

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170419001

http://www.yykxjz.cn/

刘志轩, 王印庚, 张正, 王凯, 蔡生力, 包海岩, 姚学良, 张振. 几种消毒剂对凡纳滨对虾致病性弧菌的杀灭作用. 渔业科学进展, 2018, 39(3): 112-119

Liu ZX, Wang YG, Zhang Z, Wang K, Cai SL, Bao HY, Yao XL, Zhang Z. Germicidal effect of several disinfectants on the pathogenic bacteria of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in *Litopenaeus vannamei*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(3): 112-119

## 几种消毒剂对凡纳滨对虾致病性弧菌的杀灭作用\*

刘志轩<sup>1,2</sup> 王印庚<sup>1,2①</sup> 张正<sup>2</sup> 王凯<sup>2</sup>  
蔡生力<sup>1</sup> 包海岩<sup>3</sup> 姚学良<sup>3</sup> 张振<sup>4</sup>

- (1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 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. 天津市水产技术推广站 天津 300321; 4. 青岛远大海洋生物科技有限公司 青岛 266035)

**摘要** 本研究对分离的副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)及 *Vibrio* sp. Ex25 共 4 株急性肝胰腺坏死病(AHPND)致病菌(编号分别为 PV130903A、PV140731A、PV150526A 和 PV140821A)进行了杀灭作用实验,研究了聚六亚甲基胍(PHMG)、双氧水(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、聚维酮碘(PVPI)及二氧化氯(ClO<sub>2</sub>) 4 种消毒剂对 4 株致病菌的杀灭浓度、杀灭时间及杀灭率的比较分析;同时追踪了 PHMG 在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖过程中对池塘水体弧菌的杀灭效果。结果显示,2 μl/L 的 ClO<sub>2</sub> 作用 1 h、1 μl/L 的 PHMG 或 1 μl/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 2 h、8 μl/L 的 PVPI 作用 6 h 可完全杀灭 4 种弧菌,PHMG 和 PVPI 的杀菌率随时间的推移逐渐升高,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 ClO<sub>2</sub> 的杀菌率在达到峰值之后均有不同程度的下降。在池塘养殖水体的弧菌杀灭实验中,浓度为 0.5、1、2 μl/L 的 PHMG 可使养殖水体中的弧菌总量分别在第 4 天、第 3 天和第 3 天下降到最低值,分别为初始弧菌总数的 79.14%、82.48%和 87.30%;各浓度实验组弧菌总量达到最低值后逐步升高,直到第 11 天时上述各浓度实验组的弧菌总量仍然低于消毒前初始值的 3.58%、5.53%和 6.10%。综合比较分析,这 4 种消毒剂对致病性弧菌的杀菌能力强弱为:PHMG > H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> > ClO<sub>2</sub> > PVPI。结合消毒剂的杀菌浓度、杀菌效果、持续时间以及使用成本等几个方面考虑,认为 PHMG 具有高效、持久等优点,在水产养殖中将会有良好的应用前景。

**关键词** 副溶血弧菌; 哈维氏弧菌; 溶藻弧菌; *Vibrio* sp.; 聚六亚甲基胍; 杀菌效果

**中图分类号** S9 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)03-0112-08

\*“十二五”国家科技支撑计划课题(2012BAD17B03)、山东省自主创新与成果转化专项(2014ZZCX06205)和山东省海洋经济创新发展区域示范项目《山东省海水养殖重要疾病高效专用药物产业化及示范推广》共同资助 [This work was supported by National Key Technology Research and Development Program of the Ministry of Science and Technology of China (2012BAD17B03), Special Program for Independent Innovation and Achievements Transformation of Shandong Province (2014ZZCX06205), and Ocean Economic Innovation and Development Area Demonstration Project of Shandong Province “the Industrialization and Demonstration of High Efficiency and Special Medicine for Mariculture Diseases in Shandong Province”] 刘志轩, E-mail: lzhexuan@vip.qq.com

① 通讯作者: 王印庚, 研究员, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-04-19, 收修改稿日期: 2017-07-10

