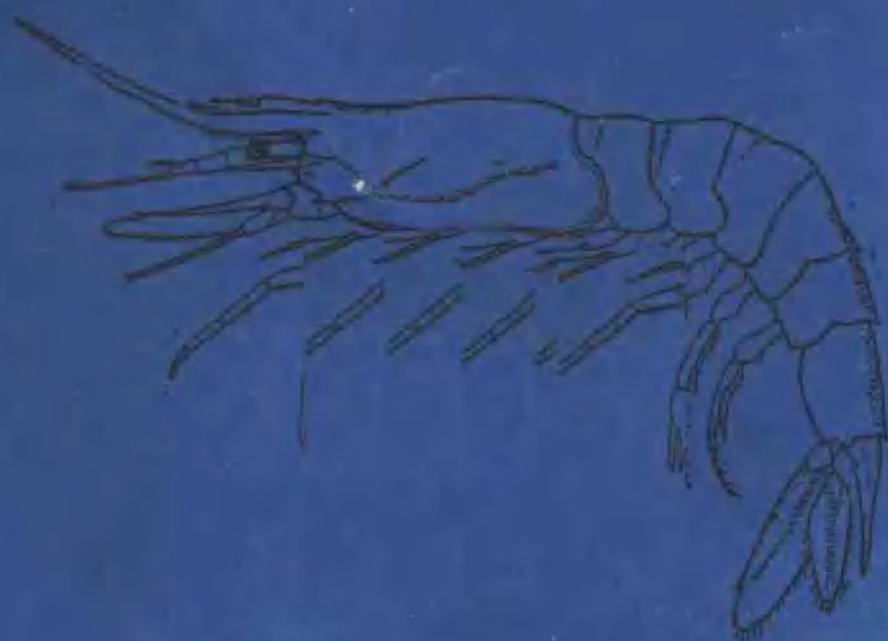


对虾养殖专题文献

对虾病防治

專輯

III



中国科学院海洋研究所科技情报室编

一九九二年六月·青岛

对虾幼体真菌病及防治的研究

吴定虎 洪 心 曾华伟

(厦门市水产研究所)

有关甲壳类及幼体寄生真菌的研究,国外早在本世纪四十年代就开始。当时主要是分类的研究,如美国的 Couch (1942), Sandoz, Rogers and Newcombe (1944) 等。到了六七十年代,由于生产发展的需要,虾苗人工繁殖逐渐形成新的产业,生产中不断受到病害的威胁。因此,有关幼体病害的研究,尤其真菌病,逐渐被人们重视。研究内容也从单纯分类向传播途径、防治措施等方面深入。Johnson (1958, 1960, 1970)、Cook (1971)、Bian, Hatai, Po and Egusa (1977, 1979, 1980) 等都做了大量的研究。

国内孟庆显、俞开康 (1980) 认为寄生于中国对虾卵及幼体上的真菌有两种。一是具有顶囊的可能是链壶菌 (*Legenidium* sp); 另一种只有放出管而无顶囊的可能是离壶菌 (*Sirolopidium* sp)。孙修勤 (1990) 研究了我国对虾幼体的链壶菌病及防治。此外,国内至今未见对对虾幼体真菌病的形态、分类及生态等做进一步研究。

在对虾人工育苗中,由于真菌病的发生,损失很大。福建南部每年因真菌病流行,损失幼体达数亿尾。为此,我们曾就中国对虾,长毛对虾及斑节对虾,育苗期幼体的真菌病及其防治进行研究。现将研究结果报告于下。

材 料 与 方 法

一、调查与实验材料

材料来自厦门市水产养殖公司对虾育苗场,同安县兴发对虾育苗场及漳浦县水产开发中心对虾育苗场等。调查方法,每个点选择 3—5 个育苗池,从卵到各期幼体各镜检 20 尾。

发现病原后,把阳性幼体置于培养皿或 250cc, 500cc 烧杯中,而后定期取材于显微镜下进行观察,以目测微尺测量其大小。并进行显微摄影。

二、病原菌的分离培养

分别从厦门吴冠育苗场和厦门水产养殖公司育苗场的中国对虾和斑节对虾的蚤状幼体,分离到海壶菌及链壶菌。将感染有真菌的幼体,放入 PYG 液体培养基,加少许青霉素,然后放 25℃ 恒温培养箱中培养。后以无菌操作将培养物接种到 PYG 固体培养基上,进行纯化培养。

三、病原对温度、pH、NaCl 的耐受性试验

1、温度:将病原接种于 PYG 固体培养基上,分别置于 5—35℃,梯度为 5℃ 的

恒温培养箱内,培养96小时,观察记录各自的生长情况。

2、pH: 配制pH 2—12, 梯度为2的各级灭菌海水, 分别接种, 于25℃恒温培养96小时, 观察记录各自的生长情况。

3、NaCl: 配制含NaCl 0—12%, 梯度为2的各级PYG培养基, 分别接种, 于25℃恒温培养96小时, 观察记录生长情况。

四、药物预防试验:

试验池从亲虾入池产卵开始, 用10—40ppb亚基兰全池泼洒。每天一次, 直至蚤状期。而对照池不加任何药物。

结 果

研究结果表明, 福建南部中国对虾, 长毛对虾及斑节对虾的卵及幼体的真菌病有两种, 为海壶菌病及链壶菌病。其病原体经鉴定分别为弥尔福海壶菌 (*Haliphthoros milfordensis*) 和青蟹链壶菌 (*L. Scyllae*)。现分别叙述于下。

