

## 老化参池刺参腐皮综合征致病原的分离与鉴定

黄华伟<sup>1,2</sup>, 王印庚<sup>2\*</sup>, 陈霞<sup>3</sup>, 张凤萍<sup>4</sup>

(1. 湖南省水产科学研究所, 湖南长沙 410153;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 海水鱼类养殖与设施渔业研究室, 山东青岛 266071;

3. 青岛九洋红水产科技有限公司, 山东青岛 266071;

4. 浙江省舟山市水产研究所, 浙江舟山 316000)

**摘要:** 从患病刺参体表病灶组织分离出菌株 060330B, 其优势度高达 90%, 人工回接感染试验证实其具有较强的致病性, 可导致健康刺参出现与自然患病刺参相同的症状。通过形态学观察、API 半自动化鉴定和常规生理生化试验的结果表明, 菌株 060330B 具有假单胞菌属的特征, 其表型特征与恶臭假单胞菌相似。对该菌株进行 16S rRNA 基因序列分析和构建系统发育树, 结果显示其与恶臭假单胞菌的亲缘关系最近, 相似率达到 99.5%。菌株 060330B 可鉴定为恶臭假单胞菌, 并视为养殖刺参腐皮综合征的致病原之一。通过对多起不同来源患病刺参的研究表明, 使用年限长、淤泥层厚呈黑色并伴有腥味的养殖池塘在该时期容易导致刺参腐皮综合征的发生。

**关键词:** 刺参; 腐皮综合征; 恶臭假单胞菌; 老化参池

**中图分类号:** S 947.9

**文献标识码:** A

随着北方沿海刺参 (*Apostichopus japonicus*) 养殖规模的日益扩大, 由于疾病防治技术相对滞后, 加之不规范操作, 在养殖过程中普遍发生腐皮综合征疾病, 导致极高死亡率和严重经济损失<sup>[1-3]</sup>。该病多发生在养殖水体温度较低时期, 而且波及面广, 越冬保苗期幼参和养成期刺参均可被感染, 一旦发病很快就会蔓延至全池, 死亡率高达 90%, 属急性死亡<sup>[1]</sup>。刺参腐皮综合征主要症状表现为肿嘴、摇头、排脏、身体萎缩、体表溃烂直至解体死亡, 其传染性强、发病快、流行性广, 严重制约了刺参健康养殖和可持续发展。研究表明, 假交替单胞菌<sup>[2]</sup>、灿烂弧菌<sup>[3]</sup>以及溶藻弧菌<sup>[4]</sup>均可导致刺参腐皮综合征的发生, 其病原具有地域性和多样性的特点<sup>[2]</sup>。本文报道了由恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 感染引起的刺参腐皮综合征疾病, 不仅为丰富和完善养殖刺参的病原学研究奠定了理论基础, 也为疾病发生早期的科学诊断和防治提供依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 样品来源

患病刺参样品来自青岛城阳(记为 A)和即墨田横(记为 B)某刺参养殖场。其症状表现为肿嘴、摇头、排脏、身体萎缩、体表出现蓝白色溃烂, 最终解体死亡。发病池塘养殖时间较长, 池塘底质松软、淤泥层较厚, 泥样发黑并伴有腥味。

#### 1.2 水质分析与细菌总数检测

用 YSI 556 MPS 型溶氧仪现场测定池塘表层水体(水面以下约 30 cm 处)和底层水体(距池底约 30 cm 处)的温度(T)、盐度(S)、pH、溶解氧(DO)。同时分别采集池塘表、底层水样和表层泥样(距池底约 10 cm 处), 低温保存带回实验室后按文献[5]中方法测定水样的化学耗氧量(COD)、氨氮(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)和亚硝酸氮(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N)以及平板菌落计数法<sup>[6]</sup>测定水样和泥样的异养菌总数及弧菌总数。

收稿日期:2010-04-07 修回日期:2010-06-27

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA100313);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);农业部农业结构调整重大技术专项(06-05-04B);山东省农业良种工程重大课题

通讯作者:王印庚, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

### 1.3 病灶观察与细菌分离纯化

用 1.5% 生理盐水冲洗刺参病灶组织部位后,取病参体表粘液和病灶组织制作水浸片在光学显微镜下观察。无菌条件下取刺参病灶组织少许,采用 TSB 固体培养基以平板划线法分离细菌,同时记录涂布水样和泥样平板上各不同形态的菌落数和菌落特征,挑取优势菌落分离纯化。所有平板置 20 °C 培养箱重复培养 3 次获得纯化菌株,并且保存在 TSB 半固体斜面及 15% 甘油中备用(V/V, 1.5% 生理盐水配制, -80 °C 保藏)。

### 1.4 人工回接感染试验

**试验用参** 健康刺参购自青岛崂山,均为自然海区底播刺参。刺参体长为 8~12 cm,体重为 15~36 g。刺参在塑料水箱充气暂养 5 d 后,随机挑取数头进行显微观察和微生物分离培养,进一步确认其健康状况,无异常后进行正式试验。

**菌悬液制备** 将刺参病灶组织分离的优势菌株 060330B 接种于 TSB 固体培养基,20 °C 培养 24 h 后用无菌 1.5% 生理盐水洗下菌落,制成菌悬液,通过麦氏比浊法制得浓度为  $1.5 \times 10^9$ 、 $1.5 \times 10^8$ 、 $1.5 \times 10^7$ 、 $1.5 \times 10^6$  和  $1.5 \times 10^5$  CFU/mL 5 个梯度的菌悬液。

**攻毒试验** 感染试验在 20 L 的塑料水箱中进行,每只水箱为一组,每组 5 头刺参,五个浓度梯度各设 2 个平行组,每头刺参口腹部肌肉注射 0.2 mL 菌悬液;同时布设对照组,分别注射等量 1.5% 灭菌生理盐水和浓度为  $1.5 \times 10^9$  CFU/mL 的氢氧化细菌(由中国水产科学研究院黄海水产研究所海洋渔业环境与生物修复实验室提供)。试验期间,海水水温在 17~19 °C,盐度在 28~29,每 2 天按刺参体重的 1% 投饵料一次,同时换水一次,每次换水量约 1/3,不充气。人工感染后,每日记录刺参的摄食、活动、体表变化以及死亡情况,连续观察 25 d,以改进的寇氏法<sup>[7]</sup>计算该菌株对刺参的半致死量 LD<sub>50</sub>。试验期间,取体表出现溃烂、濒死的刺参进行细菌再分离,所分离菌株(编号为 060330B-1)再次感染刺参,观察记录结果。

### 1.5 病原菌分类鉴定

**形态学观察** 将菌株 060330B 活化培养后,经革兰氏染色后在光学显微镜下观察。无菌条件下,挑取菌株 060330B 活化培养后的单菌落,用 2% 戊二醛固定数分钟,取 1 滴固定好的菌

液置于铜网上,以 3% 磷钨酸负染,凉干,在透射电镜下观察其形态特征。

**细菌学常规鉴定与 API 人工鉴定** (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》<sup>[8]</sup>和《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[9]</sup>方法进行。

(2) API 半自动化鉴定。将菌株 060330B 接种于 TSB 固体平板,20 °C 培养 24 h 后用无菌 1.5% 生理盐水洗下菌落,制成菌悬液,用 API/ATB 光电比浊仪测量配成 0.5 mol/L McFarland 的菌悬液,吸取菌悬液(每孔 55 μL)接种于 ID32E 测试卡,置于 25 °C 培养箱孵育 24 h,取出测试卡人工读卡。

**细菌的 16S rRNA 基因序列分析** (1) PCR 模板 DNA 的制备。将菌株 060330B 接种 TSB 固体平板,20 °C 培养过夜。取单菌落悬浮于 30 μL 的双蒸水中,100 °C 沸水浴加热 5 min 后置于冰块中。4 °C,12 000 r/min 离心 10 min,上清液即为 PCR 模板 DNA。

(2) 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增与测序。根据细菌 16S rRNA 设计通用扩增引物,扩增基因的正向引物为 27F:5'-AGAGTTTGATC(C/A)TGGCTCAG-3'(对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的第 8~27 bp 位置),反向引物为 1492R:5'-TACGGC(C/T)TACCTTGTTACGACTT-3'(对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的第 1 492~1 510 bp 位置)。50 μL 的 PCR 反应体系中含有:10 × PCR 缓冲液 5 μL,4 × dNTP(10 mmol/L)4 μL,MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L)4 μL,引物(10 μmol/L)各 2.5 μL,Taq 聚合酶(50 U/μL)1.25 μL,DNA 模板 1 μL,ddH<sub>2</sub>O 29.75 μL。PCR 反应条件为第一阶段 94 °C 变性 3 min;第二阶段 94 °C 平衡 40 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,此阶段 35 个循环;第三阶段 72 °C 温育 6 min。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 的最终产物由上海博亚生物技术公司进行纯化和测序。

**系统发育树构建** 将测试菌株的 16S rRNA 基因序列与互联网 NCBI 的基因库中细菌的 16S rRNA 进行比对,从中选取 16 株与该菌株基因序列最相似的菌株,采用 Clustal w 软件进行多序列匹配分析,然后用系统发生推断软件包 PHYLIP 3.65 进行该菌株系统发育树的构建。

## 2 结果

### 2.1 发病池塘水质与细菌数量特征

刺参发病早期,池塘水质检测结果表明:池塘表层水体水温和溶氧均高于水体底层,底层水体溶氧缺乏;池水 COD 含量较低,水层差异不大,盐

度和 pH 符合海参养殖要求,但底层水体氨氮、亚硝酸氮含量均高于表层,氨氮超出海参养殖 0.02 mg/L<sup>[10]</sup> 以下的指标要求(表 1),底层水体出现不同程度恶化。细菌数量检测结果表明:池水中异养菌总数、弧菌总数都处于较低水平,但表层底泥中异养菌总数处于较高水平(表 2)。

表 1 发病刺参养殖池塘水体的理化特征

Tab.1 Physico-chemical characteristics of cultural ponds water where sea cucumber suffered from skin ulcer syndrome

养殖场 farm	水层 water layer	水温(°C) T	盐度 S	pH	溶氧(mg/L) DO	化学耗氧量(mg/L) COD	氨氮(mg/L) NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> - N	亚硝酸氮(mg/L) NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> - N
A	表 surface	10.1	31.95	7.86	6.13	0.78	0.009 2	0.004 6
	底 bottom	8.9	32.04	7.84	2.41	0.96	0.025 8	0.028 9
B	表 surface	13.2	29.68	7.96	6.97	0.60	0.009 7	0.012 5
	底 bottom	11.6	29.71	7.99	2.63	0.62	0.031 2	0.029 6

表 2 发病刺参养殖池塘水体和底泥中的细菌总数

Tab.2 Total bacteria count in cultural ponds water and bottom mud where sea cucumber suffered from skin ulcer syndrome

养殖场 farm	异养菌总数(CFU/mL 或 CFU/g)			弧菌总数(CFU/mL 或 CFU/g)		
	表层水体	底层水体	底泥	表层水体	底层水体	底泥
	surface water	bottom water	bottom mud	surface water	bottom water	bottom mud
A	$(3.3 \pm 0.31) \times 10^2$	$(5.2 \pm 0.35) \times 10^2$	$(4.8 \pm 0.28) \times 10^6$	$(6.0 \pm 0.14) \times 10$	$(7.0 \pm 0.21) \times 10$	$(5.2 \pm 0.11) \times 10^4$
B	$(3.5 \pm 0.34) \times 10^2$	$(1.3 \pm 0.17) \times 10^3$	$(1.6 \pm 0.23) \times 10^6$	$(9.0 \pm 0.18) \times 10$	$(2.1 \pm 0.16) \times 10^2$	$(1.4 \pm 0.24) \times 10^5$

注:水体中细菌数量以 CFU/mL 表示,底泥中细菌数量以 CFU/g 表示。

Notes: Bacteria count in pond water and bottom mud were indicated by CFU/mL and CFU/g respectively.

### 2.2 病原菌的分离

取病参体表粘液和病灶组织制作水浸片,光镜下可见大量运动的短杆状细菌,并未发现寄生虫和霉菌。解剖病参发现其大都已经排脏,未排脏的刺参其肠道呈橘红色,参体内壁呈乳白色近乎溃烂状。从刺参体表病灶组织分离出菌株 060330B,从菌落形态特征及镜检结果来看,该菌落优势度高达 90%,TSB 固体培养基 25 °C 培养 24 h 条件下,菌落圆形,中等大小,呈灰白色,中央隆起,不透明,表面光滑,边缘整齐,半湿润,较粘稠;TCBS 固体培养基上可生长,呈绿色菌落。

### 2.3 人工感染试验

人工回接感染试验表明  $1.5 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^6$  CFU/mL 组刺参未出现明显感染症状和死亡,  $1.5 \times 10^7 \sim 1.5 \times 10^9$  CFU/mL 组均可造成健康刺参出现不同程度感染,呈现与自然患病刺参相同的症状,且  $1.5 \times 10^9$  CFU/mL 组刺参死亡率达 100%,而对照组刺参则均正常未出现任何症状和死亡(表 3)。人工感染试验条件下,该菌株对刺参的半致死量 LD<sub>50</sub> 为  $7.5 \times 10^6$  CFU。健康刺参从感染病原菌出现症状到死亡的病变过程如图版-1~4 所示。

表 3 人工感染试验结果

Tab.3 Results of artificial infection experiment

分组 group	细菌浓度(CFU/mL) bacterial concentration	剂量(mL) dose	试验数(ind) test no.	死亡数(头) death no.	死亡率(%) mortality
1	$1.5 \times 10^9$	0.2	10	10	100
2	$1.5 \times 10^8$	0.2	10	8	80
3	$1.5 \times 10^7$	0.2	10	3	30
4	$1.5 \times 10^6$	0.2	10	0	0
5	$1.5 \times 10^5$	0.2	10	0	0
对照 1 control 1	1.5% 生理盐水 physiological saline	0.2	10	0	0
对照 2 control 2	$1.5 \times 10^9$ 氨氧化细菌 ammonia-oxidizing bacteria	0.2	10	0	0

注:人工感染试验进行 25 d 完成。

Notes: Artificial infection experiment was finished in 25 d.

## 2.4 病原菌形态特征

菌株 060330B 为革兰氏阴性菌,呈短杆状(图 1)。透射电镜下,其大小为 $(0.2 \sim 0.6) \mu\text{m} \times (1.0 \sim 1.2) \mu\text{m}$ ,略弯曲,具有两根极生鞭毛,最长鞭毛可达菌体长度的 3 倍(图 2)。

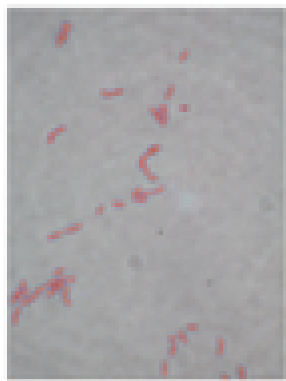


图 1 060330B 革兰氏染色图片

Fig. 1 Micrograph of 060330B after Gram-staining

## 2.5 生理生化试验及 API 试验条鉴定

菌株 060330B 非发酵型,氧化分解葡萄糖,氧化酶、过氧化氢酶、枸橼酸盐利用、硝酸

盐还原、精氨酸双水解酶阳性;V-P 反应、甲基红实验、 $\text{H}_2\text{S}$  产生、吲哚反应、脲酶、明胶酶、鸟氨酸脱羧酶、赖氨酸脱羧酶阴性;生长不需要钠盐,4 °C 能生长,40 °C 以上不生长。参照《伯杰细菌鉴定手册》<sup>[8]</sup>和《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[9]</sup>进行了 40 余项生理生化指标测定,结果显示其与恶臭假单胞菌的生理生化特征相似(表 4)。

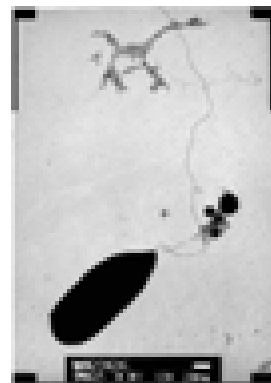


图 2 060330B 的电镜照片(标尺 = 200 nm)

Fig. 2 Electron micrograph of 060330B (bar = 200 nm)

表 4 菌株 060330B、060330B-1 与恶臭假单胞菌标准菌株的形态及生理生化特征比较

Tab. 4 Morphological, physiological and biochemical characteristics of 060330B, 060330B-1 compared with standard strain *P. putida*

鉴定项目 items	060330B	060330B-1	恶臭假单胞菌 <i>P. putida</i>
革兰氏染色 gram stain	-	-	-
鞭毛染色 flagella	p	p	p
荧光色素 fluorescent pigments	+	+	+
运动性 motility	+	+	+
4 °C 生长 growth at 4 °C	+	+	+
25 °C 生长 growth at 25 °C	+	+	+
30 °C 生长 growth at 30 °C	+	+	+
35 °C 生长 growth at 35 °C	+	+	+
40 °C 生长 growth at 40 °C	-	-	-
0% NaCl 生长 growth on 0% NaCl	+	+	+
3% NaCl 生长 growth on 3% NaCl	+	+	+
6% NaCl 生长 growth on 6% NaCl	+	+	+
8% NaCl 生长 growth on 8% NaCl	+	+	+
10% NaCl 生长 growth on 10% NaCl	+	+	-
氧化酶 oxidase	+	+	+
过氧化氢酶 catalase	+	+	+
柠檬酸盐利用 citrate utilization	+	+	+
硝酸盐还原 nitrate reduction	+	+	+
反硝化 denitrification	-	-	-
O/F 试验 oxidation/Fermentation test	O	O	O

· 续表 4 ·

鉴定项目 items	060330B	060330B-1	恶臭假单胞菌 <i>P. putida</i>
V-P 反应 vogus-proskauer	-	-	-
甲基红实验 methyl red test	-	-	-
H <sub>2</sub> S 产生 H <sub>2</sub> S production	-	-	-
七叶灵水解 esculin hydrolyze	-	-	-
吲哚产生 indole production *	-	-	-
脲酶 urease *	-	-	-
明胶酶 gelatinase	-	-	-
淀粉酶 amylase	-	-	-
脂肪酶 lipase *	+	+	+
精氨酸双水解酶 arginine dihydrolase *	+	+	+
鸟氨酸脱羧酶 ornithine decarboxylase *	-	-	-
赖氨酸脱羧酶 lysine decarboxylase *	-	-	-
果糖 fructose	+	+	+
海藻糖 fucose	-	-	-
肌醇 inositol *	-	-	-
葡萄糖 glucose *	+	+	+
蔗糖 sucrose *	-	-	-
L-阿拉伯糖 L-arabinose *	-	-	-
鼠李糖 rhamnose *	-	-	-
山梨醇 D-sorbitol *	-	-	-
甘露醇 mannitol *	-	-	-
麦芽糖 D-maltose *	-	-	-

注：“+”阳性；“-”阴性；“p”多鞭毛；“O”氧化型；“\*”ID32E 试剂条部分指标。

Notes：“+”positive；“-”negative；“p”polytrichous；“O”oxidation；“\*”partial items of ID32E.

## 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 060330B 的分类地位，测定了其 16S rRNA 基因序列。通过国际互联网 NCBI, 在 GenBank 中采用 BLAST 程序与已知序

列进行相似性分析, 发现其与假单胞菌属 16S rRNA 序列自然聚类(表 5)。在相近的 100 个序列中, 从中选取 16 株最相近的菌株构建系统发育树(图 3), 结果表明菌株 060330B 与恶臭假单胞菌亲缘关系最近, 同源性达到 99.5%。

表 5 16S rRNA 序列来源和数据库存取号

Tab. 5 Bacterial strains for phylogenetic dendrogram construction and their access numbers in GenBank

细菌 bacteria	存取号 access number	细菌 bacteria	存取号 access number
<i>Pseudomonas lundensis</i> 1	AB021395	<i>Pseudomonas syringae</i> 9	AM184090
<i>Pseudomonas fragi</i> 2	AB021413	<i>Pseudomonas migulae</i> 10	AY047218
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 3	AB204715	<i>Pseudomonas fragi</i> 11	AY195842
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> 4	AF094722	<i>Pseudomonas putida</i> 12	AY450555
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 5	AF094725	<i>Pseudomonas putida</i> 13	AY450557
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 6	AF336352	<i>Pseudomonas veronii</i> 14	AY512618
<i>Pseudomonas tolaasii</i> 7	AF348507	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 15	DQ084459
<i>Pseudomonas corrugata</i> 8	AF348508	<i>Pseudomonas putida</i> 16	DQ178233

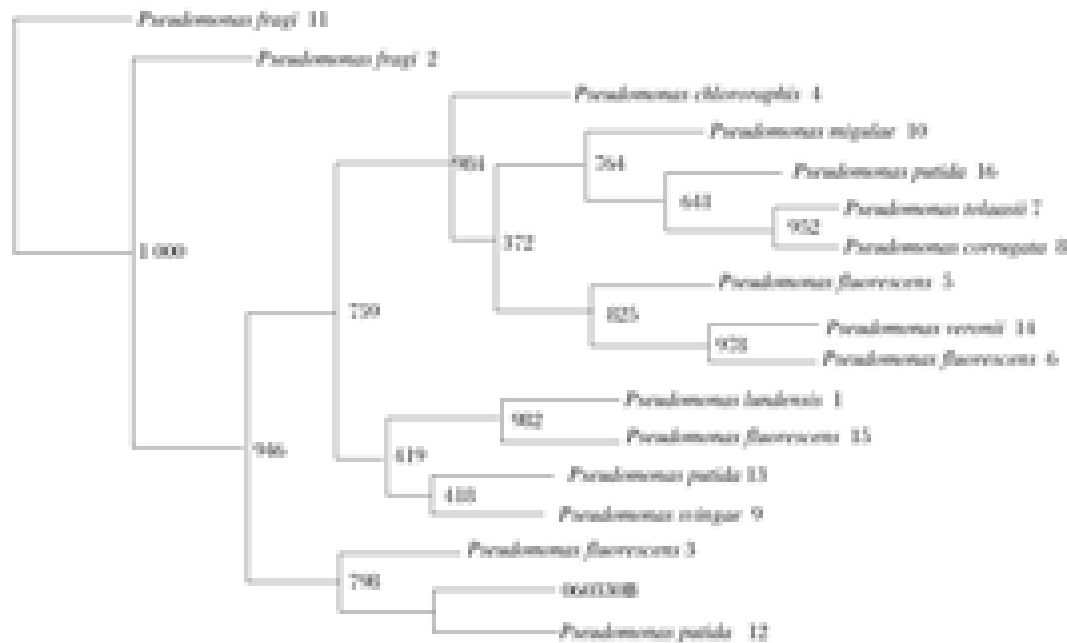


图3 菌株 060330B 的 16S rRNA 基因序列聚类分析结果

Fig.3 Clustering result of gene sequence of 16S rRNA of the bacterial strain 060330B

### 3 讨论

鉴于菌株 060330B 的形态、生理生化特征以及 16S rRNA 基因序列与恶臭假单胞菌相似性极高,因而菌株 060330B 被鉴定为恶臭假单胞菌。分离菌株 060330B 可在人工回接感染条件下使正常健康的刺参产生与自然发病相同的症状,从中再次分离的优势菌 060330B-1 也可致使健康刺参感染出现一致的症状,且经鉴定与菌株 060330B 为同一种细菌,符合柯赫法则。因此,恶臭假单胞菌也是导致刺参腐皮综合征的重要致病原。

恶臭假单胞菌有生物型 A 和生物型 B 两种,均有致病性且致病性较强,经口感染不仅可以导致鸟类的腹泻甚至死亡<sup>[11]</sup>,而且还能造成人类的食物中毒<sup>[12]</sup>。在水产动物中,其可引起罗氏沼虾的黄鳃、黑鳃病<sup>[13]</sup>、欧洲鳗鲡的烂鳃病<sup>[14]</sup>以及虹鳟鱼的溃烂病<sup>[15]</sup>。此外,恶臭假单胞菌的粘附素和胞外产物的溶血素等毒性蛋白共同作用还能对养殖河蟹造成危害<sup>[16]</sup>。

假单胞菌属细菌为条件致病菌,正常条件下普遍存在于养殖环境中,并不对水产动物造成危害,只有在环境条件适宜,其达到足够数量,易感动物失去抵抗力或抵抗力较弱时才导致水产动物疾病的发生。刺参腐皮综合症发生早期,发病池

塘水质检测结果表明:表层水体水温和溶氧普遍高于水体底层,池塘水体形成了水温和溶氧双分层,上下水体得不到有效交换,底层水体不仅缺氧而且氨氮、亚硝酸氮含量也高于表层,氨氮超出了刺参养殖低于 0.02 mg/L<sup>[10]</sup> 的指标要求,底层水体开始出现恶化。同时,细菌总数检测结果显示水体中细菌数量较低,这可能与水体的 COD 含量不高有关,但表层底泥中异养菌总数却处于较高水平,而且从菌落特征来看底泥中分离出的优势菌与菌株 060330B 具有一致性,后经证实也确为同一种细菌。刺参营底栖生活,人工池塘养殖条件下主要以表层底泥中的底栖生物和有机碎屑等为生,并且是连同底泥一起摄食。在水质环境恶化的情况下,一旦刺参摄入含有一定量致病菌的底泥,体质虚弱的刺参就容易出现感染,导致腐皮综合症的发生。可见,池塘水体恶化、底泥中病原菌数量激增是导致该时期养殖刺参腐皮综合症发生的原因之一。

由于恶臭假单胞菌的致病性与刺参的生理状态和养殖环境密切相关,因此在刺参低温养殖季节一定要确保水体水温的稳定,避免水体分层的形成。同时加大换水量及频率、定期进行池塘的底质改良,控制病原微生物数量在危害水平以下。鉴于此,今后应深入进行养殖刺参的底栖生态学尤其是病原生态学方面的研究,掌握疾病发生的

水环境和微生态环境特征,以便为疾病发生早期的快速诊断和科学防治提供技术支持。

#### 参考文献:

- [1] 王印庚,荣小军,张春云,等. 养殖刺参暴发性疾病-“腐皮综合症”的初步研究与防治[J]. 齐鲁渔业,2004,21(5):44-47.
- [2] 王印庚,方波,张春云,等. 养殖刺参苗期重大疾病“腐皮综合症”病原及其感染源分析[J]. 中国水产科学,2006,13(4):610-616.
- [3] 张春云,王印庚,荣小军. 养殖刺参腐皮综合症病原菌的分离与鉴定[J]. 水产学报,2006,30(1):118-123.
- [4] 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[J]. 水产学报,2007,31(4):504-511.
- [5] 魏复盛. 水和废水监测分析方法[M]. 北京:中国环境科学出版社,2002.
- [6] 沈萍,范秀容,李广武. 微生物学实验[M]. 北京:高等教育出版社,1999.
- [7] 杨茂成. 兽医统计学[M]. 北京:中国展望出版社,1990.
- [8] Holt J G. Bergey's manual of determinative Bacteriology [M]. 9th edition. Maryland: Williams & Wilkins,1994.
- [9] 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.
- [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] 杨润德,王琳,范欢,等. 丹顶鹤恶臭假单胞菌的分离及生物学特性鉴定[J]. 中国兽医杂志,2005,41(4):55-56.
- [12] 李庆山,邢瑞云,张芳萍,等. 首次发现恶臭假单胞菌引起的食物中毒[J]. 中国公共卫生,2000,16(1):50-51.
- [13] 陶保华,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.
- [14] 樊海平. 恶臭假单胞菌引起的欧洲鳗鲡烂鳃病[J]. 水产学报,2001,25(2):147-150.
- [15] Ilhan A, Sevki K, Erol C. *Pseudomonas putida* infection in rainbow trout [J]. Aquaculture, 2006, 261:850-855.
- [16] 江定丰,李槿年,余为一. 一株中华绒螯蟹病菌鉴定及其致病机理的研究[J]. 水利渔业,2003,23(6):51-54.

## Isolation and identification of cultured *Apostichopus japonicus* pathogen associated with skin ulcer syndrome in old ponds

HUANG Hua-wei<sup>1,2</sup>, WANG Yin-geng<sup>2\*</sup>, CHEN Xia<sup>3</sup>, ZHANG Feng-ping<sup>4</sup>

(1. Fishery Sciences Institute of Hunan Province, Changsha 410153, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. Sunny Oceans Aquaculture Technology Co., Ltd, Qingdao 266071, China;

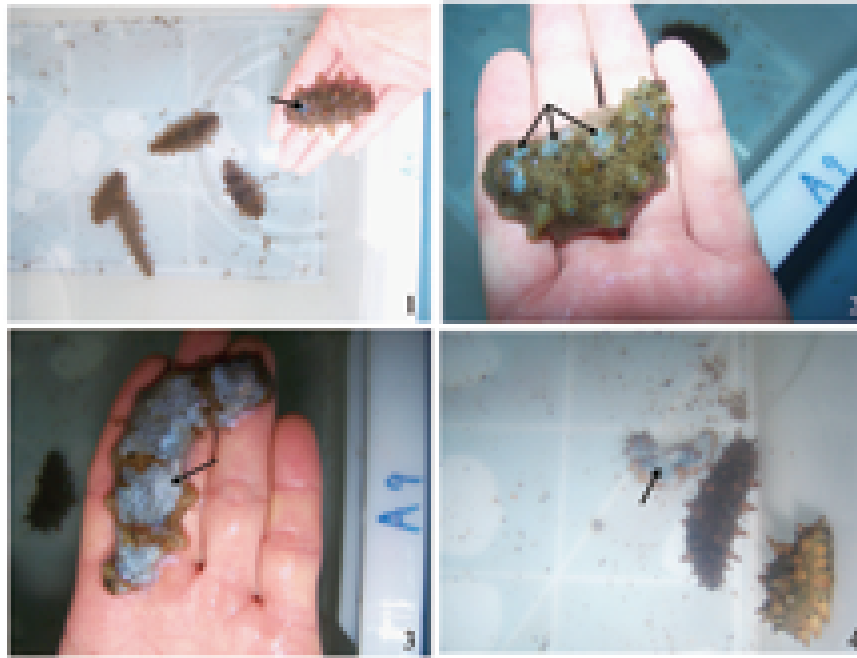
4. Fisheries Institute of Zhoushan, Zhoushan 316000, China)

**Abstract:** From January to April of the year 2006, in cultured *Apostichopus japonicus* broke out skin ulcer syndrome in several areas nearby Qingdao, whose typical clinical signs were mouth swelling, eviscerating bowels, skin ulcer, body disjuncting and then the infected sea cucumber died. Bacterium 060330B was isolated from focus tissue of *Apostichopus japonicus*, whose predominance degree reached 90% and was verified to be the pathogen causing skin ulcer syndrome based on artificial infection test. Morphological observation, semi-automatic identification through API system as well as traditional physiological and biochemical methods were applied in the bacterial classification. The results showed that 060330B had same character as *Pseudomonas* genus bacteria, its characteristics were similar with *Pseudomonas putida*, having short rods with several polar flagella, forming green colony on TCBS agar. Further results from 16S rRNA sequence analysis turned out that the sequence of 060330B was highly identical to *Pseudomonas putida*, with 99.5% identity. Thus bacterium 060330B was identified as *Pseudomonas putida*, and regarded as one of the pathogens causing skin ulcer syndrome of cultured *Apostichopus japonicus*. In addition, epidemiology investigation and detection of several samples from different areas revealed that the ponds whose culturing history reached two years or more and having thick black bottom mud with fishy smell were likely to result in the outbreak of skin ulcer syndrome in cultured *Apostichopus japonicus* at that time.

**Key words:** *Apostichopus japonicus*; skin ulcer syndrome; *Pseudomonas putida*; old sea cucumber culturing ponds

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





图版 人工感染试验期间刺参的病变过程

1. 刺参感染早期体表出现零星溃烂; 2. 刺参感染中期体表溃烂部位增多; 3. 刺参感染中后期体表溃烂部位扩大成片; 4. 刺参感染末期解体死亡。

**Plate Pathological changes of sea cucumber during artificial infection experiment**

1. Skin of sea cucumber showed sporadic ulcer during early stage of infection; 2. Skin ulcering part of sea cucumber increased during middle stage of infection; 3. Skin ulcering part of sea cucumber spread and joined together during after-middle stage of infection; 4. Sea cucumber disjointed and died at the end stage of infection.