

# 海南养殖方斑东风螺暴发性疾病 病原分离鉴定及药敏分析

刘巧红 王世锋 蔡 岩 张 晗 谢珍玉 郭伟良 冯永勤 周永灿\*

(热带生物资源可持续利用省部共建国家重点实验室培育基地 海南省热带水生生物技术重点实验室,海口 570228)

**摘 要** 2011 年 4 月,从海南工厂化养殖的患病方斑东风螺体内分离得到 3 株优势菌,经感染实验确定菌株 DFL11-01 为该暴发性疾病的致病菌,其对方斑东风螺注射感染的  $LD_{50}$  为  $2.6 \times 10^6$  CFU/g。采用常规形态和生理生化特征,对菌株 DFL11-01 进行鉴定,并以 16S rRNA 基因序列同源性分析法对所有 3 株分离菌进行同源性分析,结果表明,3 株细菌均为哈氏弧菌 *Vibrio harveyi*。药敏试验结果表明,菌株 DFL11-01 对阿洛西林、利福平等 15 种药物耐药;对头孢他啶、四环素等 3 种药物中介敏感;对氨苄西林、恩诺沙星、头孢三嗪、哌拉西林、左旋氧氟沙星等 5 种药物敏感。

**关键词** 方斑东风螺;哈氏弧菌;分离鉴定;致病性;药敏分析

中图分类号 S944.4<sup>+</sup>9 文献标志码 A 文章编号 1000-7075(2014)01-0074-08

## Isolation, identification and antibiotic sensitivity analysis of bacterial pathogen from cultured *Babylonia areolata* with fulminant infectious disease in Hainan

LIU Qiao-hong WANG Shi-feng CAI Yan ZHANG Han XIE Zhen-yu  
GUO Wei-liang FENG Yong-qin ZHOU Yong-can\*

(State Key Laboratory Breeding Base for Sustainable Utilization of Tropical Bioresource,  
Key Laboratory of Tropical Aquatic Biotechnology of Hainan Province, Haikou 570228)

**ABSTRACT** Three strains of pathogenic bacteria, DFL11-01, DFL11-02 and DFL11-03 were isolated from the diseased *Babylonia areolata* cultured in Hainan Province, and were identified as *Vibrio harveyi* by regular physiological and biochemical observations and 16S rRNA gene sequence phylogenetic analysis. The DFL11-01 was identified as the causative agent *via* artificial infection test, and the  $LD_{50}$  value was  $2.6 \times 10^6$  CFU/g. Drug sensitivity tests showed that strain DFL11-01 was highly sensitive to ampicillin, ceftriaxone, piperacillin, enrofloxacin and lebofloxacin; mildly sensitive to neomycin, tetracycline, and ceftazidime, but resistant to 15 kinds of antibiotics including azlocillin, rifampir and cefaclor.

**KEY WORDS** *Babylonia areolata*; *Vibrio harveyi*; Isolation and identification; Pathogenicity; Antibiotic sensitivity analysis

国家海洋公益性项目(201205025)、海南省重点科技计划项目(ZDXM20110010)和海南省自然科学基金(312069)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: zychnu@163.com, Tel: (0898)66279214

收稿日期:2012-12-17;接受日期:2013-06-30

作者简介:刘巧红(1988-),女,硕士研究生,主要从事水产健康养殖与病害控制研究。E-mail: lqh5070@163.com

方斑东风螺 *Babylonia areolata* 俗称花螺、香螺、白带螺,隶属腹足纲 Gastropoda、新腹足目 Neogastropoda、蛾螺科 Buccinidae(魏永杰等 2007),在我国主要分布于福建、广东、广西和海南等南方省份。与分布在我国的其他几种东风螺相比,方斑东风螺具有个体大、适应栖息环境能力强、生长速度快等优点;其肉质鲜美、营养丰富,具有很高的食用价值和经济价值(刘永等 2005;冯永勤等 2006)。有关其生物学特性、苗种繁育、工厂化养殖和无公害养殖等方面已有较多的研究报道(裴琨 2006;王国福等 2006;陈建华等 2008;冯永勤等 2008)。

近年来,随着方斑东风螺养殖业的迅速发展,疾病的种类越来越多,危害也日益严重,已报道的方斑东风螺疾病病原已有近 10 种,如:浮游期纤毛虫病(黄海立等 2007;郑养福 2007),稚螺和幼螺养殖期肉壳分离病(王建钢等 2011),养成期单孢子虫病(彭景书等 2011)、吻管水肿病(黄郁葱等 2009)、肿吻病(张新中等 2010)等。2011 年 4 月,随着方斑东风螺养殖水温的升高,海南文昌等地工厂化养殖的方斑东风螺大面积暴发疾病,该病暴发速度快、病期短、死亡率高,对海南工厂化养殖方斑东风螺造成了严重影响。为了了解该病的病原及寻找合适的控制方法,作者对其病原进行了分离鉴定,并检测了该病原对一些常见抗生素类抗菌药物的敏感性。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

患病方斑东风螺:2011 年 4 月取自海南文昌某方斑东风螺工厂化养殖场,体重(2~4)g,选择具典型症状的患病个体,塑料袋充氧运回实验室后立即用于病原分离。

健康方斑东风螺:购自海南省文昌某方斑东风螺养殖场,选择体重为(3.0±0.5)g 的健康个体,无患病史。塑料袋充氧运回实验室,暂养于玻璃水族箱中(0.5m×0.4m×0.4m),玻璃水族箱底层覆沙约 5cm,暂养期间不投饵,连续充气,水温(25~28)℃,暂养 7 d 无异常后用于人工感染实验。

细菌生化鉴定管、药敏试纸及相关试剂均购自杭州微生物试剂有限公司。

### 1.2 病原菌的分离、纯化

取具有典型患病症状的方斑东风螺,用 75%酒精棉球擦拭体表后,于超净工作台以无菌操作分别从病螺的吻、肝胰脏、出水管、腹足等部位取样,划线于 TCBS 琼脂平板和 2216E 海水琼脂平板,30℃培养 24h 后,挑取形态特征一致的优势单菌落划线纯化。纯化后的优势菌株转至 2216E 海水液态培养基中,30℃培养(18~20)h 后保种于 80%无菌甘油中,于-80℃超低温冰箱保存备用。

### 1.3 人工感染实验

取-80℃保存的菌株经 2216E 海水液体培养基活化后扩大培养,离心收集菌体,用无菌生理盐水分别稀释成 $1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^6$  CFU/ml 的菌悬液备用。实验分为 4 个实验组和 1 个对照组,每组 20 只,设置 1 个重复。实验组以不同浓度的菌液对健康方斑东风螺进行腹足注射感染,注射量为 0.1 ml/只,对照组腹足注射等量无菌生理盐水。为模拟养殖场升温 and 闷热的环境,实验开始后在实验玻璃缸上方用保鲜膜覆盖并以加热棒对水体加热升温,水温升至 30℃后保持温度基本稳定。感染实验期间正常投喂新鲜小杂鱼,每隔 2 d 换水 1/3,连续 10d 观察并记录方斑东风螺,养殖情况和患病症状等,并取具典型症状的濒死方斑东风螺,从吻、肝胰脏、出水管、腹足等部位进行细菌的再分离。根据感染结果确定病原菌。

### 1.4 病原菌对方斑东风螺半数致死量(LD<sub>50</sub>)的测定

以 Reed-Muench 法测定病原菌注射感染方斑东风螺的 LD<sub>50</sub> 值(王满霞等 2005)。

### 1.5 病原菌形态观察及生理生化鉴定

对经感染试验确定的病原菌进行常规形态学检查,并结合《常见细菌系统鉴定手册》进行分类鉴定(东秀珠

等 2001)。鉴定指标包括革兰氏染色、精氨酸、赖氨酸、蔗糖、阿拉伯糖、葡萄糖、肌醇、甘露醇、蛋白胨水、葡萄糖水、0~10%NaCl 等。

## 1.6 16S rDNA 序列测定与分析

### 1.6.1 细菌模板 DNA 的提取

用接种环挑单一菌落悬浮于 50 $\mu$ l 无菌去离子水中,100 $^{\circ}$ C 水浴 5min,12 000 r/min 离心 20min,取上清液作为 PCR 反应所用模板。

### 1.6.2 PCR 的扩增和测序

选择 Xiang 等(2002)中的通用引物进行 PCR 扩增。引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。

Pf:5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'

Pr:5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT-3'

PCR 反应体系为 ddH<sub>2</sub>O 18.8 $\mu$ l,10 $\times$ PCR Buffer 2.5 $\mu$ l,10mmol/L dNTP 0.5 $\mu$ l,引物各 1 $\mu$ 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:94 $^{\circ}$ C 5min,94 $^{\circ}$ C 1min,55 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 2min,循环扩增 30 次,72 $^{\circ}$ C 10min。PCR 产物按 DNA 凝胶回收试剂盒说明书回收和纯化,将 PCR 产物连接到 pMD19-T 载体上,再转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞中,在含有 Amp/IPTG/X-Gal 的平板上进行蓝白斑筛选。挑取白斑扩大培养并进行 PCR 检测后,将阳性菌液送北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

## 1.7 系统发育树的构建

所测序列利用 GenBank 数据库中的 Blast 进行相似性比较。根据返回的结果,从 GenBank 数据库选取 9 条与所分析的细菌基因序列同源性较高的已知相关序列,利用 DNASTAR MegAlign 的 ClustalV 方法进行距离分析,同时利用 MEGA 4.0 进行 N-J 法构建系统进化树,并通过自举分析(Bootstrap)进行置信度检测,自举数集 1 000 次。

## 1.8 药敏试验

采用纸片扩散法。取 100 $\mu$ l 菌悬液(1 $\times$ 10<sup>9</sup>CFU/ml)均匀涂布于 2216 E 培养基平板,用无菌镊子将抗生素纸片轻轻贴在平板表面,30 $^{\circ}$ C 恒温培养 24 h,用游标卡尺测定其抑菌圈直径。

## 2 实验结果

### 2.1 患病症状及病原分离纯化

病螺侧卧或倒翻在养殖池的沙面上,其外壳完整,但腹足发黑,部分病螺还可见吻部红肿,活力明显下降,对外界刺激反应不敏感,不潜沙、不摄食。从不同患病个体的不同部位共分离得到优势菌 3 株:DFL11-01、DFL11-02 和 DFL11-03,其中,菌株 DFL11-01 分离自病螺的肝胰脏,其含量约占该平板总菌量的 85%;DFL11-02 分离自病螺的吻部,其含量约占该平板总菌量的 90%;DFL11-03 分离于鳃部,其含量约占该平板总菌量的 65%。不过,3 株优势菌的菌落形态相似,在普通海水固体培养基上 30 $^{\circ}$ C 培养 24h 的菌落呈淡乳白色,圆形,中央微凸,不透明,湿润,直径(1.5~2.0)mm;在 TCBS 培养基上菌落呈黄色,圆形,中央微凸,不透明,湿润,直径(2.0~3.0)mm。3 株细菌经进一步纯化培养后,-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

### 2.2 人工感染实验结果

取分离得到的 3 株优势菌株分别对健康方斑东风螺进行人工感染,结果表明(表 1),菌株 DFL11-01 注射浓度达到 1 $\times$ 10<sup>7</sup> CFU/ml 时,方斑东风螺开始出现死亡;注射浓度达到 1 $\times$ 10<sup>9</sup> CFU/ml 时,感染组方斑东风螺在 18h 内全部不钻沙,少数出现吻部肿大,触摸后腹足收缩慢,反应迟钝,且在感染后 3d 内全部死亡。菌株 DFL11-02 在注射感染浓度为 1 $\times$ 10<sup>8</sup> CFU/ml 时,10d 内实验方斑东风螺死亡率仅为 5%;感染浓度

$1 \times 10^7$  CFU/ml 及以下时,实验螺均 100% 成活。菌株 DFL11-03 注射感染浓度为  $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^7$  CFU/ml 时,10d 内实验方斑东风螺死亡率分别仅为 5% 和 2.5%;感染浓度为  $1 \times 10^6$  CFU/ml 时,实验螺 100% 成活。对照组正常,未见发病。从感染 DFL11-01 患病的方斑东风螺的肝胰脏等部位进行细菌分离,得到的菌株与原感染菌的形态相同,表明菌株 DFL11-01 为引起该养殖方斑东风螺患病的病原菌。

### 2.3 病原菌感染方斑东风螺的 LD<sub>50</sub> 值

病原菌 DFL11-01 的原始浓度是  $1.0 \times 10^9$  CFU/ml,经 10 倍梯度稀释后对健康方斑东风螺进行注射感染,死亡率见表 1。按 Reed-Muench 法计算 DFL11-01 的 LD<sub>50</sub> 为  $2.6 \times 10^6$  CFU/g;由于菌株 DFL11-02、DFL11-03 的感染结果未能达到 Reed-Muench 法计算 LD<sub>50</sub> 的要求,未计算其 LD<sub>50</sub>。

表 1 DFL11-01、DFL11-02、DFL11-03 对健康方斑东风螺注射感染的结果

Table 1 Injected infection of DFL11-01,DFL11-02 and DFL11-03 on healthy *B. areolata*

菌株编号 Strain	菌液密度 Concentration of bacteria (CFU/ml)	组别 Group	数量(只) Number of samples	感染不同时间死亡数(只) Death number at different day					总数(只) Total number		累计总数(只) Cumulative number		死亡率 Mortality (%)
				2d	3d	5d	8d	10d	成活数 Number of survival	死亡数 Number of deaths	成活数 Number of survival	死亡数 Number of deaths	
DFL11-01	$1 \times 10^9$	1	20	5	15	0	0	0	0	40	0	64	100
		2	20	7	13	0	0	0					
	$1 \times 10^8$	1	20	2	1	5	1	0	19	21	19	24	55.8
		2	20	3	3	2	4	0					
	$1 \times 10^7$	1	20	0	0	0	1	0	37	3	56	3	5.1
		2	20	0	0	1	1	0					
$1 \times 10^6$	1	20	0	0	0	0	0	40	0	96	0	0	
	2	20	0	0	0	0	0						
DFL11-02	$1 \times 10^9$	1	20	1	0	0	0	0	38	2	38	4	9.5
		2	20	0	1	0	0	0					
	$1 \times 10^8$	1	20	0	0	1	0	0	38	2	76	2	2.6
		2	20	1	0	0	0	0					
	$1 \times 10^7$	1	20	0	0	0	0	0	40	0	116	0	0
		2	20	0	0	0	0	0					
$1 \times 10^6$	1	20	0	0	0	0	0	40	0	156	0	0	
	2	20	0	0	0	0	0						
DFL11-03	$1 \times 10^9$	1	20	0	2	0	0	0	37	3	37	6	14
		2	20	1	0	0	0	0					
	$1 \times 10^8$	1	20	1	0	0	0	0	38	2	75	3	3.8
		2	20	0	0	1	0	0					
	$1 \times 10^7$	1	20	0	1	0	0	0	39	1	114	1	0.9
		2	20	0	0	0	0	0					
$1 \times 10^6$	1	20	0	0	0	0	0	40	0	154	0	0	
	2	20	0	0	0	0	0						
对照 Control	0	1	20	0	0	0	0	0	40	0	40	0	0
		2	20	0	0	0	0	0					

## 2.4 病原菌形态观察及生理生化鉴定

对致病性菌株 DFL11-01 的形态观察及生理生化鉴定结果表明(表 2),该株细菌为革兰氏阴性菌,在 TCBS 培养基上生长良好,需  $\text{Na}^+$  才能生长,10% 以上 NaCl 胨水中不生长;对赖氨酸脱羧,精氨酸不脱羧;对 1% 蔗糖、1% 甘露糖、1% 蛋白胨水反应阳性;对肌醇、阿拉伯糖、1% 葡萄糖水等反应阴性,这些特性与《常见细菌系统鉴定手册》对哈维氏弧菌的描述基本一致(东秀珠等 2001),初步认为菌株 DFL11-01 为哈维氏弧菌。

表 2 菌株 DFL11-01 的生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of pathogen DFL11-01

