

# 海洋蛭弧菌类生物 DA5 对凡纳滨对虾育苗期幼体和水质的影响

温崇庆<sup>1,2,3</sup>, 梁华芳<sup>1</sup>, 丁贤<sup>2,3</sup>, 薛明<sup>1</sup>, 周世宁<sup>3</sup>

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025; 2. 中国水产科学研究院南海水产研究所/农业部渔业生态环境重点开放实验室, 广东 广州 510300; 3. 中山大学生命科学学院/有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广东 广州 510275)

**摘要:** 以热灭活的溶藻弧菌 *Vibrio alginolyticus* 培养海洋蛭弧菌类生物菌株 DA5, 将其以高(11500pfu·mL<sup>-1</sup>)、低(1150pfu·mL<sup>-1</sup>)两种浓度加入凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* 育苗用水中, 研究了无节幼体培育到糠虾幼体期间 DA5 对幼体变态和存活、水体中异养细菌和弧菌含量、pH、化学需氧量(COD)和氨氮(NH<sub>3</sub>-N)含量的影响。结果显示, 高浓度 DA5 可显著提高幼体存活和变态率, 并在加入后 3d 内降低或显著降低水体异养细菌和弧菌含量, 而低浓度 DA5 对试验期间幼体成活、变态及水体异养细菌和弧菌含量均无显著影响。除糠虾幼体 — 期高浓度处理组水体 NH<sub>3</sub>-N 含量有显著升高外, 试验期间各组水体 pH、COD 和 NH<sub>3</sub>-N 含量均无显著差异。表明海洋蛭弧菌类生物 DA5 可作为一种较理想的生物控制因子应用于对虾育苗中。

**关键词:** 海洋蛭弧菌类生物; 凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei*; 幼体; 水质

中图分类号: S917.1 文献标识码: A 文章编号: 1009-5470(2010)06-0147-06

## Effects of marine *Bdellovibrio*-and-like organism DA5 on larval survival and water quality in larval rearing of *Litopenaeus vannamei*

WEN Chong-qing<sup>1,2,3</sup>, LIANG Hua-fang<sup>1</sup>, DING Xian<sup>2,3</sup>, XUE Ming<sup>1</sup>, ZHOU Shi-ning<sup>3</sup>

(1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China; 2. Key Laboratory of Fishery Ecology Environment of Ministry of Agriculture, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 3. State Key Laboratory of Biocontrol, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** The authors studied the effects of marine *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALOs) strain DA5, which was cultured from heat-killed *Vibrio alginolyticus*, on larval survival and water quality from nauplius stage to mysis stage of *Litopenaeus vannamei*. The results showed that the survival rate and metamorphic rate of mysis larvae treated with high concentration of DA5 (11500pfu·mL<sup>-1</sup>; HC) could be improved visibly, and the amounts of heterotrophs and vibrios in rearing water were reduced or significantly reduced in the first 3 days. However, there were no obvious effects on larval survival and bacterial amount treated with low concentration of DA5 (1150pfu·mL<sup>-1</sup>; LC) during the larval rearing period. There were no significant differences in pH, chemical oxygen demand, and ammonia-N content in water body among the HC, LC, and control groups, except that the ammonia-N content in the HC group at mysis — stage was increased significantly. This study indicated that marine BALOs strain DA5 can be applied in larval rearing of shrimp as a promising biocontrol agent.

**Key words:** marine *Bdellovibrio*-and-like organism; *Litopenaeus vannamei*; larva; water quality

蛭弧菌类生物 (*Bdellovibrio*-and-like organisms, BALOs) 是一类能捕食其他敏感革兰氏阴性细菌为生的小型细菌, 普遍存在于土壤、水体和生物膜等

环境中<sup>[1]</sup>。BALOs 通常依赖于活宿主细胞营专性寄生, 具有独特的二态生活周期: 游离的攻击期细胞侵入宿主菌周质空间后进入周质生长期, 利用宿主

收稿日期: 2009-01-08; 修订日期: 2009-06-22。刘学东编辑

基金项目: 国家“863”项目(2007AA09Z448); 农业部渔业生态环境重点开放实验室开放基金; 广东省渔业生态环境重点实验室开放基金项目(2006-8); 广东省海洋渔业科技推广专项项目(A200808A04); 广东海洋大学自然科学基金项目(0812067)

作者简介: 温崇庆(1974—), 男, 安徽省郎溪县人, 副教授, 博士, 主要从事海洋和水产微生物学研究。E-mail: wencq@gdou.edu.cn

通信作者: 周世宁。E-mail: lsszsl@mail.sysu.edu.cn.

