

文章编号: 1005-8737(2000)02-0093-03

·综述·

水产动物病原菌致病性胞外产物的研究进展

Research progress of extracellular products from aquacultural pathogenic bacteria

牟海津¹, 刘志鸿²

(1. 青岛海洋大学 水产学院, 山东 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

MOU Hai-jin¹, LIU Zhi-hong²

(1. Fisheries College, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Qingdao 266071, China)

关键词: 水产动物; 病原菌; 致病性; 胞外产物

Key words: aquatic animal; pathogenic bacteria; pathogenicity; extracellular products

中图分类号: S917.4

文献标识码: A

据统计, 目前已发现的水产养殖疾病不少于 5 000 种, 其中, 细菌性疾病成为水产养殖中最常见、最严重的病害之一。水产病原菌的致病机理错综复杂, 如产生胞内或胞外毒性物质、质粒介导的铁结合系统、对血清杀菌活力的抗性、与宿主组织的粘附等方面已有报道, 而人们了解最多的可能是关于病原菌致病性胞外产物的产生及其作用机理的研究。

1 病原菌的致病性胞外产物(ECP)

水产动物病原菌在生长和繁殖过程中, 细胞不断向环境中释放出代谢产物, 这些代谢产物对于细胞吸收营养物质、吸附和入侵宿主体、在宿主体内扩散、繁殖以及抵抗宿主免疫因子的免疫作用等具有极为重要的作用。而有些胞外产物可以直接破坏宿主机体的体质, 引起宿主的发病甚至死亡, 如胞外蛋白酶、溶血素、细胞毒素等, 胞外产物成为决定病原菌毒力的重要因素之一。

1.1 胞外蛋白酶

实验证明, 水产动物病原菌的胞外产物中具有多种酶活性, 其中蛋白酶(明胶酶或酯蛋白酶等)的活性对病原菌的致病性具有重要作用。目前已经发现, 杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)^[1,2]、嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)^[3]、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)、鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)^[4]、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)^[5]、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)^[5]、创伤弧菌(*V. vulnificus*)^[6]、黄杆菌

(*Flavobacterium* sp.)^[7]等多种鱼、虾类病原菌均可产生具有强烈致病作用的胞外蛋白酶。在多数病原菌的胞外产物中发现的蛋白酶都具有热不稳定性, 但 Thune 等^[3]发现嗜水气单胞菌可以产生 2 种胞外蛋白酶, 1 种为热稳定性蛋白酶, 对鳗鱼具有较强的致病力; 另 1 种为热不稳定性蛋白酶, 其致病力较弱。Tanaka 等^[8]认为, 副溶血弧菌产生的胞外蛋白酶是一种诱导酶, 在有明胶或其水解产物存在的条件下, 蛋白酶的产量为非诱导条件下的 40 倍左右。在细菌的生长早期, 蛋白酶的分泌几乎完全缺乏, 到了生长后期便开始迅速增加。

Ototake 和 Wakabayashi^[7]从黄杆菌的胞外产物中除了发现明胶蛋白酶和酯蛋白酶活性外, 还检测到强烈的磷酸酶和磷酸酯酶活性, 但作者对这些酶类的致病作用未加以验证和讨论。有人发现铜绿假单胞菌产生的胞外卵磷脂酶同致病性之间有密切关系。许兵等^[5]从中国对虾病原菌副溶血弧菌和溶藻弧菌的胞外产物中发现了淀粉酶、脂肪酶、卵磷脂酶、几丁质酶等多种酶活性, 并认为这些酶类与病原菌的致病性有关。

1.2 溶血素

溶血素是多数病原菌的重要致病因子之一, 目前已在杀鲑气单胞菌^[1]、嗜水气单胞菌、鳗弧菌^[9-11]、副溶血弧菌^[12,13]以及铜绿假单胞菌等病原菌的胞外产物中检测到。

Yanagase 等^[14]认为, 副溶血弧菌产生的多种酶类均可引起溶血作用, 包括磷脂酶 A、溶血磷脂酶及其它 2 种直接溶血因子, 一种为热稳定性因子, 另一种为热不稳定性因子。根据 Nomura 和 Saito^[15]的结论, 溶血素最初可能是以一种没有溶血活性的前体形式存在, 至细菌生长的对数后期, 在

收稿日期: 1998-11-01

作者简介: 牟海津(1973-), 男, 山东烟台人, 青岛海洋大学讲师, 从事海洋微生物方面研究。

细胞内形成并结合在细胞内膜上;至细菌生长稳定期,随着细胞的自溶裂解而释放到培养基中。

很多观点认为,细菌在生长过程中,所分泌的胞外蛋白酶很可能会抑制或破坏其它因子的活性,如细胞溶素、溶血素等,而这些因子在侵染宿主的过程中发挥了较为重要的作用。因此,在细菌的侵染过程中,蛋白酶仅作为一种提高侵袭力的毒性酶发挥作用,而不是根本性的致病因子。有人认为,胞外蛋白酶以及溶血素等蛋白性毒素在各种细菌的致病中发挥着不同的作用,当蛋白酶产生的效价较高时,细菌以蛋白酶作为主要的致病因子;当蛋白酶缺乏时,其它的蛋白性致病因子则起主导作用,此时细菌的致病性要更强一些。

1.3 其它胞外致病因子

Kodama等^[16]认为,鳃弧菌产生的对虹鳟具有致死作用的胞外产物与溶血素和蛋白酶无关,该物质由蛋白质和碳水化合物组成,具有较强的热稳定性,对胰蛋白酶和丙酮的作用不敏感,因此,其致病性可能是由碳水化合物部分所决定的。Inamura等^[9]认为鳃弧菌的主要致病因子为胞外产物中的蛋白酶和外毒素。Fuller等从杀鲑气单胞菌的培养液中提取到一种糖蛋白,可以作为白细胞溶解性因子在对虹鳟等动物的侵染过程中发挥作用。Toranzo等^[11]发现,鱼类致病性和非致病性鳃弧菌均能产生胞外溶血素,因此,溶血素不是鳃弧菌的主要致病因子,而胞外产物中的细胞毒素和血细胞凝集素在侵染宿主的过程中可能具有重要的作用。Orotake Wakabayashi^[7]也认为,黄杆菌胞外产物中的血细胞凝集素、细菌凝集素和蛋白酶是引起鱼类鳃部丝状细菌病的主要成分。Sakai^[17]认为,杀鲑气单胞菌的致病性是由它的自体凝集素、血细胞凝集素、对血清杀菌活性的抵抗力以及对宿主组织的粘附力所决定的,另外菌体产生的胞外蛋白酶、溶血素和白细胞溶解性因子也参与了致病作用。

2 胞外产物的致病性研究

众多研究证明,胞外产物是水产动物病原菌侵染机体的主要成分之一,其作用表现在:破坏宿主的体质,分解破坏其组织成分,以有利于其它病原的进一步侵染;破坏机体血淋巴中凝血系统的酶活性;破坏血细胞,影响其功能发挥,并导致溶血现象的发生;破坏血清的免疫功能等等。利用胞外产物单独感染宿主,有可能引起机体的严重发病并死亡。而病原菌的细胞经生理盐水反复洗涤除去胞外产物后,对宿主的侵袭力和致病性便会大大降低甚至完全丧失^[7],很容易被宿主吞噬消灭掉,血清中的病原菌数量也大大减少。

Larnas等^[18]利用鳃弧菌及其胞外产物对虹鳟进行腹腔注射感染后,检测了部分血液参数及肝脏、脾、肾、鳃、肠道、皮肤、肌肉、心脏等部位的组织病理变化。结果发现,虹鳟经鳃弧菌及其胞外产物注射后,表现出极为相似的症状,即:血液中的血细胞数量、比容及血红蛋白含量降低,肝组织细胞坏死,肾毛细血管舒张,鳃丝水肿,肠粘膜脱皮以及注射部位肌肉坏死等等。唯一的区别是,注射鳃弧菌后,肾、脾等处的

细菌数量要远高于注射ECP的情况。De la Cruz等^[19]用鳃弧菌胞外产物感染日本鳊鱼后,也观察到类似的情况,肌肉组织受到严重损伤,普遍出现液化、出血现象,脾脏部位血铁黄蛋白发生沉积等。许兵等^[5]用副溶血弧菌和溶藻胶弧菌的胞外产物肌肉注射感染中国对虾后,发现死亡对虾的症状同自然发病虾基本一致:附肢及尾扇变红,头胸甲鳃甲部微黄,血细胞数量明显减少,血淋巴不凝固,但不混浊,而且镜检观察没有发现细菌。Kanai和Wakabayashi等^[20]从鳃病菌——嗜水气单胞菌的胞外产物中提取并纯化到蛋白酶,用豚鼠进行感染实验发现,注射后15 min内,开始出现皮内出血反应,24 h后,出血部位开始坏死。

Ellis等^[21]认为,杀鲑气单胞菌感染虹鳟后引起的病理学变化主要是由细菌胞外产物中的毒素或其它侵染因子引起,如蛋白酶对胶原蛋白的水解及杀白细胞素对吞噬细胞的破坏作用等,另外,ECP还可作用于嗜酸性粒细胞,使其脱颗粒并伴随有组胺的释放。Munn^[10]用鳃弧菌产生的胞外溶血素对鳊鱼进行注射感染,临死前鱼体表现出痉挛收缩等症状,而后迅速死亡,并伴随有肌肉的软垂。根据这些症状可以看出,该毒素可能具有较强的神经毒性。Moustafa等人^[22]发现鳃弧菌的胞外产物能够对虹鳟和小鼠表现出肠毒素毒性,导致动物肠道普遍发生出血性炎症反应,推测认为,该毒素主要作用于动物的血管系统,使其通透性增加。

病原菌在侵染宿主时,首先要通过菌毛对宿主的组织进行吸附。而在Orotake和Wakabayashi^[7]的研究中,一种可溶性蛋白质——凝集素被认为是黄杆菌等致病菌吸附鳃组织细胞的重要成分,细菌利用胞外产物中的凝集素吸附到鱼鳃丝表面后分泌出大量的刺激性物质,引起鳃丝肿胀,鳃瓣融合;另外,这些细菌还可产生胞外细菌凝集素,它有利于水体中的病原菌在鱼鳃表面形成细菌区系。

胞外蛋白酶则可以破坏机体的免疫系统,促进病原菌在宿主组织中的繁殖,蛋白酶甚至可以直接作用于宿主组织,使其发生溶解和坏死。Kanemori等^[23]采用亚致死剂量的蛋白酶对日本鳊鱼进行肌肉注射后,再用鳃弧菌悬液进行感染,发现鳊鱼经蛋白酶刺激后,机体的免疫能力大大降低,很小剂量的病原菌即可引起机体的严重发病并死亡。鳊鱼血清具有很强的体外杀菌活性,能够有效地抑制和杀死侵入机体内的细菌,然而血清经10 $\mu\text{g/ml}$ 的蛋白酶处理2 h后,杀菌活性几乎完全丧失。另有人发现,杀鲑气单胞菌的胞外蛋白酶可以破坏虹鳟鱼血清的溶血活性。另外,鱼类的皮肤粘膜在免疫防御中也起到了重要的屏障作用,其表面含有一种类似于溶菌酶的物质,能够溶解溶壁微球菌,鱼体经蛋白酶浸浴后对鳃弧菌等病原菌的抵抗力大大降低,因此,蛋白酶的致病作用可能与鱼体外部防御系统的破坏有密切关系^[23]。Sakai^[17]则认为,杀鲑气单胞菌在生长时分泌的胞外蛋白酶的作用可能是用来分解消化宿主组织中的蛋白质以获得菌体可利用性氨基酸的。

许兵等^[5]认为,病原菌在侵染宿主时,可以通过自身分

泌的几丁质酶破坏虾体外壳,而后病原菌在虾体内大量繁殖并伴随血淋巴运动到全身各器官,细菌产生的胞外蛋白酶能够破坏对虾血淋巴中凝血系统的酶活性,导致血淋巴长时间不凝固,ECP 中的蛋白酶、卵磷脂酶及脂肪酶等联合作用,又破坏了血细胞的细胞膜,致使血细胞发生溶解,最终对虾因严重缺氧而窒息死亡。因此,病原菌侵入对虾循环系统所分泌的胞外产物是中国对虾患红腿病死亡的主要原因。

3 讨论

总之,不同种类的病原菌在不同环境条件及生长阶段,能够产生不同种类的胞外产物,这些胞外产物在水产动物病原菌感染宿主的过程中发挥了极为重要的作用。国外自 70 年代开始对水产动物病原菌的致病机理特别是胞外产物的致病性进行了广泛的研究,从多种病原菌的胞外产物中提取并纯化到溶血素、蛋白酶、血细胞凝集素等致病性物质,并对这些物质的理化性质和致病作用进行了分析,把水产动物疾病的控制深入到分子细胞学、遗传学和免疫学领域。而国内在这方面的研究甚少,无法从本质上对病原菌及其致病性进行系统的认识,在水产养殖病害的防治工作上存在很大的盲目性,使我国的水产疾病控制技术长期处于操作简单、效果低微的局面。因此,进一步加深对水产动物病原菌胞外产物的理化性质、致病机理及产生机制等方面的研究,对于寻找切实有效的疾病防治措施,提高养殖品种的抗病力,振兴水产养殖业具有深远的意义。

参考文献:

- [1] Cipriano R C, Griffin G R, Lidgerding B C. *Aeromonas salmonicida*: Relationship between extracellular growth products and isolate virulence[J]. Can J Fish Aquat Sci Vol, 1981, 38: 1 322 - 1 326.
- [2] Shieh H S. Lethal toxicity of *Aeromonas salmonicida* protease to Atlantic salmon[J]. Microbios Lett, 1982, 20: 137 - 139.
- [3] Thune R L, Graham T E, Riddle L M, et al. Extracellular proteases from *Aeromonas hydrophila*: Partial purification and effects on age - 0 channel catfish[J]. Transactions of the American Fisheries Society, 1982, 111: 749 - 754.
- [4] Inamura H, Nakai T, Muroga K. An extracellular protease produced by *Vibrio anguillarum* [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1985, 51(12): 1 915 - 1 920.
- [5] 许 兵, 纪伟尚, 徐怀想, 等. 中国对虾病原菌及其致病机理的研究[J]. 海洋学报, 1993, 15(1): 98 - 106.
- [6] Kreger A, Lockwood D. Detection of extracellular toxin(s) produced by *Vibrio vulnificus* [J]. Infection and Immunity, 1981, 33 (2): 583 - 590.
- [7] Ototake M, Wakabayashi H. Characteristics of extracellular products of *Foxobacterium* sp., a pathogen of bacterial gill disease [J]. Fish Pathology, 1985, 20(2/3): 167 - 171.
- [8] Tanaka S, Iuchi S. Induction and repression of an extracellular proteinase in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Biken Journal, 1971, 14(2): 81 - 96.
- [9] Inamura H, Muroga K, Nakai T. Toxicity of extracellular products of *Vibrio anguillarum* [J]. Fish Pathology, 1984, 19(2): 89 - 96.
- [10] Munn C B. Production and properties of a haemolytic toxin by *Vibrio anguillarum* [A]. W Ahne, Ed. Fish Diseases, 3rd COPRAQ - Session [M]. Springer - Verlag Berlin, 1980. 252.
- [11] Toranzo A E, Barja J L, Colwell R R, et al. Haemagglutinating, haemolytic and cytotoxic activities of *Vibrio anguillarum* and related vibrios isolated from triped bass on the Atlantic Coast [J]. FEMS Microbiology Letters, 1983, 18: 257 - 262.
- [12] Bradshaw J G, Shah D B, Wehby A J, et al. Thermal inactivation of the Kanagawa hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* in buffer and shrimp [J]. Journal of Food Science, 1984, 49: 184 - 187.
- [13] Cherwonogrodzky J W, Clark A G. The purification of the Kanagawa haemolysin from *Vibrio parahaemolyticus* [J]. FEMS Microbiology Letters, 1982, 15: 175 - 179.
- [14] Yanagase Y, Inoue K, Ozaki M, et al. Hemolysins and related enzymes of *Vibrio parahaemolyticus* I. Identification and partial purification of enzymes [J]. Biken Journal, 1970, 13: 77 - 92.
- [15] Nomura S, Saito H. Production of the extracellular hemolytic toxin by an isolated strain of *Aeromonas salmonicida* [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1982, 48(11): 1 589 - 1 597.
- [16] Kodama H, Moustafa M, Mikami T, et al. Characterization of extracellular substance of *Vibrio anguillarum* toxic for rainbow trout and mice [J]. Microbiol Immunol, 1985, 29 (10): 909 - 920.
- [17] Sakai D K. Significance of extracellular protease for growth of a heterotrophic bacterium, *Aeromonas salmonicida* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1985, 50(4): 1 031 - 1 037.
- [18] Lamas J, Santos Y, Bruno D, et al. A comparison of pathological changes caused by *Vibrio anguillarum* and its extracellular products in rainbow trout [J]. Fish Pathology, 1994, 29(2): 79 - 89.
- [19] De la Cruz M C, Muroga K. The effects of *Vibrio anguillarum* extracellular products of Japanese eels [J]. Aquaculture, 1989, 80: 201 - 210.
- [20] Kanai K, Wakabayashi H. Purification and some properties of protease from *Aeromonas hydrophila* [J]. Bull Japan Soc of Sci Fish, 1984, 50(8): 1 367 - 1 374.
- [21] Ellis A E, Hastings T S, Munro A L S. The role of *Aeromonas salmonicida* extracellular products in the pathology of furunculosis [J]. Journal of Fish Diseases, 1981, 4: 41 - 51.
- [22] Moustafa M, Kodama H, Mikami T, et al. Toxic substance in culture filtrate of *Vibrio* sp. strain N7802, a poor producer of hemolysin and protease [J]. Fish Pathol, 1985, 20(2/3): 181 - 186.
- [23] Kanemori Y, Nakai T, Muroga K. The role of extracellular protease produced by *Vibrio anguillarum* [J]. Fish Pathol, 1987, 22 (3): 153 - 158.