

一株凡纳滨对虾病原菌的分离、鉴定及其致病力分析

张宝存^{1,2} 刘 飞^{1,2} 边慧慧³ 刘 杰³ 潘鲁青¹ 黄 健^{2*}

(¹ 中国海洋大学, 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 上海海洋大学, 201306)

摘 要 从患病凡纳滨对虾肝胰腺中分离出菌株 20100612001, 经人工感染实验证实, 该分离菌株对凡纳滨对虾的半数致死量为 1.44×10^6 CFU/ml。形态学观察和革兰氏染色表明, 该菌株为革兰氏阴性, 无芽孢, 有一根端极鞭毛; 呈球杆状、球状、棒状或梨状且有两极浓染现象; 在 2216E 培养基上为透明或半透明的圆形菌落, 而在 TCBS 选择性培养基上为绿色或蓝绿色菌落。经 Biolog 碳源利用反应、脂肪酸气相色谱分析得出, 该菌株与副溶血弧菌、需钠弧菌等的生理生化特性最相似; 16S rDNA 序列测定表明, 该菌株与弧菌属中几株病原菌的同源性均达到 98.9% 以上。在分子进化树中该菌株与副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolyticus* 的进化地位最接近。综合上述实验结果分析得出, 该细菌分离物为副溶血弧菌。

关键词 凡纳滨对虾 16S rDNA 副溶血弧菌 脂肪酸 碳源利用

中图分类号 S945.1⁺9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2012)02-0056-07

Isolation, identification, and pathogenicity analysis of a *Vibrio parahaemolyticus* strain from *Litopenaeus vannamei*

ZHANG Bao-cun^{1,2} LIU Fei^{1,2} BIAN Hui-hui³ LIU Jie³ PAN Lu-qing¹ HUANG Jie^{2*}

(¹ 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 Shanghai Ocean University, 201306)

ABSTRACT A pathogenic bacterium strain 20100612001 was isolated from the hepatopancreas tissue of diseased white shrimp *Litopenaeus vannamei*. The LD₅₀ challenge assay was performed and the LD₅₀ value was found to be 1.44×10^6 CFU/ml. The cell morphotype was observed to be bacilli, coccoid rod or pear-like and some cells could be observed intensely stained at two poles. The strain was Gram-negative, sporeless and had a single polar flagellum. It formed transparent or translucent round colonies on 2216E solid medium but green or blue-green colonies on TCBS medium. It showed the highest identity to *V. parahaemolyticus* or *Vibrio natriegenis* by using fatty acid analysis and Biolog system. Based on 16S rRNA sequencing, the

国家虾现代产业技术体系(MCAR-47)和公益性行业科研专项经费项目(201103034)共同资助

* 通讯作者。E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2011-03-26; 接受日期: 2011-12-08

作者简介: 张宝存(1985-), 男, 硕士研究生, 主要从事水产动物病原分子学研究。E-mail: virusouc@hotmail.com

strain is $>98.9\%$ identical to several species in *Vibrio* genus, and the phylogenetic tree revealed that it is most close to *Vibrio parahaemolyticus*. Taken together, the pathogenic strain 2010060612001 is identified as *V. parahaemolyticus*.

KEY WORDS *Litopenaeus vannamei* 16S rDNA *Vibrio parahaemolyticus*
Fatty Acids Carbon sources utilization

弧菌 *Vibrio* spp. 广泛存在于世界各地近海岸的海水、海底沉积物及海生动物中,在河口入海处和盐碱地区也可以分离到(房海等 2010;Thompson *et al.* 2004)。副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolyticus* 系弧菌科、弧菌属,属兼性厌氧菌,该菌可引起人和多种水产养殖动物(鱼、虾、蟹、贝等)的疾病(乔华林等 1999),可导致对虾、龙虾、河蟹和锯缘青蟹等感染发病。对虾感染副溶血弧菌后可表现为红腿病(苏永全等 1994;宋春华等 1998)、肌肉白浊病(纪荣兴等 2008)、红体病(刘荭等 1999)、黄鳃病(战文斌 2004)等,并且可引起对虾幼体的菌血症(房海等 2010)。当病原体入侵虾体时,机体的生理生化指标会发生一系列的变化,导致免疫机能的损坏,防病、抗病能力下降,进一步导致虾体患病,甚至死亡(李光友 1995;翟秀梅等 2007),同时该菌是对虾苗期常见的致病细菌之一(周丽等 1998;Vandenbergh *et al.* 1999)。

2010年广西北海出现养殖对虾大规模发病情况,对当地对虾养殖产业造成了巨大影响。本研究从患病凡纳滨对虾肝胰腺中分离出一菌株,在革兰氏染色及常规形态学观察的基础上,分别利用 Biolog 气相色谱进行碳源和脂肪酸分析鉴定,并结合 16S rDNA 序列进行最终的菌株鉴定。本实验系统地得到了副溶血弧菌在碳源需求和脂肪酸组成方面的生理生化指标,同时也比较出所分离细菌与弧菌的同源性及其在弧菌属中的进化地位。为今后弧菌病的研究和防治提供了参考数据。

1 材料与方法

1.1 对虾

患病凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* 于 2010 年 6 月采自广西北海高密度养殖池。病虾临床症状自苗期开始,直到养殖期的幼虾中均有出现,表现为个体大小不一,肝胰腺萎缩发黄,死亡率达到 90%。

健康凡纳滨对虾购自山东省青岛胶州市宝荣水产有限公司,采用室内水箱养殖,对虾平均规格为 2.5 ± 0.5 g,水温 $27.5 \sim 28.0$ °C,按正常时间投饵、换水,24 h 供氧。

1.2 菌株的分离和纯化

从患病养殖期的凡纳滨对虾萎缩肝胰腺中取样,进行 2216E 琼脂平板划线分离,28 °C 培养 24 h,挑取优势单一菌落在 2216E 培养基中划线分离数次,最终选择在培养基中占有明显优势的 20100612001 菌株作为实验对象。

1.3 革兰氏染色及形态学观察

参照《常见细菌系统鉴定手册》(Holt *et al.* 1994),对纯培养的细菌作革兰氏染色,进行细菌形态观察。

1.4 菌株 20100612001 碳源利用分析

实验在本实验室完成,操作依照 GN₂ 鉴定板(Biolog,美国)使用流程进行,在含 95 个碳源的 Biolog 革兰氏阴性菌鉴定微孔板中,每孔加入 150 μ l 待测菌悬浮液。在 30 °C 下培养 24 h 后由细菌糖代谢测定鉴定仪(GEN III MicroStation)测得反应结果,并将数据输入细菌糖代谢鉴定软件(Biolog 公司)进行菌种鉴定。

1.5 菌株 20100612001 脂肪酸分析

按 6850 气相色谱仪(Agilent 公司)操作程序进行样品处理,将菌株接种于 TSBA50 固体培养基(北京陆侨技术有限公司)上,28 °C 培养约 24 h。刮取约 40 mg 的菌落悬浮于 1.0 ± 0.1 ml 皂化液 I 中,沸水浴 5 min,振

荡 5~10 s,再沸水浴 25 min 进行皂化。样品管冷却后,加入 2.0 ± 0.1 ml 甲基化液 II,振荡液体 5~10 s, 80 ± 1 °C 水浴 10 min,快速冷却至室温完成甲基化。在冷却的样品管中加入 1.25 ml 萃取液 III,快速振荡 10 min 左右,弃去下层水相。在剩余有机相中加入 3 ml 洗涤液 IV 及几滴洗涤液 V,快速振荡 5 min 左右,取 2/3 上层有机相置气相色谱样品瓶中。集中安装在 6850 气相色谱仪自动进样器上进行脂肪酸含量分析,其数据直接输入微生物脂肪酸分析鉴定系统进行菌种鉴定。

1.6 菌株 20100612001 基因组 DNA 制备及 16S rDNA 扩增

从 2216E 培养基中挑取菌落半环,悬于 $50 \mu\text{l}$ ddH₂O 中,用力振荡,将获得的菌悬液 100 °C 煮 10 min, 10 000 r/min 离心 5 min,取上清作为 PCR 扩增模板。用细菌 16S rDNA 通用引物,正向引物 27F:5'-AGA GTT TGA TC (C/A) TGG CTC AG-3',反向引物 1492R:5'-TAC GG(C/T) TAC CTT GTT ACG ACT T-3'(上海生工生物工程有限公司合成)。采用 ExTaq 聚合酶(TaKaRa 公司)进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为:94 °C 预变性 3 min,94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,30 个循环后于 72 °C 延伸 5 min,再 1% 琼脂糖凝胶电泳。

1.7 序列分析与数据处理

PCR 扩增所得的产物送华大基因公司进行序列测定,将测得的 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库中获得的弧菌属细菌的 16S rDNA 采用 Clustal V 方法进行序列同源性比对,利用软件 MEGA 4.0 构建系统进化树。

1.8 人工感染实验

通过稀释涂布平板法参照《常见细菌系统鉴定手册》方法测定菌液浓度。参照郑国兴等(1990)的方法,在 16 个 54 cm×40 cm×30 cm 的水族箱中各暂养大小相同的健康凡纳滨对虾 25 尾,连续充气,暂养 7d 后进行人工感染实验。实验共有 5 个实验组和 1 个对照组,实验组的细菌浓度分别为 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 CFU/ml,对照组为 1×PBS,采用腹部肌肉注射,注射剂量为 $25 \mu\text{l}$ /尾。饲养水温 27.5~28 °C,盐度 30,每天正常投饵,24 h 通气,连续观察 7 d,随时记录对虾的死亡情况。

1.9 药物敏感实验

将浓度为 1×10^7 CFU/ml 的菌液涂布于 2216E 平板,按抗菌药物敏感测试纸片(杭州天和微生物试剂有限公司)所提供的方法测试菌株对 23 种抗菌药物的敏感性。

2 结果

2.1 菌株 20100612001 的鉴定

2.1.1 菌体形态特征

所分离的菌株在 2216E 平板上,经 28 °C 培养 18 h 左右,即可形成典型菌落。菌落边缘不整齐,隆起,光滑,湿润,不透明,单个菌落呈圆形,直径在 2 mm 左右。在 TCBS 选择性培养基上形成 2 mm 左右的绿色或蓝绿色菌落。

将分离的病原菌进行革兰氏染色镜检,为革兰氏阴性,无芽孢,有 1 根端极鞭毛;呈球杆状、球状、棒状或梨状且有两极浓染现象(图 1)。

2.1.2 菌株 20100612001 的 Biolog 碳源利用鉴定

Biolog 碳源利用鉴定系统测定其生长情况(表 1)。根据与 Biolog 菌种库中副溶血弧菌标准菌株相比较,6 h 相似度为 0.941,18h 相似度为 0.811,可能性均为 100%。结果表明,该菌株为副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolyticus*。

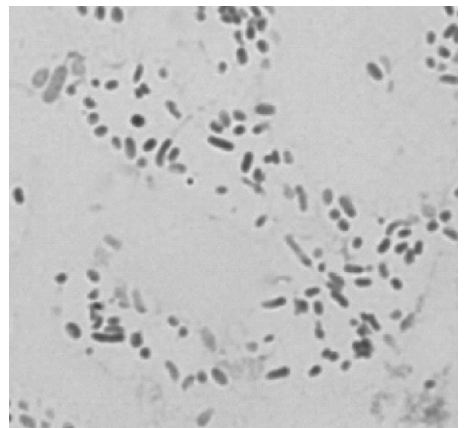


图 1 发病对虾细菌分离物的革兰氏染色
Fig.1 Gram staining of the bacterium from *L. vannamei*

表 1 凡纳滨对虾细菌分离物 20100612001 的 Biolog 碳源利用反应结果

Table 1 Biolog reaction of carbon source utilization of the bacterium 20100612001 from *L. vannamei*

鉴定项目 Items	6h	18h	鉴定项目 Items	6h	18h	鉴定项目 Items	6h	18h
水 Water	-	-	环糊精 α -Cyclodextrin	+	+	糊精 Dextrin	+	+
赤藻糖醇 Erythritol	-	-	D-果糖 D-Fructose	+	+	L-果糖 L-Fucose	-	-
D-蜜二糖 D-Melibiose	-	-	β -甲基-D-葡萄糖苷 β -Methyl-D-Glucoside	+	+	D-阿洛酮糖 D-Psicose	+	+
乙酸 Acetic acid	-	b	顺-乌头酸丙烯三羧酸 cis-Aconitic acid	-	b	柠檬酸 Citric acid	-	-
p-羟基苯乙酸 p-Hydroxy phenylacetic acid	-	-	衣康酸 Itaconic acid	-	-	α -酮丁酸 α -Keto butyric acid	-	-
溴丁二酸 Bromo succinic acid	-	+	琥珀酰胺酸 Succinamic acid	-	-	葡糖醛酰胺 Glucuronamide	-	b
L-组氨酸 L-Histidine	-	-	羟基-L-脯氨酸 Hydroxy-L-proline	-	+	L-亮氨酸 L-Leucine	-	-
尿刊酸 Urocanic acid	b	b	肌苷 Inosine	+	+	尿苷 Uridine	+	+
淀粉 Glycogen	+	+	吐温 40 Tween 40	+	+	吐温 80 Tween 80	+	+
D-半乳糖 D-Galactose	-	+	龙胆二糖 Gentiobiose	-	-	α -D-葡萄糖 α -D-Glucose	+	+
D-棉子糖 D-Raffinose	-	-	L-棉子糖 L-Rhamnose	-	-	D-山梨醇 D-Sorbitol	-	-
甲酸 Formic acid	-	-	D-乳糖酸内酯 D-Galactonic acid lactone	-	-	D-半乳糖醛酸 D-Galacturonic acid	-	-
α -酮戊二酸 α -Keto glutaric acid	-	-	α -酮戊酸 α -Keto valeric acid	-	-	D,L-乳酸 D,L-Lactic acid	+	+
L-丙氨酸胺 L-Alaninamide	-	-	D-丙氨酸 D-Alanine	-	+	L-丙氨酸 L-Alanine	-	+
L-鸟氨酸 L-Ornithine	-	-	L-苯丙氨酸 L-Phenylalanine	-	-	L-脯氨酸 L-Proline	b	+
胸腺嘧啶核苷 Thymidine	+	+	苯乙胺 Phenethylamine	-	-	丁二胺 Putrescine	-	-
N-乙酰基-D-半乳糖胺 N-Acetyl-D-Galactosamine	-	-	N-乙酰基-D-葡萄糖胺 N-Acetyl-D-Glucosamine	+	+	侧金盏花醇 Adonitol	-	-
m-肌醇 m-Inositol	-	-	α -D-乳糖 α -D-Lactose	-	-	乳果糖 Lactulose	-	-
蔗糖 Sucrose	-	-	D-海藻糖 D-Trehalose	+	+	松二糖 Turanose	-	-
D-葡萄糖酸 D-Gluconic acid	+	+	D-葡萄糖胺酸 D-Glucosaminic acid	-	-	D-葡萄糖酸 D-Glucuronic acid	-	+
丙二酸 Malonic acid	-	-	丙酸 Propionic acid	-	+	奎尼酸 Quinic acid	-	-
L-丙氨酰甘氨酸 L-Alanyl-glycine	-	-	L-天冬酰胺酸 L-Asparagine	+	+	L-天门冬氨酸 L-Aspartic acid	+	+
L-焦谷氨酸 L-Pyroglutamic acid	-	-	D-丝氨酸 D-Serine	-	-	L-丝氨酸 L-Serine	b	+
2-氨基乙醇 2-Aminoethanol	-	-	2,3-丁二醇 2,3-Butanediol	-	-	丙三醇 Glycerol	-	+
L-阿拉伯糖 L-Arabinose	b	+	D-阿拉伯糖 D-Arabitol	-	-	D-纤维二糖 D-Cellobiose	-	-
麦芽糖 Maltose	+	+	D-甘露醇 D-Mannitol	+	+	D-甘露糖 D-Mannose	+	+
木糖醇 Xylitol	-	+	甲基丙酮酸 Methyl pyruvate	b	+	单甲基琥珀酸 Mono-methyl-succinate	-	b
α -羟基丁酸 α -Hydroxy butyric acid	-	-	β -羟基丁酸 β -Hydroxy butyric acid	-	-	γ -羟基丁酸 γ -Hydroxy butyric acid	-	-
D-葡糖二酸 D-Saccharic acid	-	-	癸二酸 Sebacic acid	-	-	琥珀酸 Succinic acid	b	+
L-谷氨酸 L-Glutamic acid	-	+	甘氨酸-L-天门冬氨酸 Glycyl-L-aspartic acid	-	-	甘氨酸-L-谷氨酸 Glycyl-L-glutamic acid	b	+
L-苏氨酸 L-Threonine	b	+	D,L-肉碱 D,L-Carnitine	-	-	γ -氨基丁酸 γ -Amino butyric acid	-	-
D,L- α -磷酸甘油 D,L- α -Glycerol phosphate	-	+	1-磷酸葡萄糖 Glucose-1-phosphate	-	+	6-磷酸葡萄糖 Glucose-6-phosphate	+	+

注：“+”表示特征性碳源，“-”表示非特征性碳源，b表示介于“+”和“-”二者之间

2.1.3 菌株 20100612001 的脂肪酸组分分析

细菌分离物的脂肪酸经气相色谱分析,确定了其脂肪酸组分(表 2),通过微生物脂肪酸鉴定系统鉴定,匹配程度参照 Buyer 等(2002)的原则,该分离菌与需钠弧菌 *V. natriegens* 的 FAME 相似系数为 0.981。

表 2 凡纳滨对虾细菌分离物 20100612001 的脂肪酸含量分析
Table 2 The analysis of fatty acid of the bacterium 20100612001 from *L. vannamei*

脂肪酸 Fatty acid	含量 Percentage	脂肪酸 Fatty acid	含量 Percentage
12 : 0 Aldehyde	0.09	18 : 1 ω 7c	13.15
14 : 0 3OH/16 : 1 iso I	3.65	16 : 1 ω 6c/16 : 1 ω 7c	38.22
16 : 1 ω 7c/16 : 1 ω 6c	38.22	18 : 0 ante/18 : 2 ω 6,9c	0.27
18 : 0 ante/18 : 2 ω 6,9c	0.27	18 : 1 ω 6c	13.15

2.1.4 菌株 20100612001 的 16S rDNA 序列分析与系统发育关系

所获菌株的基因组 DNA 用 16S rDNA 通用引物扩增,获得 1 426bp 的产物(图 3)。该产物经序列分析,并与弧菌属 10 种弧菌比较。结果说明与副溶血弧菌、溶藻弧菌 *V. alginolyticus*、需钠弧菌、哈氏弧菌 *V. harveyi* 等的同源性均在 98.9% 以上。利用 MEGA 4.0 绘制系统发生树(图 4),表明该细菌分离物与弧菌属中的副溶血弧菌进化地位最接近。

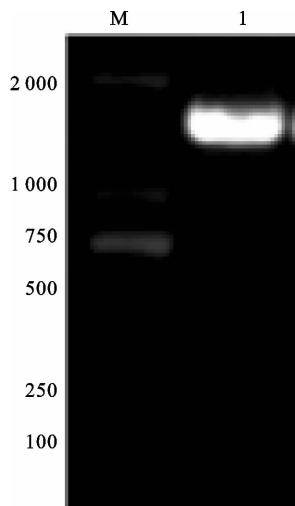


图 2 凡纳滨对虾细菌分离物 20100612001 的 16S rDNA 扩增片段电泳检测
Fig. 2 The amplification of 16S rDNA of the bacterium 20100612001 from *L. vannamei*

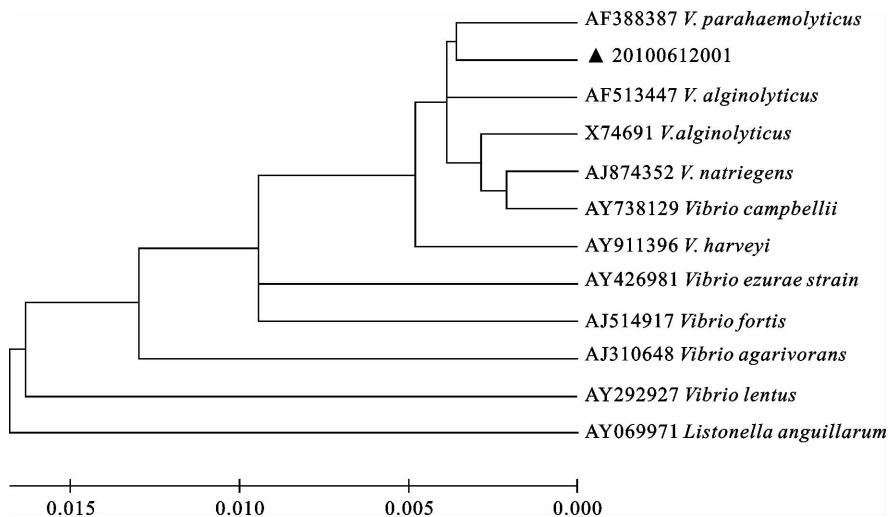


图 3 凡纳滨对虾细菌 20100612001 分离物的系统进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree of 10 *Vibrio* spp. and the bacterium from *L. vannamei*

2.2 人工感染实验

通过人工感染,证实上述细菌分离物对凡纳滨对虾有明显的致病性,实验组注射 1×10^7 CFU/ml 菌液的健康对虾于攻毒后 1 d 开始死亡,死亡率达到 84%,对照组无死亡(表 3)。从发病虾的肝胰腺再次分离到与实验菌株形态、理化性质完全一致的菌株,表明该分离菌株是凡纳滨对虾的致病菌。按照 Reed 等(1938)的方法计算得出 LD_{50} 为 1.44×10^6 CFU/ml。

2.3 药物敏感实验

药敏试验结果显示(表 4),该细菌分离物仅对氟苯尼考 1 种药物敏感,对头孢唑林、头孢三嗪、链霉素和诺氟沙星等抗生素中度敏感,对头孢氨苄、头孢拉定、头孢他啶、丁胺卡那、庆大霉素、新霉素、红霉素等抗生素具有耐药性。

表 3 凡纳滨对虾细菌分离物 20100612001 的对健康凡纳滨对虾的人工感染试验

Table 3 Artificial infection of healthy *L. vannamei* with the bacterium 20100612001 from *L. vannamei*

组别 Group	接种浓度 (CFU/ml)	剂量 (μl)	试验尾数 Total amount	死亡尾数 Amount of death							死亡率(%)
				1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	
实验组	1×10 ⁷	25	50	43	1	1	0	2	0	0	94
Experimental group	1×10 ⁶	25	50	5	0	0	0	1	2	1	18
	1×10 ⁵	25	50	3	0	1	1	1	1	0	8
对照组	1×10 ⁴	25	50	1	0	3	1	1	2	0	16
Control group	1×10 ³	25	50	0	1	0	2	2	1	0	12
	PBS	25	50	0	0	0	0	0	1	0	2

表 4 凡纳滨对虾细菌分离物 20100612001 的药敏试验

Table 4 Drug sensitivity test of the bacterium 20100612001 from *L. vannamei*

抗生素 Antibiotics	含量 Amount (μg/disc)	抑菌圈直径 (mm)	敏感性 Sensitivity	抗生素 Antibiotics	含量 Amount (μg/disc)	抑菌圈直径 (mm)	敏感性 Sensitivity
头孢氨苄 Cefalexin	30	-	R	洛美沙星 Lomefloxacin	18	-	R
头孢唑林 Cefazolin	30	11	I	诺氟沙星 Norfloxacin	10	15	I
头孢拉定 Cefradine	30	-	R	氧氟沙星 Ofloxacin	5	11	R
头孢他啶 Ceftazidime	30	13	R	灭滴灵 Metronidazole	5	11	R
头孢三嗪 Ceftriaxone	—	17	I	吡哌酸 PPA	30	9	R
丁胺卡那 AMK	30	13	R	利福平 RFP	5	16	R
庆大霉素 Meropenem	10	10	R	新生霉素 Novobiocin	30	13	I
新霉素 Neomycin	30	12	R	卡那霉素 Kanamycin	30	15	I
链霉素 Spiramycin	10	12	I	二甲胺四环素 Minocin	30	-	R
红霉素 Erythrocin	15	12	R	多西环素 Doxycycline	30	-	R
克拉霉素 Clarithromycin	15	11	R	氟苯尼考 Florfenicol	30	24	S
阿奇霉素 Azithromycin	15	8	R	复方新诺明 SMZCO	3.75/1.25	16	R
萘啶酸 Nalidixic acid	30	18	R				

注:R 表示耐药,S 表示不耐药,I 表示介于耐药和不耐药之间

3 讨论

副溶血弧菌是水产动物养殖中常见的致病菌,也是研究较多和较深入的弧菌(许斌福等 2002;李天道等 1998)。本实验所取发病对虾临床症状表现为肝胰腺萎缩、发黄,并伴有体长大小不一的情况。该临床症状在仔虾和幼虾中均有出现。刘 荃等(1999)曾报道斑节对虾“红体病”,主要由副溶血弧菌和嗜水气单胞菌的混合感染所致。本研究在攻毒后试验对虾也出现了肝胰腺轻微萎缩症状,但由于感染后养殖时间太短,未呈现生长大小不一的情况。

对所分离的菌株进行一系列 Biolog 碳源代谢测定和 16S rDNA 序列测定,二者鉴定一致,鉴定该菌为副

溶血弧菌。由于多年来微生物基因数据资源高度丰富,目前16S rDNA鉴定已成为国际上认可度较高的微生物鉴定依据。在进行脂肪酸含量分析后,可能因脂肪酸鉴定系统所给出微生物脂肪酸鉴定的弧菌数据库不够完善,得出的鉴定结果与Biolog碳源代谢测定和16S rDNA序列测定的鉴定结果有差异。但从16S rDNA序列的系统发育树可以看到,需钠弧菌与副溶血弧菌16S rDNA序列近似度达98.5%,是最相似的几种弧菌之一。同时因菌株20100612001的其他鉴定结果均与副溶血弧菌一致,因此这种误差是可以理解的。

本研究感染实验中向健康对虾肌肉注射 2.5×10^5 CFU/ml的副溶血弧菌时,对虾呈现急性死亡,但注射量从 2.5×10^4 CFU/ml下降到 2.5×10^2 CFU/ml的范围时,对虾的死亡水平没有显著差异。本实验通过Reed等(1938)的方法计算得到这次分离的副溶血弧菌对凡纳滨对虾的半致死量 LD_{50} 为 1.44×10^6 CFU/ml。该结果与许斌福等(2002)分离的副溶血弧菌对大黄鱼的 LD_{50} 为 1.0×10^7 CFU/ml,李天道等(1998)测定副溶血弧菌对中国对虾24h的 LD_{50} 为 6.5×10^7 CFU/ml,48h的 LD_{50} 为 8×10^6 CFU/ml等结果相近,表明本研究所分离的副溶血弧菌对凡纳滨对虾也具有很强的致病力。

刘荃等(1999)报道副溶血弧菌对氟哌酸、红霉素、青霉素和强力霉素敏感,纪荣兴等(1998)报道副溶血弧菌对四环素、多粘菌素B、链霉素、庆大霉素、氟哌酸等药物敏感。本研究药敏试验表明分离到的副溶血弧菌对大部分抗菌药都有不同程度的耐药性,仅对氟苯尼考敏感。抗生素的过度使用已使细菌产生了越来越广泛的耐药性,危害到了水产养殖系统的生物安全。世界动物卫生组织(OIE)针对这一问题已经着手建立有关防止微生物抗药性的国际法规(OIE 2010a, 2010b)。今后在水产养殖中应该从增加对虾免疫力和改善养殖环境的角度来进行生态健康养殖,而不是一味地追求利益而盲目使用抗生素类药物。

致谢:感谢广西北海正渔生物技术有限公司庞德彬会长提供对虾病料。

参 考 文 献

- 纪荣兴,邹文政,鄢庆批,戴春光. 2008. 凡纳滨对虾“肌肉白浊病”病原的初步研究. 集美大学学报(自然科学版),13(3):210~214
- 李光友. 1995. 中国对虾疾病与免疫机制. 海洋科学,(4):1~3
- 李天道,于佳,俞开康. 1998. 四种弧菌对中国对虾的致病性研究. 海洋湖沼通报,(1):57~98
- 刘荃,王侃,彭锦新,赵像和,张小倩. 1999. 斑节对虾“红体病”细菌性病原的初步研究. 水产科技情报,26(1):7~9
- 乔华林,章俊. 1999. 副溶血弧菌的致病性及其检验和测定. 水产科学,18(4):28~30
- 许斌福,林能锋,杨金先,俞优松,黄传甫,林天龙. 2002. 大黄鱼副溶血弧菌的分离、鉴定及致病力分析. 福建农业学报,17(3):17~43
- 苏永全,蔡心一,翁卫华,王军,黄淑华. 1994. 对虾养殖中弧菌数量与对虾“红腿病~黄鳃病”关系研究. 厦门大学学报(自然科学版),33(3):422~424
- 宋春华,孟庆显. 1998. 副溶血弧菌引起中国对虾红腿病的组织病理及防治. 齐鲁渔业,15(3):24~27
- 郑国兴,沈亚林,李何. 1990. 中国对虾病原菌(鳃弧菌)的研究. 水产学报,14(1):1~7
- 房海,陈翠珍,张晓君. 2010. 水产养殖动物病原细菌学. 北京:中国农业出版社,327~335
- 周丽,宫庆礼. 1998. 海水鱼虾蟹贝病害防治技术. 青岛:青岛海洋大学出版社,83
- 周永灿,张本,陈雷芬,钱家英. 2003. 养殖对虾细菌性红体病的初步研究. 海洋科学,27(5):61~65
- 战文斌. 2004. 水产动物病害学. 北京:中国农业出版社
- 陶保华,胡超群,任春华. 2000. 副溶血弧菌对斑节对虾和日本对虾的致病力研究. 中国水产科学,7(3):117~119
- 翟秀梅,王斌,毛连菊,郭郝,桂运明. 2007. 副溶血弧菌对南美白对虾生理生化指标的影响. 上海水产大学学报,16(2):162~168
- Buyer, J. S., Roberts, D. P., and Russek, C. E. 2002. Soil and plant effects on microbial community structure. Can. J. Microbiol. 48(11):955~964
- Holt, J. G., and Krige, N. R. 1994. Bergey's Manual of Bacteriology (9th Ed). London: Williams and Wilkins Press, 1224~1289
- Reed, L. J., and Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hygiene, 27(3): 493~497
- Thompson, F. L., Iida, T., and Swings, J. 2004. Biodiversity of *Vibrios*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68(3): 403~431
- Vandenbergh, J., Verdonck, L., Robles, A. R. et al. 1999. *Vibrios* associated with *Litopenaeus vannamei* larvae postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. Appl. Environ. Microbiol. 65(6):2592~2597
- OIE. 2010a. Aquatic Animal Health Code (13th Ed.). France: World Organisation for Animal Health, 121
- OIE. 2010b. Terrestrial Animal Health Code (19th Ed.). France: World Organisation for Animal Health, 239~293