

文章编号:1005-8737(2000)04-0052-04

Biolog GN 法对不同地区养殖对虾弧菌区系的比较研究

李 筠¹, J. Vandenberghe², 纪伟尚¹, P. Sorgeloos², J. Swings², 徐怀恕¹

(1. 青岛海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛, 266003;

2. 比利时根特大学, 根特 9000, 比利时)

摘 要:采用 Biolog 细菌鉴定技术, 分析来自 5 个国家的 4 个对虾养殖品种苗期及部分养成期虾体上的 185 株弧菌(其中 24 株来自成虾)。结果表明:来源、种类不同的养殖对虾苗期的主要弧菌的区系组成相似, 溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)和鲨鱼弧菌(*V. carchariae*)(即哈维氏弧菌 *V. harveyi*)是普遍存在的种类, 同一种对虾在不同地区养殖, 其区系组成略有差异;哈维氏弧菌多为对虾苗期致病菌, 副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)主要为成虾致病菌;在健康虾苗和发病虾苗体内都可分离到溶藻弧菌。

关键词:对虾;弧菌区系;Biolog GN

中图分类号:S945.12

文献标识码:A

世界对虾养殖业主要集中在东南亚和拉丁美洲地区,厄瓜多尔、墨西哥、中国、印度尼西亚是其中养殖规模较大的国家。近年来,对虾育苗期间幼体大批死亡的现象时有发生,很多育苗场不能培育出健康的虾苗,给对虾养殖业的正常生产造成很大的影响^[1,2]。细菌性疾病是目前对虾工厂化育苗过程中危害最大、发病率最高的一类疾病^[1-4],其中弧菌病是对虾育苗阶段最严重的细菌病害,可引起对虾幼体或仔虾急性、亚急性和慢性感染,造成大量死亡^[1,2,5-7]。弧菌广泛分布于近岸海水、海洋生物体表和肠道中,属于海洋环境中的正常菌群,只有极少数弧菌对对虾幼体具有较强的致病性,而大部分弧菌是无害的,甚至是有益的^[8,9]。

由于弧菌种间特征的相似性很强,建立于少数关键特征基础上的不同鉴定系统往往因为某个关键特征结果的差异而导致鉴定结果的不同。用同一种方法对不同来源的弧菌同时进行比较分析,更具可比性。Biolog GN(Biolog Identification System, Bi-

olog)是以细菌对 95 种不同碳源的利用能力进行鉴定的方法^[10],主要应用于细菌的分类鉴定,在各鉴定系统中以其特征多、氧化还原指示剂的使用、数据库庞大、快速、准确而越来越显示出其优越性^[10-14]。目前在研究微生物群落功能潜势(functional potential of microbial communities)方面开辟了新的应用领域^[13]。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

菌株分离于中国对虾 *Penaeus chinensis*(中国)、南美白对虾 *P. vannamei*(厄瓜多尔、比利时、墨西哥)、斑节对虾 *P. monodon*(印度尼西亚、中国、比利时)、罗氏新对虾 *Metapenaeus rosenbergii*(比利时、印度尼西亚),共 185 株菌,其中中国 32 株,墨西哥 26 株,比利时 30 株,分离自虾苗、成虾和养殖海水;厄瓜多尔 56 株,分离自虾苗和成虾;印度尼西亚 41 株,分离自虾苗。

1.2 细菌分离方法

不同发育阶段虾苗的取样量为无节幼体 50 尾、蚤状幼体 20~30 尾、糠虾幼体 20~30 尾、仔虾 10~20 尾,无菌海水洗涤 3 次,每次 100 ml,将清洗过

收稿日期:2000-04-30

基金项目:欧盟欧洲委员会项目资助(TS3-CT94-0269)

作者简介:李 筠(1967-),女,青岛海洋大学博士生,讲师,从事海洋微生物研究。

的虾苗过滤到无菌匀浆器中进行组织匀浆,10 倍系列稀释,涂布平板分离;取成虾的肝胰腺、血淋巴,经组织匀浆或直接涂布分离;取养殖海水稀释涂布分离。细菌分离培养基为 TCBS 和 2216E^[8]。28℃ 培养 2~7 d,挑取 3 种优势菌,纯化后,于 15% 甘油中 -80℃ 保藏。