胞质成分为营养进行丝状生长,最后分裂成几个子代细胞并裂解宿主细胞得以增殖和开始新一轮的生活周期<sup>[1]</sup>。通过不同方法也可能获得不依赖活宿主细胞进行纯培养生长的非宿主依赖型或腐生型 BALOs<sup>[2]</sup>,腐生型菌株可能是专性的,即丧失了裂解宿主菌的寄生性生活特征,也可能是仍具有裂解宿主菌能力的兼性寄生物<sup>[3]</sup>。目前分类上 BALOs 被归为两个内在多样的科——蛭弧菌科(Bdellovibrionaceae)和噬菌弧菌科(Bacteriovoraceae)<sup>[4]</sup>。海水或其他咸水环境来源 BALOs 菌株都属于噬菌弧菌科噬菌弧菌属(*Bacteriovorax*),但在种的水平上至少可分为 8 个不同的系统类群<sup>[5]</sup>,其中仅类群 和类群 菌株具有确定的种名<sup>[5-6]</sup>。

BALOs 独特的捕食特性,使其在生物防治有害细菌上具有潜在应用价值,特别是在水产养殖上更具应用前景<sup>[7-8]</sup>。国内一些试验表明淡水或陆生 BALOs 在一定程度上能够防治某些淡水养殖动物细菌性病害<sup>[7-8]</sup>,且已有一些商品化水产养殖用 BALOs 制剂销售和一定程度使用<sup>[8-9]</sup>。但目前还较少见海洋 BALOs 用于海水养殖动物的研究报道,仅储卫华等最近报道将一株海洋 BALOs 成功用于对虾人工感染病原弧菌的试验性治疗<sup>[10]</sup>。

由于专性寄生 BALOs 必须依赖活的宿主菌才能增殖,生产、保存和应用时通常较难与其活宿主细胞彻底分开,因此不仅在生产时不太方便,而且实际应用时可能将某些潜在有害宿主菌也引入养殖环境造成副作用。显然,兼性寄生 BALOs 很大程度上可以克服这种不利因素。但目前尚未见有兼性寄生 BALOs 在水产养殖应用中的研究报道。本研究将一株能兼性寄生的海洋 BALOs 用于凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* 育苗试验中,旨在了解其对幼体存活和变态、对育苗水体异养细菌和弧菌含量以及对水体理化指标的影响,从而为海洋 BALOs 在对虾育苗中的应用提供参考和依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

海洋 BALOs 菌株 DA5(以下简称 DA5),是作者以前从海水环境分离并鉴定为噬菌弧菌属类群的菌株<sup>[11]</sup>,DA5 能较好地适应海水环境并可裂解多种海水养殖病原弧菌<sup>[12]</sup>。

溶藻弧菌 *Vibrio alginolyticus* zouA (zouA)<sup>[13]</sup>,用作 DA5 和初始水体 BALOs 培养和计数的宿主菌。

### 1.2 宿主细胞准备和 DA5 的培养

培养、收集和配制活的 zouA 细胞海水悬液按以前描述的方法进行<sup>[12]</sup>,另通过 60 °C 水浴处理 1h 获得灭活的 zouA 细胞。本试验用的 DA5 是通过灭活 zouA 细胞海水悬液( $5 \times 10^8$  个·mL<sup>-1</sup>)富集和培养的,以此培养的 DA5 在一定传代次数内,同时具有裂解活的和灭活的 zouA 细胞能力。DA5 使用液是新培养的,其中含有较多攻击期 DA5 细胞且灭活的 zouA 细胞已被裂解较完全(显微镜镜检时已极少见 zouA 细胞)。

### 1.3 对虾幼体和饵料

凡纳滨对虾幼体购自广东省湛江市某商业对虾育苗场,为同池同批孵化发育至无节期(N<sub>3</sub>)的健康幼体(N、Z 和 M 分别表示对虾无节幼体、蚤状幼体和糠虾幼体,下标数字表示变态期分期,下同)。育苗期幼体饵料主要为螺旋藻粉、虾片(台湾滋丰水产资材有限公司)和 BP 粉(台湾明懋宝业有限公司)等。

### 1.4 对虾育苗试验体系

育苗试验在湛江市东海岛广东海洋大学海洋生物实验基地进行。试验分为低浓度 DA5 处理组(LC)、高浓度 DA5 处理组(HC)及对照组(CK),于 6 个 500 L 玻璃纤维育苗桶中进行,每组设两个重复。育苗桶先用 0.1% KMnO<sub>4</sub> 浸泡消毒后再以海水浸泡冲洗数遍,每个桶加入 400L 海水(盐度 31.0‰,pH8.05),保持一致的水温(30±1 °C)和充气条件。试验用海水为天然海水经沉淀、沙滤后,再以 300 目筛绢网过滤后均匀的抽入各育苗桶。每个育苗桶最初均投放约  $1.21 \times 10^5$  尾 N<sub>3</sub> 幼体,约 15h 后即绝大多数幼体变态至 N<sub>5</sub>—N<sub>6</sub> 时,开始定时定量投喂由无菌海水调匀的幼体饵料至第 7 天,其后根据存活幼体数量按比例投喂饵料。第一次投喂后于 LC 和 HC 组每一育苗桶水体中分别加入 50mL 和 500mL DA5 使用液,LC 组的另加 450mL 无菌海水,CK 组只加相应体积的无菌海水。整个试验期间不换水,不用药物。

