

文章编号: 0529-6579 (2000) S-0218-06

成虾发光病病原体的 分离鉴定及防治技术研究^{*}

陈月忠, 钟硕良, 周 宸

(福建省水产研究所, 厦门 361012)

摘 要: 成虾养殖中也经常发生发光病, 危害同样十分严重. 研究证明, 哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 也是成虾发光病的主要致病菌. 注射、投喂、创伤、浸泡等几种感染方式都会造成对虾大量死亡, 但感染速度和发光程度有明显的差别. 侵入虾体内的发光菌的数量对对虾的成活率有明显的影响. 致病菌与幼苗发光病的药物敏感性相似, 仅对少数药物敏感. 2 种药饵可减少损失率, 但防治工作应以预防为主, 综合处理.

关键词: 成虾发光病; 哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*); 防治

中图分类号: S945.4⁺1; S945.4⁺9 **文献标识码:** A

对虾发光病不但发生于育苗期, 也经常发生于成虾养殖, 其危害十分严重, 对虾患此病后在 3~5 d 内就会大量死亡, 死亡率达 60% 以上, 甚至导致绝收. 为此我们自 1993 年起对该病的流行病学、病因学、病理学及治疗方法进行了初步研究, 取得了一定的成效.

1 材料与方法

1.1 培养基

(1) 营养琼脂: 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, 陈海水 500 mL, 蒸馏水 500 mL, pH 7.5, 琼脂 20 g, 15 Pa 高压灭菌 30 min.

(2) 甘油碳酸钙培养基: 牛肉膏 10 g, 蛋白胨 20 g, NaCl 15 g, 甘油 10 g, CaCO₃ 5 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.6, 琼脂 20 g, 15 Pa 高压灭菌 30 min.

(3) 2216E 固体培养基: 酵母膏 1 g, 胰蛋白胨 5 g, 磷酸高铁 0.01 g, 琼脂 20 g, 陈海水 1 000 mL, pH 7.5~7.8, 15 Pa 高压灭菌 30 min.

(4) 鸡蛋平板培养基: 取鸡蛋 1 枚, 打入烧杯中, 加入陈海水 100 mL, 搅匀, 分装于培养盘 10 mL/盘, 15 Pa 高压灭菌 30 min.

(5) 病虾来源: 长毛对虾取自同安西柯垦区, 体长 7~9 cm; 日本对虾采自漳浦狮头村养虾池, 体长 6~8 cm.

1.2 病原菌分离和纯化

1.2.1 从对虾肌肉中分离细菌的方法 取发病池中具有典型发光症状的对虾, 先用无菌

^{*} 收稿日期: 1999-09-15 菌株由福建省防疫站陈拱立教授鉴定.

棉花拭干对虾体表海水, 再用 20% 的酒精棉球擦试虾体, 无菌操作剪取部分虾肉, 在无菌的磨砂捣碎管内, 加入无菌生理盐水后匀浆, 取匀浆液划线于鸡蛋平板培养基中。

1.2.2 从心脏、血淋巴液中分离细菌的方法 先用 70% 的酒精棉球在病虾头胸甲的心区上反复擦试进行体表消毒, 然后用灭菌针筒做心脏穿刺抽取血淋巴液, 迅速注于含 1% NaCl 的营养琼脂平板上, 以涂布法接种。

将接种后的琼脂平板于 28 °C 培养 24 h, 选取形态一致的单个菌落在甘油 CaCO_3 培养基重复划线分离以获得纯培养。

1.3 分离菌的生物学性状测定

按文献 [1] 所述的方法测定, 并按文献 [2] 鉴定至种。

1.4 人工感染实验

试验用健康对虾 (体长 6~8 cm) 取自同安养虾池, 试验对虾饲养于玻璃水族箱 (30 cm×40 cm×45 cm), 饲养用水是取自对虾育苗场的沙滤水, 盐度 30‰, 水温 28~30 °C, 暂养 2 d, 每组 20 头虾。

(1) 注射法: 试验菌株经活化培养 24 h 后, 用无菌生理盐水洗下, 制成菌悬液。细菌浓度每 mL 为 $10^8 \sim 10^9$ 个, 于对虾第 3~4 腹节连接处肌肉注射 0.01 mL 菌液, 对照组注射无菌生理盐水 0.01 mL/尾, 充气, 饲养, 观察对虾死亡情况及发病症状, 并及时移去死虾。

(2) 投喂法: 将试验菌株的菌悬液用注射器注入健康的腹肌肉, 待菌液扩散后, 剥去虾壳投喂给健康的试验对虾做饵料, 充气、饲养、观察方法同 (1)。

(3) 创伤浸泡: 将经活化的新鲜试验菌悬液 (每 mL 含菌约 10^9 个) 加入试验用水族箱内, 充气搅拌使海水中含菌量为 9×10^5 个/mL, 然后对健康试验对虾用针头在腹肌上刺扎造成创伤后放入带菌的海水中。

(4) 浸泡: 方法同 (3), 试验虾直接放入带菌海水中。

1.5 复感染实验

取人工感染中出现典型发光症状的病虾, 用上述的无菌操作法采样, 匀浆后在 NaCl 营养琼脂平板上划线, 选取其中优势菌株, 纯化后再次注射于健康的试验对虾 (体长 7~9 cm) 腹肌上, 具体方法同感染实验。

1.6 感染剂量比较实验

将经 24 h 活化培养的哈维氏弧菌菌体用无菌生理盐水洗下, 稀释成 $10^5 \sim 10^7$ 个/mL 不同稀释度的菌液, 按 1.4 中的方法 (1) 所述方法分别感染健康的对虾, 观察症状, 比较其死亡率。

1.7 防治实验

分别以同安西柯和漳浦狮头垦区内具有明显发光症状的对虾养殖池为试验池, 而以相邻的狮头 4 号池为对照池 (该池因发病未及时发现, 没有用药)。

2 结 果

2.1 致病菌的分离及其对对虾的感染

1993 年 8~9 月先后从漳浦、同安等地发生发光病养殖长毛对虾和日本对虾体内背肌、心肌和腹肌分离得到了 3 株发光菌株, 代号为 9316、9317 和 9318。将分离到的 3 株发光

菌分别进行腹肌注射感染，结果在 5 d 内 9316 和 9317 两株菌对虾的致死率高达 100%，9318 菌株的致死率为 90%，发光率均为 100%，3 株菌都有较强的致病性，病虾的症状与自然感染基本一致；最初出现活动力下降，游动迟缓，离群，不摄食，胃肠空等现象，接着断须，有的红腿或黄鳃，背部、腹部和体侧肌肉变白，并且区域逐渐扩大，直到全身发白，在暗光背景下局部或全身发光，最后沉底侧卧，死亡。

2.2 致病菌再分离

从人工感染的发光病虾的肌肉和心脏等处均可分离到大量的发光菌株，命名为 R9313、R9317 和 R9318 等，它们的菌落特征、菌体形态与从自然发病的发光病虾体上分离的发光菌株基本一致。

用 R9316 和 R9318 菌株感染健康的长毛对虾（体长 7~9 cm），结果试验虾在 6 d 之内死亡率高达 95% 以上，且症状与自然感染相似，对照组仅死亡 10%，且没有发光症状，表明这 2 株发光菌株是成虾发光病的致病菌。

从具发光症状的受感染病虾体内再次分离到发光菌株，名为 RR9316 和 RR9318。

2.3 致病菌的生物学性状分析和分类学地位确认

将分离到的发光菌株 9316、9317、9318 和 R9316、R9317、R9318 及 RR9316、RR9317、RR9318 等分别进行生物学特性和生理生化特性测定，结果表明它们同为一 种菌，根据文献 [2] 确认其为哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*)。

2.4 感染途径的探讨

用上述分离到致病菌对对虾进行注射、投喂、创伤、浸泡等方式感染都会造成对虾大量死亡。其中以注射方法的感染速度最快，致死率最高，多数在 12 h 内就濒临死亡，在 24 h 内 100% 死亡；采用投喂带菌虾肉和创伤浸泡感染在 108 h 内也是全部死亡，但病程较长。而浸泡感染的速度较慢，24 h 后才开始出现症状，36 h 出现死亡，108 h 死亡率达高峰，达 75%，呈亚急性感染。

2.5 防治试验

分离到的哈维氏弧菌对少数药物敏感（另文详述）。根据药敏结果配制了 GF-1、GF-2 等 2 种药饵在虾池中应用，并配合改善消毒等一系列措施，结果都能取得良好的治疗效果，损失率（29%~42%），比没有及时用药物的对照防治（超过 92%）为好。

表 1 2 种药物对对虾发光病防治效果

药饵品种	虾池	面积/hm ²	成虾大小/cm	预计产量/kg	实际产量/kg	损失率/%
GF-1	西柯 10 号	1.87	8~10	110	63	42
GF-2	狮头 4 号	2.00	10~13	128	91	29
对照	狮头 5 号	3.33	10~12	120	110	92

3 讨 论

有关对虾发光病的病例报告多为幼苗期的发光病。迄今为止，国内外对发光病的研究也基本上局限于育苗期，对于成虾发光病的研究几乎未见报道，其实成虾发光病对于对虾养殖生产的危害也是十分严重的。在福建省，成虾发光病始发现于 1987 年。1987 年 7 月在云霄岱南 4 号养殖池有部分体长 5~7 cm 大小的长毛对虾虾体局部发白，夜晚虾体局部

发光, 对虾活动性减弱, 不摄食, 有部分对虾死亡. 由于当时对该病认识不足, 加之海里经常有夜光虫发光便误以为是夜光虫附着所致. 1989年起成虾发光病日趋严重, 与“红腿病”、“黄鳃病”等3种细菌性疾病共同成为当时的对虾主要疾病, 使得对虾养殖业严重滑坡, 经济损失惨重. 仅1989年7月间在安西柯垦区的400多 hm^2 虾池中在1周之内就有近53.3 hm^2 虾塘相继罹患对虾发光病, 死亡率超过60%, 有的虾池基本绝收. 在万亩对虾高产养殖试验池中, 有2口池共3.87 hm^2 的长毛对虾同时感染了对虾发光病, 当时对虾体长已达8~10 cm, 再过20 d后即可收成, 预计每 hm^2 产量可达3 750 kg, 感染发光病后, 对虾在3~4 d内相继死亡, 其中1个池因治疗不及时, 3 d后死亡率超过80%, 成虾发光病的流行和危害在1992~1993年达到最高潮, 福建省南起诏安, 北至连江、霞浦等沿海县市的养殖区每年有许多虾池受到该病危害, 在漳浦狮头村1991~1993年每年都有40%以上的虾池受到该病的危害, 有的虾池连续3年都发生发光病, 直接经济损失达30万元以上.

在受到自然感染, 具有发光症状的养殖对虾体内分离到哈维氏弧菌, 将其分别进行感染、复感染实验, 后从发光的病虾体内都能分离到哈维氏弧菌, 其症状和毒性基本一致, 根据柯赫关于致病菌的3原则可以确认哈维氏弧菌就是对虾发光病的致病菌. Lavilla-Pitogo, Jiraporn, Pillai 及李忠成等先后证实了哈维氏弧菌是对虾苗发光病的致病菌^[3~5], 而陈毕生在墨吉对虾幼苗体内分离到灿烂弧菌, 并认为灿烂弧菌也是发光病的致病菌^[6]. 我们在多种对虾的成虾或幼苗发病体上分离的发光菌均为哈维氏弧菌, 是否灿烂弧菌也会导致成虾发生发光病尚待于进一步研究, 但从分离得到的哈维氏弧菌的频度和症状重现率等方面, 可以肯定哈维氏弧菌是本地区成虾发光病的主要致病菌, 因此我们的防治试验以其为主要对象进行研究, 并取得了较好的效果.

菲律宾的 Lavilla-Pitogo 在幼苗的口腔内发现有大量的哈维氏弧菌, 认为口器是感染开始的进入路径^[3]. 哈维氏弧菌具有很强的致病性和很高的致死率. 我们比较了注射, 浸泡、投喂创伤等几种感染方式, 发现这几种方式都会引起养殖对虾发生发光病. 采用注射和创伤感染, 细菌很容易通过创口侵入虾体内, 造成死亡. 对虾的捕捉搬运、受惊吓以及频繁活动, 都有可能造成虾体创伤, 导致虾体的第一道防御屏障被破坏, 使得细菌乘虚而入, 通过创口侵入到肌肉组织, 造成肌肉组织发炎、溃烂、细胞崩解. 哈维氏弧菌侵入虾体后, 利用机体组织作为营养物质进行大量繁殖, 并在荧光素酶的作用下使还原型荧光素氧化成氧化型荧光素, 同是放出荧光, 因而我们可见对虾局部组织发白发光. 大量繁殖的发光菌随着虾体的循环系统逐渐侵入到虾体全身器官, 遍布全身就使得虾体全身发光并死亡, 对虾的养殖密度过高, 除了容易使对虾产生应激反应, 降低抗病力, 败坏水质, 造成缺氧之外, 也常因活动中彼此间的频繁碰撞而加大了受伤的可能性, 为细菌感染创造了条件. 因此减少放苗量, 保持合理的养殖密度, 避免对虾受刺激是防治细菌性虾病的一个重要措施. 我们认为近年来成虾发光病有所降低也与目前采取低密度生态养殖方法有一定的关系.

消化道也是细菌侵入的一个重要途径. 对虾发病后, 活力差, 游动慢缺乏反抗力, 往往会被那些摄饵不足的对虾当作“美味”吞食, 健康虾摄食了已被感染发光病的虾后, 细菌就通过这些虾的肠壁细胞间隙进入虾体组织内, 并迅速侵染全身导致对虾死亡. 由于对病虾的吞食往往是由许多对虾同时分享的, 疾病就以对数级的速度很快地传染给同池的其

他虾,造成重大损失.因此发生发光病要尽早发现,及时清除病虾,特别是在夜晚要经常巡塘观察,一旦发现对虾发光就要及时采取防治措施,并捞去发光的病虾,在发病期间应尽量提供新鲜、优质、诱食性好的饵料,少量多次投喂,既可增强养殖对虾体质,提高抗病能力,又可尽量避免健康对虾去摄食那些已发病的病虾而受到感染.

王军等应用付溶血弧菌,溶藻弧菌和嗜水气单胞菌等几种主要的对虾细菌性疾病的致病菌进行感染实验,证明它们都有较强的致病性.但采用浸泡感染尽管浸泡菌液浓度高达 10^8 个/mL,试验虾却均无死亡^[7],对虾在含有 9×10^5 个/mL 哈维氏弧菌的海水中浸泡 108 h 后即有 75% 对虾发病死亡,表明哈维氏弧菌比其他致病菌具有更强的致病性.

调查发现,哈维氏弧菌喜营养,大多分布于富于营养化的水域中,是表层沉积物中发光细菌的主要品种,Shilo 通过实验也证实了在丰富营养中,该菌比 *P. leiognathi* 等细菌具有更强的竞争力.所以说养殖环境恶化是导致养殖对虾暴发发光病的重要原因.在过去几年的养殖中,由于盲目追求产量效益,一味增加放苗密度,大量投饵,使得残饵大量沉积,对虾养殖环境严重营养化,细菌大量繁殖.由于水质恶化,生态平衡失调,哈维氏弧菌成为优势菌,并使得对虾体质及抗病力下降,病原体乘虚而入,最终导致流行病全面暴发,由此可见,讲究养殖技术,科学管理,合理投饵,避免水质败坏对于防治对虾发光病是十分重要的.加强基础饵料培养,尽量减少残饵量;定期施用底质改良剂,定期施用消毒剂杀菌等方法可以改善水质减少细菌量,是我们在预防发光病的实验中采用的主要措施.

在生产中最常使用的消毒剂有漂白粉和生石灰,但对于防治对虾发光病,生石灰的效果最好.因为发光细菌大多适宜在微酸性或中性的环境中生长,哈维氏弧菌的最适生长酸碱度在 6.9~7.7 之间,在 pH 8.0 以上其繁殖速度明显下降,因此施用生石灰具有双重功效,既杀灭了细菌病毒,又提高了 pH 值,从而阻止了发光细菌的再次感染.

尽管投喂药饵可以有效地防治养殖对虾发光病,但由于哈维氏菌毒力强,感染途径多,造成对虾发光病发病急,传播广,感染性强,快速死亡,治疗十分困难.因此防治对虾发光病应以预防为主,综合处理.主要措施有:

(1) 彻底清淤.由于哈维氏弧菌是表层沉积物中发光细菌的主要品种,清淤既可去除有机质,防止富营养化,又可大大减少哈维氏弧菌数量.

(2) 发光细菌不形成孢子,干燥状态下不能生存,可通过晒池杀死致病菌.

(3) 定期施用生石灰清塘消毒,既杀菌又可提高底质和海水 pH 值,抑制哈维氏弧菌生长.

(4) 合理放苗密度,科学养殖管理,避免对虾受到损伤.

(5) 做好基础饵料培养,投喂优质、新鲜饵料.讲究投饵方法,控制投饵量,既要防止摄食不足,又要避免残饵沉积,污染水质.

(6) 施用光合细菌,抑制哈维氏弧菌繁殖.

参考文献:

- [1] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法[M] . 北京: 科学出版社, 1998. 139 ~ 145.
- [2] BRENNER D J, BERGY S. Manual of systematic bacteriology[M] . Baltimore/ London: Wilkins, 1984. 408 ~ 452.
- [3] LAVILLA-PIFIGO C R. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines [J] . Aquaculture, 1990, (1/2): 1 ~ 13.
- [4] PILLAI D. Responses of shrimp *Penaeus indicus* post larvae to luminous bacteria *Vibrio harveyi*[J] . Indian J Mar Sci, 1993, 22 (4): 303 ~ 304.
- [5] 李忠成, 陈秀男. 养殖虾类之疾病[J] . 养殖世界, 1990: 63 ~ 71.
- [6] 陈毕生. 虾苗发光病的病因学与病理学探讨[J] . 南海水产研究, 1993(6): 11 ~ 18.
- [7] 王军, 张朝霞, 苏永全. 斑节对虾致病菌的回归感染实验[A] . 见: 虾类健康养殖[C] . 北京: 海洋出版社, 1998. 139 ~ 145.

Prevention and Treatment of Luminous Disease of Adult Prawns

*
CHEN Yue-zhong^{*}, ZHONG Shuo-liang, ZHOU Chen

Abstract: Luminous disease could occur in the cultivation of adult prawns. *Vibrio harveyi* is also a major disease germ which causes luminous disease of adult prawns. Such modes of infection as in jection, feeding, wound and soak might cause mortality of adult prawns in a large scale. But the speed of infection and the extent of luminous are obviously different. The quantity of luminous germs which invade the body of the prawn has obviously affected the survival of prawns. The disease germs of the luminous disease of adult prawns and that of the luminous disease of young prawns are similar in the sensitiveness to medicines. It is sensitive only to few medicine. The two kinds of medicine and bait may decrease the loss rate. But stress should be put on the prevention in the prevention and treatment of disease.

Keywords: luminous disease; *Vibrio harveyi*; prevention

* Fujian Fisheries Research Institute, Xiamen 361012, China