

文章编号:1005-8737(2001)01-0041-05

环境因子对发光细菌的生长及 日本对虾仔虾感染死亡率的影响

钟硕良, 陈月忠, 周 宸

(福建省水产研究所, 福建 厦门 361012)

摘 要:以水温、盐度、pH、COD、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 为环境因子,以哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)感染日本对虾(*Penaeus japonicus*)仔虾,试验进行3 d。结果表明,水温、盐度、pH和COD对发光细菌的生长和日本对虾仔虾的感染死亡率具有明显的促进作用。在水温30℃,盐度32.8, pH 7.64和COD 10.2 mg/L时,发光细菌在试验结束时的数量比初始时分别增加了11.2倍,6.5倍,6.2倍和7.9倍;日本对虾仔虾的死亡率比对照组分别增加了60%,45%,43%和50%。 $\text{NH}_3\text{-N}$ 对发光细菌的促生长作用不明显,但其质量浓度1.2~1.6 mg/L时,能增加日本对虾仔虾对发光病的感染率和死亡率。

关键词:环境因子;发光细菌;生长;日本对虾;仔虾;死亡率

在对虾育苗过程中,常常发生对虾幼体发光病。闽南地区引起对虾幼体发光病的病原菌经鉴定为哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)^[1]。发光细菌侵入对虾幼体后,利用机体组织作为营养物质进行繁殖,并在荧光素酶的作用下使还原型荧光素酶转化为氧化型荧光素酶,同时发出荧光^[2]。因而由该病原菌感染后濒死的或已死亡的幼体在育苗池中随着池水充气的滚动,犹如群星闪烁。此种现象能持续2~3 d,随着时间的推移(4 d后)会自行逐渐终止。对虾发光病在对虾发育各期(蚤状期、糠虾期、仔虾期)均会发生,它发病急,传播快,传染性强,致死率高,在1、2 d内,就能导致80%以上的对虾幼体陆续感染死亡。

本文对日本对虾(*Penaeus japonicus*)育苗池水体中的环境因子的变化与发光细菌的生长及其对仔虾的感染死亡率的关系进行探讨,并在对虾幼体发光病流行时,进行了育苗池和海区水质的监测验证,以期控制对虾育苗水体的理化环境,改良育苗水质,

摒除发光细菌适宜生长的基础环境,防治对虾幼体发光病提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 培养基 改良营养琼脂:牛肉膏5 g,蛋白胨10 g,琼脂20 g,陈海水1 000 ml, pH 7.0。15 Pa高压灭菌30 min。

1.1.2 菌液的制备 哈维氏弧菌菌种保存在冰箱中,每周转接1次。试验前,将菌种接种于营养琼脂培养基斜面上,在28℃下培养24 h。然后用无菌3% NaCl溶液洗下菌苔制成菌悬液待用。

1.1.3 试验用虾 日本对虾仔虾幼体平均体长0.49 cm,平均体重0.001 7 g,取自同安丙洲对虾育苗场和厦门集美鳌冠对虾育苗场,置于水族箱中适应性暂养6 h。然后,挑选健壮活泼的仔虾幼体作受试样品。

1.2 试验方法

1.2.1 菌数测定 在菌悬液中和试验结束时海水中的发光细菌数,均采用平板菌落计数法计数,或在721型分光光度计于550 nm波长处测定其光密度

收稿日期:2000-02-28

基金项目:福建省海洋与渔业局资助项目(92703)

作者简介:钟硕良(1953-),男,高级工程师,从事水产养殖和养殖水环境化学研究。

而换算其菌数。

1.2.2 环境因子的测定 水温用铁壳温度计测定;盐度用精密密度计测定;pH 用 pH-S2 型酸度计测定;溶解氧用碘量法测定;COD 用碱性高锰酸钾法测定; $\text{NH}_3\text{-N}$ 用次溴酸盐氧化,重氮偶氮法测定。

温度用 WJ-1 控温仪调控;盐度用纯净食盐调节;pH 用酸碱调节; $\text{NH}_3\text{-N}$ 用氯化氨(分析纯)调节;有机质用阴干后的虾池底部沉积物,按梯度分别称取一定质量放入试验水体中,然后测定各组水体中 COD。

1.2.3 感染试验 试验容器为 6.0 L 的塑料盆,加入经用多层纱布和棉花制成的过滤器过滤的海水 4.0 L。内置 1 个 2* 砂石充气,呈沸腾状。仔虾幼体饵料以丰年虫为主,并投少量的虾片、日本对虾幼体配合饵料(1 号),饵料投量与正常相同。设试验组和对照组,每组 2 盆各放入仔虾幼体 50 尾作平行试验。试验组在未放入幼体前加入发光细菌菌悬液并换算成水体中发光细菌的初始浓度。对照组不加发光细菌菌悬液,二者均仅调节相应的环境因子梯度量值。试验历时 3 d。试验期间,每天测定 1 次环境因子,观察仔虾生长和死亡情况。试验结束时,检

测水体中发光细菌和存活仔虾的数量,并换算成发光细菌数量的对数值和仔虾的死亡率。

2 结果与分析

2.1 水温对发光细菌的生长及仔虾感染死亡率的影响

水温在 24~30℃ 的范围内,水体中发光细菌的生长及其对日本对虾仔虾的感染死亡率随水温上升而递增(图 1)。当水温 24℃ 时,发光细菌生长缓慢,仔虾感染死亡率也较低,试验组比对照组仅增加了 7%;水温 26~28℃ 时,发光细菌的生长速度和仔虾的感染死亡率迅速上升;水温 30℃ 时,发光细菌的生长速度和仔虾的感染死亡率最高,发光细菌数量高达 $2.57 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$,比初始时($2.10 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$)增加了 11.2 倍,试验组仔虾死亡率比对照组增加了 60%;水温 32℃ 时,发光细菌的生长速度和仔虾的感染死亡率则明显下降。由此表明,发光细菌的生长最适温度范围为 28~30℃,此时,发光细菌对日本对虾仔虾的感染死亡率最高。水温 $\geq 32^\circ\text{C}$ 或 $\leq 28^\circ\text{C}$ 时,发光细菌的生长速度和仔虾的感染死亡率便随之下降。

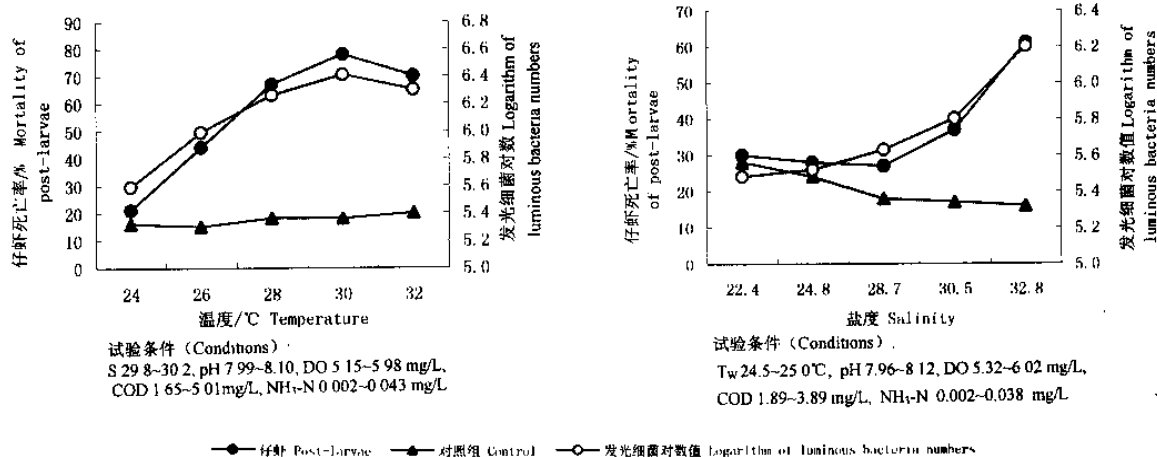


图 1 水温和盐度对发光细菌的生长及仔虾感染死亡率的影响

Fig.1 Effects of temperature and salinity on growth of luminous bacteria and mortality of infected post-larvae of *P. japonicus*

2.2 盐度对发光细菌的生长及仔虾感染死亡率的影响

盐度在 22.4~32.8 的范围内,水体中发光细菌的生长及其对日本对虾仔虾的感染死亡率随盐度的递增而升高,但升幅则比温度组小(图 1)。当盐度

22.4~24.8 时,发光细菌的生长速度和仔虾的感染死亡率均很低;盐度 28.7~30.5 时,发光细菌的生长速度和仔虾的感染死亡率提高较快,盐度 30.5 时的发光细菌数量比初始时($2.10 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$)增加了 2.0 倍,试验组仔虾死亡率比对照组增加了 20%;盐

度 32.8 时,发光细菌的生长速度和仔虾的感染死亡率迅速上升,发光细菌数量在试验结束时高达 $2.08 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$,比初始时增加了 6.5 倍,试验组仔虾死亡率比对照组增加了 45%。由此表明,发光细菌在盐度达 32.8 时生长速度最快,日本对虾仔虾染病死亡率亦最高。

2.3 COD 对发光细菌的生长及仔虾感染死亡率的影响

如图 2 所示,水体中发光细菌的生长及其对日本对虾仔虾的感染死亡率随 COD 的递增而上升。当 COD 2.2~6.2 mg/L 时,发光细菌的生长较为缓

慢,仔虾的感染死亡率亦较低;COD 6.2 mg/L 时的发光细菌数量比初始时($1.95 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$)仅增加了 1.9 倍,试验组仔虾死亡率比对照组亦仅增加 16%;当 COD 8.4~10.2 mg/L 时,发光细菌生长速度和仔虾的感染死亡率迅速上升;COD 10.2 mg/L 时的发光细菌数量高达 $2.19 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$,比初始时增加了 7.9 倍,试验组仔虾死亡率比对照组增加了 50%。由此表明,在有机质丰富的水体中($\text{COD} \geq 8 \text{ mg/L}$),发光细菌生长较快,仔虾的感染死亡率亦较高。

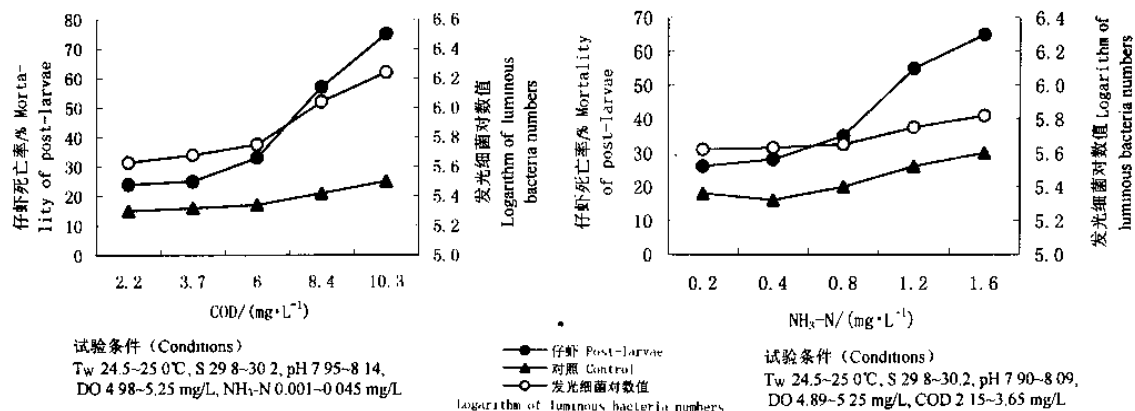


图 2 COD 和 NH₃-N 对发光细菌的生长及仔虾感染死亡率的影响

Fig.2 Effects of COD and NH₃-N on growth of luminous bacteria and mortality of infected post-larvae of *P. japonicus*

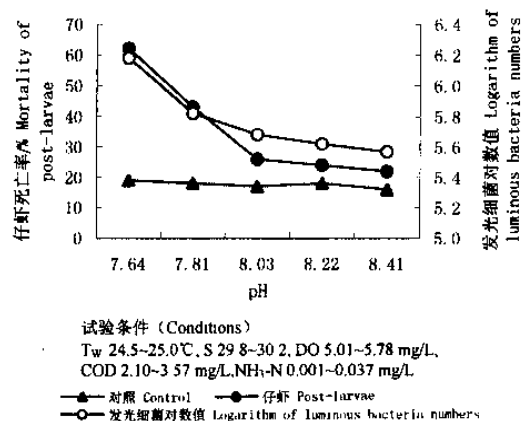


图 3 pH 对发光细菌的生长及仔虾感染死亡率的影响

Fig.3 Effects of pH on growth of luminous bacteria and mortality of infected post-larvae of *P. japonicus*

2.4 NH₃-N 对发光细菌的生长及仔虾感染死亡率的影响

水体中发光细菌的生长速度和仔虾的感染死亡率随氨氮质量浓度的递增而缓慢上升,但升幅比 COD 组小得多(图 2)。当氨氮质量浓度在 0.2~0.8 mg/L 时,发光细菌的生长速度和仔虾的感染死亡率均很低,发光细菌数量比初始时($1.95 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$)仅增加了 1.1~1.3 倍,试验组仔虾死亡率比对照组亦仅增加 8%~15%;当氨氮质量浓度 1.2~1.6 mg/L 时,发光细菌的生长量稍有上升;氨氮质量浓度 1.6 mg/L 时达 $6.61 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$,比初始时增加了 2.4 倍,试验组仔虾死亡率比对照组增加了 35%。由此表明,高质量浓度的氨氮对发光细菌生长的促进作用并不明显,但氨氮质量浓度 $\geq 1 \text{ mg/L}$ 时却能提高发光细菌对仔虾的感染率和死亡率。

2.5 pH 对发光细菌的生长及仔虾感染死亡率的影响

如图3所示, pH在7.64~8.41的范围内, 水体中发光细菌的生长及其对日本对虾的感染死亡率随pH的降低而递增。当pH 8.41~8.03时, 发光细菌的生长速度较为缓慢, 仔虾的感染死亡率也较低; 当pH 7.81~7.64时, 发光细菌的生长和仔虾的感染死亡率迅速上升; pH 7.64时的发光细菌数量高达 $1.51 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$, 比初始时($2.10 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$)增加了6.2倍, 试验组仔虾死亡率比对照组增加了43%。由此表明, 发光细菌在较低的酸碱度($\text{pH} \leq 7.60$)下生长较快, 日本对虾仔虾也较易感染发光病。

2.6 生产性验证

在对虾幼体发光病猖獗流行时, 对厦门市集美区鳌冠对虾育苗场和海区进行了水质监测。结果见表1, 在水温、盐度、COD和 $\text{NH}_3 - \text{N}$ 较高以及pH较低时(一般 $T: 28 \sim 31^\circ\text{C}$, $S: 31 \sim 34$, $\text{COD}: 6.15 \sim 9.25 \text{ mg/L}$, $\text{NH}_3 - \text{N}: 0.13 \sim 0.884 \text{ mg/L}$, $\text{pH}: 7.70 \sim 8.00$)易发生发光病, 且发病池水体中的细菌总数和弧菌数均较高。通过15个育苗池中蚤状期、糠虾期、仔虾期的发病池和正常池以及海区的水质监测, 结果与试验基本一致。

表1 在发光病流行期间对虾育苗池和海区的水质监测结果

Table 1 The monitoring results of water quality in prawn seedling - culture ponds and sea area during eloidamic period of luminous bacteria disease

项目 Item	池水 Pond water		海水 Sea water	
	发病池 Diseased pond	正常池 Normal pond	常发区 Frequently-diseased area	罕发区 Seldom-diseased area
$T/^\circ\text{C}$	27~31	27~31	27~29	27~29
S	28~33	25~32	28~33	25~32
pH	7.70~8.01	8.00~8.30	7.78~8.10	8.01~8.22
$\text{COD}/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	6.15~9.25	3.29~6.75	4.12~7.00	0.80~0.96
$\text{NH}_3 - \text{N}/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	0.13~0.884	0.34~0.40	0.287~0.680	0~0.062
细菌总数/ $(10^4 \cdot \text{ml}^{-1})$ Total bacteria density	9.1~40.0	0.02~7.2	0.15~4.00	0.016~0.39
弧菌数/ $(10^4 \cdot \text{ml}^{-1})$ <i>V. harveyi</i> density	2.6~6.6	0.037~0.14	0.10~0.20	0.0008~0.0010

3 讨论

(1) 由于海洋微生物都具有嗜盐的特性, 而海水温度会直接影响海水微生物的新陈代谢。因此, 在适宜的温度、盐度范围内, 海洋微生物在较高的温度、盐度下的生长速度比较低的温度、盐度下要快^[2]。在对虾育苗过程中, 仔虾期的水温较高, 仔虾的蜕壳周期缩短, 生长速度加快, 但因体能消耗加大而使其抵御疾病的能力下降, 仔虾感染发光病的机率便升高。故日本对虾培育至仔虾后期时, 水温应缓降至自然海区水温。在盐度高达30.0以上的培育水体中, 仔虾期亦可添加少量淡水, 使盐度降至28.0左右, 这样不仅有利于仔虾蜕壳, 而且有利于改变适宜发光细菌生长的环境。

(2) 海洋中发光细菌的生长受海水中溶解的有机质的浓度所控制^[3]。对虾幼体培育水体中幼体的排泄物、残饵和动植物残体等有机质含量较高, 为发光细菌生长提供了丰富的营养。在培育水中的 $\text{COD} > 8 \text{ mg/L}$ 时, 发光细菌的生长速度加快, 水体发光细菌数量明显提高。同时水体中的氨氮含量也相应

较高。氨氮对发光细菌的生长影响并不明显, 但高浓度的氨氮却能加剧仔虾染病和加快染病仔虾死亡。因为随着氨氮质量浓度的增加, 对虾体内一些重要酶如超氧化歧化酶、酚氧化酶和溶菌酶的活性下降, 致使对虾的抗病力降低, 对疾病感染率明显提高^[4,5]。由此, 在对虾育苗时, 要预防和减轻发光病对幼体的危害, 应做到如下几点: ①通过沙滤或氧化剂消毒育苗水, 尽量减少培育水中有机质和氨氮的含量; ②严格控制幼体的培养密度, 较为准确地掌握幼体的存池数和投饵量, 避免幼体的排泄物和残饵过多。

(3) 对虾育苗后期, 随着对虾幼体长大, 残饵及对虾排泄物日益积累, 丰富的有机质发酵分解导致水体中的pH也随之下降。由于目前对虾病毒病较为猖獗, 且此病又无有效药物治疗, 以及近海水中污染较为严重, 春夏之交经常发生“赤潮”, 故大多数对虾育苗场均普遍采用少量换水的育苗方法, 使在仔虾后期水体中pH均较低, 有些育苗池水体中pH甚至降至7.60以下。这样, 易导致发光细菌生长速度迅速上升, 在短期内造成大量的仔虾患发光病而死

亡。

参考文献:

- [1] 陈月忠, 周 震, 钟硕良. 哈维氏弧菌引起的对虾幼体发光病流行病学研究[A]. 对虾健康养殖[C]. 福建: 厦门大学出版社, 1998: 145-148.
- [2] Lavilla - Pitogo C R. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines[J]. Aquaculture, 1990, (1-2): 1-13.
- [3] 曹蕴慧, 胡锡钢. 海洋发光细菌的生理特征[J]. 海洋学报, 1982, 4(4): 89-93.
- [4] 汪心源, 张淑华, 梁作平. 海水中的氨对对虾(*Penaeus orientalis*) 幼体的影响[J]. 海水养殖, 1982, (2): 19-25.
- [5] 丁美丽, 林 林, 李光友, 等. 有机污染对中国对虾体内外环境影响的研究[J]. 海洋与湖沼, 1997, 28(1): 7-12.

Effects of environmental factors on growth of luminous bacteria (*Vibrio harveyi*) and mortality of infected post-larvae of *Penaeus japonicus*

ZHONG Shuo-liang, CHEN Yue-zhong, ZHOU Chen

(Fisheries Research Institute of Fujian Province, Xiamen 361012, China)

Abstract: Water temperature, salinity, pH, COD, $\text{NH}_3 - \text{N}$ were regarded as the environmental factors and the bacterium *Vibrio harveyi* was used to infect *Penaeus japonicus* for 3 d. The results show that water temperature, salinity, pH and organic matters have obvious enhancement effect on the growth of *V. harveyi* and lead to higher mortality of *P. japonicus* with any one of the factor levels going up. When water temperature 30°C , salinity 32.8, pH 7.64 and COD 10.2 mg/L, the bacteria densities of *V. harveyi* at the end of the experiment is higher by 11.2, 6.5, 6.2 and 7.9 times, respectively, than those at the beginning and the mortalities of *P. japonicus* in the corresponding groups are increased by 60%, 45%, 43% and 50%, respectively. $\text{NH}_3 - \text{N}$ has no obvious effect on growth of *V. harveyi*, but when its concentration is between 1.2 and 1.6 mg/L, the mortality and *V. harveyi*-infected rate of *P. japonicus* can be heightened.

Key words: environmental factor; *Vibrio harveyi*; growth; *Penaeus japonicus*; post-larva; mortality