### 1.5 水样采集

分别于加入 DA5 前 30min(即 N<sub>5</sub>—N<sub>6</sub> 幼体时,作为 0 时刻),加入 DA5 后 0.5d (N<sub>6</sub>—Z<sub>1</sub>)、1d (N<sub>6</sub>—Z<sub>1</sub>)、2d (Z<sub>1</sub>—Z<sub>2</sub>)、3d (Z<sub>1</sub>—Z<sub>2</sub>—Z<sub>3</sub>)、5d (Z<sub>2</sub>—Z<sub>3</sub>)、7d (Z<sub>3</sub>—M<sub>1</sub>)和 9d (M<sub>1</sub>—M<sub>2</sub>)采集水样。采样时以 300 目筛绢网隔离幼体和较大的悬浮物,无菌操作采集育苗桶圆心中上层水样,从每一育苗桶分 3 次各采集 500mL 水样混合于无菌聚乙烯瓶中,4 °C 暂存备用,部分水样用于微生物计数和水质分析,

其余水样冻存。

### 1.6 细菌计数

采用稀释涂布平板法, 分别以 2216E 培养基和 TCBS 培养基 30 培养 3d 计数每批次水样中异养细菌和弧菌含量<sup>[14]</sup>, 以菌落形成单位(cfu·mL<sup>-1</sup>)表示。DA5 使用液含量和初始水体 BALOs 含量均以活 zouA 为宿主菌的海水双层琼脂平板法计数<sup>[14]</sup>, 以噬斑形成单位(pfu·mL<sup>-1</sup>)表示。相关实验操作在水样采集后 4h 内完成。

### 1.7 水质监测

测定了除 0.5d 外所有采集水样的 pH, 化学需氧量(COD)和氨氮(NH<sub>3</sub>-N)含量<sup>[14]</sup>。

### 1.8 幼体分析

每天上午 10:00 左右观察计数幼体存活情况, 直至第 9 天(M<sub>1</sub>—M<sub>2</sub>)试验结束时。根据幼体密度变化, 以洁净带柄烧杯从每个育苗桶的 8 个固定位点分别取中上层水样 50mL 或 200mL, 计数存活幼体数量并以最初加入的幼体为标准换算成存活率, 以分析 DA5 对幼体存活的影响。另从第 5、6、7 和 9d 计数的存活幼体中随机取 30 只通过解剖镜观察不同变态期幼体数量并计算最晚期幼体的百分比,

以分析 DA5 对幼体变态的影响。

### 1.9 数据处理

对水体异养细菌和弧菌含量进行对数转换, 幼体成活率和变态率百分比数据进行反正弦平方根转换。用 SPSS 15.0 统计软件进行数据的单因素方差分析(ANOVA), 当差异达显著性水平时, 用 Duncan's 多重比较进行不同处理间的显著性分析( $P<0.05$ )。

## 2 结果

### 2.1 DA5 的使用量和初始水体本底 BALOs 含量

双层平板计数显示 DA5 使用液含量为  $9.2 \times 10^6$  pfu·mL<sup>-1</sup>, 即加入 CK、LC 和 HC 组水体中 DA5 初始含量分别为 0、1150 和 11500 pfu·mL<sup>-1</sup>; 加入 DA5 前 CK、LC 和 HC 组水体 BALOs 计数结果分别为  $55.0 \pm 7.1$ 、 $50.0 \pm 7.5$  和  $56.7 \pm 15.1$  pfu·mL<sup>-1</sup>, 表明各组水体初始本底可培养 BALOs 含量很相近。

### 2.2 DA5 对细菌含量的影响

加入 DA5 前后水体中异养细菌和弧菌含量的变化如表 1 所示。与各组水体 BALOs 含量情况相似, 加入 DA5 前各组水体异养细菌或弧菌含量也很接近, 表明初始水体环境一致性较高。

表 1 DA5 对凡纳滨对虾育苗水体异养细菌和弧菌数量的影响

Tab. 1 Effects of DA5 on the amount of heterotrophs and vibrios in rearing water of *L. vannamei* larvae

