

⑦

对虾白黑斑病的病原病因研究

蔡生力 王崇明 杨丛海
(黄海水产研究所, 青岛 266003)

许小幸[✓]
(青岛医学院, 266021)

S845.26.2

A **摘要** 对虾白黑斑病是养殖中国对虾的常见病,曾被怀疑是细菌性疾病。本试验通过对病虾肝胰腺、血液和病灶组织的细菌分离,对正常虾用白黑斑病虾投喂感染,与病虾共栖感染以及用分离于病虾的细菌注射感染等一系列试验发现:细菌或其它生物性病原与对虾白黑斑病并无直接关系。通过对病虾的酚氧化酶活力测定、血细胞的观察和流行病学研究、分析认为该病是由于对虾长期营养不良在应激状态下所引发的一种生理性疾病。腹部每节两侧基部和尾肢等部位出现的病灶——白斑或黑斑是在对虾处于应激状态下,酚氧化酶诱导相关基质由酚到醌最终产生黑色素形成的。此外还讨论了相关基质的来源以及与对虾应激反应有关的几项因素。

关键词 对虾, 白黑斑病, 细菌, 酚氧化酶, 血液

对虾白黑斑病曾是我国对虾养殖中的主要疾病之一,尤其是在以养殖中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 为主的北方诸省如山东、河北、辽宁等最常见。发病时间一般在7月下旬至8月下旬。轻者可导致发病虾池10%~20%的虾死亡,重者死亡率超过70%,危害相当严重。1993年以来,以杆状病毒为病原的对虾暴发性流行病发生后,由于大多数虾池在7月底以前均已因病收虾,所以很大程度上掩盖了对虾白黑斑病的发生和危害。随着养殖模式的改变,病毒病逐步得以控制,白黑斑病的发生在1995年又有增加,形成一定的危害。孟庆显和俞开康(1986)、孟庆显[1991]描述了该病的症状,并提出了防治方法。徐启家和刘梦侠[1987]做了药物防治试验,并分析了黑白斑病与环境 and 营养等因子的关系。赵增元等(1991)则着重强调了该病与温度的关系,推测可能是一种季节病。莫佛素和翁雄[1992]报道了广东省养殖的斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 也发生此病。目前尚未见国外对此病的详细报道,Lightner[1983]曾提及南太平洋塔希提岛养殖的日本对虾 (*Penaeus japonicus*)、墨吉对虾 (*P. merguensis*) 出现类似的疾病,病因不明。自发现白黑斑病以来,许多研究人员怀疑此病为细菌性疾病,有的从病虾体内分离到了细菌,并且用抗菌素治疗此病获良好效果,但人工感染未成功。本研究除了从病原分离到人工感染等方面探讨该病与生物性病原(主要是细菌)的关系外,还通过对病虾体内的酚氧化酶活力的测定和血细胞的观察,由对虾生理角度探讨白黑斑病的病因。

收稿日期:1995-12-04。

(1) 孟庆显、俞开康,1986。中国对虾新发现的两种疾病。鱼病简讯,(1):33-34。

(2) 赵增元等,1991。对虾流行病防治技术研究(鉴定材料)。

1 材料与方 法

1.1 样品采集

病虾样品分别采自山东莱州土山、仓西、青岛流亭、黄岛以及山东乳山等地,采集后装入25L加仑桶,并注意充气,带回实验室。

1.2 细菌的分离和鉴定

将蒸馏水冲洗实验用虾,无菌操作抽取心脏血液。用镊子剥去头胸部一侧外甲壳,夹取部份肝胰组织。酒精棉球轻擦病灶表面后,用手术剪取整块病灶组织,并经组织研磨器碾碎。按何晓青[1989]方法进行细菌分离和鉴定。

将发病虾池和周围正常虾池水置于500mL棕色玻璃瓶,放入冰桶。在6小时内尽快按上述方法进行细菌的分离、鉴定和计数。

1.3 感染试验

1.3.1 投喂感染

6个30L的玻璃缸,分2组,各3缸,每缸放养长7~8cm的健康虾6尾,第1组每天投喂2次白黑斑病虾,2次投喂配饵(海马牌,下同),另1组每天投喂4次配饵。每天换水1/3,间歇充气,溶解氧为2~4mg/L,实验共进行10天。

