

科学实验

对太平洋牡蛎弧菌病的初步研究

邓欢 隋锡林 王志松

(辽宁省海洋水产研究所, 大连116023)

提 要

1991年6月大连金州海珍品增殖站育苗室, 在太平洋牡蛎人工育苗期间发生了严重的流行病, 幼体发育到D形幼虫阶段大量下沉, 连续几批幼体出现了类似现象。显微镜观察, D形幼虫面盘肿胀, 严重者面盘脱落, 取发病幼体经表面并研碎后, 接种在TCBS弧菌生长培养基上, 经25℃、15小时恒温培养后, 分离培养出3种弧菌。我们分别对3种弧菌的群体形态特征、个体形态特征做了观察, 并用3种弧菌分别感染正常的太平洋牡蛎D形幼体均获得成功, 同时使用十几种抗菌药物分别对3种弧菌做了药物敏感性试验。结果表明, 抗菌药物土霉素、吡嗪酸、氯霉素、红霉素对3种弧菌均有明显的抑制作用。

关键词: 太平洋牡蛎 弧菌 人工感染 药物敏感试验

太平洋牡蛎, 又称日本真牡蛎。由于它具有个体大、生长快、适应性强, 经济价值高的特点, 是世界牡蛎养殖的主要品种之一。因此1979年以来, 我国南、北方相继开始了太平洋牡蛎育苗、伴随着牡蛎的育苗和养殖的发展, 病害的防治也不可缺少。

国外Walne, 1958, Tubiash et al., 1965, Town and Losee, 1978, Elston, R., 1979分别对自然生长和人工培育的牡蛎弧菌病有认识 and 了解, Elston, R., and Leibovitz, 等1981年首次公开报道了牡蛎孵化时所患弧菌病, 以及用荧光抗体试验去诊断病原体的方法。国内有关牡蛎病害的研究尚未见报告, 本文对太平洋牡蛎幼体发生的弧菌病行了初步研究, 现报告如下。

一、症 状

太平洋牡蛎幼体发病时, 取水样用肉眼观

察幼体几乎全部下沉, 取下沉幼体在显微镜下观察, 幼体活力减弱, 纤毛在壳内轻微摆动, 不摄食, 面盘肿胀, 收不回去, 严重者面盘解体, 纤毛连同呈大小不均的团块状细胞脱落, 最终面盘解体脱落, 失去活动能力而死亡。图1为放大800倍的太平洋牡蛎幼体, 面盘已开始脱落。纤毛开始脱落的幼体, 在显微镜下观察壳内有大量的杆状、弧状细菌存在, 带有纤毛的面盘组织块有些尚留在壳内, 有些已离开贝壳进入水中。

二、病原分离

在发病现场取发病幼体用70%酒精表面消毒后, 研碎后接入TCBS培养基平板中, 经25℃、15小时恒温培养后有三种弧菌(9101、9102、9103)生长。三种弧菌的群体及个体特征见表1, 群体特征是将三种菌分别在TCBS培养基上经24小时、25℃恒温培养后的结果。

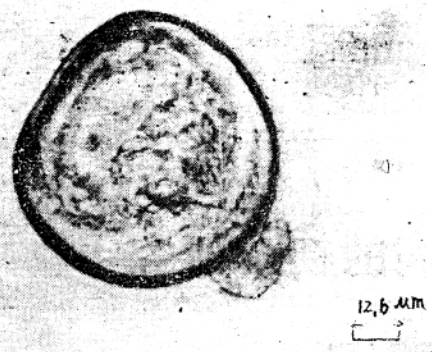


图 1 部分面盘已脱落的发病幼体

表 1 三种弧菌群体及个体特征

菌株号	群 体 特 征		个 体 特 征		
	菌落颜色	菌落其它特性	革兰氏染色	菌体大小(μm)	菌体形态
9101	淡桔黄色	半透明	阴性	2.1×1.1	两端钝圆
9102	兰 色	不透明	阴性	2.1×0.6	两端稍平
9103	灰绿色	不透明	阴性	1.5×1.1	两端钝圆

三种菌在 TCBS培养基上培养后皆菌落边缘整齐、表面光滑。9103菌体比其它两种菌体明显

短。其中9101菌常 2 个菌体连在一起，9102常以单个菌体存在，9103 菌常三个菌体连在一起。

三、感 染 结 果

感染试验所用幼体是将成熟的太平洋牡蛎亲贝、经自然排卵后孵化出的 D 形幼体。感染试验用海水取自大连黑石礁近岸的天然海水，经黑暗沉淀后使用，水温 25℃、水 pH7.9—8.0、海水盐度 31‰。感染采用浸染的方法、试验在 500ml 烧杯中进行、试验水体 500ml、幼体密度是 8 个/ml，菌液加入量 1ml。感染试验共设四个组，每一组又设一平行组，其中包括不加菌液的对照组。在做幼体显微镜下观察时取中、上层幼体。