近年来,在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖中,流行一种新的疾病——统称为急性肝胰腺坏死病(Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease, AHPND),其传播速度快、致病力强、死亡率高。该病以肝胰腺坏死为主要特征,患病对虾体色发红,壳软,肝胰腺变为红褐色、肿大后呈纤维化萎缩,空肠,空胃,3~5 d死亡率可达90%以上(徐含颖等,2015)。该病最初于2010年在我国海南省首次发现,随后迅速传播至全国大部分对虾养殖区,排塘率高达80%,对凡纳滨对虾养殖业造成了巨大损失(徐含颖等,2015)。越南和马来西亚分别在2010年和2011年相继报道了该疾病的发生(Leano, 2012)。

目前,对于AHPND病原尚存在不同的看法(Suebsing *et al.*, 2013; 刘群等, 2014)。Lightner等(2012)首先报道了AHPND的致病原是副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*),之后有学者指出副溶血弧菌分为致病株和非致病株,并非所有菌株具有致病性(Kondo *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014)。随后,又有多篇报道证明AHPND是由副溶血弧菌引起。虽然尚不清楚是否所有的AHPND都是由一个或多个特定的副溶血弧菌株引起,但通过控制弧菌可以大大减少AHPND暴发的风险(Gomez-Gill *et al.*, 2014; De *et al.*, 2014)。我国海岸线漫长,养殖环境复杂,该病的致病原具有病原的多样性,AHPND有多种细菌性致病原,其中,副溶血弧菌检出率最高(黄志坚等,2016)。2013~2016年间,作者先后在山东、天津、河北、浙江、江苏等地进行了凡纳滨对虾AHPND流行病学调查和病原学研究。在多地患病对虾样品中,副溶血弧菌、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)和*Vibrio sp.* Ex25具有较高检出率,分离的4株菌均可引起与AHPND相似的临床症状。因此,副溶血弧菌、哈维氏弧菌、溶藻弧菌、*Vibrio sp.* Ex25都是AHPND的疑似致病菌(另文报道)。

目前,在养殖生产中对虾疾病防控的常规措施有:投放健康、无特定病原的苗种;养殖环境定期消毒;使用微生态制剂调控水质和生态菌群结构;投喂卫生饵料以及口服专用药物等(张水波, 2013; 赵永锋等, 2014)。一般情况下,养殖者对养殖环境进行定期消毒是最常见的防控手段。常用的消毒剂是聚维酮碘(PVPI)和二氧化氯( $\text{ClO}_2$ ) (张继平等, 2004; 吴岗等, 2016),聚维酮碘对病毒、细菌、真菌及霉菌孢子都有较强的杀灭作用,二氧化氯能高效率消灭原生动物、孢子、霉菌、水藻和生物膜,但这两种消毒剂在养殖生产上的应用具有一定的缺点:碘是国家战略物资,使用成本较高,同时它也具有着色和腐蚀作用;二氧化氯对大部分生物有药害作用,同时,容易伤害

单胞藻而形成倒藻。而双氧水( $\text{H}_2\text{O}_2$ )、聚六亚甲基胍(PHMG)作为新兴消毒剂,具有价格适中、高效杀菌、安全、无残留等优点(李志富等, 2009; 张慧等, 2010)。

本研究拟从聚六亚甲基胍、双氧水、聚维酮碘及二氧化氯对4株致性弧菌的杀灭效果分析入手,筛选出适合对虾健康养殖的高效消毒剂,以期为AHPND防控和对虾健康养殖提供技术支撑和理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种来源及菌悬液的制备

实验用的菌种为副溶血弧菌、哈维氏弧菌、溶藻弧菌和*Vibrio sp.* Ex25(编号分别为PV130903A、PV140731A、PV150526A和PV140821A),该4株菌株均从患AHPND凡纳滨对虾肝胰腺组织内分离,且经人工感染实验证实可引起与AHPND相似的临床症状和组织病理特征,证实为AHPND的致病菌(姜燕, 2016)。

将4株细菌于TSB培养基在28℃下培养24 h,在无菌条件下挑到1.5%的灭菌生理盐水中混匀,用麦氏比浊管初测菌悬液的浓度,然后将其稀释到 $10^5$  CFU/ml左右;枪吸取0.1 ml菌悬液加入到0.9 ml灭菌生理盐水中使其稀释10倍,依次稀释100倍、1000倍,取0.1 ml稀释液涂布到TSB培养基上对菌悬液进行准确定量,每种菌悬液设3个平行组,菌悬液的浓度为3组数据的平均值。