1.3.2 共栖感染

9个30L的玻璃缸分3组,每组3缸,第1组取正常外海水,每缸放养6尾体长7~8cm健康虾,第2组取正常外海水,每缸放养3尾健康虾,3尾白黑斑病虾,第3组取发病虾池水,每缸放养健康虾6尾,每天喂配饵4次。饲养条件与投喂感染相同。

1.3.3 注射感染

按何晓青[1989]方法从病虾肝胰腺分离的细菌接种于海水营养琼脂培养基上,30℃培养48小时,用生理盐水冲洗,镜检计数,用生理盐水将注射用细菌悬液调至 1.2×10^4 个/mL和 1.2×10^3 个/mL两种浓度,取体长9~10cm健康虾27尾,分养于9个30L玻璃缸。每缸3尾,分3组,第1组每尾注射0.1mL生理盐水,第2组每尾注射0.1mL, 1.2×10^3 个/mL细菌悬液,第3组注射0.1mL, 1.2×10^4 个/mL细菌悬液,注射部位为第2腹节侧面,每日喂配饵4次。饲养条件与投喂感染相同。

1.4 酚氧化酶(PO)活力测定

用灭菌注射器从心脏抽取血液,置冰箱4℃过夜,取析出血清作酚氧化酶活力测定,以L-DOPA为底物,参照Horowitz和Shen[1952]和王雷等[1995]方法进行。将3mL 0.1mol/L的L-DOPA及10μL的血清在室温下混匀。每隔2分钟读取490nm波长下的透光率值(T),根据 $A = \lg 1/T$ 可换算出光密度值(A)。

1.5 血细胞的观察计数

参照叶燕玲和陈宽智[1992]方法,用装有3%戊二醛磷酸钾缓冲液的注射器,插入心脏取

血,缓冲液:血液=4:1,将样品装入小瓶,混匀后,用显微镜观察和血球计数板计数。

2 结果

2.1 细菌分离和鉴定

对9尾正常虾、8尾白斑病和6尾黑斑病虾的肝胰腺、血液、病灶和肠道的细菌分离结果可知(表1)。病虾各组织细菌检出率以肠道最高(100%),肝胰腺次之(37.5%和50%),血液和病灶组织较低(12.5%,33.3%和25%、16.6%),正常虾肠道细菌检出率也为100%,肝胰腺也有少量检出(22.2%)。血液未检出细菌,正常虾细菌检出率与叶美美和郭平[1992]的结果接近。

表1 正常虾和白斑病虾各组织细菌分离结果

Table 1 Results of bacterial isolation from healthy shrimps, and white and black spot disease shrimps

	正常虾			白斑病虾			黑斑病虾		
	分离数(尾)	阳性数(尾)	阳性率(%)	分离数(尾)	阳性数(尾)	阳性率(%)	分离数(尾)	阳性数(尾)	阳性率(%)
肝胰腺	9	2	22.2	8	3	37.5	6	3	50.0
血液	9	0	0	8	1	12.5	6	2	33.3
病灶				8	2	25.0	6	1	16.6
肠道	9	9	100.0	8	8	100.0	6	6	100.0

注:病灶取腹部下侧基部呈白斑部位。

以上各组织中检出的细菌以弧菌为主,优势种类为海鱼弧菌(*Vibrio damsela*),副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*),其次是灿烂弧菌(*V. splendidus* II),溶蛋白弧菌(*V. proteolyticus*)和创伤弧菌(*V. vulnificus*)等。同时采集的发病虾池水样和正常虾池水样的细菌以副溶血弧菌为优势种,细菌总数在 $10^4 \sim 10^5$ 范围。此结果与王文兴等[1983]报道的结果相符。

2.2 感染试验

2.2.1 投喂感染

用现场采集的新鲜白斑病虾投喂健康对虾,每日2次,连续10天,18尾虾均未感染白斑病(表2)。这一实验证实健康虾捕食白斑病虾不会引发相同疾病,或者病虾体内不存在传染性生物病原,与莫佛素和翁雄[1992]报道的斑节对虾白斑病情况不相符。

表2 对虾白斑病人工投喂感染试验

Table 2 Artificial infection of healthy shrimp by feedings with white and black spot disease shrimps

	配合饲料			白斑病虾		
	1	2	3	4	5	6
起始虾数(尾)	6	6	6	6	6	6
10天后存活数(尾)	6	5	5	6	6	5
存活率(%)	100	83.3	83.3	100	100	83.3
平均存活率(%)		83.9			94.4	
白斑病发病情况	—	—	—	—	—	—

2.2.2 共栖感染

将白斑病虾与正常虾放养于同一玻璃缸进行共栖感染试验,10天后,9尾正常虾均未发

生白黑斑病,9尾白黑斑病虾死亡3尾,仍有2尾略带轻微白斑。另外4尾已痊愈,这一结果可进一步证实白黑斑病为非传染性疾病。

用白黑斑病虾池水放养健康对虾的感染试验也进行了10天,3个缸18尾对虾(包括死亡2尾)均未出现白黑斑病,这显示发病池水虽然细菌数量较高($>10^5$ 个/mL),其它生物如原生动物和浮游生物数量也远较外海水高,但并没有一种特定病原生物能直接引发对虾白黑斑病。

2.2.3 注射感染

注射生理盐水组对虾基本正常,死亡的2尾可能为操作不慎,受伤所致。 1.2×10^3 个/mL细菌浓度组,9尾虾死亡6尾,其中2尾48小时内死亡,4尾48小时后死亡。 1.2×10^4 个/mL浓度组,9尾虾死亡7尾,4尾48小时内死亡,3尾48小时后死亡。死亡虾中,有4尾鳃部具明显的棕色肉芽肿,镜检可见鳃丝末端细胞裂解,有大量细菌活动。虽然所注射的细菌分离于白黑斑病虾肝胰腺,但试验虾无论存活与否,均无白黑斑现象。也许这些细菌是虾体内正常可分离到的或是继发感染甚至因操作不慎污染所致,而并非是直接导致白黑斑病的病原菌。

2.3 酚氧化酶活力测定

从图1可看出,正常对虾血清的酚氧化酶(PO)的活性明显高于白黑斑病虾PO活性,前者在60分钟内,吸光值增加近5倍,而后者仅增加1倍,正常虾血清的酚氧化酶活力测定结果与王雷等[1995]较符。

2.4 血细胞观察

8~9cm的正常中国对虾的血细胞总数平均为 $8\ 450$ 个/ mm^3 ,大颗粒细胞共有 563 个/ mm^3 ,占血球总数的6.6%。同时采集相同大小的白黑斑病虾血细胞总数 $3\ 070$ 个/ mm^3 ,不足正常虾的一半,而大颗粒细胞(422 个/ mm^3)却占总数的10.9%,光镜下,小颗粒细胞与透明细胞区分不很明显,而大颗粒细胞与其他两种细胞差异非常显著,颗粒大,着色深,易区分。正常虾血细胞总数与叶燕玲[1993]所测结果($10\ 320$ 个/ mm^3)基本相符。但由于季节、虾体大小和健康状况等的差异,对虾血细胞数量差异很大,所测结果变异也较大。

3 讨论

3.1 生物性病原

对虾白黑斑病刚出现时,许多学者怀疑这是一种细菌性疾病,其主要根据是:(1)从肝胰腺或血液中分离到细菌。(2)用抗菌素拌药饵治疗具有一定效果。(3)发病季节,虾池细菌数量相对较高($>10^5$ 个/mL)。本次试验首先从病原菌分离着手,分析了各为10余尾的病虾和正常虾的肝胰腺、血液及病灶组织发现,除肝胰腺细菌检出率稍高约50%(正常虾20%)外,血液和病灶的细菌检出率均较低($<25\%$),因此,可基本上排除因细菌侵入虾体组织导致白黑斑病

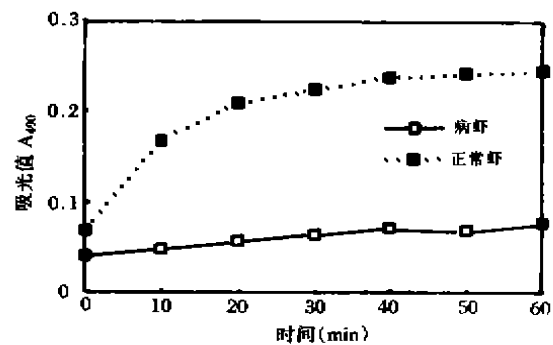


图1 正常和白黑斑虾血清酚氧化酶(PO)活力
Fig.1 measurement of PO activities in the haemolymph of normal or diseased shrimp

发生的可能性。同时进行的投喂感染、共栖感染以及注射感染试验结果进一步证实细菌非该病直接病原,正常虾摄食病虾并不会引发相同疾病,正常虾栖息于发病虾池水中,也不易感染白黑斑病,说明病虾体内或病虾池水中并无直接引发白黑斑病的生物性病原,如病毒、细菌、真菌和原生动植物等,该病是一种非传染性疾病。另外,通过对病虾病灶等组织的光镜和电镜观察也未发现细菌等生物性病原(蔡生力等,1995a)。

虽然有不少研究和生产试验报道用抗菌素拌饵料对该病有较好疗效(蔡生力等,1995b),但我们认为,抗菌素的作用主要是针对白黑斑病的继发性感染,患白黑斑病对虾抵抗力较低,易受细菌感染,适当使用抗菌素的确具有较好的预防和治疗作用。事实上,白黑斑病虾在良好的水环境中,投喂优质饵料,不用任何其它药物,也能自然康复。

3.2 环境因子

根据流行病学研究结果,认为使对虾处于应激状态的主要因素是温度和营养。因为该病主要发生在7月下旬至8月下旬,此时水温通常在30℃以上(水温低于25℃,几乎不发病),若投喂低质配饵,以鱼为主或变质鲜饵,则易发此病。对虾最适生长水温在25℃左右,超过30℃,正常生理代谢受抑,再加上长期营养不良,势必影响造血等功能,而处于脱皮阶段的虾,可能有较多的血液流向全身各甲壳内层,为新生甲壳作准备,此时若得不到足够的血液补充,就可能引起生理功能失调。实验观察的白黑斑病虾血细胞明显比正常虾少也可说明这一点。

3.3 酚氧化酶

酚氧化酶原广泛存在于血液(尤其是大颗粒细胞)和甲壳内层组织,在对虾的体液免疫和脱壳生理代谢中起重要作用,该酶原能在多种条件下被激活,如:(1)自发激活,在正常生理条件下,当对虾处于脱皮阶段,存在于甲壳内层的酚氧化酶原能自发激活,参与对虾新甲壳替代旧甲壳的生理代谢过程,促使甲壳硬化[Madero和Finne,1982]。(2)异物入侵激活,对虾血液受到异物入侵,大颗粒细胞裂解,释放出具

活性的酚氧化酶,刺激产生一种粘性蛋白、附着在异物上,有助于小颗粒细胞对异物的吞噬和包囊,起调理素作用,同时酚氧化酶还诱导血液中的某些基质经过一系列化学变化形成黑色素,起抵抗异物作用[Leonard等,1985;Lightner和Redman,1977]。(3)物理刺激激活,此现象在对虾冷藏过程中较常见。在收虾前,当对虾处于某种应激状态如拥挤、摩擦、刺伤等,使积聚在甲壳内层的酚氧化酶原激活,诱导形成黑色素。所发生的化学变化基本一致,都是在酚氧化酶的催化下,血液中的或来源于血液的一些相关基质由一元酚氧化形成二元酚,进一步产生有色醌类,最终形成黑色素[Krol等,1989],其变化过程由图2所示。

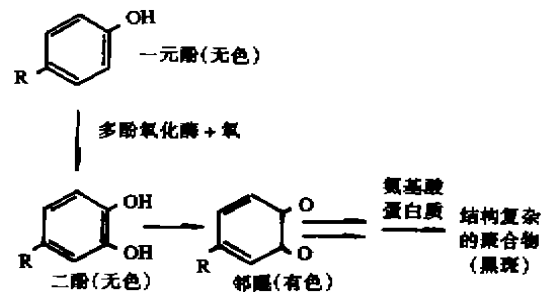


图2 对虾黑斑形成过程

Fig.2 Formation of black spot of shrimp

(3)蔡生力等,1995a。对虾白黑斑病的组织病理学研究,待刊。

(4)蔡生力等,1995b。对虾白黑斑病的防治试验研究,待刊。

对虾冷藏过程中发生的黑斑主要出现在腹部每节两侧甲壳基部、尾扇和额角等部位,O-gana等[1984]曾分析指出这是由于这些部位的甲壳内层具有丰富的酚氧化酶原及相关基质,该酶原和基质均来源于血液。当对虾处于脱皮阶段时,酶和基质尤为丰富,此时若收虾,对虾受到刺伤、摩擦和拥挤等,酚氧化酶原易被激活,则诱导形成黑斑的几率就高。而处于脱皮间期,甲壳已硬化的虾较少发生黑变,可能是由于原先在脱皮期阶段所聚集的酶和基质已在新旧甲壳的替换和新甲壳硬化过程中被消耗。

对虾白黑斑病的病灶部位与冷藏时发生的黑斑部位很相近,最常见的是腹部每节两侧甲壳基部、尾扇、头胸甲下侧和额角。显微镜观察结果发现,病灶部位甲壳内层聚集着成团的不定形褐色物质。孟庆显[1991]曾推测这些物质为凝聚坏死的血细胞组织碎片残渣。我们认为这些物质来源于血液,既有坏死血细胞组织,还有来自血液的一些基质,在受酚氧化酶的催化后变成了黑色的复合物。当对虾处于某种应激状态,正常的脱壳生物机能受阻,酚氧化酶被外来因素激活,诱导相关基质形成黑色素聚集在一些特定部位的甲壳内层,外观看就是白斑或黑斑,白斑聚集物质较少,黑斑较多。

试验所测的白黑斑病虾血清中酚氧化酶活力明显比正常虾小,这一结果与王雷等[1995]报道的濒死虾血清中酚氧化酶活力显著高于正常虾相反。这可能是他所取的病虾血液由于异物入侵,引起大量大颗粒细胞裂解,释放出较多的酚氧化酶起免疫反应。而白黑斑病虾的酚氧化酶分布和作用主要集中于甲壳内层,血液中并没有受到外源异物直接刺激。

对虾处于应激状态时激活酚氧化酶形成黑色素的外来因子可能较复杂,如生物因子(真菌、原生动物、细菌等)、理化因子和机械因子(拥挤、刺伤)等都有可能启动酚氧化酶作用。该酶的活力和催化作用具有一种级联效应,最初的启动因子作用似乎较小,而引起的连锁反应却可能相当大。在对虾白黑斑病发生过程中,究竟是哪一种或哪几种因子首先启动了酚氧化酶原活化系统,在什么条件下该酶的作用朝催化形成黑色素方向发展等问题,目前尚难解释。但通过本次试验,我们认为对虾白黑斑病是由于对虾长期营养不良、在高温季节引发的一种生理性疾病,与细菌等生物性病原没有直接关系。病灶白黑斑是由于甲壳内层用于脱壳生理代谢的酚氧化酶在对虾处于应激状态、正常激活机制受抑条件下催化有关基质由酚变醌进而产生黑色素而形成的。

本研究系国家“八·五”攻关课题,编号85-15-03-03。本文承蒙青岛市卫生防疫站鲁开国教授、国家海洋局一所王文兴研究员和中科院海洋研究所王雷副研究员的大力帮助、指导,深表谢意。

参 考 文 献

- [1] 王雷、李光友、毛远兴,1995。中国对虾血淋巴中抗菌、溶菌活力与酚氧化酶活力的测定及其特性研究。海洋与湖沼,26(2):179-185。
- [2] 王文兴等,1983。青岛太平角和即墨丰城沿海对虾养殖场异养菌群和条件致病菌的研究。黄渤海海洋,26(2):68-78。
- [3] 叶燕玲、陈宽智,1993。中国对虾(*Penaeus chinensis*)血细胞超微结构、分类及其计数。青岛海洋大学学报,26(2):35-42。
- [4] 叶美美、郭平,1992。虾池水域环境细菌变动与患“红腿病”虾心脏带菌率关系的初步探讨。水产科学,(12):7-9。
- [5] 何晓青,1989。卫生防疫细菌检验,1-60。新华出版社(京)。
- [6] 孟庆显,1991。对虾疾病防治手册,110-116。青岛海洋大学出版社。
- [7] 徐启家、刘梦侠,1987。中国对虾黑白斑病的初步观察。齐鲁渔业,(3):38-40。

- [8] 莫佛素,翁 雄,1992. 斑节对虾白斑病的治疗方法与体会. 中国水产, (12):127 ~ 128.
- [9] Horowitz N. H. and S. C. Shen, 1952. *Nenrospora*. *Tyrosinae*. *J. Biol. Chem.*, **197**:513 ~ 520.
- [10] Krol R. M. *et al.*, 1969. Histopathology and Ultrastructure of the Hemolytic Response to an Acidfast Bacterial Infection in Culture *Penaeus vannamei*. *J. Agr. Ani., Healyh*, (1):37 ~ 42.
- [11] Lightner D. V. and R. Redman, 1937. Histochemical Demonstration of Melanin in Cellular Inflammatory Processes of Penaeid Shrimp. *J. Invertebr. Pathol.*, **30**:289 ~ 302.
- [12] Lightner D. V., 1983. Handbook of Mariculture Vol. Crustacean Aquaculture 289 ~ 320 J. D. Mcrey editor CRC Press, INC., Boca Raton, FL.
- [13] Leonard C. *et al.*, 1985. The role of Prophenoloxidase Activation in Nonspecific recognition and Phagocytosis by Insect Blood Cells. *J. Insect. Physiol.*, **31**(10):789 ~ 799.
- [14] Madero C. F. and G. Finne, 1982. Properties of Phenoloxidase Isolated from Gulf Shrimp Proceedings of the 7th Annual Tropical and Subtropical. *Fisheries Technological Conference of the Americas*. 323 ~ 339.
- [15] Ogama M. *et al.*, 1984. On Physiological Aspects of Black Spot Appearance in Shrimp. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, **50**(10):1763 ~ 1769.

STUDIES OF PATHOGENY OF WHITE AND BLACK SPOT DISEASE ON PENAEID SHRIMP

Cai Shengli, Wang Chongming and Yang Conghai

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Qingdao 266003)

Xu Xiaoxing

(Qingdao Medical College, 266003)

ABSTRACT White and black spot disease of penaeid shrimp was one of serious diseases on shrimp farming of China. In this study, bacteria were isolated from hepatopancreas, blood and focus of disease shrimp. Healthy shrimps were infected artificially by injecting bacteria from diseased shrimps, fed with fresh diseased shrimps, and stocking them with diseased shrimps together or in the water taken from diseased shrimp pond. The results showed that there's no direct relationship between white and black spot disease of shrimp and bacteria or other pathogen. Based on the results of measurements of phenoloxidase activities in diseased shrimp blood and observation of diseased shrimp blood, we consider that white and black spot disease is a kind of physiological deficiency disease, which was caused by long term malnutrition and high temperature press of culture water ($> 30^{\circ}\text{C}$). The focus, white and black spot appeared mainly on base of each segment of abdomen and tail, etc., was caused by accumulated melanin, the end product of a series of chemical reactions. These reactions begin with activation of prophenoloxidase located inside shrimp shells, and further the enzyme catalyzes substrates from blood producing quinones and eventually melanin.

KEYWORDS Penaeid shrimp, White and black spot disease, Bacteria, Phenoloxidase, Blood