

罗氏沼虾亲虾暴发性疾病病原的研究及防治

孙玉华 孙其焕

(上海水产大学渔业学院, 200090)

摘 要 通过对上海一家水产养殖公司在 1991~1992 年度发生的暴发性疾病的现场检测和病原分离, 获得了 S-1、S-2 菌株。经人工感染试验对健康亲虾具很强的致病力, 出现与自然病虾相同的症状并在人工感染病虾上分离出同样性状的菌株。证实了这二菌株是该病的致病菌。通过菌体形态、培养特性和生理生化反应, 鉴定为莫格球拟酵母。通过药物筛选, 配制出沼虾-I 和沼虾-II 药饵, 对预防及早期治疗效果良好。

关键词 罗氏沼虾, 亲虾, 暴发性疾病, 莫格球拟酵母

罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 生长快, 肉味美, 生长周期短, 且饲料成本低, 是理想的养殖品种, 在上海市郊及江、浙等地广为养殖。但前几年越冬亲虾成活率偏低, 特别在 1991~1992 年度, 上海东海水产养殖公司发生了一种传染性强、死亡率极高的暴发性疾病, 来势凶猛, 致使亲虾死亡惨重, 严重影响该年度的苗种生产。

国内外对该虾疾病的研究虽已有报导[王洪起 1985] (何筱洁 1989), 而对越冬亲虾疾病未见有关报导[卞伯仲 1987] (中国科学院海洋研究所科技情报室 1992)。我们在 1991~1992 年度 12~2 月深入现场, 对一定批量的病虾进行全面检查, 在病虾的心脏血淋巴液和肝胰腺中分离到毒力强的病原微生物纯培养物, 经鉴定为莫格球拟酵母 (*Torulopsis mogii*)。

1 材料和方法

1.1 病虾来源和现场检测

病虾来自上海东海水产养殖公司罗氏沼虾育苗场。在垂死病虾中取 18 尾, 以无菌方式吸取心脏血淋巴液, 取 3 尾病虾的肝胰腺或鳃丝, 以细菌学方法进行涂片、简单染色后镜检。

1.2 菌株的分离和鉴定

取 5 尾病虾, 以灭菌注射器进行心脏穿刺, 抽取心脏血淋巴液一小滴, 注射到 PDA 培养基 [Lodder 1970] 平板边缘, 迅速做划线分离, 同时以无菌操作摘取 2 尾病虾的少量肝胰腺, 同样置于 PDA 培养基平板边缘, 先用接种环将其捣碎, 而后迅速进行平板划线分离。以上分离的平板在温室放置一小时, 然后倒置于 28℃ 恒温培养 2 天选取单菌落移接于斜面, 再次划线分离, 获纯种后斜面保存待用。菌种鉴定主要参照 Lodder [1970] 的方法。

收稿日期: 1997-01-29

(1) 何筱洁. 1989. 罗氏沼虾病的研究. 水产科技, (4): 30~33.

(2) 中国科学院海洋研究所科技情报室. 1992. 虾病防治专辑. 青岛: 对虾养殖专题文献 II、III.

1.3 人工感染试验

以培养 48 小时的 PDA 斜面培养物, 用灭菌生理盐水洗下, 制成菌体悬浊液, 经平板菌落计数法测定菌数。对健康亲虾腹部第四或第五腹节的肌肉内注射进行人工感染。

1.4 外用消毒剂及内服药物的筛选

漂白粉(有效氯 30%)、高锰酸钾、孔雀绿、亚甲基兰、新洁尔灭、氯化钠等的抑菌效果检测参照周德庆 [1986], 内服药大蒜素的最低抑菌浓度(MIC)检测参照余 贺 [1964]。

