

• 研究简报 •

河流弧菌对石斑鱼体表黏液的黏附作用

赵敏慧¹, 邹文政¹, 鄢庆彬¹, 陈强², 庄峙厦³, 王小如³

(1. 集美大学 水产学院, 福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室, 福建 厦门 361021; 2. 中国海洋大学 水产学院, 山东 青岛 266003; 3. 国家海洋局 第一海洋研究所, 山东 青岛 266061)

摘要: 采用 ³H-TdR 同位素示踪法研究了河流弧菌 (*Vibrio fluvialis*) TS-1 对青石斑鱼 (*Epinephelus awoara*) 表皮黏液的黏附作用。研究结果显示, 经 TSB 培养的河流弧菌对青石斑鱼表皮黏液的黏附作用极显著高于经 TSA 培养的河流弧菌 ($P<0.01$); 河流弧菌经 TSB 培养后能很好地黏附于青石斑鱼表皮黏液, 其黏附量随菌浓度升高而增大并符合饱和黏附动力学特征; 不同生长阶段河流弧菌的黏附能力不同, 在培养初期阶段细菌的黏附量先是随着培养时间的延长而增大, 并在培养 24 h 后黏附量达到最大, 而后随培养时间的延长其黏附量急剧下降。本实验研究结果表明, 河流弧菌对青石斑鱼表皮黏液有较强的黏附作用, 其黏附作用受细菌培养条件、营养状况等自身因素的显著影响。本研究结果有助于了解河流弧菌的流行病学和致病机理。[中国水产科学, 2008, 15(2): 347-351]

关键词: 河流弧菌; 青石斑鱼; 体表黏液; 黏附

中图分类号: S942

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)02-0347-05

青石斑鱼 (*Epinephelus awoara*) 肉质鲜嫩, 营养丰富, 是经济价值较高的海产鱼类之一。近年来, 随着石斑鱼养殖规模不断扩大, 其病害的发生和流行也日趋频繁。其中河流弧菌 (*Vibrio fluvialis*) 是引起青石斑鱼弧菌病的主要病原之一^[1]。河流弧菌是 1 种可常见于海水养殖动物中的嗜盐性致病菌^[2], 具有较强的致病性, 能引起多种养殖动物的疾病^[3]。

黏附作用是细菌感染的第一步, 它对细菌侵入宿主细胞并有效发挥毒素作用具有重要意义^[4]。鱼类体表是病原弧菌主要的侵入位点之一, 其覆盖一层由外胚层球状细胞分泌的黏液层^[5]。病原菌只有先黏附于鱼类的体表黏液, 才能进一步侵染机体感染致病, 因此对黏液的黏附能力的研究是病原菌毒力研究的一个重要方面^[4,6]。研究病原菌对体表黏液的黏附作用对于了解病原菌对鱼类的致病机理具有重要的意义。目前国内外对水产病原弧菌的黏附动力学^[7], 环境因素及益生菌对弧菌黏附作用的影响^[8-9]等已经开展了一些研究, 证明病原菌、宿主体表黏液和环境因素是影响黏附作用的三大要素^[8-9], 但是已有的

对黏附作用的研究都侧重于理化因子和益生菌对黏附作用的影响以及细菌的黏附动力学, 而着重从病原菌的角度探讨其黏附特性的研究尚未见报道。

本实验以病原性河流弧菌为研究对象, 从病原菌培养条件、生长阶段、表面抗原、细菌浓度等方面探讨其对青石斑鱼体表黏液黏附作用的影响, 以期了解病原菌的黏附特性, 为进一步探讨河流弧菌对青石斑鱼的致病机理以及疾病的防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 青石斑鱼体表黏液制备

20 尾体质量 300~500 g 的健康青石斑鱼购自厦门某养殖渔排。参考 Balebona 等^[10]的方法制备体表黏液, 具体步骤如下: 用钝塑料片刮取青石斑鱼体表背部黏液, 然后放入灭菌海水中混匀; 4℃、20 000 g 离心 2 次, 每次 30 min, 以去除颗粒物质; 然后依次用 0.45 μm、0.22 μm 微孔滤膜过滤上清液除菌。用 Bradford 的方法^[11]测定所制备黏液的蛋白含量, 将蛋白含量调整到 1 mg/mL 后, 4℃保存备用。

收稿日期: 2007-04-12; **修订日期:** 2007-09-19.