### 1.2 消毒剂及培养基的制备

聚六亚甲基胍[( $\text{C}_7\text{H}_{16}\text{N}_3\text{Cl}$ )<sub>n</sub>],淡琥珀色溶液,有效活性成分25%,由上海黛龙生物工程科技有限公司提供。双氧水,过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )有效含量为30%,无色透明液体,由国药集团化学试剂有限公司提供。聚维酮碘( $\text{C}_6\text{H}_9\text{I}_2\text{NO}$ ),棕黄色细滑粉末,为聚乙烯吡咯烷酮和碘的有机复合物,纯度98%,由上海索桥生物有限公司提供。二氧化氯( $\text{ClO}_2$ ),白色颗粒,含有效氯8%,由山东西亚化学股份有限公司提供。TSB和TCBS培养基均由南京美博生物科技有限公司提供。

### 1.3 初试杀菌实验

参考各种消毒剂在水产中实际应用的泼洒浓度,适当扩大和缩小一定倍数后设计消毒实验浓度。将各种实验药物分别用灭菌蒸馏水配制成一定浓度的消毒剂,定量加入到菌悬液中制成含有一定消毒剂浓度的菌悬液,按照实验设计反应一定时间后,分别从各个试管取0.1 ml混合液均匀涂布在TSB培养基上,28℃生化培养箱中培养48 h后,肉眼观察菌落生长

情况以检测灭菌效果,每个浓度梯度设2个平行组,同时,设定1个空白对照组(施慧等,2006)。通过初试杀菌实验,选取各消毒剂合适的杀菌浓度,分别设定如下:0、0.1、0.5、1.0  $\mu\text{L/L}$  的 PHMG; 0、0.1、0.5、1.0  $\mu\text{L/L}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 0、6.0、8.0、10.0  $\mu\text{L/L}$  的 PVPI; 0、0.5、1.0、2.0  $\mu\text{L/L}$  的  $\text{ClO}_2$ 。

#### 1.4 对4种病原菌的杀灭实验

**1.4.1 含消毒剂菌悬液配制** 配制菌悬液,按照初试结果加入消毒剂,配制含有一定消毒剂的菌悬液。

**1.4.2 消毒剂杀灭病原菌效果的检测** 从加入消毒剂开始计时,在10 min、1 h、2 h、3 h、6 h、12 h 和 24 h 分别从每个试管中取 0.1 ml 混合液加入到 0.9 ml 灭菌的生理盐水中,混匀后从中取 0.1 ml 涂布到 TSB 固体培养基上,在 28 $^{\circ}\text{C}$  生化培养箱中培养 24~48 h,观察细菌生长情况,每个浓度梯度设 2 个平行组。

#### 1.5 聚六亚甲基胍对对虾养殖池水的杀菌作用观察

**1.5.1 对虾养殖池水水质指标** 养殖水源为自然海水,经过送水渠引入蓄水池,再经消毒、沉淀后以 60 目筛绢过滤进入养殖池。投苗密度为约 3~3.3 万尾/池,投放消毒剂时,池塘内养殖对虾规格约为 180 尾/kg。养殖期间,水温为 28 $^{\circ}\text{C}$ ~29 $^{\circ}\text{C}$ ,盐度为 29~30, pH 为 7.3~7.8,溶解氧保持在 4.5 mg/L 以上。

#### 1.5.2 聚六亚甲基胍使用剂量与杀灭弧菌效果检测

养殖池 1~3 号、4~6 号、7~9 号全池泼洒 PHMG,终浓度分别为 0.5、1 和 2  $\mu\text{L/L}$ ; 10~12 号池为对照组,不采取消毒措施。投苗后第 55 天开始泼洒 PHMG,1~9 号养殖池实验期间每 15 d 全池泼洒 PHMG 一次。

泼洒 PHMG 进行消毒前,取水样进行弧菌培养计数,统计初始弧菌总量;泼洒 PHMG 后,每日 16:00 取水样进行弧菌培养计数,追踪每日弧菌总量的变化。水样的采集和弧菌计数方法:使用 2 L 有机玻璃采水器,取水样以下 50 cm 的水样,每池塘固定 4 个取样点,然后用灭菌的三角烧瓶各收集水样 200 ml 均匀混合在一起;将采集的水样用 1.5% 的灭菌生理盐水稀释 10 倍、100 倍、1000 倍,每个浓度取 100  $\mu\text{L}$  液涂布于选择性弧菌培养基 TCBS 平板上,每个浓度 2 个平行,28 $^{\circ}\text{C}$  倒置培养 24~48 h,计数,取平均值,计算出每毫升水中的总弧菌数。

