

皱纹盘鲍脓毒败血症病原菌的发现及初步研究

马健民 王琦 马福恒 刘明清

(大连碧龙海珍品有限公司, 116044)

摘要 1992 年 9 月至 1994 年 11 月间,在大连沿海发现的致皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)脓毒败血症的一株病原菌,对皱纹盘鲍人工感染有很高的死亡率,并且与自然发病有相同的症状。其特征为:革兰氏染色阴性,短杆状,极生单鞭毛,无芽孢,氧化酶和过氧化氢酶均为阳性,发酵葡萄糖产酸不产气,0/129 10 μ g 敏感,0%和 8% NaCl 胨水中不能生长,不利用葡萄糖酸盐和蔗糖等,定名为坎氏弧菌(*Vibrio campbellii*)。

关键词 皱纹盘鲍,坎氏弧菌,脓毒败血症

北方沿海因皱纹盘鲍(以下简称鲍)的脓毒败血症的流行,致使天然、养殖鲍大量死亡。脓毒败血症成为当今养鲍业的最主要的流行性病害,已严重威胁到养鲍业的进一步发展。但,未见国内外对此详细报道。为此,1992 年 9 月至 1994 年 11 月,作者对鲍脓毒败血症的特征作了详尽的观察,调查了发病规律和流行范围,并对病原菌做了分离、鉴定和人工感染试验。

1 材料和方法

1.1 细菌的分离

选取症状明显的病鲍,割断左右壳肌与壳的联系后,翻转软体部,暴露出围心腔,用无菌毛细玻璃管吸取围心腔内的血淋巴液,于 2216E 培养平板上分离划线,30℃下培养 18~24 小时,选单菌落继续纯化后,存于含 3% NaCl 的营养琼脂斜面上备用。并按常规法免疫家兔,制备出抗血清。

1.2 人工感染试验

将纯培养细菌,接种于 2216E 培养平板上,培养 18~24 小时,用无菌海水按 Brown's 法制成试验所需浓度的菌悬液。选用壳长在 25~30mm 的健康鲍进行感染试验,同时设对照组。

注射法:注射位点在鲍右侧上足前部,注射后用含活性氯 1.0×10^{-6} 的海水浸浴消毒 30 分。

浸浴法:在含菌海水中浸浴 3 小时。经处理后的和对照的鲍分别放在 4 个水泥池内(大小为 40cm \times 35cm \times 30cm),淋水、充气饲养,水温控制在 21~22℃,饲以鲜海藻。

1.3 细菌的特征

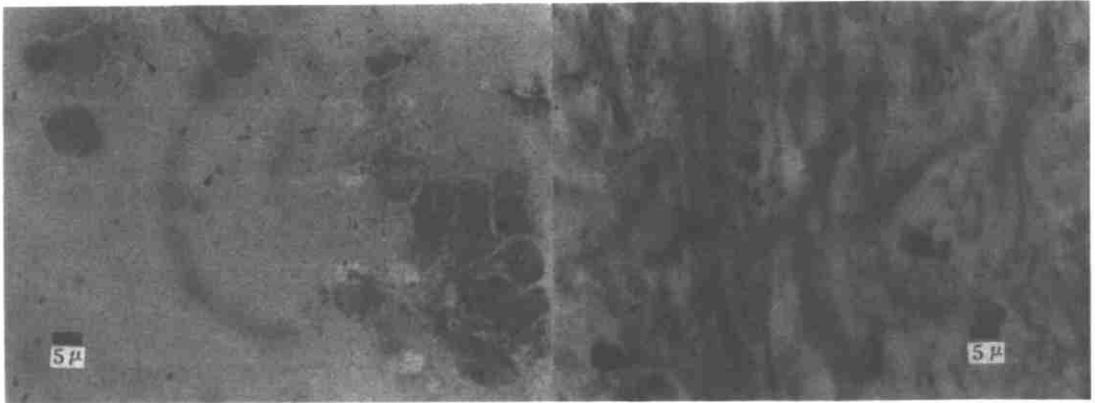
生理生化特征按一般细菌常用鉴定方法[中科院微生物研究所,1978]和医学细菌生化试

验鉴定手册[麦克法丁,1985年中译本]进行鉴定。

2 结果

2.1 病鲍特征

所有病鲍的围心腔都因充盈含细菌的血淋巴液而过分膨大。但外观症状典型地表现为二类:(1)腹足呈僵硬收缩状,表面具大小不等的脓疱,腹足底面尤多且大。(2)腹足呈松弛舒展状,表面偶见脓疱,肌肉组织极为疏松,腹足可用拇、食两指轻易捏穿。在经革兰氏染色的血淋巴液和脓汁涂片上,可见大量均一的革兰氏阴性、双端浓染的小杆菌及血淋巴细胞碎片(图版 I)。在肌肉组织切片上,可见组织间隙充满大量小杆菌,正常的组织结构已被破坏(图版 II)。



图版 I Plate I

病鲍血淋巴液涂片:显示双端浓染的革兰氏阴性小杆菌和血淋巴细胞碎片。
革兰氏染色($\times 1000$)。

图版 II Plate II

病鲍肌肉组织切片:显示被病原菌破坏的肌纤维及大量病原菌。
H.E染色($\times 1000$)。

2.2 人工感染试验

用从病鲍血淋巴液中分离出的 920918 菌株进行人工感染。注射法 5 天内的死亡率为 100%(表 1)。浸浴法 20 天内的死亡率为 75%(表 2)。人工感染得到的病、死鲍,外观症状明显表现为上述两类。其中,注射法表现为第二类,浸浴法表现为第一类。对照组个别死亡个体,不表现上述两类症状。从濒死病鲍血淋巴液中,又分离出细菌 2-2 株。

2.3 病原菌的特性

在 1992 年 9 月至 1994 年 11 月之间的发病季节中,凡具明显症状的病鲍的血淋巴液和脓汁液中,始终能分离到病原菌,且初次分离培养即为纯培养。在 30℃、18h 培养条件下,在

2216E 培养平板上,呈直径 1mm 左右,圆凸,周缘光滑,乳白色菌落。在 TCBS 培养平板上,呈直径为 2~3mm,圆而扁平,兰绿色菌落。其他生理生化特征见表 3。

表 3 表明:在人工感染试验中使用的 920918 菌株与再分离的 2-2 菌株,在培养、形态和生理生化特征完全相同,是同一菌株。据伯杰系统细菌学手册[Krieg 等,1984]的描述,定名为坎氏弧菌(*Vibrio campbellii*)。

表 1 920918 菌株注射鲍的感染效应
Table 1 Effect of Artificial Injection
of The Bacterium on Abalones

项目	菌悬液浓度 (cells/mL)	剂量 (mL)	死亡枚数/试 验枚数	致死时间 (天)
注射组	6.25×10^6	0.02	20/20	5
对照组	无菌海水	0.02	0/20	5

表 2 920918 菌株浸浴鲍的感染效应
Table 2 Effect of The Bacterium-bathing
Infection on Abalones

项目	菌悬液浓度 (cells/mL)	死亡枚数/试 验枚数	致死时间 (天)
浸浴组	3.5×10^8	15/20	20
对照组	无菌海水	1/20	20

2.4 鲍脓毒败血症发病情况

1992 年 9 月中旬,大连碧龙海珍品有限公司浮筏上的养殖鲍突然出现大量死亡,当时水温在 22℃ 左右。病、死鲍外观症状典型地表现为上述两类。至 11 月中旬,大量死亡现象基本停止,水温为 16℃ 左右。其后,1993 年 7 月底至 11 月下旬,1994 年 8 月初至 11 月中旬,脓毒败血症两度重复发生。在此期间,细菌培养结合抗血清凝集法检验证实 *V. campbellii* 在病、死鲍血淋巴液和脓汁液中的检出率达 95% 以上。

1993 年 7 月,在辽宁省长海县小长山岛某育苗室内大量死亡的当龄鲍(壳长为 8mm 左右)血淋巴液中检出 *V. campbellii*。同年 10 月,在大连新港大孤山的天然鲍(壳长 70~80mm)血淋巴液和脓汁液中检出 *V. campbellii*。

说明作为皱纹盘鲍病原菌的 *V. campbellii*,在时间上,已持续流行 3 年。在范围上,遍及大连沿海。

3 讨论

3.1 病原菌的致病能力

在人工感染试验中,采用无损伤的浸浴法感染后的实验用鲍,是在优良条件下饲养的,仍有 75% 的鲍因被感染而患病死亡。显然,*V. campbellii* 对皱纹盘鲍的致病能力,明显强于幼红鲍(*H. rutescens*)氧陶醉后令其全身性感染的溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)[Elston, 1983]。所要求的条件也低于因高水温造成鲍伤口发生溃疡[孟庆显,1988]的致病性细菌。

3.2 鲍的脓毒败血症

患脓毒败血症的病鲍特征为:在腹足的肌肉上有肉眼可见的脓疱,病原菌存在于血淋巴液中而遍布全身各组织、器官。细菌培养及血淋巴液和脓汁液涂片检查结果证实,鲍的脓毒败血症的病原菌只 *V. campbellii* 一种。*V. campbellii* 通过分泌胞外酶,破坏正常的组织结构而致鲍

死亡。造成外观症状表现为两类的详细机制,有待于进一步研究。

表 3 920918 菌株和 2-2 菌株的形态、生理生化特征

Table 3 Morphological, physiological and Biochemical Characteristics of The strains 920918 and 2-2

