

## 虾夷扇贝脓胞病病原的分离、鉴定与致病性

滕炜鸣, 李文姬\*, 张 明, 于佐安, 李石磊, 刘项峰, 李华琳, 付成东

(辽宁省海洋水产科学研究院, 辽宁省应用海洋生物技术开放实验室,  
辽宁省海洋水产分子生物学重点实验室, 辽宁 大连 116023)

**摘要:** 开展对大连市长海县附近养殖海域近几年夏季出现的大规模虾夷扇贝死亡现象的研究, 能为虾夷扇贝养殖过程中的疾病防治提供基础理论支持。以患病虾夷扇贝为研究对象, 通过对病变组织进行细菌分离、提纯培养, 并采用人工感染试验确定虾夷扇贝脓胞病的病原性质; 通过生理生化特性、16S rRNA 基因部分序列和药物敏感性测定, 对虾夷扇贝脓胞病进行了鉴定。结果表明, 从患病组织中分离出的其中一株细菌经人工感染试验证实为虾夷扇贝脓胞病的病原菌, 在水温 19 °C、注射浓度为  $1.09 \times 10^5$  CFU/mL 的条件下, 该菌有较强的致病性。通过对该病原菌的生理生化特性测定和 16S rRNA 基因部分序列分析, 确定虾夷扇贝脓胞病的病原为查氏弧菌。

**关键词:** 虾夷扇贝; 查氏弧菌; 脓胞病

**中图分类号:** S 944.3

**文献标志码:** A

20 世纪 80 年代初, 辽宁省海洋水产研究院将虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)由日本引入中国<sup>[1]</sup>, 目前已经成为黄海北部浅海浮筏养殖的主导产品<sup>[2]</sup>。2009 年和 2010 年两年的夏季, 长海县周边养殖海域浮筏养殖虾夷扇贝出现大规模死亡, 死亡虾夷扇贝具有明显症状。解剖濒死虾夷扇贝, 发现逾 80% 的闭壳肌上有脓胞病变。为探明此病的病原及更好地认识虾夷扇贝的这种疾病, 对上述濒死虾夷扇贝的病变组织进行细菌分离, 按照常规方法<sup>[3-5]</sup>, 采用细菌表型特征、生理生化鉴定结合 16S rRNA 序列分析等方法, 对该菌进行鉴定, 并进一步研究其药敏特性, 旨在为虾夷扇贝闭壳肌脓胞病的有效防控提供科学依据。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材 料

患病虾夷扇贝采自长海县大长山岛和广鹿岛养殖海域, 健康扇贝采自獐子岛养殖海域。

#### 1.2 细菌分离与提纯培养

打开濒死虾夷扇贝壳, 用灭菌海水冲洗 5 遍, 无菌

条件下连带附近组织取出闭壳肌上的脓胞部分, 接种于 2216E<sup>[6]</sup>培养基上。25 °C 条件下培养 48 h 后镜检, 反复纯化, 直至在显微镜下形成单独的圆形小点状菌落<sup>[7-13]</sup>。

#### 1.3 人工感染试验

**病原菌的培养与定量** 用灭菌海水将纯化好的菌落冲洗下来, 于  $15\ 000 \times g$  离心 30 min, 将菌液浓缩 10 倍后重新接种于 2216E 培养基上, 25 °C 培养 24 h 后, 用灭菌海水将细菌冲洗下来, 以上面方法将菌液浓缩 30 倍, 用血球计数板和分光光度计在 600 nm 波长下进行定量。根据菌液的吸光值将菌液稀释成  $1.09 \times 10^7$  CFU/mL 的病原液待用。

