

养殖刺参溃疡病杀鲑气单胞菌的分离、致病性及胞外产物特性分析

杨嘉龙, 周丽, 邢婧, 绳秀珍, 战文斌

(中国海洋大学 教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要:从患溃疡病的养殖刺参(*Apostichopus japonicus*)病灶处分离出1株优势菌H1,以浸浴、创伤浸浴、体腔注射和体壁肌肉注射等方式进行感染实验,证实菌株H1为养殖刺参溃疡病病原菌,并证明该菌通过体表创伤侵入的方式感染刺参,以创伤浸浴和体壁肌肉注射感染的LD₅₀(半数致死量)分别为 2.26×10^7 CFU/尾和 1.80×10^7 CFU/尾。经形态学观察、生理生化特性分析和mini API系统鉴定,确定菌株H1为杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种(*Aeromonas salmonicida masoucida*)。提取菌株H1的胞外产物(ECP)进行致病性实验,结果表明ECP可导致刺参死亡,其对刺参的LD₅₀为5.24 μg 蛋白/g 体质量。H1-ECP具有酪蛋白酶、明胶蛋白酶、几丁质酶和淀粉酶活性,并具有溶血素活性;对底物偶氮酪蛋白(Azocasin)作用的酶比活力可达到674.5活力单位/mg蛋白,最适作用温度为50℃;对热不稳定,70℃作用30 min时,酪蛋白酶活性降到0;100℃作用30 min, ECP对刺参的毒性消失;ECP酶活可被10 mmol/L EDTA完全抑制,可被5 mmol/L PMSF抑制98.8%,Ca²⁺和Mg²⁺可使酶活性分别提高约9%和4%。结论认为,该病原菌通过体表创伤侵入方式感染宿主刺参,菌株H1胞外产物是其对刺参致病的因子之一。[中国水产科学,2007,14(6):981-989]

关键词:刺参;溃疡病;杀鲑气单胞菌;胞外产物;蛋白酶

中图分类号:S917

文献标识码:A

文章编号:1005-8737-(2007)06-0981-09

刺参(*Apostichopus japonicus*)隶属于棘皮动物门(Echinodermata)、海参纲(Holothuroidea)、盾手目(Aspidochirotida),自古以来便是滋补和药用佳品。随着刺参需求量的增加,20世纪90年代末在中国山东和辽宁两省掀起了刺参人工养殖的热潮,养殖面积近百万亩,年产值超过100亿元^[1],刺参已成为推动中国北方沿海养殖业发展的新兴养殖品种。

然而,随着养殖规模的不断增大,刺参病害也日益显著。自2003年起,各地的养殖刺参频发溃疡病(俗称“化皮病”),症状为厌食、体壁肌肉溃疡、肿嘴、排脏、最后溃疡处扩大,导致刺参自溶死亡。2004年春季,该病呈暴发之势,几乎波及全部刺参养殖区域^[2],严重制约了刺参养殖业的发展。海参疾病已引起养殖工作者及研究人员的关注,目前国内外已逐渐开展了相关研究。张春云等^[1]报道,2003年山东省青岛地区暴发刺参溃疡病,感染体长10~15 cm的成参,有的养殖池感染率高达80%,经人工感染确定此次溃疡病的病原菌为灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*);王印庚等^[3]报道,山东、辽宁省众多地区暴

发的育苗期刺参溃疡病可引起90%的死亡率,经感染确定其病原菌为假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas nigrifaciens*);Becker等^[4]发现糙海参(*Holothuria scabra*)幼体培育过程中暴发的流行性皮肤溃烂病,可引起幼体大面积死亡,感染率达80%,认为弧菌属(*Vibrio*)的哈维氏弧菌(*V. harveyi*)或溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)可能是引发此病的病原菌。

2005年春,山东省乳山某刺参养殖场发生刺参溃疡病,患病刺参为体长5~8 cm的成参,死亡率高达60%,本研究从患溃疡病养殖刺参病灶处分离出1株优势菌H1,经感染实验证明菌株H1为致病菌,用常规生理生化方法和mini API细菌鉴定系统对其进行鉴定,并提取病原菌胞外产物,测定其致病性和生物学特性。

1 材料与方法

1.1 材料

患病刺参取自山东乳山某刺参养殖场,肉眼观

收稿日期:2007-01-11; 修订日期:2007-04-06.

基金项目:国家高技术研究发展计划(863)(2006AA100306);国家自然科学基金(30271016);中国海洋大学资助项目(1400-813764);教育部海水养殖重点实验室开放基金(200212)。

作者简介:杨嘉龙(1982-),男,硕士研究生,主要从事水产病害与免疫学研究.E-mail: jlyang1220@gmail.com

通讯作者:周丽.Tel: 0532-82031862; E-mail: zhouli@ouc.edu.cn

察表现为厌食、体表溃疡、肿嘴、吐肠、自溶等症状,平均发病率约60%。健康刺参购自山东乳山禧丰达渔业公司,体长 (5 ± 1) cm。

营养琼脂购于北京陆桥生物公司,pH 7.2~7.4,盐度20。

1.2 病原菌的分离

无菌条件下从患病刺参体表、嘴等溃疡部位分离细菌,划线接种于营养琼脂平板上,28℃培养24 h,挑取形态一致的优势菌落进行纯化培养,直至获得纯培养菌H1,营养琼脂冻存液(含15%甘油)-80℃保存备用。

1.3 病理组织切片

切取患溃疡病刺参具有典型症状的体壁溃疡处、排出的肠及肿大的嘴等部位,同时取健康刺参的相同部位作为对照,Bouin氏固定液固定后,样品经梯度酒精脱水、石蜡包埋、切片,HE染色,在Olympus显微镜下观察拍照。

1.4 人工感染实验

健康刺参饲养于盛有20 L海水的玻璃缸中,每组10尾,实验期间连续充气,水温16℃,每天换水,不投饵。

实验菌株28℃培养24 h后,用1.5%无菌生理盐水洗脱得菌悬液,McFarland比浊法设定细菌浓度,以4种方式进行感染。

(1) 浸浴感染 水体中菌液终浓度分别为 9×10^9 CFU/mL、 9×10^8 CFU/mL、 9×10^7 CFU/mL、 9×10^6 CFU/mL、 9×10^5 CFU/mL,每天换水补充菌液以维持此浓度。

(2) 体壁创伤浸浴感染 用锋利的刀片在健康刺参体壁割1~2个深度约1 mm,创口直径3~5 mm的创伤,再浸浴感染,水体中菌液终浓度分别为 9×10^8 CFU/mL、 9×10^7 CFU/mL、 9×10^6 CFU/mL、 9×10^5 CFU/mL,每天换水补充菌液。对照组创伤后不加菌液。

(3) 体腔注射 菌液浓度分别为 9×10^8 CFU/mL、 9×10^7 CFU/mL、 9×10^6 CFU/mL、 9×10^5 CFU/mL,每尾健康刺参注射0.1 mL,对照组注射0.1 mL 1.5%生理盐水。

(4) 体壁肌肉注射 菌液浓度分别为 9×10^8 CFU/mL、 9×10^7 CFU/mL、 9×10^6 CFU/mL、 9×10^5 CFU/mL,采用多点注射方式,每尾刺参注射0.1 mL,对照组注射等量1.5%生理盐水。

定时观察记录,取濒死刺参,于病灶处进行细菌

再分离,所分离菌株(编号为H1-1)再次感染健康刺参,观察结果。

1.5 细菌形态观察

将纯化的细菌划线接种于营养琼脂平板,28℃培养24 h后,观察菌落特征。取营养琼脂平板18 h培养物,革兰氏染色,光学显微镜观察细菌形态。同时用无菌水洗下少量菌落,负染,透射电镜观察;制作扫描电镜标本,扫描电镜观察。

1.6 病原菌鉴定

菌株H1、H1-1的生理生化特征试验参照《常见细菌系统鉴定手册》^[5]和伯杰氏手册第9版^[6]进行,快速鉴定采用法国生物梅里埃公司mini API鉴定系统20NE鉴定条。

1.7 病原菌胞外产物(ECP)的制备

用平板玻璃纸法^[7]制备ECP。将菌株H1接种于营养琼脂液体培养基,28℃摇床培养24 h,取0.2 mL液体培养物涂布于预先放置一层玻璃纸的营养琼脂平板上,28℃培养24 h。每平板用3 mL磷酸盐缓冲液(PBS,0.01 mol/L,pH 7.4)洗下菌体,收集菌悬液于4℃ 5 000 g离心20 min,上清经0.22 μm微孔滤膜过滤除菌后,加入硫酸铵盐析,使硫酸铵终浓度为2.0 mol/L,室温搅拌1 h,4℃沉降过夜,4℃、2 000 g离心1 h取沉淀,适量PBS(0.01 mol/L,pH 7.4)重悬沉淀并以PBS在4℃透析24 h,每6 h更换1次PBS,透析袋内即为ECP提取物。

1.8 ECP的致病性实验

以牛血清白蛋白(BSA)为标准,采用考马斯亮蓝染色法^[8]测定ECP提取物中蛋白含量。以PBS对ECP进行系列稀释。

取0.02 mL ECP系列稀释液以体壁肌肉注射的方式注射健康刺参,其体长为 (1.5 ± 0.2) cm,平均体质量5 g。设3个ECP浓度组和1个对照组,同时以100℃处理30 min后的ECP注射健康刺参,每组10尾刺参,记录刺参症状和存活情况,用改进的寇氏法^[9]计算半数致死剂量。

1.9 ECP的特性分析

1.9.1 ECP中酶的测定 分别配制淀粉、酪蛋白、明胶、几丁质、脂肪(吐温-80)、卵磷脂平板和脱纤维含量均为1%的兔血琼脂平板,用杯碟法在上述平板上各加入100 μL ECP,28℃孵育24 h后判断酶产生情况。几丁质酶和酪蛋白酶的产生以牛津杯周围出现透明圈为阳性;脂酶和卵磷脂酶的产生以

牛津杯周围出现不透明晕圈为阳性;观察明胶酶的产生时,滴加酸性氯化汞,以牛津杯周围出现透明圈者为阳性;观察淀粉酶的产生时,滴加新配制的 Lugol 氏碘液,牛津杯周围有无色透明圈出现者为阳性。

1.9.2 ECP 中蛋白酶活力测定 以偶氮酪蛋白(Azocasein)作为底物检测蛋白酶活力。0.5 mL ECP 液与等体积的 Azocasein 溶液(5 mg/mL,用 0.2 mol/L pH8.0 的 Tris-HCl 配制)混匀(对照组只加 ECP),25 ℃ 保温 20 min 后,加入 3.5 mL 10% 的三氯乙酸 0.5 mL 终止反应(对照组加入三氯乙酸终止酶活后)再加入 0.5 mL Azocasein),4 ℃、2 000 g 离心 10 min,取上清加入等体积的 0.5 mol/L NaOH 中和,于 440 nm 下测定光密度值。在反应条件下光吸收值每增加 0.01 所需的酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。

1.9.3 酶与底物作用的最适温度和酶的热稳定性 检测酶与底物作用的最适温度时,将 ECP 与底物混合后,将孵育温度分别设为 4 ℃、10 ℃、20 ℃、30 ℃、40 ℃、50 ℃、60 ℃、70 ℃ 及 80 ℃,孵育

20 min,再同上述方法进行检测。

检测酶的热稳定性时,先将 ECP 置于 4 ℃、10 ℃、20 ℃、30 ℃、40 ℃、50 ℃、60 ℃、70 ℃ 及 80 ℃ 作用后,再加反应底物进行酶活力检测。

1.9.4 酶抑制剂试验 ECP 与一些化学试剂在 37 ℃ 保温 1 h 后,检测酶活的变化。各种试剂所用浓度见表 5。配制时 PMSF 用丙酮溶解,其他试剂用蒸馏水溶解。

2 结果与分析

2.1 组织病理切片

患溃疡病刺参主要病变部位的组织病理切片如图 1 所示,从图 1 中看出患病刺参体壁肌肉黏膜层变薄,上皮与细胞间界线模糊,细胞排列紊乱,多数细胞坏死(图 1-a);患病刺参的肠道细胞大部分坏死、崩解并脱落(图 1-c);患病刺参肿嘴处组织内细胞肿胀、排列紊乱,并发生变性,纤维断裂消失(图 1-e)。正常刺参的相应部位如图 1-b、1-d 和 1-f 所示。

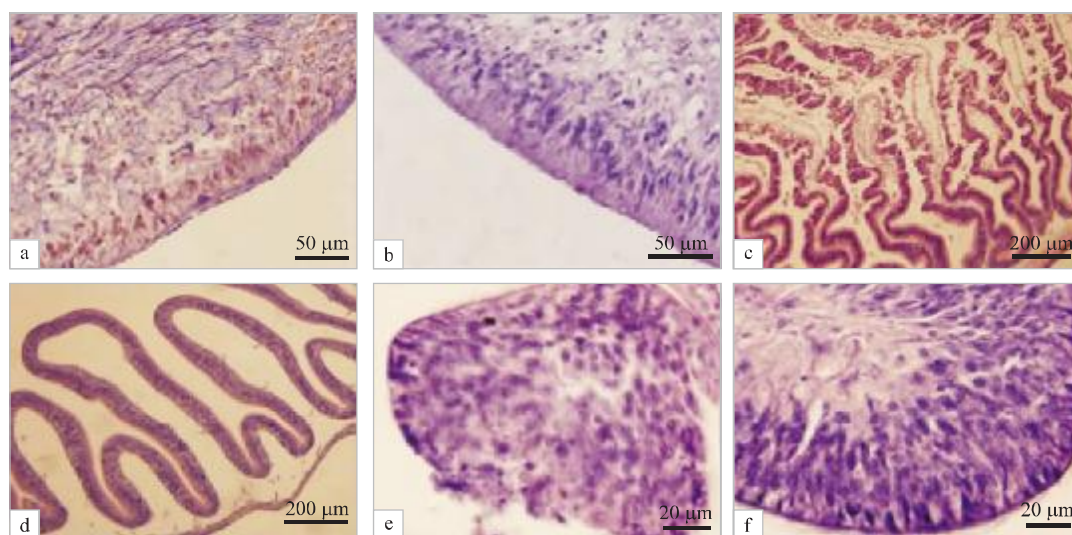


图 1 刺参病理组织切片观察

a-患病刺参溃疡处体壁;b-健康刺参溃疡处体壁;c-患病刺参肠道;d-健康刺参肠道;e-患病刺参肿嘴处组织;f-健康刺参嘴处组织。

Fig.1 Histopathology of the sea cucumber

a-body wall of diseased *A. japonicus*; b-body wall of healthy *A. japonicus*; c-intestines tissue of diseased *A. japonicus*; d-intestines tissue of healthy *A. japonicus*; e-mouth tissue of diseased *A. japonicus*; f-mouth tissue of healthy *A. japonicus*.

2.2 人工感染实验

以浸浴和体腔注射的方式进行感染的实验组刺参在 2 周内仍然健康,没有出现死亡情况;以体壁创

伤浸浴和体壁肌肉注射方式进行感染的实验组刺参存活状况见表 1 和表 2。

以体壁创伤浸浴和体壁肌肉注射方式感染后的

刺参其体壁肌肉以创伤部位和注射点为中心,周围出现大面积溃疡,黏液增多,刺参出现排脏,最后自溶死亡。对照组未表现任何异常症状。从感染发病的刺参溃疡处分离细菌,用优势菌 H1-1 再次感染刺参,得到相同的结果。表明 H1 是刺参溃疡病的

致病菌。

按改进的寇氏法计算菌株 H1 以体壁创伤浸浴和体壁肌肉注射方式对刺参进行感染的半致死剂量 (LD_{50}) 分别为 2.26×10^7 CFU/尾和 1.80×10^7 CFU/尾。

表 1 健康刺参创伤浸浴感染实验结果

Tab.1 Results of soaking wounded of healthy *A. japonicus* with suspension of bacteria

分组 Group	菌液浓度 / (CFU·mL ⁻¹) Bacterial concentration	浸浴尾数 Soaking nos.	死亡尾数 Death nos.	死亡率 / % Mortality
1	9×10^8	10	9	90
2	9×10^7	10	7	70
3	9×10^6	10	5	50
4	9×10^5	10	0	0
对照 Control	0	10	0	0

表 2 健康刺参体壁肌肉注射感染实验结果

Tab.2 Results of muscle injection of healthy *A. japonicus* with bacteria suspension

分组 Group	菌液浓度 / (CFU·mL ⁻¹) Bacterial concentration	剂量 / mL Dose	注射尾数 Injection nos.	死亡尾数 Death nos.	死亡率 / % Mortality
1	9×10^8	0.1	10	10	100
2	9×10^7	0.1	10	7	70
3	9×10^6	0.1	10	4	40
4	9×10^5	0.1	10	1	10
对照 Control	1.5% NaCl	0.1	10	0	0

2.3 细菌形态观察

菌落光滑圆形、边缘整齐、较扁平、灰白色、直径 2 mm 左右,在血液营养琼脂上出现 β -溶血现象。革兰氏染色显示该病原菌为革兰氏阴性菌,单个或成

对排列。透射电镜显示该菌呈短杆状,无鞭毛,菌体周围生有许多细小的菌毛,如图 2 所示。扫描电镜显示该菌短杆状,无鞭毛,有的菌成对出现,如图 3 所示。

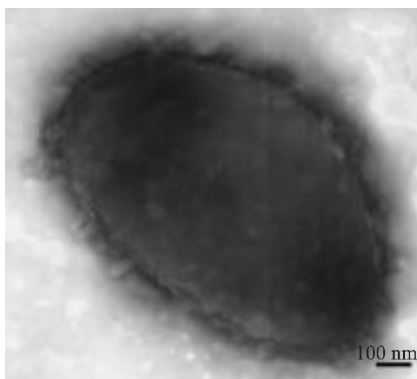


图 2 从患病刺参分离的菌株 H1 的负染电镜照片
Fig.2 Electron micrograph of strain H1 isolated from diseased *A. japonicus*



图 3 从患病刺参分离的菌株 H1 的扫描电镜照片
Fig.3 Scanning electron micrograph of strain H1 isolated from diseased *A. japonicus*

2.4 病原菌鉴定

菌株 H1 和 H1-1 均为革兰氏染色阴性,短杆状,无鞭毛,不具有运动性,4 ℃ 生长、37 ℃ 不生长,氧化酶阳性,发酵葡萄糖产酸产气,对弧菌抑制剂 O/129 (2,4-二氨基-6,7-二异丙基喋啶,150 μg) 不敏感。对菌株 H1 和 H1-1 进一步测试发现,菌株 H1 和 H1-1 的各项生理生化指标与杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种 (*Aeromonas salmonicida masoucida*) 基本吻合,仅在硫化氢产生和阿拉伯糖的利用 2 个指标

上存在差异,初步可将菌株 H1 鉴定为杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种。

利用细菌快速鉴定仪 mini API 对菌株 H1 和 H1-1 进行鉴定,采用 20NE 鉴定条,结果显示菌株 H1 和 H1-1 均为杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种,其可置信度达 95.6%。

结合常规生理生化指标测定和 mini API 的测定,可将这株刺参溃疡病的致病菌鉴定为杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种。

表 3 分离自患病刺参的菌株 H1、H1-1 和杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种生理生化特征的比较

Tab.3 Comparison of physiological and biochemical characteristics among strains H1 and H1-1 from *A. japonicus* and *Aeromonas salmonicida masoucida*

鉴定项目 Identified item	菌株 Strain H1	菌株 Strain H1-1	杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种 <i>Aeromonas salmonicida masoucida</i>
4 ℃ 生长	+	+	+
25 ℃ 生长	+	+	+
37 ℃ 生长	—	—	—
动力	—	—	—
O/129 (150 μg) 敏感	—	—	—
氧化酶反应	+	+	+
基红	+	+	+
V.P. 反应	+	+	+
葡萄糖产酸	+	+	+
葡萄糖产气	+	+	+
硝酸盐还原	+	+	+
鸟氨酸脱羧酶	—	—	—
精氨酸双水解酶	+	+	+
赖氨酸脱羧酶	+	+	d
明胶液化	+	+	+
吲哚	+	+	+
硫化氢产生	—	—	+
尿素水解	—	—	—
七叶苷水解	+	+	+
碳源利用			
肌醇	—	—	—
甘露醇	+	+	+
山梨醇	—	—	—
侧金盏花醇	—	—	—
乳糖	—	—	—
半乳糖	+	+	+
甘露糖	+	+	+
蔗糖	+	+	+
鼠李糖	—	—	—
草糖	+	+	+
木糖	—	—	—
麦芽糖	+	+	+
阿拉伯糖	—	—	+
水杨苷	—	—	d
柠檬酸盐	—	—	—
褐色水溶性色素	—	—	—

注:“+”表示阳性;“—”表示阴性;“d”表示有的阴性,有的阳性。

Note: “+” positive; “—” negative; “d” some strains are positive and some are negative.

2.5 ECP 的致病性

ECP 对刺参的致病性实验结果见表 4。当每尾刺参注射蛋白剂量达到 $52.45 \mu\text{g}$ 时, 实验刺参 12 h 即出现死亡, 24 h 死亡率达到 90%; 当蛋白剂量降到 $26.22 \mu\text{g}$ 时, 48 h 的死亡率为 50%; 当每尾刺参注射蛋白 $13.11 \mu\text{g}$ 时, 48 h 的死亡率仅为 10%; 注射等量 1.5% 生理盐水的对照组没有出现死亡。

实验过程中死亡的刺参都表现出体壁肌肉溶解, 并继而扩散出现白色溃疡症状, 而在 $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 中处理 30 min 后的 ECP 用于注射刺参, 没有引起刺参死亡, 说明 ECP 是菌株 H1 对刺参致病的因子之一。

按改进的寇氏法计算 H1-ECP 对刺参的半致死量 $\text{LD}_{50} = 5.24 \mu\text{g}$ (蛋白) / g 体质量。

表 4 H1-ECP 对刺参的毒性实验

Tab.4 Toxicity experiment of H1-ECP to *A. japonicus*

分组 Group	蛋白质量浓度 / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) Protein concentration	剂量 / mL Dose	实验数 / 尾 Test nos.	死亡数 / 尾 Death nos.	死亡率 / % Mortality
1	2.622 5	0.02	10	9	90
2	1.311 2	0.02	10	5	50
3	0.655 6	0.02	10	1	10
4	2.652 3 (100 $^{\circ}\text{C}$, 30 min)	0.02	10	0	0
对照 Control	1.5% NaCl	0.02	10	0	0

2.6 H1-ECP 的特性

对 H1-ECP 进行酶活性检测, 结果表明 ECP 具有酪蛋白酶、明胶蛋白酶、几丁质酶和淀粉酶活性

(图 4); 无卵磷脂酶和脂肪酶活性; 并具有溶血性, 在脱纤维兔血琼脂平板上出现 β -溶血现象 (图 5)。

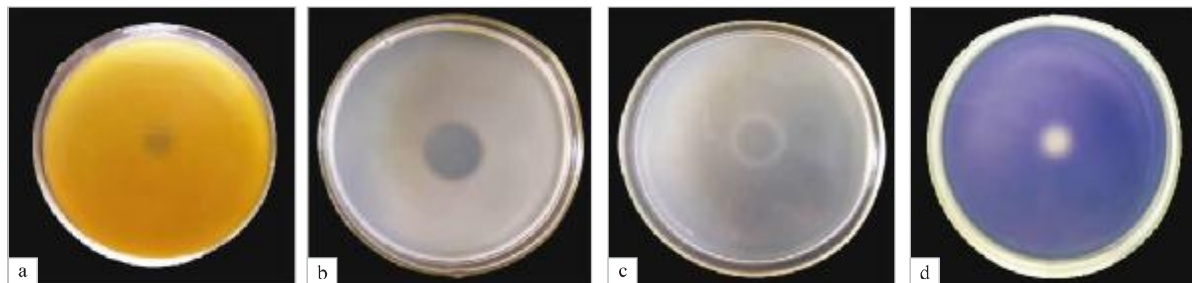


图 4 H1-ECP 酶活性检测结果

a—酪蛋白酶阳性; b—明胶蛋白酶阳性; c—几丁质酶阳性; d—淀粉酶阳性。

Fig.4 Detection results of enzyme activity of H1-ECP

a—caseinase; b—gelatinase; c—chitinase; d—amylase.



图 5 H1-ECP 溶血性检测结果

Fig.5 Detection result of haemolytic activity of H1-ECP

通过对底物偶氮酪蛋白作用的情况来检测 H1-ECP 的蛋白酶活性, 作用温度为 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 时其酶比活力为 470.6 活力单位 / mg 蛋白。当改变作用温度时, 可观察到随着温度的上升, 酶活逐渐增加, $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 时达到最高值, 其酶比活力为 674.5 活力单位 / mg 蛋白, 超过此温度时, 酶活又逐渐下降, 如图 6 所示。

H1-ECP 的热稳定性实验结果如图 7 所示, 可见 ECP 在 $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下温度处理 30 min 后, 其酶比活力保持在一个比较稳定的水平, 当温度超过 $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, 酶比活力呈下降趋势, 到 $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, 酶比活力下降到 0。

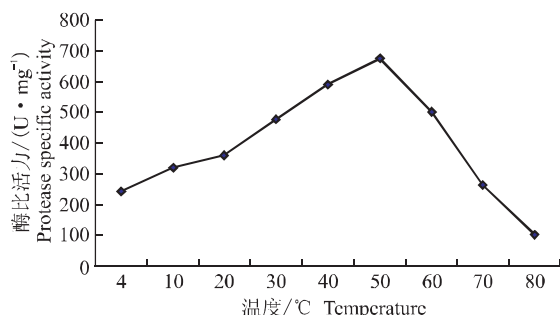


图6 ECP的最适作用温度

Fig.6 Optimum temperature of protease specific activity of ECP

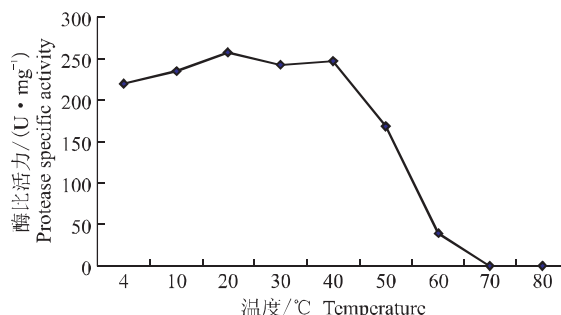


图7 ECP的热稳定性

Fig.7 Thermostability of the protease specific activity of ECP

一些金属离子和化学试剂对 H1-ECP 酶活性的影响见表 5。当 EDTA 作用浓度为 10 mmol/L 时, ECP 酶活被完全抑制; 当 PMSF 作用浓度为 5 mmol/L 时, ECP 酶活几乎完全被抑制; HgCl₂ 和 SDS 可以抑制大部分的酶活; 高碘酸和 MnCl₂ 可以抑制 50% 的酶活; Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 分别使酶活力提高了大约 9% 和 4%。

表5 金属离子和化学试剂对 H1-ECP 活力的影响

Tab.5 Effects of reagents at different concentrations on activity of H1-ECP

试剂	浓度/(mmol·L ⁻¹) Concentration	相对酶活/% Relative enzyme activity
None	0	100
HIO ₄ ·2H ₂ O	10	58.6
EDTA	10	0
PMSF	5	1.2
SDS	5	28.3
HgCl ₂	5	11.6
MnCl ₂	5	52.4
CaCl ₂	5	108.6
MgCl ₂	5	103.5

3 讨论

本研究在传统的单一感染方式的基础上采用浸浴、创伤浸浴、体腔注射和体壁肌肉注射 4 种方式对刺参进行感染, 旨在探明病原菌对刺参的侵染方式。实验结果表明, 浸浴感染和体腔注射感染的方式均无法使刺参致病。浸浴感染失败说明刺参在健康状态下不易发病, 这与肖培华^[10]、Becker 等^[4]的实验结果一致。笔者认为体腔注射感染失败是因为刺参

体腔中具有大量体腔细胞和多种体液免疫因子, 具有吞噬异物等防御功能, 这与张峰^[11]的观点一致; 同时刺参的体腔与外界相通, 能够将大部分注入体腔的菌液排出体外。创伤浸浴和体壁肌肉注射感染成功说明该病原菌是通过体表创伤侵入的方式感染宿主刺参的, 因此在刺参养殖的生产操作中需要特别仔细, 避免刺参体表创伤而使病原菌乘虚而入。

杀鲑气单胞菌 (*A. salmonicida*) 亦被称为灭鲑气单胞菌, 为革兰氏阴性杆菌, 通常单个、成对或成短链状出现, 本研究中透射电镜和扫描电镜观察到的菌体形态有所差异, 可能是由于所取的细菌处于不同的生长时期所致。杀鲑气单胞菌能引起人类和多种动物的疾病, 在世界上分布的地区广泛, 最早是从患疥疮病的鲑科鱼类中分离出, 但近些年来发现其病原宿主范围明显在扩大, 可导致多种非鲑科鱼类和水貂、蛙类等动物发生疾病, 如 McCarthy 等^[12]报道杀鲑气单胞菌是鱼类皮肤溃疡病的主要病原, Austi 等^[13]报道杀鲑气单胞菌可感染米诺鱼 (*Gobiocypris rarus*)、金鱼 (*Carassius auratus* L.)、鲤 (*Cyprinus carpio*)、河鲈 (*Perca fluviatilis*)、狗鱼 (*Esox reicherti*)、大菱鲈 (*Scophthalmus maximus*)、鲈类等, Kitao 等^[14]报道杀鲑气单胞菌还可感染日本鳗 (*Anguilla japonica*)、砂鳗 (*Ammodytes americanus*)、鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 及平鲷 (*Rhabdosargus sarba*) 等; 张晓君^[15]报道杀鲑气单胞菌能够引起石斑 (*Kareius bicoloratus* L.) 的疾病。杀鲑气单胞菌引发刺参溃疡病在国内外尚属首次发现, 这说明杀鲑气单胞菌病原宿主具有多样性。文献 [5] 和 [6] 根据生理生化指标的差异将杀鲑气单胞菌分为无色亚种 (*A. salmonicida achromogenes*)、杀日

本鲑亚种 (*A. salmonicida masoucida*)、杀鲑亚种 (*A. salmonicida flounderacida*) 和史氏亚种 (*A. salmonicida smithia*), 张晓君等在患病石鲽上分离出 1 株与此 4 个亚种不同的杀鲑气单胞菌, 并确定为杀鲑气单胞菌的一个新亚种, 命名为杀鲽亚种 (*A. salmonicida flounderacida*)^[15]。本研究分离的菌株 H1 各项生理生化指标与杀日本鲑亚种几乎完全一致, 故确定其为杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种。

细菌 ECP 中存在多种外毒素, 如溶血素和胞外蛋白酶等。溶血素可以溶解动物血液中的红细胞, 从而对动物造成损伤, 红细胞溶解后释放的血红蛋白为细菌提供营养物质^[16]; 胞外蛋白酶可以降解宿主的组织结构蛋白, 造成广泛的组织损伤, 从而有利于细菌突破宿主的防线并在体内扩散, 并能增强逃避宿主机体内免疫机制的能力等^[17]。本研究 H1-ECP 具有多种蛋白酶活性和溶血活性, 在一定程度上增加了菌株 H1 的致病性。H1-ECP 对刺参的 LD₅₀ 为 5.24 μg (蛋白) /g 体质量, 由于本实验中 H1-ECP 为硫酸铵粗提蛋白, 未经分离纯化, 故其毒性相对于提纯的毒素蛋白为弱, H1-ECP 中毒素蛋白的分离纯化还有待于进一步的探讨研究。

酶比活力是衡量酶活力的一个重要标准, 本研究测定了 H1-ECP 中蛋白酶的酶比活力和酶与底物作用的最适温度, 探讨了 ECP 中蛋白酶的热稳定性以及一些化学试剂对蛋白酶活力的影响, 更进一步的掌握了 H1-ECP 中蛋白酶的生物学特性, 为下一步进行毒性蛋白酶的分离、纯化奠定了实验的基础。

参考文献:

- [1] 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[J]. 水产学报, 2006, 30 (1): 118-123.
- [2] 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[J]. 齐鲁渔业, 2004, 21 (5): 44-47.
- [3] 王印庚, 方波, 张春云, 等. 养殖刺参保苗期重大疾病“腐皮综合征”病原及其感染源分析[J]. 中国水产科学, 2006, 13 (4): 610-616.
- [4] Becker P, Gillan D, Lanterbecq D, et al. The skin ulceration disease in cultivated juveniles of *Holothuria scabra* [J]. Aquaculture, 2004, 242: 13-30.
- [5] 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.
- [6] Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition [M]. Maryland: Williams & Wilkins, 1994.
- [7] Inamura H, Muroga K, Nakai T. Toxicity of extracellular products of *V. anguillarum* [J]. Fish Pathol, 1984, 19 (2): 89-96.
- [8] 李建武, 蔺能庆, 余瑞元, 等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994.
- [9] 邹玉霞, 张培军, 莫照兰, 等. 大菱鲆出血症病原菌的分离和鉴定[J]. 高技术通讯, 2004, 4: 89-93.
- [10] 肖培华, 唐永新, 与乐河, 等. 刺参病害细菌感染试验[J]. 齐鲁渔业, 2005, 22 (6): 26-27.
- [11] 张峰. 棘皮动物体内防御机制的研究进展[J]. 大连水产学院学报, 2005, 20 (4): 340-344.
- [12] McCarthy D H, Rawle C T. Rapid serological diagnosis of fish furunculosis caused by smooth and rough strains of *Aeromonas salmonicida* [J]. J Gen Microbiol, 1975 (86): 185-187.
- [13] Austin B, Austin D A. Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish [M]. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1987: 262-295.
- [14] Kitao T, Yoshida T, Aoki T, et al. Atypical *Aeromonas salmonicida*, the causative agent of an ulcer disease of eel occurred in Kagoshima Prefecture [J]. Fish Pathol, 1984, 19: 113-117.
- [15] 张晓君, 房海, 陈翠珍, 等. 石鲽 (*Kareius bicoloratus* L.) 源杀鲑气单胞菌杀鲽亚种生物学性状的研究[J]. 海洋与湖沼, 2005, 36 (1): 51-60.
- [16] 雷祚荣. 细菌毒素分子生物学[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1993.
- [17] 陈师勇, 莫照兰, 张振冬. 鳃弧菌胞外产物中致病因子的分离纯化及性质研究[J]. 高技术通讯, 2002, 8: 96-100.

Identification of *Aeromonas salmonicida* associated with skin ulceration of cultured sea cucumber *Apostichopus japonicus* and characterization of the extracellular products

YANG Jia-long, ZHOU Li, XING Jing, SHENG Xiu-zhen, ZHAN Wen-bin

(The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Bacterial strain H1, which was isolated from the diseased cultured sea cucumber *Apostichopus japonicus* with skin ulceration, was proved to be a pathogen by soaking with bacteria suspension, soaking with bacteria suspension after the sea cucumbers were wounded, coelom injection and muscle injection with bacteria suspension. The LD₅₀ doses of soaking with suspension of bacteria after wound and muscle injection were 2.26×10^7 CFU /ind and 1.80×10^7 CFU /ind. By methods of morphological observation, physiological and biochemical characteristic analysis and mini API systematic identification, strain H1 was identified as *Aeromonas salmonicida masoucida*. The lethality of the extracellular products (ECP) of strain H1 was detected by injecting ECP to *A. japonicus*, the LD₅₀ dose was $5.24 \mu\text{g}$ (protein) /g body weight. The ECP exhibited caseinase, gelatinase, chitinase, amylase and haemolytic activities. The protease specific activity of ECP to azocasein was 674.5 U /mg protein when at the optimum temperature 50 °C. The ECP was instable to heat and was inactivated at 70 °C and the toxicity to the sea cucumber disappeared after incubation at 100 °C for 30 min. The enzymatic activity could be inhibited by 10 mmol /L EDTA and 5 mmol /L PMSF, and Ca²⁺ and Mg²⁺ could increase enzymatic activity by 9% and 4%, respectively. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (6): 981 – 989]

Key words: *Apostichopus japonicus*; skin ulceration; *Aeromonas salmonicida masoucida*; extracellular products (ECP); protease

Corresponding author: ZHOU Li. E-mail: zhouli@ouc.edu.cn

《生命科学研究》2008 年征稿征订启事

《生命科学研究》是由中华人民共和国新闻出版署、科技部批准创办的有关生命科学的综合性学术期刊,是在中国以此命名的唯一的全国性期刊,创办于 1997 年 12 月。国内标准刊号为:CN43-1266/Q, 国际标准刊号为 ISSN1007-7847, CODEN:SKYAFI。季刊,逢季末月 30 日出版,国内外公开发行。邮发代号:42-172, 国内定价:12 元,大 16 开,6 印张。

《生命科学研究》主要反映世界各国生命科学领域中的最新研究成果,所刊登的论文 90% 来源于中国国家自然科学基金、国家科技部重大项目基金以及省级科学基金。经过专家评审,论文达到国家先进水平及国内外先进水平的共占 85% 以上。

本刊通讯地址:

长沙市湖南师范大学《生命科学研究》编辑部,邮编:410081。

投稿 E-mail: life@hunnu.edu.cn; smky6688@yahoo.com.cn; 咨询 E-mail: sky@hunnu.edu.cn; 咨询电话:0731-8872616; 传真:0731-8872616。

网址: <http://smky.chinajournal.net.cn>

本刊承诺“特快通道”修回稿件 3 个月内出版,一般稿件修回后 6 个月内出版。

热诚欢迎国内外各大专院校、科研院所生命科学相关领域的研究人员投稿!

欢迎订阅 2008 年《生命科学研究》杂志! 错过订期者也可通过邮局向本刊编辑部订阅(免收邮费)。