2 结果

2.1 现场检测结果

病虾体表症状不明显, 仅体色较深, 不透明, 部分病虾步足变红。肝胰腺肿大, 发白以至糜烂。从心脏抽出的血淋巴液在载玻片上长期不能凝固。体表未发现寄生虫和丝状真菌。取 18 尾垂死病虾血淋巴液的染色片镜检, 在 17 尾中均检出满视野单一形态微生物。在 2 尾病虾的肝胰腺涂片及 1 尾病虾的鳃丝涂片中也观察到同一类微生物。该微生物较细菌大, 大小为 $(2.5 \sim 5.0) \times (3.75 \sim 6.25) \mu\text{m}$, 大多呈卵圆形, 菌体表面有荚膜, 有的菌体明显可见到芽殖(图版-1~2)。



图版 Plate

1. 具有荚膜的病原体细胞, $\times 1000$; 2. 病原体的芽殖细胞, $\times 1000$

2.2 菌株致病性

以 5 尾垂死病虾血淋巴液及 2 尾病虾的肝胰腺, 在 PDA 平板上划线分离, 48 小时后均出现很多形态一致的菌落(图 1), 挑取单菌落, 分别编号为 S-1(来源于心脏血淋巴液)及 S-2(来源于肝胰腺)菌株。用 S-1 及 S-2 菌株分别注射感染健康亲虾, 在 7~36 小时全部发病且先后死亡, 症状与自然病虾相似。同时再从人工感染病虾的血淋巴液涂片、染色镜检, 视野中一样存在满视野的该种病原微生物(表 1)。从 S-1 菌株人工感染病虾的血淋巴液及肝胰腺中再分离得到 S-3(来源于心脏血淋巴液)及 S-4(来源于肝胰腺)菌株, 它们的菌落及菌体形态和 S-1 及 S-2 菌株相同。

2.3 形态、生理生化特性

S-1、S-2 及 S-3、S-4 菌株的形态、培养特性及生理生化反应完全一致。

2.3.1 形态特征

细胞形态及大小：在 25~28℃的麦芽汁中培养 3 天，细胞球型至卵圆形，大小为(2.5~5.0)×(3.75~6.25)μm。

无性繁殖方式：多边芽殖。

假菌丝和真菌丝：在加盖片的马铃薯葡萄糖琼脂上，均不形成假菌丝和真菌丝。

子囊孢子的形成：在醋酸钠斜面上，培养 14 天，不形成子囊孢子。

蹼膜等的形成：在麦芽汁液体中培养 3 天，液面有很薄的菌膜，菌液混浊，底部有沉淀。

巨大菌落特征：在麦芽汁琼脂培养 3 天，菌落直径达 0.8 厘米，乳白色，表面光滑，隆起，具有少量放射状勾纹。

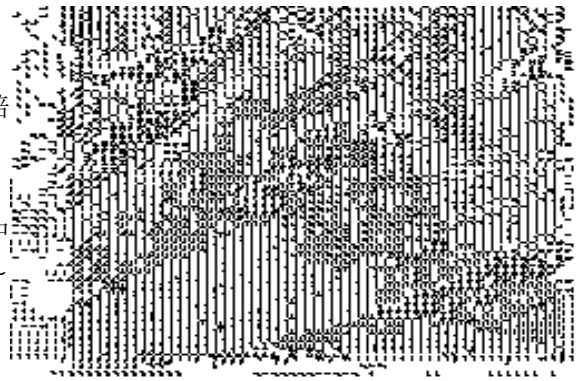


图 1 直接取病虾血淋巴液在 PDA 平板上划线分离单落

Fig. 1 The isolation of mono colony on PDA plate directly from haemolymph of sick prawn

