

鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)对青蛤(*Cyclina sinensis*)的毒性及半致死浓度研究*

葛端阳 赵 婷 潘宝平

(天津师范大学生命科学学院 天津市动植物抗性重点实验室 天津 300387)

提要 利用不同浓度的鳃弧菌对青蛤进行了急性毒性实验,观察青蛤在菌液胁迫下的存活情况,进一步统计得到鳃弧菌对青蛤的半致死浓度。结果表明,青蛤在鳃弧菌液浓度 OD_{600} 为 1.0—2.2 范围内,胁迫 96h 以内死亡率呈逐渐上升趋势,并且在 $OD_{600} = 2.2$ 时所有受试个体全部死亡。在相同的胁迫时间内,受试个体死亡率与胁迫浓度均呈正相关。经 SPSS16.0 软件分析后,最终得到鳃弧菌对青蛤的半致死浓度(LC_{50})为 $OD_{600} = 1.57$,说明鳃弧菌对青蛤有明显的毒害作用。

关键词 青蛤, 鳃弧菌, 半致死浓度

中图分类号 Q789

青蛤(*Cyclina sinensis*)是我国沿海地区重要的增殖贝类(高玮玮等, 2009)。近年来,部分沿海地区相继出现青蛤的大面积死亡事件,给国民经济造成了重大的损失。贝类大规模流行性死亡是由多方面因素造成的,病原体入侵即为重要原因之一(曹华, 2004; 梁玉波等, 2000)。弧菌病是引起多种海洋生物死亡的重要病原物类群,主要由鳃弧菌、创伤弧菌、溶藻弧菌和哈维氏弧菌等引起。鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)隶属于弧菌科(Vibrionaceae)、弧菌属(*Vibrio*),是一种常见致病微生物,其分泌的外毒素等物质可导致多种海洋生物因出现出血性败血症并伴随大面积组织损伤而死亡(戈蕾等, 2007)。国内外学者(Jayasree *et al.*, 2006; 王洪斌等, 2012)多方面研究后普遍认为鳃弧菌的致病性与其产生的毒素类物质密切相关,并且从分子生物学角度对其展开研究,为阐明其致病机理提供一定依据。相关研究表明,青蛤在低浓度鳃弧菌($OD_{600} = 0.4$)刺激后一定时间内,其体内一系列控制免疫活性物质如酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、超氧化物歧化酶、溶菌酶等免疫因子的活性及其基因会明显上调表达(宋欣等, 2010; 潘宝平等, 2010; 刘可君

等, 2011),证明鳃弧菌对青蛤有明显的危害性。另外,青蛤在一般浓度鳃弧菌胁迫下并不发生急性死亡,说明其自身免疫系统可抵抗较低浓度鳃弧菌的侵染(翟玉梅等, 1998)。近年来,随着分子生物学技术的发展,许多专家从微观领域研究鳃弧菌毒力基因和蛋白对生物个体的致病机理(陈吉祥等, 2003)。本研究从宏观角度出发,以不同浓度鳃弧菌对青蛤胁迫一定时间,观察青蛤中毒死亡情况,进一步统计出鳃弧菌导致青蛤半数个体死亡的菌液浓度(LC_{50})(Strmac *et al.*, 1999),为探索青蛤对致病弧菌(鳃弧菌)耐受性、养殖环境条件要求等提供有价值的实验数据,并且为贝类免疫病害防治提供了一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

青蛤样品于 2012 年 5 月采于天津大港滩涂,实验前将青蛤置于密度为 $1.02\text{—}1.03\text{g/m}^3$ 的人工海水中暂养 1—2 周,水温维持 $(20\pm 2)^\circ\text{C}$,以适应室内实验环境。持续曝气,每 24h 换水一次,每次换水投喂 5‰ 的小球藻。

* 天津市科委应用基础与前沿技术重点项目资助, 12JCZDJC22800 号, 09JCZDJC19300 号。葛端阳, E-mail: 008geyang@163.com