指标 Item	菌株 DFL11-01 Strain DFL11-01	哈氏弧菌 <i>V. harveyi</i>
革兰氏染色 Gram stain	—	—
1%NaCl 蛋白胨水 1%NaCl protein peptone water	+	+
1%NaCl 葡萄糖水 1%NaCl glucose peptone water	—	—
无 NaCl 胨水 peptone water without NaCl	—	—
1%NaCl 胨水 1%NaCl peptone water	+	+
3%NaCl 胨水 3%NaCl peptone water	+	+
6%NaCl 胨水 6%NaCl peptone water	+	+
8%NaCl 胨水 8%NaCl peptone water	+	—
10%NaCl 胨水 10%NaCl peptone water	—	—
精氨酸脱羧酶 Arginine decarboxylase	—	—
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	+	+
1%NaCl 葡萄糖 1%NaCl glucose	—	—
1%蔗糖 1% sucrose	+	+
1%甘露糖 1% mannose	+	+
阿拉伯糖 Arabinose	—	—
肌醇 Inositol	—	—

注:“+”:阳性;“—”:阴性

Notes: “+” is positive; “—” is negative

## 2.5 16S rDNA 序列测定结果

利用细菌 16S rDNA 通用引物对分离的 3 株优势菌进行 PCR 扩增,3 株菌均可扩增出长约 1.5kb 的目的 DNA 片段,且亮度明显,见图 1。挑选阳性克隆菌落送至华大基因科技有限公司测序,结果得到长度为(1 513~1 521)bp 的 DNA 序列。

## 2.6 系统进化树构建

将序列提交至 GenBank 进行同源性比对,发现 3 株优势菌的同源性为 99.2%~99.9%,与其中收录的哈氏弧菌同源性最高达 99.9%,与竹荚鱼弧菌 *V. trachuri* 同源率最低,为 96%。选取本研究分离的 3 株弧菌以及与其同源率较高的 4 株哈氏弧菌、4 株弧菌属其他种类细菌和 1 株嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila* 菌株,利用 DNASTAR MegAlign 的 ClustalV 方法进行距离分析,结果见图 2。利用 MEGA 4.0 进行 N-J 法构建系统进化树,结果见图 3。图 2 和图 3 的结果均表明,本研究分离的 DFL11-01、DFL11-02、DFL11-03 与哈氏弧菌自然聚为一支,结合形态及生理生化鉴定结果,可将该 3 株从患病方斑东风螺中分离的细菌均鉴定为哈氏弧菌。

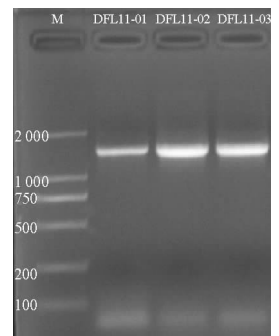


图 1 16S rDNA PCR 扩增结果

Fig. 1 Result of 16S PCR amplification of DFL11-01, DFL11-02 and DFL11-03

		同源率 Percent Identity													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
差异 Divergence	1	■	99.9	99.9	99.3	99.6	99.7	98.9	98.4	97.8	97.8	98.4	84.9	1	DEF11-01
	2	0.1	■	100.0	99.5	99.6	99.7	98.9	98.5	97.8	98.4	98.5	84.9	2	<i>V. harveyi</i> (FJ605242)
	3	0.1	0.0	■	99.5	99.6	99.7	98.9	98.5	97.8	98.4	98.5	84.9	3	<i>V. harveyi</i> (GQ180186)
	4	0.3	0.1	0.1	■	99.3	99.2	98.5	98.0	97.4	97.9	98.3	86.6	4	<i>V. harveyi</i> (FR687007)
	5	0.1	0.4	0.4	0.4	■	99.6	98.7	98.3	97.5	98.0	98.3	84.8	5	DEF11-02
	6	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	■	98.8	98.2	97.6	97.6	98.3	85.1	6	DEF11-03
	7	0.5	0.5	0.5	0.6	0.6	0.5	■	97.6	96.6	97.4	97.2	83.9	7	<i>V. harveyi</i> (DQ304557)
	8	1.1	1.1	1.1	1.2	1.3	1.3	1.4	■	99.3	99.6	99.9	87.4	8	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (EU660326)
	9	1.5	1.4	1.4	1.5	1.8	1.7	1.8	0.4	■	99.3	97.4	85.0	9	<i>Vibrio alginolyticus</i> (JK913856)
	10	1.5	1.3	1.3	1.5	1.7	1.7	1.7	0.4	0.4	■	99.7	85.1	10	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (EF467290)
	11	1.1	1.0	1.2	0.9	1.3	1.3	1.5	0.1	0.5	0.3	■	85.5	11	<i>Vibrio alginolyticus</i> (AF513447)
	12	11.5	11.5	11.5	11.6	11.6	11.6	11.7	11.5	11.9	11.7	11.4	■	12	<i>A. hydrophila</i> (FJ599747)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		

图 2 DFL11-01、DFL11-02、DFL11-03 与相近病原的 16S rRNA 序列同源性分析结果  
 Fig. 2 Homology analysis of 16S rRNA sequence among DFL11-01, DFL11-02, DFL11-03 and some of their similar pathogenic bacteria

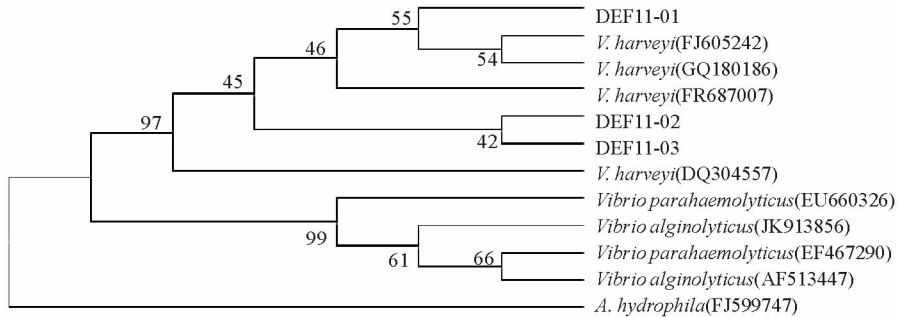


图 3 菌株 DFL11-01、DFL11-02、DFL11-03 与相近菌株 16S rRNA 基因系统进化树分析

Fig. 3 The phylogenetic tree of 16S rRNA gene of DFL11-01, DFL11-02, DFL11-03 and some of their similar pathogenic bacteria

### 2.7 病原菌的药敏试验结果

用纸片法测定 23 种抗菌药物对 DFL11-01 菌株的抗菌活性,结果表明(表 3),该菌株对 15 种药物耐药:阿洛西林、美洛西林、头孢克罗、丁胺卡那、新生霉素、链霉素、大观霉素、利福平、卡那霉素、妥布霉素、头孢肤脐、罗红霉素、乙酰螺旋霉素、氟苯尼考、杆菌肽;对 3 种药物中介敏感:头孢他啶、四环素、新霉素;仅对 5 种药物敏感:氨苄西林、恩诺沙星、头孢三嗪、哌拉西林、左旋氧氟沙星。

### 3 讨论

哈氏弧菌是海水中微生物区系的正常菌群,同时也是海水中常见的条件致病菌。近年来,由哈氏弧菌感染引起水产养殖动物疾病的报道越来越多,造成的危害也越来越严重,危害对象包括鱼类(吴后波等 1997;王保坤等 2002;覃映雪等 2004;梅冰等 2010)、虾蟹类(李军 1998)和贝类(刘连生等 2009;黄郁葱等 2009)等。梅冰等(2010)比较哈氏弧菌感染不同鱼类出现的患病症状,认为哈氏弧菌虽都可引起病鱼发生程度不同的溃疡,但因宿主不同,其症状还是存在明显差异,感染高体鲷 *Seriola dumerili* 主要表现为肠壁充血发炎且肛门有黏液样物流出等“肠炎病”症状(吴后波等 1997);感染斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides* 和花鲈 *Lateolabrax japonicus* 则出现尾鳍溃烂等“烂尾病”症状(梅冰等 2010;王保坤等 2002)。本研究对海南文昌患病方斑东风螺中所分离的病原与黄郁葱等(2009)从广东湛江患吻管水肿病的方斑东风螺中所分离的病原均为哈氏弧菌,但二者所表现的患病症状存在较大差异,前者主要表现为吻管一部分异常肿大呈气球状,管内充满白色液体,而后者只有部分患病个体吻部发红,但肿大并不明显,吻管内也不含白色液体。因此,哈氏弧菌不仅可导致不同宿主产生不同患病症状,还可使相同的宿主出现不同的患病症状。

表 3 不同抗菌药物对病原菌 DFL11-01 的抗菌活性

Table 3 Sensitivity of pathogen DFL11-01 to different kinds of antimicrobial agents

抗生素种类	Antibiotics	药物含量 Concentration( $\mu\text{g}/\text{disc}$ )	抑菌圈直径 Diameter of inhibitory zone(mm)	敏感性 Sensitivity
氨苄西林	Ampicillin	10	21	S
阿洛西林	Azlocillin	75	9	R
美洛西林	Mezlocillin	75	12	R
头孢肤肟	Cefuroxime sodium	30	8	R
头孢克罗	Cefaclor	30	5	R
头孢他啶	Ceftazidime	30	17	M
头孢三嗪	Ceftriaxone	30	19	S
丁胺卡那	Amikacin	30	11	R
卡那霉素	Kanamycin	30	11	R
链霉素	Streptomycin	10	8	R
新霉素	Neomycin	30	15	M
四环素	Tetracycline	30	16	M
新生霉素	Novobiocin	30	8	R
利福平	Rifampin	5	13	R
大观霉素	Spectinomycin	100	11	R
哌拉西林	Piperacillin	10	22	S
恩诺沙星	Enrofloxacin	5	21	S
左旋氧氟沙星	Levofloxacin	5	19	S
罗红霉素	Roxithromycin	15	0	R
乙酰螺旋霉素	Acetylspiramycin	30	0	R
氟苯尼考	Florfenicol	30	7	R
杆菌肽	Bacitracin	0.04u	0	R
妥布霉素	Tobramycin	10	0	R

注:S 为敏感;M 为中度敏感;R 为耐药

Notes: S: sensitive; M: mildly sensitive; R: resistant

弧菌感染水产动物的方式主要是通过皮肤、消化道等器官的伤口或直接进行感染(Egidius 1987)。目前已报道的东风螺人工感染方式包括病原菌注射感染、病原菌浸泡感染等(黄郁葱等 2009)。本研究在预实验阶段对方斑东风螺病原菌的人工感染方式进行了探索,分别进行了直接浸泡感染、创伤浸泡感染和注射感染,结果感染效果均不太理想,最后通过模拟发病时的温度等气候特点,采用注射感染并在饲养缸上方覆盖保鲜膜和加热方法,得到了与自然患病东风螺相似的症状。本次方斑东风螺的疾病发生与气候变化显著相关,常在天气骤变的第 2 天开始出现,且发病时间较短,传播速度快,死亡率高。养殖池一旦发现不钻沙的病螺,在(2~3) d 内蔓延全池,如果控制不及时,病螺在隔天或数天后死亡,死亡率最高可达 100%,对海南文昌等地的方斑东风螺养殖造成了十分严重的危害。由此可见,许多条件致病菌感染引起的水产养殖动物疾病虽然最终是由病原感染所引起,但与养殖的环境条件也密切相关,适当的致病环境条件对诱发相关疾病的发生具有重要的作用。本研究从不同的患病方斑东风螺个体共分离得到 3 株细菌,经感染实验验证只有 DEF11-01 菌株具有较强毒性。原因可能是不同个体本身对病原抵抗力存在差异导致菌株活力不一致,并且不同菌株在传代培养过程毒性也可能发生改变。因此,在水产动物疾病控制中,通过改良养殖环境条件以控制疾病发生的诱因,同时提高水产动物的机体抵抗力可有效预防相关疾病的暴发。

对该致病菌的药敏试验表明,在所选择的23种药物中,该致病菌株只对氨苄西林等5种药物具有敏感性,可见该病原菌已经有很高的耐药性。因此,有效治疗药物的正确选择十分重要,不可无根据地滥用或过度使用抗菌药物。在养殖过程中注意适当添加免疫增强剂,提高方斑东风螺自身的免疫力,预防疾病的发生。

## 参 考 文 献

- 王建钢,乔振国. 2011. 方斑东风螺肉壳分离病病因的初步研究. 现代渔业信息, 26(10):16-18
- 王国福,曾关琼. 2006. 方斑东风螺人工育苗技术. 河北渔业, (11):48-49
- 王保坤,余俊红,李 筠,纪伟尚,徐怀恕. 2002. 花鲈弧菌病原菌(哈维氏弧菌)的分离与鉴定. 中国水产科学, 9(1):52-55
- 王满霞,孙 刚,王笑红,黎膏沃,韩玉民,曾 滨. 2005. 阿普林津对小鼠流感病毒作用的实验研究. 美中医学, 2(3):54-57
- 冯永勤,陈华兴,王建勋. 2006. 饵料种类与密度对方斑东风螺幼虫生长影响的实验研究. 现代渔业信息, 21(5):3-7
- 冯永勤,周永灿,谢珍玉,蒲利云,卢 宁,林志运,周俊先,符小杨. 2008. 方斑东风螺健康养殖技术研究. 渔业现代化, 35(1):39-41
- 冯永勤,周永灿,李芳远,蒲利云,张 真,卢 宁,王祚吉. 2009. 方斑东风螺规模化苗种繁育技术研究. 水产科学, 28(4):209-213
- 东秀珠,蔡妙英. 2001. 常见细菌系统鉴定手册. 北京:科学出版社, 18-118
- 刘 永,余祥勇. 2005. 方斑东风螺对海水温度、条件比重适应性的研究. 水产养殖, 26(5):23-24
- 刘连生,闫茂仓,林志华,柴雪良,汤 洁,赵海泉. 2009. 引起文蛤暴发性死亡病原菌的分离和鉴定. 微生物学通报, 36(1):71-77
- 李 军. 1998. 中国对虾幼体病菌哈维氏弧菌的分离及其生物学特性研究. 海洋与湖泊, 29(4):353-361
- 吴后波,潘金培. 1997. 海水网箱养殖高体鲷弧菌病致病菌研究. 水产学报, 21(2):171-174
- 张秋明,卢飞龙,杨家坚. 2006. 方斑东风螺无公害工厂化养殖技术. 中国水产, (10):50-51
- 张新中,文万饶,冯永勤,谢珍玉,周永灿. 2010. 方斑东风螺肿吻症病原菌的分离鉴定及药敏分析. 海洋科学, 34(5):7-12
- 陈建华,阎斌伦,高 焕,赵秋龙. 2008. 方斑东风螺生物学特性及养殖技术. 水利渔业, 28(3):74-75
- 郑养福. 2007. 方斑东风螺浮游期聚缩虫病的防治. 福建水产, (2):48-51
- 梅 冰,周永灿,徐先栋,王世峰,谢珍玉. 2010. 斜带石斑鱼烂尾病病原菌的分离与鉴定. 热带海洋学报, 29(6):118-124
- 黄郁葱,简纪常,吴灶和,鲁义善,王 蓓. 2009. 方斑东风螺吻管水肿病原菌的初步研究. 渔业现代化, 36(4):37-41
- 黄海立,余德光. 2007. 方斑东风螺幼虫纤毛虫病的防治方法. 科学养鱼, (7):56-56
- 覃映雪,池信才,苏永全,王德祥,陈信忠. 2004. 网箱养殖青石斑鱼的溃疡病病原. 水产学报, 28(3):297-302
- 彭景书,戈贤平,李 明,周文川,赵秋龙,徐 跑,谢 骏. 2011. 方斑东风螺单孢子虫病的研究. 水生生物学报, 35(5):803-807
- 裴 琨. 2006. 方斑东风螺工厂化养殖的关键技术. 水产科技情报, 33(3):107-108, 111
- 魏永杰,黄 斌,柯才焕,许贻斌,王德祥. 2007. 方斑东风螺早期发育过程中几种消化酶的活性. 热带海洋学报, 26(1):55-59
- Egidius E. 1987. Vibriosis: pathogenicity and pathology. A review. Aquaculture 67(1):15-28
- Xiang SR, Chen XR, Wang YF and 1 other. 2002. Isolation and screening of phenol-degrading strain phen8 and its 16S rDNA sequence analysis. J Microbiol 22(6):366-369