

噬菌蛭弧菌预防对虾弧菌感染的应用研究

张吕平¹ 胡超群* 罗鹏 沈琪

(中国科学院海洋生物资源可持续利用重点实验室 中国科学院南海海洋研究所, 广州 510301)

摘要 采用 16S rDNA 特异引物对 63F 和 842R 对蛭弧菌标准菌株 *Bdellovibrio bacteriovorus* 109-J 和实验菌株 Bd-9913 进行了 PCR 鉴定, 使用 Bd-9913 菌株分别对 3 株虾类病原菌溶藻弧菌 *Vibrio alginolyticus* LS01、HF09, 副溶血弧菌 *V. parahaemolyticus* V28 以及 1 株大肠埃希氏菌 *Escherichia coli* CH-42 进行裂解。结果表明, 10^5 PFU/ml 的 Bd-9913 对于 10^9 CFU/ml 的宿主菌具有较好的裂解效果。采用 3.0×10^5 PFU/ml Bd109-J 和 Bd-9913 分别与饲料混合 (v/w) 后投喂 3.0g 左右的凡纳滨对虾幼虾, 14 d 内未发现对虾异常, 且在对虾肠道内检测不到 Bd109-J 及 Bd-9913, 证明二者对于凡纳滨对虾幼虾是安全的。对正常养殖了 50d 的室外集约化虾池水体分别泼洒终浓度 0.3mg/L 的二氯异氰尿酸、0.3mg/L 季胺盐络合碘和 3.0×10^5 PFU/ml 蛭弧菌, 后者对于抑制水体弧菌活菌浓度的效果明显优于化学消毒剂。当每隔 20d 左右分别进行一次上述水体处理, 通过比较体内弧菌感染的对虾个体数, 发现从肝胰腺分离到弧菌的对虾数量二者无显著差异, 但从血淋巴分离到弧菌的对虾数量, 蛭弧菌处理组显著少于化学消毒剂处理组, 显示了蛭弧菌在预防对虾弧菌感染方面的优越性。

关键词 噬菌蛭弧菌 对虾 弧菌病 生物防治

中图分类号 S945.1; S476+.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)01-0026-08

Prevention of *Vibrio* infection by application of *Bdellovibrio bacteriovorus* in intensively cultured shrimp

ZHANG Lv-ping HU Chao-qun* LUO Peng SHEN Qi

(Key Laboratory of Marine Bio-resources Sustainable Utilization, Chinese Academy of Sciences, South China Sea Institute of Oceanology, Guangzhou 510301)

ABSTRACT *Bdellovibrio bacteriovorus* strain Bd-9913 was identified using 16S rDNA universal primers 63F and 842R. The lytic ability of Bd-9913 on shrimp pathogenic bacterial agents, *Vibrio alginolyticus* and *V. parahaemolyticus*, and a standard strain of *Escherichia coli* was investigated respectively. The safety of Bd109-J and Bd-9913 to postlarvae of white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*, was demonstrated in two weeks after oral administration of 3.0×10^5 PFU/ml *Bdellovibri*os mixed 1 : 1 (v/w) with commercial feed. Disinfection effect of *Vibri*oes in shrimp water was compared between chemical disinfectant treatment (0.3mg/L chloride

中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-YW-N-47-01)和农业部渔业生态环境重点实验室开放课题(2003-04)共同资助

* 通讯作者。E-mail: cqhu@scsio.ac.cn, Tel: (020)89023218

收稿日期: 2007-11-01; 接受日期: 2007-12-08

作者简介: 张吕平(1973-), 男, 博士, 助研, 主要从事海水养殖及病害防治研究。E-mail: lpzhang@scsio.ac.cn, Tel: (020)89023216

and/or iodide) and *Bdellovibrios* addition (3.0×10^5 PFU/ml). Results indicated that the later showed great advantage to the former in keeping the concentration of live *vibrios* at a safe level twice as long (20 days). Furthermore, advantage was also shown when *Bdellovibrios* rather than chemical treatment was used to control shrimp *vibrio* infection in the outdoor intensive shrimp ponds.

