

文章编号:1000 - 0615(2006)01 - 0118 - 06

养殖刺参腐皮综合征病原菌的分离与鉴定

张春云^{1,2}, 王印庚¹, 荣小军¹

- (1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071;
2. 哈尔滨工业大学海洋学院, 山东 威海 264209)

摘要:2003 年春季, 山东省青岛地区刺参养殖场暴发了较为严重的传染性疾病 - “腐皮综合征”, 该病引起的死亡造成约 30% 的损失。养殖刺参的发病症状表现为: 厌食、摇头、肿嘴、排脏、身体萎缩、口部溃烂乃至体表大面积溃疡。从患病个体溃疡部位分离得到一种优势细菌 KL-1, KL-1 经人工回接感染实验证明对健康刺参具有较强的致病性, 且感染病参的症状与自然发病海参的症状相同。通过形态学、生理生化和 16S rDNA 分子生物学方法对该菌进行的分类鉴定表明, 导致养成刺参“腐皮综合征”的致病菌是灿烂弧菌 (*Vibrio splendidus*)。本文首次揭示了该地区“腐皮综合征”导致养成刺参大规模死亡的致病原因, 对刺参病害防治和健康养殖具有重要的指导意义。

关键词:刺参; 海水养殖; 疾病; 细菌; 腐皮综合征; 16S rDNA

中图分类号: S941.42 **文献标识码:** A

Isolation and identification of causative pathogen for skin ulcerative syndrome in *Apostichopus japonicus*

ZHANG Chun-yun^{1,2}, WANG Yin-geng¹, RONG Xiao-jun¹

- (1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources Certificated by the Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
2. School of the Ocean, Harbin Institute of Technology, Weihai 264209, China)

Abstract: The temperate sea cucumber species, *Apostichopus japonicus*, naturally distributed in Bohai Bay and Yellow Sea, is a valuable one due to its nutritional and medicinal properties. In recent years, sea cucumber aquaculture has developed rapidly along the northern coast of China, while the expansion and intensification of *A. japonicus* farming has led to the occurrence of some diseases. In the spring of 2003, the cultured sea cucumber suffered from serious disease in many farms along the coast of Qingdao, Shandong Province, which was infectious and lethal, causing 30% losses around the area. The symptom displayed as anorexia, shaking head, mouth tumidity, viscera ejection, general atrophy, and skin ulceration, the disease was tentatively termed as “skin ulcerative syndrome”. The bacterium KL-1 was isolated from the focal area of the infected sea cucumber, and it was dominant amongst the isolates. Artificial infection test proved that KL-1 was the causative pathogen associated with the disease. The bacterium KL-1 was identified as *Vibrio splendidus*, by the means of morphological, physiological and biochemical tests, and 16S rDNA sequence analysis. This paper revealed for the first time that the causative pathogen leading to the mass mortality of the sea cucumber in the area, which will be helpful in the disease control and health management during sea cucumber cultivation.

收稿日期:2005-06-30

资助项目:青岛市科技发展计划项目(02-1-kchhh-44);山东省科技发展计划项目(2004GG2205116)

作者简介:张春云(1978-)女,硕士,助教,主要从事病害微生物方面的研究。E-mail:linmeng23@sohu.com

通讯作者:王印庚, Tel:0532-85841732, E-mail:wangy @ysfri.ac.cn

Key words: *Apostichopus japonicus*; mariculture; disease; bacteria; skin ulcerative syndrome; 16S rDNA

刺参 (*Apostichopus japonicus*) 隶属于棘皮动物门 (Echinodermata)、海参纲 (Holothuroidea) 海参目 (Aspidochirotida)、仿刺参属 (*Apostichopus*), 在我国分布于黄、渤海海域, 属温带种。由于刺参是蛋白质含量高、糖类丰富而不含胆固醇的珍贵海产品, 其营养和药用价值极高, 自古以来就被誉为“海产八珍”之一^[1,2]。近年来, 我国北方大力发展刺参养殖业, 养殖面积近百万亩, 年产值超过 100 亿元, 成为海水养殖业中最大的养殖品种之一。然而, 养殖的超速发展和不规范运作造成了病害问题日趋突出, 出现了多种明显病症和大规模死亡现象, 给广大刺参养殖业者造成了惨重的经济损失。2003 年 4 月, 山东省青岛地区养殖场的刺参发生了严重的疾病和死亡现象, 感染对象为体长 10~15 cm, 体重 50 g 以上的已近商品规格的刺参。发病个体的主要症状包括: 厌食、摇头、肿嘴、排脏、口肿溃烂、身体萎缩、体表大面积溃疡 (图 1), 2~3 周内个别参池的死亡率达到 80%。此病传染性强, 波及面广, 使该区域的养殖刺参损失达 30% 左右。根据整个病变过程中病灶表皮逐步腐蚀而导致溃烂的显著特点和病症发展变化的多样性, 本课题组将该疾病命名为“腐皮综合征”^[3,4]。笔者从发病刺参的病灶部位分离到一种优势细菌, 经人工感染试验证明该株细菌属于致病原, 并采用常规生理生化测定方法和 16S rDNA 分子生物学鉴定法对该细菌进行了分类鉴定。

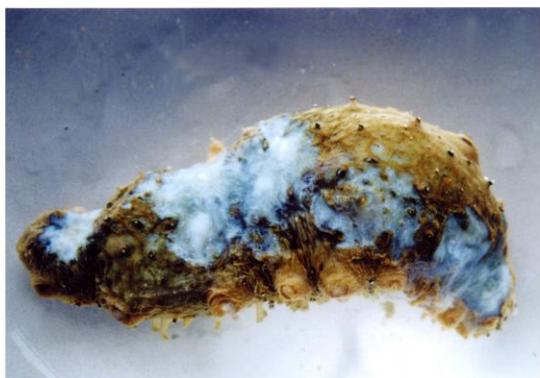


图 1 患腐皮综合征的养殖刺参

Fig. 1 Showing a sea cucumber with gross signs of skin ulceration

1 材料与方法

1.1 样品和材料来源

2003 年 4 月, 病参样品取自青岛地区两个发病养殖场中具有典型皮肤溃烂症状的 2 龄刺参个体, 共计 28 只, 每只体重约 50 g。人工回接感染试验用刺参为青岛崂山区某养殖场放流生长的健康刺参。细菌分离用培养基 TSA、TCBS 均购自北京陆桥技术有限责任公司。细菌鉴定采用常规生理生化法和 16S rDNA 分子生物学鉴定法相结合的方法进行。法国 API 20E 细菌鉴定系统试验条购自生物梅里埃中国有限公司; 细菌微量检定管购自北京陆桥技术有限公司; 细菌 16S rDNA 设计通用扩增引物由上海博雅生物公司合成, PCR 所用 Buffer、dNTP、*Taq* 酶等均购自上海生物工程技术公司。

1.2 样品剖检与病原菌的分离

无菌条件下, 对 28 只样品进行解剖并取各组织制作水浸片; 在显微镜下逐一检查, 以初步观察和确认病参病灶组织中的微生物种类。

以常规的无菌操作方法, 从典型的发生皮肤溃烂病参的表皮和皮下组织病灶处剪取少许组织, 采用 TSA 和 TCBS 培养基以平板划线法分离细菌, 接种后置于 28℃ 生化培养箱倒置培养 24 h, 挑取优势菌落并纯化培养 3 次。纯化后所得细菌以 TSA 斜面或 -80℃ 低温保存备用。

1.3 人工回接感染试验

试验用健康刺参体重 35~45 g, 体长 8~12 cm。将待试验的个体分组装在大塑料水缸中暂养 5 d 后, 选取个体大小均一、体质健康的刺参用于正式试验。

感染试验于 30 L 水箱中进行。水箱消毒、冲洗后加入砂滤的清洁海水, 每 9 头海参作为一组, 不同浓度的待试菌悬液分别设 2 个平行感染组, 同时布设对照组。