**浓度梯度感染实验** 2010 年 5 月, 取直径约 8 cm 的 2 龄虾夷扇贝 300 个, 置于 10 个体积为 70 L 的水箱中, 每日换水 50%, 早晚投喂螺旋藻粉各 1 次。室温下暂养 7 d 后开始升温, 每日升温 0.5~1.0 °C, 至 19 °C 后, 暂养 7 d。挑选 150 枚活力较好的个体, 分别放于 10 个水箱中, 每个水箱放 15 枚, 分成 5 组(每两箱为 1 组), 前 4 组扇贝的闭壳肌中分别注射 0.1 mL,  $10^0$ 、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  倍的病原液, 第 5 组作为空白对照组不注射。每日定时换水、投饵, 挑出死亡

收稿日期: 2011-8-10

修回日期: 2011-11-1

资助项目: 国家海洋公益性行业科研专项(200805037); 辽宁省农业科技特派项目(2008203004)

通讯作者: 李文姬, E-mail: wenji1016@yahoo.com.cn

扇贝并解剖, 观察发病症状, 直至注射组全部死亡。

温度梯度感染实验 2010 年 10 月, 取直径约 8 cm 的 2 龄虾夷扇贝 240 枚, 暂养于 12 个水箱中, 每个水箱中各放 20 枚。分为 4 组, 于 15、17、19、21 °C 暂养。每组 3 个平行, 每个温度组设 2 个试验组和一个对照组。室温适应 7 d 后开始加温, 每日升温 0.5~1.0 °C, 待全部升到目标温度后, 再暂养 7 d。每箱挑选 10 枚活力较好的个体, 在闭壳肌上注射  $1.09 \times 10^5$  CFU/mL 的病原液 0.1 mL。每日定时换水、投饵, 挑出死亡扇贝并解剖, 观察发病症状, 直至注射组全部死亡。

1.4 细菌鉴定

形态特征检查 取纯化培养菌观察其菌落外观形态, 经革兰氏染色、电镜负染镜检细菌特征。

生理生化鉴定 按照常规方法<sup>[3-5]</sup>, 参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[8]</sup>和《伯杰氏细菌鉴定手册》<sup>[9]</sup>进行生理生化指标的测定。

分子测序及比对 采用 16S rRNA 的 PCR 扩增及克隆, 送大连宝生物工程有限公司进行 DNA 双向测序。将菌株的 16S rRNA 序列与 GenBank 中已知核酸序列进行 BLAST 分析, 调出与该序列相关性较高的核酸序列, 采用 DNASTar 软件进行序列同源性分析。

1.5 菌株的药敏测试

选取 4 株不同时期分离的查氏弧菌 (*Vibrio cholerae*), 采用合肥恒星科技开发有限公司产 HX—2 1 半自动细菌鉴定药敏分析仪对其分别进行测试。

2 结果

2.1 发病症状

发病扇贝活力减弱, 外套膜萎缩、脱落, 外套眼失去光泽, 贝壳边缘内侧常常伴有褐色沉积, 闭壳肌收缩无力, 其上有明显的脓胞(图 1), 解剖后胃肠内几乎没有食物。

2.2 病原菌的分离

从患脓胞症状的虾夷扇贝的病变组织中共分离出 6 株细菌, 分别命名为 XJ01-XJ06。经人工回接感染预试验验证, 只有 XJ02 的发病症状与天然海域扇贝患病症状相符。

