

罗氏沼虾肌肉白浊病病原的初步研究

钱 冬 杨国梁 刘 问 王军毅 曹 铮

(浙江省淡水水产研究所, 湖州市 313001)

摘要: 收集罗氏沼虾肌肉白浊病典型病虾苗, 进行细菌分离、除菌组织悬液制备及人工感染试验、超薄切片、病毒粗提取, 结果表明: 从白浊病病虾的肌肉、肝胰腺中分离到的细菌以 5×10^8 CFU/mL 浓度浸泡感染正常沼虾苗不能复制疾病; 病虾除菌组织过滤液以 1: 50、1: 250 浓度浸泡感染正常虾苗, 7d 后可发病, 并出现典型的肌肉白浊病症状, 氯仿处理不能破坏病毒的感染力; 病虾超薄切片电镜观察发现肌肉间隙组织中存在 21—23nm 大小的球状病毒, 病虾组织浆经氯仿处理、PEG 沉淀、磷酸钨负染后可见大量 22—24nm 大小的球状病毒颗粒。上述结果表明罗氏沼虾肌肉白浊病是一种由病毒引起的疾病。

关键词: 罗氏沼虾; 虾苗; 肌肉白浊病; 病原

中图分类号: S945.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2002)05-0472-05

罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*) 又名马来西亚大虾, 具有生长快、食性广、肉质营养好、养殖周期短等优点, 经济价值高, 是我国淡水甲壳类的主要养殖品种。近年来, 罗氏沼虾虾苗发生了一种新的疾病, 目前暂称为罗氏沼虾肌肉白浊病或罗氏沼虾白体病, 主要危害罗氏沼虾淡化苗, 病虾表现为肌肉出现白斑、白浊或全身发白, 病虾可在几天内死亡^[1]。该病于 20 世纪 90 年代后期开始零星发生, 2000 年起浙江、江苏、上海、广东、广西等地出现较大规模的流行。由于该病发病急、死亡率高, 给许多养殖场及育苗场造成了巨大的损失, 已成为罗氏沼虾养殖的极大威胁。本研究通过罗氏沼虾典型病虾苗的收集、病原体分离、人工感染试验及电镜观察, 表明该病是由病毒引起。

1 材料与方法

1.1 材料来源 患肌肉白浊病罗氏沼虾苗采自浙江湖州某苗场发病池, 典型症状比例约为 30%—40%, 挑选出典型病虾用 50% 甘油磷酸缓冲液保存于 -40℃ 冰箱中备用。攻毒试验用正常罗氏沼为本所苗种场淡化苗, 规格 0.8—1 cm, 26—28℃ 水温育苗池暂养一周无发病后备用。

1.2 细菌的分离 挑选出典型病虾, 用 75% 酒精表面消毒后用无菌解剖刀切开头胸部和腹部肌肉, 用接种针挑取部分组织于 TSA、Mitis-Salivarius 平板^[2] 上划线, 30℃ 培养

收稿日期: 2001-10-30; 修订日期: 2001-11-27

作者简介: 钱 冬 (1963—), 男, 浙江省嵊州市人; 主要从事水产动物病害与免疫研究。感谢本室沈锦玉、沈智华、吴颖蕾等同志, 浙江大学电镜室徐颖、洪健老师及浙江淡水所种苗基地张宇飞、杨 浩、杨华斌、伍俊、李章来、丁新民等同志在实验中所给予的帮助

24—48h, 挑取各类细菌, 进一步纯化后用 *Mitis-Salivarius* 培养液 30℃ 振荡培养 24h, 用麦氏比色管测定细菌浓度后用 0.1mol/L pH7.2 PBS 稀释, 用于感染试验。

1.3 病毒悬液的制备 取典型症状的患病罗氏沼虾苗, 0.1mol/L pH7.2 PBS 漂洗后再加入 PBS, 用玻璃匀浆器充分匀浆, 4℃ 8 000r/min 离心 15min, 取上清稀释至 1:10, 0.1% 双抗 4℃ 处理过夜, 0.45 μ m、0.2 μ m 滤膜过滤后为感染用病毒悬液, 另取病毒悬液加入氯仿达 1:10 浓度, 剧烈振荡后离心除去脂及杂蛋白后用于感染试验; 病毒悬液灭活对照为病毒悬液经 65℃ 水浴灭活 2h。