一、海壶菌病

海壶菌主要危害中国对虾越冬亲虾的鳃、卵、无节幼体和蚤状幼体。为厦门地区中国对虾育苗期危害性最大的病害。

(一) 症状及危害性: 幼体被海壶菌感染后, 身体变得不透明, 呈灰白色。活动能力明显下降, 趋光性能减弱或不趋光, 散游于水的中下层, 重者濒死沉于底部。摄食减少或停止, 胃肠空。显微镜检查可见头胸部、腹部、附肢及眼睛等具有少量菌丝或充满菌丝体。引起越冬中国对虾亲虾黑鳃、烂鳃, 病虾眼睛凹陷, 缺少弹性。

幼体被海壶菌感染后无法正常蜕皮。当菌丝迅速生长时, 即可引起幼体死亡。最后幼体的营养, 组织全部被吸收, 余下躯壳, 内充满海壶菌的菌丝体, 并从眼睛伸出体外。卵被感染后胚胎停止发育, 并导致死亡, 最后整个卵充满菌丝体。幼体真菌病严重危害对虾的无节和蚤状幼体, 尤其是蚤状幼体。发病迅速, 当水温21—22℃时, 20小时左右即可引起幼体大量死亡, 死亡率高达95%以上。

越冬期中国对虾亲虾发病, 常与镰刀菌病并发, 加重病情增加死亡率。

(二) 病原菌的形态特征:

弥尔福海壶菌 (*H. milfordensis*) 菌丝比较粗壮, 分枝, 但没有隔壁。初生菌丝较细, 原生质较稀薄。即将成熟的菌丝较粗, 原生质稠密。菌丝直径5.96—26.82μm (图1)。全实性, 成熟时整个菌丝体均可形成游动孢子, 充满菌丝内。菌丝向外伸出的放出管, 呈波浪状或直线形, 大小为26.82—325×4.47—17.88μm。游动孢子为椭圆形、圆形或梨形, 圆形的直径为4.76—5.96μm; 椭圆形或梨形的大小为5.96—8.16×4.47—5.96μm。成熟的动孢子, 在菌丝内逐渐活动, 最后经放出管放散出去 (图2)。

(三) 病原生态:

1、无性繁殖观察: 海壶菌孢子遇到对虾卵或幼体时, 便可附上。并可分泌一种溶解甲壳质的物质, 长出发芽管, 伸入虾体, 长成新菌丝。发芽管长8.94μm, 当室温14—15.5℃时, 附着后长出的新菌丝, 经10—17小时便可增长几倍到十几倍, 使蚤状幼体

全身充满菌丝体。

2、病原菌的培养特征：在PYG液体培养基上，海壶菌生长呈疏松棉花状，菌丝体柔软。在PYG固体培养基上，海壶菌则生长成灰白色棉絮状，基底呈土黄后，逐渐变为黑褐色。

3、不同温度的生长情况：

温度在2—35℃海壶菌均可生长，但最适宜的温度为15—25℃。2℃时菌丝可生长，并形成少量的动孢子，但不放散。5—15℃菌丝生长正常，并有少量孢子放散。高于30℃生长缓慢，菌丝出现异常，粗细不均（见表1）。

表1 不同温度对海壶菌、链壶菌生长的影响（单位：℃、天）

温度 时间	海 壶 菌				链 壶 菌			
	1	2	3	4	1	2	3	4
2	-	-	±	+	-	-	-	-
5	-	±	+	+	-	-	±	±
10	±	+	+	++	-	±	±	+
15	+	++	++	+++	-	+	+	+
20	+	++	+++	+++	+	+	+	++
25	+	++	+++	+++	+	++	++	+++
30	+	+	++	+++	+	+++	+++	+++
35	+	+	+	++	+	+++	+++	+++

• - 表示不生长，± 表示生长不明显，+ 表示有少量生长，++ 表示生长较多，+++ 表示生长最好。

4、不同NaCl含量的生长情况：

海壶菌在含NaCl 0—10%的PYG固体培养基上均能生长，以NaCl含量0—2%为最适，生长最好。当NaCl为8—10%时，生长缓慢，菌落边界不清，NaCl为12%时则不生长（见表2）。

5、不同pH的生长情况：

海壶菌在pH 4—10的灭菌海水中均能生长，以pH 6—10为最适。当pH低于4时，海壶菌的生长受抑制，而pH达12时则完全不生长，而且菌丝开始萎缩、变形（见表3）。

（四）流行情况：

海壶菌病发生于中国对虾的卵、无节幼体和蚤状幼体，以及越冬的中国对虾和长毛对虾的鳃和眼睛。人工感染可使中国对虾的糠虾和仔虾感染上海壶菌，并导致幼体死亡。实验证明亲虾鳃上的海壶菌可以感染蚤状幼体和糠虾，使幼体死亡；幼体发病时均可在供产卵的亲虾鳃上找到病原体。上述表明幼体真菌病的感染源为带菌的亲虾。

斑节对虾育苗水温高达30—32℃，其幼体未见海壶菌感染。一旦将无节幼体置于24.3—24.7℃水温条件下，可以感染上海壶菌，而且菌丝能成熟，并放散孢子。

表2 不同NaCl含量海壶菌生长的情况 (单位: %、℃、天)

