

文章编号: 1674 - 5566(2015)02 - 0211 - 08

人工养殖对虾肠道内可培养细菌数量及组成分析

张盛静^{1,2}, 赵小金^{1,2}, 宋晓玲², 张晓静², 万晓媛², 黄 健²

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 为深入了解人工养殖条件下养殖对虾肠道内菌群结构和携带病毒情况, 应用常规细菌分离、培养与纯化, 细菌 16S rDNA 序列分析的方法分析了我国山东、江苏、韩国不同养殖场的凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 和中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 肠道内可培养细菌的总数、优势菌组成和数量, 并用巢式聚合酶链式反应 (Nested polymerase chain reaction, Nested PCR) 方法检测对虾携带病毒情况。结果显示各批次凡纳滨对虾和中国明对虾样品肠道内的可培养细菌总数在 $10^5 \sim 10^9$ cfu/g 之间, 并对分离出的优势菌进行属 (种) 鉴定, 结果表明这些优势菌分别属于乳球菌属 (*Lactococcus* sp.)、弧菌属 (*Vibrio* sp.)、芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.)、发光杆菌属 (*Photobacterium* sp.)、希瓦氏菌属 (*Shewanella* sp.)、节杆菌属 (*Arthrobacter* sp.)、微小杆菌属 (*Microbacterium* sp.)。凡纳滨对虾和中国明对虾均有样品检测为 WSSV 阳性, 6 批次 WSSV 阳性对虾样品中均检测到弧菌属细菌, 占可培养细菌比例为 33% ~ 93.58%。2 批次 WSSV 阳性对虾样品中检测到希瓦氏菌属细菌, 占可培养细菌比例为 21.67% ~ 34.21%。4 批次 WSSV 阳性对虾样品中检测到发光杆菌属细菌, 占可培养细菌比例为 21.03% ~ 66.83%。

研究亮点: WSSV (对虾白斑综合征病毒) 是引发养殖对虾暴发性传染性疾病的主要病原之一。本文运用 PCR 方法检测不同养殖场对虾携带病毒情况, 通过分析携带病毒与否和对虾肠道细菌组成之间的关系, 以期对养殖对虾病害防控和水产益生菌的开发提供基础数据。

关键词: 对虾; 肠道; 可培养细菌; 优势菌; WSSV
中图分类号: S 945.1
文献标志码: A

近年来, 迅速发展的对虾养殖业已成为我国水产养殖业的支柱产业。2012 年我国对虾类养殖总产量为 160.8 万吨, 其中凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 产量为 145.3 万吨; 中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 产量为 4.12 万吨 (中国渔业统计年鉴, 2013), 为社会创造了显著的经济效益和社会效益。然而, 暴发性的流行性疾病给对虾养殖业造成严重的经济损失^[1]。细菌病和病毒病是影响对虾产业最主要的病害问题, 受到越来越多的重视^[2-3]。李继秋等^[4]研究了对虾在感染病毒后肠道内细菌的数量及组成变化情况, 指出感染 WSSV 的对虾肠道细菌总数显著高于未感染 WSSV 的对虾, 感染 WSSV 的

对虾肠道内的气单胞菌属显著高于未感染 WSSV 的对虾。对虾肠道是一个复杂的微生态系统, 具有消化吸收营养和防御疾病双重功能^[5]。DEMPSEY^[6]等对虾类的消化道细菌群落进行分离鉴定, 发现好氧菌的菌群主要为弧菌属、产碱菌属、气单胞菌属、发光杆菌属和假单胞菌属。有作者报道自对虾体内存在的细菌中筛选益生菌, 能够提高对虾对疾病的防御能力^[7-9]。本文通过调查分析不同养殖场的对虾肠道内菌群结构和携带病毒之间的关系。以期对运用微生物生态调控方法防治对虾疾病技术的建立提供基础数据。

收稿日期: 2014-11-04

修回日期: 2014-12-12

基金项目: 公益性行业 (农业) 科研专项 (2011103034), 山东省自主创新专项 (2013CX80202)

作者简介: 张盛静 (1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产病害微生物防控技术研发。E-mail: zhangshengjing@126.com

通信作者: 宋晓玲, E-mail: songxl@ysfri.ac.cn

1 材料与方法

1.1 样品的采集

样品采集时间为 2013 年 7-10 月,样品包括凡纳滨对虾和中国明对虾,采样地包括我国山东、江苏及韩国,将采集到的活虾放入氧气袋中运回实验室,共采集样品 8 批次。

