

对虾暴发病的实验室生态学研究*

乔振国¹ 耿隆坤¹ 刘 健² 黄聪年¹ 高建军¹ 陆建学¹

(¹ 中国水产科学研究院东海水产研究所 上海 200092)

(² 上海市水产办公室 200002)

提要 于 1994, 1995 年在实验室条件下探讨了溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)、和非 01-霍乱弧菌(*V. cholerae non-1*) 的单一菌株与对虾病毒感染的关系; 在此基础上, 进一步探讨了 23. 5~ 25 °C 和 29. 5~ 31 °C 温度条件下用病虾匀浆感染时, 实验水体中细菌数量、弧菌数量的消长情况及其与对虾感染病毒的关系。结果表明, 3 种弧菌单独感染均可使对虾致病, 但在与对虾病毒匀浆共同感染时, 感染结果有较大差异, 其中溶藻弧菌与对虾病虾匀浆的共同感染结果比单独感染的致病率高 4 倍; 在实验设定的低温和高温条件下进行对虾病虾匀浆感染, 实验第 8 天, 低温组感染死亡率为 80 %, 高温组感染死亡率为零; 低温组的弧菌数量为高温组的近 6 倍, 而细菌数量高温组为低温组的近 6 倍。

关键词 中国对虾, 弧菌, 病虾匀浆, 温度, 感染死亡率

* 1993 年以来, 关于全国范围暴发性虾病的病因、病理及相应的防治措施, 已有许多报道。比较一致的

* 上海市农委资助项目, 郑国兴先生提供纯菌株, 周凯先生协助病菌扩大培养, 在此谨致谢意。
收稿日期: 1997-04-07

研究结果均证实病毒是暴发性虾病的病原体,但也不乏有报告指出不能忽视弧菌在暴发性虾病中的影响^[1-3]。为探讨对虾病毒和弧菌与虾病发生的关系,作者于1994年,1995年在实验室条件下对虾病的感染途径、条件以及病毒与某些弧菌的相互关系等一系列问题进行了初步的探讨,并在1996年生产性养殖中进行了验证。以期通过这些研究结果以及再进一步的工作能够对自然条件下虾病发生的某些现象作出比较客观的解释。

1 材料与方法

1.1 实验材料

用作感染用的病虾系在5~6月份对虾发病高峰期从发病虾塘获得,体长5~7 cm,PCR检测结果呈阳性,-18℃条件下存放。健康对虾取自育苗场封闭式暂养池,实验前20 d,饲养于室内6 m²池中备用,体长6~8 cm。

1.2 病毒匀浆液的制备

按300 L水体2尾病虾的比例,将病虾整尾置于粉碎机中加水粉碎,所获匀浆液经100目筛网滤除渣质后加入试验池,为使水质保持一致,对照池加入用同样方法处理的健康虾匀浆液。

1.3 感染实验

1.3.1 预备实验 实验在室内4只1.5 m×1.0 m×0.6 m水泥池中进行。每池放健康虾10尾,分两组,一组池底铺设取自虾池的底泥;另一组铺设取自淡水池塘的底泥,分3次加入,总量250 g/池,每组中有1池为试验池,加入病虾匀浆液,对照池则加入健康虾匀浆液,每4 d换水50%,换水后分别补入病虾匀浆液和健康虾匀浆液。实验所用海水系对虾发病前一个月贮存的自然海水,盐度9~10。实验期间每3~4 d测定水质(NH₄-N, NO₂-N, pH)和微生物数量(细菌数、弧菌数)。投喂饲料为淡水螺蛳。实验期间仅

闷热天气少量充气。水温28~29℃。

1.3.2 单一菌株与病毒感染实验 利用容积为80 L玻璃缸(水体60 L),缸中铺设虾池底泥20 g,实验前用100×10⁻⁶次氯酸钠(CP级,含氯量5%)消毒海水和底泥,24 h后用硫代硫酸钠和余氯。每缸放养健康对虾4尾。实验分3组,所用弧菌分别为提纯分离后经试管扩大培养的非O1-霍乱弧菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌,各缸中菌液浓度为100 000 cell/m³ L,试验缸另按2尾/300 L比例加入病虾匀浆液。实验在不充气、不换水静止条件下进行,水温23~25℃,投喂饲料为淡水螺蛳。

1.3.3 不同浓度单菌株与病毒感染实验 实验方法同单一菌株与病毒感染实验,菌株仅溶藻弧菌一种,其浓度分别为50 000 cell/m³ L,5 000 cell/m³ L,500 cell/m³ L,50 cell/m³ L,共4组,另设两缸不添加菌液作为对照,对照和试验缸均按2尾/300 L加入等量的病虾匀浆液。试验水温23~25℃。

1.3.4 温度与虾病的关系 实验在两个2 m²水泥池中进行,每池加虾池底泥300 g,并按2尾/300 L比例加入病虾匀浆液,每池放入体长7~8 cm的健康虾10尾,其中一池为常温,水温23.5~25℃,另一池用加热棒维持水温29.5~31℃,实验期间不换水,少量充气,水质指标和微生物数量检测每3~4 d 1次。

1.4 检测方法

pH测定用PHC-3型酸度计,氨氮用奈氏法,NO₂-N用重氮-偶氮比色法。微生物取样水层为水面10 cm处。细菌培养用营养琼脂,弧菌用TCBS选择性培养基,用平板计数法检测细菌数和弧菌数。

2 结果

2.1 预备实验结果

实验主要探索底泥放置数量、病虾投放数量及感染效果、实验对虾放养数量。结果见表1~表3。

表1 预备实验对虾死亡统计

Tab.1 The number of died shrimp in the preparatory experiment period

实验组别	对虾累计死亡数(尾)										死亡率 (%)
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	
1 (淡水+ 病虾匀浆)	-	-	-	1	2	4	5	7	7	8	80
2 (海水+ 病虾匀浆)	-	-	1	2	3	4	10	10	10	10	100
3 (淡水+ 健康虾匀浆)	-	-	1 ¹⁾	1	1	1	1	1	1	1	10
4 (海水+ 健康虾匀浆)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0

1) 由于随机取样,此尾对虾体长仅4.8 cm,明显小于其他对虾;“-”表示正常

表 2 预备实验微生物检测结果

Tab. 2 The microbiologic measure result in the preparatory experiment period

实验组别	细菌数(cell/m l)			弧菌数(cell/m l)		
	第 1 天	第 4 天	第 10 天	第 1 天	第 4 天	第 10 天
1	62 500	2 948	13 740	10 350	1 170	4 250
2	57 000	2 600	3 650	1 000	625	750
3	24 200	3 525	10 850	13 950	1 400	2 750
4	25 150	1 790	9 850	8 250	525	3 300

表 3 预备实验水质分析结果

Tab. 3 Water quality analysis in the preparatory experiment period

组别	pH			NH ₄ -N(m g/L)			NO ₂ -N(m g/L)		
	第 1 天	第 4 天	第 10 天	第 1 天	第 4 天	第 10 天	第 1 天	第 4 天	第 10 天
1	8. 20	8. 18	8. 32	1. 35	0. 13	1. 20	0. 067	0. 940	0. 048
2	8. 16	8. 20	/	1. 43	0. 12	/	0. 041	0. 940	/
3	8. 24	8. 18	8. 30	1. 09	0. 11	1. 14	0. 049	0. 760	0. 448
4	8. 22	8. 20	8. 34	1. 40	0. 12	1. 31	0. 070	0. 890	0. 420

由表可见: (1) 采用在池底铺设适量底泥, 可使实验结果能比较接近自然状态。(2) 对照池成活率接近 100 %, 表明实验条件基本符合对虾生长需要。(3) 在同样感染条件下, 不同来源的底泥, 在感染效果上有

一定差异。

2. 2 单一弧菌菌株加病毒的感染效果

2. 2. 1 3 种弧菌菌株加病虾匀浆感染效果的比较

表 4 不同弧菌菌株加病虾匀浆感染实验结果

Tab. 4 The result infected jointly by different vibrio bacterial strains and diseased shrimp suspension

实验组别	对虾累计死亡数(尾)						死亡率 (%)
	1 d	2d	3d	4d	5d	6d	
1(非 01-霍乱弧菌)	-	-	1	1	1	1	25
2(病虾匀浆+ 非 01-霍乱弧菌)	-	-	-	1	1	1	25
3(溶藻弧菌)	-	-	-	1	1	1	25
4(病虾匀浆+ 溶藻弧菌)	-	-	3	4	4	4	100
5(副溶血弧菌)	-	-	-	2	2	2	50
6(病虾匀浆+ 副溶血弧菌)	-	-	-	3	3	3	75

注: “-”表示正常

2. 2. 2 不同菌液浓度感染效果比较

表 5 溶藻弧菌菌液浓度对感染结果的影响

Tab. 5 The effect of bacterial solution concentration of *Vibrio alginolyticus* on infection results

实验组别	对虾累计死亡数(尾)							死亡率 (%)
	1 d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	
1(病虾匀浆)	-	-	-	1	1	1	1	25
2(病虾匀浆)	-	-	-	1	1	1	1	25
3(50 cell/m l+ 病虾匀浆)	-	-	-	1	1	1	1	25
4(500 cell/m l+ 病虾匀浆)	-	1	1	4	4	4	4	100
5(5000 cell/m l+ 病虾匀浆)	-	-	-	2	2	2	2	50
6(50000 cell/m l+ 病虾匀浆)	-	1	2	3	3	3	3	75

注: “-”表示正常

2.3 温度与对虾发病的关系

表 6 不同温度条件下感染对虾结果

Tab. 6 The infection results of diseased shrimp suspension in different temperatures

实验组别	对虾累计死亡数(尾)								死亡率 (%)
	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	
1(高温)	-	-	-	-	-	-	-	-	0
2(低温)	-	-	1	1	2	5	6	8	80

注:“-”表示正常

表 7 不同温度条件下微生物检测结果

Tab. 7 Microbiologic measure results in different temperatures

实验组别	细菌数(cell/m l)			弧菌数(cell/m l)		
	第 2 天	第 5 天	第 8 天	第 2 天	第 5 天	第 8 天
高温	33 000	5 100	10 350	535	655	495
低温	18 950	5 000	1 635	945	1 245	2 800

表 8 不同温度条件下水质测定结果

Tab. 8 Water quality measure results in different temperatures

实验组别	pH		NH ₄ -N(m g/L)		NO ₂ -N(m g/L)	
	第 1 天	第 8 天	第 1 天	第 8 天	第 1 天	第 8 天
高温	8. 5	8. 5	1. 26	1. 35	0. 045	0. 216
低温	8. 4	8. 4	1. 20	1. 35	0. 036	0. 174

3 讨论

3.1 病毒和弧菌的相互关系

综观 1993 年以来有关暴发性虾病的众多报道,既有从流行性病学研究角度对发病地区的对虾发病症状、环境因子及微生物生态方面进行调查研究的^[6,7],也有采用将病原体(病毒、细菌)分离、提纯之后通过注射浸泡或直接喂以病虾进行重复感染获得确切证据的^[1,4],本研究则试图从既保证试验条件的可比性,又尽最大可能接近自然条件(试验池底铺设适量底泥;病虾不直接喂,而是以匀浆形式投入水体,使之不能直接摄取)角度来探讨病毒和弧菌的关系。从预备实验所获结果(表 1~ 表 3)可以看出,在饲养环境基本相近的情况下,添加病虾匀浆的虾池底泥组的感染速度和死亡率均高于同样添加病虾匀浆的淡水池底泥组,而实验期间该组的弧菌数检测值始终低于淡水底泥组。据此,可以推测其原因不仅仅是细菌数量的问题,而与其中所含菌种有关。在以后进行的单菌株弧菌和对虾病虾匀浆共同感染实验中,由于底泥和海水均进行了消毒,排除了其他菌株感染的可能性。结果证明,就单一菌株的感染结果看,副溶血弧菌和病虾匀浆共同感染的感染死亡率为 75 %,非 01-霍乱弧菌

的两种结果均为 25 %,副溶血弧菌的单独感染死亡率最高(50 %)。而溶藻弧菌在单独感染条件下,感染死亡率仅 25 %,但与病虾匀浆共同感染则感染死亡率为 100 %,如再比较作者另一项有关不同浓度溶藻弧菌和病虾匀浆共同感染的结果以及在同样条件下单用病虾匀浆感染所得结果(表 4、表 5)可以看出,溶藻弧菌和副溶血弧菌与病毒存在着某种协同感染关系,而非 01-霍乱弧菌则无这种关系。

关于病毒与细菌的相互关系,据李光友先生^[5]引用挪威学者用“传导电子显微镜”观察水中微小浮游生物的研究结果,“首先病毒数量巨大(最高可达 2.5×10^8 cell/m l),其可以通过攻击细菌来控制这种平衡。另外,数量巨大的病毒能够在水体中转移不同生物间的基因材料,它们可结合一些宿主细菌的 DNA 于自体上,然后又将这些 DNA 转移至另外的宿主内,其结果使细菌改变自己,以适应外界环境的改变”。

结合本研究的结果,如果上述结论被人们进一步证实,那么是否可大胆假设病毒对其宿主细菌有一定的选择性,并借助其宿主细菌来繁殖自体,从而可解释病毒在虾池中得以繁衍的途径。

3.2 自然条件下发病季节的解释

根据 1993 年以来对对虾暴发性疾病发病规律的探索,比较一致的意见是 6 月上旬~ 7 月上旬和 8 月

下旬~9月,由于前一个死亡期对虾体长恰好在4~5 cm,因此往往会得出病毒通过摄食浮游动物途径感染对虾的结论。从本研究的结果来看,作者认为,对于对虾养殖时间较长的虾池,由于虾池底部各种病原体数量丰富,作为发病的首要因素应该是温度,从表6~表7中不难看出23.5~25℃左右的水温条件对于致病弧菌的生长极为有利,而当水温达29℃以上时,由于其他细菌数量大大增加,弧菌生长反而趋缓。从表6所得的结果来看,低温组(23~25℃)实验期间的死亡率达80%,而高温组则无死亡。这一结果结合前述的关于病毒与弧菌的相互关系,就能比较清楚地解释上述两个发病高峰期的原因。当然,也不能排除高温条件下病毒活力减弱的可能性。

3.3 防病措施的探讨

有关对虾暴发疾病预防措施,在经历了几年的摸索以后,总结出了不少经验。上海地区在1996年的养虾生产中,有条件的单位普遍采用养虾前清理池底和淡

水浸泡相结合;发病季节不从海区进水,直接应用淡水或“腊水”(1~2月在蓄水池沉淀的海水);大风大雨后,向池中泼洒漂白粉或生石灰,取得了较好效果。

因此,作者认为只要掌握发病规律,适当改善养殖条件(池中设一定数量增氧机,在封闭或半封闭养殖期间,保持池水的流动性),对虾养殖走出低谷是完全可能的。

参考文献

- 1 于占国等。海洋学报,1995,17(3):86~90
- 2 苏永全等。厦门水产学院学报,1994,16(2):40~43
- 3 马悦欣等。中国水产科学,1995,2(3):15~21
- 4 张红卫等。海洋科学,1995,1:5~7
- 5 李光友。海洋科学,1995,4:1~3
- 6 苏永全等。海洋科学,1995,1:1~3
- 7 王书锦等。海洋科学,1995,1:8~11

STUDY ON THE MIMIC ECOLOGY OF PENAEID SHRIMP IN LABORATORY DURING ITS VIRAL DISEASE PERIOD

QIAO Zhen-guo¹ GENG Long-kun¹ LIU Jian² HUANG Cong-nian¹ GAO Jian-jun¹ LU Jian-xue¹

(¹East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishiers Science, Shanghai, 200090)

(²Shanghai Fisheries Bureau, 200002)

Received: Apr. 7, 1997

Key Words: *Penaeus chinensis*, *Vibrio*, Diseased shrimp suspension, Temperature, Mortality rate

Abstract

We studied the relationships between monostrain of *Virbrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* and *V. cholerae* non-1 and shrimp virus infection in laboratory with the diseased shrimp suspension in 1994-1995. On this basis, we further studied the relationship between the increase or decrease of bacterial quantity and vibrio amount and shrimp infected virus in the experimental water when the diseased shrimp suspension was infected at the temperature of 23.5-25℃. The result indicated that the independent infection of three vibrios could be able to cause disease to shrimp but there was a great difference in infection result when the infection caused jointly by vibrios and shrimp virus suspension, of which the disease rate resulted from joint infection of *V. alginolyticus* and shrimp virus suspension increased by 400% compared with the independent infection. The infection experiment of diseased shrimp suspension on shrimp was made under two temperature conditions in laboratory. On the eighth day of experiment the mortality rate in low temperature group was

80 % and the mortality rate in high temperature group was zero. The vibrio amount in low temperature group was about 6 times that of high temperature group but the bacterial amount in high temperature group was about 6 times that of low temperature group.