



半滑舌鲷溃疡病病原菌的分离、鉴定及其致病性分析

李文悦, 左志晗*, 张晶晶, 尚碧娇, 孙金生

(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)

摘要: 采用2216E和TCBS培养基分别从患溃疡病半滑舌鲷的肠道和体表病灶分离获得菌株40株, 经血平板检验分离菌株的溶血活性, 体外筛选并鉴定出3株潜在致病性菌株, 即哈维氏弧菌、溶藻弧菌以及副溶血性弧菌。通过将3株潜在致病菌与健康半滑舌鲷的肠道上皮细胞共培养, 检测病原菌刺激后半滑舌鲷肠道上皮细胞相关免疫基因的相对表达量及共培养后肠道上皮细胞的凋亡率, 对病原菌的致病性进行细胞水平的筛选。结果显示, 经哈维氏弧菌刺激后肠道上皮细胞白介素10基因(*IL-10*)表达量极显著上调, 说明哈维氏弧菌引起的共培养上皮细胞免疫反应最为剧烈, 且哈维氏弧菌与肠道上皮细胞共培养后导致细胞的凋亡率高达48.3%, 其次为溶藻弧菌(36%)和副溶血性弧菌(34.5%), 推测哈维氏弧菌为半滑舌鲷溃疡病高致病性弧菌。通过对半滑舌鲷进行浸浴回感实验, 结果发现, 哈维氏弧菌、溶藻弧菌和副溶血性弧菌人工回感后第6天半滑舌鲷的累计死亡率分别为100%、95%和75%, 与细胞水平检测结果相吻合。实验表明, 所筛选到的3株弧菌均具有较强的毒性和致病性, 尤其以哈维氏弧菌致病性最强, 并由此推测半滑舌鲷溃疡病可能由多种致病菌共同感染所致。

关键词: 半滑舌鲷; 溃疡病; 病原菌; 分离鉴定; 细胞凋亡; 免疫基因

中图分类号: S 941.41

文献标志码: A

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)属鲽形目(Pleuronectiformes)、舌鲷科(Cynoglossidae)、舌鲷属(*Cynoglossus*), 为近海底栖鱼类, 其肉质鲜美, 口感滑嫩, 且能够适应较广范围盐度和温度, 是我国重要养殖鱼类品种之一^[1]。但目前集成化养殖半滑舌鲷过程中病害频发, 如溃疡、腹水^[2-4]等常见疾病严重威胁着半滑舌鲷产业的发展, 引发半滑舌鲷发病的原因较多, 如寄生虫性疾病, 病毒性疾病以及细菌性疾病等, 而找到导致其疾病感染的相应致病原是解决问题的关键。周红霞等^[5]在体表溃疡的半滑舌鲷中分离出了杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*), 并对半滑舌鲷幼鱼进行回感实验, 证明此菌株具有较强致病性, 致死率高达91.7%; 高桂生等^[6]

从患溃疡病的半滑舌鲷病灶中分离得到创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*), 回感实验12 h内半滑舌鲷全部死亡; 徐晓丽等^[7]从溃疡病半滑舌鲷的病灶中分离得到鱼肠道弧菌(*V. ichthyenteri*)和哈维氏弧菌(*V. harveyi*)。为找到导致工厂化养殖中半滑舌鲷溃疡病的主要致病菌, 本实验从工厂化养殖的患溃疡病的半滑舌鲷肠道和体表病灶分别分离致病菌, 试图对水产动物病原菌的分离鉴定提供有效方法, 并为工厂化养殖半滑舌鲷细菌性疾病的预防和治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

实验所用半滑舌鲷由天津市海发珍品实业

收稿日期: 2019-07-11 修回日期: 2019-10-07

资助项目: 天津市人才发展特殊支持计划高层次创新创业团队项目(ITFRS2017007); 天津市高等学校创新团队建设规划项目(TD13-5076)

通信作者: 左志晗, E-mail: zhihanzuo@163.com

发展有限公司提供。取体长(15±2) cm的溃疡病症明显的半滑舌鳎用于溃疡病致病菌的分离; 取健康的体长(15±2) cm的半滑舌鳎用于细胞培养实验及致病菌的动物回感实验。

1.2 主要试剂

TCBS培养基、2216E培养基和TSB培养基均购于青岛海博生物技术有限公司; 细菌通用引物: 27F以及1942R委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成; 胰蛋白酶、1640细胞培养液、细胞凋亡试剂盒PE Annexin V和7-AAD均为生工生物工程(上海)股份有限公司产品。

1.3 实验方法

致病菌的分离 取患病半滑舌鳎, 用75%酒精体表消毒后无菌操作进行解剖, 取病灶处及肠道组织经冰浴匀浆后用无菌水进行梯度稀释, 涂布于TCBS以及2216E琼脂平板, 28 °C培养24 h, 挑取单菌落于相应平板分离纯化2次。纯化后的单菌落经振荡培养后分别于血琼脂平板(含新鲜鱼血5%)上培养, 检测其溶血活性。