1.2 样品的处理

用 75% 的酒精擦拭活虾体表进行消毒,无菌条件下活体解剖,取出其完整肠道。将取出的肠道组织用无菌的 PBS (pH = 7.4) 缓冲液冲洗 3~4 次后放入 1.5 mL 的无菌 EP 管中称重,分别往无菌 EP 管加入 1 mL 的 PBS 缓冲液,用无菌研磨棒研磨均匀,用 10 倍递增稀释法制成菌悬液。

1.3 优势菌株的分离纯化

取 0.1 mL 的各稀释度菌悬液,采用需氧平板菌落计数法分别涂布于 2216E 固体培养基的平板上,每个梯度 3 个平行,倒置于 28 °C 恒温培养箱中培养 16~20 h。观察 2216E 平板上细菌的菌落形态,在菌落数为 30~300 的平板上对菌落颜色、形态、大小一致的菌株进行编号及计数,并将活菌数的数量排列在前 2 位的菌株判断为优势菌株,记录优势菌株数量并进行划线,纯化至获得纯培养菌株。将纯培养菌株接种于 2216E 海水液体培养基内,在转速为 150 r/min,28 °C 振荡培养箱中培养 16~20 h 进行扩大培养待鉴定用。

1.4 优势菌株的 16S rDNA 序列分析

1.4.1 PCR 模板制备

用移液器吸取培养 16~20 h 的菌悬液 1 mL 放入无菌 1.5 mL 的 EP 管中,12 000 r/min 离心 2 min,除去上清液,再加入 1 mL 的 RNase-free 水,充分吹打混匀,沸水浴 10 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液 (DNA 悬液) 作为 PCR 扩增的模板。

1.4.2 引物与 PCR 扩增

以提取的细菌基因组 DNA 为模板,用细菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增,引物由上海生物工程公司合成。扩增引物序列为^[10]:

正向引物序列 5' - AGAGTTTGATCCTGGCT CAG - 3';

反向引物序列 5' - GGTTACCTTGTTACGAC TT - 3'。

PCR 扩增体系:25 μ L 含模板 DNA 1 μ L,正向引物、反向引物各 1 μ L, Premix Ex Taq 12.5 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。PCR 扩增程序:94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物片段长度约为 1 400 bp,对 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。检测后有目的条带的样品,送往上海桑尼生物科技有限公司进行测序。

1.4.3 16S rDNA 序列分析

测序结果在 Ezbiocloud 中利用 BLAST 软件 http://ezgenome.ezbiocloud.net/ezg_BLAST 网站上进行同源性比较,找出其所属的种类范畴,并且选取相似性最高的序列。

1.5 病毒检测

白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 的检测采用世界动物卫生组织 (OIE) 水生动物健康诊断手册推荐使用的 WSD nest-PCR 检测方法^[11]。两轮 PCR 扩增产物电泳后均未出现阳性条带的病毒检测结果判定为 WSSV 阴性结果;第一轮 PCR 扩增产物电泳未出现阳性条带,第二轮 PCR 扩增产物电泳出现阳性条带,判定为 WSSV 阳性结果;两轮 PCR 扩增产物电泳后均出现阳性条带的判为 WSSV 强阳性结果。

2 结果

凡纳滨对虾肠道内可培养细菌总数、优势菌种类及占可培养细菌总数的百分比,以及病毒检测结果见表 1,从表中结果可以看出:各批次凡纳滨对虾肠道内可培养细菌总数在 1.26×10^6 至 1.09×10^9 CFU/g 之间,弧菌属 (*Vibrio* sp.) 在 6 批次凡纳滨对虾肠道内均占有较高比例,占可培养细菌总数的 20.80%~89.42%。其他优势菌属主要包括:乳球菌属 (*Lactococcus* sp.)、芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus* sp.)、希瓦氏菌属 (*Shewanella* sp.)、节杆菌属 (*Arthrobacter* sp.)、发光杆菌属 (*Photobacterium* sp.)、微小杆菌属 (*Microbacterium* sp.)。6 批样品中有一批样品没有检测 WSSV,剩余 5 批样品检测 WSSV,结果显示有 1 批次是 WSSV 阴性,2 批次样品 WSSV 强阳性,2 批样品 WSSV 阳性。检测出 WSSV 强阳性的凡纳滨对虾肠道内的优势菌属有希瓦氏菌属、弧菌属、发光杆菌属,分别占可培养细菌总数的 21.67%~34.21%、31%~

