

# 5-18 育苗池中对虾幼体致病菌的分离

陈毕生 李国荣 杨莺莺

(中国水产科学研究院南海水产研究所, 510300·广州)

郭惠棠 陈在贤

(深圳动植物检疫局, 518000·深圳)

**摘要** 从近缘新对虾 (*Metapenaeus affinis*) 育苗池中垂危的幼体分离出致病性细菌 (*Pseudomonas* sp.), 经过多次重复感染试验证明有极为显著的致病作用。在蚤状幼体期的感染试验时, 当试验水体的细菌数达到一定数量, 导致幼体在 24~36 小时死亡 96%~100%。被细菌感染的幼体表现出明显症状: 食欲减退, 体质衰弱, 发育迟缓, 脱壳困难, 体表附肢粘附脏物, 游动无力, 身体弯曲。头胸甲下中肠腺、消化道发白, 继而变褐。出现典型的病理变化。

**关键词** 对虾 幼体 细菌

对虾养殖中, 对虾苗种生产是极其重要的环节, 而对虾育苗期间的病害防治是苗种生产的关键之一。对虾育苗的研究有 20 余年的历史, 病害方面的研究则近几年才引起重视。对虾苗种从广阔天然水体转向高密度的人工育苗池内, 生态环境的改变导致病害产生, 出苗率下降, 幼体死亡率较高, 乃至全池倾覆。<sup>[4,9,12]</sup>引起幼体死亡的病原主要是微生物。已知有弧菌 (*Vibrio* sp.), 假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.), 贝内克菌 (*Benechea* sp.) 等在褐对虾<sup>[16,17]</sup> (*Penaeus aztecus*), 日本对虾<sup>[9]</sup> (*P. japonicus* B), 中国对虾 (*P. orientalis*) 的幼体发育中产生危害。在中国南方多种对虾育苗中, 笔者注意了病原细菌对近缘新对虾 (*Metapenaeus affinis* H&M.) 出苗率的影响, 从无节幼体至仔虾阶段, 由于受细菌的侵害, 使对虾苗种严重死亡。我们对发病的幼体进行实验观察, 分离培养和分离菌对幼体的反复感染试验, 证实分离菌的严重致病性, 探讨对虾幼体致病的环境因素, 病原体的来源及发病条件, 现就对虾幼体致病菌的分离作报道。

## 1 材料与方法

病原材料取自对虾育苗中濒临死亡的病虾幼体, 在显微镜下观察幼体发育时期。病原体侵害部位, 细菌的形态活动及数量, 用无菌操作采集病样, 置灭菌的玻璃研钵内匀浆, 以备接种分离<sup>[1,2,3,13]</sup>。

对虾幼体饵料如藻类, 轮虫等的细菌分离, 将样品以 3000r/min 离心 5~10 分钟, 转入研钵中匀浆, 再接种于培养基。海水水样则经液体培养基增菌 24 小时后, 再接种固体

## 平板培养基。<sup>[12,13]</sup>

试验使用本海区存取的陈海水配制分离培养基和纯化培养基及液体培养。<sup>[2,3]</sup>

培养基经高压后, 在培养箱 (28~30℃) 放置 48h 检查无污染后, 才用于细菌实验, 接入平板或斜面培养基的样品于 25~28℃ 培养 24~48h, 观察菌落生长的形态, 颜色, 大小, 数量, 挑取不同菌落作纯培养, 再将细菌涂片、染色镜下观察细菌形状, 测量细菌大小。重复感染试验时, 细菌先经增菌 36~48h, 以平板菌落计数法计算细菌量<sup>[1,8]</sup>, 然后用于感染试验。

用于致病感染试验的对虾幼体由本基地虾苗工厂和沙头角虾苗场提供。随机数入幼体 10 尾/L, 按设计浓度量入苗液, 充气增氧。每一试验设平行组列, 取其平均值, 观察试验并统计死亡率, 比较 10 次试验结果, 用统计学方法比较其百分比,  $t$  值检验显著差异性。

统计学公式<sup>[5]</sup>, 二样本百分比,  $t = MP_1 - P_2M \div (\sigma_1^2 + \sigma_2^2)^{1/2}$  比例法半数致死浓度测定,

$$TLm = M \text{ 的对数。} \quad (1)$$

$$\sigma = 2.3TLm = (\beta - \alpha) \Phi \quad (2)$$

$$M = a + (\beta - a)(0.5 - \gamma) \div (\delta - \gamma) \quad (3)$$

在实验中, 按规程进行繁育管理。每天测定气温、水温、pH 值, 氨氮、溶氧等理化性质。

## 2 结 果

### 2.1 病虾幼体的死亡状况调查

南方多种对虾育苗时, 近缘新对虾的育苗工作从四月至十月进行, 育苗时水温在 23~32℃, 最适在 26~29℃。在最适水温范围内, 温度上升, 使育苗池内的致病细菌变得更为活跃, 当菌量达到一定量时, 就使对虾幼体致病, 在高密度的育苗池中迅速传染, 短时期内发生大量死亡, 一般多见于蚤状幼体 (Zoea) I~II 期。幼体死亡的症状是体质变弱, 发育迟缓, 脱壳困难, 体表, 附肢及刚毛粘附脏物, 头胸甲下鳃区, 消化道及中肠腺可检查到细菌丛集<sup>[10,13,17]</sup>。

幼体摄食较差, 随水流翻动, 停气时, 或浮于水面, 或沉于底部, 不久死去。

表 1 对虾幼体 (Z<sub>1-2</sub>) 培育水质与出苗率

Table 1 Water-quality of cultured penaeid larvae (Z<sub>1-2</sub>) and post-larvae survival rate

| 池号 | 发育期              | 水温<br>(℃) | pH 值    | 氨氮<br>(ml/g) | 溶氧<br>(ml/g) | 比重          | 饵料       | 出苗率  |
|----|------------------|-----------|---------|--------------|--------------|-------------|----------|------|
| I  | Z <sub>1-2</sub> | 26~28     | 7.8~8.1 | 0.018~0.218  | 5.8~7.7      | 1.019~1.020 | 砂藻、酵母、蛋黄 | 72.1 |
| I  | Z <sub>1-2</sub> | 26~28     | 8.1~8.3 | 0.037~0.064  | 5.9~6.5      | 1.019~1.020 | 同上       | 9    |

## 2.2 对虾育苗池的理化环境

对虾育苗池的水质好坏也是育苗成败的关键。育苗用水来自附近海湾,经砂滤净化处理后注入育苗池,由于生物饵料和/或人工饵料的投放,幼体的代谢产物,常常会改变原有水质的理化环境,使溶氧下降,氨氮升高, pH 值偏低。超过一定忍受量时,幼体体质逐渐衰竭,以致大量幼体发生死亡。这种现象易与病原生物引起的死亡相混淆,而且两者具有一定关系。在同样饵料和管理条件下,只要把因病原致死和正常育苗水质加以比较,死亡的根本原因便易明了。表1所列两种出苗结果,其水体理化性质和管理方法大体一致,同一种对虾的育苗情况完全不同,病原微生物影响下,两种育苗结果相差很大。

表2 从病虾幼体及有关生境中分离的细菌

Table 2 Isolated bacteria from morbid larvae and related habitat

| 来 源  | 菌落颜色、形态                                           | 细菌形态   | 革兰氏染色          | 细菌大小 ( $\mu\text{m}$ ) |
|------|---------------------------------------------------|--------|----------------|------------------------|
| 天然海水 | 1. 灰白色、圆形、光滑、突起边缘不齐。                              | 1. 杆状  | G <sup>-</sup> | 1.24~1.40×0.75~0.95    |
|      | 2. 浅黄色、圆形、光滑、不透明、边缘齐。                             | 2. 单胞状 | G <sup>-</sup> | 1.71~1.90×0.72~0.86    |
| 过滤海水 | 平板少量菌落、乳白色,圆形、微突、边缘不齐,大小不一                        | 杆状     | G <sup>-</sup> | 1.14~1.24×0.90~0.95    |
| 扁藻   | 1. 乳白色、圆形、较透明、边缘齐                                 | 1. 杆状  | G <sup>-</sup> | 1.30~1.40×0.75~1.50    |
|      | 2. 黄色、光滑、不透明、边缘不齐                                 | 2. 球状  | G <sup>+</sup> | +0.70×0.72             |
| 硅藻   | 1. 乳白色、圆形、光滑、透明、边缘齐、大小一致<br>2. 灰白色、不透明、光滑湿润、边缘不齐。 | 杆状     | G <sup>+</sup> | 1.20~1.33×0.80~0.95    |
| 亲虾   | 1. 乳白色、圆形、光滑、透明、边缘不齐、大小一致                         | 1. 小杆状 | G <sup>-</sup> | 1.43~1.70×0.42~0.75    |
|      | 2. 灰白色、不透明、光滑湿润、边缘不齐。                             | 2. 杆状  | G <sup>-</sup> | 1.80~1.91×0.78~0.95    |
| 病虾幼体 | 1. 乳白色、圆形、光滑、透明、边缘不齐                              | 1. 杆状  | G <sup>-</sup> | 1.14~1.43×0.85~0.95    |
|      | 2. 浅黄色、圆形、边缘齐、大小一致                                | 2. 短杆状 | G <sup>-</sup> | 1.45~1.81×0.7~0.90     |

## 2.3 病原微生物的分离

在大量对虾幼体发生死亡时,从垂危的病体中分离的病原细菌是可靠而又容易得到。为寻找病原体的来源,也从幼体发病的环境和饵料以及亲虾中分离细菌,从分离菌的菌落形态及大小,革兰氏染色的反应加以比较,(表2),分析其相互间的关系。

表 3 细菌对虾苗幼体 ( $Z_{1-2}$ ) 24 小时致死百分比测定\*Table 3 Statistics of 24 hours lethal dose of the isolated bacterium to penaeid shrimp larvae ( $Z_{1-2}$ )

| 试 验<br>菌 株 | 对比环境 |     | 死 亡 率 |       | 标 准 误               |                      | 样品差之<br>标准误 $\sigma_d$ | 检 验<br>t | 差 异 性<br>P |
|------------|------|-----|-------|-------|---------------------|----------------------|------------------------|----------|------------|
|            | 1    | 2   | $P_1$ | $P_2$ | $\sigma_1^2$        | $\sigma_2^2$         |                        |          |            |
| $W_1$      | 菌液   | 对照  | 0.99  | 0.456 | $49 \times 10^{-6}$ | $16 \times 10^{-1}$  | 0.041                  | 12.871   | $<0.01$    |
| $W_2$      | 对照   | 培养液 | 0.90  | 0.46  | $3 \times 10^{-3}$  | $8.3 \times 10^{-3}$ | 0.1063                 | 4.0828   | $>0.05$    |

\* 试验时, 水温:  $26 \sim 30^\circ\text{C}$ , 比重  $1.019 \sim 1.020$ , pH 值  $8.0 \sim 8.3$ , 氮氮  $\text{NH}_3\text{-N}$ ,  $0.019 \sim 0.085$  mg/L, 溶解氧 DO  $5.34 \sim 7.74$  mg/L, 50%  $D_{50}$  致死量 细菌  $2178 \pm 90$  个/ml.

## 2.4 病原菌的感染试验

从分离的细菌中, 经过菌落和细菌一般性状作宏观辨别和镜下观察, 通过选择培养, 增值一定量的菌数, 反复感染成功方可证实为致病性细菌。从分离菌对近缘新对虾的感染试验结果, 发现分离菌引起对虾蚤状期幼体死亡, 其死亡率与对照组比较有非常显著差异 ( $P < 0.01$ )。同时, 我们用培养细菌的增菌液也作了对幼体的影响试验, 从对虾幼体成活率看, 两者无显著差异性 ( $P > 0.05$ )。结果列如表 3。

## 3 讨 论

### 3.1 病原体与环境的关系

海水养虾场一般都建在沿海海湾, 对虾育苗和成虾养殖用水, 受沿岸陆地污染较多。在海岸 5 公里以内的上层水体, 细菌含量较多, 主要是有较丰富的氮、磷等物质供细菌繁殖利用<sup>[3,12]</sup>, 生物种类相应增多, 细菌可从动植物排泄物和尸体中得到更多的营养物质。同时, 沿海水质受空气和陆地土壤及生物的影响, 使水体中的细菌在种类和数量上均比外海增多。我们在大鹏湾盐田海区的天然水体中分离到 10 余种细菌, 而实际远不止这些种类, 其中有些对海洋生物是有危害的。实践证明, 大鹏湾内进行海水养殖的条件是十分优越, 对虾育苗的水质相似于天然产卵场<sup>[3]</sup>。而对虾育苗池的水体环境, 是人为控制下为适合对虾育苗来调节的, 对虾育苗率高的水质和育苗率低的水质略有不同。由于受饵料和幼体代谢物的影响, 氮氮比海区水质略高, pH 值偏低, 在育苗水温下, 正适宜某些微生物繁殖<sup>[7,12]</sup>。这些轻微变化往往指示出育苗水体中对虾幼体的病变征兆。

### 3.2 病原体的来源探讨

在对虾幼体生长发育过程中, 从无节幼体 (Nauplius)、蚤状期 (Zoea)、糠虾期 (Mysis)、仔虾期 (postlarvae)、有气单胞菌 (*Aeromonas* sp.)、弧菌 (*Vibrio* sp.)、假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) 等细菌在幼体内消化道内相继占优势种类, 细菌的出现与幼体培育水环境的细菌数量基本一致<sup>[11]</sup>。表明对虾育苗池水环境与幼体有着明显联系。从我们在大量死亡的蚤状期幼体分离的致病性细菌, 与从藻类中分离的细菌比较, 对虾幼体蚤状期的病

原与其饵料有着更密切的关系。幼体摄食时,可能把水中的和饵料中的细菌同时进入消化道,因而启示我们,在对虾育苗时,常在蚤状幼体期进行药物预防<sup>[10]</sup>,并证明在蚤状期的药物预防与对虾育苗率有显著差异性<sup>[4]</sup>。从本试验结果分析,在加强育苗水体的防治措施的同时,对育苗用水应当有效过滤除菌,作为幼体饵料的藻类、轮虫等可能富集致病细菌,应当有效控制,使幼体不致“病从口入”,减少和杜绝食物链的传染途径。有些人在亲虾产卵前对亲虾药浴预防<sup>[7,9]</sup>,也是极有益的措施。

### 3.3 致病条件的分析

对虾育苗时引起幼体死亡的因素有水质恶化、饥饿及病害,高密度对虾育苗中,使人注意的是溶解氧和氨氮。但育苗池均采用充气增氧,通常在 $6.0\sim 7.5\text{mg/L}$ 就能达到满意效果。水中的氮是细菌和藻类生长的营养物质。正常情况下,氨氮含量为 $0.02\sim 0.54\text{mg/L}$ ,亚硝酸氮为 $0.008\sim 0.201\text{mg/L}$ ,但不同种对虾及其不同发育期略有差异。近缘新对虾幼体在 $0.006\sim 0.30\text{mg/L}$ 仍有较高出苗率。已比天然产卵场高,仅从水质指标完全判断幼体死因还无足够依据。但若这些水质因子异常,如氮氮增高,使幼体中毒而生理失调,逐渐衰弱,抗病力降低是可以想象的。

大多数细菌能在水体 $\text{pH}4\sim 9$ 生存,常温细菌最适范围为 $5\sim 40^\circ\text{C}$ ,中度嗜盐细菌的最适盐度为 $5\sim 20$ 。对虾幼体培育条件在嗜盐细菌最适范围内。当水体中的营养物质如氮在 $0.05\text{mg/L}$ 已足使细菌繁殖,若氮、磷更适宜,则能迅速繁衍。在育苗池中,幼体的粪便,分泌物,蜕下的壳,人为施入的豆浆、酵母、蛋黄等都会使水体营养极为丰富,在良好环境下,育苗池成了大型培养基地,供细菌大量繁殖和发育。当达到一定数量,一些致病菌可使幼体在 $24\sim 36\text{h}$ 内大批死亡。当然,水体中的细菌不断增加,有毒物质也产生,加速群体死亡。对虾育苗时,每天更换新水,以减少细菌含量,或施入抗菌药物抑制和杀灭致病菌,预防病害,提高育苗水平。

## 4 结 语

(1) 从近缘新对虾育苗中分离到致病菌,实验室感染试验证明有显著致病作用,当加入致病菌 $2178\pm 90$ 个/ $\text{ml}$ ,在 $24\sim 36\text{h}$ 内,引起蚤状幼体大量死亡。

(2) 对虾幼体致病性细菌存在于育苗水体环境中,尤其幼体摄食的藻类和轮虫等饵料是可疑的致病细菌传染途径。

(3) 受致病性细菌感染的对虾幼体,出现食欲减退,体质变弱,发育迟缓,蜕壳困难,身体弯曲,体表、附肢粘着脏物,头胸甲下中肠腺、消化道等发白,继而衰竭,病理变化显著。

### 主 要 参 考 文 献

- 1 黄梧芳. 细菌学基本原理. 北京: 科学出版社, 1964
- 2 薛廷耀. 海洋细菌学. 北京: 科学出版社, 1962