处理天数* (幼体期)	异养细菌/( $\times 10^5$ cfu·mL <sup>-1</sup> )			弧菌/( $\times 10^3$ cfu·mL <sup>-1</sup> )		
	CK	LC	HC	CK	LC	HC
0 (N <sub>5</sub> —N <sub>6</sub> )	6.67 $\pm$ 1.74 <sup>a</sup>	4.90 $\pm$ 1.41 <sup>a</sup>	6.48 $\pm$ 1.31 <sup>a</sup>	13.60 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	11.38 $\pm$ 3.64 <sup>a</sup>	14.47 $\pm$ 1.08 <sup>a</sup>
0.5 (N <sub>6</sub> —Z <sub>1</sub> )	9.41 $\pm$ 1.90 <sup>a</sup>	9.00 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	6.38 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	18.23 $\pm$ 1.38 <sup>a</sup>	20.13 $\pm$ 5.69 <sup>a</sup>	13.38 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>
1 (N <sub>6</sub> —Z <sub>1</sub> )	174.33 $\pm$ 1.41 <sup>a</sup>	174.00 $\pm$ 8.49 <sup>a</sup>	144.50 $\pm$ 6.84 <sup>b</sup>	94.25 $\pm$ 10.96 <sup>a</sup>	109.50 $\pm$ 2.83 <sup>a</sup>	92.75 $\pm$ 9.55 <sup>a</sup>
2 (Z <sub>1</sub> —Z <sub>2</sub> )	22.33 $\pm$ 0.94 <sup>a</sup>	16.00 $\pm$ 0.47 <sup>a</sup>	11.67 $\pm$ 3.77 <sup>a</sup>	15.50 $\pm$ 2.83 <sup>a</sup>	16.00 $\pm$ 1.41 <sup>a</sup>	13.25 $\pm$ 1.77 <sup>a</sup>
3 (Z <sub>1</sub> —Z <sub>2</sub> —Z <sub>3</sub> )	11.55 $\pm$ 2.57 <sup>a</sup>	9.60 $\pm$ 1.23 <sup>a</sup>	2.92 $\pm$ 0.87 <sup>b</sup>	5.35 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	4.88 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	3.35 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>
5 (Z <sub>2</sub> —Z <sub>3</sub> )	3.28 $\pm$ 0.49 <sup>b</sup>	4.58 $\pm$ 0.97 <sup>b</sup>	7.92 $\pm$ 1.06 <sup>a</sup>	0.83 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.85 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	2.02 $\pm$ 0.64 <sup>a</sup>
7 (Z <sub>3</sub> —M <sub>1</sub> )	32.00 $\pm$ 15.56 <sup>a</sup>	25.25 $\pm$ 1.06 <sup>a</sup>	15.50 $\pm$ 7.07 <sup>a</sup>	6.80**	8.15**	3.05 $\pm$ 1.27

注: 同一行数据上标不同字母者表示差异显著( $P<0.05$ ); \*0 表示加入 DA5 前 30 min, 其余数字表示加入 DA5 后的天数; \*\*两个重复样中只有其中的一个可有效计数; 第 9 天时因 2216E 平板上菌落过度蔓延及稀释涂布 TCBS 平板时的梯度过低导致计数结果不理想, 未能给出有效数据。

加入 DA5 后, 3d 内连续 4 个批次水样细菌计数结果表明同一时期 HC 组异养细菌或弧菌含量较 CK 组和 LC 组均呈下降趋势, 其中 HC 组 1d 和 3d 时的异养细菌含量及 3d 时的弧菌含量显著低于 CK 组和 LC 组( $P<0.05$ )。第 5 天时的情况则相反, HC 组异养细菌含量显著高于 CK 组和 LC 组( $P<0.05$ ), 弧菌平均含量约为 CK 组和 LC 组的两倍左右, 尽管未达到显著水平。第 7 天时, HC 组平均异养细菌含量分别约为 CK 组和 LC 组的 50%和 60%, 但 3 组间已无显著差异( $P>0.05$ ); HC 组弧菌含量也较 CK 和 LC 组的减少, 但因缺少重复样数据而未能分析 3 组水样间的差异性。各时期所测 CK 组和 LC 组水体异养细菌

或弧菌含量间均无显著差异( $P>0.05$ )。上述结果表明较高浓度的 DA5 加入凡纳滨对虾育苗水体后一定时间内, 对水体细菌含量具有显著影响作用, 主要表现为短时间内一定程度上消减异养细菌和弧菌数量, 而低浓度 DA5 则无明显作用。

### 2.3 DA5 对水体理化指标的影响

DA5 加入育苗用水后对水体 pH、COD 和 NH<sub>3</sub>-N 含量的影响见表 2, 整个试验期间水体 pH 变化幅度不大, COD 和 NH<sub>3</sub>-N 均随试验时间的增加不断上升。除第 9 天时 HC 组水体 NH<sub>3</sub>-N 含量显著高于 CK 和 LC 组外( $P<0.05$ ), 同一时期各组水体间的 3 种水质指标差异均不显著( $P>0.05$ )。