33.49%、21.03% ~ 66.83%。

表 1 凡纳滨对虾肠道内可培养细菌数量、优势菌属及 WSSV 检测结果
Tab. 1 The quantity of cultivable bacteria, the composition of dominant bacteria general and WSSV in the intestinal tract of the *Litopenaeus vannamei*

批次 batch	采样日期 date	采样地点 site	可培养细菌总数/(CFU/g) total cultivable bacteria	优势菌属名称 dominant bacteria batch name	数量/(CFU/g) number	占细菌的总数 的比例 percentage of dominant bacteria	WSSV
1	7月27日	江苏连云港	6.44×10^8	乳球菌属 <i>Lactococcus</i> sp.	4.78×10^8	74.22%	N
				弧菌属 <i>Vibrio</i> sp.	1.34×10^8	20.80%	
2	8月24日	山东胶州	1.09×10^9	弧菌属 <i>Vibrio</i> sp.	1.02×10^9	93.58%	+
				芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i> sp.	5.27×10^7	4.83%	
3	9月24日	山东青岛	4.31×10^8	弧菌属 <i>Vibrio</i> sp.	3.55×10^8	82.36%	-
				葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i> sp.	7.18×10^7	16.66%	
4	9月3日	江苏盐城	1.26×10^6	希瓦氏菌属 <i>Shewanella</i> sp.	4.31×10^5	34.21%	+++
				弧菌属 <i>Vibrio</i> sp.	4.22×10^5	33.49%	
				发光杆菌属 <i>Photobacterium</i> sp.	2.65×10^5	21.03%	
				节杆菌属 <i>Arthrobacter</i> sp.	1.02×10^5	8.09%	
5	9月3日	江苏盐城	1.20×10^7	发光杆菌属 <i>Photobacterium</i> sp.	8.02×10^6	66.75%	+++
				弧菌属 <i>Vibrio</i> sp.	3.72×10^6	31.00%	
6	9月24日	山东胶州	3.77×10^7	希瓦氏菌属 <i>Shewanella</i> sp.	2.60×10^5	2.17%	+
				弧菌属 <i>Vibrio</i> sp.	3.45×10^7	89.42%	
				微小杆菌属 <i>Microbacterium</i> sp.	2.65×10^6	8.49%	

注：“+++”表示病毒检测结果为强阳性，“+”表示病毒检测结果为阳性，“-”表示病毒检测结果为阴性，“N”表示没有检测到病毒。
Note: “+++” means the virus test results for strong positive, “+” means the virus test results for positive, “-” means the virus test results for negative, “N” means there is not test for the virus.

中国明对虾肠道内的可培养细菌总数、优势菌种类及占可培养细菌总数的百分比,以及病毒检测结果见表 2。从表中结果可以看出:各批次中国明对虾肠道内的可培养细菌总数在 $2.47 \times 10^8 \sim 1.09 \times 10^9$ CFU/g, 2 批次中国明对虾病毒检测结果均显示 WSSV 阳性,肠道内的优势菌属均为弧菌属和发光杆菌属,分别占可培养细菌总数的 64.37% ~ 71.52% 和 28.14% ~ 34.13%。

凡纳滨对虾肠道内的优势菌属总数、优势菌株种类、数量及占该优势菌属总数的百分比,以

及病毒检测结果见表 3。从表 3 可以看出:第 1 批次凡纳滨对虾肠道优势菌属乳球菌属的菌株组成为格氏乳球菌 (*L. garvieae*), 占乳球菌属总数的 100%, 弧菌属主要由魔鬼弧菌 (*V. diabolicus*) 和哈维氏弧菌 (*V. harveyi*) 组成, 分别占弧菌属总数的 84.33% 和 15.67%。第 2 批次凡纳滨对虾肠道优势菌属弧菌属由副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*) 和溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*) 组成, 分别占弧菌属总数的 56.86%、30.68%, 芽孢杆菌属由蜡样芽孢杆菌