1. 弧菌感染牡蛎幼体试验结果。由表 2 可见，菌液浓度最低的 9102 菌感染的牡蛎幼体死亡最缓慢。9101 菌液浓度比 9103 菌液浓度的 1/2 还低，但是幼体死亡最快，24 小时观察幼体不仅全部死亡，而且全部空壳。这表明幼体不到 24 小时就已经死亡。第一天 9101、9102、9103 菌感染幼体死亡率分别是 100%、100%、

表 2 弧菌感染牡蛎幼体试验结果

菌 株 号	菌液浓度 (个/ml)	感 染 时 间 (天) 及 观 察 结 果		
		1	2	3
9101	0.8×10 ⁵	幼体全部下沉，死亡		
		同 上		
9102	0.65×10 ⁵	幼体全部上浮，镜检正常	镜检 78 个幼体，36 个正常、36 个面盘收不回，6 个死	镜检 48 个幼体，42 个正常，6 个死
		同 上	同 上	镜检 27 个幼体，22 个正常，5 个死
9103	1.8×10 ⁴	幼体大部分下沉，镜检 89 个幼体，19 个正常，其余死亡	幼体全部下沉，死亡	
		幼体大部分下沉，镜检 31 个幼体，11 个正常，其余死亡	同 上	
对 照	0	幼体全部上浮，镜检正常	幼体全上浮，镜检正常	幼体全部上浮，镜检正常
		同 上	同 上	同 上

0%, 0%, 65~80%; 第二天9102、9103菌感染幼体死亡率分别是8%、8%、100%、100%; 第三天9102菌感染幼体死亡率是15%左右。

2. 氯霉素预防牡蛎幼体发病试验。在试验水体中加入菌液的同时还加入抗菌素药物氯

霉素, 结果见表3, 试验后第一天, 9101、9102、9103每种菌液感染其幼体死亡率除9101组5ppm为70%外, 其他组均无死亡; 试验后第二天, 9101、9102、9103每种菌液感染幼体其死亡率分别是100%、100%、2.5%、16%、15%、0%; 试验后第三天, 9102、9103每种

表3 氯霉素药物预防牡蛎幼体发病结果

菌株号	菌液浓度 (个/ml)	加药量 (ppm)	加药后日数及预防结果观察		
			1	2	3
9101	0.8×10^5	5	幼体大多下沉, 镜检190个幼体, 32个正常, 7个面盘开始脱落, 91个死亡, 幼体挂脏严重	幼体全部下沉死亡	
		10	幼体无下沉, 全部正常	同上	
9102	0.63×10^5	5	幼体无下沉, 全部正常	镜检40个幼体, 27个正常, 12个面盘收不回去, 1个死亡	镜检25个幼体23个正常, 2个死亡
		10	同上	镜检107个幼体, 80个正常, 10个面盘收不回去, 17个死亡	镜检40个幼体, 30个正常, 10个死亡
9103	1.8×10^5	5	幼体无下沉, 全部正常	镜检20个幼体, 15个正常, 2个面盘收不回, 3个死亡	镜检30个幼体, 23个正常, 7个死亡
		10	同上	镜检131个幼体, 120个正常, 11个面盘收不回	镜检49个幼体, 19个正常, 5个面盘收不回, 25个死亡
对 照	0	0	幼体全部上浮, 镜检正常	幼体全正常、上浮	幼体全上浮, 正常
		0	同上	同上	同上

菌液感染其幼体死亡率分别是8%、25%、23%、51%。

四、三种弧菌对常用抗菌药物敏感性试验

将分纯并培养18小时的9101、9102、9103菌株斜面培养物各自用生理盐水洗下, 然后均匀涂于TCBS培养基平板中, 再放药敏纸片, 经24小时、25℃恒温培养后, 测其每种药物的抑菌圈直径。由表4结果见, 9101菌对土霉素、吡哌酸、氯霉素、链霉素、红霉素敏感, 对庆大霉素、先锋霉素、新霉素、青霉素、头孢菌素、痢特灵耐药, 对卡那霉素中度敏感; 9102

表4 三种弧菌对抗菌药物敏感性试验结果

药 物	抑 菌 圈 直 径 mm		
	9101	9102	9103
庆 大 霉 素	12	14.5	10
先 锋 霉 素	6.5	16	7
新 霉 素	10.5	14	8.5
青 霉 素	0	8.5	0
土 霉 素	24	15	22.5
痢 特 灵	14	11.5	9
吡 哌 酸	23	26	24
氯 霉 素	28	28	31
头 孢 菌 素	8	12	8
链 霉 素	22	14.5	11
卡 那 霉 素	16	20	14
红 霉 素	22	22	25

菌对吡哌酸、氯霉素、红霉素、卡那霉素敏感,对庆大霉素、先锋霉素、新霉素、土霉素、链霉素中度敏感,对痢特灵、青霉素、头孢菌素耐药;9103菌对土霉素、吡哌酸、氯霉素、红霉素敏感,对卡那霉素中度敏感,对庆大霉素、先锋霉素、新霉素、青霉素、痢特灵、头孢菌素、链霉素耐药。

五、讨 论

1. 本次大规模流行的太平洋牡蛎幼体病害,因成功地做了9101、9102、9103三种分离菌分别感染正常牡蛎幼体试验,及重复感染试验。感染同时使用抗菌药物后,可以显然延长发病时间、缓解病情,由此可证明,这次流行病由弧菌感染所致,非病毒性感染。这与Elston, R., 等人的报告结果相一致。分离菌9101、9102、9103均为致病菌,其中以9101菌毒性较强。

抗菌药物对牡蛎幼体感染弧菌病有缓解作用、能延长幼体死亡时间,将表1、2进行比较,9101菌浸染的幼体在不加药物时,24小时后死亡率100%,并且100%已空壳,这表明幼体早已死亡;而同时分别加氯霉素5ppm、10ppm其结果,24小时后幼体死亡率分别是70%、0%,空壳率0%、0%。另外,随着时间的延长,10ppm氯霉素对幼体表现出毒性,如9102菌浸染幼体3日后死亡率是15%左右,而同时加10ppm氯霉素其幼体死亡率是25%,这一现象发生可能与氯霉素药物副作用较大有关。这一结果与本人曾做过的氯霉素对中国对虾仔虾幼体毒性试验中,随着时间的延长,幼体对氯霉素的耐受能力显著降低,幼体死亡率表现出迅猛趋势相一致。氯霉素能引起溶血性贫血、循环呼吸骤停,速发性过敏反应及心肌损害等,有些症状可在用药后数小时至2~3天发生。

2. 分析这次流行病发生原因,主要是水源不洁所造成,常温太平洋牡蛎育苗季节大多

在6月份以后,此时海水温度逐渐升高,水中各种细菌大量繁殖,当地海水沉淀池又多年没清理池底,大量有机物在池底堆积,都给病原菌的大量繁殖创造了有利条件,另外,在使用药物防治病害上不得当,其结果导致本次流行病的爆发。

保持清新的水质,适当投药预防病害的发生是海珍品育苗成功的保障。为预防牡蛎幼体病害发生可使用土霉素、吡哌酸,氯霉素等抗菌药物,3种药物最好相互搭配使用,从而可减缓抗药性的产生。

面盘脱落是目前贝类育苗中幼体骤发的严重疾病,一旦发生,常导致育苗的失败,药物也往往难以奏效,本次研究结果,初步认定为弧菌所致。在不同环境下的发病是否尚有其它致病菌及病毒感染,尚需进一步深入研究。

参 考 文 献

- (1) Brown, C. and Losee, E., 1978. Observations on natural and induced epizootics of vibriosis in *Crassostrea Virginica* larvae.
- (2) Elston, R., Leibovitz, L., Releyea, D. and Zatila, J., 1981. Diagnosis of vibriosis in a commercial oyster hatchery epizootics, diagnostic tools and management features. *Aquaculture*, 24: 53-62.
- (3) Elston, R., 1979. Economically important larval bivalve diseases and their control. *Riv. Ital. Piscicoltura, Ittiopatol.*, 14: 47-54.
- (4) Elston, R. and Leibovitz, L., 1980. Pathogenesis of experimental vibriosis in larval American oysters, *Crassostrea virginica*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 37: 964-978.
- (5) Leibovitz, L., 1979. A study of vibriosis at a Long Island shellfish hatchery. New York Sea Grant Reprint Series, NYSG-RR-79-02. N. Y. Sea Grant Institute, Albany, NY 12246. 23 pp.
- (6) Tubiash, H. S., Chanley, P. E., and Leifson, E., 1965. Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve molluscs. I. Etiology and epizootiology. *J. Bacteriol.*, 90(4): 1036-1044.
- (7) Walne, P. R., 1958. The importance of bacteria in laboratory experiments on rearing the larvae of *Ostrea edulis* (L.). *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 37: 415-425.