

梁 健,高 山,李永仁,等. 方斑东风螺肿吻病致病菌分离及中草药对其的预防效果[J]. 江苏农业科学,2016,44(11):267-269.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.11.080

# 方斑东风螺肿吻病致病菌分离 及中草药对其的预防效果

梁 健,高 山,李永仁,郭永军,黄亚东,邢克智

(天津农学院水产学院/天津市水产生态及养殖重点实验室,天津 300384)

**摘要:**以患肿吻病的方斑东风螺为研究对象,进行致病菌的分离、纯化、DNA 测序、人工感染等基础试验,在此基础上,应用 1 种中草药混合剂对健康东风螺进行肿吻病预防研究。结果表明,方斑东风螺肿吻病病原菌为弗尼斯弧菌(*Vibrio furnissii*),其 96 h 半致死浓度为  $2 \times 10^8 \sim 4 \times 10^8$  CFU/mL;病原菌对于头孢菌素药物高度敏感;连续使用 20 mg/L 中草药对弗氏弧菌具有一定的效果,但效果不显著。

**关键词:**方斑东风螺;药敏试验;中草药

**中图分类号:** S944.4<sup>+</sup>9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)11-0267-03

方斑东风螺 [*Babylonia areolata* (Link)], 俗称花螺, 属腹足纲、新腹足目、蛾螺科。该螺生长速度快、喜高温, 食用价值较大, 另外其观赏价值很高, 很适合制作各种水族景观, 混合搭配其他景物可以美化造景。由于人工育苗及养殖技术的突破, 海南、广东、福建等地工厂化观赏养殖规模日益扩大, 尤其在海南省形成了较大的观赏养殖规模, 现有观赏养殖水池面积约 30 万 m<sup>2</sup>, 产值超过 2 亿元人民币<sup>[1-2]</sup>。随着方斑东风螺养殖产业的发展, 养殖密度越来越大, 养殖过程中各种病害也逐渐增多, 且日趋严重。已有聚缩虫、纤毛虫、桡足类和单孢子虫等寄生虫病报道<sup>[3-7]</sup>, 近年来出现比较严重的病害——吻管水肿病, 经常导致方斑东风螺大规模死亡<sup>[8]</sup>, 引起学者们深入研究。目前, 已报道引发该病的致病菌有哈维

弧菌 (*Vibrio harveyi*)<sup>[9-10]</sup>、副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)<sup>[11]</sup>、鳃弧菌生物变种 I (*Vibrio anguillarum* biovar I)<sup>[12]</sup> 等。这些研究主要集中在海南、广东等南方地区, 对于北方养殖的方斑东风螺患肿吻病尚无研究报道, 更无防治方法的研究。本研究以天津地区养殖场中患肿吻病的方斑东风螺为研究对象, 进行了病原菌鉴定及防治方法的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

2014 年, 天津市海升水产养殖有限公司的方斑东风螺养殖车间暴发肿吻病, 主要表现为吻管水肿、颜色发红, 吻管伸出后无法收缩回壳内, 无法摄食, 病螺停留在沙层表面无法下潜, 不久后死亡。本试验选取患病症状明显且基本一致的个体进行致病菌分离试验, 平均壳长为 (16.4 ± 0.8) mm。取其他正常的养殖池中健康个体作为受感染个体, 在试验室内暂养 3 d, 暂养期间无死亡, 养殖海水经沙滤并用二氧化氯 (1 mg/L) 消毒, 盐度 2.4‰ ~ 2.6‰, 温度 25 ~ 28 ℃。

### 1.2 致病菌的分离

取病螺外套膜、鳃和内脏团, 冰水中进行匀浆, 用灭菌海水稀释一定倍数后涂于 Zobell 2216E 培养基、胰酪大豆琼脂汤培养基 (TSA)、海洋弧菌选择性培养基 (TCBS) 上。28 ℃ 培养 24 h, 选取菌落形态特征较一致的优势菌群划线纯化, 直

收稿日期: 2015-11-09

基金项目: 天津市高等学校创新团队基金 (编号: TD12-5018); 天津市应用基础与前沿技术计划 (编号: 15JCYBJC30400); 天津市科技特派员项目 (编号: 14JCTPJ00521); 国家贝类产业技术体系建设专项 (编号: CARS-48)。

作者简介: 梁 健 (1988—), 男, 内蒙古扎兰屯人, 硕士, 助理实验师, 主要从事贝类遗传育种研究。Tel: (022) 23787855; E-mail: liangjian1230123@126.com。

通信作者: 邢克智, 教授。E-mail: kzxing8886@126.com。

[7] Fang L S, Chiou S F. Effect of salinity on the activities of digestive protease from the tilapia fish, *Oreochromis niloticus*, in different culture environments [J]. Comp Biochem Physiol, 1989, 93 (2): 439-443.

[8] 李大勇, 何大仁, 刘晓春. 光照对真鲷仔稚鱼摄食的影响 [J]. 台湾海峡, 1994, 13(1): 26-31.

[9] 刘宇航, 陈国柱, 林小涛. 不同光照条件下叉尾斗鱼仔鱼摄食节律 [J]. 生态学杂志, 2010, 29(6): 1161-1166.

[10] 乔志刚, 张国梁, 张英英, 等. 不同光照周期下鲈幼鱼的日摄食节律 [J]. 水产科学, 2008, 27(10): 511-515.

[11] 王重刚, 陈品健, 郑森林. 真鲷幼鱼消化酶活性的昼夜变化 [J].

水产学报, 1999, 23(2): 199-201.

[12] 于 娜, 李加儿, 区又君, 等. 盐度胁迫及昼夜变化对鲮鱼幼鱼消化酶活力的影响 [J]. 南方水产科学, 2011, 7(6): 52-57.

[13] Squires E J, Haard N F, Feltham L A. Gastric proteases of the greenland cod gadus ogac. II. Structural properties [J]. Biochemistry and Cell Biology, 1986, 64(3): 215-222.

[14] Sánchez - Chiang L, Cisternas E, Ponce O. Partial purification of pepsins from adult and juvenile salmon fish *Oncorhynchus keta*. Effect of NaCl on proteolytic activities [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1987, 87(4): 793-797.

到培养基上出现单菌落后,接种于斜面培养基待用。

1.3 人工感染试验

分离出 A、B 2 株细菌,进行人工感染试验。设置 A、B 菌液浓度为  $3 \times 10^8$ 、 $3 \times 10^7$ 、 $3 \times 10^6$  CFU/mL,采用肌肉注射方式,注射到健康螺腹足基部,注射量为 50  $\mu$ L/个,建立 A、B 2 个试验组,每个试验组注射 10 个螺,每组设 3 个平行,并设对照组(注射生理盐水)。注射后不投饵养殖,观察 96 h 内累计死亡量并做记录。

1.4 致病菌的基因测序和分析

对 A、B 这 2 个菌株 16S rDNA 进行测序,测序结果在 NCBI 上进行 Blast 比对分析。

1.5 药敏试验

采用纸片扩散法(K-B 法)进行药物敏感性试验,每种药物设置 2 个重复,根据 NCCL 标准相关步骤和规定<sup>[13]</sup>进行试验。

1.6 不同浓度中草药混合制剂对东风螺抗病能力的影响

中草药混合制剂为当归、白芍、柴胡、泽泻、党参、黄芪等按一定比例混合,研磨制成粉末,用开水沏泡,将浸泡液投入 20 L 塑料箱中(箱底铺沙,放健康螺 50 个/箱),设置成中草药浓度为 5、10、15、20 mg/L 的 4 个试验组,每组设 3 个重复,并设对照组。每 3 d 施药 1 次,施药 24 h 后换水,连续饲养 30 d,期间正常投喂饵料。30 d 后每组取 10 个个体,根据人工感染试验确定的 A、B 这 2 个菌株的半致死浓度进行致病菌感染试验,注射剂量为 50  $\mu$ L/个,记录各试验组 96 h 后死亡个数。

2 结果与分析

2.1 患病个体临床表现

患病的方斑东风螺首先表现出活动缓慢,摄食量减少或停止摄食,螺停留在沙层表面而无法潜入沙中,吻管伸出体外,颜色发红、肿胀,无法收缩回壳内,严重时腹足也出现肿胀并无法缩回壳中,吻管内会有白色液体出现,对外界刺激没有反应(图 1)。不久后死亡腐烂、气味恶臭、破坏水质,并且传染速度较快,若不进行治疗和预防,很快全池都会发病。本病且有发病时间短、传染力强、致死率高等特点,严重危害方斑东风螺的养殖发展。

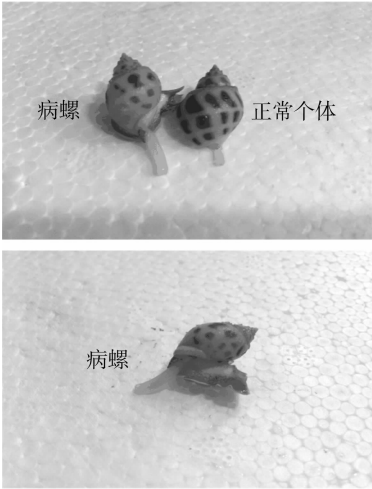


图1 患病方斑东风螺

2.2 致病菌的分离纯化

病螺组织匀浆液于 Zobell 2216E 培养基中分离得到 2 株优势细菌,分别命名为 A、B 菌株,优势强度 A > B。在 TSB 培养基上 28  $^{\circ}$ C 培养 24 h 后,菌落淡黄色、圆形,边缘规则且整齐,表面光滑、湿润并微微凸起,整个菌落不透明,直径 1.2~2.5 mm。在 TCBS 培养基上 28  $^{\circ}$ C 培养 24 h 后,菌落呈现黄色、圆形,边缘规则整齐,表面光滑、湿润、中央微微凸起,菌落不透明,直径 2.0~3.2 mm。

2.3 致病菌的基因测序和分析结果

经 NCBI 上进行 Blast 比对,A、B 菌株均与弗尼斯弧菌 NCTC 11218 菌株(GenBank 序列号为 CP 002377.1)的同源性为 99%。

2.4 人工感染试验

由人工感染试验结果(图 1)可见,A、B 菌株注射浓度为  $3 \times 10^8$  CFU/mL 时,累计死亡率分别为 40%、50%,并随着菌液浓度的降低,死亡率也降低,注射生理盐水对照组的累计死亡率为 0。通过 SPSS 17.0 线性回归方程分析得出 A 菌株的 96 h 半致死浓度为  $3.93 \times 10^8$  CFU/mL, B 菌株为  $2.19 \times 10^8$  CFU/mL(表 1)。

表 1 人工感染试验结果

菌株编号	注射浓度 (CFU/mL)	96 h 累计死亡率 (%)	半致死浓度 (CFU/mL)
A	$3 \times 10^8$	40	$3.93 \times 10^8$
	$3 \times 10^7$	30	
	$3 \times 10^6$	0	
B	$3 \times 10^8$	50	$2.19 \times 10^8$
	$3 \times 10^7$	30	
	$3 \times 10^6$	0	
生理盐水	0.9%	0	

对感染后死亡的病螺进行致病菌的再分离,得到单一的优势菌,菌落形态与之前分离的一致,菌株重新鉴定,结果与受试菌株为同一菌株。

2.5 药敏试验结果

由表 2 可知,病螺提取的 A、B 病原菌对于头孢菌素、环丙沙星、庆大霉素、氯霉素、新霉素、呋喃唑酮等药物敏感,特别是头孢菌素对其具有较高的抑制作用。而对氨苄西林、林可霉素、萘啶酸、磺胺嘧啶等药物具有耐药性。

表 2 药敏试验结果

药物	抑菌圈大小(cm)		抑制作用	
	A 菌株平均值	B 菌株平均值	A 菌株	B 菌株
头孢菌素	1.64	1.68	高敏	高敏
环丙沙星	1.35	1.33	中敏	中敏
庆大霉素	1.28	1.28	中敏	中敏
氯霉素	1.30	1.29	中敏	中敏
新霉素	1.27	1.27	中敏	中敏
呋喃唑酮	1.21	1.20	中敏	中敏
氨苄西林	—	—	耐药	耐药
林可霉素	—	—	耐药	耐药
萘啶酸	—	—	耐药	耐药
磺胺嘧啶	—	—	耐药	耐药

2.6 中草药对东风螺抗病能力的影响

由表 3 可知,人工感染 A 菌株的试验中,施用中草药

20 mg/L 的试验组 96 h 后死亡率为 36.67%, 较其他浓度组略微偏低, 但各组之间并无明显差异。

表 3 中草药对方斑东风螺肿吻病预防效果

菌株	中药浓度 (mg/L)	注射浓度 (CFU/mL)	受试个体数 (个)	死亡数 (个)	死亡率 (%)
A	0	$4 \times 10^8$	30	13	43.33
	5	$4 \times 10^8$	30	12	40.00
	10	$4 \times 10^8$	30	13	43.33
	15	$4 \times 10^8$	30	15	50.00
	20	$4 \times 10^8$	30	11	36.67
B	0	$2 \times 10^8$	30	14	46.67
	5	$2 \times 10^8$	30	14	43.67
	10	$2 \times 10^8$	30	12	40.00
	15	$2 \times 10^8$	30	13	43.33
	20	$2 \times 10^8$	30	12	40.00
生理盐水	0	0.9%	30	0	0.00

### 3 讨论

#### 3.1 方斑东风螺肿吻病的病原

对东风螺肿吻病病原的研究已有报道, 黄郁葱等研究发现湛江南山岛某东风螺养殖场出现的肿吻病致病菌为哈维氏弧菌<sup>[10]</sup>; 王江勇等从海南省万宁市山根镇某工厂化东风螺养殖场暴发的肿吻病病螺体内, 分离出的致病菌也为哈维氏弧菌<sup>[9]</sup>; 本试验所分离出的致病菌为弗氏弧菌, 与哈维氏弧菌同为弧菌类细菌。这可能是由南北方地理位置和环境气候差异导致的。地理隔离和环境差异会导致致病菌的种类发生一定变化, 即使同一地区致病菌也会出现不同, 例如张新中等从海南某养殖场患肿吻病的螺体中分离的致病菌鉴定为鳃弧菌生物变种 (*V. anguillarum biovar I*)<sup>[12]</sup>。

#### 3.2 东风螺肿吻病的治疗措施

弧菌类细菌是海水养殖的主要病原菌<sup>[14]</sup>, 可感染杂色鲍 (*Haliotis diversicolor*)<sup>[15]</sup>、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)<sup>[16]</sup>、凡纳滨对虾 (*Penaeus vannamei*)<sup>[4]</sup>、大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*)<sup>[18]</sup> 等。弧菌侵染水产动物的主要方式是通过皮肤、消化道等器官的伤口或直接进行感染<sup>[19-20]</sup>。养殖过程中出现肿吻病没有任何前兆, 若白天有部分螺体停留在沙层表面不潜入沙中, 则 2~3 d 后沙层表面会有大量螺体出现, 且行动缓慢、吻管伸出、对外界刺激不作反应, 3~5 d 后开始死亡。由此可见, 该病可以通过接触途径直接传播, 且传播迅速。本试验对致病菌的药敏试验结果显示, 头孢菌素对弗氏弧菌具有较强的抑制作用, 而其对磺胺类药物具有一定的耐药性。这说明弗氏弧菌只对部分抗生素敏感, 因此在以后的生产过程中, 应选用头孢菌素这类对弧菌具有良好抑制作用的药物, 防止滥用药物而导致致病菌出现抗药性, 以及破坏养殖水体中的微生态环境。

#### 3.3 东风螺肿吻病的预防措施

以当归、白芍、柴胡、泽泻、党参、黄芪等中草药按一定比例混合并研磨制成粉末, 试验其对东风螺肿吻病预防效果。与对照组相比, 不同施药浓度对人工感染后的死亡率影响不大, 但在 20 mg/L 施用浓度下, 感染 A、B 这 2 个菌株的东风螺的累计死亡率均为最低, 对弗氏弧菌引起的肿吻病具有一

定的效果, 但不显著。通过调整中草药种类、配伍比例, 有望开发出有效提高方斑东风螺对肿吻病抵抗力的药物, 为东风螺在北方的养殖推广提供一定帮助。

#### 参考文献:

- [1] 董杨海, 符书源, 王国福. 海南省方斑东风螺养殖业的发展及其前景展望[J]. 科学养鱼, 2011(12): 39-40.
- [2] 陈利雄, 吴进锋. 东风螺的增养殖技术及产业化前景[J]. 齐鲁渔业, 2004, 21(10): 9-11.
- [3] 郑养福. 方斑东风螺浮游期聚缩虫病的防治[J]. 福建水产, 2007(2): 48, 51.
- [4] 黄海立, 余德光. 方斑东风螺幼虫纤毛虫病的防治方法[J]. 科学养鱼, 2007(7): 56, 85.
- [5] 王建钢, 乔振国. 方斑东风螺肉壳分离病病因的初步研究[J]. 现代渔业信息, 2011, 26(10): 16-18.
- [6] 王建钢, 乔振国. 方斑东风螺脱壳病防治方法探讨[J]. 现代渔业信息, 2011, 26(11): 27-29.
- [7] 彭景书, 戈贤平, 李明, 等. 方斑东风螺单孢子虫病的研究[J]. 水生生物学报, 2011, 35(5): 803-807.
- [8] 冯永勤, 周永灿, 谢珍玉, 等. 方斑东风螺健康养殖技术研究[J]. 渔业现代化, 2008, 35(1): 39-41.
- [9] 王江勇, 孙秀秀, 王瑞旋, 等. 杂色鲍肌肉萎缩症病原菌的分离鉴定及系统发育分析[J]. 南方水产, 2010, 6(5): 21-26.
- [10] 黄郁葱, 简纪常, 吴灶和, 等. 方斑东风螺吻管水肿病病原菌的初步研究[J]. 渔业现代化, 2009, 36(4): 37-41.
- [11] 李淑芳, 邱德全, 张继东, 等. 脱壳病和吻肿病东风螺体内致病菌及条件致病菌菌相研究[J]. 海洋科学进展, 2013, 31(2): 266-272.
- [12] 张新中, 文万饶, 冯永勤, 等. 方斑东风螺肿吻症病原菌的分离鉴定及药敏分析[J]. 海洋科学, 2010, 34(5): 7-12.
- [13] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement [S]. CLSI document M100-S16 (ISBN 1-56238-588-7). Wayne, Pa, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.
- [14] 高玮, 金沁, 赵冉. 贝类产品中副溶血性弧菌的污染状况调查[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(2): 258-259.
- [15] Jiang Q R, Shi L Y, Ke C H, et al. Identification and characterization of vibrio harveyi associated with diseased abalone haliotis diversicolor [J]. Dis Aquat Org, 2013, 103(2): 133-139.
- [16] 梅冰, 周永灿, 徐先栋, 等. 斜带石斑鱼烂尾并病原菌的分离与鉴定[J]. 热带海洋学报, 2010, 29(6): 118-124.
- [17] 刘问, 钱冬, 杨国梁, 等. 南美白对虾虾苗淡化期间发光病原研究[J]. 集美大学学报: 自然科学版, 2004, 9(4): 300-304.
- [18] 王国良, 祝璟琳, 金珊, 等. 养殖大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 3 种致病弧菌的分子鉴定及其系统发育学分析研究[J]. 海洋湖沼, 2008, 39(2): 162-167.
- [19] 陈心, 马蓉, 张艺, 等. 2 种海洋弧菌的鉴定及人工感染大黄鱼病理分析[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(11): 251-253, 478.
- [20] Egidiuse. Vibriosis pathogenicity and pathology: a review [J]. Aquaculture, 1987, 67: 15-28.