

DOI: 10.12264/JFSC2024-0089

沙蚕中弧菌种类、载量及杀菌药物作用效果

苟紫玥^{1,2}, 王秀华^{2,3}, 杨冰^{2,3}, 朱欣洁^{2,3}, 席瑞², 潘明超², 胡希立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, 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室, 山东 青岛 266071;
3. 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

摘要: 为查清饵料沙蚕中弧菌病原携带情况, 建立有效病原消除技术, 本研究调查了我国沿海 10 个区域养殖及野生沙蚕中弧菌病原种类及载量, 用柠檬酸、聚维酮碘、山梨酸钾、脱氢乙酸钠、苹果酸、甲酸、二甲酸钾、丙酸及弧菌净(含柠檬酸与酸性硫酸钙商用产品)为杀菌药物, 测试了其溶解藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)的体外杀菌效果; 以最低体外杀菌浓度的柠檬酸、聚维酮碘及弧菌净杀菌药物浸泡沙蚕, 测试了其蚕体内弧菌的消除效果, 并研究了其对沙蚕的安全浓度, 同时分析了 3 种药物浸泡沙蚕 3 h 后, 沙蚕体内蛋白、脂肪、胆固醇及维生素 E 含量变化。结果表明, 样品沙蚕中携带溶藻弧菌、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)、欧文氏弧菌(*V. owensii*)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)及嗜芳香环弧菌(*V. cyclitrophicus*), 检出率分别为 86.7%、20.0%、13.3%、13.3%及 6.7%。样品中弧菌载量最高达到 7.0×10^4 cfu/g, 最低载量为 2.0×10^3 cfu/g。9 种药物体外最低杀菌浓度由低到高依次为聚维酮碘(10.0×10^{-3} g/L)、甲酸(0.5 g/L)、弧菌净(1.0 g/L)、柠檬酸/苹果酸/丙酸(1.2 g/L)、二甲酸钾(1.6 g/L)、脱氢乙酸钠(12.0 g/L)、山梨酸钾(30.0 g/L)。用柠檬酸、聚维酮碘及弧菌净最低有效浓度溶液浸泡沙蚕 0.5 h 与 3 h, 体内弧菌杀菌率分别为 96.2%、66.4%、99.9%与 97.7%、98.0%、100.0%。3 种药物对沙蚕的安全浓度分别为 48.9×10^{-3} g/L、 120.3×10^{-3} g/L、 963.0×10^{-3} g/L。经过 3 种消毒剂处理后, 沙蚕体内的蛋白、脂肪、胆固醇及维生素 E 的含量与对照组比均有显著的降低($P < 0.05$)。结果提示, 沙蚕作为生物饵料存在较大的生物安全风险, 有机酸类药物浸泡处理能够降低病原菌载量, 研究结果可为对虾疾病综合防控提供技术支撑。

关键词: 沙蚕; 弧菌; 有机酸; 聚维酮碘; 杀菌浓度; 安全浓度; 营养成分

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)06-0731-13

沙蚕属于环节动物门、多毛纲、游行多毛目、沙蚕科, 是一种营养价值极高的海洋穴居动物。沙蚕种类多, 我国约有 80 多种, 有些种类如日本刺沙蚕(*Neanthes japonica*)、多齿围沙蚕(*Perinereis nuntia*)和双齿围沙蚕(*P. aibuhitensis*)等已开展人工养殖^[1]。沙蚕富含二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)、二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)、蛋白质等^[1-2], 在水产养殖中通常作为生

物饵料, 广泛应用于虾蟹等亲体培育。沙蚕用于对虾亲虾促熟, 不仅能够促进性腺发育, 缩短性腺发育周期, 还能提高亲虾产卵量, 且提高幼体的孵化率^[3], 因此已成为国内外对虾亲虾培育用主要生物饵料。

按照我国每年养殖亲虾数量 300 万对推算^[4], 国内沿海对虾育苗场沙蚕年用量约 2000 t, 这些沙蚕均来源于野生环境或池塘养殖, 未经过净化

收稿日期: 2024-03-24; 修订日期: 2024-04-28.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFD2400205); 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(20603022023025).

作者简介: 苟紫玥(1997–), 女, 硕士研究生, 研究方向为对虾养殖生物安保. E-mail: 1805088280@qq.com

通信作者: 王秀华, 研究员, 研究方向为水产养殖动物疾病防控. E-mail: wangxh@ysfri.ac.cn

处理会携带致病菌、病毒等病原^[5],若直接用作饵料会导致病原经摄食途径水平感染健康的亲虾^[6-7],给下游育苗及养殖场带来风险。近年来对虾养殖中因弧菌感染导致的急性肝胰腺坏死病(acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)^[8]及玻璃苗病害^[9],给产业造成了巨大的损失,该疾病暴发即与亲虾摄食携带病原的饵料沙蚕直接相关^[10]。因此研究沙蚕中病原菌的净化技术,阻断病原水平传播,对预防对虾重大疾病暴发具有重要意义。

消除沙蚕携带的病原菌,传统方法多采用抗生素浸泡,而过度使用抗生素会影响水域生态环境,破坏水生动物肠道健康,导致养殖动物生长和免疫功能下降^[11-13],且影响对虾生殖细胞的活力^[14],因此迫切需要开发安全有效的新型替代产品。山梨酸、苯甲酸、脱氢乙酸、丙酸、苹果酸、柠檬酸等有机酸及其盐类是目前食品中常用的防腐杀菌剂^[15-16],该类产品安全性高且不影响食品品质,用于水产饵料生物除菌具有潜在开发价值,而且释放到环境中也易于降解^[17],具有环境友好的特性。

为了查清国内对虾亲虾培育用沙蚕的病原携带情况,探索其主要病原菌的杀菌技术,本研究采集了国内 6 省 10 个城市沿海的养殖及野生沙蚕样品,对其携带的主要弧菌病原种类及载量进行了鉴定与分析,用检出率最高的溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)为受试菌,开展了弧菌杀菌剂的筛选及其安全测试,以期为沙蚕病原的净化技术提供参考,为对虾产业的健康发展提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验用菌

实验用溶藻弧菌从浙江省台州市养殖沙蚕(*Perinereis aibuhitensis*)中分离并经过鉴定获得。

1.2 弧菌杀菌用药物

聚维酮碘(优级纯)、甲酸(纯度 99.5%)、苹果酸(纯度 $\geq 95.0\%$)、柠檬酸(纯度 98%),均购于国药集团化学试剂有限公司;弧菌净[主要成分为酸性硫酸钙(ACS)与柠檬酸]购于青岛某公司;山梨酸钾(优级纯试剂)购于生工生物工程股份有限公司;脱氢乙酸钠(纯度 99.0%)、二甲酸钾(纯度 $\geq$

95.0%)购于上海麦克林生化科技有限公司;丙酸(分析纯)购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.3 实验用沙蚕

1.3.1 病原检测用沙蚕 春季(3 月)共采集沙蚕科(Nereididae)样品 8 份,分别采集自河北省沧州、山东省日照、江苏省盐城、江苏省连云港、浙江省象山、浙江省台州、广东省湛江、海南省东方等地,均为对虾亲虾培育用饵料沙蚕,为人工养殖;夏季(8 月)共采集沙蚕样品 7 份,分别采集自河北省沧州,山东省东营、潍坊、日照(2 份),江苏省连云港,浙江省象山等地的海区滩涂,为野生样品。

