

何芊萍,赵永贞,陈秀荔,等. 凡纳滨对虾及养殖水体中弧菌的分离鉴定[J]. 江苏农业科学,2013,41(6):199-202.

凡纳滨对虾及养殖水体中弧菌的分离鉴定

何芊萍, 赵永贞, 陈秀荔, 张 彬, 黄 婷, 彭 敏, 杨春玲, 杨彦豪, 李咏梅, 陈晓汉

(广西壮族自治区水产研究所, 广西南宁 530021)

摘要:采用 TCBS 选择培养基从广西钦州市、防城港市等地的凡纳滨对虾及养殖水体中分离纯化得到 8 株细菌, 对分离菌株进行生理生化特性鉴定, 并对全部菌株 16S rRNA 基因序列及部分菌株的 HSP60 基因序列进行克隆、测序, 运用 Mega 4.1 软件中的 Neighbor-Joining 法构建系统进化树。选取河流弧菌、溶藻弧菌、哈氏弧菌各 1 株对凡纳滨对虾成虾进行人工感染试验。结果表明, 菌株 S 被鉴定为河流弧菌, 菌株 M1、M2、M3、水 1、水 2、水 3 被鉴定为溶藻弧菌、菌株 H1 被鉴定为哈氏弧菌; 溶藻弧菌对对虾成虾的致病性最强, 其次是哈氏弧菌。

关键词: 凡纳滨对虾; 弧菌; 分离鉴定; 致病性

中图分类号: S945.49 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)06-0199-03

弧菌病主要是由弧菌属细菌引起的一类细菌性疾病, 发病率高、危害大, 是海水养殖动物病害研究的主要领域之一。弧菌是一种条件致病菌, 很多研究表明, 弧菌引起对虾发病与养殖环境中的弧菌数量有关^[1]。在对虾育苗期由于弧菌病导致幼体特别是状 II 期及其后期的幼体大量死亡。已报道的相关病原主要包括哈氏弧菌 (*V. harveyi*)、溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*)、副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 等^[2-4]。本研究对广西北部湾地区凡纳滨对虾及养殖水体中的弧菌进行分离鉴定, 旨在了解弧菌分布情况及其致病性, 为凡纳滨对虾的健康养殖提供基础资料, 为调节和改善对虾养殖环境提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

人工感染试验所用虾来源于广西防城港市企沙镇广西水产研究所凡纳滨对虾良种场; TCBS、TSB 培养基购自北京路桥公司; 弧菌科微量生化鉴定管购自杭州天和微生物试剂有限公司; 2 × Taq PCR Master mix、细菌 DNA 提取试剂盒、离心柱型普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、TA Cloning 试剂盒、DH5α 感受态细胞购自北京天根生物公司; 16S rRNA1: 5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′, 16S rRNA2: 5′-GGT-TACCTTGTACGACTT-3′; HSP1: 5′-CAGCGGCAGTAGAG-CAAC-3′, HSP2: 5′-TTAGCAGTGGACGAGATG-3′, 由上海英骏 (Invitrogen) 生物技术有限公司合成。

1.2 细菌分离及培养

1.2.1 虾苗 用无菌纱布收集虾苗至灭菌培养皿中, 用灭菌

生理盐水清洗数次, 转入无菌 EP 管中匀浆, 6 000 r/min 离心 1 min 后取上清, 将不同稀释倍数的上清液涂布于 TCBS 培养基, 置 32 ℃ 下培养 16 ~ 24 h 后取出观察菌落。将培养出的细菌进行纯化, 再挑单个菌落接种到 TSB 培养基, 部分菌液置于 4 ℃ 冰箱保存备用, 部分菌液加 20% 甘油冻存于 -80 ℃ 冰箱。

1.2.2 成虾 无菌操作, 从成虾肝胰腺取样划线接种于 TCBS 培养基, 或取成虾鳃丝于无菌 EP 管中匀浆。后续步骤参考“1.2.1”节。

1.2.3 养殖水体 将养殖水体接种于无菌 TSB 中培养 16 h, 将菌液稀释一定倍数后涂布于 TCBS 培养基, 或直接将养殖水体涂布于 TCBS 培养基上。后续步骤参考“1.2.1”节。

1.3 细菌的生化鉴定

利用弧菌科微量生化鉴定管对分离纯化的细菌进行生化特性鉴定, 包括嗜盐性、糖发酵试验等。

1.4 16S rRNA 序列的扩增、克隆测序

1.4.1 细菌模板 DNA 的制备 运用细菌 DNA 提取试剂盒提取菌液中细菌的 DNA。

1.4.2 16S rRNA 的扩增 以 16S rRNA 为靶序列的 PCR 反应条件: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 50 s, 55 ℃ 退火 50 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。

1.4.3 PCR 产物的回收纯化 取 PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶 (加入 EB 替代染料) 中电泳约 20 min, 在紫外透射仪下将含目的条带的琼脂糖凝胶切下, 利用离心柱型普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收 DNA。

1.4.4 16S rRNA 序列克隆、测序 将回收产物与克隆载体于 14 ℃ 下连接过夜, 将产物转化 DH5α 感受态细胞, 于 LB 培养液中振荡培养 1 h 后涂布 LA 平板, 培养过夜后挑菌斑进行 PCR 鉴定, 之后将阳性克隆菌液送至上海英骏生物技术有限公司测序。将测序得到的 16S rRNA 序列分别与 GenBank 中核酸数据进行 Blast 分析, 选取同源性最高的序列及几种常见模式弧菌的 16S rRNA, 采用 Mega 4.1 软件邻接法构建系统发育树。

1.5 HSP60 序列的扩增、克隆测序

HSP60 序列的扩增、克隆测序步骤参照 16S rRNA 序列。

收稿日期: 2012-12-19

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项 (编号: CARS-47);

广西科学研究与技术开发计划 (编号: 桂科攻 1222013-1); 广西壮族自治区直属公益科研基本业务费 (编号: GXIF-2012-03)。

作者简介: 何芊萍 (1984—), 女, 广西柳州人, 硕士, 研究实习员, 主要从事水产遗传育种与健康养殖研究。E-mail: 214524066@qq.com。

通信作者: 陈晓汉, 研究员, 主要从事水产遗传育种与健康养殖研究。

E-mail: chnahn@163.com。

以 HSP60 为靶序列的 PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 40 s,55 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 50 s,35 个循环; 72 ℃ 延伸 8 min。后续步骤参考“1.4.4”节。

1.6 细菌的人工感染试验

采用浸泡方式进行人工感染试验,水温为 28 ℃,盐度为 2.5%。将试验虾分为 10 组,3 种弧菌处理各设 3 组,另设 1 个空白对照组。每组 6 尾虾,在塑料水箱中暂养 2 d 后进行感染试验。所用菌液为 TSA 培养基复苏 -80 ℃ 冰箱冻存的弧菌菌株,经 TCBS 选择培养基纯化后挑菌落于 TSB 里 35 ℃ 振荡过夜培养,同时取菌液测定活菌浓度(TCBS 培养基平板计数法)。

2 结果与分析

2.1 分离菌株形态和生理生化特性

8 株分离菌株来源见表 1。TCBS 平板 32 ℃ 培养 16 ~ 24 h 后,菌株 M1、M2、M3、水 1、水 2、水 3 均形成圆形、大小 2 mm 左右的黄色菌落;菌株 S 形成大小 1.5 mm 左右的黄色菌落;菌株 H1 形成大小 1.2 mm 左右的绿色菌落。

表 1 分离菌株来源			
菌株	来源地	材料	时间 (年-月)
H1	广西防城港市	虾苗	2012-07
M1	广西钦州市	虾苗	2012-06
M2	广西防城港市	虾苗	2012-06
M3	广西防城港市	虾苗	2012-07
水 1	广西钦州市	育苗池水	2012-06
S	广西防城港市	成虾鳃丝	2012-08
水 2	广西防城港市	育苗池水	2012-06
水 3	广西防城港市	育苗池水	2012-07

