



凡纳滨对虾中发光坎氏弧菌的分离、鉴定及致病性

李锦锦¹, 洪宝华¹, 倪思圳¹, 鲍佳伟², 马荣荣¹, 尹飞¹,
贺洁³, 罗华明³, 李琛¹, 黄元明², 钱冬^{1*}

(1. 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211;

2. 浙江宏野海产品有限公司, 浙江 台州 317000;

3. 台州市水产技术推广总站, 浙江 台州 317000)

摘要: 为研究凡纳滨对虾死亡的致病机理, 实验采用 TCBS 培养基从濒死凡纳滨对虾肝胰腺分离到浅绿色、直径 3~7 mm 的发荧光菌落; 革兰氏染色为阴性短杆菌; 经 API 20E 鉴定, 分离株 PvL-1 与坎氏弧菌参考菌株 CAIM249 相似度为 90%; *fitZ* 序列与坎氏弧菌 CP020076 相似度为 99.31%; *gapA* 序列与坎氏弧菌 EF596552 相似度为 98.89%; 采用坎氏弧菌种特异性引物对 PvL-1 进行 PCR 分析, 可扩增出坎氏弧菌种特异性片段, 不能扩增出轮虫弧菌和哈维氏弧菌特异性片段, 上述结果表明 PvL-1 为坎氏弧菌成员。分离菌株在 10% 脱纤维羊血平板呈 β 溶血, 脱脂奶粉平板出现明显透明圈, 表明存在溶血性和胞外蛋白酶活性。分析了 PvL-1 的急性肝胰腺坏死病、溶血素基因、菌毛基因和其他毒力基因, 表明 PvL-1 具有 *AP4*、*TLH*、*vcadHly*、*flaC*、*mukF*、*gloB*、*sodB* 和 *esrB* 等毒力基因。PvL-1 可使健康凡纳滨对虾发病死亡, 濒死凡纳滨对虾与自然发病虾呈现类似症状, 对凡纳滨对虾半数致死浓度 (LD₅₀) 2.94×10⁴ CFU/尾; 病理组织观察发现, 人工感染发病凡纳滨对虾肝胰腺小管细胞脱落、崩解、血细胞浸润等, 与自然发病凡纳滨对虾病理特征相同。研究表明, 本次实验分离到可发光的坎氏弧菌 PvL-1, 对凡纳滨对虾有较强致病性, 拓展了对凡纳滨对虾发光坎氏弧菌的认知。

关键词: 凡纳滨对虾; 坎氏弧菌; 鉴定; 致病性

中图分类号: Q 786; S 945.1

文献标志码: A

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 别称南美白对虾, 属甲壳纲 (Crustacea) 十足目 (Decapoda) 对虾科 (Penaeidae) 对虾属 (*Penaeus*)。凡纳滨对虾肉质鲜美、营养丰富, 为世界各国消费者所喜爱^[1], 是当今世界养殖产量最高的虾类。对虾养殖可受到病毒、细菌等多种病原的危害, 近年

来世界范围内流行并引起严重经济损失的凡纳滨对虾病主要有白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus, WSSV)、急性肝胰腺坏死病 (acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)、虾肝肠胞虫 (enterocytozoon hepatopenaei, EHP)、桃拉综合征病毒 (taura syndrome virus, TSV)、虾虹彩

收稿日期: 2020-01-03 修回日期: 2020-05-20

资助项目: 浙江省重点研发计划 (2020C02020)

第一作者: 李锦锦, 从事水生动物病害研究, E-mail: 1938443056@qq.com

通信作者: 钱冬 (照片), E-mail: qiandong@nbu.edu.cn



病毒 (shrimp iridescent virus, SHIV) 和弧菌 (*Vibrio* spp.) 等^[2-6]。弧菌是养殖对虾重要的细菌性病原^[7], 其中引起对虾急性肝胰腺坏死病的副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*) 及相关弧菌自 2011 年前后在世界各地暴发, 对虾养殖业造成巨大损失。

坎氏弧菌 (*V. campbellii*) 为弧菌属哈维氏弧菌群 (*V. harveyi* group) 的重要成员, 在海洋环境中分布广泛, 可引起多种水生动物疾病。过去认为坎氏弧菌是一种非致病性、不发光的弧菌^[8-10], 但近年研究表明, 坎氏弧菌为水产养殖动物的重要病原菌, 可引起养殖鱼类、虾类及贝类多种疾病^[11-14]。以往对坎氏弧菌的研究多集中于溶血素等毒力基因方面^[15]。近年来有学者从病虾中分离鉴定到坎氏弧菌, 发现坎氏弧菌携带急性肝胰腺坏死病 Pir 毒力基因, 引起凡纳滨对虾暴发 AHPND^[16-17], 非副溶血弧菌的 AHPND 毒力基因携带和致病性是一个值得关注的重要内容。

2019 年台州市某对虾海水养殖场凡纳滨对虾暴发疾病, 从濒死对虾中分离到 6 株细菌 (PvL-1~PvL-6), 分别为坎氏弧菌 (PvL-1~PvL-3) 和轮虫弧菌 (*V. rotiferianus*) (PvL-4~PvL-6), 人工回感实验显示, 2 种分离菌株的半致死数量分别为 2.94×10^4 和 2.50×10^8 CFU/尾, 初步表明坎氏弧菌有较强的致病性。本实验选择坎氏弧菌 PvL-1 开展了凡纳滨对虾致病性分析、主要致病基因和致病机理研究, 以期坎氏弧菌对凡纳滨对虾致病机理和疾病防控提供相关依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验动物及菌株 发病凡纳滨对虾采自浙江台州某养殖场大棚养殖池, 体长 5~6 cm, 体质量 (7.4 ± 0.2) g; 攻毒所用健康凡纳滨对虾为浙江台州宏野海产品有限公司提供, 平均体长 (8 ± 0.2) cm, 平均体质量 (8.8 ± 0.2) g; 用于坎氏弧菌种特异性引物鉴别的轮虫弧菌 (VR6) 及哈维氏弧菌 (VH8) 均为本实验室分离自患病凡纳滨对虾。

实验仪器 荧光显微镜 (Nikon Eclipse Ni-E/Ni-U)、酶标仪 (SpectraMax i3X)、凝胶成像仪 (gel DocTMRX⁺)、高速冷冻离心机 (Thermo Sorvall ST 16R)。

实验试剂 API 20E 鉴定试剂盒 (生物梅

里埃中国有限公司); 革兰氏染色液和药敏纸片 (杭州滨和微生物试剂有限公司); 10% 脱纤维羊血平板 (北京陆桥技术股份有限公司); 基因组 DNA 提取试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司); 2×Taq Master Mix (北京康为世纪生物技术有限公司); 引物合成和测序 (上海华大基因科技有限公司); 营养琼脂 NA、营养肉汤 NB 和硫代硫酸钠-柠檬酸盐-胆盐培养基 (TCBS) (青岛高科园海博生物技术有限公司); 脱脂奶粉平板参考文献配制^[18]。

1.2 发病凡纳滨对虾细菌分离

发病凡纳滨对虾取自大棚海水集约化养殖池, 以 10 万尾/667 m² 的放养密度, 放养规格为 4 cm/尾的凡纳滨对虾标粗苗; 放养约 1 个月, 虾池出现反应迟缓、肝胰腺褪色的濒死凡纳滨对虾, 晚上病虾可见明显的发光, 取典型发光病虾, 用 75% 酒精棉球轻擦表面后, 无菌取肝胰腺于 TCBS 培养基上划线分离, 28 °C 恒温培养。

发光虾肝胰腺于 TCBS 培养基 28 °C 恒温培养 24 h, 可观察到直径 3~7 mm、圆形、浅绿色 (发光) 和淡黄色 (不发光) 菌落, 挑取浅绿色优势菌落 (PvL-1、2、3) 和淡黄色优势菌落 (PvL-4、5、6), 用含 3% NaCl 的营养琼脂划线纯化, 挑取纯化单菌落, 用 3% NaCl 营养琼脂制备菌苔。

1.3 分离菌株对凡纳滨对虾的致病力测定

选取浅绿色 PvL-1 和淡黄色 PvL-4 单菌落接种于 3% NaCl 营养肉汤中, 28 °C、150 r/min 振荡培养 18 h, 7 000 r/min 离心 10 min, 用 pH 7.4 的灭菌磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗涤菌体 3 次, 用灭菌 PBS 重悬并稀释菌液, 制成 10 倍系列稀释菌悬液 ($4.55 \times 10^4 \sim 4.55 \times 10^8$ CFU/mL) 液。菌液以 0.1 mL/尾肌肉注射平均体质量为 (8.8 ± 0.2) g 的健康凡纳滨对虾, 对照组注射等体积生理盐水, 每组注射 15 尾, 养殖于盛有经过滤海水的 50 L 水族箱中, 充气养殖; 实验期间水温控制在 (26 ± 1) °C。每日记录凡纳滨对虾发病和死亡情况, 取濒死凡纳滨对虾肝胰腺进行细菌分离, 同时用 Davidson 氏液^[19] 固定濒死虾肝胰腺组织。LD₅₀ 采用 Karber 法计算^[20]。

1.4 分离菌株 PvL-1 的鉴定

形态和生化鉴定 取 PvL-1, 营养琼脂划线, 28 °C 培养 18 h, 挑取单菌落制备菌涂片,

按革兰氏染色液说明进行革兰氏染色；另挑取 PvL-1 纯化菌落，涂布营养琼脂制备菌苔，制备菌悬液，接种于生物梅里埃 API 20E 鉴定条中。菌悬液制备和结果观察均按 API 20E 操作说明进行。

分子鉴定 挑取 PvL-1 单菌落，煮沸法提取细菌 DNA，选择 6 个管家基因进行 PCR 反应，所用引物见表 1。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测确认，并送上海华大基因科技有限公司测序。

表 1 PvL-1 鉴定采用的管家基因引物序列

Tab. 1 Primers sequence of house-keeping genes for PvL-1 identification

引物 primers	序列 sequence	产物片段/bp fragment size	参考文献 references
<i>topA</i>	<i>topA</i> -F: GAGATCATCGGTGGTGATG <i>topA</i> -R: GAAGGACGAACGCTTCGTG	800	[21]
<i>mreB</i>	<i>mreB</i> -F: ACTTCGTGGCATGTTTTTC <i>mreB</i> -R: CCGTGCATATCGATCATTTTC	1 000	[21]
<i>fitZ</i>	<i>fitZ</i> -F: ATGCAGGAATTGCGATTCTACTCA <i>fitZ</i> -R: TTATGCGTTAGCCGCATTAAACTCAAC	951	本实验
<i>gapA</i>	<i>gapA</i> -F: ATGACTATCAAAGTAGGTATTAACGGTTTTGGC <i>gapA</i> -R: TTACTTAGAGATGTGAGCGATTAGGTCTAGAAC	996	本实验
16S <i>rRNA</i>	27F: AGAGTTTGATCCTGGCTC AG 1492R: TACGGCTACCTGTTCACGACTT	1 500	[22]
<i>rpoD</i>	<i>rpoD</i> -F: GATTTGTTGACCCTGATGCAGACGA <i>rpoD</i> -R: TAACCACGACGGTATTTCGAATTATCTACC	799	本实验
<i>Vca-hly</i>	<i>Vca-hly</i> 5: CTATTGGTGGAAACGCAC <i>Vca-hly</i> 3: GTATTCTGTCCATACAAAC	328	[8]

系统进化树 将 *gapA* 和 *fitZ* 序列于 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对分析，选择相似度较高的坎氏弧菌和哈维氏弧菌，运用 MEGA 7.0 软件基于邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建进化树。

1.5 分离菌株 PvL-1 毒力因子活性及相关基因检测

PvL-1 菌株接种到 10% 脱纤维羊血平板和脱脂奶粉平板用于溶血性和胞外蛋白酶活性测定。

根据文献合成坎氏弧菌毒力基因相关引物，用于 PvL-1 鉴定，所用引物见表 2。

1.6 凡纳滨对虾组织病理观察

取 Davidson 氏液固定健康、自然发病和人工感染后濒死凡纳滨对虾肝胰腺组织，用酒精梯度脱水、二甲苯透明、浸蜡包埋、组织切片、二甲苯脱蜡、酒精梯度复水后，经 H.E 染色，脱水透明，中性树脂封片观察^[23]。

2 结果

2.1 患病凡纳滨对虾症状

健康凡纳滨对虾活力和摄食正常，肝胰腺黑色、饱满、界面清晰(图版 I-1、4)，暗室观察未见发光；患病凡纳滨对虾游动迟缓、摄食减少，肝胰腺出现褪色、萎缩及界面模糊，部分虾出现空肠现象(图版 I-2)，濒死及短时间死亡虾夜间或暗室可见发光，死亡时间较长的凡纳滨对虾其尾部和头部因腐烂变黑，该部分的发光不明显，呈暗黑色(图版 I-5)；虾池出现明显发光后 2~3 d，死亡率可达 80% 以上。感染凡纳滨对虾与自然发病凡纳滨对虾症状相同(图版 I-3、6)。

2.2 PvL-1 对凡纳滨对虾的 LD₅₀

取 PvL-1 和 PvL-4 感染的健康凡纳滨对虾，实验结果显示，PvL-1 分离株最高浓度组 (4.55×10^8 CFU/尾) 18 h 后开始出现死亡，高浓度组 ($4.55 \times 10^6 \sim 4.55 \times 10^7$ CFU/尾) 24 h 后出现死亡；累积 2 d 后，细菌注射组虾活力变弱、游动迟缓、

表 2 坎氏弧菌毒力基因引物

Tab. 2 Primers of *V. campbellii* virulence genes

引物 primers	序列 sequence	产物片段/bp fragment size	参考文献 references
<i>vcahHly</i>	<i>vcahHly</i> -F: AATGGCGATTCCCGAAT <i>vcahHly</i> -R: GACGCACACTCAGAAC	647	[8]
<i>sodB</i>	<i>sodB</i> -F: ATGTCATTGGAATTACCTGC <i>sodB</i> -R: TCGATGTAATAAGCGTGTCCCA	490	[24]
<i>esrB</i>	<i>esrB</i> -F: GATCATGCCTTGCTAGCC <i>esrB</i> -R: TCGGCGACCAGCTTGAGA	454	[25]
<i>mukF</i>	<i>mukF</i> -F: ATGAGTGAGATGACTCTCAATGCTGC <i>mukF</i> -R: TTAGTATCGGTCGATGACATTGCTTG	1 338	本实验
<i>gloB</i>	<i>gloB</i> -F: GTGTTAGAGATCAAAAAGCATACCCGCA <i>gloB</i> -R: TTA AAAATTCGTTCTTCCACTCGCGTAGA	759	本实验
<i>flaC</i>	<i>flaC</i> -F: AAATCATTCCAAATCGGTGC <i>flaC</i> -R: TCTTTGATTGCGCTCTTA	580	[26]
<i>TLH</i>	<i>TLH</i> -F: ACGGGTTTGTATGGACAGAAT <i>TLH</i> -R: AACTCAAGGGTGAACAGGGTA	193	[27]
<i>VpPir</i>	<i>VpPirA</i> -284F: TGACTATTCTCACGATTGGACTG <i>VpPirA</i> -284R: CACGACTAGCGCCATTGTTA <i>VpPirB</i> -392F: TGATGAAGTGATGGGTGCTC <i>VpPirB</i> -392R: TGTAAGCGCCGTTAACTCA	284 392	[28]
<i>AP3</i>	<i>AP3</i> -F: ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAAC <i>AP3</i> -R: ACGATTTGACGTTCCCAA	1 269	[29]
<i>AP4</i>	<i>AP4</i> -F: TTGAGAATACGGGACGTGGG <i>AP4</i> -R: GTTAGTCATGTGAGCACCTTC	230	



图版 I 健康及发病凡纳滨对虾症状

1、4. 健康凡纳滨对虾；2、5. 自然发病凡纳滨对虾；3、6. 感染发病凡纳滨对虾

Plate I Symptoms of healthy and diseased *L. vannamei*1, 4. healthy *L. vannamei*; 2, 5. naturally morbid *L. vannamei*; 3, 6. infected morbid *L. vannamei*

摄食减少,肝胰腺开始褪色、萎缩,濒死凡纳滨对虾暗室发光,症状与自然发病虾类似;累积 7 d 后虾停止死亡;PvL-4 分离株最高浓度组 (4.55×10^8 CFU/尾) 对凡纳滨对虾致死率为 60% 左右,患病虾肝胰腺未见明显异常、暗室未见发

光。统计各组累计死亡率,用 Karber 法计算半致死数浓度 (LD_{50}),PvL-1 在 95% 的置信区间内分离菌株对凡纳滨对虾的 LD_{50} 为 2.94×10^4 CFU/尾 (表 3),有较强毒力;PvL-4 LD_{50} 为 2.50×10^8 CFU/尾,毒力较弱。

表 3 凡纳滨对虾人工感染实验结果

Tab. 3 Results of artificial infection of *L. vannamei*

浓度/(CFU/mL) concentration for challenging	死亡虾数/尾 mortality number								累计死亡数/尾 cumulative mortality	死亡率/% mortality rate
	0 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d		
4.55×10^8	0	6	6	3	0	0	0	0	15	100
4.55×10^7	0	4	5	4	1	0	0	0	14	93.3
4.55×10^6	0	3	4	4	2	0	0	0	13	86.7
4.55×10^5	0	0	2	2	0	1	3	0	8	53.3
4.55×10^4	0	0	2	0	0	0	2	0	4	26.7
对照 control	0	0	0	0	1	0	2	0	3	20.0

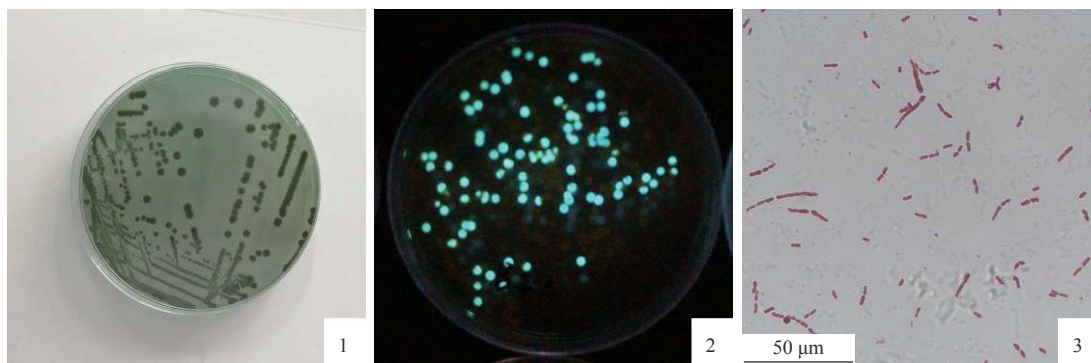
注:注射剂量为 0.1 mL/尾

Notes: injection dose was 0.1 mL/ind

2.3 凡纳滨对虾 PvL-1 分离株的鉴定

菌落和菌体形态 PvL-1 于 TCBS 培养基 28 °C 培养 24 h, 菌落呈圆形、浅绿色 (图版 II -1),

暗处可观察到发光菌落 (图版 II -2), 且发光强度与菌密度成正比。菌体为直或稍弯短杆菌, 无荚膜, 革兰氏染色呈阴性 (图版 II -3)。



图版 II 发光凡纳滨对虾分离株 PvL-1 菌落及菌体形态特征

1. PvL-1 在 TCBS 的菌落; 2. PvL-1 在 TCBS 的暗室发光菌落; 3. 革兰氏染色的 PvL-1 菌体 ($\times 100$)

Plate II Morphology of colony and bacterial thalli of PvL-1 isolated from luminous *L. vannamei*

1. colony of PvL-1 on TCBS; 2. luminescence colony of PvL-1 on TCBS; 3. thalli of PvL-1 by Gram staining ($\times 100$)

生理生化特征 采用 API 20E 生化鉴定条对 PvL-1 菌株进行鉴定, 结果发现, 分离菌株表现为革兰氏染色阴性, 氧化酶阳性, 赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶、明胶和吲哚等阳性, 精氨酸脱氢酶、肌醇、丙酮酸盐和 VP 反应等阴性, 与伯杰氏细菌手册所列的坎氏弧菌 CAIM249 性

状基本符合率达 90% (表 4)。

2.4 分离菌株 PvL-1 管家基因和种特异性引物 PCR 结果

为确定分离菌株 PvL-1 的分类地位, 用 16S *rRNA*、*topA*、*mreB*、*fitZ*、*gapA* 和 *rpoD* 等 6 个管家基因进行 PCR, 电泳和测序结果表明, PvL-1

表 4 PvL-1 生理生化鉴定结果

Tab. 4 Biochemical identification of strain PvL-1

生化项目 biochemical items	实验菌株 experimental strains		生化项目 biochemical items	实验菌株 experimental strains	
	PvL-1	CAIM249		PvL-1	CAIM249
半乳糖苷 ONPG	-	-	尿素 urea, URE	-	ND
革兰氏染色 Gram stain	-	-	山梨醇 sorbitol, SOR	-	-
氧化酶 oxidase, OX	+	+	葡萄糖 glucose, GLU	+	ND
肌醇 inositol, INO	-	-	乳糖 lactose	-	-
精氨酸 arginine, ADH	-	-	鼠李醇 rhamnol, RHA	-	ND
赖氨酸 lysine, LDC	+	+	蔗糖 sucrose, SAC	-	-
鸟氨酸 ornithine, ODC	+	ND	蜜二糖 melibiose, MEL	-	-
苯丙氨酸 phenylalanine, TDA	+	ND	苦杏仁苷 amygdalin, AMY	+	ND
枸橼酸 citric acid, CIT	-	ND	阿拉伯糖 arabinose, ARA	-	-
色氨酸 tryptophan, TRP	+	ND	硫化氢 H ₂ S	-	ND
吲哚 indole, IND	+	+	丙酮酸盐 pyruvate, VP	-	d
葡萄糖发酵 glucose, GLU O/F	+	+	运动性 moveability, MOV	+	+
明胶 gelatin, GLN	+	+	甲基红 methred, MR	-	-
硝酸盐还原 nitrate reduction NO ₂	+	+	生长需钠 Na ⁺ required for growth	+	+
发光 luminescence	+	d			

注: “+”阳性, “-”阴性, ND. 无相关数据, d. 菌株间存在差异
Notes: “+” positive, “-” negative, ND. no data, d. different in strains

可用 16S *rRNA* 和 *mreB* 引物扩增出 1 500 和 1 000 bp 条带, *fitZ* 和 *gapA* 引物扩增出 951 和 996 bp 条带, *topA* 和 *rpoD* 引物扩增出 800 和 799 bp 条带; 采用坎氏弧菌种特异性引物 *vcahHly* 对 PvL-1、轮虫弧菌和哈维氏弧菌进行检测, 结果显示, 特异性引物 *vcahHly* 能扩增出 PvL-1 分离株 328 bp 条带, 从轮虫弧菌和哈维氏弧菌不能扩增出相应条带 (图 1)。

2.5 分离菌株 PvL-1 系统进化树分析

分离菌株 PvL-1 的 16S *rRNA* 在系统进化树上与坎氏弧菌 CAIM519 (GenBank: CP015864) 和哈维氏弧菌 DP1 (GenBank: KF607037) 相聚较近, 相似度为 100%; 用 *fitZ* 进行系统进化树分析结果显示, PvL-1 与广西患病凡纳滨对虾坎氏弧菌分离株 20130629003S01 (NCBI No.: CP020076) 聚为一支, 相似性为 99.31%; *gapA* 序列与深圳患病斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 坎氏弧菌分离株 CAIM3 (NCBI No.: F596552) 聚为一支, 相似性为 98.89%; *fitZ* 和 *gapA* 序列均与哈维氏弧菌

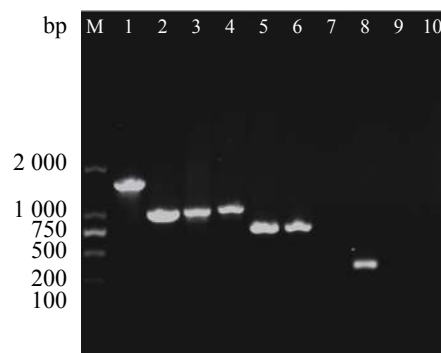


图 1 PvL-1 管家基因 PCR 扩增结果

M. Marker; 1. 16S *rRNA*; 2. *fitZ*; 3. *gapA*; 4. *mreB*; 5. *topA*; 6. *rpoD*; 7. 阴性对照; 8. 轮虫弧菌; 9. 哈维氏弧菌; 10. 坎氏弧菌

Fig. 1 PCR amplification results of housekeeping genes of PvL-1

M. Marker; 1. 16S *rRNA*; 2. *fitZ*; 3. *gapA*; 4. *mreB*; 5. *topA*; 6. *rpoD*; 7. negative control; 8. *V. rotiferianus* (VR6); 9. *V. harveyi* (VH8); 10. *V. campbellii*

聚为不同支 (图 2)。

根据生理生化鉴定、管家基因进化树分析,

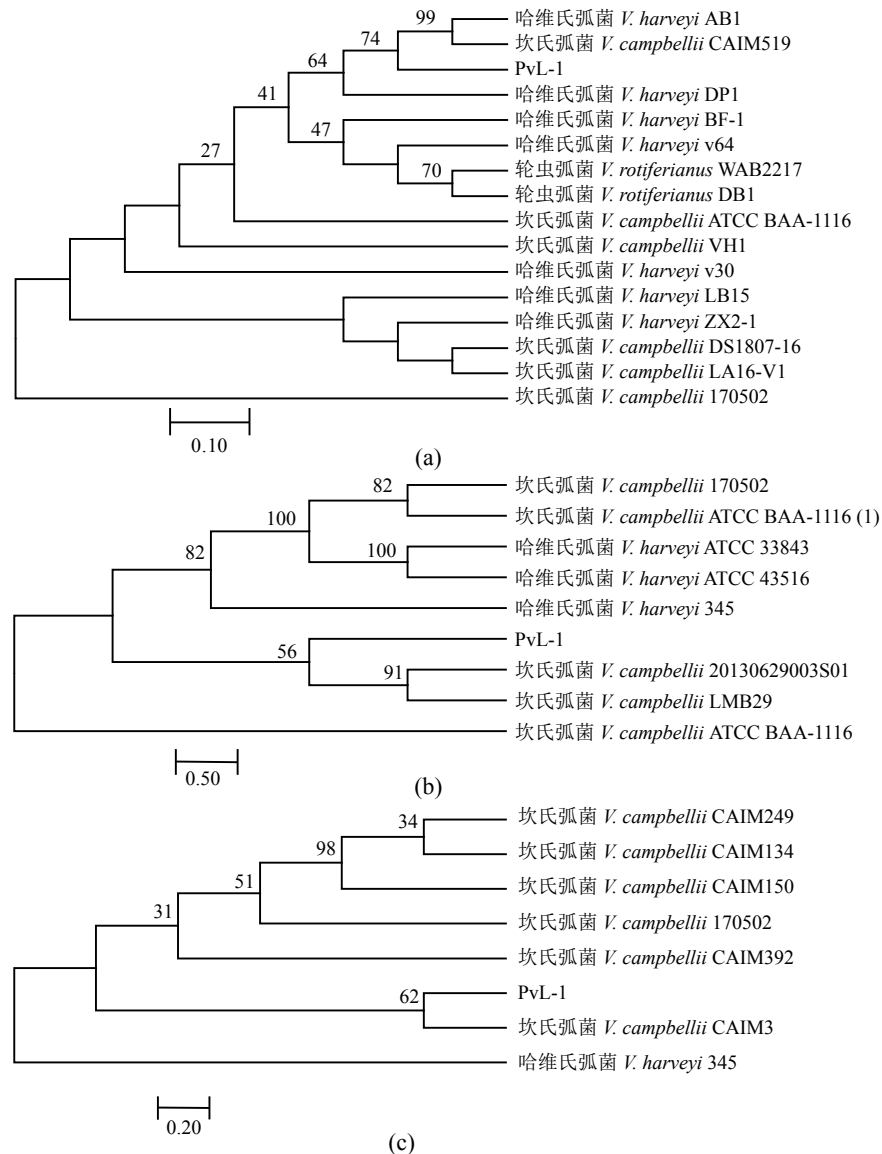


图 2 菌株 PvL-1 系统发育树分析

(a) 16S *rRNA*, (b) *fitZ*, (c) *gapA*; GenBank 基因登录号: (a) 哈维氏弧菌 AB1(KF607036), 坎氏弧菌 CAIM519(CP015864), 哈维氏弧菌 DP1(KF607037), 哈维氏弧菌 BF-1(KT428053), 哈维氏弧菌 v64(KJ508003), 轮虫弧菌 WAB2217(MH169265), 轮虫弧菌 DB1(KC756840), 坎氏弧菌 ATCC BAA-1116(CP000789), 坎氏弧菌 VH1(JX442511), 哈维氏弧菌 v30(KJ508002), 哈维氏弧菌 LB15(DQ146938), 哈维氏弧菌 ZX2-1(KY985238), 坎氏弧菌 DS1807-16(MT269596), 坎氏弧菌 LA16-V1(CP021145), 坎氏弧菌 170502(CP033134); (b) CP019293(坎氏弧菌 LMB29), CP025537(哈维氏弧菌 345), CP020076(坎氏弧菌 20130629003S01), CP006605(坎氏弧菌 ATCC BAA-1116), CP000789(坎氏弧菌 ATCC BAA-1116(1)), CP033134(坎氏弧菌 170502), CP009467(哈维氏弧菌 ATCC 33843), CP014038(哈维氏弧菌 ATCC 43516); (c) EF596546(坎氏弧菌 CAIM134), EF596558(坎氏弧菌 CAIM150), EF596552(坎氏弧菌 CAIM3), EF596551(坎氏弧菌 CAIM249), CP033134(坎氏弧菌 170502), EF596559(坎氏弧菌 CAIM392), CP025537(哈维氏弧菌 345)

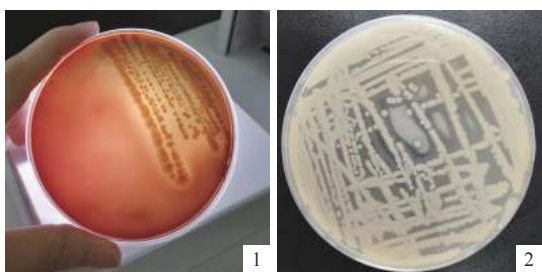
Fig. 2 Phylogenetic tree and analysis of PvL-1

(a) 16S *rRNA*; (b) *fitZ*; (c) *gapA*; GenBank accession number (a) KF607036(*V. harveyi* AB1), CP015864(*V. campbellii* CAIM519), *V. harveyi* DP1(KF607037), *V. harveyi* BF-1(KT428053), *V. harveyi* v64 (KJ508003), *V. rotiferianus* WAB2217(MH169265), *V. rotiferianus* DB1 (KC756840), *V. campbellii* ATCC BAA-1116 (CP000789), *V. campbellii* VH1 (JX442511), *V. harveyi* v30 (KJ508002), *V. harveyi* LB15 (DQ146938), *V. harveyi* ZX2-1 (KY985238), *V. campbellii* DS1807-16 (MT269596), *V. campbellii* LA16-V1 (CP021145), *V. campbellii* 170502 (CP033134); (b) CP019293 (*V. campbellii* LMB29), CP025537 (*V. harveyi* 345), CP020076 (*V. campbellii* 20130629003S01), CP006605 (*V. campbellii* ATCC BAA-1116), CP000789 (*V. campbellii* ATCC BAA-1116 (1)), CP033134 (*V. campbellii* 170502), CP009467 (*V. harveyi* ATCC 33843), CP014038 (*V. harveyi* ATCC 43516); (c) EF596546 (*V. campbellii* CAIM134), EF596558 (*V. campbellii* CAIM150), EF596552 (*V. campbellii* CAIM3), EF596551 (*V. campbellii* CAIM249), CP033134 (*V. campbellii* 170502), EF596559 (*V. campbellii* CAIM392), CP025537 (*V. harveyi* 345)

PvL-1 为坎氏弧菌, 与凡纳滨对虾坎氏弧菌 CP 020076 等分离株聚为一支, 与水生动物哈维氏弧菌分离株相聚较远, 由此判定 PVL-1 为坎氏弧菌的成员。

2.6 菌株 PvL-1 的溶血性和胞外蛋白酶活性

PvL-1 菌落在羊血平板上生长良好, 呈灰白色、湿润, 周围稍透明, 出现明显的 β 溶血 (图版 III-1), 表明该菌株存在胞外蛋白酶和溶血活性; 在脱脂奶粉培养基上生长良好, 呈乳白色、圆形菌落, 菌落周围出现明显的透明圈 (图版 III-2)。



图版 III 坎氏弧菌溶血性和胞外酶结果

1. 血平板; 2. 牛奶平板

Plate III *V. campbellii* extracellular enzyme and hemolytic results

1. blood plate; 2. milk plate

2.7 分离株毒力基因的检测

分离菌株 PvL-1 的毒力基因检测结果显示, *Pir* 毒力基因 (*PirA/PirB*) 为阴性, 而急性肝胰腺坏死病基因 (*AP4*)、溶血素基因 (*vcAhHly*)、热不稳定溶血毒素基因 (*TLH*)、鞭毛基因 (*flaC*)、毒力启动因子基因 (*esrB*)、杀伤因子基因 (*mukF*)、抵抗因子超氧化物歧化酶基因 (*sodB*) 和羟基乙酰谷胱甘肽水解酶基因 (*gloB*) 均为阳性 (图 3)。NCBI 数据库序列比对分析结果显示, *vcAhHly* 和 *TLH* 与墨西哥分离的坎氏弧菌 CAIM416 (NCBI No.: DQ 434996) 相似度分别高达 99.53% 和 99.48%; *esrB* 与美国养殖凡纳滨对虾分离到的坎氏弧菌 LA16-VI (NCBI No.: CP021146) 相似性为 96.91%; *mukF* 与孟加拉湾分离到的坎氏弧菌 BoB-90 (NCBI No.: CP026315) 相似性为 97.68%; *sodB* 与患 AHPND 的凡纳滨对虾坎氏弧菌中国分离株 170502 (NCBI No.: CP033134) 相似性高达 98.79%; *gloB* 与夏威夷分离到的坎氏弧菌 CAIM 519 (NCBI No.: CP015863) 相似性为 98.77%。

2.8 组织病理观察分析

取 PvL-1 人工感染后濒死虾肝胰腺, 经 Davidson 氏液固定、切片和 H.E 染色后观察。正

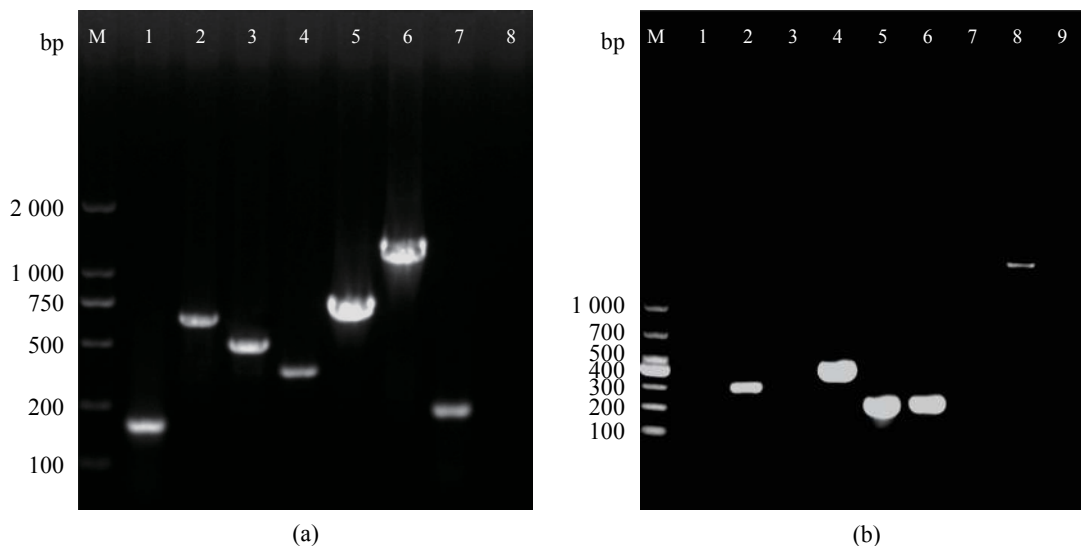


图 3 PvL-1 的 7 种毒力基因 (a) 和 4 种急性肝胰腺坏死病相关基因 (b) PCR 扩增结果

(a) 1. *TLH*, 2. *vcAhHly*, 3. *sodB*, 4. *esrB*, 5. *gloB*, 6. *mukF*, 7. *flaC*, 8. 阴性; (b) 1. 坎氏弧菌 *pirA*, 2. 副溶血弧菌 *pirA*, 3. 坎氏弧菌 *pirB*, 4. 副溶血弧菌 *pirB*, 5. 坎氏弧菌 *AP4*, 6. 副溶血弧菌 *AP4*, 7. 坎氏弧菌 *AP3*, 8. 副溶血弧菌 *AP3*, 9. 阴性

Fig. 3 PCR amplification of the seven virulence genes (a) and four AHPND genes (b) of PvL-1

(a) 1. *TLH*, 2. *vcAhHly*, 3. *sodB*, 4. *esrB*, 5. *gloB*, 6. *mukF*, 7. *flaC*, 8. negative; (b) 1. *V. campbellii pirA*, 2. *V. parahaemolyticus pirA*, 3. *V. campbellii pirB*, 4. *V. parahaemolyticus pirB*, 5. *V. campbellii AP4*, 6. *V. parahaemolyticus AP4*, 7. *V. campbellii AP3*, 8. *V. parahaemolyticus AP3*, 9. negative

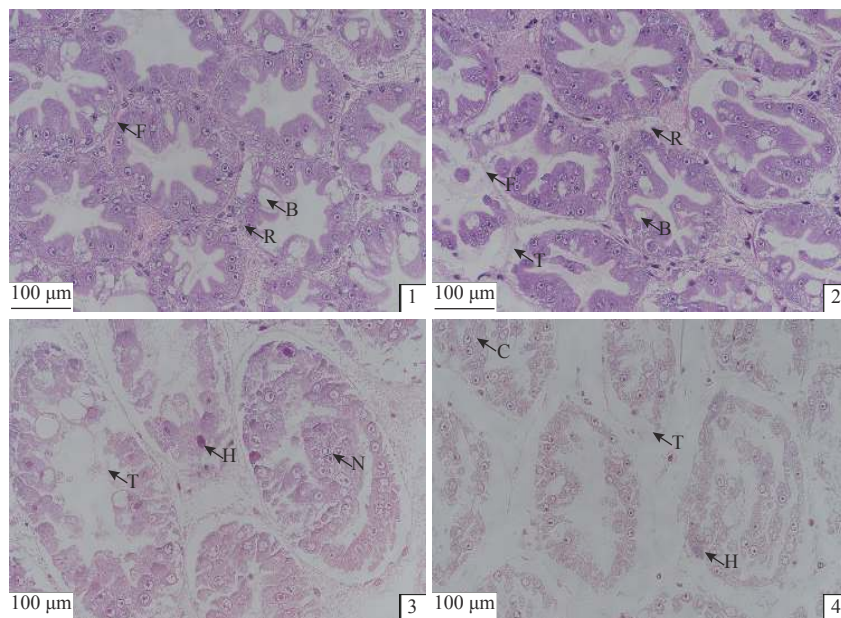
常凡纳滨对虾肝胰腺小管上皮细胞结构完整, 泡状细胞 (blister cell, B 细胞)、纤维细胞 (fibrillar cell, F 细胞) 和吸收细胞 (resorptive cell, R 细胞) 等功能性细胞清晰可见, R 细胞内脂肪颗粒明显, 肝胰腺小管间无血淋巴细胞浸润 (图版 IV-1); 用坎氏弧菌 PvL-1 攻毒后早期 (攻毒 2 d), 凡纳滨对虾肝胰腺细胞间隙变大, 肝胰腺小管变薄、细胞开始脱落、上皮细胞层遭到破坏, B 细胞和 R 细胞依然可见 (图版 IV-2); 攻毒 3 d 后, 肝胰腺小管可见明显的血细胞浸润、上皮细胞脱落, 细胞结构完全破坏和崩解, B 细胞和 R 细胞等功能细胞无法分辨, 部分肝胰腺小管被浸润, 血淋巴细胞围绕形成结节, 小管间可观察到细菌 (图版 IV-3), 与养殖池自然发生发光菌的凡纳滨对虾肝胰腺病变症状相同 (图版 IV-4)。

3 讨论

坎氏弧菌在海洋中分布广泛, 由于与轮虫弧菌、欧文氏弧菌 (*V. owens*) 及哈维氏弧菌性状极为接近, 分类上将其归为哈维氏弧菌群^[30]。坎氏弧菌曾被认为是无致病性、非发光弧菌^[10], 不

同菌株间的毒力强弱及致病性差异很大^[31], 有学者认为以往坎氏弧菌可能被错误地鉴定为哈维氏弧菌^[32-33]。本实验采用 16S *rRNA* 和 *gyrB* 序列鉴定分离的 PvL-1, 发现与哈维氏弧菌相似度 >99%。为进一步确认分类结果, 实验通过保守性较强、对近缘弧菌种有更高分辨率的 *gapA*、*fitZ* 等基因进行序列比对, 发现 *gapA* 和 *fitZ* 的系统进化树坎氏弧菌聚为一支, 相似度 >98%, 而与哈维氏弧菌形成独立的 2 支, 表明这 2 个基因可有效区分坎氏弧菌和哈维氏弧菌。坎氏弧菌种特异性引物可用于从哈维氏弧菌群中快速鉴定出坎氏弧菌。

毒力因子在弧菌对水生动物的致病性、宿主组织和细胞损伤中起重要作用^[34-36]。鞭毛蛋白与菌株毒力密切相关, 可协助细菌入侵、参与致病过程^[37]; 溶血素是弧菌和其他病原菌的重要外毒素和致病因子, 可导致红细胞膜破裂^[38-39], 引起鱼、贝、虾等出血性败血症^[12]; TLH 具磷脂酶 B 活性, 能导致细胞膜损伤^[40], 在弧菌感染中发挥致病作用^[41-42]。本次分离的坎氏弧菌 PvL-1 具有鞭毛基因、溶血素基因和 *esrB*、*mukF*、*sodB*、*gloB* 等毒力基因, 这些基因与近年来报道



图版 IV 坎氏弧菌 PvL-1 攻毒后凡纳滨对虾肝胰腺病理特征

1. 健康凡纳滨对虾; 2~3. 攻毒凡纳滨对虾; 4. 自然发病凡纳滨对虾; H.E 染色 40×; 箭头所示组织病变分别为 B. 泡状细胞; F. 纤维细胞; R. 吸收细胞; H. 血细胞浸润; N. 结节; T. 腺小管崩解; C. 弧菌样细菌

Plate IV Histopathological characteristics in hepatopancreas of *L. vannamei* challenged with *V. campbellii* PvL-1

1. healthy *L. vannamei*; 2-3. *L. vannamei* challenged with PvL-1; 4. naturally morbid *L. vannamei*; H.E staining 40×; arrow shows: B. blister cell; F. fibrillar cell; R. resorptive cell; H. hemocytic infiltration; N. nodule; T. tubules sloughing; C. *Vibrio*-like bacteria

的病虾分离坎氏弧菌相应毒力基因的相似性均在 96.9% 以上, 是近年来对虾坎氏弧菌的主要致病基因。本研究分离的坎氏弧菌 PvL-1 对健康凡纳滨对虾的 LD₅₀ 为 2.94×10⁴ CFU/尾, 毒力高于凡纳滨对虾发光病虾苗分离株 (虾苗 LD₅₀ 1.55×10⁶ CFU/尾和幼虾 LD₅₀ 1.7×10⁶ CFU/尾)^[14], 但略低于副溶血弧菌对凡纳滨对虾的 LD₅₀ 7.96×10³ CFU/尾^[43]。

将本实验分离的坎氏弧菌 PvL-1 注射凡纳滨对虾, 濒死虾病理切片可观察到肝胰腺细胞脱落、小管上皮细胞崩解、血细胞浸润、B 细胞、R 细胞和 F 细胞等功能细胞无法分辨等特征性病理变化, 与副溶血弧菌引起的急性肝胰腺坏死病有类似的病理特征, 可能是坎氏弧菌的毒力基因共同作用的结果。近年来也有关于坎氏弧菌引起凡纳滨对虾 AHPND 的报道, 病虾表现出典型的急性肝胰腺小管上皮细胞脱落的病理现象, 并从中检测到 *PirA/PirB*^[16]。本实验分离的坎氏弧菌 PvL-1 对凡纳滨对虾有较强的毒力, *AP4* 检测为阳性, 但 *AP3*、*PirA/PirB* 检测均为阴性。近年来先后发现了副溶血弧菌、哈维氏弧菌等其他弧菌引起的 AHPND, 最新研究表明, 不同弧菌引起的凡纳滨对虾 AHPND, 虽然症状相似, 但引起 AHPND 的毒力基因所属质粒表现出较大区别, 如副溶血弧菌的 *Pir* 其质粒为 pVA, 而哈维氏弧菌则为 pVH, 目前坎氏弧菌 *Pir* 的质粒还未明确^[17]。本课题组分析了 7 株不同坎氏弧菌分离株的 *Pir* 序列 (GenBank: MH890610、CP033136、CP020078、CP021148、MH152522、MH152521 和 MH152520), 发现坎氏弧菌与副溶血弧菌的 *Pir* 其同源性低于 75%, 而坎氏弧菌间的 *Pir* 同源性也低于 80%。引起宿主急性肝胰腺坏死病的坎氏弧菌, 其毒力基因和相关质粒有待于进一步研究。

参考文献 (References):

- [1] Wang Z, Yan C, Yan Y, *et al.* Integrated assessment of biomarker responses in caged shrimps (*Litopenaeus vannamei*) exposed to complex contaminants from the Maluan Bay of China[J]. *Ecotoxicology*, 2012, 21(3): 869-881.
- [2] 俞开康, 战文斌, 周丽, 等. 我国沿海养殖对虾的疾病及研究现状[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2000, 39(S1): 1-5.
- [3] 陈信忠, 郭书林, 龚艳清, 等. 对虾急性肝胰腺坏死综合征病原研究进展[J]. 检验检疫学刊, 2016, 26(1): 72-76.
- Chen X Z, Guo S L, Gong Y Q, *et al.* Progress of pathogen for acute hepatopancreas necrosis syndrome[J]. *Journal of Inspection and Quarantine*, 2016, 26(1): 72-76(in Chinese).
- [4] 丁慧昕, 施慧, 谢建军, 等. 虾肝肠胞虫(EHP)在凡纳滨对虾养殖水环境中的分布情况及传播途径初步研究[J]. 浙江海洋大学学报(自然科学版), 2018, 37(1): 14-19.
- Ding H X, Shi H, Xie J J, *et al.* Preliminary study on distribution and transmission ways of *Enterocytozoo hepatopenaei* in *Litopenaeus vannamei*'s culture environment[J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science Edition)*, 2018, 37(1): 14-19(in Chinese).
- [5] 邱亮. 养殖对虾的病毒宏基因组分析及虾血细胞虹彩病毒 (shrimp hemocyte iridescent virus, SHIV) 的分子流行病学研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.
- Qiu L. Viral metagenomics analysis of farmed shrimp and molecular epidemiological study of shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2018 (in Chinese).
- [6] 王筱珊, 胡智博, 费荣梅. 江苏地区对虾3种病毒病的流行病学调查及5株IHNV的编码区基因序列分析[J]. 水产学报, 2017, 41(10): 1623-1630.
- Wang X S, Hu Z B, Fei R M. Prevalence of three viruses in Pacific white leg shrimp in Jiangsu Province and the analysis of coding sequence of five strains of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(10): 1623-1630(in Chinese).
- [7] 胡超群, 陶保华. 综述: 对虾弧菌病及其免疫预防的研究进展[J]. 热带海洋, 2000, 19(3): 84-94.
- Hu C Q, Tao B H. Penaeid shrimp vibriosis and immune prevention: a review[J]. *Tropic Oceanology*, 2000, 19(3): 84-94(in Chinese).
- [8] Haldar S, Neogi S B, Kogure K, *et al.* Development of a haemolysin gene-based multiplex PCR for simultaneous detection of *Vibrio campbellii*, *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Letters in Applied Microbiology*,

- 2010, 50(2): 146-152.
- [9] De La Peña L D, Lavilla-Pitogo C R, Paner M G. Luminescent vibrios associated with mortality in pond-cultured shrimp *Penaeus monodon* in the Philippines: species composition[J]. *Fish Pathology*, 2001, 36(3): 133-138.
- [10] Lin B C, Wang Z, Malanoski A P, *et al.* Comparative genomic analyses identify the *Vibrio harveyi* genome sequenced strains BAA-1116 and HY01 as *Vibrio campbellii*[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2010, 2(1): 81-89.
- [11] 沈晓盛, 蔡友琼, 房文红, 等. 养殖牡蛎体内检出坎氏弧菌的鉴定[J]. *微生物学报*, 2005, 045(002): 177-180.
- Shen X S, Cai Y Q, Fang W H, *et al.* Identification of *Vibrio campbellii* isolated from cultured Pacific oyster[J]. *Acta microbiologica Sinica*, 2005, 045(002): 177-180(in Chinese).
- [12] Thompson F L, Iida T, Swings J. Biodiversity of vibrios[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68(3): 403-431.
- [13] Liu J X, Zhao Z, Deng Y Q, *et al.* Complete genome sequence of *Vibrio campbellii* LMB 29 isolated from red drum with four native megaplasmids[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2035.
- [14] Wang L P, Chen Y W, Huang H, *et al.* Isolation and identification of *Vibrio campbellii* as a bacterial pathogen for luminous vibriosis of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Aquaculture Research*, 2015, 46(2): 395-404.
- [15] 孙婧, 孙铂光, 贾爱荣, 等. 坎氏弧菌热不稳定溶血素基因的克隆表达、蛋白纯化及其活性[J]. *中国水产科学*, 2010, 17(4): 745-752.
- Sun J, Sun B G, Jia A R, *et al.* Expression, purification and characterization of *Vibrio campbellii* hemolysin (TLH)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(4): 745-752(in Chinese).
- [16] Dong X, Wang H L, Xie G S, *et al.* An isolate of *Vibrio campbellii* carrying the *pir^{VP}* gene causes acute hepatopancreatic necrosis disease[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2017, 6(1): e2.
- [17] Wangman P, Longyant S, Taengchaiyaphum S, *et al.* PirA & B toxins discovered in archived shrimp pathogenic *Vibrio campbellii* isolated long before EMS/AHPND outbreaks[J]. *Aquaculture*, 2018, 497: 494-502.
- [18] 孟庆珍, 尹飞, 傅超英, 等. 养殖中华鳖蜡样芽孢杆菌的分离、鉴定和致病性研究[J]. *水生生物学报*, 2019, 43(3): 570-578.
- Meng Q Z, Yin F, Fu C Y, *et al.* Isolation, identification and pathogenicity analysis of *Bacillus cereus* from Chinese soft-shelled turtles, *Pelodiscus sinensis*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(3): 570-578(in Chinese).
- [19] 赵玉琼, 李瑞生, 陈华. 三种固定液对大、小鼠肠道组织石蜡切片质量的影响[J]. *中国比较医学杂志*, 2014(11): 53-56.
- Zhao Y Q, Li R S, Chen H. Comparison on rat and mice intestine slides' quality fixed with three different fixatives and embede by paraffin[J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2014(11): 53-56(in Chinese).
- [20] 贾春生. 利用SPSS软件计算杀虫剂的LC₅₀[J]. *应用昆虫学报*, 2006, 43(3): 414-417.
- Jia C S. Calculatiang the LC₅₀ of insecticides with software SPSS[J]. *Chinese Bulletin of Entomology*, 2006, 43(3): 414-417(in Chinese).
- [21] Pascual J, Macián M C, Arahal D R, *et al.* Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S *rRNA*, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB* and *toxR* genes[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(1): 154-165.
- [22] Bosshard P P, Santini Y, Grüter D, *et al.* Bacterial diversity and community composition in the chemocline of the meromictic alpine Lake Cadagno as revealed by 16S *rDNA* analysis[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, 31(2): 173-182.
- [23] 郑菲, 陈培琼, 王玉环. H.E染色在临床病理诊断中的应用研究[J]. *中外医疗*, 2016, 35(30): 552-553.
- Zheng F, Chen P Q, Wang Y H. Study on the application of H.E staining in the diagnosis of clinical pathology[J]. *China Foreign Medical Treatment*, 2016, 35(30): 552-553(in Chinese).
- [24] Yamada Y, Wakabayashi H. Identification of fish-pathogenic strains belonging to the genus *Edwardsiella* by sequence analysis of *sodB*[J]. *Fish Pathology*, 1999, 34(3): 145-150.
- [25] Tan Y P, Zheng J, Tung S L, *et al.* Role of type III secretion in *Edwardsiella tarda* virulence[J]. *Microbiology*, 2005, 151(7): 2301-2313.
- [26] 庞玲玲. 哈维氏弧菌毒力相关基因的筛查及快速检测技术研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007.
- Pang L L. Screening of virulence genes and establishment of rapid identification method of *Vibrio*

- harveyi*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2007 (in Chinese).
- [27] 韦存, 于鹏, 于明超, 等. 对虾养殖体系中细菌群体感应抑制菌株的筛选及其特性初步研究[J]. *南方水产科学*, 2018, 14(1): 27-34.
- Wei C, Yu P, Yu M C, *et al.* Preliminary study of screening and characteristics of strains with quorum sensing inhibition activity in shrimp culture environment[J]. *South China Fisheries Science*, 2018, 14(1): 27-34(in Chinese).
- [28] Han J E, Tang K F J, Tran L H, *et al.* *Photorhabdus* insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2015, 113(1): 33-40.
- [29] Dangtip S, Sirikharin R, Sanguanrut P, *et al.* AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Aquaculture Reports*, 2015, 2: 158-162.
- [30] Garrity G. Bergey's manual of systematic bacteriology volume 2: the proteobacteria[M]. 2nd ed. New York: Springer, 2005: 520-531.
- [31] Soto-Rodriguez S A, Roque A, Lizarraga-Partida M L, *et al.* Virulence of luminous vibrios to *Artemia franciscana* nauplii[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2003, 53(3): 231-240.
- [32] Thompson F L, Austin B, Swings J. The biology of vibrios[M]. Washington DC: ASM Press, 2006.
- [33] Thompson F L, Gomez-Gil B, Vasconcelos A T R, *et al.* Multilocus sequence analysis reveals that *Vibrio harveyi* and *V. campbellii* are distinct species[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(13): 4279-4285.
- [34] Austin B, Zhang X H. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2006, 43(2): 119-124.
- [35] Prasad S, Morris P C, Hansen R, *et al.* A novel bacteriocin-like substance (BLIS) from a pathogenic strain of *Vibrio harveyi*[J]. *Microbiology*, 2005, 151(9): 3051-3058.
- [36] Zhang X H, Austin B. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2000, 23(2): 93-102.
- [37] Millikan D S, Ruby E G. *Vibrio fischeri* flagellin A is essential for normal motility and for symbiotic competence during initial squid light organ colonization[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(13): 4315-4325.
- [38] Zhang X H, Austin B. Haemolysins in *Vibrio* species[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 98(5): 1011-1019.
- [39] Shinoda S. Protein toxins produced by pathogenic vibrios[J]. *Journal of Natural Toxins*, 1999, 8(2): 259-269.
- [40] Shinoda S, Matsuoka H, Tsuchie T, *et al.* Purification and characterization of a lecithin-dependent haemolysin from *Escherichia coli* transformed by a *Vibrio parahaemolyticus* gene[J]. *Microbiology*, 1991, 137(12): 2705-2711.
- [41] Sun B G, Zhang X H, Tang X X, *et al.* A single residue change in *Vibrio harveyi* hemolysin results in the loss of phospholipase and hemolytic activities and pathogenicity for turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(6): 2575-2579.
- [42] Wang R Z, Zhong Y F, Gu X S, *et al.* The pathogenesis, detection, and prevention of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 144.
- [43] 贾丹, 史成银, 黄捷, 等. 凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死病(AHPND)病原分离鉴定及其致病性分析[J]. *渔业科学进展*, 2018, 39(3): 103-111.
- Jia D, Shi C Y, Huang J, *et al.* Identification and pathogenicity analysis of bacterial pathogen associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in the pacific shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(3): 103-111(in Chinese).

Isolation, identification and pathogenicity analysis of luminous *Vibrio campbellii* from *Litopenaeus vannamei*

LI Jinjin¹, HONG Baohua¹, NI Sizhen¹, BAO Jiawei², MA Rongrong¹, YIN Fei¹,
HE Jie³, LUO Huaming³, LI Chen¹, HUANG Yuanming², QIAN Dong^{1*}

(1. School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Zhejiang Hongye Seafood Co., Ltd., Taizhou 317000, China;

3. Fisheries Technology Extension Center of Taizhou, Taizhou 317000, China)

Abstract: A serious disease occurred in cultured white-leg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in greenhouse pond of mariculture farm in Taizhou, Zhejiang Province, in 2019. The diseased *L. vannamei* showed corkscrew swimming, anorexia, slow growth, hepatopancreas discoloured, with a mortality rate of more than 80% in 2-3 days. To study the pathogenic mechanism of PvL-1 in *L. vannamei*, the bacteria were isolated from morbid *L. vannamei* with typical symptoms by using thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS) agar, with the light Green colony of 3-7 mm in diameter, luminous in dark and Gram negative rods. PvL-1 was identified as *Vibrio campbellii* with API20E biochemical bacteria identification, with similarity of 90% to reference strains CAIM249. PvL-1 belonged to the same cluster with *V. campbellii* CP020076 on phylogenetic analysis for *fitZ*, with 99.31% similarity to reference strains, and same cluster as *V. campbellii* EF596552, with 98.89% similarity to *gapA*. *V. campbellii* species-specific primers were used for PCR test, with 328 bp band for PvL-1 and negative for *V. rotiferianus* and *V. harveyi*. These results indicating that PvL-1 was a member of *V. campbellii*. PvL-1 can form typical β hemolysis on sheep blood agar and transparent circle on the milk agar, indicating the existence of hemolytic and extracellular protease toxin. Acute hepatopancreatic necrosis, hemolysin gene, flagellate gene and other virulence genes of PvL-1 were analyzed, indicating that PvL-1 has virulence genes such as *AP4*, *TLH*, *vcaHly*, *flaC*, *mukF*, *gloB*, *sodB* and *esrB*. The healthy *L. vannamei*, infected with *V. campbellii* PvL-1, died with the similar symptoms to naturally morbid *L. vannamei*, with LD₅₀ of 2.94×10⁴ CFU/ind. Histopathologic examination showed that PvL-1 challenged *L. vannamei* hepatopancreas showed tubular epithelial cells massive shed and sloughing, hemocytic infiltration etc., which was similar to the naturally morbid *L. vannamei*. In summary, the luminescent *V. campbellii* PvL-1 was isolated, with high pathogenicity, which expanded our cognition of the luminescent *V. campbellii* of *L. vannamei*.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; *Vibrio campbellii*; identification; pathogenicity

Corresponding author: QIAN Dong. E-mail: qiandong@nbu.edu.cn

Funding project: Key Research and Development Plan of Zhejiang Province (2020C02020)