1.3 细菌鉴定

常规方法进行革兰氏染色、鞭毛染色。葡萄糖氧化发酵试验、氧化酶试验、过氧化氢酶试验、O/129 试验参照 West 和 Colwell 的方法^[15]进行。Biolog GN 鉴定方法如下:待测菌株活化后接种到 BHI(Difco, Detroit, USA, 添加质量浓度为 15 g/L 的 NaCl)平板培养基上,25℃ 培养 24 h,以无菌棉签蘸取少量新鲜菌苔,制成菌悬液(NaCl 质量浓度 15 g/L),使其 OD₅₉₀ = 0.261~0.300,用 8 通道连续加样器进行 Biolog GN 板(Biolog, Hayward, CA, USA)接种,每孔精确接种菌悬液 150 μl,加盖,25℃ 培养 24 h(培养时间、培养温度尽量保持精确一致),打开微孔板盖,放入结果自动读数仪(Labsystems, Helsinki, Finland)上认读反应结果(即微孔板的颜色变化),比色波长为 550 nm。比色结果与 Biolog 数据库比较,数值分类采用 Pearson product moment correlation coefficient 和 UPGMA (Sneath and

Sokal, 1973)聚类分析方法。相似性达到 80% 以上的一簇群为同一种菌,并与本簇群中的参考菌株、标准菌株为同种。

2 结果与讨论

2.1 弧菌组成特点

从 4 种养殖的对虾(中国对虾、罗氏新对虾、斑节对虾、南美白对虾)的虾苗及部分成虾、水体中分离出符合弧菌属关键特征—革兰氏阴性、短杆状、极生单鞭毛、运动、氧化酶阳性、过氧化氢酶阳性、发酵葡萄糖产酸、对弧菌抑制剂 O/129(150 μg/ml)敏感的菌株 185 株(表 1)。其中,来源于健康虾 65 株,发病期 115 株;来源于成虾 24 株,对虾幼体 145 株,育苗期水体 11 株(另 5 株未鉴定到种)。

采用 Biolog GN 系统对这些菌株进行鉴定,根据 Biolog 指纹图谱(插图 1)鉴定出 7 种弧菌,即溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、鲎鱼弧菌(*V. carchariae*)(根据《伯杰细菌鉴定手册》第 9 版,被并入哈维氏弧菌(*V. harveyi*),在后面的论述中,均称哈维氏弧菌)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)、亮弧菌(*V. splendidus*)、霍氏弧菌(*V. hollisae*)、解蛋白弧菌(*V. proteolyticus*)、地中海弧菌(*V. mediterranei*)。

表 1 5 个国家 4 种对虾的弧菌组成

Table 1 Distribution of vibrios isolated from 4 species of shrimp in 5 countries																株
菌株来源	溶藻弧菌		哈维氏弧菌		副溶血弧菌		亮弧菌		霍氏弧菌		解蛋白弧菌		地中海弧菌		未鉴定	合计
Source of vibrios	<i>V. alginolyticus</i>		<i>V. harveyi</i>		<i>V. parahaemolyticus</i>		<i>V. splendidus</i>		<i>V. hollisae</i>		<i>V. proteolyticus</i>		<i>V. mediterranei</i>		到种	Total
	H	D	H	D	H	D	H	D	H	D	H	D	H	D	Unid	
中国对虾	L	6														
<i>P. chinensis</i>	A	8	3													
	Tw		1			3	3									
	L	26	16		35				8		1					4
南美白对虾	A			1		9										
<i>P. vannamei</i>	Tw									1		1				
	Sw													1		
罗氏新对虾	L	7	6		2											
<i>M. rosenbergii</i>	A	1		1												1
斑节对虾	L	4	12		23									1		
<i>P. monodon</i>																
合 计	52	38	1	61		12	3		8	1	1	1		2	5	
Total		90		62		12	3		9		2		2		5	185

注: H—健康期, Health shrimp; D—发病期, Shrimp in diseased period; Lar—虾苗, Larval shrimp; Adu—成虾, Adult shrimp; Sw—海水, Sea water; Tw—养殖水, Culture water.

溶藻弧菌和哈维氏弧菌为明显优势种,不同来源、不同种类对虾结果相似。在碳源利用上,来源于

不同种对虾的同种弧菌没有明显的菌株间差异和地区差异,来源于发病对虾的和健康对虾的也无明显

差异。霍氏弧菌只在南美白对虾中检出,亮弧菌只在中国对虾中检出,解蛋白弧菌仅在墨西哥产的南美白对虾上检出,地中海弧菌只在比利时样品中检出。

溶藻弧菌在发病期病虾和未发病期的健康幼体上以及正常海水中都可被分离出来。溶藻弧菌曾被报道为成虾致病菌^[2],但是我们研究野生健康的中国对虾成虾肠道细菌区系时发现:弧菌为优势菌,其中包括溶藻弧菌(33%)、哈维氏弧菌(4%)、坎贝氏弧菌(20%)、漂浮弧菌(23%)^[8]。目前已有一些研究报道,认为溶藻弧菌属有益菌(probiotics)^[8,9,14]或无害菌,属于正常菌群中的一员。厄瓜多尔已将溶藻弧菌作为有益菌进行研究,而且已开发出产品并有效地应用于南美白对虾的育苗过程中。我们从中国对虾健康幼体上只检测到溶藻弧菌,没有检测到哈维氏弧菌,这从一定程度上证实溶藻弧菌对中国对虾幼体无致病性。

对于苗期对虾,自发病个体中均能分离出哈维氏弧菌,而且5个国家的4种对虾幼体的哈维氏弧菌检出规律相似,可见哈维氏弧菌与对虾苗期病害有关。已有报道中国对虾苗期发病时,哈维氏弧菌占优势,而溶藻弧菌未检出或很少检出^[8],菌浴感染试验也证实哈维氏弧菌对中国对虾和南美白对虾幼体具有致病性^[8,16]。

副溶血弧菌只在养成期病虾体上检出,与成虾的细菌病有关,是对虾的主要病原之一^[7]。

2.2 关于鉴定方法

弧菌种间相似性较强,鉴定方法的不同往往会造成鉴定结果的差异,尤其是关键特征法,并非一个种的所有菌株对某一个特征反应是100%的阳性(或阴性),因此常常因为某个关键特征结果差异而导致细菌鉴定结果的差异,进行细菌鉴定时选定的鉴定特征越少,差异率越高。本研究采用Biolog GN系统对5个国家4种对虾的弧菌进行鉴定,结果具有可比性。

目前已建立的绝大多数鉴定系统,是以关键特征为基础,依赖于细菌生长代谢而导致环境pH改变,依据酸碱指示剂的颜色变化判断结果。这些系统在多数常规检测中效果很好,但是对于一些重要菌属如 *Acinetobacter*、*Moraxella*、*Aeromonas* 和 *Haemophilus* 等的鉴定效果不佳,对某些罕见的特殊的来自于人体或环境中的污染菌也难以鉴定。Biolog 系统是一个新的细菌鉴定系统,以四唑碱

(Tetrazolium-based) 为指示剂,通过微生物对95种碳源利用情况,微生物呼吸过程中电子产生与传递, Eh 改变,使指示剂颜色发生变化而进行鉴定的。接种初始阶段,由于处于氧化态,四唑碱为无色,随着细菌增长,碳源被利用,呼吸作用不断加强,其间产生的电子将四唑碱指示剂还原, Biolog GN 板微孔中呈现程度不同的紫色,形成“呼吸指纹”,利用特定程序进行比较分析。该系统试验项目多,数值分类法分析数据,从更大程度上克服了由于一个种内的所有菌株对某一个特征反应不是100%的阳性(或阴性)而造成某些特征结果差异的弱点,鉴定结果精确度高,简便快捷,数据库庞大,是目前很好的细菌快速鉴定系统^[10,12,13]。研究证明 Biolog GN 系统可以很好地鉴定海洋弧菌^[11,14,17]。

参考文献:

- [1] 孟庆显. 对虾育苗期间的疾病[A]. 对虾疾病防治手册[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1992. 31-79.
- [2] Lightner D V. Disease of cultured shrimp[A]. P V McVey. CRC handbook of mariculture[M]. Boca Raton, Fla: CRC Press, 1993. 393-486.
- [3] 金忠文. 中国对虾人工育苗期间丝状细菌的防治[J]. 中国水产, 1992, (4): 30-31.
- [4] 叶孝经, 王文兴. 中国对虾流行性弧菌病的研究[J]. 海洋水产研究丛刊, 1986, 30: 11-18.
- [5] Chanratchakool P, Pearson M, Limsuwan C, et al. Oxytetracycline sensitivity of *Vibrio* species isolated from diseased black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius[J]. J Fish Dis, 1995, 18: 79-82.
- [6] Prayitno S B, Latchford J W. Experimental infection of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectivity[J]. Aquaculture, 1995, 132: 105-112.
- [7] Xu B, Xu H S, Ji W S, et al. Pathogens and pathogenicity to *Penaeus orientalis* Kishinouye[J]. Acta Oceanol Sin, 1994, 13: 297-304.
- [8] 徐怀恕, 杨学宋, 李 筠. 对虾苗期细菌病害的诊断与控制[M]. 北京: 海洋出版社, 1999. 23-87, 136-145.
- [9] Austin B, L F Stuckey, P A W Robertson, et al. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*[J]. J Fish Dis, 1995, 18: 93-96.
- [10] Bochner B. Breathprints at the microbial level[J]. ASM News, 1989, 55: 536-539.
- [11] Austin B, Austin D A, et al. A comparison of methods for the typing of fish-pathogenic *Vibrio* spp [J]. Syst Appl Microbiol, 1997, 20 (1): 89-101.
- [12] Kingler J M, Stowe R P, Obenhuber D C, et al. Evaluation of

- the biolog automated microbial identification system[J]. Appl Environ Microbiol, 1992, 58(6): 2 089-2 092.
- [13] Smalla K, Wachtendorf U, Heuer H, et al. Analysis of Biolog GN substrate utilization patterns by microbial communities[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(4): 1 220-1 225.
- [14] Vandenberghe J, Y Li, L Verdone, et al. Vibrios associated with *Penaeus chinenses* (Crustacea: Decapoda) larvae and post-larvae in Chinese shrimp hatcheries[J]. Aquaculture, 1998, 169:121-123.
- [15] West P A, Colwell R R. Identification and classification of Vibrionaceae - an overview[A]. R R Colwell. Vibrios in the Environment[M]. New York: John Wiley, 1984.285-363.
- [16] Robertson P A W, Calderon J, Carrera L, et al. Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae[J]. Disease of Aquatic Organisms, 1998, 32(2): 151-155.
- [17] Austin B, M Alsina, D A, Austin A R, et al. Identification and typing of *Vibrio anguillarum*: a comparison of methods[J]. Syst Appl Microbiol, 1995, 18: 285-302.

Comparison of vibrios isolated from shrimp in different countries

LI Yun¹, J. Vandenberghe², JI Wei-shang¹, P. Sorgeloos², J. Swings², XU Huai-shu¹

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China;

2. University of Gent, 9000 Gent, Belgium)

Abstract: The Biolog GN system was employed to assay the distribution of vibrios isolated from 4 species of shrimp larvae and adults, health and diseased, cultured in 5 countries (China, Ecuador, Belgium, Mexico and Indonesia). The results show that the vibrios in shrimps of different species and from different countries are similar in distribution of dominant species; *Vibrio alginolyticus* and *V. harveyi* (or *V. carchariae*) can be detected in all the sample species from the 5 countries and are the dominant species; in the same species of shrimp but from different countries, there exist some differences in vibrio distribution; the main pathogenic bacteria in shrimp larvae is mostly *V. harveyi*, while in adults is *V. parahaemolyticus*; *V. alginolyticus* can be found in both health and diseased shrimps.

Key words: shrimp; vibrio; Biolog GN