表 1 S-1、S-2 菌株人工感染试验结果

Tab. 1 The result of the infection experiments injecting S-1, S-2 strains

人工感染日期	菌株	注射剂量 (mL/尾)	试验虾	死亡虾	菌液浓度 (平板菌落计数法)	水温 (°C)	死亡时间 (小时)	备注	
1992-02-16	S-1	0.1	1	1	3.1×10 ⁸ /mL	25	9	气温低，虾运输困难，实验室难获得活虾	
		0.05	1	1			12		
		0.03	1	1			32		
1992-11-06	S-1	0.5	5	5	3.1×10 ⁴ /mL 生理盐水	21~23	7	在生产现场进行，无恒温控制，人工控温，故温度偏低、温差大	
		0.3	5	5			10		
		0.1	5	5			18		
		对照	5	0			0.5mL/尾		健康
		0.1	3	3			2.8×10 ⁸ /mL		12~20
1993-05-23	S-2	0.05	3	3	生理盐水	25	20~36	在相同水温下，考察 S-2 株致病力	
		对照	2	0			0.1mL/尾		健康

2.3.2 生理生化特征

糖发酵及碳源的同化见表 2、表 3。

氮源的利用：不利用硝酸钾，利用硫酸铵。

其它特征：熊果苷分解，无维生素培养基中生长，37℃不生长，在 50%和 60%葡萄糖-酵母膏琼脂中不生长。

表 2 S-1、S-2 及 S-3、S-4 菌株对糖的发酵

Tab. 2 Carbohydrate fermentation tests of S-1, S-2 and S-3, S-4 strains

糖类	反应	糖类	反应	糖类	反应	糖类	反应	糖类	反应	糖类	反应
葡萄糖	+(慢)	蔗糖	-	乳糖	-	棉子糖	-	麦芽糖	-	蜜二糖	-
半乳糖	-	海藻糖	-	淀粉	-	菊糖	-	松三糖	-	纤维二糖	-

表 3 S-1、S-2 及 S-3、S-4 菌株对碳源的同化试验

Tab. 3 Carbohydrate assimilation tests of S-1, S-2 and S-3, S-4 strains

碳源	反应	碳源	反应	碳源	反应	碳源	反应	碳源	反应	碳源	反应
棉子糖	-	肌醇	-	乳糖	-	菊糖	-	纤维二糖	-	木糖	-
果糖	+	鼠李糖	-	麦芽糖	+	蔗糖	+	蜜二糖	-	山梨醇	+
葡萄糖	+	淀粉	-	卫矛醇	-	甘油	+	琥珀酸	+	柠檬酸	-
乙醇	+	山梨糖	+	D-阿拉伯糖	-	L-阿拉伯糖	-	DL-乳糖	-	赤鲜醇	-
松仁糖	+	海藻糖	+	甘露醇	+	半乳糖	+	核糖	-	水杨苷	+

2.4 外用消毒剂及内服药物

测试的 6 种药品中, 新洁尔灭 ($50 \sim 100$) $\times 10^{-6}$ 抑菌效果显著。孔雀绿 ($0.4 \sim 0.5$) $\times 10^{-6}$ 也有一定的抑菌效果。但由于孔雀绿对人(动物)有较强毒性, 所以选择新洁尔灭 100×10^{-6} 作为外用消毒剂, 进行育苗池等消毒用, 效果良好。

内服药大蒜素的最低抑菌浓度为 19×10^{-6} , 辅以在水产动物病害防治中的一种广谱抗菌药物, 再添加促进生长、有利蜕壳的活性物质, 以不同的配比, 研制出沼虾-I 和沼虾-II 药饵, 连续两年生产中, 在加强各项管理工作的基础上, 应用该药饵, 对预防该病及控制其它病害的发生起了积极作用。

3 小结

在该育苗场 1991 ~ 1992 年度 12 月 ~ 2 月发生亲虾暴发性传染病期间, 在各发病池随机抽取 18 尾垂死病虾进行检测, 结果在 17 尾病虾的血淋巴中都发现数量较多且形态一致的病原微生物, 同时在被抽查的 2 尾病虾肝胰腺及 1 尾病虾的鳃丝中, 也呈现相似情况。在病虾的组织病理切片中[蔡完其 1996], 也发现在主要脏器中均有较多的该病原微生物存在。取垂死病虾心血淋巴液和肝胰腺, 在 PDA 培养基平板上通过划线分离, 48 小时后出现很多单一形态的菌落。分离菌株 S-1 及 S-2 毒力感染试验, 均能使健康亲虾诱发出和自然发病虾的相同症状, 并在 36 小时内全部死亡。再从人工感染病虾中分离出 S-3 及 S-4 菌株, 其形态、生理生化特性和 S-1 及 S-2 相同。故此, 证实 S-1 及 S-2 菌株是该暴发性传染病的病原。参照 Lodder[1970] 的方法进行鉴定, 定名为莫格球拟酵母 (*T. mogii*)。