## 2 结果

### 2.1 空白对照组菌悬液浓度随时间的变化

从空白对照曲线发现,在 1.5% 的生理盐水中,

最初 10 min 内,4 株病原菌的浓度均有小幅度增长,增幅为 0.18%~0.59%;其中, *Vibrio* sp. Ex25 浓度增长最少,溶藻弧菌浓度增长最高,这可能和细菌的初始浓度不同有关;随着时间的推移,4 株病原菌的浓度有所下降,但下降趋势比较平缓,在 24 h 后仍然保持较高的浓度,细菌浓度降低 4.77%~13.58%;其中,溶藻弧菌浓度下降最小,而 *Vibrio* sp. Ex25 细菌浓度下降最大;4 种细菌浓度下降幅度不大,说明生理盐水对细菌的存活与繁殖影响不大。

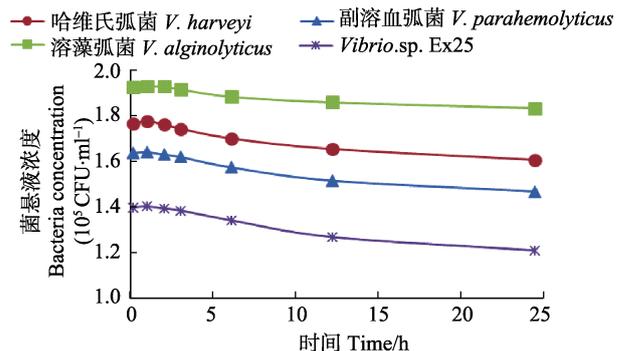


图1 空白对照组菌悬液浓度随时间的变化  
Fig.1 The variation of bacterial concentration in the control

### 2.2 4种消毒剂对4种病原菌的杀灭

在杀菌浓度及杀菌时间的关系上,0.5  $\mu\text{L/L}$  PHMG 作用 3 h、1  $\mu\text{L/L}$  PHMG 作用 10 min 均可完全杀灭副溶血弧菌、哈维氏弧菌、*Vibrio* sp. Ex25 三种细菌;1  $\mu\text{L/L}$  PHMG 作用 2 h 可完全杀灭溶藻弧菌。

0.5  $\mu\text{L/L}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  作用 2 h 可完全杀灭 *Vibrio* sp. Ex25; 1  $\mu\text{L/L}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  作用 10 min 可完全杀灭副溶血弧菌、哈维氏弧菌、*Vibrio* sp. Ex25; 1  $\mu\text{L/L}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  作用 2 h 可完全杀灭溶藻弧菌;

6  $\mu\text{L/L}$  的 PVPI 作用 2 h、8  $\mu\text{L/L}$  的 PVPI 作用 1 h 均可完全杀灭副溶血弧菌和 *Vibrio* sp. Ex25; 8  $\mu\text{L/L}$  的 PVPI 作用 6 h 可完全杀灭哈维氏弧菌和溶藻弧菌; 10  $\mu\text{L/L}$  的 PVPI 作用 10 min 即可完全杀灭 4 种细菌。

2  $\mu\text{L/L}$  的  $\text{ClO}_2$  作用 10 min 可完全杀灭副溶血弧菌、哈维氏弧菌、*Vibrio* sp. Ex25 三种细菌; 2  $\mu\text{L/L}$  的  $\text{ClO}_2$  作用 1 h 可完全杀灭溶藻弧菌。

低浓度实验中,0.1  $\mu\text{L/L}$  PHMG 作用 24 h,对 4 种细菌的杀灭率分别为 10.24%~38.84%、15.43%~41.36%、7.24%~35.95%和 12.36%~44.42%; 0.5  $\mu\text{L/L}$  PHMG 作用 3 h,对副溶血弧菌、哈维氏弧菌、*Vibrio* sp. Ex25 三种细菌的杀灭率分别从 50.95%、67.55%、64.67% 增长到 100%; 0.5  $\mu\text{L/L}$  PHMG 作用 24 h,对溶藻弧菌的杀灭率为 34.14%~75.94%。

0.1  $\mu\text{L/L}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  对副溶血弧菌作用 2 h 达到杀菌





杀菌时间上, 10 min 内 PHMG 和双氧水杀灭副溶血弧菌、哈维氏弧菌、*Vibrio sp. Ex25* 三种细菌的最低浓度均为 1  $\mu\text{L/L}$ , 而二氧化氯杀灭这 3 种细菌的最低浓度为 2  $\mu\text{L/L}$ , 聚维酮碘则需高达 10  $\mu\text{L/L}$  才能完全杀灭 4 种病原菌; 在 1 h 内, 2  $\mu\text{L/L}$  二氧化氯可完全杀灭 4 株病原菌; 在 2 h 内, 1  $\mu\text{L/L}$  聚六亚甲基胍和双氧水可完全杀灭 4 种病原菌; 随着时间的推移, 聚六亚甲基胍和聚维酮碘显示出持续杀菌的能力, 杀菌率随着时间的推移逐渐升高, 双氧水和二氧化氯的杀菌率在达到峰值之后均有不同程度的下降, 浓度越高, 达到峰值杀菌率的时间越短, 这可能与双氧水和二氧化氯自身的消解作用有关。在本研究结果中, PHMG 使用较小浓度可以在短时间内完全杀灭 4 株病原菌, 且在一定时间范围内随着时间的推移对 4 种细菌的杀灭率逐渐增高, 显示出高效且持续杀菌的能力。综上所述, 这 4 种消毒剂杀菌能力强弱的排序为聚六亚甲基胍 > 双氧水 > 二氧化氯 > 聚维酮碘。

在养殖池塘池水的弧菌杀灭实验中, 0.5  $\mu\text{L/L}$  PHMG 可使水体中弧菌总量第 4 天下降到最低值, 下降总量为 79.14%; 1  $\mu\text{L/L}$  PHMG 可使水体中弧菌总量第 3 天下降到最低值, 下降总量为 82.48%; 2  $\mu\text{L/L}$  PHMG 可使水体中弧菌总量第 3 天下降到最低值, 下降总量为 87.30%; 各实验组弧菌总量达到最低值后缓慢回升, 第 11 天时, 3 个实验组弧菌总量仍然低于初始值的 3.58%、5.53% 和 6.10%。结果表明, 使用 PHMG 全池消毒后可在第 3~4 天将养殖池水体内的弧菌总量杀灭到最低值, 有效持续控制养殖水体内的弧菌总量处于较低水平, 显示出长久的持续抑菌和杀菌能力; 根据 PHMG 对 4 株病原菌和池塘养殖水体弧菌的杀灭效果来看, 使用 0.5、1、2  $\mu\text{L/L}$  三种浓度的 PHMG 进行养殖水体消毒, 均可维持弧菌总量处于较低水平上, PHMG 三种浓度下弧菌下降总量分别为 79.14%、82.48% 和 87.30%, 效果相差不大。考虑到成本, 在养殖生产中建议使用 PHMG 浓度为 0.5~1  $\mu\text{L/L}$ , 每 15 d 使用 1 次, 可有效预防 AHPND 的发生。在泼洒 0.5、1.0、2.0  $\mu\text{L/L}$  三种浓度下, PHMG 消毒剂未引发养殖对虾的应激反应, 整个实验期间, 对虾体色正常、活力强、摄食状态良好, 保持健康的生理状态。需要指出的是, 本次实验在水色较浓的养殖水体内进行应用, 获得了高效的杀菌效果, 关于不同养殖水体内有机物总量对 PHMG 的作用以及 PHMG 对单胞藻、水质因子、浮游动物的影响, 今后尚需要进一步精细化研究和追踪分析。

目前, 研究表明, 在水产养殖业中使用二氧化氯作为消毒剂杀灭养殖水体中病原菌的同时, 也能够杀

死大量藻类, 因此, 过量使用二氧化氯易引发养殖水体中藻类大量死亡(贾瑞宝等, 2003; 李绍秀等, 2012); 大量的死亡藻体分解, 不仅会增加氧气的消耗, 还会产生大量的氨氮和亚硝酸盐, 导致对虾缺氧、中毒死亡。

