

# 文蛤病原菌——需钠弧菌的鉴定和生物学特性分析

李 国<sup>1,2</sup> 闫茂仓<sup>2\*</sup> 孙 杰<sup>1</sup> 林志华<sup>2</sup> 马爱敏<sup>1,2</sup> 常维山<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 山东农业大学, 泰安 271018)

(<sup>2</sup> 浙江省海洋水产养殖研究所, 温州 325005)

**摘 要** 从患病文蛤 *Meretrix meretrix* 体内分离出一优势菌株 WT01, 回归感染试验证明是文蛤的致病菌。对该菌形态、生理生化特征、盐度、温度和 pH 值生长条件以及 16S rRNA 基因序列进行了研究。结果表明, 该菌为革兰氏阴性菌, 发酵葡萄糖产酸不产气, 氧化酶阳性, 生长需 NaCl, 无色素, 不发光, 在 TCBS 平板上形成圆形黄色菌落, 对弧菌抑制剂 O/129 敏感, 具有弧菌属的典型特征。16S rRNA 基因序列分析表明, 该菌与需钠弧菌 *Vibrio natriegen* 的亲缘关系最为接近, 其同源性达 99% 以上。因此, 将该菌鉴定为需钠弧菌。实验显示其半数致死量为  $5.5 \times 10^6$  CFU/g。19 种抗菌药物药敏试验结果表明, 该菌对氟哌酸、复方新诺明、菌必治、先锋必、链霉素、氯霉素和庆大霉素等抗生素较为敏感。并对其胞外产物的生物学特性进行了分析。

**关键词** 文蛤 需钠弧菌 16S rRNA 系统发育树 生物学特性

**中图分类号** S944.4 **文献识别码** A **文章编号** 1000-7075(2009)06-0103-07

## Identification and biological characteristics of pathogen *Vibrio natriegen* from clam *Meretrix meretrix*

LI Guo<sup>1,2</sup> YAN Mao-cang<sup>2\*</sup> SUN Jie<sup>1</sup> LIN Zhi-hua<sup>2</sup>

MA Ai-min<sup>1,2</sup> CHANG Wei-shan<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Shandong Agricultural University, Taian 271018)

(<sup>2</sup> Zhejiang Mariculture Reseach Institute, Wenzhou 323005)

**ABSTRACT** A pathogenic bacterium(WT01) was isolated from diseased clam *Meretrix meretrix* Linnaeu, and was confirmed to be the pathogen of the epidemic by artificial infection experiment. The morphological, physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA sequence were analyzed for this bacterium, and the relationship between reproduction of the bacterium and NaCl concentrations, pH and temperature were also determined. The results showed that the strain was gram-negative, glucose fermented without gas production, oxidase positive, requiring sodium ions for growth, no pigment, non-luminescence; It grew well on TCBS-plate as yellow colonies and was sensitive to *Vibrio* inhibitor O/129. Therefore, it was confirmed that the strain

国家十一科技支撑计划项目(2007BAD43B09)、国家高技术研究发展计划项目(2006AA10A410)和浙江省重大科技攻关计划项目(2006C12013)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: yanmaocang@126.com

收稿日期: 2008-08-02; 接受日期: 2008-11-14

作者简介: 李 国(1982-), 男, 硕士研究生, 主要从事微生物与免疫学研究。E-mail: liguo-666@163.com, Tel: (0538)8249851-8213

belonged to the genus of *Vibrio*. The sequence analysis of 16S rRNA gene of WT01 and comparison with that of other related *Vibrios* showed that WT01 was very close to *Vibrio natriegen*, with a similarity of 99%. In conclusion, strain WT01 belonged to *Vibrio natriege*, and the LD<sub>50</sub> of the bacterium to *M. meretrix* was  $5.5 \times 10^6$  CFU/g (tested by Reed-Muench method). The sensitive test showed that the pathogen was sensitive to drugs such as norfloxacin(NOR), bactrim(SXT), ceftriaxone(CRO), cefobid(CFP), streptomycin(STR), chloromycetin(CMP) and cido mycin(GEN). Biochemical analysis was also done for its extracellular products.

**KEY WORDS** *Meretrix meretrix* *Vibrio natriegen* 16S rRNA gene  
Phylogenetic tree Biological characteristics

文蛤 *Meretrix meretrix* Linnaeus 是我国沿海常见的一种重要经济贝类,是出口创汇的重要水产品之一。近年来,随着文蛤养殖规模的扩大,由于养殖水域水质环境恶化和各种疾病的流行,引发的养殖文蛤的大规模死亡已造成巨大的经济损失。因此,预防与控制养殖文蛤病害的发生,加强文蛤疾病的研究,已经成为保障文蛤养殖业可持续发展的当务之急。

弧菌类,大多是致病菌,是水产养殖动物体内外和养殖环境中的正常菌群,当环境条件异常,导致弧菌大量繁殖或养殖动物体质下降时,往往会引起弧菌病的暴发流行(沈晓盛等 2005)。通常认为文蛤死亡是由弧菌的流行性感染所致(Heshil *et al.* 1998),已从病文蛤体内分离到并证明其致病性的病原弧菌有溶藻弧菌 *Vibrio alginolyticus*、弗尼斯弧菌 *Vibrio furnissii* 和副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolyticus* (郑国兴等 1991; 王广和等 1992; 杨美桂 1978),并对副溶血弧菌的致病性及其防治做了相关研究(刘军义等 1996; 沈亚林等 1993)。2007年9月浙江省温州市龙湾区养殖文蛤发生大面积死亡,死亡率高达70%,从具有明显发病症状的文蛤肝胰脏中检出1株优势细菌,回归感染实验证明其为致病病原菌,经形态、生理生化、生长条件及16S rRNA基因序列的测定及系统发育树分析,鉴定为需钠弧菌 *Vibrio natriegen*,并对其一些生物学特性和敏感药物进行了测定,旨在为养殖生产实践中该病的诊断与防治、健康养殖模式的建立提供理论依据和实践基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 病原菌的分离

患病文蛤取自温州市龙湾区,壳径大小为3~4 cm。用无菌操作的方法自肝胰脏取样,接种于2216E培养基斜面上,28℃培养24 h后,从斜面上挑取优势菌落于TCBS培养基平板反复划线分离,直至长出形态大小基本一致的菌落,标记为WT01。挑取单菌落转接种于2216E斜面保存备用。

### 1.2 人工感染和半数致死量 LD<sub>50</sub> 的测定

健康文蛤取自浙江省海洋水产养殖研究所清江养殖场,分组饲养于50L的塑料桶(盛砂滤海水40 L)中,每组10个。将细菌接种于2216E培养基上,28℃培养24 h,用无菌生理盐水(0.85% NaCl)洗下,制成悬浊液,倒入饲养用塑料桶内,通过比浊器结合平板计数法调整菌液浓度分别为: $1.0 \times 10^9$ 、 $1.0 \times 10^8$ 、 $1.0 \times 10^7$ 、 $1.0 \times 10^6$ 和 $1.0 \times 10^5$  CFU/ml。将文蛤浸浴于上述菌液中,对照组浸浴等量的正常海水。每天投喂金藻,部分换水(水体pH8.0~8.2,温度24~28℃,海水盐度24~26),充气,连续观察并记录14 d内死亡文蛤数。应用Reed-Muench法(Reed *et al.* 1983)计算LD<sub>50</sub>。

### 1.3 病原菌的再分离和生理生化特征鉴定

取感染组中死亡的文蛤无菌操作,于肝胰脏重新分离细菌,接种于2216E培养基,28℃培养24 h,取优势菌落重复划线分离出菌株WT02。细菌形态、生理生化测定按照《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠等 2001)

进行,细菌鉴定微量发酵管,购自杭州天和微生物试剂有限公司。

#### 1.4 细菌生长条件的测定

配制不同盐度(0~120)和 pH(5.0~12.0)的 2216E 液体培养基,接种细菌。参照杨嘉龙等(2007)方法,28 ℃培养 24 h,721 分光光度计 600 nm 测定 OD 值。配制盐度 30、pH 值 7.6 的 2216E 液体培养基,接种细菌,于不同温度(0~45 ℃)恒温培养 24 h,721 分光光度计 600 nm 测定 OD 值。

#### 1.5 16S rRNA 基因序列分析

##### 1.5.1 PCR 模板 DNA 的制备

将细菌接种到 2216E 斜面培养基上,28 ℃培养过夜。用无菌生理盐水(0.85% NaCl)洗脱细菌,水浴煮沸 10 min,冷却离心(7 000 g)10 min,取上清液作为模板。

##### 1.5.2 16S rRNA 扩增与测序

扩增 16S rRNA 基因所需引物由上海生工生物工程技术服务公司合成,正向引物为:5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3',反向引物为:5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 反应体系(50 μl):1×PCR 缓冲液 5 μl,25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 3 μl,2 mmol/L dNTPs 0.75 μl,5U/μl 的 Taq DNA 聚合酶 0.25 μl,0.6 mmol/L 的引物各 1 μl,模板 DNA 5 μl,ddH<sub>2</sub>O 34 μl。PCR 反应条件:94 ℃预变性 6 min,94 ℃变性 1 min,55 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 2 min,完成 30 个循环后于 72 ℃延伸 6 min,取 5 μl 反应液在含 0.5 μg/L EB 的 1% 琼脂糖凝胶上电泳,紫外检测仪下观察结果。PCR 扩增产物交由上海生工生物工程技术服务公司进行序列测定。

#### 1.6 序列分析及系统发育树的构建

将菌株 WT01 的 16S rRNA 基因序列与从 GenBank 数据库中获得的弧菌属细菌的 16S rRNA 基因序列进行比对,采用 Clustal V Method 方法和 DNA Star 软件进行序列同源性比对和系统发育树的建立。

#### 1.7 溶血性、细胞毒性和酶活性

##### 1.7.1 胞外产物的提取

接种细菌于 2216E 斜面培养基上,28 ℃培养 24 h,无菌生理盐水洗脱制成菌悬液,12 000 g 离心 15 min,取上清,0.22 μl 微孔滤膜抽滤,滤液经平板涂布培养,证实无菌生长后,分装低温保存备用。

##### 1.7.2 溶血性试验

在每个无菌离心管中加入 100 μl 无菌生理盐水,加上清液 100 μl,进行倍比稀释,每管中加入小鼠、人 O 型血和鲫鱼等不同来源的 1% 红细胞悬液 100 μl 于每管中,37 ℃孵育 1 h,4 ℃过夜,以无菌生理盐水组为阴性对照。

##### 1.7.3 细胞毒性试验

将无菌处理的上清液加入到长满单层草鱼吻端成纤维细胞(PSF)的 96 孔细胞培养板中,每孔 100 μl,置于 37 ℃密闭培养 24 h,观察细胞的病变情况,以加 2% 的小牛血清的 1640 培养液为正常对照。

##### 1.7.4 底物酶活性

分别用 PBS(pH 值 7.4)配制含明胶(0.4%)、酪蛋白(0.4%)、淀粉(0.2%)、吐温 80(1.0%)和尿素(2.0%,加酚红指示剂)的 1% 的琼脂平板,打孔,每孔加入 10 μl 上清液,28 ℃湿盒恒温孵育 24 h,向明胶平板中加入酸性氯化汞溶液;向酪蛋白中加入 10% 的三氯乙酸溶液;向淀粉平板中加入鲁哥氏碘液。观察平板,以出现透明圈(明胶、酪蛋白和淀粉平板)或不透明圈(吐温 80 平板)或出现红色(尿素平板)为阳性。

#### 1.8 药敏试验

用纸片法在 2216E 平板上测定待测菌株对药物的敏感性。28 ℃培养 24 h,观测有无抑菌圈及其直径大小。根据抑菌圈直径判断标准(姜永新 1987)判断菌株 WT01 对药物的敏感性,19 种抗菌药物药敏纸片购自

杭州天和微生物试剂有限公司。

## 2 结果

### 2.1 病原菌分离及人工感染

从濒死文蛤肝胰脏中分离到1个优势菌株 WT01(从12株菌中筛选出)。人工感染试验表明,该菌株对文蛤有明显的致病作用(表1)。发病症状为:患病文蛤不能潜入沙中,外壳无光泽,有大量粘液,闭壳肌肿大,贝壳不能紧密闭合,对刺激反应迟钝,足呈酱红色至紫黑色,外套膜和鳃糜烂,其症状与自然发病文蛤相同。人工感染重新分离的菌株为 WT02,WT02 菌株通过感染也可以发病,症状同 WT01 完全一样。按 Reed-Muench 方法计算菌株 WT01 对文蛤的  $LD_{50} = 5.5 \times 10^6$  CFU/g。

表1 WT01 的人工感染结果  
Table 1 The consequence of artificial infection by WT01

分组 Treatment	菌液浓度(CFU/ml) Bacterial concentration(CFU/ml)	实验数(个) Number of tested clam (ind.)	死亡数(个) Number of dead clam(ind.)	死亡率(%)Mortality
1	$1.0 \times 10^9$	10	10	100
2	$1.0 \times 10^8$	10	9	90
3	$1.0 \times 10^7$	10	6	60
4	$1.0 \times 10^6$	10	4	40
5	$1.0 \times 10^5$	10	2	20
对照组 Control	正常海水 Regular seawater	10	0	0

### 2.2 形态和生理生化特征

形态学观察表明,WT01 和 WT02 菌均为革兰氏阴性短杆菌,在 TCBS 培养基上为中等大小黄色圆形菌落,无色素,不发光;生长需 NaCl,在无盐陈水中不能生长,氧化酶呈阳性,能还原硝酸盐,发酵葡萄糖产酸不产气,可以利用阿拉伯糖、蔗糖和甘露醇;对弧菌抑制剂 O/129( $150 \mu\text{g}$ )敏感(表2),具有弧菌属的典型特征。两菌株的各项生理生化特征与《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠等 2001)需钠弧菌的描述基本一致,可鉴定这两株细菌为需钠弧菌。

### 2.3 生长条件

病原菌能繁殖的温度范围是  $10 \sim 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ,最适生长温度是  $26 \sim 36 \text{ }^\circ\text{C}$ ,在  $<4 \text{ }^\circ\text{C}$  和  $>42 \text{ }^\circ\text{C}$  不能生长。细菌对盐度的适应范围较广,能在高盐度下生长,生长的盐度范围是  $5 \sim 100$ ,最适生长的范围  $30 \sim 60$ ,在盐度为 40 和 50 的 2216E 培养基中生长最旺盛,但在无盐 2216E 培养基中不能生长。病原菌于 pH 值  $5 \sim 12$  范围内均能生长,最适 pH 值是  $7 \sim 9$ 。

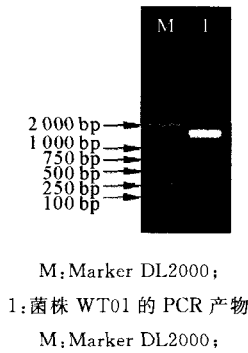
### 2.4 16S rRNA 基因序列和系统发育学分析

经 16S rRNA 基因序列测定,基因序列长度约为 1.5 kb(图1),用 Blast 软件对测序结果进行同源性分析,发现与 *V. natriegen* 和 *V. fischeri* 最为接近,其同源性高达 99% 以上,同时与 *V. alginolyticus* 和 *V. parahaemolyticus* 的同源性也很高,但 *V. fischeri* 的阿拉伯糖和蔗糖反应为阴性,*V. parahaemolyticus* 在 TCBS 上为绿色,*V. alginolyticus* 可以利用鸟氨酸和赖氨酸,不可以利用阿拉伯糖。由此,结合生理生化鉴定结果,确定该菌为 *V. natriegen*。菌株 WT01 与其他弧菌的同源性关系见系统发育树(图2)。

表 2 WT01 及 WT02 菌株的生化反应结果  
Table 2 Results of biochemical test for WT01 and WT02

项目 Item	WT01	WT02	<i>V. natriegen</i>
形态 Cell Form	杆状	杆状	杆状
革兰氏染色 Gram stain	—	—	—
泳动现象 Swarming	—	—	—
TCBS 生长 Growth on TCBS	Y	Y	Y
发光 Luminescence	—	—	—
色素产生 Pigment production	—	—	—
O/F 试验 Oxidation/Fermentation	F	F	F
O/129 敏感性(10 μg) O/129 Sensitivity(10 μg)	R	R	R
O/129 敏感性(150 μg) O/129 Sensitivity(150 μg)	S	S	S
4 ℃ 生长 Growth at 4 ℃	+	+	—
30 ℃ 生长 Growth at 30 ℃	+	+	+
42 ℃ 生长 Growth at 42 ℃	+	+	+
0% NaCl 胨水生长 Growth in 0 NaCl	—	—	—
3% NaCl 胨水生长 Growth in 3% NaCl	+	+	+
6% NaCl 胨水生长 Growth in 6% NaCl	+	+	d
8% NaCl 胨水生长 Growth in 8% NaCl	+	+	+
10% NaC 胨水生长 Growth in 10% NaCl	+	+	—
氧化酶 Oxidase	+	+	+
触酶 Catalase	+	+	+
吡啉实验 Indole production	—	—	—
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	—	—	—
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	—	—	—
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	—	—	—
精氨酸脱羧酶 Arginine decarboxylase	—	—	—
H <sub>2</sub> S 产生 H <sub>2</sub> S production	—	—	—
VP 反应 Voges-Proskauer	—	—	—
甲基红实验 Methyl red test	+	+	+
柠檬酸盐利用 Citrate utilization	+	+	+
甘露醇 Manicol	+	+	+
纤维二糖 Cellobiose	—	—	d
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	+
尿素 Carbonylamines	—	—	—
D-葡萄糖产气 D-Gas from glucose	—	—	—
D-葡萄糖产酸 D-Acid from glucose	+	+	+
淀粉酶 Amylase	+	+	d
明胶液化 Gelatin liquefaction	+	+	d
脂酶 Lipoidase	+	+	+
山梨醇 Sorbitol	+	+	+
几丁质酶 Chitinase	—	—	—
木糖 Beechwood sugar	—	—	—
阿拉伯糖 Arabinose	+	+	+
乳糖 Lactose	—	—	—
蔗糖 Sucrose	+	+	+
蜜二糖 Melibiose	—	—	d
甘露糖 Mannose	+	+	d
海藻糖 Trehalose	+	+	+
水杨苷 Salicin	+	+	+
山梨醇 Sorbitol	—	—	—
肌醇 Inositol	+	+	d
ONPG	+	+	d
乙醇 Ethanol	+	+	+

注：“+”表示阳性；“—”表示阴性；R 抗性；S 敏感；OF 氧化发酵型；“d”表示可变化；“Y”表示黄色



M: Marker DL2000;  
1: 菌株 WT01 的 PCR 产物  
M: Marker DL2000;  
1: PCR products of isolated pathogen WT01  
图 1 菌株 WT01 的 PCR 产物电泳结果  
Fig. 1 Electrophoresis results of isolated pathogen WT01 PCR products

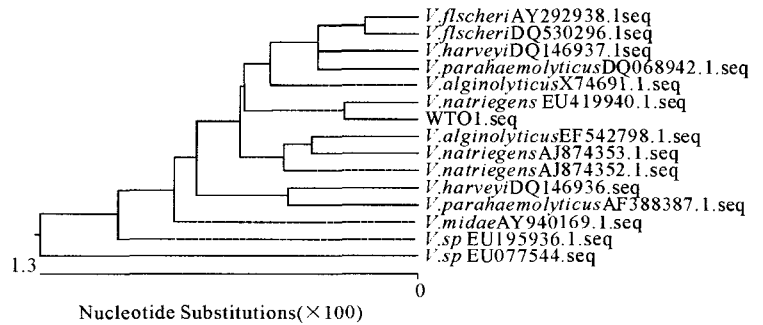


图 2 根据 16S rRNA 序列同源性构建的系统发育树  
Fig. 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequence of homology (Numbers in parentheses represent the sequence accession number in GenBank)

2.5 溶血性、细胞毒性和酶活性

实验结果表明,菌株 WT01 对小鼠的红细胞有较强的溶血性,对 O 型人血的红细胞和鲫鱼血细胞的溶血价都较低。该菌株可以引起草鱼吻端成纤维细胞(PSF)发生病变,表现为细胞间隙变大,聚合成葡萄状,有些细胞肿胀变圆,大部分细胞脱落,对照组正常草鱼吻端成纤维细胞呈纤维状,边缘清晰。酶活性实验结果表明,WT01 的胞外产物具有淀粉酶、脂肪酶、明胶酶和蛋白酶的活性,但不具有脲酶的活性。

2.6 药敏结果

采用纸片法测定致病菌株对 19 种抗菌药物的敏感性(表 3),WT01、WT02 的抗菌谱基本相同,都对其中 12 种敏感,对 7 种有耐药性。其中氟哌酸、复方新诺明、菌必治、先锋必、链霉素、氯霉素和庆大霉素等抗生素对该病原菌有显著的抑制作用。这两株菌抗菌谱的相似性,也为进一步证明这两株菌属同 1 个种提供了证据。

3 讨论

从患病文蛤肝胰脏中分离出优势菌株 WT01,回归感染试验证明是文蛤的致病菌,由 WT01 的形态学观察、传统生理生化特征结果可知,该菌与《常见细菌系统鉴定手册》中需钠弧菌的描述基本一致。16S rRNA 检测技术因其灵敏度高、特异性强和检验快速等优点,目前已经广泛应用于贝类病原性海洋弧菌的检测中(刘广锋等 2006;沈晓盛等 2005;邓先余等 2007)。为了使鉴定结果更加可信,作者从细菌的 16S rRNA 序列同源性的角度对 WT01 菌进行了系统发育学分析。结果表明,该菌株与需钠弧菌的 16S rRNA 序列同源性高达 99%,进一步证实了 WT01 为需钠弧菌。

表 3 不同抗菌药物对致病菌的抗菌活性

Table 3 Antibacterial activities of different antimicrobial agents against the pathogen

药物 Chemical	含药量 Dose(μg/disc)	抑菌圈直径(mm) Diameter	敏感度 Sensitivity
阿米卡星 AN	30	13	R
氟哌酸 NOR	10	22	H
复方新诺明 SXT	23.75/1.25	24	H
利福平 RIF	5	13	R
头孢噻吩 CEF	30	15	M
头孢拉丁 CED	30	16	M
呋喃妥因 FT	300	14	R
菌必治 CRO	30	23	H
先锋必 CFP	75	22	H
链霉素 STR	10	21	H
庆大霉素 GEN	10	17	H
红霉素 ERY	15	13	R
头孢氨苄 CEX	30	13	R
青霉素 PCN	10IU	18	R
四环素 TE	30	—	R
新霉素 NEO	30	16	M
卡那霉素 KAN	30	15	M
氨苄青霉素 AMP	10	18	M
氯霉素 CMP	30	24	H
0/129(10)	10	—	R
0/129(150)	150	23	H

注:M 为中度敏感;H 为高度敏感;R 为抑制;“—”表示无抑菌圈

WT01 菌株的主要特征符合文献(东秀珠等 2001)对需钠弧菌的描述,但在 TCBS 生长(黄色)、8%~10% NaCl 胨水生长、MR 反应阳性、利用纤维二糖 4 项特征方面与张晓华等(1998)所描述的需钠弧菌(漂浮弧菌)有异。Alsina 等(1994)认为需钠弧菌不能在 4 °C 生长,本试验所分离的菌株却能在 4 °C 生长,这可能与菌株来源的区域不同有关。需钠弧菌是近岸海水中的正常菌群,在生长中可广泛利用多种碳源(Farniss 1978),刘双江(2002)研究证实需钠弧菌可以利用葡萄糖、果糖以及糖蜜为碳源合成聚羟基丁酸[Poly(3HB)]应用于医学组织工程。有报道认为,需钠弧菌对单胞藻 *Pavlova lutheri* 的生长有抑制作用,但其致病性是否与它对藻类的抑制作用有关还有待进一步研究(Munro 1995)。王 斌等(1993)报道了需钠弧菌和哈氏弧菌 *Vibrio harveyi* 均可引起中国对虾 *Penaeus chinensis* 的红腿病并导致其死亡,死亡率高达 90%以上,当虾池水中菌数达一定量时可通过体表或创伤部位侵入虾体引起发病。感染实验中,该菌用量最低而引起发病的时间最早,死亡率为 87.5%~100%,显示出较强的毒力。该菌还可导致海湾扇贝 *Bay scallop* 肠道及肾肿胀、生殖腺及外套膜萎缩、壳内面变黑,并且同其他弧菌一起引起海湾扇贝的“面盘解体”症(张晓华等 1998;邓 欢等 2004)。本实验证实需钠弧菌可感染文蛤患病,同样也有感染其他同属贝类发病的潜在性,应引起足够重视。

应用抗菌药物仍然是目前控制水产动物弧菌病的主要手段之一(黄琪琰 1999)。对 19 种抗生素抑菌作用的研究结果表明,所分离的文蛤病原菌对氟哌酸、复方新诺明、菌必治、先锋必、链霉素、氯霉素和庆大霉素等抗生素最为敏感,这 7 种药物可以作为治疗该种文蛤病害的首选药物。这为文蛤养殖临床合理用药,防止滥用药提供了依据。对本研究中的需钠弧菌胞外产物进行初步分析,表明具有溶血活性、细胞毒性及蛋白酶活性,其胞外产物是单一成分或多种成分,是否还具有其他生物学特性以及这些胞外产物在致病过程中起的作用如何,还有待于进一步研究。

## 参 考 文 献

- 王广和,沈艳云,沙培荣,曹祥志,于志华,姚国兴,宋晓村,王汉清,郑庆树,钱晓明,孙 祥,崔广细. 1992. 文蛤弗尼斯弧菌病的研究. 微生物学通报, 19(4):222~226
- 王 斌,李 华,王幽峰. 1993. 引起中国对虾红腿病的两种新病原菌的研究. 大连水产学院学报, 8(2,3):43~48
- 邓先余,王智学,陈晓艳,何建国. 2007. 以 16S 和 16S-23SrDNA 间区为靶区建立副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) PCR 快速检测技术. 海洋与湖沼, 38(6):555~562
- 邓 欢,陈 侠,苏 浩,张东升,马志强. 2004. 海湾扇贝幼体期流行性弧菌病的研究. 大连水产学院学报, 19(4):258~263
- 东秀珠,蔡妙英. 2001. 常见细菌系统鉴定手册. 北京:科学出版社, 132~136
- 刘广锋,周世宁,徐力文,王瑞旋,王江勇,陈毕生. 2006. 杂色鲍幼苗“急性死亡脱落症”病原菌分析. 中国水产科学, 13(4):655~661
- 刘双江. 2002. 需钠弧菌 *Vibrio natriegens* 合成聚羟基丁酸的研究. 生物工程学报, 18(5):614~618
- 刘军义,陈镇鸿,阎 冰,洪家明. 1996. 文蛤副溶血弧菌病的研究. 微生物学报, 16(4):1~5
- 张晓华,廖绍安,李 筠,纪伟尚,徐怀恕. 1998. 海湾扇贝病原菌(漂浮弧菌)的研究. 青岛海洋大学学报, 28(3):426~431
- 杨美桂. 1978. 新竹区养殖文蛤病原菌 *Vibrio parahaemolyticus* 之分离. 见:台湾农发会鱼病研究专集(二), 59~67
- 杨嘉龙,周 丽,绳秀珍,邢 婧,战文斌. 2007. 养殖刺参溃疡病病原菌 RHZ 的鉴定及其生物学特性分析. 水产学报, (4):504~511
- 沈亚林,于业绍. 1993. 副溶血弧菌对文蛤的致病性及其防治. 水产学报, 7(3):249~252
- 沈晓盛,蔡友琼,房文红,顾润润,高丹枫. 2005. 养殖牡蛎体内检出坎氏弧菌的鉴定. 微生物学报, 42(2):177~180
- 郑国兴,李 何,黄宁宇,于业绍,杨季芳,吴友吕. 1991. 文蛤病原菌(溶藻弧菌)的分离与性状及文蛤组织的电镜观察. 水产学报, 15(2):85~95
- 娄永新. 1987. 临床细菌检验与质量控制. 沈阳:辽宁科学技术出版社, 120~122
- 黄琪琰. 1999. 水产动物疾病学. 上海:上海科学技术出版社, 95~139
- Alsina, M., and Blanch, A. R. 1994. A set of keys of biochemical identification of environmental *Vibrio* species. J. Appl. Bacteriol. 76:79~85
- Farniss, A. L. 1978. Public health laboratory service monograph series(The Vibrios). London: Majesty's Stationery Office
- Heshil, W. K. et al. 1998. Monitoring the marine environment for small round structure viruses(SRSVS): A new approach to combating the transmission of these viruses by molluscan shellfish water. Sci. Technol. 38(12):51~56
- Munro, P. D. 1995. Stimulation or inhibition of growth of the unicellular; Alga *Pavlova lutheri* by bacteria isolated from larval turbot culture systems. J. Appl. Bacteriol. 79:519~524
- Reed, L. J., and Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent Endpoints. Am. J. Hygiene, 27:493~497