很多酵母菌对人类有利。但也有些对人、畜有致病性, 如白色假丝酵母 (*Candida albicans*) 和新隐球酵母 (*Cryptococcus neoformans*) 等[余 1983]。据报导, 球拟酵母属 (*Torulopsis*) 中有 2 个种, 常出现在人体或家畜排泄物中, 有时也存在于某些病例中, 可能也有致病性[张纪忠 1990]。但对虾类的致病性目前, 在国内、外文献中还未见报导, 我们分离到的菌株在 37°C 下不生长; 在 50% 和 60% 的葡萄糖-酵母膏琼脂中不生长, 这二个特性与 Lodder[1970] 对该种的描述不一致, 可能是该菌寄生在虾体内及培育池的温度和低渗环境适应的结果。

该菌株在病虾心血淋巴液及脏器中寄生时, 出现明显的较厚荚膜层; 新从病虾中分离的纯培养结果也同样。但我们发现在实验室多次传代及陈旧培养物中, 荚膜层变薄, 甚至有的荚膜消失。在确定病原的情况下, 通过药物筛选, 配制了沼虾-I 和沼虾-II 药饵, 在第二年及第三年的预防和早期治疗中起到了良好的效果。

本试验的菌种鉴定得到复旦大学生命科学院黄静娟副教授的指导和帮助, 特此致谢。

参 考 文 献

- 王洪起. 1985. 罗氏沼虾一些常见病及其防治. 国外水产, (1): 36~37.
- 卞伯仲. 1987. 虾类的疾病与防治. 北京: 海洋出版社. 1~30.
- 张纪忠主编. 1990. 微生物分类学. 上海: 复旦大学出版社. 397~401.
- 余 贇主编. 1983. 医学微生物学. 北京: 人民卫生出版社. 444~449.
- 余 贇主编. 1964. 微生物学实验指导. 北京: 人民卫生出版社. 150~163.
- 周德庆主编. 1986. 微生物实验手册. 上海科技出版社. 283~290.
- 蔡完其. 1996. 罗氏沼虾莫格球拟酵母病的病理研究. 水产学报, 20(1): 13~17.
- Lodder J. 1970. The yeasts, A Taxonomic study, North Holland Publishing CO., Amsterdam, 470~527.

STUDIES ON PATHOGENIC ORGANISM AND PREVENTION AND CURE FOR EXPLOSIVE EPIDEMIC DISEASE OF PARENT PRAWN OF *MACROBRACHIUM ROSENBERGII*

SUN Yu-Hua, SUN Qi-Huan

(Fisheries College, Shanghai Fisheries University, 200090)

ABSTRACT While culturing of parent prawn, an explosive epidemic disease happened during 1991—1992 in a cultivating fishery company in Shanghai. The mortality was very high. 18 prawns of random sampling were surveyed *in situ*. The uniform microorganism was found under microscope in 17 prawns. S-1, S-2 strains were obtained from haemolymph and liver of sick prawn on plate PDA. During the infection experiment, the symptom was as same as that of the sick one. S-3, S-4 strains were isolated from the infectious prawn. All the characteristics of S-3, S-4 were similar to S-1, S-2. S-1, S-2 were proved to be the pathogenic organism, and identified to be *Torulopsis mogii*. The kinds of effective medicine food (Prawn-I, Prawn-II) were developed for prevention and cure of the disease.

KEYWORDS *Macrobrachium rosenbergii*, Parent prawn, Explosive epidemic disease, *Torulopsis mogii*