致病菌的鉴定 对保存菌种于28 °C 220 r/min振荡培养15 h后用水煮沸法制作模板。分别取致病菌1 mL置于1.5 mL的离心管中, 9 000 r/min离心2 min富集细胞, 弃上清液, 沉淀溶于100 μL灭菌水中, 100 °C煮沸10 min, 4 000 r/min离心2 min, 上清液即为PCR模板^[8-9]。16S *rDNA*通用引物序列: 27F: 5'-AGAGTTTGATC(C/A)TG GCTCAG-3', 1492R: 5'-TACGG(C/T)TACCT TGTTACGACTT-3'。PCR循环条件: 94 °C预变性4 min; 94 °C变性30 s, 50 °C退火1 min, 72 °C延伸2 min, 30个循环; 72 °C终延伸10 min。所得的PCR产物送于华大基因公司进行测序, 所得测序结果与NCBI数据库进行比对^[8-9]。在NCBI数据库中查找水产常见弧菌[如哈维氏弧菌、副溶血性弧菌(*V. parahaemolyticus*)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)、创伤弧菌、鳃弧菌(*V. anguillarum*)、费氏弧菌(*Aliivibrio fischeri*)、鱼肠道弧菌]的16S *rDNA*序列, 做系统发育进化树分析所得病原菌与水产常见弧菌间的关系。将溶血活性较强的菌株纯化2次后, 挑单菌落于Biolog平板培养12 h后, 取单菌落接种于IF-A接种液, 将接种液加入GEN III平板培养23 h后放入OmnLog读数仪检测生化指标, 将检测结果与数据库比对, 鉴定实验菌株种类。

细胞水平毒性检测 取健康半滑舌鳎用

95%酒精浸泡5 min^[10], 无菌操作取出完整肠道, 放入75%酒精消毒1 min, 肠道纵向剖开, 用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)清洗5~8次, 将组织剪碎至1 mm³左右的小组织块, 放在10倍体积的配制好的胰酶(NaCl 0.8%、Trypsin 0.5%、EDTA 0.2%)中室温消化15 min, 加入1640培养基终止消化, 经200目的细胞筛收集液体于1.5 mL离心管中, 加入PBS清洗3次, 离心弃上清液, 向沉淀中加入1 mL 1640培养基(添加15%胎牛血清, 0.5%的100 μg/mL链霉素和0.5%的100 μg/mL的青霉素)悬浮, 平均分于6个孔中并沿孔壁缓慢加入5 mL 1640培养基, 放入5% CO₂恒温培养箱培养, 温度28 °C, 培养1~2 d, 待细胞铺满6孔板时开始进行后续实验^[11-13]。设置空白对照组、1号菌组、3号菌组和6号菌组, 将3株潜在致病菌悬浮液分别接入不同6孔板中, 每组3个平行, 诱导细胞凋亡12 h, 每组裂解前3孔细胞提取RNA检测相关细胞因子的表达量(引物见表1), 剩余3孔用于检测不同菌株处理组的细胞凋亡率, 以确定菌株的致病性强弱。

表1 致病菌刺激后半滑舌鳎肠道上皮细胞免疫基因表达分析所用引物

Tab. 1 Primers used for the analysis of immune gene expression in intestinal epithelial cells after stimulation by pathogenic bacteria

| 引物名称 primers name | 引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3') |
|----------------------|--|
| IL-1β-F | ATAAGCCCACTCTACAGCT |
| IL-1β-R | ATTGGCCCTGAAAGGAGAGA |
| IL-8-F | AGCCTGAGAAGCCCTGGAG |
| IL-8-R | GCGTCTCTGTGTTTGACATCA |
| IL-10-F | AGGGCACCCAGTCTGAGAACA |
| IL-10-R | CGGCCTTGCTCTGTTTTAC |
| TNF-α-F | CAGAGGGAAGAGTTCCCCAG |
| TNF-α-F | CCTTGGTCTGGTAGGAGACG |

人工回感实验 将1、3、6号菌株分别接种于TSB液体培养基中, 28 °C培养过夜, 无菌生理盐水稀释至1×10⁷ CFU/mL用于浸浴回感实验。

取体长为(15±2) cm的健康半滑舌鳎每组各20尾, 共分4组, 1组为空白对照, 其余3组对应3株待检测候选致病菌, 每组设置3个生物学重复。置于规格为30 cm×20 cm×15 cm的养殖槽中(含曝气头)进行30 min的浸浴^[14-16], 对照组用等量

的TSB培养基经海水稀释后浸浴半滑舌鲷，浸浴结束后将半滑舌鲷捞出，冲洗体表并放回室内养殖缸中培养，观察半滑舌鲷的死亡率以及半滑舌鲷行为表现、体表症状并统计死亡率。

2 结果

2.1 致病菌的筛选

从患溃疡病的半滑舌鲷共分离得到40株菌株，其中TCBS分离得到15株：体表9株，肠道6株；2216E培养基分离得到25株：体表16株，肠道9株。经过溶血活性实验筛选出11株具溶血活性的菌株，选择溶血圈较大的1、3和6号菌株(均分离自肠道)，作为潜在致病菌进行后续实验(表2)。

2.2 致病菌鉴定

致病菌物种鉴定结果 对致病菌的16S *rDNA*进行PCR扩增并测序，与NCBI数据库进行BLAST比对结果显示，所分离到的菌株62.5%为弧菌属，其余分别为节杆菌属(*Arthrobacter*)和不动杆菌属(*Acinetobacter*)等，溶血活性强的3株菌均和分离于患病半滑舌鲷肠道，分别为1号副溶血性弧菌，3号溶藻弧菌和6号哈维氏弧菌。为确保结果的准确性，将上述3株菌株采用Biolog微生物生化鉴定系统进行鉴定，鉴定结果与16S *rDNA*检测结果相吻合。

