

水温对南美白对虾肠道菌群影响的研究

尹军霞, 沈文英, 郦萍

(绍兴文理学院生物系, 浙江 绍兴 312000)

摘要: 在不同温度下, 对南美白对虾 (*Penaeus vannamei*) 肠道乳酸杆菌 (*Lactobacillus* sp.)、双歧杆菌 (*Bifidobact* sp.)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)、厌氧菌总数和好氧菌总数进行了定性定量分析。结果表明, 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌、产气荚膜梭菌为过路菌群; 乳酸杆菌、双歧杆菌为常住菌群。厌氧菌总数、双歧杆菌随水温升高显著增加 (F test, $P < 0.01$); 好氧菌总数、乳酸杆菌随水温升高变化不显著 (F test, $P > 0.05$)。肠道中厌氧菌总数比好氧菌多 (t test, $P < 0.05$), 且随着水温升高, 厌氧菌的优势越明显。

关键词: 南美白对虾 (*Penaeus vannamei*); 肠道菌群; 水温

中图分类号: Q938.8; Q939.96 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2004)05-0033-04

南美白对虾 (*Penaeus vannamei*), 又称白肢虾 (Whiteleg shrimp)、或者白对虾 (White shrimp)。是目前世界上公认的三大养殖对虾 (其他两种为斑节对虾和中国对虾) 中单产量最高的虾种。该虾具有生长快、抗逆性强、抗病毒病、肉味鲜美、加工出肉率高, 蛋白质含量和必需氨基酸等营养指数高于其他对虾^[1]等优点。但南美白对虾对温度很敏感, 致使其养殖具有明显的季节性, 一般于 7, 8, 9 三个高温月养殖, 而其它的低温季节很难存活^[2], 使得南美白对虾很难在全年扩大养殖。陈昌生等^[3]研究表明, 不同水温及水温渐变、突变对南美白对虾的摄食、生长、存活有一定的影响。肠道菌群对其它动物包括鱼类的生长、存活有重要的生理意义^[4]。

对虾类肠道菌群的研究, 国内外报道甚少。Dempsey 等^[5]对虾类的肠道菌群进行了研究, 分离并鉴定了肠道菌群的好氧菌, 发现弧菌属、产碱菌属、气单胞菌属、发光杆菌属和假单胞菌属占优势, 肠道菌群能够提高食物的消化效率。Yasuda 等^[6]发现幼虾中, 弧菌属占优势, 而成年虾中, 假单胞菌属占优势。王祥红、李会荣等^[7]对野生健康中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 成虾肠道微生物区系进行了研究, 发现弧菌属和发光杆菌属在整个肠道中为优势菌属。这些研究

主要针对肠道菌群中的好氧菌, 而许多研究表明厌氧菌对动物的生长发育、抗病防病更具生理意义^[8], 而对南美白对虾肠道菌群的构成及变化规律的研究, 迄今国内外少有报道。

本实验选择了对肠道有益的乳酸杆菌 (*Lactobacillus* sp.)、双歧杆菌 (*Bifidobact* sp.)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和条件致病的金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 几种有代表性的菌以及好氧菌总数、厌氧菌总数为测定指标, 对南美白对虾肠道菌群的构成受温度的影响进行了研究。以期了解南美白对虾肠道菌群的结构、组成以及随温度变化的演替规律, 为合理采用生态疗

收稿日期: 2003-08-13; 修回日期: 2004-02-24

基金项目: 国家新高技术发展计划 (海洋 863 计划) 2001AA6220602003AA622060+

作者简介: 尹军霞 (1970-), 女, 湖北天门人, 硕士, 讲师, 从事微生物的教学与研究, 电话: 0575-8055199

法和反季节养殖提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料选择

实验虾取自绍兴县南美白对虾苗种场,共进行3次测定:(1)2003年4月27日,水温21.2℃。(2)2003年5月15日,水温23.2℃。(3)2003年6月1日,水温24.4℃。其它条件:pH7.8~8.2,含氧量:3.95~4.05 ml/L。虾体选择:8~10 g,食欲正常,为无病个体,剖检时,体表、体内无任何异样,肠道充盈度较好,每次取6尾。

1.2 菌液的制备

虾体随机采集后,用75%乙醇虾体表面消毒,无菌条件下解剖,用无菌棉线分别结扎食道与前肠及后肠与肛门交界处,取出肠道,无菌水反复冲洗,肠段称量后,剪碎放入装有10 mL无菌水和玻璃珠的三角瓶内。充分振摇10 min(250次/min),制成 10^{-1} 的稀释液。再分别稀释得到 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} 稀释液。

1.3 细菌的分离培养

选用几种国内外学者常用的培养基进行好氧菌总数和厌氧菌总数以及各种肠道细菌的分离培养^[9~12](需氧菌放入恒温箱中培养,厌氧菌放入厌氧培养箱培养,YQX-1型,上海跃进医疗器械厂)。培养

表1 细菌培养

Tab.1 Culture of bacteria

被检菌	培养基名称	培养方法	37℃培养时间(h)
金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	甘露醇-氯化钠培养基	需氧	24~48
大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)	EMB	需氧	24~48
好氧菌总数	营养琼脂	需氧	24~48
副溶血性弧菌(<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)	TCBS	需氧	24~48
乳酸杆菌(<i>Lactobacillus</i>)	LBS	厌氧	48~72
双歧杆菌(<i>Bifidobact</i>)	BBL	厌氧	48~72
产气荚膜梭菌(<i>Clostridium perfringens</i>)	SPS	厌氧	48~72
厌氧菌总数	EG	厌氧	48~72

方法见表1。

1.4 细菌的计数^[8~10,13]

好氧菌总数和厌氧菌总数直接平板菌落计数;6种细菌平板菌落计数的同时,取单个菌落涂片,革兰氏染色和镜检。为了判断选择培养基的情况,对每个选择性培养基平板选6个典型菌落进一步培养和生化鉴定,看各菌是否符合该菌种的基本特征(金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、副溶血性弧菌、产气荚膜梭菌)或属的基本特征(乳酸杆菌、双歧杆菌)。

1.5 数据处理

菌落计数结果换算成每克样品所含菌数量(cfu/g),所得数据取对数值,并对同一温度下的6只虾的菌数对数值进行方差分析。

2 结果与讨论

各菌群测定结果见表2和表3。

从表2可见,大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌、产气荚膜梭菌在有些虾肠道有(量极少, $1 \times$

表2 4种菌在虾中的存在情况

Tab.2 The numbers of shrimps containing following four kinds of bacteria

温度 (℃)	有大肠杆菌的虾 (尾)	有金黄色葡萄球菌的虾 (尾)	有产气荚膜梭菌的虾 (尾)	有副溶血性弧菌的虾 (尾)
21.2	1	6	1	3
23.2	0	4	4	3
24.4	2	3	6	2

注:总虾数为6尾

表 3 其它菌群测定结果

Tab.3 The examinational result of the other bacteria

温度(℃)	好氧菌总数	厌氧菌总数	双歧杆菌	乳酸杆菌
21.2	8.03 ± 0.47	8.35 ± 0.27	7.31 ± 0.54	7.20 ± 0.62
23.2	7.82 ± 0.28	9.09 ± 0.37	7.91 ± 0.24	7.43 ± 0.29
24.4	8.03 ± 0.38	9.39 ± 0.10	8.63 ± 0.40	8.03 ± 0.69
F 检验	0.2831 *	19.3779 * * *	8.6185 * * *	2.6856 *

注: * 表示差异不显著($P > 0.05$) * * 表示差异显著($P < 0.05$) * * * 表示差异极显著($P < 0.01$); 菌群测定结果数值均为取以 10 为底的对数的值, 表 4 同。

10⁻¹平板上 1~6 个菌落), 有些虾无, 说明这些菌为非常住菌(过路菌), 其中金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌、产气荚膜梭菌为条件致病菌, 它们非肠道必需菌似乎可以理解, 但大肠杆菌在其它动物包括水生鱼类的肠道一般都存在并具有很重要的生理功能, 如产生多种维生素, 而南美白对虾却很少有大肠杆菌, 其原因有待进一步研究。由表 3 可见乳酸杆菌、双歧杆菌在所有虾中都以一定的量存在, 为常住菌群, 说明它们对南美白对虾的生长发育是必需的, 这与其它的动物相似^[14, 15]。有研究表明, 常住菌是过路菌不能定植的因素^[16], 即: 乳酸杆菌、双歧杆菌等常住菌是使条件致病菌量极少, 不足以致病的重要原因。提高和促进乳酸杆菌、双歧杆菌等常住菌的生长应该可以增强南美白对虾抗肠道疾病的能力。

从表 3 可以看出, 温度升高的幅度不大, 但厌氧菌总数和双歧杆菌随着水温升高极显著增加 (F 检验 $P < 0.01$), 而南美白对虾也是随着水温升高明显生长加快, 是否可以说明厌氧菌总量和双歧杆菌有助于南美白对虾的生长, 是影响南美白对虾对水温敏感的因素值得进一步探讨。目前, 由于温度的限制, 南美白对虾的养殖具有明显的季节性, 主要集中在 7, 8, 9 三个月, 是否人为的提高南美白对虾肠道的厌氧菌总量和双歧杆菌(如投放含双歧杆菌制剂或促进双歧杆菌定植的制剂), 南美白对虾会在低温下就生长良好或者在养殖季节里生长更好, 值得研究。好氧菌总数和乳酸杆菌随水温升高变化不显著 (F 检验 $P > 0.05$), 说明它们在南美白对虾肠道含量稳定, 受外界环境的影响小。

表 4 通过好氧菌总数与厌氧菌总数对数值成组比较, 得到 $t = 4.39$, 而 $t_{0.05} = 4.303$, 故 $P < 0.05$ 。可知在肠道中厌氧菌和好氧菌之间存在显著差异 ($P < 0.05$), 厌氧菌占优势, 这和其它动物情况相符, 又由好氧菌总数与厌氧菌总数比值随温度升高而逐渐

表 4 不同温度下好氧菌总数与厌氧菌总数比较

Tab.4 Comparing the total number of anaerobe with the total number of aerobe under different water temperatures

温度(℃)	厌氧菌总数	好氧菌总数	厌氧菌总数与好氧菌总数对数之差
21.2	8.35	8.03	0.32
23.2	9.09	7.82	1.27
24.4	9.39	8.03	1.36

增大可知: 厌氧菌的优势随温度升高逐渐明显。

参考文献:

- [1] 陈晓汉, 陈琴, 谢达祥. 南美白对虾含肉率及肌肉营养价值的评定[J]. 水产科技情报, 2001, 28(4): 165-167.
- [2] 宋宗岩, 王世党, 于诗群, 等. 南美白对虾体长增长与温度的关系[J]. 齐鲁渔业, 2002, 19(7): 19.
- [3] 陈昌生, 黄标, 叶兆弘, 等. 南美白对虾摄食及存活与温度的关系[J]. 集美大学学报, 2001, 6(4): 296-300.
- [4] 陈孝煊, 吴志新, 刘毅辉. 呋喃唑酮对草鱼肠道菌群的影响[J]. 水利渔业, 1999, 19(3): 34-36.
- [5] Dempsey A C, Kitting C L. Bacterial variability among individual penaeid shrimp digestive tract[J]. *Crustaceana*, 1989, 56(3): 267-278.
- [6] Yasuda K, Kitao T. Bacterial flora in the digestive tract of prawns, *penaeus japonicus* BATE[J]. *Aquaculture*, 1980, 19: 229-233.
- [7] 王祥红, 李会荣, 张晓华, 等. 中国对虾成虾肠道微生物区系[J]. 青岛海洋大学学报, 2000, 30(3): 493-498.
- [8] 高巍, 孟庆翔. 生长育肥猪胃肠道正常厌氧菌群的数量和分区[J]. 中国农业大学学报, 2000, 5(5): 88-93.

- [9] 蒋长苗, 鲍传和, 马元山. 草鱼肠道正常菌群与肠炎病原菌关系的初步研究[J]. 吉林农业大学学报, 1992, 14(1): 55 - 58.
- [10] 王红宁, 何明清, 柳苹, 等. 鲤肠道正常菌群的研究[J]. 水生生物学报, 1994, 18 (4): 354 - 359.
- [11] Yoshimizu M. Study on the intestinal Microflora of Salmonide[J]. **Fish pathology**, 1976, 10(2): 243 - 259.
- [12] Margolis L. The effect of fasting on the bacterial flora of the instine of fish[J]. **Fish Pathology**, 1953, 10(2): 95 - 104.
- [13] 东秀珠. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 66 - 309.
- [14] 王建华. 动物肠道菌群与微生态制剂[J]. 天津畜牧兽医, 1996, 13(2): 9 - 10.
- [15] Gibbson, W X. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacterial[J]. **Apple Bacteriology**, 1994, 77: 412 - 420.
- [16] 贝濂. 肠道菌群和菌群失调[J]. 中华消化杂志, 1997, 17(6): 348.

Study on the influence of water temperature on the intestinal microflora of *Penaeus vannamei*

Yin Jun - xia, Shen Wen - ying, Li Ping

(Department of Biology, Shaoxing College of Arts and Science, Shaoxing 312000, China)

Received: Aug., 13, 2003

Key word: *Penaeus vannamei*; intestinal microflora, water temperature

Abstract: This paper considers the influence of water temperature on the intestinal microflora of *Penaeus vannamei*. Six types of bacteria *Escherichia coli*, *Lactobacillus* sp., *Bifidobacteriub* sp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Clostridium perfringens*, the total number of anaroe and the total number of aerobe were investigated both qualitatively and quantitatively under different water temperatures. Results show lactobaccillus and bifihaemolyticas are present at all tested temperatures while *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio parahaemolyticus* are sometimes present. Total number of anaroe changes remarkably (F test, $P < 0.01$) at different temperatures, and so does bifidobacteriub. Despite temperature changes (F test, $P > 0.05$) no significant changes are seen in total number of aerobe and lactobacillus present. Total number of anaerobe in the intestine is much greater than that of aerobe (t test, $P < 0.05$), this difference becomes marked as temperature increases.

(本文编辑: 刘珊珊)