KEY WORDS *Bdellovibrio bacteriovorus* Shrimp Vibriosis Biocontrol

弧菌病 Vibriosis 是养殖对虾最主要的细菌性疾病,其给养殖对虾造成的损失仅次于病毒病(杨少丽等, 1995; Lightner 1993)。自从 1970 年 Vanderzant 等首次从患病对虾体内分离到副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolyticus* 以来,陆续分离鉴定的对虾病原弧菌包括溶藻弧菌 *V. alginolyticus*、创伤弧菌 *V. vulnificus*、杀虾弧菌 *V. penaeicida*、哈氏弧菌 *V. harveyi*、非 01 霍乱弧菌 *V. cholerae non-01*、鳗弧菌 *V. anguillarum* 和产气弧菌 *V. gazogenes* 等等(Lightner 1988; Song *et al.* 1990; Ishimaru *et al.* 1995; Lavilla-Pitogo *et al.* 1998; 郑国兴等 1986、1990; 战文斌等 1997)。

对虾弧菌病的治疗,目前主要依赖各种抗生素药物。然而,随着各种抗生素药物的频繁使用,各种病原菌对于药物耐受性越来越强(盖春蕾等 2008)。耐药菌株引起水产动物发病往往更为严重, Karunasagar 等早在 1994 年就报道过哈氏弧菌耐药株引起斑节对虾虾苗大量死亡的现象,后来亦有类似报道(Ripabelli *et al.* 1999)。而且,许多虾类病原弧菌为人畜共患病原(如副溶血弧菌和创伤弧菌等),大量耐药菌株的产生对于人类健康也造成直接的威胁。因此,研究细菌性疾病的替代疗法或生物防治法近年来受到越来越多的重视。在养殖对虾弧菌病的控制方面,虽然不少学者较早就开展了免疫预防研究(Itami *et al.* 1989; Sung *et al.* 1996; 陶宝华等 1999),但是由于虾类自身先天性免疫特性的不足,此类研究仍处于实验阶段,离应用还有相当的距离。所以,寻找对于虾类弧菌病安全有效、环境友好的生物防治方法受到越来越多的重视。

蛭弧菌 *Bdellovibrio* sp. 是一类广泛存在于自然环境中,甚至存在于动物及人的肠道内的小型菌。到目前为止已发现了 4 种,分别为噬菌蛭弧菌 *Bdellovibrio bacteriovorus*、噬小球藻蛭弧菌 *B. chlorellavorus*、斯塔氏蛭弧菌(*B. starrii*)和斯托氏蛭弧菌(*B. stolpii*) (Klein *et al.* 1967; Taylor *et al.* 1974; Williams *et al.* 1984)。由于其具有特异性裂解细菌的特殊生长习性,被认为是自然环境中各种病原菌的天然净化因子,具有较好的生物防治应用前景,近年来受到了广泛关注。许多学者开展了它们对各种细菌裂解的实验研究,期望用来净化环境和水体(司稚东等 1982; Schoeffield *et al.* 1990; Edouard *et al.* 2000)。

在水产领域,杨淑专等(1997)用从海水分离到的蛭弧菌裂解 10 种对虾病原细菌,发现几乎所有供试菌株都不同程度被寄生;杨莉等(2000)通过水族箱实验指出,水体蛭弧菌浓度达到 10^5 PFU/ml 以上,对 10^8 CFU/ml 嗜水气单胞菌浸泡感染鲤鱼有一定的防治效果。本文报道使用蛭弧菌标准菌株 *Bdellovibrio bacteriovorus* 109-J(Bd109-J)和实验菌株(Bd-9913)对虾类病原菌溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)和大肠埃希氏菌 *Escherichia coli* 分别进行的裂解效应实验, Bd109-J 和 Bd-9913 对于凡纳滨对虾幼虾的安全性,集约化虾池分别使用蛭弧菌和化学消毒剂对水体弧菌数量消长的比较,以及 *Bdellovibrio bacteriovorus* 预防对虾弧菌感染的效果。

1 材料与方 法

1.1 菌种与培养基

蛭弧菌标准菌株 109-J(Bd109-J),购自美国模式培养物保藏所(American Type Culture Collection, ATCC),编号为 ATCC 43826;蛭弧菌实验菌(Bd-9913)由广东省疾控中心微生物检验所惠赠;供试宿主菌溶藻弧菌 LS01 株、HF09 株、副溶血弧菌 V28 株为本实验室分离保存,大肠埃希氏菌 *Escherichia coli* CH-42 株购自广东微生物研究所。

牛肉膏蛋白胨液体培养基:胰蛋白胨 5g,牛肉膏 3g,酵母汁 1g,NaCl 5g,H₂O 1 000 ml,pH7.2,121℃灭菌 15min。固体培养基加 1.5%的琼脂粉,半固体培养基加 0.6%的琼脂粉。

1.2 蛭弧菌计数,种子液制作与 PCR 鉴定

双层琼脂平板制作:将宿主菌接种于 5ml 液体培养基,200r/min 摇床培养,经 30℃培养 16h,取 1ml 混合倾注固体平板,30℃培养 16h 形成菌苔,再在菌苔上倾注混合了 100 μ l 供试蛭弧菌种子液的半固体培养基,30℃培养 72h 以上,计算噬菌斑形成数(Plaque forming units, PFU),同时挑取噬菌斑相差显微镜镜检。

