

## 仿刺参体腔液的抗菌特性

丛 聪<sup>1,2</sup>, 蒋经伟<sup>2\*</sup>, 董 颖<sup>2</sup>, 杨爱馥<sup>2</sup>, 关晓燕<sup>2</sup>,  
姜 北<sup>2</sup>, 高 杉<sup>2</sup>, 陈 仲<sup>2</sup>, 王 摆<sup>2</sup>, 周遵春<sup>2\*</sup>

(1. 大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁 大连 116023;

2. 辽宁省海洋水产科学研究院, 辽宁 大连 116023)

**摘要:** 为了解仿刺参体腔液的抗菌谱以及不同二价金属离子对仿刺参体腔液抗菌活性的影响, 实验采用生长曲线测定法分别测定了仿刺参体腔细胞破碎液上清和体腔液上清对哈维氏弧菌、灿烂弧菌、希瓦氏菌、假交替单胞菌、金黄色葡萄球菌、溶壁微球菌、停乳链球菌、拟诺卡式菌生长的影响, 并通过该法以溶壁微球菌为受试菌测定了海洋环境中常见的  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  对仿刺参体腔液上清抗菌活性的影响。结果显示, 仿刺参体腔细胞破碎液上清对受试的 8 株细菌的生长均无抑制作用, 体腔液上清对溶壁微球菌的生长有明显的抑制作用, 而对其他 7 株受试菌的生长无明显影响;  $\text{Mn}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  可明显增强体腔液上清对溶壁微球菌的生长抑制作用, 而  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  对体腔液上清的抗菌活性无明显影响。研究表明, 仿刺参体腔液在体外状态下只具有窄谱抗菌活性, 与抗菌相关的免疫因子主要存在于体腔液上清中; 体腔液中的抗菌免疫因子对海洋环境中的常见二价金属离子有一定的适应性, 而且适当浓度的  $\text{Mn}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  可能具有促进仿刺参抗菌应答能力的作用。

**关键词:** 仿刺参; 体腔液; 抗菌活性; 细菌; 金属离子

**中图分类号:** S 917.4

**文献标志码:** A

棘皮动物缺乏特异性免疫系统, 主要通过由细胞免疫和体液免疫组成的非特异性免疫系统杀伤和清除病原体<sup>[1-5]</sup>。体腔液是棘皮动物最为重要的免疫组织之一, 由体腔细胞和体腔液上清构成, 含有多种与免疫相关的酶和免疫因子, 如溶菌酶、磷酸水解酶、补体因子等, 通过这些酶和免疫因子参与机体的溶菌、抑菌等多种免疫应答过程<sup>[6-9]</sup>。

关于体液或血淋巴的抗菌特性研究在一些水生无脊椎动物中已有报道。在栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 中, 血清对金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、四联微球菌 (*Micrococcus tetragenus*)、产气杆菌 (*Enterobacter aerogenes*)、漂浮弧菌 (*Vibrio natriegen*) 等有明显的抑菌作用, 对普通变形菌 (*Proteus vulgaris*)、哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*)、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、副溶血弧菌

(*Vibrio parahaemolyticus*)、代远洋弧菌 (*Vibrio pelagius*) 及酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 等无明显抑制作用<sup>[10]</sup>。美洲牡蛎 (*Crassostrea virginica*) 的血清在体外对霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 和创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*) 无明显溶菌、抑菌作用, 反而为菌体的生长提供营养物质, 促进受试细菌的生长<sup>[11]</sup>。中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 和日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 的血清在体外对大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*) 有显著的抗菌作用, 并且在中国明对虾活体中注射适量的大肠杆菌后, 血淋巴的抗菌活性有明显提高<sup>[12-13]</sup>。在克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 中, 血清对大肠杆菌和溶壁微球菌同样有显著的溶菌、抑菌作用<sup>[14]</sup>。在三疣梭子蟹

收稿日期: 2014-05-30 修回日期: 2014-07-10

资助项目: 国家自然科学基金(31272687); 辽宁省科技计划项目(2011203005); 辽宁省海洋与渔业厅项目(201301)

通信作者: 周遵春, E-mail: zunchunz@hotmail.com

(*Portunus trituberculatus*) 中,血清对溶藻胶弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 有明显的溶菌、抑菌作用,而血细胞裂解液对溶藻胶弧菌的抑制作用较弱<sup>[15]</sup>。此外,在后口类动物青岛文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri tsingtaunese*) 中,体液在体外能够抑制溶藻胶弧菌、副溶血弧菌和哈维氏弧菌的生长<sup>[16]</sup>。上述结果表明,不同水生无脊椎动物的体腔液或血淋巴具有不同的抗菌谱和抗菌能力。

仿刺参 (*Apostichopus japonicus*) 是我国北方近海养殖最重要的经济品种之一。近年来,由于种质的退化和养殖环境的恶化,仿刺参养殖病害问题不断发生<sup>[17]</sup>。从目前的流行病学调查结果来看,仿刺参的病害主要是以细菌性疾病为主,且传播范围广、危害性大<sup>[18]</sup>,其中腐皮综合症、烂胃症、口围肿胀症等均是仿刺参养殖中较常见的疾病,这几种疾病的致死率均在 30% 以上,从患有上述病症的仿刺参中分离鉴定出的病原有灿烂弧菌 (*Vibrio splendidus*)、哈维氏弧菌、黄海希瓦氏菌 (*Shewanella smarislavi*) 等<sup>[17,19-22]</sup>。了解仿刺参的免疫机制和特点,研究仿刺参体腔液的抗菌特性是通过免疫手段合理预防和控制仿刺参细菌性病害的前期基础。