1.4 感染试验 在本所沼虾育苗场内进行。取淡化后养殖一周以上的健康罗氏沼虾苗约 50 尾, 置于 40mL 的育苗用水中, 加入细菌悬液或病毒悬液, 细菌感染浓度为 5×10^8 CFU/mL, 病毒感染浓度为 1:50、1:250, 设 PBS 对照、培养液对照及病毒悬液灭活对照。浸泡感染 10—15min 将虾苗及感染液均倒入实验池中, 每日投喂两次并观察发病情况。试验水体为 5L, 试验期间水温控制在 26—30℃。

1.5 病虾的超薄切片与观察 取典型症状的患病罗氏沼虾苗, 用 2.5% 戊二醛分别固定头胸部及腹部肌肉, 用 0.1mol/L pH7.0 磷酸缓冲液漂洗后, 依次用 2% 锇酸固定、乙醇系列脱水、*Spurr* 包埋、切片, 用醋酸铀柠檬酸铅双染色, JEM-1200EX 电镜观察。

1.6 病毒的分离和电镜观察 患典型肌肉白浊病罗氏沼虾苗, 按方法 1.3 制备病毒悬液, 加入氯仿达 1:10 浓度, 剧烈振荡后离心除去脂及杂蛋白, 上清置于冰浴中并搅拌, 逐渐加入固体 NaCl 及 PEG6000, 最终浓度分别为 0.5mol/L 和 10%, 4℃ 静置过夜, 8000r/min 30min 离心, 取沉淀, 加入 PBS 用力吹打重新溶解, 离心去沉淀, 重复上述过程一次, 将病毒沉淀物用少量 PBS 重新溶解, 滴铜网, 用 2% 磷钨酸负染, JEM-1200EX 电镜观察。

2 结果

2.1 细菌的分离及人工感染

从典型症状的罗氏沼虾及正常虾肝胰腺及腹部肌肉取样于 TSA 及 *Mitis-Salivarius* 分离培养, 两者均有细菌生长, 以病虾样品生长细菌略多, 用 *Mitis-Salivarius* 培养基培养时, 病虾分离样出现了蓝黑色小菌落。根据菌落特征挑取 6 个不同的菌落, 进一步纯化培养后用于感染试验。感染试验结果见表 1。6 个分离细菌以 5×10^8 CFU/mL 浸泡感染正常罗氏沼虾后, 数天内出现少量实验虾死亡, 4d 后, 不再出现死亡。对照组成活率为 78%, 试验组则为 61.22%—93.75% 不等, 以 5[#] 菌成活率最高, 为 93.75%。饲养两周后, 所有成活虾均没有出现肌肉白浊病症状, 表明所分离细菌不是引起沼虾肌肉白浊病的病原。

2.2 病毒悬液的人工感染

取典型症状病虾制备的病毒悬液以 1:50、1:250 浓度浸泡感染正常罗氏沼虾, 饲养于 28℃, 实验初期出现少量不正常死亡, 试验第 7d 起病毒感染组个别虾开始出现肌肉白浊病症状, 以 12d 左右白浊病比例最高, 以后随着病虾的死亡, 比例开始下降, 至 16d 统计成活虾数量, 各组成活率见表 2。由表 2 可见, 以 1:50、1:250 病毒悬液浸泡感染正常罗氏沼虾苗均出现了典型的肌肉白浊病症状, 成活率分别为 40% 和 47.92%, 热灭活病毒悬液和 PBS 对照成活率分别为 90.48% 和 75.51%; 以 10% 氯仿处理病毒悬液, 离心去除氯仿后感染罗氏沼虾, 也出现了典型的症状, 且死亡率要高于不用氯仿组, 成活率为 34.69%。

本试验表明,病毒是引起罗氏沼虾肌肉白浊病的主要原因,且该病毒不具有囊膜结构。

表 1 罗氏沼虾苗细菌感染试验
Tab. 1 The challenge tests of *M. rosenbergii* post larvae with bacterial isolates

菌 株	死亡数 Mortality number								存活数	存活率%
	试验尾数 Numbers of prawn	2d	4d	6d	8d	10d	12d	14d	Accumulate survive number	Survive rates %
1 [#]	49	6	6	0	0	0	0	0	30	61.22
2 [#]	50	7	0	0	0	0	0	0	36	72.00
3 [#]	49	2	0	0	0	0	0	0	40	81.63
4 [#]	49	0	1	0	0	0	0	0	41	83.67
5 [#]	48	1	0	0	0	0	0	0	45	93.75
6 [#]	50	1	0	0	0	0	0	0	41	82.00
对照* Control	50	3	1	0	0	0	0	0	39	78.00

