

## 1992~1993年福建南部地区虾病的调研\*

## SERIOUS EPIDEMIC DISEASES OF CULTURED PENAEID IN SOUTHERN FUJIAN DURING 1992~1993

苏永全 蔡心一 王 军

(厦门大学海洋系亚热带海洋研究所 361005)

1992年7月~1993年11月,福建养殖对虾发生了数起严重的流行性虾病,病发高峰期分别出现在1992年7月(发病对象为长毛对虾和斑节对虾)、1992年9月(日本对虾)、1993年5月(中国对虾,斑节对虾,长毛对虾和日本对虾)和1993年10月(日本对虾)。本文对上述4次虾病做了调研,探讨了细菌、病毒和某些生态因子的变化与虾病的关系。

## 1 材料与方 法

1.1 细菌的检测 材料取自同安西柯万亩对虾养殖池(表1),采集方法按微生物调查规范<sup>[1]</sup>,3h内带回实验室。检测按陈和范等<sup>[2,3]</sup>方法分离、培养、鉴定和计算水样及泥样中的异养细菌、粪大肠菌群、反硝化细菌、反硫化细菌、弧菌和副溶血弧菌的数量;活虾(包括病虾及非病虾)的弧菌样品是用灭菌棉签粘取肝脏病菌,立即涂抹于TCBS琼脂平板上,37℃恒温培养后,再进一步鉴定<sup>[5,6]</sup>。

1.2 病毒检测 样品于1992年7月~1993年11月间在同安和漳浦等地的养殖虾池定期或不定期(发病期)采集。病毒及其包含体的检测方法:(1)简易快速诊断法:现场检测对虾包含体。在发病虾池和未发病虾池各随机取样30尾,放入容量为15L的塑料桶(内盛海水约10L)中,几小时后收集粪便样品;或直接取对虾肝胰脏(L-P)样品于载玻片上,用锋利小刀切碎,加适量的0.1%的孔雀绿或1%曙红Y染色5min,显微镜下检查包含体。(2)组织切片:剥去现场采集的活虾(病虾和未发病虾)的头胸甲,取出L-P,切成3mm左右方块,Davidson液固定,2d后移入70%乙醇中保存。常规切片和H-E染色,光镜下检查包含体。(3)电镜观察:a.现场取活虾的L-P,切成1mm左右的方块,迅速固定于3.0%的戊二醛中,12h后取出,用磷酸缓冲液洗涤保存后待检测;b.用灭菌针筒抽取长毛对虾病虾头胸甲两侧壳内的水泡液,高速冷冻离心分离处理,得到的含病毒

提取液,用2%磷钨酸负染,电镜观察。

## 2 结果与讨论

## 2.1 四次流行性虾病的主要症状

1992年7月 斑节对虾:体长10~12cm;体表无光泽,褐色,粘附脏物;黄鳃;头胸甲呈双壳状;L-P肿大,有的糜烂;胃空,肠空;3d内暴死。长毛对虾:体长9~10cm;体表干净,有光泽;黄鳃,有的鳃盖内有椭圆形水泡,泡液无色;L-P红肿,有的“硬化”;胃肠空;3~5d暴死。

1992年9月 日本对虾:体长3~5cm;断须;第六腹节腹部微红,尾扇发红,有的末端有肉质肿块;头胸部发白;L-P有的红肿,有的萎缩或变硬;空胃空肠;病程7d或更长时间。

1993年5月 斑节对虾,中国对虾和长毛对虾:体长3~7cm;黑(黄)鳃,体外表光滑;胃肠空;L-P红肿,有的糜烂;3~5d死亡;日本对虾:体长8~12cm;黑(黄)鳃;肝胰脏红肿;5~7d死亡。

1993年10月 日本对虾:体长3~5cm;除了与1992年9月的症状相似外,尚有a:发病前1周,摄食量不减或更大,4d后锐减;b:病程可拖到10~20d。

## 2.2 细菌及生态因子与虾病的关系

2.2.1 弧菌 TCBS平板分离(包括水样、泥样和对虾肝脏)的菌株皆为短杆菌(0.4~0.8×1.5~3.0μm),氧化酶反应为阳性,革兰氏染色为阴性,以极生单鞭毛运动,对新生霉素(小圆滤纸为载体,含量10μg)表现出敏感反应,鉴定为弧菌属<sup>[10]</sup>。