将分离到的优势菌经 TSA 培养基培养 24 h 后, 用 1.5% 无菌生理盐水将其冲洗下, 并离心洗涤 3 次, 制得浓度分别为 1×10^9 , 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 CFU mL^{-1} 的菌悬液。菌悬液用 1 mL 无菌注射器经腹腔注射对刺参进行感染, 每头注射量为 0.2 mL, 对照组注射等量的 1.5% 无菌生理盐

水。注射感染开始后,每天做好记录,第14天结束试验。在整个实验过程中,试验水温 $18\sim 20$,盐度 $25\sim 30$,每日换水量大约 50% 。

1.4 菌种鉴定

从自然发病病参和人工感染死亡病参的病灶部位分别分离得到菌株,并进行鉴定。常规鉴定方法包括形态学观察、温度和盐度生长试验、法国 API 20E 细菌鉴定系统的生化试验以及细菌微量检定管的补充生化试验。试验结果参照《伯杰氏细菌鉴定手册》(第9版)^[5],另外结合分子生物学 16S rDNA 基因测序分析进行种、属鉴定。

形态学观察 将细菌纯化培养后,进行细菌的革兰氏染色和负染,以分别使用光镜和电镜观察细菌的个体形态、大小和鞭毛结构。

细菌的生理生化指标 以法国 API 20E 细菌鉴定系统的生化试验以及细菌微量检定管的补充生化试验测定细菌的生理生化指标,具体操作方法参照产品说明进行。

细菌的 16S rDNA 基因序列同源性分析
PCR 模板 DNA 的制备:将纯化的细菌接种在 TSA (含 $3\%NaCl$)平板上,28℃培养过夜。取单菌落悬浮于 $50\mu L$ 无菌盐水(1.5%)中,于 $100^\circ C$ 水浴加热 5 min , $4^\circ C$, $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心,上清即为 PCR 模板 DNA;
16S rDNA 基因序列的 PCR 扩增与测序:根据细菌 16S rDNA 设计通用扩增引物,扩增基因的正向引物 27F:5'-AGAGTTTGATC(C/A)TGGCTCAG-3'(对应于 *Escherichia coli* 16S rDNA 基因的 8~27 bp 位置),反向引物 1492R:5'-TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT-3'(对应于 *E. coli* 16S rDNA 基因的第 1492~1510 bp 位置)。在 $10\mu L$ 的 PCR 反应体系中含有: $1\times$ PCR 缓冲液 $1\mu L$ (含 Mg^{2+}), $4\times$ dNTP $0.8\mu L$ ($200\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),引物各 $0.4\mu L$ ($0.5\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),*r-Taq*聚合酶 $0.05\mu L$ ($5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), ddH_2O $6.85\mu L$,DNA 原液 $1\mu L$ 。PCR 反应条件为:第一阶段 $94^\circ C$ 变性 4 min ,第二阶段 $94^\circ C$ 平衡 30 s , $55^\circ C$ 退火 30 s , $72^\circ C$ 延伸 $1\text{ min }40\text{ s}$,此阶段 35 个循环,第三阶段 $72^\circ C$

温育 15 min 。PCR 的扩增产物由上海生物技术公司进行纯化和测序;序列分析处理:将菌株的 16S rRNA 序列与互联网 NCBI 的基因库中细菌的 16S rRNA 比对,采用 Clustalw 软件进行多序列匹配排列,然后用系统发生推断软件包进行统计和聚类分析,并采用邻接法获得细菌的分

支进化树,具体方法参照文献[6,7]。

2 结果

2.1 剖检结果与病原菌的分离结果

样品病灶组织的水浸片显微检测结果发现,大多数发病个体的表皮、皮下溃烂组织和溃疡处可见大量活跃运动的短杆状细菌,同时未见其它种类微生物大量存在。

以后 TSA 和 TCBS 培养基以平板划线法从皮肤溃烂组织中分离得到 1 种菌落和形态相同的优势菌株 KL-1,其优势度占 95% 左右,将该菌株作为人工感染的试验用菌。

2.2 人工回接感染实验

人工回接感染实验的结果见图 2,高浓度感染组(1×10^9 和 1×10^8 组)试验刺参的死亡均发生在注射后的第 2 天,死亡率分别为 66.7% 和 50% ,且在实验的第 7 天全部死亡;低浓度感染组(1×10^7 和 $1\times 10^6\text{ CFU}\cdot\text{L}^{-1}$ 组)刺参均在第 4 天开始死亡,死亡率分别为 50% 和 33.3% ;第 14 天时的最终死亡率分别升至 66.7% 和 50% 。在整个试验过程中,对照组刺参没有死亡。

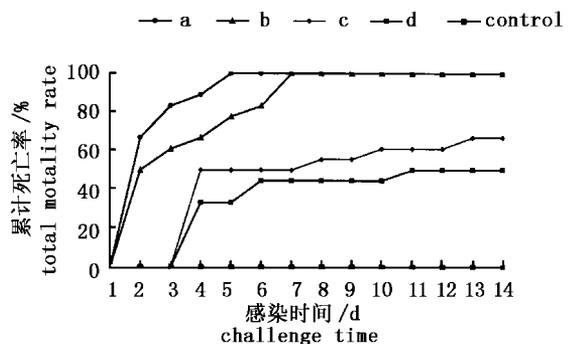


图2 分离菌 KL-1 进行的人工注射感染实验结果

Fig. 2 Challenge test of the isolated strain KL-1 by intraparitoneal injection

a, b, c, d 分别表示菌浓度为 1×10^9 , 1×10^8 , 1×10^7 和 $1\times 10^6\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 感染组,control 为对照组

a, b, c and d represent challenge groups in 1×10^9 , 1×10^8 , 1×10^7 and $1\times 10^6\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively

从病参分离所得的 KL-1 能使健康刺参致病,被感染刺参的症状与自然发病刺参的症状基本相同:即首先触手过度伸张,逐步失去伸展活力,口部肿大,体表分泌粘液增多;然后,口部出现溃烂白斑,从小到大。严重者身体发生溃烂,最终导致

死亡。从人工感染刺参的病灶部位再次分离得到大量形态单一的菌落编号为菌株 KL - 3。

2.3 病原菌的鉴定分析

分离菌的形态观察 KL-1 菌落呈棕黄色,圆形,扁平,湿润不透明,可以在 TCBS 培养基上生长良好。人工回接感染后从发病海参中重新分离的优势菌株 KL - 3 与细菌 KL-1 的菌落形态一致。两株菌均为革兰氏阴性菌,大小一样,约 4 μm 长的短杆状,具有极生单鞭毛(图 3)。

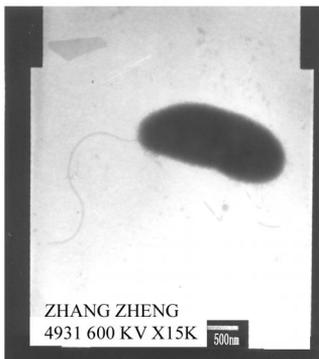


图 3 菌株 KL-1 的负染电镜照片(标尺为 500 nm)

Fig.3 Electronic microphotograph of the bacterial strain KL-1 (bar = 500 nm)

细菌生理生化指标 细菌的生理生化试验结果见表 1。在所测定的 40 项形态及生理生化指标中, KL-1 和 KL - 3 的特征完全一致,菌体呈弧形短杆状,极生单鞭毛,无色素产生,对弧菌抑制剂 O/129 敏感,氧化酶阳性,氧化葡萄糖,不产酸不产气,符合弧菌属的典型特征。参考伯杰氏细菌鉴定手册^[6],其赖氨酸脱羧酶阴性、精氨酸双水解酶阳性、鸟氨酸脱羧酶阴性及明胶酶阳性等特征与灿烂弧菌 (*Vibrio splendidus*) 的生化特征相似性最高。菌株 KL-1 的 16 S rDNA 基因序列同源性分析及系统发育树构建 菌株 KL-1 的 16 S rDNA 经 PCR 扩增后的电泳结果见图 4。其目的条带(即 PCR 产物)的大小约为 1 500 kb 左右。进一步经测序得知: KL-1 扩增的 16S rDNA 基因序列长度为 1 471 bp (不包括引物结合区)。

通过国际互联网 NCBI,在 GenBank 采用 BLAST 程序与已知序列进行相似性分析,发现与弧菌属的 16S rDNA 序列自然聚类。在最相近的 100 个序列中,有 92 个属于弧菌属细菌 (*Vibrio* spp.),而且 KL-1 与它们的同源性达到 98 % 以上;

3 个为假单胞菌属 (*Pseudoalteromonas* spp.), KL-1 与其同源性为 98 % 左右;其余为未鉴定的细菌。从 100 个序列中选取遗传距离较近的 10 个参比菌株构建系统发育树(图 5),并对 16S rDNA 序列进行系统学分析(表 2)。从中可以看出, KL-1 与两株灿烂弧菌 *V. splendidus* (AB038030 和 AY129277) 的亲缘关系最近,相似性最高,分别为 98.3 % 和 98.0 %。由此,我们将 KL-1 初步鉴定为灿烂弧菌 *Vibrio splendidus*。

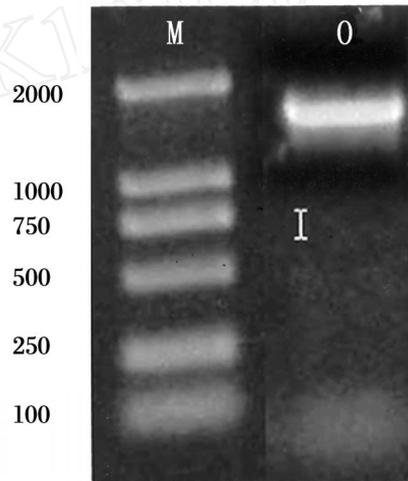


图 4 KL-1 的 16 S rRNA 经 PCR 扩增后的电泳结果

Fig.4 Electrophoresis of 16 S rRNA of the bacterium KL-1 after amplified by PCR

M. marker 标记带;O. 目的片段

M means marker; O means objective fragment

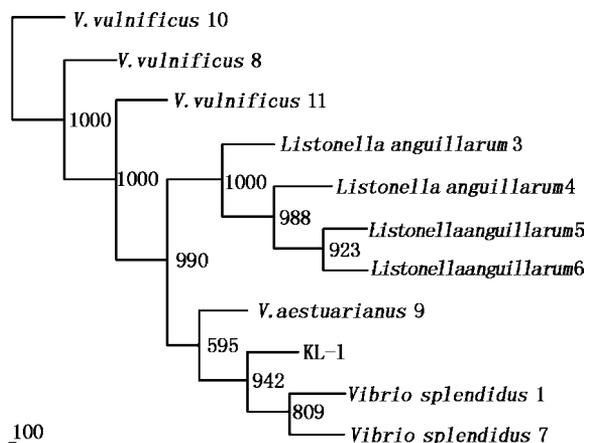


图 5 菌株 KL-1 的 16 S rDNA 基因序列聚类分析结果

Fig.5 Results of 16 S rDNA cluster analysis based on the 16 S rDNA sequence of the strain KL-1

表 1 菌株 KL-1 和 KL-3 的形态特征及生理生化指标

Tab.1 Morphological, physiological and biochemical characteristics of the bacterial strains KL-1 and KL-3

