

对虾红肢病发病机制的研究

赵增元¹ 李天保¹ 郭文¹ 王勇强¹ 李美芝¹

孙吉贵² 宋万水² 刘洪广²

(¹山东省海水养殖研究所 青岛 266071)

(²乳山市对虾育苗场 264515)

提要 1990~1993年试验使用副溶血弧菌及溶藻弧菌感染获得成功。在试验过程中发现,环境及对虾体质对对虾感染死亡率影响甚大,恶劣环境中的死亡率比优良环境中的死亡率高出83.3%;体质差的对虾感染后的24h死亡率是正常对虾的2.5~3倍。为此,在对虾养殖生产中除应注意消灭病原菌外,还应注意优化养殖环境与增强对虾体质的问题。

关键词: 对虾,红肢病,发病机制,病原菌,环境,对虾体质

1990~1993年我们在对虾红肢病防治研究过程中,对健康对虾进行了多种方式的人工感染试验,试验结果进一步验证了造成对虾染病及死亡除与病原体的存在有关,还与对虾所处的环境条件及对虾的体质状况有密切的关系。

1. 试验材料与方法

1.1 感染用菌株来源

1.1.1 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)标准菌株由中国预防医学科学院流行病学、微生物学研究所提供。

1.1.2 红肢病虾的致病菌 取活体病虾,按无菌操作取淋巴液及肝胰脏,接种于2216E培养基上,25℃下恒温培养2~3d,选取形态一致的单个菌落,重复划线培养,所获取的纯培养。

1.2 人工感染方法

1.2.1 不同方式的人工感染

1.2.1.1 注射感染 取培养18~24h的细菌,根据所需感染剂量制成不同密度的菌悬液,

使用中国药品生物制品检定所生产的比浊管测定菌悬液密度。注射部位为对虾第二腹节侧面,注射量为0.02~0.025ml,对照组在相同部位注射等量的生理盐水。

1.2.1.2 经口感染 试验用虾平均体长为7cm,感染用饵料是用副溶血弧菌、溶藻弧菌标准菌株制成的菌饵以及自然霉变的配合饵料,菌饵的含菌量为 $1\ 000 \times 10^4$ 个/g干饵。每日足量投喂。

1.2.2 不同环境的感染

1.2.2.1 洁净环境内的感染 试验在0.4m³的玻璃钢水槽中进行,试验用水为新鲜砂滤海水,试验中每日部分换水。

1.2.2.2 恶劣环境下的感染 在0.4m³的玻璃钢水槽底部铺一层虾池池底污泥,过量投饵人为恶化水质,试验用水为虾池排出的废水,试验中不换水。

1.2.2.3 养虾池内的人工感染 感染用虾

收稿日期:1994年11月21日

放养于 90cm×70cm×30cm 的封闭网箱内,网箱放置于池水的中、底二层,中层网箱距水面约 70cm,底层网箱沉于池底。

1.2.3 不同体质对虾的人工感染 试验前将虾分为两组进行驯养。一组按照生产中的正常管理方法,适量投喂优质配合饲料及鲜贝肉,定期换水。另一组过量投喂豆饼,不换水,人为恶化水质,降低对虾体能。经半月驯养后再进行人工感染试验。

1.3 感染后病原菌的再分离

取试验中受感染的病虾,按 1.1.2 的方法进行病原菌的再分离。

2. 结果

2.1 病原菌的分离

从 12 尾病虾体内皆分离出细菌。在 2216E 培养基上 25℃ 培养 2d 后,形成圆形、半透明、稍凸起、光滑湿润的菌落,镜检无芽胞、无荚膜、运动活泼,革兰氏阴性。在 TCBS 培养基上为蓝色菌落,经鉴定为副溶血弧菌。

2.2 人工感染

2.2.1 注射感染

表 1 副溶血弧菌、溶藻弧菌标准菌株的感染试验

Tab. 1 The infection test by *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus*

序号	注射物	注射量 (10 ⁴ /g 虾)	试验 虾数	试验结果	感染率 (%)	死亡率 (%)
1	生理盐水	0.02ml	10	24h 全部正常	0	0
2	副溶血弧菌	400	10	4.5h 全部死亡	100	100
3	溶藻弧菌	360	10	3h 死亡 9 尾, 1 尾有红肢症状存活 24h	100	90

使用副溶血弧菌、溶藻弧菌标准菌株及从病虾体内分离出的菌株进行注射感染,均引起健康虾出现红肢病症状,并可造成对虾死亡,感染率及死亡率的高低与注射量的大小有关。

2.2.2 经口感染

表 2 从病虾体内分离出的菌株感染试验

Tab. 2 The infection test by isolate from the diseased prawn

序号	注射物	注射量 (10 ⁴ /g 虾)	试验 虾数	试验结果	感染率 (%)	96h 死亡率 (%)
1	生理盐水	0.02ml	10	96h 全部正常	0	0
2	9012*	50	10	96h 死亡 3 尾, 存活虾中 1 尾出现红肢	40	30
3	9012	100	10	96h 死亡 4 尾, 存活虾中 2 尾出现红肢	60	40
4	9012	150	10	96h 死亡 8 尾, 存活虾中 2 尾出现红肢	100	80
5	9012	200	10	96h 死亡 10 尾	100	100
6	9012	250	10	96h 死亡 10 尾	100	100

*9012 为从红肢病虾体内分离出的菌株,经鉴定为副溶血弧菌。

表 3 菌饵对体长 7cm 对虾的感染试验

Tab. 3 The infection test by the artificial food mixed bacteria

饵料种类	试验 虾数	试验水 体(L)	饵料含菌量 (10 ⁴ /g 干饵)	投饵量 (g/d)	试验期 (d)	结果	存活 虾数
副溶血弧菌 饵料	10	200	1000	4	7	均未出现病症	8
溶藻弧菌 饵料	10	200	1000	4	7	均未出现病症	9
霉变配合 饵料	10	200	自然	4	7	正常生长	8
配合 饵料	10	200	/	4	7	正常生长	9

利用菌饵、霉变饵料饲喂 7cm 的对虾,经 7d 均未造成对虾染病,试验虾的生长发育状况及存活状况与对照组基本一致。

2.2.3 不同环境的感染试验

在室内外的试验中,死亡的对虾均呈红肢病症状。在注射后的第一天,各试验组均出现外观具红肢病症状的对虾,但在较好的环境中,未经治疗,病虾外观症状逐日减轻,直至消失。在不同环境中,注射同剂量(10⁴/g 虾)的同种病原菌,结果大相径庭,土池中感染后对虾存活率皆为

100%；在玻璃钢槽内，良好环境中存活率为 66.7~83.3%；而恶劣环境中对虾存活率仅为 16.7%。

表 4 室内玻璃钢槽内的感染试验

Tab. 4 The infection test in the fibreglass tanks

序号	底质	试验用水	对虾体长 (cm)	注射物	注射量 (10 ⁴ /g 虾)	试验虾数 (尾)	存活数				96h 存活率 (%)
							24h	48h	72h	96h	
1	泥底	A	7.5	生理盐水	0.02ml	6	6	6	6	6	100
2	泥底	A	7.5	溶藻菌	10	6	5	1	1	1	16.7
3	泥底	A	7.5	溶藻菌	10	6	6	1	1	1	16.7
4	净底	B	7.5	生理盐水	0.02ml	6	6	6	6	6	100
5	净底	B	7.5	溶藻菌	10	6	5	4	4	4	66.7
6	净底	B	7.5	溶藻菌	10	6	6	5	5	5	83.3

注：A. 虾池排出水，试验中不换水。水温：25.6~26.5℃，溶解氧上午 2.7~3.8mg/L，下午 4.9~5.0mg/L。

B. 砂滤海水，试验中换水。水温 25.6~26.4℃，溶解氧上午 4.0~4.2mg/L，下午 5.2~5.5mg/L。

表 5 室外虾池内的感染试验

Tab. 5 The infection test in the prawn pond

序号	网笼所处水层	对虾体长 (cm)	注射物	注射量 (10 ⁴ /g 虾)	试验虾数 (尾)	存活数				96h 存活率 (%)
						24h	48h	72h	96h	
1	底层	8.0	生理盐水	0.02ml	8	8	8	8	8	100
2	底层	8.0	溶藻菌	10	8	8	8	8	8	100
3	底层	8.0	溶藻菌	10	8	8	8	8	8	100
4	中层	8.0	生理盐水	0.02ml	8	8	8	8	8	100
5	中层	8.0	溶藻菌	10	8	8	8	8	8	100
6	中层	8.0	溶藻菌	10	8	8	8	8	8	100

注：水温：25.8~29.0℃。溶解氧上午 4.0~5.0mg/L，下午 10.3~13.6mg/L。

2.2.4 不同体质对虾的人工感染

在第一次感染试验中，平均体长为 7.10cm 的对虾经 11d 驯养后，正常驯养者 7.75cm，恶化驯养者为 7.24cm。人工感染 96h 后，恶化驯养组存活率最低，为对照组的 50%，为正常驯养组的

75%。感染后对虾发病及死亡主要发生在 48h 内。24h 正常驯养对虾死亡 15%，恶化驯养对虾死亡 37.5%。第二次感染试验用虾驯养前平均体长为 6.96cm，经 13d 驯养后正常驯养组为 7.5cm，恶化驯养组为 7.2cm。在注射量为 10×10⁴/g 虾时，正常驯养组 96h 存活率为 66.7%，恶化驯养组为 16.7%；在注射量为 20×10⁴/g 虾时，正常驯养组存活率为 30%，恶化驯养组为 10%，两组对照组均为 100%。感染后对虾的发病及死亡也都发生在 48h 内。24h 正常驯养组对虾死亡 9%，恶化驯养组死亡 27.3%。

2.3 感染后病原菌的再分离

结果同 2.1。生物学特性另作报道

表 6 不同体制质对虾的人工感染试验

Tab. 6 The infection test on the prawn between different constitution

序号	注射物	注射量 (10 ⁴ /g 虾)	试验虾来源	试验虾数	存活数				96h 存活率 (%)	
					24h	48h	72h	96h		
第 I 次	1	生理盐水	0.02ml	正常驯养	10	10	10	10	9	90
	2	溶藻菌	20	正常驯养	40	34	25	24	24	60
	3	生理盐水	0.02ml	恶化驯养	10	10	9	9	9	90
	4	溶藻菌	20	恶化驯养	40	25	19	18	18	45
第 II 次	1	生理盐水	0.02ml	正常驯养	6	6	6	6	6	100
	2	溶藻菌	10	正常驯养	12	11	8	8	8	66.7
	3	生理盐水	0.02ml	恶化驯养	6	6	6	6	6	100
	4	溶藻菌	10	恶化驯养	12	11	2	2	2	16.7
	5	溶藻菌	20	正常驯养	10	9	3	3	3	30
	6	溶藻菌	20	恶化驯养	10	5	1	1	1	10

3 讨论

3.1 关于病原菌的问题

许多研究结果证明^[1~3]，对虾红肢病是一种细菌性疾病，病原菌为多种弧菌及某些杆菌，我们也从红肢病虾体内分离出副溶血弧菌，且人工感染获得成功。在试验中观察到，感染后对虾的

发病率及死亡率的高低与感染剂量的大小有关。注射剂量过大时,在3~4h内,对虾未出现明显外观症状便会造成死亡。在注射剂量较小时,有些对虾仅出现轻微症状,且不一定会导致对虾死亡(见表1,2,5)。对虾表现症状及发生死亡大多在被感染后48h内,此后多数存活对虾一般可以逐渐恢复正常(见表5,6)。因此,虽然副溶血弧菌是对虾红肢病的病原菌之一,但是并非对虾感染到病原菌就一定会造成死亡。所以在对虾养殖生产中注意减少病原体是重要的,但在目前尚难完全除掉病原体的情况下,更应重视环境优化及增强对虾体质的问题。

3.2 关于感染途径问题

虽然对虾红肢病的病原体已经清楚,人工注射感染也获得成功,但在养殖生产中的感染途径问题仍有待进一步研究。对虾蜕壳、受伤有可能导致感染,但从生产中红肢病发病之快、之广及死亡率之高来看,不可能仅有上述感染途径。虽然我们的经口感染试验没有获得成功,但仍不能排除这条感染途径。我们的试验是在良好的环境中进行的,对虾体质亦较健壮,如果对虾体质较弱、虾池环境较恶劣,对虾处于紧迫状态下产生应激反应时,也有可能经消化系统造成感染。在对虾育苗生产中发生由弧菌(*Vibrio* spp)感染造成菌血症暴发之前,也多次观察到首先出现肠道细菌感染现象(中肠围食膜外有细菌活动)。

3.3 关于虾池环境问题

在不同环境中,对同一虾池的对虾进行同菌株同剂量的感染,结果在虾池内感染的对虾的96h死亡率为0;在室内较好环境试验组的对虾的96h死亡率为25%;恶劣环境试验组96h的死亡率高达83.3%(见表4,5)。3个试验组除环境的稳定性差异较大外,从检测结果来看,水中的溶解氧含量差异也较大,室外虾池的溶解氧含量最高,上午为4.0~5.0mg/L,下午为10.3~13.6mg/L;室内使用过滤海水组次之,上午为4.0~4.2mg/L,下午为5.2~5.5mg/L;室内不换气组量低,上午为2.7~3.8mg/L,下午为4.0~5.0mg/L。与试验对虾存活率呈正相关。过去我

们在对虾育苗中也曾观察到,当水中溶解氧含量下降到4.0mg/L以下时,幼体体内带菌率明显上升。因此,对虾发病是否与水中溶解氧含量过低有一定关系还需进一步研究。在对虾养殖生产中,红肢病多发于养殖后期,一般此时虾池环境都已较差,池底污染相对较重,所以要防止红肢病的发生必须重视池水、池底的优化问题。注意减轻虾池的自身污染,定期使用一些对对虾无害的池水、池底改良剂等都是防病的有效措施。

3.4 关于对虾体质问题

我们发现,在同一批试验虾中,有的对虾被感染后发病死亡;也有的在被感染后出现红肢症状,但在未经治疗的情况下,约经48h症状消失,对虾恢复正常,仅在针孔处留下一个黑色斑点;还有一部分试验虾,被感染后注射部位肌肉逐步变白,经24~48h后又还渐变黄,最后转为黑褐色。解剖观察,注射处形成一肉芽肿样黑色“包块”,内部充满大量活菌。大约经40d左右,黑色“包块”可全部消失。由此可见,对虾对侵入体内的细菌有一定的抵御能力,并非是病原菌一旦侵入对虾体内便一定会造成对虾发病死亡,而与对虾的体质状况有很大的关系。同一批对虾经11~13d不同方式驯养后,体长出现0.30~0.51cm的差异,感染试验的结果表明经恶化驯养的对虾死亡率皆高于正常驯养的对虾,尤其是在感染后的24h内,前者为后者的2.5~3倍(表6)。

因此,在对虾养殖生产中必须注意对虾的体质问题,应重视苗种质量、饲料的营养及虾池环境等环节,增强对虾体质及对病原菌的抵御能力,以减少虾病的发生。我们认为,对细菌性疾病是这样,对病毒性疾病可能也适用。

参考文献

- [1] 孟庆显,1991.对虾疾病防治手册.青岛海洋大学出版社,87~91。
- [2] 叶孝经等,1986.海洋水产研究丛刊 30:11~18。
- [3] 许兵等,1992.水产学报 16(2):130~136。

STUDY ON THE MECHANISM OF RED APPENDAGES DISEASE OF PRAWNS

Zhao Zengyuan¹, Li Tianbao¹, Guo Wen¹, Wang Yongqiang¹, Li Meizhi¹, Sun Jigui², Song Wanshui² and Liu Hongguang².

(¹Shandong Marine Cultivation Institute Qingdao 266002)

(²Rushan Prawn Nursery 264515)

Received: Nov. 21, 1994

Key words: Prawn, Red appendages disease, Disease mechanism, Environment, Constitution of prawn

Abstract

The prawn red appendages disease is caused by some infecting vibrio or bacillus. The experiment we conducted on the infection of the prawn with *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* as proved successful. We found that the environment and constitution of the prawn had a great influence on the mortality of the prawn infected. Which is 83.3% more in adverse environment than that in favorable environment. After infection, the mortality of the prawn with a poor constitution is 2.5 to 3 times that of the normal ones within 24 hours. Therefore, in the course of production of farming prawn, the problem of improving culture environment and building up constitution of the prawn must be solved in addition to sterilizing germ.