基金项目: 国家 863 计划项目 (2007AA09Z115); 福建省科技项目 (2006F5066); 福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室开放基金 (2007J101).

作者简介: 赵敏慧 (1983-), 女, 硕士研究生, 主要从事水产动物病害研究. E-mail: zmhzh-007@163.com

通讯作者: 鄢庆彬. E-mail: yanqp@jnm.edu.cn

1.2 实验菌株的培养与放射性标记

致病性河流弧菌 (TS-1) 分离自患病青石斑鱼^[1], 保存于本实验室的 -80°C 超低温冰箱。河流弧菌接种于含 2% NaCl 的胰蛋白胨大豆培养液 (TSB) 和胰蛋白胨大豆琼脂 (TSA) 斜面, 每 mL 培养基加入 $10\ \mu\text{L}\ 1\ \text{mCi/mL}\ ^3\text{H}$ -胸腺嘧啶核苷 (^3H -TdR, 中科院应用物理研究所), 25°C 培养 12 h。经 TSA 斜面培养的河流弧菌用 0.85% 无菌生理盐水洗脱菌苔, 4°C 、 $2\ 000\ \text{g}$ 离心 10 min 收集菌体; 经 TSB 培养的河流弧菌直接于 4°C 、 $2\ 000\ \text{g}$ 离心 10 min 收集菌体, 然后以 0.85% 无菌生理盐水清洗 2 次, 根据 OD_{610} 值将菌浓度调整到 $10^8\ \text{cells/mL}$ 左右待用, $\text{OD}_{610} \approx 0.1$ 。

1.3 标记菌的放射活性测定

将标记的菌悬液 ($10^8\ \text{cells/mL}$) 进行 2 倍系列稀释 7 次, 取各稀释度菌液 $150\ \mu\text{L}$ 用液体闪烁计数器 (BECKMAN COULTER LS6500) 测定放射活性 (DPM), 以 $150\ \mu\text{L}$ 含有 1% SDS 和 $0.1\ \text{mol/L}$ NaOH 的溶液作为空白对照。

1.4 体外黏附实验

参考 Yan 等^[12] 的方法进行黏附实验: 在 96 孔酶标板各孔加入 $150\ \mu\text{L}$ 制备的青石斑鱼体表黏液, 4°C 包被 18 h 后弃去残留黏液, 用 $200\ \mu\text{L}$ 生理盐水清洗 2 次; 取 TSB 和 TSA 培养的标记河流弧菌, 将菌浓度调整至 $1 \times 10^8\ \text{cells/mL}$ 左右, 加入 $150\ \mu\text{L}$ 放射性标记菌, 25°C 孵育 90 min; 然后用生理盐水清洗 2 次除去未黏附的菌; 加入 $150\ \mu\text{L}$ 含有 1% SDS 和 $0.1\ \text{mol/L}$ NaOH 的溶液, 60°C 保温 1 h 后回收黏附的菌体; 将回收液加入 20 mL 闪烁瓶中, 测定前 12 h 加入 10 mL 闪烁液 [6 g/L 2,5-二苯基噁唑 (PPO, Sigma), $0.1\ \text{g/L}$ 1,4-双-(5-苯基噁唑基-2)-苯 (POPOP, 中科院应用物理研究所) 溶于二甲苯、无水乙醇混合液 (体积比 3:2) 中], 测定 DPM, 以 $150\ \mu\text{L}$ 含 1% SDS 的 $0.1\ \text{mol/L}$ NaOH 的溶液为空白对照。

1.5 河流弧菌的黏附动力学实验

按 1.2 方法用 TSB 制备菌悬液, 2 倍稀释 7 次, 按 1.4 的方法进行黏附实验, 测定不同浓度河流弧菌对石斑鱼表皮黏液的黏附情况。

1.6 抗体处理后河流弧菌的黏附实验

取兔抗河流弧菌 O 抗原血清 (本实验室制备, 凝集效价为 $1:2\ 560$) $100\ \mu\text{L}$ 加入到 $900\ \mu\text{L}\ 1 \times 10^8\ \text{cells/mL}$ 放射标记的菌悬液中, 在 25°C 下孵育 30 min, 离心后用无菌生理盐水清洗 2 次, 按 1.4 方

