

养殖刺参附着期“化板症”病原菌的分离鉴定及来源分析

张春云^{1,2}, 陈国福^{1,2*}, 徐仲^{1,2}, 闫培生^{1,2}, 王光玉¹, 王印庚³

(¹ 哈尔滨工业大学 城市水资源与水环境国家重点实验室 哈尔滨 150090)

(² 哈尔滨工业大学海洋学院 威海 264209)

(³ 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 【目的】查明养殖刺参附着期“化板症”的病原及其来源,并获得该病的治疗药物。【方法】分别对化板症状较为典型的3家育苗场的发病幼体进行病原学分析,对可疑病原进行人工回接感染并进行形态学、生理生化及16S rDNA序列分析鉴定,对各养殖场育苗系统,包括水源、养殖池水、池底污物、附着基板和饵料进行细菌学分析,对病原菌进行药敏测试。【结果】从所有病参中分离得到1种优势菌株,人工回接感染证明它对健康刺参有较强的致病性,且感染病参与自然发病刺参的症状相同。鉴定出“化板症”的病原为弧菌 *Vibrio* sp.。养殖系统中除水源的细菌浓度没有超标污染(< 50 cfu/mL)外,其余均检出大量细菌($> 1 \times 10^5$ cfu/mL);病原来源较复杂,水源、养殖池水、池底污物、附着基板和饵料均发现了病原菌,但病原菌浓度以饵料中最多,附着基板次之,水源中最少。萘啶酸等12种常用抗生素可有效抑制该病原菌的生长。【结论】“化板症”的病原为弧菌 *Vibrio* sp.,饵料可能为“化板症”病原的主要来源,萘啶酸等12种常用抗生素可用于该病的防治。

关键词: 刺参; “化板症”病原; 鉴定; 来源; 防治

中图分类号: S941.42 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)05-0631-07

刺参是最具营养和经济价值的海珍品之一。近年来,由于刺参价格不断攀升,市场需求量急剧增加,加之对刺参的采捕强度增大造成自然资源量的急剧减少,促使刺参养殖成为我国北方水产养殖的热点,并成为海水养殖的支柱产业^[1]。

苗种培育是刺参养殖过程中的关键一环,决定刺参养殖的规模及成败^[1]。然而,刺参幼体发育经历耳状幼体、樽形幼体和五触手幼体等多个变态过程,对多种疾病易感^[2,3]。对于刺参育苗中的疾病,目前发现和报道的有化板症、烂胃病、腐皮综合征、烂边病和胃萎缩症等^[2-4]。其中,“化板症”具有发病快、传染性强和死亡率高等特点,常给育苗带来严

重威胁。2006年6月下旬,荣成好当家集团、蓬莱的大季家、东方海洋集团和蓬仙镇共4家刺参育苗场的附着期幼体相继发生了严重的“化板症”,其共同症状为:幼体收缩变短,活力下降并逐渐失去附着在PVC波纹板上的能力,然后掉落池底自溶解体,在发病池底往往可见大量刺参骨片。刺参浮游幼体在附着基板上附着后的7d内(幼体长1~2mm)发生大规模死亡,死亡率高达90%~100%。为查清病因,我们对具有典型症状的刺参样品进行了病原分离与鉴定,并对刺参育苗系统进行调查分析,以查明病原来源,此外,还对病原菌进行了药敏测试,以

基金项目: 哈尔滨工业大学(威海)研究基金[HH(WH)07]; 哈尔滨工业大学科研创新基金(IM0Q29080006); 城市水资源与水环境国家重点实验室开放课题(ES200802)

* 通信作者。Tel: +86-631-5687205; E-mail: dragonmanchen@yahoo.com.cn

作者简介: 张春云(1978-)女,硕士,讲师,主要从事海水养殖病害方面的研究。E-mail: limeng23@sohu.com.cn

收稿日期: 2008-11-24; 修回日期: 2009-02-27

期为刺参育苗生产的健康管理和“化板症”防治提供理论依据和参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 :病参取自山东蓬莱大季家、东方海洋集团和蓬仙镇 3 家刺参育苗场发生“化板症”的育苗池(分别标记为 DJJ、EOC 和 PXZ),在各家的附着板上小心挑取明显收缩、未死的患病刺参个体 100~200 头,在采集病参的同时分别收集相应养殖系统的水源、养殖池水、池底污物和饵料(鼠尾藻液)和幼体附着基板冲洗液(用灭菌海水反复冲洗数次)。所有样品均用灭菌玻璃瓶或塑料袋盛装并冰浴,迅速带回实验室于 2~3 h 内完成细菌的分离。

人工回接感染用健康刺参取自威海武岭德圣缘海珍品养殖有限公司,将附着期幼体连同附着基板带回。

1.1.2 主要试剂和仪器 :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。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 IJS rDNA 设计通用扩增引物由上海博亚生物公司合成、PCR 所用 Buffer、dNTP、Taq 酶等均购自上海生物工程技术公司。Axiophot Zeiss 显微镜;JEOL100 电子显微镜,LRH-70 生化培养箱。

1.2 病参镜检、细菌分离及计数

1.2.1 显微镜检 :在无菌条件下首先对 3 家发病养殖场附着基板上的病参进行肉眼观察,用接种环挑取明显收缩的幼体各 50 头,直接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观察和记录,以初步确定可疑病原。

1.2.2 病原的分离纯化 :在无菌条件下,挑取数个患病幼体,用 2 张灭菌的载玻片夹住稍用力研磨。然后以无菌接种环挑取少量研磨液,在 TSA 平板上划线分离。于 28℃ 恒温培养箱培养 24 h 后,挑取优势菌落,重复分离 3 次以获得纯化菌株。

1.2.3 养殖系统中细菌的数量及组成检测 :用无菌海水将水源水、养殖池水、池底污物、幼体附着基板冲洗液及饵料进行 10~100 倍稀释,分别取 0.1 mL 涂布于 TSA 平板上,每个稀释度 2 个重复,置 28℃ 培养箱中培养 2~4 d。观察平板上细菌的菌落形态、计数,确定并纯化优势度较高的菌株。

1.3 人工回接感染

用浸浴法进行人工回接感染。用 3.0% 的无菌

海水将病灶处分离所得优势菌制成悬液,经平板菌落计数确定浓度。用 50 L 的塑料水箱,注入过滤的无菌海水 25 L,加入上述菌悬液,使细菌终浓度分别为 1.0×10^3 cfu/mL、 1.0×10^4 cfu/mL、 1.0×10^5 cfu/mL、 1.0×10^6 cfu/mL 和 1.0×10^7 cfu/mL,空白对照组不加细菌。各浓度感染组和对照组均设 2 个平行。实验开始时,将附着有 50 头健康刺参幼体的 PVC 波文板置于水族箱底部,实验开始后,每隔 5 h 镜检幼体情况。实验期间投喂新鲜鼠尾藻液,每天换水 1 次,换水量为 1/3 换水时,感染组需补充细菌以维持浓度,整个实验过程气石充气,用加热棒将系统温度保持在 18~21℃,光强控制在 1300 lx 左右。从感染病参中分离出病原菌,对其进行形态观察和生理生化指标测定。

1.4 病原菌的鉴定

1.4.1 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% 戊二醛固定 5 min 后,取 1 滴铺载于铜网上,以 3% 磷钨酸负染,晾干,在透射电镜下观察。分别用光镜和电镜自带的相机进行拍照。

1.4.2 生理生化特性测定 :生理生化指标测定包括温度、盐度实验,API 20E 试验条和细菌微量检定管鉴定。温度、盐度实验参考《伯杰氏细菌鉴定手册》(第九版)^[5]进行;另参照麦克法兰标准比浊管,制备浓度大于 1.5×10^8 cfu/mL 的菌悬液,以 API 20E 细菌鉴定系统试验条和细菌微量检定管进行 42 项生理生化指标测定。结果对照《伯杰氏细菌鉴定手册》进行归类判定。

1.4.3 16S rDNA 序列分析 :参照文献^[6]的方法进行细菌 DNA 的提取和 16S rDNA 的 PCR 扩增,扩增产物直接交由上海生物工程技术公司进行纯化和测序。将获得的 16S rDNA 序列提交 GenBank,并获得相应的入口号(表 1)。分别从 GenBank 数据库中下载 16S rDNA 经 BLASTn 得分较靠前的序列(所有序列均已在正式文献中报道,以保证序列所对应的物种的正确性),选取点状气单胞菌(*Aeromonas punctata*)作为外类群,并同本文的序列(表 1),用 BioEdit 的 Multiple alignment 程序作多序列比对分析,所得序列用 MEGA 3.0 的 CLUSTL W 程序构建进化树(NJ 法),选用的数学模型为 Kimura 2-parameter distances,进化树的 Nodal 支持率用 Bootstrap 分析,分析重复次数为 1000 次。

表1 16S rDNA 序列来源和数据库存取号

Table 1 Access numbers and resources of sequence of 16S rDNA

Species	Accession number	Species	Accession number
<i>V. parahaemolyticus</i>	AY911391	<i>V. ezrae</i>	AY426981
<i>V. rumoiensis</i>	DQ530289	<i>V. parahaemolyticus</i>	DQ068942
<i>V. rumoiensis</i>	DQ530286	<i>V. natriegens</i>	X74714
<i>V. rumoiensis</i>	AB218691	<i>V. parahaemolyticus</i>	EF203421
<i>V. rumoiensis</i>	AB013297	<i>V. parahaemolyticus</i>	AF388388
<i>V. natriegens</i>	EU660320	<i>V. harveyi</i>	AY911396
<i>V. parahaemolyticus</i>	EU170469	<i>V. natriegens</i>	AJ874353
<i>V. rumoiensis</i>	DQ530292	<i>V. natriegens</i>	AJ874352
<i>V. rumoiensis</i>	DQ530287	<i>V. splendidus</i>	AY129277
<i>V. parahaemolyticus</i>	EU660326	<i>Aeromonas punctata</i>	DQ517911
<i>V. parahaemolyticus</i>	AF388387	<i>Vibrio</i> . sp. (HB-1)	FJ465010
<i>V. parahaemolyticus</i>	AF388386		

1.5 药敏试验

选用生产中常用的 16 种药物(见后面的表 4), 采用纸片法进行药敏测试。配制浓度大于 1×10^9 cfu/mL 的菌悬液约 1.5 mL, 吸取 150 μ l 均匀涂布于 TSA 培养基上, 贴上药敏试纸, 于 28 $^{\circ}$ C 培养箱恒温培养 24 h, 观察有无抑菌圈产生, 并记录抑菌圈直径大小。

2 结果

2.1 患病幼体症状观察、病原初检、优势菌分离及形态观察

显微镜检发现: 患病幼体收缩变短, 有的部分腐烂解体; 在患病个体溃烂组织处发现大量活跃运动的细菌, 未发现寄生虫、霉菌等, 由此可初步确定“化板症”由细菌引起。

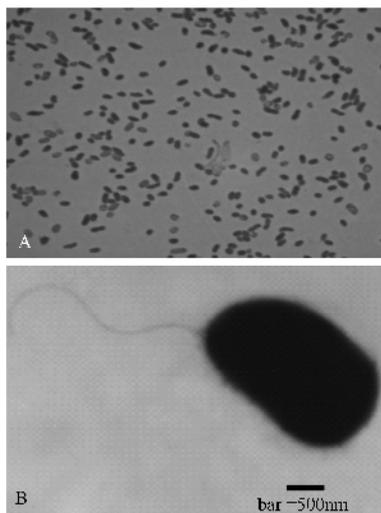


Fig.1 病原菌的革兰氏染色(A, 1000 \times)及电镜观察(B, 15000 \times) (标尺为 500 nm)

Fig.1 Gram-stain (A, 1000 \times) and electron microscopic photograph (B, 15000 \times) of LB-1 (Bar is 500 nm).

3 家养殖场的病参样品各分离到 1 株优势菌, 分别记为 HB-1、HB-2 和 HB-3, 优势度分别为 65%、85% 和 95%。3 株优势菌的菌落形态及菌体特征相同: 菌落扁平, 湿润而透明, 表面光滑, 菌体呈革兰氏阴性, 大小为 $(1.5 \sim 2.5) \mu\text{m} \times (0.5 \sim 1.0) \mu\text{m}$, 粗短杆状, 具有极生单鞭毛(图 1)。

2.2 养殖系统中细菌的培养结果

3 家养殖场养殖系统中, 饵料中的细菌含量最高, 可达 6.0×10^8 , 并且饵料中优势菌始终与刺参病灶处及附着基板分离的优势菌的形态特征一致; 而在各养殖系统中, 病灶处优势菌与水源水、养殖池水和池底污物优势菌的特征或相同或不相同(表 2)。进一步的生理生化指标测定表明: 病灶处分离的优势菌与饵料中的优势菌同属一种菌(表 3)。上述说明, 病原的来源具有多样性, 但饵料可能是主要来源。

2.3 人工回接感染结果

人工回接感染结果见图 2。浸浴浓度分别为 1.0×10^5 cfu/mL (I3)、 1.0×10^6 cfu/mL (I4) 和 1.0×10^7 cfu/mL (I5) 的实验组幼体在感染后的 20 h 开始出现“化板症”, 并开始死亡, 而在菌浓度为 1.0×10^3 cfu/mL (I1) 和 1.0×10^4 cfu/mL (I2) 实验组则分别在感染后的 40 h 和 30 h 出现“化板症”和死亡; 此外, I4 和 I5 组在实验后的 50 h 全部死亡, 而在整个实验过程中对照组没有出现化板症状及死亡。可见, 随着菌浓度增加, 细菌毒力随之上升, 可确定该

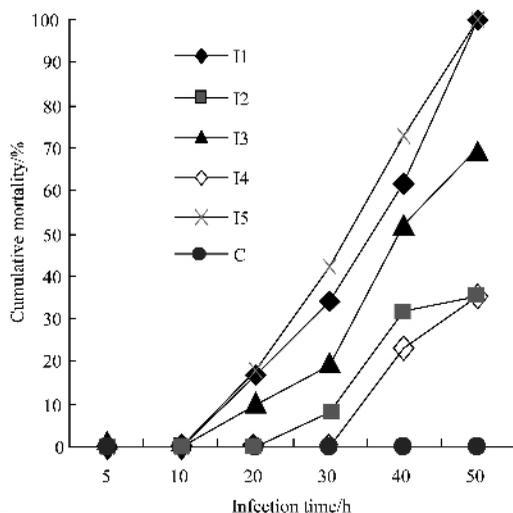


Fig.2 可疑病原菌的浸浴感染结果

Fig.2 Immersion infection by suspicious pathogenic bacteria. I1, I2, I3, I4 and I5 represents challenge groups with bacterial densities of 1.0×10^3 cfu/mL, 1.0×10^4 cfu/mL, 1.0×10^5 cfu/mL, 1.0×10^6 cfu/mL and 1.0×10^7 cfu/mL, respectively, while C represents control group.

表 2 患“化板症”刺参养殖系统的细菌分析结果

Table 2 Bacterial analysis of the rearing systems associated with “huaban syndromes”

Farm	Source of bacteria	Quantity of bacteria/ (cfu/mL)	Dominant bacteria	Morphological characteristics of bacterial colony	Percentage of dominant bacteria/ %	
DJJ	Focus	Single, numerous	HB-1	Flat, moist, transparent and slippery surface	65.0	
	Water sources	20	Nil	-	-	
	Attachments	1.8×10^6	DJJB-1	Same to HB-1	61.0	
			DJJB-2	Round, moist and opaque, regular boundary and deep yellow center	39.0	
	Pond water	3.0×10^3	DJJS-1	Same to DJJB-2	90.0	
	Pond ordure	1.03×10^6	DJJD-1	Same to DJJB-2	95.0	
	Feeds	1.2×10^8	DJJZ-1	Same to HB-1	83.3	
	EOC	Focus	Single, numerous	HB-2	Same to HB-1	85.0
		Water sources	50	Nil	Different from HB-2	-
		Attachments	6.0×10^7	EOCB-1	Same to HB-1	80.0
EOCB-2				Much bigger, orange blue brim with blue shininess	15.0	
Pond water		5.0×10^3	EOCS-1	Same to HB-1	40.0	
			EOCS-2	Same to EOCB-2	20.0	
Bottom ordure		2.4×10^6	EOCC-1	Same to HB-1	60.0	
			EOCC-2	EOCB-2	30.0	
Feeds		6.0×10^8	EOCZ-1	Same to HB-1	85.0	
PXZ		Focus	Single, numerous	HB-3	White brim, transparent centre with slight protrusion	95.0
	Water sources	10	Nil	Same to HB-1	-	
	Attachments	3.8×10^6	PXZB-1	Same to HB-1	-	
	Pond water	2.0×10^3	PXZS-1	Deep white, slight protrusion	61.0	
	Bottom ordure	2.5×10^5	PXZD-1	Same to HB-1	90.0	
	Feeds	3.5×10^8	PXZZ-1	Same to HB-1	85.0	

表 3 菌株 HB-1、HB-2、HB-3、DJJZ-1 和 AI 的生理生化特征

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of bacterial strains HB-1, HB-2, HB-3, DJJZ-1, and AI

Item	HB-1	HB-2	HB-3	DJJZ-1	AI	Item	HB-1	HB-2	HB-3	DJJZ-1	AI
Gram stain	-	-	-	-	-	Indole production	+	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+	+	H ₂ S production	-	-	-	-	-
O/129 (10 μ g)	+	+	+	+	+	Lysine decarboxylase	-	-	-	-	-
O/129 (150 μ g)	+	+	+	+	+	Arginine dihydrolase	+	+	+	+	+
Growth on TCBS	-	-	-	-	-	Ornithine decarboxylase	-	-	-	-	-
Growth in 0% NaCl	-	-	-	-	-	Tryptophan deaminase	-	-	-	-	-
Growth in 3% NaCl	+	+	+	+	+	Gas from glucose	-	-	-	-	-
Growth in 6% NaCl	-	-	-	-	-	Arabinose	-	-	-	-	-
Growth in 8% NaCl	-	-	-	-	-	Mannitol	-	-	-	-	-
Growth in 10% NaCl	-	-	-	-	-	Inositol	-	-	-	-	-
Growth at 4 $^{\circ}$ C	+	+	+	+	+	Raffinose	-	-	-	-	-
Growth at 25 $^{\circ}$ C	+	+	+	+	+	Rhamnose	-	-	-	-	-
Growth at 28 $^{\circ}$ C	+	+	+	+	+	Sucrose	-	-	-	-	-
Growth at 35 $^{\circ}$ C	+	+	+	+	+	Glucose	+	+	+	+	+
Growth at 40 $^{\circ}$ C	+	+	+	+	+	Salicin	+	+	+	+	+
Growth at 45 $^{\circ}$ C	-	-	-	-	-	Sorbitol	-	-	-	-	-
Oxidase	+	+	+	+	+	Gelatinase	-	-	-	-	-
Oxidation/Fermentation	F	F	F	F	F	Urease	-	-	-	-	-
Citric acid	-	-	-	-	-	ONPG	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	Methyl red test	-	-	-	-	-
V-P reaction	-	-	-	-	-	Pigment production	-	-	-	-	-

“+” means positive reaction; “-” means negative reaction.

菌为出现化板症及造成死亡的致病菌。从感染病参中分离到的优势菌记为 AI, AI 的形态及生理生化指标(见 2.4)与接种细菌相同。

2.4 细菌的生理生化特性测定

选取菌株 HB-1、HB-2、HB-3 和 DJJZ-1, 并同人工回接感染病参中分离到的菌株(AI)进行生理生化测试。结果表明, 上述 5 个菌株的生理生化特征完全相同, 由此可确定属同一种细菌; 参照《伯杰氏细菌鉴定手册》可进一步确定该菌为弧菌属(*Vibrio*)的一种(表 3)。

2.5 细菌 HB-1 的 16S rDNA 序列分析

HB-1 的 16S rDNA 大小为 1464 bp(不含引物), 登陆 NCBI 将获得的序列进行 BLASTn 同源检索, 结果发现: HB-1 与弧菌的 16S rDNA 序列相似性较高。进一步的进化树分析表明, HB-1 与所有弧菌聚类, 而外类群点状气单胞菌构成其树根; 但 HB-1 不与任何现已报道的菌种单独聚类, 而在进化树上独成一枝(图 3)。可见, HB-1 为弧菌属(*Vibrio*)细菌, 但还不能确定其种类, 可能是弧菌属的一新种, 也可能是在 GenBank 中没有提交 16S rDNA 的现有弧菌。

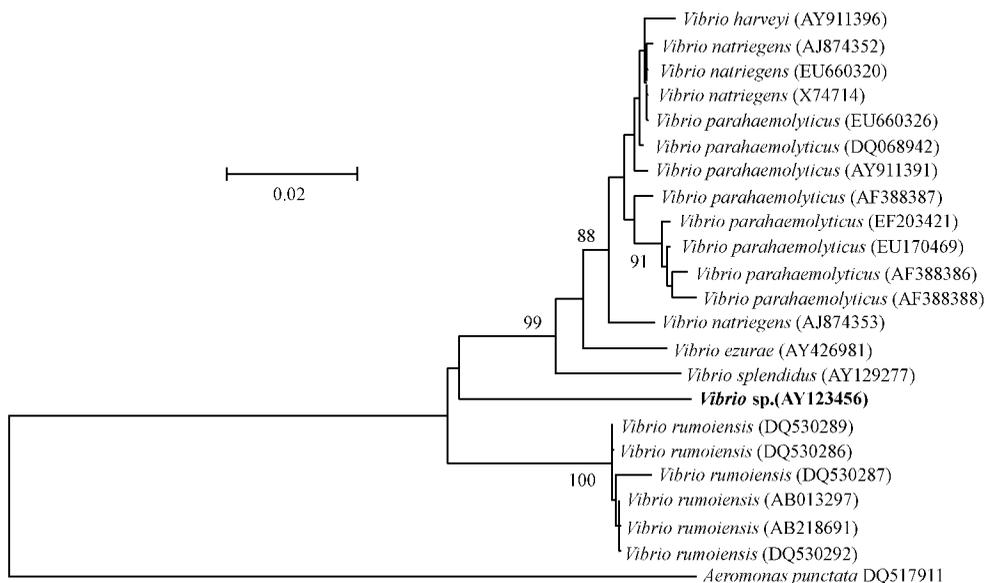


Fig.3 由 HB-1 及相关菌株的 16S rDNA 序列构建的 NJ 树

Fig.3 NJ tree inferred from the 16S rDNA sequences of HB-1 and related bacteria strains. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Bootstrap values, expressed as percentages of 1000 replications, are given at branch points. The scale bar indicated 0.02 substitutions per nucleotide position.

2.6 药敏实验结果

菌株 HB-1 对生产中常用的 16 种抗菌药物的敏感测试结果见表 4。菌株 HB-1 除对少数几种抗生素, 包括先锋必、四环素、青霉素 G 和氧哌嗪青霉素不敏感外, 对受试其它抗生素均较敏感。

表 4 菌株 HB-1 的药敏实验结果

Table 4 Results of drugs sensitivity tests

Antibiotics	Inhibition diameter/mm	Antibiotics	Inhibition diameter/mm
Cefobid	0	Cephalothin	21
Tetracycline	0	Lincomycin	15
Nalidixic acid	29	Amikacin Sulfate	13
Tarivid	28	Doxycycline	9
Nitrofurantoin	23	Ceftriaxone	32
Penicillin G	0	Sodium Cephamezine	16
Cefradine	22	Acetylspiramycin	19
Piperacillin	0	Minomycin	19

3 讨论

大量有关刺参疾病病原学的报道表明, 引发刺参疾病的病原多种多样, 不但包括寄生虫、霉菌和细菌^[2,3,6-14], 病毒也可能是致病原^[15-18]。然而, 尽管在刺参在育苗期有多种疾病, 有关苗期疾病病原学的报道较少, 仅王印庚等(2006)报道了保苗期的“腐皮综合症”^[7]和“烂胃病”^[10]的病原, 邓欢等报道了幼体“胃萎缩症”的可疑病原等^[18]。此外, 同一疾病的病原可能具有多样性和地域特异性的特点。如目前危害较为严重的“腐皮综合征”, 灿烂弧菌(*V. splendidus*)^[6]、假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas nigrifaciens*)^[7]和溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)^[12]、杀鲑气单胞菌(*A. salmonida*)^[13,14]、中间气单胞菌(*A. media*)^[13]、海弧菌生物变种 I(*V. pelagius* biovar

1)^[13]等均可引发该病,而病毒也可能引发该病^[16]。

“化板症”是一种发生在刺参育苗过程中常见且较为典型的疾病^[2,3]。该病在辽宁、山东等地多年广泛流行,严重阻碍刺参养殖业的健康持续发展。本文首次对该疾病进行了病原学研究,并针对上述同一疾病的病原可能具有多样性的问题,比较了3家不同地区暴发“化板症”的养殖场的病原。研究通过镜检在病灶处发现大量细菌,基本排除其它病原感染的可能,将分离的可疑病原进行人工回接感染,发现其符合科赫法则,通过比较发现从3家养殖场患病幼参分离得到的优势菌的菌落形态和生理生化特征相同,最终可确定该细菌为“化板症”的病原。进一步的16S DNA序列分析只能将其鉴定到属,因此,可认为“化板症”的病原为弧菌属细菌。

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、虾蟹类等多种水产动物并导致大规模死亡^[19]。近年来的研究也发现,弧菌也是海参的主要细菌性病原^[6,8-10,12,13]。目前对海参具有致病性的弧菌包括:灿烂弧菌^[6,9,10]、*V. tapetis*^[9]、溶藻弧菌^[12]和海弧菌生物变种 I (*V. pelagius* biovar I)^[13]等,因此也不难解释弧菌是造成养殖刺参附着期化板症的病原。

为了查明病原来源,分别对整个育苗系统,包括水源、养殖池水、池底污物、附着基板和饵料等进行了细菌学分析。单就细菌浓度来说,暴发“化板症”的3家养殖场的整个养殖系统中,只有水源水的细菌浓度没有超标污染(< 50 cfu/mL),而其他均检出了大量的细菌($> 1 \times 10^5$ cfu/mL)。此外,病原的来源比较复杂,水源、养殖池水、池底污物、附着基板和饵料均发现了病原菌。但病原菌浓度以饵料中最多,附着基板次之,而水源水中最少。值得指出的是,在3家养殖池的附着基板和饵料中均发现了病原菌,而水源、养殖池水和池底污物均在1家或2家养殖池中发现。因此,可以推测饵料可能为“化板症”的主要病原来源。

最后,在初步查明病原的基础之上,我们对水产生产中常用的一些抗生素进行了药敏筛选。结果表明,多种抗生素可有效抑制该病原菌的生长,并可以作为生产中的有效防治药物。因此,在生产中,为了对“化板症”进行有效防治,一方面要杜绝病原菌进入养殖系统(如本文的饵料带有大量致病菌),另一方面可以有的放矢使用抗生素对“化板症”进行防治,并防止抗生素滥用的发生。

参考文献

- [1] 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. 海洋水产研究 (*Marine Fisheries Research*), 2004, 25(3): 89-97.
- [2] 邓欢,隋锡林. 刺参育苗期常见流行病. 水产科学 (*Fisheries Science*), 2004, 23(3): 40.
- [3] 王印庚,荣小军,张春云. 养殖海参主要疾病及防治技术. 海洋科学 (*Marine Science*), 2005, 29(3): 1-7.
- [4] 邓欢,周遵春,韩家波. “胃病萎缩症”仿刺参幼体及亲参组织中病毒观察. 水产学报 (*Journal of Fisheries of China*), 2008, 32(2): 315-320.
- [5] Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, et al. *Bergey's manual of determinative Bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1999.
- [6] 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 (*Journal of Fisheries of China*), 2006, 30(1): 118-123.
- [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 (*Journal of Fishery Sciences of China*), 2006, 13(4): 610-616.
- [8] 马悦欣,徐高蓉,常亚青,等. 大连地区刺参幼参溃烂病细菌性病原的初步研究. 大连水产学院学报 (*Journal of Dalian Fisheries University*), 2006, 21(1): 13-18.
- [9] 马悦欣,徐高蓉,张恩鹏,等. 仿刺参幼参急性口围肿胀症的细菌性病原. 水产学报 (*Journal of Fisheries of China*), 2006, 30(3): 377-382.
- [10] 王印庚,孙素凤,荣小军. 仿刺参幼体烂胃病及其致病病原鉴定. 中国水产科学 (*Journal of Fishery Sciences of China*), 2006, 13(6): 908-916.
- [11] 孟庆国,吴刘记,吴信忠,等. 养殖刺参溃疡病病原学研究. 水产科学 (*Fisheries Science*), 2006, 25(12): 635-639.
- [12] 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 (*Journal of Fisheries of China*), 2007, 31(4): 504-511.
- [13] 王高学,原居林,赵云奎,等. 刺参表皮溃烂病病原菌的分离鉴定与药敏试验. 西北农林科技大学学报(自然科学版) [*Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*], 2007, 35(8): 87-90.
- [14] 杨嘉龙,周丽,邢婧,等. 养殖刺参溃疡病杀鲑气单胞菌的分离、致病性及胞外产物特性分析. 中国水产科学 (*Journal of Fishery Sciences of China*), 2007, 14(6): 504-511.

- [15] 宋坚, 王品红, 李春艳, 等. 仿刺参稚参“脱板病”超微病理的研究. 大连水产学院学报(*Journal of Dalian Fisheries University*), 2007, 22(3): 221–225.
- [16] 王品虹, 常亚青, 徐高蓉, 等. 刺参一种囊膜病毒的分离及超微结构观察. 中国水产科学(*Journal of Fishery Sciences of China*), 2005, 12(6): 766–771.
- [17] 邓欢. 刺参体内的新病原—一种球状病毒. 水产科学(*Fisheries Science*), 2006, 25(1): 30–31.
- [18] Liu Y, Yang GP, Wang HL, et al. Design of *Vibrio* 16S rRNA gene specific primers and their application in the analysis of seawater *Vibrio* community. *Journal of Ocean University of China*, 2006, 5(2): 157–164.

Etiology of off-plate syndrome in cultured larval *Apostichopus japonicus* at attachment stage and analysis of reservoir of pathogens

Chunyun Zhang^{1,2}, Guofu Chen^{1,2*}, Zhong Xu^{1,2}, Peisheng Yan^{1,2}, Guangyu Wang¹, Yingeng Wang³

(¹State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

(²School of the Ocean, Harbin Institute of Technology, Weihai 264209, China)

(³Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract [Objective] To clarify pathogens and sources of the off-plate syndrome at the attachment stage in the larval culture of *Apostichopus japonicus*, and further to find out effective medicines for this disease. **[Methods]** Etiological analysis was performed on larvae with typical off-plate syndrome from three larvae culture factories. Suspicious pathogens were used for artificial infection test, and were identified through morphological, physiological and biochemical tests, and 16S rDNA sequence analysis. Quantitative bacterial analysis was done on the culture systems of the three factories, including water sources, rearing water, ordure (in the pond floor), attachments and feeds. Finally, drug-sensitive tests were done against the pathogens. **[Results]** A common dominant bacterium strain was isolated from all ill larvae included in the study. Artificial infection test showed it was the causative pathogen associated with the disease, and the artificially infected sea cucumbers had same syndromes to the naturally ill ones. The bacterium was identified as *Vibrio* sp. Bacterial quantity of water sources was in the qualified range (< 50 cfu/mL), while out of the standard range in others (> 1 × 10⁵ cfu/mL). The sources of the pathogen were complicated, since pathogens were discovered in the water sources, rearing water, ordure, attachments and feeds. However, the density of causative bacteria was the highest in the feeds, middle in the attachments, and lowest in the water sources. Twelve antibiotics could inhibit growth of the pathogens. **[Conclusion]** The possible pathogen for off-plate syndrome was *Vibrio* sp. Feeds may be the main source of the pathogen. Twelve antibiotics besides nalidixic acid could be applied for disease prevention and treatment of *Apostichopus japonicus*.

Keywords : *Apostichopus japonicus*; off-plate syndrome; pathogen; identification; source; prevention and treatment

(本文责编: 王晋芳)