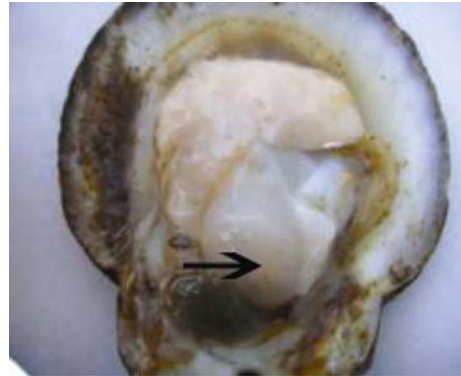


图 1 患病虾夷扇贝外观 Fig. 1 Appearance of sick *P. yessoensis*

2.3 人工感染试验

浓度感染试验结果 经 31 d 的暂养, 试验组扇贝全部死亡, 而空白对照组成活率接近 100%, 说明注射的病原菌有较强的致病性(表 1)。其中, 第 1 组(注射浓度  $1.09 \times 10^7$  CFU/mL)在注射 24 h 内, 注射个体全部急性死亡, 并且没有表现出特殊症状, 说明此浓度对扇贝来说是过量的。第 3 组(注射浓度为  $1.09 \times 10^5$  CFU/mL)死亡扇贝的闭壳肌上出现脓胞病变的数量最多, 症状的发生率为 40%, 而随着注射细菌浓度的增加(第 1、2 组)和注射细菌浓度的减少(第 4 组), 脓胞症状的发生率均降低, 说明该症状的发生与浓度关系密切。在注射浓度为  $1.09 \times 10^5$  CFU/mL 时, 脓胞症状发生率最高。

温度感染试验结果 经 28 d 的暂养, 试验组扇贝全部死亡, 试验结果见表 2。由表 2 可见, 在 19 °C 条件下, 闭壳肌上出现脓胞病变的死亡扇贝个数最多, 低于或高于这个温度, 闭壳肌上的脓胞

表 1 浓度感染试验结果 Tab. 1 Concentration infection results of the experiment

Table with 10 columns: Injection group (1, 2, 3, 4), Control group, and rows for delivery volume, dead volume, and symptoms volume.

表 2 温度感染试验结果  
Tab. 2 Temperature infection results of the experiment

	15 °C			17 °C			19 °C			21 °C		
	1(10 <sup>0</sup> )	2(10 <sup>-1</sup> )	对照 control	1(10 <sup>0</sup> )	2(10 <sup>-1</sup> )	对照 control	1(10 <sup>0</sup> )	2(10 <sup>-1</sup> )	对照 control	1(10 <sup>0</sup> )	2(10 <sup>-1</sup> )	对照 control
投放数量/N delivery volume	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
死亡数量/N dead volume	10	10	0	10	10	0	10	10	1	10	10	1
症状数量/枚/N symptoms volume	0	0	0	0	1	0	3	2	0	1	1	0

发生率都逐渐降低。19 °C 条件下, 出现症状的扇贝数量明显高于对照组, 说明在此温度下, 该病原菌对虾夷扇贝具有较强的致病性。

**病原菌的再分离** 从感染死亡的扇贝闭壳肌上的脓胞中, 重新分离到原感染菌, 表明 XJ02 是虾夷扇贝脓胞症状的病原菌。

#### 2.4 病原菌的鉴定

**病原菌的外观形态特征** 将病原菌 XJ02 通过 TCBS 培养基 25 °C 培养 24 h 后菌落圆形(图 2), 边缘整齐, 表面隆起光滑, 呈淡灰白色, 革兰氏染色阴性, 菌体呈短杆状, 两端钝圆, 具至少一根极生单鞭毛(图 3)。水浸片检查和半固体穿刺培养发现此菌具有一定的运动能力。



图 2 XJ02 在 TCBS 培养基上生长状况  
Fig. 2 Growth situation on TCBS of XJ02

**病原菌的理化性状** 将菌株 XJ02 送中科院北京微生物所进行生理生化指标的测定, 硝酸盐还原、糊精、L-阿拉伯糖、D-甘露醇、D, L-乳酸、丁二酸、氧化酶、水解明胶、肌苷反应呈阳性, 糖原、水解淀粉等反应呈阴性(表 3)。

菌株 XJ02 的 16S rRNA 扩增、测序及分析经扩增克隆测序, 结果得到 1 条长度为 1 438 bp 的 16S rRNA 基因片段(图 4)。将其在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比较, 并对其进行同源性分析。

但由于数据库中未有与本细菌同源的细菌收录, 故系统发育树建立存在一定的误差。结合上述外观形态及理化分析结果, 经中科院北京微生物研究所鉴定该病原菌为查氏弧菌。

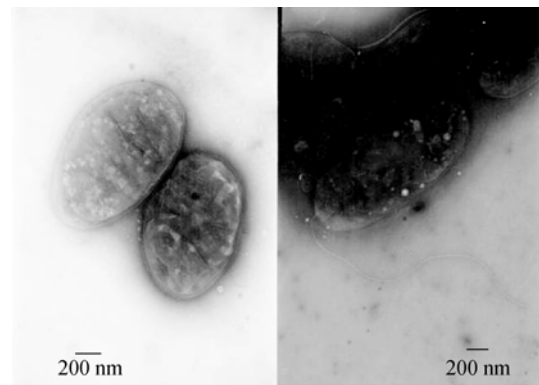


图 3 XJ02 电镜图片

Fig. 3 Electron microscopy images of XJ02

#### 2.5 药敏测试

测定查氏弧菌对 22 种抗菌类药物的敏感性, 结果发现, 查氏弧菌对氨苄西林、青霉素、环丙沙星等 20 中试验药物敏感, 对四环素、多西环素不敏感(表 4)。

### 3 讨论

弧菌是海洋环境中最常见的细菌类群之一, 广泛分布于近岸、河口海区的海水和生物体中, 其致病性受宿主的生理状态及水质环境条件等综合因素的影响较大, 是一类条件致病菌<sup>[15]</sup>。作为海水养殖动物的主要病原菌之一, 迄今作为海水养殖动物弧菌病病原已被报道过的有 20 多种<sup>[16]</sup>, 给我国的海水养殖事业带来了很大的损失。从现有资料可知, 我国养殖贝类因微生物疾病导致死亡而造成的经济损失每年达到 20~30 亿元<sup>[17]</sup>。而弧菌是引起贝类死亡的一类重要的病原微生物, 主要危害鲍、扇贝、蛤、牡蛎等。脓胞病是贝类养殖过程中比较少见的一种细菌性疾病。目前仅李霞<sup>[18]</sup>报道过由河流弧菌(*V. fluvialis*)引起皱纹盘鲍的脓胞病,

