

刺参表皮溃烂病病原菌的分离鉴定与药敏试验

王高学,原居林,赵云奎,袁 明

(西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 为了确定刺参表皮溃烂病的病原菌,从山东省烟台和日照两个地区人工饲养的刺参中挑取具有明显症状的幼参,从体表病灶和体内组织中共分离得到 15 株细菌,利用人工感染试验、细菌形态观察及生理生化试验对其进行鉴定。结果表明,引起山东省日照地区养殖场刺参表皮溃烂病的病原菌 R-2 为杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonida*);烟台地区养殖场的病原菌 Y-1 为中间气单胞菌(*Aeromonas media*),Y-8 为弧菌属的海弧菌生物变种 I (*Vibro. pelagius biovar I*)。药敏试验结果表明,R-2 对萘诺沙星、氟苯尼考、硫酸庆大霉素敏感,对氧氟沙星、硫酸阿米卡星等 8 种抗生素不敏感;Y-1 和 Y-8 仅对氟苯尼考敏感。

[关键词] 刺参;表皮溃烂病;细菌分离鉴定;药敏试验

[中图分类号] S968.9;S947.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)08-0087-04

Isolation, identification and drug sensitivity of the pathogens of the skin ulceration disease in *Apostichopus japonicus*

WANG Gao-xue, YUAN Ju-lin, ZHAO Yun-kui, YUAN Ming

(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In order to find the pathogens of the skin ulceration disease of *Apostichopus japonicus*, the diseased *Apostichopus japonicus* were selected from Yantai and Rizhao of Shandong Province. 15 strains of bacterials were isolated from the diseased *Apostichopus japonicus* and 3 strains of them were confirmed to be the pathogen of the disease by artificial infection test: R-2, Y-1, and Y-8. According to the results, morphological feature, physiological and biochemical characteristics were very similar to *Aeromonas salmonida*, *A. media*, and *Vibro. pelagius biovar I*. Experiments showed that R-2 was sensitive to enromycin, florfenicol and gentamycin sulfate, but it was insensitive to ofloxacin, amikacin sulfate and so on; Y-1 and Y-8 were only sensitive to florfenicol.

Keyword: *Apostichopus japonicus*; skin ulceration disease; separation and identification of bacteria; drug sensitive experiment

刺参(*Apostichopus japonicus*)属于棘皮动物门(Phylum Echinodermata)海参纲(Holothuridae)楯手目(Aspidochirotida)刺参科(Stichopodidae)海洋无脊椎动物。我国在 20 世纪 90 年代末掀起刺参人工养殖热潮,山东省是我国刺参主要养殖区域之一,随着养殖面积的扩大,刺参的病害越来越多,刺参表皮溃烂病即是刺参养殖过程中的主要

病害之一。该病在育苗期、保苗期、育成期均可发生,主要危害幼参,且具有很强的传染性,感染后 4 d 内便可引起刺参死亡,死亡率高达 90 %。

国内外关于刺参表皮溃烂病的报道均很少。据 Becker 等^[1]报道,马达加斯加水产试验育苗场刺参幼参的表皮溃烂病主要是由弧菌、拟杆菌和 α -蛋白菌引起的。王印庚等^[2]认为,引起养殖刺参“腐皮综

†收稿日期 2006-07-17

〔作者简介〕 王高学(1965-),男,陕西富平人,副教授,在读博士,硕士生导师,主要从事生物工程制药研究
E-mail: wanggaoxue @126.com

合症’的主要病原为弧菌属和假单胞属两种细菌。为进一步明确刺参表皮腐烂病的病原菌,特对山东省日照、烟台两地区刺参养殖场感染表皮溃烂病的刺参进行了病原菌的分离鉴定,并对其进行了药敏试验,以期对刺参表皮溃烂病病原菌的确定和防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 刺参表皮溃烂病病原菌的分离