NaCl含量	温度 时间		20				25			
	1	2	3	4	1	2	3	4		
0	+	++	++	+++	+	++	+++	+++		
2	+	+	++	++	+	++	+++	+++		
4	-	±	+	+	+	+	+	++		
6	-	-	+	+	-	+	+	+		
8	-	-	±	+	-	+	+	+		
10	-	-	±	±	-	±	±	±		
12	-	-	-	-	-	-	-	-		

表3 不同pH海壶菌生长的情况 (单位: ℃、天)

pH	温度 时间		20				25			
	1	2	3	4	1	2	3	4		
2	-	-	±	±	-	±	±	±		
4	-	-	+	+	-	+	+	-		
6	-	+	++	+++	+	+	++	+++		
8	-	+	++	+++	+	++	++	+++		
10	-	±	+	++	-	+	++	+++		
12	-	-	-	-	-	-	-	-		

对虾育苗工艺和投喂的饵料,与海壶菌病的发生关系密切。厦门市水产养殖公司对虾育苗场,1988年3月开展中国对虾育苗,早期幼体投喂蛋黄或豆浆,残饵多有机物多,导致海壶菌病严重暴发。6、7两口池无节幼体均为2800万个左右,到无节幼体后期已快病,严重发病引起大量死亡。6号池仅余下五、六十万个蚤状幼体,只好放掉,死亡率高达97.9%,7号池到第七天仔虾出苗时为190万,出苗率仅6.8%。镜检这二口发病池,无节、蚤状幼体各20尾。其中6号池无节幼体海壶菌感染率达55.0%,蚤状幼体感染率为76.7%,感染强度为+—+++。7号池蚤状幼体的感染率为15% (该池已大量死亡后,才镜检)。强度为+—+++。

镜检池水温为20—24℃,比重1.021, pH7.92—8.3, 氨氮0.03—1.25mg/l。

而便是厦门海区的关冠对虾育苗场,用生态系育苗培育中国对虾,早期幼体投喂单胞藻,也曾发生海壶菌病,但很轻。检查三口池的蚤状幼体1—2期结果见表4。

海壶菌病流行于3—4月,5月以后,同一育苗场长毛对虾及斑节对虾的卵及幼

体,则未见海壶菌病发生,而发生链壶菌病。

二、链壶菌病

链壶菌寄生于长毛对虾及斑节对虾的卵和幼体。常导致幼体,尤其蚤状幼体的大批死亡。为长毛对虾及斑节对虾育苗中,危害性最大的病害之一。

(一) 症状及危害性:

其症状与海壶菌引起的中国对虾幼体病的症状相似。幼体活动能力下降,散游于水的中、下层。趋光能力减弱,身体变得不透明,呈灰白色。严重时便沉于底部。幼体摄食减少以至停止。镜检可见头胸部、腹部、附肢和眼睛等具有分散的菌丝,严重时整个幼体内充满菌丝体(图3)。

危害斑节对虾及长毛对虾的卵及各期幼体,对蚤状幼体的危害性更大,孢子侵入,萌发二、三条菌丝便可使幼体处于濒死状态。发病非常迅速,最初仅少数幼体活力下降,不摄食,经10—20小时便可造成大批死亡,死亡率高达95%以上。

(二) 病原的形态特征:

经鉴定病原体为青链壶菌(*L. Scyllae*),菌丝分支,较海壶菌稍细,没有隔壁。初生菌丝较细,原生质稀薄。成熟菌丝原生质较稠密。繁殖时菌丝先长出放出管,而后原生质流向放出管的末端而膨大形成顶囊。顶囊呈圆形或椭圆形,其内原生质形成动孢子,(图4)动孢子成熟后逐渐活动,顶囊壁崩解,动孢子冲出顶囊,散于水中。动孢子游动一定时间,当遇到寄主或附着物便附上形成休眠孢子,经短时间休眠后长出细长的发芽管,其末端膨大长成新菌丝。如果因顶囊壁较坚固没有崩解,动孢子无力破囊而出,则为孢子在顶囊内照样可萌发,长出新菌丝。这表明动孢子发芽时,可产生某种溶组织的物质(如酶),溶解顶囊壁(或幼体的几丁质,钻入幼体组织),使其发芽长出新菌丝。

青链壶菌菌丝直径为5.96—13.39 μm 。放出管直线形,大小为35.76—134.10 $\times$ 5.96—13.41 μm 。顶囊圆形的直径为13.41—65.56 μm ;椭圆形的大小为62.53—104.3 $\times$ 52.1—50.6 μm 。动孢子椭圆形或梨形,其大小为8.69—13.41 $\times$ 5.96—11.92 μm 。休眠孢子圆形,直径为5.22—3.94 μm 。顶囊内动孢子的数目为3—60个,发芽管长11.92—53.02 μm 。

(三) 病原生态:

1、繁殖观察:当室温在24—25.5℃,从顶囊形成到动孢子开始微动,需20—45分钟;动孢子微动到放散需10—30分钟;动孢子放散到发芽需5—40分钟。从顶囊形成到动孢子放散、休眠、并发芽只需35分钟到2小时,温度高顶囊内孢子成熟、放散及发芽快,反之则慢。如果顶囊形成中,菌丝原生质流向顶囊缓慢,则成熟后动孢子活力差,呈不规则形的多,这种孢子发芽率低,即使能发芽,生长也较缓慢。其原因可能是链壶菌菌丝生长中营养不良所致。

