 0—1 群霍乱弧菌引起中国对虾烂眼病。非 0—1 群霍乱弧菌适应于低盐、高温、微碱性的水体中生长繁殖，所以由该菌造成的对虾疾病发生流行与养殖的地区和季节有密切关系。本文报道的 2 个对虾养殖场均位于河口地区，烂泥底质，池水盐度低，一般均在 3‰~6‰，6 月份潮汕地区水温已高达 30℃，又由于养成期间每天投饵，水中有机物质也十分丰富，给非 0—1 群霍乱弧菌的生长繁殖提供了良好的环境条件，引起了该疾病的发生流行。

虾病防重于治，预防措施应贯穿整个生产过程。养虾池放养前应彻底清淤晒干和消毒，养成期间应调控好水质和底质，定期泼洒生石灰或含氯消毒剂，最好增设增氧机，饵料优质适量，为对虾生长创造良好的环境条件。若对虾发生非 0—1 群霍乱弧菌病，应马上用含氯消毒剂泼洒池水，按饵料质量的 0.05%~0.1%混入菌必治或氟哌酸或氯霉素等高敏药物，制成药饵进行投喂。

参考文献:

[1] 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. 66~68, 135~194.

[2] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册(第 8 版)[M]. 北京: 科学出版社, 1984. 474~482.

[3] 孟庆显. 对虾红腿病的研究 I . 病状、组织、病理学情况和病原的鉴定[J]. 鱼病简讯, 1989, 43/44(2/3): 36~38.

[4] 于占国, 林凤翔, 卞正和, 等. 溶藻弧菌引起中国对虾红腿病的回接实验观察[J]. 海洋学报, 1996, 18(6): 35~139.

[5] 郑国兴, 沈亚林, 李何. 中国对虾病原菌(鳃弧菌)的研究[J]. 水产学报, 1990, 14(1): 1~6.

[6] 郑国兴. 养殖对虾弧菌病原菌非 0—1 群霍乱弧菌的生物学性状与致病性[J]. 1986, 10(2): 195~203.

[7] 杨秀芳, 吴友吕, 祝希雅. 中国对虾养成期细菌性黑鳃、褐斑综合症的病原生物学[J]. 东海海洋, 1992, 10(4): 27~36.