注: 对照为 1: 5 稀释营养肉汤; Nutrient broth 1: 5 diluted used as control

表 2 罗氏沼虾苗病毒感染试验
Tab. 2 The challenge tests of *M. rosenbergii* post larvae with virus

病毒浓度及处理 Virus concentration and treatment	试验尾数 Numbers of prawn	试验天数 Days of test								存活数 Accumulate survive number	存活率% Survive rates%
		2d	4d	6d	8d	10d	12d	14d	16d		
1: 50	45	1	0	0	1	2	6	6	4	18	40.00
1: 250	48	1	1	0	1	2	5	5	2	23	47.92
1: 50	49	1	1	0	1	5	12	6	2	17	34.69
10% CHCl ₃ treated 热灭活病毒	42	1	2	0	1	0	0	0	1	38	90.48
heat inactivated viurs	49	2	1	0	0	0	0	1	0	37	75.51
对照 control	49	2	1	0	0	0	0	1	0	37	75.51

2.3 病毒的超薄切片观察

典型症状罗氏沼虾苗, 分别取头胸部及腹部肌肉, 制备超薄切片, 用 JEM- 1200EX 电镜观察。从腹部肌肉组织中发现存在大量的球状病毒(图 1)。病毒颗粒大小为 22 ± 1. 5nm, 主要分布于肌肉组织间隙中, 细胞核中没有发现病毒颗粒。

2.4 病毒的分离和电镜观察

患典型肌肉白浊病罗氏沼虾幼体, 制备病毒悬液, 经氯仿去脂及杂蛋白、PEG 选择性沉淀病毒后、磷钨酸染色、JEM- 1200EX 电镜观察, 结果见图 2。由图 2 可见, 经 PEG 沉淀后的悬液中有大量的病毒颗粒及少量病毒空壳, 表现为均一的球状。随机测量 10 个病毒粒子, 得出病毒粒子平均大小为 23 ± 1. 0nm。

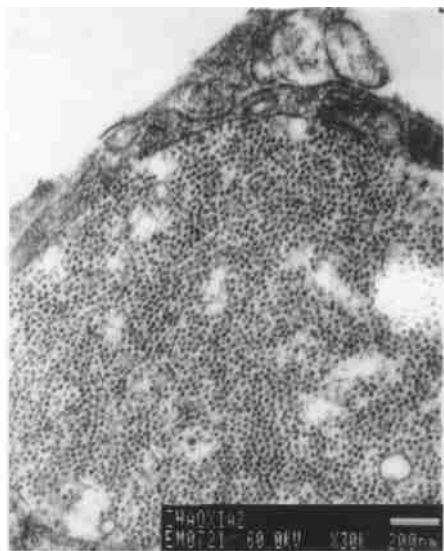


图 1 罗氏沼虾肌肉组织间隙中的病毒颗粒
($\times 30\,000$)

Fig. 1 The virion in the abdomen muscle connection
of *M. rosenbergii*

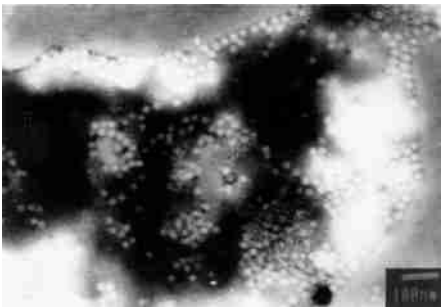


图 2 PEG 沉淀的罗氏沼虾肌肉白浊病负染
病毒颗粒 ($\times 50\,000$)

Fig. 2 The virion of *M. rosenbergii* whitish muscle
disease by negative staining

3 讨论

罗氏沼虾肌肉白浊病又称罗氏沼虾白体病、白尾病等, 是近年来严重危害罗氏沼虾虾苗的疾病, 该病早期肌肉出现不透明或白斑、白浊、全身发白, 主要发生于幼体变态为仔虾后, 病虾可在几天内迅速死亡, 严重时可使育苗场虾苗全部死亡。作者通过对典型病虾的细菌分离、除菌过滤液的制备及对正常罗氏沼虾苗的人工感染试验, 发现病虾的除菌过滤液可复制出典型的肌肉白浊病症状, 从病虾分离的细菌不能使正常虾苗发病, 表明该病是由病毒引起。通过超薄切片、病毒的 PEG 沉淀、电镜观察, 发现了病毒粒子为 22—24nm 的无囊膜球状病毒颗粒, 这为该病的进一步研究奠定了基础。

