

中国对虾细菌性黑鳃病的组织病理观察

周 凯 郑国兴 曹 直

(中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090)

摘 要 报道中国对虾细菌性黑鳃病的症状、鳃组织的显微、超显微结构的病理变化。病虾鳃区呈黑色条斑状、活动力差、厌食、死亡率较高。光镜下观察, 鳃组织严重坏死、断裂, 鳃丝充血, 为多量血淋巴细胞浸润, 黑色素大多沉积在鳃丝末端。电镜观察到鳃组织的甲壳层和表皮层中有许多不同切面的杆状细菌, 呈多形态, 大小约为 $(0.2 \sim 0.4) \times (1.2 \sim 1.8)$ 微米, 单个, 偶而连成双, 无芽孢, 菌体周围细胞结构完全瓦解, 组织被腐蚀成许多圆形或不规则的空斑。

关键词 中国对虾, 黑鳃病, 细菌, 组织病理

黑鳃病是养殖对虾的主要病害之一 [Couch 1978, Lightner 1988], 在全国各养虾地区都很流行, 发病率甚高。疾病多发生在七月上旬后的高温季节, 可延续至 10 月上旬, 在越冬虾中也常发现 [孟庆显 1991, 薛清刚和王文兴 1992]。

引起黑鳃的原因有很多。黑鳃病最早是由日本学者石川雄介 [1968] 提出的, 他发现镰刀菌 (*Fusarium*) 寄生能使日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 的鳃产生黑变。有关镰刀菌引起对虾的黑鳃病在我国也相继有报导 [陈 波等 1992, 战文斌等 1993a] (洪 心等 1991)。鳃被缘毛类纤毛虫 (聚缩虫、累枝虫及钟形虫等) 附着时, 大多数对虾鳃部发炎, 出现变黑现象。弧菌属等细菌的感染, 也是引起对虾黑鳃病的主要原因之一。除此以外, 丝状细菌、藻类或污物附着; 抗坏血酸缺乏症; 某些重金属 (铜、镉、高锰酸钾); 石油或其它化学物质刺激; 以及机械损伤等都会引起对虾的黑鳃症状 [孟庆显和俞开康 1982]。

由真菌引起对虾黑鳃的组织病理变化, 国内外都有些报导 [吴友吕和陈 波 1992, 战文斌等 1993b, 桃山和夫 1987, Bian 和 Egusa 1981], 有关细菌感染引起黑鳃病组织病理变化的报导尚不多见。本文论述了应用光学显微镜和电子显微镜对由细菌感染引起的黑鳃病虾的鳃组织病理观察结果。

1 材料与方 法

1.1 光镜病理观察

1.1.1 新鲜组织压片观察

取黑鳃病病虾, 揭开头胸甲后, 用尖头镊子摘取几片鳃丝, 置于载玻片上, 加一滴生理盐水或过滤海水, 盖上载玻片后, 用显微镜观察。

收稿日期: 1996-02-01

(1) 洪 心等. 1991. 对虾镰刀菌病及病原微生物学的研究. 厦门水产科技, (2): 21~25.

1.1.2 病理组织切片的制备

取黑鳃病病虾的鳃组织,固定于戴维生氏(Davidson's)固定液中,24 小时后将组织块移入 50%酒精中保存,再按常规方法制成 5~7 微米的石蜡切片,用苏木精—伊红染色,在光学显微镜下观察和拍照。

1.2 电镜病理观察

将黑鳃病病虾鳃组织固定于 0.1 M 磷酸盐缓冲溶液配制的 2.5% 戊二醛固定液中过夜,然后经缓冲液冲洗后,在 pH 7.2 的 1% 锇酸中固定 1 小时左右,脱水后用 Epon-812 树脂包埋, LKB-V 超薄切片机切片,醋酸双氧铀—柠檬酸铅双重染色,置于日立 H-600 或 JEM-1200 透射电镜下观察与拍照。

