

## 池塘养殖刺参病原菌塔式弧菌的分离与鉴定

杨求华<sup>1</sup>, 葛辉<sup>1</sup>, 方旅平<sup>2</sup>, 林琪<sup>1</sup>, 何丽斌<sup>1</sup>, 周宸<sup>1</sup>

(1. 福建省水产研究所, 福建 厦门 361013; 2. 厦门大学海洋与地球学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 2013年春季, 福建漳州地区池塘养殖刺参(*Apostichopus japonicus*)感染不明病原而患病。病参表现出排脏、身体萎缩、体表溃烂等症状, 俗称为“腐皮综合征”。为确定引起该病的病原菌, 从患病刺参病灶部位分离得到1株优势菌FJY001, 经回接感染试验, 证实所分离的细菌为刺参的病原菌。经形态、生理生化、16S rRNA序列分析和Biolog微生物自动鉴定系统等多项指标鉴定, 确定该病原菌为塔式弧菌(*Vibrio tubiashii*)。

**关键词:** 刺参; 病原菌; 塔式弧菌

中图分类号: S 947.9

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2014)04-0045-07

## Identification of *Vibrio tubiashii* isolated from diseased pond-cultured sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*)

YANG Qiuhua<sup>1</sup>, GE Hui<sup>1</sup>, FANG Lüping<sup>2</sup>, LIN Qi<sup>1</sup>, HE Libin<sup>1</sup>, ZHOU Chen<sup>1</sup>

(1. Fisheries Research Institute of Fujian Province, Xiamen 361013, China; 2. Ocean and Earth Institute of Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** In the spring of 2013, the pond-cultured sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*) were infected by an unrestrained pathogen in Zhangzhou City of Fujian Province. The sea cucumbers with the disease tentatively termed as “skin ulcerative syndrome” showed symptoms such as viscera ejection, general atrophy and skin ulceration. To determine the bacterial pathogen that caused the disease, one strain (FJY001) was isolated from the lesions of diseased sea cucumbers. Pathogenicity of the strain was confirmed by artificial infection and the strain was identified as *Vibrio tubiashii* by indicators of morphological, physiological and biochemical characteristics as well as sequencing of 16S rRNA and identification of Biolog microbiol system.

**Key words:** *Apostichopus japonicus*; pathogen; *Vibrio tubiashii*

海参隶属于棘皮动物门、海参纲, 素有“海产八珍”的美誉, 含有丰富的蛋白质、维生素及矿物质, 具有增强机体免疫力、抗肿瘤、抗炎症及抗血栓等作用<sup>[1-2]</sup>。刺参(*Apostichopus japonicus*)作为海参中一个重要品种, 是中国重要的海水养殖经济种类, 根据《2013 中国渔业统计年鉴》数据<sup>[3]</sup>, 2012年全国海参养殖总产量为170 830 t, 其中福建省养殖总产量为15 459 t, 产值达18亿元, 是继山东、辽宁后全国第三大刺参养殖大省。漳州地区是福建

省主要刺参养殖基地之一, 其主要养殖模式为池塘养殖, 据有关学者统计, 2011年漳州市刺参池塘养殖面积达400 hm<sup>2</sup><sup>[4]</sup>, 并呈逐渐增长之势。

然而随着养殖密度和养殖规模的扩大, 刺参的病害发生情况也日益严重, 在中国北方地区, “腐皮综合征”是养殖刺参主要疾病之一<sup>[5]</sup>, 该病在育苗期、保苗期、育成期均可发生, 具有极高的传染性和死亡率。目前, 已有诸多学者对刺参病原学进行了研究<sup>[6-10]</sup>, 嗜环弧菌(*Vibrio cyclitrophicus*)、

收稿日期: 2014-01-13; 修回日期: 2014-03-16

资助项目: 福建省科技厅公益类科研专项(2010R1002-3); 福建省水产研究所科研发展基金资助项目(2014fjscq04)

作者简介: 杨求华(1988-), 男, 硕士, 研究实习生, 从事水产生物疾病研究。E-mail: qhyang1314@163.com

通信作者: 周宸(1961-), 男, 教授级高工, 从事水产病害防治技术和水生实验动物研究。E-mail: ccdaifj@fjscs.ac.cn

灿烂弧菌(*V. splendidus*)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)、塔斯曼弧菌(*V. tasmaniensis*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp.)、发光杆菌(*Photobacterium* sp.)、黄海希瓦氏菌(*Shewanella marisflavi*)、原玻璃蝇节杆菌(*Arthrobacter protophormiae*)和马胃葡萄球菌(*Staphylococcus equorum*)等已被证实为养殖刺参病原菌。在中国南方地区也积极开展了养殖刺参疾病学的研究,葛辉等<sup>[11]</sup>对网箱养殖刺参腐皮综合征病原进行分析,结果显示细菌感染和寄生虫寄生是网箱养殖刺参腐皮综合征的主要病因。

2013年春季,福建漳州地区池塘养殖刺参出现患病情况,病参表现出排脏、身体萎缩、体表溃烂乃至死亡等症状。该研究对患病刺参进行了病原菌的分离鉴定以及相关药敏试验,旨在为该病病原的确定和防治工作提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 刺参

患病和回接感染试验所用刺参均取自福建漳州某刺参养殖场。取典型病症个体用于病原分离与鉴定。取参体肥壮、饱满、顺挺、肌肉厚实、肉刺挺拔的健康个体用于回接感染试验,个体平均体质量为 $(48.0 \pm 5.0)$  g。

### 1.2 菌株

菌株 FJY001 分离自患病刺参病灶部位; CFL002 为回接感染后病灶部位重分离菌株。

### 1.3 细菌鉴定系统

API 20E 肠杆菌和其他革兰氏阴性杆菌鉴定系统为法国生物-梅里埃公司(BioMérieux)产品; BIOLOG 自动微生物鉴定系统为美国 Biolog 公司产品。

### 1.4 刺参病灶部位病原菌的分离

取典型症状的患病刺参,用灭菌海水清洗体表,以无菌操作取病灶部位组织,接种于 TCBS 培养基上,28℃恒温培养24 h,观察菌落形态,挑取典型优势菌落纯化培养2~3次,将纯化后的菌落接种于2216E培养基上,经纯化后的菌落转接到斜面培养基上,-20℃保存备用。

### 1.5 回接感染试验

菌株 FJY001 接种于2216E培养基,28℃恒温培养24 h,采用麦氏比浊法测定菌浓度,无菌生理

盐水稀释配制 $1.0 \times 10^9$  cfu·mL<sup>-1</sup>菌悬液,120头平均体质量为 $(48.0 \pm 5.0)$  g的健康刺参随机分为6组,每组10头,设2个重复,其中试验组包括5个梯度( $10^9$ 、 $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$ 和 $10^5$ 菌浓度),每头刺参进行体壁注射感染,注射菌悬液剂量为每头0.1 mL,对照组注射相同剂量的无菌生理盐水。试验期间控制水温为21~23℃,盐度30~31,期间不投饵,连续充气,日换水量约为30%。感染后观察刺参发病死亡情况,同时对濒死刺参进行病原菌的重分离,并测定重分离菌株生理生化指标。

### 1.6 病原菌的鉴定

1.6.1 形态学观察 将病原菌分别接种于 TCBS 平板和2216E培养基上28℃恒温培养24 h,观察菌落的形态特点。同时将培养20 h的细菌制成菌悬液,稀释后作磷钨酸负染,透射式电镜下观察并拍照。

1.6.2 16S rRNA 序列分析 采用细菌组 DNA 抽提试剂盒(美国 OMEGA 公司出品)提取病原菌 DNA 作为模板,16S rRNA 基因 PCR 扩增引物为 27f: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG, 1492r: ACGGC-TACCTTGTT-ACGACTT<sup>[12]</sup>; PCR 扩增体系为 5 μL 10 × PCR buffer, 200 μmol·L<sup>-1</sup> dNTPs, 1.25 U Taq polymerase, 1 μL DNA 模板和 0.4 μmol·L<sup>-1</sup> 引物; PCR 扩增程序为 94℃ 5 min, 30 个循环(94℃ 1 min, 54℃ 1 min, 72℃ 2 min), 72℃ 10 min。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检验正确后,送至 Invitrogen 公司测序,测序结果提交 GenBank 数据库。用 NCBI-BLAST 软件进行序列比对,用 ClastalX 1.83 软件进行多重序列匹配和聚类分析,用 Mega 4.0 软件构建系统发育树。

1.6.3 生化特征 参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[13]</sup>和《伯杰氏鉴定细菌学手册》(10版)<sup>[14]</sup>等相关文献,并结合 API 20E 和 BIOLOG 自动微生物鉴定系统对病原菌进行鉴定。

## 2 结果

### 2.1 病原菌的分离和回接感染结果

患病刺参表现为身体萎缩、体色变暗、排脏、肉刺秃钝,体表出现溃烂斑,而后逐渐扩大,直至成鼻涕状胶体,导致死亡(图1-a),从病灶部位分离得到1株优势菌株,编号为 FJY001。回接感染试验结果表明,该分离菌株对刺参有明显的致病作用,感染后刺参患病率和死亡率见表1。从回接

感染发病死亡的刺参重新分离得到的病原菌 CFL002, 其菌落特征、菌体形态及理化特性与自然发病刺参病灶部位分离的菌株一致。再次注射感

染刺参的致病率和死亡率也基本相似(表1)。注射感染后刺参的主要症状与自然发病症状相同(图1-b)。

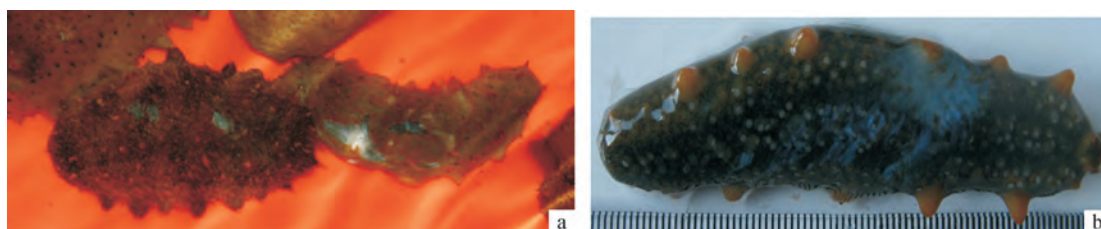


图1 患腐皮综合征的养殖刺参

a. 自然发病刺参; b. 回接感染发病刺参

Fig. 1 Sea cucumbers with gross signs of skin ulceration

a. sea cucumbers infected under natural condition; b. sea cucumbers infected under challenge test

表1 分离菌回接感染刺参试验结果

Tab. 1 Challenge test of isolated strains to healthy *A. japonicus*

菌株 strain	菌浓度/cfu·mL <sup>-1</sup> strain concentration	组别 group	试验数/头 quantity	死亡数/头 death number	症状出现率/% cumulative incidence	累积死亡率/% cumulative mortality
FJY001	1.0 × 10 <sup>9</sup>	1	10	10	100	100
		2	10	10	100	100
	1.0 × 10 <sup>8</sup>	1	10	10	100	100
		2	10	9	100	90
	1.0 × 10 <sup>7</sup>	1	10	9	100	90
		2	10	8	100	80
	1.0 × 10 <sup>6</sup>	1	10	7	90	70
		2	10	7	90	70
CFL002	1.0 × 10 <sup>5</sup>	1	10	5	80	50
		2	10	6	70	60
	1.0 × 10 <sup>8</sup>	1	10	9	100	90
		2	10	10	100	100
对照组 control	生理盐水	1	10	0	0	0
		2	10	0	0	0

## 2.2 病原菌的鉴定

2.2.1 菌落及菌株形态观察 病原菌在 TCBS 培养基上形成中央隆起、边缘整齐、表面湿润、光滑的黄色菌落, 24 h 培养后直径为 1 ~ 2 mm; 在 2216E 培养基上的菌落为白色圆形, 不透明, 边缘整齐, 表面湿润。透射电镜下可见病原菌呈弧形短杆状, 极生单鞭毛, 两端钝圆, 单个排布, 菌体大小为 1.8 μm × 0.8 μm(图2)。

2.2.2 病原菌的 16S rRNA 序列分析 对病原菌

FJY001 (GenBank 序列登录号为 KJ094891) 的 16S rRNA 序列进行扩增, 得到长度为 1 418 bp 的特异性条带(图3), 通过基因测序获得了病原菌的部分基因序列。通过 NCBI-Blast 同源性分析发现病原菌的 16S rRNA 基因与塔式弧菌的同源性达 99%。从 GenBank 数据库中下载相关序列, 用 ClustalX 软件对序列进行校正, 采用 Mega 4.0 软件构建系统发育树, 结果显示病原菌 FJY001 与塔式弧菌聚为一支(图4)。

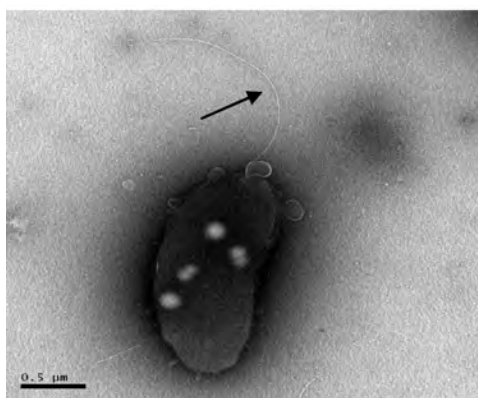


图2 病原菌的透射电镜图(×4 000)

箭头示鞭毛

Fig. 2 Pathogen strains under electron microscopy

Microscope arrow shows flagellum

2.2.3 病原菌生理生化特性分析 生理生化和 API 20E 鉴定结果显示,病原菌 FJY001 及重分离菌株 CFL002 为革兰氏阴性菌,弧形,具运动性,葡萄糖发酵,氧化酶、触酶阳性; $\beta$ -半乳糖苷酶、精氨酸双水解酶、鸟氨酸脱羧酶、脲素酶阴性;赖氨酸脱羧酶、色氨酸脱羧酶、明胶酶阳性;利用葡萄糖、蔗糖、阿拉伯糖、甘露醇、肌醇、苦杏仁苷等;不利用柠檬酸、鼠李糖、蜜二糖、山梨醇等(表2)。采用 BIOLOG 自动微生物鉴定系统鉴定,结果显示病原菌 FJY001 为塔式弧菌(*V. tubiashii*),鉴定概率为 98%。结合细菌形态学观察、16S rRNA

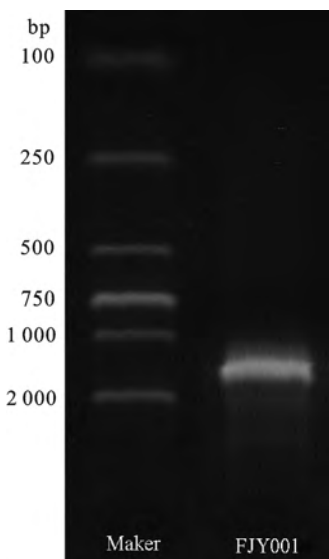


图3 病原菌 FJY001 的 16S rRNA 基因序列扩增电泳图

Fig. 3 Electrophoresis of 16S rRNA of FJY001

after being amplified by PCR

基因序列分析以及生理生化鉴定结果,确定病原菌 FJY001 为弧菌属的塔式弧菌(*V. tubiashii*)。

### 3 讨论

#### 3.1 刺参疾病病原的研究

研究表明,养殖刺参育苗期的主要疾病有化板症<sup>[15]</sup>、烂胃病<sup>[16]</sup>等,而越冬保苗期和养成期则以腐皮综合征的危害最为严重,其病原具有地域性和

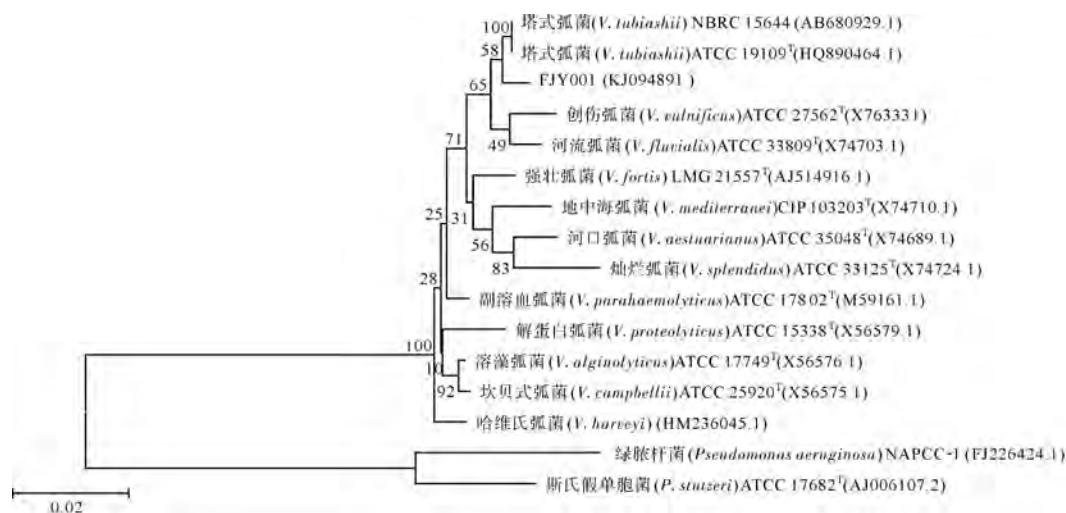


图4 病原菌 FJY001 的 16S rRNA 序列系统发育树

线段 0.02 代表 1/50 进化距离单位;括号中序号为 GenBank 登录号

Fig. 4 Phylogenetic tree of FJY001 based on 16S rRNA sequence

Scale bar 0.02 indicates nucleotide substitution per 50 nucleotides of 16S rRNA sequence. Serial numbers in brackets are GenBank accession No.

表2 病原菌 FJY001 和重分离菌 CFL002 的部分生理生化特征

Tab. 2 Biochemical and physical characteristics of FJY001 and CFL002

鉴定项目 identified item	FJY001	CFL002	塔式弧菌 <sup>[13-14]</sup> <i>V. tubiashii</i>
形状 shape	弧杆状	弧杆状	弧杆状
运动性 movability	+	+	+
极生鞭毛 polar flagella	+	+	+
革兰氏染色 gran staining	-	-	-
O/F	F	F	F
V-P	-	-	-
生长在: pH 5	-	-	-
pH 6	+	+	+
1% 氯化钠 1% NaCl	+	+	+
4% 氯化钠 4% NaCl	+	+	+
触酶 catalase	+	+	+
酯酶 esterase	+	+	+
氧化酶 oxidase	+	+	+
明胶酶 gelatinase	+	+	+
淀粉酶 amylase	+	+	+
精氨酸双水解酶 arginine dihydrolase	-	-	d
利用: 蔗糖 sucrose	+	+	+
葡萄糖 glucose	+	+	+
肌醇 myo-inositol	-	-	-
山梨醇 D-sorbitol	-	-	-
丙酸 propionic acid	d	-	-
甘氨酸 glycine	+	+	+
丁酸盐 butyrate	-	-	-
柠檬酸盐 citrate	+	+	+
$\alpha$ -D-乳糖 $\alpha$ -D-lactose	-	-	d
L-鼠李糖 L-rhamnose	-	-	-
L-阿拉伯糖 L-arabinose	-	-	-
D-木糖 D-xylose	-	-	-
D-麦芽糖 D-maltose	+	+	-
D-海藻糖 D-trehalose	+	+	+
D-甘露糖 D-mannose	+	+	+
D-甘露醇 D-mannitol	+	+	+
D-半乳糖 D-galactose	+	+	+
D-蜜二糖 D-melibiose	-	-	d
D-纤维二糖 D-cellobiose	+	+	+
L-亮氨酸 L-leucine	-	-	-
L-丝氨酸 L-serine	+	+	+
L-丙氨酸 L-alanine	+	+	+
$\alpha$ -酮戊二酸 $\alpha$ -ketoglutarate	-	-	d

注: +. 阳性; -. 阴性; F. 发酵; d. 可变

Note: +. positive; -. negative; f. fermentation; d. variable

多样性等特点<sup>[5]</sup>。在中国北方地区,细菌性病原是刺参患病的主要病原,杨嘉龙等<sup>[7]</sup>和黄华伟等<sup>[8]</sup>对山东省乳山和青岛地区养殖场中的患病刺参进行病原研究,结果证实溶藻弧菌和恶臭假单胞菌分别为刺参溃烂病和老化参池刺参腐皮综合征的主要病原菌;王印庚等<sup>[15]</sup>对辽宁地区苗种培育期的患“化板症”稚参病原进行了研究,结果显示副溶血弧菌为其主要病原菌。此外,黄海希瓦氏菌<sup>[10]</sup>、嗜环弧菌、哈维氏弧菌以及塔斯曼弧菌等<sup>[6]</sup>均已被证实为养殖刺参病原菌;而 LIU 等<sup>[9]</sup>对青岛仰口地区患病刺参进行病原检测结果表明,除细菌外,病毒感染也可能是刺参唇肿大征的病原之一。在中国南方地区,葛辉等<sup>[11]</sup>对福建霞浦网箱养殖刺参的病原研究表明,灿烂弧菌、假交替单胞菌和后口虫感染是刺参患腐皮综合征的主要病因。在国外,BECKER 等<sup>[17]</sup>的研究表明溶藻弧菌可能是糙海参(*Holothuria scabra*)体表“溃烂病”的主要病原。该研究从患病刺参病灶部位分离得到优势菌株 FJY001,经形态、生理生化特征以及 16S rRNA 基因序列分析鉴定该菌为塔式弧菌。在回接感染试验中,分离菌 FJY001 可致使健康刺参产生与自然发病相同的症状,从感染刺参中重新分离得到优势菌株 CFL002 也可使健康刺参感染产生一致的症状,且经鉴定与菌株 FJY001 为同一种菌。根据科霍氏法则<sup>[18]</sup>,证实该菌是养殖刺参的病原菌。

### 3.2 塔式弧菌引起的水产动物疾病

塔式弧菌隶属于弧菌科、弧菌属,该菌是由 TUBIASH 等<sup>[19]</sup>于 1965 年首次分离得到,而后由 HADA 等<sup>[20]</sup>于 1984 年重新鉴定并正式确定为弧菌属一个新种,命名为塔式弧菌(*V. tubiashii*)。塔式弧菌是条件致病菌,在正常条件其广泛分布于养殖环境中,AKINBOWALE 等<sup>[21]</sup>的研究表明,赤鳍笛鲷(*Lutjanus erythropterus*)的皮肤和鳍条,以及锯缘青蟹(*Scylla serrata*)和海马(*Hippocampus*)培育池池水和池壁上均有该菌的分布。不过当宿主的生理状态或养殖环境的理化条件改变时,该菌就有可能引起养殖动物患病。早在 1965 年就有塔式弧菌致使文蛤(*Mercentria mercenaria*)和牡蛎(*Crassostrea virginica*)等<sup>[19]</sup>双壳类软体动物幼体及成体发病的相关报道<sup>[14]</sup>;CASTRO 等<sup>[22]</sup>对患有“棕环病”[brown ring disease(BRD)]的菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)的研究表明,塔式弧菌、灿烂弧菌和哈维氏弧菌是引起该病的主要病原;ELSTON 等<sup>[23]</sup>对

北美西海岸贝类育苗场的 3 种贝类患病情况进行了报道,结果表明塔式弧菌致使长牡蛎(*C. gigas*)、熊本牡蛎(*C. sikamea*)和象牙蚌(*Panope abrupta*)患病,而高达  $1.6 \times 10^5$  cfu·mL<sup>-1</sup> 的菌密度是引起此次患病的主要原因。在中国,王江勇等<sup>[24]</sup>对杂色鲍(*Haliotis diversicolor*)大规模死亡与细菌数量的关系进行了研究,结果显示塔式弧菌等弧菌的大规模增长是杂色鲍幼苗大规模死亡的重要标志。此外,DELSTON 等<sup>[25]</sup>和杜宗军等<sup>[26]</sup>分别对塔式弧菌的含锌金属蛋白酶和琼胶酶的表达情况进行了研究,而 GHARAIBEH 等<sup>[27-28]</sup>以塔式弧菌的金属蛋白酶为目标基因,建立起基于实时荧光定量 PCR 和横向流动试纸条技术(LFD)的塔式弧菌快速检测技术。

### 参考文献:

- [1] BORDBAR S, ANWAR F, SAARI N. High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods: a review[J]. Mar Drugs, 2011, 9(10): 1761–1805.
- [2] 李海鹏, 罗鹏, 于宗赫, 等. 热带海参糙刺参野外网箱养殖的初步研究[J]. 南方水产科学, 2013, 9(6): 1–7.
- [3] 农业部渔业局. 2013 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2013: 32–34.
- [4] 李正良. 刺参南方池塘养殖技术[J]. 福建水产, 2011, 33(5): 77–80.
- [5] 王印庚, 荣小军, 张春云, 等. 养殖海参主要疾病及防治技术[J]. 海洋科学, 2005, 29(3): 1–7.
- [6] DENG H, HE C B, ZHOU Z C, et al. Isolation and pathogens from skin ulceration disease and viscera ejection syndrome of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. Aquaculture, 2009, 287(1/2): 18–27.
- [7] 杨嘉龙, 周丽, 绳秀珍, 等. 养殖刺参溃疡病病原菌 RH2 的鉴定及其生物学特性分析[J]. 水产学报, 2007, 31(4): 504–511.
- [8] 黄华伟, 王印庚, 陈霞, 等. 老化参池腐皮综合征致病病原的分离与鉴定[J]. 水产学报, 2010, 34(9): 1460–1468.
- [9] LIU H Z, ZHENG F R, SUN X Q, et al. Identification of the pathogens associated with skin ulceration and peristome tumescence in cultured sea cucumbers *Apostichopus japonicus* (Selenka)[J]. J Invertebra Pathol, 2010, 105(3): 236–242.
- [10] LI H, QIAO G, LI Q, et al. Biological characteristics and pathogenicity of a highly pathogenic *Shewanella marisflavi* infecting sea cucumber, *Apostichopus japonicus* [J]. J Fish Dis, 2010, 33(11): 865–877.
- [11] 葛辉, 何丽斌, 林琪, 等. 福建海区网箱养殖刺参“腐皮综合症”病原分析与鉴定[J]. 福建水产, 2012, 34(2): 105–110.
- [12] LANE D J. 16S/23S rRNA sequencing[M]//STACKEBRANDT

- E, GOODFELLOW M. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. New York: John Wiley & Sons, 1991: 115–175.
- [13] 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: 114–116.
- [14] BRENNER D J, KRIEG N R, STALEY J T, et al. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol 2 Part B[M]. 2nd ed. USA: Springer, 2005: 520–527, 544.
- [15] 王印庚, 郭伟丽, 荣小军, 等. 养殖刺参“化板症”病原菌的分离与鉴定[J]. 渔业科学进展, 2012, 33(6): 81–86.
- [16] 邓欢, 隋锡林. 刺参育苗期常见疾病[J]. 水产科学, 2004, 23(3): 40.
- [17] BECKER P, GILLAN D, LANTERBECQ D, et al. The skin ulceration disease in cultivated juveniles of *Holothuria scabra* (Holothuroidea, Echinodermata) [J]. Aquaculture, 2004, 242(1/2/3/4): 13–30.
- [18] LIPKIN W. Microbe hunting in the 21st century[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 106(1): 6–7.
- [19] TUBIASH H S, CHANLEY P E, LEIFSON E. Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks I. Etiology and epizootiology[J]. J Bacteriol, 1965, 90(4): 1036–1044.
- [20] HADA H S, WEST P A, LEE J V, et al. *Vibrio tubiashii* sp. nov., a pathogen of bivalve mollusks[J]. Int J Syst Bacteriol, 1984, 34(1): 1–4.
- [21] AKINBOWALE O L, PENG H, BARTON M D. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia [J]. J Appl Microbiol, 2006, 100(5): 1103–1113.
- [22] CASTRO D, PUJATE M J, LÓPEZ-CORTÉS L, et al. Vibrios isolated from the cultured manila clam (*Ruditapes philippinarum*): numerical taxonomy and antibacterial activities[J]. J Appl Microbiol, 2002, 93(3): 438–447.
- [23] ELSTON R A, HASEGAWA H, HUMPHREY K L, et al. Re-emergence of *Vibrio tubiashii* in bivalve shellfish aquaculture: severity, environmental drivers, geographic extent and management [J]. Dis Aquat Org, 2008, 82(2): 119–134.
- [24] 王江勇, 王瑞旋, 刘广锋, 等. 杂色鲍幼苗大规模死亡与细菌数量的关系[J]. 南方水产科学, 2005, 1(1): 57–61.
- [25] DELSON R B, KOTHARY M H, SHANGRAW K A, et al. Isolation and characterization of a zinc-containing metalloprotease expressed by *Vibrio tubiashii* [J]. Can J Microbiol, 2003, 49(8): 525–529.
- [26] 杜宗军, 王鹏, 李筠, 等. 两株琼胶酶高产细菌的筛选和鉴定[J]. 海洋科学, 2002, 26(3): 1–4.
- [27] GHARAIBEH D N, GASEGAWA H, HÄSE C C. Development of a quantitative real-time PCR assay for detection of *Vibrio tubiashii* targeting the metalloprotease gene[J]. J Microbiol Meth, 2009, 76(3): 262–268.
- [28] GHARAIBEH D N, BIEL F M, HÄSE C C. Development of monoclonal antibody-based assays for the detection of *Vibrio tubiashii* zinc-metalloprotease (VtpA) [J]. J Microbiol Meth, 2013, 94(2): 125–132.