8 株分离菌株的生化试验,包括耐盐性试验、蔗糖发酵试验、葡萄糖蛋白胨水试验(V-P),结果见表 2。

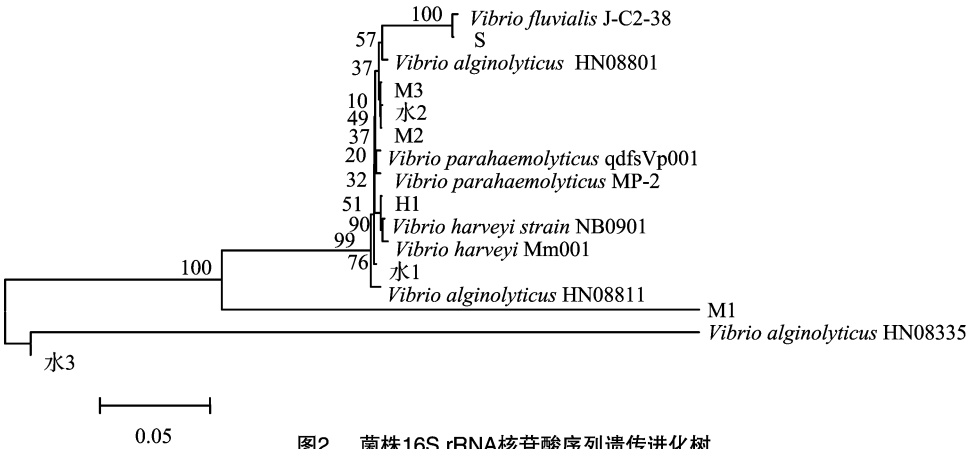


图2 菌株16S rRNA核苷酸序列遗传进化树

2.3 菌株 HSP60 序列分析

2.3.1 HSP60 电泳扩增结果 HSP60 PCR 产物电泳结果如图 3 所示,从 6 株分离菌的 DNA 模板中均扩增出了目标片段,长度约 370 bp,与预期相符。

2.3.2 HSP60 的序列的遗传进化树 由系统进化树(图 4)看出,M1、M2、M3、水 1、水 2、水 3 的 HSP60 序列与溶藻弧菌

表 2 菌株生化特性鉴定结果

菌株	耐盐性 (%)	蔗糖	V-P	适宜温度 (℃)
H1	6	-	-	28 ~ 30
M1	10	+	+	30 ~ 35
M2	8	+	-	30 ~ 35
M3	8	+	+	30 ~ 35
水 1	8	+	+	30 ~ 35
S	6	+	-	30 ~ 35
水 2	10	+	+	30 ~ 35
水 3	8	+	-	30 ~ 35

注:“+”代表阳性反应,“-”代表阴性反应。

2.2 菌株 16S rRNA 序列分析

2.2.1 16S rRNA 电泳扩增结果 16S rRNA PCR 产物电泳结果如图 1 所示,从分离菌株的 DNA 模板中均扩增出了目标片段,长度约 1 500 bp,与预期相符。

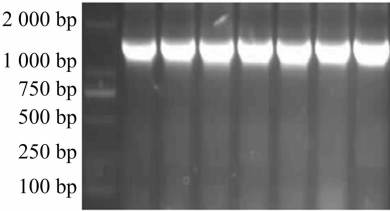


图1 16S rRNA序列PCR扩增电泳图

2.2.2 16S rRNA 序列的遗传进化树 由系统进化树(图 2)看出,菌株 S 与河流弧菌聚集为一个分支,菌株 H1 与哈氏弧菌聚集为一个分支。结合生理生化特性,菌株 S 鉴定为河流弧菌,菌株 H1 鉴定为哈氏弧菌。菌株水 1、水 2、水 3、M1、M3 与溶藻弧菌的遗传距离较近,菌株 M2 与溶藻弧菌及副溶血弧菌的遗传距离较近,但无法准确将它们定种,还需结合菌株的 HSP60 序列进行分析。

