

# 粤东养殖区分离的 2 株海洋弧菌及其胞外产物对皱纹盘鲍致死毒性的初步分析

房沙沙<sup>1,2</sup>, 林壮炳<sup>3</sup>, 邱 初<sup>1</sup>, 王劭雯<sup>1</sup>, 刘 晓<sup>1</sup>

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东青岛 266071; 2. 中国科学院大学, 北京 100039; 3. 广东省汕头市水产技术推广中心站, 广东汕头 515041)

**摘要:** 2011 年秋, 福建和广东地区养殖的皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)相继暴发死亡。同年 12 月, 我们从广东汕头病区取样分离得到 2 株弧菌, 其中 bb3 为溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*), bb4 为哈氏弧菌(*V. harveyi*)。本研究以 bb3、bb4 作为供试菌株对 1 龄皱纹盘鲍进行侵染实验, 获得如下结果: 20℃ 条件下, 供试菌及其胞外产物粗提液注射处理均可致受试鲍死亡, 浓度  $2.5 \times 10^7$  cfu/mL 的 bb3 与  $2.0 \times 10^7$  cfu/mL 的 bb4 悬液注射可分别引发 43.33% 和 78.02% 的受试鲍死亡; 供试菌株的致死毒性与注射弧菌的总量正相关, 与受试幼鲍的壳长、全湿重负相关; 注射或浸泡-创伤两种处理方式均可导致受试鲍死亡, 并且因注射供试弧菌而死亡的幼鲍软体部组织被健康鲍取食后也可引发取食者死亡; 从侵染实验死亡的受试鲍软体部组织中可重新分离得到这 2 种供试弧菌。上述结果表明, 溶藻弧菌 bb3 和哈氏弧菌 bb4 是皱纹盘鲍的病原菌。药敏试验表明, bb3、bb4 均已对抗生素具有一定程度的耐药性, 在测试的 20 种抗生素中, 仅有头孢曲松和丁胺卡那霉素是这 2 株弧菌同时高度敏感的抗生素, 但 bb3 和 bb4 却对 8 种抗生素同时表现出抗性。

**关键词:** 皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*); 溶藻弧菌(*Vibrio harveyi*); 哈氏弧菌; 致病性; 侵染途径; 耐药性

中图分类号: S944 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)03-0016-07

皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)自然分布于我国辽东和山东半岛水域<sup>[1]</sup>, 是重要的海水养殖贝类。我国从 20 世纪 80 年代中期开始皱纹盘鲍人工养殖, 主要养殖区在辽东半岛、山东半岛及福建北部和中部沿海。近 30 年来, 皱纹盘鲍养殖区域和规模增长迅速, 目前, 辽宁、山东、浙江、福建、广东等省沿海海域均有皱纹盘鲍养殖。

2011 年秋季以来, 福建和广东东部养殖的皱纹盘鲍发生流行性病害, 培育的鲍苗死亡情况尤其严重。2011 年 12 月初, 我们从广东汕头市南弘海珍养殖有限公司采集 2 月龄患病幼鲍, 从中分离纯化得到两株细菌, 菌株编号分别为 bb3 和 bb4, 回归感染实验表明, 菌株 bb3 和 bb4 均可致皱纹盘鲍死亡且可从接种死亡的受试鲍中重新分离得到。经 16S rRNA 序列分析初步鉴定此 2 株细菌均为弧菌; 经 *topA*, *ftsZ*, *gapA*, *mreB*, *gyrB*, *pyrH*, *recA* 等管家基因的序列分析进一步明确 bb3 为溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*), bb4 为哈氏弧菌(*V. harveyi*)<sup>[2]</sup>。

为明确溶藻弧菌 bb3、哈氏弧菌 bb4 与我国南方

皱纹盘鲍流行性病害的关系, 我们开展了一系列的研究工作。本文报道该 2 株弧菌及其胞外产物对皱纹盘鲍的致死效应、侵染途径及对抗生素的敏感性等研究结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 弧菌菌株

本研究使用的 2 株弧菌于 2011 年 12 月从汕头市南弘海珍养殖有限公司的 2 月龄患病幼鲍中分离得到, 菌株 bb3 为溶藻弧菌、bb4 为哈氏弧菌<sup>[2]</sup>。

#### 1.1.2 实验动物

供试实验动物为我们培育的皱纹盘鲍“97”选育群体第 5 代。2011 年 4 月 24 日在荣成亿祥水产养

收稿日期: 2013-04-23; 修回日期: 2013-06-20

基金项目: 国家 863 计划课题(2012AA10A412)

作者简介: 房沙沙(1987-), 女, 山东济宁人, 硕士研究生, 从事贝类遗传育种研究; 刘晓, 通信作者, E-mail: liuxiao@qdio.ac.cn

殖有限公司鲍育苗室繁育, 10 月将部分苗种送到青岛润海珍品养殖公司的鲍越冬车间养殖。越冬期间水温 10~15℃, 投喂人工配合饵料, 日常管理按常规生产方法进行。2012 年 3 月, 供试幼鲍转移到中国科学院海洋研究所培育楼暂养。暂养期间, 培育水温 20℃, 投喂盐渍海带, 每天清理粪便、残饵并全量换水 1 次。

2012 年 4 月, 从暂养的幼鲍中取 3 种规格个体用于本研究, 其中 A 组(壳长 35.5 mm±0.9 mm、全湿重 5.58 g±0.48 g)和 C 组(壳长 24.5 mm±0.8 mm、全湿重 1.84 g±0.11 g)用于比较幼鲍对弧菌的敏感性差异; 其他实验均采用 B 组(壳长 31.2 mm±1.4 mm、全湿重 4.01 g±0.54 g)幼鲍。

侵染实验之前, 按实验设计要求选取所需幼鲍, 随机分组备用。侵染处理结束后, 继续在 20℃ 自然海水中培育, 每天 2 次清理、统计死亡幼鲍。

## 1.2 侵染实验

### 1.2.1 弧菌悬浮液及胞外产物粗提液制备

弧菌悬液制备: 从 LB 平板上挑取单菌落接种到 LB 液体培养基中, 在 28℃, 160 r/min 条件下振荡培养 10~12 h 后离心收集细菌, 用无菌 PBS 洗涤 5 遍。用 PBS 悬浮后在 600 nm 波长下测定细菌悬浮液的 OD 值(A), 按预实验稀释平板计数法标定的每 1.0 OD 悬浮液的弧菌浓度<sup>[2]</sup>(bb3: 12.4×10<sup>8</sup> cfu/mL; bb4: 10.0×10<sup>8</sup>cfu/mL)调整到侵染实验所需浓度。弧菌悬液制备后立即进行注射处理。

胞外产物粗提液制备: 参考文献[3-4]的方法略有改动, 在 LB 固体培养基表面覆盖 1 层无菌玻璃纸, 取 100 μL 供试菌的菌液均匀涂布于灭菌玻璃纸上培养过夜, 每个菌株铺 4~5 个平板。每个平板用 2 mL PBS 洗下玻璃纸上生长的弧菌, 小心转移到无菌离心管中, 于 4℃、8 500 r/min 离心 30 min, 取上清, 经孔径 0.22 μm 的纤维素膜过滤, 所得滤液即为相应菌株的胞外产物粗提液。

### 1.2.2 弧菌对皱纹盘鲍的致死效应研究

弧菌及其胞外产物的侵染实验在中国科学院海洋研究所培育楼进行。侵染实验共采用注射、创伤-浸浴和取食等 3 种方法。侵染实验全程在 20℃ 进行, 期间投喂饵料、清理粪便、换水等均采用常规方法。

注射: 本研究供试幼鲍及注射用弧菌悬液的浓度如表 1 所示。幼鲍阴干 10~15 min 后往每个供试幼鲍腹足中部的肌肉组织注射 100 μL 当天制备的弧

菌悬浮液, 对照组注射相同体积的 PBS 溶液。每个幼鲍的注射位置、深度基本接近。注射处理后约 10 min, 将受试幼鲍置于自然海水中培育。每处理 3 次重复, 每个重复各注射 30 个幼鲍。

表 1 注射侵染的分组和处理情况

Tab.1 The infection experiment by intramuscular injection

幼鲍 分组	弧菌菌株及浓度 (cfu/mL)					
	bb3			bb4		
	2.5×10 <sup>6</sup>	2.5×10 <sup>7</sup>	2.5×10 <sup>8</sup>	2.0×10 <sup>6</sup>	2.0×10 <sup>7</sup>	2.0×10 <sup>8</sup>
A	-	+	-	-	+	-
B	+	+	+	+	+	+
C	-	+	-	-	+	-

注: + 示注射处理组

创伤-浸浴:(1) 创伤-浸浴处理组: 用 1 mL 一次性无菌注射器的针头刺入供试幼鲍的腹足部, 深度约 2 mm, 每个供试鲍处理 2 次, 经创伤处理后, 将幼鲍放入到弧菌浓度为 1.0×10<sup>8</sup> cfu/mL 的海水中再进行浸浴处理, 24 h 后转移到自然海水中培育;(2) 浸浴处理组: 未经创伤处理的幼鲍在含弧菌 1.0×10<sup>8</sup>cfu/mL 的海水中浸浴处理 24 h 后转移到自然海水中培育;(3) 创伤对照组: 经过创伤处理的幼鲍直接置于自然海水中培育。每处理 3 次重复, 每个重复各 30 个幼鲍。

取食: 实验开始前在供试的健康幼鲍贝壳上做标记并对供试鲍进行为期 2 d 的饥饿处理。然后将注射 bb4 悬液后死亡的幼鲍尸体投入到受试健康鲍的养殖容器中, 12 h 内将病死鲍尸从养殖容器中移除, 更换新鲜海水后再投入新的刚死亡的幼鲍尸体。实验共进行 5 d, 实验期间不投喂其他饵料。观察、记录受试健康鲍对病死幼鲍软体部的取食情况并每天 2 次观察记录取食者的死亡现象, 连续观察 1 周。每组实验含健康鲍和注射弧菌后死亡的一龄鲍各 10 个。

### 1.2.3 弧菌胞外产物粗提液致死毒性的初步研究

为研究供试菌胞外产物的致死毒性, 将胞外产物粗提液分别注射到供试幼鲍腹足部肌肉组织。每处理 10 个个体, 每组 2 次重复, 对照组注射 PBS 溶液。注射处理后按常规方法管理, 每天 2 次观察统计死亡个体数。

## 1.3 供试弧菌的药敏试验

选取 20 种抗生素, 采用纸片法进行药敏试验。药敏纸片购自杭州微生物试剂有限公司。在每个 LB 固体培养基平板上涂布 100 μL 浓度为 5.0×10<sup>8</sup>cfu/mL 的菌液, 然后将药敏纸片平铺到培养基表面, 每个

培养皿放置 4 片药敏纸片。在 28℃ 培养 16 h 后测定抑菌圈直径，依据生产厂家提供的判定标准 (<http://www.hangwei-media.com/tech1.asp>) 给出供试菌株对不同抗生素的敏感性。

### 1.4 数据分析

某组幼鲍在统计时段内的死亡个体数之和占该组供试鲍总数的百分比即为该组的累积死亡率，相同处理的不同重复组之间的平均值即为该处理组的累积死亡率。采用 SPSS16.0 软件中的 T 检验和单因素方差分析检验各处理间的差异显著性，显著性水平为 0.05。

## 2 结果

### 2.1 供试弧菌注射致死的剂量效应关系

取 100 μL 不同浓度的弧菌悬液注射处理一龄皱纹盘鲍，受试鲍的累积死亡率如图 1 所示。由图 1 可见，受试鲍的累积死亡率随注射弧菌菌液浓度的增加而升高，且受试鲍的死亡集中出现在注射处理后的前 8 d，之后逐渐趋稳，2 周后未见出现新的死亡(数据未列)。注射浓度为  $2.5 \times 10^6$ 、 $2.5 \times 10^7$ 、 $2.5 \times 10^8$  cfu/mL 的 bb3 菌液后，第 14 天皱纹盘鲍的累积死亡率分别是 13.95%、43.33%、78.33%；注射浓度为  $2.0 \times 10^6$ 、 $2.0 \times 10^7$ 、 $2.0 \times 10^8$  cfu/mL 的 bb4 菌液后，第 14

天皱纹盘鲍的累积死亡率分别是 64.04%、78.02%、94.37%；在本研究观察的 2 周内对照组的平均累积死亡率为 3.33%。上述结果表明，溶藻弧菌 bb3 和哈氏弧菌 bb4 对皱纹盘鲍均有致死效应，哈氏弧菌 bb4 的致死毒性强于溶藻弧菌 bb3。

### 2.2 不同规格皱纹盘鲍对溶藻弧菌 bb3 和哈氏弧菌 bb4 的敏感性差异

对不同规格皱纹盘鲍分别注射 100 μL 浓度为  $2.5 \times 10^7$  cfu/mL 的溶藻弧菌 bb3 或  $2.0 \times 10^7$  cfu/mL 的哈氏弧菌 bb4 悬浮液，其中 A 组平均壳长 35.5 mm±0.9 mm、全湿重 5.58 g±0.48 g，为大规格组；C 组平均壳长 24.5 mm±0.8 mm、全湿重 1.84 g±0.11 g，为小规格组。注射处理 2 周后统计的各组累积死亡率见图 2。溶藻弧菌 bb3 侵染处理后，A 组幼鲍的累积死亡率为 20.00%，C 组为 58.89%，T 检验结果显示 A 组与 C 组的死亡率差异显著 ( $P < 0.05$ )；哈氏弧菌 bb4 侵染处理后，A、C 组受试鲍在 2 周时的累积死亡率分别为 35.56% 和 71.11%，差异显著 ( $P < 0.05$ )。本研究的结果表明，受试鲍对病原弧菌的敏感性与个体规格相关，体重小者对病原弧菌更敏感。因此，我们在后续有关病原-宿主相互作用的研究中尽量选用规格接近的鲍作为受试对象。

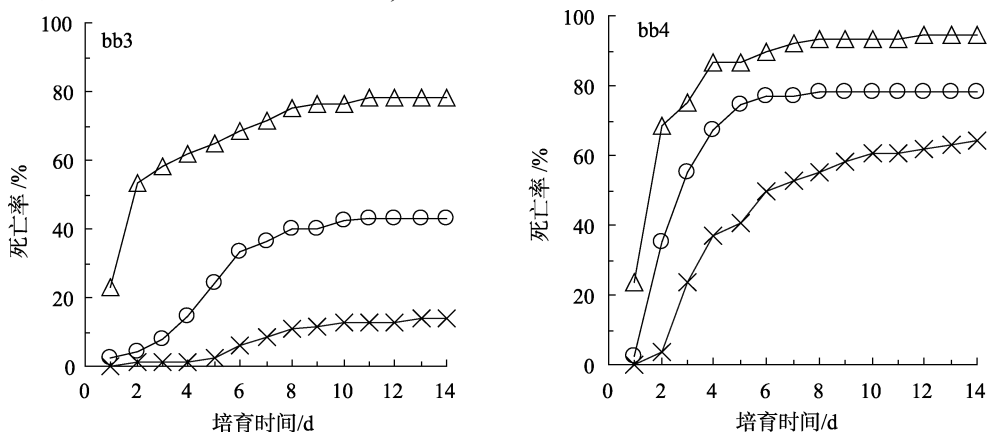


图 1 不同剂量弧菌悬浮液注射后幼鲍死亡率随培育时间的变化曲线

Fig. 1 Cumulative mortality of juvenile abalones after *vibrio* challenging

(“x”: 注射 bb3  $2.5 \times 10^6$  cfu/mL 或 bb4  $2.0 \times 10^6$  cfu/mL; “o”: 注射 bb3  $2.5 \times 10^7$  cfu/mL 或 bb4  $2.0 \times 10^7$  cfu/mL;

“Δ”: 注射 bb3  $2.5 \times 10^8$  cfu/mL 或 bb4  $2.0 \times 10^8$  cfu/mL)

(“x”: injected with  $2.5 \times 10^6$  cfu/mL of bb3 or  $2.0 \times 10^6$  cfu/mL of bb4; “o”: injected with  $2.5 \times 10^7$  cfu/mL of bb3 or  $2.0 \times 10^7$  cfu/mL of bb4;

“Δ”: injected with  $2.5 \times 10^8$  cfu/mL of bb3 or  $2.0 \times 10^8$  cfu/mL of bb4)

### 2.3 供试弧菌对皱纹盘鲍侵染途径的初步分析

#### 2.3.1 创伤-浸浴侵染

经创伤处理或不经创伤处理的皱纹盘鲍分别在

含  $1.0 \times 10^8$  cfu/mL 的 bb3 或 bb4 弧菌悬浮液中浸浴 24 h 后转移到自然海水中培育 2 周。创伤对照组经相同创伤处理但不进行弧菌浸浴，2 周后统计各处理组的死亡率，结果见表 2。溶藻弧菌 bb3 的创伤-浸浴处

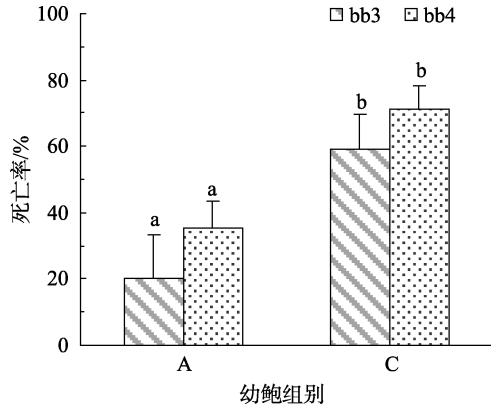


图2 菌株 bb3 和 bb4 对不同规格受试鲍的致死毒性  
Fig. 2 Pathogenicity of *vibrio* bb3 and bb4 for abalone of different sizes

注: 不同字母代表差异显著

Note: Different letters represent significant difference

理组累积死亡率为 17.78%, 高于单纯的浸浴处理组, 显著高于创伤对照组 ( $P < 0.05$ ); 哈氏弧菌 bb4 的创伤-浸浴处理组死亡率为 31.11%, 高于浸浴处理组鲍的死亡率为 22.22%, 显著高于创伤对照组 ( $P < 0.05$ )。上述结果表明, 弧菌悬浮液浸浴可致使受试鲍感染, 创伤处理可使受试鲍被病原弧菌感染的几率增加, 因此, 在养殖生产中任何减少、灭除特定病原弧菌的管理措施均有望减轻病情, 并且日常管理中应尽量避免鲍遭受机械损伤。

表2 弧菌创伤-浸浴处理对受试鲍死亡率的影响

Tab. 2 Effects of soaking-wound treatment on cumulative mortality of abalones

死亡率 (%)	处理方式		
	创伤对照组	浸浴处理组	创伤-浸浴处理组
bb3	3.33 ± 1.67 <sup>a</sup>	8.89 ± 1.92 <sup>ab</sup>	17.78 ± 8.39 <sup>b</sup>
bb4	3.33 ± 1.67 <sup>a</sup>	22.22 ± 10.18 <sup>ab</sup>	31.11 ± 12.62 <sup>b</sup>

注: 不同字母代表差异显著

### 2.3.2 摄食感染

在本研究的一组实验中, 我们观察到 4 个供试健康鲍啃食因注射哈氏弧菌 bb4 悬浮液而死亡的皱纹盘鲍的软体部组织, 这 4 个取食者在此后的 4~7 d 内相继死亡, 本研究的初步观察结果表明, 同类相食可能是鲍病原传播的途径之一。图 3 是本研究的部分观察结果, 箭头所指处为皱纹盘鲍的尸体被啃食后留下的痕迹。

### 2.4 溶藻弧菌 bb3 和哈氏弧菌 bb4 胞外产物粗提液致死毒性的初步研究

利用平板玻璃纸覆盖法制备弧菌胞外产物粗提液, 对受试皱纹盘鲍进行足部肌肉注射处理, 每个

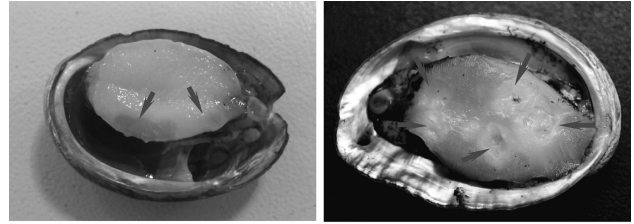


图3 被同类啃食过的幼鲍尸体

Fig. 3 Dead abalone bodies bitten by other abalones

箭头: 死亡鲍被健康鲍啃食的痕迹

Arrows indicated bites on dead abalone bodies by healthy abalones

受试鲍分别注射溶藻弧菌 bb3 或哈氏弧菌 bb4 的胞外产物粗提液 100 μL, 对照组注射等量的 PBS 溶液, 实验结果见图 4, 注射处理后次日即发现有供试鲍死亡, 处理后第 6 天, bb3 胞外产物粗提液注射组累积死亡率达到 60%、bb4 处理组死亡率高达 90%, 实验期间对照组无死亡现象发生。本研究的结果表明, 不仅供试弧菌菌株侵染可导致皱纹盘鲍死亡, 它们的胞外产物对受试鲍也同样具有致死效应。但本研究仅进行了初步的定性实验, 弧菌胞外产物致死效应的剂量效应关系及致死效应机制等均值得深入研究。

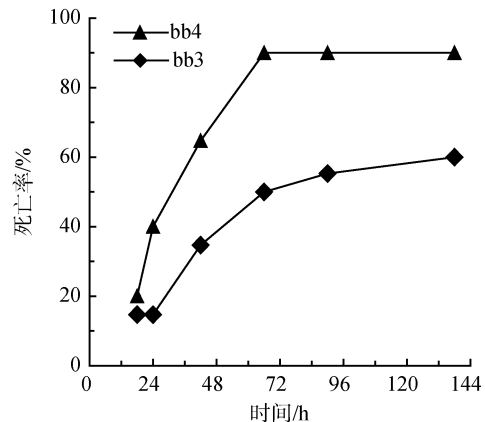


图4 菌株 bb3 和 bb4 胞外产物的致死效应分析

Fig. 4 The virulence test of the extracellular product of bb3 and bb4

### 2.5 供试弧菌的药敏试验

应用纸片法测定供试弧菌对 20 种抗生素的敏感性, 结果见表 3。结果表明, 溶藻弧菌 bb3 和哈氏弧菌 bb4 对头孢曲松和丁胺卡那霉素均表现出高度敏感性; 此外, 溶藻弧菌 bb3 对庆大霉素、复达欣、卡那霉素、红霉素高度敏感; 而哈氏弧菌 bb4 则对四环素和强力霉素高度敏感; 但 bb3 和 bb4 却分别对 8 种和 11 种抗生素表现出抗性, 其中青霉素、氨苄西林、苯唑西林、哌拉西林、羧苄青霉素和先锋霉素、先锋霉素、头孢吡辛等 8 种是 2 株供试弧菌

均具抗药性的抗生素。

表3 菌株 bb3 和 bb4 的药敏试验结果

Tab. 3 Antibiotic susceptibility tests of bb3 and bb4

药物名称	药物含量 ( $\mu\text{g}/\text{片}$ )	bb3 的敏感度	bb4 的敏感度
青霉素	10	R	R
先锋霉素	30	R	R
头孢曲松	30	S	S
新霉素	30	I	I
苯唑西林	1	R	R
先锋霉素	30	I	R
头孢哌酮	75	I	R
四环素	30	I	S
氨苄西林	10	R	R
先锋霉素	30	R	R
丁胺卡那霉素	30	S	S
强力霉素	30	I	S
羧苄青霉素	100	R	R
头孢呋辛	30	R	R
庆大霉素	10	S	I
美满霉素	30	I	I
哌拉西林	100	R	R
复达欣	30	S	I
卡那霉素	30	S	I
红霉素	15	S	R

注: S: 敏感; I: 中度敏感; R: 耐药

### 3 讨论

我国皱纹盘鲍和杂色鲍养殖区均曾发生大面积的流行性病害, 细菌<sup>[5-7]</sup>和病毒<sup>[8-10]</sup>是历次流行性死亡的主要病原生物<sup>[11]</sup>, 而海洋弧菌是细菌性病原中最主要的一个类群。

皱纹盘鲍的自然分布区和传统养殖区在我国北方的黄海海域, 我国皱纹盘鲍养殖区自 1992 年开始曾发生非常严重的流行性病害, 研究人员先后从病患样本中分离得到河流弧菌 II(*V. fluvialis*)<sup>[5, 12]</sup>、坎氏弧菌(*V. campbellii*)<sup>[6]</sup>和创伤弧菌(*V. vulnificus*)<sup>[7]</sup>, 侵染实验表明它们均为皱纹盘鲍的致病菌。此后, 从我国南方养殖的杂色鲍中陆续分离得到亮弧菌(*V. splendidus*)<sup>[13]</sup>、塔氏弧菌(*V. tubiashii*)<sup>[14]</sup>、溶藻弧菌<sup>[15-17]</sup>、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)<sup>[15-16]</sup>、霍乱弧菌(*V. cholera*)<sup>[16]</sup>、溶珊瑚弧菌(*V. coralliilyticus*)<sup>[17]</sup>及哈氏弧菌<sup>[18-19]</sup>等致病性弧菌。本研究从我国粤东养殖区分离得到的这 2 株弧菌分别为溶藻弧菌(bb3)和哈氏弧菌(bb4), 幼鲍被 bb3 或 bb4 感染后, 附着力普

遍降低, 死亡个体外套膜收缩、腹足肌肉僵硬并有部分个体的腹足部出现白色脓疱<sup>[2]</sup>。侵染实验表明菌株 bb3 和 bb4 及其胞外产物在 20℃ 水温下对 1 龄皱纹盘鲍表现出较强的致死毒性, 它们对皱纹盘鲍的致死毒性与弧菌浓度呈正相关、与皱纹盘鲍个体规格负相关, 我们的初步结果表明 bb3 和 bb4 是皱纹盘鲍的致病菌, 它们可能是引起 2011 年秋季粤东地区养殖皱纹盘鲍大规模死亡的重要病原菌。

溶藻弧菌和哈氏弧菌此前已从闽粤养殖的杂色鲍中分离得到并被证明是杂色鲍的致病菌<sup>[15-19]</sup>, 同时溶藻弧菌和哈氏弧菌也是中国北方养殖的水产动植物的常见病原菌, 但以往未见从中国北方分布或养殖的鲍科动物中分离出溶藻弧菌和哈氏弧菌的报道。本研究所用病原菌分离自广东汕头市南弘海珍养殖有限公司的皱纹盘鲍病患样本, 该公司所处的汕头市海门湾弧菌含量较高, 且以往从该公司养殖的杂色鲍中曾分离到哈氏弧菌, 本研究分离的弧菌菌株与以往从该海区养殖的杂色鲍中分离的弧菌菌株有哪些异同, 值得进一步研究。

鲍以海藻为食, 但在长期的研究中我们多次观察到皱纹盘鲍啃食同类尸体的现象。本研究对皱纹盘鲍的同类相食行为在病害传播中的作用进行了初步研究, 首次观察到致病海洋弧菌可以通过宿主被健康鲍取食而传播给健康个体, 这可能是鲍病原生物横向传播的重要方式之一。因此, 我们建议在鲍人工养殖过程中及时清除病死个体。及时清除病死个体不仅可避免尸体腐烂导致养殖水体的水质败坏, 而且可切断病原生物在养殖生物之间的传播。

本文对菌株 bb3 和 bb4 及其胞外产物的侵染毒性、侵染途径及对抗生素的敏感性进行了初步研究, 结果已反映出我国水产养殖产业存在的一些现象可能导致的危害, 比如: 对水产生物异地移养缺乏制约客观上增加了病害传播的速度和范围、并增大了病原生物在物种之间横向传播的风险; 使用抗生素不规范导致病原微生物出现耐药性——在本研究中我们测试了供试弧菌对 20 种抗生素的敏感性, 发现仅有 2 种抗生素是这 2 株弧菌均高度敏感的, 但这 2 株海洋弧菌同时表现出抗性的抗生素却达到 8 种之多。菌株 bb3 和 bb4 均具备抗药性的这 8 种抗生素分别属于青霉素类和头孢菌素类, 是人类医学及畜牧、水产业中最广泛使用的 2 大类抗生素。

致谢: 感谢孙黎博士对本文提出有益建议。

参考文献:

- [1] 吕端华. 中国近海鲍科的研究[C]//中国科学院海洋研究所. 海洋科学集刊(14). 北京: 科学出版社, 1978: 89-98.
- [2] 房沙沙. 中国南海养殖区分离的两株海洋弧菌对皱纹盘鲍致病性的研究[D]. 青岛: 中国科学院大学, 2012.
- [3] 王斌, 于兰萍, 袁甜, 等. 哈氏弧菌胞外产物对红鳍东方鲀的致病性[J]. 中国水产科学, 2010, 17(1): 88-96.
- [4] 金珊, 郑天伦, 王国良, 等. 溶藻弧菌胞外产物对大黄鱼的致病性[J]. 中国兽医学报, 2004, 24(5): 439-441.
- [5] 刘金屏, 聂丽平, 李太武, 等. 皱纹盘鲍(*Haliotis discus*)脓疱病的研究[J]. 中国水产科学, 1995, 2(2): 78-84.
- [6] 马健民, 王琦, 马福恒, 等. 皱纹盘鲍脓毒败血症病原菌的发现及初步研究[J]. 水产学报, 1996, 20(4): 332-336.
- [7] 王崇明, 杨冰, 宋晓玲, 等. 应用双抗夹心 ELISA 法检测皱纹盘鲍致病病原——创伤弧菌的研究[J]. 海洋水产研究, 1999, 20(1): 30-34.
- [8] 黄印尧, 吴文忠, 颜江华, 等. 一起毁灭性鲍鱼病毒病的调查[J]. 福建畜牧兽医, 1999, 21(3): 4-5.
- [9] 王军, 苏永全, 张蕉南, 等. 1999 年春季东山九孔鲍暴发性病害研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1999, 38(5): 641-644.
- [10] 吕军仪, 陈志胜, 杨大伟, 等. 广东省粤东地区工厂化高密度养鲍业病害情况调查报告[J]. 水产科技, 1999(4): 1-4.
- [11] Nie Zongqing, Wang Suping. The Status of abalone culture in China[J]. Journal of Shellfish Research, 2004, 23(4): 941-945.
- [12] 李太武, 张健, 丁明进, 等. 大连地区皱纹盘鲍(*Haliotis discus*)脓疱病的研究[J]. 南海研究与开发, 1997(4): 21-27.
- [13] 陈志胜, 吕军仪, 吴金英, 等. 杂色鲍 *Haliotis diversicolor* 溃疡症病原菌的研究[J]. 热带海洋, 2000, 19(3): 72-77.
- [14] 王江勇, 王瑞旋, 刘广锋, 等. 杂色鲍幼苗大规模死亡与细菌数量的关系[J]. 南方水产, 2005, 1(1): 57-61.
- [15] 张朝霞, 王军, 张蕉南, 等. 东山九孔鲍细菌性疾病研究[J]. 台湾海峡, 2001, 20(2): 193-199.
- [16] 王志. 九孔鲍鲍苗致病菌及其潜在生物防治研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2006.
- [17] 刘广锋, 周世宁, 徐力文, 等. 杂色鲍幼苗“急性死亡脱落症”病原菌分析[J]. 中国水产科学, 2006, 13(4): 655-661.
- [18] 陈月忠, 黄万红, 蔡清海, 等. 闽南地区鲍溃烂病的研究[J]. 福建水产, 2008(4): 31-37.
- [19] 王江勇, 孙秀秀, 王瑞旋, 等. 杂色鲍肌肉萎缩症病原菌的分离鉴定及系统发育分析[J]. 南方水产, 2010, 6(5): 21-26.

# The pathogenicities of two *Vibrio* bacteria and their extracellular products in the Pacific abalone, *Haliotis discus hannai* farmed in East Guangdong area

FANG Sha-sha<sup>1,2</sup>, LIN Zhuang-bing<sup>3</sup>, QIU Reng<sup>1</sup>, WANG Shao-wen<sup>1</sup>, LIU Xiao<sup>1</sup>

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 3. Shantou Promotion Station of Aquacultural Technologies, Shantou 515041, China)

**Received:** Apr., 23, 2013

**Key words:** *Haliotis discus hannai*; *Vibrio alginolyticus*; *V. harveyi*; pathogenicity; infection route; drug-resistance

**Abstract:** An incidence of massive mortality of the Pacific abalone, *Haliotis discus hannai* broke out in Fujian and Guangdong Provinces in the fall of 2011. Two *vibrio* strains were isolated from moribund juvenile abalones collected from a local aquaculture farm in Shantou of Guangdong Province. The strains were identified as *Vibrio alginolyticus* (Va) and *Vibrio harveyi* (Vh) in genotype and their toxicities were evaluated through a series of infection experiments. The results indicated that both strains and their extracellular products were lethal to one-year-old Pacific abalone juveniles. Two-week cumulative mortality was 43.33% and 78.02% for animals intramuscle-injected with Va at  $2.5 \times 10^7$  cfu/mL and Vh at  $2.0 \times 10^7$  cfu/mL, respectively. The abalone mortality was found to be positively related to the concentration of vibrio but negatively related to the size of the abalones. In addition, soaking-wound treatment induced the death of tested abalone. Moreover, healthy abalones were infected by taking soft tissues of dead ones and died ultimately. Both *Vibrio* strains were isolated again from infected abalone. Antibiotic susceptibility tests indicated drug-resistance in both strains. The Va strain was highly sensitive to six while Vh strain was sensitive to only four out of 20 antibiotics tested. Both strains were sensitive to only ceftriaxone and amikacin but were resistant to at least 8 antibiotics among 20 antibiotics tested.

(本文编辑: 张培新)