

DOI: 10.12264/JFSC2020-0561

杀鱼假交替单胞菌 2515 的抗弧菌效果及在对虾养殖中的应用

王枫林^{1,2}, 王秀华^{2,3}, 张宇哲², 王树茂², 朱娜²

1. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;
2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室, 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室, 山东 青岛 266071;
3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071

摘要: 为探讨一株杀鱼假交替单胞菌 2515 *Pseudoalteromonas piscicida* (简称菌株 2515) 在对虾养殖中的抗弧菌效果, 以鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)为指示菌, 以鳃弧菌的敏感抗生素新霉素为参比, 采用牛津杯打孔法, 比较了菌株 2515 与抗生素抗菌等效关系。设置浓度分别为 10^4 CFU/mL、 10^5 CFU/mL、 10^6 CFU/mL、 10^7 CFU/mL 的菌株 2515 与鳃弧菌共培养, 评价了该菌对鳃弧菌的拮抗效果。将含量 10^3 CFU/g、 10^5 CFU/g、 10^7 CFU/g, 及 10^3 CFU/mL、 10^5 CFU/mL、 10^7 CFU/mL 的菌株 2515 分别添加到对虾饲料和养殖水体中, 养殖凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*), 分析了菌株 2515 对水体和对虾肠道细菌总数、弧菌数及对抗副溶血弧菌效果的影响。结果显示, 相同抗鳃弧菌效果条件下菌株 2515 数量与新霉素质量存在对应关系, 与鳃弧菌混合培养时, 浓度 10^6 CFU/mL 及 10^7 CFU/mL 的菌株 2515 对鳃弧菌表现出强的抑菌作用。饲料中添加菌株 2515 浓度 10^5 CFU/g 及 10^7 CFU/g 时能够显著降低对虾肠道中的弧菌数量($P < 0.05$), 提高对虾养殖的存活率。采用副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)攻毒, 显示在饲料中添加菌株 2515 浓度为 10^5 CFU/g 一组对虾死亡率最低, 为 $(43.3 \pm 5.8)\%$, 对副溶血弧菌的相对保护率达 $(53.7 \pm 6.2)\%$ 。结果表明, 在饲料和养殖水体中添加适宜浓度的菌株 2515 均能够提高凡纳滨对虾抗副溶血弧菌的能力, 降低对虾肠道内的弧菌数量。本研究结果为对虾养殖弧菌病生物防控提供了一种技术支撑。

关键词: 杀鱼假交替单胞菌; 拮抗; 副溶血弧菌; 凡纳滨对虾; 肠道

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)07-0903-11

近年来, 弧菌病暴发严重制约了水产养殖业的健康发展, 给养殖对虾、鱼类、贝类及海参等产业的发展带来极大的危害^[1-6]。对虾急性肝胰腺坏死病(acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)是由携带 *pirABvp* 基因的弧菌引起的一类细菌性疾病, 对亚洲和拉丁美洲等国家对虾养殖业带来了巨大经济损失^[7-10]。由于导致 AHPND 的弧菌多具有较强的耐药性^[11], 目前尚缺少有效的防控措施。

假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp.)广泛分布在海洋环境中, 能够分泌抑菌、溶藻、杀菌及降解纤维素等生物活性的化合物^[12-14]。杀鱼假交替单胞菌(*P. piscicida*)为其中的一个种, 能分泌大分子蛋白、小分子化合物等广谱抗菌活性物质^[15-16], 用该菌作益生菌通过卤虫作为载体投喂对虾幼体, 能够提高对虾生长率、存活率及肠道总菌数^[17], 表明该菌在对虾疾病防控中具有较好开发应用潜能。

收稿日期: 2020-12-14; 修订日期: 2021-01-03.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFD0900105-4); 科技助力经济 2020 重点专项(SQ2020YFF0425682); 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费项目(20603022018001); 广西创新驱动发展专项(桂科 AA17204044); 中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2020TD39).

作者简介: 王枫林(1994-), 男, 硕士研究生, 研究方向为对虾疾病防控及益生菌开发. E-mail: 781274730@qq.com

通信作者: 王秀华, 研究员. E-mail: wangxh@ysfri.ac.cn

杀鱼假交替单胞菌 2515, 为从虾池中分离的一株病原拮抗菌, 前期研究发现该菌具有广谱的抗弧菌特性^[18], 对对虾血细胞不具有溶血活性, 用于对虾育苗对成活率无显著影响^[19]。本研究为了探讨该菌在对虾养殖中的应用前景, 模拟了该菌在养殖水体中抗弧菌效能, 探讨了将该菌用于对虾养殖水体及添加到饲料中的应用效果, 以期菌株 2515 在弧菌病害防控中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验用虾 实验用凡纳滨对虾购自山东日照某对虾养殖场, 虾苗体长(5.4±0.6) cm, 体重(2.2±0.7) g。实验前暂养 7 d, 日吸污 1 次, 换水 30%, 投喂 3 次, 投喂量为对虾体重的 3%。养殖期间水温 26~29 °C, 盐度 32, pH 7.8±0.5, 连续充气。

1.1.2 实验用菌 杀鱼假交替单胞菌 2515、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)3101 和副溶血弧菌(*V. parahemolyticus*)1002 均为作者实验室分离保藏。

1.1.3 菌株 2515 发酵液的制备 挑取活化后的菌株 2515 单菌落接种于液体 2216E 培养基中, 28 °C, 150 r/min 摇床培养 24 h 后, 平板涂布法测定发酵液浓度, 部分发酵液用于配制饲料, 部分发酵液 6000×g 离心 10 min, 弃上清液, 沉淀用 PBS 缓冲液重悬后, 稀释成浓度为 1×10⁹ CFU/mL 菌悬液备用。

1.2 饲料的制备

将南美白对虾商品饲料粉碎后, 按照含量水平 0、1×10³ CFU/g、1×10⁵ CFU/g、1×10⁷ CFU/g 添加菌株 2515 发酵菌液, 以 1%褐藻酸钠为黏合剂, 重新制成对虾颗粒饲料, 晾干后放在 4 °C 保存。

1.3 菌株 2515 胞内外活性物质抑菌活性及抗菌效能

1.3.1 胞外活性物质的制备 采用玻璃纸覆盖平板法制备菌株 2515 的胞外产物^[20], 将菌株 2515 接种于 2216E 斜面上, 28 °C 培养过夜后, 转接于 2216E 液体培养基中, 28 °C 培养 18 h 后, 取 0.1 mL 菌株 2515 菌悬液均匀涂布于表面覆盖有

无菌玻璃纸的平板上, 28 °C 恒温培养 36 h 后, 取出玻璃纸用 PBS 缓冲液将玻璃纸上的菌苔洗下来, 收集于 1.5 mL 离心管中制成菌悬液, 测其浓度 1.3×10¹⁰ CFU/mL, 取菌悬液 1.5 mL, 4 °C 离心(12000×g, 10 min), 上清液经 0.22 μm 孔径的细菌过滤器过滤除菌后收集于 1.5 mL 无菌离心管中 4 °C 储藏备用。收集下层菌体, 用于制备胞内活性物质。

1.3.2 胞内活性物质的制备 取 1.3.1 离心后获得的菌体, 用 PBS 缓冲液洗涤 2 次后, 加 10 mL PBS 缓冲液重悬, 使其终浓度为 2×10⁹ CFU/mL, 用超声波细胞破碎仪破碎 10 min (150 W), 使菌液澄清。澄清菌液经 0.22 μm 孔径的细菌过滤器过滤除菌, 即获得细胞内容物。

1.3.3 菌株 2515 胞内外抗菌物抗菌活性定性测试 取 100 μL 鳃弧菌菌悬液(浓度为 10⁷ CFU/mL)均匀涂布于 2216E 平板上, 利用牛津杯在培养基上等距打 4 个孔, 其中 2 个孔分别加入 50 μL 菌株 2515 胞内及胞外样品, 另 2 个孔分别加入新霉素抗生素(浓度为 1 mg/mL)为阳性对照, 无菌 PBS 缓冲液为阴性对照, 设置 3 个平行, 28 °C 培养 24 h, 采用十字交叉法测量抑菌圈直径大小:

抑菌圈直径=测量直径-牛津杯直径

1.3.4 菌株 2515 抗菌效能

鳃弧菌敏感药物的筛选 采用药敏纸片扩散法^[21], 以鳃弧菌为指示菌(浓度 10⁷ CFU/mL), 将 16 种抗生素药敏纸片(表 1)均匀贴于培养基表面, 每种药敏片 3 组平行, 28 °C 恒温培养箱培养 24 h 后, 采用十字交叉法测量抑菌圈直径。根据杭州微生物试剂有限公司提供的药敏试验纸片法的抑菌范围解释标准判读结果。

菌株 2515 抗菌效能 准确称取新霉素(购于 Sigma) 0.1 g 溶于 1 mL PBS 缓冲液中, 配制成 1×10⁵ μg/mL、2×10⁴ μg/mL、4×10³ μg/mL、8×10² μg/mL 及 1.6×10² μg/mL 5 个梯度。同时, 将制备好的菌株 2515 胞内外物质做 2、4、8 及 16 倍稀释, 参照 1.3.3 方法, 以鳃弧菌为指示菌, 测定不同稀释浓度的新霉素及菌株 2515 胞内外物质抗菌效果。分析相同抗菌效果条件下, 菌株 2515 细菌数与新霉素量的对应关系。

1.4 菌株 2515 对鳗弧菌的相对去除率

从某养殖场取养殖池水(pH7.4、盐度 25.5、弧菌浓度 8×10^2 CFU/mL, 总菌浓度 4×10^4 CFU/mL), 先用脱脂棉过滤除去杂质, 然后将水体用 $1 \mu\text{m}$ 滤膜进行过滤, 最后高温灭菌, 除去杂菌备用。

取 500 mL 三角烧瓶 18 个, 分别加 300 mL 处理好的养殖水体, 添加菌株 2515, 使其终浓度分别为 10^4 CFU/mL、 10^5 CFU/mL、 10^6 CFU/mL 及 10^7 CFU/mL, 每瓶再添加浓度为 10^5 CFU/mL 的鳗弧菌, 同时设置仅添加菌株 2515 组(浓度 10^6 CFU/mL)及仅添加鳗弧菌组(浓度 10^5 CFU/mL)为菌株 2515 与鳗弧菌的正常培养对照, 每组设 3 个平行, 28°C , 150 r/min 培养。在 1、2、3、4、6 d 取水样均匀涂布于 2216E 平板及 TCBS 平板上, 每组 3 个平行, 28°C 恒温培养箱中过夜培养后, 在 2216E 平板中统计菌株 2515 菌落数(菌株 2515 为黄色菌落)、TCBS 平板统计鳗弧菌菌落数(菌株 2515 在 TCBS 平板上不生长)。

1.5 对虾养殖实验分组及日常管理

实验设置 7 个组, 其中饲料加菌组 3 个, 分别为投喂含菌株 2515 浓度为 1×10^3 、 1×10^5 及 1×10^7 CFU/g 饲料; 水体加菌组 3 个, 养殖水体中菌株 2515 的初始浓度为 1×10^3 、 1×10^5 及 1×10^7 CFU/mL, 仅在实验开始时接种一次, 对照组不添加菌液, 投喂菌株 2515 浓度 0 CFU/g 的饵料, 每组设置 4 个平行(其中 1 个用于取样后提供补充用虾)。养殖实验用水槽为有效水体 10 L 底部为圆锥型的特制塑料桶, 底部设有粪便收集室, 每个平行养殖 20 尾对虾, 模拟高密度养殖(养殖密度相当于 $1000 \text{ 尾}/\text{m}^3$)。

试验期间每日投喂 3 次, 投喂量为对虾体重的 3%, 每天早 8:00 从桶底部排出残饵和粪便 1 次, 整个养殖期间不换水, 连续充气, 每天观察对虾的摄食情况及存活情况, 对死亡的对虾进行记录, 计算存活率:

存活率(%) = $100\% \times \text{实验结束存活尾数} / \text{实验初始尾数}$

1.6 菌株 2515 对凡纳滨对虾肠道及养殖水体中细菌总数及弧菌数的影响

实验开始后的第 1、4、7 天测定对虾肠道弧

菌和细菌总数, 测定方法参考李继秋^[22]的方法。在对虾养殖的第 1、4、7 天分别从各实验组和对照组随机取虾 3 尾, 在无菌操作台中, 用 75% 的酒精擦拭对虾体表后取出对虾的全肠, 去除粪便后, 精确称重, 并置于 1.5 mL 无菌 EP 管中, 加入肠道体重 10 倍的 PBS 缓冲液, 用无菌研磨棒充分研磨, 再依次用 PBS 缓冲液以 10 倍梯度稀释, 各取 100 μL 均匀涂布于 2216E 和 TCBS 平板上, 每个平板 3 组平行, 28°C 培养 24 h, 统计并计算每克肠道中细菌总数及弧菌总数。

同时取实验组和对照组水样置于 1.5 mL 无菌 EP 管内, 梯度稀释后按同样的方法涂布至 2216E 和 TCBS 的平板, 28°C 培养 24 h 后统计水体中细菌总数及弧菌总数。

1.7 对虾攻毒及保护率

副溶血弧菌菌液的制备 挑取活化后的菌株 1002 单菌落接种于装有 300 mL 2216E 液体培养基的锥形瓶中, 28°C 培养 24 h, 将发酵液 $6000 \times g$ 离心 10 min, 弃上清, 沉淀用 PBS 重悬并稀释成浓度 1×10^9 CFU/mL 的菌悬液备用。

浸泡感染实验 对虾养殖至第 7 天, 从各对虾养殖实验组随机挑选对虾 30 尾, 养殖于水体 10 L 的水族箱内, 加入菌株 1002 悬液, 使其浓度为 4×10^6 CFU/mL, 每个实验组设置 3 个平行, 每个平行用 10 尾对虾, 攻毒 12 h 后各攻毒组添加养殖用水 10 L 稀释, 之后每天换水 30%, 感染后的第 2 天正常投喂相应组的饲料, 管理与养殖期间相同, 及时清出死虾, 统计并记录死亡对虾数量, 实验至各组对虾数量稳定后 3 d 停止, 计算相对保护率:

相对保护率(RPS) = $[1 - (\text{实验组死亡率} / \text{对照组死亡率})] \times 100\%$

1.8 饲料中细菌的鉴定

饲料制备 24 h 后, 取添加不同浓度菌株 2515 的饲料各 1 g 分别研磨成粉, 加入 10 mL PBS 缓冲液, 浸泡 2 h, 用 $5 \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 过滤液再经过 $1 \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 取 100 μL 过滤液涂布于 2216E 固体培养基。将涂布好的平板在恒温培养箱 28°C 培养 24 h 后, 根据黄色菌落的不同形态, 分别统计菌落数, 并挑取不同形态黄色单菌落进行分离

纯化, 并对其鉴定。

1.9 数据处理及统计分析

实验数据采用 Excel 和 SPSS 软件辅助进行统计分析, 数据取平均值±标准误差($\bar{x} \pm SD$, $n=3$), 使用 SPSS(23.0)分析软件对数据进行单因素方差分析, 当差异显著时, 用 Duncan 检验法进行多重比较($P<0.05$ 认为差异显著)。

2 结果与分析

2.1 菌株 2515 胞内外抗菌物抗菌活性

菌株 2515 经培养 36 h 之后, 测其胞内外抗菌物质对鳃弧菌的拮抗效果见图 1, 可知菌株 2515 胞内和胞外均含有抑菌物质, 对鳃弧菌具有较强的抑菌效果, 等同于新霉素的抑菌效果。

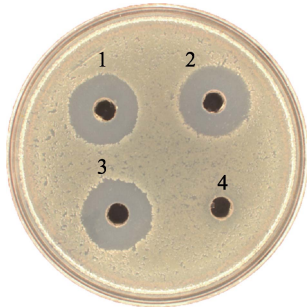


图 1 菌株 2515 胞内外物质抑菌效果
1: 胞内物质; 2: 胞外物质; 3: 新霉素; 4: PBS.
Fig. 1 Antibacterial effect of intracellular and extracellular substances of strain 2515
1: Intracellular substances; 2: Extracellular substances; 3: Neomycin; 4: PBS.

2.2 菌株 2515 抗菌效能

以鳃弧菌为受试菌, 分析鳃弧菌敏感性药物, 结果见表 1, 筛选抑菌圈最大的新霉素为参比用抗生素, 用于定量评价菌株 2515 的抗菌活性。通过设置不同浓度的新霉素测定其对鳃弧菌的抑菌大小, 得新霉素的质量数与抑菌圈大小的关系为 $y = 0.1071x + 0.6818$ (y 为新霉素质量对数值, x 为抑菌圈直径, $R^2=0.9917$)。分析不同浓度菌株 2515 胞内外抗菌物质的抑菌圈大小, 得菌株 2515 的细菌数与新霉素量的对应关系曲线如图 2 所示, 由图 2 可以推算相同抗菌效果时菌株 2515 数量与新霉素质量对应关系。

表 1 鳃弧菌的敏感性药物筛选
Tab. 1 Screening of sensitive drugs for *Vibrio anguillarum*

抗生素 antibiotics	药片浓度/ ($\mu\text{g}/\text{片}$) content	抑菌圈直径/mm diameter inhibition zone	敏感性 sensitivity
多黏菌素 B polymyxin B	300U	14.9	S
氯霉素 chloramphenicol	30	14.7	I
青霉素 penicillin	10	0.0	R
氧氟沙星 ofloxacin	5	7.3	R
新霉素 neomycin	30	21.5	S
多西环素 doxycycline	30	0.0	R
卡那霉素 kanamycin	30	21.1	S
红霉素 erythromycin	15	0.0	R
哌拉西林 piperacillin	100	18.0	I
头孢他啶 ceftazidime	30	19.8	S
头孢唑林 cefazolin	30	0.0	R
头孢呋辛 cefuroxime	30	15.5	I
头孢哌酮 cefoperazone	75	20.9	I
呋喃唑酮 furazolidone	300	11.0	R
米诺环素 minocycline	30	12.5	R
诺氟沙星 norfloxacin	10	0.0	R

注: R 为耐药, I 为中度敏感, S 为敏感。
Note: R, I, S means resistant, intermediate and sensitive, respectively.

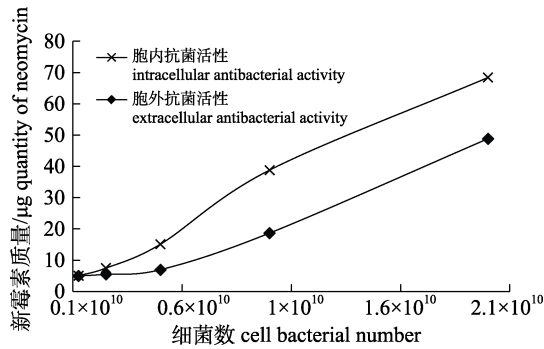


图 2 相同抗鳃弧菌效果条件下菌株 2515 数量
与新霉素质量的对应关系

Fig. 2 Relationship between the cell number of strain 2515 and the quality of neomycin under the same antibacterial effect against *Vibrio anguillarum*

2.3 不同浓度菌株 2515 对鳃弧菌的拮抗效果

不同浓度菌株 2515 与鳃弧菌共培养后, 对鳃弧菌的拮抗效果见图 3, 混合培养的前 3 d, 除了 10^7 CFU/mL 组浓度有升高外, 其他各组中菌株 2515 浓度均能保持稳定状态, 之后各组浓度略有下降。自共培养的第 1 天开始, 菌株 2515 浓度为 10^6 CFU/mL 与 10^7 CFU/mL 的两组中, 鳃弧菌浓度的对数值分别达到 (3.49 ± 0.20) CFU/mL 与 $(3.59 \pm$

0.11) CFU/mL, 均显著低于 10^4 CFU/mL (5.02 ± 0.16) CFU/mL、 10^5 CFU/mL (5.06 ± 0.25) CFU/mL 和对照组 (4.96 ± 0.16) CFU/mL ($P < 0.05$), 之后略有波动, 到第 6 天时两个高浓度组中鳃弧菌浓度对数值达到 (3.91 ± 0.14) CFU/mL 与 (3.64 ± 0.19) CFU/mL, 显著低于其他组 ($P < 0.05$), 两组间差异不显著 ($P > 0.05$)。菌株 2515 浓度为 10^4 CFU/mL 与 10^5 CFU/mL 的两组与鳃弧菌共培养至第 2 天时, 鳃弧菌数量开始下降, 之后快速升高, 在第 3~4 天时, 浓度达

到最高状态, 而到第 6 天时, 鳃弧菌浓度又出现下降, 两组浓度的对数值分别达 (4.99 ± 0.09) CFU/mL 和 (4.66 ± 0.15) CFU/mL。

2.4 不同浓度菌株 2515 对对虾存活率影响

统计养殖第 2、4、7 天时各组对虾存活情况, 存活率结果如图 4 所示, 对虾在高密度养殖 7 d 的过程中, 在第 2、4 天时, 各实验组与对照组的存活率差别不显著 ($P > 0.05$); 第 7 天时, 饲料中添加菌株 2515 浓度为 10^5 CFU/g 及 10^7 CFU/g 的两

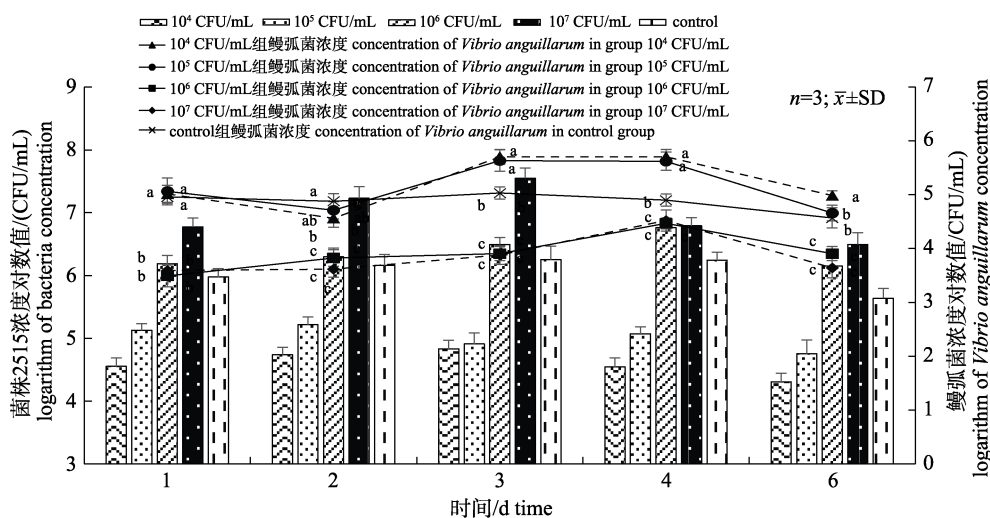


图 3 菌株 2515 浓度变化和对鳃弧菌的拮抗效果

不同组别同一时间段不同字母表明差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 3 Concentration of strain 2515 and antagonistic effect on *Vibrio anguillarum*
Groups in the same day with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

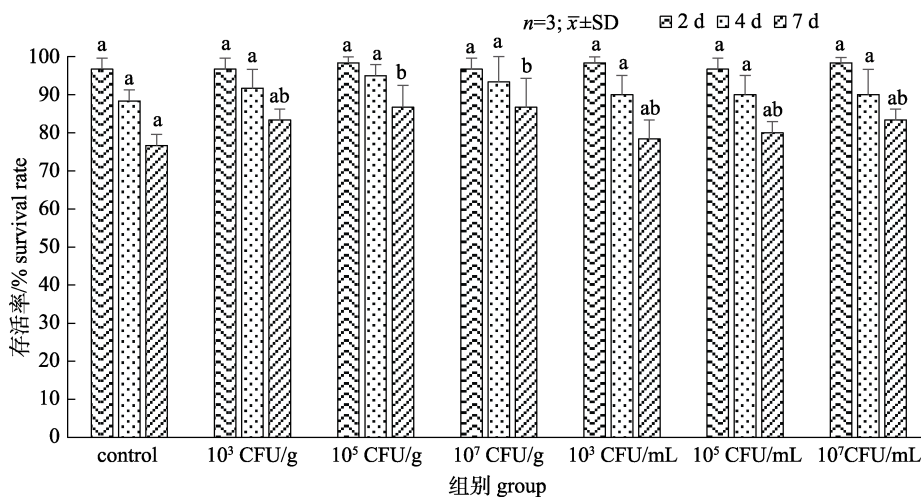


图 4 菌株 2515 对凡纳滨对虾存活率影响

不同组别同一时间段不同字母表明差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 4 Effect of strain 2515 on survival rate of *Litopenaeus vannamei*
Groups in the same day with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

组的对虾存活率显著高于对照组($P<0.05$), 其他组间差异不显著($P>0.05$)。

2.5 菌株 2515 对凡纳滨对虾肠道内细菌总数及弧菌数的影响

养殖期间各组中凡纳滨对虾肠道内细菌总数和弧菌总数如表 2 所示, 养殖第 1 天各组对虾肠道内细菌总数和弧菌总数均没有差异($P>0.05$); 在第 4 天时实验组与对照组的细菌总数无差异($P>0.05$), 而对虾肠道弧菌总数显著低于对照组($P<0.05$); 在养殖的第 7 天, 对照组细菌总数显著高于饲料中添加菌株 2515 浓度 10^5 CFU/g 实验组($P<0.05$), 其他各组的细菌总数差异不显著, 而对照组的弧菌总数显著高于其他各实验组($P<0.05$), 各饲料添加组中的对虾肠道弧菌总数均低于水体添加组($P<0.05$), 而水体添加组及饲料添

加组的各组内弧菌总数差异不显著($P>0.05$)。结果表明在饲料中和养殖水体中添加菌株 2515 对凡纳滨对虾肠道内的弧菌具有一定的抑制效果, 并且在饲料中添加效果是优于水体中添加的。

2.6 菌株 2515 对凡纳滨对虾养殖水体中细菌总数及弧菌数的影响

凡纳滨对虾养殖期间水体中细菌总数和弧菌总数如表 3 所示, 在养殖的第 1、4 天各组水样中弧菌数无明显差异($P>0.05$); 在第 7 天浸泡组弧菌数明显低于对照组和饲料组($P<0.05$)。在养殖的第 1 天, 浓度为 10^5 、 10^7 CFU/mL 的 2 个组细菌总数显著高于其他组别($P<0.05$); 在第 4、7 天各组别之间细菌总数无显著差异($P>0.05$)。实验结果表明对虾养殖水体中适宜浓度的添加菌株 2515 的菌液可以有效地控制养殖水体中弧菌数量。

表 2 养殖期间凡纳滨对虾肠道内细菌总数、弧菌总数
Tab. 2 Total bacterium counts (TBC) and *Vibrio* bacterium counts (VBC) in shrimp gut

n=3; $\bar{x} \pm SD$				
时间/d time	组别 group	细菌总数/ (10^6 CFU/g) TBC	弧菌总数/ (10^5 CFU/g) VBC	弧菌所占比/% ratio of VBC/TBC
1	10^3 CFU/g	2.50 ± 0.20^a	2.83 ± 0.76^a	11.31
	10^5 CFU/g	2.78 ± 0.21^a	2.88 ± 0.76^a	10.36
	10^7 CFU/g	2.45 ± 0.14^a	3.17 ± 1.06^a	12.90
	10^3 CFU/mL	2.46 ± 0.17^a	2.79 ± 0.38^a	11.34
	10^5 CFU/ mL	2.76 ± 0.22^a	4.08 ± 1.12^a	14.78
	10^7 CFU/mL	2.53 ± 0.14^a	2.75 ± 0.75^a	10.87
	control	2.54 ± 0.20^a	3.38 ± 0.94^a	13.30
4	10^3 CFU/g	5.41 ± 1.47^a	1.13 ± 0.33^b	2.08
	10^5 CFU/g	4.55 ± 6.67^a	0.63 ± 0.38^b	1.37
	10^7 CFU/g	5.70 ± 1.40^a	0.75 ± 0.25^b	1.32
	10^3 CFU/mL	4.08 ± 1.86^a	0.96 ± 0.19^b	2.35
	10^5 CFU/ mL	3.46 ± 0.98^a	1.08 ± 0.32^b	3.13
	10^7 CFU/mL	5.46 ± 1.13^a	0.58 ± 0.32^b	1.07
	control	5.67 ± 1.34^a	7.39 ± 0.95^a	13.03
7	10^3 CFU/g	16.20 ± 6.30^{ab}	1.14 ± 0.32^c	0.70
	10^5 CFU/g	9.87 ± 4.20^b	0.83 ± 0.35^c	0.84
	10^7 CFU/g	11.00 ± 1.90^{ab}	1.13 ± 0.35^c	1.03
	10^3 CFU/mL	27.90 ± 13.6^{ab}	4.54 ± 0.83^b	1.63
	10^5 CFU/mL	20.90 ± 10.2^{ab}	3.25 ± 0.82^b	1.56
	10^7 CFU/mL	18.80 ± 10.0^{ab}	3.42 ± 1.00^b	1.82
	control	29.80 ± 15.0^a	13.70 ± 2.00^a	4.60

注: 同一时间段内同列数据上标不同表示组间存在显著差异($P<0.05$).
Note: Values in the same day in each column with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

表 3 凡纳滨对虾养殖水体中可培养细菌总数和弧菌总数

Tab. 3 Total bacterium counts (TBC) and *Vibrio* bacterium counts (VBC) in the aquaculture water of *Litopenaeus vannamei*

$n=3; \bar{x} \pm SD$

时间/d time	组别 group	细菌总数/ ($\times 10^5$ CFU/mL) TBC	弧菌总数/ ($\times 10^3$ CFU/mL) VBC	弧菌所占比/% ratio of VBC/TBC
1	10^3 CFU/g	0.06 ± 0.10^c	2.83 ± 0.64^a	47.17
	10^5 CFU/g	0.04 ± 0.07^c	2.80 ± 0.99^a	70.00
	10^7 CFU/g	0.05 ± 0.01^c	3.30 ± 1.35^a	66.00
	10^3 CFU/mL	8.83 ± 0.91^c	3.87 ± 1.33^a	0.44
	10^5 CFU/ mL	0.28 ± 0.08^b	2.50 ± 0.76^a	8.93
	10^7 CFU/mL	21.20 ± 2.10^a	3.67 ± 1.52^a	0.17
	control	0.08 ± 0.01^c	2.53 ± 1.00^a	31.63
4	10^3 CFU/g	5.33 ± 0.62^a	6.10 ± 2.29^a	1.14
	10^5 CFU/g	4.57 ± 1.32^a	10.20 ± 2.00^a	2.23
	10^7 CFU/g	3.78 ± 0.63^a	10.10 ± 3.50^a	2.67
	10^3 CFU/mL	3.83 ± 1.23^a	7.13 ± 1.34^a	1.86
	10^5 CFU/ mL	4.03 ± 1.01^a	8.90 ± 1.90^a	2.21
	10^7 CFU/mL	5.06 ± 0.41^a	7.57 ± 2.03^a	1.50
	control	5.37 ± 1.49^a	9.03 ± 3.86^a	1.68
7	10^3 CFU/g	10.70 ± 1.30^a	6.90 ± 1.65^a	0.64
	10^5 CFU/g	11.70 ± 1.80^a	7.47 ± 1.51^a	0.64
	10^7 CFU/g	9.47 ± 1.10^a	10.10 ± 1.60^a	1.07
	10^3 CFU/mL	11.30 ± 1.50^a	1.53 ± 0.70^b	0.14
	10^5 CFU/mL	10.10 ± 2.30^a	1.70 ± 0.99^b	0.17
	10^7 CFU/mL	11.70 ± 1.80^a	1.20 ± 0.69^b	0.10
	control	9.85 ± 1.71^a	7.27 ± 3.19^a	0.74

注: 同一时间段内同列数据上标不同表示组间存在显著差异($P<0.05$)。
Note: Values in the same day in each column with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

2.7 菌株 2515 提高凡纳滨对虾抗副溶血弧菌效果

统计不同浓度菌株 2515 的饲料组及浸泡组对虾累积死亡率, 结果如图 5 所示, 可知自感染后第 3 天各实验组的对虾累积死亡率显著低于对照组($P<0.05$), 至感染的第 7 天, 对照组累积死亡率最高达到(93.3±5.8)%, 而最低死亡率组为饲料中添加浓度 10^5 CFU/g 的组, 其死亡率(43.3±5.8)% 显著低于对照组($P<0.05$)。统计实验组的相对保护率, 结果见图 6, 3 个饲料添加组的相对保护率均有高于水体添加组的趋势, 最高组为饲料中添加浓度 10^5 CFU/g 的一组, 保护率为(53.6±6.2)%, 最低组为浓度 10^3 、 10^7 CFU/mL 的浸泡组, 保护率均为(32.1±6.2)%。饲料添加的 3 个组间及水体浸泡的 3 个组间差异不显著($P>0.05$)。结果表明在对虾饲料及水体中添加菌株 2515 能够提高凡纳滨

对虾抗副溶血弧菌的感染能力, 饲料中添加菌株 2515 效果优于水体中添加, 最适浓度为 10^5 CFU/g。

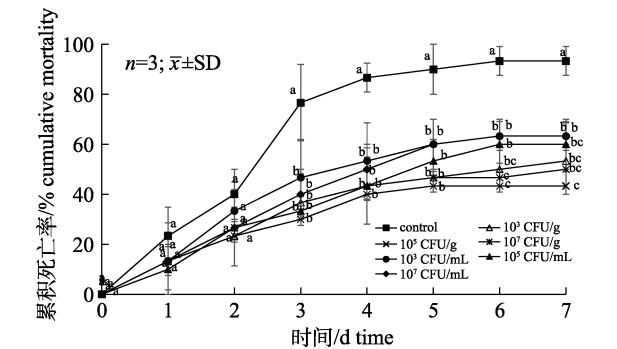


图 5 凡纳滨对虾感染副溶血弧菌后的累积死亡率
不同组别同一时间段不同字母表明差异显著($P<0.05$)。
Fig. 5 Accumulative mortality of *Litopenaeus vannamei* challenged by *Vibrio Parahaemolyticus*
Groups in the same day with different letters are significantly different ($P<0.05$).

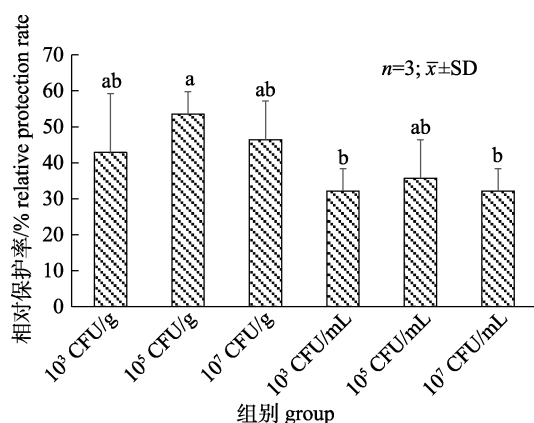


图 6 各实验组凡纳滨对虾的相对保护率
不同组别中不同字母表明差异显著($P<0.05$)。

Fig. 6 Relative percent survival against *Vibrio parahaemolyticus* in each group
Groups with different letters are significantly different ($P<0.05$).

2.8 饲料中菌株 2515 的分离鉴定

涂布添加各浓度菌株 2515 的饲料粉碎液, 均没有黄色菌落出现, 说明在饲料添加的菌株 2515 均已经失活。

3 讨论

近年来, 随着海水养殖业的发展, 病害问题越来越严重, 利用微生物防控技术控制水产养殖病害已成为当前研究的热点^[23-24]。研究表明, 环境中的某些假交替单胞菌能够产生有广谱抑菌作用的化合物^[25]。唐杨^[26]分离的假交替单胞菌 m8 和 a22, 其胞内外活性物质对副溶血弧菌具有很好的抑制效果, 且胞外抑菌效果优于胞内。于敏^[25]从金丽假交替单胞菌(*P. flavipulchra*)的胞外物质中分离纯化出一种蛋白质 Pfap 和 5 种具有抗菌性的小分子化合物, 能够抑制鳗弧菌的生长。本研究发现菌株 2515 胞内外均存在活性较强的抗菌化合物, 在一定的浓度范围内的抗鳗弧菌效果可达到敏感抗生素新霉素效果。研究结果为水产养殖病害的防控提供了一种新的方法。

研究表明细菌之间拮抗机制与营养物质竞争、扑食或产生抑菌物质有关^[27-28]。Richards 等^[29]研究发现杀鱼假交替单胞菌在海水中与副溶血弧菌混合培养, 能通过表面的囊泡转移, 分泌水解酶, 使副溶血弧菌的细胞壁破裂。本研究通过牛

津杯打孔方法, 发现菌株 2515 胞内外产物对鳗弧菌具有很强的抑制作用, 通过混合培养再次表明一定浓度的菌株 2515 对鳗弧菌具有较好的拮抗效果。表明了菌株 2515 的抗菌机制是通过分泌抗菌化合物实现的; 是否通过分泌溶解鳗弧菌的抗菌物质而实现为自身提供营养物质, 进而构成捕食关系, 还需要进一步的研究。

益生菌是一种活体微生物制剂, 因具有提高养殖动物的免疫机能、改善体内菌群结构及拮抗病原菌等功效, 在最近几年得到了广泛应用^[30]。益生菌的主要作用机制包括提供营养物质或产生消化酶提高养殖动物机体消化能力、竞争营养附着位点或产生拮抗物质来抑制有害微生物繁殖、改善养殖水环境、增强机体免疫功能等^[30-32]。Wang 等^[33]在饲料中添加假交替单胞菌降低了对虾肠道内弧菌的数量, 对肠道细菌总数无明显影响, 显著提高了感染副溶血弧菌后的存活。王春迪等^[34]发现在养殖水体中添加蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)PC465 能降低凡纳滨对虾肠道内总的细菌数量, 且降低了养殖水体弧菌数量。张盛静等^[35]研究表明在饲料中添加枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)和地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)能够显著提高凡纳滨对虾抗副溶血弧菌感染的能力, 本研究采用菌株 2515, 发现添加到饲料和浸泡在水体中的两种方式都能够降低对虾肠道内弧菌数量, 并且添加到水体的组别能够降低水体弧菌的数量, 但对肠道和水体中细菌总数没有影响。此外, 还能够提高养殖期间对虾的存活率和提供对副溶血弧菌的保护率, 且添加到饲料中效果优于添加到水体中, 这与之前的报道结果基本一致。菌株 2515 在水产养殖的开发利用以及对养殖动物的作用机理还需要更深入的研究。

4 结论

综上所述, 菌株 2515 胞内外能够分泌活性较强的抗弧菌活性物质, 在养殖水体和饲料中添加适合浓度的菌株 2515, 能够降低养殖水体和凡纳滨对虾肠道内的弧菌数量, 显著提高对虾养殖期间的成活率及对副溶血弧菌的保护率。研究结果为杀鱼假交替单胞菌 2515 在对虾养殖的应用提

供了理论依据; 有关益生菌的开发和抑制弧菌的具体机制还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Huang J, Zeng L B, Dong X, et al. Trend analysis and policy recommendation on aquatic biosecurity in China[J]. Strategic Study of CAE, 2016, 18(3): 15-21. [黄健, 曾令兵, 董宣, 等. 水产生物安保发展趋势与政策建议[J]. 中国工程科学, 2016, 18(3): 15-21.]
- [2] Flegel T W. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2012, 110(2): 166-173.
- [3] Egidius E. Vibriosis: Pathogenicity and pathology. A review [J]. Aquaculture, 1987, 67(1-2): 15-28.
- [4] Sakata T, Hattori M. Characteristics of *Vibrio vulnificus* isolated from diseased tilapia[J]. Fish Pathology, 1988, 23(1): 33-40.
- [5] Wu H B, Pan J P. Progress in studies of vibriosis in aquaculture [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2001, 8(1): 89-93. [吴后波, 潘金培. 弧菌属细菌及其所致海水养殖动物疾病[J]. 中国水产科学, 2001, 8(1): 89-93.]
- [6] Ma Y X, Xu G R, Zhang E P, et al. The etiology of acute preistome edema disease in cultured juveniles of *Apostichopus japonicus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(3): 377-382. [马悦欣, 徐高蓉, 张恩鹏, 等. 仿刺参幼参急性围肿胀症的细菌性病原[J]. 水产学报, 2006, 30(3): 377-382.]
- [7] Lee C, Chen I, Yang Y, et al. The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(39): 10798-10803.
- [8] Tran L, Nunan L D, Redman R M, et al. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2013, 105(1): 45-55.
- [9] Dabu I M, Lim J J, Arabit P M T, et al. The first record of acute hepatopancreatic necrosis disease in the Philippines[J]. Aquaculture Research, 2017, 48(3): 792-799.
- [10] Hong X P, Lu L Q, Xu D. Progress in research on acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)[J]. Aquaculture International, 2016, 24(2): 577-593.
- [11] Han J E, Mohny L L, Tang K F J, et al. Plasmid mediated tetracycline resistance of *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimps[J]. Aquaculture Reports, 2015, 2: 17-21.
- [12] Bowman J P. Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*[J]. Marine Drugs, 2007, 5(4): 220-241.
- [13] Tutino M L, Parrilli E, Giaquinto L, et al. Secretion of α -amylase from *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAB23: Two different pathways in different hosts[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(20): 5814-5817.
- [14] Sánchez-Porro C, Mellado E, Bertoldo C, et al. Screening and characterization of the protease CP1 produced by the moderately halophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain CP76[J]. Extremophiles, 2003, 7(3): 221-228.
- [15] Zheng L, Chen H M, Han X T, et al. Antimicrobial screening and active compound isolation from marine bacterium NJ6-3-1 associated with the sponge *Hymeniacidon perlewe*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005, 21(2): 201-206.
- [16] Longeon A, Peduzzi J, Barthélemy M, et al. Purification and partial identification of novel antimicrobial protein from marine bacterium *Pseudoalteromonas* species strain X153[J]. Marine Biotechnology, 2004, 6(6): 633-641.
- [17] Hamsah, Widanarni, Alimuddin, et al. The nutritional value of *Artemia* sp. enriched with the probiotic *Pseudoalteromonas piscicida* and the prebiotic mannan-oligosaccharide[J]. Aquaculture, Aquarium, Conservation and Legislation, 2017, 10(1): 8-17.
- [18] Zhang H H, Wang X H, Li C, et al. Isolation and identification of a bacterial strain with vibrios-antagonism from shrimp ponds[J]. Progress in Fishery Sciences, 2016, 37(3): 85-92. [张欢欢, 王秀华, 李晨, 等. 对虾养殖池中一株弧菌拮抗菌的分离鉴定[J]. 渔业科学进展, 2016, 37(3): 85-92.]
- [19] Zhang Y Z, Wang X H, Yu D H, et al. The potential toxicity of a strain *Pseudoalteromonas piscicida* 2515 with antagonistic activity against vibrio and antibacterial effect after heat treatment detoxification[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2021, 36(3): 399-405. [张宇哲, 王秀华, 于党辉, 等. 抗弧菌杀鱼假交替单胞菌 2515 的潜在毒性及热处理脱毒后抗菌效果[J]. 大连海洋大学学报 2021, 36(3): 399-405.]
- [20] Gauthier M J, Flatau G N. Antibacterial activity of marine violet-pigmented *Alteromonas* with special reference to the production of brominated compounds[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1976, 22(11): 1612-1619.
- [21] Tan Y, Zhao Q, Shu W Q, et al. K-B disk diffusion method for drug sensitivity test[J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2010, 7(20): 2290-2291. [谭瑶, 赵清, 舒为群, 等. K-B 纸片扩散法药敏试验[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(20): 2290-2291.]
- [22] Li J Q. Studies on the effects of microbial ecological agents for shrimp[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2004.

- [李继秋. 对虾微生态制剂的研究和应用[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004.]
- [23] Balcázar J L, Rojas-Luna T, Cunningham D P. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2007, 96(2): 147-150.
- [24] Leyva-Madrigal K Y, Luna-González A, Escobedo-Bonilla C M, et al. Screening for potential probiotic bacteria to reduce prevalence of WSSV and IHNV in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under experimental conditions[J]. Aquaculture, 2011, 322-323: 16-22.
- [25] Yu M. The antibacterial mechanism of *Pseudoalteromonas flavipulchra* JG1[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013. [于敏. 金丽假交替单胞菌 JG1 抑菌机理研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.]
- [26] Tang Y. Analysis of Extracellular product characteristics of *Pseudoalteromonas* and cloning and expression of its anti-bacterial protein[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017. [唐杨. 假交替单胞菌胞外产物的特性分析及其抑菌蛋白的克隆与表达[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.]
- [27] Kuramitsu H K, He X S, Lux R, et al. Interspecies interactions within oral microbial communities[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2007, 71(4): 653-670.
- [28] Pérez J, Moraleda-Muñoz A, Marcos-Torres F J, et al. Bacterial predation: 75 years and counting![J]. Environmental Microbiology, 2016, 18(3): 766-779.
- [29] Richards G P, Watson M A, Needleman D S, et al. Mechanisms for *Pseudoalteromonas piscicida*-induced killing of vibrios and other bacterial pathogens[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(11): e00175-17.
- [30] Balcázar J L, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, et al. The role of probiotics in aquaculture[J]. Veterinary Microbiology, 2006, 114(3-4): 173-186.
- [31] Gatesoupe F J. The use of probiotics in aquaculture[J]. Aquaculture, 1999, 180(1-2): 147-165.
- [32] Thompson F L, Abreu P C, Cavalli R. The use of microorganisms as food source for *Penaeus paulensis* larvae[J]. Aquaculture, 1999, 174(1-2): 139-153.
- [33] Wang H L, Wang C D, Tang Y, et al. *Pseudoalteromonas* probiotics as potential biocontrol agents improve the survival of *Penaeus vannamei* challenged with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)-causing *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Aquaculture, 2018, 494: 30-36.
- [34] Wang C D, Song X L, Zhang X J, et al. Effects of adding *Bacillus cereus* PC465 to rearing water on disease resistance of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(1): 146-155. [王春迪, 宋晓玲, 张晓静, 等. 养殖水体中添加蜡样芽孢杆菌 PC465 对凡纳滨对虾抗病力的影响[J]. 中国水产科学, 2016, 23(1): 146-155.]
- [35] Zhang S J, Song X L, Zhao X J, et al. Effects of adding probiotics to the feed on anti-infection and five kinds of immune gene expression of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(6): 899-907. [张盛静, 宋晓玲, 赵小金, 等. 饲料中添加益生菌对凡纳滨对虾抗感染和 5 种免疫基因表达的影响[J]. 水产学报, 2015, 39(6): 899-907.]

Anti-vibrio effect of *Pseudoalteromonas piscicida* 2515 and its application in shrimp culture

WANG Fenglin^{1,2}, WANG Xiuhua^{2,3}, ZHANG Yuzhe², WANG Shumao², ZHU Na²

1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity, Qingdao 266071, China;
3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071, China

Abstract: Acute hepatopancreatic necrosis disease caused by *Vibrio* has brought huge economic losses to the shrimp farming industry in many countries. Owing to restrictions on the application of antibiotics in aquaculture and the demand for green and healthy aquatic products in the market, microbial control technology has shown great application prospects in the prevention and control of shrimp diseases. *Pseudoalteromonas piscicida* 2515 (strain 2515) is a broad-spectrum *Vibrio* antagonistic bacterium that has probiotic potential in aquaculture. To investigate the antagonistic effect of strain 2515 against *Vibrio* in shrimp farming, the antimicrobial effect between strain 2515 and neomycin was compared using the Oxford cup test method, with *V. anguillarum* as the indicator. The antagonistic effect of *V. anguillarum* was evaluated by co-culture with strain 2515 at concentrations of 10^4 CFU/mL, 10^5 CFU/mL, 10^6 CFU/mL, and 10^7 CFU/mL. To study the application effect, the total number of bacteria and *Vibrio* in the aquaculture water and shrimp intestines were analyzed after strain 2515 was administrated by oral and immersion at concentrations of 10^3 CFU/g, 10^5 CFU/g, and 10^7 CFU/g in the feed and 10^3 CFU/mL, 10^5 CFU/mL, and 10^7 CFU/mL in the water body, respectively. The relative percent survival (RPS) against *V. parahaemolyticus* in each group was compared. The results showed a corresponding relationship between the number of strain 2515 and the quality of neomycin under the same effect as against *V. anguillarum*. Strain 2515 concentrations of 10^6 CFU/mL and 10^7 CFU/mL showed strong antibacterial effects when co-cultured with *V. anguillarum*. Strain 2515 concentrations of 10^5 CFU/g and 10^7 CFU/g in shrimp feed could significantly increase shrimp survival rate and reduced the number of *Vibrio* in shrimp intestines ($P < 0.05$). The optimum concentration was 10^5 CFU/g, which exhibited the lowest mortality (43.3 ± 5.8)% and the highest RPS (53.7 ± 6.2)% against *V. parahaemolyticus*. The results indicated that strain 2515, added in feed or water in appropriate concentrations, could improve the ability of shrimp resistance to *V. parahaemolyticus* and reduce the number of *Vibrio* in shrimp intestines.

Key words: *Pseudoalteromonas piscicida*; antagonism; *Vibrio parahaemolyticus*; *Litopenaeus vannamei*; intestine

Corresponding author: WANG Xiuhua. E-mail: wangxh@ysfri.ac.cn