

刘继晨,金晓杰,李明,等. 虾夷扇贝育苗阶段幼体细菌性病原的确定[J]. 海洋学研究, 2018,36(1):86-92, doi:10.3969/j.issn.1001-909X.2018.01.009.

LIU Ji-chen, JIN Xiao-jie, LI Ming, et al. Identification of bacterial infections associated with larval development of Yesso scallop [J]. Journal of Marine Sciences, 2018,36(1):86-92, doi:10.3969/j.issn.1001-909X.2018.01.009.

虾夷扇贝育苗阶段幼体细菌性病原的确定

刘继晨^{1,3}, 金晓杰^{*1}, 李明², 陈娟¹, 郭宗明¹, 马悦欣³

(1. 烟台南山学院 食品系, 山东 烟台 265713; 2. 獐子岛集团股份有限公司, 辽宁 大连 116001;

3. 大连海洋大学 农业部 北方海水增养殖重点实验室, 辽宁 大连 116023)

摘要:本研究确定了獐子岛集团虾夷扇贝 *Patinopecten yessoensis* 育苗过程中幼体大规模死亡的病原菌。采用 TCBS 培养基从患病幼体中分离弧菌, 其数量为 1.12×10^4 CFU/g, 以 V1 菌株和 V2 菌株为优势菌, 占总弧菌数的 64.3% 和 32.1%。用血琼脂平板测定 V1 菌株和 V2 菌株的溶血性, 2 株菌分别呈 β 溶血和 α 溶血。用 2 株菌分别感染扇贝幼体, 幼体的死亡率显著高于对照组 ($P < 0.05$), 症状与自然状态下的发病症状一致, 并且从感染死亡的幼体中分离到原感染菌株, 确定 V1 菌株和 V2 菌株是造成扇贝幼体大规模死亡的病原菌。对 2 株病原菌进行致病基因分析, 结果发现 V1 菌株含有胞外金属蛋白酶基因。经 16S rRNA 基因测序分析, V1 菌株 (GenBank 登录号 KR 232924) 和 V2 菌株 (GenBank 登录号 KR 232925) 与 *Vibrio splendidus* ctt 31/5 和 *Vibrio tasmaniensis* 007 的相似度分别为 99.9% 和 99.2%。用药敏纸片扩散法检测病原菌对常见抗生素的敏感性, 结果表明利福平、氟苯尼考和磺胺异恶唑均能有效抑制病原菌的生长。

关键词: 虾夷扇贝幼体; 细菌性病原; 灿烂弧菌; 塔斯马尼亚弧菌

中图分类号: S917.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-909X(2018)01-0086-07

Doi: 10.3969/j.issn.1001-909X.2018.01.009

0 引言

虾夷扇贝 *Patinopecten yessoensis* 是扇贝科 Peetiniidae, 虾夷扇贝属 *Patinopecten* 的优良品种。它自然分布在日本北部, 俄罗斯远东地区和朝鲜半岛北部, 为大型冷水性贝类, 具有生长快, 个体肥大, 味道鲜美, 经济价值高等特点。自从 20 世纪 80 年代被引入中国后, 它就成为中国北方主要的贝类养殖品种, 产量呈爆发式增长^[1]。但是, 该品种在育苗期间常会受到细菌性病原的感染而导致育苗失败, 很大程度上限制

了虾夷扇贝的发展。而弧菌是各种双壳贝类幼体和成体最主要的致病菌^[2-14], 在中国频发的弧菌病对虾夷扇贝养殖造成巨大的经济损失^[6]。国内外对双壳贝类病原的报道有很多, 但有关虾夷扇贝育苗过程中幼体病原的研究鲜有报道。2015 年 2 月虾夷扇贝育苗期间, 獐子岛集团育苗室虾夷扇贝幼体发生了大规模死亡现象, 根据以往经验推断是由弧菌感染引起的, 本研究分离并鉴定出了病原菌, 对虾夷扇贝育苗过程中疾病的预防及合理用药起到一定指导作用。

收稿日期: 2017-09-28

修回日期: 2017-12-29

基金项目: 国家科技支撑计划项目资助(2013BAD23B01); 獐子岛集团横向项目资助(99801214)

作者简介: 刘继晨(1989—), 男, 山东烟台人, 助教, 主要从事海洋微生物学研究。E-mail: liujichen789@126.com

* 通讯作者: 金晓杰(1989—), 女, 讲师, 主要从事海洋学研究。E-mail: 1271085337@qq.com

1 材料与方法

1.1 样品采集

2015年2月在獐子岛集团育苗室进行虾夷扇贝育苗,幼体在100 L塑料桶中静水充气饲养,密度为5~6个/mL,饲喂饵料为叉鞭金藻 *Dicrateria inornata* [(7~9) × 10⁵ cells/mL],每天投喂3次,每次100 mL。养殖水体每天更换一半,水温保持在15 ± 1℃,盐度32 ± 0.5。在受精后的第9天,壳顶幼体开始出现异常现象,表现为幼体纤毛脱落,瓣壳解体,失去游动能力,沉到水底死亡。疑似弧菌感染的症状。在受精后第10天,采集垂死的幼体样品于无菌离心管中。

1.2 优势菌的分离与纯化

将幼体样品用无菌海水过滤冲洗3次,离心(3 000 r/min, 10 min, 4℃)后称重,加入9倍无菌生理盐水,用可调速匀浆器研磨均匀。将匀浆液梯度稀释,取稀释液100 μL涂布2216E平板和TCBS平板(青岛海博生物技术有限公司),15℃培养3 d后观察菌落形态并计数。根据形态挑取优势菌落在2216E平板进行纯化,获得纯培养于2216E斜面4℃保存。从垂死幼体样品中分离出4株优势菌进行后续实验。

1.3 溶血实验

对4株优势菌进行溶血实验,挑取单菌落点种于哥伦比亚血琼脂平板(郑州安图绿科生物工程有限公司),15℃培养48 h后观察菌落周围是否出现溶血环。根据形成的溶血环来判断菌株的溶血类型^[15]。

1.4 人工感染实验

根据TORKILDSEN et al^[2]人工感染实验方法稍加修改。取受精后9 d的健康幼体于装有5 L灭菌海水的烧杯中,密度2~3个/mL。将培养过夜的潜在病原菌离心后用无菌海水冲洗3次然后加入烧杯中,使菌的最终浓度达到1 × 10⁶ cells/mL。每株菌做6个平行,对照组不加菌。采用与育苗时相同的温度(15 ± 1℃)充气培养48 h后用显微镜观察记录每组幼体死亡数并计算死亡率。数据用SPSS 21.0软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)以及Tukey多重比较,结果以平均值±标准差($\bar{X} \pm SD$)表示,当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

收集各组死亡幼体,按照方法1.2对幼体进行处理,研磨后涂布TCBS平板,对病原进行再分离。

1.5 病原菌的16S rRNA基因序列分析

1.5.1 细菌基因组DNA的提取、PCR扩增及序列测定

采用土壤基因组DNA提取试剂盒(上海生工生物工程有限公司)提取细菌基因组DNA。细菌16S rRNA基因序列扩增引物为27F/1492R^[16]。PCR反应体系、反应程序及产物的测序参照孙雪莹等^[17]的方法进行。

1.5.2 系统发育树的构建

将获得的菌株序列上传至NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>),并在NCBI数据库中进行序列同源性比对,从Blast结果中取相似性最高的序列。通过Clustal W程序进行多序列对位排列,基于Kimura-2-parameter计算遗传距离,通过MEGA 7.0软件采用邻接法(Neighbor-Joining)构建种系型系统发育树,系统发育树各分枝的置信度自检举(bootstrap)1 000次^[18]。

1.6 致病基因分析

胞外金属蛋白酶和外膜蛋白U,是致病性弧菌两个重要的致病因子,他们分别由 *vsm* 和 *ompU* 基因编码。参照LIU et al^[6]的研究方法检测致病菌是否具有 *vsm* 和 *ompU* 基因。

1.7 药敏实验

用药敏纸片扩散法^[19]检测病原菌对常见抗生素的敏感性。病原菌在2216E液体培养基中过夜培养后,吸取100 μL菌液涂布在2216E平板上,将药敏纸片(杭州微生物试剂有限公司)贴到培养基表面,在15℃条件下经24 h培养后,测定抗生素产生抑菌圈的直径,参照药敏试纸片的抑菌范围解释标准,判断致病菌株对抗生素的敏感程度。

2 结果与分析

2.1 优势菌的分离

从死亡幼体涂布的2216E和TCBS平板中分离到的异养细菌和弧菌数量分别为1.32 × 10⁴ CFU/g和1.12 × 10⁴ CFU/g。根据形态从2216E平板中挑取2株优势菌B1和B2,分别占该平板总细菌数的37.8%和51.5%。TCBS平板中优势菌为V1和V2,分别占该平板总弧菌数的64.3%和32.1%。用这4株优势菌进行后续实验。

2.2 溶血实验

根据KONEMAN et al^[15]解释标准,4株用于溶血实验的菌株中,V1菌株呈现β溶血,V2菌株呈现

α 溶血, B1 和 B2 菌株呈现 γ 溶血。需通过感染实验进一步确定病原菌。

2.3 人工感染实验

感染实验结果如图 1 所示。用 V1 和 V2 菌株感染幼体 48 h 后, 幼体的累积死亡率($82.5\% \pm 5.2\%$ 和 $43.3\% \pm 6.1\%$) 显著高于对照组($18.3\% \pm 4.1\%$), 而 B1 和 B2 菌株组与对照组无显著差异。被 V1 和 V2 菌株感染致死的幼体纤毛脱落, 失去游动能力, 沉到水底解体死亡, 与自然发病症状一致。在病原菌的再分离实验中, V1 菌株组中分离到的 V1 菌株和 V2 菌株组中分离到的 V2 菌株分别占总弧菌数的($92.5 \pm 7.0\%$) 和 ($89.40 \pm 5.4\%$)%, 说明造成幼体死亡的病原菌是 V1 和 V2 菌株。

2.4 病原菌的 16S rRNA 基因序列分析

将病原菌 V1 和 V2 菌株的 16S rRNA 基因序列上传至 NCBI 数据库获得登录号分别为 KR 232924 和 KR 232925。为了确定 V1 和 V2 菌株的系统发育地位, 将其 16S rRNA 基因序列在 NCBI 中进行 Blast 比对, 结果两菌株均归为弧菌属, 并且 V1 菌株与灿烂弧菌 *Vibrio splendidus* ctt 31/5 相似性达到了

99.9%, V2 菌株与塔斯马尼亚弧菌 *Vibrio tasmaniensis* 007 相似性达到了 99.2%。以 V1 和 V2 菌株及其相近菌株的 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树如图 2 所示, 可以看到 V1 和 V2 菌株均归到了弧菌属, 并且分别属于灿烂弧菌和塔斯马尼亚弧菌。

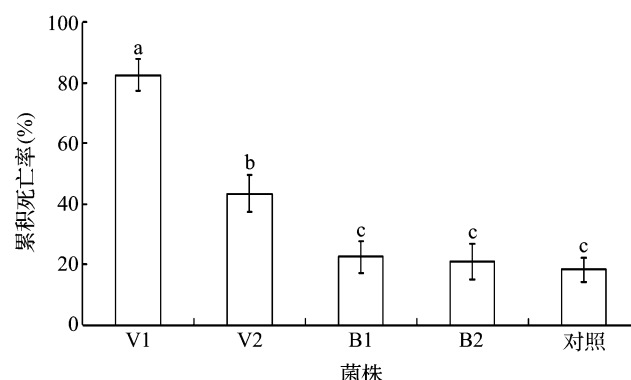


图 1 4 株优势菌在 15 °C 条件下感染幼体 48 h 后的累积死亡率

Fig. 1 Accumulative mortality of larvae caused by bath challenge with four dominant strains at 15 °C for 48 h
不同的小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$)

Different lowercase letters represent significantly different ($P < 0.05$)

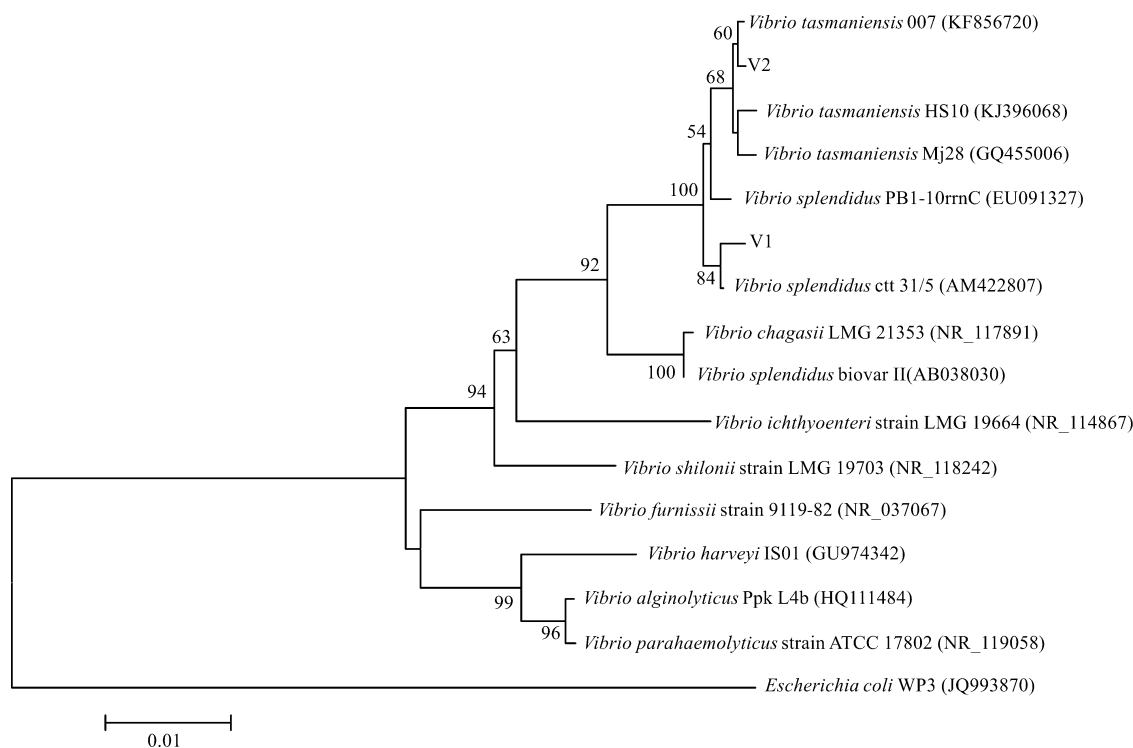


图 2 以病原菌的 16S rRNA 基因序列采用邻接法构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree constructed based on partial 16S rRNA gene sequences of pathogens using the neighbor-joining method
大肠杆菌 WP3 作为组外种类; 括号中为菌株的登录号, 枝节点上的数字代表平均自举值,
未标注数字的枝节点自举值小于 50%

Escherichia coli WP3 is used as an out-group. GenBank sequence accession numbers are given in parentheses. Numbers at the nodes show the percentage bootstrap values. Nodes without a number are of low bootstrap support ($< 50\%$)

2.5 病原菌的致病基因分析

将致病基因序列进行 Blast 比对,发现只有 V1 菌株含有 *vsm* 基因,与灿烂弧菌 *Vibrio splendidus* LGP32 (GenBank 登录号 DQ 987707)的该基因相似性达到了 96%。将该基因序列上传至 NCBI 获得登录号为 KR 559560。V1 菌株不含有 *ompU* 基因,V2 菌株两个基因都不含有。

2.6 药敏实验

从药敏结果(表 1)可以看出,2 种病原菌对不同的抗生素有不同的抗性。V1 菌株和 V2 菌株对利福平、氟苯尼考和磺胺异恶唑均敏感,但对复方新诺明和新霉素均有耐药性。V1 菌株对氨苄西林和多西环素敏感,但 V2 菌株对这两种抗生素均有耐药性。

表 1 病原菌 V1 菌株和 V2 菌株对常见抗生素的敏感性
Tab.1 Sensitivity of strains V1 and V2 to different antibiotics

药物	剂量(μg/slip)	菌株	
		V1	V2
头孢哌酮	75	R	S
多西环素	30	S	R
复方新诺明	23. 75/1. 25	R	R
诺氟沙星	10	W	W
利福平	5	S	S
氟苯尼考	75	S	S
磺胺异恶唑	300	S	S
氨苄西林	10	S	R
链霉素	10	R	W
新霉素	30	R	R

注:“S”: 敏感;“R”: 耐药;“W”: 不敏感

3 讨论

虾夷扇贝幼体发育到壳顶幼体时期时,发生了大规模死亡现象。在本实验中,从死亡幼体分离出 2 株优势菌 V1 和 V2。由于这 2 株菌在哥伦比亚血琼脂平板中表现出溶血现象(包括 α 溶血和 β 溶血),所以推断 V1 菌株和 V2 菌株是潜在的病原菌^[20]。V1 菌株和 V2 菌株在感染实验中使扇贝幼体的死亡率显著提高,并且从感染死亡的幼体中分离到原感染菌株,因此判定 V1 菌株和 V2 菌株是造成幼体大量死亡的病原菌^[6]。由系统发育树可得知 V1 菌株和 V2 菌株分别属于灿烂弧菌和塔斯马尼亚弧菌。LIU et al^[6]报道过灿烂弧菌 JZ6 菌株曾造成了虾夷扇贝成体的大规模死亡。本研究是国内外首次发现弧菌是造成虾夷扇贝幼体大面积死亡的病原菌。

弧菌是各种双壳贝类幼体最主要的致病菌。在

本研究中灿烂弧菌 V1 为优势菌,灿烂弧菌是扇贝幼体发育过程中主要的致病菌之一。NICOLAS et al^[3]对大扇贝 *Pecten maximus* 育苗过程中造成幼体死亡的灿烂弧菌进行过研究,在 5 a 的研究中分离到 4 株灿烂弧菌,以 10⁴ cells/mL 的浓度对大扇贝幼体和太平洋牡蛎 *Crassostrea gigas* 幼体进行人工感染实验,其中的 2 株菌(C 和 F)在 72 h 的感染时间中能够造成扇贝幼体的大量死亡,但对牡蛎幼体无显著影响。TORKILDSEN et al^[2]对挪威卑尔根一育苗场的大扇贝幼体进行细菌学研究,分离到灿烂弧菌 LT06,以 5×10⁵ cells/mL 浓度进行感染实验时,扇贝幼体死亡率大约为 67.1%。智利北部某些育苗场的紫扇贝 *Argopecten purpuratus* 幼体大规模死亡现象也与灿烂弧菌有关^[3, 21]。本研究中,灿烂弧菌 V1 使虾夷扇贝幼体的累积死亡率显著高于对照组,表明该菌是造成幼体死亡的主要致病菌。

灿烂弧菌不仅对扇贝幼体有毒害作用,在其他一些双壳贝类中,灿烂弧菌也是常见的病原菌。KE-SARCODI-WATSON et al^[10]报道了灿烂弧菌是造成绿壳贻贝 *Perna canaliculus* 幼体大量死亡的病原菌。LACOSTE et al^[22]将法国莫尔莱湾太平洋牡蛎稚贝 *Crassostrea gigas* 夏季大规模死亡的原因归结为灿烂弧菌的感染。夏季是太平洋牡蛎亲贝性腺发育成熟时期,由于灿烂弧菌的感染,可使亲贝大量死亡,导致育苗过程失败^[23]。GUISANDE et al^[9]用灿烂弧菌对菱形蛤仔 *Venerupis rhomboids* 进行感染实验能导致蛤仔死亡。生物 II 型灿烂弧菌能造成太平洋牡蛎幼体、稚贝以及菲律宾蛤仔 *Ruditapes decussatus* 的死亡^[16, 24-25]。双壳贝类幼体易受到病原菌感染,这可能与其变态发育过程有关^[23],本研究中,虾夷扇贝幼体处于变态发育阶段,免疫系统脆弱,受到病原菌感染后,产生了大面积死亡现象。

由致病基因分析结果可知,只有 V1 菌株含有 *vsm* 基因。当把灿烂弧菌 LGP32 菌株注射到牡蛎组织中时,LGP32 菌株的胞外产物对牡蛎具有毒害作用,而胞外金属蛋白酶是 LGP32 菌株胞外产物中的主要致病因子^[26]。LE ROUX et al^[27]将 LGP32 菌株的 *vsm* 基因敲除后,发现其胞外产物对牡蛎的毒性有所降低。这说明 *vsm* 基因的存在是灿烂弧菌产生毒性的重要因素。灿烂弧菌 JZ6 含有 *vsm* 基因,该菌能够感染虾夷扇贝成体,使其闭壳肌发生病变,并且含有 *vsm* 基因的弧菌致病力显著高于不含有 *vsm* 基因的弧菌^[6],本研究结果与之相似。因此推断 *vsm* 基因

的存在可能是 V1 菌株致病性较高的原因。

根据系统发育树将 V2 菌株归为塔斯马尼亚弧菌。该菌是牡蛎和蛤仔养殖过程中的优势菌^[9]。LAGO et al^[28]的研究表明从处于繁殖期的健康牡蛎亲贝分离的 5 株塔斯马尼亚弧菌能够定植在菱形蛤仔 *Venerupis rhomboids* 组织中并导致蛤仔患病。该菌还是海参 *Apostichopus japonicas* 腐皮病的病原菌^[29]。最近, VANHOVE et al^[30]发现塔斯马尼亚弧菌 LGP32 菌株能够对牡蛎血细胞造成侵染, 该菌能够向血细胞内和细胞外释放外膜泡。本研究结果与之相似, V2 菌株呈 α 溶血, 会对扇贝幼体血细胞造成损害, 导致幼体活力减弱, 摄食能力下降, 最终导致幼体死亡。因此推断 α 溶血是造成 V2 菌株致病性较高的原因。

在双壳贝类育苗过程中使用抗菌药物来防治细菌性疾病是很普遍的, MIRANDA et al^[31]在紫扇贝大规模育苗中研究了氟苯尼考对幼体存活和生长的影响, 提出应控制药物的使用, 寻求最佳用量以发挥药物的最大功效。本研究中常用的水产药物氟苯尼考、利福平、磺胺异恶唑能有效抑制致病性弧菌的生长, 这些药物在扇贝育苗过程中应合理利用。但是, 由于长期用药, 近年来病原菌的抗药性越来越强, 在贝类育苗池中也出现大量的抗药弧菌^[32]。人们对绿色健康水产品的追求以及法律对水产用药的限制, 促使人们不断追求更安全有效的方法来控制病害^[33]。其中使用益生菌是一个有效方法^[34], 在后续的实验过程中, 我们将筛选潜在益生菌并应用到虾夷扇贝育苗过程中, 以达到有效抑制致病性弧菌的目的。

参考文献 (References):

- [1] LI Wen-ji, TAN Ke-fei. The inspiration on massive mortality of scallop *Patinopecten yessoensis* resolved by Japan[J]. Fisheries Science, 2009, **28**(10): 609-612.
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.
- [2] TORKILDSEN L, LAMBERT C, NYLUND A, et al. Bacteria associated with early life stages of great scallop, *Pecten maximus*: impact on larval survival[J]. Aquaculture International, 2005, **13**(6): 575-592.
- [3] NICOLAS J L, CORRE S, GAUTHIER G, et al. Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1996, **27**(1): 67-76.
- [4] ROJAS R, MIRANDA C D, OPAZO R, et al. Characterization and pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with massive mortalities of commercial hatchery-reared larvae of scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819)[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2015, **124**(1): 61-69.
- [5] PAILLARD C, LE ROUX F, BORREGO J J. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution [J]. Aquatic Living Resources, 2004, **17**(4): 477-498.
- [6] LIU Rui, QIU Li-mei, YU Zuo-an, et al. Identification and characterisation of pathogenic *Vibrio splendidus* from Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*) cultured in a low temperature environment[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2013, **114**(2): 144-150.
- [7] TENG Wei-ming, LI Wen-ji, ZHANG Ming, et al. Isolation, identification and pathogenicity of *Vibrio chagasii* from *Patinopecten yessoensis* [J]. Journal of Fisheries of China, 2012, **36**(6): 937-943.
滕炜鸣, 李文姬, 张明, 等. 虾夷扇贝脓胞病病原的分离、鉴定与致病性[J]. 水产学报, 2012, **36**(6): 937-943.
- [8] SANDLUND N, TORKILDSEN L, MAGNESEN T, et al. Immunohistochemistry of great scallop *Pecten maximus* larvae experimentally challenged with pathogenic bacteria[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2006, **69**(2-3): 163-173.
- [9] GUISANDE J A, LAGO E P, PRADO S, et al. Genotypic diversity of culturable *Vibrio* species associated with the culture of oysters and clams in Galicia and screening of their pathogenic potential[J]. Journal of Shellfish Research, 2008, **27**(4): 801-809.
- [10] KESARCODI-WATSON A, KASPAR H, LATEGAN M J, et al. Two pathogens of Greenshell™ mussel larvae, *Perna canaliculus*: *Vibrio splendidus* and a *V. coralliilyticus/neptunius*-like isolate[J]. Journal of Fish Diseases, 2009, **32**(6): 499-507.
- [11] RICHARDS G P, WATSON M A, NEEDLEMAN D S, et al. Mortalities of eastern and Pacific oyster larvae caused by the pathogens *Vibrio coralliilyticus* and *Vibrio tubiashii* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, **81**(1): 292-297.
- [12] BEAZ-HIDALGO R, DIÉGUEZ A L, CLEENWERCK I, et al. *Vibrio celticus* sp. nov., a new *Vibrio* species belonging to the *Splendidus* clade with pathogenic potential for clams[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2010, **33**(6): 311-315.
- [13] GENARD B, MINER P, NICOLAS J L, et al. Integrative study of physiological changes associated with bacterial infection in Pacific Oyster larvae[J]. PLoS One, 2013, **8**(5): e 64534.
- [14] PRADO S, DUBERT J, ROMALDE J L, et al. *Vibrio ostreicida* sp. nov., a new pathogen of bivalve larvae[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary, 2014, **64**(5): 1 641-1 646.
- [15] KONEMAN E W, ALLEN S D, JANDA W M, et al. Diagnóstico Microbiológico[M]. Mexico City, Mexico: Médica Panamericana Press, 2001: 1-158.
- [16] SUGUMAR G, NAKAI T, HIRATA Y, et al. *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1998, **33**(2): 111-118.
- [17] SUN Xue-ying, LIU Ji-chen, LI Ming, et al. Characterization of culturable bacterial diversity in the water of Yesso scallop *Patin-*

- opecten yessoensis* larva rearing tanks[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2017, **32**(3): 323-328.
- 孙雪莹, 刘继晨, 李明, 等. 虾夷扇贝苗种培育水中可培养细菌群落分析[J]. 大连海洋大学学报, 2017, **32**(3): 323-328.
- [18] GUAN Feng, GAO Wei, CHEN Ji-gang, et al. Virulence characteristics and antimicrobial susceptibility of three pathogenic bacteria isolated from the channels and ports in Ningbo and Zhoushan[J]. Journal of Marine Sciences, 2015, **33**(4): 77-82.
- 管峰, 高威, 陈吉刚, 等. 宁波-舟山港口航道 3 种致病性细菌毒力特征与耐药性[J]. 海洋学研究, 2015, **33**(4): 77-82.
- [19] YE Ying-wu, WANG Yu-san, SHEN Zi-yu. National guide to clinical laboratory procedures [M]. second edition. Nanjing: Southeast University Press, 1997.
- 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程 [M]. 第二版. 南京: 东南大学出版社, 1997.
- [20] SCHULZE A D, ALABI A O, TATTERSALL-SHELDRAKE A R, et al. Bacterial diversity in a marine hatchery: Balance between pathogenic and potentially probiotic bacterial strains[J]. Aquaculture, 2006, **256**(1-4): 50-73.
- [21] RIQUELME C, TORANZO A E, BARJA J L, et al. Association of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio alginolyticus* with larval mortalities of scallop (*Argopecten purpuratus*) [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1996, **67**(1): 213-218.
- [22] LACOSTE A, NORMANNO G, ADDANTE N, et al. A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France) [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2001, **46**(2): 139-145.
- [23] GARNIER M, LABREUCHE Y, GARCIA C, et al. Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. Microbial Ecology, 2007, **53**(2): 187-196.
- [24] WAECHTER M, LE ROUX F, NICOLAS J L, et al. Characterization of pathogenic bacteria of the cupped oyster *Crassostrea gigas* [J]. Comptes Rendus Biologies, 2002, **325**(3): 231-238.
- [25] GÓMEZ-LEÓN J, VILLAMIL L, LEMOS M L, et al. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, **71**(1): 98-104.
- [26] BINESSE J, DELSERT C, SAULNIER D, et al. Metalloprotease *vsm* is the major determinant of toxicity for extracellular products of *Vibrio splendidus* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, **74**(23): 7 108-7 117.
- [27] LE ROUX F, BINESSE J, SAULNIER D, et al. Construction of a *Vibrio splendidus* mutant lacking the metalloprotease gene *vsm* by use of a novel counter selectable suicide vector [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, **73**(3): 777-784.
- [28] LAGO E P, NIETO T P, SEGUIN R F. Fast detection of *Vibrio* species potentially pathogenic for mollusc [J]. Veterinary Microbiology, 2009, **139**(3-4): 339-346.
- [29] DENG Huan, HE Chong-bo, ZHOU Zun-chun, et al. Isolation and pathogenicity of pathogens from skin ulceration disease and viscera ejection syndrome of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* [J]. Aquaculture, 2009, **287**(1-2): 18-27.
- [30] VANHOVE A S, DUPERTHUY M, CHARRIÈRE G M, et al. Outer membrane vesicles are vehicles for the delivery of *Vibrio tasmaniensis* virulence factors to oyster immune cells [J]. Environmental Microbiology, 2015, **17**(4): 1 152-1 165.
- [31] MIRANDA C D, ROJAS R, ABARCA A, et al. Effect of florfenicol and oxytetracycline treatments on the intensive larval culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) [J]. Aquaculture Research, 2014, **45**(1): 16-30.
- [32] DUBERT J, OSORIO C R, PRADO S, et al. Persistence of Antibiotic Resistant *Vibrio* spp. in Shellfish Hatchery Environment [J]. Microbial Ecology, 2015, **72**(4): 1-10.
- [33] RIQUELME C, JORQUERA M, ROJAS A, et al. Addition of inhibitor-producing bacteria to mass cultures of *Argopecten purpuratus* larvae (Lamarck, 1819) [J]. Aquaculture, 2001, **192**(2-4): 111-119.
- [34] KESARCODI-WATSON A, MINER P, NICOLAS J L, et al. Pathogenic threats and probiotic use in larviculture of the scallop, *Pecten maximus* [J]. Aquaculture Research, 2016, **47**(4): 1 221-1 230.

Identification of bacterial infections associated with larval development of Yesso scallop

LIU Ji-chen^{1,3}, JIN Xiao-jie^{*1}, LI Ming², CHEN Juan¹, GUO Zong-ming¹, MA Yue-xin³

(1. Department of Food, Yantai Nanshan University, Yantai 265713, China; 2. Zhangzidao Group Co., Ltd., Dalian 116001, China; 3. Dalian Ocean University, Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China's Sea, Ministry of Agriculture, Dalian 116023, China)

Abstract: The pathogens causing mortality in Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*) larvae in the hatchery of Zhangzidao Group Co. Ltd. were identified. A high mortality of the Yesso scallop larvae occurred during the seedling process; the larvae lost their ability to swim, their cilia fell off and their valves closed, they then sank to the bottom of the nursery pond and died. *Vibrio* has been reported as the primary pathogen for massive mortalities of different bivalves both in hatchery and in the field worldwide. Total viable vibrios counts in moribund larvae were 1.12×10^4 CFU/g on Tryptone Citrate Bile Sucrose agar plates. Two dominant strains, named V1 and V2, accounted for 64.3% and 32.1% of total vibrios counts respectively. Blood agar plates were used to measure hemolysis of isolated strains. Strain V1 exhibited beta hemolysis, while strain V2 exhibited alpha hemolysis. A challenge test showed that the signs of infected larvae were identical to those of natural moribund larvae, the cumulative mortality caused by strains V1 and V2 was significantly higher than that of the control ($P < 0.05$) and bacteria were re-isolated from the dead larvae. Strains V1 (GenBank Accession No: KR232924) and V2 (GenBank Accession No: KF232925) shared 99.9% and 99.2% identity with *Vibrio splendidus* ctt 31/5 and *Vibrio tasmaniensis* 007, respectively, by 16S rDNA sequencing. The presence of genes coding for virulence factors was examined by PCR analysis, showing that strain V1 possessed the extracellular metalloprotease (*vsm*) gene. Antibiotic susceptibility assays showed that both strains were sensitive to the rifampicin, florfenicol and sulfafurazole.

Key words: *Patinopecten yessoensis* larvae; bacterial pathogen; *Vibrio splendidus*; *Vibrio tasmaniensis*