

仿刺参幼体烂胃病及其致病原鉴定

王印庚¹, 孙素凤^{1,2}, 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. 中国海洋大学 生命科学与技术学部, 山东 青岛 266003)

摘要: 山东、辽宁两省在仿刺参(*Apostichopus japonicus*)苗种培育期间的5~7月,耳状幼体易发生一种以胃壁增厚、萎缩、溃烂为主要特征的“烂胃病”。从患烂胃病的耳状幼体中分离到1株细菌LW-1,人工回接感染实验证实其具有较强的致病性,并与自然发病症状相同。通过API半自动化鉴定和常规的生理生化试验的结果表明,LW-1具有弧菌属的特征,其表型特征与灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)相似。对该菌株16S rRNA基因序列分析和构建系统发生树。结果显示,菌株LW-1与灿烂弧菌的亲缘关系最近,相似率达到99.8%。菌株LW-1可鉴定为灿烂弧菌,并视为耳状幼体烂胃病的致病原之一。通过对多起仿刺参苗期烂胃病的调查研究表明,烂胃病病原也具有多样性和复杂性,并与投喂老化腐败的单胞藻饵料有关。[中国水产科学,2006,13(6):908-916]

关键词: 仿刺参;育苗;烂胃病;灿烂弧菌;16S rRNA

中图分类号: S945.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2006)06-908-09

仿刺参(常用名刺参)(*Apostichopus japonicus*)主要分布在太平洋西岸,包括俄罗斯、日本、朝鲜、韩国和中国北部沿海。日本于20世纪30年代率先进行刺参的育苗技术研究,中国在20世纪的80年代中期也进行了人工育苗技术的研究探讨,并取得了突破性进展;90年代末期运用人工养殖技术进行尝试,于21世纪初养殖面积迅速扩展,一举发展成为北方沿海水产养殖的支柱产业,经济效益和社会效益显著^[1]。然而,养殖规模的急剧扩大加之养殖技术不规范,致使养殖刺参相继发生了多种疾病,其中育苗期耳状幼体的烂胃病引起业界的关注。该病传染快,死亡率高,危害较大,时常因幼体的死亡率高达70%以上而不能正常安排苗种生产。因此,烂胃病的发生与否可视为育苗过程中培苗成败的关键环节之一。近年来,有学者对烂胃病病症、流行情况进行了相关报道^[1-2],但缺乏对其病原学等方面深入系统的研究。本文较全面报道了刺参耳状幼体烂胃病的特征、流行情况、组织病理学、致病原鉴定、人工回接感染等试验性结果,并揭示了刺参耳状幼体烂胃的病变原因,以期对育苗期烂胃病的防治提供理论依据和参考。

1 材料与方法

1.1 耳状幼体来源

2005年6月份,山东省蓬莱、长岛、威海地区数家刺参育苗场的中耳幼体发现明显的烂胃病症状,时值投喂牟氏角毛藻(*Chaeloceros muelleri*)作为饵料。选取5家育苗场的幼体进行检验,每家育苗场取正常和各期发病幼体各4万只,个体长度为400~800 μm。带水、充氧运输,带回实验室后进行观察和进一步分析。

1.2 环境因子调查

用YSI 556便携式水质测定仪测定养殖水体温度、盐度、溶解氧、pH等水质指标,平板计数法测定水源、池水及饵料中的细菌总数,并观察、分析优势菌株的菌落特征。

1.3 病症的显微观察

用消毒的筛绢网(200目)富集耳状幼体,并用灭菌海水冲洗,然后用吸管将耳状幼体置于滴有无菌生理盐水(1.5%)的凹玻片凹面处,再于光学显微镜下观察幼体的病症和胃内细菌感染情况。与正常幼体进行形态学和病理学比较,并描述各期发病幼体的症状来阐明病变过程。

收稿日期:2006-02-21; 修订日期:2006-04-21.

