

文章编号: 1000-0615(2007)04-0504-08

养殖刺参溃疡病病原菌 RH2 的鉴定及其生物学特性分析

杨嘉龙, 周 丽, 绳秀珍, 邢 婧, 战文斌
(中国海洋大学教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要:从患溃疡病养殖刺参(*Apostichopus japonicus*)病灶处分离出 3 株优势菌(RH1、RH2、RH3),以浸浴、体腔注射、体壁肌肉注射等方式进行感染实验,证实菌株 RH2 为养殖刺参溃疡病的病原菌,其对刺参的 LD₅₀(半数致死量)每尾为 5.68×10^6 CFU,并证实浸浴、体腔注射的方式无法感染刺参,该菌可能通过体表创伤侵入的方式感染刺参。经形态学观察、生理生化特性分析、16S rRNA 和 HSP60 基因测序确定菌株 RH2 为溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)。基于 16S rRNA 基因构建的系统发育树显示,菌株 RH2 与溶藻弧菌(AF513447)亲缘关系最近,置信度为 50%;HSP60 基因序列分析表明 RH2 与溶藻弧菌(AY332570、AF230931)聚为一个分支,且置信度高达 99%。菌株 RH2 的最适生长盐度为 25~35,最适生长 pH 为 7.2~8.0,最适生长温度为 14~22 ℃。对 18 种药物的敏感实验证实菌株 RH2 对诺氟沙星、复方新诺明、壮观霉素等较为敏感。

关键词:刺参;溃疡病;溶藻弧菌;16S rRNA 基因;HSP60 基因;生物学特性

中图分类号:S 941.42 文献标识码:A

Identification and biological characteristics of pathogen RH2 associated with skin ulceration of cultured *Apostichopus japonicus*

YANG Jia-long, ZHOU Li, SHENG Xiu-zhen, XING Jing, ZHAN Wen-bin
(Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Three bacterial strains named RH1, RH2 and RH3 were isolated from the cultured sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) with skin ulceration. The strain RH2 was proved to be a pathogen by soaking with suspension of bacteria, coelome injection and muscle injection, the LD₅₀ dose was 5.68×10^6 CFU per sea cucumber, and it was proved that soaking with suspension of bacteria and coelome injection could not infect the sea cucumber successfully. By methods of morphological observation, physiological and biochemical characteristic analysis, RH2 was identified as *Vibrio alginolyticus*. 16S rRNA gene and 60 ku heat shock protein (HSP60) gene sequence detection further proved that strain RH2 belonged to *V. alginolyticus*. Phylogenetic tree of *Vibrio* based on 16S rRNA gene and HSP60 gene both indicated that strain RH2 showed the highest level of similarity to *V. alginolyticus*, and its bootstrap was 50% and 99%, respectively. The optimum salinity and temperature for strain RH2 was 25-35 and 14-22 ℃, the optimum pH was 7.2-8.0. The results of sensitivity to 18 kinds of antibacterial agents showed that strain RH2 was sensitive to norfloxacin,

收稿日期: 2006-06-21

资助项目: 国家自然科学基金(30271016); 山东省教育厅科技计划(032070104); 教育部海水养殖重点实验室开放基金(200212); 中国海洋大学资助项目(1400-813764)

作者简介: 杨嘉龙(1982-), 男, 山东蓬莱人, 硕士研究生, 主要从事水产病害与免疫学研究。E-mail: jlyang1220@gmail.com

通讯作者: 周 丽, Tel: 0532-82031862, E-mail: zhouli@ouc.edu.cn

sulfamethoxazolom and spectinomycine.

Key words: *Apostichopus japonicus*; skin ulceration; *Vibrio alginolyticus*; 16S rRNA gene; HSP60 gene; biological characteristic

刺参 (*Apostichopus japonicus*) 隶属于棘皮动物门 (Echinodermata)、海参纲 (Holothuroidea)、盾手目 (Aspidochirotida)、刺参科 (Stichopodidae), 具有非常高的营养和药用价值。20 世纪 90 年代末我国掀起了刺参人工养殖的热潮, 山东和辽宁两省是主要的刺参养殖地。

随着养殖规模的不断增大, 刺参病害也日益显著。自 2003 年起, 全国各地养殖刺参频发溃疡病 (俗称“化皮病”), 症状为体壁肌肉溃疡、排脏, 有的伴随肿嘴症状, 最后溃疡处扩大, 导致刺参自溶死亡。刺参溃疡病多发于养殖水温较低 (10 ~ 14 °C) 的春季, 2 ~ 3 月是发病的高峰期, 越冬保苗期的幼参和养成期的成参均可被感染发病。海参疾病已引起养殖工作者及研究人员的关注, 目前国内外已逐渐开展了海参疾病的研究。Becker 等发现糙海参幼体培育过程中暴发的流行性皮肤溃烂病, 可引起幼体大面积死亡, 感染率达 80%, Becker 等^[1]认为弧菌属 (*Vibrio* sp.) 的哈维氏弧菌或溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 可能是引发此病的病原菌; 张春云等^[2]报道 2003 年山东省青岛地区暴发刺参溃疡病, 感染 10 ~ 15 cm 的成参, 有的刺参池感染率高达 80%, 经人工感染确定此次溃疡病的病原菌为灿烂弧菌 (*Vibrio splendidus*); 王印庚等^[3]报道山东、辽宁省众多地区暴发的保苗期刺参溃疡病可引起 90% 的死亡率, 经感染确定其病原菌为假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas nigrifaciens*)。

2005 年 3 月, 山东乳山某刺参养殖场暴发刺参溃疡病, 发病对象为 4 ~ 8 cm 的成参, 平均死亡率 60%。本研究从患溃疡病养殖刺参病灶处分离出 3 株优势菌 (RH1、RH2、RH3), 经感染实验证明菌株 RH2 为致病菌, 在常规生理生化鉴定的基础上, 利用 16S rRNA 和 HSP60 基因序列分析的方法对菌株 RH2 进行了分类鉴定, 并对其一些生物学特性和敏感药物进行了测定。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

患病刺参取自山东乳山某刺参养殖场, 症状

为体表溃疡、肿嘴、吐肠、自溶等。健康刺参购自山东乳山禧丰达渔业公司, 体长 (5 ± 1) cm。

溶藻弧菌标准菌株 283 (LMG4408T), 由中国海洋大学联合国教科文组织中国海洋生物工程中心 (UNESCO·BAC) 提供, 来自英国 Heriot-Watt 大学生物学系。

1.2 病原菌的分离

取溃疡症状典型的病参, 无菌条件下从体表、嘴等溃疡部位分离细菌, 划线接种于 2216E 平板上, 25 °C 培养 24 h, 挑取形态一致的优势菌落进行纯化培养, 直至获得纯培养菌 (RH1、RH2、RH3), 2216E 冻存液 (15% 甘油) 于 -80 °C 保存备用。

1.3 人工感染实验

实验刺参饲养于 20 L 海水的玻璃缸中, 每组 10 尾, 实验期间连续充气, 水温 14 °C, 每天换水, 不投饵。

实验菌株 25 °C 培养 24 h 后, 用无菌 1.5% NaCl 水洗脱得菌悬液, 按 McFarland 比浊法配制 0.5 麦氏单位, 并进一步设定细菌浓度梯度, 以 3 种方式进行感染。

浸浴感染, 水体中菌液终浓度分别为 9×10^7 、 9×10^6 、 9×10^5 mL⁻¹, 每天换水补充菌液。

体腔注射, 菌液浓度分别为 9×10^7 、 9×10^6 、 9×10^5 、 9×10^4 mL⁻¹, 每尾刺参注射 0.1 mL, 对照组注射等量无菌 1.5% NaCl 水。

体壁肌肉注射, 菌液浓度分别为 9×10^7 、 9×10^6 、 9×10^5 、 9×10^4 mL⁻¹, 采用多点注射方式, 每尾刺参共注射 0.1 mL, 对照组注射等量无菌 1.5% NaCl 水。

1.4 细菌形态观察

将纯化的细菌划线接种于 2216E 和 TCBS 平板, 25 °C 培养 24 h 后, 观察菌落特征。取 2216E 平板 18 h 培养物, 革兰氏染色, 光学显微镜观察细菌形态。同时用无菌水洗下少量菌落, 负染, 透射电镜观察。

1.5 细菌生理生化鉴定

细菌的生理生化特征实验参照《常见细菌系统鉴定手册》^[4]和《伯杰氏细菌学鉴定手册》(第九

版)^[5]进行。

1.6 16S rRNA 和 HSP60 基因序列测定和分析

模板 DNA 的制备 细菌于 2216E 平板 25 ℃ 培养 24 h。挑取单一菌落,悬浮于 100 μL 无菌去离子水中,沸水煮 5 min,冷却后 4 ℃ 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,上清液即为模板 DNA。

基因序列的 PCR 扩增与测序 16S rRNA 基因 PCR 扩增的正向引物为 27F: 5' - AGAGTTTGATC(C/A) TGGCTCAG - 3', 反向引物为 1429R: 5' - GGCTACCTTGTTACGACTT - 3'^[6]。100 μL PCR 反应体系为: 10 μL 10 × PCR 缓冲液, 6 μL 25 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 2 μL 10 mmol·L⁻¹ 4 × dNTP, 引物各 1 μL, Taq DNA 聚合酶(5 U·μL⁻¹) 1 μL, 模板 DNA 2.5 μL, 去离子水 76.5 μL。PCR 反应条件为: 94 ℃ 预变性 4 min; 接着 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 复性 30 s, 72 ℃ 延伸 100 s, 30 个循环; 72 ℃ 温育 6 min。

HSP60 基因 PCR 扩增的正向引物为 P1: 5' - ACAACAGCAACGGTACTAGC - 3', 反向引物为 P2: 5' - CAACTTTCACGATGCCAC - 3'^[7]。PCR 反应体系同 16S rRNA 基因。反应条件为: 94 ℃ 预变性 2 min; 接着 94 ℃ 30 s, 50 ℃ 45 s, 72 ℃ 60 s, 30 个循环; 72 ℃ 延伸 7 min。

PCR 产物交由上海生物工程技术公司进行纯化和序列测定。

序列分析与系统发育树的构建 通过 Blast 从 GenBank 数据库中检索与待测菌序列同源性较高的细菌基因序列, 从中选取同源性较高的已知菌株采用 ClustalX1.8 软件进行多序列匹配排列, 用 Mega2.1 采用邻位相连法(Neighbor-joining method) 获得系统发育树, 自举分析(Bootstrap) 检测置信度, 自举数集 1 000 次。

1.7 细菌最适生长温度、盐度、pH 测定

配制不同盐度(5 ~ 50) 和 pH(6.0 ~ 9.2) 的 2216E 液体培养基, 接种细菌, 25 ℃ 摇床恒温振荡培养 24 h, 721 分光光度计 600 nm 测定 OD 值。配制盐度 30、pH 7.6 的 2216E 液体培养基, 接种细菌, 于不同温度(10 ~ 32 ℃) 恒温培养 24 h, 721 分光光度计 600 nm 测定 OD 值。

1.8 药物敏感试验

药敏纸片购自青岛爱普科技有限公司, 共 18 种抗菌药物, 药敏试验参照纸片法抗菌药物敏感试验操作标准进行。

2 结果

2.1 人工感染实验

用菌株 RH1、RH2、RH3 通过浸浴和体腔注射方式感染实验组, 刺参在 20 d 内仍健康, 均未出现发病症状; 体壁肌肉注射方式感染的实验组, 感染 RH1、RH3 的刺参在 20 d 内仍健康, 无发病症状, 而感染 RH2 的实验组, 刺参存活情况见表 1。

表 1 人工感染实验结果

Tab.1 Results of artificial infection experiment

分组 group	菌液浓度(mL ⁻¹) bacterial concentration	剂量(mL) dose	实验数(尾) test no.	死亡数(尾) death no	死亡率(%) mortality
1	9 × 10 ⁷	0.1	10	9	90
2	9 × 10 ⁶	0.1	10	6	60
3	9 × 10 ⁵	0.1	10	2	20
4	9 × 10 ⁴	0.1	10	0	0
对照 control	1.5% NaCl	0.1	10	0	0

以体壁肌肉注射方式感染 RH2 后的刺参体壁肌肉以注射点为中心向周围出现大面积溃疡(图 1), 粘液增多, 排脏, 有 1/4 的刺参出现肿嘴的症状, 最后刺参自溶死亡。对照组不表现任何症状。从感染发病的刺参溃疡处分离细菌, 用优势菌 RH2-1 再次感染刺参, 得到相同的结果。表明 RH2 是刺参溃疡病的致病菌。

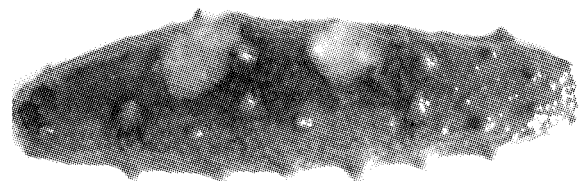


图 1 人工感染实验照片

Fig.1 The sea cucumber with skin ulceration in artificial infection experiment

按改进的寇氏法^[8]计算菌株 RH2 的半致死量 LD₅₀每尾为 5.68 × 10⁶ CFU。

2.2 细菌形态观察

在 2216E 平板上 25 ℃ 培养 24 h, 菌株 RH2 和 RH2-1 形成的菌落边缘略粗糙, 直径 1.5 ~ 2.0 mm, 不产生色素, 中央略隆起。TCBS 平板上, 菌落黄色, 形状和大小与在 2216E 平板上相似。菌株 RH2 电镜观察发现菌体呈杆状略弯曲, 具有 1 根端生鞭毛(图 2)。

2.3 生理生化鉴定结果

菌株 RH2 和 RH2-1 均为革兰氏染色阴性, 兼性厌氧, 氧化酶阳性, V.P. 反应阳性, 发酵葡萄糖产酸不产气, 对弧菌抑制剂 O/129 (150 μg) 敏感, 初步判定为弧菌属细菌 (*Vibrio* sp.)。

菌株 RH2 和 RH2-1 均具有运动性, 在 40 ℃ 以上和 4 ℃ 以下不生长; 鸟氨酸脱羧酶、精氨酸脱羧酶、精氨酸双水解酶阴性; 发酵葡萄糖产酸不产气; 还原硝酸盐; 淀粉酶、明胶酶阳性; 利用葡萄糖、半乳糖、海藻糖、蔗糖、甘露醇、精氨酸、鸟氨酸、柠檬酸盐等; 不利用乳糖、鼠李糖、木糖、阿拉

伯二糖、甘露糖、肌醇、山梨醇、水杨苷等。参照文献[4-5]发现, 菌株 RH2 和 RH2-1 与溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 较为相似, 初步鉴定为溶藻弧菌。有关 RH2、RH2-1、溶藻弧菌标准菌株 283 和文献[4]中溶藻弧菌生理生化特性的比较见表 2。

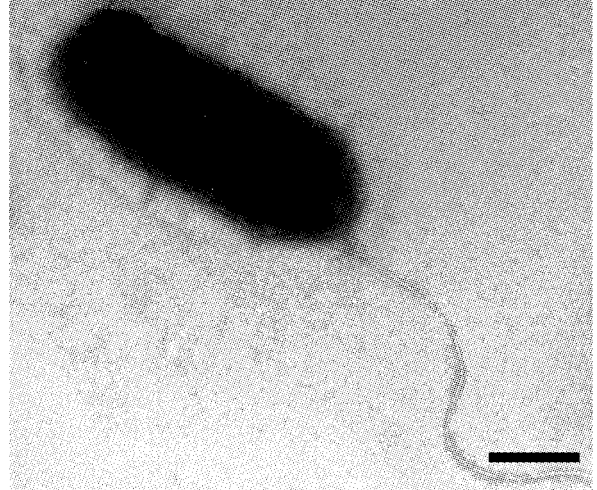


图 2 菌株 RH2 的负染电镜照片 (标尺 = 500 nm)

Fig. 2 The electron micrograph of strain RH2 (bar = 500 nm)

表 2 菌株 RH2 和溶藻弧菌生理生化特征的比较

Tab. 2 Comparison of physiological and chemical characteristics of strain RH2, RH2-1, 283 and *Vibrio alginolyticus*

鉴定项目 item	菌株 RH2	菌株 RH2-1	菌株 283	溶藻弧菌 <i>Vibrio alginolyticus</i>
4 ℃ 生长 4 ℃, growth	-	-	-	-
30 ℃ 生长 30 ℃, growth	+	+	+	+
35 ℃ 生长 35 ℃, growth	+	+	+	+
40 ℃ 生长 40 ℃, growth	-	-	+	-
生长需要 Na ⁺ Na ⁺ required for growth	+	+	+	+
O/129 (150 μg) 敏感 O/129 (150 μg) sensitivity	+	+	+	+
氧化酶反应 oxidase	+	+	+	+
V.P. 反应 Voges-Proskauer	+	+	+	+
葡萄糖产气 glucose, gas	-	-	-	-
硝酸盐还原 nitrate reduction	+	+	+	+
鸟氨酸脱羧酶 ornithine decarboxylase	-	-	-	-
精氨酸双水解酶 arginine dihydrolase	-	-	-	-
赖氨酸脱羧酶 lysine decarboxylase	-	-	-	-
明胶酶 gelatinase	+	+	+	+
淀粉酶 amylase	+	+	+	+
利用: 肌醇 myo-Inositol	-	-	-	-
甘露醇 mannitol	-	-	-	-
山梨醇 sorbitol	-	-	-	-
乳糖 lactose	-	-	-	-
半乳糖 galactose	+	+	+	+
甘露糖 mannose	+	+	+	d
蔗糖 sucrose	+	+	+	+
鼠李糖 rhamnose	-	-	-	-
海藻糖 trehalose	+	+	+	+
木糖 xylose	-	-	-	-
阿拉伯二糖 arabinose	-	-	-	-
水杨苷 salicin	-	-	-	-
柠檬酸盐 citrate	+	+	+	+
精氨酸 arginine	+	+	+	+
鸟氨酸 ornithine	+	+	-	-

注: “+”表示阳性; “-”表示阴性; “d”表示有的阴性, 有的阳性

Notes: “+” positive; “-” negative; “d” some strains are positive and some negative

2.4 基因序列分析和系统发育树的构建

为了更准确地确立菌株 RH2 的分类学地位,测定了其 16S rRNA 和 HSP60 基因序列,以总 DNA 为模板,经通用引物 27F 和 1 429R 扩增到约 1 500 bp 条带,经引物 P1 和 P2 扩增到约 500 bp 的条带(图 3)。

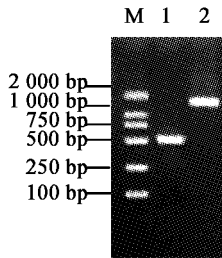


图3 菌株 RH2 的 HSP60 和 16S rRNA 基因的 PCR 扩增产物

Fig. 3 PCR amplified products of HSP60 and 16S rRNA genes of strain RH2

M. Marker; 1. 菌株 RH2 的 HSP60 基因的 PCR 扩增产物; 2. 菌株 RH2 的 16S rRNA 基因的 PCR 扩增产物
M. Marker; 1. HSP60 gene PCR product of strain RH2; 2. 16S rRNA gene PCR product of strain RH2

去除引物结合区,所扩增的菌株 RH2 的 16S rRNA 基因序列长度为 1 409 bp,用 Blast 在国际互联网上进行检索,发现在源性较高(98.87% ~ 99.72%)的 109 个序列中,有 100 个为弧菌属细菌的 16S rRNA 基因序列。从源性较高的序列中选取典型的序列进行系统发育学分析,结果如图 4 所示,菌株 RH2 与 *V. alginolyticus* (AF513447) 自然聚合,置信度为 50%。

所扩增的菌株 RH2 的 HSP60 基因部分序列长度为 513 bp, Blast 分析显示,与该基因序列源性较高(90% ~ 99%)的 100 个序列全部是弧菌属细菌的 HSP60 基因序列。系统发育树结果表明,该菌株与 *V. alginolyticus* (AY332570、AF230931) 聚为一个分支,置信度高达 99% (图 5)。可将这株刺参溃疡症的病原菌 RH2 鉴定为溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)。

目前,菌株 RH2 的 16S rRNA 和 HSP60 基因序列已经提交 GenBank 核苷酸序列数据库,存取号分别为 DQ664544 和 DQ664545。

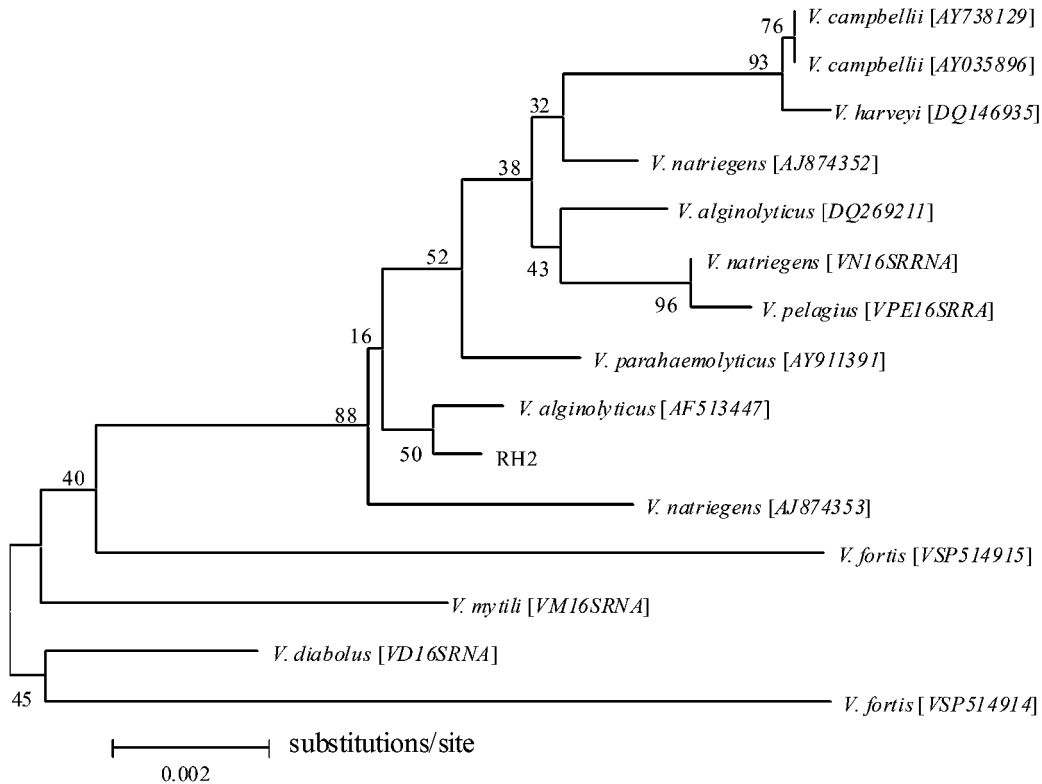


图4 以 16S rRNA 基因构建的弧菌系统发育树
Fig. 4 Phylogenetic tree of *Vibrio* based on 16S rRNA genes

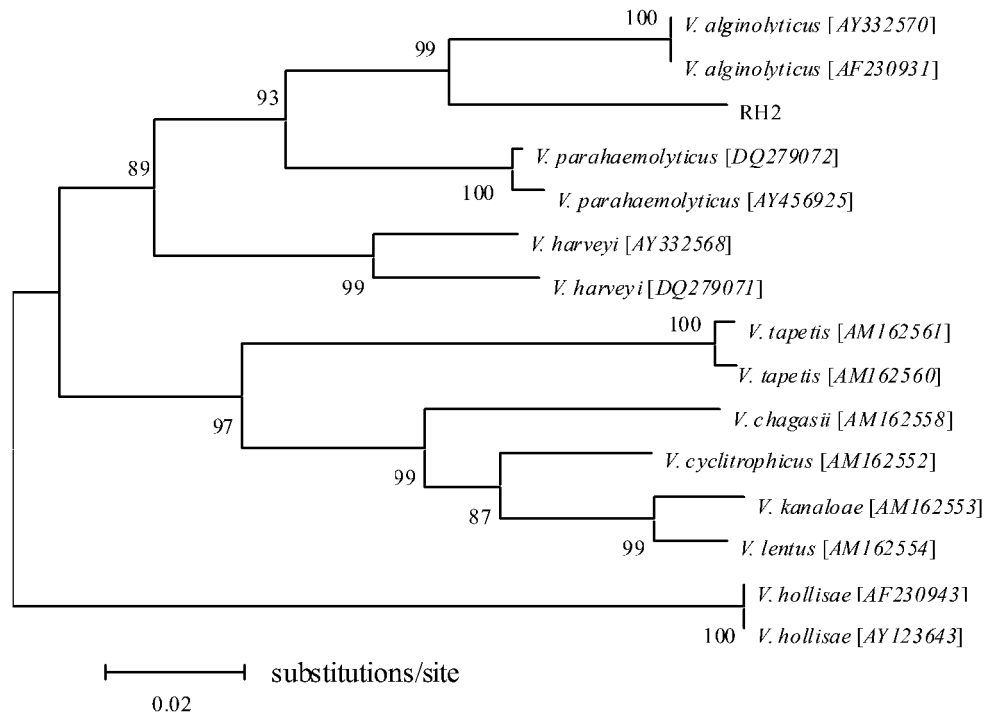


图5 以 HSP60 基因构建的弧菌系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree of *Vibrio* based on HSP60 genes

2.5 最适生长温度、盐度和 pH 测定

721 分光光度计检测发现,在 2216E 盐度为 5~50 时,最适生长盐度为 25~35,在盐度为 30 时生长最好;在 2216E pH 为 6.0~9.2 时,最适生长 pH 为 7.2~8.0,在 pH 为 7.6 时生长最好;在 2216E 盐度 30、pH 7.6 时,最适生长温度为 14~22 ℃,在 20 ℃ 时生长最好。

2.6 药物敏感试验

利用纸片法测定 18 种抗菌药物对菌株 RH2 的作用效果(表 3),菌株 RH2 对诺氟沙星、复方新诺明、壮观霉素等 8 种药物较为敏感,而对青霉素类药物和头孢类药物等具有耐药性。

3 讨论

本实验采用浸浴、体腔注射、体壁肌肉注射 3 种方式对刺参进行人工感染,旨在探明病原菌对刺参的侵染方式。实验结果表明浸浴感染和体腔注射的方式均无法使刺参致病,浸浴感染失败说明刺参在健康状态下不易发病,这与肖培华等^[9]、

Becker 等^[1]的实验结果一致。笔者认为体腔注射感染失败是因为刺参体腔中具有大量体腔细胞和多种体液免疫因子,具有吞噬异物等的防御功能,这与张峰^[10]的观点一致,并且刺参的体腔与外界相通,能够将大部分注入体腔的菌液排出体外。体壁肌肉注射感染成功且刺参溃疡部位是以注射部位为中心向周围逐渐扩散,故可以推测该病原菌是通过体表创伤侵入的方式感染宿主刺参的,因此在刺参养殖的生产操作中需要特别仔细,避免刺参体表创伤而使病原菌乘虚而入。

目前 16S rRNA 测序分析方法已被广泛应用于细菌性疾病的诊断^[11],但 16S rRNA 序列高度保守,对于属以下的分类单位分辨率明显不足^[12]。热激蛋白(heat shock protein)广泛存在于细菌及真核生物细胞中,其中热激蛋白 60(60 ku heat shock protein)由 HSP60 基因编码由于 HSP60 基因在系统进化中保守,并在不同种间具有足够的多态性,因此适合用于细菌属内的鉴定^[12-13]。

表3 菌株RH2对不同抗菌药物的敏感性

Tab.3 Sensitivity of the strain RH2 to antibacterial agents

抗菌药物 antibacterial agents	纸片含量 ($\mu\text{g}/\text{piece}$)	抑菌圈直径(mm) diameter of inhibiting ring	敏感性 sensitivity	抗菌药物 antibacterial agents	纸片含量 ($\mu\text{g}/\text{piece}$)	抑菌圈直径(mm) diameter of inhibiting ring	敏感性 sensitivity
青霉素 G penicillin	10	0	耐药 R	红霉素 erythromycin	15	17	中介 I
苯唑青霉素 bictocil	10	0	耐药 R	诺氟沙星 norfloxacin	10	26	敏感 S
头孢氨苄 cefalexin	30	0	耐药 R	环丙沙星 ciprofloxacinum	5	25	敏感 S
头孢拉定 cefradine	30	10	耐药 R	罗美沙星 lomefloxacin	10	22	敏感 S
头孢唑啉 cefamezin	30	13	耐药 R	复方新诺明 SMZ + TMP	25	26	敏感 S
庆大霉素 gentamicinum	10	19	敏感 S	呋喃妥因 nitrofurantoin	300	16	中介 I
卡那霉素 kanamycinum	30	13	耐药 R	痢特灵 furazolidone	300	19	敏感 S
链霉素 streptomycin	10	18	敏感 S	利福平 rifampicine	5	17	中介 I
四环素 tetracycline	30	16	中介 I	壮观霉素 spectinomycine	100	30	敏感 S

在病原菌 RH2 的分子生物学鉴定中,本实验采用了 16S rRNA 和 HSP60 基因序列两种方法,从结果中可以看出以 16S rRNA 基因构建的弧菌系统发育树,菌株 RH2 与溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)自然聚合,但置信度仅为 50%,而且同一种的聚类不明显;以 HSP60 基因构建的弧菌系统发育树,菌株 RH2 也与溶藻弧菌聚合,置信度高达 99%,同一种的聚类也很明显,说明 HSP60 基因比 16S rRNA 基因更适合于细菌属内种之间的分类鉴定。

目前国内外对海参溃疡病的研究刚刚展开,对此病的病原也是众说纷纭,不能统一。Becker 等^[1]认为糙海参幼体的皮肤溃烂病的病原是哈维氏弧菌或溶藻弧菌;张春云等^[2]报道灿烂弧菌是山东青岛地区刺参溃疡病的病原;王印庚等^[3]认为假交替单胞菌是山东、辽宁省保苗期刺参溃疡病的病原。本研究通过人工感染实验证实溶藻弧菌是山东乳山养殖刺参溃疡病的病原菌。病原菌不同可能是由于地域、物种以及养殖环境的差异而造成的,在刺参溃疡病病原问题上我们仍需进行深入的调查研究,以期早日攻克阻碍刺参养殖业发展的难题。

溶藻弧菌能够引起多种水产动物疾病,如牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、大菱鲆(*Scophthalmus*

maximus)、斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)等^[14-16],Becker 等^[1]也曾从刺参溃疡病的病灶处分离出溶藻弧菌。药物敏感试验显示菌株 RH2 对诺氟沙星、复方新诺明、壮观霉素等较为敏感,可为实际生产的用药提供参考。笔者认为在实际生产中贯彻健康养殖、合理用药的理念才是解决养殖动物疾病问题的根本途径,盲目的大范围、高剂量的用药只会使疾病愈演愈烈,失去控制。

本实验从病原学方面对刺参溃疡病做了基础性研究,并对病原菌的敏感性药物进行了筛选,有助于指导养殖生产。

参考文献:

- [1] Becker P, Gillan D, Lanterbecq D, *et al.* The skin ulceration disease in cultivated juveniles of *Holothuria scabra* [J]. *Aquaculture*, 2004, 242: 13-30.
- [2] 张春云, 王印庚, 荣小军. 养殖刺参腐皮综合征病原菌的分离与鉴定[J]. *水产学报*, 2006, 30(1): 118-123.
- [3] 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[J]. *中国水产科学*, 2006, 13(4): 610-616.
- [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.
- [5] Bergey's manual of determinative bacteriology ninth

- edition[M]. Maryland: Williams & Wilkins, 1994.
- [6] Polz M F, Cavanaugh C M. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(10): 3724.
- [7] 李宁求, 白俊杰, 吴淑勤, 等. 斜带石斑鱼 3 种致病弧菌的分子生物学鉴定[J]. *水产学报*, 2005, 29(3): 356 - 361.
- [8] 邹玉霞, 张培军, 莫照兰, 等. 大菱鲆出血症病原菌的分离和鉴定[J]. *高技术通讯*, 2004, 4: 89 - 93.
- [9] 肖培华, 唐永新, 与乐河, 等. 刺参病害细菌感染试验[J]. *齐鲁渔业*, 2005, 22(6): 26 - 27.
- [10] 张 峰. 棘皮动物体内防御机制的研究进展[J]. *大连水产学院学报*, 2005, 20(4): 340 - 344.
- [11] 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.
- [12] 石存斌, 胡学峰, 李宁求, 等. 哈维氏弧菌 SpGY020601 株的鉴定和生物学特性分析[J]. *水产学报*, 2004, 28(增刊): 117 - 123.
- [13] Goh S H, Wood J O. HSP60 gene sequences as universal targets for microbial species identification: studies with coagulase-negative staphylococci [J]. *J Clin Microbiol*, 1996, 34(4): 818 - 23.
- [14] Tanasomwang V. Intestinal microflora of larval and juvenile stages in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Fish Pathol*, 1988, 23(2): 77 - 83.
- [15] Austin B, Stobi M, Robertson P A W, *et al.* *Vibrio alginolyticus*: the cause of gill disease leading to progressive low-level mortalities among juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L. in a Scottish aquarium[J]. *J Fish Dis*, 1993, 16: 277 - 280.
- [16] 段翠兰, 吴灶和, 陈 辉, 等. 溶藻弧菌 01 株外膜蛋白的分离及其抗原性分析[J]. *水产学报*, 2004, 28(增刊): 112 - 116.