法进行黏附实验, 以 $100\ \mu\text{L}$ 生理盐水代替抗血清加入到 $900\ \mu\text{L}$ 河流弧菌中同法处理作为对照。

1.7 不同培养阶段河流弧菌的黏附实验

将已活化的河流弧菌接种于含 ^3H -TdR 的 2% NaCl 的 TSB 中, 分别培养 5 h、7 h、12 h、24 h、36 h、72 h 后按 1.2 方法离心收集菌体, 将菌浓度调至 $1 \times 10^8\ \text{cells/mL}$ 左右, 按 1.4 的方法进行黏附实验。

1.8 数据处理

每个处理均设 3 组平行, 结果以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm \text{SD}$) 表示, 用 EXCEL、SPSS 进行统计学分析。当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

2 结果与分析

2.1 标记菌的放射活性与细菌数量的关系

用添加 ^3H -TdR 的 TSA 和 TSB 培养基培养河流弧菌, 其放射活性 (y) 随细菌数量 (x) 的增加而增大, 两者之间存在线性关系 (TSA: $y = 0.7009x - 1.1386$, $R^2 = 0.9873$; TSB: $y = 0.8270x - 1.9836$, $R^2 = 0.9874$; 图 1)。通过测定黏附细菌的放射活性可反映细菌的黏附量。经 TSA 培养进行放射性标记的河流弧菌, 其最低检测限为 $5.36 \times 10^4\ \text{cells}$; 而经 TSB 培养进行放射性标记的河流弧菌, 其最低检测限为 $1.07 \times 10^5\ \text{cells}$ 。

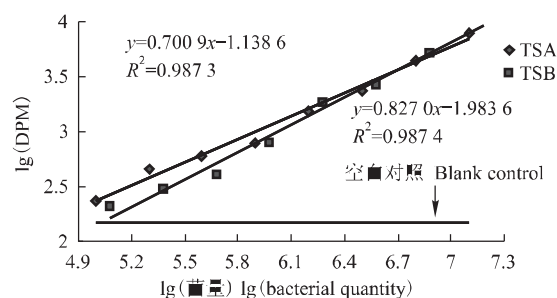


图 1 标记菌的放射活性与菌量的关系

DPM: 放射性

Fig.1 Relationship between radioactivity and bacterial quantity

DPM: radioactivity

2.2 不同培养条件对河流弧菌黏附作用的影响

河流弧菌对石斑鱼体表黏液的黏附作用随不同培养条件而异 (图 2), 在菌液浓度同为 $10^8\ \text{cells/mL}$ 条件下, 经 TSB 培养的河流弧菌对青石斑鱼体表黏液的黏附量为 $3.81 \times 10^6\ \text{cells/孔}$, 高于经 TSA 培养的河流弧菌的黏附量 ($6.91 \times 10^5\ \text{cells/孔}$), 两者存在极显著差异 ($P < 0.01$)。

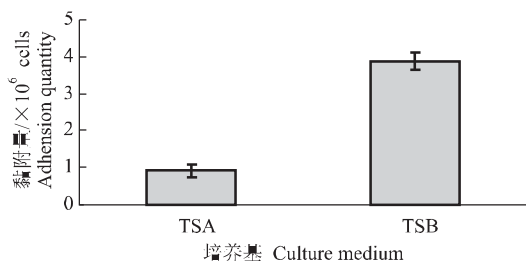


图2 不同培养基培养的河流弧菌对青石斑鱼表皮黏液的黏附作用

Fig. 2 Adhesion of *Vibrio fluvialis* cultured in different culture mediums to skin mucus of *Epinephelus awoara*

