

沙滤对白斑综合症病毒和细菌的过滤效果^{*}

孙成波¹, 黎子兰², 何建国¹

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275;

2. 海南莺歌海洋生物技术有限公司, 海南 三亚 572536)

摘要: 研究了沙滤对游离白斑综合症病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 和细菌的过滤效果。以凡纳对虾 *Litopenaeus vannamei* 作为感染对象, 用游离病毒 2.4×10^5 拷贝/mL 浸泡感染对虾 (感染初期投喂人工配合饲料), 17 d 内死亡率 100%, 第 1 尾对虾死亡时间为 36.5 h, 最后 1 尾死亡时间为 402 h, 平均死亡时间 124 h; 相同浓度的游离病毒经沙滤后人工浸泡感染对虾, 16 d 内死亡率 100%, 第 1 尾受感染对虾 60 h 死亡, 最后 1 尾死亡时间为 374 h, 平均死亡时间 168.6 h; 病毒沙滤后平均死亡时间延长 26.8%。 1.2×10^4 拷贝/mL 游离病毒浸泡感染对虾, 18 d 内受感染对虾死亡率 100%, 第 1 尾死亡时间为 111 h, 最后 1 尾死亡时间为 415 h, 平均死亡时间 274.7 h; 相同浓度游离病毒经沙滤后浸泡感染组养殖 18 d, 仅 1 尾死亡, 时间为 448 h。 1.2×10^3 拷贝/mL 病毒组和 1.2×10^2 拷贝/mL 病毒组直接感染和沙滤后感染养殖 20 d, 均未出现死亡。对细菌沙滤效果研究结果表明, 从 2003 年 8 月 11 日—12 月 28 日连续 27 次检测, 细菌过滤率最低为 30%, 最高为 98.14%, 平均为 63.33%; 其中弧菌最低为 5.26%, 最高为 97.2%, 平均为 66.46%。研究结果认为沙滤对游离病毒和细菌过滤有一定的作用。为防止对虾从海区海水污染感染病毒病和细菌病, 建议对虾养殖过程中, 外海水采用沙滤加蓄水池中间沉淀消毒以保证养殖用水的安全。

关键词: 沙滤; 白斑综合症病毒; 细菌; 弧菌

中图分类号: S968.22 文献标识码: A 文章编号: 03E074 (2004) 04-0070-04

20 世纪 70 年代以来, 人工育苗和配合饲料的成功, 促进了世界范围内对虾养殖业的发展。但是, 在对虾人工繁殖、养殖、营养和饲料已得到较好的解决的情况下, 病害问题就成为对虾养殖业发展的瓶颈^[1-4]。近年来危害南方斑节对虾 *Penaeus monodon* 和凡纳对虾 *Litopenaeus vannamei* 养殖最严重的疾病是白斑综合症 white spot syndrome, WSS。白斑综合症的流行, 使我国 1993—1994 年对虾绝产面积达 50% 以上, 损失巨大, 从 1992 年的 20×10^4 t 降至 1993 年和 1994 年的 $6 \times 10^4 \sim 7 \times 10^4$ t。近几年来中国对虾业逐年恢复和发展。2000 年中国对虾产量达到 21.8×10^4 t, 2001 年更是达到 32×10^4 t。南方高位高密度对虾养殖对中国对虾养殖业的恢复和发展起到了促进作用^[5-13]。2001 年统计结果显示, 广东、广西、海南 3 省区的对虾产量分别为 10×10^4 , 4×10^4 , 4.8×10^4 t, 占全国对虾养殖产量的 58.7% 以上。2001 年海南省高位池对虾养殖面积达到 2 703 hm², 单造最高单产 30 000 kg/hm² 以上。高位池养殖模式其中一项关键性措施是