分别取山东省日照市顺源刺参育苗场和烟台市莱洲所玉柱刺参养殖场发病症状典型的刺参,用无菌生理盐水冲洗体表 3 遍,无菌操作取体表病灶底层的肌肉组织、腹腔液、内脏组织接种于普通营养琼脂平皿,25℃培养 24 h 后,挑选形态一致的菌落,进一步划线分离纯化,直到获得纯培养后,转入斜面培养基中 4℃保存。

1.2 刺参表皮溃烂病病原菌人工感染试验

从养殖场挑取体长 4~6 cm 的健康刺参,暂养于水族箱中(水温(18±2)℃),将分离纯化的菌株分别接种于普通营养肉汤中,25℃培养 18 h,采用平板菌落计数法计算出菌液浓度。然后将其营养液分别加入到过滤除菌的海水中,使海水中的菌液浓度为 1×10⁸ mL⁻¹,每组放入健康刺参 6 尾进行浸泡感染,记录各组发病和死亡情况。

1.3 刺参表皮溃烂病病原菌的鉴定

将纯培养的细菌 25℃培养 18~24 h,观察菌落形态,并进行革兰氏染色、鞭毛染色,观察细菌形态。将普通肉汤培养的幼龄菌 1 000 r/min 离心 10 min,分离出菌团,弃上清,体积分数 3%戊二醛固定,进行扫描电镜观察。病原菌各项生理生化性质

的测定按照文献[3]和[4]的方法进行。

1.4 刺参表皮溃烂病病原菌的药敏试验

采用最低抑菌浓度和最低杀菌浓度梯度法,测定氟苯尼考、硫酸庆大霉素、培氟沙星、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺喹噁林钠、阿奇霉素、盐酸萘诺沙星、酒石酸吉他霉素、盐酸土霉素、烟酸萘诺沙星、氧氟杀星、硫酸阿米卡星等 12 种试验药物对病原菌的最低抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration,MIC)和最低杀菌浓度(Minmum bactericidal concentration,MBC)。

1.5 刺参表皮溃烂病病理组织观察

将从养殖场采集的具有明显症状的幼参,用 Zenker 氏固定液固定,石蜡切片,H.E 染色,进行病理组织学观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 刺参表皮溃烂病病参症状

该病主要发生在每年的 1~4 月份(水温在 15~25℃),其中尤以 3~4 月份最为严重。其症状如下:发病初期,病参有摇头现象,围口腔膜松弛,触手对外界刺激反应迟钝,继而出现排脏现象;发病中期,刺参口腹部出现小面积溃烂,形成小白斑,溃烂面积逐渐增大,口部肿大,不能收缩与闭合,逐渐失去摄食能力;发病末期,刺参体表大面积溃烂,身体收缩,溶解成粘胶状。

2.2 刺参表皮溃烂病病原菌人工感染试验

从日照市顺源育苗场病参中共分离到 4 株细菌,编号为 R-1~R-4,从烟台莱州所玉柱养殖场病参中共分离到 11 株细菌,编号为 Y-1~Y-11,运用浸泡法进行人工感染试验,其结果见表 1。

表 1 刺参表皮溃烂病病原菌人工感染试验结果

Table 1 Result of artificial infection of the pathogens of the skin ulceration disease of *Apostichopus japonicus*

细菌种类 Bacteria species	菌液浓度/ mL ⁻¹ Bacteria number	试验尾数 No. of fish	感染后死亡尾数 Death number							死亡率/ % Mortality
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	
R-1	6×10 ⁸	6	0	0	0	0	0	0	0	0
R-2	8×10 ⁸	6	0	0	0	3	0	2	0	83.3
R-3	3×10 ⁸	6	0	0	0	0	0	0	0	0
R-4	1.5×10 ⁸	6	0	0	0	0	0	0	0	0
Y-1	3×10 ⁸	6	0	0	0	0	0	0	0	0
Y-2	5×10 ⁸	6	0	0	0	0	0	0	0	0
Y-3	6×10 ⁸	6	0	0	0	0	0	0	0	0
Y-4	8×10 ⁸	6	0	0	0	2	3	1	0	100
Y-5	7×10 ⁸	6	0	0	0	0	0	0	0	0
Y-6	8×10 ⁸	6	0	0	0	0	0	0	0	0
Y-7	4×10 ⁸	6	0	0	0	0	0	0	0	0
Y-8	7×10 ⁸	6	0	0	0	3	3	0	0	100
Y-9	8×10 ⁸	6	0	0	0	0	0	0	0	0
Y-10	9×10 ⁸	6	0	0	0	0	0	0	0	0
Y-11	3.5×10 ⁸	6	0	0	0	0	0	0	0	0
对照 CK 过滤海水 Filtered seawater		6	0	0	0	0	0	0	0	0

由表 1 可知,R-2、Y-4、Y-8 菌株对健康刺参有致病作用,均在 4~7 d 引起刺参发病,并出现死亡,且症状与自然发病的症状相同,即体表出现溃烂,在泄殖腔周围出现小白点色斑。从人工感染发病的刺参体表病灶分离到的菌株形态、生理生化特征与感染菌株相同,表明 R-2 是引起日照养殖场刺参表皮溃烂病的病原菌,Y-4、Y-8 是引起烟台养殖场刺参发病的病原菌。

2.3 病原菌的鉴定

3 株病原菌在普通营养琼脂平板上生长良好,菌落圆形半透明,表面光滑湿润、隆起,边缘整齐。

其中 R-2 为革兰氏染色阴性,短杆状,无鞭毛,个体大小为(1~3) μm $\times$ (0.1~0.2) μm (图 1-A);Y-4 为革兰氏染色阴性,杆状,无鞭毛,个体大小为(1~3.5) μm $\times$ (0.1~0.23) μm (图 1-B);Y-8 为革兰氏染色阴性,杆状,有鞭毛,个体大小为(0.5~1) μm $\times$ (0.05~0.08) μm (图 1-C)。3 株病原菌的各项生理生化反应结果见表 2,对照文献[4]的标准,认为病原 R-1、Y-4 分别为气单胞菌属中的杀鲑气单胞菌(*Aeromonas. salmonida*)和中间气单胞菌(*Aeromonas. media*),而 Y-8 则为弧菌属的海弧菌生物变种 I(*Vibro. pelagius biovar I*)。

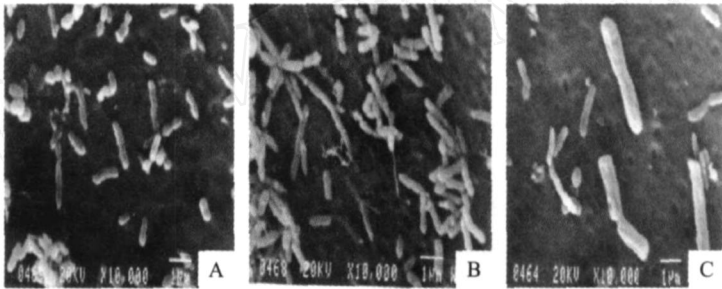


图 1 R-2、Y-4、Y-8 的电镜观察($\times 10\,000$)

A. R-2;B. Y-4;C. Y-8

Fig. 1 Electron micrograph of strain R-2, Y-4 and Y-8($\times 10\,000$)

A. R-2;B. Y-4;C. Y-8

表 2 刺参表皮溃烂病病原菌的生理生化特性

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of the pathogenic bacteria of theskin ulceration disease of *Apostichopus japonicus*

项 目 Items	菌种 Bacterial species			项 目 Items	菌种 Bacterial species		
	R-2	Y-4	Y-8		R-2	Y-4	Y-8
革兰氏染色 Gram stain	-	-	-	苯丙氨酸脱羧酶 Phenylalanine hydroxylase	-	-	-
O/ F 试验 O/ F test	O	O	F	鸟氨酸脱羧酶 L-ornithine decarboxylase	-	-	-
硝酸盐还原 Reduction of nitrate experiment	+	+	+	赖氨酸脱羧酶 Lysine-decarboxylase	-	-	-
氧化酶 Oxidase experiment	+	+	+	精氨酸双水酶 L-arginine hydrolase	+	+	-
V- P	-	-	-	接触酶 hydrogen perox-ide experiment	+	+	+
H ₂ S 产生 Production of H ₂ S	+	+	-	葡萄糖利用 Use of glucose	+	+	+
0 g/L NaCl 生长 Growth of 0 g/L NaCl	+	+	+	鼠李糖利用 Use of rhamnose	-	+	-
70 g/L NaCl 生长 Growth of 7 g/L NaCl	-	+	+	肌醇利用 Use of inosite	-	-	-
0 ℃生长 Growth of 0 ℃	+	+	+	甘露醇利用 Use of mannitolum	-	+	+
40 ℃生长 Growth of 40 ℃	-	-	-	半乳糖利用 Use of galactose	+	+	+
O/ 129	-	-	+	乳糖利用 Use of lactose	-	+	+
柠檬酸盐利用 Use of citrate	-	+	-	D-甘露糖利用 Use of D-mannose	d	+	+
果糖利用 Use of fructose	-	+	+	麦芽糖利用 Use of maltose	-	+	+
琼脂糖利用 Use of agarose	+	-	-	棉籽糖利用 Use of raffinose	+	-	+
阿拉伯糖利用 Use of arabinose	-	+	+	山梨醇利用 Use of D-sorbitol	-	-	d

注:“+”表示阳性,“-”表示阴性,“d”表示阳性阴性均有可能。
Notes:“+” positive;“-” negative;“d” positive or negative.

2.4 刺参表皮溃烂病病原菌的药敏试验

对 R-2、Y-4、Y-8 3 株病原菌进行 12 种药物的

敏感试验,由表 3 可知,R-2 对氟苯尼考、萘诺沙星、硫酸庆大霉素敏感;Y-4、Y-8 仅对氟苯尼考敏感。

表 3 刺参表皮溃烂病病原菌的药敏试验结果

项目 Items	菌种 Bacterial species					
	R-2		Y-4		Y-8	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
氟苯尼考 Florfenicol	1.563	6.25	0.781	1.563	0.391	0.391
硫酸庆大霉素 Gentamycin sulfate	3.125	3.125	> 50	> 50	25	25
培氟沙星 Pefloxacin	12.5	12.5	> 50	> 50	25	50
磺胺对甲氧嘧啶 Sulfamethoxy diazine	3.125	50	> 50	> 50	> 50	> 50
磺胺喹噁林钠 Sulfaquinoxaline sodium	3.125	50	> 50	> 50	> 50	> 50
阿奇霉素 Azithromycin	> 50	> 50	> 50	> 50	6.25	50
盐酸土霉素 Oxytetracycline hydrochloride	3.125	50	0.391	50	0.195	50
酒石酸吉他霉素 Kitasamycin	25	25	25	50	25	50
盐酸萘诺沙星 Enrofloxacin hydrochloride	1.563	1.563	1.563	50	3.125	50
烟酸萘诺沙星 Norfloxacin nicotinate	> 50	> 50	25	25	> 50	> 50
硫酸阿米卡星 Amikacin sulfate	12.5	12.5	50	50	> 50	> 50
氧氟杀星 Ofloxacin	25	50	> 50	> 50	> 50	> 50

2.5 刺参表皮溃烂病的病理组织学观察

表皮溃烂病病理组织学观察发现,溃烂表皮下出现大量的炎症细胞,并且炎症细胞的核发生浓缩(图 2-A);在肌肉层中发现有细菌性包囊结构,并且

体壁与肌肉层之间有炎症带(图 2-B);内部管腔的管壁已与其下的结缔组织分离,局部甚至出现了残缺,管腔破裂,内部无完整的组织结构(图 2-C)。

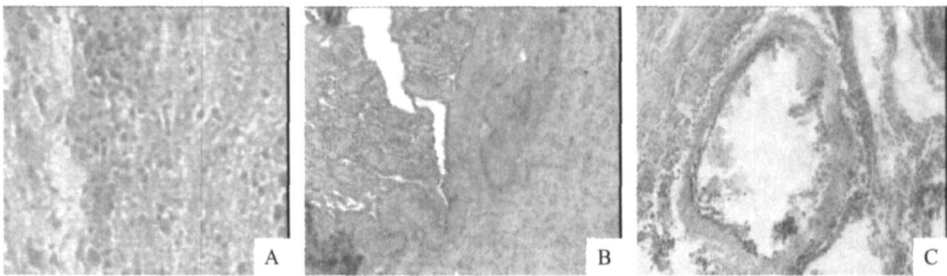


图 2 刺参表皮溃烂病的病理组织学观察

A. 表皮下出现大量的炎症细胞,且炎症细胞的核发生浓缩;B. 肌肉层中有细菌性包囊结构,且体壁与肌肉层之间有炎症带;C. 管腔的管壁与结缔组织分离,内部无完整的结构组织

Fig. 2 Histopathological observation of the skin ulceration disease of *Apostichopus japonicus*

- A. There were a lot of inflammatory cell under the epidermis ,and the nuclure of the Epidermis had condensation ;
- B. The bacterial kystis structure appeared in muscle layer ,and the inflammation zone appeared between the muscle layer and the integument ;
- C. The vessel wall of the internal lumens had seperated from the connective tissue ,and there wasn't integrity constitution in the vessel

3 讨 论

刺参表皮溃烂病是刺参人工养殖中广为流传的一种疾病,其感染性强、传播快、特征典型。该病主要是由细菌引起的,人工感染试验表明,引起日照养殖场的病原菌为杀鲑气单胞菌,引起烟台莱州所玉柱养殖场的病原菌为中间气单胞菌和海弧菌生物变种 I,这 3 种细菌均是水生生物常见的致病菌。同时根据有关报道,杀鲑气单胞菌(*Aeromonas. salmonida*)、中间气单胞菌(*Aeromonas. media*)、海弧菌生物变种 I(*Vibro. pelagius biovar I*)具有世界范围性的分布,宿主范围也很广,是水生动物的重要病

原菌之一^[5-6]。其中杀鲑气单胞菌能感染虹鳟^[7]和非鲑科鱼类^[8-9],如金鱼、鲤鱼、鲶鱼、狼鱼(*Wolf fish*)等,也能感染伸口鱼(*Atlantic salmon*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[10]、大西洋鳕(*Psetta maxima*)、裸盖鱼(*coalfish*)^[11]等。本试验关于杀鲑气单胞菌(*Aeromonas. salmonida*)能够感染刺参的报道尚属首次,这丰富了杀鲑气单胞菌引起疾病的内容,为水产养殖的病害防治提供了理论依据。中间气单胞菌(*Aeromonas. media*)对黄鳝^[12]、斑马贝^[13]、龟^[14]、海胆^[15]等水生生物也都有致病作用。而关于海弧菌生物变种 I(*Vibro. pelagius biovar I*)对水产动物致病性的研究报道尚较少。

(下转第 96 页)

- [7] Larrigaudiere C, Pinto E. Differential effect of ethephon and senescence color development of "Starking Delicious" apple[J]. J Amer Sci, 1996, 12: 746-749.
- [8] 高梅, 张继澍. 亚精胺对柿果采后乙烯生物合成的影响[J]. 园艺学报, 1999, 26(6): 364-368.
- [9] 童斌, 饶景萍. 柿子成熟过程中几种生理代谢及细胞膜透性的变化[J]. 西北植物学报, 1999, 19(3): 482-486.
- [10] Prange R K, Delong J M. 1-methylcyclopropane: the "magic bullet" for horticultural products[J]. Chronica Horticulturae, 2003, 43(1): 11-14.
- [11] Fuscger R L, Bennett A B. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening[J]. Phyto Plant Mol Biol, 1991, 42: 675-703.
- [12] Wakabayashi K, Chun J P, Lubert D J. Extensive solubilization and depolymerization of cell wall polysaccharides during avocado (Persea americana) ripening involves concerted action of polygalacturonase and pectinmethylesterase [J]. Physiol Plant, 2000, 108: 345-352.
- [13] 吕昌文, 齐灵. 桃波动温度及其机理研究[J]. 华北农学报, 1994, 9(1): 75-80.
- [14] 方建雄, 华雪增, 刘愚. 贮藏温度和气体状况对苹果果胶、多聚半乳糖醛酸酶变化的影响[J]. 植物生理学报, 1991, 17(1): 99-104.
- [15] 田建文, 许明宪, 贺普超. 柿果实采后生理分析[J]. 植物生理学通讯, 1991, 27(2): 109-117.
- [16] 王贵禧, 韩雅珊, 于梁. 浸钙对猕猴桃果实硬度变化影响的生化机制[J]. 园艺学报, 1995, 22(1): 21-24.
- [17] 胡位荣, 刘顺枝. 1-甲基环丙烯在果蔬采后生理与保鲜上的研究[J]. 嘉应大学学报: 自然科学版, 2002, 20(3): 88-92.

(上接第 90 页)

本试验表明, 各处刺参表皮溃烂病的病原菌并不相同。Becker 等^[1]报道的刺参表皮溃烂病的病原菌为弧菌、杆菌和 α -蛋白菌, 这一报道与本试验的结果也存在一定差异, 说明该病具有地域差异性。另外, 该病的发生有明显的季节性, 主要发生在 1~4 月, 发病高峰为 3~4 月, 且幼参最易感染。该病主要由细菌引起, 但其他因素也对该病具有极大影响, 如酸碱度、溶氧量均有利于该病的发生。因此, 该病发生是综合作用的结果, 病原菌必须与其他一些因素相结合才可引起该病害的发生。

[参考文献]

- [1] Becker P, Gillan D. The skin ulceration disease in cultivated juveniles of *Holothuria scabra*[J]. Aquaculture, 2004, 24(6): 13-30.
- [2] 王印庚, 宋小军, 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(11): 44-47.
- [3] 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.
- [4] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A. Bergey's manual of determinative bacteriology[M]. 9th edition. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.
- [5] 钱云霞, 邵健忠, 王国良. 海水养殖鱼类细菌性疾病研究概况[J]. 海洋湖沼通报, 2001(2): 78-87.
- [6] 牟海津, 刘志鸿. 水产动物病原菌致病性胞外产物的研究进展[J]. 中国水产科学, 2000, 7(2): 93-95.
- [7] 丁雷, 岳永生, 宋憬愚. 虹鳟皮肤溃烂病的病原研究[J]. 淡水渔业, 2002, 32(3): 28-30.
- [8] Austin B, Austin D A. Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish[M]. Chichester, UK: Ellis Horwood Ltd, 2003: 111-177.
- [9] Austin B, Austin D A. Bacterial fish pathogens: disease in farmed fish[M]. Chichester, UK: Praxis Publishing Ltd, 2004: 66-67.
- [10] Treasurer J W, Cox D. The occurrence of *A. salmonicida* in wrasse (Labridae) and implications for Atlantic salmon farming[J]. Bull Eur Fish Pathol, 2005, 11(5): 155-161.
- [11] Pedersen K, Larsen J L. First report of an outbreak of furunculosis in turbot[J]. Bull Eur Fish Pathol, 2004, 16(6): 129-133.
- [12] 王兴礼. 黄鳝常见的疾病及其防治[J]. 临床兽医, 2004, 12(7): 36-37.
- [13] 顾继东, 范延臻. 土著致病菌及其胞外物在生物防治斑马贝中的作用[J]. 应用与环境生物学报, 2001, 7(11): 572-576.
- [14] 郑延平. 龟“穿孔病”的防治[J]. 渔业致富指南, 2002, 22(9): 42.
- [15] 常亚青, 高绪生. 中间球海胆的人工育苗及增殖技术[J]. 水产科学, 2004, 23(12): 49-50.