致病菌16S *rDNA*系统发育树 将溶血活性较强的1、3、6号菌的16S *rDNA*与NCBI数据库中常见的弧菌序列进行比对，结果显示，3号和

表2 致病菌的溶血活性实验结果

Tab. 2 Results of hemolytic activity of pathogenic bacteria

| 菌株编号 strain number | 菌株名称 strains name | 溶血活性 hemolytic activity |
|--------------------------|---|-------------------------------|
| 1 | 副溶血性弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> JGB080708-1 | +++ |
| 2 | 哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i> NS131251 | ++ |
| 3 | 溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i> B11-1 | ++++ |
| 4 | 弧菌 <i>Vibrio</i> Pr V0032 | ++ |
| 5 | 哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i> WC13H252 | ++ |
| 6 | 哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i> 0233 | ++++ |
| 7 | 哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i> WC141015 | ++ |
| 8 | 哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i> B14-3 | ++ |
| 9 | 弧菌 <i>Vibrio</i> InS-159 | ++ |
| 10 | 欧文斯氏弧菌 <i>V. owensii</i> Xmb026 | + |
| 11 | 弧菌 <i>Vibrio</i> PrV1099 | ++ |

6号弧菌相似度较高，分别与溶藻弧菌及哈维氏弧菌亲缘关系相近，1号菌与3、6号菌相似度较低，与副溶血弧菌亲缘关系更近(图1)，进一步证实了3种弧菌鉴定结果的可靠性。

2.3 细胞水平毒性检测结果

细胞共培养形态观察 取健康半滑舌鲷肠道上皮细胞培养时，可见细胞呈较规则的球形(图2)，确认无细菌感染后接种致病菌进行共培养，测定致病菌对半滑舌鲷肠道上皮细胞凋亡率及相关免疫基因表达量的影响。

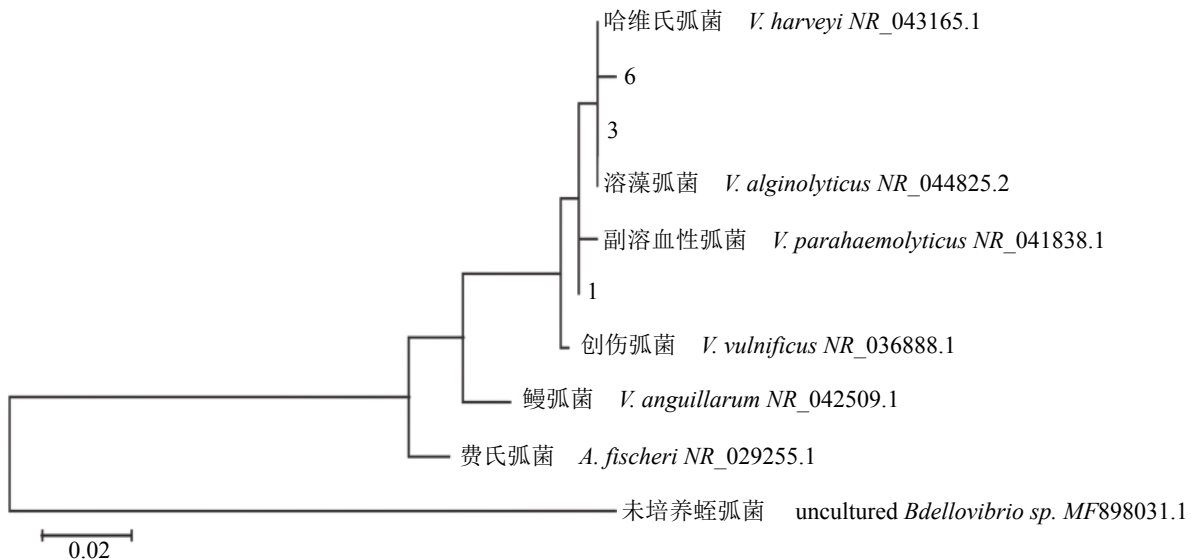


图1 依据16S *rDNA*序列构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S *rDNA* sequence

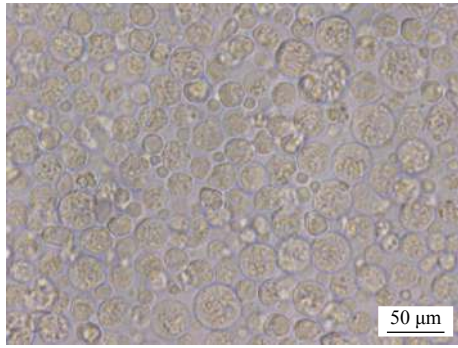


图 2 健康半滑舌鳎肠道上皮细胞形态

Fig. 2 Intestinal epithelial cells of *C. semilaevis*

细胞共培养后相关免疫基因表达量的测定 半滑舌鳎肠道上皮细胞与致病菌共培养 12 h 后, 选取白介素 1 β 基因 (*IL-1 β*)、白介素 8 基因 (*IL-8*)、白介素 10 基因 (*IL-10*) 以及肿瘤坏死因子基因 α (*TNF- α*) 分析共培养后半滑舌鳎肠道上皮细胞免疫应答差异, 以探究 3 株致病菌对细胞造成的刺激^[17-18]。在不同处理组中, 半滑舌鳎肠道上皮细胞在与病原菌共培养后发现, 4 种细胞因子的表达量没有一定的规律性。测定结果显示, 4 种基因相对表达量相对于空白对照组均发生了改变, 其中哈维氏弧菌组的肠道上皮细胞 *IL-10* 表达量极显著上调, 溶藻弧菌组变化不明显, 而副溶血性弧菌组 *IL-10* 表达量有所下调。副溶血性弧菌组和溶藻弧菌组的肠道上皮细胞 *IL-1 β* 表达量明显下调, 而 3 组致病菌组肠道上皮细胞的 *TNF- α* 与 *IL-8* 表达量均明显上调 (图 3)。