养殖用海水处理——沙滤系统。沙滤系统主要由沙滤池, 沙滤井, 沙滤管组成。其主要原理都是通过采用沙滤来减少携带 WSSV 的生物和其它病原菌的进入, 以及改善养殖用海水, 尽可能减少 WSSV 和细菌的传播。沙滤井建在高潮线附近, 深度为 6~10 m, 一般为 8 m 左右。池底低于最低低潮线 1~2 m, 沙滤池内径 6 m, 在底部井壁留有进水孔, 外连内径为 15~20 cm 的 PVC 管 6~8 根, 管上有直径为 1~2 cm 的孔, 外包 20 目筛绢网, 防止沙堵塞管道。沙层厚度不少于 1~2 m, 沙为自然沙。沙滤井可以有效去除水中的悬浮颗粒、有机碎屑, 可比较有效的阻断大部分 WSSV 的宿主生物, 如甲壳类等, 对预防 WSS 的发生起了相当大的作用。本文主要研究了沙滤对游离白斑综合症病毒和细菌过滤效果, 探讨沙滤在防病和控病中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验地点及实验条件

海南莺歌海洋生物技术有限公司板桥基地。

* 收稿日期: 2003—09—08

基金项目: 国家重大基础研究计划资助项目 (G1999012010); 国家自然科学基金资助项目 (39670577); 国家 863 资助项目 (2003AA603120); 广东省自然科学基金资助项目

作者简介: 孙成波 (1970 年生), 男, 博士研究生, 通讯联系人, 何建国; E-mail: lsbr05@zsu.edu.cn

实验用海水为天然海水, 用前先用 1 m 厚沙层过滤。实验过滤用沙的粒径如沙滤井附近自然沙, 沙层厚度不少于 1 m, 沙子为自然沙, 其粒径测定如下, 粗: 大小为 1.01 mm, 比例为 25%; 中: 大小为 0.61 mm, 比例为 65%; 小: 大小为 0.26 mm, 比例为 10%。海水相对密度 1.021 左右, pH 8.0 ~ 8.3。实验水族箱体积 40 L, 实验前用 20 mg/L 的漂粉精消毒 72 h (有效氯接近 70%左右), 水族箱养殖水体 30 L, 24 h 充气。每天吸污 2 次, 换水 1 次, 换水量接近 100%。

1.2 健康对虾

海南莺歌海洋生物技术有限公司板桥基地没有暴发 WSS 虾池的健康凡纳对虾 500 尾, 体长 4~5 cm, 实验前在 5 m³ 的水泥池暂养 7 d, 每天投喂 2 次人工配合饲料。随机选取 10 尾对虾进行 WSSV PCR 二步法检测, 检测结果为阴性。

1.3 游离 WSSV 粗提液的制备

海南莺歌海洋生物技术有限公司板桥基地发病虾池甲壳上白斑明显, 身体褪色, 经 PCR 一扩检测呈阳性濒死斑节对虾。病虾于冰壶中携带到中山大学实验室保存于-70 ℃冰箱中。病虾头胸部去甲壳和肝胰腺后, 在冰浴条件下剪碎, 按 0.1 g 组织加 1 mL 0.01 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.4), 于匀浆器中匀浆, 匀浆液 200 目筛绢网过滤, 再经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 其滤液本文称为 WSSV 粗提液, 其内病毒本文称游离病毒。WSSV 粗提液在冰浴上操作 2 h 内制备完成。采用 PE7000 荧光实时定量 PCR 仪对制备的 WSSV 定量 (另文发表)。

1.4 沙滤游离 WSSV 病毒

采用模拟的办法, 用砖砌成长 120 cm、宽 80 cm、高 120 cm 的水泥池, 在水泥池底部安装一根内径 20 cm PVC 管, 管上密布 2 mm 小孔, 外包 40 目筛绢网, 管上覆盖 100 cm 厚细沙 (细沙粒径、大小同沙滤井), 管头通过水龙头通出池外, 以便收集过滤水。

1.5 浸泡感染

对虾暂养 7 d 后放入实验用水簇箱中。实验用海水比重为 1.021, pH 为 8.2, 凡纳对虾体长 4~5 cm。设 9 个水族箱, 4 种病毒浓度, 分别为 2.4×10⁵ 拷贝/mL、1.2×10⁴ 拷贝/mL、1.2×10³ 拷贝/mL、1.2×10² 拷贝/mL, 每个病毒浓度设 2 组, 一组是没有经过过滤病毒的感染组, 一组是经过沙滤的游离病毒感染组, 另设 1 个共用的没有病毒感染的对照组, 共 9 组, 每组 40 尾凡纳对虾。实验用凡纳对虾每天投喂 2 次人工配合饲料, 感染前停饲 1 d。按实验要求投入游离病毒后立即投饲。每天