目前,关于仿刺参体腔液抗菌谱和二价金属离子对仿刺参体腔液抗菌活性影响的研究尚缺乏报道,并且前期相关研究中使用的梯度稀释平板计数法和比浊法较适用于溶菌活性检测,但无法准确测

定抑菌活性,而生长曲线测定法则能较好地检测溶菌活性和抑菌活性相叠加的抗菌活性。因此,本实验通过生长曲线测定法分析了仿刺参体腔液的细胞组分和非细胞组分对多种细菌的抗菌活性,并进一步研究了海洋环境中常见的二价金属离子对体腔液非细胞组分抗菌活性的影响,以期对仿刺参的免疫特性和病害控制研究积累数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

仿刺参体质量为  $(20.4 \pm 3.2)$  g,取自锦州凌海海参养殖池塘,于实验室暂养、备用。暂养条件为水温  $15 \sim 17$  °C; pH  $8.2 \sim 8.4$ ; 盐度 30。

### 1.2 实验菌株

使用哈维氏弧菌、灿烂弧菌 (*V. splendidus*)、希瓦氏菌 (*Shewanella baltica*)、假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas nigrifaciens*)、金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*)、溶壁微球菌 (*M. lysodeikticus*)、停乳链球菌 (*Streptococcus dysgadysgalactiae*) 和拟诺卡式菌 (*Nocardiosis sp.*) 作为实验细菌。细菌的革兰氏染色属性、来源、培养条件以及菌液在  $A_{600} 1.0$  时的 CFU/mL 等信息见表 1。将 8 株细菌的培养悬液分别在  $5000 \times g, 4$  °C 离心 15 min,取细菌沉淀,用生理盐水重悬至终浓度为  $A_{600} 1.0$ ,用于体腔液的抗菌活性测定。

表 1 菌种信息

Tab. 1 Bacteria information

细菌种类 bacteria species	革兰氏鉴定 Gram identification	来源 source/strain	培养基 medium	温度/°C temperature	$A_{600} = 1.0$ 时 CFU/mL * CFU/mL at $A_{600}$ of 1.0
哈维氏弧菌 <i>Vibrio harveyi</i>	革兰氏阴性 G -	仿刺参 <i>Apostichopus japonicus</i>	2216E	28	$(8.87 \pm 0.05) \times 10^{17}$
灿烂弧菌 <i>Vibrio splendidus</i>	革兰氏阴性 G -	仿刺参 <i>A. japonicus</i>	2216E	28	$(6.84 \pm 0.04) \times 10^{17}$
希瓦氏菌 <i>Shewanella baltica</i>	革兰氏阴性 G -	仿刺参 <i>A. japonicus</i>	2216E	28	$(2.30 \pm 0.05) \times 10^{18}$
假交替单胞菌 <i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i>	革兰氏阴性 G -	仿刺参 <i>A. japonicus</i>	2216E	28	$(5.79 \pm 0.02) \times 10^{18}$
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	革兰氏阳性 G +	ATCC 55804	2216E	28	$(1.14 \pm 0.08) \times 10^{13}$
溶壁微球菌 <i>Micrococcus lysodeikticus</i>	革兰氏阳性 G +	ATCC 4698	2216E	28	$(2.26 \pm 0.08) \times 10^{18}$
停乳链球菌 <i>Streptococcus dysgadysgalactiae</i>	革兰氏阳性 G +	ATCC 51499	2216E	28	$(5.42 \pm 0.02) \times 10^{20}$
拟诺卡式菌 <i>Nocardiosis sp.</i>	革兰氏阳性 G +	繁茂膜海绵 <i>Hymeniacidon perleve</i>	2216E	28	$(1.52 \pm 0.02) \times 10^{23}$

注: \* . CFU 数值采用梯度稀释平板计数法得出

Notes: \* . CFU was determined using gradient dilution plate count method

### 1.3 二价金属离子

使用  $\text{FeCl}_2$ 、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{CdCl}_2$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{MnCl}_2$ 、 $\text{ZnSO}_4$  (上海生工) 作为海洋环境中常见二价金属离子  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  的来源<sup>[23-24]</sup>。实验前,将每种金属离子分别配制成浓度为 50 mmol/L 的溶液(溶于生理盐水)。

### 1.4 仿刺参体腔液上清及体腔细胞破碎液上清的制备

仿刺参(10只)经过滤海水冲洗后,使用滤纸吸干仿刺参表面的液体,采用解剖法获得体腔液。将10只仿刺参的体腔液混合均匀后,在4℃、800×g离心15min,收集上清液作为体腔液上清,冻存于-20℃。体腔细胞沉淀用生理盐水重悬后,经超声波破碎仪(宁波新芝)在4℃、40W条件下破碎30s,于4℃、12000×g离心30min,取上清液作为体腔细胞破碎液上清,冻存于-20℃。

