

一株仿刺参致病菌 *Shewanella* sp. B9的分离筛选

作者：刘上 赵欣妍 秦鹤洋 李佳希 陈英旭 赵晨阳 霍忠明 方蕾

单位：大连海洋大学



1. 研究背景及研究意义

- 中国仿刺参养殖规模巨大，2022年产量达到248,508吨。
- 受全球气候变暖和海水水质恶化影响，仿刺参病害频发，影响品质和产量，给仿刺参养殖业造成巨大经济损失。
- 从仿刺参患病组织分离病原，可用于仿刺参病害防治，并可用于仿刺参抗病良种选育，具有重要应用价值。

3. 溶血菌株的筛选



图1.溶血试验结果

6. 菌株B9人工感染试验

表1.菌株B9人工感染试验结果
Number of Survive *Apostichopus japonicus*

cell/g	1d	2d	3d	4d	5d	5d Survival rate /%
2.5×10^7	1.3	0	0	0	0	0%
2.5×10^6	10	7.3	5.3	5.3	5.3	53%
2.5×10^5	10	8.3	5.3	5.3	5.3	53%
2.5×10^4	10	8.3	8.3	8.3	8.3	83%
control	10	10	10	10	10	100%

4. 菌株B9分子鉴定

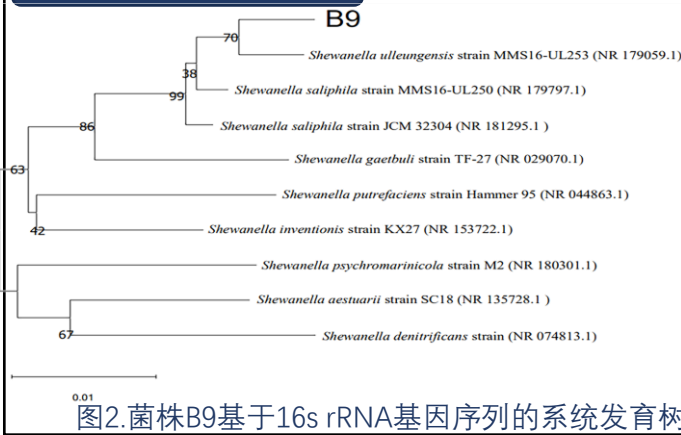


图2.菌株B9基于16s rRNA基因序列的系统发育树

7. 组织病理学分析

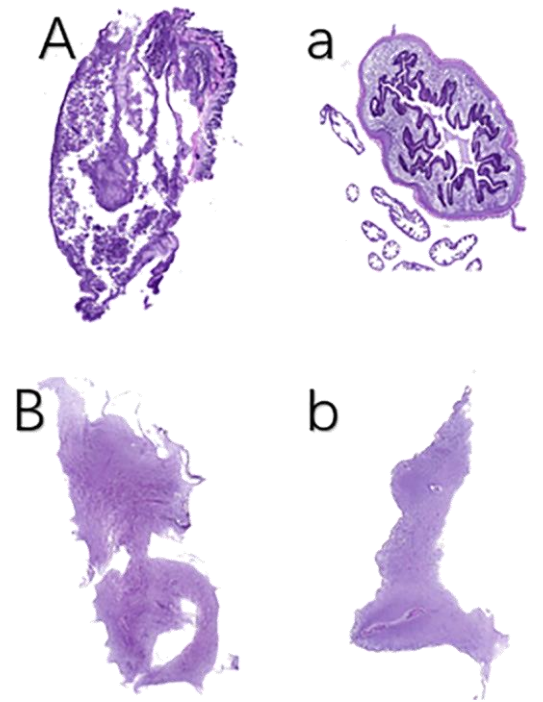
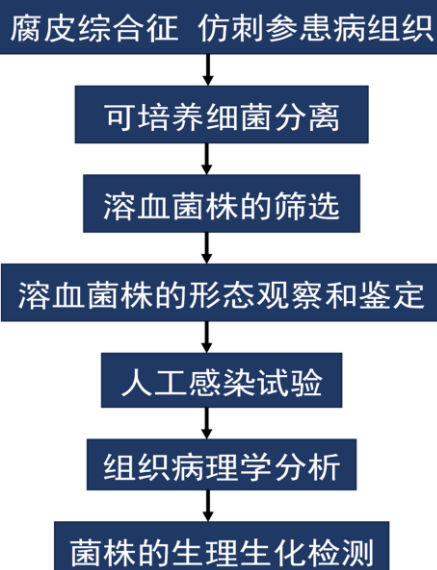


图4.组织病理学分析

仿刺参肠道切片 (A为菌株B9感染患病肠道,a未感染仿刺参组织切片 (B为菌株B9感染患病组织,b为感染

2. 技术路线



5. 菌株B9形态观察

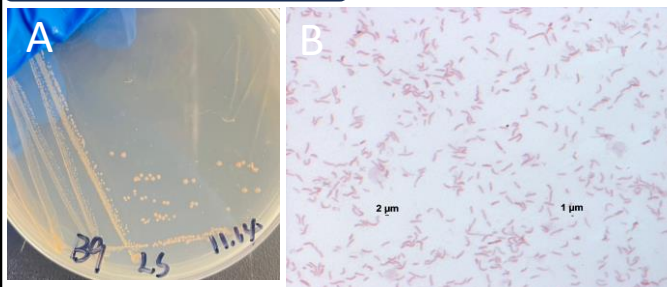


图3.菌株B9形态观察

A.2216E平板上菌株B9 B.菌株B9革兰氏染色图

8. 菌株B9生理生化检测

表2.菌株B9抗生素敏感试验结果

抗生素敏感性分析结果见表，菌株B9对头孢氨苄、青霉素、新霉素、卡那霉素、链霉素、庆大霉素、妥布霉素、妥布霉素、妥布霉素具有耐药性，对阿莫西林、阿奇霉素、诺氟沙星、复方新诺明、氯霉素、多黏菌素B敏感。

抗生素分类 Type of antibiotics	抗生素 Antibiotics	基于抑菌圈直径的判定标准/mm Criteria based on diameter of inhibitory zone			B9	
		耐药 (R) Resistant	中度敏感 (I) Intermediate	高度敏感 (S) Susceptible	抑菌圈直径 (mm) Diameter of inhibitory zone	敏感性 Sensitivities
β-内酰胺类 β-lactams	头孢氨苄 Cefalexin	≤14	15-17	≥18	11.33±0.05	R
	头孢曲松 Ceftriaxone	≤13	20-22	≥23	20.33±0.02	I
	青霉素 Penicillin	≤17	18-20	≥21	15.5±0.33	R
	阿莫西林 Amoxicillin	≤13	14-17	≥18	17.67±0.52	S
氨基糖苷类 Aminoglycosides	新霉素 Neomycin	≤12	13-16	≥17	11.23±0.02	R
	卡那霉素 Kanamycin	≤13	14-17	≥18	10.34±0.05	R
	链霉素 Streptomycin	≤11	12-14	≥15	8.33±0.45	R
大环内酯类 Macrolides	红霉素 Erythromycin	≤13	14-22	≥23	20.00±0.56	I
	阿奇霉素 Azithromycin	≤13	14-17	≥18	20.23±0.05	S
喹诺酮类 Quinolones	诺氟沙星 Norfloxacin	≤12	13-16	≥17	16.67±0.43	S
	氧氟沙星 Ofloxacin	≤12	13-16	≥17	14.33±0.33	I
磺胺类 Sulfonamides	复方新诺明 Cotrimoxazole	≤10	11-15	≥16	20.00±0.23	S
氯霉素类 Chloramphenicols	氯霉素 Chloramphenicol	≤12	13-17	≥18	24.33±0.45	S
多肽类 Polypeptides	多黏菌素 B Polymyxin B	≤8	9-11	≥12	18.67±0.33	S
硝基咪唑类 Nitrofurans	呋喃唑酮 Furazolidone	≤14	15-16	≥17	13.67±0.12	R

表3.菌株B9生理生化结果

菌株B9对龙胆二糖、pH 6、1% NaCl、4% NaCl、8% NaCl、D-果糖、L-鼠李糖、核糖、D-葡萄糖-6-P04、明胶、Glycyl-L-脯氨酸、L-天(门)冬氨酸、L-组氨酸、L-丝氨酸、L-酪氨酸、果胶、粘液酸、奎尼酸、丙酮酸盐、D-乳酸甲酯、Bromo-琥珀酸、吐温 40、γ-Amino-丁酸、α-Keto-丁酸、乙酰乙酸呈阳性。

BIOLOG GEN III 碳源	结果	BIOLOG GEN III 碳源	结果	BIOLOG GEN III 碳源	结果	BIOLOG GEN III 碳源	结果
A1 Negative Control	-	C1 α-D-Glucose	-	E1 Gelatin	+	G1 p-Hydroxy-Phenylacetic Acid	-
A2 Dextrin	-	C2 D-Mannose	-	E2 Glycyl-L-Proline	+	G2 Methyl Pyruvate	+
A3 D-Maltose	w	C3 D-Fructose	+	E3 L-Alanine	-	G3 D-Lactic Acid Methyl Ester	+
A4 D-Trehalose	-	C4 D-Galactose	-	E4 L-Arginine	-	G4 L-Lactic Acid	w
A5 D-Cellobiose	-	C5 3-Methyl Glucose	w	E5 L-Aspartic Acid	+	G5 Citric Acid	-
A6 Gentioibiose	+	C6 D-Fucose	-	E6 L-Glutamic Acid	-	G6 α-Keto-Glutaric Acid	w
A7 Sucrose	-	C7 L-Fucose	w	E7 L-Histidine	+	G7 D-Malic Acid	w
A8 D-Turanose	-	C8 L-Rhamnose	+	E8 L-Pyroglutamic Acid	-	G8 L-Malic Acid	w
A9 Stachyose	-	C9 Inosine	-	E9 L-Serine	+	G9 Bromo-Succinic Acid	+
A10 Positive Control	+	C10 1% Sodium Lactate	w	E10 Lincomycin	+	G10 Nalidixic Acid	-
A11 pH 6	+	C11 Fusidic Acid	+	E11 Guanidine HCl	-	G11 Lithium Chloride	w
A12 pH 5	w	C12 D-Serine	+	E12 Niaproof 4	w	G12 Potassium Tellurite	-
B1 D-Raffinose	-	D1 D-Sorbitol	-	F1 Pectin	+	H1 Tween 40	+
B2 α-D-Lactose	-	D2 D-Mannitol	-	F2 D-Galacturonic Acid	w	H2 γ-Amino-Butyric Acid	+
B3 D-Melibiose	-	D3 D-Arabinol	w	F3 L-Galactonic Acid Lactone	w	H3 α-Hydroxy-Butyric Acid	-
B4 β-Methyl-D-Glucoside	-	D4 myo-Inositol	-	F4 D-Gluconic Acid	w	H4 β-Hydroxy-D,L-butyrlic Acid	w
B5 D-Salicin	w	D5 Glycerol	w	F5 D-Glucuronic Acid	w	H5 α-Keto-Butyric Acid	+
B6 N-Acetyl-D-Glucosamine	-	D6 D-Glucose-6-PO4	+	F6 Glucuronamide	-	H6 Acetoacetic Acid	+
B7 N-Acetyl-β-D-Mannosamine	-	D7 D-Fructose-6-PO4	w	F7 Mucic Acid	+	H7 Propionic Acid	-
B8 N-Acetyl-D-Galactosamine	-	D8 D-Aspartic Acid	w	F8 Quinic Acid	+	H8 Acetic Acid	-
B9 N-Acetyl Neuraminic Acid	w	D9 D-Serine	-	F9 D-Saccharic Acid	w	H9 Formic Acid	-
B10 1% NaCl	+	D10 Trolandomycin	-	F10 Vancomycin	-	H10 Aztreonam	-
B11 4% NaCl	+	D11 Rifamycin SV	-	F11 Tetrazolium Violet	w	H11 Sodium Butyrate	-
B12 8% NaCl	+	D12 Minocycline	-	F12 Tetrazolium Blue	w	H12 Sodium Bromate	-

9. 结论

- 从腐皮综合征仿刺参患病组织分离出一株细菌，其产生β-溶血环，回接至健康仿刺参可诱导腐皮综合征的发生，并且从攻毒仿刺参患病组织中可再次被分离。根据科赫法则，该株细菌为仿刺参腐皮综合征致病菌。
- 经形态学鉴定及16s rRNA基因序列，该病原菌属于希瓦氏菌属 (*Shewanella*) 细菌