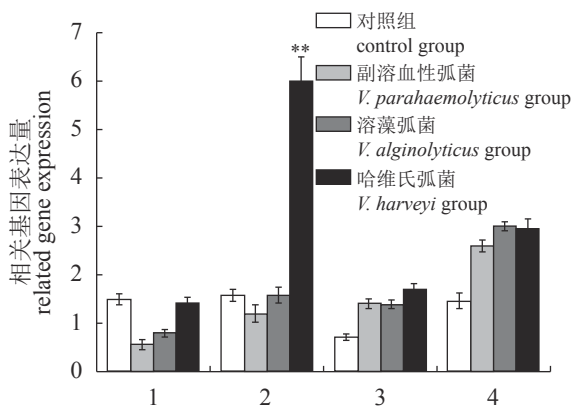


图 3 细胞共培养后半滑舌鳎肠道上皮细胞中 *IL-1 β* 、*IL-10*、*IL-8* 以及 *TNF- α* 的相对表达量

** 差异极显著 ($P < 0.01$)

Fig. 3 Relative expression levels of *IL-1 β* , *IL-10*, *IL-8* and *TNF- α* in intestinal epithelial cells after co-culture

1. *IL-1 β* , 2. *IL-10*, 3. *IL-8*, 4. *TNF- α* ; **, extremely significant difference ($P < 0.01$)

细胞凋亡率检测结果 对空白对照组和与病原菌共培养后的半滑舌鳎肠道上皮细胞进行细胞凋亡率测定, 结果显示, 空白对照组细胞凋亡率为 0.02%, 而与副溶血性弧菌、溶藻弧菌以及哈维氏弧菌共培养的 3 组肠道上皮细胞的细胞凋亡率均不同程度的上升, 其中副溶血性弧菌组、溶藻弧菌组以及哈维氏弧菌组的凋亡率分别为 34.5%、36% 和 48.3% (图 4), 表明 3 种弧菌对半滑舌鳎肠道上皮细胞具有不同程度的侵害作用, 其中哈维氏弧菌侵害作用最强, 其次为溶藻弧菌和副溶血性弧菌。

2.4 人工回感实验

采用 3 株分离的病原菌进行半滑舌鳎的人工回感实验, 其中哈维氏弧菌回感后第 3~4 天, 半滑舌鳎摄食量下降, 体表和头部出现白色溃疡, 腹部部分肿大, 解剖后肠道肿大肠道内几乎无食物, 腹水严重且部分肠道含黄色颗粒状物。回感溶藻弧菌后第 4 天, 半滑舌鳎体表出现溃疡、腹部肿大, 但发病较为缓慢, 死亡数量低于回感哈维氏弧菌; 回感副溶血性弧菌的半滑舌鳎病症较轻, 发病缓慢且死亡数量低于哈维氏弧菌和溶藻弧菌。空白组摄食量较大, 无发病症状, 回感第 6 天统计各组累计死亡尾数, 并计算 3 组平行实验的平均死亡率 (表 3)。综合分析人工回感实验结果, 3 株病原菌感染半滑舌鳎后均导致其出现了自然感染状态下患溃疡病病鱼相似的症状 (图 5), 但程度相对较轻 (分离病原菌选择的是发病症状最为严重的个体), 从发病时间、发病症状以及死亡速度三方面综合分析, 哈维氏弧菌致病性最强, 其次是溶藻弧菌, 而副溶血性弧菌致病性最弱。

实验结果显示, 3 株候选致病菌均能不同程度的感染半滑舌鳎并导致其死亡率明显高于空白对照组, 表明上述 3 株病原菌对半滑舌鳎均具有致病性, 其中 6 号菌 (哈维氏弧菌) 的致病性最强, 死亡率为 100%, 确定其为半滑舌鳎高致病性菌株; 其次为 3 号菌 (溶藻弧菌), 死亡率为 95%; 相对前 2 株致病菌, 1 号菌 (副溶血性弧菌) 致病性略弱, 但死亡率仍高达 75%。回感实验中半滑舌鳎的死亡率高与细胞水平实验中的细菌毒性强弱相吻合。取回感后发病的半滑舌鳎肠道及体表样本再次于 TCBS 和 2216E 平板上分离培养, 能分离纯化得到回感实验中相应致病菌。取分离到的菌株再次回感并对死亡率进行统计, 结果与初始回感实验结果一致, 证明

