

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

王印庚¹, 方波^{1,2}, 张春云³, 荣小军¹

(1. 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国海洋大学 水产学院, 山东 青岛 266003; 3. 哈尔滨工业大学 海洋学院, 山东 威海 264209)

摘要:2003~2005年冬、春季, 山东省和辽宁省众多养殖区域的保苗期刺参(*Apostichopus japonicus*)暴发了较为严重的传染性疾病——“腐皮综合征”。该病波及面广, 传染性强, 死亡率高达90%以上。发病症状主要表现为: 厌食、摇头、肿嘴、排脏、身体萎缩、口部溃烂乃至体表大面积溃腐。本研究对症状较为典型的3家海参保苗期的发病幼参进行了详细的病原学分析, 从所有病参的病灶组织分离得到了1种占有绝对优势的菌株, 经人工感染实验证明它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 and 16S rDNA 分子生物学方法对该菌进行的分类鉴定表明, 导致保苗期刺参“腐皮综合征”的致病菌是假交替单胞菌(*Pseudomonas nigricauda*)。同时也对3家养殖场刺参保苗养殖系统进行了分析研究。结果表明, 水源中细菌含量不高, 为 $(0.8 \times 10^2) \sim (1.2 \times 10^2)$ cells/mL, 其特征与病灶处优势菌不同; 而饵料中细菌含量最高可达 3.2×10^6 cells/mL。饵料、池水和池底污物的优势菌与病灶处优势菌基本一致, 说明饵料可能是病原菌的主要来源。本研究首次揭示了“腐皮综合征”导致保苗期刺参大规模死亡的原因及其致病源, 对刺参健康养殖和病害防治具有重要的指导意义。[中国水产科学, 2006, 13(4): 610~616]

关键词:刺参; 水产养殖; 腐皮综合征; 细菌; 假交替单胞菌

中图分类号: S941.42 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2006)04-0610-07

近年来, 随着人民生活水平的日益提高, 海珍品特别是海参消费量迅速增加。北方沿海刺参的人工养殖随之兴起, 短短几年间成为中国沿海水产养殖重要的新兴产业之一^[1]。2004年, 山东省海参养殖面积达2.4万hm², 存养量13亿头, 海参鲜品产量达5.7万t, 产值达70亿元以上^[2]。然而, 养殖的过快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, 严重制约了该产业的可持续发展^[3]。笔者通过对多家养殖场海参保苗期(也称中间培育期)发病海参检查发现, 患病幼参的症状基本相同, 从摇头、口肿、排脏、萎缩、附着力下降、体表腐烂到死亡, 养殖业者通常称之为“肿嘴病”、“化皮病”等。病变过程中具有从病灶表皮逐步被腐蚀而导致溃烂的显著特点和病症发展变化的多样性, 该病被命名为“腐皮综合征”^[3]。在2003~2005年的流行病学调查中发现, 该病波及面广, 传染性强, 死亡率极高; 山东省和辽宁省大部分保苗期幼参均发生了相似的病症。目前国内外有关海参病害的研究较少^[1,3-5,12]，“腐皮综合征”的

病因也暂无结论。为了查清该病的具体病因, 笔者对症状较为明显的多家育苗场的发病幼参样品进行了详细的病原学和致病力分析, 同时也对刺参保苗养殖系统的水源、养殖池水、池底污物、饵料等进行了调查分析, 以期查找出病原的传染源, 为海参的育苗生产和健康管理提供理论依据和参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集与流行病学调查

病参样品取自山东省牟平、即墨、胶南地区3家发病刺参(*Apostichopus japonicus*)养殖场(分别记为A、B、C), 各家取具有明显“腐皮综合征”症状的幼参30~50头。同时分别采取养殖系统的水源、养殖池水、池底污物、饵料等样品。用来取样的玻璃瓶或塑料袋经灭菌处理。所有样品用保温箱加冰保存, 带回实验室后在3h内完成细菌的分离工作。

在取样过程中, 测量和记录养殖池水的常规水质指标, 了解养殖海参的养殖过程、养殖管理, 观察和总结发病特征及流行情况(表1)。

收稿日期: 2005-11-21; 修订日期: 2005-12-25。

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

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

表1 患“腐皮综合征”的三家刺参养殖场的发病情况
Tab.1 The information about disease in three sea cucumber farms

场家 Farm	所在地 Location	取样时间 Sampling time	体长/cm Body length	养殖密度 (头·m ⁻²) Stocking density	常规水质指标 Water quality	发病时间 Disease occurrence	病症 Symptom	死亡率/% Mortality
A	牟平 Mouping	2004-12	1.7	12	正常 normal	2004-11	摇头、排脏、溃烂 shaking head, evisceration, skin ulcer	>90
B	即墨 Jimo	2005-01	2.5	9	正常 normal	2005-01	摇头、排脏、溃烂 shaking head, evisceration, skin ulcer	90
C	胶南 Jiaonan	2005-02	2.8	10	正常 normal	2005-01	摇头、排脏、溃烂 shaking head, evisceration, skin ulcer	≈100

1.2 显微观察与细菌分离

1.2.1 显微观察 在无菌条件下,首先对病参进行肉眼观察和解剖,然后取病灶组织制成水浸片进行显微观察,对细菌、霉菌、寄生虫的种类和数量进行初步的观测和记录,以分析“腐皮综合征”与微生物种类之间的必然关系。

1.2.2 细菌分离及纯化 在无菌条件下,取病灶部位组织少许,剪碎,用无菌的研钵研磨后用接种环挑取少许碾碎的组织及黏液,在灭菌的 TSB 固体培养基上划线分离。于 28℃ 恒温生化培养箱培养 24 h。挑取培养基上优势菌落,重复进行培养 3 次,以获得纯化的菌株。

1.2.3 养殖系统中异养菌的数量及其组成检测 分别取水源、池水、池底污物、饵料,用无菌海水进行 10 倍梯度系列稀释,分别取 0.1 mL 涂布 TSB 平板上,每个稀释浓度涂布 2 个。置 28℃ 培养箱中培养 2~4 d。观察平板上细菌的菌落形态特征,分类、计数,确定并分离纯化优势度较高的菌株。

1.3 病原菌的分类鉴定

1.3.1 形态学观察 纯培养的细菌于 28℃ 培养 24 h 后,按常规方法进行革兰氏染色和显微观察。另外,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。

1.3.2 生理生化测定 采用法国-梅里埃(BioMérieux)公司的 API-32E 鉴定系统并结合传统的手工鉴定方法对纯化菌株进行生理生化指标的测试。

1.3.3 病原菌的 16S rDNA 序列分析 采用细菌 16S rDNA 序列扩增的通用引物(正向引物为 27f;

5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物为 1492r: 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'),对纯培养的细菌 16S rDNA 序列进行 PCR 扩增,扩增产物交由上海博亚生物技术有限公司测序。测序的结果登录 GenBank 进行 Blast,从中选取 12 株与待分类菌株序列相似的菌株,采用 Clustalw 软件进行多序列匹配分析后用系统发生推断软件包 PHYLIP3.65 进行该菌的系统发育树的构建^[6]。

1.4 人工回接感染实验

1.4.1 实验用参 实验用刺参是从青岛崂山某养殖场获得的健康幼参,体质量 1.0~2.4 g,体长 1.6~4.0 cm。将待试个体于塑料水缸中暂养 3 d,发现无异常后进行正式实验。

1.4.2 菌悬液制备 将纯培养菌株接种于新鲜 TSB 琼脂培养基上,28℃ 培养 24 h 后,用无菌生理盐水洗下菌落,制成菌悬液,以麦氏比浊法制得 1.0×10^7 cells·mL⁻¹ 浓度的菌悬液。

1.4.3 攻毒实验 将每缸设为一组(每组 10 头),共 3 组分别用于所分离得到的 3 株菌(从上述 3 家病参分别分离得到的优势菌)的攻毒实验,每头腹腔注射 0.01 mL 菌悬液;同时设对照组,注射 1.5% 生理盐水。整个实验期间,实验水温保持在 18~20℃,盐度 25~30,每天换水量 50%,充气培养。人工感染后,记录刺参的体表变化、运动、摄食及死亡情况,连续观察 14 d。

2 结果

2.1 病症及流行情况

经过肉眼观察和解剖发现,该病的症状表现为:初期感染的病参有摇头现象,口部肿胀,触手黑浊,

对外界刺激反应迟钝,不能收缩与闭合,继而大部分海参会出现排脏现象;中期感染的刺参身体萎缩、僵直,体色变暗,附着力下降;肉刺变白、秃钝,口腹部先出现小面积溃疡,形成蓝白色斑点;感染末期病参的病灶扩大、体壁溃疡处增多,表皮大面积腐烂(图1),最后导致海参死亡,溶化为鼻涕状的胶体。

从多家养殖场的调查结果来看,该病主要在冬、春季暴发,发病的温度范围在2~15℃。疾病发生率在80%以上,死亡率在30%~90%,个别养殖场甚至死亡率达到了100%。自发现病情开始,感染后的参苗在5~7 d内锐减,表现为急性死亡。

2.2 优势菌分离结果

对病参病灶组织进行的水浸片显微观察表明:



图1 患有腐皮综合症的幼参

Fig.1 Sea cucumbers associated with the skin ulcer syndrome

2.3 养殖系统中细菌的培养结果

从表2可以看出,3家养殖场所用的饵料中细菌含量最高,可达 3.2×10^6 cells/mL,并且饵料中优势菌特征与刺参病灶处分离的优势菌以及水源、池底污物和池水中的优势菌具有一致性。经生理生化的初步鉴定表明:分离的优势菌与饵料中的优势菌同属于一种菌株(表4)。分析结果也发现,水源的细菌含量不高,为 $(0.8 \times 10^2) \sim (1.2 \times 10^2)$ cells/mL,其特征与病灶处优势菌不同;但饵料、池水和池底污物的优势均与病灶处优势菌基本一致,说明水源不是病原菌的传播途径,饵料则可能是病原菌的来源。

2.4 人工感染实验

人工感染实验表明,从病参分离所得的优势菌

发病初期病灶处全部是细菌感染,发病中后期的病灶处除了以细菌为主,也常伴有霉菌或寄生虫的存在。但霉菌或寄生虫的检出率不高,与海参发生的腐皮现象不成必然关系。由此,可初步确定腐皮综合征是由细菌引起的。

从A、B、C三家养殖场所有病参的病灶组织都分离得到了1种占有绝对优势的、几乎单一的菌株,优势度都在90%以上,分别记为菌株FP-1、FP-2、FP-3。在TSB培养基上的菌落形态特征为:菌落圆形,隆起,灰白色,表面光滑黏稠,不易挑取,半湿润不透明,革兰氏染色呈阴性,短杆状或略有弯曲。负染电镜图片显示该细菌大小为 $(0.3 \sim 0.4) \mu\text{m} \times (0.6 \sim 0.9) \mu\text{m}$,具有极生单鞭毛(图2)。

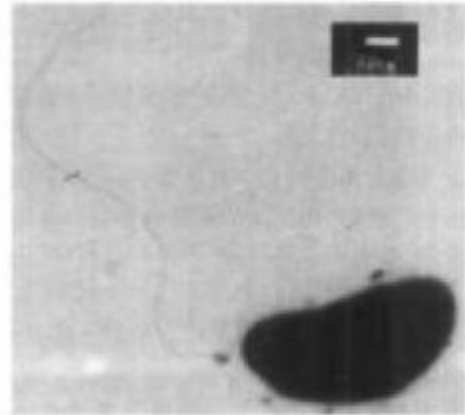


图2 FP-1的电镜负染照片(bar=200 nm)

Fig.2 Electron microscope photograph of bacterium FP-1

FP-1、FP-2和FP-3均能使健康刺参致病,并且感染海参的症状与自然发病的症状基本相同。同时,在14 d内导致50%左右的刺参死亡,而对照组无死亡发生(表3)。感染后,首先口部肿大,触手不能完全合拢;然后口部出现溃烂白斑,直至参体大面积溃烂,导致最终死亡。从所有感染死亡的海参中都分离出了与注射菌株特性一致的菌株。因此认为菌株FP-1、FP-2和FP-3具有较强的致病力,它们是海参发病的致病原。

2.5 形态及生理生化测定

选取菌株FP-1、FP-2、FP-3和AE-1,对其进行生理生化测试(表4)。测试结果表明,上述4个菌株的特性具有极高的相似性,确定属同一种细菌,是假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)的一种。

表2 患“腐皮综合征”刺参养殖场系统的细菌分析结果
Tab.2 Bacterial analysis of the rearing systems associated with skin ulcer syndrome

养殖场 Farm	细菌来源 Source of bacteria	细菌量 (cells·mL ⁻¹) Quantity of bacteria	优势菌 落代号 Dominant bacteria	菌落特征 Characteristic of bacterial colony	优势度/% Percentage of dominant bacteria
A	刺参病灶处 Focus	单一、大量 Single, numerous	FP-1	圆形,灰白,表面光滑黏稠,半湿润不透明 Round, hoariness, ropy & opacity	95
	水源 Water supply	1.2×10^2	无 Nil	5种不同形态的菌落,无FP-1菌落 Five colonies without FP-1	
	池水 Pond water	2.9×10^5	AW-1	同FP-1 Same as FP-1	60
			AW-2	圆形,较小,浅黄,半湿润半透明 Round, small, yellowish & translucency	35
	池底污物 Bottom ordure	6.5×10^5	AD-1	同FP-1 Same as FP-1	70
			AD-2	同AW-2 Same as AW-2	15
	饲料 Feeds	1.42×10^6	AE-1	同FP-1 Same as FP-1	80
B	刺参病灶处 Focus	单一、大量 Single, numerous	FP-2	同FP-1 Same as FP-1	90
	水源 Water supply	0.8×10^2	无 Nil	6种不同形态的菌落,无FP-2菌落 Six colonies without FP-2	
			BW-1	同FP-1 Same as FP-1	40
	池水 Pond water	1.9×10^3	BW-2	圆形,较小,浅白色,半湿润不透明 Round, small, whitish & opacity	30
			BW-3	圆形,较大,略隆起,浅黄,不透明 Round, big, yellowish & opacity	20
			BD-1	同FP-1 Same as FP-1	50
	池底污物 Bottom ordure	5.3×10^5	BD-2	同BW-2 Same as BW-2	20
			BD-2	同BW-3 Same as BW-3	20
C	刺参病灶处 Focus	单一、大量 Single, numerous	FP-3	同FP-1 Same as FP-1	95
	水源 Water supply	0.9×10^2	无 Nil	4种不同形态的菌落,无FP-3菌落 Four colonies without FP-3	
	池水 Pond water	3.2×10^5	CW-1	同FP-1 Same as FP-1	70
			CW-2	同AW-2 Same as AW-2	25
	池底污物 Bottom ordure	7.1×10^5	CD-1	同FP-1 Same as FP-1	80
	饲料 Feeds	3.2×10^6	CE-1	同FP-1 Same as FP-1	68
			CE-2	圆形,较小,米黄,半湿润不透明 Round, small, yellowish & opacity	23

注:刺参病灶处的细菌未作定量分析,表中单一、大量是指分离的菌落在目视的情况下优势度高,数量大。

Note: Bacteria isolated from sea cucumber focus were always numerous and in single strain.

表3 分离优势菌 FP-1、FP-2 和 FP-3 的人工感染实验结果
Tab.3 Challenge test of isolated strains FP-1, FP-2 and FP-3 to young sea cucumber

组别 Group	注射菌浓度 (cells·mL ⁻¹) Concentration	注射头数 Tested Number	死亡头数 Death count	出现病症 Symptom	存活头数 Survival	死亡率/% Mortality
FP-1	1.0×10 ⁷	10	6	摇头、排脏、溃烂 Shaking head, evisceration, skin ulcer	4	60
FP-2	1.0×10 ⁷	10	5	摇头、排脏、溃烂 Shaking head, evisceration, skin ulcer	5	50
FP-3	1.0×10 ⁷	10	5	摇头、排脏、溃烂 Shaking head, evisceration, skin ulcer	5	50
对照组 Control	1.5%生理盐水 Saline	10	0	无症状 normal	10	0

注：人工感染实验进行14 d完成。
Note: Challenge test was finished in 14 d.

表4 菌株 FP-1、FP-2、FP-3 和 AE-1 的生理生化特性比较
Tab.4 Morphological, physiological and biochemical characteristics of bacterial strains FP-1, FP-2, FP-3 and AE-1

项目 Item	FP-1	FP-2	FP-3	AE-1	项目 Item	FP-1	FP-2	FP-3	AE-1
革兰氏染色 Gram stain	-	-	-	-	吲哚产生 Indole production	+	+	+	+
鞭毛染色 Flagella	m	m	m	m	V.P. 反应 Vogus-proskauer	-	-	-	-
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)	+	+	+	+	赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	-	-	-	-
O/129 (150 μg)	+	+	+	+	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	-	-	-	-	ONPG	+	+	+	+
3% NaCl 生长 Growth	+	+	+	+	D-纤维二糖 D-cellobiose	+	-	-	-
6% NaCl 生长 Growth	+	+	+	+	D-甘露糖 D-mannitol	-	-	-	-
10% NaCl 生长 Growth	-	-	-	-	木糖 Xylose	-	-	-	-
4℃ 生长 Growth	+	+	+	+	棉子糖 Raffinose	-	-	-	+
25℃ 生长 Growth	+	+	+	+	蔗糖 Sucrose	+	+	+	-
28℃ 生长 Growth	+	+	+	+	水杨素 Salicin	-	-	-	-
45℃ 生长 Growth	-	-	-	-	明胶酶 Gelatinase	-	-	-	-
氧化酶 Oxidase	+	+	+	+	脲酶 Urease	-	-	+	+
氧化-发酵 (O/F) Oxidation/fermentation	F	F	F	F	七叶灵水解 Esculine hydrolysis	-	-	-	-
葡萄糖 Glucose	+	+	+	+	甲基红实验 Methyl red	-	-	-	-

注：“+”示阳性；“-”示阴性；“F”示发酵型；“m”示鞭生单鞭毛。
Note: “+” positive; “-” negative; “F” fermentation; “m” monotrichous.

2.6 16S rDNA 序列分析和系统发育

选取菌株 FP-1 为代表菌株,进行 16S rDNA 序列分析和系统发育树构建(图 3)。从图中可确定,FP-1 为假交替单胞菌属细菌,与 *Pseudalteromonas nigri-*

faciens 和 *Pseudalteromonas elyakovii* 的亲缘关系较近,相似性分别为 99.5%和 99.1%。其中,与 *P. nigrifaciens* 聚成一群,相似性最高。因此,可将 FP-1 鉴定为假交替单胞菌(*Pseudalteromonas nigrifaciens*)。

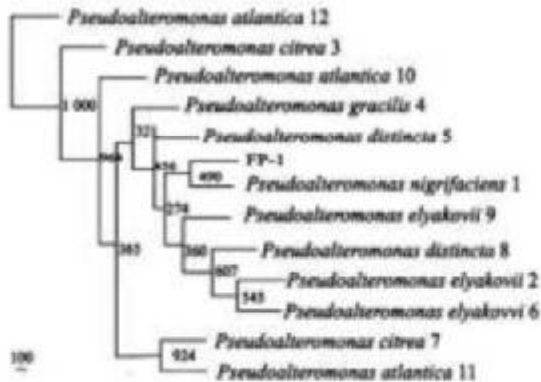


图3 FP-1的16S rDNA基因序列分析聚类结果
注:分支上的数字是1 000次重复抽样检测的bootstrap值。
Fig.3 Clustering result of gene sequence of 16S rDNA of the bacterial strain FP-1

Note: Numbers on the branches are bootstrap values (%) of 1 000 replications.

3 讨论

“腐皮综合征”的调查和分析表明:该病发生具有较强的季节性,即在每年的冬、春季海参保苗时期发病。它的波及面广,传染性强,死亡率极高,是当前海参保苗期的重要病害。

有鉴于3家分离得到的优势菌具有相似的菌落形态和生理生化特性,其16S rDNA基因序列与假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas nigrifaciens*)相似性达到99.5%,因此被鉴定为假交替单胞菌(*P. nigrifaciens*)。通过活体显微检查、分离培养,未发现明显与发病相关的其他微生物,且分离的该菌株可在人工感染条件下导致刺参幼体发病,所以假交替单胞菌被视为保苗期“腐皮综合征”的重要致病原之一。

假交替单胞菌是十分重要的致病原,可导致多种水产经济动物致病,引起盘纹鲍溃烂病^[7]、罗氏沼虾黄鳃病^[8]、暗纹东方鲀“脱黏病”^[9]、大黄鱼体表溃烂病^[10]以及中华绒螯蟹颤抖病^[11]等。然而,假交替单胞菌导致海参致病,引发“腐皮综合征”疾病,是属首次详细报道。

对3家养殖场养殖系统的细菌总量和病原特性分析发现,水源的细菌含量都不高,在 $(0.8 \times 10^2) \sim (1.2 \times 10^2)$ cells/mL之间,其特征与病灶处优势菌不同,说明水源不是病原菌的传播途径。但是饵料、池水和池底污物的优势菌含量都非常高,其中所投饲的

饵料中细菌含量可高达 3.2×10^6 cells/mL,并且饵料中优势菌的特征与刺参病灶处分离的优势菌具有一致性。由此说明,除了刺参苗种本身以外(苗种的细菌未能检测,有待进一步研究),饵料则可能是病原菌的主要来源。因此饵料携带细菌等有害微生物是导致发病的主要原因。在保苗期间,提供优质饵料特别是卫生饵料(指无菌或含菌量极少)是预防该病的重要措施之一。在保苗管理当中,严格切断饵料感染源,把好饵料选择和消毒处理是重要的工作环节。

