

文章编号: 0529-6579 (2000) S-0208-06

斑节对虾病原菌河流弧菌 (I 型) 的研究^{*}

张朝霞, 苏永全, 王 军, 鄢庆枇, 马 梁

(厦门大学海洋学系 / 亚热带海洋研究所, 厦门 361005)

摘 要: 从患“红体综合症”的斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 体内分离到一株细菌 6101 号, 回归感染证实了其致病性. 经形态观察以及生理生化特性检测, 鉴定为河流弧菌 (I 型). 提取河流弧菌 6101 号胞外产物, 分析其酶成分, 定量检测了胞外产物中蛋白酶、酸性磷酸酯酶和碱性磷酸酯酶的活性, 将提取的河流弧菌 6101 号胞外产物对健康斑节对虾进行致死试验, 证实其胞外产物所具有的毒性甚于该菌的菌悬液. 电镜观察致死对虾肝组织细胞严重受损, 从细胞病理方面进一步证实了病原菌胞外产物的致病性.

关键词: 虾病; 河流弧菌; 胞外产物; 斑节对虾 (*Penaeus monodon*)

中图分类号: S945.4⁺7 **文献标识码:** A

近年来, 我国的对虾养殖正处于复兴阶级. 但是, 由于过度养殖等造成的近岸海域富营养化问题远未得到解决, 虾病仍时有发生, 特别是台风暴雨过后, 病害更是不可避免. 1997 年 Alapidetendencia 等报道过从患红体综合症 (red disease syndrome) 的斑节对虾体内分离到副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、哈维氏弧菌 (*V. harveyia*) 及河流弧菌 (*V. fluvialis*) 等几种弧菌, 但在回归感染试验中仅前两者引起对虾全身发红, 而河流弧菌感染后未有此症状^[1]. 河流弧菌是一类人、畜常见的病原菌, 可引起鱼、贝产生脓毒及败血等症状^[2,3], 但作为对虾病原菌则较少报道.

1997 年 8 月初, 受台风影响, 厦门地区连日暴雨, 过后同安对虾养殖区发生了“白斑症”与“红体综合症”的大面积虾病. 本文对斑节对虾“红体综合症”的病原菌进行诊断和鉴定, 测定了病原菌胞外产物的酶成分及蛋白酶、酸性磷酸酯和碱性磷酸酯酶的酶活性, 证实了病原菌胞外产物的致死性及对对虾肝细胞的毒性, 并探讨了病原菌导致对虾发病的原理.

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 试验对象 病虾采自同安新店后村 8 号池和洪塘下墩 26 号池, 体长 8~11 cm. 回归感染用对虾取自同安新店东坑洪玉杯养殖虾塘的健康斑节对虾, 体长 8~11cm. 细菌胞外产物致死试验用对虾取自新店东坑洪玉杯养殖虾塘的健康斑节对虾, 体长 8~11cm.

^{*} 收稿日期: 1999-09-15

1.1.2 主要培养基 盐度试验、糖发酵试验以及酶试验等主要培养基的配置方法参照文献 [6, 7] 所述。

1.2 方法

1.2.1 细菌的分离 用灭菌棉签沾取病虾肝胰脏, 迅速涂布于 TCBS 平板上, 3 h 内带回实验室, 30 ℃ 培养 24 h, 用划线法反复分离纯化, 纯种于 4 ℃ 保存备用。

1.2.2 回归感染试验 试验对虾放养在玻璃水箱中, 充气, 水温 22 ~ 25 ℃, 海水密度为 1.006 ~ 1.008 kg/L, 每天换水 30%, 以“福星牌”饲料每日 2 次投喂 (9:30 和 18:30)。

(1) 菌悬液制备. 将试验菌株活化后接种于斜面, 在 30 ℃ 培养 24 h 后, 用无菌生理盐水洗下菌苔, 浓度梯度稀释为 $10^5 \sim 10^7$ 个/mL。

(2) 回归感染试验. 设置 3 个试验组, 每组 8 尾对虾. 所有注射组注射剂量均为 50 μ L/尾, 注射部位均选用腹部第 2~3 肌节接合部. 第 1 组为对照组, 注射生理盐水; 第 2 组注射菌液浓度为 10^7 个/mL; 第 3 组注射液的浓度为 10^5 个/mL。

从回归感染死亡对虾体内分离细菌按方法 1.2.1 的操作进行。

1.2.3 分离菌的鉴定

(1) 形态观察. 将分离菌的新鲜培养物进行稀释, 磷钨酸负染后电镜观察。

(2) 生理生化特性检测. 按文献 [6, 7] 的方法. 选择氧化酶、动力试验及糖发酵等生化反应进行测定。

1.2.4 分离菌胞外产物的提取及酶活力测定 细菌于营养肉汤中增菌, 培养物 13 000 r/min 离心 40 min, 收集上清液, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀, 4 ℃ 4 000 r/min 离心 20 min 后, 将沉淀物溶于 Tris-HCl 缓冲液 (0.01 mol/L, pH 7.2) 中, 用同一缓冲液透析后, 经冷冻干燥浓缩即为细菌胞外产物粗提液。

(1) 细菌胞外酶检查. 采用双层纸碟法对细菌胞外产物的酶成分进行分析^[8]. 脂肪酶平板含 1.0% 吐温 80, 检查方法为纸碟周围出现不透明晕圈为阳性^[9]; 几丁质酶平板含 2.0% 胶体几丁质, 纸碟周围出现透明晕圈为阳性^[9]; 磷酸酯酶平板含 5.0% 蛋黄, 纸碟周围出现云雾状为阳性^[7]; 蛋白酶平板含 0.4% 酪蛋白, 加 10% 三氯乙酸, 出现透明晕圈为阳性^[8]。

(2) 蛋白质含量及蛋白酶活力测定. 采用 Folin-酚法测定^[10], 以每 min 水解酪蛋白释放 1 μ g 酪氨酸所需要的酶量为 1 个蛋白酶活力单位, 用 U 表示。

(3) 磷酸酯酶活力测定. 参照文献 [11, 12] 方法测定. 磷酸酯酶活力定义为每 min 生成 1 μ g 的对硝基苯酚所需的酶量, 用 U 表示。

1.2.5 细菌胞外产物的毒性 设置 3 个试验组, 每组 8 尾对虾, 分别注射 2 倍及 16 倍稀释的细菌胞外产物 50 μ L/尾, 并以注射同剂量 0.01 mol/L, pH 7.2, Tris-HCl 缓冲液的对虾作为对照. 注射部位均在对虾腹部侧面 2~3 肌节处. 记录对虾死亡时间及死亡症状. 取刚死对虾肝组织, 制作超薄切片, 电镜观察肝组织细胞受损情况, 健康对虾肝组织为对照。

2 结果

2.1 分离菌的鉴定

病虾头胸甲、背部、尾扇及步足均发红, 肝区红肿, 从养殖池病虾体内分离到 1 株菌株, 编号为 6101 号, 纯化后进行回归感染试验, 结果注射细菌 6101 号 (10^7 个/mL) 的对

虾注射后 4 h 后开始死亡，死亡率达 87.5%；注射细菌 6101 号（ 10^5 个/mL）的对虾 12 h 后开始出现死亡，死亡率为 25%。死亡对虾的头胸甲、尾扇、背部及步足发红，尾部溃烂，肝脏红肿。未死亡对虾在感染初期也出现红体，后症状慢慢减轻乃至消失。从回归感染死亡对虾体内分离到细菌，编号为 6X07 号。6101 号呈弧状或杆状。一般单个，大小为 $(0.5 \sim 0.8) \mu\text{m} \times (1.3 \sim 1.7) \mu\text{m}$ ，端生单鞭毛（图 1A、1B）。在 TCBS 上菌落直径为 0.5 ~ 1.5 mm，黄绿色，菌落表面隆起、光滑、湿润，有鱼腥味。

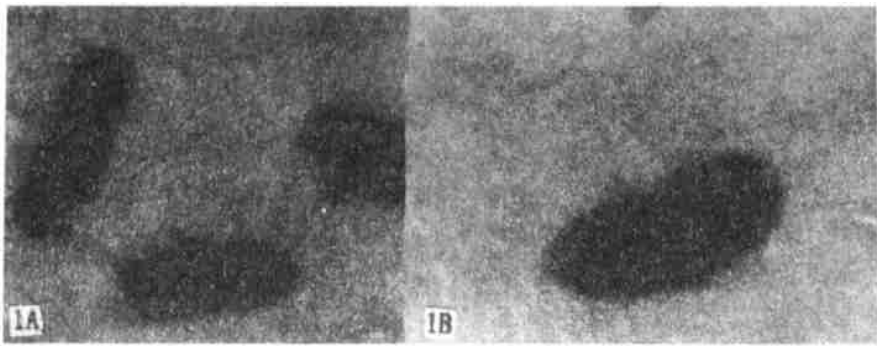


图 1 多个分离菌 6101 号 (A) 和单个分离菌 6X07 号 (B) 的电镜照片 (× 14 000)

2 株细菌生理生化特征检测结果均为革兰氏染色阴性杆菌，在无盐胨水中可生长，在 8% 的 NaCl 胨水中不生长，氧化或发酵葡萄糖产弱酸，不产生 H_2S ，VP 试验阴性，氧化酶、精氨酸脱羧酶及精氨酸双水解酶反应阳性，色氨酸脱氢酶、 β -半乳糖苷酶、赖氨酸脱羧酶和鸟氨酸脱羧酶反应阴性，可利用柠檬酸盐、蔗糖、阿拉伯糖、酪蛋白及卵磷脂，对 0/129 ($150 \mu\text{g}$) 敏感（表 1）。根据以上的检测结果以及 2 株细菌利用葡萄糖产酸不产气的特点^[13]，参照文献 [14]，鉴定为河流弧菌 I 型（*Vibrio fluvialis* type I）。

表 1 分离菌的糖发酵试验和形态及生理生化特性

糖发酵			生理生化项目					
项目	6101	6X07	项目	6101	6X07	项目	6101	6X07
葡萄糖	+	+	在 TCBS 上生长	+	+	吡啶	—	—
棉仔糖	—	—	特征菌落颜色	绿色	绿色	V. P.	—/+	—
蜜二糖	—	—	革兰氏染色	—	—	产 H_2S	—	—
肌醇	—	—	菌体形态	杆状或弧状	杆状或弧状	柠檬酸盐利用	+	+
木糖	—	—	端生单鞭毛	端生单鞭毛	端生单鞭毛	硝酸盐利用	—	—
阿拉伯糖	+	+	O/F 试验	O/F	O/F	尿素	—	—
山梨醇	—	—	动力	+	+	氧化酶	+	+
鼠李糖	—	—	0% 胨水生长	+	+	精氨酸脱羧酶	+	+
果糖	—	—	3% 胨水生长	+	+	赖氨酸脱羧酶	—	—
乳糖	—	—	6% 胨水生长	+	+	鸟氨酸脱羧酶	—	—
蔗糖	+	+	8% 胨水生长	—	—	精氨酸双水解酶	+	+
纤维二糖	—	—	10% 胨水生长	—	—	明胶酶	—	—
			43 ℃ 生长	—	—	淀粉酶	—	—
			酪蛋白	+	+	β -半乳糖苷酶	—	—
			卵磷脂	+	+	色氨酸脱氢酶	—	—
			几丁质	—	—	0/129 10^4g/片	—	—
						0/129 150^4g/片	+	+

2.2 分离菌的胞外产物提取和酶活力分析

2.2.1 胞外产物的酶成分 分析结果表明, 分离菌胞外产物中蛋白酶活力和磷酸酯酶活力较高, 2 种酶的阳性现象在反应 24 h 后均已出现, 脂肪酶则是在反应 72 h 后才出现小的云雾状圈, 检测 10 d 后仍无几丁质酶活性.

2.2.2 分离菌胞外产物的酶活力 6101 号菌株的蛋白酶、酸性磷酸酯酶和碱性磷酸酯酶的活力分别为 30.5、70.6 和 11.6 U, 3 种酶比活力分别为 1.09、2.42 和 0.42 U. 以酸性磷酸酯酶的活力最强.

2.3 分离菌胞外产物的致病性

2.3.1 致死试验 注射细菌 6101 号胞外产物 2 倍稀释液的对虾不到 1 h 就开始死亡, 校正死亡率为 100%, 注射细菌胞外产物 16 倍稀释液的对虾不到 3 h 就开始死亡, 校正死亡率也为 100%. 死虾出现头胸甲、背部、尾扇及步足发红, 肝脏红肿的症状. 注射细菌胞外产物 16 倍稀释液的比注射细菌悬液 (10^7 个/mL) 的对虾出现症状的时间短, 死亡速度快, 死亡率高 (表 2).

表 2 病原菌胞外产物与菌悬液致死效应比较

注射液种类	剂量/ μ L	注射后时间/h			死亡率/%
		出现症状	开始死亡	全部死亡	
菌悬液原液	50	2	4	21	87.5
ECP16 倍稀释液	50	1	2	7	100

2.3.2 分离菌胞外产物对对虾肝组织的破坏作用 注射分离菌胞外产物的对虾肝组织细胞受到的破坏最严重, 核仁消失, 核膜受损 (I), 线粒体嵴 (M) 消失, 有些细胞质均解体呈碎片 (图 2B, G), 细胞器散落在细胞间隙, 多数细胞胞内物质破碎消失呈空白状 (图 2C, V).

3 讨 论

河流弧菌是一类动物流行病病原菌, 也曾作为鱼和贝的致病菌报道过. 对于该菌的毒力因子 (如表面结构和成分、内毒素和外毒素等), 国外学者进行了不少研究^[15, 16]. 利用葡萄糖不产气的河流弧菌 I 型, 主要是从动物尤其是患腹泻症的动物体内分离到的, 而会产气的河流弧菌 II 型一般是从水环境中分离到的^[13]. 本文在台风暴雨之后首次从斑节对虾体内分离到河流弧菌 I 型, 其胞外产物致死斑节对虾速度和死亡等毒性效应明显强于菌悬液, 因此, 其产生的胞外产物是其导致对虾发病乃至死亡的直接原因. 河流弧菌胞外产物对对虾的致病力与胞外产物中各种毒性酶类 (包括蛋白酶、酸性磷酸酯酶和碱性磷酸酯酶) 的酶比活力密切相关. 该菌胞外产物中蛋白酶比活力与嗜水气单胞菌以及副溶血弧菌等常见水产动物致病菌相当, 但酸性磷酸酯酶的活性比后二者高得多. 对对虾的毒性也相应强一些. 因此蛋白酶和磷酸酯酶等毒性酶类是河流弧菌 I 型胞外产物中重要的致病因子. 本文所探讨的河流弧菌引起对虾致病的病理, 与一些国内外学者的研究结论相似. Inamura 等证实了鳗弧菌的胞外产物可致死多种鱼类, 毒力与其蛋白酶的活力相关^[17], 陈怀青等报道了嗜水气单胞菌的蛋白酶能分解宿主肌体的各种蛋白, 造成广泛的组织损伤, 细菌籍损伤的组织大量繁殖^[18], 而 Kimi 等认为, 磷酸酯酶可分解包括卵磷脂在内的磷酸酯,

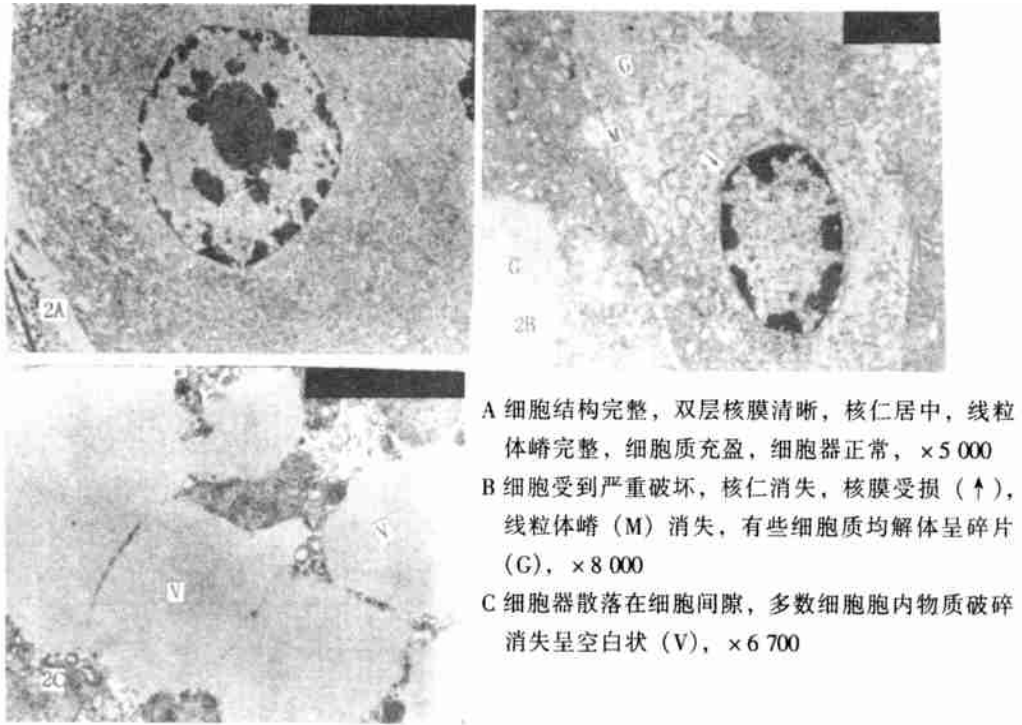


图 2 健康斑节对虾细胞和注射分离菌胞产物的对虾肝组织细胞

具有较强的毒性效应^[19]。

从超薄切片电镜观察的结果可以看出，河流弧菌 I 型有胞外产物作用于宿主细胞，破坏组织中的蛋白和磷酸酯成分，使对虾的细胞出现核受损，细胞器被破坏，细胞质空泡化，组织中成片细胞破碎，导致对虾细胞无法进行正常的物质和能量代谢，对虾因丧失正常的生理功能而死亡。

参考文献:

- [1] ALAPIDEFENDENIA E V, DUREZA L A. Isolation of *Vibrio* spp from *Penaeus monodon* (Fabricius) with red disease syndrome[J]. Aquaculture, 1997, 154 (2): 107~114.
- [2] 徐伯亥, 殷战, 吴玉深, 等. 淡水养殖鱼类暴发性传染病致病细菌的研究[J]. 水生生物学报, 1993, 17 (3): 260~265.
- [3] 聂丽平, 丁明进, 刘金屏, 等. 皱纹盘鲍脓疱病病原菌——河流弧菌 II 型的生物学性状研究[J]. 中国微生物生态学杂志, 1995, 7(1): 33~36.
- [4] 张朝霞, 王军, 苏永全, 等. 斑节对虾细菌性疾病的病原生物学研究[A]. 见: 虾类的健康养殖[C]. 北京: 海洋出版社, 1998. 107~116.
- [5] 苏永全, 张朝霞, 王军, 等. 斑节对虾病原菌的回归感染试验[A]. 见: 虾类的健康养殖[C]. 海洋出版社, 1998. 119~126.
- [6] 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.
- [7] PHILIPP G. 普通细菌学手册[M]. 厦大学生物系微生物教研室翻译. 厦门: 厦门大学出版社, 1989.
- [8] 邱秀宝, 李彤, 戴宏, 等. 嗜冷性海洋微生物蛋白酶的研究[J]. 微生物学通报, 1991, 18(3): 138~141.

- [9] 谢湘玉. 紫外诱变球孢白僵菌选育几丁质酶高产菌株方法的研究[J]. 河南师范大学学报, 1996, 24(3): 568~573.
- [10] 北京大学生物系生物化学教研室编. 生物化学实验指导[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1978.
- [11] 陈清西, 颜思旭. 文昌鱼的碱性磷酸酶的必需基因研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1986, 25(3): 568~573.
- [12] 陈素丽, 陈清西, 胡天惠, 等. 长毛对虾酸性磷酸酶的纯化与性质[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1997, 36(1): 121~125.
- [13] 权太淑, 李薇. 河弧菌在腹泻患者粪便和饮水中同时分离及其病原性意义的探讨[J]. 微生物学报, 1986, 26(3): 262~267.
- [14] BUCHANAN R E GIBBONS N E. 伯杰细菌鉴定手册(第九版)[M]. 中国科学院微生物研究所“伯杰细菌鉴定手册”翻译组. 北京: 科学出版社, 1994.
- [15] RAHIM Z. Enterotoxigenicity of *Vibrio fluvialis* strains isolated from fresh water environment[J]. J. Diarrhoeal Dis Res, 1994, 12(4): 290~291.
- [16] KENNE. Structural studies of the O-antigen polysaccharide of *Vibrio fluvialis* AA-18292[J]. Carbohydrate Res, 1990, 205(19): 440~443.
- [17] INAMURA H. Toxicity of extracellular products of *Vibrio anguillarum*[J]. Fish Pathology, 1987, 22: 153~158.
- [18] 陈怀青, 陆承平. 气单胞菌研究进展[J]. 鱼类病害研究, 1997, 9(3~4): 18~30.
- [19] KIMI R M, IWANAGA S. Structure-function relationships of phospholipase I: prediction of presynaptic neurotoxicity[J]. Toxicon, 1986, 24: 527.

Studies on the Pathogen of *Penaeus monodon* *Vibrio fluvialis* Type I

*
ZHANG Zhao-xia, SU Yong-quan, WANG Jun, YAN Qing-pi, MA Liang

Abstract: After the 9710 typhoon in August 1997, a strain resulted in a serious penaeid disease was isolated from the ill *Penaeus monodon* collected from Tong'an, Xiamen and studied. It was confirmed that this strain was pathogenic to *P. monodon* by intramuscular infection. Both strains isolated from the ill and infected shrimps, were observed by transmit electron microscopy (TEM) and their biochemical characteristics were also tested. Based on the results and according to Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, the pathogen was identified as *Vibrio fluvialis* type I. Extracellular products (ECP) were drawn from the bacterial cultural solution. Enzyme activities and the relative activities of protease and phospholipases (including acidic phospholipase and alkaline phospholipase) in ECP were also detected, of which relative activities of the acidic phospholipase were highest with 2.42 and those of the alkaline phospholipase were lowest, 0.42. In ECP lethal experiment, healthy *P. monodon* were killed by the ECP and cells of the dead shrimps' livers were injured at different degree.

Keywords: shrimps disease; *Vibrio fluvialis*; extracellular products; *Penaeus monodon*