

文章编号: 1004-7271(2006)01-0109-05

· 研究简报 ·

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

李继秋^{1,2}, 谭北平², 麦康森²

(1. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090;

2. 中国海洋大学农业部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要 比较了同一养殖池中的感染白斑综合征病毒(WSSV)和未感染 WSSV 的凡纳滨对虾的肠道菌群,旨在探讨对虾肠道菌群与机体健康状态之间的关系。感染 WSSV 对虾肠道的细菌总数为 1.06×10^6 CFU/尾,显著高于未感染 WSSV 的对虾 (1.78×10^5 CFU/尾; $P < 0.05$),且其肠道中的细菌分别属于弧菌属、气单胞菌属、海水球菌属、盐球菌属和乳酸杆菌属;感染 WSSV 的对虾 ($P < 0.05$),气单胞菌的比例显著的低于感染 WSSV 的对虾 ($P < 0.05$),盐球菌所占的比例两者之间差异不显著。结果显示,两种对虾在肠道菌群组成和细菌组成和细菌数量上存在显著的差异,初步表明对虾肠道菌群区系和机体的健康状态密切相关。

关键词 凡纳滨对虾; 白斑综合征病毒; 肠道菌群

中图分类号 S 945.4 文献标识码: A

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

LI Ji-qiu^{1,2}, TAN Bei-ping², MAI Kang-sen²

(1. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

2. The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Agriculture, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract The present study was to investigate the relationship between white spot syndrome virus(WSSV) outbreak in shrimp intestine. In intestine of the shrimp infected by WSSV, the total bacteria count was 1.05×10^6 CFU/shrimp, it was significantly higher than that of the shrimp uninfected by WSSV (1.78×10^5 CFU/shrimp, $P < 0.05$); Five genus bacteria were identified and the dominant genus were *Vibrionaceae* and *Aeromonas*, followed by *Marinococcus*, *Salinicoccus* and *Lactobacillus*. In intestine of the shrimp uninfected by WSSV, four genus bacteria were identified excepting *Marinococcus*, the percentages of *Vibrionaceae* and *Lactobacillus* were significantly higher, and the percentages of *Aeromonas* was significantly lower than that of the shrimp infected by WSSV ($P < 0.05$). There was not significant difference in the percentage of *Salinicoccus* in the shrimp intestine. The results indicated that there is significant difference in intestine microflora between the shrimp infected with WSSV and the normal,

收稿日期 2005-03-30

基金项目 国家高技术研究发展计划(863 计划)(2001AA620206、2003AA622060)

作者简介 李继秋(1975-),男,山东东平人,讲师,博士,主要从事水产动物营养与免疫方面的研究。Tel: 021-65710362, E-mail: jqli

@shfu.edu.cn.

and there is a form of linkage between the intestinal microflora and WSSV.

Key words : *Penaeus vannamei* ; white spot syndrome virus ; intestinal bacterium community

动物的消化道具有营养和防御疾病的双重功能^[1]。肠道中寄居着大量的微生物,共同生存于一定空间内组成了一个处于动态平衡的微生物生态系统^[2]。在人和畜禽上的研究表明,肠道菌群参与并调节宿主生化反应和生理反应,还具有免疫调节作用,抵制宿主疾病发生^[3]。由于生存环境和自身的生物学特点与陆生动物不同,对虾肠道的菌群容易受环境的影响^[4]。目前,对虾肠道菌群的研究多局限于对正常对虾肠道菌群区系的研究^[5-7],不同种类间对虾肠道菌群区系组成的差异^[8],以及养殖水体温度、盐度等对正常菌群的影响^[9-11]等方面。但是,对于不同健康状态下,对虾肠道菌群区系差异的研究尚未见报道。本实验对从同一对虾养殖池中采集到的感染白斑综合征病毒(WSSV)的对虾和未感染 WSSV 凡纳滨对虾的肠道微生物区系进行了比较研究,目的在于探讨肠道微生物区系与对虾健康状态之间是否密切相关,为水产益生菌的开发和应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验样品的采集

试验用虾为凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*),体长为 6~8 cm。取自山东省胶南市对虾养殖场。该对虾养殖池为水泥池,采样前,虾池没有施加任何抗生素和微生态制剂产品。盐度约为 20,温度约 28 ℃。将采集到的活虾放入氧气袋中迅速运回实验室进行样品处理。

1.2 样品的处理

首先用 75% 的酒精擦拭活虾体表进行消毒,无菌操作将活虾解剖,取出对虾的头部软组织和肠道,分别用于白斑综合征病毒(WSSV)检测和肠道菌群区系分析。取感染 WSSV 的对虾和未感染 WSSV 的对虾各 9 尾,每 3 尾为一个重复,进行肠道细菌的计数和鉴定。

1.3 WSSV 的检测

参照文献 [12] 的方法,从对虾头部软组织中提取用于 WSSV 病毒检测的 DNA,然后按照 Yoganandhan 等^[13]所描述的方法进行 WSSV 病毒 DNA 的检测。

1.4 肠道细菌的计数和分离

取出的肠道用无菌生理盐水冲洗 3 次,分别置于无菌匀浆器中加 1 mL 无菌生理盐水匀浆,取匀浆液进行 10 倍系列稀释,分别取 0.1 mL 涂布 2216E 平板,28 ℃ 培养 48 h 后统计细菌菌落(CFU)。

挑取菌落分布均匀且菌落数为 300 左右的平板,平均划分几个区域,每个区域大约含 30 个菌落的区域,随机挑取一个区域的细菌用于菌群区系研究。从 2216E 平板上挑取的菌落通过划线进一步纯化。纯化后的菌种置于含 15% 甘油的生理盐水中保存于 -80 ℃ 的冰箱中。

1.5 细菌鉴定

参照 Oliver^[14]和 Muroga 等^[15]海洋细菌鉴定系统,对细菌的形态、生理和生化特征进行测定,然后根据《伯杰氏细菌鉴定手册》^[16]将菌株鉴定到属。鉴定指标主要有: 格兰氏染色、鞭毛、运动性、菌落形态、抗生素敏感性、O/129(弧菌抑制剂的敏感性)、氧化酶、接触酶、葡萄糖氧化发酵、吲哚产生反应、鸟氨酸、赖氨酸和精氨酸脱羧、精氨酸双水解酶和硫化氢等反应。

1.6 统计分析

利用 SPSS 11.0 软件进行差异显著性检验。

2 结果

2.1 WSSV 的检测结果

通过对样品 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳可知对虾 WSSV 检测结果(图 1)。V1、V2、V3 三条带表明被检测的对虾样品感染了 WSSV, 未感染 WSSV 的对虾样品的 PCR 产物没有电泳条带出现(H1、H2、H3)。

2.2 肠道细菌数

感染 WSSV 对虾的肠道细菌总数为 1.06×10^6 CFU/尾, 显著高于未感染 WSSV 的肠道细菌总数 (1.78×10^5 CFU/尾; $P < 0.05$)。

2.3 肠道菌群组成测定结果

从感染 WSSV 的对虾肠道中分离到了弧菌属、气单胞菌属、海水球菌属、盐水球菌属、乳酸杆菌属等 5 个属的细菌, 分别占肠道总菌数的 18.75%、17.19%、15.62%、7.81% 和 4.69%。从未感染 WSSV 的对虾肠道中分离了弧菌属、乳酸杆菌属、气单胞菌属和盐水球菌属等 4 个属的细菌, 分别占肠道总菌数的 51.78%、14.29%、8.93% 和 8.93%。其中, 未感染 WSSV 对虾肠道中弧菌和乳酸菌所占比例显著地高于感染 WSSV 对虾 ($P < 0.05$), 而气单胞菌的比例显著的低于感染 WSSV 对虾 ($P < 0.05$)。两者之间盐水球菌所占的比例差异不显著。对虾肠道细菌鉴定结果见图 2。

3 讨论

本试验所有用虾均来自同一养殖池, 因此管理和饲养条件完全相同。通过对肠道菌群的分析, 发现感染 WSSV 的对虾和未感染 WSSV 的对虾的肠道菌群组成和细菌数目存在着明显的差异性。说明 WSSV 是导致肠道菌群区系差异的主要因素。

肠道正常菌群是微生物与其宿主在长期进化过程中形成的生态系。在健康的对虾肠道微生物区系中, 只有一到两个属的细菌占优势。在野生的中国对虾成虾肠道中弧菌和发光杆菌为优势菌^[7]; Yasuda 和 Kitao^[5]发现在日本对虾的溞状幼体时期弧菌属是优势菌属; Oxley 等^[17]报道无论是野生的还是养殖的墨吉对虾, 健康的对虾肠道中的优势菌都是弧菌属。由此可知, 弧菌是海水养殖对虾肠道中的优势菌属之一。本实验结果也证实, 无论是在感染 WSSV 的还是未感染 WSSV 的对虾肠道中弧菌都是优势菌。虽然, 两者之间盐水球菌所占的比例差异不显著, 但是, 未感染 WSSV 对虾肠道中弧菌和乳酸菌所占比例显著的高于感染 WSSV 对虾, 而气单胞菌的比例显著的低于感染 WSSV 对虾, 并且, 在未感染 WSSV 对虾的肠道中未发现海水球菌。大量研究证明, 乳酸杆菌是罕见致病的细菌, 在水产动物上用作益生菌可起促进机体生长和增强机体免疫力的作用^[18, 19]。气单胞菌和弧菌都是条件性致病菌^[20]。条件致病菌可能是过路菌, 也可能是机体内正常微生物菌群的组成部分, 只有在其数量超过正常值或其所在部位不是正常生境, 或者宿主抵抗力下降时等条件下才能致病^[21]。在对虾养殖中, 病原菌相当一部分是来自养

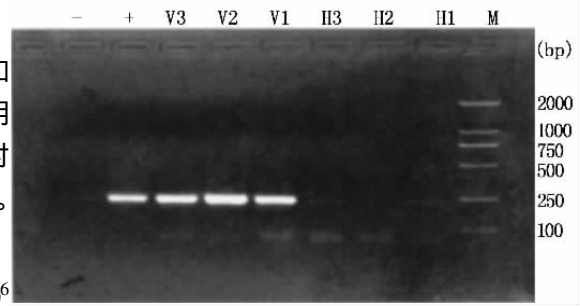


图 1 对虾样品 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Determination of WSSV DNA in head
solt tissue collected from samples

- 阴性对照; + : 阳性对照; H1, H2, H3 : 未感染 WSSV 的对虾;
V1, V2, V3 : 感染 WSSV 的对虾。

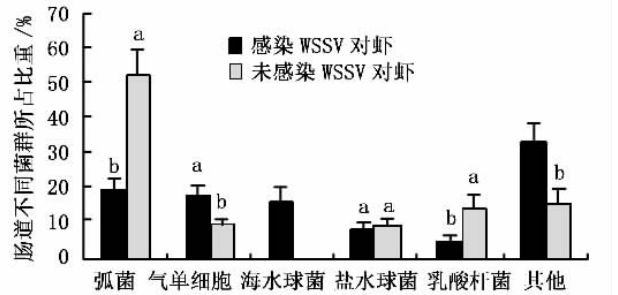


图 2 对虾肠道细菌的各属细菌组成

Fig.2 Frequency of bacteria isolated from
moribund and healthy shrimp

以 $P > 0.05$ 为标准, 对 3 个重复的平均数进行 LDS
多重比较, 差异不显著的处理标有相同的字母;
“其他”为用本研究方法不能鉴定的细菌。

殖环境或对虾肠道中的正常菌群^[22]。Skjermo 和 Vadsteir^[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。Yasuda 和 Kitao^[5]研究发现,以气单胞菌和弧菌为肠道优势菌的日本对虾的生长速度比以假单胞菌为肠道优势菌的慢。从数量上比较,感染 WSSV 的对虾肠道总细菌数约为未感染 WSSV 对虾的 10 倍,差异显著。Tannock^[1]在哺乳动物上做了肠道中正常菌群对宿主健康状况影响的实验,证实了动物肠道中的正常菌群对宿主的生化反应、生理状况以及机体的免疫功能具有重大影响。正常菌群的失衡会引起不同类型的疾病,反之,不同类型的疾病也有可能造成正常微生物的失衡^[21]。由以上试验结果可推断,感染 WSSV 的对虾和未感染 WSSV 的对虾肠道菌群区系的差异是肠道正常菌群的失衡的具体表现。进一步说明了对虾肠道正常菌群、病原体(就本实验具体而言指 WSSV)和机体的健康状态存在者必然联系。

在人和畜禽上的研究表明,消化道中的菌群在维持宿主健康方面具有重要的作用。动物肠道内菌群是肠道生态环境密不可分的组成部分,参与并调节许多与化学环境有关的反应,如生物化学反应,生理反应,免疫调节反应和疾病的抵制^[3]。大量且种类繁多的细菌共同生存于一定空间内组成了一个处于动态平衡的微生态系统^[2]。系统中的生态因子通过竞争性排斥和拮抗作用来调节菌群的平衡,同时有助于抑制肠道中病原性微生物^[24]。而益生菌是指那些能通过改善微生物生态平衡或改进原有微生物区系属性的对养殖动物施加有利影响的活微生物细胞^[25]。因此,通过饲喂益生菌来改善动物肠道菌群平衡也是提高机体免疫力的重要手段之一。开展水产动物肠道菌群的研究可为水产饲用益生菌研究和应用提供理论依据。

本实验得到中国水产科学院黄海水产研究所生态实验室李健研究员的大力支持和帮助,谨致谢意!

参考文献:

- [1] Tannock G W. Studies of the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics [J]. *Int dairy Journal*, 1998, 8: 527-533.
- [2] Ducluzeau R. Role of experimental ecology in gastroenterology [M]. In: Bergogne-Berezin E, ed. *Microbial Ecology and Intestinal Infections*, Springer, Paris, 1989. 1-5.
- [3] Wilhelm H, Holzapfel, Petr Haberer, et al. Overview of gut flora and probiotics [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1998, 41: 85-101.
- [4] Gatesoupe F J. The use of probiotics in aquaculture [J]. *Aquac*, 1999, 180: 147-165.
- [5] Yasuda K, Kitao T. Bacterial flora in the digestive tract of prawns, *Penaeus japonicus* Bate [J]. *Aquac*, 1980, 19: 229-234.
- [6] Ampe F, Thiéry A. Microflora associated with the digestive tract of the fairy shrimp *Branchinella spinosa* (H. Milne Edwards, 1840) (Crustacea, Branchiopoda) [J]. *Microbiology Letters*, 1998, 158: 201-205.
- [7] 徐怀恕, 杨学宋, 李筠, 等. 对虾苗期细菌病害的诊断与控制 [M]. 北京: 海洋出版社, 1999. 84-87.
- [8] Pinn E H, Nickell L A, Rogerson A, et al. Comparison of gut morphology and gut microflora of seven species of mud shrimp (Crustacea: Decapoda: Thalassinidea) [J]. *Mar Biol*, 1999, 133: 103-114.
- [9] Lésel R. Thermal effect on bacterial flora in the gut of rainbow trout and African catfish [M]. In: Lésel R, ed. *Microbiology in Poecilotherms*. Elsevier, Amsterdam, 1990. 33-38.
- [10] Hamid A, Sakata T, Kakimoto D. Microflora in the alimentary tract of grey mullet: 2. A comparison of the mullet intestinal microflora in fresh and sea water [J]. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1978, 44: 53-57.
- [11] Ringø E, Strøm E. Microflora of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.): gastrointestinal microflora of free-living fish and effect of diet and salinity on intestinal microflora [J]. *Aquaculture Fish Manage*, 1994, 25: 623-629.
- [12] Lo C F, Leu J H, Ho C H, et al. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome virus (WSSV) in penaeid shrimp using polymerase chain reaction [J]. *Dis Aquat Org*, 1996, 25: 133-141.
- [13] Yoganandhan K, Sathish S, Murugan V, et al. Screening the organs for early detection of white spot syndrome virus in *Penaeus indicus* by histopathology and PCR techniques [J]. *Aquac*, 2003, 215: 21-29.
- [14] Oliver J D. Instrument and methods, taxonomic scheme for the identification of marine bacteria [J]. *Deep Sea Res*, 1982, 29: 795-798.
- [15] Muroga K, Higashi M, Keitoku H. The isolation of intestinal microflora of farmed red seabream (*Pagrus major*) and black seabream (*Acanthogagrus schlegeli*) at larval and juvenile stages [J]. *Aquac*, 1987, 65: 79-88.
- [16] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, et al. *Bergey's manual of determinative bacteriology* (ninth edition) [M]. Baltimore, Williams and

- Wilkins, 1994.
- [17] Oxley A, Shipton W, Owens L, et al. Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguensis* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 93 : 214 - 223.
- [18] Gatesoupe F J. The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus* [J]. Aquac, 1991, 96 : 335 - 342.
- [19] Byun J W, Park S C, Benno Y, et al. Probiotic effect of *Lactobacillus* sp. DS - 12 in flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. J Gen Appl Microbiol, 1997, 43 : 305 - 308.
- [20] 徐怀恕, 杨学宋 李 筠, 等. 对虾苗期细菌病害的诊断与控制 [M]. 北京 海洋出版社, 1999. 217.
- [21] 郭兴华. 益生菌基础与应用 [M]. 北京 北京科学技术出版社, 2002. 3 - 4.
- [22] Lightner D V. Diseases of cultured penaeid shrimp [A]. McVey J P. (Ed.), CRC Handbook of Mariculture [M]. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 1993. 289 - 320.
- [23] Skjermo J, Vadstein O. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae [J]. Aquac, 1999, 177 : 333 - 343.
- [24] Tannock G W. The microecology of lactobacilli inhabiting the gastrointestinal tract [J]. Adv Microbiol Ecol, 1990, 11 : 147 - 171.
- [25] Fuller R. Probiotics in man and animals [J]. J Appl Bacteriol, 1989, 66 : 365 - 378.

书 讯

《水产品安全生产与品质控制》出版

广东海洋大学洪鹏志、章超桦教授主编的《水产品安全生产与品质控制》一书, 近期由化学工业出版社出版, 该书以生产过程中的流程为主线, 按生产原料、生产环境、生产过程及人员、设备、储运、包装等过程中可能出现的危害及控制途径来进行分别叙述。在各个环节中, 围绕各关键点容易出现各种危害, 如化学性危害、物理性危害、生物性危害等几个方面来论述各种危害分析及其控制方法, 在系统、详细地介绍 GAP、GMP、HACCP 等概念和知识的同时, 着重为读者提供一个有参考价值并能够应用到实际的操作文本和实例。该书内容新颖、实用, 体现了食品生产过程中的危害分析、控制方法、最终达到食品安全的主题思想。

全书共分六章。介绍了国内外水产品的安全现状及水产品安全的重要性, 详细阐述了水产品安全与质量控制体系、水产品中存在的危害以及水产品危害的控制方法, 最后介绍了实际生产中的危害控制及水产品安全与质量控制体系文件的编写。另外, 还有七个附录, 分别是《中国水产品卫生要求》、《日本水产品卫生要求》、《欧盟水产品卫生要求》、《俄罗斯水产品卫生要求》、《美国水产品卫生要求》、《韩国水产品卫生要求》、《国外 × × 官员检查水产公司冷冻制品厂百问》。

本书语言通俗易懂, 注重逻辑的连贯性, 将危害分析与预防方式融合在操作中, 更加符合生产实际。适用于水产品加工企业、科研单位、水产品贸易机构、食品卫生和水产品大中专院校等相关单位。定价 38 元。

本刊编辑部