的遗传距离比较近,聚集为 1 个分支。综上,可将 M1、M2、M3、水 1、水 2、水 3 鉴定为溶藻弧菌。

2.4 细菌感染试验结果

由表 3 可见,随着菌液浓度降低,试验虾死亡率降低,而对照虾无死亡现象。溶藻弧菌的总死亡率最高,其次为哈氏弧菌,且溶藻弧菌组的首次死亡时间最短。表明 3 种弧菌对

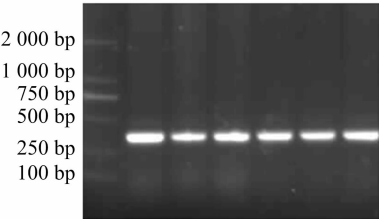


图3 HSP60序列PCR扩增电泳图

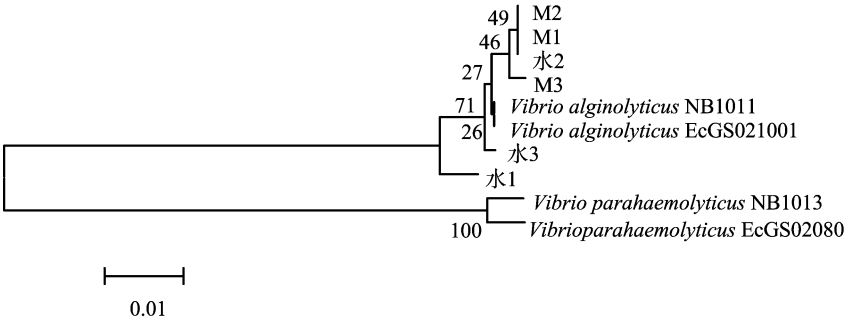


图4 菌株HSP60核苷酸序列遗传进化树

表 3 人工感染试验结果

菌株	组别	菌液浓度 (CFU/mL)	不同感染时间下的虾死亡数(尾)								死亡率 (%)
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	合计	
M2	1	2.8×10^7	0	0	2	1	2	1	0	6	100
	2	2.8×10^6	0	0	0	0	1	1	2	4	66.7
	3	2.8×10^5	0	0	0	0	0	0	2	2	33.3
H1	1	2.3×10^7	0	0	0	0	1	2	2	5	83.3
	2	2.3×10^6	0	0	0	0	0	1	2	3	50.0
	3	2.3×10^5	0	0	0	0	0	0	1	1	16.7
S	1	2.5×10^7	0	0	0	0	1	0	1	2	33.3
	2	2.5×10^6	0	0	0	0	0	0	1	1	16.7
	3	2.5×10^5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
空白对照			0	0	0	0	0	0	0	0	0

死虾进行白斑病毒及桃拉病毒检测,确定无病毒感染,表明该人工感染试验成立。

3 结论与讨论

温崇庆等通过表型和分子特征对 2 个育苗场凡纳滨对虾蚤状Ⅱ期幼体弧菌病原进行鉴定,确定为副溶血弧菌及溶藻弧菌^[2]。van den Berghe 等对厄瓜多尔凡纳滨对虾育苗场的研究表明,溶藻弧菌作为优势弧菌存在于凡纳滨对虾幼体各阶段,特别是无节期和蚤状期健康幼体上,但在仔虾期更多见于患病个体上^[5]。徐怀恕等对中国对虾幼体细菌性暴发病的研究表明,蚤状幼体大批死亡的病原为哈氏弧菌^[6]。本研究对广西北部湾地区健康虾苗、成虾、养殖水体进行弧菌的分离鉴定,旨在了解弧菌分布情况及其致病性,为广西北部湾地区凡纳滨对虾的健康养殖提供基础资料。传统生理生化特征测定法得出的细菌鉴定结果不一定准确,且弧菌属内各种细菌的生化鉴定结果较相似,必须结合分子生物学方法进行验证。16S rRNA 序列测定已成为细菌鉴定的重要工具,能有效区分细菌属及属以上的分类单元,然而许多亲缘较近的细菌种具有几乎相同的 16S rRNA 基因序列,如溶藻弧菌、副溶血弧菌等的 16S rRNA 基因序列间的同源性在 98% 以上^[7],