随着近期大量样品的分析发现,导致“腐皮综合征”的致病菌除了假交替单胞菌外,还有气单胞菌、弧菌等(另文报道),说明保苗期刺参“腐皮综合征”的致病菌具有多样性和复杂性。今后需深入和综合分析“腐皮综合征”的病原种类、病原学、病原生态学、微生物监控以及防治技术,为刺参保苗过程中防治腐皮综合征提供理论依据和参考。

参考文献:

- [1] 王印庚,荣小军,张春云. 养殖海参主要疾病及防治技术[J]. 海洋科学, 2005, 29(3): 1-7.
- [2] 宋修武. 大力发展海参健康养殖, 培育海洋渔业经济发展新亮点[J]. 齐鲁渔业, 2005, 22(1): 1-2.
- [3] 王印庚,荣小军. 我国刺参养殖存在的主要问题与疾病综合防治技术要点[J]. 齐鲁渔业, 2004, 21(10): 29-31.
- [4] Becker P, Gillan D, Lanterbecq M, et al. The skin ulceration disease in cultivated juveniles of holothuria scabra (*Holothuridae*, *Echinodermata*) [J]. *Aquaculture*, 2004, 242 (1-4): 13-30.
- [5] 隋锡林,邓 次. 刺参池塘养殖的病害及防治对策[J]. 水产科学, 2004, 23(6): 22-23.
- [6] Michael P, Roy A H, John S M. Molecular Characterisation of the Japanese Encephalitis Serocomplex of the Flavivirus Genus [J]. *Virology*, 1996, 218 (15): 417-421.
- [7] 叶 林,俞开康,王如才,等. 皱纹盘纹鲍溃烂病原菌的研究[J]. 中国水产科学, 1997, 4(4): 43-48.
- [8] 陶宝华,石和荣,黄俊文,等. 假单胞菌引起罗氏沼虾黄鳃、黑鳃病的研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2000, 39: 255-259.
- [9] 李福年,魏梅芳,于道平. 暗纹东方鲀“脱黏病”病原菌的分离鉴定[J]. 水利渔业, 2001, 21(5): 42-43.
- [10] 刘家富,余作顺,林永邵,等. 大黄鱼假单胞菌病的初步研究[J]. 海洋科学, 2004, 28(2): 5-7.
- [11] 余为一,李福年,祖国事. 一株中华绒螯蟹病原菌的研究初报[J]. 安徽农业大学学报, 1999, 26(2): 174-177.
- [12] 王印庚,荣小军,张春云. 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): 44-48.

Etiology of skin ulcer syndrome in cultured juveniles of *Apostichopus japonicus* and analysis of reservoir of the pathogens

WANG Yin-geng¹, FANG Bo^{1,2}, ZHANG Chun-yun³, 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. College of fishery, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 3. School of the Ocean, Harbin Institute of Technology, Weihai 264209, China)

Abstract: The cultured sea cucumber *Apostichopus japonicus* suffered from serious disease 'skin ulcer syndrome' in many farms around Shandong and Liaoning province during winter and spring from 2003 to 2005. The disease was widely spread with high infectious and lethal feature, often causing 90% mortality even total destruction of sea cucumber juveniles. The syndrome displayed as anorexia, shaking head, mouth tumidity, viscera ejection, general atrophy, and skin ulceration.

This study investigated the etiology of diseased sea cucumber from three farms. One bacterial strain was isolated from these infected sea cucumbers, and it was always dominant amongst the isolates, and artificial infection test proved that it was the causative pathogen associated with the disease. The bacterium was identified as *Pseudoalteromonas nigrifaciens* by the means of morphological, physiological and biochemical tests, and 16S rDNA sequence analysis. This paper also studied the reservoir of the pathogens, through the bacteriological analysis of water supply, rearing water, benthon and feeds. The results showed that only little bacteria ($0.8 \times 10^2 - 1.2 \times 10^2$ cells/mL) have been found in water supply, and the character was not same as the dominant bacterium of the infected sea cucumber. However, numerous bacteria (3.2×10^6 cells/mL) could be detected in the feeds, and its character was same as the dominant bacterium of the infected sea cucumber, which indicated that the bad feed was most probably the origin of the disease etiology. This paper firstly report the causative pathogen of 'skin ulcer syndrome' in juveniles of *Apostichopus japonicus*, which will be helpful in the disease control and health management during sea cucumber cultivation. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(4): 610 - 616]

Key words: *Apostichopus japonicus*, aquaculture, skin ulcer syndrome, bacterium, *Pseudoalteromonas nigrifaciens*