

一株单环刺螠致病弧菌的分离鉴定、生长特性研究及药敏分析

于士翔^{1,2}, 纪元³, 李新^{1,3}, 刘峰³, 刘芳华¹

(1. 中国科学院烟台海岸带研究所 海岸带生物学与生物资源利用所重点实验室, 山东 烟台 264003; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 中国农业大学烟台研究院, 山东 烟台 264670)

摘要: 对患病的单环刺螠幼体 3 000~4 000 只/kg 肠道内病原菌进行分离鉴定、生长特性研究及药敏分析, 为人工养殖单环刺螠幼体过程中出现的疾病提供治疗依据。对患病幼体肠道内的病原菌进行分离纯化、生理生化鉴定、16S rRNA 基因序列分析、人工回接感染试验、生长曲线测定、最适生长温度、pH、盐度的探究; 采用 K-B 纸片扩散法对米诺环素、庆大霉素、卡那霉素、头孢唑林、四环素中度敏感, 对阿奇霉素、新霉素、万古霉素、利福平、红霉素、克林霉素、阿莫西林进行药敏试验; 并对抑菌效果最好的药品进行安全性检测。分离纯化后经生理生化鉴定获得一种弧菌命名为菌株 SX-1, 16S rRNA 基因序列分析极有可能为新喀里多尼亚弧菌(*Vibrio neocaledonicus*), 人工回接感染试验表明 SX-1 是单环刺螠幼体从沙底钻出, 活动能力减弱, 体表变红症状的致病菌, 生长特性研究表明其最适生长温度、pH、盐度分别为 30℃, 6.0, 35; 药敏试验结果表明, SX-1 对氟喹诺酮类、羧苄西林、氧氟沙星、头孢曲松高度敏感, 安全性检测实验表明, 氧氟沙星抑菌治疗效果明显, 并对单环刺螠无伤害。从单环刺螠肠道内分离获得了一种极有可能为新喀里多尼亚弧菌(*Vibrio neocaledonicus*)的致病菌 SX-1。对于感染该种弧菌的单环刺螠, 氧氟沙星抑菌治疗效果明显, 并对单环刺螠无伤害。我们的实验结果对于预防并治疗人工养殖过程中单环刺螠患病提供理论依据和治疗模式, 因而具有实际指导意义。

关键词: 单环刺螠; 弧菌; 分离鉴定; 生长特性; 药敏试验

中图分类号: S966.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2019)07-0112-10

DOI: 10.11759/hyhx20190123001

单环刺螠(*Urechis unicinctus*)俗称海肠、海肠子^[1], 隶属于螠虫动物门(Echiuroidea), 是中国黄渤海沿岸潮间带^[2]和潮下带常见的底栖生物^[3]。单环刺螠具有很高的食用价值^[4]及药用价值^[5]。近几年来, 随着海洋环境的污染^[6], 造成单环刺螠的捕捞量大幅度下降^[7], 在烟台市的价格曾经增长至海参价格的三至四倍, 因而, 单环刺螠急需大规模人工养殖^[8], 但目前未见对单环刺螠幼体疾病的研究^[9]。随着对肠道微生物的探索不断地深入^[10], 肠道微生物对宿主健康有着至关重要的影响^[11], 甚至可以延长宿主的寿命^[12], 而一旦由于外界环境的刺激, 造成肠道内菌群失调^[13], 失去原有的平衡, 将会对宿主产生致

病性^[14], 造成宿主的死亡, 所以, 单环刺螠的人工养殖过程中急需加强对其肠道微生物的探索^[15]。本文从患病的幼螠肠道中, 经过平板划线分离得到一株致病菌。对该菌的生长特性研究及药敏试验分析, 旨在为幼螠疾病研究提供病原学理论依据, 同时, 对单环刺螠人工健康养殖具有实际指导意义。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

患病及健康幼螭均采自山东省烟台市东方海洋云溪养殖基地,规格为 3 000~4 000 只/kg。其中,患病幼螭症状为行动迟缓,从沙底洞穴浮至沙子表面,全身暗红色。

LB 培养基、弧菌生理生化鉴定盒购自广东环凯微生物科技有限公司,氯霉素、羧苄西林、氧氟沙星、头孢曲松、对米诺环素、庆大霉素、卡那霉素、头孢唑林、四环素、对阿奇霉素、新霉素、万古霉素、利福平、红霉素、克林霉素、阿莫西林 16 种抗生素药敏纸片购自北京博尔优生物技术有限公司。

1.2 患病幼螭解剖与致病菌分离

将患病的幼体单环刺螭体表用无菌水冲洗 3 遍后,放置在超净工作台中已经过高温灭菌处理的托盘上,无菌条件下对单环刺螭进行解剖^[16],分离肠道,并将适量全长肠道放入 1.5 mL 离心管中,加入灭菌的生理盐水并混匀,后吸取混合液 50 μ L 均匀涂布在 LB 固体培养基上,将培养基放置在 30 $^{\circ}$ C 的温室中恒温培养 36 h 后,挑取优势单菌落接种至 5 mL LB 液体培养基中,30 $^{\circ}$ C 恒温培养 24 h,再进行重复划线分离纯化培养三次后,挑取单菌落到液体培养基,制成新鲜菌液,并将新鲜菌液(对数期)加入体积分数为 30%的甘油,置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用

收稿日期: 2019-01-23; 修回日期: 2019-03-28

基金项目: 国家自然科学基金(91751112, 41573071); “科学”号高端用户项目(KEXUE2018G01); 山东省自然科学基金(JQ201608); “泰山学者”青年专家计划(tsqn 20161054); 山东省重点研发计划(公益类专项, 2018GHY115028)

[Foundation: National Natural Science Foundation of China, No.91751112, No.41573071]; Senior User Project of RV KEXUE of Chinese Academy of Sciences, No. KEXUE2018G01; Natural Science Foundation of Shandong Province, No.JQ201608; Young Taishan Scholars Programme of Shandong Province, No.tsqn20161054; Shandong Province Key Research and Development Program of China, public welfare fund, No.2018GHY115028]

作者简介: 于士翔(1996-), 男, 山东省烟台人, 研究生, 硕士, 主要从事微生物研究, 电话: 15153525066, E-mail: 1441342189@qq.com; 刘峰, 通信作者, 黑龙江省齐齐哈尔人, 教授, 博士, 主要从事水产养殖研究, 电话: 13001623257, E-mail: 869272328@qq.com; 刘芳华, 通信作者, 男, 湖北省当阳人, 教授, 博士, 主要从事微生物电子传递机制研究, 电话: 0535-2109268, E-mail: fhliu@yic.ac.cn

待鉴定^[17]。

1.3 菌株的生理、生化鉴定

用 LB 固体培养基培养该微生物,挑取单菌落制成菌悬液进行革兰氏染色,置于显微镜下观察;另外,将菌悬液制备成 0.5McFarland 并于标准浊度管比浊,分别吸取 60 μ L 菌悬液加入弧菌生理生化鉴定中,并置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 24~48 h,观察生理生化反应^[18]。

1.4 优势菌 16S rRNA 基因序列分析及系统发育树的构建

用灭菌的枪头挑取单个菌落并置于 100 μ L 灭菌水(PCR 管装)中,100 $^{\circ}$ C 水浴锅中水浴 10 min 后,在离心机中离心 3 min,转速为 7200 r/min。取上清作为 PCR 模板,PCR 扩增采用细菌 16S rRNA 基因通用引物(上海英潍捷基生物公司合成),正向引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物 1492R: 5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3',PCR 反应体系(50 μ L): 10 \times EX Taq buffer 5 μ L, dNTPs 4 μ L, 27F 2 μ L, 1492R 2 μ L, ExTaq 0.25 μ L, 无菌水 34.75 μ L。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 57 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min。经琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物后,将 PCR 产物送至上海英潍捷基贸易有限公司单端测序,检测结果为纯菌后补测另一端,最后将结果进行拼接得到序列。将此序列与 GenBank 中的核酸序列进行 Blast 分析,选取同源性较高的序列,使用 Clustal X 1.83 软件进行多重序列比对分析,并通过 MAGA X 软件采用邻接法构建系统发育树图。

1.5 人工回染试验

分别挑取 20 只健康幼螭放入 6 个规格为 1 L 的烧杯中暂养 3 天,随机选择 3 个烧杯中的幼螭为试验组,另外 3 个烧杯中的幼螭为对照组,并且控制相同的生长条件(温度 23 $^{\circ}$ C, 盐度 25, pH6.3, 持续充氧)。三天内观察到无病变单环刺螭后,向试验组的养殖水

体中注入适量菌悬液, 将菌悬液浓度调至 10^8 cfu/mL, 使用该养殖水体每天正常养殖并观察记录试验组与对照组发病与死亡情况。

1.6 生长特性分析

1.6.1 生长曲线的绘制

取 10 μ L 培养至指数期的新鲜菌液接种于 5 mL 灭菌的 LB 培养基中, 设置三个平行, 选用紫外分光光度计 600 nm 波长进行光电比浊测定, 用未接菌的 LB 培养基作为空白对照。调节 pH 为 6, 盐度为 35 测, 量起始 OD_{600} 平均值放于 30 $^{\circ}$ C 恒温温室中进行培养。每隔 6 h 取样一次并测定光密度值, 采用 SPSS 25 软件包单因素方差分析法(one-way ANOVA) 中的 Duncan 多重比较检验法进行数据分析, 再利用 OriginPro 2017 软件进行作图。

1.6.2 温度、盐度、pH 对生长的影响

该部分分为三个实验大组, 分别是温度实验组、盐度实验组、pH 实验组, 以此探究温度、盐度、pH 对微生物生长的影响。取 10 μ L 培养至指数期的菌液接种于 5 mL 灭菌的不同处理的 LB 培养基中, 具体实验条件详见表 1, 每组实验条件设置三个平行。

测量每组起始 OD_{600} 平均值后, 培养 24 h 后测各个处理下菌液的 OD 值。数据分析与作图方法同 1.6.1。

1.7 药敏试验

采用 K-B 纸片扩散法测定该菌株对 16 种抗生素药物的敏感性。在超净工作台中, 取 50 μ L 纯菌菌液均匀涂布在 LB 固体培养基上, 用无菌涂布棒进行涂布后, 将复方新诺明、利福平、氯霉素等 16 种药敏纸片轻轻贴于培养基上, 每个平板分四个区域贴四种药敏纸片, 并作 3 组平行, 放置于 30 $^{\circ}$ C 恒温温室中培养 24 h 后, 观察抑菌圈的产生情况并测量抑菌圈直径, 根据美国临床实验室标准化研究所的抗菌药物敏感性试验执行标准^[19], 判定该菌对 16 种抗生素的敏感程度。

表 1 温度, 盐度, pH 对生长的影响

Tab. 1 Effects of temperature, salt content, and pH on growth of *Urechis uncinatus*

取样量/ μ L	温度 $T/^{\circ}$ C	盐度 S	pH
10	10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50	35	6
10	30	35	4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7
10	30	15, 20, 25, 30, 35, 40, 45	6

1.8 抗生素安全性试验

选取对该菌最为敏感的抗生素, 进行养殖模拟治疗。分别选取 20 条单环刺螠分为 4 组, 暂养 3 天均无死亡后进行试验, 第 1 组添加适量摇至指数期的菌液; 第 2 组添加相同量的菌液并采用泼洒法施加适量浓度的抗生素; 第 3 组添加相同剂量的菌液, 待单环刺螠死亡率达到 30% 时添加抗生素; 第四组为空白对照。观察一周内单环刺螠的死亡与生长情况。

2 结果与分析

2.1 病原菌的形态特征

该纯菌在 LB 培养基上培养 24 h 后呈现的菌落为圆形, 表面光滑, 颜色为黄色的突起菌落。革兰氏染色结果表明, 菌体为杆状, 菌体呈红色, 是革兰氏阴性菌(图 1), 命名为菌株 SX-1。

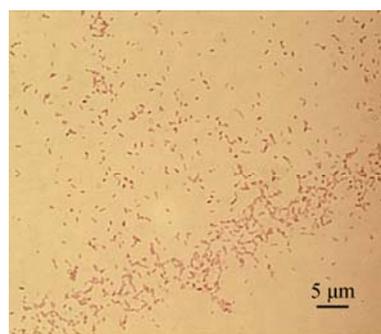


图 1 菌株 SX-1 革兰氏染色显微照片

Fig. 1 Gram staining microphotograph of strain SX-1

2.2 菌株 SX-1 的生理生化鉴定

该菌生理生化鉴定结果如表 2 所示, 查找《伯杰

氏细菌鉴定手册》等细菌分类书籍未发现与之一致细菌, 但该病原菌与弧菌属中的细菌极为相似, 初步鉴定该菌为弧菌属中的一种。

表 2 弧菌 SX-1 生理生化特征
Tab. 2 Biochemical identification of *Vibrio* SX-1

检测项目	SX-1
葡萄糖产气	+
V-P	—
蛋白胨水	—
蔗糖	+
甘露糖	+
阿拉伯糖	+
肌醇	—
赖氨酸脱羧酶	—
精氨酸双水解酶	+
无盐胨水	+
3%NaCl 胨水	+
6%NaCl 胨水	+
8%NaCl 胨水	+
10%NaCl 胨水	+

注: “+”表示反应为阳性, “—”为阴性, “d”为结果未知

2.3 菌株 SX-1 16S rRNA 基因序列的鉴定及发育树的构建

将菌株 SX-1 所测得的基因序列通过 BLAST 进

行序列比对分析, 结果显示该菌与新喀里多尼亚弧菌 SCSIO 43737 序列同源性最相近, 相似度达到 99.93%; 选择与该序列相近的 15 个弧菌菌株的 16S rRNA 基因序列构建系统发育树, 可以看出, 菌株 SX-1 与新喀里多尼亚弧菌 SCSIO 43737 聚为一支(图 2), 结合菌株的生理生化特征, 鉴定该菌株 SX-1 极有可能为新喀里多尼亚弧菌(*V.n*), 新喀里多尼亚弧菌属于原生动植物门(Proteobacteria)、 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)、弧菌目(Vibrionales)、弧菌科(Vibrionaceae)、弧菌属(*Vibrio*)。

2.4 人工回接感染试验

在人工回接感染后的第二天, 单环刺螠开始从沙底钻出, 活动能力减弱, 体表变红, 腹部鼓起, 隐约可见其中肠道卷曲为一团, 肠道内部变黑, 疑似肠道坏死的症状, 并且部分单环刺螠肠道破碎, 内容物流至体腔, 如图 3 所示, 症状与第一次提取纯菌的患病幼体相同, 第三天死亡率达到 40%, 第五天全部死亡, 对试验期间患病的单环刺螠肠道病原菌再次分离纯化, 并进行革兰氏染色, 生理生化鉴定及 16S rRNA 基因序列分析鉴定, 结果显示, 新分离的微生物各项特征均与原菌相符, 故鉴定该种疑似为新喀里多尼亚弧菌的肠道菌是单环刺螠的致病菌。

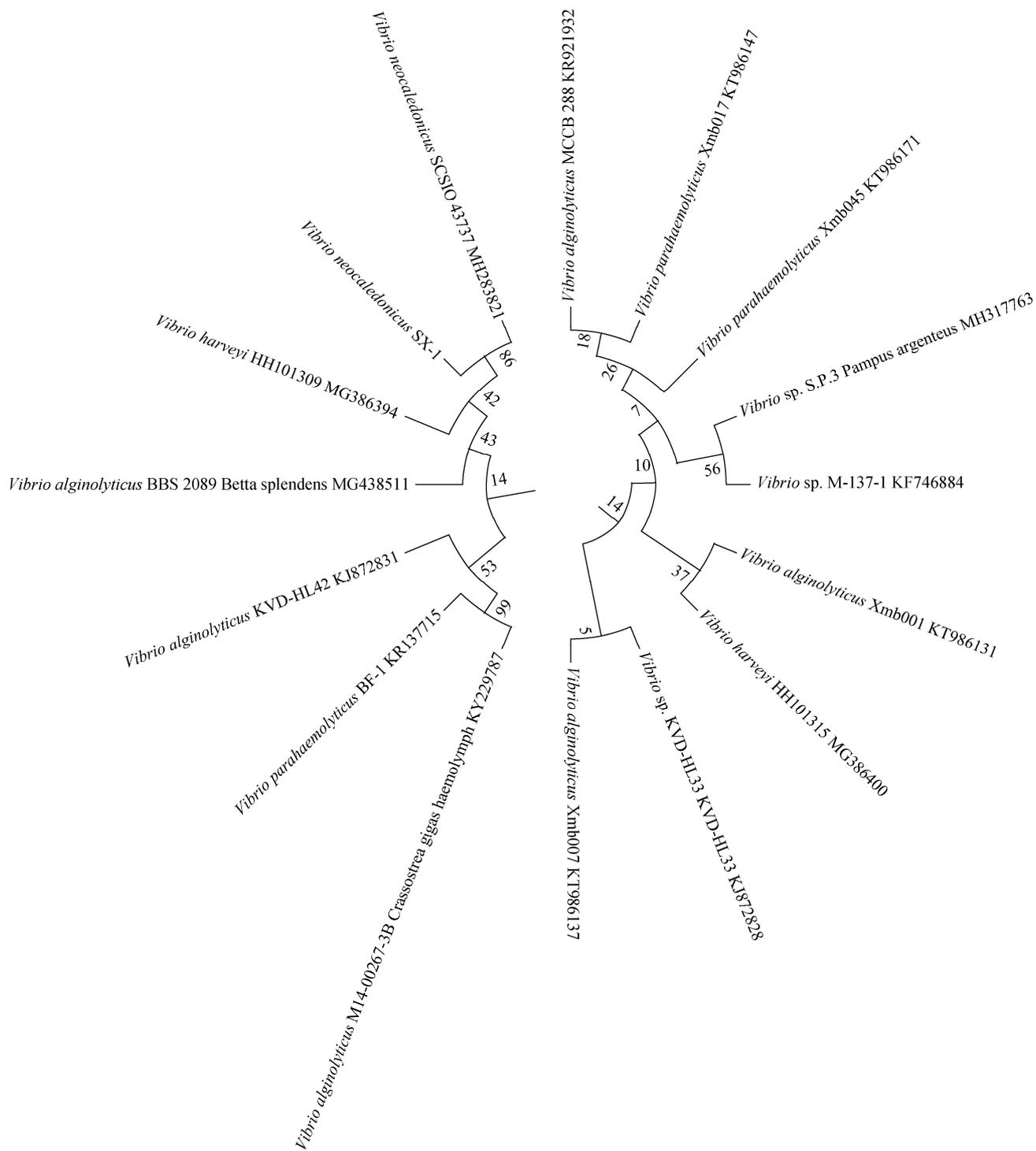


图 2 基于分离菌株 SX-1 的 16S rRNA 基因序列构建的系统发育图

Fig. 2 Phylogenesis graph based on the 16S rRNA gene sequence of the isolated SX-1 strain



图3 患病单环刺螠幼体
Fig. 3 Diseased *Urechis uncinatus* larva

2.5 生长特性研究结果

2.5.1 生长曲线的研究

SX-1 的生长曲线如图 4a 所示。起始 OD₆₀₀ (600nm 波长处的吸光值) 为 0.115, 在培养 6 h 前, 菌液的 OD 值只有小幅度的上升, 表明 SX-1 此时生长较为缓慢, 该阶段是 SX-1 生长的延迟期。经过上一阶段的适应, 在 6 h~18 h, OD 值迅速增加, 说明此时 SX-1 在培养基里快速繁殖生长, 该阶段是 SX-1 的指数生长期。18 h 之后 OD 增长缓慢, 生长速率常数基本为零, 说明此时 SX-1 进入稳定生长期。

2.5.2 最适温度的研究

菌液接种到 LB 培养基后, 在不同温度下培养 24 h 后, 测定不同温度下 SX-1 的 OD 值如图 4b 所示。在 15℃~50℃ 下均能生长, 但生长情况存在明显差异。相比于起始的 OD₆₀₀ 平均值(0.108), 可以看出, 在 10℃ 下 SX-1 的 OD 值变化不大, 生长近乎停止; 在 15℃~30℃ 之间, OD 值随着温度的上升而升高, 说明 SX-1 随温度增加, 生长速率加快, 在 30℃ 处出现最大 OD 值, 说明 30℃ 为该菌株生长的最适温度; 而当温度继续上升时, 24 h 后的 OD 值逐渐下降, 说明温度继续升高对 SX-1 的生长产生抑制作用。

2.5.3 最适 pH 的研究

SX-1 在不同 pH 下的生长情况如图 4c 所示。起始 OD₆₀₀ 平均值为 0.110, 相比于起始的 OD₆₀₀ 平均值(0.110), SX-1 在 4.0~7.0 的 pH 范围内均能生长, 但

存在明显差异, 在 pH 为 6.0 时, OD 值最大即生长状况最佳, 所以 SX-1 最适合生长的 pH 在 6.0 左右, 但是与 pH 为 5.5、6.5 的两组 OD 值相差不大。在 pH 是 7.5~8 左右时, OD 值相对于其它几组明显较低, 表明 SX-1 在偏碱性条件下难以生长^[20], 综上, SX-1 适合在偏酸性环境下生长。

2.5.4 最适盐度的研究

SX-1 在不同盐度下的生长情况如图 4d 所示。起始 OD₆₀₀ 平均值为 0.121, SX-1 在盐度为 20 至 45 的范围内均能生长, 在盐度为 15 至 25 之间时, OD 值逐渐增加, 在盐度为 30 时, 相对低盐度细菌生长状态下的 OD 值增加明显, 并在盐度为 35 处 OD 值达到最大值, 说明该菌株的最适盐度为 35。

通过观察抑菌圈产生情况并测量抑菌圈直径, 得到新喀里多尼亚弧菌药敏结果如表 3 所示。结果表明, 该菌株对氯霉素、羧苄西林、氧氟沙星、头孢曲松高度敏感, 对米诺环素、庆大霉素、卡那霉素、头孢唑林、四环素中度敏感, 对阿奇霉素、新霉素、万古霉素、利福平、红霉素、克林霉素、阿莫西林耐药。从抗生素分类情况看, 该菌株对氨基醇类、喹诺酮类抗生素高度敏感, 对 β-内酰胺类抗生素部分高度敏感, 对头孢素类抗生素敏感甚至高度敏感, 对四环素类敏感, 对氨基糖苷类部分抗生素敏感, 对大环内酯类、利福霉素类、多肽类、林可酰胺类耐药, 但该实验只对每类抗生素选取一种或两种抗生素进行实验, 该菌具体对何种类别抗生素的敏感程度有待进一步验证。

2.6 抗生素效果试验

据药敏试验结果, 我们选取氧氟沙星作为施用抗生素进行安全性试验。第一组单环刺螠第三天时全部死亡, 病状特征与回染试验一致。第二组单环刺螠四天内无死亡。第三组单环刺螠在 24 小时后死亡 5 条, 另有 2 条浮于沙面, 且行动能力大幅度下降, 此时加入氧氟沙星, 三天后, 浮于沙面的体表明明显变红的单环刺螠死亡, 说明此条单环刺螠受 SX-1 感染严重, 无法救活; 而另一条在用药后正常存活, 钻

入沙底,说明该抗生素及时在单环刺螠的体内抑制了病菌的生长;该组其余的13条单环刺螠无死亡现象。第四组单环刺螠无死亡,对比第四组与第二组单环刺螠,生长状态相似,处于健康状态。

3 讨论

本文从人工养殖的单环刺螠患病幼体中,分离获得一株弧菌 SX-1(图 2),该菌可导致幼螠患病。患病单环刺螠主要症状为活动能力减弱,体表变红(图 3)。弧菌一方面在海洋环境中占有极为重要的地位^[7],特别是海洋中的碳循环,有着不可或缺的作用,

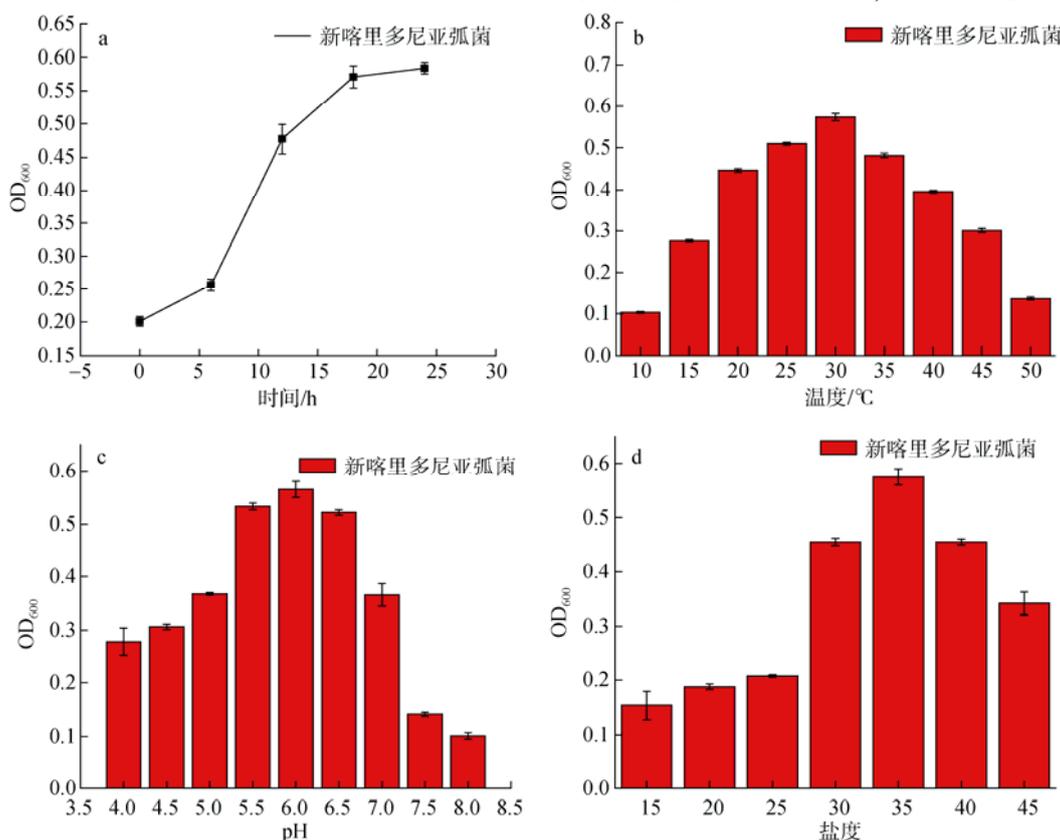


图 4 生长特性研究

Fig. 4 Growth characteristics studies

注: a. 生长曲线图; b. 不同温度下菌株生长情况; c. 不同 pH 下菌株生长情况; d. 不同盐度下菌株生长情况

表 3 药敏试验结果

Tab. 3 Drug sensitivity test results

抗生素分类	抗生素名称	药物含量/(μg /片)	抑菌圈直径/mm	判定结果
氨基糖苷类	庆大霉素	10	11	I
	卡那霉素	30	12	I
	新霉素	30	无抑菌圈	R
大环内酯类	阿奇霉素	15	无抑菌圈	R
	红霉素	15	无抑菌圈	R
四环素类	米诺环素	30	16	I
	四环素	30	12	I

β-内酰胺类	羧苄西林	100	21	S
	阿莫西林	10	无抑菌圈	R
头孢素类	头孢曲松	30	25	S
	头孢唑林	30	12	I
氨基醇类	氯霉素	30	20	S
喹诺酮类	氧氟沙星	5	32	S
利福霉素类	利福平	5	无抑菌圈	R
多肽类	万古霉素	30	无抑菌圈	R
林可酰胺类	克林霉素	2	9	R

注: S 为高度敏感, I 为中度敏感, R 为耐药

另一方面也是水产养殖行业中的常见致病菌^[21], 如溶藻弧菌对皱纹盘鲍^[22]、凡纳滨对虾^[23], 哈维氏弧菌对大菱鲆^[24]、石斑鱼^[25]等。已有研究表明, 患有急性肝胰腺坏死综合征的凡纳滨对虾肠道内菌群丰富度降低, 菌落组成的均匀度遭到破坏, 其中弧菌属占据绝对优势^[23]。该菌 SX-1 疑似的新喀里多尼亚弧菌(*Vibrio neocaledonicus*)(图 2)在缓解金属腐蚀方面有着重大的研究潜力^[26]。然而其可作为单环刺螠的致病菌则为首次报道, 目前尚无幼螠疾病方面研究, 本实验为人工养殖幼螠过程中出现的疾病提供治疗依据。通过本文对该弧菌的致病性研究, 有助于增加人们对该菌的了解和重视, 在注意安全、积极防治的同时, 开发该菌的应用价值。

在水产养殖过程中, 根据目前已有的研究可知, 单环刺螠人工养殖最适温度为 25℃左右, 最适生长 pH 为 8^[27], 盐度为 25 前后^[28], 这与我们所测的 SX-1 的最佳生长条件(温度 30℃, pH7.5~8, 盐度 35)有所差异, 因而在高温期通过水质监测, 及时控制养殖环境尤其是 pH, 一定程度上抑制单环刺螠养殖过程中该致病菌的生长, 使幼体单环刺螠健康生长。另外, 对该弧菌的生理生化研究可为《伯杰细菌鉴定手册》等细菌分类书籍的完善提供参考价值。

通过药敏试验结果可以得知, 该弧菌对多种抗生素拥有极强的耐药性, 能对该菌产生明显抑制效应的抗生素为氯霉素、羧苄西林、氧氟沙星、头孢曲松。而效果最好的氧氟沙星在一定用药范围内不

具有危害性, 建议当幼螠出现出沙全身通红时可挑出患病幼螠在容器中用适宜浓度的氧氟沙星进行浸泡。目前, 在水产养殖过程中, 当单环刺螠出现疾病, 人们不可避免地要施用抗生素, 但如果滥用抗生素, 将导致致病菌的耐药性不断增加。所以在单环刺螠患病后, 可以结合本文的治疗模式, 结合药敏试验结果有针对性的添加合适的抗生素进行治疗, 减少耐药菌株出现, 提高治疗效率。在药敏试验部分存在不足之处: 只选用了 16 种抗生素进行实验分析, 并且在药敏试验平板中, 部分抑菌圈内出现单菌落, 经分析可能的原因是该菌在短时间产生了具有耐药性的突变体^[29], 但未对这些突变体进行进一步的详细分析及药敏试验处理。

通过安全性效果试验结果可知, 氧氟沙星在此范围内可以有效抑制海肠致病弧菌的生长。

目前, 抗生素被广泛用于水产养殖行业, 但是施加药物的同时, 会加剧水体污染, 改变海洋生物的生长环境, 进而影响其生长繁殖, 这也是单环刺螠捕捞量急剧下降的原因之一。抗生素的滥用使得耐药菌频繁出现^[30], 所以以更加有效的方式取代抗生素添加是今后的热点问题。实验中发现, 施用微弱剂量的致病菌并不会导致单环刺螠发病, 暗示了在单环刺螠体内存在活性物质(如黏液^[31]、血液等), 或者肠道中的有益菌群可以抑制此种致病菌的生长^[32], 如果能够获得这种活性物质或者菌种, 作为生防菌^[33], 采用生物制剂^[34]的方法, 可以实现无污染绿色可持

续的治疗目的。研究单环刺螠的肠道菌群结构显得尤为重要,不仅可以为疾病治疗提供依据,投喂益生菌也可在养殖中实现增产增量。这为今后提供了新的研究方向。

参考文献:

- [1] 李诺, 宋淑莲, 唐永政. 单环刺螠生活史研究[J]. 齐鲁渔业, 1995, (6): 24-27.
Li Nuo, Song Shulian, Tang Yongzheng. The Life History of the *Urechis unicinctus*[J]. Shandong Fisheries, 1995, (6): 24-27.
- [2] Liu W, Han Y, Wang B B, et al. Isolation, identification, and characterization of the *nematophagous fungus monacrosporium salinum* from China[J]. Journal of Basic Microbiology, 2015, 55(8): 992-1001.
- [3] 刘峰, 孙涛, 纪元, 等. 单环刺螠生物学及生态学研究进展[J]. 海洋科学, 2017, 41(10): 125-131.
Liu Feng, Sun Tao, Ji Yuan, et al. Advances in studies on the biology and ecology of *Urechis unicinctus*[J]. Marine Sciences, 2017, 41(10): 125-131.
- [4] Bi Q Q, Han B Q, Feng Y L, et al. Antithrombotic effects of a newly purified fibrinolytic protease from *Urechis unicinctus*[J]. Thrombosis Research, 2013, 132(2): E135-E144.
- [5] Zhu Y Z, Liu J W, Wang X, et al. Anti-BACE1 and antimicrobial activities of steroidal Compounds Isolated from Marine *Urechis unicinctus*[J]. Marine Drugs, 2018, 16(3): .
- [6] Su H C, Liu S, Hu X J, et al. Occurrence and temporal variation of antibiotic resistance genes (ARGs) in shrimp aquaculture: ARGs dissemination from farming source to reared organisms[J]. Science of the Total Environment, 2017, 607: 357-366.
- [7] Cheng C, Wang Q, He L Y, et al. Change in mineral weathering behaviors of a bacterium *Chitinophaga jiangningensis* JN53 under different nutrition conditions[J]. Journal of Basic Microbiology, 2017, 57(4): 293-301.
- [8] Nehal F, Jallouli R, Krayem N, et al. Biochemical and molecular characterization of a lipase from an Algerian isolated *Staphylococcus aureus* strain[J]. Journal of Basic Microbiology, 2017, 57(3): 253-264.
- [9] 刘峰, 孙涛, 纪元, 等. 单环刺螠生物学及生态学研究进展[J]. 海洋科学, 2017, 41(10): 125-131.
Liu Feng, Sun Tao, Ji Yuan, et al. Advances in studies on the biology and ecology of *Urechis unicinctus*[J]. Marine Sciences, 2017, 41(10): 125-131.
- [10] 张喜昌, 费世洲, 常亚青, 等. 刺参肠道微生物组成分析及产酶、溶血性试验[J]. 海洋科学, 2014, 38(5): 24-30.
Zhang Xichang, Fei Shizhou, Chang Yaqing, et al. Microflora in digestive tract of *apostichopus japonicus* and enzyme producing and hemolytic analysis[J]. Marine Sciences, 2014, 38(5): 24-30.
- [11] 杨娜, 梁箫, 彭莉华, 等. 肠道细菌对厚壳贻贝稚贝附着的作用研究[J]. 海洋科学, 2017, 41(11): 45-54.
Yang Na, Liang Wei, Peng Lihua, et al. Effects of gut bacteria on the settlement of spats of *Mytilus coruscus*[J]. Marine Sciences, 2017, 41(11): 45-54.
- [12] Mohammed A B A, Al-Saman M A, Tayel A A. Antibacterial activity of fusion from biosynthesized acidocin/silver nanoparticles and its application for eggshell decontamination[J]. Journal of Basic Microbiology, 2017, 57(9): 744-751.
- [13] Li L Y, Pan X W, Cui X L, et al. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* phage K5 genome and identification of its receptor related genes[J]. Journal of Basic Microbiology, 2016, 56(12): 1344-1353.
- [14] Kalai-Grami L, Karkouch I, Naili O, et al. Production and identification of iturin a lipopeptide from *Bacillus methyltrophicus* TEB1 for control of *Phoma tracheiphila*[J]. Journal of Basic Microbiology, 2016, 56(8): 864-871.
- [15] Shirnalli G G, Kaushik M S, Kumar A, et al. Isolation and characterization of high protein and phycocyanin producing mutants of *Arthrospira platensis*[J]. Journal of Basic Microbiology, 2018, 58(2): 162-171.
- [16] 邓先余, 王智学, 孙成波, 等. 工厂化养殖杂色鲍致病菌副溶血弧菌的分离鉴定及其生理特性[J]. 海洋科学, 2007, 31(11): 33-38.
Deng Xianyu, Wang Zhixue, Sun Chengbo, et al. Isolation and biological characteristics of the pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) in plant-cultured abalone (*Haliotis diversicolor*)[J]. Marine Sciences, 2007, 31(11): 33-38.
- [17] 韦露, 陈偿, 龙云映, 等. 一株拮抗菌 C-5 的分离及鉴定[J]. 海洋科学, 2015, 39(10): 29-35.
Wei Lu, Chen Chang, Long Yunying, et al. Isolation and identification of a probiotic strain C-5[J]. Marine Sciences, 2015, 39(10): 29-35.
- [18] 苗鹏飞, 杨映, 谭淑雯, 等. 罗氏沼虾致病性溶藻弧菌的鉴定及药敏分析[J]. 水产科学, 2018, 37(3): 384-388.
Miao Pengfei, Yang Ying, Tan Shuwen, et al. Identification and antibiotic susceptibility of pathogenic bacterium *Vibrio alginolyticus* from diseased giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Fisheries Science, 2018, 37(3): 384-388.
- [19] 崔惠敬, 孟玉霞, 冯文倩, 等. 养殖大菱鲆肠道中大菱鲆弧菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 水产科学, 2017, 36(2): 125-131.

- Cui Huijing, Meng Yuxia, Feng Wenqian, et al. Identification and antimicrobial susceptibility test of *Vibrio scophthalmi* isolated from the intestine of cultured turbot *Scophthalmus maximus*[J]. Fisheries Science, 2017, 36(2): 125-131.
- [20] Xue L G, Shang H, Ma P, et al. Analysis of growth and lipid production characteristics of *Chlorella vulgaris* in artificially constructed consortia with symbiotic bacteria[J]. Journal of Basic Microbiology, 2018, 58(4): 358-367.
- [21] 刘淑文, 丁家旺, 秦伟. 海水中致病菌检测研究进展[J]. 海洋科学, 2017, 41(2): 145-156.
Liu Shuwen, Ding Jiawang, Qin Wei. Research progress in detecting pathogenic bacteria in seawater[J]. Marine Sciences, 2017, 41(2): 145-156.
- [22] 房沙沙, 林壮炳, 邱弼, 等. 粤东养殖区分离的 2 株海洋弧菌及其胞外产物对皱纹盘鲍致死毒性的初步分析[J]. 海洋科学, 2013, 37(8): 16-22.
Fang Shasha, Lin Zhuangbing, Qiu Reng, et al. The pathogenicities of two *Vibrio* bacteria and their extracellular products in the pacific abalone, *Haliotis discus hannai* farmed in east guangdong area[J]. Marine Sciences, 2013, 37(8): 16-22.
- [23] 卢芷程, 许鑫佳, 卢文字, 等. 溶藻弧菌对凡纳滨对虾血细胞毒性及细胞凋亡和免疫相关基因的影响[J]. 南方农业学报, 2018, (12): 2559-2565.
Lu Zhicheng, Xu Luanjia, Lu Wenyu, et al. Effects of *Vibrio alginolyticus* on hemocytes toxicity, apoptosis and immune-related genes in *Litopenaeus vannamei*[J]. South China Journal of Agricultural Sciences, 2018, (12): 2559-2565.
- [24] 张永刚, 栾林林, 任海, 等. 中草药对大菱鲆源哈维氏弧菌的体外抑菌效果[J]. 淡水渔业, 2018, 48(3): 78-82.
Zhang Yonggang, Luan Linlin, Ren Hai, et al. Antibacterial effect of Chinese herbal medicines against *Vibrio harveyi* isolated from *Scophthalmus maximus* in vitro[J]. Freshwater Fisheries, 2018, 48(3): 78-82.
- [25] 陈建国. 美洲黑石斑鱼(*Centropristis striata*)“突眼”症的病原菌分离鉴定和组织病理学研究[D]. 上海海洋大学, 2017.
Chen Jianguo. Histopathology, Isolation and classification and of one pathogenic bacteriaum from *Centropristis striata* with exophthalmic disease[D]. Shanghai Ocean University, 2017.
- [26] 闫涛, 宋振纶, Moradi M, 等. 新喀里多尼亚弧菌对 Cu 在人工海水中腐蚀行为的影响[J]. 中国腐蚀与防护学报, 2016, 36(2): 157-164.
Yan Tao, Song Zhenlun, Moradi M, et al. Effect of *Vibrio Neocaledonicus* sp. on corrosion behavior of copper in artificial sea water[J]. Journal of Chinese Society for Corrosion and Protection, 2016, 36(2): 157-164.
- [27] 孙涛, 纪元, 于海瑞, 等. pH 值对单环刺螠呼吸排泄的影响[J]. 应用海洋学学报, 2017, 36(4): 533-537.
Sun Tao, Ji Yuan, Yu Hairui, et al. Effects of pH on respiration and excretion of *Urechis unicinctus*[J]. Journal of Applied Oceanography, 2017, 36(4): 533-537.
- [28] 许星鸿, 朱晓莹, 阙义进, 等. pH、温度和盐度对单环刺螠消化酶和溶菌酶活力的影响[J]. 水产科学, 2017, 36(2): 138-142.
Xu Xinghong, Zhu Xiaoying, Que Yijin, et al. Effects of pH, water temperature and salinity on activities of intestinal digestive[J]. Aquatic Science, 2017, 36(2): 138-142.
- [29] Erginkaya Z, Turhan E U, Tatli D. Determination of antibiotic resistance of *lactic acid bacteria* isolated from traditional Turkish fermented dairy products[J]. Iranian Journal of Veterinary Research, 2018, 19(1): 53-56.
- [30] Chem E D, Anong D N. Prescribing patterns and associated factors of antibiotic prescription in primary health care facilities of kumbo east and kumbo west health districts, north west cameroon[J]. Plos One, 2018, 13(3): e0193353.
- [31] Dhowlaghar N, Bansal M, Schilling M W, et al. Scanning electron microscopy of *Salmonella biofilms* on various food-contact surfaces in catfish mucus[J]. Food Microbiology, 2018, 74: 143-150.
- [32] 潘雷, 郭文, 高凤祥, 等. 饵料中添加益生菌对大菱鲆幼鱼肠道菌群及部分免疫指标的影响[J]. 海洋科学, 2012, 36(2): 34-39.
Pan Lei, Guo Wen, Gao Fengxiang, et al. Effects of dietary probiotic on intestinal bacteria and immunity of juvenile *Scophthalmus musmaximus*[J]. Marine Sciences, 2012, 36 (2): 34-39.
- [33] 方卫东, 唐旭, 刘源森, 等. 生防细菌 K2-1 对大菱鲆病原菌的抑制作用及其抗菌特性分析[J]. 海洋科学, 2015, 39(09): 51-56.
Fang Weidong, Tang Xu, Liu Yuansen, et al. Antimicrobial activity of a biocontrol bacterium strain K2-1 against selected pathogens of *Scophthalmus maximus* and its antimicrobial property analysis[J]. Marine Sciences, 2015, 39(09): 51-56.
- [34] Shabani A, Boldaji F, Dastar B, et al. Preparation of fish waste silage and its effect on the growth performance and meat quality of broiler chickens[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018, 98(11): 4097-4103.

Isolation, identification, characterization, and sensitivity analysis of gut pathogenic *Vibrio* of *Urechis unicinctus*

YU Shi-xiang^{1, 2}, JI Yuan³, LI Xin^{1, 3}, LIU Feng³, LIU Fang-hua¹

(1. Key Laboratory of Coastal Biology and Biological Resources Utilization, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Yantai Research Institute, China Agricultural University, Yantai 264670, China)

Received: Jan. 23, 2019

Key words: *Urechis unicinctus*; *Vibrio*; isolation and identification; growth characteristics; drug sensitivity test

Abstract: The larvae of the diseased intestinal pathogenic bacterium *Urechis unicinctus* (3000 to 4000 kg) were isolated and identified, and their growth characteristics and drug sensitivities were evaluated to provide a treatment basis for diseases that occur in an artificial culture of the larva. Isolation and purification, biochemical identification, 16S rRNA gene sequence analysis, artificial resumption infection, and growth curve assay as well as studies on optimum growth temperature, pH, and salt content were conducted on the pathogenic bacteria isolated from human intestines. The K-B disk diffusion method was applied for drug sensitivity testing, whereas ofloxacin was used for security detection testing. For pathogenic *Vibrio*, the optimum growth temperature, pH, and salt content were 30°C, 6.0, and 35, respectively. Drug sensitivity tests demonstrated that *Vibrio* is highly sensitive to chloramphenicol, carbenicillin, ofloxacin, and ceftriaxone; moderately sensitive to minocycline, gentamicin, kanamycin, cefazolin, and tetracycline; but resistant to azithromycin, neomycin, vancomycin, rifampicin, erythromycin, clindamycin, and amoxicillin. Security detection tests revealed that although ofloxacin exerted a clear antibacterial effect, it did not harm *U. unicinctus*. Based on the results of the drug sensitivity test, *Vibrio*-infected *U. unicinctus* can be effectively treated using targeted antibiotics. These experimental results could provide a theoretical basis and treatment pattern for the prevention and treatment of *U. unicinctus* in artificial cultures.

(本文编辑: 丛培秀)