1.3.2 毒性实验用沙蚕 实验用沙蚕购自浙江省临海市崇顺水产养殖有限公司,平均体重(2.0 ± 0.7) g。实验前用漂白粉消毒后的自然海水流水养殖 2 d,连续充气,期间不投喂饲料。

1.4 毒性实验用虾

实验用凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) 300 尾,购自山东省青岛市西海岸新区黄海水产研究所琅琊基地,体长(11.0 ± 0.5) cm,体重(13.5 ± 0.5) g,养殖实验前养殖于水体 20 m³的水泥池中,连续充气,养殖用水为漂白粉消毒后的自然海水,日吸污并换水 1 次,换水量 30%,日投喂颗粒饲料 4 次,投饵量为体重 3%。

1.5 沙蚕体中弧菌载量及弧菌鉴定

1.5.1 沙蚕体中弧菌载量 从每份沙蚕样品中随机取 5 条沙蚕,放入灭菌海水中 3 h,洗除其体表的附着物,之后取出用灭菌纱布吸干体表水分,经准确称重后,分别对其匀浆,取匀浆液 10 mL,用无菌 PBS 缓冲液梯度稀释 10²、10³、10⁴、10⁵ 倍,分别取 0.1 mL 的稀释液涂布于 TCBS 培养基上,每个稀释浓度重复 3 个平板,将平板置于 28 °C 培养箱培养 24 h,根据菌落的形态、大小、颜色等特征区分不同菌落并进行编号,并分别统计不同菌落数及总数,根据沙蚕重量、稀释倍数及菌落数计算沙蚕体内弧菌量。对从每份样品中分离出的不同特征的单一菌落,二次划线分离纯化后-80 °C 保存。

弧菌占比=100%×单位沙蚕组织中某种弧菌数量/单位沙蚕组织中全部细菌数。

1.5.2 细菌分离鉴定 将从 1.5.1 中分离的不同菌株接种于 TCBS 平板活化, 用细菌 16S rRNA 序列扩增方法对所分离的细菌进行初步鉴定^[18], 扩增产物委托生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 所得序列在 NCBI 数据库中进行同源性比对, 待鉴定菌种对比的菌株相似率大于 99.0%判定为同一个种, 记为鉴定成功, 用于统计分析。

1.6 不同药物对弧菌体外杀菌效果及最佳药物的筛选

将溶藻弧菌接种于 TCBS 平板, 28 ℃培养 24 h 后, 转接于 TCBS 液体培养基中, 28 ℃摇床 (150 r/min)培养 24 h, 收集发酵液, 于离心机中 3000 g 离心, 收集菌体, 用无菌 PBS 稀释制成菌悬液, 调整其浓度 1.0×10^7 CFU/mL。经过预实验确定各种药物有效杀菌浓度范围及作用时间后, 按照表 1 的药物浓度梯度配制药液与细菌混合液 (1.0×10^7 CFU/mL), 将不同浓度的菌药混合液于室温条件下放置 15 min, 之后分别取菌药混合液 0.1 mL 涂布于 TCBS 平板, 每个梯度设 3 个平行, 28 ℃恒温培养 24 h 后, 统计各个平板上弧菌菌落数量。每个平板上菌落数量大于 50 个, 标记为“+++”; 落数大于 10 个, 小于或等于 50 个, 标记为“++”; 菌落数大于 1 个, 小于或等于 10 个, 标记为“+”; 没有菌落生长标记为“—”, 平行平板上菌落数出现不一致时进行重复实验。

表 1 各种抗菌药物工作浓度梯度
Tab. 1 Concentration gradient of different antibacterial drugs

抗菌药物 antibacterial drug	质量浓度/(g/L) concentration					
聚维酮碘($\times10^{-3}$) povidone iodine	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0
柠檬酸 citric acid	0.4	0.6	0.8	1.1	1.2	1.3
弧菌净* VKP	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
山梨酸钾 potassium sorbate	10.0	15.0	20.0	28.0	30.0	32.0
脱氢乙酸钠 sodium dehydroacetic acid	2.0	4.0	8.0	10.0	12.0	14.0
苹果酸 malic acid	0.2	0.4	0.8	1.0	1.2	1.4
甲酸 formic acid	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
二甲酸钾 potassium dimethyl acid	0.4	0.8	1.2	1.4	1.6	1.8
丙酸 propionic acid	2.0	4.0	6.0	1.0	1.2	1.4

注: *产品为商业产品。
Note: * means a commercial product.

1.7 最低弧菌杀菌浓度的 3 种杀菌药物对沙蚕体内弧菌的杀菌效果测定

根据 1.6 的实验结果, 选择最低杀菌浓度的柠檬酸、聚维酮碘及弧菌净用于沙蚕体内弧菌杀菌实验。取 12 个容积均为 5 L 的实验水槽, 加入灭菌海水 2 L, 每组 3 个平行, 分别加入灭菌海水、柠檬酸、聚维酮碘及弧菌净溶液, 使药物浓度分别为 0、1.2、 10×10^{-3} 及 1.0 g/L, 每个水槽中均放入受试沙蚕 100 g, 搅匀后充气浸泡, 并于 0.5、1 及 3 h 后, 各组分别取 5 尾, 方法参照 1.5.1 进行沙蚕体内弧菌定量, 实验期间水温 23~25 ℃, 盐度 32, pH8.0, 溶氧大于 4.0 mg/L。

弧菌杀菌率(%)=100×(空白组弧菌载量-实验组弧菌载量)/空白组弧菌载量。

1.8 柠檬酸、聚维酮碘及弧菌净对沙蚕的毒性实验及安全浓度

先经过预实验, 确定柠檬酸、聚维酮碘及弧菌净 3 种药物浸泡沙蚕 24 h 及 48 h 不能致死的最高质量浓度及全部致死最低质量浓度范围。在该范围内按照等对数浓度梯度设计柠檬酸、聚维酮碘及弧菌净的 24 h 及 48 h 半致死浓度梯度, 如表 2 所示。于 33 个 10 L 的水族箱中, 分别加入 2 L 海水及相应浓度的药物, 每个浓度中加入 30 尾沙蚕, 观察记录各质量浓度 24 h 及 48 h 沙蚕的死亡数, 发现死亡的沙蚕及时移出, 实验期间不投喂饵料, 每 12 h 换水 1 次并重新加入相应浓度的药液。实验期间海水温度 16~18 ℃, 盐度 32, pH8.0, 设 3 个空白对照组。采用 SPSS 16.0 计算 24 h LC_{50} 及 48 h LC_{50} , 安全浓度按照公式 $SC=LC_{50, 48h}\times0.3/(LC_{50, 24h}/LC_{50, 48h})^2$ 计算^[19]。