罗氏沼虾由于个体大、生长迅速、肉质鲜美而在东南亚及世界各地广泛养殖, 而育苗阶段的类似疾病在以往也有过报道。Nash 等^[3]报道了泰国罗氏沼虾幼体孵化 28d 的虾苗出现肌肉坏死症, 其症状与国内的白浊病相似, 作者进行了病虾的组织病理学研究, 但没有涉及病原方面研究而认为是由水质不良及养殖密度过高而诱发; 台湾学者 Cheng Wirtton^[4,5]报道了罗氏沼虾肌肉坏死症的病原研究, 从中分离到了肠球菌, 注射感染可使健康虾出现肌肉白斑、不透明等症状, 分离菌的致死剂量为 3×10^5 , 作者认为高 pH、高温可增强细菌的致病力, 加重疾病; 法国学者 Arcier 等^[6]从法属西印度群岛发生的罗氏沼虾苗白肌肉病, 作者通过超薄切片、病毒提取、电镜观察发现了 25nm 左右大小的病毒颗粒, 其形态与笔者的研究相似, Arcier 等通过病毒粒子、包涵体存在于细胞质认为是一种 RNA 病毒, 但没有进行人工感染, 此外还有 Anderson 等、Tung CW 等分别从罗氏沼虾中发现类细小病毒、罗氏沼虾肌肉病毒等报道。作者通过肠球菌选择性培养基 Mitis Salivarius 分离了细菌, 但不能使健康罗氏沼虾发病, 而除菌病毒悬液能使健康虾发病, 表明我国的罗氏沼

虾肌肉白浊病是由病毒引起的。病毒形态与 Arcier 的报道相似,而颗粒略小于其的报道。目前有关病毒的进一步提取及鉴定正在进行中。

参考文献:

- [1] 夏冬. 罗氏沼虾育苗期白尾病(白浊病)的防治方法[J]. 科学养鱼, 2001, (4): 48
- [2] 陈天寿. 微生物培养基的制造与应用[M]. 北京: 中国农业出版社出版, 1995, 312—313
- [3] Nash G, Chinabut S, Limsuwan C. Idiopathic muscle necrosis in the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, cultured in Thailand[J]. *J. Fish Dis.*, 1987, **10**: 109—120
- [4] Cheng W, Chen JC. Isolation and characterization of an *Enterococcus* like bacterium causing muscle necrosis and mortality in *Macrobrachium rosenbergii* in Taiwan[J]. *Dis. Aquat. Org.* 1998, **34**(8): 93—101
- [5] Cheng W, Chen JC. *Enterococcus*-like infection in *Macrobrachium rosenbergii* are exacerbated by high pH and temperature but reduced by low salinity[J]. *Dis. Aquat. Org.* 1998, **34**(8): 103—108
- [6] Arcier JM, Heman F, Lightner DV, et al. A viral disease associated with mortalities in hatchery reared postlarvae of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Dis Aquat. Org.* 1999, **38**(8): 177—181

PRELIMINARY STUDIES ON THE WHITISH MUSCLE DISEASES OF *MACROBRACHIUM ROSENBERGII* POST-LARVAE

QIAN Dong, YANG Guo-liang, LIU Wen, WANG Jun-yi and CAO Zheng

(*Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001*)

Abstract: A new epidemic spread out recently years in the larvae and post-larvae of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, in many hatcheries of some South China provinces. The diseases, with the symptom of whitish muscle in abdomen or opacity muscles, was called as whitish muscle diseases, causing serious loss of *M. rosenbergii* larvae or post-larvae. The typical diseased post-larvae were used for bacteria isolation, tissue homogenizing and artificial challenging test with health *M. rosenbergii* larvae by immersion infection tests. The health larvae could not be infected by the bacteria strains isolated from hepatopacreas and muscles of diseased larvae in two weeks after infection at the concentration of 5×10^8 CFU/ml, but could be infected by bacteria-free tissue homogenate at concentration of 1: 50 and 1: 250, with symptom similar of the nature diseased shrimps, 7 days after challenging. The infectivity could not be inactivated by 10% chloroform. With the ultrathin section, spherical virions were found with the size of 21—23nm in the muscle connection. The virus partly purification was carried out with diseased larvae homogenized in PBS, treated with chloroform followed by PEG precipitation and 2% PTA negative staining. It could be found plenty of spherical virions with the size of 22—24nm. These results showed that the whitish muscle disease of *M. rosenbergii* post-larvae was caused by this virus.

Key words: *Macrobrachium rosenbergii*; Post-larvae; Whitish muscle disease; Pathogen