取样观察并记录感染情况, 游离 WSSV 按实验养殖水体计算病毒浓度直接投入水簇箱中, 沙滤方式处理水游离 WSSV 按实验养殖水体计算病毒浓度经沙滤后使用。

1.6 细菌培养

细菌数量测定采用常规稀释培养法, 细菌培养基配方采用 20 Bell 2261E; 弧菌数量测定采用选择性培养法, 弧菌培养基采用 TCBS^[10]。

2 结 果

2.1 沙滤对 WSSV 游离病毒的过滤效果

2.4×10⁵ 拷贝/mL 浓度组: 游离病毒直接浸泡凡纳对虾 17 d 内死亡率 100%, 第 1 尾死亡时间为 36.5 h, 最后 1 尾死亡时间为 402 h, 平均死亡时间 124 h; 游离病毒经沙滤后浸泡凡纳对虾 16 d 内死亡率 100%, 第 1 尾死亡时间为 60 h, 最后 1 尾死亡时间为 374 h, 平均死亡时间 168.6 h, 病毒沙滤后平均死亡时间延长 26.8%。1.2×10⁴ 拷贝/mL 游离病毒浸泡感染对虾, 18 d 内受感染对虾死亡率 100%, 第 1 尾死亡时间为 111 h, 最后 1 尾死亡时间为 415 h, 平均死亡时间 274.7 h; 相同游离病毒经沙滤后浸泡感染组养殖 18 d, 仅 1 尾死亡, 时间为 448 h。1.2×10³ 拷贝/mL 病毒组和 1.2×10² 拷贝/mL 病毒组直接感染和沙滤后感染养殖 20 d, 均未出现死亡 (表 1)。由此可以看出, 当游离 WSSV 低于 1.2×10³ 拷贝/mL, 游离病毒附着在饲料上经口感染对虾不会引起急性感染; 沙滤对 1.2×10³ ~ 1.2×10⁴ 拷贝/mL 的游离 WSSV 在生产中有意义。

表 1 沙滤对游离病毒的过滤效果

Tah 1 Effect of filtering issociate WSSV

病毒浓度 (拷贝·mL ⁻¹)	死亡时间 h	游离病毒 h	沙滤病毒 h
2.4×10 ⁵	第 1 尾死亡	36.5	60.0
	最后 1 尾死亡	402.0	374.0
	平均死亡	124.0	168.6
1.2×10 ⁴	第 1 尾死亡	111.0	448.0
	最后 1 尾死亡	415.0	20 d 未死
	平均死亡	274.7	/
1.2×10 ³	第 1 尾死亡	20 d 内未死亡	20 d 内未死
	最后 1 尾死亡	/	/
	平均死亡	/	/
1.2×10 ²	第 1 尾死亡	20 d 内未死亡	20 d 内未死
	最后 1 尾死亡	/	/
	平均死亡	/	/

2.2 沙滤对细菌的过滤效果

从 8 月 11 日到 12 月 18 日共做了 27 次外海水

和过滤水的细菌调查。每次调查间隔时间为 5 d。结果表明, 沙滤对细菌过滤最低 30%, 过滤最高 98.14%, 平均为 63.33%(图 1)。

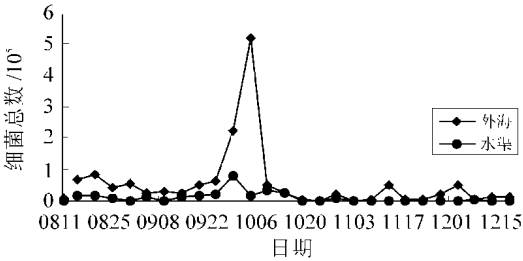


图 1 外海水和沙滤水细菌数量
Fig. 1 The filtering effect of bacteria

从 8 月 11 日到 12 月 18 日细菌数量变化整个过程来看, 9 月 29 日—10 月 4 日为海南第 1 次寒流, 温度由 31 ℃降到 22 ℃, 细菌数量显著提高 1~2 个数量级。9 月 24 日外海水细菌为 6.31×10^5 菌落/mL, 9 月 29 日为 2.22×10^6 菌落/mL, 10 月 4 日 5.18×10^6 菌落/mL, 10 月 9 日 5×10^5 菌落/mL。沙滤水细菌数 9 月 24 日为 2.2×10^5 菌落/mL, 9 月 29 日为 7.9×10^5 菌落/mL, 10 月 4 日 2.69×10^5 菌落/mL, 10 月 9 日 3.4×10^5 菌落/mL。同期, 海南省对虾大面积暴发 WSS。

2.3 沙滤对弧菌的过滤效果

从 8 月 11 日到 12 月 18 日共做了 27 次外海水和过滤水弧菌数量调查, 每次间隔时间为 5 d, 弧菌过滤率最低 5.26%, 过滤最高 97.27%, 平均为 66.46% (图 2)。

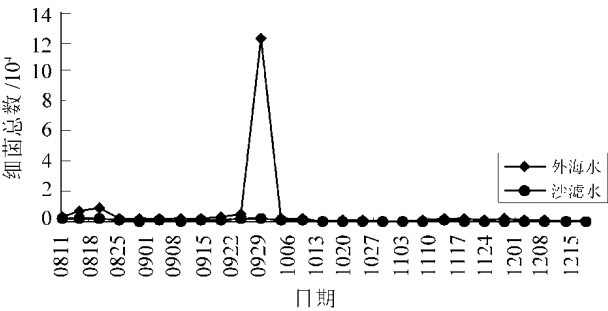


图 2 沙滤对弧菌的过滤效果
Fig. 2 The filtering effect of vibrio

从 8 月 11 日到 12 月 18 日弧菌数量变化整个过程来看, 9 月 29 日—10 月 4 日为海南第 1 次寒流, 温度由 31 ℃降到 22 ℃, 弧菌数量显著提高, 外海水 9 月 24 日弧菌数量为 5×10^3 菌落/mL, 9 月 29 日为 1.2×10^5 菌落/mL, 10 月 4 日 2.2×10^3 菌落/mL, 10 月 9 日 2.2×10^3 菌落/mL, 沙滤水弧菌数量为 9 月 24 日为 1.61×10^3 菌落/mL, 9 月 29 日为 1.6×10^3 菌落/mL, 10 月 4 日 6×10^2 菌落/mL。

10 月 9 日 1.04×10^3 菌落/mL。同期, 海南省对虾大面积暴发 WSS。

3 讨论

我国养殖对虾主要的病害仍然是 WSS。与 WSS 暴发流行相关因素众多且复杂, 包括 WSSV 传播途径、感染途径、虾池中的细菌数量、养殖水体理化因子、对虾的营养水平和对虾品种等。对虾高位池养殖模式主要采取沙滤方式 (有沙滤池, 沙滤井, 沙滤管等 3 种模式) 来处理养殖用外海水, 可以有效阻止虾蟹等携带 WSSV 的较大型甲壳类动物进入养殖虾池, 从而基本上切断了 WSSV 经虾蟹宿主生物进入养虾池的传播途径。随着对虾养殖面积的日益扩大, 投饵量的剧增, 海区富营养化问题愈显突出, 细菌含量日益增高。2001 年 8 月至 12 月在海南东方市海区对外海水和过滤水细菌检测与 WSS 暴发流行关系来看, 细菌数量与 WSS 暴发流行具有较好的正相关性。细菌与温度等其他理化因子相互作用, 导致潜伏感染 WSSV 的养殖对虾转为急性感染, 从而暴发 WSS。沙滤对外海水细菌具有较好的过滤效果, 包括对虾致病细菌弧菌的数量明显减少, 从而沙滤不但表现出对水体理化因子有净化作用, 也比较有效减少细菌的数量, 进而减少有害细菌对养殖对虾的胁迫, 减少 WSS 的暴发流行。游离病毒虽然存活时间短, 但同样具有感染性。游离状态的病毒可以通过 2 种途径进入对虾体内, 一种是 WSSV 附着在对虾人工饲料和生物饵料上, 经口感染对虾, 当病毒达到一定浓度时, 这一种方式可以导致对虾急性感染; 另一种是游离病毒经体表进入体内, 这种感染方式不会引起 WSSV 急性感染, 但会导致对虾潜伏感染, 在其他因子的胁迫下会转为急性感染^[3]。本文研究结果表明沙滤对处于游离状态的病毒附着在有机物上的病毒有一定的过滤效果, 可以减少病毒的浓度, 进而减少对养殖对虾的威胁。虽然沙滤对细菌和病毒都有较好的过滤效果, 但由于沙滤对病毒和细菌的过滤效果与沙粒径的大小和厚度有关, 在生产中, 沙厚度受到风浪和潮汐影响较大, 沙滤也不能完全过滤细菌和病毒, 因此在对虾养殖过程中, 外海水经沙滤处理后最好再进入中间蓄水池, 经药物消毒 (如含氯制剂, 碘制剂) 后使用, 增加对虾养殖成功率。

参考文献:

[1] LIGHTNER D V, POULOS B T, BRUCE L, et al. New development in penaeid virology: Application of biotechnology in research and disease diagnosis for shrimp

viruses of concern in the Americas//FULKS W, MAIN K L. Diseases of cultured penaeid shrimp in Asia and the united states[M] . The Oceanic Institute, 1992; 233.

[2] 何建国,莫福. 对虾白斑综合症病毒爆发流行与传播途径、气候和水体理化因子的关系及其控制措施[J] . 中国水产, 1999(7): 34— 41.

[3] 何建国,翁少萍,邓敏,等. 斑节对虾白斑病病原与病理[J] . 中山大学学报论丛, 1996(增刊): 12— 15.

[4] 何建国,周化民,姚泊,等. 白斑综合症杆状病毒宿主种类和感染途径[J] . 中山大学学报(自然科学版), 1999, 38(2): 65— 69.

[5] 相建海. 海水养殖生物病害发生与控制[M] . 北京: 海洋出版社, 2001: 158— 199.

[6] 苏永全,蔡心一,王军. 1992— 1993 年福建南部地区虾病的调研[J] . 海洋科学, 1995(1): 1— 4.

[7] LO C F, HO C H, PENG S, et al. White stop syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods[J] . Dis Aquat Org, 1996, 27: 215— 225.

[8] LO C F, LEU J H. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction[J] . Dis Aquat Org, 1996, 25: 133 — 141.

[9] LO C F, HO C H, et al. White stop syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods[J] . Dis Aquat Org, 1996, 27: 215— 225.

[10] 张士璠. 海洋生物技术原理和应用[M] . 北京: 海洋出版社, 1998.

[11] 高玮, 张立人. 对虾病毒病害的研究进展[J] . 中国病毒学, 1997, 12(1): 8— 13.

[12] 麻次松, 王秀华, 于佳, 等. 对虾爆发性流行病综合防治技术研究[J] . 上海水产大学学报, 1997, 6(2): 134— 138.

[13] CHEN S N. Current status shrimp aquaculture in Taiwan// BROWDY C L, HOPKIN J S. Swimming through troubled water . Proceedings of the special session on shrimp farming [M] . Aquaculture Society, Baton Rouge Louisiana USA, 1995: 29— 34.

Effects of Filtering Seawater by Sand Filtering on
White Spot Syndrome Virus and Bacteria

SUN Cheng bo¹, Li Ze lian², HE Jian guo¹

(1. School of Life Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China;
2. Hainan Yingge Marine Biotechnique Co. Ltd Hainan Sanya 572536, China)

Abstract: Sand filtering is mostly used in treating sea water in Chinese for shrimp culture. In the present study, we mainly study the effect of sand filtering on white spot syndrome virus (WSSV) and bacteria. Concentration of WSSV, 2.4×10^5 copies /mL, 1.2×10^4 copies /mL, 1.2×10^3 copies /mL and 1.2×10^2 copies /mL was used directly to infect Litopenaeus vannamei by marinating, respectively. Same concentration WSSV filtered by sand Under was used to infect the shrimp too. The first concentration group untreated by sand filter, the deadtime of first shrimp was 36. 5 hours, and that of the last one was 402 hours, the average was 124 hours. The first concentration group treated by sand filter, the deadtime of first shrimp was 60 hours, and that of the last one was 374 hours, the average was 168. 6 hours. The second concentration, the deadtime of first shimp The deadtime of antitheses is 36. 5 hours. 402 hours and 124 hours. Under the first concentration, the deadtime of two groups is very different. To bacteria and vibrio we tested 27 times, the average filtering ratio of bacteria was 63. 33%, and that of vibrio was 66. 46%.

Key words: sand filtering; white spot syndrome virus; bacteria