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

作者简介:王印庚(1963-),博士,研究员,从事水产动物疾病学研究. Tel:0532-85841732, E-mail: wangyg@ysfi.ac.cn

1.4 细菌分离培养

将冲洗干净的耳状幼体放入玻璃研磨器中研碎,在无菌条件下用接种环蘸取少许破碎的幼体组织,接种于胰蛋白大豆肉汤(TSB)平板上,置于25℃下培养24 h后观察结果。对5家刺参育苗场患烂胃病耳状幼体微生物的分离表明,优势菌LW-1的检出率为最高(表1)。为此,本研究进行的人工回接感染和病原鉴定工作以菌株LW-1为主。

1.5 人工回接感染

中耳幼体体长600~800 μm,由青岛胶南一家刺参育苗场提供,幼体健康,没有病症。以30 L大塑料箱为水浴保温器皿,内置3个3 L的小塑料箱为养殖器皿。全部器皿以漂白粉做消毒处理,灭菌海水冲洗干净。每个大塑料箱加自来水至1/4,置加热棒于箱底,控制水温20℃;在养殖用小塑料箱中各放置1块气石,并注入1 500 mL灭菌海水,放入并调节健康耳状幼体的密度为0.8/mL(每个养殖箱装有健康中耳幼体约1 200只),微充气培养。

菌株LW-1感染浓度设6个梯度,分别为 10^4 CFU/mL、 10^5 CFU/mL、 10^6 CFU/mL、 10^7 CFU/mL和 10^8 CFU/mL,并设1个对照(不加细菌),上述各组设2个平行组同时进行。投喂牟氏角毛藻25 000/(mL·d⁻¹),每24 h换水1/3,每隔6 h在光学显微镜下观察1次耳状幼体的变化情况。

1.6 细菌的透射电镜观察

无菌操作挑取单菌落,用2%戊二醛电镜固定液固定数分钟,取1滴固定好的菌液置于铜网上,以3%磷钨酸负染,晾干,最后在透射电镜下观察细菌的形态特征。

1.7 细菌学常规鉴定与API人工鉴定

1.7.1 生理生化试验 细菌的生理生化试验按《伯杰氏细菌鉴定手册》^[3]和《常见细菌系统鉴定手册》^[4]方法进行。

1.7.2 API半自动化鉴定 将纯化的菌株LW-1接种于TSB平板,25℃下培养24 h后挑取菌落均置于生理盐水中,用API/ATB光电比浊仪测量配成0.5 mol/L cFarland的菌悬液,吸取菌悬液(55 μL/孔)接种于ID32E测试卡,置25℃培养箱孵育24 h,取出测试卡人工读卡。

1.8 细菌的16S rRNA基因序列分析

1.8.1 PCR模板DNA的制备 将纯化细菌接种在TSB平板上,25℃培养过夜。取单菌落悬浮液于50 μL无菌生理盐水(1.5%)中,在100℃水浴加热5 min,该溶液即为进行PCR的模板DNA。

1.8.2 16S rRNA基因序列的PCR扩增与测序 扩增基因的正向引物为27F:5'-AGAGTTTGAT-CTGGCTCAG-3'(对应于*E. coli* 16S rRNA基因的第8~27 bp位置),反向引物1492R:5'-TACGGCTAC-CTTGTTCAGACTT-3'(对应于*E. coli* 16S rRNA基因的第1 492~1 510 bp位置)。引物由上海博雅生物技术公司合成。在10 μL的PCR反应体系中含有:1×PCR缓冲液1 μL(含Mg²⁺),4×dNTP 0.8 μL(200 μmol/L),正向、反向引物各0.4 μL(0.5 μmol/L),r-Taq聚合酶0.05 μL(5 U/μL),去离子水6.85 μL,模板DNA原液1 μL。PCR反应条件为:第一阶段94℃变性4 min;第二阶段94℃平衡30 s,55℃退火30 s,72℃延伸1 min 40 s,此阶段进行35个循环;第三阶段72℃温育15 min^[5-6]。经PCR扩增的产物进行1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测以证明PCR扩增的效果后,将PCR的最终扩增产物直接交给上海博雅生物技术公司进行纯化和基因序列测序。

1.8.3 系统发育树构建 将测试菌株的16S rRNA序列与互联网NCBI的基因库中细菌的16S rRNA比对,用OMEGA软件进行对比分析,确定其相似性,再用TREECON软件采用邻位相连法(Neighbor-joining)获得测试菌株的系统发育树^[7]。