将已形成噬菌斑的双层平板,每个用 5ml 灭菌生理盐水(0.9% NaCl)浸润,30min 后吸出,用 0.45 μ m 的针孔滤器过滤,4℃,10 000g \times 15min 离心,上清为蛭弧菌浸出液,4℃可以保存 15d,剩余部分用冻存管分装,添加 25%(v/v)的甘油,-80℃冻存。

将 Bd109-J 和 Bd-9913 经双层平板形成的噬菌斑分别挑取 20 个,参照水体细菌 DNA 提取方法(Luo *et al.* 2007)并适当修改提取总细菌 DNA。

采用蛭弧菌特异性引物对 63F(5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3')和 842R(5'-CGWCACT-GAAGGGGTCAA-3')(Edouard and Barak, 2000b)扩增特异性片断,PCR 反应体系包含 1.0 unit 的 *Taq* DNA 聚合酶(TAKARA, 大连),1 \times 的反应缓冲液(100mmol/L 的 Tris-HCl,pH 9.0,Triton X-100 1%,500 mmol/L 的 KCl),3.0 mmol/L 的 MgCl₂,各 20 μ mol/L 的 dNTP,各 1.0 μ mol/L 的上下游引物,各 1.0 μ l 的模板 DNA。反应程序为:94℃,4min 变性;94℃,1 min,50℃,1 min,72℃,1 min 扩增,34 个循环;72℃,5 min 延长。反应结束后,将反应产物与 2 μ l 6 倍溴酚蓝上样缓冲液混合,1.0%琼脂糖电泳(120V,20min),EB 染色后紫外成像。

1.3 蛭弧菌对宿主的裂解实验

按照 Edouard 等(2000)的方法适当修改。宿主菌 *Vibrio alginolyticus* LS01 株、HF09 株,*V. parahae-molyticus* V28 株及 *Escherichia coli* CH-42)分别接种于 5ml 液体培养基,200r/min 摇床培养,30℃培养 16h 后(570nm 光密度约 0.6,含有约 1~5 \times 10⁸ CFU/ml),取 200 μ l 转接于 20ml 液体培养基,200r/min,30℃培养 24h 后(浓度约为 1~5 \times 10⁹ CFU/ml),添加 MgCl₂·6H₂O 和 MgCl₂·2H₂O(pH 7.2)至浓度分别为 3.0 mmol/L 和 2.0 mmol/L,接种 5ml 蛭弧菌供试菌 Bd-9913 浸出液(浓度约为 2~3 \times 10⁵ PFU/ml)。每隔 24h 分别取 100 μ l 按 1.2 的方法制双层培养平板,计算噬菌斑形成数,同时分别取 100 μ l 用灭菌生理盐水梯度稀释法倾注平板 24h 培养,计算宿主菌的活菌浓度(Clone forming unit, cfu),连续取样 7d。

1.4 蛭弧菌对凡纳滨对虾的安全性实验

3 个 100L 的塑料桶,分别加砂滤海水 50L,盐度 30,温度 28~30℃,pH 8.2,连续充气,每桶放凡纳滨对虾稚虾 15 尾(平均体重 3.0g),分成 A、B、C 三组,A、B 为实验组,C 为对照组,开始实验前先暂养 3d。将 4℃保存的 Bd109-J 和 Bd-9913 噬菌斑浸出液(浓度约为 3.0 \times 10⁶ PFU/ml)用灭菌生理盐水稀释 10 倍,临喂前 30min 按 1:1(v/w)与 1# 颗粒饲料混匀,分别投喂 A 组和 B 组,连喂 3d,以后喂正常颗粒饲料;C 组投喂正常颗粒饲料,每天早、晚喂 1 次(按体重的 10%)并吸污,每天换水 50%。14d 内统计各组死亡数。于实验第 4 天用吸管吸取各组对虾新鲜粪便,按上述 1.2 的 PCR 方法检测蛭弧菌的有无;最后于实验结束第 14 天时各组分别取两尾肠道饱满的对虾,分别按如下方法获取肠道内容物并提取 DNA,检测蛭弧菌:

(1) 用 70%的酒精擦拭对虾体表,剪开背部,取出中肠;(2) 用镊子轻轻压出肠道内容物,置于 1.5ml 离心管,同一组的两个样混合;(3) 各加入 0.5 ml 0.1%的 Tween-80(PBS 配制,pH 7.4),吹打洗脱 3 min;(4) 500 g 离心 5 min,取上清,12 000 g 离心 10 min,弃上清;(5) 加入 200 μ l 裂解液,按上述 1.2 的方法提取 DNA。