2 结果

2.1 症状

肉眼观察鳃区呈黑色条斑状,鳃丝外观肥厚和脆弱,有糜烂现象,有的步足和游泳足基部及尾扇也呈黑色(图版 I-1)。脱壳后,黑色虽能减退,但仍存在。对虾腹部及尾部肌肉变白,不透明。病虾常浮于水面,游动缓慢,反应迟钝,有的在池边水面打转。有的匍伏于池底,厌食。病虾体表及鳃上常有污物或缘毛类纤毛虫附着,往往清晨发现池底有大批死虾,死亡率高。

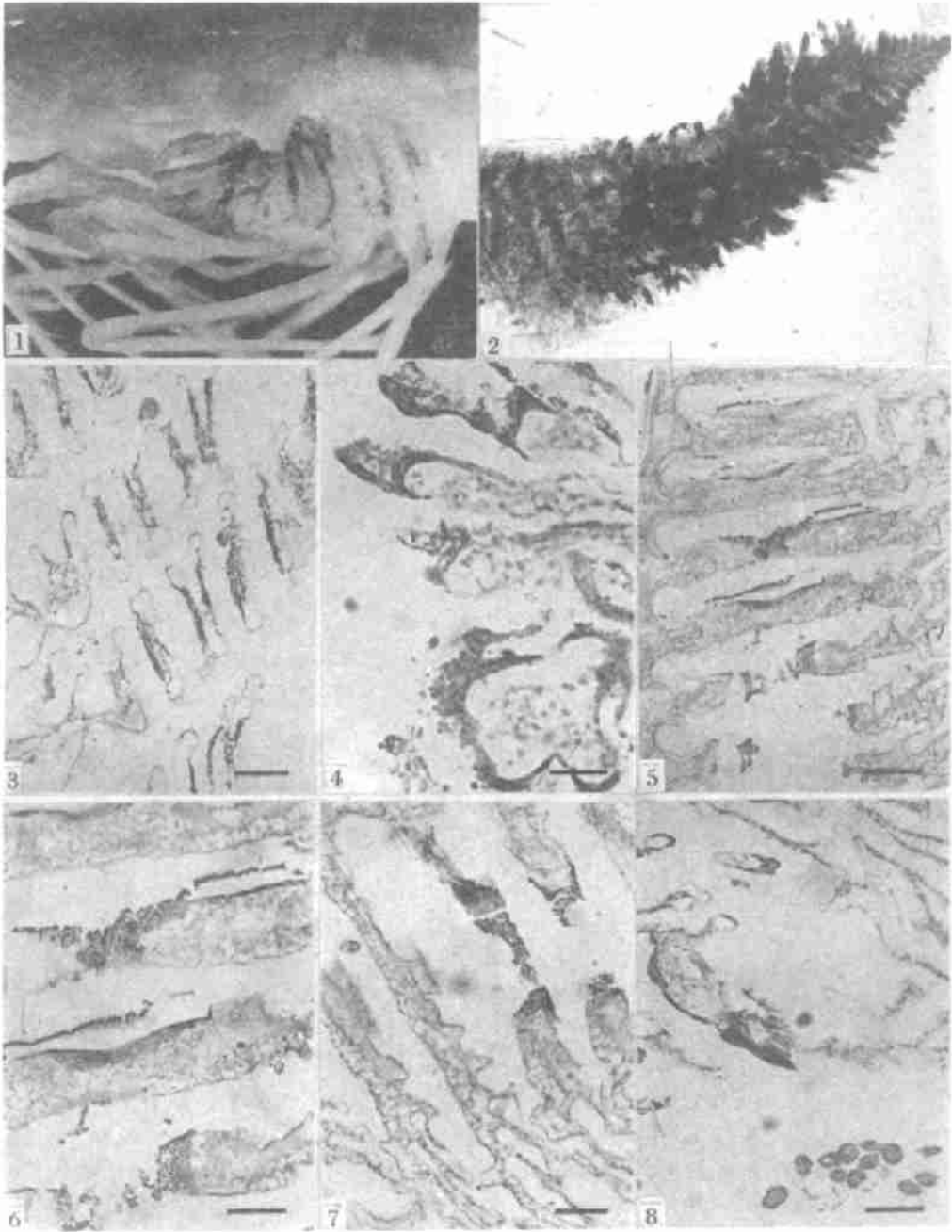
2.2 光镜病理观察

病虾鳃丝组织新鲜水浸片,在光学显微镜下观察可看到鳃丝呈棕褐色或黑色,黑变部位多发生在鳃丝末端,严重者整条鳃丝均黑变、肥厚,鳃轴处也有变黑现象(图版 I-2)。

病虾鳃组织的石蜡切片,在显微镜下观察可看到被感染的部位,出现黑色素沉积,黑色素沉积多出现在鳃丝末端,有的也出现在鳃轴表面,鳃丝被多量血淋巴细胞浸润,严重者呈弥漫性坏死(图版 I-3,4)。从切片中观察鳃组织感染后的病理变化过程大致如下:起初被感染的鳃丝组织充血,被多量血淋巴细胞浸润,组织表面开始出现凹陷及黑色素沉积,随着感染的加重,黑色素沉积区逐渐扩大,表面的凹陷也逐步加深,最终坏死断裂(图版 I-5~7)。患黑鳃病的对虾,鳃部常带有污物及缘毛类纤毛虫附着,加速了黑鳃病病情的发展(图版 I-8)。

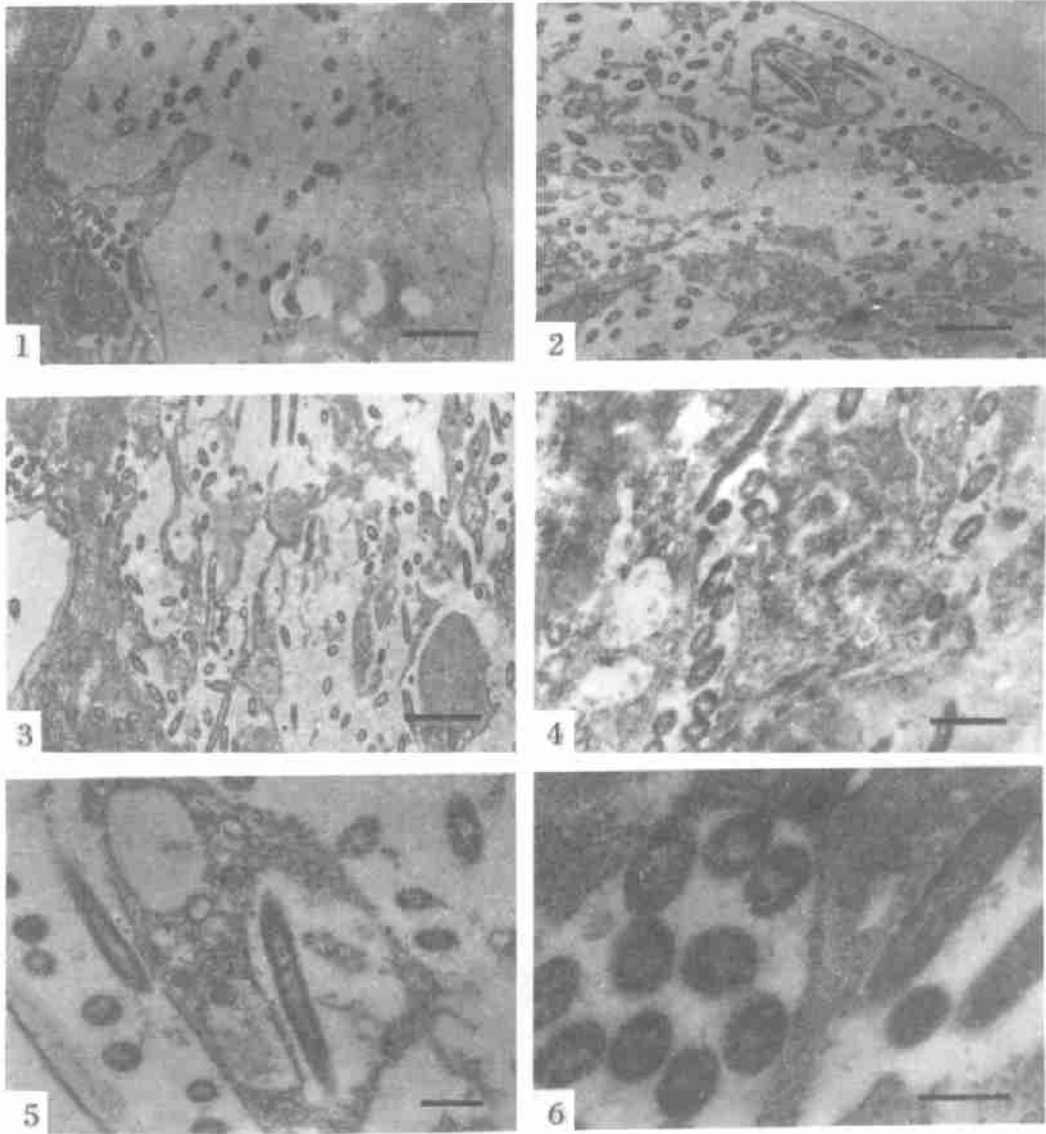
2.3 电镜病理观察

黑鳃病病虾组织超薄切片在电镜下观察,可看到鳃组织中有许多不同切面的杆状细菌,分散在鳃丝的几丁质层和表皮层中(图版 II-1~4),尤以表皮层中菌数多。表皮层中寄生细菌的周围组织被腐蚀成圆形或不规则的透明圈,细胞结构破坏殆尽。寄生的杆状细菌呈多形态,大小约为(0.2~0.4)×(1.2~1.8)微米,单个,偶尔连成双,无芽胞,病原菌高倍放大观察,中部电子密度较低,外周密度较高,但无结构明显的细胞壁存在(图版 II-5,6)。



图版 I Plate I

1:患黑鳃病的对虾,示头胸甲鳃区甲壳剥落;2:光学显微镜下观察的黑鳃,水浸片,示一叶黑鳃瓣;3:黑鳃瓣组织切片,示鳃组织变性、坏死及黑色素沉积。H.E染色,横杠=150 μ ;4:黑鳃瓣放大,示鳃组织被多量血淋巴细胞浸润及鳃丝表面的黑色素沉积。H.E染色,横杠=50 μ ;5:黑鳃组织切片,示病变过程,上部鳃丝表面出现黑色素沉积,鳃丝充血;鳃丝从上→下黑色素沉积区不断扩大,表面凹陷逐步加深,下部鳃丝严重坏死、断裂。H.E染色,横杠=200 μ ;6:图5部分放大。H.E染色,横杠=100 μ ;7:黑鳃组织切片放大图,示鳃丝坏死、断裂。H.E染色,横杠=150 μ ;8:黑鳃组织切片,示黑变、坏死及右下方的聚缩虫群落。H.E染色,横杠=200 μ 。



图版 II Plate II

1,2:黑鳃病虾鳃丝超薄切片的电镜观察,示鳃组织几丁质层中许多不同切面的寄生细菌。横杠=4 μ ; 3,4:黑鳃病虾鳃丝超薄切片的电镜观察,示鳃组织表皮层中许多不同切面的寄生细菌。3,横杠=5 μ ; 4,横杠=2 μ ; 5,6:黑鳃病虾鳃组织的超薄切片,示寄生细菌各种切面的放大,细菌周围的组织被腐蚀瓦解,呈圆形或不规则的透明圈。横杠=1 μ 。

3 讨论

鳃是对虾的呼吸器官,直接与水环境接触,因而容易受到各种病原体(包括病毒、细菌、真菌及原虫)的侵袭和各种有害因素的损伤。对虾在受到病原体的感染或有害物质的刺激时,常出现黑色素的沉积。黑色素是组织中的酪氨酸和3,4-二羟基苯丙氨酸(多巴)因酚氧化酶的作用而氧化,并合成黑色素。黑色素的形成是对虾对异物刺激所作的积极防御反应,但无论哪种原因引起的黑鳃,都会妨碍鳃的正常呼吸功能,给对虾带来危害。

细菌性黑鳃病是养殖对虾主要疾病之一,能在短时间内使大批养殖对虾死亡。国内外的

研究资料表明,弧菌是引起对虾黑鳃病的主要病原之一,Kusada和Watada[1969]报道了引起日本对虾黑鳃病的病原是一种弧菌(*Vibrio parvulus*)。上田忠男和北上一男[1975]调查了日本鹿儿岛附近养虾场的病虾,其主要症状是鳃叶变黄,鳃叶前端有黑斑出现。该病病原菌以分解几丁质能力强的溶藻弧菌和副溶血弧菌为主。Lightner和Lewis[1975]调查了美国德克萨斯州附近养虾场的病虾,在描述对虾的症状时,也提到病虾外壳有黑色溃疡,鳃上有黑斑,头胸甲的腹侧面也有黑斑,最常分离到的病原菌主要有溶藻弧菌、鳃弧菌和副溶血弧菌。杨季芳等[1992]报道了引起对虾黑鳃、褐斑综合症的两种弧菌。我们从黑鳃病病虾鳃和血淋巴液中分离到具有分解几丁质能力的细菌主要是弧菌属细菌,包括养殖对虾常见条件致病菌——溶藻弧菌和副溶血弧菌,其次是气单胞菌属,此外,还有微球菌属,这些都是养殖环境中的常见菌。但将菌液加入到饲养水中的感染方法,未获得黑鳃、褐斑的满意结果。几丁质分解细菌使对虾甲壳产生溃疡,还需有机械损伤、原虫寄生或在其它能产生脂肪酶、蛋白酶的细菌作用下,使对虾表皮层产生初始损伤后,才能实现。

病虾鳃超薄切片的电镜观察表明,在鳃组织的甲壳层和表皮层中有许多不同切面的杆状细菌,菌体周围的组织被破坏殆尽,细胞结构完全瓦解,寄主组织被腐蚀成许多圆形或不规则的空斑。石蜡组织切片在光学显微镜下检查,病虾鳃丝充血,为多量血淋巴细胞浸润,鳃组织严重坏死、断裂。感染部分有黑色素沉积,使鳃丝呈黑色条斑状。黑色素沉积大多发生在鳃丝三级分支的末端,感染严重者的鳃丝的大部分及鳃轴也发生黑变。由于鳃组织坏死,对虾的呼吸系统受到严重破坏,因而可能会导致窒息死亡。

本文是“八·五”国家科技资助项目部分内容,编号:85-15-03-03。

参 考 文 献

- 吴友吕,陈波.1992.中国对虾镰刀菌病的细胞病理研究.东海海洋,10(4):21~26.
- 陈波等.1992.中国对虾养成期间镰刀菌致病性研究.东海海洋,10(4):7~15.
- 孟庆显.1991.对虾疾病防治手册.青岛海洋大学出版社.114~116,160.
- 孟庆显,俞开康.1982.关于对虾的“黑鳃病”.山东海洋学院学报,12(4):95~100.
- 杨季芳等.1992.中国对虾养成期细菌性黑鳃、褐斑综合症的病原生物学研究.东海海洋,10(4):27~36.
- 战文斌等.1993a.中国对虾镰刀菌病原体的研究.青岛海洋大学学报,23(2):91~99.
- 战文斌等.1993b.中国对虾镰刀菌病的症状和病理组织学研究.青岛海洋大学学报,23(3):125~130.
- 薛清刚,王文兴.1992.对虾疾病的病理与诊断.青岛海洋大学出版社.125~128.
- 上田忠男,北上一男.1975.养殖クルマエビのから分离された病原菌について.鹿儿岛水试报告,24~30.
- 石川雄介.1968.养殖クルマエビのカビ感染に因る鳃の黒変について.鱼病研究,3(1):34~38.
- 桃山和夫.1987.フサリワム 症罹病クルマエビ体内におけるフサリワム菌の分布.鱼病研究,22(1):15~23.
- Bian B E, Egusa S. 1981. Histopathology of black gill disease caused by *Fusarium solani* (Martius) infection in the Kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate. Journal of Fish Diseases, 4(3):195~201.
- Couch J A. 1978. Diseases, parasites, and toxic responses of commercial penaeid shrimps of the Gulf of Mexico and South Atlantic coasts of North American. Fish Bull, 76(1):1~44.
- Kusada R, Watada A. 1969. A new pathogenic bacterium, belong to the genus *Vibrio*, isolated from diseased spiny lobster and prawn. Res Repts Kochi Unvi, 18(8):77~79.
- Lightner D V. 1983. Black gill syndrome of penaeid shrimp. In: Sindermann C J. ed. Diseases diagnosis and control in North American. Marine Aquaculture. Amsterdam, Oxford, New York: Elsevier Scientific Publ. Co. 86~88.

Lightner D V, Lewis D H. 1975. A septicemic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp. *Marine Fisheries Review*, 37(1): 25 ~ 28.

HISTOPATHOLOGICAL OBSERVATION OF BLACK GILL DISEASE IN *PENAEUS CHINENSIS*

ZHOU Kai, ZHENG Guo-Xing, CAO Zhi

(East China Sea Fisheries Research Institute, CAFS, Shanghai 200090)

ABSTRACT This paper reports symptoms and histopathological changes of black gill disease in *Penaeus chinensis* infected with bacteria. The diseased shrimp appeared black streaky gills, anorexia, lethargy and a high mortality. From light microscopic observation, gill filaments showed serious necrosis, broking, hyperaemia and infiltration of many hemolymphatic cells. Melanins were mostly observed in the tip of gill filaments. Electron microscopic examination revealed that numerous bacteria of different sections were presented in cuticular and epithelial layers of the gills. The pathogen was rod-shaped, non-gemma, pleomorphic forms, 0.2 ~ 0.4 μ wide and 1.2 ~ 1.8 μ long, single or occasionally united into pairs. The structures of cells were completely disintegrated around the bacteria, and infected tissue was heavily necrosed and formed a lot of round or irregular vacuous spots.

KEYWORDS *Penaeus chinensis*, Black gill disease, Bacteria, Histopathology

欢迎订阅《渔业致富指南》杂志

《渔业致富指南》杂志是由原《渔业科技报》改办的一本综合性水产科普杂志。主要辟有实用技术、名特水产、病害防治、致富集锦、专题讲座、经营管理、企业论谈、渔市动态等栏目。

《渔业致富指南》杂志办刊宗旨：以崭新的面貌，穿梭于渔业经济领域；以权威的信息，供养殖经营决策参考；以最快的速度，传递渔业养殖新技术；以奉献的精神，为渔业经济建设服务。

本刊国内公开发行，32开本，48页，每月10日、25日出版。每期定价1.5元，全年36元。请读者直接汇款本刊编辑部订阅，亦可在当地邮局订阅。

《渔业致富指南》杂志是目前国内水产行业出版周期最短、传递信息最快的综合性期刊，封面及插图均采用进口铜版纸彩印，内页用60克书写纸激光照排胶印，版面清新美观，欢迎全国水产企事业单位前来预约刊登1998年广告。

地址：武汉市武昌东湖路96号（湖北省水产科学研究所内）

电话：(027)7311934 邮编：430071

广告发行联系人：黄凯勤