通讯作者: 潘宝平, 博士, 教授, E-mail: panbaoping@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-06-12, 收修改稿日期: 2012-08-18

鳃弧菌为本实验室冻存菌种, 实验前将其以 1:100 比例接种至 2216E 液体培养基中, 200r/min, 28℃ 培养。

1.2 实验方法

将恢复活性的鳃弧菌扩大培养至 200ml 2216E 液体培养基中, 200r/min, 28℃ 培养 12h 后, 用 0.9% 灭菌生理盐水清洗三次, 洗净残留培养基后重悬菌液, 于分光光度计中调至 OD_{600} 分别为 1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2。选取形态指标没有显著差异的成体青蛤, 每 20 只一组, 共 7 组, 将每组实验个体分别于前闭壳肌处注射不同浓度鳃弧菌菌液 50 μ l, 同时设置 0.9% 灭菌生理盐水等量注射组为对照进行实验。将各组注射后青蛤分别置于比重 1.02—1.03g/m³ 人工海水环境中, 维持水温(20 $\pm$ 2)℃, 持续曝气并停止投喂, 在 24h、48h、72h、96h 分别清理死亡个体, 记录并统计各实验组青蛤的死亡个体数(个体死亡标准以外套膜萎缩破损, 双壳持久张开, 多次刺激无闭壳反应为准)。

将所得数据输入 Excel 进行初步整理, 使用数据处理软件 SPSS16.0 对 96h 内检测的数据进一步统计后, 得到鳃弧菌对青蛤的半致死浓度。

2 结果

2.1 不同浓度鳃弧菌刺激下青蛤死亡情况

通过实验观察, 注射生理盐水的对照组实验个体均能正常生活, 无死亡个体出现。由此可证明不同实验组青蛤个体死亡均为鳃弧菌刺激所致。

将各实验组所得数据进行分析, 随鳃弧菌注射浓度从 OD_{600} 为 1.0—2.2 的逐渐升高, 各实验组受试个体死亡情况呈逐渐上升趋势; 其中 $OD_{600} = 1.0$ 时, 受试个体全部存活, 不出现死亡现象。 $OD_{600} = 1.2$ 、1.4 时, 实验组受试个体在注射后 48h 内并不出现死亡现象, 随后 48—96h 受试个体分别死亡 2 只、6 只。 $OD_{600} = 1.6$ 、1.8 时, 实验组受试个体在 24h 后开始出现死亡, 96h 内分别死亡 12 只和 16 只。 $OD_{600} = 2.0$ 、2.2 的实验组受试个体在注射后 24h 内即发生死亡, $OD_{600} = 2.0$ 组受试个体 96h 内死亡个体数为 18 只, $OD_{600} = 2.2$ 组受试个体 24h 内全部死亡。

2.2 数据分析及半致死浓度计算

将所得数据输入 Excel 2007, 初步分析(图 1), 通过观察可知在不同实验浓度下, 受试个体 96h 内总体死亡情况先是呈缓慢上升趋势, 到达一定程度后则呈现迅速上升的趋势, 此后再次趋于平缓, 并且在 $OD_{600} = 2.2$ 时达到最大值, 即全部实验个体均死亡。

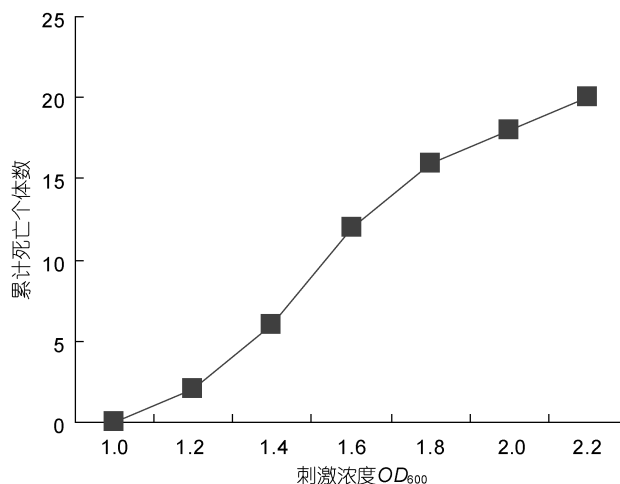


图 1 不同浓度鳃弧菌刺激后青蛤死亡情况

Fig.1 The death situation of *C. sinensis* after *V. anguillarum* infected in different concentration

依据不同浓度鳃弧菌胁迫下青蛤不同时间段死亡情况(图 2), 得到相同实验时间内不同实验组受试个体死亡数量与鳃弧菌胁迫浓度呈现正相关。低浓度实验组中死亡个体较少, 随菌液浓度升高表现出死亡个体相应升高; 而且在最高浓度实验组中青蛤死亡率在实验开始的短时间内即达到 100%。

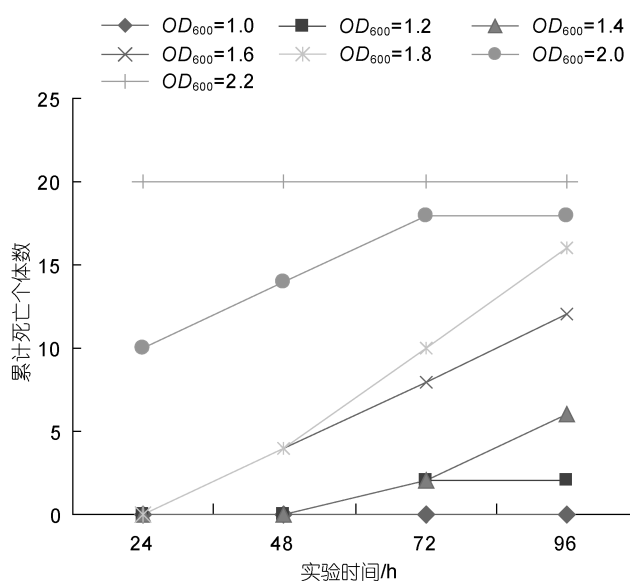


图 2 不同浓度鳃弧菌刺激下青蛤不同时间段死亡情况

Fig.2 The death situation of *C. sinensis* after *V. anguillarum* infected in different concentration at different time

运用数据处理软件 SPSS16.0 对所得实验数据进行分析后(表 1), 得到回归方程为: $Y = 18.214X - 18.571$ ($R^2 = 0.999$, $P < 0.01$), 半致死浓度(LC_{50})为 $OD_{600} = 1.57$, 在置信系数 $\alpha = 0.05$ 时的置信区间为 $1.48 \leq LC_{50} \leq 1.66$ 。

表 1 鳃弧菌对青蛤半致死浓度的统计分析
Tab.1 Statistic analysis of Semi-lethal concentration *V. anguillarum* to *C. sinensis*

组别	剂量	样本数	死亡数	死亡率 (%)	剂量对数	概率(P)
1	1.2	20	2	10	0.079	3.720
2	1.4	20	6	30	0.146	4.480
3	1.6	20	12	60	0.204	5.250
4	1.8	20	16	80	0.255	5.840
5	2.0	20	18	90	0.301	6.280

3 讨论

鳃弧菌是最常见的海洋动物致病微生物, 它的侵染能引起贝类发生出血性败血症, 从而导致组织损伤并使个体死亡(Jayasree *et al*, 2006; Lightner *et al*, 1975)。有关鳃弧菌致病机制研究已有许多报道, 如产生细胞内或细胞外毒素、质粒介导的铁结合系统、对血清杀菌活力的抗性等(Croxatto *et al*, 2002; Norqvist *et al*, 1990), 由于其致病渠道的多样性, 导致鳃弧菌对多种海洋生物均具有一定的危害性(Larsen *et al*, 1994)。根据已有研究, 青蛤在低浓度鳃弧菌刺激后, 一系列免疫相关因子如磷酸酶、热休克蛋白、溶菌酶、抗菌肽等基因在一定时间内均会发生上调表达, 并且其血清中各种免疫相关酶蛋白含量也会随之相应升高(Cheng *et al*, 1978)。由此可知, 鳃弧菌刺激后早期青蛤体内即可出现组织损伤等症状, 因而引发青蛤一系列固有免疫反应。本实验中在较低浓度($OD_{600} = 1.0$ 、 1.2 、 1.4)鳃弧菌胁迫下, 受试个体短时间内不出现死亡, 一定时间后(48h)出现少数死亡现象, 其原因可能是由于青蛤体内一系列免疫活性因子表达量升高开启其体内的固有免疫, 抑制了鳃弧菌对机体的损伤, 但随菌体数量的增加, 个别受试个体自身免疫难以抵抗菌体对机体的损伤作用因而死亡。在中等浓度($OD_{600} = 1.6$ 、 1.8)鳃弧菌胁迫时, 实验组个体仅在较短时间内(24h)维持生存正常, 继而相继出现死亡现象, 其原因可能是初始刺激浓度较高, 所激发的受试个体自身固有免疫只能在短时间内发挥一定作用抵抗病原体, 但随着菌体数量的剧增, 自身固有免疫调节范围有限, 最终较高浓度病原体释放的有毒物质超出机体自身固有免疫可调节范围因而发生死亡。在高浓度($OD_{600} = 2.0$ 、 2.2)鳃弧菌液胁迫下, 受试个体在短时间内(24h)即发生大量死亡直至全部死亡, 究其原因是因为过高浓度菌液注射到体内后, 使得短时间内鳃弧菌分泌的外毒素等毒性物质在青蛤

体内迅速增加, 青蛤本身的固有免疫体系已不能抵抗过高浓度的毒性物质, 从而发生严重组织损伤导致急性死亡, 说明鳃弧菌对青蛤有明显的毒害作用。另外, 本研究还发现在相同时间段内不同实验组之间, 受试个体总死亡率与胁迫浓度均呈现正相关, 并且高浓度胁迫组总死亡率在早期等于低浓度胁迫组, 后期则明显大于低浓度胁迫组。其原因可能是青蛤自身固有免疫调节能力有限, 有害物质胁迫浓度越高, 依靠自身免疫起到的抵抗作用相对越弱, 因此相同时间内受高浓度刺激个体更容易发生组织损伤而死亡。另外, 参考青蛤抗性研究的其它报道, 其成贝较幼贝或其它双壳类(扇贝等)对重金属离子抗性较强(张丽岩等, 2010), 故推测青蛤对环境不利因素有相对较强的适应性。本实验得到的鳃弧菌对青蛤半致死浓度 $OD_{600} = 1.57$, 属于较高浓度胁迫菌液, 其原因可能与青蛤对不利环境因素刺激耐受力较强有关(李晓英等, 2009)。此外, 由于青蛤行开放式血液循环, 本胁迫实验中在前闭壳肌处注射的菌液不能迅速随血循环至身体各处, 亦可能是半致死浓度数值较大的原因之一。

参 考 文 献

- 王洪斌, 成 明, 吴 琴, 2012. 鳃弧菌感染对日本蟳部分免疫活性因子的影响. 水生态学杂志, 33(3): 112—115
- 戈 蕾, 黄 捷, 李 琪, 2007. 鳃弧菌毒力相关基因的研究进展. 微生物学通报, 34(3): 584—586
- 刘可君, 刘 阳, 潘宝平, 2011. 鳃弧菌侵染对青蛤(*Cyclina sinensis*)溶菌酶和超氧化物歧化酶活性的影响. 四川动物, 30(5): 802—804
- 李晓英, 董志国, 薛 洋, 2009. 温度骤升和窒息条件对青蛤酸性磷酸酶和溶菌酶的影响. 水产科学, 28(6): 321—324
- 宋 欣, 张丽岩, 高玮玮等, 2010. 鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)侵染对青蛤(*Cyclina sinensis*)磷酸酶活性的影响. 海洋与湖沼, 41(2): 254—258
- 张丽岩, 宋 欣, 高玮玮等, 2010. Cd^{2+} 对青蛤(*Cyclina sinensis*)的毒性及蓄积过程分析. 海洋与湖沼, 41(3): 418—421
- 陈吉祥, 于德华, 李 筠, 2003. 鱼类病原鳃弧菌致病相关因子及分子生物学. 海洋科学, 27(8): 11—15
- 高玮玮, 袁 媛, 潘宝平等, 2009. 青蛤(*Cyclina sinensis*)贝壳形态性状对软体部重的影响分析. 海洋与湖沼, 40(2): 166—169
- 曹 华, 2004. 沿海滩涂青蛤死亡原因及对策. 中国水产, (4): 57—58
- 梁玉波, 杨 波, 王立俊等, 2000. 辽宁黄海沿岸水域增殖贝类病害发生机理和防治对策. 海洋环境科学, 19(1): 5—10
- 翟玉梅, 丁秀云, 李光友, 1998. 软体动物血细胞及体液免疫研究发展. 海洋与湖沼, 29(5): 558—561

- 潘宝平, 宋 欣, 罗凯娅等, 2010. 青蛤(*Cyclina sinensis*)溶菌酶基因在鳃弧菌刺激下的表达. 海洋与湖沼, 41(6): 901—906
- Cheng T C, Guida V G, Gerhart P L, 1978. Aminopeptidase and lysozyme activity levels and serum protein concentrations in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) challenged with bacteria. Journal of Invertebrate Pathology, 32(3): 297—302
- Croxatto A, Chalker V J, Lauritz J *et al*, 2002. VanT, a homologue of *Vibrio harveyi* LuxR, regulates serine, metalloprotease, pigment, and biofilm production in *Vibrio anguillarum*. Journal of Bacteriology, 186(6): 1617—1629
- Jayasree L, Janakiram P, Madhavi R *et al*, 2006. Characterization of *Vibrio* spp. associated with diseased shrimp from culture ponds of Andhra Pradesh (India). Journal of the World Aquaculture Society, 37(4): 523—532
- Larsen J L, Pedersen K, Dalsgaard I, 1994. *Vibrio anguillarum* serovars associated with vibriosis in fish. Journal of Fish Diseases, 17(3): 259—267
- Lightner D V, Lewis D H, 1975. A septicemic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp. Fish, 37(5—6): 25—28
- Norqvist A, Bo Norrman B, Wolf-Watz H, 1990. Identification and characterization of a zinc metalloprotease associated with invasion by the fish pathogen *V. anguillarum*. Infect and Immunity, 58(11): 3731—3736
- Strmac M, Braunbeck T, 1999. Effects of triphenyltin acetate on survival, hatching success, and liver ultra structure of early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). Ecotoxicology and Environmental Safety, 44(1): 25—39

TOXICITY TEST AND HALF LETHAL CONCENTRATION OF *VIBRIO ANGUILLARUM* TO THE CLAM *CYCLINA SINENSIS*

GE Duan-Yang, ZHAO Ting, PAN Bao-Ping

(College of Life Sciences, Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, Tianjin Normal University, Tianjin, 300387)

Abstract The acute toxicity test was conducted under different concentration of *Vibrio anguillarum* to *Cyclina sinensis*. The death rate of the *C. sinensis* were observed, then the half lethal concentration of *V. anguillarum* was got after infection. The results showed that the death rate of the clam was increased at the *Vibrio* concentration from $OD_{600} = 1.0$ to $OD_{600} = 2.2$ in 96h, and all the experimental individuals were dead at the concentration $OD_{600} = 2.2$. The death rate and the *Vibrio* concentration showed a positive correlation at the same time point. After analyzing the experimental data by SPSS 16 package, we got that the LC_{50} of *Vibrio anguillarum* to *C. sinensis* was $OD_{600} = 1.57$. The results suggested that the *V. anguillarum* was obviously toxic to *C. sinensis*.

Key words *Cyclina sinensis*, *Vibrio anguillarum*, Semi-lethal concentration (LC_{50})