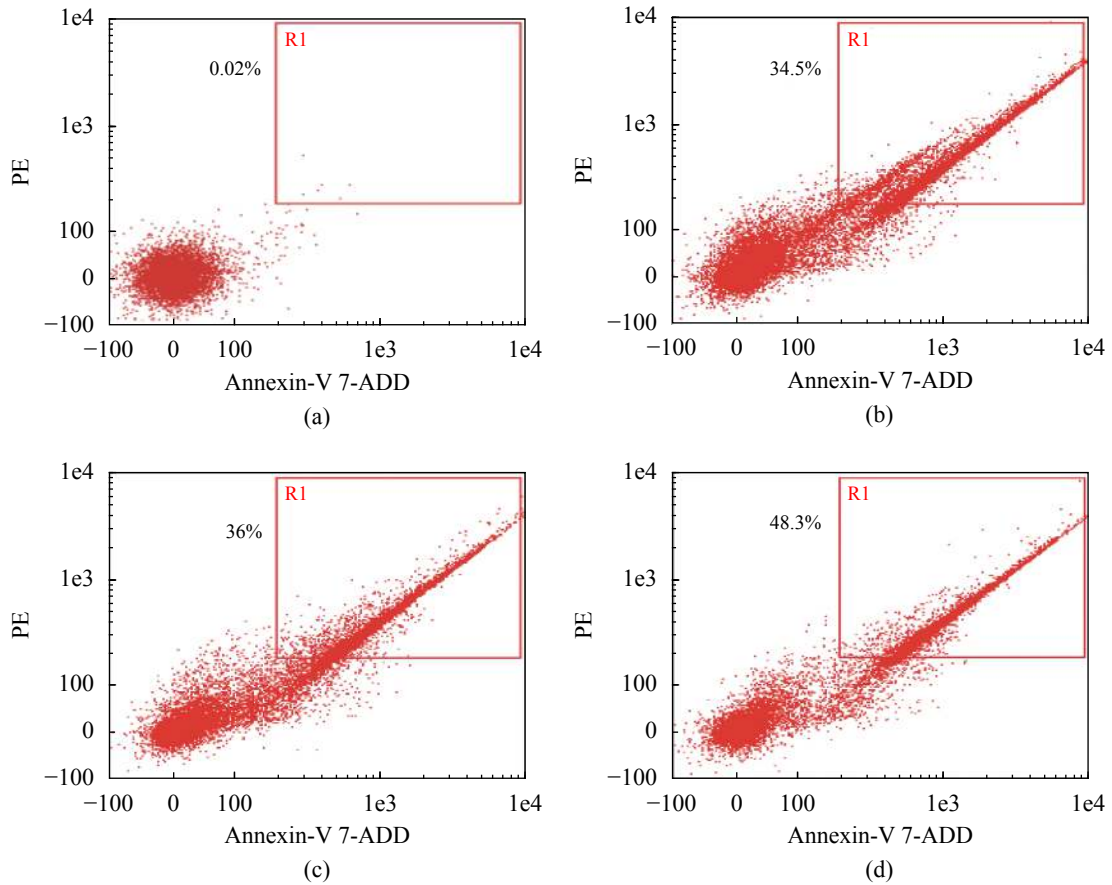


图4 与病原菌共培养后的细胞凋亡率

(a)对照组; (b)副溶血性弧菌组; (c)溶藻弧菌组; (d)哈维氏弧菌组

Fig. 4 Apoptosis rate after co-culture with pathogens

(a) control group; (b) *V. parahaemolyticus* group; (c) *V. alginolyticus* group; (d) *V. harveyi* group

表3 致病菌的人工感染实验结果

Tab. 3 Results of artificial infection of pathogenic bacteria

| 组别 group | 死亡数 death number | 实验鱼 数量/尾 number of trials | 平均死 亡率/% average mortality |
|---|------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| 1号菌(副溶血性弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>) | 15±2 | 20 | 75±10 |
| 3号菌(溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>) | 19±1 | 20 | 95±5 |
| 6号菌(哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>) | 20 | 20 | 100 |
| 空白对照组 blank control | 6±1 | 20 | 30±5 |

本实验中筛选所得病原菌为半滑舌鳎溃疡病高致病性菌株。

3 讨论

本实验分别从患溃疡病半滑舌鳎的肠道和体表病灶取样进行致病菌的分离筛选, 经溶血活性、细胞水平毒性实验筛选获得3株活性较强的潜在致病菌, 且3种病原菌单独回感后均能导

<http://www.scxuebao.cn>



图5 自然感染及人工回感致病菌的半滑舌鳎

(a)自然感染致病菌的半滑舌鳎; (b)人工回感致病菌的半滑舌鳎

Fig. 5 *C. semilaevis* of natural infection and artificial re-pathogenic bacteria

(a) *C. semilaevis* of natural infection bacteria; (b) *C. semilaevis* of artificial re-pathogenic bacteria

致半滑舌鳎体表溃疡, 可以初步确定半滑舌鳎溃疡病可能由多种高致病性弧菌所致。

弧菌为革兰氏阴性菌, 其菌体短小呈弧形, 弧菌属在海水中分布广泛^[19], 由弧菌引起鱼类的疾病较多。涂志刚等^[20]对网箱养殖的卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*)“烂身病”的病原菌进行分离, 经鉴定确定病原菌为哈维氏弧菌; 苗鹏飞等^[21]对

广东湛江市养殖的患病罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)的病原菌进行分离得到溶藻弧菌;陈加贝等^[22]对舟山市毛蚶(*Scapharca subcrenata*)的创伤弧菌进行检测,发现夏季创伤弧菌为污染高峰时期。上述研究均表明,目前水产养殖中高致病性弧菌仍是导致水产动物发病的主要病原菌。本实验从溃疡病半滑舌鳎的肠道分离得到的3株致病性较强的病原菌均为弧菌,并从细胞和个体水平对其致病性进行了测定,从而证实了导致半滑舌鳎溃疡病的主要病原菌为高致病性弧菌,与上述研究结果相一致。