### 1.5 仿刺参体腔液对8株细菌生长的影响

仿刺参体腔液对8株细菌生长的影响测定方法如下:100μL各细菌悬液分别与500μL体腔液上清或体腔细胞破碎液上清混匀后,在37℃孵育2h。将孵育好的混合物在5000×g、4℃条件下离心15min,得到的细菌沉淀用200μL生理盐水重悬后,接种到3mL的2216E液体培养基中,在28℃条件下进行振荡培养(150r/min)。在培养的过程中,每隔1h取出100μL细菌培养液,用酶标仪在600nm波长下测定吸光值。3种对照同时进行并按以下方式孵育:(1)500μL生理盐水+100μL细菌悬液;(2)500μL高温灭活体腔液上清+100μL细菌悬液;(3)500μL高温灭活体腔细胞破碎液上清+100μL细菌悬液。本实验共做4次重复。

### 1.6 二价金属离子对仿刺参体腔液上清抗菌活性的影响

二价金属离子对仿刺参体腔液上清抗菌活性的影响测定方法如下:200μL溶壁微球菌悬液与500μL体腔液上清及50μL各金属离子溶液混匀后,在37℃孵育2h。将孵育好的混合物在5000×g、4℃条件下离心15min,得到的细菌沉淀用200μL生理盐水重悬后,接种到3mL的2216E液体培养基中,在28℃条件下进行振荡培养(150r/min)。在培养的过程中,每隔1h取出100μL细菌培养液,用酶标仪在600nm波长下测定吸光值。3种对照同时进行并按以下方式孵

育:(1)500μL生理盐水+50μL各金属离子溶液+200μL溶壁微球菌悬液;(2)500μL体腔液上清+50μL生理盐水+200μL溶壁微球菌悬液;(3)500μL生理盐水+200μL溶壁微球菌悬液。本实验共做4次重复。

### 1.7 数据分析

数据使用SPSS 11.5分析计算标准差,结果以平均值±标准差表示。

## 2 结果

### 2.1 仿刺参体腔液对8株细菌生长的影响

生长曲线检测结果显示:与生理盐水处理组(空白对照)相比,高温灭活的体腔液上清和体腔细胞破碎液上清对细菌的生长均无明显影响;在8株受试细菌中,体腔液上清仅对溶壁微球菌有明显的抑制效果,而体腔细胞破碎液上清对8株细菌的生长均无明显影响(图1)。

### 2.2 二价金属离子对仿刺参体腔液上清抗菌活性的影响

使用溶壁微球菌作为受试菌,生长曲线测定结果显示:实验所选6种二价金属离子对细菌的生长无明显影响; $\text{Mn}^{2+}$ 和 $\text{Zn}^{2+}$ 可明显增强体腔液上清对溶壁微球菌的生长抑制作用,而 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 对体腔液上清的抗菌活性无明显影响(图2)。

## 3 讨论

在棘皮动物中,体腔液是最重要的免疫组织之一,直接参与溶菌、抑菌等多种免疫应答过程<sup>[1,7]</sup>。前期在一些水生无脊椎动物中开展的体液抗菌特性研究表明,体液在体外条件下具有溶菌和抑制细菌生长的能力,并且不同物种的体液具有不同的抗菌谱和抗菌能力<sup>[10-15]</sup>。细菌是仿刺参病害暴发的主要病原之一<sup>[17]</sup>,了解仿刺参体腔液的抗菌谱和抗菌特性对通过免疫手段预防、控制仿刺参病害的发生具有指导意义。因此,本研究分析了仿刺参体腔液在体外对8株细菌生长的影响,并进一步分析了海洋环境中常见的6种二价金属离子对仿刺参体腔液上清抗菌活力的影响。

抗菌活性测定结果显示,仿刺参体腔细胞破碎液上清对8株受试细菌的生长无明显影响,而体腔液上清仅对溶壁微球菌的生长有明显抑制作

用,对其余 7 株受试细菌的生长无明显影响。这一结果一方面表明,在仿刺参中直接参与溶菌、抑菌的免疫因子主要存在于体腔液上清中,而不是体腔细胞中;另一方面也表明,仿刺参的体腔液在

自然状态下只具有非常有限的抗菌能力。在一些无脊椎动物中,体液具有较强的抗菌活性。例如栉孔扇贝的血清对金黄色葡萄球菌、四联微球菌、产气杆菌、漂浮弧菌的生长有强烈抑制作用<sup>[10]</sup>;

