

养殖刺参“化板症”病原菌的分离与鉴定

王印庚¹ 郭伟丽^{1,2} 荣小军¹ 李 彬¹ 廖梅杰¹
张 正¹ 陈 霞³ 刘升平²

(¹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)

(²青岛农业大学, 266109)

(³青岛九洋红水产科技有限公司, 266071)

摘 要 本研究对辽宁 4 家刺参育苗场患“化板症”的稚参进行了病原学分析, 从患有“化板症”的稚参体表病灶处分离得到一株优势菌 Aj2010072802A90。人工回接感染试验证实, 该细菌能使稚参发生厌食、萎缩、降低附着力、溃烂、死亡等现象, 具有较强的致病性, 为此次“化板病”的病原菌。在此基础上, 利用细菌形态观察、生理生化及 16S rDNA 分子生物学方法对该菌株进行了鉴定, 结果显示, 该菌为副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolyticus*。这是副溶血弧菌导致海参感染的首次报道。此外, 本研究针对该病原菌进行了药敏学测试, 证实所分离的副溶血弧菌菌株对氟苯尼考等药物高度敏感, 相关研究结果将为刺参疾病防控和健康养殖提供了理论依据和技术支撑。

关键词 刺参 化板症 副溶血弧菌 16S rDNA 鉴定

中图分类号 S917.1 **文献识别码** A **文章编号** 1000-7075(2012)06-0081-06

Isolation and identification of a pathogenic bacterium associated with off-plate syndrome from *Apostichopus japonicus* cultured in Liaoning Province

WANG Yin-geng¹ GUO Wei-li^{1,2} RONG Xiao-jun¹ LI Bin¹ LIAO Mei-jie¹
ZHANG Zheng¹ CHEN Xia³ LIU Sheng-ping²

(¹Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(²Qingdao Agricultural University, 266109)

(³Sunny Oceans Aquaculture Technology Co., LTD, Qingdao 266071)

ABSTRACT The off-plate syndrome is an epidemic disease of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* during nursery period, showing severe infection, rapid transmission and high mortality. In this study, epidemiological investigation of off-plate syndrome was conducted in several infected hatcheries along the coast of Liaoning Province. A dominant bacteria strain coded Aj2010072802A90 was isolated from the skin of affected juveniles and proved to be the

科研院所技术开发研究专项(2011EG34219)、山东省农业良种工程重大课题“速生、抗病、耐高温刺参良种选育”、国家自然科学基金项目(30901120;31202016)、“十二五”863 项目(2012AA10A412)和青岛市科技计划项目(11-1-11-hy)共同资助

收稿日期:2012-05-25;接受日期:2012-05-31

作者简介:王印庚(1963-),男,研究员,主要从事海参健康养殖相关研究。E-mail: wangyg@ysfri. ac. cn

pathogen through the artificial infection tests. The pathogen was identified as *Vibrio parahaemolyticus* through morphological observation, physiological & biochemical tests and 16S rDNA sequence analysis. This is the first report on *V. parahaemolyticus* disease in juvenile sea cucumber. Drug-sensitive tests were done against the pathogen and revealed that the *V. parahaemolyticus* strain was sensitive to florfenicol. The result would provide theoretical basis and technical support for disease control and health management in sea cucumber culture.

KEY WORDS *Apostichopus japonicus* Off-plate syndrome
Vibrio parahaemolyticus 16S rDNA Identification

苗种培育是刺参养殖过程的关键环节之一,流行病学研究表明,刺参育苗过程中的主要疾病有烂边病、烂胃病、化板症等多种疾病(邓欢等 2004;王印庚等 2005、2006、2009;张春云等 2009),其中,化板症是苗期最为严重和普遍发生的一种流行性疾病。此病具有传染性较强、波及面广、死亡率高的特点,严重威胁着刺参育苗和养殖产业(Wang *et al.* 2004)。针对该疾病,前期的研究主要在山东地区育苗场进行,尚未见到其他地区“化板病”的相关报道。2010年,辽宁省沿海地区多家刺参育苗场出现严重“化板症”,主要的症状表现为:刺参机体萎缩成球形,附着力显著下降,从附苗板上滑落至池底,参体溃烂死亡。鉴于水产疾病病原多样性和地域性等特点,为明确刺参“化板症”的病原,本研究对辽宁省地区“化板症”进行流行病学和病原学分析,以为该疾病的防治提供理论依据和参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

患病刺参于2010年3~7月取自辽宁大连开发区4家刺参育苗场发生“化板症”的育苗池,患病苗种为0.5~1 cm稚参,其患病症状为:刺参出现萎缩、附着力下降、溃烂等现象。从每家育苗场的发病池中取附苗板3个,采集明显萎缩的尚存活的参苗100~200头,低温迅速带回实验室。分别做成水浸片在显微镜下观察是否有寄生虫、霉菌和细菌。

副溶血弧菌标准菌株购自中国科学院微生物研究所,人工回接感染用的健康刺参苗购自山东青岛胶南某刺参育苗场,药敏纸片购自杭州微生物试剂有限公司。

1.2 病原菌的分离与形态学观察

以常规无菌操作的方法,剪取典型患病稚参的病灶处少许组织,无菌研磨器对组织研磨,采用胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB培养基)和硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基(TCBS培养基),用平板划线法进行细菌的分离,28℃培养24~72 h,挑取优势菌进行纯化,纯化后的细菌用保种液于-80℃保存备用。纯培养的病原菌于28℃培养18 h后,按常规方法进行革兰氏染色和显微观察。无菌操作的方法将病原菌制成 1.0×10^7 CFU/ml的菌悬液,用3%戊二醛固定5 min,滴1滴于附有极薄的电子透明薄膜的铜网上,再用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 人工感染试验

试验用刺参苗体长为1~2 cm。刺参暂养7 d后,选取健康、大小均一的个体进行试验。每10头作为一组,置于2 L消毒的塑料容器中。将分离纯化的病原菌菌株分别接种于TSB液体培养基中,28℃培养20 h,4 000 r/min离心5 min,弃上层培养基,用灭菌生理盐水离心洗涤3次,将细菌投放到试验水体中。按照比浊法调整浸浴水体的细菌浓度分别为: 1.0×10^9 、 1.0×10^8 、 1.0×10^7 、 1.0×10^6 、 1.0×10^5 CFU/ml和空白对照组(无细菌添加组)。不同的细菌浓度组设两个平行,同时设立对照组。实验期间每天换水1次,换水量为1/2(换水后,感染组补充细

菌以维持浓度),连续充气,水温 18~21℃,连续观察 16d,记录刺参的活动、摄食、病变及死亡情况。

1.4 菌种的鉴定

1.4.1 细菌生理生化鉴定

用法国 API 20E 细菌鉴定生理生化试剂条对分离纯化的菌株进行生理生化指标测试,以副溶血弧菌标准菌株进行生理生化指标的对比,试验结果参照《伯杰氏细菌鉴定手册》(Holt *et al.* 1994)。

1.4.2 细菌的 16S rDNA 序列分析

取纯培养的单菌落悬浮于灭菌水中,制成菌悬液,于 100℃水浴加热 10min,4℃、12 000 r/min 离心 5min,上清液即为 PCR 模板 DNA。用细菌 16S rDNA 通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3')和 1492R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')进行 PCR 扩增。切胶回收 PCR 扩增产物,连接转化后,对检测阳性样品送测序公司测序。将所获得的 16 rRNA 基因序列在 GenBank 中进行 BLAST 搜索,选取 20 株与所分离菌株相似性最高的细菌 16 rRNA 基因序列,用 ClustalW 软件对该菌与 GenBank 中的 20 株细菌的 16 rRNA 基因序列进行对比分析、多序列匹配排列,用系统发生推断软件包 PHYLIP 3.6.3 进行统计和聚类分析。采用邻位相连法(Neighbor-joining)获得系统发育树,通过自举分析(Bootstrapping)进行系统进化树的评估,自举数据集为 1 000 次。

1.5 病原菌的药敏试验

选用常见的 20 种药物,采用药敏纸片扩散法进行药敏测试,刮取 TSB 培养基上 28℃纯化培养 20 h 的细菌培养物于 1.5%无菌盐水中,制成 1×10^8 CFU/ml 左右的菌悬液;取 200 μ l 菌悬液均匀涂布于 TSB 培养基上,用无菌镊子将抗生素纸片轻轻贴在培养基表面,28℃恒温培养 18h 后,观察有无抑菌圈产生并测定抑菌圈直径大小。

2 结果

2.1 病原菌的分离与形态学观察

显微镜镜检发现患病幼体萎缩,部分溃烂解体,从患病个体病灶处发现大量活跃运动的细菌,未发现寄生虫、霉菌等敌害生物,由此可初步确定辽宁地区刺参“化板症”是由细菌引起的。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 Aj2010072802A90。其在 TSB 固体培养基上菌落形态及特征为:菌落圆形、土黄色、不透明、表面湿润光滑、易挑取。革兰氏染色呈阴性,短杆状(图 1)。电镜观察结果显示,菌体长约为 2.3 μ m,具有极生单鞭毛(图 2)。

2.2 人工感染试验结果

人工感染试验结果见图 3。高浓度组(1.0×10^9 和 1.0×10^8 CFU/ml)对健康刺参有较强的致病作用,均在第 3 天开始出现化皮和死亡现象,死亡率为 10%,到第 8 天和第 9 天全部死亡。中浓度感染组(1.0×10^7 CFU/ml)在第 5 天开始出现死亡,死亡率为 20%,第 13 天全部死亡。低浓度感染组(1.0×10^6 和 1.0×10^5 CFU/ml),在第 6 天均出现不同程度的死亡,到第 16 天累计死亡率分别为 60%和 70%,而空白对照组刺参没发生化板及死亡现象。由此可见,随着菌浓度的增加,其对稚参的毒力增强。从患“化板症”刺参中分离的病原菌能使健康的刺参致病,被感染刺参的症状与自然发病刺参的症状基本相同,且从人工感染刺参病灶处分离的优势菌 Aj2010112901A92 在菌落形态上与感染菌株 Aj2010072802A90 一致,因此,人工感染实验证实该 Aj2010072802A90 菌株为出现化板症及造成稚参死亡的致病菌。

2.3 病原菌生理生化特征

Aj2010072802A90 菌株的生理生化指标见表 1。氧化酶试验阳性,能分解葡萄糖、麦芽糖、甘露醇、覃糖、阿拉伯胶糖和淀粉而产酸,不分解乳糖、蔗糖、纤维二糖、木胶糖、卫矛醇、肌醇、水扬苷。甲基红、靛基质、明胶

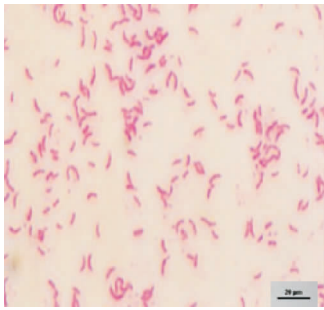


图1 病原菌的革兰氏染色
(标尺为 20 μm)

Fig. 1 Gram stain of
Aj2010072802A90
(Scale bar=20 μm)

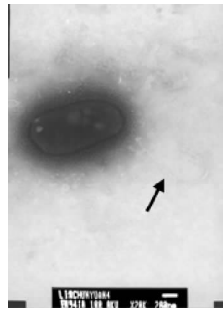


图2 病原菌的电镜观察
(箭头示鞭毛,标尺为 288 nm)

Fig. 2 Electronic microphotograph
of Aj2010072802A90
(Arrow indicates the flagella,
Scale bar=288 nm)

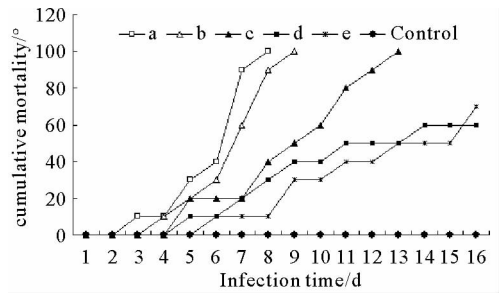


图3 Aj2010072802A90 菌株的
人工感染实验结果
Fig. 3 Artificial infection test of
bacteria Aj2010072802A90

表1 菌株 Aj2010072802A90 与副溶血弧菌标准菌株生理生化指标的对比

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of bacteria j2010072802A90 and *V. parahaemolyticus* standard bacterial strain

项目 Items	Aj2010072802A90	标准菌株 Standard strain	项目 Items	Aj2010072802A90	标准菌株 Standard strain
Growth on TCBS	+	+	淀粉 Starch	+	+
葡萄糖 Glucose	+	+	乳糖 Lactose	-	-
麦芽糖 Maltose	+	+	纤维二糖 D-cellobiose	-	-
木胶糖 Xylose	-	-	蔗糖 Sucrose	-	-
阿拉伯胶糖 Sugar gum arabic	+	+	覃糖 Qin sugar	+	+
水扬苷 Salicin	-	-	甲基红 Methyl red	+	+
卫矛醇 Euonymus alcohol	-	-	靛基质 Indole	+	+
肌醇 Inositol	-	-	明胶液化 Gelatinase	+	+
尿素酶 Urease	-	-	氧化酶 Oxidase	+	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	+	+
硫化氢 H ₂ S production	-	-	鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	+	+
VP 反应 Vogus-Proskauer reaction	-	-	精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	-	-
D-甘露醇 D-mannitol	+	+	氧化还原反应 Oxidation/ reduction	O	O
O/129 (10 μg)	S	S	O/129 (150 μg)	S	S

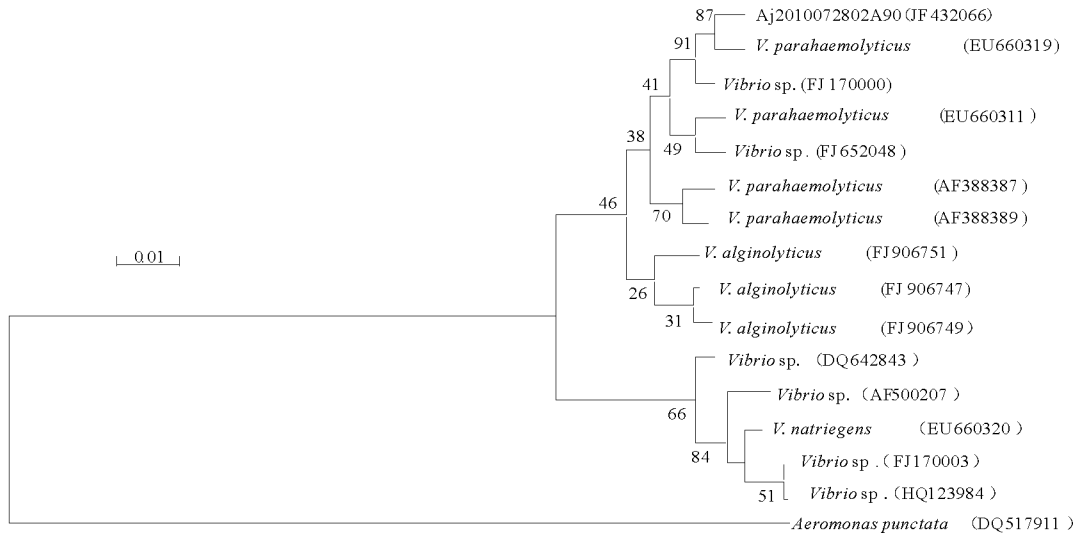
注：“+”表示阳性；“-”表示阴性；“S”表示敏感；“O”氧化反应

Notes: +: Positive reaction; -: Negative reaction; S: Sensitive; O: Oxidation

液化、鸟氨酸脱羧酶、赖氨酸脱羧酶和硝酸盐还原试验阳性,VP、硫化氢、尿素酶和精氨酸双水解酶阴性,对弧菌抑制剂 O/129 敏感。参考伯杰氏细菌鉴定手册(Holt *et al.* 1994),符合弧菌属的典型特征,与副溶血弧菌 *V. parahaemolyticus* 标准菌株的生理生化特征基本一致。

2.4 病原菌的 16S rDNA 序列分析

Aj2010072802A9 菌株的 16S rDNA 片段大小为 1 453bp,序列已提交至 GenBank 核酸数据库,序列号为 JF432066。通过互联网 NCBI,在 GenBank 采用 BLAST 程序与其他细菌的 16S rDNA 序列进行比对,与副溶血弧菌序列同源性达到 100%。以外类群点状气单胞菌 *Aeromonas punctata* 构成其树根,用 BIOEDIT 中的 Clustal W 进行多序列比对,然后用 MEGA 中的 Limura 双参数修正模型进行 Neighbor-Joining 系统发育树(NJ 树)的构建(图 4),初步确定 Aj2010072802A90 为副溶血弧菌。



Notes: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank.

The scale bar indicated 0.01 substitutions per nucleotide position.

图 4 Aj2010072802A90 及相关菌株的 16S rDNA 序列构建的 NJ 树

Fig. 4 NJ tree inferred from the 16S rDNA sequences of Aj2010072802A90 and related bacteria strains

2.5 药敏实验结果

菌株 Aj2010072802A90 对常用的 20 余种抗菌药物的敏感测试结果见表 2。该菌株对氟苯尼考、头孢三嗪、新生霉素等高度敏感,对强力霉素、恩诺沙星、多粘菌素 B 等中度敏感,而对复方新诺明、卡那霉素、庆大霉素、吡哌酸等抗生素不敏感。

表 2 菌株 Aj2010072802A90 的药敏实验结果

Table 2 Results of antibiotic sensitivity of Aj2010072802A90 tested by paper disk method

抗生素	Antibiotics	药敏直径 Bacteriostatic circle (mm)	敏感性 Sensitivity	抗生素	Antibiotics	药敏直径 Bacteriostatic circle(mm)	敏感性 Sensitivity
阿米卡星	Amikacin	12.13	R	头孢唑林	Cefazolin	6.96	R
强力霉素	Doxycycline	20.89	I	多粘菌素 B	B Polymyxin B	9.20	I
头孢三嗪	Ceftriaxone	23.77	S	氨苄青霉素	Ampicillin	6.96	R
复方新诺明	Cotrimoxazole	23.39	R	苯唑西林	Oxacillin	6.96	R
新生霉素	Novobiocin	22.35	S	吡哌酸	Pipemidic acid	12.44	R
卡那霉素	Kanamycin	10.67	R	氧氟沙星	Ofloxacin	13.14	I
庆大霉素	Gentamicin	10.17	R	恩诺沙星	Enrofloxacin	15.43	I
青霉素	Penicillin	6.96	R	新霉素	Neomycin	11.29	R
舒普深	Sulperazon	6.96	R	链霉素	Streptomycin	6.96	R
头孢氨苄	Cephalexin	8.12	R	氟苯尼考	Florfenicol	19.07	S

注:“S”表示敏感;“I”表示中度敏感;“R”表示抗性

Note: S: Sensitive; I: Intermediate sensitive; R: Resistant

3 讨论

本研究从患有“化板症”刺参中分离获得一株优势菌 Aj2010072802A90,人工回接感染试验表明该菌对健康刺参有较强的致病和致死作用,并且症状与自然发病的症状一样。另外,从人工回接感染发病的刺参病灶处分离得到大量形态单一的优势菌株,其形态特征、生理生化特征都与 Aj2010072802A90 完全相同,其结果符合生物学柯赫法则,由此证明菌株 Aj2010072802A90 为该例养殖刺参“化板症”的致病菌。采用常规生理生化指标测定和分子生物学 16S rDNA 两种鉴定方法对患“化板症”刺参的病灶分离到的优势菌株进行了分类学鉴定,其生理生化指标与副溶血弧菌标准菌株的特征基本一致,同时与副溶血弧菌序列同源性达到 100%。由

此,菌株 Aj2010072802A90 初步确定为副溶血弧菌 *V. parahaemolyticus*。

副溶血弧菌具有嗜盐性,存在于近海岸的海水、海底沉积物、海产品(鱼、虾、蟹、贝和海藻等)当中(王淑娜等 2009)。副溶血弧菌可以直接感染多种鱼类、贝类、虾蟹等水产养殖动物并导致大面积死亡(Karunasagar *et al.* 1986; 孟繁梅等 2000; 邓先余等 2004; 夏小安等 2010),但其对刺参的感染性却未见报道。对于副溶血弧菌的致病机理已有诸多报道,通过菌毛的黏附产生两种致病因子:一是细菌分泌耐热性溶血素(TDH),二是产生具有耐热相关溶血素(TRH)。这些胞外产物具有多种酶活性和溶血活性,是感染水产动物的主要因素(Honda *et al.* 1988; 史丽滨等 2001; 牟海津等 2006; 张晓君等 2009; 邱晴等 2010)。本研究首次证实了副溶血弧菌也能导致刺参苗期“化板症”,成为棘皮动物的一种的新的致病原。

刺参“化板症”是刺参育苗期间较为流行的一种疾病,其特点是感染性强、传播快、死亡率高(王印庚等 2005),该病主要发生在每年的4~10月份,尤其是在夏季高温期最为严重,时常发生大面积的死亡,死亡率高达90%以上。随着刺参养殖规模的不断扩大,刺参“化板症”病原菌的多样性程度也不断增加,呈现出了明显的时间性和地域性。早期对山东地区刺参疾病进行的研究表明,刺参“化板症”由三株革兰氏阴性菌引起,其中一株属于弧菌属(王印庚等 2005; 张春云等 2009)。本研究通过对辽宁地区“化板症”病原菌的分离和鉴定结果表明,引起辽宁地区稚参“化板病”的病原与山东地区引起刺参“化板症”的病原菌有所不同,并初步鉴定为副溶血弧菌,这可能是由于病原菌随着养殖地域不同和时间推移而有所不同。

在初步查明致病原的基础上,本研究完成了常用抗生素对该菌株的药效学试验和药物筛选。结果表明,所分离的病原菌对氟苯尼考、头孢三嗪、新生霉素高度敏感。在疾病临床实践中,作者应用氟苯尼考等药物开展了相关疾病防治工作,收到了良好治疗效果,为该疾病的治疗提供了参考。然而,鉴于刺参苗期“化板症”病原的复杂性和多样性,今后应继续加强该疾病的病原学研究,系统查明疾病病因;积极开展包括病原快速诊断、微生态制剂、专用高效药物和中草药复方等在内的疾病防控技术,为刺参健康养殖提供技术支撑。

参 考 文 献

- 王印庚,孙素凤,荣小军. 2006. 仿刺参幼体烂胃病及其致病原鉴定. 中国水产科学, 13(6):908~916
- 王印庚,荣小军,张春云,孙素凤. 2005. 养殖海参主要疾病及防治技术. 海洋科学, 29(3):1~7
- 王印庚,冷敏,陈霞,荣小军,廖梅杰. 2009. 中草药对刺参腐皮综合症病原菌的体外抑菌试验. 渔业科学进展, 30(2):1~7
- 王淑娜, Khamphouth Vongxay, 沈 颺, 周向阳, 金培婕, 陈健舜, 方维焕. 2009. 副溶血弧菌海产品分离株 *tdh* 基因及其临近区域结构分析. 微生物学报, 49(12):1 576~1 583
- 邓先余,王智学,何建国. 2004. 3株杂色鲍致病菌—副溶血弧菌的16S-23S rDNA 间区序列的分析. 微生物学报, 44(3): 304~308
- 邓欢,隋锡林. 2004. 刺参育苗期常见流行病. 水产科学, 23(3):40
- 史丽滨,张卓然. 2001. 副溶血弧菌耐热性溶血素的肠毒性及细胞毒性. 国外医学(微生物学分册), 24(5):44~45
- 农业部渔业局. 2009. 中国渔业年鉴 2010. 北京:中国农业出版社, 171
- 牟海津,李 筠,包振民,杨学宋,徐怀恕. 2000. 溶血弧菌胞外产物对中国对虾的致病性分析. 海洋与湖沼, 31(3):273~280
- 张春云,陈国福,徐 仲,闫培生,王光玉,王印庚. 2009. 养殖刺参附着期“化板症”病原菌的分离鉴定及来源分析. 微生物学报, 49(5):631~637
- 张晓君,陈翠珍,阎斌伦,房 海,秦国民,徐 静. 2009. 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)病原副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)的表型及分子特征. 海洋与湖沼, 40(5): 654~662
- 邱晴,谢李珍,傅兴隆,杨受保. 2010. 缢蛏副溶血弧菌的分离与鉴定. 安徽农学通报, 16(12):46~49
- 孟繁梅,朱义福,艾云灿. 2000. 南海珠江口区域水生病原弧菌的分离鉴定及血清学分析. 中山大学学报(自然科学版), 39(S2):59~62
- 夏小安,吴清洋,李远友,王树启,游翠红,林尤顺. 2010. 锯缘青蟹混合感染症致病菌的分离鉴定与感染治疗. 热带海洋学报, 29(5):103~110
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., and Williams, S. T. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology* (9th edition). London: William and Wilkins
- Honda, T., Ni, Y., and Miwatani, T. 1988. Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. *Infection and Immunity*, 56: 961~965
- Karunasagar, I., Venugopal, M. N., Segar, K., and Indrani, Karunasagar. 1986. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in cold smoked fish. *Antonie van Leeuwenhoek*, 52:145~152
- Wang, Y. G., Zhang, C. Y., Rong, X. J., Chen, J. J., and Shi, C. Y. 2004. Diseases of cultured sea cucumber, *Apostichopus japonicus*, in China. In the book "Advances in sea cucumber aquaculture and management", FAO Fisheries Technical Paper 463 (ISSN 0429-9345). 297~310. FAO, Rome