细胞培养技术具有周期短、操作简单等优点,现已成为研究病原与宿主相互关系以及判断某物质对细胞作用效果的重要手段。陈瑞花等^[23]为研究布鲁氏菌(*Brucella* spp.)的外膜蛋白PB26对细胞的毒性,分别采用PB26缺失菌株和PB26蛋白与细胞进行共培养,观察细胞形态以及贴壁状况,并对IL-6、TNF- α 和LDH等表达量进行检测,得出了PB26蛋白能引起HTP-8细胞的炎症,对此细胞具有毒性的结论。余庆等^[24]为研究溶藻弧菌对卵形鲳鲹的毒性,将弧菌的胞外产物与半滑舌鳎的头肾细胞共培养24 h,测定胞外产物对共培养的头肾细胞的毒性。本实验中为确定从半滑舌鳎筛选到的3株病原菌的毒性强弱,将病原菌与半滑舌鳎的肠道上皮细胞共培养12 h,测定共培养后细胞的免疫基因IL-10、IL-1 β 、IL-8及TNF- α 的表达量,4种基因在生物免疫调节中均发挥着重要作用,其上调或下调与机体受外界刺激后的免疫强弱相关,因此,本实验对这4种免疫因子表达量进行了测定,以探究3种病原菌对细胞刺激后引起的免疫应答反应。其中IL-10为抑炎性细胞因子,具有限制肠上皮细胞对致病菌的免疫应答和维持共生细菌稳态的作用,测定结果表明,所筛选的潜在致病菌在不同程度上引起了肠道上皮细胞的免疫应答反应。其中哈维氏弧菌组的肠道上皮细胞IL-10表达量极显著上调,表明哈维氏弧菌刺激后导致肠道上皮细胞产生了较强的炎症反应,细胞通过增加抑炎因子表达量来应对由病原菌导致的炎症反应,从基因水平证明哈维氏弧菌可能具有较强的致病性,哈维氏弧菌的人工回感实验结果也支持了这一结论。IL-8又被称为炎性趋化因子CXCL8,通过吸引并激活中性粒细胞导致局部炎症从而达到杀菌的作用。TNF- α 因可以

在体内抑制并杀伤肿瘤细胞而得名。除了能使肿瘤细胞发生出血性坏死外,TNF- α 还可以参与机体炎性反应和免疫应答的调节作用^[25],3组致病菌组肠道上皮细胞的TNF- α 与IL-8表达量变化一致,均明显上调,且TNF- α 上调幅度大于IL-8,表明3种病原菌对肠道上皮细胞均产生了较强的免疫刺激反应,但3种病原菌的致病性与TNF- α 和IL-8表达量之间无明显相关性。IL-1 β 是炎症反应中的重要因子,常被当作免疫刺激发生的阳性标志。IL-1 β 在哈维氏弧菌组中表达量与空白组无明显差异,而溶藻弧菌组和副溶血性弧菌组中IL-1 β 明显低于对照组。总体分析各不同处理组中,3种病原菌刺激了肠道上皮细胞产生了不同程度的免疫应答反应,但4种免疫因子表达量与3种病原菌致病性之间没有呈现一定的规律性。通过对与病原菌共培养的细胞凋亡率的测定,初步确定了3种病原菌细胞毒性的强弱依次为哈维氏弧菌、副溶血性弧菌、溶藻弧菌,后期的病原菌对半滑舌鳎的人工回感实验结果与细胞水平的结果一致,表明采用细胞与病原菌共培养的方法用于判断致病菌对宿主毒性高低在一定程度上具有可行性。

参考文献:

- [1] 李凯,李鲁晶. 2017年鲆鲽鱼养殖生产形势特点及建议[J]. *河北渔业*, 2018(3): 19-21.
Li K, Li L J. Characteristics and recommendations of the flatfish breeding and production situation in 2017[J]. *Hebei Fishery*, 2018(3): 19-21(in Chinese).
- [2] 张正. 养殖半滑舌鳎常见疾病的病理学观察与感染微生物生态分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
Zhang Z. Study on histopathology and infectious microecology of common diseases in cultured half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther)[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012 (in Chinese).
- [3] 胡璇,孙敬锋,陈成勋,等. 养殖半滑舌鳎腹水病的病原分离鉴定及药物敏感性分析[J]. *天津农学院学报*, 2014, 21(3): 12-16.
Hu X, Sun J F, Chen C X, et al. Isolation and identification of pathogen of ascites disease from *Cynoglossus semilaevis* Günther and its antibiotic sensitivity analysis[J]. *Journal of Tianjin Agricultural College*, 2014, 21(3): 12-16(in Chinese).

- [4] 徐晓丽, 尤宏争, 宋昀鹏, 等. 半滑舌鳎腹水症病原的分离鉴定[J]. *东北农业大学学报*, 2015, 46-48(3): 74-80.
Xu X L, You H Z, Song Y P, *et al.* Isolation and identification of pathogenic bacterium associated with ascites in *Cynoglossus semilaevis*[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2015, 46-48(3): 74-80(in Chinese).
- [5] 周红霞, 姚俊杰, 房文红, 等. 半滑舌鳎溃疡病原杀鲑气单胞菌的分离鉴定与药敏试验[J]. *海洋渔业*, 2017, 39(3): 322-330.
Zhou H X, Yao J J, Fang W H, *et al.* Isolation and identification & antimicrobial susceptibility test of *Aeromonas salmonicida* associated with the skin ulceration disease of *Cynoglossus semilaevis* Günther[J]. *Marine Fisheries*, 2017, 39(3): 322-330(in Chinese).
- [6] 高桂生, 张艳英, 张召兴, 等. 半滑舌鳎皮肤溃疡病的病原分离鉴定与药物敏感性分析[J]. *中国兽医学报*, 2016, 36(4): 595-599.
Gao G S, Zhang Y Y, Zhang Z X, *et al.* Isolation and identification of pathogen of skin ulcer from *Cynoglossus semilaevis* and analysis of antibiotic sensitivity[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2016, 36(4): 595-599(in Chinese).
- [7] 徐晓丽, 邵蓬, 李贺密, 等. 半滑舌鳎体表溃疡病病原的分离鉴定[J]. *中国海洋大学学报*, 2015, 45(11): 29-35.
Xu X L, Shao P, Li H M, *et al.* Isolation and identification of the pathogens of the skin ulceration disease of *Cynoglossus semilaevis*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2015, 45(11): 29-35(in Chinese).
- [8] Sarookhani M R, Ayazi P, Alizadeh S, *et al.* Comparison of 16S *rDNA*-PCR amplification and culture of cerebrospinal fluid for diagnosis of bacterial meningitis[J]. *Iranian Journal of Pediatrics*, 2010, 20(4): 471-475.
- [9] 熊静, 关瑞章, 郭松林, 黄文树, 关淑芳. 不同方法提取鳎鳎病原菌DNA模板的差异分析[J]. *集美大学学报(自然科学版)*, 2012, 17(3): 161-166.
Xiong J, Guan R Z, Guo S L, *et al.* Differentiation analysis of the templates DNA extracted by different methods from three pathogenic bacteria strains of eels[J]. *Journal of Jimei University (Natural Science)*, 2012, 17(3): 161-166(in Chinese).
- [10] 刘肖峰, 陈松林, 沙珍霞, 等. 云纹石斑鱼心脏细胞系的建立与鉴定[J]. *农业生物技术学报*, 2015, 23(10): 1394-1400.
Liu X F, Chen S L, Sha Z X, *et al.* Establishment, characterization of a new cell line from heart of kelp bass (*Epinephelus moara*)[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2015, 23(10): 1394-1400(in Chinese).
- [11] 姚仕彬, 叶元土, 蔡春芳, 等. 草鱼肠道黏膜上皮细胞的分离与原代培养[J]. *上海海洋大学学报*, 2013, 22(1): 33-41.
Yao S B, Ye Y T, Cai C F, *et al.* Dissociation and primary culture of *Ctenopharyngodon idellus* intestinal epithelial cells[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2013, 22(1): 33-41(in Chinese).
- [12] 骆源, 张春晓, 王玲, 等. 斜带石斑鱼肝细胞分离及原代培养方法的建立[J]. *水产学报*, 2016, 40(4): 558-565.
Luo Y, Zhang C X, Wang L, *et al.* Study on the isolation and primary culture of hepatocytes from liver of grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(4): 558-565(in Chinese).
- [13] 王梦珣, 朱鹤, 王玉珏, 等. 斑石鲷肌肉、脑细胞系的建立与生物学特性[J]. *中国海洋大学学报*, 2018, 48(6): 67-74.
Wang M X, Zhu H, Wang Y Y, *et al.* Establishment and characterization of two cell lines derived from spotted knifejaw *Oplegnathus punctatus* muscle and brain[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2018, 48(6): 67-74(in Chinese).
- [14] 方苹, 丁彩霞, 吴亚锋, 等. 鲢鱼、鳙鱼源鲁氏耶尔森氏菌的分离鉴定及系统发育分析[J]. *淮海工学院学报(自然科学版)*, 2017, 26(2): 84-87.
Fang P, Ding C X, Wu Y F, *et al.* Isolation and identification and phylogenetic analysis of *Yersinia ruckeri* from silver carp and bighead[J]. *Journal of Huaihai Institute of Technology (Natural Science Edition)*, 2017, 26(2): 84-87(in Chinese).
- [15] 赵凤娇. 大菱鲆白便病病原、病理及防治研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2014.
Zhao F J. The study of pathogen, pathology and prevention on turbot with white stool[D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2014 (in Chinese).
- [16] 覃初斌. 干酪乳杆菌对斑马鱼抵御气单胞菌感染的分子机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
覃初斌. 干酪乳杆菌对斑马鱼抵御气单胞菌感染的分子机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2017.

