

仿刺参“腐皮综合症”病灶处优势菌的分离 鉴定及 AHLs 信号分子的检测

张莹 姜国良* 刘云 吴志强 马海燕 苏明霞

(中国海洋大学海洋生命学院 山东 青岛 266003)

摘要: 仿刺参“腐皮综合症”是一种由细菌引起的高传染性、高死亡率疾病。为了研究仿刺参“腐皮综合症”病灶处优势菌以及其是否存在 N-酰基高丝氨酸内酯类化合物(AHLs)介导的群体感应系统, 本文从患病仿刺参病灶处分离纯化出 7 株优势菌, 生理生化指标测定和 16S rDNA 序列分析表明: 菌株 C6 属 *Tenacibaculum* 属, 菌株 4 属于腐败希瓦菌群(*Shewanella putrefaciens* group), 菌株 TB 属于弧菌属(*Vibrio*), 菌株 BP2、BP3、BP4 及 BP6 属于假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)。采用 AHLs 的高效检测菌株根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens* KYC55)对优势菌的 AHLs 活性进行检测, 其中菌株 C6、4、TB、BP3 及 BP4 存在以 AHLs 为信号分子的群体感应系统, 菌株 BP2 与 BP6 则无 AHLs 活性; 不同细菌 AHLs 活性不同, AHLs 活性从高到低顺序为 4>TB>BP4>BP3>C6。
关键词: 仿刺参, 腐皮综合症, 优势菌, 群体感应, 信号分子

Identification and AHLs Detection of Dominant Bacterium of Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*) Infected with the Skin Ulceration Syndrome

ZHANG Ying JIANG Guo-Liang* LIU Yun WU Zhi-Qiang MA Hai-Yan SU MING-Xia

(College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China)

Abstract: The skin ulceration syndrome of sea cucumber is a kind of disease induced by bacterium. In order to investigate the bacterium of infected sea cucumber and detect the N-acyl-homoserine lactones(AHLs) secretion of the bacterium, 7 bacterial strains were isolated from the infected sea cucumber. These strains were identified by physiological-biochemical characteristics and 16S rDNA sequence. Results show that strain C6 belongs to *Tenacibaculum*, strain 4 belongs to *Shewanella putrefaciens* group, strain TB belongs to *Vibrio*, strain BP2, BP3, BP4 and BP6 belong to *Pseudoalteromonas*, respectively. AHLs were detected with strain *Agrobacterium tumefaciens* KYC55. Among these bacterial strains, strain C6, 4, TB, BP3 and BP4 can secrete AHLs, while strain BP2 and BP6 can't. And the AHLs activity differs, from the highest to the lowest are 4, TB, BP4, BP3 and C6.

Keywords: *Apostichopus japonicus*, The skin ulceration disease, Dominant bacteria, Quorum sensing, Signal molecule

基金项目: 国家“十一五”支撑计划项目(No. 2007BAD62B04)资助

* 通讯作者: Tel: 86-532-82032913; E-mail: gljiang@ouc.edu.cn

收稿日期: 2009-04-17; 接受日期: 2009-06-03

仿刺参(*Apostichopus japonicus*)是棘皮动物门中经济意义最大的一纲。近年来“腐皮综合症”因其高传染性、高死亡率而引起普遍的关注,目前国内外已经展开了对仿刺参“腐皮综合症”的研究。研究结果表明,仿刺参“腐皮综合症”主要由细菌感染引起,且其致病菌具有地域性和多样性。

细菌根据周围环境中自身或其它细菌的数量变化自发产生并释放特定信号分子,革兰氏阴性菌的信号分子一般为 N-酰基高丝氨酸内酯类化合物(AHLs),当信号分子达到一定的浓度阈值时,即可启动菌体中相关基因的表达。启动的生物功能包括抗生素的生物合成、毒性因子的产生、胞外多糖的合成等,尤其是可以调节病原菌致病性^[1,2]。这一调控系统称为群体感应系统(Quorum sensing, QS)。然而目前只有少数细菌的群体感应调控特征被发现,研究较为详细的包括革兰氏阴性菌的哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)^[3]、液化沙雷菌(*Serratia liquefaciens*)^[4]、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)^[5]及革兰氏阳性菌的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)^[6]等,其研究深度和广度均有待于进一步加强。因此,对仿刺参“腐皮综合症”病灶处优势菌的分离鉴定及其是否存在 AHLs 介导的群体感应系统的研究具有重要的意义。

目前, AHLs 的检测方法有物理检测法、生物检测法和 TLC 检测法 3 种。由于生物检测法具有简单、快速、不需要特殊实验仪器等优点,得到了广泛的应用。AHLs 信号分子检测菌主要有紫色杆菌(*Chromobacterium violaceum* CV₀₂₆)^[7,8]、液态肠杆菌(*Serratia liquefaciens* MG44)^[9]以及根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens* NT)^[10]。本实验采用高效检测菌株 *Agrobacterium tumefaciens* KYC55 检测患病仿刺参病灶处优势菌 AHLs 的产生情况,以期探讨细菌群体感应系统与仿刺参“腐皮综合症”之间的关系,为疾病防治寻找契机,同时也为细菌群体感应系统的研究积累基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料: 患病仿刺参幼体,体长约 7.0 cm ± 0.5 cm。取自于青岛麦岛刺参养殖场。根癌农杆菌 *A. tumefaciens* KYC55(pJZ372/pJZ384/pJZ410)和 *A. tumefaciens* R10(pCF218)。

1.1.2 试剂: API-20E 试剂条与 JAMES 试剂: 法国 bioMerieux 公司; 引物(GM5F、DS907R)及质粒通用引物: 上海生工; dNTP 及 *Taq* 酶: 立陶宛 Fermentas 公司; 去 5'质粒载体(pMD19-T): 日本 TaKaRa 公司; ONPG 及 X-gal: 上海生工。

1.1.3 培养基: 2216E 培养基: 蛋白胨 5.0 g, 酵母浸粉 1.0 g, 磷酸高铁 0.1 g, pH 7.4 ± 0.2, 陈海水 1000 mL。

LB 培养基: 蛋白胨 10.0 g, 酵母浸粉 5.0 g, NaCl 10.0 g, pH 7.2 ± 0.2, 蒸馏水 1000 mL, 1 μg/mL 四环素。

AT 培养基: 20 × AT buffer 50 mL, 20 × AT salts 50 mL, 50%(g/mL)葡萄糖溶液 10 mL, 蒸馏水 890 mL。20 × AT buffer: KH₂PO₄ 214.0 g, pH 7.3, 蒸馏水 1000 mL; 20 × AT salts: (NH₄)₂SO₄ 40.0 g, MgSO₄ 1.56 g, CaCl₂ 0.152 g, FeSO₄·7H₂O 0.1 g, MnSO₄·H₂O 0.044 g, 蒸馏水 1000 mL; 50%(g/mL)葡萄糖溶液: 葡萄糖 500.0 g, 蒸馏水 1000 mL。

1.1.4 溶液: Z-buffer: Na₂HPO₄·7H₂O 16.1 g, NaH₂PO₄·H₂O 5.5 g, KCl 0.75 g, MgSO₄·7H₂O 0.245 g, 2-mercaptoethanol 2.7 mL, pH 7.0 ± 0.2, 蒸馏水 1000 mL, 4℃ 保存。

1.2 方法

1.2.1 患病仿刺参的症状观察: 取“腐皮综合症”症状典型的病参,对其病症特征进行观察。

1.2.2 病灶处优势菌的分离纯化: 将患病仿刺参置于超净工作台中,在其病灶处切取 1 cm × 1 cm × 0.5 cm 大小的组织块,健康仿刺参做对照。分别剪碎制成菌悬液,梯度稀释 10、10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶ 倍。吸取稀释 10⁵、10⁶ 倍的菌悬液 0.1 mL,涂布于 2216E 平板,28℃ 培养。48 h 后观察细菌生长情况,将其中的优势单菌落分离出来,采用平板划线法进一步分离纯化,获得纯菌株。

1.2.3 细菌的鉴定: 1) 生化指标鉴定。采用 API-20E 鉴定系统进行测定。2) 16S rDNA 序列鉴定。SDS 常规方法提取细菌 DNA,采用细菌 16S rDNA 扩增通用引物: GM5F(5'-CCTACGGGAGGC AGCAG-3')和 DS907R(5'-CCGTCAATTCCTTTTTRAG TTT-3')。PCR 反应条件为: 94℃ 10 min; 94℃ 1 min, 65℃ 1 min, 72℃ 2 min, 10 个循环,每经过 1 个循环退火温度下降 1℃,直到降至 53℃; 94℃ 1 min, 53℃ 1 min, 72℃ 2 min, 10 个循环; 72℃ 12 min。将

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

经胶纯化的 PCR 产物与质粒 pMD19-T 连接后转入 *E. coli* JM109 感受态细胞。挑取经蓝白斑筛选为阳性的转化子进行测序鉴定。

1.2.4 AHLs 检测: 1) AHLs 的初步检测。以无菌 2216E 液体培养基作为空白对照, 每组设 3 个平行样。将纯化的待测菌分别接种于 100 mL 2216E 液体培养基中, 28°C、180 r/min 连续培养 36 h。从接种开始计时, 每 6 h 取 2 mL 菌悬液, 6000 r/min 离心去菌体, 过滤除菌, 得无菌的 AHLs 粗提物。

将 KYC55 接种于 10 mL AT 培养基中, 摇匀, 加入 1 mL 实验样品, 混匀, 28°C 培养过夜后, 测定菌液的 OD_{600} 。取 600 μ L 该菌液与 2.4 mL Z-buffer 混匀, 细胞破碎机超声破碎(工作时间 3 min, 工作/间歇为 5 s/5 s, 功率 400 W, 冰浴)。加 4 mg/mL ONPG 300 μ L, 摇匀并开始计时, 直至液体变黄, 加入 1.8 mL 1 mol/L Na_2CO_3 , 离心去菌体, 取上清, 测定其 OD_{420} 。根据变色时间、 OD_{420} 和 OD_{600} 计算 AHLs 浓度。

$$\text{Miller units} = \frac{1000 \times OD_{420}}{OD_{600} \times T \times V}$$

其中, OD_{420} 为反应混合物的吸光值, OD_{600} 为待测菌液的吸光值, T 表示 β -半乳糖苷酶与底物反应的时间, V 表示待测菌液的体积。

2) AHLs 提取制备及检测。将 AHLs 初步检测呈阳性的细菌分别接种于 300 mL 2216E 液体培养基中, 28°C、180 r/min 培养至 AHLs 浓度最高时, 6000 r/min 离心去菌体, 用等体积的加有 0.5% 甲酸的乙酸乙酯抽提上清 2 次。收集有机相, 用旋转蒸发器于 43°C 蒸干液体, 用 3 mL 蒸馏水重新溶解沉淀, 过滤除菌, 得无菌的 AHLs 提取物, -20°C 保存备用。

将 *A. tumefaciens* R10 接种于 LB 培养基中, 28°C、180 r/min 培养 24 h, 6000 r/min 离心去菌体后按相同方法抽提制备, -20°C 保存待用, 作为阳性对照。将灭菌 2216E 液体培养基按相同方法抽提制备, 作为空白对照。

检测方法同 1)。

1.2.5 统计分析方法: 本实验数据用 SPSS 软件进行标准偏差分析和单因素方差分析(One-way ANOVA)。

2 结果

2.1 患病仿刺参的症状观察

患病初期仿刺参个体体刺回收, 口围部肿大, 腹部体色变浅, 活力降低, 出现排脏现象, 严重者身

体收缩, 体表背、腹部及体刺处出现蓝白色溃烂斑。

2.2 病灶处优势菌的分离鉴定

2.2.1 菌落形态描述: 7 株优势菌的菌落形态描述如表 1 所示, 菌株 BP2、BP3、BP4 与 BP6 菌落形态比较相似, 其余 3 株优势菌则各不相同。

表 1 菌落观察结果 Table 1 Observation of bacterium community					
菌株 Strain	形状 Shape	边缘 Edge	隆起 形状 Uplift	透明度 Transparence	菌落颜色 Color
C6	圆形	整齐	凸起	不透明	玉米黄色 (表面可反射蓝色金属光泽)
TB	圆形	不整齐	凸起	不透明	乳白色 (略带蓝色金属光泽)
4	圆形	整齐	凸起	不透明	棕黄色
BP2	圆形	整齐	凸起	不透明	乳黄色
BP3	圆形	整齐	凸起	不透明	乳黄色
BP4	圆形	整齐	凸起	不透明	乳白色
BP6	圆形	整齐	凸起	不透明	乳白色

2.2.2 生化指标: 细菌生理生化鉴定结果如表 2 所示。7 株优势菌均为革兰氏阴性细菌, 菌株 C6、4、BP2、BP3、BP4 及 BP6 的 MAN、INO、SOR、RHA、SAC、MEL、AMY 及 ARA 的检测结果均为阴性, 菌株 BP2、BP3、BP4 及 BP6 的生理生化鉴定结果比较相似, 其他细菌则各不相同。

2.2.3 系统发育分析: 对各病灶处优势菌的 16S rDNA 部分序列进行测序, 序列提交 GenBank 数据库。用 Clustal X 软件对所测菌株 16S rDNA 序列进行人工校正, 从 GenBank 上下载相应数据, 采用 Mega 4 软件按照 N-J 法聚类, 经自举法检验(1000 次重复), 构建系统发育树, 如图 1 所示。

基于细菌形态学观察、生理生化鉴定以及 16S rDNA 序列分析, 菌株 C6 属 *Tenacibaculum* 属, 菌株 4 属于腐败希瓦菌群(*Shewanella putrefaciens* group), 菌株 TB 属于弧菌属(*Vibrio*), 菌株 BP2、BP3、BP4 及 BP6 属于假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)。

2.3 优势菌产生 AHLs 的检测

2.3.1 AHLs 的初步检测: AHLs 活性检测结果表明(图 2), 从病灶处分离的 7 株优势菌中, 有 5 株可产生 AHLs, 分别为 4、C6、TB、BP3 和 BP4, 但其 AHLs 活性随细菌生长时间和菌种的不同而有差异。

表 2 7 种菌的生化反应结果
Table 2 Biochemical results of 7 kinds of bacterium

项目 Item	C6	4	TB	BP2	BP3	BP4	BP6
β-半乳糖苷酶 ONPG	-	-	-	-	-	+	+
精氨酸双水解酶 ADH	+	+	+	+	+	+	+
赖氨酸脱羧酶 LDC	+	+	+	+	+	+	+
鸟氨酸脱羧酶 ODC	+	+	+	+	+	+	+
柠檬酸盐利用 CIT	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S 产生试验 H ₂ S	-	+	-	-	-	-	-
脲酶 URE	+	+	+	+	+	+	+
色氨酸脱羧酶 TDA	+	+	+	+	+	+	+
吲哚产生试验 IND	-	-	+	-	-	+	-
V. P 试验 VP	+	+	+	+	+	+	+
明胶液化 GEL	+	-	+	-	-	-	-
葡萄糖发酵 GLU	-	-	+	-	-	-	-
甘露醇发酵 MAN	-	-	-	-	-	-	-
肌醇发酵 INO	-	-	-	-	-	-	-
山梨醇发酵 SOR	-	-	+	-	-	-	-
鼠李糖发酵 RHA	-	-	-	-	-	-	-
蔗糖发酵 SAC	-	-	+	-	-	-	-
密二糖发酵 MEL	-	-	-	-	-	-	-
苦杏仁苷发酵 AMY	-	-	-	-	-	-	-
阿拉伯糖发酵 ARA	-	-	-	-	-	-	-

注: - : 阴性; +: 阳性.
Note: - : Negative; +: Positive.

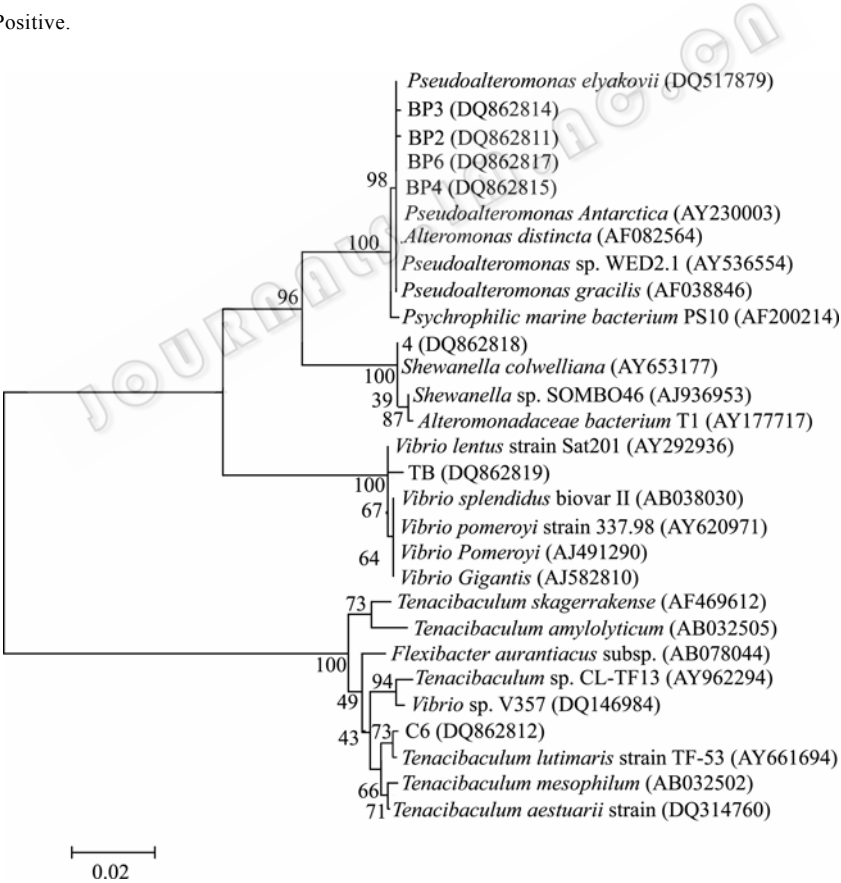


图 1 仿刺参病灶处优势菌的 16S rDNA 系统发育数

Fig. 1 The phylogenetic tree of the dominant bacteria of sea cucumber based on 16S rDNA sequences

注: 线段 0.02 代表 1/50 进化距离单位; 分支上的数值为自举 1000 次的结果; 括号中序号为 GenBank 登录号.
Note: Scale bar: 0.02 nucleotide substitution per 50 nucleotides of 16S rDNA sequence. Nuerals on branches are the supporting percentage by 1000 replicates. Serial numbers in parentheses are GenBank accession numbers.

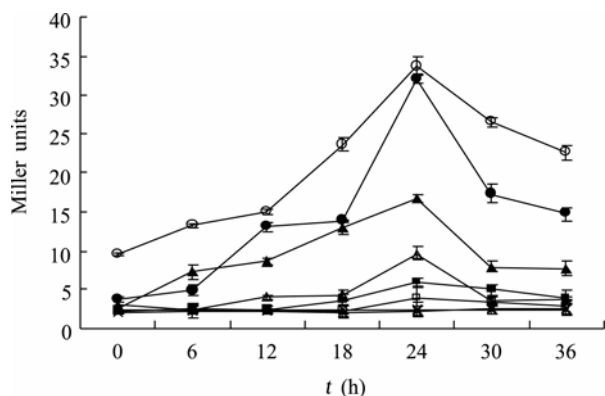


图2 细菌不同生长时期 AHLs 的产生情况

Fig. 2 Amount of AHLs in different growing periods of predominance bacterium of sea cucumber

注: —○—: 4; —●—: TB; —■—: C6; —□—: BP2; —△—: BP3; —▲—: BP4; —×—: BP6; —: 空白。

Note: —○—: 4; —●—: TB; —■—: C6; —□—: BP2; —△—: BP3; —▲—: BP4; —×—: BP6; —: Blank.

5 菌株均在生长至 24 h 时 AHLs 活性达到最高, 其中菌株 4 的活性最大, 其培养上清中 AHLs 活性值为 $33.68 \text{ Miller units} \pm 0.90 \text{ Miller units}$; 菌株 C6 的活性最小, 为 $6.44 \text{ Miller units} \pm 0.40 \text{ Miller units}$ 。

2.3.2 AHLs 提取制备及检测: 对 5 株产 AHLs 的海洋细菌, 浓缩提取并测定 AHLs 活性的结果见图 3。可见, 菌株 4 与菌株 TB 培养上清浓缩提取物中 AHLs 活性最大, 分别为 $998.60 \text{ Miller units} \pm 79.25 \text{ Miller units}$ 和 $412.50 \text{ Miller units} \pm 50.89 \text{ Miller units}$, 而菌株 BP4、BP3 和 C6 的 AHLs 活性相对较小, 分别为 $35.10 \text{ Miller units} \pm 3.50 \text{ Miller units}$ 、 $20.0 \text{ Miller units} \pm 2.37 \text{ Miller units}$ 和 $9.74 \text{ Miller units} \pm 1.99 \text{ Miller units}$ 。不同细菌 AHLs 活性不同。AHLs 活性从高到低顺序为: $4 > \text{TB} > \text{BP4} > \text{BP3} < \text{C6}$ 。经统计分析, 各菌株培养上清浓缩提取物中 AHLs 活性

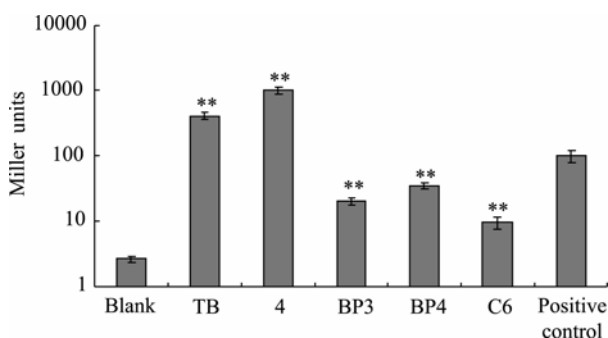


图3 5 株病灶处优势菌的 AHLs 产生情况

Fig. 3 Amount of AHLs in the 5 isolated strains

注: **: $P < 0.01$ 与空白相比差异极显著。

Note: **: $P < 0.01$. Very significantly different compared with blank.

检测结果与空白组相比均具有极显著差异 ($P < 0.01$)。

3 讨论

相关研究认为仿刺参“腐皮综合症”多以细菌感染为主, 常伴有霉菌和寄生虫的继发性感染^[11]。王印庚等于病灶部位分离的优势菌被鉴定为弧菌属和假单胞菌属细菌^[12]。杨嘉龙等从患溃疡病仿刺参病灶处分离的致病菌被鉴定为溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)^[13]。Huan Deng 等由患腐皮综合症仿刺参体表及排脏中分离纯化出 8 株优势菌, 均被证实为致病菌, 经鉴定分别为弧菌属 (*Vibrio*)、发光杆菌属 (*Photobacterium*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*) 及葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 细菌^[14]。本研究由患病仿刺参病灶处分离纯化出 7 株优势菌, 均为革兰氏阴性菌。生化指标鉴定并结合 16S rDNA 基因进化分析推出菌株 C6 属 *Tenacibaculum* 属, 菌株 4 属于腐败希瓦菌群 (*Shewanella putrefaciens* group), 菌株 TB 属弧菌属 (*Vibrio*), 菌株 BP2、BP3、BP4 与 BP6 则属假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*)。相关报道指出, *Tenacibaculum* 属中最常见的病原海洋屈挠杆菌 (*Tenacibaculum maritimum*) 可导致养殖大菱鲆发生屈挠杆菌病^[15]; 腐败希瓦氏菌 (*Shewanella putrefaciens*) 为养殖大黄鱼冷藏期的优势腐败菌^[16]; 弧菌属 (*Vibrio*) 的细菌是许多水产动物的致病菌, 在患病糙海参 (*Holothuria scabra*) 病灶处亦发现弧菌属细菌为优势菌^[17]; 假交替单胞菌曾被报道为养殖刺参溃疡病致病菌^[18]。不同地区仿刺参的致病菌种类不同, 可能是由于地域环境以及物种的差异而造成的。

革兰氏阴性细菌通常以 AHLs 作为信号分子, 很多生理模式都采用群体感应系统调控, 现在一般认为其调控机理为 LuxI 类蛋白催化 AHLs 信号分子的合成, 当细菌浓度急剧上升时, AHLs 分子的水平超过一个特定的阈值, 则可识别与 LuxI 同源的 LuxR 类蛋白, 与之结合并形成特定的构象, 使羧基残端与靶 DNA 序列结合, 启动下游靶基因的转录, 从而调节某些功能基因的表达。其中群体感应系统对致病菌致病性的调控作用引起国际学术界的广泛关注。目前已有研究证实 AHLs 与细菌的致病性关系密切, 如铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)^[19] 可通过 AHLs 介导的群体感应系统调节产生大量的胞外酶和毒性因子; 洋葱伯克霍尔德菌

(*Burkholderia cepacia*)^[20]通过 AHLs 可启动毒力因子的表达并抑制铁载体蛋白的产生; 软腐欧文氏杆菌 (*Erwinia carotovora*)^[21]可通过 AHLs 启动致病因子的表达等。我们采用生物检测法确定了 5 株可产生 AHLs 信号分子的病灶处优势菌, 由于它们均与水产养殖常见致病菌有较大同源性, 故推测其群体感应系统与细菌的致病性存在一定的相关性, 但其作用机理尚需进一步研究。

本实验分离鉴定了患“腐皮综合症”仿刺参病灶处的优势菌, 并对其产生 AHLs 活性进行了研究, 仿刺参病害很有可能是由这些细菌共同作用引起的, 且疾病的暴发与细菌的群体感应系统具有密切的相关性。因此, 通过 AHLs 类似物干扰海水养殖致病细菌的群体感应系统, 或通过酶类降解 AHLs 使之调控致病性不表达, 可达到防治养殖仿刺参疾病的目的, 从而为水产养殖病害的防治开辟了新途径。

致谢: 感谢南京农业大学朱军教授提供菌株根癌脓杆菌 *A. tumefaciens* KYC55 和 *A. tumefaciens* R10。

参 考 文 献

- [1] 袁茵, 鲁欣. 具细菌群体感应一致或性海洋细菌的筛选鉴定. 生物技术, 2006, **16** (4): 30–33.
- [2] 陈峰. 微生物的群体感应信号分子. 上海农业学报, 2005, **21** (1): 98–102.
- [3] Freeman JA, Bassler BL. Sequence and function of LuxU: a two-component phosphorelay protein that regulates quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol*, 1999, **181**: 899–906.
- [4] Eberl L, Winson MK, Sternberg C, *et al.* Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. *Mol Microbiol*, 1996, **20**(1): 127–136.
- [5] Kevin RP, Susanne Beck von Bodman, Stephen KF, *et al.* Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. *Nature*, 1993, **362** (6419): 448–450.
- [6] Novick RP. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol*, 2003, **48**(6): 1429–1449.
- [7] Kay H, McClean, Michael K, *et al.* Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology*, 1997, **143**: 3703–3711.
- [8] Renée S, Blosser, Kendall M, *et al.* Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for N-acyl homoserine lactone autoinducers. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, **40**: 47–55.
- [9] Lindum PW, Anthoni U, Christophersen C, *et al.* N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers control production of an extracellular lipopeptide biosurfactant required for swarming motility of *Serratia liquefaciens* MGI. *J Bacteriol*, 1998, **180**: 6384–6388.
- [10] Zhu J, Beaver JW, More MI, *et al.* Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 1998, **180**: 5398–5405.
- [11] 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. 齐鲁渔业, 2004, **21** (5): 44–47.
- [12] 张春云, 王印庚, 荣小军. 养殖刺参腐皮综合征病原菌的分离与鉴定. 水产学报, 2006, **30**(1): 118–123.
- [13] 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. 水产学报, 2007, **31**(4): 504–511.
- [14] Huan Deng, Chongbo He, Zunchun Zhou, *et al.* Isolation and pathogenicity of pathogens from skin ulceration disease and viscera ejection syndrome of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Aquaculture*, 2009, **287**: 18–27.
- [15] Avendaño-Herrera R, Toranzo AE, Romalde JL, *et al.* Iron uptake mechanisms in the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(11): 6947–6953.
- [16] 郭全友, 杨宪时, 许钟, 等. 冷藏养殖大黄鱼细菌相组成和优势腐败菌鉴定. 水产学报, 2006, **30**(30): 824–830.
- [17] Becker P, Gillan D, Lanterbecq D, *et al.* The skin ulceration disease in cultivated juveniles of *Holothuria scabra* (Holothuroidea, Echinodermata). *Aquaculture*, 2004, **242**: 13–30.
- [18] 张春云, 王印庚, 荣小军. 养殖刺参腐皮综合征病原菌的分离与鉴定. 水产学报, 2006, **30**(1): 118–123.
- [19] Latifi A, Foglino M, Tanaka K, *et al.* A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR(VsmR) to expression of the stationary phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol*, 1996, **21**(6): 1137–1146.
- [20] Birgit H, Friederike F, Manuela K, *et al.* Identification of a novel virulence factor in *Burkholderia cenocepacia* H111 required for efficient slow killing of *Caenorhabditis elegans*. *Infection and Immunity*, 2004, **72**(12): 7220–7230.
- [21] Pirhonen M, Flego D, Heikinheimo R, *et al.* A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *EMBO J*, 1993, **12**: 2467–2476.

<http://journals.im.ac.cn/wwxwtbcn>