(*B. cereus*) 组成, 占该菌属总数的 100%。第 3 批次凡纳滨对虾肠道优势菌属弧菌属由施氏弧菌(*V. shilonii*) 和溶藻弧菌组成, 分别占该菌属总数的 67.22% 和 29.58%, 葡萄球菌属由表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*) 和溶血葡萄球菌(*S. haemolyticus*) 组成, 分别占该菌属总数的 62.95% 和 37.05%。第 4 批次凡纳滨对虾肠道优势菌属希瓦氏菌属由 *S. amazonensis* 组成, 占该菌属总数的 100%, 弧菌属由溶珊瑚弧菌(*V. coralliilyticus*)、副溶血弧菌组成, 占该菌属总数的 80.33% 和 19.67%, 发光杆菌属由美人鱼发光杆菌(*P. damsela*) 组成, 占该菌属总数的 100%, 节

杆菌属由阿氏节杆菌(*A. arilaitensis*) 组成, 占该菌属总数的 100%。第 5 批次凡纳滨对虾肠道优势菌属发光杆菌属由美人鱼发光杆菌组成, 占该菌属总数的 100%, 弧菌属由巴西弧菌(*V. brasiliensis*) 组成, 占该菌属总数的 100%, 希瓦氏菌属由 *S. amazonensis* 组成, 占该菌属总数的 100%。第 6 批次凡纳滨对虾肠道优势菌属弧菌属由哈维氏弧菌和副溶血弧菌组成, 占该菌属总数的 80.87% 和 19.13%, 微小杆菌属由深海微小杆菌(*Exiguobacterium profundum*) 组成, 占该菌属总数的 100%。

表 2 中国明对虾肠道内可培养细菌数量、优势菌属及 WSSV 检测结果

Tab. 2 The quantity of cultivable bacteria, the composition of dominant bacteria general and WSSV in the intestinal tract of the *Fenneropenaeus chinensis*

批次 batch	采样日期 date	采样地点 site	可培养细菌总数 (CFU/g) total cultivable bacteria	优势菌属名称 dominant bacteria batch name	数量/(CFU/g) number	占细菌的总数 的比例 percentage of dominant bacteria	WSSV
7	9月25日	韩国	2.47 × 10 ⁸	弧菌属 <i>Vibrio</i> sp	1.59 × 10 ⁸	64.37%	+
				发光杆菌属 <i>Photobacterium</i> sp	8.43 × 10 ⁷	34.13%	
8	10月18日	山东即墨	1.09 × 10 ⁹	弧菌属 <i>Vibrio</i> sp	1.02 × 10 ⁹	93.58%	+
				发光杆菌属 <i>Photobacterium</i> sp	5.27 × 10 ⁷	4.83%	

注: “+”表示病毒检测结果为阳性。

Note: “+” means the virus test results for positive.

中国明对虾肠道内的优势菌属总数、优势菌株种类、数量及该优势菌属总数的百分比, 以及病毒检测结果见表 4。从表 4 可以看出: 第 7 批次中国明对虾肠道内优势菌属弧菌属由副溶血弧菌组成, 占该菌属总数的 100%, 发光杆菌属由美人鱼发光杆菌组成, 占该菌属总数的 100%。第 8 批次中国明对虾肠道内优势菌属弧菌属由哈维氏弧菌组成, 占该菌属总数的 100%, 发光杆菌属由美人鱼发光杆菌组成, 占该菌属总数的 100%。

综合表 1 和表 2 的结果表明, 各批次凡纳滨对虾和中国明对虾肠道内的可培养细菌总数、优势菌属组成以及数量在每个采样地点都有所不同, 可培养细菌总数在 10⁵ 至 10⁹ CFU/g 之间, 优势菌属呈现种属类别少、个别菌属分布多的特征, 弧菌属占可培养细菌总数的 20.80% ~ 93.58%, 是所有对虾肠道内最高比例的优势菌

属。凡纳滨对虾和中国明对虾均有样品检测为 WSSV 阳性, 检测出 WSSV 阳性对虾肠道的优势菌属为弧菌属、希瓦氏菌属、发光杆菌属。6 批 WSSV 阳性对虾样品中均检测到弧菌属细菌, 占可培养细菌比例为 33% ~ 93.58%。4 批 WSSV 阳性对虾样品中检测到希瓦氏菌属细菌, 占可培养细菌比例为 21.67% ~ 34.21%。2 批 WSSV 阳性对虾样品中检测到发光杆菌属细菌, 占可培养细菌比例为 21.03% ~ 66.83%。

综合表 3 和表 4 的结果表明, 各批次凡纳滨对虾和中国明对虾肠道内的优势菌属的菌株组成以及数量在每个采样地点都有所不同, 1 批次凡纳滨对虾没有检测 WSSV, 该批次对虾肠道优势菌属乳球菌属的菌株组成为格氏乳球菌, 弧菌属主要由魔鬼弧菌和哈维氏弧菌组成。2 批次 WSSV 阳性凡纳滨对虾肠道优势菌属弧菌属由副溶血弧菌、溶藻弧菌和哈维氏弧菌组成, 芽孢杆菌

