

# 夏季保苗期刺参(*Apostichopus japonicus*) 腐皮综合征病原菌的分离鉴定及其致病阈值\*

张文泽<sup>1,2</sup> 王印庚<sup>2①</sup> 廖梅杰<sup>2</sup> 荣小军<sup>2</sup> 李彬<sup>2</sup>  
张正<sup>2</sup> 李华<sup>1</sup> 范瑞用<sup>3</sup>

(1. 大连海洋大学 大连 116023; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院  
黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 青岛瑞滋海珍品发展有限公司 青岛 266400)

**摘要** 2013年夏季山东地区某刺参育苗场处于保苗期的刺参苗种暴发腐皮综合征疾病,表现为附着力下降、棘刺顶端溃烂、排脏、表皮溃疡和自溶等症状。自患病个体病灶组织分离优势细菌,并利用形态学观察、生理生化测定、回接感染、16S rDNA基因序列分析等方法完成致病原的鉴定。此外,通过对发病前后养殖系统中优势菌丰度的变化,追踪确定了所分离病原菌的致病阈值。结果显示,从患病参苗体表病灶处分离的一株优势菌HP130917A-1,经回接感染证实,该菌株具有较强的致病力,其对刺参苗种的半致死浓度为 $1.2 \times 10^6$  CFU/ml。生理生化结合分子鉴定表明,该菌株为溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)。此外,完成了患病池保苗期间池水和附着基表面微生物菌群结构动态分析,共分离得到了6种主要优势菌,分别为溶藻弧菌、需钠弧菌(*Vibrio natriegens*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)和马胃葡萄球菌(*Staphylococcus equorum*)。溶藻弧菌一直是养殖系统中优势度最高的种类,且随着附着基在保苗池中时间的延长,其在附着基表面沉积物中的浓度越来越高。到第50天时,浓度达到 $8.97 \times 10^6$  CFU/cm<sup>2</sup>。而此时系统中参苗开始暴发腐皮综合征疾病,可将此浓度视为该病原的致病阈值。因此,在夏季保苗过程中应加强养殖系统中弧菌总数的监测,制定适宜的附着基更换频率,建立和优化刺参保苗工艺,以期对刺参苗期疾病防控和优化健康养殖管理提供理论依据和参考。

**关键词** 刺参; 保苗期; 腐皮综合征; 病原菌; 溶藻弧菌; 致病阈值

**中图分类号** S965 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)06-079-09

近年来,我国刺参(*Apostichopus japonicus*)养殖业迅猛发展,养殖面积迅速扩大,年产量(鲜重)超过20万t,产值逾300亿元,成为我国海水养殖单产最高的物种。然而,随着集约化养殖的发展,刺参病害问题也日趋严重,病害问题成为产业可持续发展的瓶颈。其中,腐皮综合征发生率高、致病力强,在苗期

和养成期均暴发,造成重大经济损失并成为刺参养殖业可持续发展的重要限制性因素(王印庚等,2014)。对腐皮综合征病原的研究表明,其病原主要以细菌为主,继发感染霉菌、寄生虫等(王印庚等,2004;王印庚等,2005)。目前,已报道的病原菌有灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)、假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp.)、恶

\* 国家十二五“863”项目(2012AA10A412-4)、海洋经济创新发展区域示范重点项目—山东省海水养殖重要疾病高效专用药物研发及产业化、山东省自主创新成果转化专项(2013ZHZX2A0801)和国家自然科学基金项目(31202016)共同资助。  
张文泽, E-mail: zwz19870609@163.com

① 通讯作者: 王印庚, 研究员, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-05-20, 收修改稿日期: 2015-08-27

臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、哈维式弧菌(*Vibrio harveyi*)和蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)等(张春云等, 2006; 王印庚等, 2006; 黄华伟等, 2010; Deng *et al.*, 2009; 骆艺文等, 2009; 艾新海等, 2012)。

水产疾病的发生是病原、环境、养殖体三者相互作用的结果, 疾病暴发是由于外界环境发生不良改变、病原感染后增殖到一定数量水平(达到致病阈值)、自身免疫水平下降等多因素共同作用引发的(王印庚等, 2014)。黄华伟等(2011)通过研究池塘养殖模式下高温期和低温期刺参腐皮综合征的发生与环境因子之间的关系, 发现刺参养殖池塘中刺参腐皮综合征的发生与池塘水体、底泥中致病性弧菌数量密切相关, 这与刺参营底栖生活的特性密切相关。在刺参保苗期, 苗种附着基为参苗的主要的栖息地, 参苗新陈代谢产生的排泄物、老化沉淀的饵料等不断沉积到池底和附着基上, 滋生大量病原菌, 不断累积容易使参苗栖息环境恶化, 导致参苗病害的发生。因此, 解析疾病发生与附着基沉积物菌群关系对优化养殖工艺具有重要的现实意义。

2013年8月, 山东某育苗场参保苗车间部分育苗池发生腐皮综合征现象, 发病参苗规格为(4.00±0.12)g/头, 发病时参龄为6月龄, 作者对养殖流程中的附着基更换工艺进行了追踪、采集发病刺参并从病灶处分离出了一株优势菌, 继而对该优势菌进行了鉴定和致病性分析, 结合保苗期养殖系统中附着基沉积物中细菌群落结构变化确定其致病阈值。相应研究结果为刺参苗种培育期的疾病防控以及健康养殖管理提供了理论依据和参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

2013年8月, 患病刺参苗种取自山东省青岛市某刺参育苗场, 疾病暴发时水温为28℃, 苗种规格为(4.00±0.12)g/头, 每天投饵1次, 每天换1次水, 每4-5d倒池1次, 每50d更换1次附着基。

采集发病样品30头, 同时收集健康刺参苗种700头, 规格为(3.84±0.22)g/头。溶藻弧菌的标准菌株购自北京微生物研究所, 菌株编号为VABZ0005。

### 1.2 病原菌分离与形态学观察

剪取典型患病参苗的病灶处组织, 用无菌研磨器对其进行研磨, 在胰蛋白胨大豆肉汤培养基(Trypticase, 北京陆桥技术有限责任公司)上进行划线分离, 28℃培养16-24h, 挑取优势菌进行分离纯化培养3次并

对纯化菌落保种。采用革兰氏染色对所分离细菌进行分类。另外, 刮取培养基上纯培养的菌落将其用无菌的1.5% NaCl溶液稀释成浓度约 $1 \times 10^7$  CFU/ml的菌悬液, 用3%戊二醛固定5min, 再经3%磷钨酸负染, 晾干, 在透射电镜下观察细菌的形态特征。

### 1.3 人工回接感染实验

将受试的健康刺参苗种暂养于 $4 \text{ m}^3$ 水泥池中5d, 每天换水30%, 换水温差不超过0.5℃, 换水后投喂饵料, 保证受试苗种处于健康状态。

将分离纯化后的优势菌于液体TSB培养基中进行扩大培养, 培养条件为28℃, 150 r/min振荡培养16h。离心收集菌体后采用麦氏比色法用无菌的1.5% NaCl溶液配制成浓度为 $6 \times 10^8$  CFU/ml、 $6 \times 10^7$  CFU/ml、 $6 \times 10^6$  CFU/ml、 $6 \times 10^5$  CFU/ml、 $6 \times 10^4$  CFU/ml和 $6 \times 10^3$  CFU/ml的菌液。

实验采用细菌浸浴感染, 实验组共设置8组, 分别为空白对照组(不投饵料, 不加菌液)、阴性对照组(投喂饵料, 但不加菌液)、6个攻毒实验组为 $6 \times 10^8$  CFU/ml组、 $6 \times 10^7$  CFU/ml组、 $6 \times 10^6$  CFU/ml组、 $6 \times 10^5$  CFU/ml组、 $6 \times 10^4$  CFU/ml组、 $6 \times 10^3$  CFU/ml组。每组设置3个平行, 每个平行投入30头参苗。试验在10L的塑料水槽中进行, 每天投饵1次, 每日换水量为总量的1/2, 换水后补充新培养菌液至原试验浓度。实验周期为25d, 试验期间, 每日观察刺参苗种的摄食、发病状态、病灶变化, 记录死亡参苗的头数。从患病刺参病灶处分离细菌。采用GB15193.3-2003《急性毒性实验》中寇氏法计算其半致死浓度, 计算公式为:

$$M = XK - I(\sum p - 0.5) \text{ 和 } LD_{50} = \log^{-1} M$$

式中,  $p$  为死亡率,  $XK$  为最大剂量的对数值,  $I$  为相邻两剂量组对数值的差。

### 1.4 细菌的生理生化鉴定

参照麦氏比浊法, 制备浓度约为 $1 \times 10^5$  CFU/ml的菌悬液, 以API 32E细菌鉴定系统试验条和细菌微量检定管进行生理生化指标的测定。参照《伯杰氏细菌学鉴定手册》和《常见细菌系统鉴定手册》进行分类判定(Holt *et al.*, 1994; 东秀珠等, 2001)。

### 1.5 细菌的16S rDNA鉴定

采用细菌基因组DNA提取试剂盒(北京天根生物)提取所纯化细菌的DNA, 利用细菌16S rDNA基因通用引物对相应序列进行扩增, 引物为27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-TACGGCT-

ACCTTGTTACGACTT-3'), PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检验后, 送至南京金斯瑞测序公司测序。测序结果在 NCBI 基因库中进行序列比对, 并通过 MEGA 5.1 软件构建系统发育树。

### 1.6 发病前后刺参保苗系统中菌群结构分析

对该育苗场保苗期间保苗系统中池水和附着基沉积物的菌群结构进行监测, 以附着基全新更换当天为监测起始点, 监测时间为 60 d, 取样间隔为 10 d, 监测内容为池水和附着基沉积物的异养细菌和弧菌的丰度, 同时记录相应取样点时刺参苗种的健康程度。其中, 附着基沉积物的取样方法为随机剪下一块附着基的边角 1 cm<sup>2</sup>, 将其在 10 ml 的灭菌海水里冲刷; 池水取样方法为保苗池底部水样。将二者梯度稀释后分别涂布于 TSB 和 TCBS 培养基, 经 28℃ 培养 24 h 后, 进行菌落计数, 分离保存优势细菌, 并利用 16S rDNA 基因序列分析对优势细菌进行鉴定。

### 1.7 数据处理

使用 Excel 2003 软件进行绘图分析和数据处理。使用 SPSS 进行标准差的计算, 数值以平均值±标准差(Mean±SD)表示。

## 2 结果

### 2.1 病原菌的分离与形态学观察

从患病刺参病灶处分离获得 1 株优势菌, 优势度为 90%, 编号为 HP130917A-1。该菌株在 TSB 固体培养基上菌落形态为: 菌落圆形、黄白色、不透明、边缘粗糙、易挑取; 生长较快, 容易连片生长。革兰氏染色显示该菌株为革兰氏阴性菌, 短杆状(图 1)。

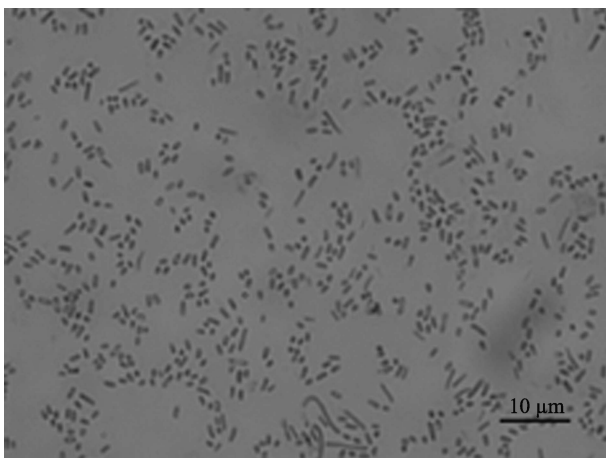


图 1 所分离优势菌株的革兰氏染色

Fig.1 Gram staining of the dominant bacteria

对菌体负染后电镜观察显示, 该菌体长约为 2.6 μm, 具有较长的极生单鞭毛, 鞭毛长度约是菌体的 2 倍以上(图 2)。



图 2 所分离优势菌株的电镜照片

Fig.2 The transmission electron microscopy of the dominant bacteria

### 2.2 回接感染实验

利用不同浓度 HP130917A-1 菌株对健康苗种的人工感染试验结果表明, 6×10<sup>8</sup> CFU/ml 组参苗自攻毒第 5 天时开始出现死亡现象, 到第 14 天时全部死亡, 死亡率为 100%; 6×10<sup>7</sup> CFU/ml 组在攻毒第 8 天开始出现死亡, 到第 25 天时死亡率达到(62.22±0.04)%; 6×10<sup>6</sup> CFU/ml 组在攻毒第 9 天时开始出现死亡现象, 到第 25 天时死亡率达到(51.11±0.04)%; 6×10<sup>5</sup> CFU/ml 组在攻毒第 10 天时开始出现死亡现象, 到第 25 天时死亡率达到(35.56±0.08)%; 6×10<sup>4</sup> CFU/ml 组在攻毒第 14 天时开始出现死亡现象, 到第 25 天时死亡率为(21.11±0.04)%; 6×10<sup>3</sup> CFU/ml 组、空白对照组和阴性对照组在试验期间均未出现化皮和死亡现象。按照寇氏法计算菌株 HP130917A-1 的半致死浓度为 1.2×10<sup>6</sup> CFU/ml(图 3)。

人工感染后, 发病个体初期症状为参苗附着力下降、摄食量减小、身体蜷缩、肿嘴、部分苗种排脏、棘刺溃烂发白; 发病后期症状为: 参苗不摄食、表皮溃疡、自溶。发病症状与自然发病的刺参症状相同(图 4)。自人工感染刺参病灶处分离的优势菌 HP130917A-2, 菌落形态上与感染菌株 HP130917A-1 相同。根据科赫法则确定 HP130917A-1 菌株确定为刺参大规格苗种腐皮综合征的致病菌。

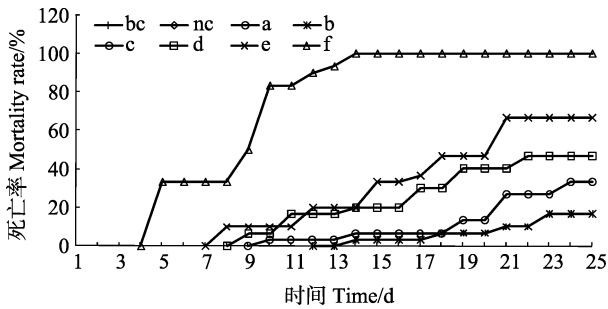


图3 攻毒感染试验各组海参苗种死亡率

Fig.3 Mortality of sea cucumbers in the artificial infection test from different groups

bc: 空白对照组; nc: 阴性对照组; a:  $6 \times 10^3$  CFU/ml;  
b:  $6 \times 10^4$  CFU/ml; c:  $6 \times 10^5$  CFU/ml; d:  $6 \times 10^6$  CFU/ml;  
e:  $6 \times 10^7$  CFU/ml; f:  $6 \times 10^8$  CFU/ml

bc: Blank control; nc: Negative control; a:  $6 \times 10^3$  CFU/ml;  
b:  $6 \times 10^4$  CFU/ml; c:  $6 \times 10^5$  CFU/ml; d:  $6 \times 10^6$  CFU/ml;  
e:  $6 \times 10^7$  CFU/ml; f:  $6 \times 10^8$  CFU/ml

### 2.3 病原菌生理生化特征检测结果

对自然发病分离的优势菌株 HP130917A-1 和人工感染试验分离的优势菌株 HP130917A-2 的生理生化指标测定结果见表 1。从表 1 可以看出, HP130917A-1 和菌株 HP130917A-2 的生理生化特征一致, 在 TCBS 培养基上生长, 氧化酶试验阳性, 对弧菌抑制剂 O/129 敏感。能分解葡萄糖、海藻糖、鼠李糖、麦芽糖、甘露醇、L-阿拉伯糖、D-阿拉伯醇。并且赖氨酸脱羧酶、胍酶、N-乙酸- $\beta$ -葡萄糖甙、 $\beta$ -半乳糖甙、 $\beta$ 葡萄糖甙酶、VP、明胶酶和淀粉酶等反应均为阳性。L-阿拉伯糖醇、酚红、 $\beta$ 葡萄糖苷酸酶、5 酮基-葡萄糖酸钾、蔗糖、半乳糖酸盐、鸟氨酸脱羧酶、精氨酸双水解酶、侧金盏花醇、丙二酸、吡嗪、古老糖、 $\alpha$ -半乳糖苷酶、肌醇、山梨醇、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶、纤维二糖、L-天冬氨酸芳胺酶、蛋白胨水、麦芽糖甙酶、硫化氢、脲酶等反应均为阳性。可以初步判定 HP130917A-1 和 HP130917A-2 为同一株菌, 而

二者与溶藻弧菌标准菌株在生理生化上有 3 项结果不同。其中, 在赖氨酸脱羧酶试验中, 菌株 HP130917A-1 和菌株 HP130917A-2 呈阳性, 而标准菌株呈阴性。在  $\beta$ -半乳糖甙试验中, 菌株 HP130917A-1 和菌株 HP130917A-2 呈阳性, 而标准菌株呈阴性。在蔗糖试验中, 菌株 HP130917A-1 和菌株 HP130917A-2 呈阴性, 而标准菌株呈阳性。根据《伯杰氏细菌鉴定手册》和《常见细菌系统鉴定手册》初步鉴定为溶藻弧菌。

### 2.4 病原菌的 16S rDNA 序列分析

采用通用引物对 HP130917A-1 和 HP130917A-2 菌株的 16S rDNA PCR 扩增产物的长度均为 1440 bp, 采用 Blast 对所获得的测序结果在 NCBI 数据库进行序列相似性比对分析表明, 本研究分离所获得的菌株与溶藻弧菌 JF836178 序列同源性达到 100%。利用 MEGA5.1 进行系统发育树的构建(图5), 确定了 HP130917A-1 和 HP130917A-2 为同一株菌, 鉴定为溶藻弧菌。

### 2.5 发病前后刺参保苗系统中菌群结构的变化分析

以更换全新附着基当天为监测起始点, 对该育苗场保苗池养殖系统进行了为期 50 d 的苗种健康状况和水质监测, 结果显示, 在前 20 d 内参苗摄食良好, 参体伸展正常; 在第 30-40 天内参苗摄食较好, 少量刺参身体收缩; 自第 43 天开始少量苗种附着力下降; 到第 50 天保苗池出现大量参苗棘刺顶端溃烂、排脏、表皮溃疡, 甚至出现自溶现象(表 2)。

对养殖池水的菌群结构检测结果显示, 异养细菌的数量在前 30 d 呈上升的趋势, 并在第 30 天达到最高值  $3.35 \times 10^3$  CFU/ml, 随后呈下降趋势, 弧菌数量在前 30 d 同样呈上升的趋势, 并在第 30 天达到最高值  $2.90 \times 10^3$  CFU/ml, 而 30 d 后开始下降, 水中的异养细菌数



图4 自然发病与回接感染发病的刺参保苗种

Fig.4 Naturally infected sea cucumber(A) and artificially infected sea cucumber(B)

表 1 菌株 HP130917A-1、菌株 HP130917A-2 和溶藻弧菌标准菌株的生理生化特征  
 Tab.1 Physiological and biochemical characteristics of the strains HP130917A-1, HP130917A-2 and the standard strain of *V. alginolyticus*

项目 Item		HP130917A-1	HP130917A-2	溶藻弧菌标准株 Standard strain of <i>V.alginolyticus</i>
TCBS	TCBS	+	+	+
氧化酶	Oxidase	+	+	+
O/129(150 μg)	O/129(150 μg)	+	+	+
鸟氨酸脱羧酶	Ornithine decarboxylase	+	+	+
精氨酸双水解酶	Drosase	-	-	-
赖氨酸脱羧酶	Lysine decarboxylase	+	+	-
脲酶	Urease	-	-	-
L-阿拉伯糖醇	L-Arabitol	-	-	-
半乳糖酸盐	Galactose acid salt	-	-	-
5-酮基-葡萄糖酸钾	5-keto-potassium gluconate	-	-	-
肢酶	Limb enzyme	+	+	+
酚红	Phenol red	-	-	-
β-葡萄糖甙酶	Beta-Glucosidase	+	+	+
甘露醇	Mannitol	+	+	+
麦芽糖	Maltose	+	+	+
侧金盏花醇	Adonitol	-	-	-
古老糖	Old sugar	-	-	-
β-葡萄糖苷酸酶	Beta-Glucuronidase	-	-	-
丙二酸	Malonicacid	-	-	-
吡啶	Benzpyrole	-	-	-
N-乙酸-β-葡萄糖甙	N-acetic acid-beta glucose glucoside	+	+	+
β-半乳糖甙	Beta-galactose glucoside	+	+	-
葡萄糖	Glucose	+	+	+
蔗糖	Saccharose	-	-	+
L-阿拉伯糖	L-Pectinose	+	+	+
D-阿拉伯醇	D-Arab alcohol	+	+	+
α-葡萄糖苷酶	Alpha Glucosidase	-	-	-
α-半乳糖苷酶	Alpha galactose glucoside enzyme	-	-	-
海藻糖	Mycose	+	+	+
鼠李糖	Rhamnose	+	+	+
肌醇	Inositol	-	-	-
纤维二糖	Cellose	-	-	-
山梨醇	Sorbitol	-	-	-
麦芽糖甙酶	Maltose glucosidase	-	-	-
L-天冬氨酸芳胺酶	L-aspartate aromatic amine enzymes	-	-	-
蛋白胨水	Peptone water	-	-	-
VP 反应	Vogus-Proskauer reaction	+	+	+
硫化氢产生	H <sub>2</sub> S production	-	-	-
明胶酶	Gelatinase	+	+	+
淀粉酶	Amylase	+	+	+

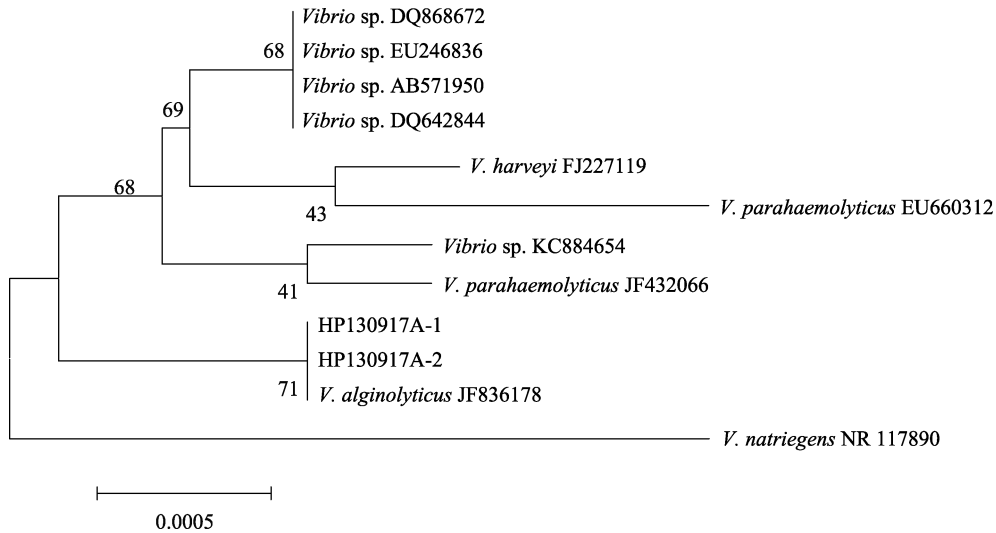


图 5 菌株 HP130917A-1 和 HP130917A-2 的 16SrDNA 系统发育树构建

Fig.5 The phylogenetic tree of HP130917A-1 and HP130917A-2 based on analysis of 16S rDNA sequence

量和弧菌数量的变化趋势与温度的变化趋势相近(图 6)。对于附着基沉积物中菌群结构变化,异养细菌的数量在 0-50 d 内呈上升趋势,并在第 50 天时达到最高值  $1.02 \times 10^6$  CFU/cm<sup>2</sup>;弧菌数量在 0-50 d 内也同样呈上升趋势,并在第 50 天时达到最高值  $1.49 \times 10^5$  CFU/cm<sup>2</sup>(表 2),沉积物中异养细菌数量和弧菌数量随附着基在养殖系统中的时间而增加,与温度相关性分析,分别为 -0.18-0.148,  $P > 0.05$ ,相关性不显著(图 7)。

自养殖水体和附着基沉积物中分离得到 6 株优势菌株,利用 16S rDNA 基因序列分析对其进行鉴定

分析结果显示,所分离出 6 种主要优势菌分别为溶藻弧菌、需钠弧菌、副溶血弧菌、枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌和马胃葡萄球菌。对这 6 株细菌在养殖池水及附着基沉积物的丰度分析见图 6 和图 7。由图 6 和图 7 可以看出,溶藻弧菌一直为水体中和附着基沉积物上的优势菌,且优势度较高。水中溶藻弧菌的优势度在第 30 天时达到弧菌最高值的 57%,其数量可达  $1.16 \times 10^3$  CFU/ml;附着基上溶藻弧菌的优势度在第 50 天时优势度达到弧菌最高值的 88%,其数量可达  $8.97 \times 10^6$  CFU/cm<sup>2</sup>。

表 2 育苗 50 d 过程中参苗健康状况

Tab.2 The juvenile healthy status during 50-day cultivation

时间 Time(d)	水中异养细菌总数 Concentration of heterotrophic bacteria in water(CFU/ml)	水中弧菌总数 Concentration of <i>Vibrio</i> in water (CFU/ml)	附着基异养细菌总数 Concentration of heterotrophic bacteria in sediment on substrates (CFU/cm <sup>2</sup> )	附着基弧菌总数 Concentration of <i>Vibrio</i> on substrates (CFU/cm <sup>2</sup> )	刺参苗种健康状况 Healthy status of the sea cucumber
0	$2.09 \times 10^2$	$1.98 \times 10^2$	$6.03 \times 10^4$	$2.86 \times 10^4$	H
10	$8.57 \times 10^2$	$2.13 \times 10^2$	$2.42 \times 10^5$	$8.10 \times 10^4$	H
20	$3.14 \times 10^3$	$2.05 \times 10^3$	$5.32 \times 10^5$	$1.47 \times 10^5$	H
30	$3.35 \times 10^3$	$2.90 \times 10^3$	$1.82 \times 10^6$	$2.50 \times 10^5$	SH
40	$2.64 \times 10^3$	$1.69 \times 10^3$	$5.04 \times 10^6$	$1.03 \times 10^6$	SH
50	$1.83 \times 10^3$	$5.99 \times 10^2$	$1.02 \times 10^7$	$9.49 \times 10^6$	S

注: 1、水质条件: 温度为 27.61-29.12℃、盐度为 29.65-30.01、pH 为 7.75-8.25、溶解氧为 5.13-6.07 mg/L

2、H (Health)表示刺参摄食良好,刺参伸展。SH (Sub-health)表示刺参摄食较好,部分刺参身体收缩,活力欠佳。S (Sick)表示有附着力下降、棘刺顶端溃烂、排脏、表皮溃疡、自溶等现象出现

Note: 1. The conditions of water quality during the experiment: temperature 27.61-29.12℃, salinity 29.65-30.01, pH 7.75-8.25 and dissolved oxygen 5.13-6.07 mg/L

2. H (Health) indicates that sea cucumber was feeding well and the body of sea cucumber was stretching. SH (Sub-health) indicates that the feeding of sea cucumber was well, while a few of sea cucumbers showed body contraction. S (Sick) indicates that the ability of adhesive decreased, the top of spines festerd, viscera everted skin showed ulceration, and autolysis occurred

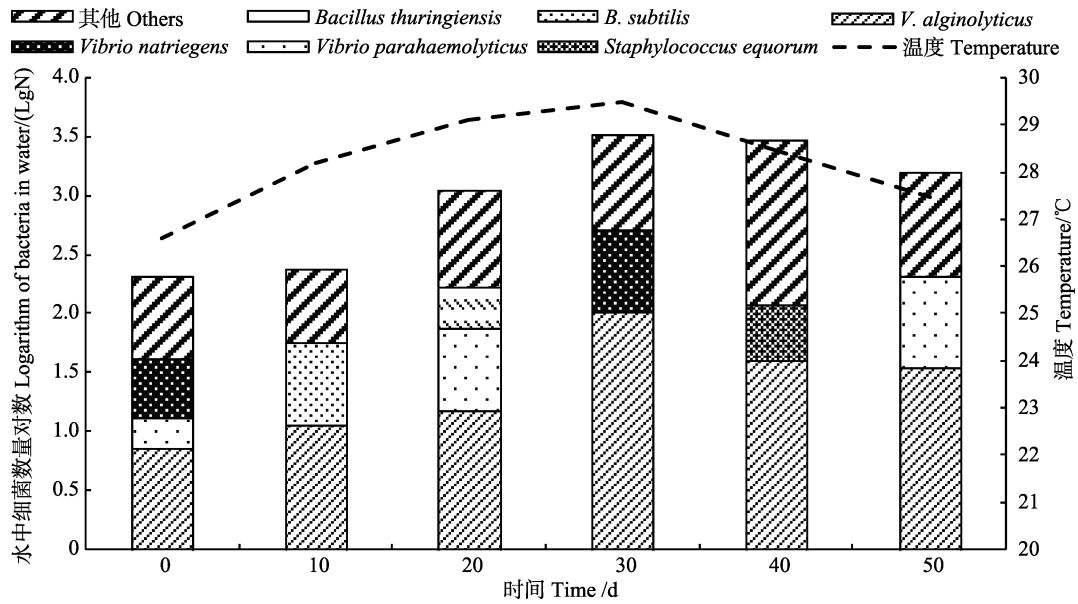


图 6 养殖池水中优势菌丰度变化

Fig.6 Microbial community structure variation in the culture pond

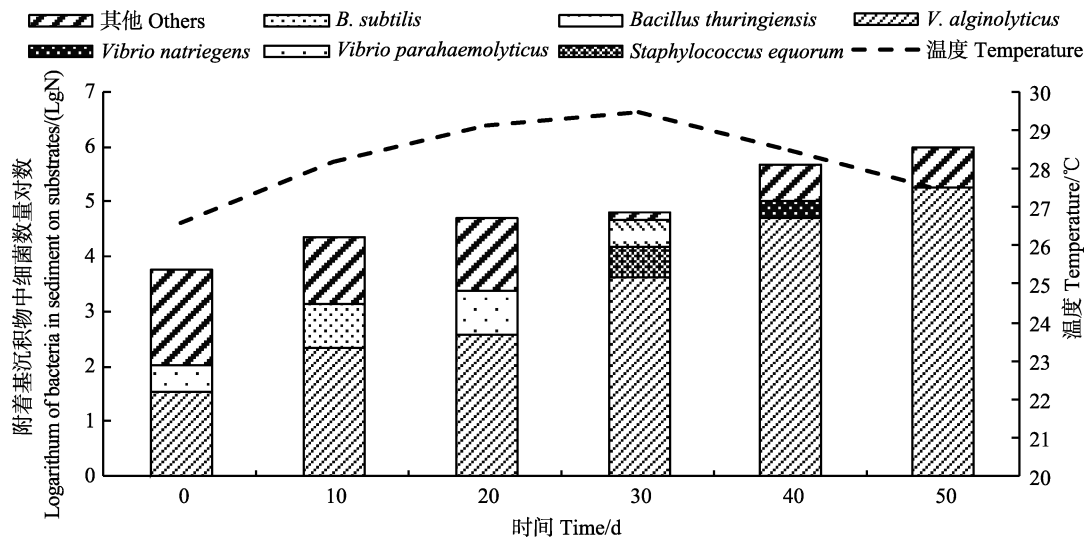


图 7 附着基沉积物中优势菌的变化

Fig.7 Microbial community structure variation in the sediment on substrates

### 3 讨论

通过人工回接感染试验证实,从患病刺参苗种病灶处分离的优势菌 HP130917A-1 能够导致刺参苗种发病,并且其发病症状与自然刺参发病症状相同;从人工感染刺参病灶处分离的优势菌 HP130917A-2 与接种感染的细菌为同一菌株,并具有较强的致病力,符合科赫法则,证实该菌株为本次病例的致病菌。通过细菌形态学、生理生化和 16S rDNA 序列分析确定了本例参苗腐皮综合征的致病菌为溶藻弧菌。

溶藻弧菌是水产养殖经济品种中常见的致病菌(苑淑宾等, 2012)。金珊等(2005)对浙江省沿海近 12 个

海水网箱养殖场进行了大量的调查和研究,发现大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)弧菌病的致病菌为溶藻弧菌和哈氏弧菌,大黄鱼感染致病菌后,肝、肾、脾等组织的病变非常明显。陈寅儿等(2005)通过对鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)血液生理生化指标的研究表明,溶藻弧菌对鲈鱼具有极强的致病性。郑国兴等(1991)发现溶藻弧菌为文蛤(*Mercenaria mercenaria*)的病原菌,可造成肠上皮及肝脏组织病变。胡超群等(2000)发现,溶藻弧菌也可以引起对虾(*Penaeus orientalis*)弯曲、失去游泳和平衡能力、肌肉不透明等不良状态。由此看来,溶藻弧菌给海水养殖产业造成了较大的危害。

对于刺参而言,腐皮综合征是刺参最为常见的疾

病(Deng *et al*, 2009; Liu *et al*, 2010), 其中, 溶藻弧菌是刺参腐皮综合征的重要病原菌之一。杨嘉龙等(2007)研究发现, 山东乳山某刺参养殖场暴发刺参成参溃疡病的病原菌为溶藻弧菌, 其半致死浓度为  $5.68 \times 10^6$  CFU/头。郝佳等(2013)自室内养殖刺参苗期出现身体发红, 随即开始出现溃烂, 分离得到主要的病原菌为溶藻弧菌。Becker 等(2004)通过研究发现, 溶藻弧菌和哈维式弧菌可导致糙海参幼体皮肤出现溃烂, 并引发糙海参育苗和保苗阶段出现大批死亡。本研究表明, 刺参腐皮综合征的病原菌为溶藻弧菌, 其发病特点与杨嘉龙等(2007)、郝佳等(2013)研究结果有所不同。此次疾病发生于刺参高温期保苗阶段, 而杨嘉龙等(2003)的研究结果是在刺参低温成参阶段, 其半致死浓度相对较低。另外, 本例未发现郝佳等(2013)的结果参体发红现象。

在刺参的育苗和保苗阶段, 附着基是刺参采食、生长的栖息载体。随着附着基在养殖池中使用时间的增加, 附着基上的有机残留物增多、水质恶化、滋生大量的细菌和霉菌, 导致刺参患病的几率加大, 因此, 合理确定附着基更换频率对苗种健康养殖十分重要。本研究通过对保苗池附着基沉积物菌群结构分析可以看出, 随着附着基在养殖池中使用时间的增加, 附着基上异养菌总数和弧菌总数都一直在增加, 到第 50 天时, 浓度分别达到  $1.02 \times 10^7$ 、 $1.49 \times 10^6$  CFU/cm<sup>2</sup>, 且致病菌溶藻弧菌的浓度和相对丰度都达到了峰值, 浓度为  $8.97 \times 10^6$  CFU/cm<sup>2</sup>, 丰度达到 88%, 而海参苗种也于第 50 天暴发了腐皮综合征。由此可见, 确定最佳的附着基更换频率, 对保持苗种培育系统良好的水质条件和菌群结构进而保障刺参的成活率和生长效益具有重要的现实意义。

根据人工回接感染实验结果, 按照寇氏法计算溶藻弧菌对参苗的半致死浓度为  $1.2 \times 10^6$  CFU/ml。这一浓度比出现腐皮综合征现象时池水中溶藻弧菌的数量高 4 个数量级, 而与附着基上沉积物中溶藻弧菌的浓度处于同一个数量级。随着附着基使用时间的增加, 附着基沉积物中溶藻弧菌浓度也持续增加, 而刺参苗种摄食沉积物时, 溶藻弧菌也随之进入刺参体内, 达到一定浓度(致病阈值)时, 引发腐皮综合征。由此可以推测出, 溶藻弧菌引发腐皮综合征的致病阈值为其在附着基沉积物上的浓度达到  $8.97 \times 10^6$  CFU/cm<sup>2</sup>。

一般认为, 病原弧菌首先通过菌毛并在荚膜和外膜蛋白的辅助下牢靠的粘附在感染部位的细胞上, 随后通过降解感染部位的蛋白质及细胞外基质而快速

繁殖, 使感染部位破损, 如皮肤溃疡及肠炎等(吴后波等, 2003)。此次疾病发生在 8 月的高温期(温度变化范围为 27–29℃), 高温期的水温及附着基沉积饵料等有机质为细菌滋生提供了适宜条件, 使其附着基沉积物中病原菌数量大幅度增加, 直接影响到刺参苗种的成活率。因此, 在高温保苗期应当注意对养殖水体中弧菌尤其是致病性弧菌的控制。由于芽孢杆菌对一般弧菌类细菌有抑制作用(伏传永等, 2008)<sup>1)</sup>, 所以, 在夏季保苗过程中应定期泼洒微生态制剂抑制弧菌的大量增殖。陈辉等(2012)报道五倍子、公丁香和石榴皮等中草药能够有效抑杀溶藻弧菌, 王印庚等(2009)研究发现, 复方中草药穿心莲、大青叶、金银花和川芎(最佳配比为 2 : 1 : 3 : 2)可有效防治刺参腐皮综合征。故可考虑定期使用上述中草药进行预防和治疗。此外, 在生产过程中应加强对池水中、附着基上进行微生物特别是弧菌总数的监测, 建立和优化良好的刺参保苗工艺, 以提高苗种的成活率 and 经济效益。

## 参 考 文 献

- 王印庚, 荣小军, 廖梅杰, 等. 刺参健康养殖与病害防控丛解. 北京: 中国农业出版社, 2014, 116–158
- 王印庚, 荣小军, 张春云, 等. 养殖刺参暴发性疾病“腐皮综合症”的初步研究与防治. 齐鲁渔业, 2004, 21(5): 44–47
- 王印庚, 荣小军, 张春云, 等. 养殖海参主要疾病及防治技术. 海洋科学, 2005, 29(3): 1–7
- 王印庚, 方波, 张春云, 等. 养殖刺参保苗期重大疾病腐皮综合征病原及其感染源分析. 中国水产科学, 2006, 13(4): 610–616
- 王印庚, 冷敏, 陈霞, 等. 中草药对刺参腐皮综合征病原菌的体外抑菌试验. 渔业科学进展, 2009, 30(2): 1–7
- 艾海新, 于晶晶, 郑方亮, 等. 刺参“腐皮综合症”致病菌 LNUB415 的分离及防治的初步研究. 微生物学杂志, 2012, 32(2): 68–72
- 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001
- 吴后波, 潘金培. 病原弧菌的致病机理. 水生生物学报, 2003, 27(4): 422–426
- 陈辉, 张其中. 100 种中草药对溶藻弧菌的体外抑菌实验. 中国预防兽医学报, 2012, 34(6): 452–455
- 张春云, 王印庚, 荣小军, 等. 养殖刺参腐皮综合征病原菌的分离与鉴定. 水产学报, 2006, 30(1): 118–123
- 骆艺文, 郝志凯, 王印庚, 等. 一株引起刺参腐皮综合征的蜡样芽孢杆菌. 水产科技情报, 2009, 36(2): 60–62
- 黄华伟, 王印庚, 陈霞, 等. 老化参池刺参腐皮综合征病原菌的分离与鉴定. 水产学报, 2010, 34(9): 1460–1468
- 黄华伟, 王印庚, 陈霞, 等. 渡夏期养殖刺参腐皮综合征的发生与环境因子间的关系. 农产品质量安全与现代农业发

1) 伏传永. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)对刺参腐皮综合病致病菌的拮抗作用以及对水质的影响. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2008: 28–36



- 展专家论坛论文集, 2011a: 132-140
- 黄华伟, 王印庚, 陈霞, 等. 低温期养殖刺参腐皮综合征的发生与环境因子间的关系. 水产科技情报, 2011b, 38(6): 292-297
- 苑淑宾, 朱爱意. 溶藻弧菌对水产动物致病性及其防治的研究进展. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2012, 31(3): 256-264
- 金珊, 王国良, 赵青松, 等. 海水网箱养殖大黄鱼弧菌病的病原菌. 水产科学, 2005, 24(1): 17-19
- 陈寅儿, 金珊, 王国良, 等. 鲈鱼溶藻弧菌病的血液生理生化指标研究. 台湾海峡, 2005, 24(1): 104-108
- 郑国兴, 李何, 黄宁宁, 等. 文蛤病原菌(溶藻弧菌)的分离与性状及病文蛤组织的电镜观察. 水产学报, 1991, 15(2): 85-95
- 胡超群, 陶保华. 对虾弧菌病及其免疫预防的研究进展. 热带海洋, 2000, 19(3): 84-94
- 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. 水产学报, 2007, 31(4): 504-511
- 郝佳, 王洪军, 陈文博, 等. 室内养殖仿刺参“红体症”的初步研究. 水产科学, 2013, 32(5): 261-266
- Becker P, Gillan D, Lanterbecq D, *et al.* The skin ulceration disease in cultivated juveniles of *Holothuria scabra* (Holothuroidea, Echinodermata). *Aquaculture*, 2004, 242(1-4): 13-30
- Deng H, He CB, Zhou ZC, *et al.* Isolation and pathogenicity of pathogens from skin ulceration disease and viscera ejection syndrome of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Aquaculture*, 2009, 287(1-2): 18-27
- Holt JG, Krieg NR, Sheath PHA, *et al.* *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*(Ninth Edition). Baltimore, Williams & Wilkins. 1994, 262-263
- Liu H, Zheng F, Sun X, *et al.* Identification of the pathogens associated with skin ulceration and peristome tumescence in cultured sea cucumbers *Apostichopus japonicus* (Selenka). *J Invertebr Pathol*, 2010, 105(3): 236-242

(编辑 陈严)

## Isolation and Identification of the Pathogenic Bacteria of Skin Ulcerative Syndrome (SUS) from *Apostichopus japonicus* Juveniles in Summer and Study on Its Pathogenic Threshold

ZHANG Wenze<sup>1,2</sup>, WANG Yingeng<sup>2①</sup>, LIAO Meijie<sup>2</sup>, RONG Xiaojun<sup>2</sup>, LI Bin<sup>2</sup>,  
ZHANG Zheng<sup>2</sup>, LI Hua<sup>1</sup>, FAN Ruiyong<sup>3</sup>

(1. Dalian Ocean University, Dalian 116023; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Qingdao Ruizhi Seafood Development Co., Ltd, Qingdao 266400)

**Abstract** In the summer of 2013, there was an outbreak of skin ulcerative syndrome (SUS) in *Apostichopus japonicus* juveniles at a hatchery in Shandong Province. The symptoms included weak adhesion, rotten spines, viscera eversion, skin ulceration, and body autolysis. From the skin lesions of diseased juveniles we isolated a dominant strain HP130917A-1 with a median lethal concentration of  $1.2 \times 10^6$  CFU/ml. This strain exhibited high pathogenicity and caused the same symptoms as SUS. The identification of this pathogen was verified using morphological observation, physiological and biochemical test, and 16S rDNA gene sequence analysis. The results demonstrated that HP130917A-1 was *Vibrio alginolyticus* and the causative pathogen associated with SUS. The microbial community structure was also analyzed using 16S rDNA gene sequencing, from which six major strains were found in the rearing system including *V. alginolyticus*, *V. natriegens*, *V. parahaemolyticus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* and *Staphylococcus equorum*. *V. alginolyticus* was predominant among six major strains during the 50 days. On the 50th day of the experiment, the amount of *V. alginolyticus* reached the highest value of  $1.31 \times 10^5$  CFU/ml in the substrates, which was considered as the pathogenic threshold of causing sea cucumber SUS. These results provided insights into the mechanisms of SUS and the health management of sea cucumber *A. japonicus*. Based on our findings we recommend healthy management strategies such as regular monitor of the amount of *Vibrios*, suitable frequency changing of the substrates, and the application of probiotics or herbal medicines.

**Key words** *Apostichopus japonicus*; Nursery period; Skin ulcerative syndrome; Pathogen; *Vibrio alginolyticus*; Pathogenic threshold

① Corresponding author: WANG Yingeng, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn