

罗氏沼虾肌肉白浊病病原研究

姜 兰¹ 邓国成¹ 石存斌¹ 梁森汉² 郑 重²

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所; 农业部热带与亚热带重点实验室, 广州 510380;

2. 广东省肇庆市新技术应用研究所, 肇庆 526040)

摘要: 从患白浊病的罗氏沼虾虾苗病灶分离到 10 多株菌株, 其中一株经人工感染证实为病原菌, 经 ATB Expression 自动细菌鉴定仪测试, 为木糖葡萄球菌, 其主要特性为拟球状(直径 0.8—1.1 μm), 革兰氏阳性, 无鞭毛, 无荚膜, 不产生芽孢, 发酵葡萄糖、果糖、麦芽糖、乳糖、海藻糖、阿拉伯糖、蔗糖及甘露醇产酸, β -半乳糖苷酶、过氧化氢酶及脲酶阳性, 氧化酶、血浆凝固酶、V-P 反应、精氨酸双水解酶、鸟氨酸脱羧酶均为阴性。最适生长温度、盐度和 pH 值范围分别为 28—37℃、0%—2%、6—9。对红霉素、卡那霉素、头孢氨苄及庆大霉素等药物敏感。

关键词: 罗氏沼虾; 肌肉白浊病; 病原; 木糖葡萄球菌

中图分类号: S945.4 文献标识码: A 文章编号: 1009-3207(2002)05-0477-06

罗氏沼虾是我国主要的淡水养殖虾类, 仅广东省养殖面积就达 12 000 hm^2 。罗氏沼虾白浊病主要危害育苗期间的虾苗, 尤其是淡化前后的虾苗, 许多虾苗场都因肌肉白浊病引起虾苗大批死亡, 其发病率高达 80% 以上, 感染的虾苗死亡率可高达 90%, 造成了巨大的经济损失^[1]。患病虾的主要表现症状为虾游泳足以下到尾部的肌肉呈白色混浊状、不透明, 患病虾游动缓慢, 摄食亦不正常, 病虾逐渐死亡。近年来, 由于罗氏沼虾白浊病的暴发流行, 严重制约了罗氏沼虾养殖业的发展。国内有许多水产病害工作者都对该病进行过研究报道, 并对该病的流行规律和防治方法做了大量的工作, 但尚未有对该病病原菌研究的确切报道^[1, 2]。本文作者从病原菌的分离、鉴定、致病性等方面开展了研究工作, 初步证实罗氏沼虾肌肉白浊病与木糖葡萄球菌有关。

1 材料与方法

1.1 材料 取自广东省中山市罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii* Man)育苗场患肌肉白浊病的病虾。回归感染用实验虾为本课题组自养、无肌肉白浊病发病史的罗氏沼虾健康苗种, 规格为 1.5 cm 左右。

1.2 病原菌的分离培养 无菌操作取仍未死亡病虾的病灶部位, 划线接种于普通营养琼

收稿日期: 2001-11-20; 修订日期: 2002-01-30

基金项目: 1999 年广东省重点科技项目资助

作者简介: 姜 兰(1965—), 女, 湖北省宜都县人; 副研究员; 主要从事鱼类病害研究。E-mail: jianglan2@163.net

脂平皿,置 30℃恒温培养,挑取单菌落进一步分离纯化^[3],供人工感染和鉴定用。

1.3 人工感染试验 将分离纯化的菌株接种到营养平皿,30℃恒温培养 18h,用 0.65% 无菌生理盐水洗下菌苔,采用比浊法测定菌液浓度并稀释成 15×10^8 cfu/mL (即麦氏比浊管第 5 管的浓度),再用试验用水将细菌浓度稀释为 1×10^8 cfu/mL,每组放 20 只健康的实验虾,进行浸泡感染,同时设不加细菌的空白对照组。实验用水为经曝气的自来水,实验容器为容量 10L 的塑料盆中,室温(约 25℃左右)饲养二星期,定时观察发病及死亡情况。从病灶中重复分离细菌,得到生长明显优势且与首次人工感染所用菌株相似的单菌落,纯化后再次作人工感染,方法同上。

1.4 病原菌的鉴定 细菌纯培养物划线接种于普通营养琼脂,30℃培养 24h,观察菌落的形态、大小、颜色等。细菌纯培养物涂片作革兰氏染色观察^[4]。取营养肉汤培养 16h 的细菌菌株,经负染后,用透射电镜观察菌株的形态及大小形状^[5]。生理生化特征测定:取纯培养的菌株,做氧化酶,过氧化氢酶及血浆凝固酶试验^[4]。细菌鉴定:用 ATB Expression 自动细菌鉴定仪对纯培养的菌株进行测试。