对虾的致病性强度有差异,以溶藻弧菌致病性最强,其次为哈氏弧菌,河流弧菌最弱。不同种弧菌感染虾导致的症状基本一致,附肢变红,部分步足也变红;须变红;尾扇变红、溃烂;头胸甲区呈黄色,部分虾的肝胰腺糜烂;部分虾的眼溃烂。从感染死亡虾肝胰腺重新划线分离细菌,得到与感染试验所用弧菌形态一致的菌落。将菌株进行 16S rRNA、HSP60 序列测定,结果发现从感染致死对虾分离到的菌株与感染试验所用菌株的 16S rRNA、HSP60 序列同源性均达 99% 以上;另外,对

因此对这些细菌的准确鉴定还须测定其他基因序列。Kwok 等对 15 种共 29 株海洋弧菌部分 HSP60 基因序列分析表明,弧菌种间 HSP60 基因序列相似性为 71% ~ 82%,种内菌株间的相似性为 96% ~ 100%,相对于 16S rRNA 基因序列更适合海洋弧菌的系统发育分析和鉴定^[8]。本研究结合生理生化特性及 16S rRNA、HSP60 基因序列克隆测序结果对分离菌株进行鉴定,结果发现分离到的菌株中有 6 株为溶藻弧菌,1 株为哈氏弧菌,1 株为河流弧菌,表明在广西北部湾地区凡纳滨对虾育苗时期的养殖水体及虾苗体内,溶藻弧菌为最优势的弧菌菌种,此结果与前人研究结论^[9-10]较一致。人工感染试验表明,当菌液浓度达到 10^5 CFU/mL 时,溶藻弧菌及哈氏弧菌可以导致凡纳滨对虾发病甚至死亡,与相关研究结果^[11]接近。本研究中溶藻弧菌及哈氏弧菌人工感染试验中所用虾为抗病力更强的成虾,若是用虾苗做人工感染试验导致的死亡率可能会更高。因此,定时监测养殖水体尤其是育苗池中弧菌的数量变化有利于凡纳滨对虾的健康养殖。

参考文献:

[1] 王晓颖,席 峰,袁建军,等. 虾池沉积环境中若干功能菌及弧菌的时空变化[J]. 厦门大学学报:自然科学版,2006,45(5):250-256.

蒲正宇,史军义,姚俊,等. 燕凤蝶生物学特性及人工养殖技术初探[J]. 江苏农业科学,2013,41(6):202-203.

燕凤蝶生物学特性及人工养殖技术初探

蒲正宇¹, 史军义¹, 姚俊¹, 李贵兴²

(1. 中国林业科学研究院资源昆虫研究所蝴蝶研究与发展中心, 云南昆明 650224;

2. 云南中林生物资源科技有限公司, 云南昆明 650216)

摘要:燕凤蝶生物学特性观察表明,燕凤蝶一年发生 3~4 代,成虫最早于 4 月下旬发生。成虫吸水访花,喜访鬼针草花采蜜,寄主植物为青藤。在对燕凤蝶的生物学特性和青藤培育技术的研究基础上,实现了对燕凤蝶规模化人工循环养殖。燕凤蝶成虫饲养于成虫繁殖园,园内放置青藤供雌蝶产卵;着卵植株移至孵化室,于室内孵化;1~3 龄幼虫在寄主植物园内用 70 目的尼龙袋饲养,4~5 龄幼虫饲养于幼虫饲养室,直至挂蛹;留为种源的蛹移至羽化室内羽化,供应市场的蛹包装于塑料筐内运输。

关键词:燕凤蝶;生物学特性;人工养殖

中图分类号: Q965;S185 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)06-0202-02

燕凤蝶 (*Lamproptera curia* Fabricius) 属昆虫纲 (Insecta) 鳞翅目 (Lepidoptera) 凤蝶科 (Papilionidae) 燕凤蝶属 (*Lamproptera*), 国内主要分布于广东、广西、海南、云南、香港^[1]。燕凤蝶是中国国家林业局令《国家保护的有益的或者有重要经济、科学价值的陆生野生动物名录》中列入的种类,在生态观赏和工艺制作中也具有较高的利用价值^[2]。

随着我国经济的发展、物质生活水平的提高,人们对精神文化方面的需求也随之提高。在此情况下,活蝴蝶园的建立能够给生活在城市中的人群提供一份宁静,提供亲近自然、接触自然的机会。进入 20 世纪以来,活蝴蝶园雨后春笋般涌现,所需蝴蝶量巨大,而这些蝴蝶主要来自野外捕捉,由此带来了活体蝴蝶供需关系的矛盾,以及蝴蝶捕捉带来的经济利益与生态环境保护的矛盾。蝴蝶人工养殖是解决这些矛盾的有效途径,它不仅可以为市场供应蝴蝶抑制野外蝴蝶捕捉,还

能为农民带来不菲的收入,改变农村经济结构^[3]。到 2010 年左右,我国约能人工养殖 30 种蝴蝶,年产量约 300 万只,但仍不能满足市场上对蝴蝶数量和种类的需求。本研究于 2009 年至 2012 年在广西凭祥进行,观察了燕凤蝶的生物学特性,并成功规模化养殖出燕凤蝶,以期丰富蝴蝶市场供应种类、缓解人工养殖蝴蝶市场供给矛盾、保护野外蝴蝶资源奠定基础。

1 研究区概况

试验基地位于广西壮族自治区凭祥市区以北约 3 km 处的中国林业科学研究院热带林业研究中心试验林场内,地处 21°57'~22°19'N,106°39'~106°59'E,海拔 690~710 m。该地区属北热带季风气候,境内日照充足,雨量充沛,干湿季节明显,光、水、热资源丰富,年平均气温 20.5~21.7℃,年均降水量 1 200~1 500 mm^[4]。

燕凤蝶人工养殖主要设备包括寄主植物园、成虫繁殖园、幼虫饲养室、蛹羽化室、空调、加湿器、温湿度测量仪等。

2 燕凤蝶的形态特征及其生活习性

燕凤蝶成虫是凤蝶中最小的,触角黑色,体背黑色,头宽,腹短,前翅长约 9~11 mm,白色透明,外缘、前缘和基部均黑色,前缘中部到臀角有 1 条黑色斜带,后翅狭长,尾突长,从前

收稿日期:2012-11-15

基金项目:国家林业局科技项目[编号:(2010)12号]。

作者简介:蒲正宇(1987—),男,四川广元人,硕士,研究方向为资源昆虫。E-mail: puzhengyu@qq.com。

通信作者:史军义,研究员,研究方向为资源昆虫。E-mail: esjy@163.com。

[2] 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.

[3] 苏杭. 养殖凡纳滨对虾病原菌(哈维氏弧菌)的分离鉴定与防治[D]. 雅安:四川农业大学,2010:13-15.

[4] 蔺红苹,邱德全,谭龙艳. 一株副溶血弧菌的分离和鉴定[J]. 水产科学,2007,26(5):296-299.

[5] van den Berghe J, Verdonck L, Robles A R, et al. Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(6): 2592-2597.

[6] 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,1999:211-217.

[7] 房海,陈翠珍,张晓君,等. 水产养殖动物病原细菌学[M]. 北

京:中国农业出版社,2010:327-346.

[8] Kwok A Y, Wilson J T, Coulthart M, et al. Phylogenetic study and identification of human pathogenic *Vibrio* species based on partial *hsp60* gene sequences[J]. Can J Microbiol, 2002, 48(10): 903-910.

[9] 张洪沂,赵勇,戴习林,等. 南美白对虾养殖系统中弧菌为主的致病菌群的分子比较[J]. 华北农学报,2008,23(增刊):257-262.

[10] 韩丽,张玉婷,孙晓红,等. 南美白对虾养殖水体 5 株疑似病原菌的分离与初步鉴定[J]. 食品与发酵工业,2008,34(6): 72-74.

[11] 王滨,吕均. 一起副溶血弧菌污染小龙虾的病原学鉴定[J]. 中国卫生检验杂志,2011,21(8):1969-1973.