1.9 柠檬酸、聚维酮碘及弧菌净对凡纳滨对虾的安全浓度评估

考虑到药物使用后随饵料通过口服进入对虾体内, 结合对虾消化系统特点, 参照章宇思等^[20]的方法, 以肌肉注射方法评估 3 种药物对凡纳滨对虾的安全浓度。先经过预实验, 确定柠檬酸、聚维酮碘及弧菌净 3 种药物注射对虾 24 h 及 48 h 不能致死的最高质量浓度及致死最低质量浓度范围。在该范围内配制柠檬酸、聚维酮碘及弧菌净

表 2 抗菌药物 24 h 及 48 h 半致死浓度梯度

Tab. 2 Concentration gradient of antibacterial drug in the test of 24 h LC₅₀ and 48 h LC₅₀

药物 antibacterial drug	浓度梯度 concentration gradient (×10 ⁻³ g/L)									
	24 h					48 h				
柠檬酸 citric acid	130.0	153.0	180.0	212.0	250.0	100.0	125.7	185.1	198.8	250.0
聚维酮碘 povidone iodine	300.0	363.8	441.5	535.7	650.0	250.0	311.7	387.3	482.1	600.0
弧菌净*VKP	2500.0	2837.2	3531.8	4395.4	6000.0	2000.0	2514.8	3162.3	3976.4	5000.0

注: *产品为商业产品。
Note: * means a commercial product.

等对数浓度 10.0、15.0、22.0、33.0 g/L、50.0 g/L; 80、95、113、134、160 g/L; 50、75、112、167、250 g/L 注射液。于 18 个 300 L 的玻璃钢水槽中, 分别加入 200 L 海水, 每个桶放对虾 10 尾。按照每尾对虾注射 0.1 mL 的量, 用 1 mL 无菌注射器, 于对虾第一腹节腹部进行肌肉注射, 观察记录各质量浓度 24 h 及 48 h 对虾的死亡数, 期间对虾不投喂饵料, 发现死亡的对虾及时移出, 每 24 h 换水 30%。实验期间海水温度 25~26 ℃, 盐度 32, pH 8.0, 连续充气, 3 个空白对照组仅注射 PBS。采用 SPSS 16.0 计算 24 h LD₅₀ 及 48 h LD₅₀, 安全浓度按照 $SC=LD_{50, 48h} \times 0.3 / (LD_{50, 24h} / LD_{50, 48h})^2$ 计算。

1.10 杀菌药物处理对沙蚕营养组分的影响

取无菌海水净化后的沙蚕 100 g 12 份, 3 份用于处理前的营养成分分析, 剩余 9 份分别用浓度 1.2 g/L 的柠檬酸、10×10⁻³ g/L 的聚维酮碘及 1.0 g/L 的弧菌净海水溶液浸泡 3 h, 每个处理组设置 3 个平行。取浸泡前及消毒浸泡后沙蚕, 用无菌海水清洗体表残余药液并用纱布吸干体水分, 称重后冰浴匀浆, 用于总蛋白、总脂肪、胆固醇及维生素 E 的含量分析。蛋白及胆固醇测定分别使用总蛋白检测试剂盒(生工生物工程股份有限公司)与胆固醇检测试剂盒测定(南京建成生物工程研究所), 总脂肪检测方法参照 GB 5009.6-2016^[21], 维生素 E 参照 GB 5009.82-2016^[22]。某营养成分损失率(%)=100×(处理前某营养的含量-处理后某营养的含量)/处理前某营养的含量。

1.11 数据处理

实验数据用 Excel 软件进行统计分析, 数据取平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$), 使用 SPSS 分析软件对数据进行单因素方差分析及差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 沙蚕中主要弧菌

用 TCBS 培养基, 从 15 份样品中共分离到 25 株菌, 结果见表 3, 可知所有的样品中均有弧菌检出, 统计各种弧菌的检出率显示, *V. alginolyticus*、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)、欧文氏弧菌(*V. owensii*)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)、嗜芳香环弧菌(*V. cyclitrophicus*)的检出率分别为 86.7%、20.0%、13.3%、13.3%及 6.7%, 15 个样品中有 10 个样品的溶藻弧菌为沙蚕中的优势菌, 溶藻弧菌为优势菌在样品中的检出率占比 66.7%; 有 2 个样品中的副溶血弧菌为优势菌, 优势菌检出率 13.3%; 欧文氏弧菌及弧菌均有 1 次优势菌检出, 优势菌检出率均为 6.7%。湛江市沙蚕样品的病原弧菌载量最高, 达到 7.0×10⁴ cfu/g, 菌株为哈维氏弧菌及溶藻弧菌组成。采集自沧州的野生沙蚕中 TCBS 分离的可培养细菌数最高为 8.0×10⁴ cfu/g, 其中有 97.5%的菌为 *V. cyclitrophicus*, 其致病性未知。最低细菌载量样品来自潍坊的野生沙蚕, 载量为 0.3×10⁴ cfu/g, 但其中有 66.7%的细菌为 *V. parahaemolyticus*, 弧菌载量为 2.0×10³ cfu/g。

2.2 不同浓度药物对弧菌病原的体外杀菌效果

以溶藻弧菌为药物评价用菌株, 将待筛选药物聚维酮碘、柠檬酸、弧菌净、山梨酸钾、脱氢乙酸钠、苹果酸、甲酸、二甲酸钾、丙酸配成不同浓度梯度进行杀菌效果测试, 结果见表 4。可知杀菌浓度最低的药物为聚维酮碘, 浓度 10×10⁻³ g/L 在 15 min 时即可全部杀死病菌, 山梨酸钾敏感性最差, 浓度 30 g/L 方可达到杀菌效果, 脱氢乙酸钠的杀菌浓度为次高组, 浓度为 12 g/L 时方可达

表 3 采集样品 TCBS 平板分离细菌鉴定结果

Tab. 3 Identification results of bacteria isolated by TCBS plate in collected samples

采样季节 sampling season	样品采集地 sampling site	细菌载量/($\times 10^4$ cuf/g) bacterial load	细菌种类 bacterial species	细菌占比/% ratio
春季 spring	1	0.73	<i>Vibrio owensii</i>	54.4
			<i>V. alginolyticus</i>	45.6
	2	0.33	<i>V. alginolyticus</i>	100.0
	3	5.00	<i>V. alginolyticus</i>	67.2
			<i>V. harveyi</i>	32.8
	4	4.90	<i>V. alginolyticus</i>	22.5
			<i>V. parahaemolyticus</i>	61.2
	5	3.60	<i>V. alginolyticus</i>	100.0
夏季 summer	6	6.33	<i>V. alginolyticus</i>	100.0
	7	7.00	<i>V. harveyi</i>	33.3
			<i>V. alginolyticus</i>	66.7
	8	5.67	<i>V. alginolyticus</i>	82.5
			<i>V. owensii</i>	17.5
	9	8.00	<i>V. cyclitrophicus</i>	97.5
			<i>Photobacterium sanguinicancr</i>	2.5
	10	1.40	<i>V. alginolyticus</i>	42.9
			<i>Shewanella aquimarina</i>	57.1
	11	0.30	<i>V. parahaemolyticus</i>	66.7
			<i>Ferrimonas balearica</i>	33.3
	12	6.20	<i>V. alginolyticus</i>	100.0
	13	0.90	<i>V. alginolyticus</i>	100.0
	14	3.70	<i>V. alginolyticus</i>	76.3
			<i>S. aquimarina</i>	23.7
	15	4.80	<i>V. alginolyticus</i>	82.5
			<i>V. harveyi</i>	17.5

注: 样品采集地 1-8 分别为河北省沧州市、山东省日照市、江苏省盐城市、江苏省连云港市、浙江省象山县、浙江省台州市、广东省湛江市及海南东方市; 9-15 分别为河北省沧州市、山东省东营市、潍坊市、日照市(2 份)、江苏省连云港市及浙江省象山县。

Note: Sampling site 1 to 8 were Cangzhou Hebei Province, Rizhao Shandong Province, Yancheng Jiangsu Province, Lianyungang Jiangsu Province, Xiangshan County Zhejiang Province, Taizhou Zhejiang Province, Zhanjiang Guangdong Province and Dongfang Hainan Province; Sampling site 9 to 15 were Cangzhou Hebei Province, Dongying and Weifang, Rizhao (2 copies) Shandong Province, Lianyungang Jiangsu Province and Xiangshan Zhejiang Province.