2.3 菌浓度对河流弧菌黏附作用的影响

河流弧菌对青石斑鱼体表黏液的黏附量随菌浓度的升高而增大,在菌浓度较低时,其黏附量增加幅度比较大;高浓度时其黏附量增加幅度较为缓慢,并逐渐有趋于饱和之势(图3),加入菌量(x)与黏附菌量(y)的拟合曲线方程为: $y=995\ 675\ln x-1\times 10^7$, $R^2=0.972\ 7$ 。由于黏附过程趋于平衡,所以该过程中的分离常数(k_x)被定义为 $k_x=(k-1)/(k+1)=(e-e_x)x/e_x^{[13]}$, e 表示黏液中的黏附位点数, e_x 则表示黏附到黏附位点上的细菌, $(e-e_x)$ 表示空余黏附位点的数量, x 表示添加菌的数量,当 x 比 e_x 大很多的时候, e_x 接近于 e_m (最大黏附量) $^{[13]}$,该公式经整理推导出 $1/e_x=1/e_m+k_x/e_mx$ 。用黏附细胞数量倒数与添加的菌数量倒数作图可以得到一个线性关系,由该线性关系可以得出细菌黏附的最大值 e_m 、分离常数 k_x 和黏附亲和力 e_m/k_x 分别为: 1.0×10^7 cells/孔、 $6.740\ 5\times 10^7$ cells/孔、 $0.148\ 4$ 。

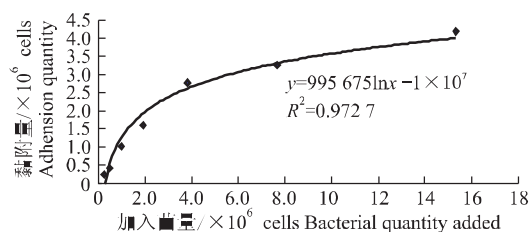


图3 河流弧菌的添加菌量与其黏附量的关系

Fig.3 Relationship between adhesion quantity and bacterial quantity added of *V. fluvialis*

2.4 抗体处理对河流弧菌黏附的影响

经兔抗河流弧菌O抗体处理后,河流弧菌的黏附量为 6.14×10^5 cells/孔,比对照组的 $1.28\times$

10^6 cells/孔下降了52%(图4),经t检验,O抗体处理组与生理盐水对照组的黏附量存在极显著差异($P<0.01$)。

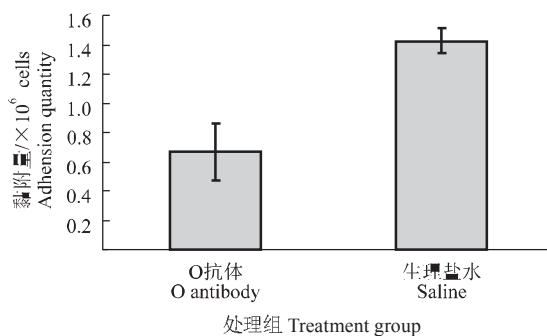


图4 O抗体处理对河流弧菌的黏附作用的影响

Fig.4 Effect of O antibody treatment on the bacterial adhesion of *Vibrio fluvialis*

2.5 不同培养阶段对河流弧菌黏附作用的影响

由图5可见,河流弧菌在培养5 h时,其黏附量为 1.79×10^6 cells/孔;随着培养时间的延长,其对黏液的黏附量逐渐升高,大约在培养24 h时,菌黏附量达最大,为 8.46×10^6 cells/孔。当培育时间延长至36 h以上时,细菌的黏附量急剧下降。

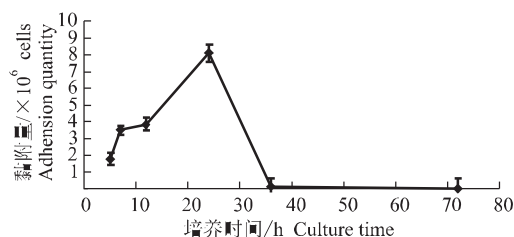


图5 不同培养阶段河流弧菌的黏附作用

Fig.5 Adhesion of *V. fluvialis* at different culture time

3 讨论

经TSB培养的河流弧菌对青石斑鱼体表黏液的黏附量高于经TSA培养的河流弧菌,这可能是由于在TSB培养基中培养的河流弧菌在溶液中的运动性高于在TSA培养基上培养的河流弧菌,而细菌的运动能力是决定其黏附性的一个重要因素 $^{[14]}$ 。研究表明,许多弧菌在液体培养基中形成端鞭毛,在固体培养基上形成侧鞭毛,而端鞭毛的运动性强于侧鞭毛 $^{[15]}$,由此可解释液体培养基所培养的细菌运动能力更强。由于在TSB中培养的河流弧菌

对青石斑鱼体表黏液的黏附能力较强,因此,本研究其余实验皆采用 TSB 培养的河流弧菌。

河流弧菌对青石斑鱼体表黏液的黏附作用属于饱和黏附,这表明青石斑鱼体表黏液的黏附位点或受体是有限的,并且河流弧菌对其黏附能够达到饱和。这与 Chabrilón 等^[16]研究的鳗李斯特菌(*Listonella anguillarum*)对金头鲷(*Sparus aurata*)黏液的黏附动力学特点相一致。本实验所测得的河流弧菌黏附量最大值(e_m)为 3.82×10^6 cells/孔,大大高于鳗李斯特菌对同等浓度金头鲷体表黏液的最大黏附量(2.16×10^4 cells/孔)^[16],这说明在青石斑鱼体表黏液中河流弧菌的黏附受体多,因而黏附量较大。

病原菌通过细菌表面的黏附素与宿主相应受体相结合而发生黏附作用^[17]。河流弧菌经 O 抗血清处理后对青石斑鱼体表黏液的黏附量显著减少,是由于河流弧菌经 O 抗血清处理后,抗血清中的免疫球蛋白分子与河流弧菌的菌体抗原相结合,封闭了细菌表面的黏附素,从而降低了黏附作用。本研究结果说明在河流弧菌菌体表面存在着特异性的黏附素。

细菌表面成分主要含有脂多糖、蛋白质、肽聚糖等成分,这些成分都含有带负电荷的基团,有利于细菌对受体的吸附^[18]。细菌表面的组分和结构改变后,细胞的吸附能力将发生变化^[19]。不同生长阶段的细菌,表面成分的表达不同^[20]。已有研究表明,细菌的生长条件能影响细菌脂磷壁酸(LTA)和表面蛋白的合成,随着细菌生长的进程,LTA的合成增加,到稳定期合成的LTA量最多,因此在稳定期细菌对上皮细胞的黏附作用最强^[21]。本研究的结果也显示河流弧菌在稳定期时对青石斑鱼体表黏液的黏附量达到最大,而衰亡期的细菌黏附能力很弱。

由本研究的结果可以看出,河流弧菌对青石斑鱼体表黏液有较强的黏附作用;培养条件和菌浓度对黏附作用有显著影响;稳定期细胞的黏附作用最强,而衰亡期细菌的黏附能力很弱。有关河流弧菌对体表黏液黏附的行为机制值得进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 鄢庆彬,王军,苏永全,等. 网箱养殖青石斑鱼河流弧菌病研究[J]. 海洋科学,2001,25(10): 17-20.
- [2] Amel B K, Amine B, Amina B. Survival of *Vibrio fluvialis* in seawater under starvation conditions[J]. Microbiol Res, 2006(9): 1-6.
- [3] Maugeri T L, Caccamo D, Gualindolo D. Potentially pathogenic vibrios in brackish waters and mussels[J]. J Appl Microbiol, 2000, 89(2): 261-266.
- [4] Lee A, O' Rourke J L, Barrington P J, et al. Mucus colonization as a determinant of pathogenicity in intestinal infection by *Campylobacter jejuni*: a mouse cecal model[J]. Infect Immun, 1986, 51(2): 536-546.
- [5] Pickering A D. The distribution of mucous cells in the epidermis of the brown trout *Salmo trutta* (L.) and the char *Salvelinus alpinus* (L.) [J]. J Fish Biol, 1974, 6(2): 111-118.
- [6] Beachey E H. Bacterial adherence: adhesion-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces[J]. J Infect Dis, 1981, 143(3): 325-345.
- [7] Bordas M A, Balebona M C, Zorrilla I, et al. Kinetics of adhesion of selected fish-pathogenic *Vibrio* strains to skin musus of Gilt-Head Sea Bream[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(10): 3 650-3 654.
- [8] Chabrilón M, Arijó S, Rosales P, et al. Interference of *Listonella anguillarum* with potential probiotic microorganisms isolated from farmed gilthead seabream(*Sparus aurata* L.) [J]. Aquac Res, 2005, 37(1): 78-86.
- [9] 鄢庆彬,陈强,邹文政,等. 不同环境条件对溶藻弧菌黏附大黄鱼肠黏液的影响[J]. 水产学报, 2006, 4: 254-259.
- [10] Balebona M C, Andreu M J, Bordas M A, et al. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for cultured gilt-head sea bream(*Sparus aurata* L.) [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(11): 4 269-4 275.
- [11] Bradford N M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Annu Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [12] Yan Q, Chen Q, Ma S, et al. Characteristics of adherence of pathogenic *Vibrio alginolyticus* to the intestinal mucus of Large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) [J]. Aquaculture, 2007, 269: 21-30.
- [13] Lee Y K, Lim C Y, Teng W L, et al. Quantitative approach in the study of adhesion of Lactic Acid Bacteria to intestinal cells and their competition with *Enterobacterial*[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(9): 3 692-3 697.
- [14] Kogure K, Ikemoto E, Morisaki H. Attachment of *Vibrio alginolyticus* to glass surfaces is dependent on swimming

- speed[J]. J Bacteriol, 1998, 180 (4): 932-937.
- [15] Belas M R, Colwell R R. Adsorption kinetics of laterally and polarly flagellated *Vibrio* [J]. J Bacteriol, 1982, 151 (3): 1568-1580.
- [16] Chabrilón M, Bordas M A, Morinigo M A, et al. Kinetics of adhesion of *Listonella anguillarum* to the mucus of gilt-head seabream, and the implication of surface components[J]. Aquac Res, 2004, 35: 403-409.
- [17] 戴卓捷, 杨光明, 汪正清. 细菌黏附素的分子结构和装配机制 [J]. 微生物学免疫学进展, 2001, 29: 55-59.
- [18] Brierley C L. Metal immobilization using bacteria[M]. New York: McGraw-Hill Book Co, 1991: 303-324.
- [19] Wang L, Zhou Q. Comprehensive analysis of the variation of Cu^{2+} adsorption capacity by cell envelope of *P. putida* cell Age[J]. Enzym Microbial Technol, 2004 (5): 474-481.
- [20] 蒋虹, 胡宏, 尹一兵, 等. 双歧杆菌及其表面分子黏附体表上皮细胞的研究 [J]. 重庆医科大学学报, 1999, 24 (2): 126-129.
- [21] 尤萍, 马玉龙. 双歧杆菌对肠上皮细胞黏附作用的研究及应用展望 [J]. 饲料工业, 2004, 25 (4): 42-45.

Adhesion of *Vibrio fluvialis* to skin mucus of *Epinephelus awoara*

ZHAO Min-hui¹, ZOU Wen-zheng¹, YAN Qing-pi¹, CHEN Qiang², ZHUANG Zhi-xia³, WANG Xiao-ru³

(1. Fisheries College, Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 3. 1st Inst. of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266061, China)

Abstract: Adhesion of *Vibrio fluvialis* to skin mucus of *Epinephelus awoara* had been investigated by using [methyl-³H] thymidine as the isotope tracer. The results show that the adhesion ability of *Vibrio fluvialis* incubated in TSB is extremely stronger than that of *V. fluvialis* incubated on TSA ($P < 0.01$). The adhesion quantity of *V. fluvialis* to skin mucus of *E. awoara* increases with the densities of bacterial suspension, and the bacterial adhesion measures up to the saturation kinetics. After the bacteria were treated with rabbit antiserum against O-antigen of *V. fluvialis*, the number of adhering bacteria reduced by 52%. *V. fluvialis* at different culture stages showed different adhesion ability. At early growth stage, the number of adhering bacteria increased with incubation time and reached peak at 24 h, and then dropped sharply with the culture time after 24 h. The results indicate that *V. fluvialis* adheres to the skin mucus of *E. awoara* strongly by specific adhesion, and this kind of bacterial adhesion is remarkably influenced by culture conditions and nutrition level. These results are helpful for better understanding the characteristics of epidemiology and pathogenesis of *V. fluvialis*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (2): 347-351]

Key words: *Vibrio fluvialis*; *Epinephelus awoara*; skin mucus; adhesion

Corresponding author: YAN Qing-pi. E-mail: yanqp@jmu.edu.cn