聚维酮碘对多种细菌、芽孢、病毒、真菌等有杀灭作用。其作用机制是释放游离碘, 起到一种缓释作用, 以保持较长时间的杀菌力, 具有较好的杀菌效果。本研究中, 聚维酮碘完全杀灭 4 株病原菌, 需要较高浓度(6~8  $\mu\text{L/L}$ ), 低浓度的聚维酮碘对副溶血弧菌、哈维氏弧菌、溶藻弧菌和 *Vibrio sp. Ex25* 的杀菌效果并不理想。相关研究表明, 聚维酮碘对不同菌株的杀菌效果存在很大差异, 高晓华等(2013)通过聚维酮碘对 30 种病原菌的杀菌力研究, 得出聚维酮碘对副溶血弧菌、哈维氏弧菌、溶藻弧菌的敏感性较差。因此, 聚维酮碘在养殖生产上预防 AHPND 的效果不理想。

双氧水是一种公认的环境友好型水产用药, 在本研究中, 双氧水对 4 株病原菌的杀灭作用在峰值杀菌率之后有所降低, 这可能与双氧水本身的快速消解作用有关(张清等, 2010; 刘志伟等, 2011)。在室外池塘的养殖生产过程中, 养殖环境复杂多变, 底泥、粪便及残饵中含有大量有机物会降低双氧水的杀菌作用。细菌等微生物在底泥的作用下可不断繁殖并扩散到池水中, 因此, 在室外池塘选用一种具有持续杀菌能力的消毒剂显得尤为重要。相比较而言, 室内工厂化养殖水体小、换水快, 残饵和粪便等排除率高, 更适于应用双氧水进行消毒。

PHMG 是一种环保型高分子聚合物, 在工业、农业、医用和日常生活中有广泛的用途, 而且价格低廉, 无污染(黄新宇, 2015), 用于水产类消毒不会产生细菌、病毒的耐药性, 且不会对单胞藻造成伤害, 是一种高效、安全的新型消毒剂(李妮妮等, 2015)。

综上所述, PHMG 杀菌浓度低、杀菌速度快、持续时间长, 对致病性弧菌具有良好杀菌效果。双氧水次之, 具有较好的杀菌速度和低浓度杀菌效果, 但杀菌的持续时间不长。比较而言, 前二者优于二氧化氯和聚维酮碘。上述结果对正确选择和使用消毒剂, 有效开展 AHPND 防控, 实施对虾健康养殖具有重要的现实意义和指导作用。

## 参 考 文 献

- De SP, Defoirdt T, Sorgeloos P. Early mortality syndrome outbreaks: A microbial management issue in shrimp farming. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(4): e1003919
- Gao XH. Safety evaluation, and bactericidal effect of fishery

