

文章编号:1000-1735(1999)03-0231-05

皱纹盘鲍脓疱病菌—河流弧菌Ⅰ胞外产物的研究

李太武¹, 苏秀榕¹, 丁明进²

(1. 辽宁师范大学 海洋生物工程研究所, 辽宁 大连 116029; 2. 大连水产养殖公司, 辽宁 大连 116023)

摘 要:利用杯碟法研究了河流弧菌Ⅰ的胞外产物。结果表明,河流弧菌Ⅰ含有淀粉酶、明胶酶、脂肪酶、酪蛋白酶、溶血因子,不含卵磷脂酶、凝酶。由于淀粉酶有分解糖原的作用;明胶酶、酪蛋白酶分解胶原等蛋白成分;脂肪酶分解了脂类;溶血因子使鲍的血细胞溶解,在病灶中,核仁消失,双层核膜破裂,核质外泄。病灶内的核糖体减少或消失,线粒体异形,嵴减少或甚至消失使其呈双层膜的空泡状结构,肌糖原消失,内质网变成大小不一的圆形空泡。在晚期的病灶内,肌纤维、结缔组织细胞几乎已完全溶解,只有许多血淋巴细胞存在。除少量细胞结构完整外,大部分血淋巴细胞的质膜破裂,胞质内充满圆形液泡,大部分胞质变性后破碎消失,核质均质化,呈无结构状态,核仁消失,核内具有数个高电子密度的结晶状颗粒。最终病灶内所有结构完全溶解消失。

关键词:皱纹盘鲍;河流弧菌Ⅰ;胞外产物

中图分类号:Q954.432 **文献标识码:**B

皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)自陆地养殖成功以来,给国民经济带来了新的增长点,为国家、集体和个人创造了巨大的经济效益。然而由于人工养殖改变了它的生存环境条件,特别是由于人工繁殖幼苗加快了退化速度及食性的巨大变化,对鲍的自身免疫有很大的影响。又由于海水污染的不断加剧,它们感染疾病的机会就比较多,脓疱病就是其中一种危害较严重的疾病。病鲍在其腹足上可见一至多个微微隆起的白色脓疱,在解剖镜下观察可见疱上具一至数个孔,用力挤压疱可从中流出许多白色脓汁,并留下大小不等的深度在2~8 mm以上的孔,有的鲍足上可发现数个脓疱,给这种病起名为脓疱病。从病鲍足部患处分离得到细菌纯种,经人工感染得到与自然感染病鲍相同的症状,并从人工感染病鲍的足部患处分离到同一种细菌,对该病原菌的细胞形态,生理生化等多种特征分析研究,可确定该菌为河流弧菌Ⅰ(*Vibrio fluvialis*-Ⅰ)^[1]。为了研究该菌的致病机理,本文采用杯碟法分析了该菌的胞外产物。

1 材料与方 法

1.1 材料

实验所用河流弧菌Ⅰ是本课题组1994年从大连水产养殖公司、太平洋海珍品有限公司、

收稿日期:1998-04-12; 修订日期:1998-10-08

基金项目:农业部重点资助项目(95-A-96-04-02);大连市科委资助的攻关计划([1995]39)

作者简介:李太武(1955-),男,吉林扶余人,辽宁师范大学教授,博士。

大连金州新港养殖公司等3个不同养殖地区的患脓疱病的病鲍足内分离的病原菌,经回复感染实验和中科院微生物研究所细菌分类室鉴定;化学试剂均购于大连化学试剂商店,并为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 胞外产物的制备 挑取单菌落接于斜面(蛋白胨1%,牛肉膏0.3%,海水和1.4%琼脂)培养24 h,用磷酸盐缓冲液(PBS) pH7.0洗下,取菌悬液涂于同样的平板培养基上,25℃培养24 h,每皿中加入PBS 5 mL将菌洗于无菌三角瓶中,磁力搅拌器搅拌30 min,4℃12 000 rpm离心20 min除去菌体,上清液经孔径0.45 μm的纤维素膜过滤,滤液置4℃冰箱保存备用。

1.2.2 细菌胞外产物活性分析 采用杯碟法,分别用蒸馏水配制无菌的含明胶(0.4%)、酪蛋白(0.4%)、淀粉(0.2%)、吐温80(1.0%)、蛋黄(2.5%)、尿素(2.0%)及酚红指示剂、脱纤维兔血等的琼脂平板^[2],pH7.5,平板置于37℃温箱过夜去除培养基表面的水分。将胞外产物液体加入平板上放置的无菌不锈钢小杯中,35℃保温2 d,取出不锈钢小杯,向明胶平板中加入酸性氯化汞溶液;向酪蛋白平板中加入10%三氯乙酸溶液;向淀粉平板中加入卢哥氏碘液。观察平板,以出现透明圈(明胶、酪蛋白、淀粉平板)或不透明圈(蛋黄、吐温80平板)或变成红色(尿素平板)为阳性;血平板测其溶血活性^[3]。

1.2.3 胞外产物对温度敏感实验 将河流弧菌Ⅰ胞外产物分别保存于35℃、50℃、55℃30 min,同样测其活性。

2 结果

2.1 以杯碟法测定河流弧菌Ⅰ胞外产物的酶活性表明,该菌具有淀粉酶、明胶蛋白酶、脂肪酶等多种酶活性,但不具有脲酶、卵磷脂酶(见附表)。相同体积的胞外产物提取液中淀粉酶、明胶酶活性较高;脂肪酶、酪蛋白酶活性较低;该菌株对兔红细胞具有一定的溶解能力(见图版)。

附表 河流弧菌Ⅰ胞外产物的酶活性

胞外产物	淀粉酶	明胶酶	脂肪酶	酪蛋白酶	溶血	脲酶	卵磷脂酶
活性	+++	++	+	+	+	-	-

+:有酶活性; -:无酶活性

2.2 淀粉酶和脂肪酶在55℃以下的温度中活性不变,而明胶酶和溶血因子在50℃以上活性降低(见图版)。

3 讨论

3.1 对自然产生的脓疱病鲍、注射河流弧菌Ⅰ和胞外毒素后产生的病鲍和死鲍足进行了组织学和超微结构研究。通过纵切和横切观察发现,脓疱的形状基本上为三角形,病灶是从腹足的下表面开始逐渐扩大、深入到足的内部。开始时,病灶较小,随着病程的进展,病灶逐渐扩大。组织的变化是:足的肌肉和结缔组织变性、坏死到逐渐瓦解消失。肌细胞核肿大游离在脓汁中。脓

汁中除了少量的肌细胞核、结缔组织细胞核、病原菌及许多组织细胞碎片等外(注射毒素的鲍足内无病原菌),还有血淋巴细胞。脓疱病发展到了晚期,病灶内的所有结构都溶解消失,只残留一些空腔。由于病灶内鲍足组织病变使鲍的运动、吸附、摄食能力下降或消失造成鲍的死亡。

对脓疱病病灶进行了透射电镜观察,并与健康鲍相同部位组织的超微结构进行比较。健康鲍腹足组织的超微结构观察结果显示:血淋巴细胞核结构清晰,核膜完整,核质分布正常、核仁明显,染色质呈不规则的块状散布于核中,有些贴核膜分布。胞质内具有很多游离的核糖体和一些糖原颗粒。肌纤维结构正常,肌原纤维排列规则,其间含有滑面内质网,圆形或卵圆形的线粒体和许多糖原颗粒等结构。具有少数巨型线粒体,呈长梭形,嵴非常发达。胞核杆状或卵圆形,位于细胞中央的最宽处,并与纵轴平行。核膜完整,核仁明显,核质结构正常,染色质呈块状,散布于核内,有部分紧贴核膜分布。核的周围具有许多线粒体、游离核糖体和滑面肌质网等结构。线粒体小,圆形,嵴不发达。少数的横纹肌原纤维束混在平滑肌原纤维之间,其横径大于后者,横纹明显。

在病灶中,平滑肌原纤维排列混乱疏松,并溶解,横纹肌原纤维的横纹淡化、模糊,也有溶解。早期病灶内的肌纤维核肿大,外膜外突呈泡状,部分地方破裂,核仁尚存在且明显,核质均质化。核的周围出现许多电子密度相似的圆形或椭圆形颗粒,放大后可见这些颗粒外被双层膜包裹。随着病情的加重,核仁消失,双层核膜破裂,核质外泄。病灶内的核糖体减少或消失,线粒体异形,嵴减少或甚至消失使其呈双层膜的空泡状结构,肌糖原消失,内质网变成大小不一的圆形空泡。在晚期的病灶内,肌纤维、结缔组织细胞几乎已完全溶解,只有许多血淋巴细胞存在。除少量细胞结构完整外,大部分血淋巴细胞的质膜破裂,胞质内充满圆形液泡,大部分胞质变性后破碎消失。核质均质化,呈无结构状态,核仁消失,核内具有数个高电子密度的结晶状颗粒。

在病鲍的超薄切片中观察到肌原纤维之间的糖原颗粒消失,线粒体嵴减少或消失,不能提供足够的能量,所以病鲍足的附着力(吸力)明显减弱(非病灶处的肌肉收缩力也下降)。核膜有的破裂,有的两层核膜分离形成小泡,核的通透力扩大,核质均质化。在后期的病灶内只看见河流弧菌Ⅱ和一些细胞碎片。在肌原纤维之间的病原菌破坏了周围的结构面形成一个透明的区域。如药敏实验中的抑菌环状。在病鲍的足内糖原颗粒均消失,而肌肉运动需要的能量(无氧酵解)只能动员肝糖原^[2]。

3.2 利用杯碟法研究了河流弧菌Ⅱ的胞外毒素。结果证明其胞外毒素含脂肪酶、蛋白酶、淀粉酶、明胶酶及溶血因子等成分。由于淀粉酶有分解糖原的作用;明胶酶、酪蛋白酶分解胶原等蛋白成分;脂肪酶分解了脂类;溶血因子使鲍的血细胞溶解。所以当这些酶作用于鲍的腹足,溶解了腹足的肌肉组织、结缔组织等而为该细菌提供了营养物质,随着时间的延长,细菌的增殖,胞外产物中的酶量增多,对腹足的破坏程度也不断增加^[4]。由于胞外产物中的酶溶解了鲍的组织产生了病灶,使鲍足失去运动、吸附等能力,不能摄食,而又因为启动免疫系统(产生大量的血细胞和体液免疫因子)而消耗了大量的能量,最终造成病鲍的大批死亡。在实验室内注射病原菌和胞外毒素的鲍相继死亡,症状相同。在注射病原菌的鲍足内分离出大量的河流弧菌Ⅱ,而注射胞外毒素的鲍足未分离出任何细菌。因此,证明胞外毒素是河流弧菌Ⅱ引起脓疱病并致死的主要因素。

3.3 胞外产物中的淀粉酶和脂肪酶对较高的温度有一定的耐性,在 55℃ 的高温中其活性仍不变;而酪蛋白酶、明胶酶和溶血因子对温度较敏感。

参考文献:

- [1] 李太武,张健,丁明进,等.大连沿海皱纹盘鲍脓疱病的研究(J).南海研究与开发,1997,4:21-27.
- [2] 李太武,张健,丁明进,等.皱纹盘鲍脓疱病的组织学和超微结构的研究(J).动物学报,1997,43(3):238-242.
- [3] 许兵,纪伟尚,许怀恕.中国对虾病原菌及其致病机理的研究(J).海洋学报,1993,5(1):98-106.
- [4] LI T W, DING M, XIANG J, et al. Studies on the pustule disease of abalone on the Dalian Coast(J). J Shellfish Research, 1998,17(3):707-711.

Study on Extracellular Products of *Vibrio fluvialis*- II , Pathogen of Pustule Disease of *Haliotis discus hannai*

LI Tai-wu¹, SU Xiu-rong¹, DING Ming-jin²

(1. Institute of Marine Biotechnology, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China;

2. Dalian Fisheries Company, Dalian 116023, China)

Abstract: This paper studies the extracellular products of *Vibrio fluvialis*- I, the results show that the extracellular products include amylase, gelatinase, lipase, casease, haemolysin, but don't contain lecithinase and urease. Because of tissue dissolved by these enzymes, there are many focus in the foot of abalone. The focus of the disease form from the surface of the foot and then stretches into the foot of the infected abalone. In the focus, the connective tissue and muscles are denatured, broken down, underwent necrosis and histolysis. The nucleus is floated and its membrane broken down. Nucleoplasm homogenized, nucleolus and glycogenosome disappeared, and mitochondria denatured, its cristae destroyed. In the advanced stage, there are only necrotic cells and *Vibrio fluvialis*- I left in the focus.

Key words: *Haliotis discus hannai*; *Vibrio fluvialis*- I; extracellular products

图版注释

图 1 胞外产物对脱纤维兔红细胞的溶解能力(4℃);

图 3 胞外产物的明胶酶活性(4℃);

图 5 胞外产物的脂肪酶活性(4℃);

图 7 胞外产物的淀粉酶活性(4℃);

图 2 胞外产物对脱纤维兔红细胞的溶解能力(55℃);

图 4 胞外产物的明胶酶活性(55℃);

图 6 胞外产物的脂肪酶活性(55℃);

图 8 胞外产物的淀粉酶活性(55℃).