1.5 蛭弧菌与化学消毒剂对于虾池水体弧菌数量消长的比较

实验地点为海南省陵水县海富公司黎安虾场。选取 4 个相邻的圆角方形虾池,分别编号为 1、2、3 和 4 号

池,每个池面积 667m²,均为水泥护坡、防渗膜铺底的提水式高位池。投放同一批经检测不带 WSSV、TSV 和 IHNV 的凡纳滨对虾虾苗,密度均为 100 尾/m²。养至第 50 天时,取水测定水体弧菌的活菌总浓度(每次每池取两个中下层水样,取平均值,下同),然后进行如下实验:

1 号池全池泼洒二氯异氰尿酸钠(含有效氯 47%),开动培养机混匀,使终浓度约为 0.3mg/L;2 号池全池泼洒季胺盐络合碘(含有效碘 35%),使终浓度约为 0.3mg/L;3 号池全池泼洒蛭弧菌浓缩增菌液(江苏南京威特生物公司提供,蛭弧菌浓度约 10¹¹ PFU/ml)使池水中蛭弧菌的浓度达到约 10⁵ PFU/ml;4 号池为对照池。次日开始取水样检测水体弧菌的活菌总浓度,每隔 3d 测 1 次,共测 7 次。

1.6 蛭弧菌预防对虾弧菌感染的应用效果

实验地点及池塘同上,每 14 d 按上述方法分别处理 1 次。7 d 后起,每 7 d 分别从各池随机取虾 10 尾,连续 56 d,分别用 TCBS 平板从肝胰腺及淋巴液划线接种,检测对虾体内弧菌的有无,最后比较各池间差异的显著性。

2 结果

2.1 蛭弧菌的 PCR 检测

图 1 是标准蛭弧菌(Bd-109-J)、供试菌株(Bd-9913)及浓缩增菌液的 PCR 检测结果。所有菌株能产生显著的 830bp 特异条带,所扩增的片段为蛭弧菌 16S rRNA 基因特殊片段,证实供试菌与标准菌株同属一种菌。空白样无此片断扩增。

2.2 蛭弧菌对宿主的裂解

图 2 是蛭弧菌供试菌株 Bd-9913 对 4 种宿主菌的裂解效果。从结果可以看出,裂解效果最好的是 *E. coli* CH-42(d),7d 宿主菌浓度下降了 6 个数量级;溶藻弧菌 LS01 也能较好被裂解,第 2 天开始宿主菌浓度开始下降,至第 7d 下降了 4 个数量级(a);HF09 株次之,7d 下降了 3 个数量级(b);副溶血弧菌 V28 被裂解效果最差,实验期间仅降低了两个数量级(c)。蛭弧菌的增菌效果与裂解效果一致。

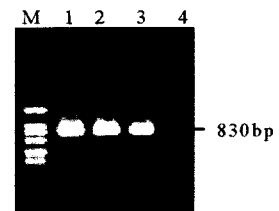
2.3 蛭弧菌对凡纳滨对虾的安全性

经 14d 的观察,在饲料中添加蛭弧菌噬菌斑浸出液,对于凡纳滨对虾没有造成表征异常,实验组与对照组死亡数没有差异(表 1),每组死亡的 1~2 尾对虾均为吸污操作时失误造成。第 4 天和第 14 天对粪样的 PCR 检测结果(图 3)表明,第 4 天实验组粪样中可检测到蛭弧菌存在(对照组无),第 14 天各组肠道粪样中均检测不到蛭弧菌。

2.4 蛭弧菌与化学消毒剂对于虾池水体弧菌数量消长的比较

从图 4 各池水体弧菌活菌总浓度(Concentration of Live Vibrios, CLV)的变化可以看出,处理之前,各池弧菌数相当,约为 10⁴ 数量级,经化学消毒剂处理,第 2 天水体弧菌急剧降低,分别达到 10² 左右的低水平,然而接下来的 14d 水体弧菌数直线上升,第 10 天已经恢复到处理前的水平,14d 以后已经超过处理前的浓度,并且,使用二氯异氰尿酸和使用季胺盐络合碘处理后的变化十分相似。

使用 10⁵ PFU/ml 蛭弧菌,亦可以明显降低水体弧菌含量,弧菌浓度下降的速率较之化学消毒剂缓慢,7d 左右达到最低,浓度对数值约为 2.8,接下来的 14d 逐渐增加,到实验结束(处理后第 20 天)时,水体弧菌浓度仍然保持在 10³ 数量级,比处理前浓度降低 1 个数量级。



M: 分子量标记; 1: Bd109-J; 2: Bd-9913; 3: 浓缩增菌液; 4: 空白样

M: molecular mass marker; 1: Bd109-J; 2: Bd-9913; 3: Condensed sample; 4: Negative Control

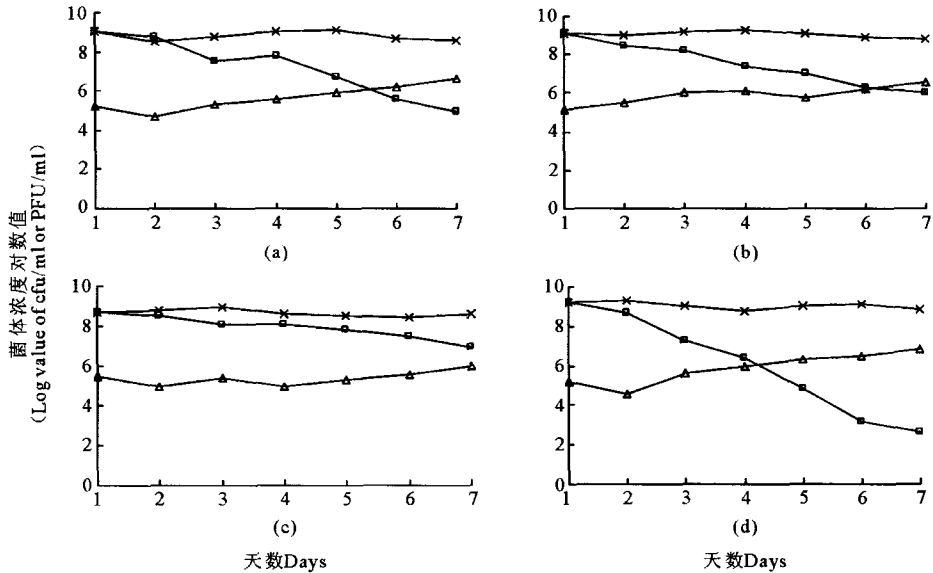
图 1 蛭弧菌的 PCR 检测

Fig. 1 PCR detection of *Bdellovibrios*

表1 凡纳滨对虾口服蛭弧菌后14d死亡情况

Table 1 Mortality of white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* in 14days by the *Bdellovibrios* oral administration

实验组别 Treatment	实验对虾数 Numbers of shrimp larvae	添加于饲料的蛭弧菌浓度 Concentration of <i>Bdellovibrio</i> suspension mixed into feed(PFU/ml)	14d内对虾死亡数 Numbers of death in two weeks
Bd-109J	15	3.5×10^5	1
Bd-9913	15	2.5×10^5	2
Control	15	—	2



(a)溶藻弧菌 LS01; (b) 溶藻弧菌 HF09; (c) 副溶血弧菌 V28; (d) 大肠埃希氏菌 CH-42

—x—对照宿主, —□—裂解宿主, —△—Bd-9913

(a)*Vibrio alginolyticus* LS01 (b)*V. alginolyticus* LS01 (c)*V. alginolyticus* HF09 (d)*E. coli* CH-42

—x—host control, —□—host lysis, —△—Bd-9913

图2 蛭弧菌供试菌株 Bd-9913 对4种宿主菌的裂解效果

Fig. 2 The lytic ability of BD-9913 to some hosts

对照组第7天弧菌数量上升,第14天下降,第21天又上升,但浓度变化的幅度不大,均保持在 10^4 数量级左右的较高水平。

2.5 蛭弧菌预防对虾弧菌感染的效果

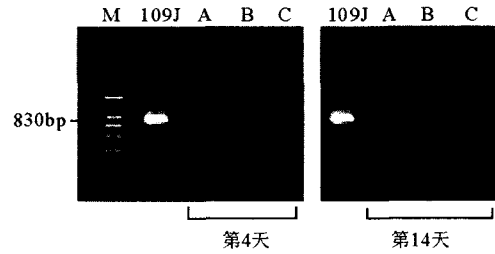
在56d时间内连续跟踪调查了实验虾池对虾体内弧菌感染情况,结果如表2。从表2中数据可以看出,3个处理池(A、B、C)分离到弧菌的对虾数明显低于没有处理的对照池(D),但各处理组从肝胰腺分离到弧菌的数量差异不显著,从血淋巴分离到弧菌的对虾数,则是蛭弧菌处理池数量最少,显著低于其他池。且各池从淋巴液分离到弧菌的对虾数量均低于从肝胰腺分离到弧菌的对虾数。

3 讨论

以前关于蛭弧菌的鉴定,主要是依靠显微镜或电镜下的形态观察,并结合其DNA的GC摩尔百分比作为分类依据,如按照GC含量50.4%和43%的不同分为两类。2000年,Edouard等(2006)在对蛭弧菌16S rRNA序列测定及比较后,设计了多组针对蛭弧菌16SrDNA特有基因序列的引物对,可以将现有的几种蛭弧菌方

便地加以区分鉴别。本研究采用的引物对 63F 和 842R 为蛭弧菌 PCR 鉴定的通用引物对,扩增的 830bp 特异条带清晰,ATCC 标准菌株、国内购买实验菌株及蛭弧菌浓缩液检测结果一致,证明了本实验使用蛭弧菌菌株的可靠性。