当温度适宜时,链壶菌生长非常迅速。斑节对虾蚤状幼体,感染后长出二、三条菌丝,在室温24.5—25℃,经5—6小时,菌丝体便可充满幼体内,并产生顶囊。

表4 蚤状幼体海壶菌感染率

(单位:尾、%)

池号	检查幼体数	感染幼体数	感染率
2	20	1	5
3	20	0	0
8	20	0	0

寄生于斑节对虾无节幼体上的链壶菌，可以感染长毛对虾的蚤状幼体。在水温24—25.5℃，经20小时，其感染率可达73.3%。

2、病原菌的培养特征：链壶菌在PYG液体培养基上生长成球状白色的小菌落。当动孢子放散后会在试管壁上形成针点状白色的小菌落。在PYG固体培养基上，则在培养基内生长成树枝状白色或灰白色的菌落。培养基表面无气生菌丝生长，呈白色或灰白色粗糙放射状的圆形或椭圆形。

3、不同温度的生长情况：在温度为5—35℃均能生长。当温度低于5℃时，链壶菌处于休眠状，菌丝不生长，动孢子不萌发。温度在5—20℃时，菌丝生长较慢，动孢子放散量很少，孢子会萌发。其适温范围为25—35℃，见表1。

4、不同NaCl含量的生长情况：链壶菌在含NaCl为0—6%的PYG固体培养基内均能生长，以NaCl为0—2%最适，生长最好。当NaCl含量8%以上时生长受抑制，菌落边界模糊不清，而NaCl含量高于10%时，则完全不生长，见表5。

表5 不同NaCl含量链壶菌生长的情况(单位：%、℃、天)

温度 时间 NaCl含量	20				25			
	1	2	3	4	1	2	3	4
0	±	+	++	+++	+	+-++	++	+++
2	±	+	++	+++	+	+-++	++	+++
4	-	+	+	++	±	+	+	++
6	-	±	+	+	±	+	+	+
8	-	-	±	±	-	-	±	±
10	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-

5、不同pH的生长情况：链壶菌在pH 6—10的灭菌海水中均能生长，以pH 6—8为最适。当pH低于6和高于10时，链壶菌的生长受抑制不能繁殖，pH达12时，菌丝原生质萎缩，变形，并呈黄褐色，完全不生长，见表6。

(四) 流行情况：

链壶菌发现于斑节对虾及长毛对虾的卵、无节及蚤状幼体，在育苗池中糠虾及仔虾没有发现链壶菌感染。水温在27—33℃发病最快，10小时左右便可造成幼体大批死亡。

1988—1990年，调查厦门水产养殖公司对虾育苗场的斑节对虾无节及蚤状幼体44池次，感染链壶菌14池次，占29.5%，见表7。

检查长毛对虾无节和蚤状幼体5池次，感染一池次占20%，感染率为12.5%。另有一池6月21日育苗，于室外没有遮盖，水温高达29.4—33.6℃，用亚甲基兰预防也无济于事，蚤状幼体感染率达81.8%。发现幼体活力差，经10小时几乎全部死亡。发病水温

27—33.6℃, 比重1.016—1.020, pH7.8—8.1。

表6 不同pH链壶菌生长的情况 (单位: ℃、天)

温 度 pH 时 间	20				25			
	1	2	3	4	1	2	3	4
2	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	±	-	-	±	+
6	-	+	+	++	+	+	++	++
8	+	+	++	+++	+	++	+++	+++
10	-	+	+	+	+	+	+	++
12	-	-	-	-	-	-	-	-

表7 链壶菌感染斑节对虾幼体的情况* (单位: 口、尾、%)

年 份	检查池数		感染池数及所占比例				感 染 率	
	N	Z	N	占比例	Z	占比例	N	Z
1988年	8	8	2	25.0	6	75.0	9.1—40(平均24.6)	5—50(平均29.8)
1989年	5	8	0	0	1	12.5	0	16.0
1990年	7	8	1	14.3	8	37.5	7.7	35—63.6(平均52.8)

• 使用亚甲基兰预防。

链壶菌病流行于4—7月, 以4—6月为严重。厦门、漳浦等地均有发现, 以厦门水产养殖公司对虾育苗场为严重。历年来损失斑节对虾及长毛对虾幼体多达数亿尾。这可能与该场所处海区的潮间带长, 且为泥滩有机物多等因素有关。

链壶菌病较海壶菌病来势更猛, 危害性更大。一是由于幼孢子为一次游泳性, 而非多次游泳性; 二是因斑节对虾及长毛对虾育苗, 水温高达25—32℃, 因此链壶菌生长繁殖快, 传播及发病也迅速。

同一育苗场, 3—4月中国对虾育苗期间, 则未见链壶菌病发生。

三、防治试验

使用10—40ppb亚甲基兰对幼体的海壶菌病及链壶菌病进行生产性防治试验, 其防治效果、感染率及出苗率见表8—9。

从表8可看出, 用10—20ppb亚甲基兰预防幼体的海壶菌病, 具有很好的效果, 有效率达90%以上, 明显提高了人工育苗的成活率。药物预防比治疗效果好, 勤检查早发现早治疗比迟治疗效果好。厦门水产养殖公司育苗场3号池, 放有产后亲虾, 后发现产

表8 中国对虾幼体弧菌病的防治试验

(单位: ppb, 万尾, %, 万尾, %)

