

人工培育对虾苗种体内可培养细菌 数量及组成分析*

张晓静^{1,2} 宋晓玲^{2①} 万晓媛² 杨冰² 黄捷^{2,3}

(1. 中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003;

2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;

3. 青岛国家海洋科学重点实验室 青岛 266071)

摘要 采用常规细菌分离、培养与纯化,结合细菌 16S rDNA 序列分析等方法,调查分析了山东、天津、浙江部分苗种场凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)和中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)苗种体内的可培养细菌总数以及优势菌的种类和数量,并用 PCR 的方法检测对虾苗种携带病毒情况。结果显示,凡纳滨对虾和中国明对虾苗种体内的可培养细菌总数均在 10^5 – 10^7 CFU/g 之间,分离出的细菌分属于弧菌属(*Vibrio*)、发光杆菌属(*Photobacterium*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)等 8 个属,其中,弧菌属在对虾苗种体内占绝对优势,达 40.0%–90.23%。部分凡纳滨对虾和中国明对虾苗种样品检测为白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)和传染性皮下及造血组织坏死病毒(Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHNV)阳性,WSSV 检出率为 50.0%,IHNV 检出率为 37.5%,同时携带两种病毒的检出率为 11.11%。只携带 WSSV 病毒以及同时携带两种病毒的对虾苗种体内的总菌数量在 1.23×10^7 – 4.14×10^7 CFU/g 之间,显著高于其他批次的样品($P < 0.05$),且弧菌数量在 10^7 CFU/g 左右,显著高于其他批次的样品($P < 0.05$)。只携带 IHNV 以及不携带病毒的对虾苗种体内的弧菌数量为 10^4 – 10^6 CFU/g。研究表明,弧菌属在凡纳滨对虾和中国明对虾苗种体内普遍存在且为优势菌属,携带 WSSV 可能会引起对虾苗种体内的弧菌数量增长。

关键词 凡纳滨对虾; 中国明对虾; 弧菌; WSSV; IHNV

中图分类号 S945.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)01-0052-06

近年来,对虾养殖业迅速发展,中国逐渐成为世界范围内的对虾养殖大国,我国对虾的养殖产量约占世界产量的 1/3,而维持这一养殖规模所需要的苗种数量,每年在 5000 亿尾以上(江世贵,2010)¹⁾。据中国渔业统计年鉴数据显示,我国凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)苗种生产量在 2008–2012 年的各年分别达到 3770 亿尾、4484 亿尾、4635 亿尾、6332

亿尾和 6948 亿尾,对虾苗种产量在逐年上升。对虾苗种是对虾养殖业发展的基础,投放健康苗种是对虾养殖成功的先决条件。对虾体内的细菌组成影响着对虾的健康状况,某些细菌成为优势菌时可能会导致对虾患病,如 Vandenberghe 等(1999)研究发现,溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)在对虾幼体的所有时期中均为优势菌,哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)多在患病的对虾

*国家重点基础研究发展计划项目(2012CB114405)和山东省自主创新专项(2013CXC80202)共同资助。张晓静, E-mail: zhangxiaojing1718@163.com

① 通讯作者: 宋晓玲, 研究员, E-mail: songxl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-01-19, 收修改稿日期: 2015-02-12

1)江世贵. 对虾苗种现状与育苗研究新进展. 对虾产业发展论坛论文集, 2010, 70–76

幼体内为优势菌;李筠等(2004)也曾报道,当哈维氏弧菌为优势菌时,对虾容易发生病害。另有些正常存在于对虾体内的细菌可以作为益生菌来提高对虾对病害的防御能力(孙艳等,2012; Vaseeharan *et al.*, 2003; 李桂英等, 2011)。所以,定性、定量研究对虾体内的细菌菌群结构对于研究对虾的健康状况具有重要意义。细菌病和病毒病是影响对虾产业最主要的病害(Lightner *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2015; Aftabuddin *et al.*, 2011; Lightner, 1999),有研究报道,病毒和细菌相互作用会引起对虾的大量死亡(苏永全等, 1995; Phuoc *et al.*, 2008; 安永菊, 2007),并且对虾在感染病毒后体内的某些病原菌数量大量增加,从而减弱对虾的抵御能力而加速死亡(李继秋等, 2006; 秦崇涛等, 2011)。国内外关于对虾体内细菌的研究已有报道(李玉宏等, 2014; Li *et al.*, 2004),但是,关于对虾苗种体内优势菌结构组成以及携带病毒的调查还鲜有报道,通过多地点的调查来研究携带病毒和不携带病毒的对虾幼苗体内的优势菌结构组成,可为养殖对虾病害的发生和防控提供必要的基础数据。

1 材料与方法

1.1 样品来源

凡纳滨对虾和中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)苗种样品共采集 9 批次,苗种采集时间为 2013 年 4-9 月,采样地包括山东、天津、浙江,所采集的对虾苗种均为无任何病症的人工培育对虾仔虾幼体。

1.2 样品的细菌总数测定

采集的对虾苗种置于盛有海水的充气袋中运回实验室。随机取 10 尾对虾苗种,立即用无菌的 PBS(pH=7.0)缓冲液冲洗 3-4 次,无菌滤纸吸干对虾表面的水分,放入无菌 EP 管中称重后,加入 1 ml 无菌 PBS,无菌研磨棒研磨成匀浆。取 0.1 ml 的匀浆液用无菌 PBS 缓冲液进行 10 倍梯度系列稀释,分别取 0.1 ml 涂布于 2216E 固体培养基上,每个梯度 3 个平行。倒置于 37℃ 恒温培养箱中培养 16-20 h,肉眼观察 2216E 平板上细菌的菌落形态,在菌落数为 30-300 的平板上,对菌落形态完全一致的细菌进行编号及计数,同时,挑选出优势菌株进行划线纯化,纯化的优势菌保存在-80℃ 冰箱中。

1.3 优势菌株 16S rDNA 序列分析

1.3.1 细菌基因组 DNA 的提取 液体培养的细菌菌悬液 0.2 ml 放入无菌的 EP 管中,12000 r/min 离心

2 min,去除上清液,再加入 0.2 ml 的无菌水,充分吹打混匀,沸水浴 10 min 后,12000 r/min 离心 2 min,取上清液(DNA 悬液)作为 PCR 扩增的模板。

1.3.2 引物与 PCR 扩增 以提取的细菌基因组 DNA 为模板,用细菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增,引物由上海生物工程公司合成。扩增引物序列(李筠等, 2006)为:

正向引物序列 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

反向引物序列 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'。

PCR 50 μ l 扩增体系:模板 DNA 2 μ l,正向引物、反向引物各 1 μ l, Premix Ex Taq 25 μ l, ddH₂O 21 μ l。PCR 扩增程序:95℃ 热启动 5 min; 94℃ 预变性 10 min; 94℃ 变性 45 s, 57℃ 退火 45 s, 72℃ 复性 1 min, 重复 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。将 PCR 产物送往上海桑尼生物科技有限公司进行测序。菌株的 16S rDNA 序列结果在 http://ezgenome.ezbiocloud.net/ezg_BLAST 网站上进行比对,共鉴定 149 株菌。

1.4 病毒检测

白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)的检测采用中华人民共和国国家标准 GB/T28630.2-2012: 白斑综合征(WSD)诊断规程第 2 部分套式 PCR 检测法。传染性皮下及造血组织坏死病毒(Infectious hypodermal & haematopoietic necrosis virus, IHNV)的检测采用中华人民共和国国家标准 GB/T25878.1-2010: 对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHNV)检测 PCR 法。

1.5 统计分析

采用 SPSS 17.0 软件对实验数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA),当差异显著($P < 0.05$)时,用 Duncan 氏法作多重比较。

2 结果与分析

2.1 中国明对虾苗种体内可培养细菌以及病毒检测结果分析

中国明对虾苗种体内的可培养细菌总数、优势菌种类及百分比、病毒检测结果见表 1。中国明对虾苗种体内的可培养细菌总数在 1.57×10^5 - 4.14×10^7 CFU/g 之间,弧菌属在中国明对虾苗种样品体内占绝对优势,达 57.14%-90.09%。其他优势菌属主要包括假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、发光杆菌属(*Photobacterium*)、*Bizionia*、盐单胞菌属(*Halomonas*)、*Planococcus*、海杆菌属(*Marinobacter*)。4 批次中国明对虾苗种病毒检测阳性样品中,有 1 批

表1 中国明对虾苗种体内的可培养细菌数量、优势菌种类及数量及病毒检测结果
Tab.1 The quantity of culturable bacteria ,dominant bacteria and virus in the larva of *F. chinensis*

采样日期 Sampling date	采样地点 Sampling site	可培养细菌总数 Total culturable bacteria (CFU/g)	优势菌属 Dominant bacteria			携带病毒 Carrying virus	
			名称 Name	数量 Amount(CFU/g)	占细菌的总数的比例 Percentage in total (%)	WSSV	IHHNV
04-16	山东日照 Rizhao, Shandong	1.40×10 ⁷ ±1.71×10 ^{6a}	弧菌属 <i>Vibrio</i>	8.00×10 ⁶ ±1.41×10 ^{5b}	57.14±1.01	+	+
			假交替单胞菌属 <i>Pseudoalteromonas</i>	2.00×10 ⁶ ±1.17×10 ^{6a}	14.28±8.38		
			发光杆菌属 <i>Photobacterium</i>	2.00×10 ⁶ ±1.21×10 ^{6a}	14.28±8.65		
			<i>Bizionia argentinensis</i>	2.00×10 ⁶ ±2.47×10 ^{5a}	14.28±1.76		
04-19	山东潍坊 Weifang, Shandong	2.22×10 ⁶ ±9.76×10 ^{5b}	弧菌属 <i>Vibrio</i>	2.00×10 ⁶ ±1.01×10 ^{6a}	90.09±45.71	N	N
			芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	1.83×10 ⁵ ±7.74×10 ^{4a}	8.24±3.49		
			弧菌属 <i>Vibrio</i>	1.15×10 ⁵ ±1.20×10 ^{4a}	73.34±7.66		
			假交替单胞菌属 <i>Pseudoalteromonas</i>	2.09×10 ⁴ ±7.33×10 ^{3a}	13.33±4.67		
05-11	山东烟台 Yantai, Shandong	1.57×10 ⁵ ±1.18×10 ^{4b}	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	1.05×10 ⁴ ±6.95×10 ^{3a}	6.67±4.43	-	+
			盐单胞菌属 <i>Halomonas</i>	9.80×10 ³ ±2.06×10 ^{3a}	6.24±1.31		
			弧菌属 <i>Vibrio</i>	3.67×10 ⁷ ±7.58×10 ^{6d}	88.58±18.83		
			动性球菌属 <i>Planococcus</i>	2.90×10 ⁶ ±4.04×10 ^{5a}	7.00±0.98		
05-21	山东日照 Rizhao, Shandong	4.14×10 ⁷ ±7.43×10 ^{6a}	假交替单胞菌属 <i>Pseudoalteromonas</i>	1.78×10 ⁶ ±4.66×10 ^{5a}	4.31±1.12	+	-
			弧菌属 <i>Vibrio</i>	1.65×10 ⁷ ±2.95×10 ^{6c}	89.10±15.90		
05-21	山东日照 Rizhao, Shandong	1.85×10 ⁷ ±2.25×10 ^{6a}	海杆菌属 <i>Marinobacter</i>	2.00×10 ⁶ ±6.95×10 ^{5a}	10.80±3.76	+	-

注：1) “+”病毒检测结果为阳性；“-”病毒检测结果为阴性；“N”没有检测病毒。2) 同一列不同字母表示样品中存在显著性差异($P < 0.05$)

Notes: 1) ‘+’ are virus positive; ‘-’ are virus negative; ‘N’ are virus not been tested. 2) Different superscript letters within each column represent significant differences among samples ($P < 0.05$)

次同时检出 WSSV、IHHNV 两种病毒，另有两批次只检出 WSSV，1 批次只检出 IHHNV。同时检出两种病毒的对虾苗种体内的弧菌数量为 8.0×10^6 CFU/g，比例为 57.14%。只检出 WSSV 的对虾苗种体内的弧菌数量在 1.65×10^7 – 3.67×10^7 CFU/g 之间，比例在 88.58%–89.10% 之间。只检出 IHHNV 的对虾苗种体内的弧菌数量为 1.15×10^5 CFU/g，比例为 73.34%。

2.2 凡纳滨对虾苗种体内可培养细菌以及病毒检测结果分析

凡纳滨对虾苗种体内的可培养细菌总数、优势菌

种类及百分比、病毒检测结果见表 2。

各批次凡纳滨对虾苗种样品体内的可培养细菌总数均在 1.36×10^5 – 1.27×10^7 CFU/g 之间，弧菌属在所有凡纳滨对虾苗种体内占绝对优势，达 40.00%–90.23%。其他优势菌属主要包括假交替单胞菌属、芽孢杆菌属、发光杆菌属、*Bizionia*、盐单胞菌属、动性球菌属、海杆菌属。4 批次凡纳滨对虾苗种样品中，有 1 批次只检出 WSSV，1 批次只检出 IHHNV。只检出 WSSV 的对虾苗种体内的弧菌数量为 1.11×10^7 CFU/g，比例为 90.23%。只检出 IHHNV 的对虾苗种体内的弧菌数量为 7.0×10^5 CFU/g，比例为 40.00%。未检出 WSSV 和

表 2 凡纳滨对虾苗种体内的可培养细菌数量、优势菌种类及数量及病毒检测结果
Tab.2 The quantity of culturable bacteria, dominant bacteria and virus in the larva of *L. vannamei*

采样日期 Sampling date	采样地点 Sampling site	可培养细菌总数 Total culturable bacteria (CFU/g)	优势菌属 Dominant bacteria			携带病毒 Carrying virus	
			名称 Name	数量 Amount (CFU/g)	占细菌总数的比例 Percentage in total (%)	WSSV	IHHNV
05-11	山东烟台 Yantai, Shandong	$1.36 \times 10^5 \pm 9.05 \times 10^{3b}$	弧菌属 <i>Vibrio</i>	$6.00 \times 10^4 \pm 8.16 \times 10^{3a}$	43.80±6.00	-	-
			盐单胞菌属 <i>Halomonas</i>	$4.00 \times 10^4 \pm 4.51 \times 10^{3a}$	29.20±3.32		
			假交替单胞菌属 <i>Pseudoalteromonas</i>	$2.00 \times 10^4 \pm 8.16 \times 10^{3a}$	14.60±6.00		
			动性球菌属 <i>Planococcus</i>	$1.30 \times 10^4 \pm 4.83 \times 10^{3a}$	9.49±2.85		
			弧菌属 <i>Vibrio</i>	$7.00 \times 10^5 \pm 7.26 \times 10^{4a}$	40.00±4.15		
05-14	天津大港 Dagang, Tianjin	$1.75 \times 10^6 \pm 1.26 \times 10^{5b}$	发光杆菌属 <i>Photobacterium</i>	$5.00 \times 10^5 \pm 3.51 \times 10^{4a}$	28.57±2.01	-	+
			极地杆菌属 <i>Polaribacter</i>	$4.30 \times 10^5 \pm 1.07 \times 10^{5a}$	24.57±6.09		
			盐单胞菌属 <i>Halomonas</i>	$1.00 \times 10^5 \pm 1.41 \times 10^{4a}$	5.71±0.81		
07-05	浙江温州 Wenzhou, Zhejiang	$4.6 \times 10^5 \pm 1.95 \times 10^{4b}$	弧菌属 <i>Vibrio</i>	$4.10 \times 10^5 \pm 2.16 \times 10^{4a}$	89.03±4.70	-	-
			假交替单胞菌属 <i>Pseudoalteromonas</i>	$4.68 \times 10^4 \pm 2.75 \times 10^{3a}$	10.17±0.60		
09-02	山东青岛 Qingdao, Shandong	$1.23 \times 10^7 \pm 2.21 \times 10^{6a}$	弧菌属 <i>Vibrio</i>	$1.11 \times 10^7 \pm 2.30 \times 10^{6b}$	90.23±18.70	+	-
			假交替单胞菌属 <i>Pseudoalteromonas</i>	$1.03 \times 10^6 \pm 9.20 \times 10^{4a}$	8.41±2.12		

注: 1) “+”病毒检测结果为阳性; “-”病毒检测结果为阴性。2) 同一列不同字母表示样品中存在显著性差异($P < 0.05$)

Notes: 1) ‘+’ are virus positive; ‘-’ are virus negative. 2) Different superscript letters within each column represent significant differences among samples ($P < 0.05$) =

IHHNV 的对虾苗种体内的弧菌数量为 6.4×10^4 – 4.0×10^5 CFU/g, 比例为 43.80%–89.03%。

2.3 小结

综合表 1 和表 2 的结果可以看出, 凡纳滨对虾和中国明对虾苗种体内的可培养细菌总数均在 10^5 – 10^7 CFU/g 之间; 弧菌在对虾苗种体内占绝对优势, 达 40.00%–90.23%; 同时检测出发光杆菌属、芽孢杆菌属、盐单胞菌属、*Biaionia*、海杆菌属、动性球菌属、极地杆菌属, 呈现出菌属分布不均匀、细菌种属类别少、个别菌属分布多的特征。部分凡纳滨对虾和中国明对虾苗种样品检测为 WSSV 和 IHHNV 阳性: WSSV 检出率为 50.0%, IHHNV 检出率为 37.5%, 两种病毒同时检出率为 11.11%。检出 WSSV 病毒的对虾苗种体内的总菌数量在 1.23×10^7 – 4.14×10^7 CFU/g 之间, 显著高于其他批次的样品($P < 0.05$), 且弧菌数量在 10^7 CFU/g 左右, 显著高于其他批次的样品($P < 0.05$); 只检出

IHHNV 以及未检出病毒的对虾苗种体内的弧菌数量为 10^4 – 10^6 CFU/g, 弧菌属在凡纳滨对虾和中国明对虾苗种体内普遍存在且为优势菌属, 但弧菌数量在对虾苗种体内的比例变化幅度较大。

3 讨论

9 批次样品中, 中国明对虾苗种和凡纳滨对虾苗种体内的优势菌菌群组成以及数量波动较大, 且菌属分布不均匀, 呈现细菌种属类别少、个别菌属分布多的特征, 这可能是受养殖环境的影响。冯娟等(1999)发现, 中国明对虾育苗池中假单胞菌属和弧菌属占绝对优势, 也呈现细菌种属类别少、个别菌属分布多的特征。宛立等(2006)发现, 同一养殖场不同养殖时间的凡纳滨对虾消化道内细菌组成有所差异, 而且优势菌也不相同。Vandenbergh 等(1998)调查研究发现, 中国北方的几个养殖场中健康和患病的中国明对虾

幼苗以及养殖水体中的细菌菌群组成不稳定,可能受投喂饲料以及养殖环境的影响。

凡纳滨对虾和中国明对虾种体内中弧菌属占绝对优势,达 40.00%–90.23%。Wang 等(2000)研究发现,中国明对虾成虾消化道内的优势菌为弧菌属和假单胞菌属,且在前肠、中肠和后肠中的细菌数量分别为 1.3×10^5 CFU/尾、 2.8×10^5 CFU/尾和 1.1×10^4 CFU/尾。中国明对虾从蚤状幼体 3 期后至仔虾 5/6 期,弧菌明显占优势(李筠等, 2004)。溶藻弧菌在对虾幼苗所有时期中为主要的优势菌,但优势菌与对虾幼体的健康状况有关(Vandenberghé *et al.*, 1998、1999)。

本研究发现,检出 WSSV 和同时检出两种病毒的对虾幼苗体内的弧菌数量在 10^7 CFU/g 左右,显著高于只检出 IHNV 病毒和未检出病毒的对虾幼苗体内的弧菌数量(10^4 – 10^6 CFU/g) ($P < 0.05$),根据细菌分离和病毒检测结果推测,对虾苗种携带 WSSV 病毒会引起体内的弧菌数量增加。这一结果与李继秋等(2006)曾报道的感染 WSSV 的凡纳滨对虾肠道内的弧菌数为 18.75%,而未感染 WSSV 的凡纳滨对虾肠道内的弧菌数为 51.78%的结果不同。而秦崇涛等(2011)曾报道,感染 WSSV 病毒的克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)血淋巴中的细菌数量约为正常螯虾的 100 倍,只是这些增加的细菌主要为弗劳地柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)、嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)和琼氏不动杆菌(*Acinetobacter junii*),可能是对虾苗种和成虾在感染病毒后引起对虾体内细菌变化不尽相同。对虾携带病毒会引起对虾种体内的弧菌数量增加,是否会由此增加后期养殖风险,因未做相应跟踪调查,还不得而知。弧菌是对虾体内存在的正常菌群,一般为优势菌,但一些弧菌是条件致病菌,一旦养殖环境恶化或对虾免疫力下降将会引起细菌在体内的大量繁殖而导致对虾死亡。Phuoc 等(2008)研究报道了感染 WSSV 病毒的对虾会增加对虾对坎氏弧菌(*Vibrio campbellii*)的敏感性。丁燊等(2000)曾报道,弧菌的潜伏感染会促进病毒的增殖,而病毒的潜伏感染不会促进弧菌的继发感染,但二者的作用机制并不明确,需要进一步研究。

本研究应用 16S rDNA 序列测定分析来鉴定从养殖对虾苗期体内分离的细菌,更适用于确定属及属以上的分类单位的亲缘关系,优点是速度快、准确率高、高通量,基本可以反映特定环境下细菌多样性特征。如果进一步将分离菌株鉴定到种,还需要逐一菌株进行形态学特性、生理生化特征、血清学特点等进行分析 and 确认。由于本研究分离的菌株较多,暂将分离的细菌鉴定到属,但所有菌株均已保存于实验室菌种库内,以备研究菌株的特性或生物学功能时活化使用。

通过 16S rDNA 序列测定以及系统进化树的分析仍可以将一些菌株初步鉴定到种,本研究中,携带病毒的对虾苗种体内的优势弧菌与巴西弧菌(*Vibrio brasiliensis*)、坎氏弧菌、溶藻弧菌、哈维氏弧菌相似度较高,不携带病毒的对虾苗种体内的优势弧菌与 *Vibrio diabollicus* 和溶藻弧菌相似度较高。溶藻弧菌在对虾幼体的所有时期中均为优势菌,哈维氏弧菌多在患病的对虾幼体内为优势菌(Vandenberghé *et al.*, 1999),巴西弧菌和 *Vibrio diabollicus* 还鲜有报道,关于养殖对虾苗种体内的优势菌与对虾携带病毒的关系还有待做进一步深入的研究。

参 考 文 献

- GB/T 25878-2010, 对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHNV)检测 PCR 法. 北京: 中国标准出版社, 2010
- GB/T 28630.2-2012, 白斑综合征(WSD)诊断规程第 2 部分: 套式 PCR 检测法. 北京: 中国标准出版社, 2012
- 丁燊, 郑莲, 王雷, 等. 对虾病毒病暴发前期病毒和弧菌相互作用关系. 湛江海洋大学学报, 2000, 20(3): 26–31
- 冯娟, 李筠, 李军, 等. 中国对虾育苗池水细菌生态学的研究, 对虾苗期细菌病害的诊断与控制. 北京: 海洋出版社, 1999, 10–22
- 安永菊. 病毒、弧菌共同作用引发虾病的预防与治疗技术初探. 齐鲁渔业, 2007(3): 4–5
- 孙艳, 刘飞, 宋晓玲, 等. 饲料中添加益生菌对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)非特异免疫基因表达量和抗病力的影响. 海洋与湖沼, 2012, 43(4): 845–851
- 苏永全, 蔡心一, 王军. 1992–1993 年福建南部地区虾病的调研. 海洋科学, 1995(1): 1–4
- 李玉宏, 柴鹏程, 胡修贵, 等. 应用 RFLP 和 DGGE 技术分析工厂化养殖凡纳滨对虾肠道微生物群落特征. 渔业科学进展, 2014, 35(2): 83–89
- 李桂英, 宋晓玲, 孙艳, 等. 几株肠道益生菌对凡纳滨对虾非特异免疫力和抗病力的影响. 中国水产科学, 2011, 18(6): 1358–1367
- 李继秋, 谭北平, 麦康森. 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. 上海水产大学学报, 2006, 15(1): 109–113
- 李筠, 吕艳, 李军, 等. 苗期中国对虾幼体异养细菌区系及其变化与病害发生的关系. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2004, 34(6): 1003–1007
- 李筠, 颜显辉, 陈吉祥, 等. 养殖大菱鲆腹水病病原的研究. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2006, 36(4): 649–654
- 宛立, 王吉桥, 高峰, 等. 南美白对虾肠道细菌菌群分析. 水产科学, 2006, 25(1): 13–15
- 秦崇涛, 杨丰, 潘大仁. 微生物在感染 WSSV 的克氏原螯虾死亡过程中的作用研究. 中国农学通报, 2011, 27(32): 72–77
- Aftabuddin S, Akter N. Swollen hindgut syndrome (SHG) of tiger shrimp *Penaeus monodon* (Crustacea, Malacostraca, Penaeidae) post larvae: Identification of causing pathogenic bacteria and their sensitivity to some antibiotics. AACL Bioflux, 2011, 4(1): 15–20

- Li Y, Lv Y, Li J, *et al.* Study of heterotrophic bacterial flora, dominant vibrios composition of larvae and postlarvae of *Penaeus chinensis* and its relationship with disease. *J Ocean Univ China (Natural Science)*, 2004, 34(6): 1003–1007
- Lightner DV, Redman RM. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, 1998, 164(1): 201–220
- Lightner DV. The penaeid shrimp viruses TSV, IHNV, WSSV, and YHV: current status in the Americas, available diagnostic methods, and management strategies. *J Appl Aquacult*, 1999, 9(2): 27–52
- Phuoc LH, Corteel M, Nauwynck HJ, *et al.* Increased susceptibility of white spot syndrome virus-infected *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio cambellii*. *Environ Microbiol*, 2008, 10(10): 2718–2727
- Vandenbergh J, Li Y, Verdonck L, *et al.* Vibrios associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. *Aquaculture*, 1998, 169(1–2): 121–132
- Vandenbergh J, Verdonck L, Robles-Arozarena R, *et al.* Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(6): 2592–2597
- Vaseeharan B, Rarnasamy P. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Lett Appl Microbiol*, 2003, 36(2): 83–87
- Wang LP, Chen YW, Huang H, *et al.* Isolation and identification of *Vibrio campbellii* as a bacterial pathogen for luminous vibriosis of *Litopenaeus vannamei*. *Aquacul Res*, 2015, 46(2): 395–404
- Wang XH, Li HR, Zhang XH, *et al.* Microbial flora in the digestive tract of adult penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*). *J Ocean Univ Qingdao*, 2000, 30(3): 493–498

(编辑 冯小花)

The Analysis of the Quantity and the Composition of Cultivable Bacteria in Artificially Cultivated Prawn Larvae

ZHANG Xiaojing^{1,2}, SONG Xiaoling^{2①}, WAN Xiaoyuan², YANG Bing², HUANG Jie^{2,3}

(1. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. National Oceanographic Center, Qingdao 266071)

Abstract Healthy postlarvae is the prominent factor in the shrimp aquaculture. Bacterial and viral diseases have been seriously harmful in the shrimp industry, therefore it is important to study the qualitative and quantitative characteristics of the bacteria and virus in the shrimp. In this study we collected the bacterial flora in the post-larvae of *Litopenaeus vannamei* and *Fenneropenaeus chinensis* in the breeding fields in Shandong, Tianjin and Zhejiang. The isolated strains were purified and identified by using conventional methods as well as the 16S rDNA sequence analysis method. We also detected the white spot syndrome virus (WSSV) and the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHNV) using the PCR method. According to our results, the total amount of the cultured bacteria in the post larvae was 10^5 – 10^7 CFU/g. The isolated bacteria belong to the genus of *Vibrio*, *Photobacterium*, *Bacillus*, *Halomonas*, *Biaionia*, *Marinobacter*, *Polaribacter*, and *Planococcus*. *Vibrio* accounted for the largest proportion in the dominant bacteria, which was from 40.00% to 90.23%. The uneven distribution of bacteria implied that there were more individual species but less categorical species of bacteria. There were WSSV and IHNV positive samples in both *L. vannamei* and *F. chinensis*. The WSSV positive rate was 50.0% and the IHNV positive rate was 37.5%, and 11.11% of the samples were infected with both. The post-larvae infected with either WSSV or both carried a total amount of bacteria from 1.23×10^7 CFU/g to 4.14×10^7 CFU/g, and the amount of *Vibrio* was about 10^7 CFU/g, both of which was significantly higher than other samples ($P < 0.05$). The amount of *Vibrio* in the uninfected postlarvae or those infected with IHNV only was between 10^4 to 10^6 CFU/g. Our studies demonstrated that *Vibrio* ubiquitously existed in the post-larvae of *L. vannamei* and *F. chinensis*, and that infection with WSSV might increase the amount of *Vibrio* in the larvae. Future investigation is needed to identify the associated risk in the shrimp culture.

Key words *Litopenaeus vannamei*; *Fenneropenaeus chinensis*; *Vibrio*; WSSV; IHNV

① Corresponding author: SONG Xiaoling, E-mail: songxl@ysfri.ac.cn