

对虾弧菌病致病菌——非 01 群霍乱弧菌的生理学性状及药物感受性*

郑 国 兴

(东海水产研究所)

提要 从患“弧菌病”的养殖对虾眼球及心脏血淋巴液中分离得的病原菌非 01 群霍乱弧菌,进行了其生理学性状及药物感受性的试验。试验表明,其生长的温度范围为 20—45°C,最适温度为 37°C;能在无盐蛋白胨水中生长,食盐浓度在 0.5—2.0% 时生长最旺盛,5% 时生长缓性,6% 以上不生长;pH5—10 范围内都能生长,pH8 时生长最好。对土霉素、氯霉素、四环素、红霉素、庆大霉素、卡那霉素高度敏感,对磺胺药加 AMP 和呋喃唑酮、呋喃妥因敏感;漂白粉 1PPM, 15 分钟即可杀灭病原。

主题词 对虾、非 01 群霍乱弧菌

1983 年 7—10 月上海市奉贤县对虾养殖场发生了一起当地称为“瞎眼病”的流行症,从病虾溃疡眼球上及心脏血淋巴液中分离到病原菌,经生物学性状的测定,鉴定为非 01 群霍乱弧菌 *Vibrio cholera* (non-01)^[1]。该病在 1984 年 7—10 月间同一地区也有发现,是当地对虾养殖的主要病害之一。

本文报导分离菌株的生理学性状,抗菌素药物感受性及漂白粉对其杀菌效力的试验结果,为控制疾病的蔓延和寻找有效的治疗药物提供科学依据。

材 料 与 方 法

1. 生理学性状

本试验及以下试验所用的非 01 群霍乱弧菌 *Vibrio cholera* (non-01) 是 1983 年 9—10 月从上海市奉贤县对虾养殖场垂死的东方对虾 *Penaeus orientalis* Kishinouye 溃疡的眼球上及心脏血淋巴液中分离的^[1]。温度、食盐浓度和 pH 对细菌生长影响的各项生理学性状的测定采用 1% 蛋白胨水,静置培养 24 小时后,用 721 型分光光度计(波长 600nm)分别测量细菌悬液的混浊度。

2. 抗菌药物敏感试验

采用纸片扩散法,试验用纸片是上海市医学化验所提供;培养基是水解酪蛋白琼脂(含 NaCl 1%),30°C 培养 24 小时后,测量抑菌圈的直径。

* 本所葛庆华同志帮助进行部份试验;沈亚林同志帮助绘图,特此感谢。

3. 漂白粉杀菌效力

称取适量漂白粉(含有效氯30%),用少量水调成糊状,然后加入已灭菌的生理盐水中,用连续稀释法配制成含漂白粉2、1、0.5、0.2和0.1PPM的溶液,以灭菌生理盐水作对照,在上述各浓度漂白粉溶液和对照的生理盐水中,分别加入在30°C中培养18小时的非O1群霍乱弧菌菌液,使每毫升液体含细菌 $3-4 \times 10^8$ 个接菌后15、30和60分钟时分别采样,以涂平板法计算存活的细菌数。

结 果

1. 生理学性状

温度对非O1群霍乱弧菌(9013菌株)生长的影响见图1。细菌生长的温度范围是20—45°C,最适生长温度是30—42°C,其中在37°C中生长最好,15°C和50°C时不能生长。

食盐浓度对非O1群霍乱弧菌(9013菌株)生长的影响见图2。如图所示,细菌在无盐蛋白胨水中生长良好,最适生长的食盐浓度是0.5—2.0%,细菌在5%食盐胨水中生长缓慢,6%中不长。

pH对非霍乱弧菌(9013菌株)生长的影响见图3。细菌在pH5—10中都能生长,最适pH6—9,其中在pH8中生长最好。

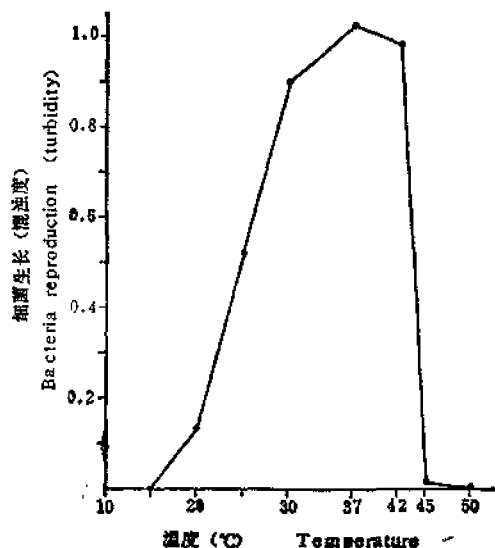


图1 非O1群霍乱弧菌[9013菌株]
生长与温度的关系

(培养基:1%蛋白胨水, NaCl 1%,
pH 7.6, 静置培养24小时)

Fig 1 The relationship between
temperature and bacteria reproduction
(Culture medium: Peptone water 1%; NaCl
1%; pH 7.6; stilling culture 24 hours)

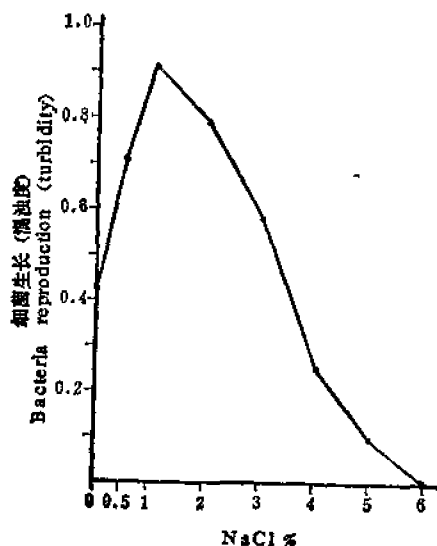


图2 非O1群霍乱弧菌[9013菌株]
生长与NaCl浓度的关系

培养基1%蛋白胨水, pH 7.6,
30°C静置培养24小时,

Fig 2 The relationship between
salinity and bacteria reproduction
(Culture medium: Peptone water 1%; pH 7.6;
temperture 30°C; stilling culture 24 hours)

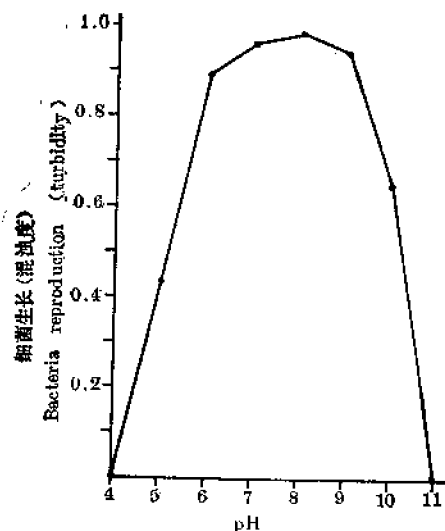


图3 非霍乱弧菌[9013 菌株]生长与 pH 的关系

(培养基 1% 蛋白胨水, NaCl 1%,
30℃, 静置培养 24 小时)

Fig3 The relationship between pH
and bacteria reproduction

(Culture medium: Peptone water 1%; NaCl 1%;
temperature 30℃; stilling culture 24 hours)

2. 抗菌药物敏感试验

非 O1 群霍乱弧菌对抗菌药物敏感试验的结果见表 1。所有试验菌株对土霉素、氯霉素、四环素、红霉素、庆大霉素、卡那霉素和新霉素都显示高度敏感;所有试验菌株对磺胺药 + AMP, 呋喃唑酮(痢特灵)和呋喃妥因也显示高度敏感。多粘菌素对非霍乱弧菌的抑制作用因菌株而异,9008、9031 和 9052 菌株呈现高度敏感,其余菌株为中度敏感。链霉素对所有试验菌株都是中度敏感。非 O1 群霍乱弧菌对青霉素 G、万古霉素和杆菌肽耐药。

3. 漂白粉对非 O1 群霍乱弧菌的杀菌效力

漂白粉对非 O1 群霍乱弧菌(9013 菌株)的杀菌效力见表 2。

细菌在 2 ppm 和 1 ppm 漂白粉溶液中作用 15 分钟后已检不出活菌。在 0.5 ppm 溶液中作用 15 分钟后,活菌数从每毫升 30 万个以上减少到 1 万 4 千个,30 分钟后剩 500 个/毫升,60 分钟后也检不出活菌。菌数在 0.2 PPM 漂白粉溶液中,随作用时间的增长也明显下降,作用 15 分钟后,菌数降低了约二分之一,30 分钟后每毫升的菌数降低到 41000 个,60 分钟后菌数只剩下 1600 个/毫升,约有 99.5% 的细菌被致死。在 0.1 ppm 溶液中,菌数随作用时间的延长也略有下降,但作用 60 分钟后,每毫升的活菌数依然有 20 万个。细菌数在对照的生理盐水中未见减少。

表 1 非 O1 群霍乱弧菌对抗菌药物的敏感度
 Table 1 The Sensitivity of *Vibrio cholera*(non-O1) to antibiotics

菌株号 No. of strains Antibiotics	9008	9011	9013	9014	9021	9031	9045	9052
青霉素 G (Penicillin G) 10 IU	-	-	-	-	-	-	-	-
链霉素 (Streptomycin) 10 µg	+	+	+	+	+	+	+	+
土霉素 (Terramycin) 10 µg	++	++	++	++	++	++	++	++
氯霉素 (Chloramphenicol) 30 µg	++	++	++	++	++	++	++	++
四环素 (Tetracycline) 30 µg	++	++	++	++	++	++	++	++
红霉素 (Erythromycin) 15 µg	++	++	++	++	++	++	++	++
庆大霉素 (Gentamycin) 10 µg	++	++	++	++	++	++	++	++
卡那霉素 (Kanamycin) 30 µg	++	++	++	++	++	++	++	++
新霉素 (Neomycin) 30 µg	++	++	++	++	++	++	++	++
万古霉素 (Vancomycin) 30 µg	-	-	-	-	-	-	-	-
多粘菌素 B (Polymyxin B) 300 IU	++	+	+	+	+	++	+	++
杆菌肽 (Bacitracin) 10 IU	-	-	-	-	-	-	-	-
磺胺药 + AMP (Co-trimoxazole) 25 µg	++	++	++	++	++	++	++	++
痢特灵 (Furazolidone) 100 µg	++	++	++	++	++	++	++	++
呋喃妥因 (Furantoin) 300 µg	++	++	++	++	++	++	++	++

表 2 漂白粉对非 O1 群霍乱弧菌(9013 菌株)的杀菌效力

Table 2 Effect of bleaching powder on the vibrio-cholera (non-O1)

漂白粉浓度 Concentration (ppm)	施药前的细菌量 bacteria No. before applying medicine (ind/ml)	施药后细菌量 bacteria no. after applying medicine(cells/ml)		
		15分钟 a quarter	30分钟 half hour	60分钟 a hour
0.1		840,000	800,000	200,000
0.2		170,000	41,000	1,600
0.5		14,000	500	0
1.0		0	0	0
2.0		0	0	0
对照 (Contrast)		320,000	370,000	310,000

注:漂白粉含有效氯 30%。active chlorine in bleaching powder is 30%.

讨 论

弧菌是对虾养殖池中的正常菌群^[3],也是对虾体内的正常菌群^[4],一旦条件合宜便大量繁殖,引起疾病的流行,属条件致病菌^[5]。1983 和 1984 年 7—10 月,上海市奉贤县对虾养殖场都发现由于非 O1 群霍乱弧菌引起的疾病,这与奉贤县对虾养殖场的自然环境密切相关。奉贤县对虾养殖场,位于杭州湾口的北侧,由于钱塘江淡水的注入,海水盐度低,一般约在 6‰—9‰ 左右,非 O1 群霍乱弧菌能在淡水中生长,最适宜在低盐(0.5—2‰)的环境中生长,奉贤养殖场的低盐环境正为非 O1 群霍乱弧菌的繁殖提供了最适宜的盐度。奉贤养殖场在对虾养成期间(5 月底—11 月初)的水温一般在 20℃ 以上,夏季高温时节(7 月中旬—9 月上旬)水温日平均一般都大于 30℃,有时竟高达 34℃ 以上,高水温也为非 O1 群霍乱弧菌生长繁殖提供了一个最适宜的温度条件。养殖场池水的 pH 值都偏于碱性,一般 pH 值在 8.4—8.9 左右,有时也可高达 9.2,这与非 O1 群霍乱弧菌生长所需的最适 pH 值相吻合。由于奉贤养殖场池水的温度,盐度和 pH 值都处于非 O1 群霍乱生长的最适范围内,又由于养虾期间每日投饵,水中有机物质也十分丰富,给非 O1 群霍乱弧菌的生长繁殖提供了良好的环境条件,因此每年 7—10 月在该地都引起疾病的流行,应引起我们注意。

国外治疗对虾弧菌病的方法是在饵料中加入土霉素,每公斤对虾投喂 360mg。Lebitous (法国国家海洋开发中心)曾报导每公斤对虾投喂 40mg 的土霉素有效。1975 年 8 月,在墨西哥佩

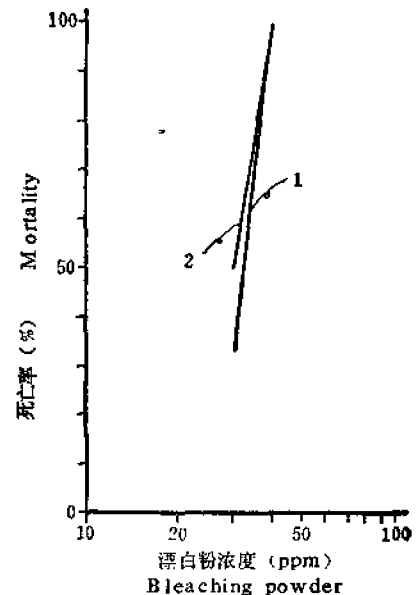


图 4 对虾对漂白粉的中间忍受限制
Fig 4 The TLm of bleaching powder to penaeid shrimp

1. TLm₂₄——32ppm
2. TLm₄₈——30ppm

尼亚期科港饲养的青对虾 *P. stylirostris* 当发生弧菌病时,在每公斤饵料中加入呋喃那斯(Furanace)和泰洛星(Tylosin),有效剂量 100mg,喂养 14 天,效果显著^[2]。作者对非01群霍乱弧菌的药敏试验表明,土、氯、四环、红、卡那、庆大,新霉素等抗生素,磺胺药物+AMP,呋喃妥因,呋喃唑酮等药物对该菌都有明显的抑制作用。但考虑上述药物比较昂贵,而且病菌主要存在于患病虾塘的水中,通过水与健康虾的接触而传染。因此为了控制疾病的流行,对患病虾塘的水质进行消毒灭菌十分重要。漂白粉对非 01 群霍乱弧菌的杀菌效力十分显著,但漂白粉对对虾的药浴毒性如何呢?作者为了弄清漂白粉对对虾的药浴毒性,曾做了试验,对虾在漂白粉溶液中药浴时的状态及半致死剂量的结果见表 3 和图 4。对虾在漂白粉浓度 10 ppm 以下的溶液中未见异常,在 20 ppm 时开始出现烦躁不安,浓度达 40 ppm 时完全不能忍受,起初狂游乱窜,以后行动迟缓,进而侧翻,试验虾全都在 24 小时内死亡。漂白粉溶液对中国对虾 24 小时的半致死剂量是 32 ppm。而病菌在 0.2 ppm 的漂白粉溶液中已难于生存,考虑到饲养池水中有机物的影响,对患病虾塘可采用 1 ppm 漂白粉全池泼洒,以达到消灭水中病菌的目的,在此浓度下对虾是十分安全的。作

表 3 中国对虾在漂白粉溶液中药浴时的状态

Table 3 The states of penaeid shrimp in bleaching powder waters

药物浓度 Concentration (ppm)	药 浴 时 间(小时) Time(hr.)							死亡数 Killed (ind.)	存活数 Living (ind.)
	2	4	6	8	12	24	48		
50	行动迟缓 一尾侧翻 act slowly 1 overturned	一尾死亡 4 尾侧翻 1 Killed 4 overturned	4 尾死亡 一尾侧翻 4 Killed 1 overturned	一尾死亡 1 killed				6	0
40	狂游乱窜 harassment	行动迟缓 act slowly	行动迟缓 二尾侧翻 act slowly 2 overturned	二尾死亡 三尾侧翻 2 Killed 3 overturned	三尾死亡 一尾侧翻 3 Killed 1 overturned	一尾死亡 1 killed		6	0
30	反复上下游动 restless	行动迟缓 act slowly	行动迟缓 act slowly	行动迟缓 一尾侧翻 act slowly 1 overturned	一尾死亡 一尾侧翻 1 Killed 1 overturned	一尾死亡 1 killed	一尾死亡 1 killed	3	3
20	稍不安定 slight restless	不安定 restless	行动迟缓 act slowly	行动迟缓 act slowly	一尾侧翻 1 overturned	一尾死亡 1 killed	其余活动 恢复正常 slight restless	1	5
10	无变化 non-abnormal	无变化 non-abnormal	无变化 non-abnormal	无变化 non-abnormal	无变化 non-abnormal	无变化 non-abnormal	无变化 non-abnormal	0	6
5	无变化 non-abnormal	无变化 non-abnormal	无变化 non-abnormal	无变化 non-abnormal	无变化 non-abnormal	无变化 non-abnormal	无变化 non-abnormal	0	6
对照 contrast	无变化 non-abnormal	无变化 non-abnormal	无变化 non-abnormal	无变化 non-abnormal	无变化 non-abnormal	无变化 non-abnormal	无变化 non-abnormal	0	6

注: 试验虾每组 6 尾。体长: 8.5—10.5cm; 水温: 22—24℃; pH: 8.0—8.2; S: 7‰。漂白粉含有效氯为 30%。

6 Shrimps in a experimental group. body length 8.5—10.5cm; Water temperature 22—24℃; pH 8.0—8.2; Salinity 7‰; active chlorine in bleaching powder 30%.

者在 84 年 8 月对奉贤县养殖场患病虾塘,曾采用 1PPM 漂白粉作全池泼洒,第二天病虾显著减少,仅在池边发现少量病虾,3—4 天后不再找到病虾了。

参 考 文 献

- [1] 郑国兴, 1986. 养殖对虾弧菌病致病菌——非 01 群霍乱弧菌的生物学性状与致病性. 水产学报, 10(2): 195—203.
- [2] Lightner, D. V., 1977 Shrimp diseases. In C. J. [Sindermann ed., *Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture*. Elsevier Scientific Publ. Co., Amsterdam—Oxford—New York.
- [3] Vanderzant, C., R. Nickelson and P. W. Judkins, 1971. Microbial flora of pond-reared brown shrimp (*Penaeus aztecus*). *Appl Microbiol* 21(5): 916—921.
- [4] Yasuda, K. and Kitao, T., 1980. Bacterial flora in the digestive tract of prawns, *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture* 19(3): 229—234.

PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS AND DRUG SENSIBILITY OF VIBRIO CHOLERA (NON-01) ISOLATED FROM THE ULCEROUS EYEBALLS OF PENAEID SHRIMP

Zheng Guoxing

(The Dong Hai Fisheries Research Institute)

ABSTRACT In this paper, physiological characteristics and drug sensitivity of vibrio cholera (non-01) isolated from the ulcerous eyeballs and hemolymph of diseased penaeid shrimp (*Penaeus orientalis* Kishinouye) are described. Effects of temperature, salinity and pH on the growth of the organism were examined: It grew in 1% peptone water at temperatures of 20–45°C (Optimum range 30–42°C), at salinity of 0–5‰ (Optimum 0.5–2‰) and a pH from 5 to 10 (Optimum 6–9) respectively.

All the isolated strains were highly sensitive to Terramycin, Chloramphenicol, Tetracycline, Erythromycin, Gentamycin, Kanamycin and Neomycin and also to Cotrimoxazole, Furazolidone and Nitro-furantoin. But they were not sensitive to Penicillin G, Vancomycin and Bacitracin.

In the solution of bleaching powder (contains active chlorine 30%) at 0.2 ppm for 60 minutes, the bacteria were 95.5% killed. It was successfully treated with bleaching powder at 1 ppm in the culture water for controlling this vibrio cholera (non-01) in penaeid shrimp.

KEY WORDS Penaeid shrimp, *Penaeus orientalis*, Vibrio Cholera (non-01) Vibriosis.