2 结果

2.1 发病特征

刺参耳状幼体的烂胃病在中国山东、辽宁及河北等省都有发现。对一些海参育苗场烂胃病的调查发现,该病多发生在中耳和大耳幼体时期,以大耳幼体后期发生率较高。在每年刺参育苗期的5~7月份发生,高温和幼体培育密度过高时更容易发病。严重时每批刺参幼体的死亡率常高达70%~90%(表1),不能正常安排育苗生产。

表 1 取样育苗场的水质指标、病情和分离细菌的特征

Tab. 1 Water quality, disease condition and characters of bacterial isolates in investigated hatcheries

育苗场 Hatchery	场家所在地 Location	水质指标 Water quality	症状 Symptom	死亡率/% Mortality	优势菌株 Dominant bacteria
A	蓬莱市新港区 Xingang distr- ict, Penglai	pH 8.0 ~ 8.4; 20 ~ 21 ℃; S 27.5; DO 5.0 ~ 6.0 mg/L。细菌总数: 1.2×10^5 CFU/mL, LW-1 占 50%。 Total bacterial count was 1.2×10^5 CFU/mL, and LW-1 counted for 50%.	出现明显烂胃症状, 幼体胃壁增厚、萎缩、直至溃烂 Shrinkage and ulcer in stomach	90	LW-1
B	烟台市长岛县 Changdao, Yantai	pH 8.2 ~ 8.7; 20 ~ 21 ℃; S30; DO5.0 ~ 6.0 mg/L。细菌总数: 3.2×10^4 CFU/mL, LW-1 占 40%。 Total bacterial count was 3.2×10^4 CFU/mL, and LW-1 counted for 40%.	出现明显烂胃症状, 幼体胃壁增厚、萎缩、溃烂 Shrinkage and ulcer in stomach	80	LW-1
C	蓬莱市铜井村 Tongjing, Peng- lai	pH 8.0 ~ 8.4; 20 ~ 21 ℃; S 28; DO 5.0 ~ 6.0 mg/L。细菌总数: 1.1×10^5 CFU/mL。与幼体分离优势菌相一致的菌株占 35%。 Total bacterial count was 1.1×10^5 CFU/mL, and the dominant bacteria (different from LW-1) counted for 35%.	出现明显烂胃症状, 同时耳状幼体体壁发生溃疡 Shrinkage and ulcer in stomach, and body lysis	90	不同于 LW-1 Different from LW-1
D	蓬莱市海头村 Haitou, Penglai	pH 8.0 ~ 8.6; 20 ~ 21 ℃; S 28; DO 5.0 ~ 6.0 mg/L。细菌总数: 2.6×10^4 CFU/mL。与幼体分离优势菌相一致的菌株占 60%。 Total bacterial count was 2.6×10^4 CFU/mL, and the dominant bacteria (different from LW-1) counted for 60%.	同时出现明显烂胃症状和烂边现象 Shrinkage and ulcer in stomach, and body lysis	70	不同于 LW-1 Different from LW-1
E	威海市环翠区 Huancui dis- trict, Weihai	pH 8.1 ~ 8.6; 20 ~ 21 ℃; S 30; DO 5.0 ~ 6.0 mg/L。细菌总数: 6.3×10^4 CFU/mL, LW-1 占 65%。 Total bacterial count was 6.3×10^4 CFU/mL, and LW-1 counted for 65%.	出现明显烂胃症状 Shrinkage and ulcer in stomach	80	LW-1

与正常幼体比较,发病幼体的症状主要表现为: 幼体胃壁增厚、粗糙,界限变得模糊不清,继而从正常的充盈梨形逐步萎缩变小、变形,严重时整个胃壁发生糜烂,继而影响到整个幼体出现体壁溃烂,最终导致苗体死亡(图 1)。在高倍显微镜下,被感染幼

体胃中观察到有大量的短杆状细菌,运动活跃。患病幼体的摄食能力明显下降或不摄食,生长和发育迟缓,形态、大小不齐,从耳状幼体到樽形幼体的变态率较低。



图 1 光学显微镜下耳状幼体“烂胃病”的病变过程

a: 正常的耳状幼体,胃饱满、呈梨形(箭头);b: 胃壁增厚、粗糙(箭头);c: 胃萎缩、变小,停止进食(箭头);d: 死亡解体的幼体。

Fig. 1 Pathogenesis of auricularia with stomach ulcer disease

a: Normal auricularia(arrow); b: Stomach wall becoming thick and rough(arrow); c: Shrinkage of the stomach(arrow); d: Body lysis(arrow).