到杀菌效果。有机酸中, 甲酸的杀菌浓度最低为 0.5 g/L, 柠檬酸、苹果酸及丙酸的最佳杀菌浓度均为 1.2 g/L, 而商用产品弧菌净的杀菌浓度在 1.0 g/L 时即可达到 100%的除菌效果。根据实验结果, 选择聚维酮碘、弧菌净及柠檬酸用于后续实验。

2.3 柠檬酸、聚维酮碘及弧菌净在不同浸泡时间条件下对沙蚕体内弧菌的杀菌效果

用最低有效体外杀菌浓度的柠檬酸、聚维酮碘及弧菌净浸泡沙蚕, 检测不同浸泡时间后其体

内的弧菌载量, 结果见表 5。可知浓度 1.2 g/L 的柠檬酸浸泡 0.5 h, 沙蚕体内的弧菌杀菌率即可达到 96.2%, 浸泡时间延长至 3 h, 弧菌的杀菌率提高到 97.7%; 用浓度 10×10^{-3} g/L 的聚维酮碘浸泡沙蚕 0.5 h, 沙蚕体内的弧菌去杀菌率仅为 66.4%, 而延长浸泡时间到 3 h 时, 杀菌率可达到 98.0%; 采用浓度 1.0 g/L 的弧菌净浸泡 0.5 h 时, 弧菌杀菌率可达 99.9%, 延长至 1 h, 对弧菌的杀菌率即可达到 100.0%。

表 4 不同浓度药物对溶藻弧菌的体外杀菌效果

Tab. 4 *In vitro* bactericidal effect of different drugs at different concentrations on *Vibrio alginolyticus*

药物 antibacterial drug		浓度/(g/L)及效果 concentration and effect					
		C(×10 ⁻³)	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0
聚维酮碘 povidone iodine	C	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0
	E	+++	++	+	+	—	—
柠檬酸 citric acid	C	0.4	0.6	0.8	1.1	1.2	1.3
	E	++	++	+	+	—	—
弧菌净*VKP	C	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
	E	++	+	+	+	—	—
山梨酸钾 potassium sorbate	C	10.0	15.0	20.0	28.0	30.0	32.0
	E	+++	++	++	+	—	—
脱氢乙酸钠 sodium dehydroacetic acid	C	2.0	4.0	8.0	10.0	12.0	14.0
	E	++	++	+	+	—	—
苹果酸 malic acid	C	0.2	0.4	0.8	1.0	1.2	1.4
	E	++	++	+	+	—	—
甲酸 formic acid	C	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
	E	++	+	+	+	—	—
二甲酸钾 potassium dimethyl acid	C	0.4	0.8	1.2	1.4	1.6	1.8
	E	++	+	+	+	—	—
丙酸 propionic acid	C	0.2	0.4	0.6	1.0	1.2	1.4
	E	++	+	+	+	—	—

注: C 代表药物浓度; E 代表灭菌效果; +++指菌落数大于 50 个/平板; ++指菌落数为 10–50 个/平板; +指菌落数为 1–10 个/平板; —菌落数 0 个/平板; *产品为商业产品.

Note: C means drug concentration; E means sterilization effect; +++ more than 50 colonies per plate; ++ 10–50 colonies per plate; + 0–10 colonies per plate; — means no colony on the plate; * means a commercial product.

表 5 最低有效杀菌浓度的 3 种药物浸泡不同时间后沙蚕体内弧菌的杀菌率

Tab. 5 Bactericidal rate of *Vibrio* in clamworm (*Perinereis aibuhitensis*) after immersion in different times at the lowest effective sterilization concentration of 3 antibacterial drugs

药物 antibacterial drugs	浓度/(g/L) concentration	处理时间/h immersion time	弧菌载量/(cu/g) <i>Vibrios</i> load		杀菌率/% bactericidal rate rate
			处理前/(×10 ⁴) before treatment	处理后/(×10 ³) after treatment	
柠檬酸 citric acid	1.2	0.5	3.83±0.39	1.47±0.31	96.2
		1.0		1.50±0.50	96.1
		3.0		0.90±0.36	97.7
聚维酮碘 povidone iodine	10×10 ⁻³	0.5		12.9±1.44	66.4
		1.0		5.63±0.96	85.3
		3.0		0.77±0.21	98.0
弧菌净*VKP	1.0	0.5		0.003±0.006	99.9
		1.0		0.00	100.0
		3.0		0.00	100.0

注: *产品为商业产品.

Note: * means a commercial product.

2.4 柠檬酸、聚维酮碘和弧菌净浸泡沙蚕的 24 h LC₅₀、48 h LC₅₀ 及安全浓度

用不同浓度的柠檬酸、聚维酮碘和弧菌净浸

泡沙蚕,发现沙蚕放入不同药物各浓度组后,均出现不适反应,表现为躯体卷曲挣扎,浓度越高组反应越强烈,柠檬酸组随着浓度升高出现体表

破碎、肌肉收缩及蚕体断裂现象, 聚维酮碘高浓度组出现轻度皮肤开裂、肌肉收缩, 弧菌净组体表完整, 但皮肤出现颗粒凸起。经过一段时间后沙蚕挣扎反应减弱, 之后中高浓度组的沙蚕逐渐出现死亡。统计 3 种药物浸泡沙蚕死亡数, 计算 24 h LC₅₀、48 h LC₅₀ 及安全浓度结果见表 6。可知柠檬酸、聚维酮碘及弧菌净对沙蚕的 24 h LC₅₀ 分别为 174.5×10⁻³、444.4×10⁻³ 及 3662.7×10⁻³ g/L, 48 h LC₅₀ 分别为 162.6×10⁻³、401.1×10⁻³ 及 3210.0×10⁻³ g/L, 安全浓度分别为 48.9×10⁻³、120.3×10⁻³ 及 963.0×10⁻³ g/L。

2.5 柠檬酸、聚维酮碘和弧菌净对凡纳滨对虾的 48 h 半致死剂量

对虾注射柠檬酸、聚维酮碘和弧菌净 3 种药液后, 均表现出挣扎不安现象。在注射柠檬酸药液后, 虾体出现抽搐, 局部组织变白, 肌肉组织僵硬, 高浓度组的应激反应强于低浓度组。注射不同浓度的聚维酮碘和弧菌净药液并放入养殖箱后, 对虾逐渐适应, 且能正常游动。各组随养殖时

