

# 弧菌对中国对虾急性感染阈值的实验\*

## EXPERIMENTS OF THE ACUTE INFECTIOUS THRESHOLD OF *Vibrios* ON *Penaeus chinensis*

罗日祥

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

Lightner 和 Lewis<sup>[4]</sup>认为鳃弧菌是白对虾 *Penaeus setiferus* 和褐对虾 *P. aztecus* 的病源菌。郑国兴等人<sup>[2]</sup>利用配制的弧菌悬浮液浸泡或肌肉注射的办法,使对虾人工地感染弧菌病,证实鳃弧菌是中国对虾的病源菌之一。赵增元等人<sup>[3]</sup>用注射或经口感染的方法,证实副溶血弧菌、溶藻弧菌也是中国对虾的病源菌。该结果与叶孝经<sup>[1]</sup>和王文兴(1986)在山东即墨市养虾场对中国对虾流行性弧菌病的调查结果一致。我们在利用弧菌诱导中国对虾免疫活性物质的实验中发现,向体内注射弧菌,剂量小时,不仅不会对虾致病,反而会诱导免疫活性物质的活力提高<sup>①</sup>只有当注射弧菌悬浮液的剂量大到一定程度时,才能使对虾致病,甚至死亡。本文报道弧菌对中国对虾急性感染的阈值实验结果。

### 1 材料与方 法

1.1 实验虾取自胶州湾自然海域的中国对虾 *Penaeus chinensis*。体长为 12~20cm,秋天 9~10 月份的雌雄各半,春天 4~5 月份的全为雌虾。实验材料运回实验室后,放于 100cm×75cm×80cm 的玻璃缸水槽内暂养,每天换水(60%)一次,连续充气。待虾稳定 1 周后进行实验。

1.2 弧菌 *Vibrio* 菌种由本所微生物研究组刘秀云先生提供。每次实验前用保存的菌种临时培育。培育好后将弧菌从培养基斜面刮下,用无菌海水配成悬浮液,其浓度约在  $10^8$  cell/ml。

1.3 注射用的器具均需经过灭菌处理,注射和配菌应用的海水,先用滤纸过滤后再进行灭菌备用。

1.4 步骤与方法。将暂养的虾按体长分级。秋天 9,10 月份的虾以 12~13cm,14~16cm 分成两级,春天产卵前和产卵后的亲虾以 15~17cm,18~20cm 也分成两级,每级分 5 组,每组 9 条虾,分别养于 5 个缸中。为避免鲜饵中细菌的感染干扰,均投喂统一的人工配合饵料。

1.5 注射弧菌。用微量进样器腹部肌肉注射。对照组注射无菌海水 200ml,其他各组分别注射 200,150,

100,60,50,40,20 $\mu$ l/条 弧菌悬浮液后,分别放回各自的缸中。每天投饵 2 次,换水 2 次(50%1 次)。

### 2 试验结果

2.1 9~10 月份体长为 12~13cm,14~16cm 的虾,各组注射 200,100,60,40 $\mu$ l/条 的弧菌悬浮液后,虾的死亡与存活的结果见表 1。从表 1 看出,注射 60 $\mu$ l/条 弧菌悬浮液时,14~16cm 的虾存活率比 12~13cm 的虾高 22.22%。对死虾外表观察,均有不同程度地出现鳃发黄或淡黄色,有的虾附肢末端发红或淡红。

2.2 春天 4~5 月份未产卵的亲虾,按体长分成 15~17cm,18~20cm 两级,每级分 5 组。各组分别注射弧菌悬浮液后,虾死亡与存活的结果见表 2。15~17cm 的虾,注射 100 $\mu$ l 弧菌悬浮液时,死亡率为 100%,存活率为 0。而 9~10 月份的虾存活率则为 22.22%。注射 60 $\mu$ l 时,体长为 15~17cm 的春季亲虾存活率比同等规格的秋季虾低 44.45%。注射 40 $\mu$ l 弧菌悬浮液时,存活率比秋季虾低 22.22%。春季未产卵的亲虾,按体长分成的两级间比较,注射 40 $\mu$ l 弧菌悬浮液时,一级(18~20cm)的存活率比二级(15~17cm)的高 11.11%,但注射剂量加大到 60 $\mu$ l 时,存活率比二级(15~17cm)虾高 33.34%。

2.3 春季已产过卵的亲虾,注射弧菌悬浮液后的结果见表 3。已排过卵的亲虾抵抗力很低,同等体长的虾,用注射 20 $\mu$ l 弧菌悬浮液的存活率与注射 40 $\mu$ l 弧菌悬浮液的未产卵亲虾比较,前者还比后者的存活率低 55.56%。从外表观察,死虾的附肢大多数发红。

### 3 讨论与结语

3.1 在注射弧菌的操作过程中,由于虾离水时间

\* 山东省自然科学基金资助项目 93D0241 号;中国科学院海洋研究所调查研究报告第 2850 号。

① 罗日祥,1995。中国对虾 *Penaeus chinensis* 凝集素活力及弧菌的诱导动力学。

收稿日期:1996 年 1 月 16 日

的长短差异,注射针头插入的深浅无法准确控制,对每条虾的机械损伤程度存在差别,损伤过重就易于死亡。这是造成实验误差的主要原因。在确定阈值时,应考虑误差的因素。因此,用虾作实验时,我们认为秋季注射弧

菌( $10^8\text{cell/ml}$ )悬浮液的最大阈值,12~13cm 虾为  $40\mu\text{l}$ , 14~16cm 的虾为  $60\mu\text{l}$  较合适。如超过此阈值,实验材料就易于死亡。

表 1 注射弧菌后秋季虾的存活率

| 实验时间 (d) | 死亡数(存活数)    |      |       |       |             |       |       |      | 对照    |
|----------|-------------|------|-------|-------|-------------|-------|-------|------|-------|
|          | 虾体长 12~13cm |      |       |       | 虾体长 14~16cm |       |       |      |       |
|          | 弧菌注射量(μl)   |      |       |       |             |       |       |      |       |
|          | 200         | 100  | 60    | 40    | 200         | 100   | 60    | 40   |       |
| 1        | 9(0)        | 2(7) | 0(9)  | 1(8)  | 9(0)        | 1(8)  | 1(8)  | 0(9) | 1(8)  |
| 2~3      | /           | 6(1) | 2(7)  | 0(8)  | /           | 4(4)  | 0(8)  | 0(9) | 0(8)  |
| 4~5      | /           | (0)  | 1(6)  | 0(8)  | /           | 1(3)  | 0(8)  | 0(9) | 0(8)  |
| 6~10     | /           | /    | 0(6)  | 0(8)  | /           | 1(2)  | 0(8)  | 0(9) | 0(8)  |
| 11~15    | /           | /    | 0(6)  | 0(8)  | /           | 0(2)  | 0(8)  | 0(9) | 0(8)  |
| 存活率(%)   | 0           | 0    | 66.67 | 88.89 | 0           | 22.22 | 88.89 | 100  | 88.89 |

表 2 注射弧菌后未产卵亲虾的存活率

| 实验时间 (d) | 死亡数(存活数)    |      |       |       |             |       |       |       | 对照    |
|----------|-------------|------|-------|-------|-------------|-------|-------|-------|-------|
|          | 虾体长 15~17cm |      |       |       | 虾体长 18~20cm |       |       |       |       |
|          | 弧菌注射量(μl)   |      |       |       |             |       |       |       |       |
|          | 200         | 100  | 60    | 40    | 200         | 100   | 60    | 40    |       |
| 1        | 9(0)        | 2(7) | 1(8)  | 1(8)  | 9(0)        | 1(8)  | 0(9)  | 1(8)  | 0(9)  |
| 2~3      | /           | 6(1) | 2(6)  | 1(7)  | /           | 3(5)  | 1(8)  | 0(8)  | 1(8)  |
| 4~5      | /           | 1(0) | 2(4)  | 0(7)  | /           | 1(4)  | 1(7)  | 0(8)  | 0(8)  |
| 6~10     | /           | /    | 0(4)  | 0(7)  | /           | 1(3)  | 0(7)  | 0(8)  | 0(8)  |
| 11~15    | /           | /    | 0(4)  | 0(7)  | /           | 0(3)  | 0(7)  | 0(8)  | 0(8)  |
| 存活率(%)   | 0           | 0    | 44.44 | 77.78 | 0           | 33.33 | 77.78 | 88.89 | 99.89 |

表 3 注射弧菌后已产卵亲虾的存活率

| 实验时间(d) | 死亡数(存活数)    |      |       |       |             |       |       |       | 对照    |
|---------|-------------|------|-------|-------|-------------|-------|-------|-------|-------|
|         | 虾体长 15~17cm |      |       |       | 虾体长 18~20cm |       |       |       |       |
|         | 弧菌注射量(μl)   |      |       |       |             |       |       |       |       |
|         | 150         | 100  | 50    | 20    | 150         | 100   | 50    | 20    |       |
| 1       | 9(0)        | 6(3) | 4(5)  | 2(7)  | 9(0)        | 5(4)  | 4(5)  | 2(7)  | 1(8)  |
| 2~3     | /           | 3(0) | 3(2)  | 3(4)  | /           | 3(1)  | 1(4)  | 2(5)  | 1(7)  |
| 4~5     | /           | /    | 1(1)  | 2(2)  | /           | 0(1)  | 1(3)  | 1(4)  | 1(6)  |
| 6~10    | /           | /    | 0(1)  | 0(2)  | /           | 0(1)  | 1(2)  | 1(3)  | 0(6)  |
| 11~15   | /           | /    | 0(1)  | 0(2)  | /           | 0(1)  | 0(2)  | 0(3)  | 0(6)  |
| 存活率(%)  | 0           | 0    | 11.11 | 22.22 | 0           | 11.11 | 22.22 | 33.33 | 66.67 |

3.2 表 1、表 2、表 3 的结果相互比较,证明秋天 8~10 月份的虾抵抗力最低,春天已排过卵的亲虾抵抗力最弱。已排过卵的亲虾,不说注射弧菌,就是注射无菌海水的死亡率都能达到 33.33%。结果表明,选用实验材料时,最好用秋季虾,因它正处生长发育旺盛时期,体质健壮,生理状态稳定,实验时取得的数据波动小,易于分析获得的结果。而春天的亲虾,正处繁殖期,这是个特殊的

生理期,生理状态不稳定,实验时干扰因素较多,取得的数据不易分析。

3.3 上面结果说明对虾对注射弧菌悬浮液的抵抗力与体长有关系,但不是对应关系。影响存活率的因素是多种多样的。如虾体质的个体差异,注射过程中的操作差异,水质、充气等均可影响存活率,而这些因素就目前的实验条件难于控制一致。因此在进行类似的感染实

验时,不能按体长的推算而套用,应按实际情况选择合适的浓度和剂量。

3.4 弧菌是对虾养殖池中的正常菌落,也是对虾体内经常携带的主要菌落之一。从本文结果可以看出,只有对虾体内的弧菌量积累到阈值时才能致病。因此,在养殖期间只要采取有效措施,避免弧菌的扩增,就能防止或减少弧菌病的发生。

## 参考文献

- [1] 叶孝经、王文兴,1986。海洋水产研究所丛刊 30:11~18。
- [2] 郑国兴等,1990。水产学报 14(1):1~6。
- [3] 赵增元等,1995。海洋科学 6:50~53。
- [4] Lightner, D. V. , *et al.* , 1975. *Mar. Fish. Rev.* 37(5-6):25-28.