菌株 BD-9913 对大肠埃希氏菌 CH-42 株的裂解效率最高,而对其他 3 株菌的裂解效果较差,可能主要与 BD-9913 来自陆生环境,而 3 株对虾病原菌均分离自海水环境有关。相反,Taylor 等(1974)从海水分离的蛭弧菌菌株,对于大多数海洋细菌以及陆生细菌都能裂解,但是对少数陆生菌株裂解效率也较弱。Takubo 等(1989)认为,这可能主要与宿主表面结构及蛭弧菌的识别系统存在差异有关。所以,针对不同的使用对象,应该选择特异性较强的蛭弧菌菌株,才有可能达到控制潜在病原菌的目的。



M: 分子量标准; A: Bd109-J; B: Bd9913; C: Control
M: molecular marker; A: Bd109-J; B: Bd9913; C: Control

图 3 蛭弧菌饲喂凡纳滨对虾后第 4~14 天粪样检测结果

Fig. 3 Results of *Bdellovibrio* detected from feces of white leg shrimp, *Litopenaeus vannamei* at day 4 and 14 after oral administration

表 2 凡纳滨对虾经不同水体处理后感染弧菌情况比较

Table 2 Comparison of *Vibrio* isolated from white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* after different ways of water disinfection

池号 Pond No.	水处理方式 Manner of water treatment	处理浓度 Concentration of treatment	被检测对虾数 Number of test shrimps	肝胰腺分离到弧菌的对虾数 Number of shrimps with vibrios isolated from the hepatopancreas	血淋巴分离到弧菌的对虾数 Number of shrimps with vibrios isolated from the hemolymph
A	含氯制剂 Chlorinic solution	0.3mg/L	80	25 ^a	20 ^a
B	含碘制剂 Iodinic solution	0.3mg/L	80	28 ^a	21 ^a
C	蛭弧菌 <i>Bdellovibrios</i>	105 PFU/ml	80	26 ^a	12 ^b
D	对照 Control	—	80	47 ^c	31 ^c

a, b 示不同差异显著性类别, a 为差异不显著 ($P > 0.1$), b 为差异显著 ($P > 0.05$), c 为差异极显著 ($P < 0.01$)

蛭弧菌对于食源性动物的安全性是普遍重视的问题。以前有文献报道,从蛙的肠道、马的粪便以及正常人的肠道中均分离到蛭弧菌 (Westergaard *et al.* 1977)。本实验通过 Bd-109J 和 Bd-9913 对凡纳滨对虾的饲喂实验,第 4 天(即实验组连喂 3d 后次日)从实验组对虾的粪样中可检测到蛭弧菌的存在,但第 14 天实验结束时则检测不到,且 14d 内实验组对虾没有出现外观症状及显著死亡,说明 10^5 PFU/ml 浓度的蛭弧菌 Bd-109J 和 Bd-9913 菌株,对于体重 3~5g 的凡纳滨对虾是安全的。至于不同菌株、不同浓度对不同种类和大小对虾的生物安全性如何有待深入研究。

含氯化合物和含碘化合物是水产养殖中经常使用的化学消毒剂,低浓度水体消毒多用于降低水体细菌的浓度,预防细菌性疾病的发生 (Boyd 1996)。对于虾类养殖,则主要是预防弧菌病的发生。但是,由于此类化学消毒剂毒性强烈,使用时不仅杀死有害细菌,同时杀死各种藻类以及浮游动、植物,严重破坏水体生态平衡 (Huang *et al.* 1997; 刘 萍等 1997)。如果使用不当,甚至直接造成对虾的伤害,影响虾类生长 (Boyd 1996)。另外,可能是由于经常使用此类化学消毒剂的缘故, Mir 等(1997)发现有些病原菌对于氯已经产生了