表 2 DA5 对凡纳滨对虾育苗水体 pH、COD 和 NH<sub>3</sub>-N 含量的影响

Tab. 2 Effects of DA5 on the pH, COD, and NH<sub>3</sub>-N content in rearing water of *L. vannamei* larvae

处理天数 (幼体期)	pH			COD/(mg·L <sup>-1</sup> )			NH <sub>3</sub> -N/(mg·L <sup>-1</sup> )		
	CK	LC	HC	CK	LC	HC	CK	LC	HC
0 (N <sub>5</sub> —N <sub>6</sub> )	8.04±0.01	8.03±0.01	8.04±0.00	1.68±0.04	1.72±0.03	1.67±0.01	0.10±0.01	0.11±0.01	0.10±0.01
1 (N <sub>6</sub> —Z <sub>1</sub> )	8.10±0.00	8.09±0.01	8.11±0.01	3.53±0.06	3.57±0.03	3.66±0.06	0.19±0.00	0.20±0.01	0.20±0.01
2 (Z <sub>1</sub> —Z <sub>2</sub> )	8.11±0.01	8.12±0.00	8.14±0.01	4.83±0.22	4.76±0.23	4.70±0.09	0.31±0.01	0.32±0.00	0.34±0.01
3 (Z <sub>1</sub> — Z <sub>2</sub> —Z <sub>3</sub> )	8.10±0.05	8.13±0.01	8.15±0.00	5.09±0.21	5.17±0.22	5.09±0.30	0.45±0.02	0.47±0.02	0.49±0.01
5 (Z <sub>2</sub> —Z <sub>3</sub> )	8.04±0.02	8.01±0.01	8.09±0.01	5.30±0.10	5.33±0.16	5.45±0.09	0.57±0.02	0.58±0.02	0.62±0.01
7 (Z <sub>3</sub> —M <sub>1</sub> )	7.92±0.01	7.92±0.04	7.86±0.01	5.91±0.10	5.79±0.02	5.84±0.08	0.64±0.01	0.67±0.03	0.74±0.04
9 (M <sub>1</sub> —M <sub>2</sub> )	7.89±0.06	7.86±0.02	7.97±0.02	6.20±0.18	6.26±0.11	6.69±0.05	0.75±0.01	0.76±0.02	0.87±0.03

2.4 DA5 对幼体存活的影响

随着育苗时间的增加, 各组对虾幼体存活率都不断下降(图 1)。在加入 DA5 后 6d 内, 同一时期各组幼体存活率未表现出显著差异( $P>0.05$ )。但到第 7 天, 即 Z<sub>3</sub> 变态至 M<sub>1</sub> 时, HC 组幼体存活率已显著高于 CK 组( $P<0.05$ ), 但与 LC 组差异不显著, 且 LC 组和 CK 组间也无显著差异( $P>0.05$ ); 到第 8 和第 9 天时 HC 组幼体存活率均显著高于 CK 组和 LC 组( $P<0.05$ ), 表明较高浓度的 DA5 加入凡纳滨对虾无

节期育苗水体后具有提高糠虾幼体存活率的作用。

2.5 DA5 对幼体变态的影响

分别计数第 5 天(Z<sub>2</sub>—Z<sub>3</sub>)Z<sub>3</sub>、第 6 天(Z<sub>3</sub>—M<sub>1</sub>)M<sub>1</sub>、第 7 天(Z<sub>3</sub>—M<sub>1</sub>)M<sub>1</sub> 和第 9 天(M<sub>1</sub>—M<sub>2</sub>)M<sub>2</sub> 幼体比例情况如图 2 所示。4 个不同计数时间中, HC 组相应最晚期幼体百分比均高于 CK 和 LC 组, 特别是第 7 天和第 9 天时显著高于后两组( $P<0.05$ ), 表明高浓度的 DA5 具有促进幼体从无节期变态至糠虾期的作用。

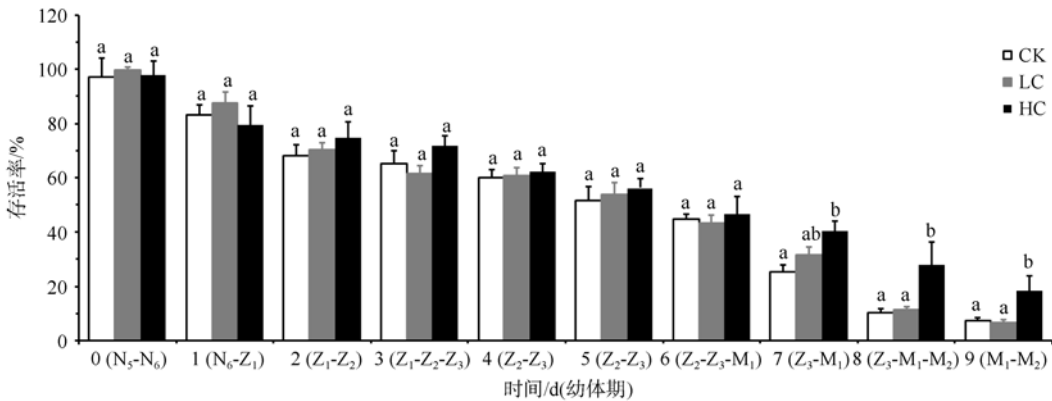


图 1 DA5 对凡纳滨对虾幼体存活率的影响

同一时期柱状图上不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )

Fig. 1 Effects of DA5 on the survival rate of *L. vannamei* larvae

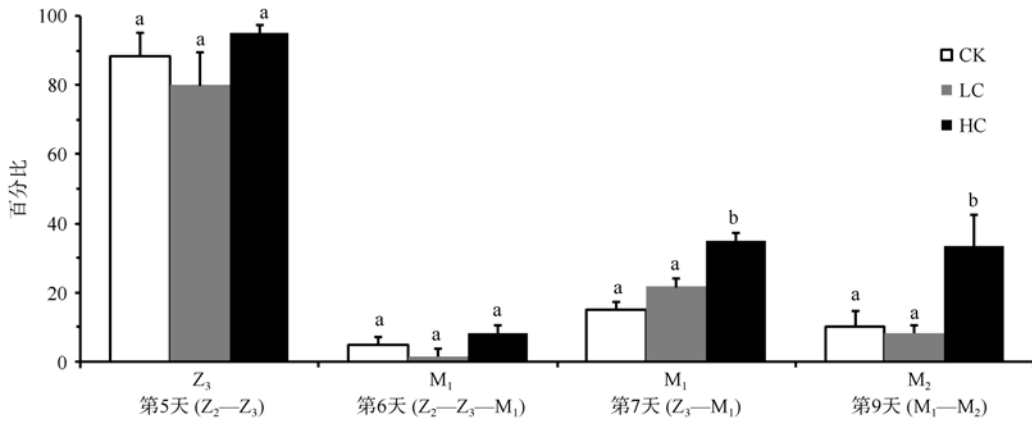


图 2 DA5 对凡纳滨对虾幼体变态率的影响

同一时期柱状图上不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )

Fig. 2 Effects of DA5 on the metamorphic rate of *L. vannamei* larvae.

### 3 讨论

#### 3.1 海洋 BALOs 在对虾育苗中应用的可能性

对虾育苗环境是一个相对封闭而又复杂的人工生态系统, 幼体密度高且仔虾期前通常很少甚至不换水。在对虾幼体的变态发育过程中, 由于饵料、幼体代谢物和残骸等使得水体有机物含量不断增加, 细菌在短时间内大量滋生, 原有的生态平衡不断改变。如果致病菌或条件致病菌(绝大多数情况下为弧菌)达到一定数量, 很容易导致细菌性病害的发生造成幼体大量死亡<sup>[15-16]</sup>, 因此控制对虾育苗过程中水体有害细菌特别是有害弧菌的数量是预防幼体细菌性病害暴发的一个必要条件。鉴于抗生素等化学药物在水产养殖应用中造成的副作用越来越多地被认识和重视, 迫切需要环境友好且易于操作的替代方法。

海水养殖环境中绝大多数致病或条件致病菌都是革兰阴性菌, 特别是以往对海洋 BALOs 宿主范围的研究表明它们更易于裂解其中的弧菌<sup>[1]</sup>, 而且在异养细菌(包括弧菌)含量较高、水体相对封闭、盐度较高、水温较恒定以及通气较充分的对虾育苗环境中, 非常有利于海洋 BALOs 的捕食性生活。因此利用海洋 BALOs 生物防治对虾育苗期细菌性病害具有较强的实践操作性。本研究结果也表明在无节后期单次加入较高浓度的 DA5 能够显著提高凡纳滨对虾糠虾幼体的存活率和变态率。

#### 3.2 DA5 对对虾育苗期菌群的调控

本研究所用 DA5 是通过 60 °C 热灭活溶藻弧菌细胞为宿主菌培养而来的, 并保持裂解活宿主菌能力, 因此可以认为属于兼性寄生型 BALOs。Ross 等<sup>[17]</sup>研究表明这种方式培养的 BALOs 与活宿主菌培养的 BALOs 具有相似的裂菌生活周期, 因此推测本研究以热灭活宿主菌培养的 DA5 释放到育苗水体后应具有正常裂解其中敏感细菌的作用。本研究显示加入 DA5 后短时期内(3d), HC 组水体异养细菌和弧菌含量相对于 LC 组和 CK 组的都呈消减趋势(表 1), 这与活宿主菌培养的 DA5 对自然海水中异养细菌和弧菌含量的影响情况相似<sup>[14]</sup>, 而这 3d 又是整个试验期间各组水体细菌数量迅速上升至最高值又快速下降的时期。因此, 一定时期内通过消减对虾育苗期水体细菌数量很可能是高浓度的 DA5 最终发挥有益作用的主要原因之一。

第 5 天时, HC 组水体异养细菌和弧菌含量均高于 CK 组和 LC 组, 特别是异养细菌含量显著高于后两组的(表 1)。这表明较高浓度 DA5 并不总是简单

的降低育苗水体细菌含量, 也可能通过对水体中不同种群细菌的选择性捕食或差异性裂解作用而相对增加某些可培养的非宿主菌含量。如果这种非宿主菌是有益于幼体的细菌, 可能会对幼体生长发育产生正效应; 当然, 增加的非敏感菌也可能是中性的甚至有害的类群, 含量过高的有害细菌在一定条件下也会对幼体产生副作用。第 5 天时 HC 组细菌含量显著增加也可能是由于最初水体中敏感宿主菌因 DA5 的存在减少到一定阈值后产生可塑性表型抗性<sup>[18]</sup>, 一定程度上又回复到较高含量。此外, 也可能是这一时期 HC 组对虾幼体代谢活性上已出现不同于 CK 组和 LC 组幼体的变化, 继而影响到水体细菌生态系统, 如果是这种情况的话, 此时 DA5 对细菌的直接捕食作用已不再是影响各组水体细菌含量差异的最主要因素了。

LC 组水体细菌含量、幼体变态率和存活率与对照组相比都不明显, 表明较低含量的 DA5 很难影响育苗水体固有的生态平衡。未加 DA5 前各组水体可培养 BALOs 含量均约为  $50\text{pfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 参考最近 Zheng 等<sup>[19]</sup>通过荧光定量 PCR 和双层平板法对自然海水噬菌体属 BALOs 计数结果的比较, 本研究中最初育苗水体实际可能含有至少  $500\text{pfu}\cdot\text{mL}^{-1}$  以上的本底 BALOs。较低含量的 DA5 可能很难竞争过水体原有 BALOs 种群, 导致其作用效果难以显现出来。

高浓度 DA5 对水体细菌含量的调控与对幼体变态和存活的影响效果并不是同步表现出来的, 本试验条件下, HC 组幼体存活率和变态率直到第 7 天时才显著高于 CK 组(图 1、2), 而 DA5 加入水体后 3d 内对水体异养细菌和弧菌含量就产生显著影响(表 1)。这显示 DA5 对幼体有益效应的发挥有一个时间延缓过程, 这一过程可能是被调节后的菌群直接或间接对幼体产生效应所需的时间, 也表明对虾育苗水体生态系统中幼体、细菌和环境因子间相互作用的复杂性。除可能对育苗水体菌群产生影响继而影响幼体外, 高浓度 DA5 很可能影响幼体体表菌群而最终对幼体的生长发育产生影响。这些方面包括对水体微生物种群的具体影响都需要进一步结合微生物分子生态学的分析才能更清楚的被认识。

#### 3.3 DA5 对对虾育苗期水体理化指标的影响

国内一些研究表明陆生 BALOs 在提高试验水生动物存活率的同时不仅明显降低了细菌数量, 一定程度上还改善了水体理化指标, 如降低水体 COD、 $\text{NH}_3\text{-N}$  等<sup>[8]</sup>。但本研究条件下 7d 内 DA5 对

所测水体的 pH、NH<sub>3</sub>-N 和 COD 的影响均不显著(表 2), 这与活宿主菌培养的 DA5 对自然海水中相关水体理化指标的影响情况<sup>[14]</sup>也相似。第 9 天时, HC 组水体 NH<sub>3</sub>-N 含量显著高于 CK 和 LC 组, 作者认为这种升高并不是由于 DA5 直接调控菌群的原因表现出来的, 而很可能是因 HC 组存活幼体数较多而相应增加了水体中幼体的代谢和排泄物, 以及第 8 天开始 HC 组投喂的饵料量也相对较多, 从而影响了水体环境, 使得第 9 天所测 HC 组的 3 种水质指标都相对增高(表 2), 只是 NH<sub>3</sub>-N 表现的更明显些。对水质的分析表明本研究条件下较高浓度的 DA5 促进对虾幼体生长和存活可能并非通过改善水体理化指标的方式发挥的, 至少不是通过调节水体 pH、NH<sub>3</sub>-N 或 COD 来实现的。DA5 对水体理化指标的影响不如陆生 BALOs 对淡水水体的作用明显, 可能

是不同 BALOs 菌种及其作用环境的差异决定的, 如海水通常具有缓冲能力相对更强的 pH 环境。当然, 如果应用更高浓度的 DA5 或其他种群 BALOs 也可能会直接或间接影响某些水质指标继而影响幼体的生长和存活情况。