2.2 环境因子

调查结果显示,各家育苗场的常规水质因子均保持在正常范围之内(表1)。然而,养殖池水的细菌总数都偏高,在 $(2.6 \times 10^4) \sim (1.2 \times 10^5)$ CFU/mL之间。每家育苗场的养殖池水中均发现优势菌,并与发病的耳状幼体中分离的优势菌基本一致。另外,优势菌 LW-1 的检出率为最高。

2.3 组织病理

正常耳状幼体的胃腔较大,呈充盈的梨形;胃壁由单层柱状细胞组成,排列整齐、完整、有序(图2-A)。被感染幼体的胃壁上皮细胞发生明显变化,细胞出现增生,胃壁变厚,着色较浓(图2-B);造成胃黏膜上皮细胞坏死,脱落,胃腔及胃壁组织中发现大量细菌存在;同时,食道括约肌细胞有炎症细胞浸润。严重感染的幼体,其胃壁坏死、萎缩,继而胃腔也变小(图2-C)。总言之,胃壁感染后,较明显的变化是胃壁上皮细胞增生,核肿胀,着色深(图2-D),黏膜上皮细胞发生崩解。以上病理现象可见该

病主要是造成食道括约肌和胃黏膜上皮损伤、病变,导致摄食障碍。在组织病理切片中,患病的胃中大多没有食物也证实了这一点。

2.4 人工回接感染

以育苗场 A 分离得到的优势菌 LW-1 为感染材料,对健康刺参的耳状幼体进行浸浴感染。菌液浓度为 1.0×10^8 CFU/ml 时,6 h 的死亡率已在 50% 以上,24 h 全部死亡(表2);其他低浓度组均出现了不同程度的典型症状,即受感染的幼体胃壁出现增厚、萎缩、溃疡现象,摄食量减少,活力减弱,变态率低,在感染后期同时伴有烂边症状。而对照组发育和变态均属正常。对人工回接感染试验所得病状耳状幼体再进行细菌分离和检测表明,其菌株的生理生化指标与 LW-1 相同,即属于同一菌株。人工回接感染后幼体数量、变态率、死亡率的变化和病症发生,说明菌株 LW-1 对刺参耳状幼体的致病性极强。

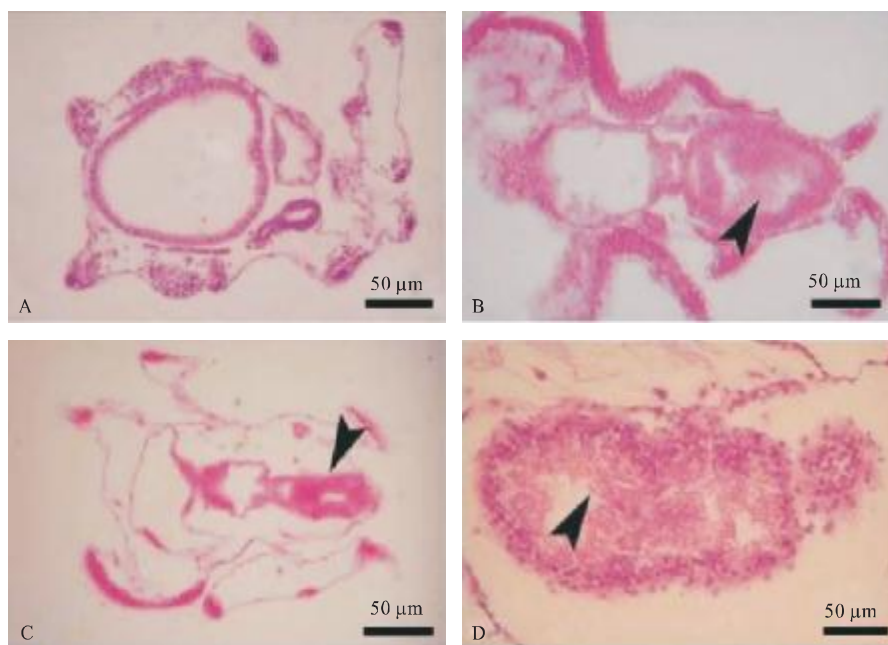


图2 患烂胃病耳状幼体的组织病变(HE染色)

A: 正常的胃呈充盈的梨形,胃上皮细胞排列整齐、完整(箭头); B: 胃壁上皮细胞增生、变厚,上皮细胞坏死、脱落(箭头); C: 胃腔萎缩、变小(箭头); D: 胃壁上皮细胞增生,核肿胀、着色深(箭头)。

Fig. 2 Histological changes of infected auricularia

A: Pear-like stomach of normal auricularia (arrow); B: Stomach epithelium appeared in hyperplastic and thicken, epithelium cells were necrotic and shed off (arrow); C: Shrink stomach became small (arrow); D: Stomach epithelium was hyperplastic, nucleus was swollen and heavily stained (arrow).

表 2 菌株 LW-1 的人工感染试验结果
Tab. 2 Results of artificial infection test by bacterium LW-1

项目 Item	菌液浓度/(CFU · mL ⁻¹) Dosage of immersion bacterium					
	0(对照) Control	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
结束时幼体密度/ (ind · mL ⁻¹) The density of auricu- laria after infection	0.5	0.5	0.3	0.1	0	0
变态率/% Metamorphosis rate	50	20	10	5	0	0
48 h 死亡率/% 48 h mortality	20	50	70	90	100	100
幼体状态 The status of auricu- laria	胃呈梨型,饱 满,摄食正常; 幼体大小正常, 变态率较高. Larvae were in normal size, pear-shaped stomach, and with high m- etamorphosis ra- te.	少数个体胃壁 增厚、萎缩、溃 疡,摄食较正 常;幼体大小正 常,变态率降 低. Larvae were in normal size, with decreased meta- morphosis rate, A little having sto- mach ulcer sym- ptom	半数个体胃壁 增厚、萎缩、溃 疡,摄食量减 少,活力减弱; 变态率低. Larvae were we- ak, with low me- tamorphosis ra- te, half having stomach ulcer sy- mptom.	大半个体胃壁 增厚、萎缩、溃 疡,极少摄食和 变态;幼体小型 化,大量死亡. The most larvae rarely fed with- out metamorpho- sis, in smaller siz- e, having stom- ach ulcer symp- tom and high mortality.	所有幼体的胃 萎缩、溃疡,不 摄食,不变态; 停止发育,48 h 全部死亡. All larvae had stomach ulcer sym- ptom. Stop feed- ing and metamo- rphosis. All die after infection of 48 h.	幼体不正常,感 染 6 h 死亡率 达 50%;24 h 全 部死亡. All larvae were abnormal, half died after infec- tion of 6 h, and all died after 24 h.

注:各组起始时幼体密度均为 0.8 pcs/mL.
Note: The density of auricularia in each group before infection was 0.8 pcs/mL.

2.5 菌株 LW-1 常规生理生化试验和 API32E 试
验条鉴定

LW-1 为革兰氏阴性,在 25 ℃ TSB 培养基培
养 24 h 条件下,菌落圆形,边缘光滑,不透明,呈微
黄。在 TCBS 培养基上生长呈黄色。经透射电镜观
察,该菌的大小为(0.7 ~ 0.9) μm × (1.5 ~ 1.7)
μm,短杆状,略呈弧形,具有极生单鞭毛,大约是菌
体长度的 2.5 倍(图 3)。对 O/129(10 μg,150 μg)
敏感,葡萄糖发酵型,不存在精氨酸双水解酶、鸟氨
酸脱羧酶、赖氨酸脱羧酶,生长需要 Na⁺,45 ℃ 以上
和 4 ℃ 以下不能生长。参照《伯杰细菌鉴定手册》
(第九版)^[3]和《常见细菌系统鉴定手册》^[4]进行了
40 多项生理生化指标的测定,显示菌株 LW-1 与
灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)的生理生化特性相似
(表 3)。

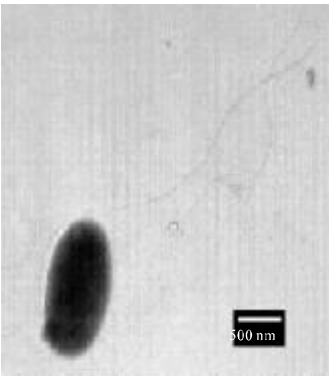


图 3 LW-1 的电镜照片
Fig. 3 Photograph of the bacterium LW-1 under elec-
tronmicroscope

表3 菌株 LW-1 与灿烂弧菌标准株的形态及生理生化特征比较

Tab. 3 Morphological, physiological and biochemical characteristics of bacterium LW-1 compared with standard strain *Vibrio splendidus*

项目 Item	LW-1	灿烂弧菌 <i>Vibrio splendidus</i>	项目 Item	LW-1	灿烂弧菌 <i>Vibrio splendidus</i>
运动性 motility	+	+	乳糖 Lactose	-	-
O/129 敏感(10 µg) Sensitivity to O/129	+	+	精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	-	-
O/129 敏感(150 µg) Sensitivity to O/129	+	+	葡萄糖 Glucose	+	+
TCBS 生长 Growth on TCBS	+	+	甘露糖 Mannose	-	-
0% NaCl 生长 Growth on 0% NaCl	-	-	L-鼠李糖 L-rhamnose	-	-
3% NaCl 生长 Growth on 3% NaCl	+	+	蔗糖 Sucrose	-	-
6% NaCl 生长 Growth on 6% NaCl	+	+	密二糖 Pantotheryl alcohol	-	-
8% NaCl 生长 Growth on 8% NaCl	+	+	麦芽糖 Maltose	-	-
10% NaCl 生长 Growth on 10% NaCl	-	+	鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-	-
4 °C 生长 Growth at 4 °C	+	+	赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	-	-
25 °C 生长 Growth at 25 °C	+	+	甘露醇 Mannose	+	+
28 °C 生长 Growth at 28 °C	+	+	阿拉伯糖 Arabinose	-	-
35 °C 生长 Growth at 35 °C	+	+	山梨醇 Sorbitol	-	-
40 °C 生长 Growth at 40 °C	+	-	肌醇 Inositol	-	-
45 °C 生长 Growth at 45 °C	-	-	N-乙酰-葡萄糖胺 N-acetyl glucosamine	-	-
氧化酶 Oxidase	+	+	脲酶 Urease	-	-
接触酶 Catalase	+	+	柠檬酸 Citrate	-	-
M-R methyl red	-	-	明胶酶 Gelatinase	+	+
V-P vogus-proskauer reaction	-	-	β-葡萄糖苷酶 β-glucuronidase	+	+
纤维二糖 Cellobiose	+	d	β-半乳糖苷酶 β-galactoside	+	+

注:“+”——阳性;“-”——阴性;“d”——40%~60%阳性率。

Note:“+”——positive;“-”——negative;“d”——positive ratio 40%~60%.

2.6 16S rRNA 基因序列同源性分析及系统发育树构建

为了进一步确定菌株 LW-1 的分类地位,测定了菌株 LW-1 的 16S rRNA 部分序列。将 PCR 扩增的片段进行 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测,得到了 1 500 bp 左右的片段(图 4)。

测定序列长度为 1 395 bp,将 LW-1 的 16S rRNA 的基因序列与 GenBank 中已经录入的菌株进行比对,发现与弧菌属的 16S rRNA 序列自然聚类(表 4)。从中选出 16 株最相近的菌株构建了系统进化树(图 5),结果发现 LW-1 与两株灿烂弧菌亲缘关系最近,其中与最近的一株的同源性达到 99.8%。

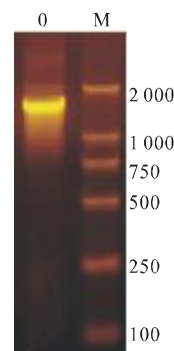


图4 菌株 LW-1 的 16S rRNA 经 PCR 扩增后的电泳结果

Fig. 4 Electrophoresis product of 16S rRNA of bacterium LW-1 amplified by PCR

表 4 16S rRNA 序列来源和数据库存取号

Tab. 4 Bacterial strains for phylogenetic dendrogram construction and their access number on GenBank

细菌 Bacteria	Access numbers in GenBank	细菌 Bacteria	Access numbers in GenBank
<i>Vibrio splendidus</i> 1	AY046955	<i>Vibrio</i> sp. 9	AF242272
<i>Vibrio splendidus</i> 2	AJ874361	<i>Vibrio</i> sp. 10	AF456340
<i>Vibrio pomeroyi</i> 3	AJ491290	<i>Vibrio</i> sp. 11	AF456339
<i>Vibrio splendidus</i> 4	AY129277	<i>Vibrio</i> sp. 12	AJ316193
<i>Vibrio lentus</i> 5	AY292936	<i>Vibrio</i> sp. 13	AB038026
<i>Vibrio aestuarianus</i> 6	AF172840	<i>Vibrio</i> sp. 14	AF456335
<i>Vibrio pomeroyi</i> 7	AJ560649	<i>Vibrio</i> sp. 15	AJ244774
<i>Vibrio chagasii</i> 8	AJ490157	<i>Vibrio</i> sp. 16	AB038025

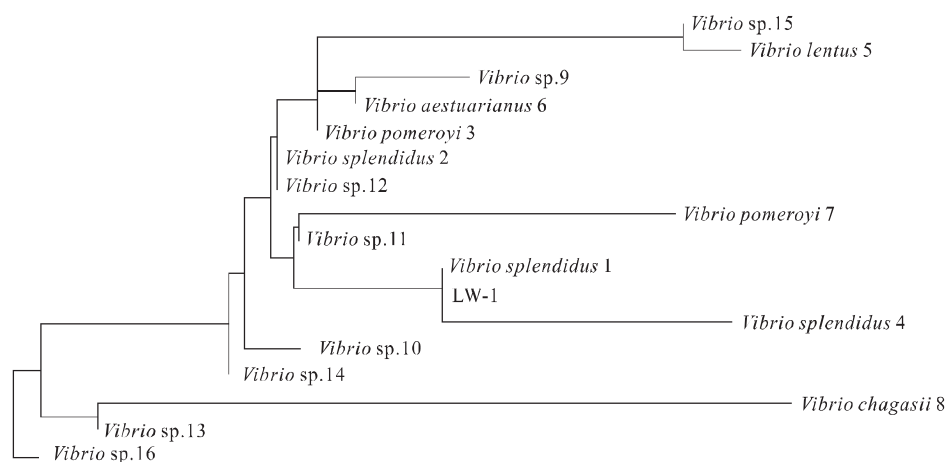


图5 菌株 LW-1 的 16S rRNA 基因序列聚类分析结果

Fig. 5 Results of 16S rRNA cluster analysis based on 16S rRNA sequence of LW-1

3 讨论

鉴于菌株 LW-1 的生理生化特性和 16S rRNA 基因序列与灿烂弧菌相似性极高,因此菌株 LW-1 被鉴定为灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)。通过活体显微检查、组织病理分析和分离培养,未发现明显与发病相关的其他微生物;养殖池水的水质指标正常,所以排除单一水质恶化致病的可能性。分离的 LW-1 菌株可在人工回接感染条件下使正常幼体产生与自然发病相同的症状,再次分离的细菌与之相同,符合柯赫法则。因此,灿烂弧菌被视为烂胃病的重要致病原之一。

灿烂弧菌可以分为生物 I 型和生物 II 型,2 种生物型都具有致病性。在养殖鱼类中,灿烂弧菌致病的实例已有多次报道,Gatesoupe 等用 6 株从大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)幼体中分离出的灿烂弧菌可以引起大菱鲆很高的死亡率^[8]。在西班牙西北部加利西亚省报道的养殖大菱鲆嘴部出血病,病原鉴定为灿烂弧菌生物 I 型^[9]。在中国,莫照兰等^[5]把患腹水症的牙鲆苗中分离的病原菌鉴定为灿烂弧菌生物 II 型,该病原菌导致牙鲆苗明显的病变和死亡。然而,灿烂弧菌导致刺参致病尚属首次报道,有关其生物类型和对刺参的致病机理也有待进一步研究和分析。

在对多起仿刺参苗期烂胃病调查研究过程中,笔者也发现不同于菌株 LW-1 的其他优势致病菌,这些细菌也可在人工回接感染时导致耳状幼体发生烂胃症状。由此说明,烂胃病病原具有多样性和复杂性。另外,在研究过程中也发现,烂胃病的发生多与投喂老化腐败的单胞藻饵料有关,在多数情况下老化腐败的单胞藻中含有大量细菌,且与烂胃中分离出的细菌种类相同。这一现象提示,单胞藻携带大量病原菌,与烂胃病的发生密切相关。由于刺参耳状幼体主要以单胞藻为饵料,所以预防烂胃病的发生,需要从生产管理入手,严格切断感染源,特别是应杜绝以老化的单胞藻做为饲育饵料进行投喂。

有学者曾认为烂胃病的发生与高密度幼体培

育、投喂老化和低质、营养搭配不当的单胞藻有关^[10-11]。这一现象具有一定的普遍性和客观性,但长期以来没有与之相关的更进一步微生物感染分析。本研究着重以微生物学的手段研究烂胃病的发生及其病理过程,初步揭示了这一“烂胃”现象的实质性变化。鉴于烂胃病病原具有多样性和复杂性,今后将继续综合分析重要病原的病原学、病原生态学特征,建立快速诊断和疾病防治技术,为刺参育苗过程中防治烂胃病提供理论依据和技术支撑。

参考文献:

- [1] 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(3): 1-7.
- [2] 邓欢,隋锡林. 刺参育苗期常见疾病[J]. 水产科学,2004,23(3):40.
- [3] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, et al. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. Ninth Edition. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994.
- [4] 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. 114-118.
- [5] 莫照兰,茅云翔,陈师勇,等. 养殖牙鲆鱼苗腹水症病原菌的鉴定及系统发育学分析[J]. 海洋与湖沼,2003,34(2):131-141.
- [6] 塞文婴,东秀珠. 定向进化同源基因在细菌系统进化研究中的应用[J]. 微生物学通报,2000,27(5):377-381.
- [7] 史成银,王印庚,黄健,等. 中国大菱鲆虹彩病毒主要衣壳蛋白基因的 PCR 扩增及序列分析[J]. 中国水产科学,2005,12(5):588-593.
- [8] Lupiani B, Dopazo C P, Ledo A, et al. New syndrome of mixed bacterial and viral etiology in cultured turbot *Scophthalmus maximus*[J]. J Aquat Anim Heal, 1989, 1: 197-204.
- [9] Gatesoupe F J, Lambert C, Nicolas J L. Pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*[J]. Appl Microbiol, 1999, 87(5):757-763.
- [10] 于东祥,孙慧玲,陈四清,等. 海参健康养殖技术[M]. 北京:海洋出版社,2005.
- [11] 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[C]. FAO Fisheries Technical Paper, 2004, 463:297-310.

Stomach ulcer disease in auricularia of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) and its etiological identification

WANG Yin-geng¹, SUN Su-feng^{1,2}, RONG Xiao-jun¹

(1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Life Science and Technology College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: A high mortality occurred in reared auricularia of sea cucumber *Apostichopus japonicus* along the coastal area of Shandong and Liaoning Provinces from May to July in recent years. The syndrome was called stomach ulcer disease, which was characterized by hyperplasia, atrophy, and ulceration in the stomach tissues. The disease can cause high mortality of auricularia (up to 70% – 90%), often resulting in failure of breeding practice. One dominant bacterium LW – 1 was often isolated from the affected auricularia, and it was verified to be the pathogen causing the stomach ulcer disease through an artificial infection test. Traditional physiological and biochemical methods as well as semi-automatic identification through API system were applied in the bacterial classification. The result showed that LW – 1 had the similar characters as *Vibrio splendidus*, having short rods with a single polar flagellum, forming yellow colony on TCBS agar. Further results from 16S rRNA sequence analysis showed that the sequence of bacterium LW – 1 was highly identical to *Vibrio splendidus*, with 99.8% identity. Thus bacterium LW – 1 was identified as *V. splendidus*, and regarded as one of the major pathogens causing stomach ulcer disease. In addition, this investigation also revealed that the causative pathogens are complicated and comprise more microbes associated with the disease condition, and the occurrence of the disease was associated with the unadvisable use of aging microalgae. This paper is the first report to reveal the causative agents and the pathogenesis of stomach ulcer disease. It is useful to provide information and techniques for healthy management in sea cucumber cultivation. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13 (6): 908 – 916]

Key words: *Apostichopus japonicus*; breeding; stomach ulcer disease; *Vibrio splendidus*; 16S rRNA

Corresponding author: WANG Yin-geng. E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn