

# 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)病原副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)的表型及分子特征\*

张晓君<sup>1</sup> 陈翠珍<sup>2</sup> 阎斌伦<sup>1</sup> 房海<sup>2</sup> 秦国民<sup>1</sup> 徐静<sup>1</sup>

(1. 淮海工学院海洋学院 江苏省海洋生物技术重点建设实验室 连云港 222005;

2. 河北科技师范学院动物科学系 秦皇岛 066600)

**提要** 采用常规的形态及生理生化特性检验及分子生物学等方法,对引起凡纳滨对虾幼虾发生毁灭性死亡的病原菌进行了致病性、表型生物学及分子生物学的系统研究。结果表明,分离菌为弧菌属(*Vibrio* Pacini 1954)的副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*),对凡纳滨对虾、中国对虾及日本对虾仔虾均有强致病性。分离鉴定的 4 株副溶血弧菌具有淀粉酶、明胶酶、卵磷脂酶活性,但不具有蛋白酶、脂肪酶活性, KP 溶血均呈阴性,且均具有 K 抗原;代表菌株(JGB080708-1 株)的 16S rRNA 基因序列(长度为 1456bp, GenBank 登录号为 GQ205448)和 *gyrB* 基因序列(长度为 1195bp, GenBank 登录号为 GQ205453)与副溶血弧菌的两种基因序列相似性均可达 98%以上。病原菌的耐药性检测结果显示,对供试 49 种抗菌药物中的林可霉素等 6 种药物耐药。

**关键词** 凡纳滨对虾, 副溶血弧菌, 16S rRNA 基因, *gyrB* 基因

**中图分类号** Q346

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)又称白对虾、万氏对虾等,是一热带虾种,其具有适盐范围广、耐密养、生长快、抗逆能力强等优点,我国于 1988 年引进后,现已在全国沿海各地大规模养殖。随着凡纳滨对虾养殖规模的扩大,养殖生态环境日益恶化,由某些病原微生物所引起的流行病,具有发病率高、在水环境中传播速度快、致死率高等特点,严重制约其人工养殖的发展,如桃拉病、白斑病、红体病、红腿病、白斑病、肠炎病、烂鳃病等(樊景凤等, 2006; 周永灿等, 2003; 沈文英等, 2004; 陈爱平, 2002)。

近年来江苏赣榆养殖凡纳滨对虾幼虾发生毁灭性死亡,病虾大小在 2—3cm,主要症状为运动能力差、摄食能力下降,身体弯曲,体表和附肢上常有大量污物附着,肌肉浑浊、鳃部呈黑色等症状。经调查及对发病幼虾的检验,排除了病毒和寄生虫感染,取病虾做细菌学及致病性检验,结果表明,其病原为弧菌属(*Vibrio* Pacini 1954)的副溶血弧菌[*Vibrio para-*

*haemolyticus* (Fujino *et al* 1951) Sakazaki Nakamura and Takizawa 1963]。为丰富该菌在生物学性状、宿主范围及分子生物学等方面的内容,对其进行了致病性、形态特征、理化特性、16S rRNA 基因和 *gyrB* 基因序列及系统发育学、对抗菌类药物的敏感性等系统研究,旨在能为对该菌的有效检验及流行病学特征等深入研究等提供一定的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 细菌分离

取经生理盐水清洗后的病虾肝胰组织为样品,先经抹片后革兰氏染色镜检细菌;再用普通营养琼脂培养基做划线接种分离培养(28 培养 48h 检查)细菌,取分离菌移接于普通营养琼脂斜面(28 培养 24h)做纯培养供检验用。

### 1.2 人工感染试验

试验用虾选用暂养 3 天后的健康凡纳滨对虾、中

\* 淮海工学院江苏省海洋生物技术重点建设实验室研究基金资助, 2008HS016 号; 连云港市科技攻关项目资助, CN0826 号; 淮海工学院引进人才科研启动基金资助项目, KQ07106 号。张晓君, 博士, 教授, E-mail: zxj9307@163.com

收稿日期: 2008-09-15, 收修改稿日期: 2008-11-23

国对虾及日本对虾仔虾, 采用浸浴的感染方式。将供试菌株(JGB080708-1)接种于普通营养肉汤, 28℃过夜培养后作为供试菌液(调至  $1 \times 10^8$  CFU/ml), 分别取 25ml、50ml、100ml 的供试菌液加至 1000ml 的试验用海水中使活菌数分别达到  $2.5 \times 10^6$  CFU/ml、 $5 \times 10^6$  CFU/ml、 $1 \times 10^7$  CFU/ml 3 个不同浓度, 每个浓度分为 3 组, 3 种供试仔虾分别浸浴感染; 同时设立接种无菌营养肉汤作对照; 观察记录试验仔虾的发病与死亡情况, 以引起仔虾发病死亡作为分离菌致病性的判定指标。

### 1.3 形态与菌落特征观察及理化特性检查

分离菌制备成涂片标本后经革兰氏染色镜检形态; 接种于半固体培养基, 置 28℃培养 24h 后, 取菌悬浮于无菌蒸馏水中制成淡菌悬液作为供试菌液, 取此菌液 1 滴于经 Formvar 膜包被的铜网上, 静置 1min 左右后吸除菌液, 再以 0.5% 磷钨酸水溶液同样加 1 滴于铜网上负染 1min 左右, 吸除染液并待自然干燥后, 置 JEM-100CX 透射电子显微镜下检查。

纯培养菌接种于普通营养肉汤、2216E 海水培养基及硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖琼脂(TCBS)培养基, 置 28℃培养 24h, 检查生长情况。分离菌分别接种于细菌理化特性鉴定用培养基中, 按常规进行氧化酶、接触酶、糖(醇及苷)类代谢、 $H_2S$ 、吲哚、MR、V-P 试验、硝酸盐还原、OF 试验、枸橼酸盐利用(Simmons)等较系统的理化特性测定, 主要参照《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠等, 2001)及《人及动物病原细菌学》(杨正时等, 2003)进行。

### 1.4 胞外酶活性及 KP 溶血活性检测

分离菌的胞外蛋白酶活性、卵磷脂酶活性、脂酶活性、淀粉酶活性、尿素酶活性采用平板检验方法, 明胶酶活性采用试管液化方法。将处于对数生长期的 4 株供试菌株分别点种于含有脱脂牛奶(10%)、蛋黄液(10%)、吐温 80(1.0%)、淀粉(1%)、DNA (0.5%) 的普通营养琼脂平板中, 将供试菌穿刺接种于含明胶(8%)的培养基试管, 于 28℃恒温培养 24h 后观察。含脱脂牛奶、蛋黄液、吐温 80 及 DNA 的平板可以直接观察水解圈; 含淀粉的平板则在观察之前加入显色剂碘液。透明的水解圈区域显示有酶活。含明胶的培养基试管于 28℃恒温培养 24h 后, 置于 4℃冰箱中过夜后观察。

分离菌的溶血活性检验, 采用将菌株接种至我妻氏琼脂(酵母浸膏 3g、蛋白胨 10g、NaCl 70g、 $K_2HPO_4$  5g、甘露醇 10g、结晶紫 0.001g、琼脂 15g、

蒸馏水 1000ml, 各成分经加热溶解后调 pH 至 8.0, 煮沸加热 30min 灭菌; 待冷至 45℃左右时无菌操作按 7% 的量加入新鲜的家兔血液)培养基平板的方法, 将接种后的培养基平板置 28℃恒温培养 24h 后, 观察菌株周围是否出现溶血圈。

### 1.5 K 抗原的检测

选取代表菌株 JGB080708-1 接种于适宜发育的液体培养基中经培养扩繁后, 分别制备成福尔马林灭活的全菌(OK)抗原及经热处理(121℃作用 1h)的菌体(O)抗原, 经分别强化免疫接种家兔制备相应抗血清。

取分离菌分别移接于普通营养琼脂斜面 28℃培养 18h 作为 OK 玻板凝集原, 分别与代表菌株 JGB080708-1 所制备的 OK、O 抗血清做玻板凝集反应(直接取菌少许与 1 小滴约 0.025ml 血清混匀), 若与相应 OK、O 抗血清均呈基本一致凝集强度的明显凝集(++), 则判定为无明显 O 凝集抑制性 K 抗原的存在(混匀后即刻出现明显凝集并于 2min 内判定结果); 若仅与 OK 抗血清明显凝集、与 O 抗血清不凝或仅轻微不明显凝集, 则判为存在 O 凝集抑制性 K 抗原(出现接近于“+”的现象说明存在 K 抗原但可能在有的菌体表达不良); 同时以无菌生理盐水代替抗血清作为对照, 需不出现凝集(菌株不自凝)。

供试菌移接于普通营养肉汤管(20ml/管)置 28℃振荡培养 18h 后, 每个菌株等分 10ml/管的各 2 份, 其中 1 份直接作为试管 OK 凝集原, 另 1 份经 121℃处理 1h 作为试管 O 凝集原, 与上述用 JGB080708-1 菌株制备的 OK 及 O 抗血清做相应及交叉的试管凝集试验(沈关心等, 1998)。方法是将抗血清用含 0.5% 石炭酸的无菌生理盐水做 1:2 倍(第 1 管)至 1:65536 倍(第 16 管)的倍比稀释(即  $1 \log_2$  至  $16 \log_2$ )0.2ml/管, 然后分别用前述 OK、O 凝集原(等量加入并混匀其总量为 0.4ml/管)做相应及交叉的试管凝集反应, 同时设立以无血清的对照管, 具体为混匀后置室温下经 24h 左右判定结果, 以仍能呈现明显凝集(++ )的抗血清最高稀释倍数作为相应抗血清的凝集效价。

### 1.6 16S rRNA 和 gyrB 基因序列测定与系统发育学分析

**1.6.1 PCR 模板 DNA 的制备** 取纯培养菌分别接种于 LB 肉汤中 28℃培养 16h, 按小量细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(上海赛百盛基因技术有限公司)所述方法提取 DNA 作为 PCR 模板 DNA。

**1.6.2 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增与测序** 16S rRNA 基因 PCR 扩增的两个引物分别为: 27F(正

向引物): 5'-AGA GTT TGA TC(C/A) TGG CTC AG-3', 1492R(反向引物): 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3' (Martin *et al*, 1998)。在 20 $\mu$ l 反应体系中含有: 无菌蒸馏水 14.4 $\mu$ l, 10 $\times$  PCR 缓冲液 2 $\mu$ l, 1.5mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.6 $\mu$ l, 4 $\times$  dNTP 混合物 0.4 $\mu$ l, 引物各 0.2 $\mu$ l, 2.5U/ $\mu$ l 的 *Taq* DNA 聚合酶 0.2 $\mu$ l, 模板 DNA 1 $\mu$ l。PCR 反应条件为: 95 预变性 3min、接 94 变性 1min、55 复性 1min、72 延伸 2min, 30 个循环后 72 温育 6min。PCR 扩增产物由上海生物工程技术公司进行基因序列测定。

**1.6.3 *gyrB* 基因序列的 PCR 扩增与测序** *gyrB* 基因 PCR 扩增的两个引物分别为: UP1(正向引物): 5'-GAA GTC ATC ATG ACC GTT CTG CAY GCN GGN GGN AAR TTY GA-3', UP2r(反向引物): 5'-AGC AGG GTA CGG ATG TGC GAG CCR TCN ACR TCN GCR TCN GTCAT-3' (Yamamoto *et al*, 1995)。在 20 $\mu$ l 反应体系中含有: 无菌蒸馏水 14.4 $\mu$ l, 10 $\times$  PCR 缓冲液 2 $\mu$ l, 1.5mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.6 $\mu$ l, 4 $\times$  dNTP 混合物 0.4 $\mu$ l, 引物各 0.2 $\mu$ l, 2.5U/ $\mu$ l 的 *Taq* DNA 聚合酶 0.2 $\mu$ l, 模板 DNA 1 $\mu$ l。PCR 反应条件为: 94 预变性 5min, 接 94 变性 1min、57 复性 1min、72 延伸 2min、30 个循环, 然后 72 温育 7min。PCR 扩增产物由上海生物工程技术公司进行基因序列测定。

**1.6.4 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列系统发育树构建** 对分离菌的 16S rRNA 基因和 *gyrB* 基因序列通过 NCBI 的 Blast 检索系统进行序列同源性分析, 并使用 Clustal X 软件与从 GenBank 数据库中获得的序列相似性较高的菌株的序列进行多序列匹配排列 (Multiple Alignments), 采用 MEGA3 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, MEGA) 软件构建系统发生树, 采用邻接法 (neighbor joining method) 建树方法, 并通过 Bootstrap 法 (1000 次重复) 检验。

### 1.7 菌种分类位置确定

根据细菌形态、培养及理化特性测定的结果, 主要依据《Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed》(Holt *et al*, 1994)、《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology》(Krieg *et al*, 1984)、《Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish》(Austin *et al*, 1999) 及有关资料, 并结合细菌 16S rRNA 和 *gyrB* 基因系统发育学分析的结果, 进行分离菌的种属分类位置判定。

### 1.8 药物敏感性测定

经鉴定后的菌株, 用常规琼脂扩散 (K-B) 法进行对常用抗菌类药物的敏感性测定, 以是否出现抑菌

圈及抑菌圈直径大小作为敏感与耐药的判定指标 (叶应妩等, 1997)。

## 2 结果

### 2.1 虾组织中的细菌分离

在被检凡纳滨对虾的肝胰腺中, 均存在大量革兰氏阴性、散在或成双排列、两端钝圆、无芽孢、大小多在 (0.8—1.0)  $\mu$ m  $\times$  (1.2—2.0)  $\mu$ m 的短杆菌 (个别菌体稍弯曲)。自被检凡纳滨对虾的肝胰腺中均分离到了优势生长的同种细菌, 随机取 4 个菌落做纯培养, 其编号为: JGB080708-1—4。

### 2.2 分离菌的致病性

供试菌株 (JGB080708-1) 浸浴感染凡纳滨对虾、中国对虾、日本对虾仔虾后, 供试虾于感染后 48h 内全部死亡, 3 组对照仔虾在 48h 观察期内均正常; 取感染死亡仔虾进行细菌学检验, 结果均检验并分离到大量纯一的同供试菌株 (JGB080708-1) 在形态及菌落特征上相似的细菌, 理化特性表明为原感染菌。实验结果表明分离菌对凡纳滨对虾、中国对虾、日本对虾均具有强致病性。感染虾的发病死亡情况等如表 1 所示。

### 2.3 形态特征

4 株纯培养菌均为革兰氏染色阴性、球杆状、散在 (个别成双)、无芽孢, 与所检虾肝胰腺中细菌形态一致。菌株 (JGB080708-1) 经 EM 负染色标本检查, 菌体为着生极端单鞭毛 (图 1)。

### 2.4 培养及理化特性

4 株纯培养菌在 2216E 海水培养基上培养 24h 检查其菌落特征为圆形光滑、不透明、隆起、灰白色、边缘呈锯齿状、直径多在 1mm 左右, 48h 的菌落直径多在 1.5mm 左右, 生长良好; 在 TCBS 琼脂培养基上, 28 培养 24h 为圆形光滑、稍隆起、表面有光泽、直径多在 1.2mm 左右 (48h 多在 1.8mm 左右) 的绿色菌落, 菌落中间深绿色, 边缘不整齐, 生长良好; 在普通营养肉汤中, 28 培养 24h 检查呈轻度均匀混浊生长, 管底形成点状沉淀菌体 (摇动易消散)。酶活性及 KP 溶血实验结果表明, 4 株分离菌均具有淀粉酶、明胶酶、卵磷脂酶, 但不具有蛋白酶、脂肪酶活性, 且 4 株分离菌 KP 试验均呈阴性。其它主要理化性状的结果一致 (表 2)。

### 2.5 菌株血清效价及 K 抗原

玻板凝集和试管凝集反应结果表明分离菌具有明显的表面 K 抗原, 其凝集试验结果及血清抗体效价见表 3。

表 1 分离菌的感染试验结果  
Tab.1 Results of challenge test with isolates

供试虾	感染尾数	细菌浓度 (CFU/ml)	发病死亡时间及死亡率				
			6h	12h	24h	48h	
试验组	凡纳滨对虾	约 100	$2.5 \times 10^6$	约 30%	约 50%	100%	
		约 100	$5 \times 10^6$	约 50%	100%		
		约 100	$1 \times 10^7$	约 50%	100%		
	中国对虾	约 100	$2.5 \times 10^6$	约 20%	约 50%	100%	
		约 100	$5 \times 10^6$	约 50%	100%		
		约 100	$1 \times 10^7$	约 70%	100%		
	日本对虾	约 100	$2.5 \times 10^6$	约 20%	约 40%	约 80%	100%
		约 100	$5 \times 10^6$	约 35%	约 50%	100%	
		约 100	$1 \times 10^7$	约 50%	100%		
对照组	凡纳滨对虾	约 50	0				无死亡
	中国对虾	约 50	0				无死亡
	日本对虾	约 50	0				无死亡

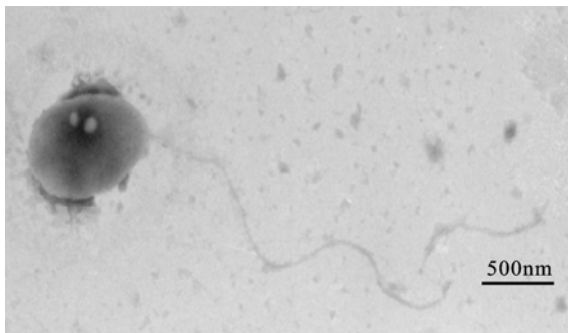


图 1 JGB080708-1 株电镜照片  
Fig.1 Electron micrograph of JGB080708-1  
比例尺为 500nm

## 2.6 16S rRNA 和 gyrB 基因序列与系统发育学

分离菌(JGB080708-1)所扩增的 16S rRNA 基因序列长度为 1456bp(GenBank 登录号: GQ205448); 所扩增的 gyrB 基因序列长度为 1195bp(GenBank 登录号: GQ205453)。

将分离菌(JGB080708-1)所扩增的 16S rRNA 基因序列在 NCBI 通过 Blast 进行同源性检索, 结果检索出的均为弧菌属细菌的 16S rRNA 基因序列, 主要包括副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)、溶藻酸弧菌(*V. alginolyticus*)、坎氏弧菌(*V. campbellii*)、需钠弧菌(*V. natriegens*), 分离菌(JGB080708-1)的 16S rRNA 基因序列与这些弧菌的相似性均在 98%—99%, 相似性均能达到种的要求。选择爱德华氏菌 16S rRNA 基因序列(登录号: DQ233654)作为外围菌进行系统发育学分析, 其系统发育树如图 2 所示。

将分离菌(JGB080708-1)所扩增的 gyrB 基因序列在 NCBI 通过 Blast 进行同源性检索, 结果检索出的均为弧菌属细菌的 gyrB 基因序列, 主要包括副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*), 相似性在 98%—99%; 另外检索出的有溶藻酸弧菌(*V. alginolyticus*)、坎氏弧菌(*V. campbellii*)、需钠弧菌(*V. natriegens*)及轮虫弧菌(*V. rotiferianus*), 分离菌的 gyrB 基因序列与这些弧菌的相似性在 86%—89%, 未达到种的要求。选择嗜水气单胞菌 gyrB 基因序列(登录号: FJ608553)作为外围菌进行系统发育学分析, 其系统发育树如图 3 所示。

## 2.7 菌种分类位置

结合形态观察、普通的生理生化特征、16S rRNA 及 gyrB 基因的分子鉴定结果, 判定分离菌为弧菌属(*Vibrio* Pacini 1854)的副溶血弧菌[*Vibrio parahaemolyticus* (Fujino *et al* 1951) Sakazaki Nakamura and Takizawa 1963]。

## 2.8 药物敏感性

供试 4 株副溶血弧菌对测定的 49 种抗菌类药物的药物敏感性试验结果见表 4。

## 3 讨论与结论

在致病性的弧菌中, 除了霍乱弧菌外, 副溶血弧菌是相对研究的较多和较深入的弧菌, 可引起人和鱼、虾、蟹、贝等水产养殖动物的感染发病, 因此也被认为是一种人与水产养殖动物共染的病原菌。在鱼类, 副溶血弧菌可引起海鲷、大黄鱼、石斑鱼等感染发病(许斌福等, 2002; 林星等, 1998); 在甲壳类, 该

菌可引起斑节对虾、对虾、龙虾、河蟹、锯缘青蟹等的感染发病(毛芝娟等, 2001; 万夕和等, 2000; 刘荭等, 1999; 李文宽等, 1999; 宋春华等, 1998); 在贝类, 该菌可引起九孔鲍和文蛤等的感染发病(张朝霞等, 2001; 刘军义等, 1996); 副溶血弧菌在人的感染主要为肠炎或食物中毒, 呈世界性分布, 发病常表现有季

节性, 多与食用带菌海产品、直接或间接地接触带菌海产品等有关。本次通过对呈毁灭性死亡的凡纳滨对虾肝胰脏抹片直接染色发现细菌, 有规律地自肝胰脏分离到形态特征一致的优势生长的细菌, 对健康凡纳滨对虾、中国对虾及日本对虾进行人工感染试验, 48h 即可引起供试虾的全部死亡并回收到原感染菌,

表 2 分离菌的理化特性结果  
Tab.2 Physiological and biochemical characteristics of isolates

特性	分离菌(4 株)				副溶血弧菌 <sup>a</sup>	特性	分离菌(4 株)				副溶血弧菌 <sup>a</sup>
	1	2	3	4			1	2	3	4	
37 生长	+	+	+	+	+	糊精	+	+	+	+	+
氧化酶	+	+	+	+	+	卫茅醇	-	-	-	-	-
接触酶	-	-	-	-	-	纤维二糖	+	+	+	+	-
H <sub>2</sub> S 产生	+	-	-	+	-	α-甲基-D-葡萄糖苷	-	-	-	-	-
O-F 试验	F	F	F	F	F	乳糖	-	-	-	-	-
动力	+	+	+	+	+	甘露糖	+	+	+	+	+
葡萄糖: 产酸	+	+	+	+	+	果糖	-	-	-	-	-
产气	-	-	-	-	-	甲基红	-	-	-	-	[+]
山梨醇	-	-	-	-	-	V-P 试验	-	-	-	-	-
蜜二糖	-	-	-	-	-	吡啶	+	+	+	+	+
蔗糖	-	-	-	-	-	硝酸盐还原	+	+	+	+	+
鼠李糖	-	-	-	-	-	枸橼酸盐利用	+	+	-	+	+
阿拉伯糖	-	-	-	-	d	丙二酸盐利用	-	-	-	-	+
肌醇	-	-	-	-	-	醋酸盐利用	-	-	-	-	-
甘露醇	+	+	+	+	+	酒石酸盐利用	-	-	-	-	-
麦芽糖	+	+弱	+	+	-	黏液酸盐利用	-	-	-	-	-
木糖	-	-	-	-	-	β-半乳糖苷酶	-	-	-	-	-
苦杏仁苷	-	-	-	-	-	苯丙氨酸脱氨酶	-	-	-	-	-
山梨糖	-	-	-	-	-	NaCl 中生长: 0%	-	+弱	-	-	-
侧金盏花醇	-	-	-	-	-	1%	+	+	+	+	+
棉子糖	-	-	-	-	-	3%	+	+	+	+	+
七叶苷	-	-	-	-	-	6%	+	+	+	+	+
水杨苷	+	+	+	+	-	O/129 敏感性: 10 μg	+	+	+	+	+
半乳糖	+弱	-	-	-	+	150 μg	+	+	+	+	+
海藻糖	+	+	+	+	+						

注: “+”示阳性,“-”示阴性,“F”示发酵型,“d”示 11%—89%的菌株为阳性,“-”示在原文中无记载。上角标<sup>a</sup>指表中数据取自《Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed》(Holt *et al*, 1994)

表 3 分离菌凝集反应结果  
Tab.3 Results of the agglutination test

抗血清(JGB080708-1)	玻板凝集原	试管凝集原	
		OK	O
OK-抗血清	++	7log <sub>2</sub> (1 : 128X)**	2log <sub>2</sub> (1 : 4X)
O-抗血清	+(弱)	3log <sub>2</sub> (1 : 8X)	7log <sub>2</sub> (1 : 128X)
生理盐水	-	0log <sub>2</sub> (< 1 : 2X)	0log <sub>2</sub> (< 1 : 2X)

注: ++表示明显凝集; - 表示不凝集; \*\*表示凝集效价

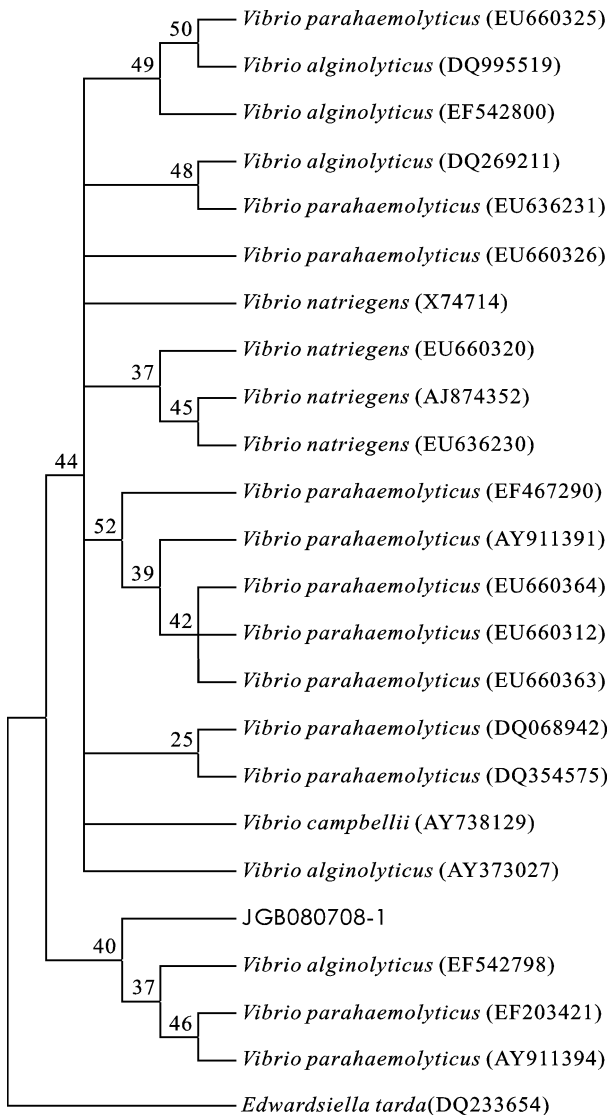


图2 JGB080708-1 株 16S rRNA 基因序列系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree based on JGB080708-1 16S rRNA gene sequences

注: 图中 EU660325—DQ233654 为菌株在 NCBI 的登录号, 数字为自举值。图中黑体是本文研究的菌株编号

表明副溶血弧菌对于凡纳滨对虾、中国对虾及日本对虾均具有非常强的致病性, 且为本次在江苏赣榆地区引起养殖凡纳滨对虾毁灭性死亡的病原菌。

本次对于分离菌的鉴定, 在进行常规的形态特征、理化特性等生物学性状检验的基础上, 用 PCR 方法同时进行了 16S rRNA 和 *gyrB* 基因的分子鉴定, 比较了 16S rRNA 和 *gyrB* 两种基因对副溶血弧菌的鉴别能力。细菌核糖体中的 16S rRNA 常用于细菌的鉴定与分类研究, 本次研究的分离菌(JGB080708-1)16S rRNA 基因序列在 NCBI 通过 blast 检索, 检索结果主要为副溶血弧菌、溶藻酸弧菌、坎氏弧菌、需

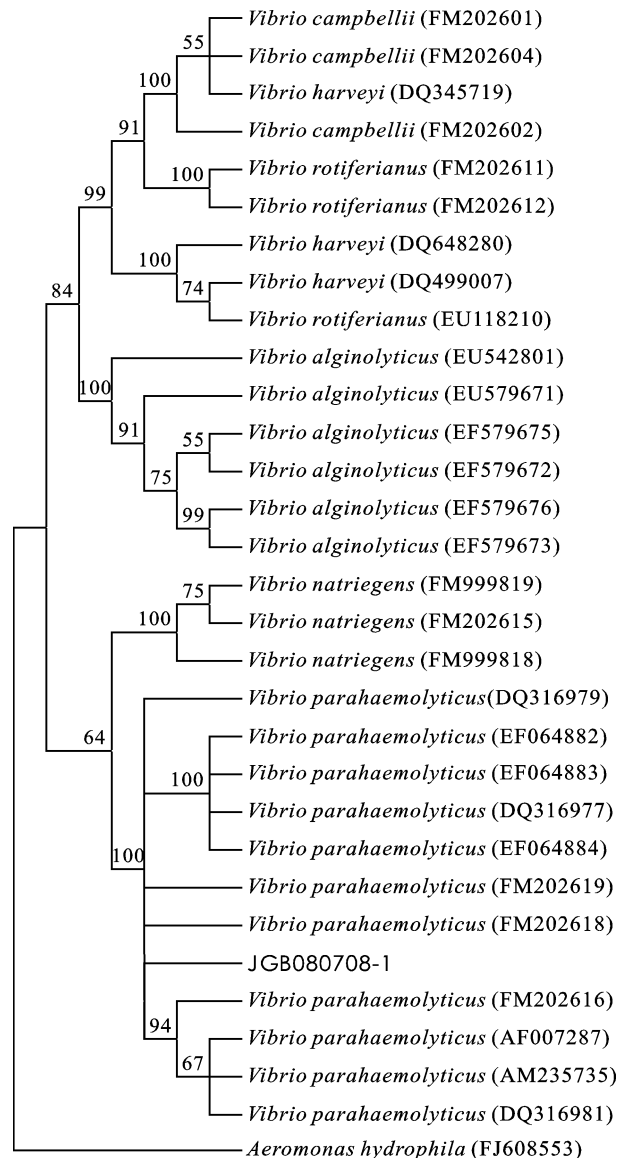


图3 JGB080708-1 株 *gyrB* 基因序列系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree based on JGB080708-1 *gyrB* gene sequences

注: 图中 FM202601—FJ608553 为菌株在 NCBI 的登录号, 数字为自举值。图中黑体是本文研究的菌株编号

钠弧菌, 且与这些弧菌的相似性均达到了 98%—99%, 系统发生树(图 2)中 JGB080708-1 与副溶血弧菌和溶藻酸弧菌聚为一个类群, 本研究表明用 16S rRNA 基因序列难于将分离菌鉴定到种; 而编码 DNA 解旋酶 B 亚单位的基因(*gyrB* 基因)普遍存在于各种细菌中, 其序列具有保守性和变异性, 在以核苷酸序列为基础的细菌分类及鉴别研究中, 可作为靶分子, 其显著优点是基因进化率较快, 碱基替换频率较高(侯晓丽等, 2005), 本次研究的分离菌(JGB080708-1)*gyrB* 基因序列在 NCBI 通过 blast 检索, 检索结果主要为副溶

表4 药敏纸片名称和规格及病原副溶血弧菌的药物敏感性  
Tab.4 Name and type of discs and antimicrobial sensitivity of pathogenic *V. parahaemolyticus*

序号	名称	规格 ( $\mu\text{g}/\text{片}$ )	抑菌圈直径 (mm)	药物敏感性	序号	名称	规格 ( $\mu\text{g}/\text{片}$ )	抑菌圈直径 (mm)	药物敏感性
1	青霉素 G	10	0	R	26	新生霉素	30	25	S
2	氨苄青霉素	10	0	R	27	万古霉素	30	15	S
3	羧苄青霉素	100	12	R	28	头孢噻吩	30	17	HS
4	苯唑青霉素	1	0	S	29	强力霉素	30	32	HS
5	先锋	30	25	HS	30	四环素	30	27	HS
6	先锋必	30	37	HS	31	氯霉素	30	35	HS
7	复达欣	30	38	HS	32	红霉素	15	27	HS
8	麦迪霉素	30	16	S	33	痢特灵	300	22	HS
9	林可霉素	2	8	S	34	头孢拉啶	30	28	HS
10	呋喃妥因	300	26	HS	35	氧氟沙星	5	32	HS
11	氟罗沙星	5	35	HS	36	壮观霉素	100	30	HS
12	菌必治	30	38	HS	37	氟哌酸	10	34	HS
13	复方新诺明	1.25/23.75	30	HS	38	环丙沙星	5	36	HS
14	洛美沙星	10	34	HS	39	利福平	5	22	HS
15	氨曲南	30	44	HS	40	链霉素	10	32	HS
16	舒普深	75/75	36	HS	41	卡那霉素	30	28	HS
17	阿奇霉素	15	32	HS	42	阿米卡星	30	26	HS
18	克拉霉素	15	28	HS	43	头孢氨苄	30	23	R
19	左氟沙星	5	34	HS	44	阿洛西林	75	25	抑菌
20	克林霉素	2	20	R	45	罗红霉素	15	26	HS
21	依诺沙星	10	33	HS	46	恩诺沙星	10	36	HS
22	杆菌肽	0.04	0	R	47	甲氧胺嘧啶	5	30	HS
23	庆大霉素	120	30	HS	48	阿莫西林	10	0	S
24	妥布霉素	10	28	HS	49	米诺环素	30	30	HS
25	新霉素	30	30	HS					

血弧菌、溶藻酸弧菌、坎氏弧菌、需钠弧菌及轮虫弧菌,分离菌与这些弧菌的 *gyrB* 基因序列相似性除了与副溶血弧菌达到 98%—99%外,与其它弧菌相似性均在 90%以下,且在系统发生树(图 3)中也明显地与副溶血弧菌聚为一个分支。本研究表明在本次副溶血弧菌的检测和鉴别方面 *gyrB* 基因比 16S rRNA 基因更具优越性。

弧菌的致病性取决于弧菌与宿主细胞间的相互作用,致病过程也包括黏附、侵袭、体内增殖及产生毒素等,而这些又与弧菌产生的各种毒力因子有关。目前已发现的弧菌毒力因子有外毒素(Exotoxin)、蛋白酶(Protease)、荚膜(Capsule)、载铁体(Siderophore)及外膜蛋白(Outer membrane protein, OMP)等。本次

通过对分离鉴定的副溶血弧菌胞外酶及 KP 溶血活性的检测表明 4 株供试菌均具有淀粉酶、明胶酶、卵磷脂酶,但不具有蛋白酶、脂肪酶活性,且 4 株分离菌 KP 试验均呈阴性,该研究结果可为水产动物副溶血弧菌的致病机理的深入研究提供参考。

此外,细菌的 K 抗原成分在病原细菌的致病作用中常发挥着重要作用,可构成病原细菌的重要毒力因子,主要表现在抵抗机体免疫系统吞噬细胞的吞噬作用、对机体细胞的黏附发挥毒力作用、利于细菌向机体内部广为深入扩散的侵袭作用等方面。本次经用 4 株供试菌制备的 OK、O 凝集原与用代表菌株 JGB080708-1 所制备的 OK、O 抗血清做对应及交叉的凝集抗体效价测定,表明 4 株供试菌均存在不耐热

的 K 抗原, 这一结果在对该菌进行血清流行病学调查、免疫血清学检验及致病机理研究方面具有一定的指导意义。

### 参 考 文 献

- 万夕和, 裴鸿生, 沈怀舜等, 2000. 江苏南部河蟹幼苗培育系统中致病性弧菌的分离诊断. 水产养殖, (1): 19—21
- 毛芝娟, 卓华龙, 杨季芳等, 2001. 锯缘青蟹细菌性传染病的病原菌研究. 台湾海峡, 20(2): 187—192
- 东秀珠, 蔡妙英, 2001. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 106—120
- 叶应妩, 王毓三, 1997. 全国临床检验操作规程(第二版). 南京: 东南大学出版社, 553—562
- 刘 荭, 王 侃, 彭锦新等, 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
- 刘军义, 陈振鸿, 阎 冰等, 1996. 文蛤副溶血弧菌病的研究. 微生物学杂志, 16(4): 1—5
- 许斌福, 林能锋, 杨金先等, 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): 174—177
- 李文宽, 于 翔, 闻秀荣等, 1999. 辽宁地区河蟹暴发性流行病病原研究. 水产科学, 18(4): 10—13
- 杨正时, 房 海, 2003. 人及动物病原细菌学. 石家庄: 河北科学技术出版社, 1550—1610
- 沈文英, 阳会军, 尹军霞, 2004. 南美白对虾的病害及防治研究现状. 水利渔业, 24(1): 58—60
- 沈关心, 周汝麟, 1998. 现代免疫学试验技术. 武汉: 湖北科学技术出版社, 68—73
- 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
- 张朝霞, 王 军, 张蕉南等, 2001. 东山九孔鲍细菌性疾病研究. 台湾海峡, 20(2): 193—199
- 陈爱平, 2003. 2002 年我国南美白对虾养殖及病害情况综述(中). 科学养鱼, 11: 41—42
- 林 星, 肖懿哲, 1998. 大黄鱼弧菌病的诊治. 水产学报, 22(4): 29—30
- 周永灿, 张 木, 陈学芬等, 2003. 养殖对虾细菌性红体病的初步研究. 海洋科学, 27(5): 61—65
- 侯晓丽, 陈 智, 2005. 分类及鉴别细菌的新靶标——*gyrB* 基因. 国外医学·流行病学传染病学分册, 32(1): 38—41
- 樊景凤, 宋立超, 王 斌等, 2006. 一株引起凡纳对虾红体病的病原菌——副溶血弧菌的初步研究. 海洋科学, 30(4): 40—44
- Austin B, Austin D A, 1999. Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish. Third (Revised) Edition. Praxis Publishing Ltd, Chichester, UK, 103—119
- Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A *et al*, 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition. Baltimore: Williams and Wilkins, 192, 253, 256—257
- Krieg N R, Holt J G, 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 1. London: Williams and Wilkins, Baltimore, 545—548
- Martin F Polz, Collen M Cavanaugh, 1998. Bias in template to product ratios in multitemplate PCR. Appl Environ Microbiol, 64(10): 3724—3730
- Yamamoto S, Harayama S, 1995. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. Appl and Environ Microbiol, 61(3): 1104—1109



## PHENOTYPIC AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PATHOGENIC *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* ISOLATED FROM *PENAEUS VANNAMEI*

ZHANG Xiao-Jun<sup>1</sup>, CHEN Cui-Zhen<sup>2</sup>, YAN Bin-Lun<sup>1</sup>, FANG Hai<sup>2</sup>, QIN Guo-Min<sup>1</sup>, XU Jing<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Oceanic Biotechnology of Jiangsu, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang, 222005;

2. Department of Animal Science, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao, 066600)

**Abstract** A mass mortality of cultured *Litopenaeus vannamei* broke out during summer in a local farm in northern Jiangsu Province. Syndromes include swimming near water surface and the pond walls, with black gill and opaque muscle. Tissue samples were taken in the liver, and strong pathogenicity to *L. vannamei*, *P. japonicus* and *P. chinensis* were determined by immersion. The phenotypic characteristics of isolates (4 strains) were examined in morphology, physiology and biochemistry; the 16S rRNA and *gyrB* were amplified by PCR and compared with sequences in databases, from which molecular phylogenetic trees were constructed. The sequenced 16S rRNA gene of strain JGB080708-1 (GenBank accession No.GQ205448) is 1456bp in length, the sequenced *gyrB* gene of strain JGB080708-1 (GenBank accession No.GQ205453) is 1195bp in length. Results of phylogenetic analysis on 16S rRNA and *gyrB* genes revealed a high homogeneity between the isolates and *V. parahaemolyticus* from GenBank database. Comparison in method between 16S rRNA and *gyrB* genes confirms that *gyrB* gene analysis is more useful. The isolates were identified as *V. parahaemolyticus* [(Fujino *et al* 1951) Sakazaki Nakamura and Takizawa 1963] of *Vibrio* (Pacini 1854) in phenotypic and molecular characteristics. Test on the activity of extracellularase and hemolysin shows that the isolates could produce diastase, gelatinase, and lecithinase, but no proteinase and lipase, and KP haemolysis was negative. Examination of K-antigen and agglutination titers show that the isolates have K-antigen, and the titer of OK-agglutininogen with OK-antiserum and O-agglutininogen with O-antiserum was the same (7log<sub>2</sub>); the titer of OK-antiserum with O-agglutininogen and O-antiserum with OK-agglutininogen was 2log<sub>2</sub> and 3log<sub>2</sub>, respectively. The drug resistance of isolates to 49 antimicrobial agents was detected, the results show that the isolates are resistant to penicillin G, ampicillin, oxacillin, lincomycin, bacitracin and amoxicillin.

**Key words** *Litopenaeus vannamei*, *Vibrio parahaemolyticus*, 16S rRNA gene, *gyrB* gene