间增长开始出现不能平游的症状并出现死亡现象。用不同浓度的柠檬酸、聚维酮碘和弧菌净注射凡纳滨对虾, 24 h 及 48 h 半致死剂量结果见表 7。可知柠檬酸、聚维酮碘及弧菌净对沙蚕的 24 h LD₅₀ 分别为 2.91、11.9、14.75 mg/尾, 48 h LD₅₀ 分别为 1.28、10.5、9.51 mg/尾, 安全浓度分别为 0.55、3.15、2.85 mg/尾。

2.6 用 3 种药物最低杀菌浓度处理活体沙蚕后对沙蚕营养组分的影响

沙蚕经过柠檬酸、聚维酮碘、弧菌净 3 种药物处理浸泡后, 分析其体内的总蛋白、总脂肪、胆固醇及维生素 E 的含量的变化, 结果见表 8。可知经过处理后, 沙蚕体内的总蛋白、总脂肪、胆固醇及维生素 E 的含量与对照组相比均有显著的降低($P<0.05$)。其中柠檬酸浸泡后, 沙蚕的营养损失最大, 与对照组相比体内维生素 E、总脂肪、胆固醇的损失达到 60.0%、50.0%、16.7%, 总蛋白的损失与聚维酮碘组相当为 6.0%; 聚维酮碘浸泡后, 总蛋白与总脂肪含量显著低于弧菌净及

表 6 柠檬酸、聚维酮碘和弧菌净浸泡沙蚕的 24 h LC₅₀、48 h LC₅₀ 及安全浓度
Tab. 6 24 h LC₅₀ and 48 h LC₅₀ biotoxicity and safe concentration of citric acid, povidone-iodine and *Vibrio*-killing product to *Perinereis aibuhitensis* by immersion challenge

药物 antibacterial drug	24 h 毒性实验 toxicity test in 24 h			48 h 毒性实验 toxicity test in 48 h			安全浓度/(×10 ⁻³ g/L) safe concentration
	浓度/(×10 ⁻³ g/L) concentration	死亡率/% mortality	LC ₅₀ / (×10 ⁻³ g/L)	浓度/(×10 ⁻³ g/L) concentration	死亡率/% mortality	LC ₅₀ / (×10 ⁻³ g/L)	
柠檬酸 citric acid	130.0	0.0	174.5	100.0	0	162.6	48.9
	153.0	26.7		125.7	23.3		
	180.0	56.7		158.1	46.7		
	212.0	86.7		198.8	76.7		
	250.0	100.0		250.0	100.0		
聚维酮碘 povidone iodine	300.0	0.0	444.4	250.0	0.0	401.1	120.3
	363.8	16.7		311.2	20.0		
	441.5	53.3		387.3	43.3		
	535.7	80.0		482.1	70.0		
	650.0	100.0		600.0	100.0		
弧菌净* VKP	2500.0	0	3662.7	2000.0	0.0	3210.0	963.0
	2837.2	16.7		2514.8	26.7		
	3531.8	40.0		3162.3	46.7		
	4395.4	80.0		3976.4	66.7		
	6000.0	100.0		5000.0	100.0		
空白 blank control	0.0	0.0	—	0	0	—	—

注: *产品为商业产品; —指没有数据。
Note: * means a commercial product; — means no data.

表 7 柠檬酸、聚维酮碘和弧菌净注射对虾的 24 h LD₅₀、48 h LD₅₀ 及安全浓度
Tab. 7 24 h LD₅₀ and 48 h LD₅₀ biotoxicity and safe concentration of citric acid, povidone-iodine and *Vibrio*-killing product to *Litopenaeus vannamei* by injection challenge

药物 antibacterial drugs	注射剂量/(mg/ind) injection dose	24 h 死亡率/% mortality in 24 h	48 h 死亡率/% mortality in 48 h	24 h LD ₅₀ / (mg/ind)	48 h LD ₅₀ / (mg/ind)	安全剂量/(mg/ind) safe dose
柠檬酸 citric acid	1.0	0.0	0.0	2.91	1.8	0.55
	1.5	0.0	30.0			
	2.2	20.0	70.0			
	3.3	60.0	100.0			
	5.0	100.0	100.0			
聚维酮碘 povidone iodine	8.0	0.0	0.0	11.9	10.5	3.15
	9.5	0.0	20.0			
	11.3	40.0	70.0			
	13.4	80.0	100.0			
	16.0	100.0	100.0			
弧菌净* VKP	5.0	0.0	0.0	14.8	9.5	2.85
	7.5	0.0	30.0			
	11.2	20.0	60.0			
	16.7	60.0	100.0			
	25.0	100.0	100.0			
空白 control	0.0	0.0	0.0			

注: *产品为商业产品。
Note: * means commercial product.

表 8 沙蚕经 3 种消毒剂处理后体内营养成分的含量
Tab. 8 The content of nutrients in the *Perinereis aibuhitensis* after immersion in antibacterial drugs

营养组分 nutritional components	100 g 鲜沙蚕含量/g content in 100 g fresh <i>P. aibuhitensis</i>			
	柠檬酸 citric acid	聚维酮碘 povidone iodine	弧菌净*VKP	对照 control
总蛋白 total protein	12.6±0.1 ^a	12.6±0.2 ^a	12.9±0.2 ^b	13.4±0.1 ^c
总脂肪 total fat	1.0±0.1 ^a	1.2±0.1 ^b	1.6±0.1 ^c	2.0±0.1 ^d
胆固醇 cholesterol	0.80±0.01 ^a	0.94±0.04 ^b	0.91±0.02 ^b	0.96±0.02 ^c
维生素 E (×10 ⁻⁴) vitamin E	4.4±0.2 ^a	10.2±0.1 ^c	9.8±0.1 ^b	11.0±0.1 ^d

注: *产品为商业产品。同行不同的上标字母代表各组间差异显著($P<0.05$)。
Note: * means a commercial product. Different superscript letters in the same row mean significant difference ($P<0.05$) between groups.

对照组,但维生素 E 含量高于其他两个处理组,低于对照组($P<0.05$),总蛋白、总脂肪、胆固醇及维生素 E 损失率分别为 6.0%、40.0%、20.8%及 7.3%。弧菌净浸泡后,总蛋白与总脂肪含量显著高于其他处理组但低于对照组($P<0.05$),但维生素 E 含量高于柠檬酸组,低于聚维酮碘及对照组($P<0.05$),总蛋白、总脂肪、胆固醇及维生素 E 损失率分别为 3.7%、20.0%、5.2%及 10.9%。表

