

## 多种细菌与凡纳滨对虾肝胰腺 坏死症 ( HPNS ) 爆发有关<sup>\*</sup>

黄志坚<sup>1</sup>, 陈勇贵<sup>1</sup>, 翁少萍<sup>1,2</sup>, 路晓锋<sup>1</sup>, 钟立洪<sup>1</sup>, 范文洲<sup>2</sup>,  
陈旭凌<sup>1</sup>, 张慧文<sup>2</sup>, 何建国<sup>1,2</sup>

( 1. 水产品安全教育部重点实验室 // 中山大学海洋学院, 广东 广州 510275;

2. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

**摘 要:** 近年来, 在中国南方超过 50% 以上的凡纳滨对虾养殖场在养殖 30 d 后爆发 1 种疾病, 导致 80% 以上的养殖对虾死亡。患病对虾临床症状为肝胰腺萎缩坏死、活动力减弱、对虾在池塘底部死亡, 发病初期水面和池塘边观察不到病虾, 因此养殖者通常将该病称为“偷死病”。患病对虾肝胰腺萎缩坏死是主要症状, 因此, 我们称这种对虾疾病为对虾肝胰腺坏死症 ( hepatopancreas necrosis syndrome, HPNS )。2012 年 3 月 - 2013 年 10 月, 我们在中国南方广东、海南和广西 3 个省的 12 个养殖地区采集具有 HPNS 症状的凡纳滨对虾进行了组织病理观察、病毒检测与人工感染、细菌分离鉴定与人工感染研究。组织病理学研究表明具有 HPNS 症状的病虾肝胰腺坏死, 在部分区域肝胰腺管细胞消失, 肝胰腺小管间结缔组织减少。对 305 尾 HPNS 对虾进行 11 种对虾病毒 PCR 检测, 并采用人工病毒感染方式感染健康对虾, 感染对虾不表现 HPNS 症状。从 63 尾 HPNS 病虾的肝胰腺、血淋巴和肠道分离鉴定 383 株细菌, 这些细菌分别属于 10 个属, 49 种细菌, 每尾对虾均混合感染多种细菌, 其中 38 尾对虾中分离到副溶血弧菌, 34 尾对虾中分离到蜡样芽孢杆菌, 20 尾对虾中分离到苏云金芽孢杆菌, 19 尾对虾中分离到霍乱弧菌。选取副溶血弧菌和苏云金芽孢杆菌分别采用注射和浸泡方式感染健康对虾, 感染对虾均出现 HPNS 症状。结果表明多种细菌与凡纳滨对虾 HPNS 爆发有关。

**关键词:** 凡纳滨对虾; 肝胰腺坏死症; 细菌; 病毒

中图分类号: S941.42 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579 (2016) 01-0001-11

## Multiple bacteria species were involved in hepatopancreas necrosis syndrome ( HPNS ) of *Litopenaeus vannamei*

HUANG Zhijian<sup>1</sup>, CHEN Yonggui<sup>1</sup>, WENG Shaoping<sup>1,2</sup>, LU Xiaofeng<sup>1</sup>, ZHONG Lihong<sup>1</sup>,  
FAN Wenzhou<sup>2</sup>, CHEN Xuling<sup>1</sup>, ZHANG Huiwen<sup>2</sup>, HE Jianguo<sup>1,2</sup>

( 1. MOE Key Laboratory of Aquatic Product Safety // School of Marine Sciences,  
Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** In recent years, a disease outbreak occurred in >50 percent of *Litopenaeus vannamei* farms at about 30 days after fries are released into the ponds in southern China. About 80% culture shrimps were dead in culture period. The clinical symptoms of the diseased shrimps include atrophy and necrosis of the

\* 收稿日期: 2015-12-14

基金项目: 国家基金联合基金资助项目 ( U1131002 ); 国家科技支撑资助项目 ( 2012BAD17B03 ); 国家现代农业产业技术体系建设专项资助资金 ( CARS-47 ); 农业公益性行业科研专项经费资助项目 ( 201103034 ); 广东省科技计划资助项目 ( 2012A020602084 ); 广州市科技计划资助项目 ( 201510010071 )

作者简介: 黄志坚 ( 1970 年生 ), 男; 陈勇贵 ( 1969 年生 ), 男; 翁少萍 ( 1963 年生 ), 女; 以上 3 人并列第一作者;  
通讯作者: 何建国; E-mail: lsshjg@mail.sysu.edu.cn

hepatopancreas, weakened activity, and shrimp found dead in the bottom of the pond. The farmers in China usually called this symptom as “hidden death disease”. Since hepatopancreas atrophy and necrosis are the main symptoms of the disease, so we called this disease as hepatopancreas necrosis syndrome (HPNS). In March 2012 to October 2013, we have collected the diseased *L. vannamei* with the symptoms of HPNS in 12 farms from Guangdong, Hainan and Guangxi provinces, China. Histopathology showed necrosis of hepatopancreas of the diseased shrimps, disappearance of some hepatopancreatic epidermal cells, and connective tissue. We used PCR to detect the presence of 11 viruses in 305 HPNS shrimps and performed artificial viral infection to healthy shrimps. The artificially infected shrimps did not show symptoms of HPNS. A total of 383 bacteria strains were identified from hepatopancreas, hemolymph and intestine of 63 diseased shrimps. These bacteria belong to 10 genera, 49 species. We isolated *Vibrio parahaemolyticus* from 38 shrimps, *Bacillus cereus* from 34 shrimps, *B. thuringiensis* from 20 shrimps and *V. cholera* from 19 shrimps. Injection and immersion of *V. parahaemolyticus* and *B. thuringiensis* can cause symptoms of HPNS. The results suggest that multiple bacteria were involved in HPNS of *L. vannamei*.

**Key words:** *Litopenaeus vannamei*; hepatopancreas necrosis syndrome (HPNS); bacterium; virus

凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* 现为世界第一大养殖对虾种, 占世界养殖对虾总产量的 70%。中国凡纳滨对虾养殖产量占全球对虾养殖产量的 30%, 2012 年中国养殖凡纳滨对虾养殖产量达到 145.32 万 t。近年来, 一种称为早期死亡综合症 (early mortality syndrome, EMS)<sup>[1-3]</sup> 或急性肝胰腺坏死综合症 (acute hepatopancreas necrosis syndrome, AHPNS)<sup>[4-5]</sup> 的对虾疾病在中国、泰国、越南、印度尼西亚、印度和墨西哥等地对虾养殖场中爆发<sup>[1-2, 5-9]</sup>。EMS/AHPNS 导致全球对虾养殖产业严重损失<sup>[5, 10-13]</sup>。最近在中国南方超过 50% 以上的凡纳滨对虾养殖场在养殖 30 d 后爆发 1 种疾病, 导致 80% 以上的养殖对虾死亡。患病对虾临床症状为肝胰腺萎缩坏死、活动力减弱、在池塘底部死亡, 水面和池塘边观察不到病虾, 因此对虾养殖者通常将该病称为“偷死病”。肝胰腺萎缩坏死是患病对虾的主要临床症状, 因此, 我们称这种对虾疾病为对虾肝胰腺坏死症 (hepatopancreas necrosis, HPNS)。尽管患有 HPNS 的对虾与患有 EMS/AHPNS 的对虾均表现为肝胰腺坏死, 但 HPNS 对虾与 EMS/AHPNS 对虾不同, EMS/AHPNS 是在对虾养殖早期死亡 (一般在 7~30 d 的养殖时间发病), 发病速度快, 有报道认为 EMS/AHPNS 是由 1 株高致病力的副溶血弧菌致病菌引起对虾急性大量死亡<sup>[1, 14-17]</sup>。与 EMS/AHPNS 相比, HPNS 的爆发和发病进程相对比较缓慢, 而且 HPNS 一般发生在凡纳滨对虾养殖 30 d 以后, 池塘养殖对虾不会在短时间内大量死亡, 而是逐渐死亡, 养殖到 90 d 左右, 死亡率达到 80%。

为了研究对虾 HPNS 爆发是否跟细菌和/或病毒等因素有关, 本文开展了组织病理学、病毒检测与人工感染、细菌分离鉴定与人工感染等方面的研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 肝胰腺坏死症凡纳滨对虾样品采集

于 2012 年 3 月-2013 年 10 月分别在中国南方广东、海南和广西 3 个省的 12 个凡纳滨对虾主要养殖区域收集具有典型 HPNS 症状的病虾肝胰腺、血淋巴和肠道样品。为了检测细菌或病毒病原, 病虾样品分别在现场进行不同处理和保存。采用无菌操作方法现场取患病凡纳滨对虾的肝胰腺、血液、肠道, 用接种环分别在 LB、TSA、TCBS、BHI 平板培养基上划线接种, 平板培养基密封保存带回实验室用于检测和鉴定细菌。现场采集的病虾样品用冰盒冷冻, 封装后带回实验室, 存放于 -80℃ 冻存用于对虾 DNA 病毒检测和病毒人工感染。同时取对虾不同组织用 RNA later 液 (Invitrogen, USA) 于 -80℃ 保存, 用于对虾 RNA 病毒检测。采集患病对虾样品同时用 Davidson's AFA 组织固定液<sup>[18-19]</sup>固定用于组织病理分析。

### 1.2 肝胰腺坏死症凡纳滨对虾组织病理观察

采集 36 尾 HPNS 对虾肝胰腺, Davidson's AFA 组织固定液固定, 固定 12~24 h 后换  $\varphi = 70\%$  酒精保存<sup>[19]</sup>。将固定的对虾组织用无菌去离子水冲洗 12 h, 然后用  $\varphi$  为 50%、70%、80%、90%、95%、100% 的梯度酒精逐级脱水, 二甲苯透明、透蜡, 石蜡包埋、切片, 苏木精-伊红 (H&E)

染色, 光学显微镜下观察并拍照。

### 1.3 肝胰腺坏死症凡纳滨对虾病毒 PCR 检测

采用酚氯仿法提取 HPNS 对虾基因组 DNA 进行对虾 DNA 病毒检测<sup>[20]</sup>。采用 Trizol 法 (Invitrogen, USA) 提取 HPNS 对虾总 RNA, 并用 Prime-Script 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, Japan) 试剂盒进行逆转录以检测 HPNS 对虾 RNA 病毒。针对各种对虾病毒性病原的高度保守区段设计特异性引物, 采用 PCR 检测方法分别检测白斑综合症病毒 (WSSV)、传染性皮下及造血组织坏死病毒 (IHHNV)、对虾杆状病毒 (BPV)、斑节对

虾杆状病毒 (MBV)、肝胰腺细小病毒 (HPV)、黄头病毒 (YHV)、桃拉综合症病毒 (TSV)、传染性肌肉坏死病毒 (IMNV)、莫里恩病毒 (MOV)、罗氏沼虾诺达病毒卫星病毒 (XSV) 和生长缓慢综合症病毒 (LSNV)。对虾病毒检测所用引物均由 Invitrogen 公司合成, 引物信息见表 1。PCR 反应条件为: 94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 30 个循环后于 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物经  $w=1\%$  琼脂糖凝胶电泳检测后分析。

表 1 病毒检测的引物序列

Table 1 The primer sequences for virus detection

引物名称	引物序列 (5'-3')	引物名称	引物序列 (5'-3')
WSSV - F1	CGTGCCTGAATCAGTATGTACGC	YHV - F	CCGCTAATTTCAAAAACACTACG
WSSV - R1	GACGTTACAATAGACCCATGTTTCGAT	YHV - R	ACTTCCTCGACATAACACCTT
WSSV - F2	CTCATGTACCAAATCTGGGTACG	TSV - F	TCAATGAGAGCTTGGTCC
WSSV - R2	CGATAGACCACAAGTTTCCGTAGG	TSV - R	AAGTAGACAGCCGCGCTT
IHHNV - F	ATCGGTGCACTACTCGGA	IMNV - F1	TTTATACACCGCAAGAATTGGCCAA
IHHNV - R	TCGTACTGGCTGTTTCATC	IMNV - R1	AGATTTGGGAGATTGGGTGCTATCC
BP - F	GATCTGCAAGAGGACAAACC	IMNV - F2	TGTTTATGCTTGGGATGGAA
BP - R	ATCGCTAAGCTCTGGCATCC	IMNV - R2	TCGAAAGTTGTTGGCTGATG
MBV - F	AACCTTCGGCCTTCCATT	MOV - F1	GGGATGGTGTGTCATACAAAGG
MBV - R	AATCGAACGGCCTTAGCA	MOV - R1	GTCATTAGCTGGTCTTAGTTTTCAC
HPV - F	GCACTTATCACTGTCTCTAC	MOV - F2	ACAGTTTGTCAAGCTCACAGGATG
HPV - R	GTGAACTTTGTAATAACCTTG	MOV - R2	AGAAGCGCCATTCTGATGAACATC
XSV - F	GGAGAACCATGAGATCACG	LSNV - F	TTGCCTTCTCCCGAGTGCTC
XSV - R	CTGCTCATTACTGTTCCGAGTC	LSNV - R	CCGGCTGAGGTAGCTGCTTG

### 1.4 病毒人工感染

实验所用健康凡纳滨对虾 (均质量 5 g) 由中山大学海洋生物技术研究开发中心珠海基地提供。选取容积为 0.8 m<sup>3</sup> 的水族箱, 试验用水为天然海水, 水温 28~32 ℃。选取大小均一适中、活力较好的对虾放入水族箱暂养 3~5 d, 24 h 充气, 每天按时喂料并吸污换水, 直至对虾生长状况稳定。感染试验分组前, 随机选取 10 尾试验对虾进行对虾病毒检测, 没有检测到病毒的对虾可进行病毒攻毒试验。

小心剥离 30 尾具典型 HPNS 症状的病虾头胸甲, 称取病虾头胸部用 10 倍体积的无菌 PBS 用匀浆器在冰上匀浆, 匀浆液在 5 000 r/min 离心 10

min, 上清经 0.45 μm 滤膜过滤, 10 倍体积 PBS 液稀释用于对虾感染。实验健康对虾分为过滤组、未过滤组和对照组 3 个组, 每个组设 3 个平行组, 每个平行组 30 尾对虾。过滤组和未过滤组分别用 0.5 mL 过滤液和未过滤液稀释液注射感染健康对虾, 对照组注射等量无菌 PBS 缓冲液, 观察 7 d。感染 7 d 后, 每个平行组随机选取 5 尾对虾进行病毒检测。

### 1.5 肝胰腺坏死症凡纳滨对虾细菌分离和鉴定

从 HPNS 病虾肝胰腺、血淋巴和肠道分离的细菌在 LB, TSA, TCBS 和 BHI 不同培养基上 28 ℃ 培养 24 h, 挑取优势单一菌落在培养基中再次划线纯化和培养, 直至获得纯化的单一菌落。采用传统

微生物学鉴定方法<sup>[21]</sup>进行细菌鉴定。细菌 16S rDNA 基因扩增<sup>[22]</sup>采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (Tiangen, Beijing) 提取细菌基因组 DNA。16S rDNA 扩增反应的引物为通用引物, 正向引物序列: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 反向引物序列: 5'-GGTACCTTGTACGA CTT-3', 由上海英骏生物科技有限公司合成。PCR 反应条件为: 94 ℃ 预变性 3 min, 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 30 个循环后于 72 ℃ 延伸 5 min。PCR 扩增产物经  $w=1\%$  琼脂糖凝胶电泳检测后送上海英骏公司测序, 测序结果用 BLAST 软件进行同源性比对, Clustal X 软件进行多序列比对, MEGA 4.0 软件进行系统进化树的构建, 以进行细菌种类鉴定和分析。

#### 1.6 副溶血弧菌和苏云金芽孢杆菌人工感染凡纳滨对虾

选取来源于 HPNS 对虾肝胰腺的副溶血弧菌 (VP) 和来源于 HPNS 对虾肠道的苏云金芽孢杆菌 (BT), 分别采取肌肉注射感染及浸泡感染方式进行凡纳滨对虾肝胰腺坏死症细菌人工感染。

注射感染对虾分为 4 个组, 每个组设 3 个平行

组, 每个平行组 30 尾对虾, 分别注射细菌浓度为  $10^6$  CFU  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 的 VP、BT 和 VP + BT 菌液 50  $\mu$ L/尾, 对照组对虾注射等量无菌 PBS, 注射剂量均为 50  $\mu$ L/尾。浸泡感染也分为 4 个组, 每个组设 3 个平行组, 每个平行组 30 尾对虾, 感染对虾分别用细菌终浓度为  $10^5$  CFU  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 的 VP、BT 和 VP + BT 菌液浸泡, 对照组用天然海水浸泡。不同方式感染对虾观察 14 d, 记录对虾感染症状和死亡情况, 从感染对虾中分离和鉴定细菌, 同时取感染对虾组织用 AFA 组织固定液固定, 用常规组织学方法进行组织病理学检测<sup>[19]</sup>。

## 2 结 果

### 2.1 肝胰腺坏死症凡纳滨对虾症状和组织病理观察

患 HPNS 对虾的主要症状是活力减弱, 摄食减弱或不摄食, 肝胰腺边缘不清晰呈弥散状, 最后肝胰腺萎缩坏死 (图 1-a, 图 1-a')。与健康凡纳滨对虾 (图 1-b, 图 1-b', 图 1-c) 比较, 患病对虾肝胰腺肝小管 B, F, R 细胞坏死或脱落, 肝小管间结缔组织松散或坏死, 严重者肝小管崩解 (图 1-d)。

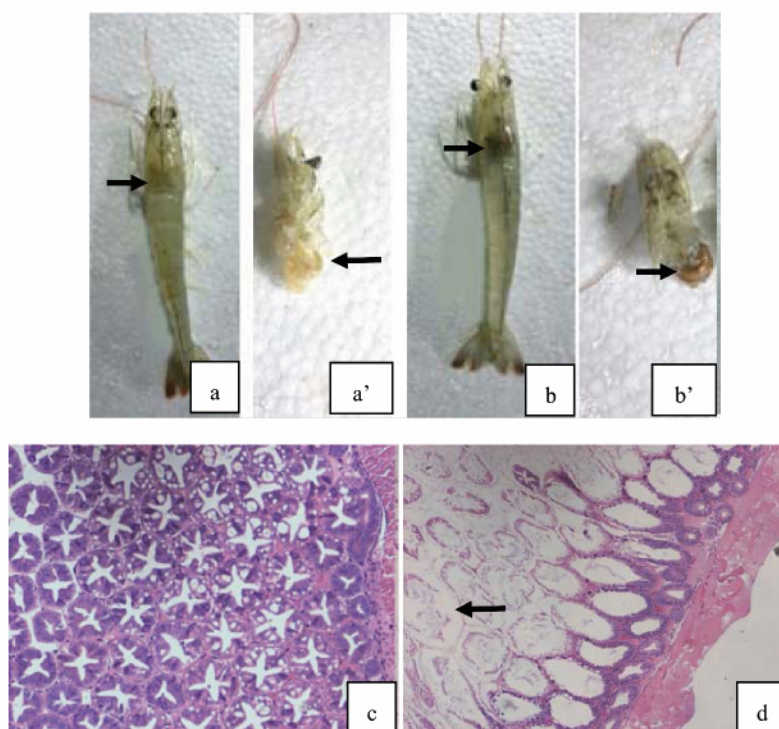


图 1 HPNS 对虾症状和组织病理观察

Fig. 1 Symptoms and histopathology observation of shrimp with the symptoms of HPNS

a: 具 HPNS 症状的病虾, 箭头指示病虾的肝胰腺; a': 具 HPNS 症状病虾的肝胰腺, 箭头指示病虾的肝胰腺; b: 健康对虾症状, 箭头指示健康对虾的肝胰腺; b': 健康对虾的肝胰腺, 箭头指示健康对虾的肝胰腺; c: 健康对虾肝胰腺组织病理观察; d: 病虾肝胰腺组织病理观察, 箭头指示肝小管间结缔组织受到破坏

## 2.2 肝胰腺坏死症凡纳滨对虾病毒检测和人工感染

采用 PCR 方法针对 305 尾具有 HPNS 症状的患病对虾进行对虾病毒检测携带情况。检测结果显示, 可检测到 WSSV、IHHNV 2 种病毒, BPV、MBV、HPV、YHV、TSV、IMNV、MOV、XSV、LSNV 等其余 9 种病毒在所有样品中均未检测出。其中 WSSV 一扩中未检出, 仅在二扩中检出, 二扩检出率为 66.7%, IHHNV 仅检出 2 例。

选取具典型 HPNS 症状的病虾头胸部组织制备组织匀浆液, 分别用不经微孔滤膜过滤的组织匀浆液和经微孔滤膜过滤的组织匀浆液注射感染健康对虾, 感染后 7 d 统计结果, 未过滤组对虾死亡率达到 100%, 表现典型肝胰腺坏死症状, 过滤组对虾在实验期内没有死亡。对照组对虾在实验期内也没有死亡。感染结果表明病毒不是 HPNS 的主要病因。

## 2.3 肝胰腺坏死症凡纳滨对虾细菌分离鉴定

从 63 尾具 HPNS 症状的对虾不同组织中分离鉴定 49 种细菌, 分别属于 10 个属。所有这些细菌中, 肝胰腺分离鉴定 34 种细菌, 肠道 31 种, 血淋巴 39 种 (表 2)。

其中弧菌属 *Vibrio* 10 种, 包括副溶血弧菌 *V. parahaemolyticus*、哈维氏弧菌 *V. harveyi*、溶藻弧菌 *V. alginolyticus*、霍乱弧菌 *V. cholera*、河流弧菌 *V. fluvialis*、创伤弧菌 *V. vulnificus*、弗尼斯弧菌 *V. furnissii*、远青弧菌 *V. azureus*、需钠弧菌 *V. natriegens*、拟态弧菌 *V. mimicus*; 芽孢杆菌属 *Bacillus* 11 种, 包括蜡样芽孢杆菌 *B. cereus*、解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens*、地衣芽孢杆菌 *B. licheniformis*、苏云金芽孢杆菌 *B. thuringiensis*、枯草芽孢杆菌 *B. subtilis*、高地芽孢杆菌 *B. altitudinis*、死谷芽孢杆菌 *B. vallismortis*、巨大芽孢杆菌 *B. megaterium*、弯曲芽孢杆菌 *B. flexus*、韩国芽孢杆菌 *B. koreensis*、南海恩施芽孢杆菌 *B. ensch*; 气单胞菌属 *Aeromonas* 7 种, 包括豚鼠气单胞菌 *A. caviae*、嗜水气单胞菌 *A. hydrophila*、维罗纳气单胞菌 *A. veronii*、温和气单胞菌 *A. sobria*、斑点气单胞菌 *A. punctata*、舒氏气单胞菌 *A. schubertii*、肠棕气单胞菌 *A. enteropelogenes*; 微小杆菌属 *Exiguobacterium* 5 种, 包括印度微小杆菌 *E. indicum*、金橙黄微小杆菌 *E. aurantiacum*、乙酰微小杆菌 *E. acetylicum*、深海微小杆菌 *E. profundum*、海洋微球菌 *E. marinum*; 葡萄球菌属 *Staphylococcus* 6 种, 包括沃氏葡萄球菌 *S. warneri*、木糖葡萄球菌 *S. xylosus*、巴氏

葡萄球菌 *S. pasteurii*、路邓葡萄球菌 *S. lugdunensis*、松鼠葡萄球菌 *S. sciuri*、腐生葡萄球菌 *S. saprophyticus*; 不动杆菌属 *Acinetobacter* 3 种, 包括约氏不动杆菌 *A. johnsonii*、泛耐药鲍曼不动杆菌 *A. baumannii*、溶血不动杆菌 *A. haemolyticus*; 希瓦氏菌属 *Shewanella* 3 种, 包括脱色希瓦氏菌 *S. decolorationis*、海藻希瓦氏菌 *S. algae*、鲍希瓦氏菌 *S. halotis*; 发光杆菌属 *Photobacterium* 2 种, 包括美人鱼发光杆菌 *P. damsela* 和鳃发光杆菌 *P. leiognathi*; 肠杆菌属 *Enterobacter* 1 种, 阿氏肠杆菌 *Enterobacter asburiae*; 假单胞菌属 *Pseudomonas* 1 种, 包括弯曲假单胞菌 *P. geniculata*。

在 63 尾患病对虾中, 38 尾对虾中鉴定有副溶血弧菌 *V. parahaemolyticus*, 其余 25 尾没有分离到, 占鉴定对虾总数的 60.3%; 有蜡样芽孢杆菌 *B. cereus* 的对虾 34 尾, 其余 29 尾没有分离到, 占鉴定对虾总数的 54.0%; 有苏云金芽孢杆菌 *B. thuringiensis* 的对虾 20 尾, 其余 43 尾没有分离到, 占鉴定对虾总数的 31.8%; 有霍乱弧菌 *V. cholera* 的对虾 19 尾, 其余 44 尾没有分离到, 占鉴定对虾总数的 30.2%; 有金橙黄微小杆菌 *E. aurantiacum* 的对虾 14 尾, 占鉴定对虾总数的 22.2%; 有嗜水气单胞菌 *A. hydrophila* 的对虾 11 尾, 占鉴定对虾总数的 17.5%; 解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* 的对虾为 7 尾, 分别占鉴定对虾总数的 11.1%; 其他种细菌分别从一些 HPNS 单尾虾中分离鉴定 (表 2)。不同种类细菌可以从不同的单尾 HPNS 病虾中分离, 单尾 HPNS 病虾中最多鉴定细菌 9 种, 最少鉴定细菌 3 种。以上结果表明多种细菌可能与对虾 HPNS 爆发有关。

## 2.4 肝胰腺坏死症凡纳滨对虾细菌人工感染

用副溶血弧菌 VP、苏云金芽孢杆菌 BT、VP + BT 混合菌分别注射感染健康对虾, 在感染后 6 d 全部死亡, 死亡率 100%, 表现典型肝胰腺坏死症状。对照组死亡率为 12%, 没有肝胰腺坏死症状 (图 2)。用副溶血弧菌 VP、苏云金芽孢杆菌 BT、VP + BT 混合菌分别浸泡感染健康对虾, 感染组对虾缓慢死亡, 在感染后 14 d 统计结果, VP + BT 混合菌感染组对虾死亡率较高, 达到 75%, VP 感染组对虾死亡率达到 66%, BT 感染组对虾死亡率为 62%, 感染组死亡对虾表现典型肝胰腺坏死症状。对照组死亡率为 16%, 没有肝胰腺坏死症状 (图 3)。

表 2 63 尾 HPNS 对虾肝胰腺、肠道和血淋巴中分离鉴定的细菌

Table 2 Identified bacteria species from 63 shrimp with HPNS

对虾编号	肝胰腺	肠道	血淋巴
001	苏云金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i> , 解淀粉芽孢杆菌 <i>B. amyloliquefaciens</i> , 霍乱弧菌 <i>V. cholera</i> , 巴氏葡萄球菌 <i>S. pasteurii</i>	美人鱼发光杆菌 <i>P. damsela</i> , 解淀粉芽孢杆菌 <i>B. amyloliquefaciens</i>	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>
002	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> , 副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>
003	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> .	印度微小杆菌 <i>E. indicum</i> , 阿氏肠杆菌 <i>E. asburiae</i>
004	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	泛耐药鲍曼不动杆菌 <i>A. baumannii</i>
005	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	解淀粉芽孢杆菌 <i>B. amyloliquefaciens</i> , 苏云金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i>
006	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> , 解淀粉芽孢杆菌 <i>B. amyloliquefaciens</i>	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> , 苏云金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i>	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>
007	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> , 鳕发光杆菌 <i>P. leiognathi</i>	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>
008	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> , 枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i> , 弯曲芽孢杆菌 <i>B. flexus</i>	弯曲芽孢杆菌 <i>B. flexus</i> , 沃氏葡萄球菌 <i>S. warneri</i>
009	远青弧菌 <i>V. azureus</i> , 副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> , 弯曲芽孢杆菌 <i>B. flexus</i>	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> , 美人鱼发光杆菌 <i>P. damsela</i>	远青弧菌 <i>V. azureus</i> , 弯曲芽孢杆菌 <i>B. flexus</i>
010	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> , 蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> , 金橙黄微小杆菌 <i>E. aurantiacum</i> , 弗尼斯弧菌 <i>V. furnissii</i>	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> , 死谷芽孢杆菌 <i>B. vallismortis</i>
011	死谷芽孢杆菌 <i>B. vallismortis</i> , 蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> , 副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> , 金橙黄微小杆菌 <i>E. aurantiacum</i>
012	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> , 远青弧菌 <i>V. azureus</i> , 金橙黄微小杆菌 <i>E. aurantiacum</i>	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> , 霍乱弧菌 <i>V. cholera</i>
013	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> , 鳕发光杆菌 <i>P. leiognathi</i>	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> , 斑点气单胞菌 <i>A. punctata</i>
014	约氏不动杆菌 <i>A. johnsonii</i> , 巴氏葡萄球菌 <i>S. pasteurii</i>	沃氏葡萄球菌 <i>S. warneri</i> , 鳕发光杆菌 <i>P. leiognathi</i> , 需钠弧菌 <i>V. natriegens</i>	海藻希瓦氏菌 <i>S. algae</i> , 约氏不动杆菌 <i>A. johnsonii</i> , 霍乱弧菌 <i>V. cholera</i>
015	苏云金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i> , 深海微小杆菌 <i>E. profundum</i> , 副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	需钠弧菌 <i>V. natriegens</i> , 沃氏葡萄球菌 <i>S. warneri</i> , 约氏不动杆菌 <i>A. johnsonii</i>	巴氏葡萄球菌 <i>S. pasteurii</i> , 深海微小杆菌 <i>E. profundum</i> , 苏云金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i>
016	苏云金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i> , 霍乱弧菌 <i>V. cholera</i> , 斑点气单胞菌 <i>A. punctata</i>	斑点气单胞菌 <i>A. punctata</i> , 蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	苏云金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i> , 豚鼠气单胞菌 <i>A. caviae</i>
017	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> , 副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	远青弧菌 <i>V. azureus</i> , 副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>
018	斑点气单胞菌 <i>A. punctata</i> , 乙酰微小杆菌 <i>E. acetylum</i>	肠棕气单胞菌 <i>A. enteropelogenes</i> , 霍乱弧菌 <i>V. cholera</i> , 斑点气单胞菌 <i>A. punctata</i>	斑点气单胞菌 <i>A. punctata</i> , 木糖葡萄球菌 <i>S. xylosus</i>

续表 2

对虾编号	肝胰腺	肠道	血淋巴
019	苏云金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i> , 霍乱弧菌 <i>V. cholera</i>	金橙黄微小杆菌 <i>E. aurantiacum</i> , 海洋微球菌 <i>E. marinum</i> , 副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	斑点气单胞菌 <i>A. punctata</i> , 木糖葡萄球菌 <i>S. xylosus</i>
020	霍乱弧菌 <i>V. cholera</i> , 海洋微球菌 <i>E. marinum</i> , 苏云金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i>	木糖葡萄球菌 <i>S. xylosus</i> , 金橙黄微小杆菌 <i>E. aurantiacum</i> , 肠棕气单胞菌 <i>A. enteropelogenes</i>	苏云金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i>
021	木糖葡萄球菌 <i>S. xylosus</i> , 海洋微球菌 <i>E. marinum</i>	木糖葡萄球菌 <i>S. xylosus</i> , 金橙黄微小杆菌 <i>E. aurantiacum</i>	苏云金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i>
022	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> , 需钠弧菌 <i>V. natriegens</i> , 副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	苏云金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i> , 霍乱弧菌 <i>V. cholera</i> , 副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	远青弧菌 <i>V. azureus</i> , 蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>
023	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> , 霍乱弧菌 <i>V. cholera</i> , 金橙黄微小杆菌 <i>E. aurantiacum</i>	霍乱弧菌 <i>V. cholera</i> , 副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	金橙黄微小杆菌 <i>E. aurantiacum</i> , 蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> , 肠棕气单胞菌 <i>A. enteropelogenes</i>
024	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> , 霍乱弧菌 <i>V. cholera</i>	霍乱弧菌 <i>V. cholera</i> , 副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> , 苏云金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i>
025	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i> , 舒氏气单胞菌 <i>A. schubertii</i>	肠棕气单胞菌 <i>A. enteropelogenes</i> , 副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	金橙黄微小杆菌 <i>E. aurantiacum</i> , 苏云金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i> , 蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>
026	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> , 乙酰微小杆菌 <i>E. acetylicum</i>	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> , 副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> , 乙酰微小杆菌 <i>E. acetylicum</i>	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> , 副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> , 弗尼斯弧菌 <i>V. furnissii</i>
027	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> , 远青弧菌 <i>V. azureus</i>	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	创伤弧菌 <i>V. vulnificus</i> , 副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>
028	深海微小杆菌 <i>E. profundum</i> , 副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	深海微小杆菌 <i>E. profundum</i> , 副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	木糖葡萄球菌 <i>S. xylosus</i> , 副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> , 嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>
029	豚鼠气单胞菌 <i>A. caviae</i> , 蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> , 副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	需钠弧菌 <i>V. natriegens</i> , 豚鼠气单胞菌 <i>A. caviae</i>
030	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> , 路邓葡萄球菌 <i>S. lugdunensis</i>	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i> , 肠棕气单胞菌 <i>A. enteropelogenes</i> , 需钠弧菌 <i>V. natriegens</i>	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i> , 需钠弧菌 <i>V. natriegens</i>
031	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i> , 乙酰微小杆菌 <i>E. acetylicum</i>	鳃发光杆菌 <i>P. leiognathi</i> , 溶血不动杆菌 <i>A. heamolyticus</i> , 需钠弧菌 <i>V. natriegens</i>	需钠弧菌 <i>V. natriegens</i> , 霍乱弧菌 <i>V. cholera</i> , 脱色希瓦氏菌 <i>S. decolorationis</i>
032	溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i> , 溶血不动杆菌 <i>A. heamolyticus</i> , 拟态弧菌 <i>V. mimicus</i>	巴氏葡萄球菌 <i>S. pasteurii</i> , 苏云金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i> , 溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	约氏不动杆菌 <i>A. johnsonii</i> , 鳃发光杆菌 <i>P. leiognathi</i> , 蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>
033	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i> , 乙酰微小杆菌 <i>E. acetylicum</i> , 约氏不动杆菌 <i>A. johnsonii</i>	肠棕气单胞菌 <i>A. enteropelogenes</i>	苏云金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i> , 乙酰微小杆菌 <i>E. acetylicum</i> , 蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>

续表 2

对虾编号	肝胰腺	肠道	血淋巴
034	需钠弧菌 <i>V. natriegens</i> , 深海微小杆菌 <i>E. profundum</i>	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> , 苏云金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i>	沃氏葡萄球菌 <i>S. warneri</i> , 霍乱弧菌 <i>V. cholera</i>
035	高地芽孢杆菌 <i>B. altitudinis</i> , 蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> , 深海微小杆菌 <i>E. profundum</i>	深海微小杆菌 <i>E. profundum</i> , 苏云金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i>
036	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> , 蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> , 金橙黄微小杆菌 <i>E. aurantiacum</i>	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> , 蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> , 鳕发光杆菌 <i>P. leiognathi</i>	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>
037	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	沃氏葡萄球菌 <i>S. warneri</i> , 副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	金橙黄微小杆菌 <i>E. aurantiacum</i> , 沃氏葡萄球菌 <i>S. warneri</i>
038	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> , 鳕发光杆菌 <i>P. leiognathi</i>	苏云金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i> , 海洋微球菌 <i>E. marinum</i>	海洋微球菌 <i>E. marinum</i> , 金橙黄微小杆菌 <i>E. aurantiacum</i> , 深海微小杆菌 <i>E. profundum</i>
039	需钠弧菌 <i>V. natriegens</i> , 肠棕气单胞菌 <i>A. enteropelogenes</i>	鳕发光杆菌 <i>P. leiognathi</i> , 苏云金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i>	木糖葡萄球菌 <i>S. xylosus</i> , 海洋微球菌 <i>E. marinum</i> , 蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>
040	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> , 木糖葡萄球菌 <i>S. xylosus</i> , 副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> , 苏云金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i>	乙酰微小杆菌 <i>E. acetylicum</i>
041	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> , 约氏不动杆菌 <i>A. johnsonii</i> , 海洋微球菌 <i>E. marinum</i>	约氏不动杆菌 <i>A. johnsonii</i> , 脱色希瓦氏菌 <i>S. decolorationis</i>
042	远青弧菌 <i>V. azureus</i> , 副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	远青弧菌 <i>V. azureus</i> , 霍乱弧菌 <i>V. cholera</i>	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> , 河流弧菌 <i>V. fluvialis</i> , 斑点气单胞菌 <i>A. punctata</i>
043	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> , 乙酰微小杆菌 <i>E. acetylicum</i>	霍乱弧菌 <i>V. cholera</i> , 蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	远青弧菌 <i>V. azureus</i> , 霍乱弧菌 <i>V. cholera</i> , 副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>
044	斑点气单胞菌 <i>A. punctata</i> , 蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	斑点气单胞菌 <i>A. punctata</i> , 副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> , 斑点气单胞菌 <i>A. punctata</i> , 维罗纳气单胞菌 <i>A. veronii</i>
045	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> , 副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> , 斑点气单胞菌 <i>A. punctata</i>	苏云金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i> , 鲍希瓦氏菌 <i>S. haliotis</i> , 斑点气单胞菌 <i>A. punctata</i>
046	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> , 枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i> , 蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> , 蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	鲍希瓦氏菌 <i>S. haliotis</i> , 腐生葡萄球菌 <i>S. saprophyticus</i> , 斑点气单胞菌 <i>A. punctata</i>
047	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> , 枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> , 蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> , 嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	斑点气单胞菌 <i>A. punctata</i> , 维罗纳气单胞菌 <i>A. veronii</i>



续表 2

对虾编号	肝胰腺	肠道	血淋巴
048	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> , 蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	松鼠葡萄球菌 <i>S. sciuri</i> , 蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>
049	松鼠葡萄球菌 <i>S. sciuri</i> , 金橙黄微小杆菌 <i>E. aurantiacum</i>	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i> , 金橙黄微小杆菌 <i>E. aurantiacum</i>	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> , 腐生葡萄球菌 <i>S. saprophyticus</i>
050	松鼠葡萄球菌 <i>S. sciuri</i>	维罗纳气单胞菌 <i>A. veronii</i> , 金橙黄微小杆菌 <i>E. aurantiacum</i>	韩国芽孢杆菌 <i>B. koreensis</i> , 松鼠葡萄球菌 <i>S. sciuri</i>
051	斑点气单胞菌 <i>A. punctata</i> , 松鼠葡萄球菌 <i>S. sciuri</i>	松鼠葡萄球菌 <i>S. sciuri</i> , 苏云金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i>	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> , 金橙黄微小杆菌 <i>E. aurantiacum</i>
052	斑点气单胞菌 <i>A. punctata</i>	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> , 松鼠葡萄球菌 <i>S. sciuri</i>	维罗纳气单胞菌 <i>A. veronii</i> , 斑点气单胞菌 <i>A. punctata</i>
053	松鼠葡萄球菌 <i>S. sciuri</i>	斑点气单胞菌 <i>A. punctata</i>	巨大芽孢杆菌 <i>B. megaterium</i>
054	巨大芽孢杆菌 <i>B. megaterium</i>	肠棕气单胞菌 <i>A. enteropelogenes</i>	斑点气单胞菌 <i>A. punctata</i>
055	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i> , 霍乱弧菌 <i>V. cholera</i>	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>
056	巨大芽孢杆菌 <i>B. megaterium</i> , 蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	巨大芽孢杆菌 <i>B. megaterium</i> , 弯曲假单胞菌 <i>P. geniculate</i>	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> , 嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>
057	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> , 蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	地衣芽孢杆菌 <i>B. licheniformis</i> , 溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> , 副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>
058	温和气单胞菌 <i>A. sobria</i> , 嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	维罗纳气单胞菌 <i>A. veronii</i> , 温和气单胞菌 <i>A. sobria</i>	解淀粉芽孢杆菌 <i>B. amyloliquefaciens</i> , 嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>
059	解淀粉芽孢杆菌 <i>B. amyloliquefaciens</i> , 维罗纳气单胞菌 <i>A. veronii</i>	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i> , 解淀粉芽孢杆菌 <i>B. amyloliquefaciens</i>	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i> , 南海恩施芽孢杆菌 <i>B. ensch</i>
060	河流弧菌 <i>V. fluvialis</i> , 霍乱弧菌 <i>V. cholera</i>	温和气单胞菌 <i>A. sobria</i> , 嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i> , 斑点气单胞菌 <i>A. punctata</i>	温和气单胞菌 <i>A. sobria</i> , 嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>
061	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i> , 霍乱弧菌 <i>V. cholera</i>	霍乱弧菌 <i>V. cholera</i> , 温和气单胞菌 <i>A. sobria</i>	霍乱弧菌 <i>V. cholera</i> , 嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>
062	温和气单胞菌 <i>A. sobria</i> , 维罗纳气单胞菌 <i>A. veronii</i>	肠棕气单胞菌 <i>A. enteropelogenes</i> , 解淀粉芽孢杆菌 <i>B. amyloliquefaciens</i> , 死谷芽孢杆菌 <i>B. vallismortis</i>	肠棕气单胞菌 <i>A. enteropelogenes</i> , 霍乱弧菌 <i>V. cholera</i> , 解淀粉芽孢杆菌 <i>B. amyloliquefaciens</i>
063	拟态弧菌 <i>V. mimicus</i> , 霍乱弧菌 <i>V. cholera</i> , 哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	霍乱弧菌 <i>V. cholera</i>	拟态弧菌 <i>V. mimicus</i> , 解淀粉芽孢杆菌 <i>B. amyloliquefaciens</i>

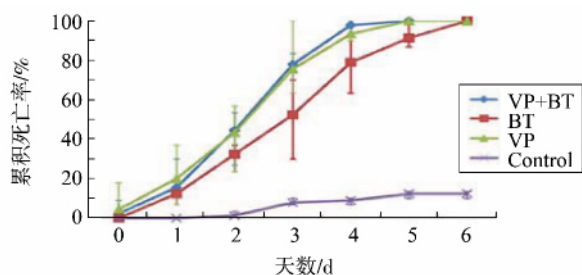


图 2 副溶血弧菌 VP、苏云金芽孢杆菌 BT、VP + BT 混合菌注射感染对虾的情况

Fig. 2 Mortality of the shrimp injected by *V. parahaemolyticus* (VP), *B. thuringiensis* (BT) and VP + BT both bacteria

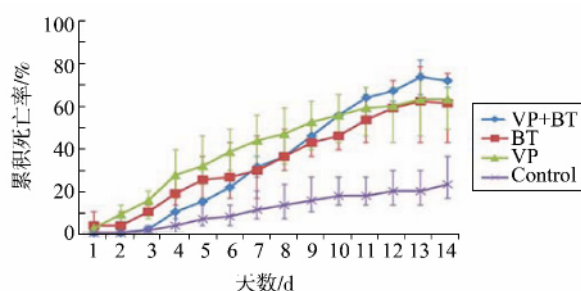


图 3 副溶血弧菌 VP、苏云金芽孢杆菌 BT、VP + BT 混合菌浸泡感染对虾的情况

Fig. 3 Mortality of the shrimp immersed by *V. parahaemolyticus* (VP), *B. thuringiensis* (BT) and VP + BT both bacteria

取不同感染方式感染对虾进行病毒 PCR 检测，未检测到病毒。感染对虾重新进行细菌分离和鉴定，V1 感染组对虾中分离鉴定出副溶血弧菌，Z7 感染组对虾中分离鉴定出苏云金芽孢杆菌，V1 + Z7 混合感染组分离鉴定的细菌有副溶血弧菌和苏

云金芽孢杆菌，两种细菌都可以分别从人工感染对虾中对应重新分离。这些结果表明副溶血弧菌和苏云金芽孢杆菌都可以感染健康对虾产生 HPNS 症状。

分别用副溶血弧菌 VP、苏云金芽孢杆菌 BT 以及两者的混合菌液 VP + BT 注射感染和浸泡感染健康对虾，病虾均能产生与对虾自然发病的 HPNS 症状：摄食减少或不摄食，肝胰腺萎缩，B、F、R 细胞坏死（图 4）。

### 3 讨 论

有报道采用 PCR 方法证明 WSSV、YHV、IMNV 和 TSV 等对虾病毒不是 EMS 的病因<sup>[8]</sup>。在本研究中我们运用 PCR 方法检测 HPNS 病虾 11 种对虾病毒，只有 WSSV 和 IHNV 2 种病毒可检测出，但病毒人工感染对虾并没有产生 HPNS。因此对虾 HPNS 不是由单一病毒引起的。

为了确定 HPNS 产生是否与细菌有关，我们采集 63 尾 HPNS 病虾进行细菌分离鉴定，细菌可以从每一尾对虾的肝胰腺、血淋巴和肠道分离，经鉴定，这些细菌属于 10 个属，没有单一的一种细菌可以从所有 63 尾 HPNS 病虾中分离。比如，副溶血弧菌只从其中的 38 尾对虾中分离到，蜡样芽孢杆菌从其中 34 尾对虾中分离到，苏云金芽孢杆菌从其中 20 尾对虾分离到，霍乱弧菌从其中 19 尾对虾分离到。我们选择副溶血弧菌和苏云金芽孢杆菌人工感染健康对虾，所有发病对虾均表现 HPNS 症状。结果表明 HPNS 产生与多种细菌种类有关。

为什么 HPNS 产生会与多种细菌有关呢？我们认为这要归结于水体理化因子和有毒藻类的胁迫。HPNS 爆发与水体理化因子（如氨氮，亚硝酸盐等）密切相关。在氨和亚硝酸盐浓度较高的养殖

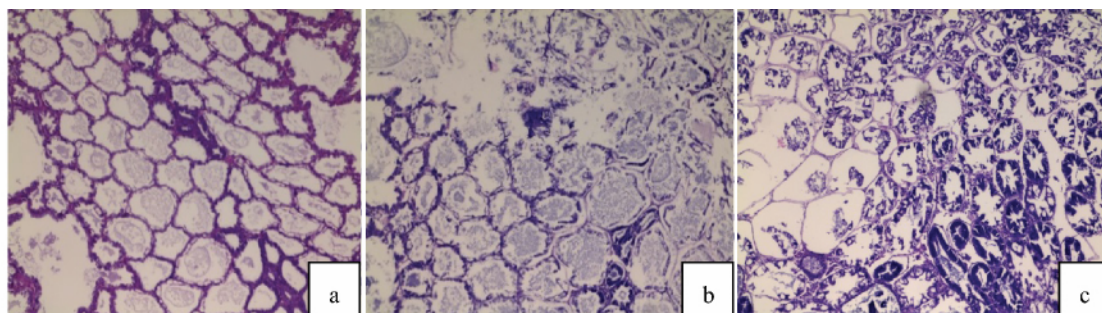


图 4 副溶血弧菌 VP 和苏云金芽孢杆菌 BT 感染对虾组织病理观察

Fig. 4 Histopathology observations of infected shrimp by *V. parahaemolyticus* (VP), *B. thuringiensis* (BT) and VP + BT both bacteria

a: 苏云金芽孢杆菌 BT 浸泡感染对虾的肝胰腺组织切片观察；b: 副溶血弧菌和苏云金芽孢杆菌混合菌浸泡感染对虾的肝胰腺组织切片观察；c: 副溶血弧菌和苏云金芽孢杆菌混合菌注射感染对虾的肝胰腺组织切片观察

池塘越容易爆发 HPNS 感染。如果爆发 HPNS 疾病, 减料停料可以有效降低养殖水体氨氮浓度并有效控制疾病的产展 (未发表数据)。如果养殖池塘有毒藻类爆发, HPNS 也会产生 (未发表数据)。在对虾养殖中, 减料和/或减少养殖密度将降低 HPNS 爆发的风险, 而且对虾和不同鱼类 (罗非鱼、草鱼、胡子鲶等) 混养可以有效改善养殖环境并且降低 HPNS 爆发的风险 (未发表数据)。因此, 我们认为对虾养殖生态系统平衡被打破是 HPNS 爆发的根本原因, 养殖生态系统紊乱, 导致条件致病菌大量产生和氨氮胁迫, 对虾处于亚健康状态, 多种细菌包括在非胁迫条件下不能感染对虾的细菌也可以感染对虾。环境胁迫及导致条件致病菌繁生的生态系统是对虾发生 HPNS 的根本原因。

#### 参考文献:

- [1] LIGHTNER D V, REDMAN R M, PANTOJA C R, et al. Early mortality syndrome affects shrimp in Asia [J]. *Global Aquaculture Advocate*, 2012, January/February: 40.
- [2] GAA. Cause of EMS shrimp disease identified [J]. *Global Aquaculture Advocate*, 2013, July/August: 8.
- [3] FAO. Report of the FAO/MARD technical workshop on early mortality syndrome (EMS) or acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPND) of cultured shrimp (under TCP/VIE/3304) [R]. FAO Fisheries and Aquaculture Report No. 1053. Rome. Hanoi, Viet Nam, 2013: 54.
- [4] LIGHTNER D V, REDMAN R M, PANTOJA C R, et al. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2012, 110: 174 – 183.
- [5] MOONEY A. An emerging shrimp disease in Vietnam, microsporidiosis or liver disease? [EB/OL]. [2012 – 02 – 24]. <http://aquatichealth.net/issues/38607>.
- [6] NACA – FAO. Quarterly aquatic animal disease report (Asia and Pacific Region) [R]. NACA, Bangkok, Thailand, 2011.
- [7] ANUPARP P A, THITAMADEE S, SRIURAIRATANA S, et al. Shotgun sequencing of bacteria from AHPNS, a new shrimp disease threat for Thailand [Z]. Poster, National Institute for Aquaculture Biotechnology, Mahidol University. Bangkok, Thailand, 2012.
- [8] FLEGEL T W. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2012, 110: 166 – 173.
- [9] LEAÑO E M, MOHAN C V. Early mortality syndrome threatens Asia's shrimp farms [J]. *Global Aquaculture Advocate*, 2012, July/Aug: 38 – 39.
- [10] ANDERSON J, VALDERRAMA D. Production: Global shrimp review – disease drops production, but recovery anticipated [J]. *Global Aquaculture Advocate*, 2013, November/December: 12 – 13.
- [11] BONDAD – REANTASO M G, SUBASINGHE R P, JO-SUPEIT H, et al. The role of crustacean fisheries and aquaculture in global food security: past, present and future [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2012, 110: 158 – 165.
- [12] NEWMAN S G. Impacts of acute hepatopancreatic necrosis syndrome – short – term market dynamics affect long – term practices [J]. *Global Aquaculture Advocate*, 2013, May/June: 16 – 17.
- [13] STENTIFORD G D, NEIL D M, PEELER E J, et al. Disease will limit future food supply from the global crustacean fishery and aquaculture sectors [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2012, 110: 141 – 157.
- [14] EDUARDO M L, MOHAN C V. Early mortality syndrome threatens asia's shrimp farms [J]. *Global Aquaculture Advocate*, 2012, July/August: 38 – 39.
- [15] TRAN L, NUNAN L, REDMAN R M, et al. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2013a, 105: 45 – 55.
- [16] TRAN L, NUNAN L, REDMAN R M, et al. EMS/AHPNS: infectious disease caused by bacteria [J]. *Global Aquaculture Advocate*, 2013b, July/August: 18 – 20.
- [17] HAN J E, TANG K F, 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. doi: 10.3354/dao02830.
- [18] BELL T A, LIGHTNER D V. A handbook of normal shrimp histology [R]. Special Publication No. 1. World Aquaculture Society. Baton Rouge, LA, 1988.
- [19] LIGHTNER D V. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp [R]. World Aquaculture Society. Baton Rouge, LA, 1996.
- [20] KÖCHL S, NIEDERSTÄTTER H, PARSON W. DNA extraction and quantitation of forensic samples using the phenol – chloroform method and real – time PCR [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2005, 297: 13 – 30.
- [21] HOLT J G. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* [M]. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984.
- [22] HORZ H P, VIANNA M E, GOMES B P F A, et al. Evaluation of universal probes and primer sets for assessing total bacterial load in clinical samples: general implications and practical use in endodontic antimicrobial therapy [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43: 5332 – 5337.