1.5 病原菌对温度、pH 值和盐度的耐受性试验 试验用培养基为液体营养肉汤,每管 2mL,将培养 18h 的实验菌株用无菌生理盐水配制成浓度为 1×10^8 cfu/mL 的细菌悬液,每管接种 200μL,用 ATB 比浊器(生物梅里埃出品的 ATB Expression 自动细菌鉴定仪所配浊度计)定时检测实验管的细菌比浊度,以监测细菌的生长状况;各比浊度无变化的实验管在 1h 及 10h 分别取 30μL 细菌悬液,接种于营养平皿,置 30℃培养过夜,观察细菌的存活情况。所设温度梯度为 8℃、15℃、20℃、25℃、28℃、33℃、37℃、42℃、56℃,pH 值梯度为 3、4、5、6、7、7.5、8、9、10、11,盐度梯度为 0%、0.5%、1%、1.5%、2%。

1.6 药敏试验 培养 18h 的菌株,均匀涂布于营养琼脂平皿上,贴上药敏试纸,30℃恒温培养过夜后观察并记录抑菌结果。药敏试纸购自上海卫生防疫站。

1.7 病变组织的超微结构观察 取病虾的病灶部位,2.5% 戊二醛固定,制备电镜超薄切片,用透射电子显微镜对病变组织的病理变化进行超微结构观察^[5]。

2 结果

2.1 病原菌的分离与鉴定

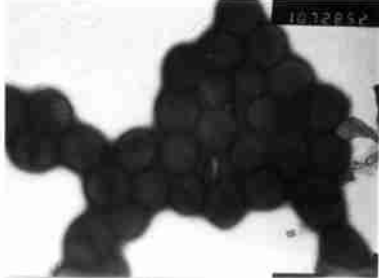


图 1 分离菌株的透射电镜观察
($\times 10\,000$)

Fig. 1 Observation of EM for
isolated strain

细菌的分离培养: 从被检病虾的肌肉白浊病灶分离出大量细菌,菌落圆形、边缘整齐、稍凸起、乳白色、不透明、较干燥、无光泽、菌落较小,30℃培养 24h,菌落直径约 1—2mm。

细菌形态: 菌体形态为拟球形,大小基本一致,无鞭毛,不形成芽孢,革兰氏染色阳性。营养肉汤培养 16h 负染电镜观察,直径大小约 0.8—1.1μm 左右(图 1)。

生理生化实验: 生理生化特性,氧化酶阴性、过氧化酶阳性、血浆凝固酶阴性。ATB Expression 自动细菌鉴定仪鉴定结果,该病原菌为木糖葡萄球菌(*Staphylococcus xylosus* Schleifer et kloos)(表 1)

表 1 分离菌株的生理生化特性

Tab. 1 Physiological and biochemical characteristics of the isolated strain

试验项目 Item	判断结果 Result
氧化酶(OX)	—
过氧化氢酶	+
血浆凝固酶	—
脲酶(URE)	+
精氨酸双水解酶(ADH)	—
鸟氨酸脱羧酶(ODC)	—
七叶灵(水解) (ESC)	—
葡萄糖(GLU)	+
甘露糖(MNE)	—
果糖(FRU)	+
麦芽糖(MAL)	+
乳糖 (发酵) (LAC)	+
海藻糖(TRE)	+
甘露醇(MAN)	+
棉子糖(RAF)	—
核糖(RIB)	+
纤维二糖(CEL)	—
硝酸盐(NIT)	+
产丙氨酸(VP)	—
β-半乳糖苷酶(β GAL)	+
精氨酸芳胺酶(ArgA)	—
碱性磷酸酶(PAL)	+
吡咯烷基芳胺酶(PyrA)	—
新生霉素(抗性) (NOVO)	+
蔗糖(发酵) (SAC)	+
N 乙酰葡萄糖胺(发酵) (NAG)	+
松二糖(发酵) (TUR)	—
阿拉伯糖(发酵) (ARA)	+
β 葡糖醛酸酶(β GUR)	+

注: + 为阳性, — 为阴性。

2.2 人工感染试验

细菌浸泡组的个别实验虾第4d 开始出现有肌肉白浊现象, 第6d 达 20%, 其表现症状与自然发病症状相似。但对照组在实验过程中一直表现正常(表 2)。将从人工感染试验明显显症的病虾病灶分离的菌株再次感染健康虾, 实验组的感染发病症状与首次回归感染相同, 与自然发病症状相似。

表 2 人工浸泡感染试验结果

Tab.2 Results of bath challenge trial

组别	数量(只)	细菌浓度(× 10 ⁸ cfu/ mL)	感染率(%)	开始显症时间
实验一组	20	1	20	第四天
实验二组	20	1	25	第三天
对照组	30	0	0	无

2.3 病原菌对温度、pH 值和盐度的耐受性

2.3.1 试验结果表明,该病原菌生长的适宜温度为 25—42℃,最适温度为 28—37℃,低于 20℃、高于 50℃不生长;pH 值的适宜范围为 6—9,最适为 8,低于 5、高于 10 时不生长;盐度的适应范围较广,0%—2% 的 NaCl 含量均适宜该菌株的生长。

2.3.2 结果表明:该病原菌在 56℃、pH3 及 pH11 条件下,1h 就会致死;而在 8℃、15℃、20℃、及 pH4、pH5、pH10 时,菌株虽然没有生长繁殖(菌液的比浊度没有变化),但细菌并没有死亡,只是处于一种休眠状态(表 3)。

表 3 分离菌株生存条件试验结果
Tab. 3 Results of survival test of the isolated strain

时间(h)	温度(℃)				pH 值				
	8	15	20	56	3	4	5	10	11
1	+	+	+	—	—	+	+	+	—
10	+	+	+	—	—	+	+	+	—

注: + 为菌株存活, — 为菌株死亡

2.4 药敏试验

药敏试验表明,病原菌对红霉素、卡那霉素、丁胺卡那、利福平、头孢三嗪、头孢氨苄、头孢拉定、环丙沙星、氧氟沙星、庆大霉素及氯霉素等 11 种药物敏感,对痢特灵、氧氟沙星、氟啶酸等 8 种药物中等敏感,而对复方新诺明及杆菌肽不敏感(表 4)。

表 4 分离菌株的药物敏感试验结果
Tab. 4 Sensitivity of the isolated strain to the 21 chemotherapeutants

药物名称	敏感性	药物名称	敏感性
红霉素	敏感	头孢三嗪	敏感
强力霉素	中等敏感	头孢氨苄	敏感
四环素	中等敏感	头孢拉定	敏感
卡那霉素	敏感	甲氧哌酸	中等敏感
丁胺卡那	敏感	氟啶酸	中等敏感
利福平	敏感	环丙沙星	敏感
痢特灵	中等敏感	氧氟沙星	敏感
诺氟沙星	中等敏感	复方新诺明	耐药
庆大霉素	敏感	多粘菌素 B	中等敏感
杆菌肽	耐药	氯霉素	敏感
乙酰螺旋霉素	中等敏感		

2.5 病理变化

显症组织的超微结构观察显示,病虾肌肉组织的肌纤维排列整齐,无断裂、肿胀等细胞坏死的现象;样品中亦未发现病毒样颗粒;但肌纤维间的线粒体肿胀、变形,有明显的病理变化(图 2)。

3 讨论

罗氏沼虾肌肉白浊病最早出现在 1996 年, 当时病害只是在广西一带小范围地区发生, 随着时间的推移, 该病从广西迅速蔓延到广东, 并引起人们的重视。国外有从患肌肉白浊病的罗氏沼虾体内发现病毒粒子的报道^[6]; 国内邓欢等曾对中国对虾患“肌肉白浊病”做过研究报告^[7], 钱冬等亦对罗氏沼虾肌肉白浊病病原进行了研究报道^[8]; 目前国内外学者对罗氏沼虾肌肉白浊病的病原各持己见。

作者经病原菌的分离纯化、人工感染从患病病虾中分离到一株可复制出相同病症的细菌菌株, 经细菌鉴定, 初步判定其病原菌是木糖葡萄球菌; 这与钱冬等报道的罗氏沼虾肌肉白浊病是由病毒引起的结果不同。从表观上看, 患肌肉白浊病的病虾其肌肉似乎已坏死, 但从严重患病的病虾肌肉取材, 在电子显微镜下, 看到的却是排列整齐、无病变的肌纤维,

病灶部位亦未找到感染的病毒颗粒。该病的病原是否寄生在细胞之间, 该病是否是一种由多种病原引起的并发症以及白浊病的致病机理以及传染和传播途径等问题尚须进一步的研究。

本文分离所得到的病原菌为革兰氏阳性菌, 而在淡水养殖中常见的病原菌多为革兰氏阴性菌, 但亦有从养殖鱼类分离到革兰氏阳性病原菌的报道^[9, 10]; 作者认为, 罗氏沼虾虾苗的孵化及培育需在咸水中进行, 而且此菌株在 20℃ 以下生长受到抑制, 而且对盐度的适应范围较广 (0%—2%), 因而极有可能对需要在 30℃ 左右温度、1%—2% 盐度条件下繁殖育苗的罗氏沼虾造成威胁。

分离菌株的药物敏感性试验表明, 木糖葡萄球菌对许多抗菌素类药物都敏感, 在生产上使用杀菌类消毒药物和内服抗菌素类药物也确有一定的效果, 但由于甲壳类动物构造、生长及食性方面的特性, 一定程度上阻碍了药物的吸收, 因而, 切断疾病的传染源、保持养殖水体水环境的稳定性、提高虾的抗病力, 才有利于防治虾病发生。

参考文献:

- [1] 梁森汉, 郑重, 邓国成, 等. 罗氏沼虾肌肉白浊病的防治研究[J]. 淡水渔业, 2001, 31(5): 34—36
- [2] 李其才, 侯昕, 岳永生, 等. 罗氏沼虾成虾的疾病防治[J]. 水利渔业, 1997, 92(5): 50—51
- [3] 韩文瑜, 何昭阳, 刘玉斌, 等. 病原细菌检验技术[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1992, 66—68, 429—431
- [4] 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, 111—192
- [5] 林钧安, 高锦辉, 洪健. 实用生物电子显微术[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1989, 48—52, 69
- [6] Tung C W, Wang C S, Chen S N. Histological and electron microscopic study on *Macrobrachium* muscle virus (MMV) infection in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), cultured in Taiwan[J]. *Journal of Fish Diseases*, 1999, 12: 319—323



图 2 病变组织的超微结构观察(× 8 000)

Fig. 2 Observation for ultrastructure of pathologic muscle tissue

- [7] 邓欢, 严隽箕, 刘亚杰, 等. 弧菌感染中国对虾患“肌肉白浊病”的试验研究[J]. 水产科学, 1993, 12(7): 5—9
- [8] 钱冬, 杨国梁, 刘问, 等. 罗氏沼虾虾苗肌肉白浊病病原初步研究[J]. 鱼类病害研究, 2001, 23(3—4): 46
- [9] 黄旭田. 肠内球菌感染症[J]. 养鱼世界, 1999, 23(10): 43—44
- [10] 吴小慧, 杜佳根. 牙鲆链球菌病的防治[J]. 中国水产, 1999, 7: 29—30

STUDIES ON PATHOGEN OF OPAQUE MUSCLE DISEASE IN *MACROBRACHIUM ROSENBERGII*

JIANG Lan¹, DENG Guo cheng¹, SHI Guo bin¹, LIANG Sen han² and ZHENG Zhong²

(1. Pearl River Fishery Research Institute, CAFS, Guangzhou 510380;

2. The Use of New Technology Research Institute, Zhaoqing 526040)

Abstract: More than 10 strains were isolated from the diseased parts of the postlarvae of shrimp *Macrobrachium rosenbergii* with opaque muscle disease. One of strains was proved to be the pathogen by challenge test. This isolate was classified as *Staphylococcus xylosus* by the testing of ATB Expression automatic bacteria identifying instrument. It was coccus (dia 0. 8 —1. 1 μ m), Gram positive, neither polar flagellum, nor capsule and spores. Acid production from glucose, fructose, maltobiose, lactose, trehalose, arabinose and mannite. ONPG test, superoxidase and urease and were positive. Oxidase, coagulant of plasma, Voges proskauer reaction, arginine dihydrolase and ornithine decarboxylase were negative. Optimum growth temperature, salinity and pH range from 28 $^{\circ}$ C —37 $^{\circ}$ C, 0% —2%, 6—9, respectively. This isolated bacterium was highly sensitive to Drythromycin, Kanamycin, Cegatexin and Gentamicin etc.

Key words: *Macrobrachium rosenbergii*; Opaque muscle disease; Pathogen; *Staphylococcus xylosus*