一株引起凡纳滨对虾红体病的病原菌——副溶血弧菌的初步研究

樊景凤[1],宋立超[2],王 斌[2],臧红梅[2],梁玉波[1]

(1. 国家海洋环境监测中心,辽宁 大连 116023;2. 大连水产学院,辽宁 大连 116023)

摘要:从 2001 年 7 月辽宁省盘锦市大洼对虾养殖厂大面积暴发红体病(全身发红,活动减弱,食欲减退,壳变硬,死亡率高)的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)肌肉组织中分离到 3 株优势菌,经回归感染证实其中一株为引发本次凡纳滨对虾红体病的病原菌,编号为 0107。对该菌进行了生理生化鉴定和 16S rRNA 基因序列同源性分析,将其判定为副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)。药敏实验结果显示,该菌对头孢哌酮、头孢曲松等多种抗生素敏感,对氨苄西林、青霉素等抗生素不敏感。

关键词:副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*);凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*);红体病;病原

中图分类号:Q93 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-3096(2006)04-0040-05

近年来,凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)作为海虾淡养的优良品种在全国得到迅速发展,产生了良好的经济和社会效益。随着对虾养殖规模的不断扩大,集约化程度的不断提高,对虾养殖病害发生频率亦相应增加,如红体病、红腿病、白斑病、肠炎病、烂鳃病等。2001 年 7 月辽宁省盘锦市大洼对虾养殖厂出现大面积凡纳滨对虾红体现象,主要症状为全身发红,游泳足尤为明显,反应迟钝,活动减弱,在池边水面缓慢游动或沉底不动,有时旋转或垂直游动,食欲减退,壳变硬,传播快,死亡率高。经调查、解剖分析以及电镜负染和电镜切片排除了寄生虫和病毒为病原的可能,从虾肌肉组织分离出 3 株优势菌,经回归感染试验证实其中一株(编号为 0107)是引起此次凡纳滨对虾红体病病害的病原菌。作者从生理生化特性以及 16S rRNA 基因序列同源性分析等方面对该菌进行了鉴定,并对其进行了药物敏感性分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验用虾

患病的凡纳滨对虾(体长 7~12 cm)于红体病暴发的高峰期取自辽宁省盘锦市大洼对虾养殖厂。健康凡纳滨对虾(体长 8~11.5 cm)取自辽宁省庄河市对虾养殖厂,用于回归感染试验。

1.1.2 试剂和材料

普通营养琼脂培养基、TCBS 培养基以及药敏纸片均购自中国腹泻病控制上海试剂供应研究中心;常规 PCR 试剂、Taq 酶、dNTP 等购自宝生物工程(大连)公司,引物亦由该公司合成,其它试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 病原菌的分离

自患病凡纳滨对虾的肌肉组织中分离细菌。在普通营养琼脂、TCBS 平板上划线分离,置 28 ℃恒温培养 24 h,挑取优势菌落在普通营养琼脂培养基和 TCBS 培养基平板划线分离数次,直至获取纯培养物。

1.2.2 回归感染

随机选取健康无病的凡纳滨对虾在实验条件下暂养一星期(平均体长 9 cm/尾),每个菌株均设 3 个平行实验组与 1 个对照组,每组 10 尾。将 28 ℃培养 24 h 的 3 株优势菌用 0.85 %的生理盐水洗脱,制成 1.2×10^9 cfu/mL 菌悬液。于实验组每尾虾的第二、

收稿日期:2005-01-18;修回日期:2005-05-17

基金项目:国家 863 高技术研究发展计划资助项目(2002AA639470);国家海洋局重点青年基金项目(2001303)

作者简介:樊景凤(1972-),女,黑龙江明水人,助理研究员,从事海洋微生物与水产病害学研究,电话:0411-84782602,E-mail:jffan@nmemc.gov.cn

三腹节之间注射 0.1 mL 菌悬液,对照组在相同部位注射 0.1 mL 的 0.85 %的生理盐水。每隔 2 h 记录一次对虾活动情况和发病情况,并移去死虾,连续观察 72 h。

1.2.3 形态观察及生理生化鉴定

于光镜和电镜下观察菌体形态、大小和鞭毛。参照《常见细菌系统鉴定手册》[1]、《伯杰氏细菌系统鉴定手册》(第 9 版)[2],按常规方法分析菌株的生理生化特征。

1.2.4 分子生物学方法鉴定细菌

借鉴莫照兰等[3]设计的细菌 16S rRNA 基因保守区特异性引物,正向引物 CTS657F:5′-AGAGTTTGATC(C/A)TGGCTCAG-3′,反向引物 CTS657R:5′-TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT-3′,将分离到的菌株采用热裂解法获得 DNA 作为模板,对该菌株 16S rRNA 基因片段进行 PCR 扩增。

反应体系为:10 ×LA Buffer 5 μL,dNTP(2.5 mmol/L) 8 μL,模板 DNA 2 μL,CTS657F(20 μmol/L) 1 μL,CTS657R(20 μmol/L) 1 μL,LA Taq 0.5 μL,ddH_2O 32.5 μL。反应程序:94 ℃预变性 10 min;接 98 ℃变性 10 s,55 ℃复性 30 s,72 ℃延伸 2 min,25 个循环;最后 72 ℃延伸 5 min。扩增产物交宝生物工程(大连)有限公司回收测序。将 0107 菌株的 16S rRNA 基因序列与从 Genbank 数据库中获得的细菌 16SrRNA 基因序列,采用 DNAMAN 软件进行统计和聚类分析,获得系统发生树。

1.2.5 药敏试验

采用药敏纸片对 0107 菌株进行药敏检测,根据 30 ℃恒温培养 24 h 后测量的抑菌圈大小确定其对各种药物的敏感性,经法国梅里埃生物公司生产的自动细菌鉴定/药敏仪(ATB expression)进行鉴定和药敏分析并计算耐药率。共有 18 种抗生素:青霉素、红霉素、氯霉素、四环素、氨苄西林、头孢哌酮、头孢呋辛钠、头孢他啶、氨曲南、阿米卡星、诺氟沙星、克林霉素、庆大霉素、呋喃妥因、万古霉素、环丙沙星、复方新诺明、头孢曲松。

2 结果

2.1 自然发病的凡纳滨对虾红体病症状

首先是活动减弱,在池边水面缓慢游动或沉底不动,有时作旋转游动或垂直游动,反应迟钝,食量减退,游泳足变红,继而全身变红,最后死亡,胸甲鳃区呈淡黄色,壳变硬;也有的死亡后无红体症状出现。

2.2 形态特征

0107 菌株在普通营养琼脂培养基上经 28 ℃培养 24 h 后形成的菌落呈圆形,半透明,表面光滑,边缘整齐,直径约 2 mm;TCBS 培养基上的菌落呈绿色,直径约 3 mm。菌体革兰氏染色阴性,杆状,可运动,极生鞭毛,菌体大小为(0.5～0.8) μm ×(1.4～2.6) μm(图 1)。

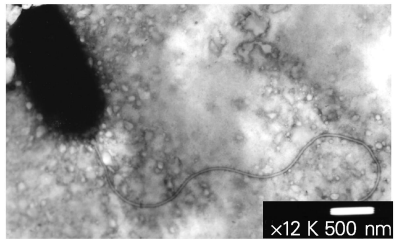

图 1 病原菌的电镜照片

Fig.1 Electron micrograph of pathogenic bacteria

2.3 回归感染结果

3 株优势菌经回归感染试验,发现只有 0107 菌株试验组有发病死亡现象,而另两株优势菌和生理盐水试验组的凡纳滨对虾均表现正常,无发病症状。肌肉注射 6 h 后 0107 菌株的试验组凡纳滨对虾开始出现症状,表现为不活跃,大部分凡纳滨对虾卧于缸底,18 h 后个别凡纳滨对虾出现红体现象,19 h 后有 1 尾凡纳滨对虾死亡,其它凡纳滨对虾陆续出现红体症状并逐渐加重。30 h 死亡数超过 50 %,余者有的也出现红体现象,至 72 h 试验组凡纳滨对虾全部死亡。而其它组凡纳滨对虾没有出现任何病症。无菌条件下从试验组濒死凡纳滨对虾的肌肉组织中分离细菌,经生理生化鉴定分离到的优势菌株与感染菌株相同,说明分离到的菌株是引发此次凡纳滨对虾红体病的病原菌。

2.4 生理生化特性

0107 菌株为兼性厌氧菌,对营养要求一般,但对盐有严格要求,属于低度嗜盐菌,生长在含 2 %～8 % NaCl 的环境中,尤其是 2 %～3 % NaCl 生长最好,在无盐蛋白胨水中不生长。氧化酶阳性,接触酶阳性,不发酵葡萄糖不产气但产酸,具体的生理生化特性鉴定结果见表 1。鉴定结果与《伯杰氏细菌系统鉴定手册》中所描述的副溶血弧菌特性最接近,只是 0107 菌可以利用蜜二糖和纤维二糖作为惟一碳源生长。

表 1　0107 菌株的生理生化鉴定结果

Tab. 1　Result of physiological and biochemical tests of strain 0107

项目	结果	项目	结果	项目	结果
革兰氏染色	阴性	发酵葡萄糖产气	-	半乳糖	+
细胞形状	杆状	碳水化合物产酸		乳糖	-
运动性	+	葡萄糖	+	蔗糖	-
鞭毛	极毛 1 根	甘露糖	-	蜜二糖	+
接触酶	+	山梨醇	+	纤维二糖	+
氧化酶	+	蔗糖	-	甘露醇	+
生长需要钠离子	+	乳糖	-	山梨醇	-
需氧性	兼性厌氧	半乳糖	+	葡萄糖酸钠	+
硝酸盐还原	+	海藻糖	+	谷氨酸钠	+
反硝化	-	甘露醇	+	苹果酸钠	+
淀粉水解	+	木糖	-	柠檬酸钠	+
水解七叶灵	+	精氨酸双水解酶	-	丙酸	+
明胶液化	+	脲酶	-	乳酸	+
VP 试验	-	产生吲哚	-	L-精氨酸	+
MR 试验	+	利用惟一碳源生长		乙酸	+
0 %NaCl 生长	-	葡萄糖	+	β-丙氨酸	-
5 %NaCl 生长	+	木糖	-	L-丙氨酸	+
8 %NaCl 生长	+	核糖	+	L-亮氨酸	+
10 % NaCl 生长	-	海藻糖	+	L-丝氨酸	+
O/ F 试验	发酵	甘露糖	+	乙醇	+

2.5　分子生物学方法鉴定结果

为了进一步确定 0107 菌株的分类学地位,测定了其 16S rRNA 基因部分序列。所获得的 16S rRNA 基因序列长度为 570 bp,通过 GenBank 将该菌 16S rRNA 基因序列与基因库中 100 个较相近的细菌的 16S rRNA 基因序列进行同源性比较,发现 0107 菌株与弧菌的 16S rRNA 序列自然聚类。在最接近的 100 个序列中,弧菌占 7 %,与它们的同源性为 92 %～99 %;沙门氏菌占 9 %,同源性为 89 %～90 %;埃希氏菌占 4 %,同源性为 89 %～90 %;假单胞菌占 14 %,同源性为 87 %～88 %;其它细菌和未鉴定的菌占 66 %,同源性为 83 %～90 %。与 *Vibrio parahaemolyticus* 的同源性最高,达 99 %。从 100 个细菌株中选取 27 个菌株采用 DNAMAN 软件进行系统发育学分析,结果如图 2 所示,0107 菌株与两株 *V. parahaemolyticus* 聚为一类,相似性也最高,表明菌株 0107 与 *V. parahaemolyticus* 的亲缘关系最近。

2.6　药敏试验结果

利用纸片法测定了 18 种抗菌素对 0107 菌株的抑菌作用。根据 whonet5.0 软件和自动细菌鉴定/药敏仪来判断不同抗菌药物抑菌圈直径与其敏感性之间的关系。在所测定的 18 种抗菌药物中,对头孢哌酮、头孢曲松等 11 种抗生素敏感,对氨苄西林、青霉素等 5 种抗生素不敏感(表 2)。

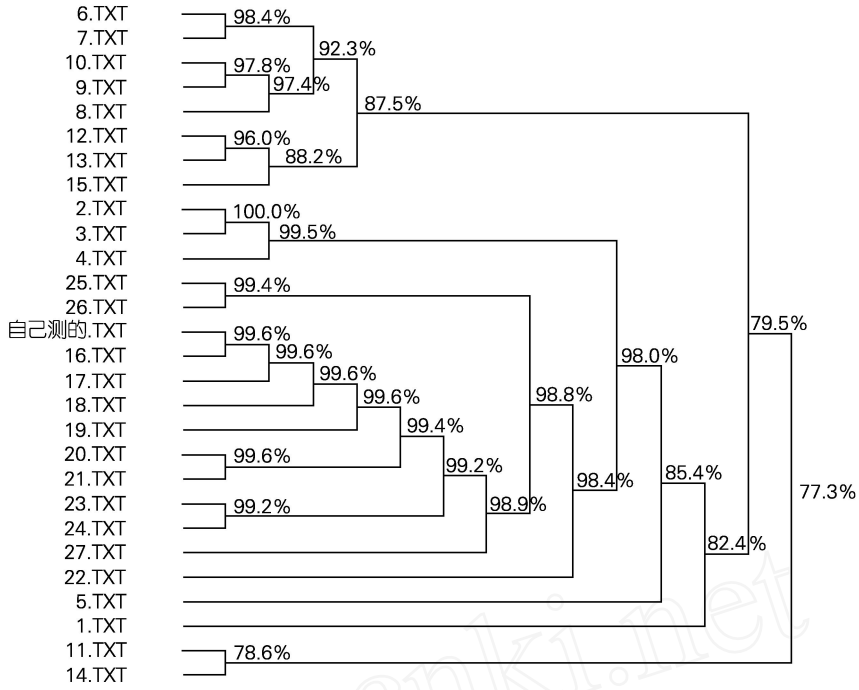

图 2　16 SrRNA 基因序列分析聚类结果

Fig. 2　Clustering result of 16S rRNA gene sequence

1. *V. parahaemolyticus* 2210633; 2. *V. vulnificus* YJ0; 3. *V. vulnificus* CMCP6; 4. *V. vulnificus* CMCP6; 5. *V. cholerae* O1 N16961; 6. *Salmonella typhimurium* LT2; 7. *Salmonella typhimurium* DT104; 8. *Shigella flexneri* 301; 9. *Escherichia coli* O157:H7; 10. *E. coli* K12; 11. *Shewanella oneidensis* MR-1; 12. *Y. pestis* CO92; 13. *Y. pestis* KIM; 14. *P. putida* KT2440; 15. *E. chrysanthemi* 3937; 16. *V. parahaemolyticus* CIP 73.30; 17. *V. parahaemolyticus* 17802T; 18. *V. alginolyticus* CIP70.65; 19. *V. alginolyticus* 17749T; 20. *V. campbelli* 25920T; 21. *V. harveyi* ACMM 642; 22. *V. parahaemolyticus* EcGS020801; 23. *V. fischeri isolate* 7744; 24. *V. alginolyticus* EcGS021001; 25. *V. natriegens* 14048T; 26. *V. pelagius* 25916T; 27. *V. carchiariae* 35084T

3　讨论

“红体病”是近年来凡纳滨对虾养殖过程中最常见也是经济损失最严重的疾病之一,国内外均有报道[4~6]。引起凡纳滨对虾“红体病”的原因,常见的有以下 3 种情况:(1) 应激性红体现象,是由养殖环境发生突变,凡纳滨对虾为适应变化而表现出的现象。症状表现为触须变红、尾扇的尖部变红,病死的虾壳变软。(2) 病毒性红体现象,病原主要是桃拉病毒,通常发生在水环境急剧变化后的 1～2 d,病毒性红体又称桃拉综合征,主要表现为病虾红须、红尾,尤其是尾扇变红,所以又称之为“红尾病”,体色变成茶红色,病虾甲壳变软,久病不愈的病虾甲壳上有不规则的黑斑,基本无红腿现象。(3) 副溶血弧菌性的红体现象,副溶血弧菌所致的红体病有如下特点:多发于 6 月下旬后的高温多雨季节,多年养殖的池塘,且清淤和消毒不彻底、池水交换不良的情况下更易发生,病症所表现的特点为附肢变红,同时全身呈红色,病死虾壳不变软。本试验采用电镜负染和电镜切片的方法,对患红体病的凡纳滨对虾进行了病毒检测,在其体内没有发现大量的病毒存在,排除了病毒致病的可能性,结合发病症状观察和回归感染试验,将本次发病的原因确定为副溶血弧菌感染所致。

从患红体病的凡纳滨对虾肌肉组织中分离到的,并经回感试验确定为病原菌的 0107 菌株,为革兰氏阴性,氧化酶反应阳性,能在 TCBS 选择性培养基上生长,均属于弧菌科弧菌属的特性。进行 0107 菌株生理生化特性鉴定时,发现其可以利用蜜二糖和纤维二糖作为惟一碳源生长,这两个特性与《伯杰氏细菌系统鉴定手册》上描述的副溶血弧菌特性有所差异,其余特性均相同。为了进一步确定 0107 菌株的分类学地位,进行了 16S rRNA 序列测定,并通过 GenBank DNA 序列数据库进行比对,在 100 株细菌中 0107 菌株与副溶血弧菌同源性最高为 99 %。综合 0107 菌株的生理生化特性和 16S rRNA 同源性鉴

定,判定该菌为副溶血弧菌,这与周永灿等从患红体病的凡纳滨对虾体内分离到的病原菌中的一株相同[7]。在确定菌株的分类学地位过程中,发现任何一种分类学方法都有其优缺点,单纯依靠一种方法来判定,均有可能产生失误,因此在进行微生物种类鉴定时,结合多种分析方法得到的结论更具有可靠性。

表 2 0107 菌株药敏实验结果

Tab. 2 Result of drug sensitivity test to strain 0107

药物	抑菌圈直径 (mm)	敏感性
青霉素	10	R
氧哌嗪青霉素	26	S
庆大霉素	17	S
环丙沙星	25	S
克林霉素	11	R
氨曲南	23	S
氧氟沙星	25	S
头孢哌酮	24	S
头孢他啶	25	S
头孢呋辛钠	16	I
红霉素	13	R
复方新诺明	24	S
万古霉素	6	R
氨苄西林	8	R
呋喃妥因	22	S
诺氟沙星	23	S
头孢曲松	26	S
阿米卡星	16	I

注:S 表示敏感;I 表示中介度;R 表示耐药

副溶血弧菌属于一种海洋性细菌,广泛存在于沿岸海水、沉积物和海洋动物体中,是海水鱼、虾、贝类的一种常见致病菌,但是大多弧菌属于条件致病菌,通过改良养殖环境、彻底消毒池塘辅助合理用药,多数情况下能够避免疾病的发生。当确定是副溶血弧菌为病原菌引发红体病时,可以参考本文中的药敏实验结果选择合适的药物进行控制。

参考文献:

[1] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001. 107-113.

[2] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, *et al*. Bergy's Manual of Determinative Bacteriology (9th) [M]. London: William & Wilkins Press, 1994. 259-271.

[3] 莫照兰,茅云翔,陈师勇,等. 养殖牙鲆鱼苗腹水症病原菌的鉴定及系统发育学分析[J]. 海洋与湖沼,2003,**34**(2):131-141.

[4] 张坷,万志. 南美白对虾三种类型红体病的防治方法[J]. 北京水产,2004,4:34.

[5] Alapide T E V, Dureza L A. Isolation of *Vibrio* spp. From *Penaeus monodon* (Fabricius) with red disease syndrome[J]. **Oceanographic Literature Review**, 1998, 45:362-367.

[6] Aguirre G, Gabriel, Ascencio V, *et al*. Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential[J]. **Resent Res Devl Microbiology**, 2000, 4:333-348.

[7] 周永灿,张木,陈雪芬,等. 养殖对虾细菌性红体病的初步研究[J]. 海洋科学,2003,**27**(5):61-65.

Preliminary study on one pathogenic bacterium ——Vibrio parahaemolyticus associated with red body disease in Litopenaeus vannamei

FAN Jing-feng[1], SONG Li-chao[2], WANG Bin[2], ZANG Hong-mei[2], LIANG Yu-bo[1],

(1. National Marine Environmental Monitoring Center, Dalian 116023, China; 2. Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China)

Received: Jan., 18, 2005

Key words: *Vibrio parahaemolyticus; Litopenaeus vannamei;* red body disease; pathogen

Abstract: Red body disease occurred on a large scale in the shrimp farm in Liaoning Province in July, 2001. The characteristics of red body disease were observed. Infected animals displayed red bodies, sluggish swimming, disgusted feeding, hard shell and high mortality. Three bacterial strains were isolated from the muscles of the diseased *Litopenaeus vannamei*. In artificial infection test, one of them was proved to be a pathogen, numbered 0107. According to the traditional biochemical identification and 16S rRNA homology analysis, the pathogenic bacterium was *V. parahaemolyticus*. Drug sensitivity test showed that the pathogenic bacterium was highly sensitive to cefoperazone, ceftriaxone, etc. whereas it is not sensitive to ampicillin and benzylpenicillin.

(本文编辑:刘珊珊)