表 3 凡纳滨对虾肠道内可培养优势菌属数量和优势菌种组成
 Tab.3 The quantity of dominant bacteria general and the composition of dominant bacteria in the intestinal tract of *Litopenaeus vannamei*

批次 batch	优势菌属(科) dominant bacteria general(family)	数量/(CFU/g) number	菌株组成 the composition of dominant bacteria	数量/(CFU/g) number	占菌属比例 percentage
1	乳球菌属 <i>Lactococcus</i> sp	4.78×10^8	格氏乳球菌 <i>Lactococcus garvieae</i>	4.78×10^8	100.00%
			魔鬼弧菌 <i>Vibrio diabolicus</i>	1.13×10^8	84.33%
	弧菌属 <i>Vibrio</i> sp	1.34×10^8	哈维氏弧菌 <i>Vibrio harveyi</i>	2.10×10^7	15.67%
2	弧菌属 <i>Vibrio</i> sp	1.02×10^9	副溶血弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	5.80×10^8	56.86%
			溶藻弧菌 <i>Vibrio alginolyticus</i>	3.13×10^8	30.68%
	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i> sp	5.27×10^7	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	5.27×10^7	100.00%
3	弧菌属 <i>Vibrio</i> sp	3.55×10^8	施氏弧菌 <i>Vibrio shilonii</i>	2.39×10^8	67.22%
			溶藻弧菌 <i>Vibrio alginolyticus</i>	1.05×10^8	29.58%
	葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i> sp.	7.18×10^7	表皮葡萄球菌 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	4.52×10^7	62.95%
			溶血葡萄球菌 <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2.66×10^7	37.05%
4	希瓦氏菌属 <i>Shewanella</i> sp	4.31×10^5	<i>Shewanella amazonensis</i>	4.31×10^5	100.00%
	弧菌属 <i>Vibrio</i> sp	4.22×10^5	溶珊瑚弧菌 <i>Vibrio coralliilyticus</i>	3.39×10^5	80.33%
			副溶血弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	8.30×10^4	19.67%
	发光杆菌属 <i>Photobacterium</i> sp	2.65×10^5	美人鱼发光杆菌 <i>Photobacterium damsela</i>	2.65×10^5	100.00%
5	节杆菌属 <i>Arthrobacter</i> sp	1.02×10^5	阿氏节杆菌 <i>Arthrobacter arilaitensis</i>	1.02×10^5	100.00%
	发光杆菌属 <i>Photobacterium</i> sp	8.02×10^6	美人鱼发光杆菌 <i>Photobacterium damsela</i>	8.02×10^6	100.00%
	弧菌属 <i>Vibrio</i> sp	3.72×10^6	巴西弧菌 <i>Vibrio brasiliensis</i>	3.72×10^6	100.00%
6	希瓦氏菌属 <i>Shewanella</i> sp	2.60×10^5	<i>Shewanella amazonensis</i>	2.60×10^5	100.00%
	弧菌属 <i>Vibrio</i> sp	3.45×10^7	哈维氏弧菌 <i>Vibrio harveyi</i>	6.85×10^6	80.87%
			副溶血弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	6.60×10^6	19.13%
	微小杆菌属 <i>Microbacterium</i> sp	2.65×10^6	深海微小杆菌 <i>Exiguobacterium profundum</i>	2.65×10^6	100.00%

属由蜡样芽孢杆菌组成,微小杆菌属由深海微小杆菌组成。2 批次 WSSV 强阳性凡纳滨对虾肠道优势菌属希瓦氏菌属由 *Shewanella amazonensis* 组成,弧菌属由溶珊瑚弧菌、副溶血弧菌、巴西弧菌组成,发光杆菌属由美人鱼发光杆菌组成,节杆菌属由阿氏节杆菌组成。1 批次 WSSV 阴性凡纳

滨对虾肠道优势菌属弧菌属由施氏弧菌和溶藻弧菌组成,葡萄球菌属由表皮葡萄球菌和溶血葡萄球菌组成。2 批次中国明对虾均为 WSSV 阳性,中国明对虾肠道内优势菌属弧菌属由副溶血弧菌和哈维氏弧菌组成,发光杆菌属由美人鱼发光杆菌组成。