表3 分离菌株的生理生化指标  
Tab. 3 Separate strains physiological and biochemical indexes

试验项目 item	结果 result	试验项目 item	结果 result	试验项目 item	结果 result	试验项目 item	结果 result
细胞形态 cell morphology	短杆 short bar	革兰氏染色 gram stain	-	接触酶 catalase	-	氧化酶 oxidase	-
硝酸盐还原 nitrate reduction	-	水解淀粉 amylohydrolysis	-	Vp 试验 Vp	-	水解明胶 hydrolyzed gelatin	-
对照 control	-	D-密二糖 D-melibiose	-	p-苯乙醇酸 p-mandelic acid	-	L-组氨酸 L-histidine	-
$\alpha$ -环糊精 $\alpha$ -cyclodextrin	-	甲基葡糖苷 methyl glucoside	-	衣康酸 itaconic acid	-	羟脯氨酸 hydroxy proline	-
糊精 dextrin	-	D-阿洛酮糖 D-psicose	-	$\alpha$ -氧代丁酸 $\alpha$ -4-oxobutanoic acid	-	L-亮氨酸 L-leucine	-
糖原 glycogen	-	D-棉子糖 D-gosypose	-	$\alpha$ -氧代戊二醛 $\alpha$ -oxygen glutaraldehyde	-	L-鸟氨酸 L-ornithine	-
Tween40	-	L-鼠李糖 L-rhamnose	-	$\alpha$ -氧代戊酸 $\alpha$ -oxopentanoic acid	-	L-苯丙氨酸 L-phenylalanine	-
Tween80	-	D-山梨醇 D-sorbitol	-	D, L-乳酸 D, L-lactate	-	L-脯氨酸 L-proline	-
N-乙酰半乳糖胺 N-acetylgalactosamine	-	蔗糖 sucrose	-	丙二酸 malonic acid	-	L-焦谷氨酸 L-pyroglutamic acid	-
N-乙酰半葡萄糖胺 N-acetylglucosamine	-	D-海藻糖 D-trehalose	-	丙酸 propionic acid	-	D-丝氨酸 D-serine	-
核糖醇 ribitol	-	松二糖 turannose	-	奎尼酸 quetiapine in acid	-	L-丝氨酸 L-serine	-
L-阿拉伯糖 L-arabinose	-	木糖醇 xylitol	-	D-己糖酸 D-hexonic acid	-	L-苏氨酸 L-threonine	-
D-阿糖醇	-	丙酮酸甲酯 acid methyl ester	-	葵二酸 sebacic acid	-	D, L-肉碱 D, L-carnitine	-
D-a sugar alcohol	-	丁二酸-甲酯 methyl succinic acid	-	丁二酸 succinic acid	-	g-氨基丁酸 g-amino butyric acid	-
D-纤维二糖 D-cellobiose	-	乙酸 ethanoic acid	-	溴代丁二酸 bromide succinate	-	尿刊酸 irotanic acid	-
i-赤藓醇 l-erythritol	-	顺-阿康酸 trans-aconic acid	-	琥珀酰胺酸 succinic acid	-	肌苷 inosine	-
D-果糖 D-fructose	-	柠檬酸 citric acid	-	葡萄糖酰胺 glucuronic acid amide	-	尿苷 uridine	-
L-果糖 L-fructose	-	甲酸 formic acid	-	L-丙氨酸 L-Alcrylic amide	-	胸苷 thymidine	-
D-半乳糖 D-galactose	-	D-半乳糖酸内酯 D-galactose acid lactone	-	D-丙氨酸 D-alanine	-	苯基乙胺 phenyl ethylamine	-
龙胆二糖 gentiobiose	-	D-半乳糖醛酸 D-galactose uronic acid	-	L-丙氨酸 L-alanine	-	腐胺 putrescine	-
$\alpha$ -D-葡萄糖 $\alpha$ -D-glucose	-	D-葡萄糖 D-sour grapes	-	L-丙氨酸甘氨酸 L-alanyl glycine	-	2-氨基乙醇 2-amino ethanol	-
m-肌醇 m-inositol	-	$\beta$ -甲基葡萄糖苷 $\beta$ -methyl Glucoside	-	L-天冬酰胺 L-asparagine	-	2, 3-丁二醇 2, 3-butanediol	-
$\alpha$ -D-乳糖 $\alpha$ -D-lactose	-	D-葡萄糖醛酸 D-glucuronic acid	-	L-天冬氨酸 L-aspartic acid	-	甘油 glycerine	-
乳果糖 lactulose	-	$\alpha$ -羟基丁酸 $\alpha$ -butyric acid	-	L-谷氨酸 L-glutamic acid	-	D, L-甘油磷酸盐 D, L-glycerol phosphate	-
麦芽糖 maltose	-	$\beta$ -羟基丁酸 $\beta$ -butyric acid	-	甘氨酸天冬氨酸 glycyl aspartic acid	-	D-葡萄糖-1-磷酸 D - glucose-1-phosphate	-
D-甘露醇 D-mannitol	-	g-羟基丁酸 g-butyrlic acid	-	甘氨酸谷氨酸 glycyl glutamate	-	D-葡萄糖-6-磷酸 D-glucose-6-phosphate	-
D-甘露糖 D-mannose	-						

注：“+”表示阳性；“-”表示阴性。

Notes: “+” is positive; “-” is negative.