鉴定项目	characteristics	KL-1	KL-3	鉴定项目	characteristics	KL-1	KL-3
革兰氏染色	gram stain	-	-	吲哚产生	indole Production	+	+
鞭毛染色	flagella	m	m	V. P. 反应	vogus-proskauer reaction	-	-
运动性	motility	+	+	H ₂ S 产生	H ₂ S production	-	-
色素产生	pigmentation	-	-	硝酸盐还原	nitrate reduction	+	+
O/129 (10 μg)		S	S	赖氨酸脱羧酶	lysine decarboxylase	-	-
O/129 (150 μg)		S	S	精氨酸双水解酶	arginine dihydrolase	+	+
TCBS 生长	growth on TCBS	+	+	鸟氨酸脱羧酶	ornithine decarboxylase	-	-
0% NaCl 生长	growth on 0% NaCl	-	-	葡萄糖	glucose	+	+
3% NaCl 生长	growth on 3% NaCl	+	+	D-纤维二糖	D-cellobiose	-	-
6% NaCl 生长	growth on 6% NaCl	+	+	D-甘露糖	D-mannitol	-	-
8% NaCl 生长	growth on 8% NaCl	-	-	木糖	xylose	-	-
10% NaCl 生长	growth on 10% NaCl	-	-	棉子糖	raffinose	-	-
4 生长	growth on 4	+	+	蔗糖	sucrose	+	+
25 生长	growth on 25	+	+	水扬素	salicin	-	-
28 生长	growth on 28	+	+	-半乳糖苷	-galactoside	-	-
35 生长	growth on 35	+	+	明胶酶	gelatinase	+	+
40 生长	growth on 40	-	-	脲酶	urease	-	-
45 生长	growth on 45	-	-	葡萄糖产气	gas from glucose	-	-
氧化酶	oxidase	+	+	七叶灵水解	esculine hydrolysis	-	-
氧化-发酵	(O/F) oxidation/fermentation	O	O	肌醇	inositol	-	-

注：“+”表示阳性；“-”表示阴性；“m”表示极生单鞭毛；“S”表示敏感；“F”表示发酵型；“O”表示氧化型

Notes：“+” means positive reaction；“-” means negative reaction；“m” means monotrichous “S” means sensitive；“F” means fermentation；

“O” means oxidation

表 2 用于系统发育树构建的参比菌株
和数据来源登录号

Tab.2 The bacterial strains for phylogenetic dendrogram
construction and their access number on GenBank

参比菌株 compared strains	数据库存取号 access number
<i>Vibrio splendidus</i> 1	AB038030
<i>Listonella anguillarum</i> 3	A Y035897
<i>Listonella anguillarum</i> 4	A Y069970
<i>Listonella anguillarum</i> 5	A Y069971
<i>Listonella anguillarum</i> 6	A Y069971.1
<i>Vibrio splendidus</i> 7	A Y129277
<i>V. vulnificus</i> 8	X76333
<i>V. aestuarianus</i> 9	X74718
<i>V. vulnificus</i> 10	X74689
<i>V. vulnificus</i> 11	X74727

3 讨论

经人工回接感染试验证实,从患“腐皮综合征”刺参的病灶分离到的优势菌株(KL-1)对健康刺参有较强致病和致死作用,而且感染病参的症状与自然发病海参的症状相同。另外,从人工感染发病的刺参体内分离得到大量形态单一的优势

菌株,其形态特征和生化特征与 KL-1 完全相同。以上结果符合生物学柯赫法则,证明菌株 KL-1 为该例养殖刺参“腐皮综合征”的致病菌。此外,本实验室还对该批样品作了组织病理学和电镜学检测,未见病毒等其它微生物感染^[8],由此可确认细菌性病原为刺参“腐皮综合征”的致病因。采用常规生理生化指标测定和分子生物学 16S rDNA 两种鉴定方法对从患“腐皮综合征”刺参的病灶分离到的优势菌株(KL-1)进行了分类学鉴定,两者鉴定结果一致并初步确定为灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)。长期以来,弧菌被公认为危害海水养殖业的重要病原之一,它可以感染多种鱼类、虾蟹类等水产养殖动物并导致大规模死亡^[9,10],最近国外学者 Becker 等证明弧菌能导致热带种糙海参幼体发病死亡^[11],而弧菌引发养殖刺参发病在国内外尚属首次报道。

刺参营底栖生活,以底泥、有机碎屑、小型动植物尸体为食^[2]。有资料表明,生活在自然条件下的刺参,其消化道中细菌数量可达 1×10^7 cells · mL⁻¹ 而不导致疾病^[12],说明刺参消化液对细菌有较强的消化作用和抵抗力。相比之下,在当今

集约化养殖方式下,刺参疾病频繁暴发,危害逐渐加重,导致大规模死亡和巨大经济损失^[3],而本项研究揭示了细菌性病原是目前养殖刺参发病的主要原因。目前山东半岛沿海地区已多次发生类似“腐皮综合征”危害^[4],但该病害的致病原是否存在地域性和多样性尚待进一步调查研究。

笔者认为,疾病的频繁发生可能与养殖方式和操作工艺密切相关。首先,在养殖条件下,养殖环境较自然环境差,如水浅、水交换量小、缺乏良好的底栖附着基;加之养殖密度过高,造成刺参的抗病能力下降而容易发病;另外,随着养殖过程的持续,饲料的投入、排泄物的积累和养殖环境的恶化引起某些有害菌的大量繁殖,以致形成细菌性疾病危害。有鉴于此,减少养殖投放密度,加强养殖管理,改善刺参养殖环境条件,抑制有害菌的优势性增生是保证刺参健康养殖的重要措施。

参考文献:

- [1] 樊绘曾. 海参:海中人参 关于海参及其成分保健医疗功能的研究与开发[J]. 中国海洋药物, 2001, (4):37 - 44.
- [2] 张春云,王印庚,荣小军,等. 国内外海参自然资源、养殖状况及存在问题[J]. 海洋水产研究,2004,25(3):89 - 97.
- [3] Wang Y G, Zhang C Y, Rong X J, *et al.* Diseases of cultured sea cucumber *Apostichopus japonicus* in China [A]. Advances in sea cucumber aquaculture and management. FAO Fisheries Technical Paper [C], 2004. 463, 297 - 310.
- [4] 王印庚,荣小军,张春云,等. 养殖刺参暴发性疾病“腐皮综合征”的初步研究与防治[J]. 齐鲁渔业,2004,21(5):44 - 47.
- [5] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, *et al.* Bergey's manual of determinative bacteriology (9th edition) [M]. London: William and Wilkins, 1994.
- [6] 莫照兰,茅云翔,陈师勇,等. 一株牙鲆出血症病原菌的分子生物学鉴定[J]. 高技术通讯,2001,12:12 - 17.
- [7] 戴欣,陈月琴,周惠,等. 海洋细菌的分子鉴定分类[J]. 中山大学学报,2000,39(1):68 - 71.
- [8] 荣小军. 养殖刺参主要疾病的流行病学和组织病理学研究以及寄生虫病原学初探[D]. 中国海洋大学硕士学位论文,2005. 1 - 97.
- [9] 徐怀恕,杨学宋,李筠. 对虾苗期细菌病害的诊断与控制[M]. 北京:海洋出版社,1999. 166 - 190.
- [10] 徐海圣,舒妙安,占秀安,等. 养殖河螃蟹弧菌病病原菌分离鉴定及其胞外产物的致病性[J]. 水产学报,2002,26(4):357 - 362.
- [11] Becker P, Gillan D, Lanterbecq D, *et al.* The skin ulceration disease in cultivated juveniles of *Holothuria scabra* (Holothuroidea, Echinodermata) [J]. Aquac, 2004, 242: 13 - 30.
- [12] 孙奕,陈玛. 刺参体内外微生物组成及其生理特征的研究[J]. 海洋与湖沼,1989,20(4):300 - 307.