表 4 中国明对虾肠道内可培养优势菌属数量和优势菌种组成

Tab. 4 The quantity of dominant bacteria general and the composition of dominant bacteria in the intestinal tract of *Fenneropenaeus chinensis*

批次 batch	优势菌属(科) dominant bacteria general (family)	数量/(CFU/g) number	菌株组成 the composition of dominant bacteria	数量/(CFU/g) number	占菌属比例 percentage
7	弧菌属 <i>Vibrio</i> sp	1.59×10^8	副溶血弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1.59×10^8	100.00%
	发光杆菌属 <i>Photobacterium</i> sp	8.43×10^7	美人鱼发光杆菌 <i>Photobacterium damsela</i>	8.43×10^7	100.00%
8	弧菌属 <i>Vibrio</i> sp	1.08×10^9	哈维氏弧菌 <i>Vibrio harveyi</i>	1.08×10^9	100.00%
	发光杆菌属 <i>Photobacterium</i> sp	4.25×10^8	美人鱼发光杆菌 <i>Photobacterium damsela</i>	4.25×10^8	100.00%

3 讨论

通过本次调查发现凡纳滨对虾和中国明对虾肠道内的优势菌属的菌株组成以及数量在每个采样地点都有所不同,且菌属分布不均匀,呈现细菌种属类别少个别菌属分布多的特征。弧菌属为明显的优势菌属,所占的优势菌占总菌数的百分比为 20.80% ~ 93.58%。这可能是受养殖环境、不同养殖场的养殖模式不同的影响。WANG 等^[12]研究发现中国明对虾成虾消化道内的优势菌为弧菌属和假单胞菌属,且在前肠、中肠和后肠中的细菌数量分别为 1.3×10^5 、 2.8×10^5 、 1.1×10^4 cfu/尾。宛立等^[13]对健康的凡纳滨对虾肠道的好氧菌进行研究,共分离得到 111 株菌,分别属于 13 个属,发光杆菌属、弧菌属、气单胞菌属、肠杆菌属、黄单胞菌属 (*Xanthomonas* sp.) 为优势菌。以上资料表明,在不同条件下,尽管对虾肠道的主要菌群有所差异,弧菌属、气单胞菌属 (*Vibrio* sp.)、假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.) 以及发光杆菌属为对虾消化道中常见的优势菌。

WSSV 是世界范围内对虾病毒性疾病的主要病原,分布广泛,危害严重,感染 WSSV 后可引起对虾大规模死亡^[3,14]。本次调查研究的对虾样品中除一次没有进行病毒检测外,其他 7 批次样品只有 1 批未检出 WSSV。6 批 WSSV 阳性对虾样品中均检测到弧菌属,4 批 WSSV 阳性对虾样品中检测到希瓦氏菌属,2 批 WSSV 阳性对虾样品中检测到发光杆菌属。未感染 WSSV 对虾样品肠道内可培养细菌总数为 2.18×10^9 cfu/g,感染 WSSV 对虾样品肠道内可培养细菌总数为 1.26

$\times 10^6 \sim 1.59 \times 10^9$ cfu/g,感染 WSSV 后引起对虾肠道菌群变化不尽相同,是由于对虾肠道微生物区系受到肠道内在结构和外在因素双重影响^[15-17]。

在健康的对虾肠道细菌群落中,一般是 1 到 2 个属的优势菌占主要地位,OXLEY 等^[18]指出无论是野生的还是养殖的墨吉对虾,在健康的对虾肠道中弧菌属为优势菌群。YASUDA 等^[19]发现在日本对虾的幼体期弧菌属是优势菌属。弧菌是对虾体内存在的正常菌群,一般为优势菌,但一些弧菌是条件致病菌,当宿主免疫力下降或其数量超过正常值时可引起对虾发生疾病,如:烂鳃病、红腿病、甲壳溃疡病和烂尾病等^[20-22],SKJERMO 和 VADSTEIN^[23]证实条件性致病菌的大量繁殖是水产动物发生疾病的主要原因,其造成疾病发生的可能性往往要大于专性病原菌。WIPASIRI 等^[24]采用浸浴法,用哈维氏弧菌感染黑虎虾,实验结果表明,哈维氏弧菌极易破坏幼虾肠道微生态系统,而成虾对其具有一定的抵抗感染能力。WINTON 等^[25]将溶藻弧菌注入凡纳滨对虾体内,在 32 ~ 34℃ 时溶藻弧菌感染凡纳滨对虾的能力比在 20 ~ 32℃ 更强。一旦养殖环境恶化或对虾免疫力下降将会引起细菌在体内的大量繁殖而导致对虾死亡。对虾感染病毒后可引发对虾肠道内菌群发生变化^[4],但二者的作用机制并不明确,需要进一步地研究。

参考文献:

- [1] NUNNA L M,POULOS B T,LIGHTNER D V. The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp [J]. *Aquaculture*, 1998,160(1):19-30.

- [2] LIGHTNER D V. The penaeid shrimp viruses TSV, IHNV, WSSV, and YHV; current status in the Americas, available diagnostic methods, and management strategies[J]. Journal of Applied Aquaculture, 1999, 9(2): 27-52.
- [3] CHOU H Y, HUANG C Y, WANG C H, et al. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1995, 23(3): 165-173.
- [4] 李继秋, 谭北平, 麦康森. 白斑综合征病毒与凡纳滨对虾肠道菌群区系之间关系的初步研究[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(1): 109-113.
- LI J Q, TAN B P, MAI K S. Study on the relationships between white spot syndrome virus outbreak in cultured shrimp (*Penaeus vannamei*) and the composition of aerobic heterotrophic bacterium communities in shrimp intestine[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2006, 15(1): 109-113.
- [5] HOOPER L V, MIDTVEDT T, GORDON J I. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine [J]. Annual Review Nutrition, 2002, 22: 283-307.
- [6] DEMPSEY C, KITTING C T, ROSSON R A. Bacterial variability among individual Penaeid shrimp digestive tract [J]. Crustaceana, 1989, 56(3): 267-278.
- [7] 李海兵, 宋晓玲, 韦嵩, 等. 4株对虾肠道益生菌的筛选及鉴定[J]. 海洋与湖沼, 2008, 39(4): 374-380.
- LI H B, SONG X L, WEI S, et al. Screening and identification of four probiotic bacteria isolated from intestine of shrimp [J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2008, 39(4): 374-380.
- [8] 兰萍, 宋晓玲, 张辉, 等. 美人鱼发光杆菌对凡纳滨对虾非特异性免疫功能及抗病力的影响[J]. 渔业科学进展, 2010, 31(1): 65-73.
- LAN P, SONG X L, ZHANG H, et al. Effect of *Photobacterium damsela* on the non-specific immune response and disease resistance of *Litopenaeus vannamei* [J]. Progress in Fishery Sciences, 2010, 31(1): 65-73.
- [9] 李桂英, 宋晓玲, 孙艳, 等. 几株肠道益生菌对凡纳滨对虾非特异免疫力和抗病力的影响[J]. 中国水产科学, 2012, 18(6): 1358-1367.
- LI G Y, SONG X L, SUN Y, et al. Effects of probiotics from the shrimp intestine on the non-specific immunity and antiviral capacity of *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 18(6): 1358-1367.
- [10] 李筠, 颜显辉, 陈吉祥, 等. 养殖大菱鲆腹水病原的研究[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2006, 36(4): 649-654.
- LI Y, YAN X H, CHEN J X, et al. Studies on the characteristics of pathogenic *Edwardsiella tarda* isolated from diseased *Scophthalmus maximus* [J]. Periodical of Ocean University of China, 2006, 36(4): 649-654.
- [11] LO C F, HO C H, PENG S E, et al. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crab and other arthropods [J]. Disease of Aquatic Organisms, 1996, 27: 215-225.
- [12] WANG X H, LI H R, ZHANG X H, et al. Microbial flora in the digestive tract of adult penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*) [J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 1999, 30(3): 493-498.
- [13] 宛立, 王吉桥, 高峰, 等. 南美白对虾肠道细菌菌群分析[J]. 水产科学, 2006, 25(1): 13-15.
- WAN L, WANG J Q, GAO F, et al. Bacterial flora in intestines of white leg shrimp (*Penaeus vannamei* Booen) [J]. Fisheries Science, 2006, 25(1): 13-15.
- [14] LO C, HO C, PENG S, et al. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1996, 27(3): 215-225.
- [15] SUGITA H, TSUNOHARA M, OHKOSHI T, et al. The establishment of an intestinal microflora in developing goldfish (*Carassius auratus*) of culture ponds [J]. Microbial Ecology, 1988, 15(3): 333-344.
- [16] HORSLEY R W. A review of the bacterial flora of teleosts and elasmobranchs, including methods for its analysis [J]. Journal of Fish Biology, 1977, 10(6): 529-553.
- [17] SUGITA H, OSHIMA K, TAMURA M, et al. Bacterial flora in the gastrointestinal of fresh-water fishes in the river [J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1983, 49(9): 1387-1395.
- [18] OXLEY A P A, SHIPTON W, OWENS D, et al. Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguensis* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 93(2): 214-223.
- [19] KIMIYAKI Y, TADATOSHI K. Bacterial flora in the digestive tract of prawns, *Penaeus japonicus* Bate [J]. Aquaculture, 1980, 19(3): 229-234.
- [20] 战文斌, 周丽, 俞开康, 等. 一种新的中国对虾弧菌病原菌——产气弧菌 [J]. 海洋与湖沼, 1997, 28(1): 21-26.
- ZHAN W B, ZHOU L, YU K K, et al. *Vibrio gazogenes*, a new vibrio pathogen from septicemia of *Penaeus chinensis* [J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 1997, 28(1): 21-26.
- [21] 陶保华, 胡超群, 吴蔚. 斑节对虾弧菌的病原生物学研究 [J]. 热带海洋学报, 2001, 20(2): 80-87.
- TAO B H, HU C Q, WU W. Studies on pathogenetic biology of vibriosis occurring in *Penaeus monodon* [J]. Journal of Tropical Oceanography, 2001, 20(2): 80-87.
- [22] 杨少丽, 王印庚, 董树刚. 海水养殖鱼类弧菌病的研究进展 [J]. 海洋水产研究, 2005, 26(4): 75-83.
- YANG S L, WANG Y G, DONG S G. Progress of research on vibriosis in marine cultured fish [J]. Marine Fisheries Research, 2005, 26(4): 75-83.
- [23] SKJERMO J, VADSTEIN O. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae [J]. Aquaculture, 1999, 177(1): 333-343.