明消毒处理后,对沙蚕的营养成分具有一定破坏作用。

3 讨论

3.1 沙蚕中的病原弧菌

自然条件下成体沙蚕等多毛类生物通常栖息于沿海滩涂潮间带的泥沙中,以海洋沉积物为饵料,而由于沉积物中含有多种微生物^[23-24],因此

导致该类生物体内微生物具有多样性。弧菌作为海洋中的主要菌群之一,在沉降物中载量较高,本研究表明,我国周边海洋的沉积物中弧菌的载量能够达到 $1.00 \times 10^5 \sim 9.04 \times 10^5$ cfu/g^[25]。因此导致以摄食沉积物为主的多毛类动物体内会聚集大量的弧菌。Licciano 等^[26]调查发现,正常状态下,缨鳃虫(*Branchiomma luctuosum*)体内弧菌数量可超过到 1×10^4 cfu/g,而饥饿状态下可达到 $(2.4 \pm 0.4) \times 10^5$ CFU/g,显著高于栖息环境中海水中弧菌的密度,同样在养殖的饵料沙蚕中,也可发现有 *V. parahaemolyticus*、*V. harveyi*、*V. alginolyticus* 等病原弧菌检出,且即使经过净化后,载量仍可达到 6.47×10^3 cfu/g^[5]。本研究结果也显示,春夏季养殖及野生沙蚕中均含有 *V. alginolyticus*、*V. harveyi*、*V. owensii*、*V. parahaemolyticus* 等病原弧菌,且南方地区样品的载量较高,达到 8.0×10^4 cfu/g,表明沙蚕用于对虾亲虾培育具有较高的风险。

3.2 有机酸杀菌剂的杀菌效果

用消毒剂处理食品是减少交叉污染和细菌传播风险的最常见方法,由于食品安全的需求,用于食品消毒的产品不同于传统的消毒剂,目前在食品工业中研究及应用较多的有有机酸如柠檬酸、乳酸等^[27]、臭氧氧化消毒方法^[28]等。亚甲基蓝联合激光杀菌法、光动力抗菌等新技术作为去除水产品病原体也展现出了良好的效果^[29-30]。沙蚕体软,缺少骨骼的支撑及保护,受到高热、低温、辐射等物理消毒时蚕体容易断裂,导致营养物质的流失。借鉴食品消毒方法,本课题组研究了多种有机酸及其盐类的消毒效果,发现除了甲酸外,其他有机酸在浓度 1.2 g/L 时即可达到 100% 的杀菌效果,尽管甲酸的杀菌浓度较低(0.5 g/L),由于其刺激性强,不宜用做沙蚕消毒。有机酸杀菌主要利用了其低 pH 对细胞膜的通透性的破坏作用及干扰 DNA 及蛋白质的合成^[31-32]。弧菌净复合了柠檬酸与 ACS, ACS 具有较低的酸性与低腐蚀性,与柠檬酸复配后杀菌效果增强。聚维酮碘杀菌浓度较低,主要用于表面消毒,其杀菌机制是释放出的碘离子能够快速渗透到微生物中,

氧化关键蛋白质、核苷酸和脂肪酸,而导致细胞死亡^[33-34]。

3.3 弧菌杀菌剂的生物安全性及其对环境的影响

消毒净化沙蚕病原时,消毒剂对沙蚕及摄食消毒后沙蚕的对虾的安全性是选择消毒剂的重要指标,理想的消毒剂的安全浓度远大于其最低的杀菌浓度,且不对养殖动物产生副作用。本研究发现柠檬酸、聚维酮碘、弧菌净对沙蚕的安全浓度分别为 48.9×10^{-3} 、 120.3×10^{-3} 及 963.0×10^{-3} g/L,而有效的杀菌最低浓度分别为 1.2、 10.0×10^{-3} 及 1.0 g/L,表明聚维酮碘、弧菌净 2 种消毒剂处理沙蚕既能达到除菌效果又能保持沙蚕的鲜活度,而柠檬酸可能会导致沙蚕失活,但不会影响使用,因有研究结果也表明,饲料中添加浓度 2.0~3.0 g/kg 柠檬酸能够促进进行对虾生长,且具有提高抗病力的功效^[35]。同样在饲料中添加 1.2%~2% 的 ACS 能够提高凡纳滨对虾的抗病力,对其生长存活均没有影响^[36]。表明采用最低杀菌浓度的柠檬酸与弧菌净处理沙蚕,对对虾没有安全风险。聚维酮碘对多种病原具有杀菌效果,通常用于表面消毒,在养殖中鲜有用于口服的报道。在人类医学中,有研究显示用于漱口后,碘能通过皮肤黏膜吸收并具有诱发甲状腺疾病的风险^[37],因此用于对虾饵料脱毒,其对对虾的风险需要进行评估。

柠檬酸、苹果酸、甲酸、乙酸、丙酸等低分子量有机酸在植物根际土壤环境中普遍存在,具有增强土壤中 P、Fe、Mn 和 Zn 等营养元素的活性,缓解土壤重金属污染,活化磷元素等功能^[38],被用作食物酸化剂,无污染无残留^[39],尾水排放后于环境无影响。弧菌净中主要成分是 ACS, ACS 作为一种新型的杀菌剂,具无毒性^[40],释放环境分解后主要是中性的硫酸钙。聚维酮碘作为常规的水产用消毒剂,其在水环境中残留的研究较少,但有报道表明,聚维酮碘用于水产养殖后会环境影响微生物将 NH_4^+ 向其他形式氮的转化^[41]。有机酸、聚维酮碘及 ACS 用作水产饵料病原净化处理,尽管其残留低、环境影响小,但集中于局部水域使用会也可能导致特定水域浓度升高,带来副作用,需要引起关注。

3.4 弧菌杀菌剂对饵料生物营养成分的影响

沙蚕中含有丰富的蛋白、脂肪酸及维生素等营养成分^[1],但在对沙蚕的消毒处理过程中,浓度过高的消毒剂会导致沙蚕死亡,而低浓度长时间的浸泡也可造成营养成分的损失。本研究中采用最低杀菌浓度的柠檬酸、聚维酮碘及弧菌净浸泡沙蚕,发现 3 个处理组沙蚕体内的总蛋白、总脂肪、胆固醇及维生素 E 均有不同程度的损失,柠檬酸组综合损失最高,弧菌净相对较轻。推测营养损失与沙蚕体浸泡后皮肤破损、体液外流有关,因柠檬酸浸泡易导致皮肤破损及断裂,且能够改变细胞膜通透性^[31],导致细胞内物质的外溢。弧菌净中含有柠檬酸及 ACS,因 ACS 腐蚀性低^[42],加之浓度比柠檬酸低,对蚕体及细胞膜破坏轻,导致营养流失较低。碘消毒剂中,碘离子对蛋白质、核苷酸和脂肪酸具有一定的氧化破坏作用^[33-34],且沙蚕体经聚维酮碘处理后体表也出现一定破裂,导致部分体液流失。可见,在应用消毒剂净化沙蚕病原时,沙蚕的营养会有轻度的流失,在达到消毒浓度时应避免延长消毒时间。

参考文献:

- [1] Lin T, Yang Y, Wang S M, et al. Nutritional analysis and food safety study of *Perinereis aibuhitensis*[J]. Journal of Applied Oceanography, 2016, 35(3): 412-417. [林涛, 杨寅, 王素敏, 等. 双齿围沙蚕的营养成分与食用安全[J]. 应用海洋学报, 2016, 35(3): 412-417.]
- [2] Cao Q M, Liu Q B, Yu Y Q, et al. Nutritional composition and safety of cultured and wild sandworm (*Perinereis aibuhitensis*) from a coastal area of Shandong Province[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(5): 1164-1172. [曹启猛, 刘清兵, 于跃芹, 等. 山东沿海养殖和野生双齿围沙蚕营养成分比较及饵料安全性评价[J]. 中国水产科学, 2016, 23(5): 1164-1172.]
- [3] Yao W J, Huang X H, Li H. Effect of various natural diets on broodstock's gonad development of *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2009, 29(4): 84-88. [姚卫军, 黄翔鹄, 李活. 不同天然饵料对凡纳滨对虾亲虾性腺发育的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2009, 29(4): 84-88.]
- [4] Chen X Z, Li M, Li J, et al. Study on the promotion and application of the main fishery variety *Litopenaeus vannamei* [J]. China Fisheries, 2016(7): 51-54. [陈学洲, 李苗, 李健, 等. 渔业主推品种“凡纳滨对虾”的推广应用情况研究[J]. 中国水产, 2016(7): 51-54.]
- [5] Zhu N. Investigation of key pathogen risk points and biological control of bacterial diseases in a domestic shrimp hatchery[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2022. [朱娜. 一对虾育苗场关键病原风险点排查与细菌病的生物防控[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2022.]
- [6] Soowannayan C, Phanthura M. Horizontal transmission of white spot syndrome virus (WSSV) between red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) and the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*)[J]. Aquaculture, 2011, 319(1-2): 5-10.
- [7] Soonthornchai W, Rungrasamee W, Karoonuthaisiri N, et al. Expression of immune-related genes in the digestive organ of shrimp, *Penaeus monodon*, after an oral infection by *Vibrio harveyi*[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2010, 34(1): 19-28.
- [8] Kumar R, Ng T H, Wang H C. Acute hepatopancreatic necrosis disease in penaeid shrimp[J]. Reviews in Aquaculture, 2020, 12(3): 1867-1880.
- [9] Zou Y, Xie G S, Jia T C, et al. Determination of the infectious agent of translucent post-larva disease (TPD) in *Penaeus vannamei*[J]. Pathogens, 2020, 9(9): 741.
- [10] Chi Y. Prevention of early mortality syndrome (EMS) in *Penaeus vannamei*[J]. Current Fisheries, 2015, 40(6): 70-71. [柴宇. 南美白对虾早期死亡综合征(EMS)的预防[J]. 当代水产, 2015, 40(6): 70-71.]
- [11] Landers T F, Cohen B, Wittum T E, et al. A review of antibiotic use in food animals: Perspective, policy, and potential[J]. Public Health Reports, 2012, 127(1): 4-22.
- [12] Limbu S M, Zhou L, Sun S X, et al. Chronic exposure to low environmental concentrations and legal aquaculture doses of antibiotics cause systemic adverse effects in Nile tilapia and provoke differential human health risk[J]. Environment International, 2018, 115: 205-219.
- [13] Tapia-Paniagua S T, Vidal S, Lobo C, et al. Dietary administration of the probiotic SpPdp11: Effects on the intestinal microbiota and immune-related gene expression of farmed *Solea senegalensis* treated with oxytetracycline[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 46(2): 449-458.
- [14] Nimrat S, Sonwat S, Matharatanukul B, et al. Chilled and cryopreserved spermatophores of banana shrimp (*Fenneropenaeus merguensis*): Effects of antibiotics on sperm quality and bacterial abundance[J]. Aquaculture, 2022, 560: 738551.
- [15] Gao H J, Fan Z Y, Zhang H Y, et al. Simultaneous and rapid determination of propionic acid, sorbic acid, benzoic acid

- and dehydroacetic acid in food by gas chromatography[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2017, 25(5): 47-51. [高海军, 范自营, 张红云, 等. 气相色谱法同时快速测定食品中丙酸、山梨酸、苯甲酸及脱氢乙酸[J]. 粮油食品科技, 2017, 25(5): 47-51.]
- [16] Zhang Y Y, Wu J, Tang X W, et al. Optimization of the method for determination of propionic acid in pastry foods by gas chromatography[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2018, 9(11): 2787-2792. [张艳艳, 伍娟, 唐湘伟, 等. 优化气相色谱法测定糕点类食品中丙酸的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(11): 2787-2792.]
- [17] Wang L F, Zhang W, Wen L K. Screening and identification of a strain degrading L-malic acid and citric acid[J]. Food Science, 2010, 31(21): 279-282. [王立芳, 张微, 文连奎. 可降解 L-苹果酸和柠檬酸菌株的筛选及鉴定[J]. 食品科学, 2010, 31(21): 279-282.]
- [18] Bikrol A, Saxena N, Singh K. Characterization of *Bradyrhizobium* strains isolated from different varieties of soybean with 16SrDNA RFLP from agricultural land of Madhya Pradesh, India[J]. Indian Journal of Microbiology, 2010, 50(4): 404-411.
- [19] Lai Z P, Feng S C, Liang W Q, et al. Acute toxicity of several conventional disinfectants to sand worm *Perinereis aibuhitensis*[J]. Fisheries Science, 2014, 33(3): 147-151. [赖祖鹏, 冯善聪, 梁伍气, 等. 几种常用消毒剂对双齿围沙蚕的急性毒性试验[J]. 水产科学, 2014, 33(3): 147-151.]
- [20] Zhang Y S, Pan L D, Hong B. Acute and chronic toxicological effects of continuous intramuscular injection of enrofloxacin on Chinese pond turtle[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2017, 32(6): 643-650. [章宇思, 潘连德, 洪滨. 连续肌注恩诺沙星对中华草龟的急性和慢性毒理研究[J]. 大连海洋大学学报, 2017, 32(6): 643-650.]
- [21] National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, China Food and Drug Administration. GB 5009.6-2016 national food safety standard determination of fat in foods[S]. Beijing: China Standards Press, 2016. [中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 5009.6-2016 食品安全国家标准 食品中脂肪的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.]
- [22] National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, China Food and Drug Administration. GB 5009.82-2016 national food safety standard determination of vitamins A, D, and E in food products[S]. Beijing: China Standards Press, 2016. [中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 5009.82-2016 食品安全国家标准 食品中维生素 A、D、E 的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.]
- [23] Hoshino T, Doi H, Uramoto G I, et al. Global diversity of microbial communities in marine sediment[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117(44): 27587-27597.
- [24] Zhang B D. Isolation, identification of petroleum-degrading bacteria and analysis of intestinal microbial diversity in the digestive tract of *Perinereis aibuhitensis* (Polychaete)[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2013. [张柏东. 双齿围沙蚕消化道降油细菌的分离鉴定及菌群多样性分析[D]. 大连: 大连海洋大学, 2013.]
- [25] Wang X L, Liu J W, Li B, et al. Spatial heterogeneity of *Vibrio* spp. in sediments of Chinese marginal seas[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(10): e03064-18.
- [26] Licciano M, Stabili L, Giangrande A, et al. Bacterial accumulation by *Branchiomma luctuosum* (Annelida: Polychaeta): A tool for biomonitoring marine systems and restoring polluted waters[J]. Marine Environmental Research, 2007, 63(3): 291-302.
- [27] Bai Y H, Ding X Y, Zhao Q, et al. Development of an organic acid compound disinfectant to control food-borne pathogens and its application in chicken slaughterhouses[J]. Poultry Science, 2022, 101(6): 101842.
- [28] Feng L F, Zhang K, Gao M S, et al. Inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* by aqueous ozone[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2018, 28(8): 1233-1246.
- [29] Deng X, Tang S Z, Wu Q, et al. Inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* by antimicrobial photodynamic technology using methylene blue[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2016, 96(5): 1601-1608.
- [30] Rafeeq S, Shiroodi S, Schwarz M H, et al. Inactivation of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio parahaemolyticus* by curcumin-mediated photosensitization and nanobubble-ultrasonication approaches[J]. Foods, 2020, 9(9): Article No.1306.
- [31] Langworthy T A. Microbial life in extreme pH values[M]// Kushner D J. Microbial life in extreme environments[M]. London: Academic Press, 1978: 279-315.
- [32] Yasothai R, Giriprasad R. Weak organic acids in food technology[J]. International Journal of Environmental Science and Technology, 2015, 4(1): 164-166.
- [33] Lachapelle J M, Castel O, Casado A F, et al. Antiseptics in the era of bacterial resistance: A focus on povidone iodine[J]. Clinical Practice, 2013, 10(5): 579-592.
- [34] McDonnell G, Russell A D. Antiseptics and disinfectants:

- Activity, action, and resistance[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 1999, 12(1): 147-179.
- [35] Su X G, Li X Q, Leng X J, et al. The improvement of growth, digestive enzyme activity and disease resistance of white shrimp by the dietary citric acid[J]. *Aquaculture International*, 2014, 22(6): 1823-1835.
- [36] Anuta J D, Buentello A, Patnaik S, et al. Effect of dietary supplementation of acidic calcium sulfate (vitoxal) on growth, survival, immune response and gut microbiota of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2011, 42(6): 834-844.
- [37] Nobukuni K, Hayakawa N, Namba R, et al. The influence of long-term treatment with povidone-iodine on thyroid function [J]. *Dermatology*, 1997, 195(Suppl 2): 69-72.
- [38] Zhao K, Wan X, Xing D K, et al. Research progress on effects of low molecular weight organic acids on release of available phosphorus and heavy metals in soil[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2022, 53(5): 1228-1236. [赵宽, 万昕, 邢德科, 等. 低分子量有机酸对土壤有效磷及重金属释放影响的研究进展[J]. *土壤通报*, 2022, 53(5): 1228-1236.]
- [39] Hu G L, Ding P, Song Z H, et al. Application of acidifier in livestock and poultry[J]. *Feed Review*, 2018(7): 27-31, 34. [胡贵丽, 丁鹏, 宋泽和, 等. 酸化剂在畜禽生产中的作用[J]. *饲料博览*, 2018(7): 27-31, 34.]
- [40] Zhang X L, Fan S L, Zhang L P, et al. Bactericidal effects and security study of acid calcium sulfate[J]. *Journal of Baotou Medical College*, 2016, 32(9): 23-24, 44. [张晓丽, 樊树理, 张利平, 等. 酸性硫酸钙杀菌效果及其安全性研究[J]. *包头医学院报*, 2016, 32(9): 23-24, 44.]
- [41] Ding J H, Zhang Z Z, Liao M J, et al. Effect of disinfectant povidone iodine on nitrogen-cycling microorganisms in cultured water sediments[J]. *Technology of Water Treatment*, 2024, 50(2): 51-56. [丁建鹤, 张志忠, 廖明军, 等. 消毒剂聚维酮碘对养殖水体沉积物中氮循环微生物的影响[J]. *水处理技术*, 2024, 50(2): 51-56.]
- [42] Zhao T, Doyle M P, Kemp M C, et al. Influence of freezing and freezing plus acidic calcium sulfate and lactic acid addition on thermal inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in ground beef[J]. *Journal of Food Protection*, 2004, 67(8): 1760-1764.

***Vibrio* species, load and antibacterial effect of bactericidal drugs in clamworm**

GOU Ziyue^{1,2}, WANG Xiuhua^{2,3}, YANG Bing^{2,3}, ZHU Xinjie^{2,3}, XI Rui², PAN Mingchao², HU Xili²

1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
3. 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

Abstract: Clamworm is a biological bait with high nutritional value, widely used in promoting gonadal maturation of shrimp brood stock. However, as most clamworm occur in wild environments, they are prone to carrying pathogenic bacteria and viruses, posing a potential disease risk for farmed shrimp. To eliminate the pathogens carried by clamworm, antibiotics are often used by immersion. Due to the disadvantages of using antibiotics, novel safe and effective alternative products must be developed urgently. Sorbic acid, malic acid, citric acid, and other organic acids and their salts are commonly used as preservatives and fungicides in food and have potential development value for biological sterilization of aquatic bait. To research the profile of *Vibrio* pathogens carried by bait clamworm and establish effective pathogen elimination technology, the pathogen species and *Vibrio* load in 10 coastal areas of China were investigated. Sodium citric acid, povidone iodine, potassium sorbate, sodium dehydroacetate, malic acid, potassium dimethyl acid, propionic acid, and a *Vibrio*-killing product (VKP)—a commercial product containing citric acid and acid calcium sulfate—were employed to test the bactericidal effect *in vitro* in this study. The lowest and safest bactericidal concentrations of citric acid, povidone iodine, and VKP were tested *in vitro* for the elimination effect of *Vibrios* in clamworm. Additionally, protein, fat, cholesterol, and vitamin E content changes in clamworm after soaking in citric acid, povidone iodine, and VKP for 3 h were analyzed. The results displayed that the sample clamworm carried *Vibrio alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. owensii*, *V. parahaemolyticus*, and *V. parahaemolyticus* with detection rates of 86.7%, 20.0%, 13.3%, 13.3%, and 6.7%, respectively. The highest and lowest pathogenic *Vibrio* loads in the sample were 7.0×10^4 and 2.0×10^3 cfu/g, respectively. The minimum bactericidal concentrations of the nine drugs *in vitro* from low to high were povidone-iodine (10.0×10^{-3} g/L), formic acid (0.5 g/L), VKP (1.0 g/L), citric acid/malic acid/propionic acid (1.2 g/L), potassium dicarboxylate (1.6 g/L), sodium dehydroacetate (12.0 g/L), and potassium sorbate (30.0 g/L). The inactivation rates of *Vibrio in vivo* were 96.2%, 66.4%, 99.9% and 97.7%, 98.0% 100.0%, respectively, when the clamworm were soaked in the citric acid, povidone-iodine and VKP solutions at the minimum effective bactericidal concentration for 0.5 and 3 h. Safe concentrations of the three drugs were 48.9, 120.3 and 963.0 mg/L, respectively, meanwhile the contents of protein, fat, cholesterol, and vitamin E in the clamworm were significantly reduced compared with those in the control group ($P < 0.05$) after the 3 h treatment. The results suggest that the clamworm has a great biosafety risk as biological bait, and the soaking treatment in organic acids can reduce the pathogenic bacterial load. The results of this study provide a basis for the comprehensive prevention and control of shrimp diseases.

Key words: clamworm; *Vibrio*; organic acids; povidone-iodine; bactericidal concentration; safe concentration; nutrients

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