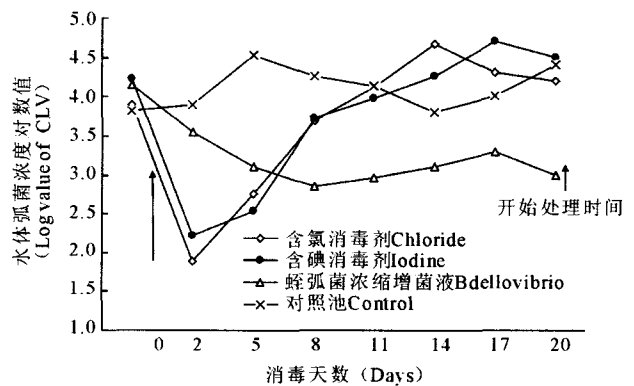


图 4 蛭弧菌与化学消毒剂对水体弧菌的控制效果比较

Fig. 4 CLV change in 20 days after different disinfectant treatment

较强的抵抗力。

蛭弧菌对于宿主的裂解实验结果与杨淑专等(1997)和杨莉等(2000)的结果近似,对于主要虾类病原菌都有很强的裂解效应,显示了很好的应用前景,如果使用蛭弧菌选择性地杀灭水体病原菌,则不会造成水体生态平衡的严重破坏。尽管蛭弧菌在自然环境中的分布极为广泛,但 Williams 等(1994)的研究结果表明,蛭弧菌要在水体中起到杀灭病原菌的效果,宿主菌的浓度要达到 10^8 PFU/ml 以上的数量级,除了污水中病原菌有可能达到这一浓度外,一般的自然水体环境几乎不可能达到。本研究结果表明, 10^5 PFU/ml 的试验菌株浓度,可以显著降低虾池水体弧菌活菌浓度,较之化学消毒剂作用温和,且维持的时间长两倍以上,可能是在虾类养殖中期细菌浓度较高的特殊水体环境才有的效果。

当以 100 尾/ m^2 的密度放养凡纳滨对虾,50d 时水体弧菌浓度已经达到或超过 10^4 CFU/ml,使用二氯异氰尿酸钠和季胺盐络合碘进行水体消毒,弧菌浓度于第 2 天即降至 10^2 CFU/ml 以下。可能由于此类化合物较易挥发,加上杀死了大量浮游动、植物,使水体中可以被细菌利用的有机物的含量增加,所以 7d 以后水体弧菌浓度直线上升,14d 以后,甚至超过消毒前的浓度。相比之下,蛭弧菌抑制水体弧菌浓度显示了更好的稳定性,实验期间,均维持在 10^3 CFU/ml 左右水平。如果进一步筛选适合特定养殖环境的菌株,添加更高的浓度,有可能达到更佳的抑菌效果。

有研究表明,对虾体内分离到弧菌与否,是对虾感染弧菌的直接证据,也是弧菌病发生的前兆(Sung *et al.* 1999)。本实验结果显示,经蛭弧菌与化学消毒剂处理水体后,从肝胰腺分离到弧菌的对虾数差异不显著,即两种处理的效果相当;但是,从血淋巴分离到弧菌的对虾数蛭弧菌组明显少于化学消毒剂组,这一结果说明蛭弧菌处理水体较之化学消毒剂具有更好的预防弧菌感染的效果。尽管导致这种差异的原因有待进一步研究,但是我们相信,如果筛选特异性更强的裂解对虾病原弧菌的蛭弧菌菌株,可能对于虾类弧菌感染会有更好的控制效果。

参 考 文 献

- 司稚东,秦生巨,秋 频,张贤良,郭和厚. 1982. 细菌的寄生菌——噬菌蛭弧菌的研究. 中华微生物学和免疫学杂志,2(1):12~15
- 刘 萍,李 健,孙修涛,刘得月. 1997. 对虾病害防治药物对浮游植物的影响研究. 海洋水产研究,18(1):34~41
- 杨 莉,马志宏,黄 文,王秀茹,高 傲. 2000. 蛭弧菌对鲤感染嗜水气单胞菌预防效果的观察. 大连水产学院学报,15(4):288~292
- 杨淑专,黄庆辉. 1997. 海洋噬菌蛭弧菌对对虾病原菌及其他细菌的寄生作用. 厦门大学学报,36(3):449~453
- 杨少丽,王印庚,董树刚. 2005. 海水养殖鱼类弧菌病的研究进展. 海洋水产研究,26(6):75~83
- 郑国兴. 1986. 养殖对虾弧菌病致病菌——非 O1 群霍乱弧菌的生物学性状与致病性. 水产学报,10(2):195~203
- 郑国兴,沈亚林,李 何. 1990. 中国对虾病原菌(鳃弧菌)的研究. 水产学报,14(1):1~6
- 战文斌,周 丽,俞开康,陈章群,孟庆显. 1997. 一种新的中国对虾弧菌病原——产气弧菌. 海洋与湖沼,28(1):21~26
- 徐 琴,李 健,刘 淇,王 群. 2007. 嗜菌蛭弧菌和粘红酵母对中国对虾生长及非特异免疫因子的影响. 海洋水产研究,28(5):42~47
- 陶宝华,胡超群. 2000. 弧菌疫苗对斑节对虾和日本对虾免疫预防的作用. 水产学报,24(6):564~569
- 盖春蕾,李 健,刘 淇. 2008. 二氟沙星对 3 种海洋弧菌的抗菌后效应研究. 海洋水产研究,29(2):97~101
- Boyd, C. E. 1996. Chlorination and water quality in aquaculture ponds. World Aquaculture, 27: 41~45
- Edouard, J., Minz, D., Ramati B., and Gili, B. 2000a. Prey range characterization, ribotyping, and diversity of soil and rhizosphere *Bdellovibrio* isolated on phytopathogenic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2 365~2 371
- Edouard, J., and Ramat, B. 2000b. Design and uses of *Bdellovibrio* 16S rRNA-targeted oligonucleotides. FEMS Microbiol. Lett. 184: 265~271
- Huang, J., Wang, L., Ren, N., Liu, X. L., Sun, R. F., and Yang, G. 1997. Disinfection effect of chlorine dioxide on viruses, algae and animal planktons in water. Water Research, 31: 455~460
- Ishimaru, K. M., Akagawa-Matsushita, and Muraga, K. 1995. *Vibrio penaeicida* sp. nov., a pathogen of kuruma prawn (*Penaeus japonicus*). Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 134~138
- Itami, T., Takahashi, Y., and Nakamura, Y. 1989. Efficacy of vaccination against vibriosis in cultured kuruma prawn *Penaeus japonicus*. J. Aquat. Anim. Health, 1: 238~242
- Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G. R., and Karunasagar, I. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. Aquaculture, 128: 203~209
- Klein, D. A., and Casida, L. E. J. 1967. Occurrence and enumeration of *Bdellovibrio bacteriovorus* in soil capable of parasitizing *Escherichia coli*

- and indigenous soil bacteria. *Can. J. Microb.* 13:1 235~1 241
- Lavilla-Pitogo, C. R., Baticados, M. C., Cruz-Lacierda, E. R. *et al.* 1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture*, 91: 1~13
- Lightner, D. V. 1993. Diseases of cultured penaeid shrimp. In: *Handbook of Marineculture, Crustacean Aquaculture*, Mcvey, J. P. Ed. CRC Press, 1: 393~486
- Lightner, D. V. 1988. *Vibrio* diseases of cultured penaeid shrimp. Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, vol. 6, 2nd revised edition. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, The Netherlands, 42~47
- Luo, P., Hu, C., Zhang, L., Ren, C., and Shen, Q. 2007. Effects of DNA extraction and universal primers on 16S rRNA gene-based DGGE analysis of a bacterial community from fish farming water. *Chin. J. Ocean. Limn.* 25:310~316
- Mir, J., Morato, J., and Ribas, F. 1997. Resistance to chlorine of freshwater bacterial strains. *J. Appl. Microb.* 82:7~18
- Ripabelli, G., Sammarco, M. L., and Grasso, G. M. *et al.* 1999. Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* (Mussels) harvested from Adriatic Sea, Italy. *Intern. J. Food Microb.* 49. 43~48
- Schoeffield, A. J., and Williams, H. N. 1990. Efficiencies of recovery of *Bdellovibrios* from brackish-water environments by using various bacterial species as prey. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 230~236
- Rendulic, S., Jagtap, P., Rosinus, A., Eppinger, M., Baar, C. *et al.* 2004. A predator unmasked: Life cycle of *Bdellovibrio bacteriovorus* from a genomic perspective. *Science*, 303: 689~692
- Song, Y. L., Cheng, W., Shen, C. H. *et al.* 1990. Occurrence of *Vibrio vulnificus* infections in cultured shrimp and eel in Taiwan. *J. Invert. Path.* 59: 18~23
- Sung, H. H., Yang, Y. L., and Song, Y. L. 1996. Enhancement of microbicidal activity in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) via immunostimulation. *J. Crust. Biol.* 16:279~285
- Sung, H. H., Li, H. Ch., Tsai, F. M., Ting, Y. Y., and Chao, W. L. 1999. Changes in the composition of *Vibrio* communities in pond water during tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultivation and in the hepatopancreas of healthy and diseased shrimp. *J. Exper. Mari. Biol. and Ecol.* 236, 261~271
- Takubo, Y., Nishimura, Y., Zytoon, E. M., Nishihara, T., and Kondo, M. 1989. Isolation of the saprophytic strain of MC-3 and participation of the cell surface structure in predation. *Microbiol. Immu.* 33:1 053~1 057
- Taylor, V. L., Paul, B., John, L. R., and Richard, D. A. 1974. Isolation, enumeration, and host range of marine *Bdellovibrios*. *Arch. Microbiol.* 98: 101~114
- Westergaard, J. M., and Kramer, T. T. 1977. *Bdellovibrio* and the intestinal flora of vertebrates. *Appl. and Environ. Microb.* 34:506~511
- Williams, H. N., and Falkler, W. J. 1984. Distribution of *Bdellovibrios* in the water column of an estuary. *Can. J. Microb.* 30:971~974
- Williams, H. N., Falkler, W. J., and Shay, D. E. 1994. Incidence of marine bdellovibrios lytic against *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microb.* 40:970~972