本研究表明较高浓度的兼性寄生海洋 BALOs 菌株 DA5 在凡纳滨对虾育苗中具有提高幼体变态和存活作用, 因此在对虾育苗中应用 DA5 等海洋 BALOs 菌株调控水体细菌生态系统, 预防相关病害发生, 是一种不依赖化学药物且环境友好的对虾育苗方式, 具有潜在应用前景。当然, 实际应用中以何种形式生产和长期保存 BALOs 的裂菌活性, 在什么幼体阶段应用和具体应用方式, 以及应用过程中可能涉及到的其他一些理论和实际问题<sup>[7-8]</sup>等都需要进一步研究。

## 参考文献

- [1] JURKEVITCH E. Predatory prokaryotes: biology, ecology and evolution [M]. Berlin: Springer. 2007: 11–56, 213–248.
- [2] FERGUSON M A, SCHMITT J L, SINDHURAKAR A R, et al. Rapid isolation of host-independent *Bdellovibrio bacteriovorus* [J]. Journal of Microbiological Methods, 2008, 73 (3): 279–281.
- [3] DIEDRICH D L, DENNY C F, HASHIMOTO T, et al. Facultatively parasitic strain of *Bdellovibrio bacteriovorus* [J]. Journal of Bacteriology, 1970, 101 (3): 989–996.
- [4] DAVIDOV Y, JURKEVITCH E. Diversity and evolution of *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALOs), reclassification of *Bacteriovorax starrii* as *Peredibacter starrii* gen. nov., comb. nov., and description of the *Bacteriovorax-Peredibacter* clade as *Bacteriovoracaceae* fam. nov. [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54 (5): 1439–1452.
- [5] PINEIRO S A, STINE O C, CHAUHAN A, et al. Global survey of diversity among environmental saltwater *Bacteriovoracaceae* [J]. Environmental Microbiology, 2007, 9 (10): 2441–2450.
- [6] BAER M L, RAVEL J, PINEIRO S A, et al. Reclassification of salt-water *Bdellovibrio* sp. as *Bacteriovorax marinus* sp. nov. and *Bacteriovorax litoralis* sp. nov. [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54 (4): 1011–1016.
- [7] 杨吉霞, 徐丽, 蔡俊鹏. 海水养殖中应用蛭弧菌控制病原菌的前景与问题 [J]. 湛江海洋大学学报, 2004, 24 (3): 79–82.
- [8] 杨先乐, 曹海鹏, 钱云云. 噬菌蛭弧菌—水产动物病害生物防治的新工具 [J]. 淡水渔业, 2006, 36 (2): 55–60.
- [9] 温崇庆, 薛明, 张金燕, 等. 水产养殖用蛭弧菌类生物制剂的检测 [J]. 水产学报, 2009, 33 (2): 326–333.
- [10] 储卫华, 朱卫, 康春涛. 海洋蛭弧菌的分离鉴定及其对副溶血弧菌的作用 [J]. 微生物学通报, 2009, 36 (1): 20–24.
- [11] WEN C Q, LI X T, XUE M, et al. Molecular typing and identification of *Bdellovibrio*-and-like organisms isolated from seawater shrimp ponds and adjacent coastal waters [J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 106 (4): 1154–1162.
- [12] 温崇庆, 薛明, 周世宁. 四个类群海洋蛭弧菌类生物生长特性的比较 [J]. 微生物学通报, 2009, 36 (6): 815–820.
- [13] 温崇庆, 薛明, 何红, 等. 两株对虾幼体弧菌病原的分离和鉴定 [J]. 微生物学通报, 2008, 35 (3): 346–352.
- [14] 温崇庆, 丁贤, 薛明, 等. 一株海洋蛭弧菌类生物对海水细菌的生物控制和水质的影响 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2008, 47 (3): 85–88.
- [15] 周丽, 宫庆礼. 海水鱼虾蟹贝病害防治技术 [M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社. 1998: 83–86.
- [16] 徐怀恕, 杨学宋, 李筠, 等. 对虾育苗期细菌病害的诊断与控制 [M]. 北京: 海洋出版社. 1999: 10–22, 146–152.
- [17] ROSS E J, ROBINOW C F, ROBINSON J. Intracellular growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* 6-5-S in heat-killed *Spirillum serpens* VHL [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1974, 20 (6): 847–851.
- [18] SHEMESH Y, JURKEVITCH E. Plastic phenotypic resistance to predation by *Bdellovibrio* and like organisms in bacterial prey [J]. Environmental Microbiology, 2004, 6 (1): 12–18.
- [19] ZHENG G, WANG C, WILLIAMS H N, et al. Development and evaluation of a quantitative real-time PCR assay for the detection of saltwater *Bacteriovorax* [J]. Environmental Microbiology, 2008, 10 (10): 2515–2526.