GTCATGAACCACAAAGTGGTGAGCGTCCTCCCCGAAAGGTTAACTACCCACTTCTTTGCAGCCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTG  
TACAAGGCCCGGAACGTATTACCGTAGCATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTCAGACTCCAATCCG  
GACTACGACGCATTTTTTGGGATTCGCTCACTCTCGCAAGTTCCGCCCTCTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAA  
GGCCATGATGACTTGACGTCGTCGCCACCTTCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCCTGGAGTCCCGACATTACTCGCTGGCAAACAAG  
GATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATTTACAACACGAGCTGACGACGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTCCCGAAG  
GCACACCTGCGTCTCCGCTGGCTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTG  
TGCGGGCCCCGTCATTCATTTGAGTTTAATCTTGCACCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTAACGCGTTAGTCCGAAAGCCACGGCTC  
AGGGCCACAACCTCCAAGTAGACATCGTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGCATCTGAGTGTG  
AGTATCTGTCCAGGGGGCCCTTCGCCACTGGTATTCTTTCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGAAATTTACCCCTCTACA  
GTACTCTAGTTCACCAGTTTCAAATGCAGTTCGAGGTTGAGCCCCGGGCTTTCACATCTGACTTAATGAACCACCTGCATGCGGCTTTAC  
GCCCAGTAATCCGATTAACGCTCGCACCTCCGTATTACCGCGGTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTCTTCTTCTGTTGCTAACGTCAAG  
AGATGCCCTATTAACGACACCCCTTCTCACAACGAAAGTACTTTACAADDGAAGGCTTCTTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAG  
GCTTTCGCCATTGTGCAATATTTCCCACTGCTGCCCTCCGTTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCTGATCATCTCTCAGA  
CCAGCTAGGGATCGTCGCTTGGTGAGCCATTACCTACCAACTAGCTAATCCACCTAGGCATATCTTGACGCGAGAGGCCCGAAGGTCCC  
CCTCTTTGGCCCGTAGGCGTTATGCGGTATTAGCCATCGTTTCCAATGGTTATCCCCACATCAAGGCAATTTCTAGGCATTACTCACCCG  
TCCGCCGCTCGACGCGTTAACGTTCCCGAAGGTTTCAGATAACTCGTTTCCGCTGACT

图 4 查氏弧菌 16S rRNA 基因序列  
Fig. 4 16S rRNA gene sequence of *V. chagasii*

表 4 分离菌株的药物敏感性试验结果

Tab. 4 The sensitivity of the isolated strains to test chemotherapentants

药品名称 drug name	剂量/( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) dose	敏感性 sensitivity	药品名称 drug name	剂量/( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) dose	敏感性 sensitivity
青霉素 benzylpenicillin	8	S	庆大霉素 gentamicin	4	S
氨苄西林 ampicillin	8	S	阿米卡星 amikacin	16	S
头孢呋辛 cefuroxime	8	S	环丙沙星 ciprofloxacin	1	S
头孢噻肟 cefotaxime	8	S	氧氟沙星 ofloxacin	4	S
头孢他啶 ceftazidime	8	S	诺氟沙星 norfloxacin	4	S
头孢吡肟 cefepime	8	S	左氧氟沙星 levofloxacin	2	S
亚胺培南 imipenem	4	S	复方新诺明 SXT	2/38	S
美罗培南 meropenem	4	S	四环素 tetracycline	16	R
哌拉西林/舒巴坦 PIZ	64/8	S	多西环素 doxyxyclyne	16	R
氨苄西林/舒巴坦 SAM	1	S	氯霉素 chloramphenicol	8	S
头孢哌酮/舒巴坦 CPS	16/16	S	红霉素 erythromycin	0.5	S

注: R 为耐药; S 为敏感。

Notes: R is resist; S is sensitive.

其病理表现与由查氏弧菌引起的虾夷扇贝脓胞病状极为相似。查氏弧菌致病性目前国内外尚未见报道。

有关查氏弧菌的描述, 仅国家海洋局第三海洋研究所报道过查氏弧菌原产国为中国, 其生物危害程度仍在研究中。从此次虾夷扇贝爆发性流行病中分离确定查氏弧菌为致病菌, 在国内外尚属首次。此菌能在 TCBS 上生长, 也与国家海洋局第三海洋研究所报道过该菌不能在 TCBS 培养基上生长不同。通过本次对查氏弧菌较系统的研究鉴定,

进一步补充、丰富了该菌的形态与培养特性以及 16S rRNA 基因序列方面的内容, 并首次报道该菌的理化特性。为对该菌的有效检验、进一步研究提供了可参考的资料。

虾夷扇贝为变温动物, 体温随海水温度的变化而变化, 而适宜的温度是病原菌能进行正常活动的必要条件, 当养殖水体升到一定温度时, 达到了该细菌生长所需温度, 细菌开始繁殖, 对贝体造成损害并导致扇贝的最终死亡。由试验结果可知,

水温 19℃ 时有利于该菌致病。这与高温季节自然海域浮筏养殖扇贝发病时的环境温度相符。近几年,长海县西北部海域在 7—9 月份养殖扇贝大规模死亡,此时月平均水温约为 19~21℃。其中 2009 年 7 月取广鹿岛大量濒死扇贝解剖,超过 80% 死亡扇贝闭壳肌上有脓胞病变,此时 2 米层月平均水温在 20.1℃。随后随着温度的升高,死亡扇贝中患脓胞症状的扇贝数量却明显减少,此时扇贝死亡更大可能是高温引起。结合实验室内温度感染试验结果,认为 19~21℃ 是扇贝出现脓胞病变并死亡的高峰期温度。

浓度感染试验与温度感染试验,在同等条件(19℃,  $1.09 \times 10^5$  CFU/mL)下注射,由于注射时间不同结果也有差异。5—6 月浓度回接感染试验症状发生率要高于同样条件下 10—11 月温度回接感染试验的症状发生率。分析原因主要有两方面,首先,弧菌是海水中的正常菌群,为条件致病菌,其致病性取决于宿主的健康状况、环境条件、海水中的细菌数量、海水的理化物质等因素<sup>[14]</sup>。上半年虾夷扇贝产卵结束,体内营养大量流失,个体本身健康情况与下半年个体相比有一定差别,使其更易受到病原菌感染。查氏弧菌的致病条件需要更进一步的探索研究;其次,下半年经过夏季扇贝大规模死亡后存活下来的扇贝与上半年的扇贝相比较,对此病原菌具有更强的抗性,同等条件下更不容易患病。这也造成了两次试验感染结果的差异。

虾夷扇贝脓胞病多发于水质差、养殖密度大的水域。此外,与适宜温度下水体中爆发大量的查氏弧菌也有直接的联系。虾夷扇贝脓胞病的防治主要靠药物治疗、改善环境和提高免疫等方法。虽然化学药物防治是最为直接和简便的控制手段,但海洋中使用药物存在一定的局限性,而且长期使用化学药品将使病原体产生耐药性,易导致防治失败,同时也可能导致产品中的药物残留引起质量卫生安全问题。因此,利用确定的致病菌株开发免疫防治技术,是控制虾夷扇贝脓胞病的主流方向。

综上所述,本研究的结论是查氏弧菌是虾夷扇贝重要的致病性病原生物之一。近年来虾夷扇贝

的大规模死亡可能是致病因子的感染和高温等环境胁迫因子共同作用的结果。

#### 参考文献:

- [1] 徐高蓉,宋林生,常亚青,等. 虾夷扇贝面盘幼虫细菌性疾病的病原研究[J]. 水产科学, 2008, 27(1): 9-12.
- [2] 李文姬,谭克非. 日本解决虾夷扇贝大规模死亡的启示[J]. 水产科学, 2009, 28(10): 609-612.
- [3] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌的常用鉴定方法[M]. 北京: 科学出版社, 1978: 98-193.
- [4] 韩文瑜,何昭阳,刘玉斌,等. 病原细菌检验技术[M]. 吉林:吉林科技出版社, 1992: 10-110.
- [5] Holt J G, Krieg N R, Sheath P H, *et al.* Bergey's manual of determinative bacteriology(9th edition)[M]. Baltimore: William and Wilkins, 1994: 183-217.
- [6] 陈绍铭,郑福寿. 水生微生物学实验法[M]. 北京: 海洋出版社, 1985: 35-36.
- [7] 曹澍泽. 兽医微生物学及免疫学技术[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1992: 3-4.
- [8] 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: 162-171.
- [9] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 第 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 482-486.
- [10] Buller N B. Bacteria from fish and other aquatic animals: A practical identification manual[M]. UK: CABI Publishing, 2004: 2-43.
- [11] 徐彪,杨红生. 一株形态特殊的细菌对栉孔扇贝致病性的初步研究[J]. 动物学杂志, 2003, 38(4): 24-27.
- [12] 张维鑫,吴信忠,李登峰,等. 海湾扇贝养殖过程中的流行病学调查研究[J]. 海洋学报, 2005, 27(5): 137-144.
- [13] 张维鑫,吴信忠,孙敬锋,等. 栉孔扇贝大量死亡的流行病学调查研究[J]. 海洋学报, 2006, 28(5): 90-100.
- [14] 马悦欣,徐高荣,常亚青,等. 大连地区刺参幼参溃烂病细菌性病原的初步研究[J]. 大连水产学院学报, 2006, 21(1): 13-18.
- [15] 李国,闫茂仓,常维山,等. 我国海水养殖贝类弧菌病研究进展[J]. 浙江海洋学院学报:自然科学版, 2008, 27(3): 327-334.
- [16] 郑天伦,王国良,金珊. 海水养殖动物弧菌病防治的研究进展[J]. 台湾海峡, 2002, 21(3): 372-376.
- [17] 吴信忠. 海洋养殖贝类病害的流行状况及其控制对策[C]/南海资源开发研究[M]. 广州: 广东经济出版社, 1998: 670-679.
- [18] 李霞,刘淑范. 皱纹盘鲍“裂壳病”的病原及组织病理研究[J]. 水产学报, 1998, 22(3): 61-66.

## Isolation, identification and pathogenicity of *Vibrio chagasii* from *Patinopecten yessoensis*

TENG Wei-ming, LI Wen-ji\*, ZHANG Ming, YU Zuo-an, LI Shi-lei, LIU Xiang-feng,  
LI Hua-lin, FU Cheng-dong

(Liaoning Open Laboratory of Applied Marine Biotechnology,  
Liaoning Key Laboratory of Marine Fisheries Molecular Biology,  
Liaoning Ocean and Fisheries Science Research Institute, Dalian 116023, China)

**Abstract:** In recent years cultured sea scallop (*Patinopecten yessoensis*) dead on a large-scale in seas near Changhai County, Dalian, China, in summer. The main symptom is the abscess on adductor muscle. The transmission experience was improved to indicate that a bacterium isolated from natural infected focus, named XJ02 displayed intense pathological activity to scallops, and the symptom is the same to natural intention. The bacterium XJ02 identification test through morphological specificity, physical and chemical properties and 16S rRNA gene sequence analysis showed the bacterium is *Vibrio chagasii*. There has been no any research on the pathogenicity of *V. chagasii*. This article for the first time to find a more comprehensive's vibrio physicochemical properties of research. The dose-and temperature-dependent test indicated that the bacterium had the most pathogenicity at 19 °C while the concentration was  $1.09 \times 10^5$  CFU/mL. The medicine sensitivity analysis that's to check Ampicillin, Benzylpenicillin, Ciprofloxacin etc is sensitive during 20 drugs sensitive test, to Tetracycline, Doxycycline is not sensitive element.

**Key words:** *Patinopecten yessoensis*; *Vibrio chagasii*; abscess

**Corresponding author:** LI Wen-ji. E-mail: wenji1016@yahoo.com.cn