- povidonum-iodum. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2013 [高晓华. 水产用聚维酮碘的安全性评价及其杀菌效果研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2013]
- Gomez-Gil B, Soto-Rodríguez S, Lozano R, *et al.* Draft genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* strain M0605, which causes severe mortalities of shrimps in Mexico. *Genome Announcements*, 2014, 2(2): e00055–14
- Huang XY. Research progress of properties and application of polyhexamethylene guanidine disinfectant. *Chinese Journal of Public Health Engineering*, 2005, 4(5): 324–325 [黄新宇. 盐酸聚六亚甲基胍消毒剂研究进展. 中国卫生工程学, 2005, 4(5): 324–325]
- Huang ZJ, Chen YG, Weng SP, *et al.* Multiple bacteria species were involved in hepatopancreas necrosis syndrome (HPNS) of *Litopenaeus vannamei*. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2016, 55(1): 1–11 [黄志坚, 陈勇贵, 翁少萍, 等. 多种细菌与凡纳滨对虾肝胰腺坏死症 (HPNS) 爆发有关. 中山大学学报, 2016, 55(1): 1–11]
- Jia RB, Li L, Li SJ, *et al.* Study on water treatment of algae-rich reservoir by chlorine dioxide. *China Water & Wastewater*, 2003, 19(S1): 93–95 [贾瑞宝, 李力, 李世俊, 等. 二氧化氯强化处理含藻水库水研究. 中国给水排水, 2003, 19(S1): 93–95]
- Jiang Y. In vitro bacteriostatis Chinese herb compound selection for acute hepatopancreas necrosis syndrome in *Litopenaeus vannamei*. Master's Thesis of Dalian Ocean University [姜燕. 凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死病防治中草药的筛选. 大连海洋大学硕士研究生学位论文, 2016]
- Kondo H, Tinwongger S, Proespraiwong P, *et al.* Draft genome sequences of six stains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease in Thailand. *Genome Announcements*, 2014, 2(2): e214–e221
- Leano EM. Early mortality syndrome threatens Asia's shrimp farms. *Global Aquaculture Advocate*, 2012, July/August: 38–39
- Li NN, Yu W. Research progress of properties and application of polyhexamethylene guanidine disinfectant. *Detergent & Cosmetics*, 2015, 38(9): 36–39 [李妮妮, 于文. 聚六亚甲基胍类消毒剂性能及应用研究进展. 日用化学品科学, 2015, 38(9): 36–39]
- Li SX, Xia WQ, Zhao DJ, *et al.* Killing chlorella with chlorine dioxide. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2012, 6(10): 3657–3661 [李绍秀, 夏文琴, 赵德骏, 等. 二氧化氯杀灭小球藻. 环境工程学报, 2012, 6(10): 3657–3661]
- Li ZF, Shao W, Ding J. Experimental study on germicidal efficacy and toxicity of polyhexamethylene biguanidine disinfection solution. *Chinese Journal of Disinfection*, 2009, 26(4): 382–384 [李志富, 邵伟, 丁静. 聚六亚甲基胍消毒液杀菌效果及毒性试验观察. 中国消毒学杂志, 2009, 26(4): 382–384]
- Lightner DV, Redman RM, Pantoja CR, *et al.* Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. *Global Aquaculture Advocate*, 2012, 15(1): 40
- Liu Q, Huang J, Yang HL, *et al.* Detection of a new genotype of yellow-head virus in farmed shrimp suspicious of EMS/AHPNS infection. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(4): 703–709 [刘群, 黄捷, 杨昊霖, 等. 疑患 EMS/AHPNS 对虾中检出黄头病毒的一种新株型. 海洋与湖沼, 2014, 45(4): 703–709]
- Liu ZW, Wang YG, Chen X, *et al.* The rate of decompose of hydrogen peroxide and formaldehyde in seawater and the influence on water quality factors. *Fishery Modernization*, 2011, 38(3): 18–22 [刘志伟, 王印庚, 陈霞, 等. 双氧水和甲醛在海水中的消解速率及其对水质因子的影响. 渔业现代化, 2011, 38(3): 18–22]
- Shi H, Xu WJ, Liu Q, *et al.* Comparison of the bactericidal effects of several commonly used disinfectants. *Chinese Journal of Animal Quarantine*, 2006, 23(5): 29–30 [施慧, 许文军, 刘琴, 等. 几种常用消毒剂的杀菌效果比较. 中国动物检疫, 2006, 23(5): 29–30]
- Suebsing R, Prombun P, Srisala J, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification combined with colorimetric nanogold for detection of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* in Penaeid shrimp. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, 114(5): 1254–1263
- Wu G, Zhou QL, Guo XL, *et al.* The prevention of povidone iodine to *Litopenaeus vannamei* AHNS. *Journal of Aquaculture*, 2016, 37(10): 23–28 [吴岗, 周启良, 郭秀玲, 等. 聚维酮碘对凡纳滨对虾偷死综合征的防治研究. 水产养殖, 2016, 37(10): 23–28]
- Xu HY, Zhang WR, Zhang XS, *et al.* Research advances in early mortality syndrome of shrimp. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2015, 43(6): 166–167, 170 [徐含颖, 张婉蓉, 张学舒, 等. 对虾早期死亡综合征的研究进展. 安徽农业科学, 2015, 43(6): 166–167, 170]
- Yang YT, Chen IT, Lee CT, *et al.* Draft genome sequences of four strains of *V. parahaemolyticus*, three of which cause early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp in China and Thailand. *Genome Announcements*, 2014, 2(5): e00816–e008114
- Yao G, Qin YX, Zou WZ, *et al.* Characteristics of *Vibrio alginolyticus* biofilm formation. *Fisheries Science*, 2012, 31(2): 73–78 [姚刚, 覃映雪, 邹文政, 等. 致病性溶藻弧菌生物膜形成特性研究. 水产科学, 2012, 31(2): 73–78]
- Zhang H, Gu W, Bai QL, *et al.* Efficacy of hydrogen peroxide disinfection on fungus diseases prevention during eggs incubation of whitespot char, *Salvelinus leucomaenis*. *Chinese Journal of Fisheries*, 2010, 23(3): 3–6 [张慧, 谷伟, 白庆利, 等. 双氧水预防白点鲑卵水霉病发生的效果研究. 水产学杂志, 2010, 23(3): 3–6]
- Zhang JP, Guo ZL, Yang QL. Application of stable chlorine dioxide in control diseases for *Penaeus vannamei*. *Heilongjiang Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2004(8): 64–65 [张继平, 郭照良, 杨权立. 稳定

性二氧化氯在南美白对虾疾病防治中的应用. 黑龙江畜牧兽医, 2004(8): 64–65]

- Zhang Q, Ying CY, Yu KN, *et al.* Study on decomposition rate and stability of hydrogen peroxide. Journal of Jiaying University, 2010, 22(3): 51–53 [张清, 应超燕, 余可娜, 等. 双氧水分解速率和稳定性研究. 嘉兴学院学报, 2010, 22(3): 51–53]
- Zhang SB. Prevention and control of EMS in *Litopenaeus*

*vannamei* in ponds. Scientific Fish Farming, 2013, 29(7): 63 [张水波. 土池养殖南美白对虾白浊偷死病的防控要点. 科学养鱼, 2013, 29(7): 63]

- Zhao YF, Song QH. Techniques on prevention and control of acute hepatopancreatic necrosis disease in *Litopenaeus vannamei*. Scientific Fish Farming, 2014, 30(7): 13–17, 29 [赵永锋, 宋迁红. 南美白对虾养殖概况及病害防控措施. 科学养鱼, 2014, 30(7): 13–17, 29]

(编辑 冯小花)

## Germicidal Effect of Several Disinfectants on the Pathogenic Bacteria of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in *Litopenaeus vannamei*

LIU Zhixuan<sup>1,2</sup>, WANG Yingeng<sup>1,2①</sup>, ZHANG Zheng<sup>2</sup>, WANG Kai<sup>2</sup>, CAI Shengli<sup>1</sup>,  
BAO Haiyan<sup>3</sup>, YAO Xueliang<sup>3</sup>, ZHANG Zhen<sup>4</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

2. Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes; Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

3. Tianjin Fisheries Technology Extension Station, Tianjin 300321;

4. Qingdao Grand Marine Biological Technology Co. Ltd, Qingdao 266035)

**Abstract** Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) has pathogenic diversity causing high mortality and economic losses in shrimp culture. We isolated PV130903A (*Vibrio parahaemolyticus*), PV140731A (*V. harveyi*), PV150526A (*V. alginolyticus*), and PV140821A (*V. sp.* Ex25) from the infected *Litopenaeus vannamei*, and designed a germicidal experiment on the isolated pathogens. Polyhexamethylene guanidine (PHMG), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), povidone-iodine (PVPI), and chlorine dioxide (ClO<sub>2</sub>) were chosen to determine their concentration, killing rate, and killing time on the four pathogenic bacteria. Furthermore, an experiment was also conducted to determine the killing efficiency of PHMG on the Vibrios in the pond water. The results showed that 2 μL/L ClO<sub>2</sub> killed all the bacteria in 1 h; 1 μL/L PHMG and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> killed all the bacteria in 2 h; and 6 μL/L PVPI killed all the four bacteria in 6 h. It is noteworthy that the killing rate of PHMG and PVPI gradually increased with time. In contrast, the killing rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ClO<sub>2</sub> decreased after attaining the peak value. In the experiment carried out on the Vibrios in the pond water, 0.5 μL/L, 1 μL/L, and 2 μL/L PHMG decreased the total amount of Vibrios in the water to the minimal value of 79.14% on day 4, 82.48% on day 3, and 87.30% on day 3, respectively. Furthermore, the total amount of Vibrios in all the three concentration groups recovered slowly after reaching the minimal value. On day 11, the total amount of Vibrios in the three groups was still lower than the initial value of 3.58%, 5.53%, and 6.10%, respectively. The bactericidal ability of these four disinfectants was in the order: PHMG > H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> > ClO<sub>2</sub> > PVPI. Based on the bactericide concentration, germicidal efficacy, duration, and cost, it was proved that PHMG has been efficiently used in aquaculture and it has a good application prospect in the future.

**Key words** *Vibrio parahaemolyticus*; *Vibrio harveyi*; *Vibrio alginolyticus*; *Vibrio sp.*; Polyhexamethylene guanidine; Germicidal effect

① Corresponding author: WANG Yingeng, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn