

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(5):687–693; 4 May 2010
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

仿刺参耳状幼体“烂边症”的病原及其来源分析

张春云^{1,2}, 陈国福^{1,2}, 徐仲^{1,2}, 闫培生^{1,2}, 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】查明仿刺参耳状幼体“烂边症”的病原及其来源, 并获得该病的治疗药物。【方法】对烂边症状较为典型的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、生理生化和 16S rDNA 序列分析鉴定, 对养殖场育苗系统, 包括水源、饵料、育苗池水、育苗池底污物和亲参池水进行细菌学分析, 对病原菌进行药敏测试。【结果】从患病幼体分离得到 1 种优势菌株, 人工回接感染证明它对健康仿刺参有较强的致病性, 且感染发病与自然发病仿刺参幼体的症状相同。鉴定出“烂边症”的病原为弧菌 *Vibrio lentus*。养殖系统中的细菌浓度均较高 ($2.8 \times 10^2 - 8.8 \times 10^7$ cells/mL); 病原来源较复杂: 育苗池水、池底污物和亲参池水均发现了病原菌, 病原菌浓度以池底污物中最多, 育苗池水次之, 亲参池水最少。新霉素等 15 种常用抗生素可有效抑制该病原菌的生长。【结论】“烂边症”的病原为弧菌 *Vibrio lentus*; 池底污物、育苗池及亲参均可能是本次“烂边症”的病原来源; 新霉素等 15 种常用抗生素可用于该病的防治。

关键词: 仿刺参; “烂边症”; 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 (2010) 05-0687-07

20 世纪 80 年代, 我国建立了仿刺参 (*Apostichopus japonicus*) 的人工育苗技术, 随后仿刺参的增养殖在北方沿海逐渐开展起来^[1–3]。进入 21 世纪, 由于仿刺参价格不断上涨, 市场需求量急剧增加, 大大刺激了仿刺参养殖业的发展。目前, 山东、辽宁等省的仿刺参养殖面积超过百万亩, 室内育苗池面积达到 10 万立方米, 仿刺参已经迅速发展成为该地区海水养殖的支柱产业^[4–5]。

苗种培育的成败是决定仿刺参养殖产量的重要因素^[3]。仿刺参个体发育经历耳状幼体、樽形幼体、五触手幼体等多个变态过程^[6], 在该过程中幼体易发生疾病和死亡^[4–6]。对于仿刺参育苗中的疾病, 目前已报道的有化板症、烂胃病、脱板病和胃萎缩症等, 这些疾病发病快、传染性强, 死亡率高, 给育苗工作带来

很大困难^[3–4,7–10]。近年来在山东烟台、威海等多家仿刺参育苗场均发生了严重的耳状幼体“烂边症”, 死亡率达 60% 以上。发病个体长约 600–800 μm , 即从中耳幼体变态到大耳幼体的时期, 症状为体表边缘发黑进而溃烂解体, 因此本课题组暂将其命名为“烂边症”。我们对具有典型症状的仿刺参样品进行了病原分离与鉴定, 并对仿刺参育苗系统进行细菌学分析, 以探明病原来源; 此外, 还对病原菌进行了药敏测试, 以期仿刺参育苗生产的健康管理和“烂边症”的防治提供理论参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试材: 患病耳状幼体取自山东某发病仿刺参

基金项目: 威海市科技发展计划 (IMJQ01110013); 山东省科技发展计划项目 (2004GG2205116); 哈尔滨工业大学科研创新 (IMQ29080006); 城市水资源与水环境国家重点实验室开放课题 (ES200802); 哈尔滨工业大学优秀团队支持计划

* 通信作者。Tel: +86-532-85841732; E-mail: wangyg@ysfri.ac.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。

收稿日期: 2009-12-07; **修回日期:** 2010-02-22

育苗池,经镜检有明显的“烂边”症状,体长 600 – 800 μm。以虹吸法抽取适量发病育苗池池水至消毒塑料箱,水中含患病幼体约 1 万只,充气,同时将育苗场的水源水、饵料[盐藻(*Dunaliella salina*)]、育苗池水、池底污物和亲参养殖池水装于灭菌器皿分别带回。人工感染用健康幼体采自烟台一仿刺参育苗场,体长 600 μm – 720 μm。

1.1.2 培养基及试剂:细菌分离用培养基 TSA 和 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;扩增细菌 16S rDNA 通用引物由上海博雅生物公司合成,PCR 所用 Buffer、dNTP 和 *Taq* 酶等均购自上海生物工程技术公司。

1.2 病参的显微镜检

以无菌烧杯取发病池水,静置 5 min,吸取烧杯底部池水置显微镜下观察,选取其中典型的“烂边”耳状幼体 52 个,制作水浸片逐一镜检,初步观察幼体病变情况和优势病原。

1.3 病原的分离纯化

以 200 目无菌筛绢过滤池水得到患病幼体,用无菌海水充分洗涤,并收集于 Eppendorf 管,将患病幼体离心 (2500 × g, 5 min) 富集后,以无菌研钵充分研磨。在无菌条件下,用接种环挑取研磨后得到的样品,在 TSA 和 TCBS 固体培养基上划线分离;将平板置于 28℃ 恒温生化培养箱培养,36 h 后挑取优势菌落,连续进行 3 次纯化培养。

1.4 菌种鉴定

1.4.1 形态观察:纯培养的细菌于 28℃ 培养 24 h 后,进行革兰氏染色和光镜观察;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、盐度实验参考文献[11]进行;另参照麦克法兰标准比浊管,制备细菌浓度大于 1.5×10^8 cells/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。检测结果均对照文献[11]进行归类判定。

1.4.3 16S rDNA 序列分析:参照文献^[5]的方法进行细菌 DNA 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。将测得 16S rDNA 序列提交 GenBank,并获取相应的入口号。分别从 GenBank 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,用 BioEdit 作比对分析,所得结果用 MEGA 3.0 构建进化树和计算遗传距离,进化树的构建选用的数学模型为 Kimura 2-parameter distances,进化树的 Nodal 支持率用 Bootstrap 分析,分析重复次数为 1000。

1.5 人工回接感染

人工回接感染用浸浴法进行。用 3.0% 的无菌生理盐水将分离所得优势菌制成悬液,并经平板菌落计数确定浓度。用盛有 15 L 自来水的塑料水箱,底部设置加热棒,水箱内置 2 L 烧杯 12 个,烧杯内底部放置一块圆形波纹板(面积同烧杯的底面,紧贴烧杯内壁),注入无菌海水 1.5 L,气石充气,调节整个系统温度于 18 – 21℃。在各烧杯内投放健康耳状幼体,使其终密度为 0.6 cells/mL。实验时,各感染组烧杯中加入菌悬液,使细菌终浓度分别为 1.0×10^3 cells/mL、 1.0×10^4 cells/mL、 1.0×10^5 cells/mL、 1.0×10^6 cells/mL 和 1.0×10^7 cells/mL,空白对照组不加细菌。各感染组和对照组均设 2 个平行。实验中所用器具均进行预消毒;实验期间投喂盐藻(*D. salina*),投喂量为 2.5×10^4 cells/mL;每天换水 1 次,换水量为 1/2(感染组需补充细菌,维持感染浓度);整个实验光强控制在 1300 lx 左右。实验开始后,每隔 5 h 镜检幼体情况(包括烧杯水层及波纹板上的幼体),并从感染后出现症状的幼体再次分离优势细菌,进行形态及生理生化指标分析。

1.6 养殖系统中细菌的数量及组成检测

用无菌海水将水源水、饵料、育苗池水、池底污物和亲参养殖池水进行 10 – 1000 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 24 d。观察平板上细菌的菌落形态、计数并纯化优势度较高的菌株,对优势菌株进行形态和生理生化鉴定(方法同前)。

1.7 药敏试验

选用生产中常用的 24 种药物(表 3),采用纸片法进行药敏测试:配制浓度大于 1×10^9 cells/mL 的菌悬液约 1.5 mL,吸取 150 μL 均匀涂布于 TSA 培养基上,贴上药敏试纸,于 28℃ 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、病原初检和优势菌分离
经镜检发现:患“烂边症”的耳状幼体失去浮游

能力、活力下降,体表边缘发黑、粗糙并出现不同程度的溃烂,严重者发生解体、自溶。在患病个体溃烂组织处均发现大量活跃运动的细菌,未发现寄生虫、霉菌等其它病原,由此可初步确定细菌是主要病原。分离得到 1 种优势菌株记为 RES-1。RES-1 在 TSA 培养基上的菌落为圆形、深黄色、表面光滑、有光泽、湿润不透明,并在 TCBS 培养基上生长良好且使培

养基变成黄色。

2.2 细菌学鉴定结果

2.2.1 形态观察:

细菌 RES-1 呈革兰氏阴性,短杆状略有弯曲(图 1-A);电镜照片显示菌体大小为 $(0.8-2.0)\mu\text{m} \times (0.4-0.6)\mu\text{m}$,具有极生单鞭毛(图 1-B)。

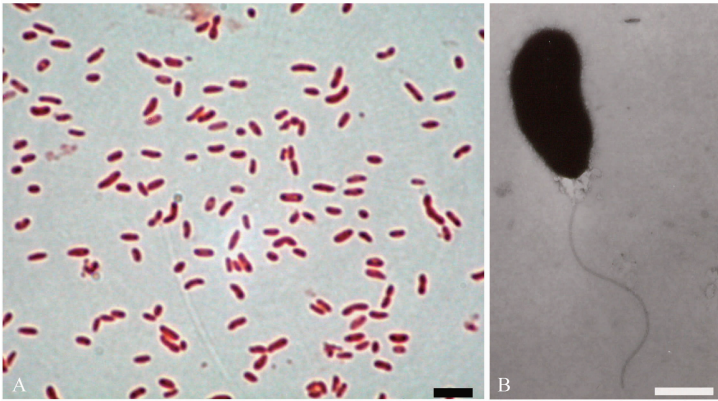


图 1 菌株 RES-1 的革兰氏染色 (A) (标尺为 1 μm) 及电镜照片 (B) (标尺为 500 nm)

Fig.1 Gram-stain (A) (Bar is 1 μm) and electron microscopic photograph (B) of RES-1(Bar is 500 nm).

2.2.2 细菌的生理生化特性测定:

对优势菌 RES-1 (从病参分离)、RES-2 (从人工感染病参分离)、WCP (从育苗池水分离)、BO (从池底污物分离) 和 WCC (从亲参养殖池水分离) 进行生理生化测定,结果见表 1。除了在耐盐和温度生长特性有个别差异外

(可能是因生长环境所致生态幅的变化),5 个菌株的生理生化特征基本相同,由此可认为属同一种细菌;参照伯杰氏细菌鉴定手册,可见菌株具有弧菌属的典型特征,因此,可推测该菌株是弧菌属 (*Vibrio*) 细菌。

表 1 菌株 RES-1、RES-2、WCP、BO 和 WCC 的生理生化特征											
Table 1 Physiological and biochemical characteristics of bacterial strains RES-1, RES-2, WCP, BO and WCC											
Item	RES-1	RES-2	WCP	BO	WCC	Item	RES-1	RES-2	WCP	BO	WCC
Gram stain	—	—	—	—	—	Indole production	+	+	+	+	+
Motility	—	—	—	—	—	H ₂ S production	—	—	—	—	—
O/129 sensitivity (10 μg)	—	—	—	—	—	Lysine decarboxylase	—	—	—	—	—
O/129 sensitivity (150 μg)	+	+	+	+	+	Arginine dihydrolase	+	+	+	+	+
Growth on TCBS	+	+	+	+	+	Ornithine decarboxylase	+	+	+	+	+
Growth at 0% NaCl	—	—	—	—	—	Gas from glucose	—	—	—	—	—
Growth at 3% NaCl	+	+	+	+	+	Arabinose	+	+	+	+	+
Growth at 6% NaCl	+	+	+	+	—	Mannitol	+	+	+	+	+
Growth at 8% NaCl	—	—	+	—	—	Myo-inositol	—	—	—	—	—
Growth at 10% NaCl	—	—	—	—	—	Raffinose	—	—	—	—	—
Growth at 4℃	+	+	+	+	+	Rhamnose	—	—	—	—	—
Growth at 25℃	+	+	+	+	+	Sucrose	+	+	+	+	+
Growth at 28℃	+	+	+	+	+	Glucose	—	—	—	—	—
Growth at 35℃	—	—	—	—	+	Salicin	+	+	+	+	+
Growth at 40℃	—	—	—	—	—	Sorbitol	—	—	—	—	—
Growth at 45℃	—	—	—	—	—	Gelatinase	—	—	—	—	—
Oxidase	+	+	+	+	+	Urease	—	—	—	—	—
Oxidation/fermentation	F	F	F	F	F	β-galactoside	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	D-cellobiose	—	—	—	—	—
Citrate	—	—	—	—	—	Luminescence	—	—	—	—	—
Vgus-proskauer reaction	+	+	+	+	+	Methyl red test	—	—	—	—	—

“+” means positive reaction; “—” means negative reaction;“F” means fermentation .

2.2.3 菌株 RES-1 的 16S rDNA 序列分析:

菌株 RES-1 的 16S rDNA 序列长度为 1469 bp。登陆 NCBI,将获得的序列进行 BLASTn 同源检索,结果发

现:与 RES-1 最相近的 100 个序列中,有 93 个属弧菌属细菌,RES-1 与它们的同源性为 97% - 99%。分子系统进化分析表明 RES-1 与所有弧菌聚类,并

与 *Vibrio lentus* 在进化树上聚成一枝,且有较高的 Bootstrap 值 (89%),加之进一步的遗传距离分析

(结果未显示),可确定 RES-1 与 *Vibrio lentus* 为同一种(图 2)。

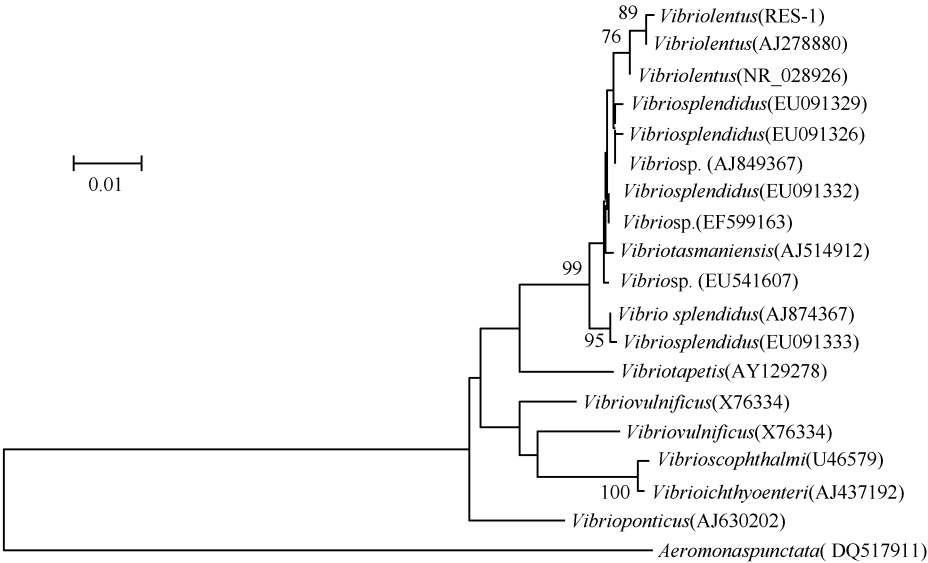


图 2 RES-1 的 16 S rDNA 基因序列分析聚类结果

Fig. 2 Clustering result of gene sequence of 16S rDNA of RES-1. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Accession numbers were included in the bracket following the corresponding species. Bootstrap values, expressed as percentages of 1000 replications, were shown at branch points. The scale bar indicated 0.01 substitutions per nucleotide position.

2.3 人工回接感染结果

优势菌 RES-1 对健康仿刺参幼体的浸浴感染实验结果见表 2。5 个感染组幼体均出现“烂边”症状,出现时间分别为实验开始后的第 25、20、15、15 和 10 小时。观察比较 25 h 和 50 h 内幼体状况发现,随着感染时间的延长,各感染组烧杯水层中健康幼体逐渐

减少并开始下沉,而烧杯底部波纹板上的幼体检出数逐渐增多(除了 1.0×10^6 和 1.0×10^7 高剂量组因幼体已发生解体、自溶,故 50 h 时波纹板上的幼体检出数少于 25 h 时)。镜检发现各感染组幼体均显示出有规律性的病变:感染初期幼体活力下降,失去浮游能力,继而体表外周明显加厚、颜色发黑(图 3-B);病情继

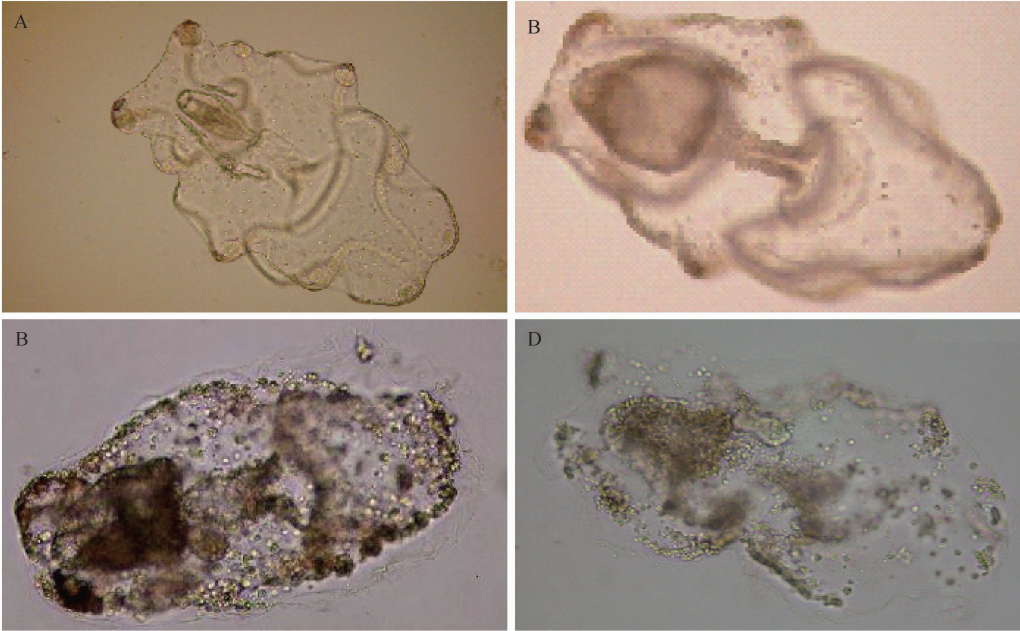


图 3 “烂边症”幼体的自溶解体过程

Fig. 3 Autolyzing process of larvae with rotting edges syndrome. A: A normal auricularia; B: Thickened and darkened edges at the early stages; C: Edges of the larva decayed and the stomach shrank when the ifection developed; D. The whole body disintegrates and autolyzes, and eventually the larva died.

续发展,有的幼体胃部萎缩,停止摄食,体壁肿大并崩解(图 3-C);随着感染的继续,幼体从体壁处断裂、溶解并最终解体、死亡(图 3-D)。在整个实验过程中对

照组幼体未发生“烂边”症状。从出现“烂边”症的幼体再次分离病原,得到优势菌 RES-2,对其进行形态学及生理生化分析,结果与 RES-1 完全一致(表 2)。

表 2 人工回接感染实验结果

Table 2 Results of artificial infection experiment						
Group	Initial larvae density/ (cell/mL)	Bacteria density/ (cells/mL)	Larvae detection at 25 h		Larvae detection at 50 h	
			Mortality/%	Detection rate in the polyvinylchlorid plate/%	Mortality/%	Detection rate in the polyvinylchlorid plate/%
1	0.6	1.0×10^3	50	15	80	55
2	0.6	1.0×10^4	70	42	90	70
3	0.6	1.0×10^5	80	50	95	80
4	0.6	1.0×10^6	90	67	100	16
5	0.6	1.0×10^7	95	84	100	5
Control	0.6	0	40	20	50	30

Mortality = [1 - (Number of living larvae in the water/ Number of total larvae)] × 100% ; Detection rate on the polyvinylchlorid plate = (Number of living larvae on the polyvinylchlorid plate/ Number of total larvae) × 100% .

2.4 养殖系统中细菌的培养结果

养殖系统中细菌培养结果见表 3。可见,在分析的养殖系统中,除水源和饵料外,在育苗池水、池底污物及亲参池水中均发现有优势菌的存在,且这

些优势菌均与患病幼体分离的优势菌形态特征相同,进一步的生理生化指标测定也表明上述菌株属同一种菌(表 1)。

表 3 患“烂边症”仿刺参养殖系统的细菌分析结果

Table 3 Bacterial analysis of the rearing systems associated with “rotting edges syndrome”				
Source of bacteria	Quantity of bacteria /cells/mL	Dominant bacteria	Morphological characteristics of bacterial colony	Percentage of dominant bacteria/%
Focus	Numerous	RES-1	Round, moist and opaque, regular boundary and deep yellow center	65
Water sources	2.8×10^2	None	—	—
Feeds	3.9×10^2	None	—	—
Water from cultivation pond	4.4×10^5	WCP	Same to RES-1	90
Bottom ordure	8.8×10^7	BO	Same to RES-1	89
Water from cultivation pond for parent sea cucumber	2.5×10^3	WCC	Same to RES-1	72

2.5 药敏实验结果

菌株 RES-1 对生产中常用的 21 种抗菌药物的敏感测结果试见表 4。菌株 RES-1 对少数抗生素,包括链霉素、四环素、利福平、青霉素 G、强力霉素和先锋 V 不敏感,对其它受试抗菌药物较敏感。

表 4 菌株 RES-1 的药敏实验结果

Table 4 Results of drugs sensitivity tests			
Antibiotics	Inhibition diameter/mm	Antibiotics	Inhibition diameter/mm
Neomycin	15	Cefonicid sodium	20
Norfloxacin	16	Cephalothin	12
Streptomycin	0	Lincomycin	10
Tetracycline	0	Gentamycin	12
Nalidixic Acid	13	Amikacin	11
Rifampicin	0	Doxycycline	0
Novobiocin	12	Ceftriaxone sodium	20
Cefotaxime sodium	22	Cefazolin sodium	0
Ampicillin-G	0	Acetylspiramycin	14
Compound sulfamethoxazole	20	Minocycline	10
Ceftazidime	10		

3 讨论

中国和日本是最早进行仿刺参人工培育的国家,也是对仿刺参开展研究最多的国家,而长期以来有关仿刺参的研究主要集中在繁殖生物学、育苗技术、养殖生态以及药用活性物质等,对近年来养殖中出现的病害只有简单的描述,并未进行系统深入的研究^[2,3]。中国水产科学研究院黄海水产研究所首次对山东地区养殖仿刺参的病害进行了较为系统的研究,发现在仿刺参养殖生产中存在多种疾病,包括腐皮综合征、烂边症、烂胃病、化板症、细菌性溃烂病、盾纤毛虫病、霉菌病、扁形动物病和后口虫病等^[4-5,12]。近年来,更多的学者还报道了溃疡病^[13]、急性口围肿胀症^[14-15]、胃萎缩症^[10]和排脏症^[13]等疾病。这些研究也揭示了引发仿刺参疾病的病原多样性,不但包括寄生虫、霉菌和细菌^[4,12,14],病毒也可能是致病原^[13,15-17]。

仿刺参在育苗过程中存在多种疾病,但有关这些疾病病原学的报道只包括“烂胃病”^[7]、“化板症”^[9]和“胃萎缩症”^[10]等。本文首次对浮游期幼体的“烂边症”进行了病原学研究。该病在辽宁、山东等地多年广泛流行,如在 2003/2004 年度山东蓬莱、长岛、胶南等地育苗场均有该病发生,死亡率可达 90%,可见其危害相当严重。本研究首先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;接着将分离的可疑病原进行人工回接感染,结果符合科赫法则,因此最终确定了“烂边症”的病原。我们从形态学、生理生化及分子系统进化分析对病原进行分析,将其鉴定为弧菌属细菌 *V. lentus*。

弧菌是危害水产养殖动物的重要病原之一,也是引发海参疾病的主要病原^[3-5,7,9,13]。*V. lentus* 是近几年从海洋环境中分离到的一个新种,该菌最早由 Macián 等^[18]首次从养殖的患病地中海牡蛎 (*Mediterranean oysters*) 体内发现。Farto 等^[19]在发病的野生章鱼 (*Octopus vulgaris*) 的鳃心组织中也分离到 *V. lentus*,并通过人工感染证实它能引起健康章鱼发病,此外还发现 *V. lentus* 只有在特定水温、盐度或其它条件下才会引发疾病。本文首次报道了从养殖的患病仿刺参幼体分离到 *V. lentus*,研究结果证明了它对棘皮动物仿刺参具有致病性。因此,可推测 *V. lentus* 能引起多种水产动物致病。

养殖系统污染可能是苗种发生疾病的重要外因。在对“化板症”的病原学研究中,我们对养殖系统进行了细菌学分析,结果发现整个养殖系统存在大量细菌,且细菌总数的 60% 以上是“化板症”的病原菌;病原来源较为复杂,推测饵料为病原的主要来源^[9]。在本研究中,我们对发生“烂边症”育苗场的水源、饵料、育苗池水、池底污物和亲参养殖池水进行了细菌学分析,结果也发现所有水样中的细菌浓度较高 (> 100 cells/mL),但水源和饵料中细菌数相对较少,且未检出病原菌,说明本次“烂边症”的病原来源不是饵料。在育苗池水、池底污物和亲参池水均发现了病原菌,而病原菌浓度以池底污物中最多,养殖池水次之,亲参池水中最少。为此我们分析,池底滋生的大量的病原菌可能是引发此次疾病的源头。可见,养殖过程中应该经常清理池底以保证水质清新。另外,在亲参池水中也发现了病原菌,但不能确定是由养殖系统水交换引入还是亲参本身携带病原菌。因此,育苗生产前有必要对亲参进行病原检测。由于亲参在进入该育苗场之前的带菌情况未知,故池底的病菌和亲参都有可能是病原的来源。

本实验还对水产生产中常用的 24 种抗生素进行了敏感性检测,结果发现病原菌对一些抗生素具

有抗药性,而对大多数受试药物敏感,这些药物均可考虑在生产中用于该病的防治。

因此,在本研究的基础上,我们建议在养殖生产中,为了避免“烂边症”的发生,一方面应杜绝病原菌进入养殖系统,进一步净化育苗水体,包括水源水、亲参育苗系统等;另一方面在进行药物防治时,药物选择必须对病原有针对性,切忌滥用抗生素。

参考文献

- [1] 牟绍敦, 李元山, 刘岗, 王颖. 山东省增养殖技术发展现状. 海洋湖沼通报 (*Transactions of Oceanology and Limnology*), 2000, 2(1), 63-65.
- [2] 隋锡林, 邓欢. 仿刺参池塘养殖的病害及防治对策. 水产科学 (*Fisheries Science*), 2004, 23(6): 22-23.
- [3] 张春云, 王印庚, 荣小军, 孙惠玲, 董树刚. 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.
- [4] 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.
- [5] 张春云, 王印庚, 荣小军. 养殖仿刺参“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.
- [6] 张群乐, 刘永宏. 海参海胆增养殖技术. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1998, 1-20.
- [7] 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.
- [8] 宋坚, 王品虹, 李春艳, 杨尔欣, 常亚青. 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.
- [9] 张春云, 陈国福, 徐仲, 闫培生, 王光玉, 王印庚. 养殖仿刺参附着期“化板症”病原菌的分离鉴定及来源分析. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2009, 49(5): 631-637.
- [10] 邓欢, 周遵春, 韩家波. “胃萎缩症”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.
- [11] Holt JG. *Bergey's manual of determinative Bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1999.
- [12] Wang YG, Zhang CY, Rong XJ, Chen JJ & Shi CY. Diseases of cultured sea cucumber *Apotichopus japonicus* in China. *Advances in sea cucumber aquaculture and management*. FAO Fisheries Technical Paper, 2004, 463: 297-310.
- [13] Deng H, He CB, Zhou ZC, Liu C, Tan KF, Wang NB, Jiang B, Gao XG & Liu WD. Isolation and pathogenicity of pathogens from skin ulceration disease and viscera ejection syndrome of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Aquaculture*, 2009: 28718-28727.

- [14] 马悦欣, 徐高蓉, 张恩鹏, 王品虹, 常亚青. 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.
- [15] Wang PH, Chang YQ, Yu JH, Li CY & Xu GR. Acute peristome edema disease in juvenile and adult sea cucumbers *Apostichopus japonicus* (Selenka) reared in North China. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2007, 96: 11-17.
- [16] Deng H, Zhou ZC, Wang NB & Liu C. The syndrome of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) infected by virus and bacteria. *Virologica Sinica*, 2008, 23 (1): 63-67.
- [17] 王品虹, 常亚青, 徐高蓉, 宋林生. 仿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.
- [18] Macian MC, Ludwig W, Aznar R, Grimont PAD, Schleifer KH, Garay E & Pujalte MJ. *Vibrio lentus* sp. nov., isolated from Mediterranean oysters. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51(6), 1449-1456.
- [19] Farto R, Armada SP, Montes M, Guisande JA, Pérez MJ & Nieto TP. *Vibrio lentus* associated with diseased wild octopus (*Octopus vulgaris*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 2003, 83(7):149-156.

Etiology of rotting edges syndrome in cultured larval *Apostichopus japonicus* at auricularia stage and analysis of reservoir of pathogens

Chunyun Zhang^{1,2}, Guofu Chen^{1,2}, Zhong Xu^{1,2}, Peisheng Yan^{1,2}, Yingeng Wang^{3*}
(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**] We clarified pathogens and its sources of the disease called rotting edges syndrome at the auricularia stage in the larval culture of *Apostichopus japonicus*, and further developed effective medicines against this disease. [**Methods**] Etiological analysis was performed on larvae with typical rotting edges syndrome from larvae culture farm. Suspicious pathogen was used for artificial infection test, and then identified through morphological, physiological and biochemical tests, and 16S rDNA sequence analysis. Bacterial analysis on the culture system of the factory, including water sources, feeds, rearing water, bottom ordure and water from cultivation pond for parent sea cucumber, was carried out. Finally, drug-sensitive tests were performed on 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 the same syndromes to the naturally ill ones. The bacterium was identified as *V. lentus*. Bacterial quantity of rearing water system were at a high range ($2.8 \times 10^2 - 8.8 \times 10^7$ cells/mL). The sources of the pathogen were complicated, since pathogens were discovered in the rearing water, bottom ordure and water from cultivation pond for parent sea cucumber. However, the density of causative bacteria was the highest in the bottom ordure, middle in the rearing water, and lowest in the water from cultivation pond for parent sea cucumber. Fifteen antibiotics could inhibit growth of the pathogens. [**Conclusion**] The possible pathogen for rotting edges syndrome was *V. lentus*. The bottom ordure, rearing water and parent sea cucumber may be the main infective origin of the pathogen. Fifteen antibiotics including neomycin, could be applied for disease prevention and treatment of *Apostichopus japonicus*.

Keywords: *Apostichopus japonicus*; rotting edges syndrome; pathogen; identification; source; prevention and treatment

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Program of Excellent Team in Harbin Institute of Technology, Program of Weihai Science and Technology Development (IMJQ01110013), Innovation Foundation of Harbin Institute of Technology (IM0Q29080006), and Opening Foundation of State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology (ES200802)

* Corresponding author. Tel: +86-532-85841732; E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

Received: 7 December 2009/ Revised: 22 February 2010