

文章编号:1005-8737(2000)03-0117-03

·研究简报·

副溶血弧菌对斑节对虾和日本对虾的致病力研究

Studies on the pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* to *Penaeus monodon* and *P. japonicus*

陶保华, 胡超群, 任春华

(中国科学院南海海洋研究所, 广东广州 510301)

TAO Bao-hua, HU Chao-qun, REN Chun-hua

(South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

关键词: 副溶血弧菌; 致病力; 斑节对虾; 日本对虾

Key word: *Vibrio parahaemolyticus*; pathogenicity; *Penaeus monodon*; *Penaeus japonicus*

中图分类号: S945.12

文献标识码: A

作为条件致病菌的弧菌, 前人对其致病性已作了大量的研究, 但不同研究者得出的结果很不一致, 有的甚至相互矛盾^[1-4], 其差异主要在于浸泡感染能否使健康对虾致病。因此, 本实验以不同的感染方式以及不同的实验条件, 对斑节对虾体内分离出的副溶血弧菌的致病力进行研究, 以便了解对虾弧菌病的发病条件。

1 材料与方法

1.1 材料

对虾: 体长 7~9 cm 的健康斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 和日本对虾 (*P. japonicus*), 直接购于养殖场。

菌株: 对虾病原菌—副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*), 分离自人工养殖的患病斑节对虾。

1.2 感染实验

实验在室内进行, 每个实验组用虾 10 尾, 所有实验均重复 2 次。水族箱规格 80 cm×40 cm×60 cm, 水深 50 cm, 实验用水为砂滤新鲜海水, 斑节对虾和日本对虾的实验水温分别为 30℃ 和 26℃, 盐度为 28~31, pH 8.2。实验期间水族箱中连续足量充气, 每天正常投饵、吸污、换水, 日换水量为 30%, 实验周期为 10 d。

1.2.1 注射感染 将分离的副溶血弧菌于 30℃ 培养 20 h 后, 用无菌生理盐水洗下菌苔, 分别配制成 2.5×10^9 、 0.5×10^9 、 1.0×10^8 、 2.0×10^7 、 4.0×10^6 、 8.0×10^5 、 1.6×10^5 CFU/ml 等 7 个浓度梯度, 用无菌注射器向对虾第 2 腹节基

部作肌注感染, 注射剂量为 0.1 ml/尾。对照组注射等量生理盐水, 记录对虾的发病情况及死亡量。

1.2.2 浸泡感染 将培养菌液倒入水族箱中, 使菌悬液的终浓度为 2.5×10^7 CFU/ml, 将实验对虾放入其中浸泡 12 h 后, 加等量海水稀释。对照组不加菌悬液, 记录对虾的发病情况及死亡量。

1.2.3 创伤感染 将实验虾剪去背部一小块甲壳和部分尾扇, 其余操作和实验菌悬液浓度同 1.2.2, 对照组不加菌悬液, 记录对虾的死亡情况。

1.2.4 投喂感染 将浓度为 2.5×10^9 CFU/ml 的菌悬液, 以 1 ml 菌悬液 1 g 干饵料的比例将饵料与菌悬液混匀, 晾干后投喂感染。对照组投喂正常饵料, 记录对虾的发病情况及死亡量。

1.3 半致死浓度的测定

据以上结果, 按寇氏法分别求出该菌对斑节对虾和日本对虾 24 h 和 48 h 的半致死浓度。

1.4 致病条件的研究

本实验分控制组和非控制组, 以斑节对虾为实验材料, 菌液终浓度为 3.2×10^7 CFU/ml。在非控制组中, 对照组、浸泡组和创伤感染组均将实验对虾从盐度 17 的养殖水体中直接移入盐度为 30 的实验水体中, 且不正常换水。而在控制组里, 对照组、浸泡组和创伤感染组的实验用水盐度保持不变, 每天吸污、换水。实验重复 2 次, 记录对虾死亡情况。

2 结果

2.1 人工感染试验

在肌注感染实验中, 副溶血弧菌对斑节对虾和日本对虾都具有明显的致死性, 在 10^9 CFU/ml 注射组中 4~8 h 即出现大量死亡, 死亡对虾无明显症状。在 10^7 CFU/ml 浓度组

收稿日期: 1999-12-13

基金项目: 中国科学院“九五”重大项目资助(K2951-B1-111); 广东省自然科学基金资助项目(963029)

作者简介: 陶保华(1970-), 男, 湖北黄冈人, 广东省农业科学院兽医研究所硕士。

中,对虾发病时间约为 10 h,患病对虾出现与自然发病相似的症状:烦躁不安,游动缓慢,鳃部变黄,游泳足变红,有的背部甲壳也变红色,严重者侧卧箱底,不久即死亡。两种对虾的症状表现比较相似,只是斑节对虾红腿现象稍明显一些,日本对虾则黄鳃出现更快且更显著。

在浸浴感染实验中,斑节对虾在感染初期有 2 尾正处于蜕皮期,第 3 天时有 1 尾步足变为红色,其余实验对虾均无

明显症状,也无死亡。日本对虾实验组均正常。

创伤感染组中,实验开始时对虾沿水族箱边游动,基本不摄食,第 2 天开始少量进食,到第 3 天基本恢复正常,整个实验周期中无对虾死亡,也无明显的致病症状。

投喂感染实验中,所有实验对虾均正常,无明显发病症状和死亡现象。实验重复性很好,各组实验对虾平均死亡情况见表 1。

表 1 人工感染后实验对虾的死亡情况

Table 1 Results of artificial infection experiments to tested shrimps

尾 ind

实验组别 Group	菌液浓度/(CFU·ml ⁻¹) Concentration of bacteria	实验用虾数 Numbers of tested shrimps	死亡数 Numbers of death								总死亡量 Total
			4 h	8 h	12 h	16 h	24 h	36 h	48 h	96 h	
注射组 1	2.5×10^9 (M)	10	4	2	1	1	2				10
Injection1	1.20×10^9 (J)	10	2	3	3	1	1				10
注射组 2	0.5×10^9 (M)	10	0	1	2	2	3	1	1		10
Injection2	2.40×10^8 (J)	10	0	2	1	2	2	1	2		10
注射组 3	1×10^8 (M)	10	0	1	1	2	2	1	2	0	9
Injection3	4.80×10^7 (J)	10	0	1	1	2	2	0	2	1	9
注射组 4	2×10^7 (M)	10	0	0	2	1	2	1	2	0	8
Injection4	9.60×10^6 (J)	10	0	0	1	1	2	1	2	0	7
注射组 5	4×10^6 (M)	10	0	0	0	0	1	2	1	1	5
Injection5	1.92×10^6 (J)	10	0	0	0	2	1	0	2	0	5
注射组 6	8×10^5 (M)	10	0	0	0	0	0	1	1	0	2
Injection6	3.84×10^5 (J)	10	0	0	0	0	0	1	1	0	2
注射组 7	1.6×10^5 (M)	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Injection7	7.68×10^4 (J)	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
浸泡组	2.5×10^7 (M)	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Soaking G	1.2×10^7 (J)	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
创伤组	2.5×10^7 (M)	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hurting G	1.2×10^7 (J)	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
投喂组	10^9 CFU/g干重(M)	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Feeding G	10^9 CFU/g干重(J)	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
注射对照组	0(M)	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Control - Injection	0(J)	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
浸泡对照组	0(M)	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Control - Soaking	0(J)	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
创伤对照组	0(M)	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Control - Hurting	0(J)	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
投喂对照组	0(M)	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Control - Feeding	0(J)	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0

注:M和J分别表示斑节对虾和日本对虾 M and J refer to *P. monodon* and *P. japonicus* respectively

2.2 半致死浓度的测定

据 2.1 中结果,该菌对斑节对虾 24 h 和 48 h 的半致死浓度分别为 3.8×10^7 和 6.5×10^6 CFU/ml,其 95% 可信限分别为 $(1.6 \sim 9.3) \times 10^7$ CFU/ml 和 $2.8 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^7$ CFU/ml;对日本对虾 24 h 和 48 h 的半致死浓度分别为 2.1×10^7 和 3.1×10^6 CFU/ml,其 95% 可信限分别为 $8.3 \times 10^6 \sim 5.5 \times 10^7$ CFU/ml 和 $(1.3 \sim 7.5) \times 10^6$ CFU/ml。

2.3 浸泡和创伤感染在不同实验条件下的致病力

在控制组(组 1)中,对照组、浸泡组和创伤感染组均无死亡,也无明显的致病症状;而在非控制组 2 里,浸泡组和创伤感染组均有不同程度的死亡,死亡症状主要为游泳足发红,尾扇部分腐烂,创伤感染组也有 1 尾因蜕皮而死去。各组死亡情况见表 2。

表 2 不同实验条件下对虾感染后的死亡情况

Table 2 Results of artificial infection experiments under different conditions

尾 ind

实验组别 Group	菌液浓度/(CFU·ml ⁻¹) Concentration of bacteria	实验用虾数 Numbers of tested shrimps	死亡虾数 Numbers of death										总死亡量 Total
			1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h	9 h	10 h	
浸泡组 1 Soaking 1	10 ⁷	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
创伤组 1 Hurting 1	10 ⁷	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
浸泡对照组 1 Control 1 - Soaking	10 ⁷	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
创伤对照组 1 Control 1 - Hurting	10 ⁷	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
浸泡组 2 Soaking 2	10 ⁷	10	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2
创伤组 2 Hurting 2	10 ⁷	10	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	3
浸泡对照组 2 Control 2 - Soaking	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
创伤对照组 2 Control 2 - Hurting	0	10	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1

3 讨论

3.1 感染方式的选择

在对条件致病菌的致病性和致病力大小及其侵入途径的研究中,感染方法是非常关键的。许多研究者对此做了较多的工作,并且在肌注感染和投喂感染能否导致对虾发病的问题上基本得到了一致意见,而对浸泡感染能否成功的争议较大。郑国兴等^[2]和许兵等^[3]分别将鳃弧菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌等的浸泡法、创伤法和注射法感染对虾均得到阳性结果,并认为浸泡法能使对虾发病、死亡,其成功率在 10% 左右。Itami^[4]也认为浸泡感染能导致对虾发病。而 Lightner^[1,5]发现浸泡对健康对虾的感染很难成功,除非用大量菌的注射法以压倒对虾的免疫力,并认为肌注感染是查明病因的唯一途径,弧菌不能经口感染。

本实验经 4 种感染发现,肌注感染能使健康对虾致病,对照组注射生理盐水后均能正常生长,说明肌肉注射对实验对虾的损伤很小,可忽略不计。投喂感染不能引起对虾发病;浸泡和创伤感染则随实验条件和外界环境因子变化,其结果有较大差异。

3.2 对虾弧菌病的发病条件

弧菌是条件致病菌,其发病有其复杂的内部和外部条件,在本实验的浸泡和创伤感染中,实验水体的含菌量高达 10⁷ CFU/ml,远远高于正常养殖水体含菌量的阈值,且实验对虾的密度与高密度养殖条件基本相似,但在控制组中仍无一实验对虾被感染死亡,而在人为使盐度急剧变化和不断换水使实验水体污染的情况下,则造成实验组有不同程度的死

亡,甚至连创伤对照组也有 1 尾死亡,这说明即使体质健壮的健康对虾,在环境及水体理化因子有较大变化的情况下,也能感染弧菌病。由此可说明,在养殖水体中细菌含量偏高是一个重要因素,但不是诱发虾病的唯一因子,这为弧菌病的预防提供线索,即改善水质可缓解病情或少发病,只要养殖密度适宜、各项环境因子无恶性变化,人为控制弧菌病的发生是可能的。因此生产管理上对养殖水质条件进行日常监测,严格控制水质,保持好的水环境对控制对虾细菌性疾病的暴发极为重要。

参考文献:

- [1] Lightner D V. *Vibrio* disease of cultured penaeid shrimp [A]. Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture. Developments in Aquaculture and Fisheries Science [C], Vol. 6, 2nd revised edition. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. 1988. 42-47.
- [2] 郑国兴,沈亚林,李 何. 中国对虾病原菌(鳃弧菌)的研究[J]. 水产学报, 1990, 14(1): 1-6.
- [3] 许 兵,纪伟尚,徐怀恕. 中国对虾病原菌及其致病机理的研究[J]. 海洋学报, 1993, 15(1): 93-106.
- [4] Itami T, Takahashi Y, Yoneoka K, et al. Survival of larval giant tiger prawns *Penaeus monodon* after addition of killed *Vibrio* cells to a microencapsulated diet [J]. J Aquatic Animal Health, 1991, 3(2): 151-152.
- [5] Lightner D V, Lewis D H. A septicemic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp [J]. Marine Fisheries Review, 1975, 37(5/6): 25-28.