- [24] WIPASIRI S, WANILADA R, NITSARA K, et al. Expression of immune-related genes in the digestive organ of shrimp, *Penaeus monodon*, after an oral infection by *Vibrio harveyi* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2010, 34 (1): 19–28.
- [25] WINTON C, LONG-UONG W, JIANN-CHU C. Effect of water temperature on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio alginolyticus* [J]. *Aquaculture*, 2005, 250(3/4): 592–601.

Analysis of the culturable bacteria's quantity and composition in the intestinal tract of cultivation shrimp

ZHANG Shengjing^{1,2}, ZHAO Xiaojin^{1,2}, SONG Xiaoling², ZHANG Xiaojing², WAN Xiaoyuan², HUANG Jie²

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory for Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Qingdao 266071, China)

Abstract: In order to study the flora structure in the intestinal tract and the virus-carrying condition of the different aquatic farm shrimps, we used conventional method of bacteria isolation, cultivation, purification and bacteria 16SrDNA sequences analysis to analyze the total number of culturable bacteria, the species and numbers of dominant bacteria and we used Nested polymerase chain reaction (Nested PCR) method to detect shrimp virus in *Litopenaeus vannamei* and *Fenneropenaeus chinensis* cultivated in different farms of Jiangsu, Shandong and the Republic of Korea. The results showed that the total number of culturable bacteria of *Litopenaeus vannamei* and *Fenneropenaeus chinensis* is between 10^5 and 10^9 CFU/g, and identified the dominant bacteria isolated from the intestinal tract to genus (species). The results showed that the dominant bacterial respectively belong to *Lactococcus* sp, *Vibrio* sp, *Bacillus* sp, *Photobacterium* sp, *Shewanella* sp, *Arthrobacter* sp and *Microbacterium* sp. *Litopenaeus vannamei* and *Fenneropenaeus chinensis* samples are tested positive for WSSV, 6 batches of shrimp samples which were tested positive WSSV, are isolated *Vibrio* sp from intestinal tract, accounting for 33%–93.58% of culturable bacteria, 2 batches of shrimp samples which were tested positive WSSV, are isolated *Shewanella* sp, from intestinal tract, accounting for 21.67%–34.21% of culturable bacteria, 4 batches of shrimp samples which were tested positive WSSV, are isolated *Photobacterium* sp, from intestinal tract, accounting for 21.03%–66.83% of culturable bacteria.

Key words: shrimp; intestinal tract; culturable bacteria; dominant bacteria; WSSV