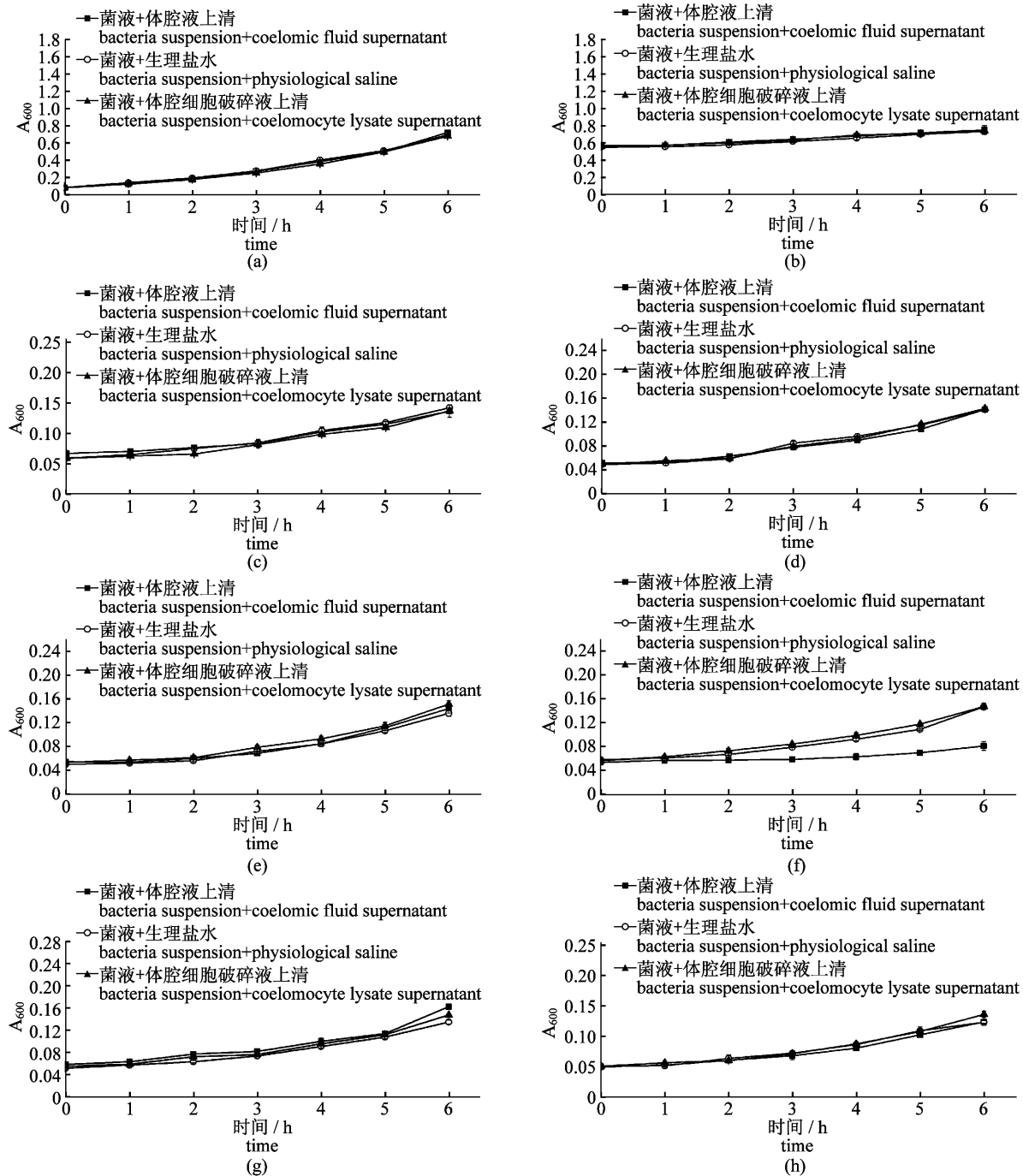


图 1 仿刺参体腔液对不同细菌生长的影响

(a) 哈维氏弧菌; (b) 灿烂弧菌; (c) 希瓦氏菌; (d) 假交替单胞菌; (e) 金黄色葡萄球菌; (f) 溶壁微球菌; (g) 停乳链球菌; (h) 拟诺卡式菌

Fig. 1 The effects of *A. japonicus* coelomic fluid on the growth of different bacteria

(a) *Vibrio harveyi*; (b) *Vibrio splendidus*; (c) *Shewanella baltica*; (d) *Pseudoalteromonas nigrifaciens*; (e) *Staphylococcus aureus*; (f) *Micrococcus lysodeikticus*; (g) *Streptococcus dysgalactiae*; (h) *Nocardopsis* sp.