- Qin C B. The molecular mechanism of *Lactobacillus casei* resistance against *Aeromonas* infection in zebrafish[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2017 (in Chinese).
- [17] 侯红红, 苗亮, 李多云, 等. 大黄鱼(*Larimichthys crocea*)白细胞介素10(IL-10)基因克隆及溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)感染后表达变化分析[J]. *海洋与湖沼*, 2018, 49(6): 1334-1340.
- Hong H H, Miao L, Li M Y, et al. Cloning of Interleukin-10 (IL-10) gene from large yellow croaker *Larimichthys crocea* and the expression pattern analysis on *Vibrio alginolyticus* infection[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2018, 49(6): 1334-1340(in Chinese).
- [18] 王冕柱, 邬彩虹, 陈吉. 溃疡性结肠炎患者血清IL-1 β 、TNF- α 和IL-10的表达及其意义[J]. *国际消化病杂志*, 2009, 29(5): 362-364.
- Wang M Z, Wu C H, Chen J. The expression and significance of IL-1 β and TNF- α and IL-10 in the serum of patients with ulcerative colitis[J]. *International Journal of Digestive Diseases*, 2009, 29(5): 362-364(in Chinese).
- [19] 张晓华, 林禾雨, 王晓磊, 等. 弧菌在海洋有机碳循环中的重要作用[J]. *中国科学: 地球科学*, 2018, 61(10): 1357-1368.
- Zhang X H, Lin H Y, Wang X L, et al. Significance of *Vibrio* species in the marine organic carbon cycle-a review[J]. *Science China: Earth Sciences*, 2018, 61(10): 1357-1368.
- [20] 涂志刚, 崔婧, 严耿杰, 等. 网箱养殖卵形鲳鲹“烂身病”病原分离鉴定及药敏分析[J]. *水产科学*, 2018, 37(5): 634-639.
- Tu Z G, Cui J, Yan G J, et al. Isolation, identification and antibiotic sensitivity of bacterial pathogen in ovate pompano *Trachinotus ovatus* with rot body disease in deep-sea cage aquaculture[J]. *Fisheries Science*, 2018, 37(5): 634-639(in Chinese).
- [21] 苗鹏飞, 杨映, 谭淑雯, 等. 罗氏沼虾致病性溶藻弧菌的鉴定及药敏分析[J]. *水产科学*, 2018, 37(3): 384-388.
- Miao P F, Yang Y, Tan S W, et al. Identification and antibiotic susceptibility of pathogenic bacterium *Vibrio alginolyticus* from diseased giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Fisheries Science*, 2018, 37(3): 384-388(in Chinese).
- [22] 陈加贝, 王虹玲, 罗红宇, 等. 舟山市毛蚶中创伤弧菌的污染分布及特征[J]. *中国卫生检验杂志*, 2018, 28(10): 1184-1187, 1192.
- Chen J B, Wang H L, Luo H Y, et al. Pollution distribution and characteristics of *Vibrio vulnificus* in *Anadara subcrenata* from Zhoushan[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2018, 28(10): 1184-1187, 1192(in Chinese).
- [23] 陈瑞花, 张辉, 唐利燕, 等. 布鲁氏菌外膜蛋白BP26细胞毒性作用的研究[J]. *中国农业科学*, 2012, 45(16): 3406-3413.
- Chen R H, Zhang H, Tang L Y, et al. Study on cytotoxicity of outer membrane protein BP26 of *Brucella*[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(16): 3406-3413(in Chinese).
- [24] 余庆, 李菲, 王一兵, 等. 广西北部湾大宗海水养殖鱼类卵形鲳鲹感染溶藻弧菌及其致病性研究[J]. *广西科学*, 2018, 25(1): 68-73.
- Yu Q, Li F, Wang Y B, et al. Isolation, identification and pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* from marine cultured *Trachinotus ovatus* in Beibu Gulf, Guangxi[J]. *Guangxi Sciences*, 2018, 25(1): 68-73(in Chinese).
- [25] 陈传悦. 微囊藻毒素microcystin-LR对斑马鱼组织病理损伤和免疫调节的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
- Chen C Y. Pathological damage and immunomodulatory effects in zebrafish exposed to microcystin-LR[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016 (in Chinese).

Isolation and identification of pathogens of ulcer disease in *Cynoglossus semilaevis*

LI Wenyue, ZUO Zhihan*, ZHANG Jingjing, SHANG Bijiao, SUN Jinsheng

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

Abstract: In this study, 40 bacterial strains were isolated from the intestinal tract and surface lesions of the diseased *Cynoglossus semilaevis* with 2216E and TCBS medium. The hemolytic activity of the strains was tested, and three strains i.e. *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus* with the strongest hemolysis activity were screened and identified as the three potential pathogenic strains *in vitro*. By co-culturing the three kinds of potential pathogenic bacteria with the intestinal epithelial cells of the healthy *C. semilaevis*, the relative expression of the immune genes and the apoptosis rate of the intestinal epithelial cells after co-culture were detected separately to evaluate the pathogenicity of these strains at the cellular level. The results showed that the expression of interleukin-10 gene (*IL-10*) in intestinal epithelial cells was significantly up-regulated after being stimulated with *V. harveyi*, suggesting that *V. harveyi* elicited the most intense immune response after co-culturing, and the apoptosis rate of the intestinal epithelial cells after co-culture with *V. harveyi*, *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus* was 48.3%, 36% and 34.5%, respectively. It is speculated that *V. harveyi* is a highly pathogenic strain of *C. semilaevis* ulcer disease. Finally, the results of the artificial infection showed that the mortality rates of *V. harveyi*, *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus* were 100% and 95% and 75% respectively on the sixth day after artificial re-infection of *C. semilaevis*, which is consistent with the results of the cellular level test. The study indicated that the three *Vibrio* strains screened in this experiment had strong toxicity and pathogenicity, especially the pathogenicity of *V. harveyi* was the strongest, and it is speculated that *C. semilaevis* ulcer disease may be caused by co-infection of various pathogenic bacteria.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; ulcer disease; pathogenic bacteria; separation and identification; cell apoptosis; immune gene

Corresponding author: ZUO Zhihan. E-mail: zhihanzuo@163.com

Funding projects: Tianjin Development Program for Innovation and Entrepreneurship Team (ITTFRS2017007); Program for Innovative Research Team in University of Tianjin (TD13-5076)