防治药物	药物浓度	池号	无节幼体数量	各期幼体感染率				出苗量	成活率
				N	Z	M	P		
亚甲基兰 (预防)	10—20	3	1400	—	—	—	—	724	51.7
		4	1400	—	—	—	—	964	68.9
		5	800	—	—	—	—	762	95.3
			3600					2450	68.1
亚甲基兰 (治疗)	20	8	400	62.2		—	—	105	26.3
未用药物防治	/	6	2800	55.0	76.7	—	—	死亡严重 排掉	
		7	2800	未检查	15.0**	—	—	190	6.8

* “—”表示未检出(下同)

** 大量死亡后才进行镜检

卵,因未采取药物预防,导致发病。当时随机取2000毫升育苗池水,逐个检查无节及蚤状幼体,其感染率达62.2%。后及时进行治疗,病得到控制,400万的无节幼体,最后出苗10万,成活率为26.3%。比未加药物预防6.8%的出苗率要高,但比药物预防平均出苗63.1%要低得多。

表9 斑节对虾幼体弧菌病防治试验

(单位: ppb, 万尾, %, 万尾, %)

防治药物	药物浓度	池号	无节幼体数量	各期幼体感染率				出苗量	成活率
				N ₁₋₃	Z	M	P		
亚甲基兰 (预防)	20—40	7	162	3	—	—	—	120	38.1
		9	156	—	—	—	—		
		13—2	140	—	—	—	—	141	48.6
		15—2	130	—	—	—	—		
		16—2	180	—	—	—	—	59	32.8
未用药物防治	/	13	250	42.8	(因弧菌病严重全部排掉)				
		15	300	51.3					
		16	250	45.2					
		17	200	40.7					

表9说明用20—40ppb亚甲基兰预防链壶菌病,同样具有很好的效果。采取药物预防的5个池子,其幼体除一池外,均未检出链壶菌。而未加药物预防的4个池子,无节幼体1—3链壶菌平均感染率达45%,到了无节幼体后期及蚤状幼体便大量死亡,全部排掉。

讨 论

1、据记载寄生于海产甲壳类,常见真菌有海壶菌,链壶菌,离壶菌及阿特金斯菌(*Atkinsiella*)等四个属。其中海壶菌属有寄生于菲律宾斑节对虾(*Penaeus monodon*)幼体的菲律宾海壶菌(*H. philippinensis*)及寄生于美国产白对虾(*P. setiferus*), *Vrosalpinx arneres*及*Homarus americanus*的卵,幼体或成体鳃的弥尔福海壶菌(*H. milfordensis*)等。经鉴定中国对虾卵及幼体上寄生的海壶菌,从形态及生态均与弥尔福海壶菌相同;与菲律宾海壶菌存在差异。两者所不同的是,放出管及休眠孢子发芽管长度。菲律宾海壶菌的放出管大小为 $620 \times 7.5-12.5 \mu\text{m}$;发芽管长 $50 \mu\text{m}$ 。而中国对虾上海壶菌,放出管大小为 $26.82-225 \times 4.47-17.88 \mu\text{m}$;发芽管长 $8.94 \mu\text{m}$ (从一个刚侵入幼体长出新菌丝的休眠孢子测得)。

2、寄生于海产甲壳类卵和幼体的链壶菌,已知有三种:①青蟹链壶菌(*L. Scyllae*),寄生于菲律宾产锯缘青蟹卵和幼体。②小藤壶链壶菌(*L. Chthamalophilum*)寄生于美国一种小藤壶的卵。③蟹链壶菌(*L. Callinectes*)寄生于美国产扁龟藤壶(*Chelonibia patula*)、豆蟹(*Pinnotheres* sp)等的卵。除外还有寄生于菲律宾的斑节对虾,美国的美州龙虾(*Homarus americanus*)等卵和幼体上的若干未定种,而寄生于长毛对虾及斑节对虾(马来西亚引进亲虾)卵和幼体的链壶菌与青蟹链壶菌相同。

3、对虾幼体真菌病的发生与育苗技术、工艺,亲虾性腺发育好坏、幼体健壮与否,水温,投喂的饵料及水中有机物的多少等育密切关系。1988—1989年我们在厦门水产养殖公司对虾育苗场,用亚甲基兰防治海壶菌和链壶菌病均取得很好的效果。亚甲基兰的作用机理在于,与微生物的酶系统发生氢离子竞争性对抗,使酶失去活性,抑制真菌的繁殖。试验证明使用亚甲基兰后链壶菌虽能形成顶囊,但无法成熟产生幼孢子。

但也出现过用亚甲基兰防治效果不稳定。如同样是厦门水产养殖公司斑节对虾育苗,使用亚甲基兰,1989年效果很好,而1990年则较差,用量比1989年多2—5倍,也未能完全控制链壶菌病。其原因我们认为与育苗的技术、工艺有关。1990年换了二位育苗技工,亲虾切除眼柄催熟仅2天即行产卵。无节幼体6期起每2小时投饵一次。(1989年则在切除眼柄后4天才产卵。蚤状期起每4小时投喂一次)造成卵子成熟成度差、孵化率低、无节幼体弱,刚毛弯曲附有污物,不趋光变态慢等。过量投饵使水中残饵多,水质破坏,蚤状期即受到聚缩虫感染,感染率达20—41%。这种幼体和水质,使得20—40ppb亚甲基兰也无法控制链壶菌和聚缩虫的并发症。因亚甲基兰在有机物多的水中药性易减退,影响防治的效果。

因此,使用亚甲基兰等抗真菌药防治幼体真菌病,尤其斑节对虾、长毛对虾在较高温度下育苗,发病非常迅速,必须贯彻预防为主,采取生态防病与药物预防相结合,选择健壮、性腺成熟度好的亲虾,育苗水须经严格过滤,采用生态系育苗,严格控制投饵量,防止水质污染等生态防病措施。同时应用抗真菌药进行预防,亚甲基兰的用量视水温高低,水中有机物的多少而增减。这样才能达到预防与控制幼体真菌病发生的目的。



图1 弥尔福海壶菌形态, 及在幼体上分布情况 $\times 130$

图2 弥尔福海壶菌菌丝内成熟的动孢子及放出管 $\times 700$

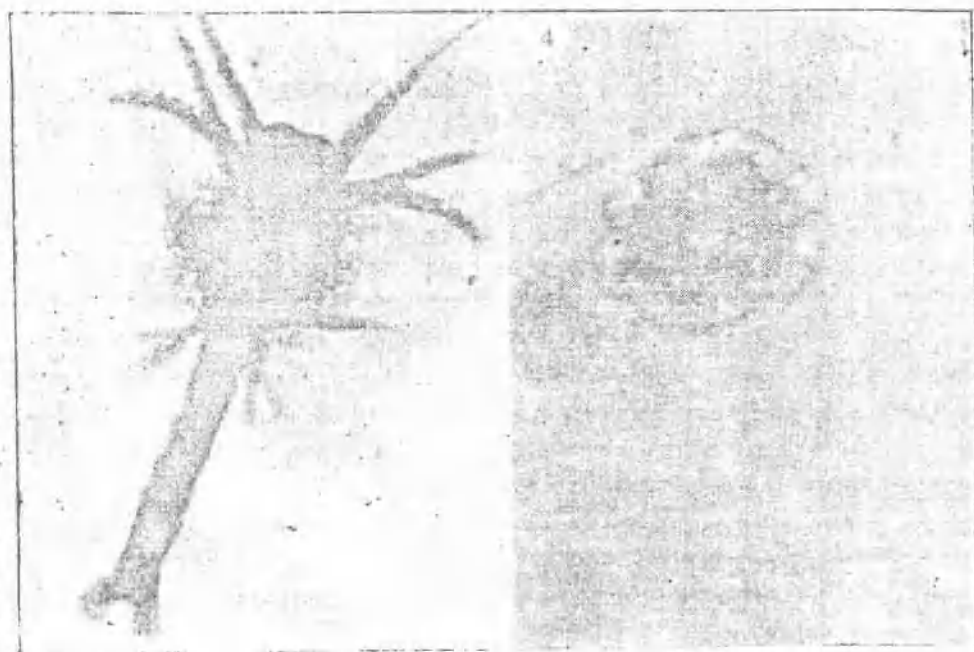


图3 对虾幼体全身充满青蟹链壶菌 $\times 30$

图4 青蟹链壶菌顶囊及形成的动孢子 $\times 600$

中国对虾 (*Penaeus Orientalis* Kishinouye)

流行性弧菌病的研究^{*1*2*3}

叶 孝 经

(黄海水产研究所)

王 文 兴

(国家海洋局第一海洋研究所)

一. 前 言

对虾弧菌病的研究国内未见报道。在国外, Donald V. Lightner等报道了美国1972~1973年的褐对虾 (*Penaeus agtecus*)、白对虾 (*P. setiferus*)、桃红对虾 (*P. duorarum*) 的幼虾由于感染了以溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 为主的病原菌使死亡率接近100%⁽¹⁰⁾。1975年8月在墨西哥佩尼亚斯科港区饲养的青对虾 (*P. stylirostris*) 发生弧菌病大流行⁽³⁾。日本对虾 (*P. japonicus*) 由于弧菌病流行造成大量糠虾幼体死亡时有发生⁽⁵⁾。

本文对幼体到养成前对虾的流行性弧菌病进行了研究, 作了细菌学和病原菌学的研究工作。报告于下:

一. 材 料 与 方 法

1. 样品及处理:

3小时内将近岸水样、饵料样、濒死虾样盛无菌瓶置于冰瓶中, 带回实验室作细菌分离、计数。

计数方法用MPN三管法, 按总异养菌、弧菌培养在25℃下, 7天后计数。将濒死幼体50尾置于无菌研磨器中加1毫升2.5%无菌食盐盐水磨碎作细菌计数、分离; 成虾取病灶磨碎作细菌分离。将分纯的菌株鉴定到属, 再挑选有代表性的菌株鉴定到种。弧菌属的鉴定是根据多贺信夫鉴定法⁽⁷⁾, 种的鉴定是根据A. L. Furniss⁽⁸⁾和I. K. Woehsuth等“Vibrio”鉴定法⁽¹¹⁾。

●1 工作中多次得到山东海洋学院水产系陈世阳副教授的指导, 生物系徐怀恕老师提供了资料 and 标准菌株; 在作小白鼠毒性试验时得到山东海洋药物研究所病毒室殷丽明主任的协助和指导, 在此一并致谢。

●2 黄海水产研究所调查研究报告第295号。

●3 1985年10月18日收到。

2. 培养基:

异养菌培养基: 葡萄糖 2 克, 蛋白胨 5 克, 酵母膏 1 克, 氯化钠 25 克, 蒸馏水 1 升, 固体培养基加琼脂 15 克, pH7.7。

TCBS 培养基: 酵母膏 5 克, 蛋白胨 10 克, 硫代硫酸钠 10 克, 柠檬酸钠 10 克, 柠檬酸铁 1 克, 牛胆汁粉 8 克, 蔗糖 20 克, 氯化钠 25 克, 溴酚兰 0.04 克, 百里酚兰 0.04 克, 蒸馏水 1 升, 固体培养基加琼脂 14 克, pH8.6。