由TCBS平板37℃培养24h的弧菌,出现两大类的菌落:一类呈蓝绿色(BG类),圆形,直径约2~3mm,扁平光滑,中心增厚不透明,较润湿;另一类呈黄色(Y

\* 福建省水产厅资助项目。

类),圆形,直径5mm左右,扁平光滑,中心不透明,但周围半透明,较润湿;将这两类分别再做TCBS平板划线,

于42℃培养24h,BC类的生长良好,而Y类的有30~40%死亡;再将BG类和Y类分别做三碳铁(TSI)琼脂

表1 对虾养殖水和泥中的细菌数

日期	采集地	W/M	异养细菌数	粪大肠菌群	反硝化菌	反硫化菌	弧菌总数	副溶血弧菌	pH	DO (mg/L)	D (°C)	S	虾种 Shrimp
1992	南堤9号池	W	188	92	480	1 200	90.0	15.0	7.1	6.9	22.0	25.6	<i>Penaeus japonica</i>
11.10	东头埔1号池	W	59	44	45	23	2.5	2.5	7.6	7.8	21.5	16.5	<i>P. japonica</i>
10.38	进水沟	W	108	332	170	430	37.5	14.0	6.9	7.0	22.0	16.5	
1992	南堤9号池	W	119	120	1 044	1 680	75.0	29.5	8.1	7.0	18.5	22.9	<i>P. japonica</i>
12.19	东头埔1号池	W	34	19	61	89	7.5	4.5	7.8	6.8	19.0	20.3	<i>P. japonica</i>
09.50	进水沟	W	120	230	UD	UD	45.0	14.0	7.8	7.0	19.0	20.3	
1993	南堤9号池	W	67	50	760	1 100	14.0	7.5	8.1	7.2	13.5	25.6	<i>P. japonica</i>
02.09	东头埔1号池	W	21	14	88	65	7.5	2.5	8.3	7.6	12.5	27.0	<i>P. japonica</i>
11.20	进水沟	W	31	35	89	208	9.5	7.5	8.0	7.0	13.0	27.0	
1993	南堤9号池	W	56	77	560	890	4.5	4.5	8.5	9.2	14.0	26.5	<i>P. japonica</i>
03.05	东头埔1号池	W	43	34	121	224	2.5	4.5	8.5	9.2	14.0	27.0	<i>P. japonica</i>
10.40	进水沟	W	22	89	UD	UD	2.5	2.5	8.5	7.2	14.0	27.0	
1993	南堤9号池	W	96	48	622	823	2.5	4.5	8.3	7.3	18.0	26.9	<i>P. japonica</i>
03.15	东头埔1号池	W	48	25	232	440	2.5	4.5	8.4	9.3	19.0	26.9	<i>P. japonica</i>
11.00	进水沟	W	43	77	224	403	9.5	9.5	8.4	7.0	19.0	26.9	
1993	南堤9号池	W	77	32	572	930	2.5	25.0	8.3	9.1	18.0	21.7	<i>P. japonica</i>
03.20	东头埔1号池	W	62	32	UD	UD	2.5	25.0	8.3	9.2	19.0	21.7	<i>P. japonica</i>
09.45	进水沟	W	68	44	288	410	4.5	25.0	8.2	7.0	18.5	20.4	
1993	东头埔1号池	W	53	22	276	388	45.0	14.0	8.3	8.2	21.0	19.1	<i>P. japonica</i>
03.28	东头埔1号池	M	44	18	320	270	255.0	25.5					
10.50	进水沟	W	72	56	UD	UD	25.0	14.0	8.2	7.3	22.0	19.1	
1993	东头埔1号池	W	79	20	404	288	25.0	25.0	8.2	7.6	18.5	16.5	<i>P. japonica</i>
04.07	东头埔1号池	M	2 300	20	437	423	4 200	42					
10.40	进水沟	W	59	110	340	404	25	110	8.3	6.9	18.5	16.5	
	进水沟	M	3 400	16	4 400	6 100	3 340	890					
1993	东头埔1号池	W	110	56	288	508	1 120	140	8.0	7.1	21.5	19.0	<i>P. japonica</i>
04.20	东头埔1号池	M	42 000	6 600	1 174	1 606	6 700	890					
11.15	进水沟	W	320	270	UD	UD	880	60	8.3	6.9	22.0	18.0	
	进水沟	M	4 000	4 200	4 100	7 000	45	14					
1993	东头埔1号池	W	139	140	336	560	1 400	260	8.2	9.4	24.0	14.4	<i>P. japonica</i>
05.03	东头埔2号池	W	44	79	208	226	85	25	7.8	6.7	23.0	14.4	<i>P. monodon</i>
11.20	进水沟	W	75	266	UD	UD	210	78	8.1	8.5	23.5	14.4	
1993	东头埔1号池	W	188	90	986	1 022	4 500	1 400	8.3	6.8	24.5	14.4	<i>P. japonica</i>
05.15	东头埔1号池	M	38 000	1 300	4 800	1 200	226 000	156 000					
10.30	东头埔2号池	W	340	45	664	880	3 300	1 200	8.3	7.3	26.0	14.4	<i>P. monodon</i>
	东头埔2号池	M	89	76	8 900	5 600	186 000	156 000					
	进水沟	W	890	1 560	UD	UD	790	290	7.6	6.5	25.0	15.0	
	进水沟	M	50	38	2 100	6 700	45 000	27 000					
1993	东头埔2号池	W	103	40	UD	UD	UD	UD	1.7	5.9	24.8	16.1	<i>P. monodon</i>
05.25	东头埔2号池	M	290	258	19 800	970	UD	UD					
09.55	进水沟	W	370	600	UD	UD	UD	UD	7.9	6.0	24.0	15.0	
	进水沟	M	440	450	2 900	301	UD	UD					

注:(1)W者取自水样(个/ml),M者取自泥样(个/g湿重);(2)UD为未检测;(3)每次取样都测氨氮和硫化物,其值分别都小于0.1mg/L和0.07mg/L,未列入。(4)溶解氧、氨氮和硫化物的检测均用水质监测箱(福建海洋所产品)测定,并分别用碘量滴定法,光谱法和碘量法校正;盐度以测海水比重换算而得。

斜面划线及深层穿刺(37℃)培养 18h,有所不同,观察到 BG 类在 TSI 斜面培养的产碱,在深层的产酸,但不产气或 H<sub>2</sub>S,鉴定为副溶血弧菌;Y 类在 TSI 斜面和深层培养的都产酸,但也不产气或 H<sub>2</sub>S,鉴定为溶藻性弧菌。

由表 1 可见,(1)同样是刚放养的日本对虾,新虾(东头埔 1 号)水样的弧菌和副溶血弧菌数量比老虾池(南堤 9 号)少得多。虽然老虾池经过严格消毒,但也无法彻底灭除底泥中有害微生物。1992 年 10~11 月对虾的红腿病和黄鳃病正在流行,这两口池的幼虾都有患病死亡,但南堤 9 号池(12 月初补海捕苗 40%)比东头埔 1 号池严重得多。(2)同一虾池,底泥比水样中的弧菌数量高出 1~2 个数量级。这是因为数月的养殖残饵和对虾排泄物等大量有机质沉积在池底使得底泥中的弧菌迅速繁殖所致。而对于昼伏夜出的对虾来说,池底是它们潜伏休息和摄食的场所,所以污染严重的池底在一定的条件下极易诱发疾病。(3)水样中弧菌的数量与温度有着密切的关系。1992 年 12 月~1993 年 3 月温度较低,弧菌(表 1)和其它微生物的数量很少,这阶段对虾生长稳定良好(南堤 9 号 3 月底收成)。而 1993 年 5 月,水温较高,再之又下了几场大雨,大量陆地污染物和有害物质冲入养殖海区,无论是新虾池老虾池或者是进水沟的水样和泥样,弧菌的数量比 5 月前增高了数百倍,由此诱发严重的黄鳃病是造成 5 月对虾(包括日本对虾,中国对虾,长毛对虾和斑节对虾)暴病死亡的主要原因之一。

2.2.2 异养细菌 从表 1 中看出,1993 年 4 月虾池的异养细菌比 3 月底高出数百倍,这里除了与有机物的积累外,尚与其他因素(特别是温度)有关。而 4 月底由于虾病已发生,虾农撒生石灰和高效消毒剂等,异养菌数量锐减,可见这类细菌对这些药物是很敏感的。由此推断,在 1992 年 11 月和 1993 年 5 月发生的虾病中,异养细菌并非是主要的病原体。

2.2.3 反硝化细菌和反硫化细菌 这两类细菌可分别促使亚硝氮,氨氮和硫化物的增加。由于它们主要分布在底部和池泥中,药物难以杀死。由表 1 看出,在刚放养的老虾池(南堤 9 号),可能由于清污和消毒不彻底,这两类菌的数量比东头埔 1 号高出数十倍,老虾池首先暴发虾病;在养殖后期的新虾池(东头埔 1 号),因数月的养殖残饵和其他污染,这两类菌的数量也比原先增高了数十倍,虾病随后发生。虽然在不同养殖池,不同养殖期虾病发生时反硝化细菌和反硫化细菌的数量都有比较明显的变化,但所测的氨氮和 H<sub>2</sub>S 均未超过养殖

标准。看来,这两类细菌并非是诱发当时虾病的主要因素。

2.2.4 粪大肠菌 粪大肠菌不是直接引发虾病的主要致病菌,但可以从它们数量的变化看出水质受陆地生活污水影响的程度。表 1 中可见,4 月下旬,可能由于春播已开始,施用农肥使得进水沟和底泥样品中粪大肠菌的数量增加了数十乃至数百倍,虾病也已暴发。

2.2.5 生态因子 1992 年 5 月以来,所测的酸碱度(pH),盐度(S),氨氮和硫化物的含量均低于养殖标准,其变化(表 1)与虾病的发生似乎没有表现出直接的联系。本文有关 DO 数据均在中午前后测定,与作者(1992 年 7~8 月)的昼夜检测有所不同。一般地说,DO 值在凌晨前后比较低(视对虾的大小和密度而异)。检测结果表明,DO 并非是诱发这 4 次虾病的主要生态因子。1993 年 5 月,水温比 3 月上升了 3~4℃,又下了几场大雨,陆地大量污水排入近海和虾池,导致水体中各种细菌数量剧增(表 1),诱发了“黄鳃”等疾病。可见,水温和大陆污水是 1993 年 5 月虾病大暴发的主要环境因素。

### 3 病毒与虾病的关系

用孔雀绿染色的斑节对虾、长毛对虾和中国对虾的 L-P 压片检查,可找到近圆形的深蓝绿色颗粒,直径 5~11μm;用曙红 Y 染色的可找到拟三角和多角形的着色物,但量少得多(是因染色问题或这类着色物本来就少,有待以后再探讨),这两种着色物分别与张氏(张朴胜,1992。台湾大学博士论文)和 Couch<sup>[8,9]</sup>所描述的斑节对虾杆状病毒(MBV)和 Couch 氏杆状病毒(BP)的包含体很相似。初步认为,这两种对虾至少被 MBV 和 BP 所感染。现场简易快速压片法找到深蓝绿色的病毒包含体检出率见表 2。

H-E 染色的组织切片镜检,发现斑节对虾,长毛对虾,中国对虾和日本对虾病虾的 L-P 细胞都有不同程度的病变。1992 年 7 月和 1993 年 5 月病虾标本的 L-P 细胞结构很不完整,有的只能看到细胞的外围空架,内部已“溶空”。在外围空架的内侧可找到许多圆形、三角形和锥形等着色物,与廖(廖一久,1989。台湾省水产研究所)研究 MBV 和 Sergio 描述 *Penaeus subtilis* BP 包含体的光学显微照片<sup>[10]</sup>相似,与上述的快速压片法所观察到的一致,但数量多。由此表明它们至少带有可疑的 MBV 和 BP 包含体。

表 2 对虾病毒包含体检出率(%)

对虾种类	时间(年.月)	发病虾池	检出率(%)	未发病虾池	检出率(%)
斑节对虾	1992.7	漳浦竹屿中心 8#	56.7	同安马巷山亭 1#	13.3
	1993.5	同安潘涂南堤 18#	63.3	同安西柯瑶头 14#	16.7
长毛对虾	1992.7	漳浦旧镇刘坂 1#	43.3	东山西埔南堤 7#	6.67
	1993.5	同安西柯瑶头 11#	36.7	同安新店吕塘 6#	0.00
中国对虾	1993.5	同安西柯瑶头 2#	30.0	同安丙州中堤 3#	6.67