		920918 菌株	2-2 菌株	<i>V. campbellii</i>
特 征	革兰氏染色	G ⁻	G ⁻	G ⁻
	芽 孢	-	-	-
大 小	鞭 毛	(0.7~0.8) μ	(0.8~1.6) μ	
	直 杆	单极	单极	单极
在 NaCl(%) 中生长	固体复杂培养基上滑动	+	+	+
	色 素	-	-	-
温 度(°C)	发 光	-	-	-
	要求有机生长因子	-	-	-
生理特征	0	-	-	-
	3	+	+	+
产 生	6	+	+	+
	8	-	-	-
利 用	10	-	-	-
	4	-	-	-
0/129	30	+	+	+
	37	+	+	+
产 生	40	-	-	-
	43	-	-	-
利 用	氧化酶	+	+	+
	过氧化氢酶	+	+	+
利 用	精氨酸双水解酶	-	-	-
	V-P	-	-	-
利 用	D-葡萄糖产气	-	-	-
	L-赖氨酸脱羧酶	+	+	+
利 用	L-鸟氨酸脱羧酶	-	-	-
	L-精氨酸脱羧酶	-	-	-
利 用	ONPG(24h)	-	-	-
	NO ₃ → NO ₂	+	+	+
利 用	10 μ g	S	S	S
	150 μ g	S	S	S
利 用	淀粉酶	+	+	+
	明胶酶	+	+	+
利 用	脂 酶	+	+	+
	卵磷脂酶	+	+	+
利 用	D-木糖	-	-	-
	L-阿拉伯糖	-	-	-
利 用	D-半乳糖	+	+	-
	蔗 糖	-	-	-
利 用	乳 糖	-	-	-
	D-葡萄糖酸	-	-	-
利 用	柠 檬 酸	-	-	d
	D-甘露醇	-	-	d
利 用	肌 醇	-	-	-
	乙 醇	-	-	-
利 用	L-组氨酸	-	-	-
	L-精氨酸	-	-	-
利 用	D-果糖	+	+	+

3.3 鲍的脓毒败血症发病情况调查

1992年9月~1994年11月连续3年,我们对鲍脓毒败血症及病原菌进行跟踪调查发现:当水温升到16℃以上时,脓毒败血症即开始出现、传播和流行;降到16℃以下时,基本停止。水温越高,鲍患病的比率越大,死亡率越高。采用细菌培养结合抗血清凝集法,对病原菌 *V. campbellii* 检验中,我们发现:*V. campbellii* 感染皱纹盘鲍,对期龄无选择性。体长8mm以上,就可因被感染而患病死亡。*V. campbellii* 的潜伏越冬方式仍需进一步调查。

参 考 文 献

- [1] 中科院微生物研究所细菌分类组,1978。一般细菌常用鉴定方法,135~187。科学出版社(京)。
- [2] 麦克法丁 J.F.(林万明译),1985。医学细菌生化试验鉴定手册,236~244。人民卫生出版社(京)。
- [3] 孟庆显,1988。鲍的疾病与防治。海洋湖沼通报,(1):96~98。
- [4] Paul Baumann A. L. Furniss and John V. Lee: *Vibrio* Pacini 1854,411. In: *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*. 1 (ed by N. R. Krieg & J. C. Holt), Williams & Wilkins Baltimore 1934, pp.513~533.
- [5] Elston R. 1983. Histopathology of oxygen intoxication in the red abalone *Haliotis rufescens* Swainson. *J. Fish Diseases*, 6(2): 101~110.

A PATHOGEN OF SEPTICOPYAEMIA IN THE ABALONE *HALIOTIS DISCUS HANNAI* INO. DALIAN, CHINA

Ma Jianmin, Wang Qi, Ma Fuheng and Liu Mingqing

(*Dalian Bilong Seafood Co. Ltd., Dalian 116044*)

ABSTRACT This paper describes the characters of a strain of pathogenic bacteria of septicopyaemia in the abalone in Dalian in autumn months from 1992 to 1994. The strain isolated from the blood of the diseased abalone were shown to be the cause of the same symptom and high mortality by infection experiment. This strain are short rod shaped, scale: $0.7 \sim 0.8 \mu \times 0.8 \sim 1.6 \mu$. Gram-negative, no spore, single polar flagellum. Oxidase and catalase positive. Produce acid and not produce gas from glucose. Sensitive to 10ug of 0/129. Cannot utilise gluconate and sucrose, and cannot grow in liquid peptone medium containing 0% and 8% of NaCl. According to criterion of the Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1, the strain was assigned to the species *Vibrio campbellii*.

KEYWORDS *Haliotis discus hannai* Ino., *Vibrio campbellii*, Septicopyaemia