毒性试验用培养 24 小时发病幼体分离菌注入小白鼠腹腔; 幼虾感染试验在腹节 3~4 节注入。

药敏试验用药物纸片是上海医学化验所产品。

二. 结 果

(一). 幼体发病部分

在发病期及时取样, 进行细菌计数(表 1)。

表 1 6 月 2 日 样 品 的 细 菌 计 数

细 菌	样 品 菌 数 (个 / 克)					备 注
	岸边水样	水塔水样	出口卤虫卵	卤虫饵料	酵母饵料	
总异养菌	43×10^4	93×10^2	46×10^4	46×10^7	24×10^7	饵料是现场投喂幼体用的 鲜重。
弧 菌	24×10^4	24×10^2	23×10^4	24×10^5	24×10^7	

以岸边水引入水塔, 经沉淀后, 再引入养殖池中作养殖虾苗及幼体用水, 从水塔水样来看, 养殖用水菌数不高, 而酵母饵料和卤虫饵料弧菌数很高, 比出口卤虫卵高 1~3 个数量级, 比养殖用水高 3~5 个数量级。由于所用该两种饵料的弧菌数很高, 恰在此期间连续 1 个月的阴雨天, 饵料的污染和长期阴雨天诱发了这类病原菌大量繁殖而导致发病的重要原因。

发病幼体的观测:

表 2 对 虾 幼 体 的 菌 数

细 菌	菌 数 (个 / 克 湿 重)		备 注
	健康幼体菌数	濒死病幼体菌数	
总异养菌	56×10^7	48×10^9	该菌数不是发病指数, 只是当时发病 的表现。
弧 菌	96×10^5	48×10^8	

从健康幼体和濒死幼体的菌数对比来看,无论从总异养菌数或弧菌数,得病的都比健康的幼体多2个数量级。

对濒死幼体的增菌培养液用显微镜直接观察,发现了大量活跃的杆菌。对增菌液的菌进行了分离和属的鉴定,证明主要是弧菌属的细菌。

发病幼体,先是游泳打转,然后肝胰脏变白,肠变粗呈“S”形,最后整个幼体变白沉底而死。

病原菌是从育苗池中发病的50尾鲢状幼体,得到了12株分离菌,进行了属的鉴定。

表3 濒死幼体分离菌株属的鉴定

菌株编号	在TCBS培养基24小时菌落(毫米)	格兰氏染色	汉—莱复进培养基试验	0/129敏感试验(150μg/片)	鞭毛染色	结 论
Z601—1	1.2, 黄	阴性	发酵型, 有动力	+	单极毛	弧菌属(<i>Vibrio</i> spp.)
Z601—2	1.2, 黄	阴性	发酵型, 有动力	+	单极毛	弧菌属(<i>Vibrio</i> spp.)
Z601—3	1.2, 黄	阴性	发酵型, 有动力	+	单极毛	弧菌属(<i>Vibrio</i> spp.)
Z601—4	针尖, 绿	阴性	氧化型, 有动力	±	单极毛	假单胞杆菌属(<i>Pseudomonas</i> spp.)
Z601—5	1.2, 黄	阴性	发酵型, 有动力	+	单极毛	弧菌属(<i>Vibrio</i> spp.)
Z601—6	1.2, 绿	阴性	发酵型, 有动力	+	单极毛	弧菌属(<i>Vibrio</i> spp.)
Z601—7	1.2, 黄	阴性	发酵型, 有动力	+	单极毛	弧菌属(<i>Vibrio</i> spp.)
Z601—8	1.0, 黄	阴性	发酵型, 有动力	+	单极毛	弧菌属(<i>Vibrio</i> spp.)
Z601—9	1.2, 黄	阴性	发酵型, 有动力	+	单极毛	弧菌属(<i>Vibrio</i> spp.)
Z601—10	1.2, 黄	阴性	发酵型, 有动力	+	单极毛	弧菌属(<i>Vibrio</i> spp.)
Z601—11	1.2, 黄	阴性	发酵型, 有动力	+	单极毛	弧菌属(<i>Vibrio</i> spp.)
Z601—12	1.2, 黄绿	阴性	发酵型, 有动力	+	单极毛	弧菌属(<i>Vibrio</i> spp.)

经鉴定在12株分离菌中全为格兰氏阴性杆菌,在TCBS培养基上25℃,经24小时培养,有10株是黄色菌落,1株为绿色菌落,汉—莱复进培养基试验都是发酵型,有动力,鞭毛为单极毛,对0/129都敏感,被鉴定为弧菌属(*Vibrio* spp.);而有1株分离菌Z601—4是针尖大小绿菌落,汉—莱复进培养基试验为氧化型,有动力,鞭毛是单极毛,对0/129微敏感,鉴定为假单胞杆菌属(*Pseudomonas* spp.)。

将分离菌进行了如下毒性试验:

表 4

小白鼠毒性试验

(菌液浓度: $10^8 \sim 10^{10}$ 个/毫升)

感染菌株编号	腹腔注入菌液 (0.5毫升/只)	2天TCBS培养基 上的菌落(毫米)	格兰氏染色	汉—莱复选培养基试验	鞭毛染色
Z601—1	20小时死去	5.0 , 黄	阴性	发酵型, 有动力	单极毛
Z601—6	11小时死去	1.0~2.0, 绿	阴性	发酵型, 有动力	单极毛
Z601—7	20小时死去	1.0~3.5, 黄	阴性	发酵型, 有动力	单极毛
Z601—10	—	4.0 , 黄	阴性	发酵型, 有动力	单极毛
对照(2.5%无 菌食盐水)	存活	无菌	—	—	—

表4可见: 感染用的菌株, 通过对小白鼠腹腔注射, 在11~20小时先后死去, 毒性是较强的, 而对照无死亡。对照是用2.5%无菌食盐水对小白鼠进行腹腔注射不发病也分离不出菌来。对感染病死者马上剖腹分离得到各菌株, 通过表4中的各项试验来看, 这些分离的菌正是腹腔注入小白鼠的感染菌株。表4中的感染菌株正是表3中的同一菌株。

用幼虾作感染试验: 供试Z601—1和Z601—6两株菌, 菌液浓度 10^{10} 个/毫升, 每尾虾从腹节3~4节注入0.001毫升, 对照用2.5%无菌食盐水0.001毫升注入, 供试虾体长为5~7厘米, 每组10尾。

表 5

幼 虾 感 染 试 验

供 试 菌 株	感染时间和死亡率			备 注
	1天	2天	3天	
Z601—1	0	20	50	对照组第2天死了1尾, 可能是操作之故。
Z601—6	0	20	60	
对照(2.5%无菌食盐水)	0	10	10	

由表5可见两株菌都有毒性, 而Z601—6更强一些。

用无菌操作法, 从感染后的濒死幼虾的肝胰脏中得到分离菌株, 经24小时, 25°C 下培养作了如下试验:

表 6

感染后濒死病幼虾肝胰脏分离菌株

在TCBS平板上的菌 落(毫米)	格兰氏染色	汉—莱复选培养基试验	鞭毛染色	结 论
1.5, 黄	阴 性	发酵型, 有动力	单极毛	A. 弧菌属(<i>Vibrio</i> spp.)
1.5, 绿	阴 性	发酵型, 有动力	单极毛	B. 弧菌属(<i>Vibrio</i> spp.)

从分离的两株弧菌A、B来看, 正是感染的供试菌株Z601—1和Z601—6, 用发病幼体分

离菌作感染幼虾用的供试菌株，幼虾感染后发病，在濒死病虾体中又分离出感染菌株，符合柯霍三原则。确证了即墨养虾场对虾幼体大量死亡的流行性病原菌是弧菌属的细菌造成的。

为了证实幼体弧菌病选用何种抗菌药物防治，作了下列12种药物敏感试验：

表 7 濒死幼体分离菌株的药物敏感试验

分离菌株编号	抑 菌 直 径 (毫 米)											
	氯	新	红	庆	痢	妥	密	四	链	青	卡	土
Z601—1	34	7	12	9	17	14	6	14	6	6	7	10
Z601—2	30	15	14	17	18	12	30	16	8	6	6	20
Z601—3	28	16	15	18	9	11	22	14	16	6	8	13
Z601—4	39	9	22	12	6	6	6	13	10	6	6	6
Z601—5	27	14	12	11	11	16	6	10	10	6	6	9
Z601—6	35	22	15	20	17	7	6	13	13	19	16	14
Z601—7	38	13	12	12	10	16	32	23	6	6	7	20
Z601—10	20	9	10	12	12	11	6	11	11	6	11	10
Z601—11	23	10	10	11	11	12	6	10	11	6	7	9
平均抑菌直径(毫米)	30.4	12.8	13.6	13.6	12.3	11.7	13.3	13.8	10.1	7.4	8.2	12.3

从表7可见：高度敏感药物为氯霉素抑菌圈直径平均为30.4毫米；中度敏感药物为四环素13.8毫米，庆大霉素为13.6毫米，红霉素为13.6毫米，磺胺嘧啶为13.3毫米，新霉素为12.8毫米，痢特灵为12.3毫米，土霉素为12.3毫米，呋喃妥因为11.7毫米，链霉素为10.1毫米；轻度敏感药物或不敏感药物为卡那霉素8.2毫米，青霉素7.4毫米。

通过12种抗菌药物对分离的病原菌的抑菌圈来看对弧菌病抗菌最有效药物是氯霉素。

(二). 养成前对虾发病部分

1984年8月中旬前成虾大量死亡，其诱发因素是由于刮台风引起的，加上有的虾池因密度大，死去70~80%，收虾季节就要到来，几千亩对虾面临危险，传染很快，对此进行了观察研究。病症是对虾游泳上腹部甲壳变或圆形白斑或黑斑，有的背部节间的甲壳变成白条或黑条带纹象“斑马”似的，红足等，其特点不向水面游动，不易发现，最后沉底而死，1~2两天内就可使前成虾大量死去。

从濒死的虾鳃、甲壳、肝胰脏分离出22株菌，经属的鉴定全为弧菌属 (*Vibrio* spp.) 的细菌。从2年的发病濒死幼体和前成虾分离菌中挑选了前成虾5株菌和幼虾4株菌与美国国家菌种收藏委员会的1株标准付溶血弧菌 (ICMSF) 作对照，作了种的鉴定。结果确证是由2个种组成：溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*) 和付溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*)。说明该虾场弧菌病的流行是这两种弧菌为主引起的。

鉴定结果如表8：