用超薄切片和磷负染的电镜(EM)检查发现,可疑的病毒种类有:(1) MBV;这种病毒在斑节对虾体内非常普遍,国内外已有不少研究(廖一久,陈秀男等,1989.台中家畜疾病防治所)。本文所调研的同安(西柯,潘涂及马巷)和漳浦(霞美,佛潭及竹屿)的斑节对虾病虾 L-P 中,MBV 感染的 EM 检出率较高(病毒颗粒达 60%以上)。细胞核内很容易找到象廖描述的具有晶格状基质的包含体和杆状的病毒颗粒。这类病毒也曾在长毛对虾和中国对虾 L-P 细胞核内发现。(2) BP;对用光镜检测到 BP 包含体的长毛对虾和日本对虾 L-P 样品进行超薄切片观察,可找到与用超薄切片研究 *P. subtilis*<sup>[17]</sup>相似的三角形或多角形 BP 包含体和杆状病毒粒子,但数量不多,在日本对虾 L-P 细胞内则更少,有的还分布在胞浆中。这可能是细胞坏死核解体后,病毒粒子散到胞浆中。长毛对虾(1992 年 7 月 31 日漳浦刘坂样品)头胸甲腹水泡处理液的磷钨酸负染样品中也能看到类似的杆状病毒。(3) 中肠腺坏死病毒(BMNV);在 1992 年 9 月和 1993 年 10 月的日本对虾病虾的 L-P 细胞中较易观察到象 Sano<sup>[13]</sup>研究的 BMNV,其细胞核肿大,核内分布着拟杆状的病毒粒子,颗粒外有核衣壳和核衣膜。1992 年 10 月 11 日同安丙州日本对虾的一个肥胖细胞,核内外膜之间散布着许多 BMNV。但在细胞核解体后,其粒子也可能散在胞浆中。此外,1993 年 5 月 28 日同安西柯斑节对虾 L-P 样品的 L-P 细胞中,也多次看到弹状的病毒粒子(RH)和一些锥形或三角形的粒子。从以上分析看出,导致 1992~1993 年闽南地区恶性虾病的病毒至少有上述 4 种。但是,病毒的鉴定是一项非常复杂的工作,有些方面的问题尚待进一步深入的研究。

综合上述分析,1992 年 7 月<sup>[7]</sup>和 1993 年 5 月暴发虾病的主要病因是病毒和细菌(主要是弧菌)的合并感染,而 1992 年 9 月和 1993 年 10 月的恶性虾病则主要是由病毒感染所造成的。

参考文献

[1] 国家技术监督局,1991.中华人民共和国国家标准.海洋生物调查规范.中国标准出版社,10~17.

[2] 陈绍铭、郑福寿,1985.水生微生物学实验法(上册).海洋出版社,22~147;198~222.

[3] 范秀容等,1989.微生物实验法(第 2 版).高等教育出版社,29~45;56~64.

[4] 中科院南京土壤研究所微生物室,1985.土壤微生物研究法.科学出版社,41~59.

[5] 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(北京).科学出版社,66~67;98~194.

[6] 上海医学科学技术情报研究所等,1961.食物中毒 嗜菌感染专辑.上海市科学技术编译馆 1~64;133~163.

[7] 蔡心一、苏永全,1993.现代渔业信息 8(9):11~18.

[8] Couch, J. A., 1974. *J. Invertebr. Pathol.* 24: 311-331.

[9] Couch, J. A., 1974. *Nature* 247: 229-231.

[10] Sergio Luiz de Siqueira Bueno, 1990. *J. World Aqua. Soc.* 21(3): 325-328.

[11] Lightner, D. V. et al., 1985. *J. Invertebr. Pathol.* 45: 47-53.

[12] Lightner, D. V. et al., 1989. *J. Invertebr. Pathol.* 53: 137-139.

[13] Sano, T. et al., 1981. *Fresh Pathol.* 15: 185-191.