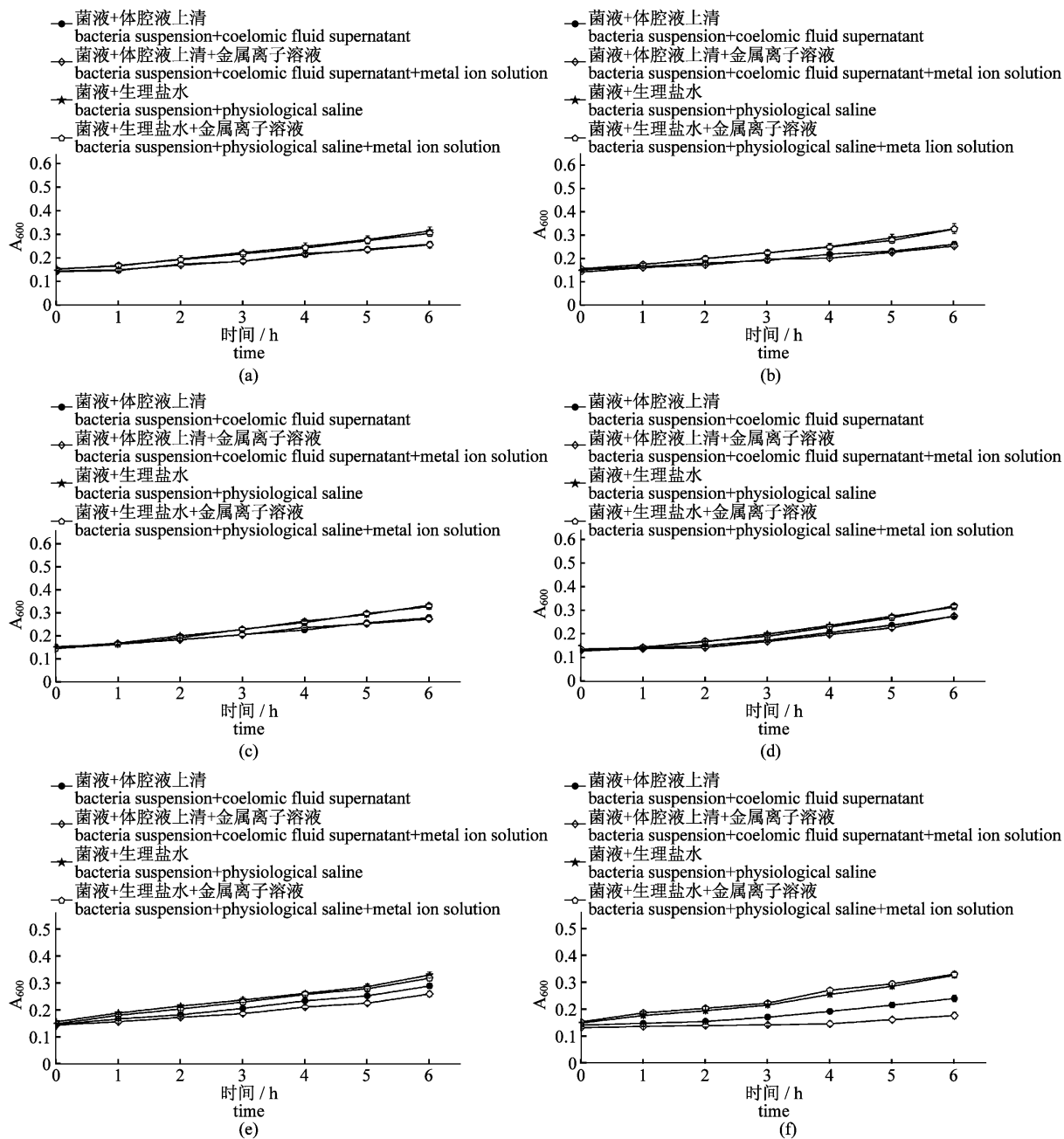


图2 二价金属离子对仿刺参体腔液上清抗菌活性的影响

仿刺参体腔液上清抗菌活性的测定采用溶壁微球菌作为受试菌。(a)  $\text{Fe}^{2+}$ ; (b)  $\text{Ca}^{2+}$ ; (c)  $\text{Cd}^{2+}$ ; (d)  $\text{Mg}^{2+}$ ; (e)  $\text{Mn}^{2+}$ ; (f)  $\text{Zn}^{2+}$

**Fig. 2 The effects of divalent metal ions on the antibacterial activities of *A. japonicus* coelomic fluid supernatant**

The antibacterial activities of *A. japonicus* coelomic fluid supernatant were determined using *M. lysodeikticus* as the tested bacteria. (a)  $\text{Fe}^{2+}$ ; (b)  $\text{Ca}^{2+}$ ; (c)  $\text{Cd}^{2+}$ ; (d)  $\text{Mg}^{2+}$ ; (e)  $\text{Mn}^{2+}$ ; (f)  $\text{Zn}^{2+}$

中国对虾、日本沼虾和克氏原螯虾的血清对大肠杆菌和溶壁微球菌有显著抑制作用<sup>[12-14]</sup>;青岛文昌鱼体液则对溶藻胶弧菌、副溶血弧菌和哈维氏弧菌的生长有明显抑制作用<sup>[16]</sup>。然而,在其他一些无脊椎动物中,体液却呈现出较弱抗菌活性甚

至无抗菌活性。例如,美洲牡蛎的血清在体外对霍乱弧菌和创伤弧菌不仅无明显的溶菌、抑菌作用,反而为菌体的生长提供营养物质,促进受试细菌的生长<sup>[11]</sup>。此外,王斌等<sup>[25]</sup>通过分析仿刺参不同组织液的抗菌活性发现,仿刺参的体腔液、体

腔液上清、体腔细胞悬液对哈维氏弧菌、白色葡萄球菌 (*Staphylococcus albus*) 和迟钝爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 均无明显抑制作用,而体壁内皮组织匀浆液对 3 种受试细菌均有显著抑制作用。通过综合分析,我们可以得出,不同无脊椎动物的体液可能具有不同的免疫分工,从而表现出不同的抗菌谱和抗菌活性。就仿刺参而言,体腔液与其他组织或器官共同构成一个完整有效的免疫应答系统,在这一系统中,体腔液之外的其他组织如体壁内皮组织等在直接抑菌、抗菌应答中扮演十分重要角色,而体腔液一方面承担有限的直接抑菌、抗菌功能,另一方面可能作为其他组织或器官发挥各种免疫效应的液体媒介而在仿刺参的免疫应答中发挥积极重要作用,主要是通过参与凝集、黑化、吞噬、包囊、结节形成、消化等涉及多种组织细胞的复杂级联反应来对抗病原入侵<sup>[7]</sup>,从而保证了仿刺参对多种病原菌具有有效的抵御能力。前期有报道发现,青岛文昌鱼体液对溶藻胶弧菌、副溶血弧菌和哈维氏弧菌的生长抑制作用可被补体抗体阻断,证明补体作用是文昌鱼体液抑制弧菌生长的主要因素<sup>[16]</sup>。然而,在本研究中,8 株受试菌中只有溶壁微球菌的生长受到仿刺参体腔液上清的抑制,而溶壁微球菌是溶菌酶酶解作用的主要靶菌<sup>[26]</sup>,因此,仿刺参体腔液中直接参与抗菌作用的主要免疫因子可能是溶菌酶。

前期许多研究发现,二价金属离子对无脊椎动物体液中多种免疫因子如酚氧化酶、溶菌酶、磷酸酶、超氧化物歧化酶、髓过氧化物酶等的活性影响显著<sup>[2,27-31]</sup>,表明二价金属离子对无脊椎动物体液的抗菌活性可能会有显著影响。目前,在青岛文昌鱼中已证实, $Mg^{2+}$  对文昌鱼体液的抗菌活力有明显增强作用<sup>[16]</sup>。本研究通过分析海洋环境中常见的 6 种二价金属离子对仿刺参体腔液上清抗菌活力的影响发现, $Mn^{2+}$  和  $Zn^{2+}$  可明显增强体腔液上清的抗菌活力,表明在适当浓度下, $Mn^{2+}$  和  $Zn^{2+}$  可能具有促进仿刺参抑制、清除病原菌的作用,具有潜在的免疫增强剂的应用价值。另外, $Fe^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  对仿刺参体腔液上清的抗菌活力无明显影响。所测试的 6 种二价金属离子中,无金属离子抑制体腔液上清的抗菌活力,表明仿刺参体腔液中直接参与抗菌作用的免疫因子对海洋环境中常见的二价金属离子有一定

的适应性,有利于仿刺参在自然环境下保持稳定的抗菌能力。

拟诺卡式菌 (*Nocardiosis* sp.) 由中国科学院大连化学物理研究所海洋生物产品工程组惠赠,谨致谢忱。

#### 参考文献:

- [1] Ramírez-Gómez F, García-Araráz J E. Echinoderm Immunity [J]. *Invertebrate Survival Journal*, 2010, 7 (2): 211 - 220.
- [2] Wang Y N, Liu X W, Liu Y P, et al. Analysis of phenoloxidase activity in the coelomic fluid of *Strongylocentrotus intermedius* [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2011, 13 (2): 116 - 120. [王轶南,刘学伟,刘艳萍,等. 虾夷马粪海胆体腔液的酚氧化酶活性分析. 中国农业科技导报, 2011, 13 (2): 116 - 120.]
- [3] Gross P S, Walid Z A, Lori A C, et al. Echinoderm immunity and the evolution of the complement system [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 1999, 23 (4): 429 - 442.
- [4] Sun H J, Zhou Z C, Dong Y, et al. Identification and expression analysis of two Toll-like receptor genes from sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34 (1): 147 - 158.
- [5] Wang F Y, Yang H S, Gao H R, et al. Immune condition of *Apostichopus japonicus* during aestivation [J]. *Aquaculture*, 2008, 285 (1): 238 - 243.
- [6] Liu H Z, Zheng F R, Sun X Q, et al. Effect of exposure to ammonia nitrogen stress on immune enzyme of holothurian *Apostichopus japonicus* [J]. *Marine Sciences*, 2012, 36 (8): 47 - 52. [刘洪展,郑风荣,孙修勤,等. 氨氮胁迫对刺参几种免疫酶活性的影响. 海洋科学, 2012, 36 (8): 47 - 52.]
- [7] Smith L C, Ghosh J, Buckley K M, et al. Echinoderm immunity [M] // Söderhäll K, ed. *Invertebrate immunity*. New York: Springer US, 2010: 260 - 301.
- [8] Wang F Y, Yang H S, Gao F, et al. Annual changes of immune enzymes in coelome fluid of sea cucumber, *Apostichopus japonicus* [J]. *Marine Sciences*, 2009, 33 (7): 75 - 80. [王方雨,杨红生,高菲,等. 刺参体腔液几种免疫指标的周年变化. 海洋科学, 2009, 33 (7): 75 - 80.]

- [9] Yu M Z, Wang T, Zhang F. Preliminary study on the function of coelomocyte of the Roche sea jigger (*Asterias rollestoni* Bell) [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2008, 8(8): 1452 - 1456. [于明志, 王婷, 张峰. 罗氏海盘车体腔细胞及免疫功能的初步研究. 现代生物医学进展, 2008, 8(8): 1452 - 1456.]
- [10] Mu H J, Jiang X L, Wang H M. Studies on immune factors in the serum of *Chlamys farreri* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1999, 6(2): 33 - 36. [牟海津, 江晓路, 王慧谧. 栉孔扇贝血清中的免疫因子的研究. 中国水产科学, 1999, 6(2): 33 - 36.]
- [11] Tamplin M L, Fisher W S. Occurrence and characteristics of agglutination of *Vibrio cholerae* by serum from the eastern oyster, *Crassostrea virginica* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55(11): 2882 - 2887.
- [12] Wang L, Li G Y, Mao Y X. Studies in the activities and characteristics of the antibacterial, bacteriolysis and phenoloxidase in the haemolymph of *Penaeus chinensis* [J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 1995, 26(2): 179 - 185. [王雷, 李光友, 毛远兴. 中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力和酚氧化酶活力的测定及其特性研究. 海洋与湖沼, 1995, 26(2): 179 - 185.]
- [13] Chang M X, Chen X X, Wu Z X, et al. The effect of *Cordyceps* polysaccharide on *Macrobrachium nipponense* immune function [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2001, 20(3): 275 - 278. [昌鸣先, 陈孝煊, 吴志新, 等. 虫草多糖对日本沼虾免疫机能的影响. 华中农业大学学报, 2001, 20(3): 275 - 278.]
- [14] Mo Z L, Li H R, Yu Y. Effect of bacterial glycoprotein on immune factors in *Procambarus clarkii* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2000, 7(3): 28 - 32. [莫照兰, 李会荣, 俞勇. 细菌糖蛋白对鳌虾免疫因子的影响. 中国水产科学, 2000, 7(3): 28 - 32.]
- [15] Li C H, Jin S. Preliminary study on immune function of the haemolymph in crab *Portunus trituberculatus* [J]. Fisheries Science, 2008, 27(4): 163 - 166. [李长红, 金珊. 三疣梭子蟹血淋巴免疫功能的初步研究. 水产科学, 2008, 27(4): 163 - 166.]
- [16] Li Z M. Complement-mediated killing of *Vibrio* species by the humoral fluids of amphioxus *Branchiostoma belcheri tsingtauense* and *Vibrio* species escape the mechanisms of complement's attack [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2008. [栗志民. 青岛文昌鱼体液补体介导弧菌溶菌活性及弧菌逃避补体攻击机制的研究. 青岛: 中国海洋大学, 2008.]
- [17] Zhang C Y, Wang Y G, Rong X J. Isolation and identification of causative pathogen for skin ulcerative syndrome in *Apostichopus japonicus* [J]. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(1): 118 - 123. [张春云, 王印庚, 荣小军. 养殖刺参腐皮综合症病原菌的分离与鉴定. 水产学报, 2006, 30(1): 118 - 123.]
- [18] Wang Y G, Rong X J, Zhang C Y. Main diseases of cultured *Apostichopus japonicus*: Prevention and treatment [J]. Marine Science, 2005, 29(3): 1 - 7. [王印庚, 荣小军, 张春云. 养殖海参主要疾病及防治技术. 海洋科学, 2005, 29(3): 1 - 7.]
- [19] Li H, Qiao G, Li Q, et al. Biological characteristics and pathogenicity of a highly pathogenic *Shewanella marisflavi* infecting sea cucumber, *Apostichopus japonicus* [J]. Journal of Fish Diseases, 2010, 32(11): 865 - 877.
- [20] Deng H, He C B, Zhou Z C, et al. Isolation and pathogenicity of pathogens from skin ulceration disease and viscera ejection syndrome of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* [J]. Aquaculture, 2009, 287(1-2): 18 - 27.
- [21] Wang Y G, Sun S F, Rong X J. Stomach ulcer disease in auricularia of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) and its etiological identification [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(6): 908 - 916. [王印庚, 孙素凤, 荣小军. 仿刺参幼体烂胃病及其致病原鉴定. 中国水产科学, 2006, 13(6): 908 - 916.]
- [22] Ma Y X, Xu G R, Zhang E P, et al. The etiology of acute preistome edema disease in cultured juveniles of *Apostichopus japonicus* [J]. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(3): 377 - 382. [马悦欣, 徐高蓉, 张恩鹏, 等. 仿刺参幼参急性口围肿胀症的细菌性病原. 水产学报, 2006, 30(3): 377 - 382.]
- [23] Walsh K, Dunstan R H, Murdoch R N, et al. Bioaccumulation of pollutants and changes in population parameters in the gastropod mollusc *Austrocochlea constricta* [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 1994, 26(3): 367 - 373.
- [24] Looi L J, Aris A Z, Johari W L W, et al. Baseline metals pollution profile of tropical estuaries and coastal waters of the Straits of Malacca [J]. Marine Pollution Bulletin, 2013, 74(1): 471 - 476.

- [25] Wang B, Hu L, Cheng Z Y, *et al.* Antibacterial activity of different tissue components in sea cucumber *Apostichopus japonicus* [ J ]. Journal of Dalian Ocean University, 2010, 25 ( 6 ) : 523 - 527. [ 王斌,胡亮,程振远,等. 仿刺参不同组织液的抗菌活性. 大连海洋大学学报, 2010, 25 ( 6 ) : 523 - 527. ]
- [26] Zhang W H. Study of extracting lysozyme from hen egg white [ D ]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2003. [ 张文会. 从鸡蛋清中提取溶菌酶的研究. 北京:北京化工大学, 2003. ]
- [27] Xing J, Jiang J W, Zhan W B. Phenoloxidase in the scallop *Chlamys farreri*: Purification and antibacterial activity of its reaction products generated in vitro [ J ]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 32 ( 1 ) : 89 - 93.
- [28] Wang Y N, Mu X H, Feng N S, *et al.* Analysis of phenoloxidase activity in the coelomic fluid of sea cucumber *Apostichopus japonicus* [ J ]. Journal of Dalian Ocean University, 2013, 28 ( 4 ) : 319 - 322. [ 王轶南,穆晓虎,封妮莎,等. 仿刺参体腔液中酚氧化酶活性的分析. 大连海洋大学学报, 2013, 28 ( 4 ) : 319 - 322. ]
- [29] Misook K, Minjeong P, Yoonhwa J. Purification and characterization of lysozyme from Filipino venus, *Ruditapes philippinarum* [ J ]. Food Science and Biotechnology, 2012, 21 ( 5 ) : 1463 - 1468.
- [30] Blasco J, Puppo J, Sarasquete M C. Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Ruditapes philippinarum* [ J ]. Marine Biology, 1993, 115 ( 1 ) : 113 - 118.
- [31] Yang Z B, Zhao Y L, Zhou Z L, *et al.* Effects of water-borne copper on activities of metabolism enzymes in *Eriocheir sinensis* [ J ]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2006, 37 ( 2 ) : 118 - 124. [ 杨志彪,赵云龙,周忠良,等. 水体铜对中华绒螯蟹代谢酶活力的影响. 海洋与湖沼, 2006, 37 ( 2 ) : 118 - 124. ]



## Antibacterial analysis of coelomic fluid from the sea cucumber (*Apostichopus japonicus*)

CONG Cong<sup>1,2</sup>, JIANG Jingwei<sup>2\*</sup>, DONG Ying<sup>2</sup>, YANG Aifu<sup>2</sup>, GUAN Xiaoyan<sup>2</sup>,  
JIANG Bei<sup>2</sup>, GAO Shan<sup>2</sup>, CHEN Zhong<sup>2</sup>, WANG Bai<sup>2</sup>, ZHOU Zunchun<sup>2\*</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

2. Liaoning Key Lab of Marine Fishery Molecular Biology, Dalian 116023, China)

**Abstract:** Previous studies suggested that the coelomic fluid or hemolymph from different aquatic invertebrates had different antibacterial spectrum and capacity, and bacterial disease is one of the primary factors limiting the development of *Apostichopus japonicus* aquaculture. To control the bacterial disease in *A. japonicus* with the immunological methods, understanding the antibacterial characteristics of coelomic fluid is necessary. However, the information about the antibacterial characteristics of coelomic fluid is limited in *A. japonicus*. Besides, the gradient dilution plate count method and turbidimetric method used for antibacterial analysis in previous studies are just suitable for the determination of bacteriolytic activities rather than the antibacterial activities consisting of bacteriolytic activities and bacteriostatic activities, while the method of bacterial growth curve determination, applicable to the determination of antibacterial activities, was not broadly employed. Therefore, in order to study the antibacterial spectrum of coelomic fluid from *A. japonicus* and the effects of divalent metal ions on the antibacterial activities of coelomic fluid, using the method of bacterial growth curve determination, we determined the effects of coelomocyte lysate supernatant and coelomic fluid supernatant from *A. japonicus* on the growth of *Vibrio harveyi*, *Vibrio splendidus*, *Shewanella baltica*, *Pseudoalteromonas nigrifaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Nocardiosis* sp., respectively, and then determined the effects of  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  commonly found in marine environment on the antibacterial activities in *A. japonicus* coelomic fluid supernatant with *M. lysodeikticus* as tested bacteria. The results showed that the coelomocyte lysate supernatant had no obvious effects on the growth of all tested bacteria, while the coelomic fluid supernatant only showed strong inhibition on the growth of *M. lysodeikticus*. In addition,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  increased the inhibition of coelomic fluid supernatant on the growth of *M. lysodeikticus*, while  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  showed no obvious effects on the antibacterial activities of coelomic fluid supernatant. The results above suggested that *A. japonicus* coelomic fluid in vitro only had limited-spectrum antibacterial activity, and the immune factors directly related to anti-bacteria were mainly distributed in coelomic fluid supernatant. Besides, these antibacterial factors in coelomic fluid supernatant developed a certain adaptability to the divalent metal ions that are commonly found in marine environment, and at certain concentrations,  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  might be beneficial to the promotion of *A. japonicus* antibacterial capacity.

**Key words:** *Apostichopus japonicus*; coelomic fluid; antibacterial activity; bacteria; metal ions

**Corresponding author:** ZHOU Zunchun. E-mail: zunchunz@hotmail.com