

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.01023

间接 ELISA 法研究嗜水气单胞菌对鳗鲡表皮黏液的黏附特性

林桂芳¹, 鄢庆枇¹, 陈文博¹, 苏永全², 覃映雪¹

1. 集美大学 水产学院, 福建省高校水产科技与食品安全重点实验室, 福建 厦门 361021;

2. 厦门大学 海洋与地球学院, 福建 厦门 361005

摘要: 采用间接 ELISA 法研究菌浓度、孵育时间、温度、pH、阳离子及碳源等因子对嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)黏附鳗鲡(*Anguilla anguilla*)表皮黏液的影响。结果表明, 改良后的间接 ELISA 法的检测灵敏度约为 9.92×10^4 CFU, 细菌的黏附量随菌浓度的升高而逐渐增大并符合饱和黏附动力学方程: $y=0.135\ln(x)-0.936(R^2=0.986)$; 嗜水气单胞菌黏附鳗鲡表皮黏液的最佳条件为: 温度 20~28℃, pH 6.2~6.6, NaCl、MgCl₂ 质量浓度分别为 15~25 g/L 和 3 g/L, 孵育时间为 150 min。碳源对嗜水气单胞菌的黏附作用有不同程度的影响, 葡萄糖和麦芽糖能显著提高嗜水气单胞菌的黏附量($P<0.05$), 果糖则显著降低嗜水气单胞菌的黏附量($P<0.05$)。以上结果说明, 嗜水气单胞菌对鳗鲡表皮黏液具有较强的黏附作用, 且其黏附作用具有可控性。

关键词: 嗜水气单胞菌; 黏附; 间接 ELISA; 鳗鲡; 表皮黏液

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)05-1023-09

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)广泛分布于各种水体环境中, 被视为水产动物最常见的致病菌之一^[1-2], 不仅感染鳗鲡(*Anguilla anguilla*)等养殖鱼类^[3-5], 还可感染人类引起人肠胃炎、蜂窝组织炎和败血症等, 危害巨大^[6-7]。因此, 关于嗜水气单胞菌致病机理的研究一直受到高度关注, 而关于该菌感染宿主早期黏附特性和机制的研究也逐步受到重视。

近年来的研究已经证实, 黏附是致病菌感染宿主的第 1 个关键步骤, 致病菌通过黏附因子在宿主体表或特定组织定植, 使细菌得以增殖和发挥毒力^[8]。关于细菌黏附的研究已广泛开展和报道^[8-12], 但现有研究仍存在着一定的局限性。首先, 目前国内外普遍采用放射性标记^[13]和革兰氏染色法^[14]研究细菌对鱼类黏液的黏附, 这两种方法均存在不容忽视的缺陷。放射性标记法存在放射性威胁和计数不稳定等问题; 而革兰氏染色法

则存在误差大、繁琐耗时且不易区分具有相同革兰氏染色的细菌等不足。因此, 寻找一种高效、安全的方法研究细菌黏附具有重大意义。其次, 有关嗜水气单胞菌黏附的研究大都是以鲤(*Cyprinus carpio*)的黏液或 Hep-2 细胞作为黏附对象, 结果是否具有普遍性尚需更多的实验进行验证。最后, 细菌黏附受多种因子影响, 只有充分了解细菌黏附对理化因子的响应规律才能建立细菌黏附的体外模型, 这是进一步探索嗜水气单胞菌黏附机制的前提。

ELISA 技术因其特异性强、灵敏度高及易于推广普及等优点具有很高的应用前景, Blay 等^[15]将 ELISA 同放射性标记等方法进行比较, 研究细菌对宿主细胞的黏附作用, 认为 ELISA 在具备高质量及高特异性抗体的情况下是一种用于细菌黏附研究的快速、简便、重复性高的方法。此外, ELISA 的方法不使用放射性物质, 所以不存在安

收稿日期: 2013-01-16; 修订日期: 2013-04-09.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31272699); 福建省自然科学基金项目(2011J06014).

作者简介: 林桂芳(1988-), 女, 硕士研究生, 主要从事水产微生物研究. E-mail: grafang@163.com

通信作者: 覃映雪, 副教授. E-mail: yxqin@jmu.edu.cn

全性问题。

鳗鲡是中国出口的主要水产养殖品种之一,也是嗜水气单胞菌感染的重要宿主^[16-17],研究嗜水气单胞菌对鳗鲡表皮的黏附特性对疾病的防治具有重要意义。因此,本研究以分离自养殖鳗鲡的致病性嗜水气单胞菌为研究对象,采用改良后的间接 ELISA 法研究嗜水气单胞菌对鳗鲡表皮黏液的黏附特性,以揭示该菌黏附对外界理化因子的响应规律并建立该菌黏附的体外模型,为进一步揭示鳗鲡嗜水气单胞菌黏附及致病的机理提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验菌株及试剂

嗜水气单胞菌分离自患病鳗鲡,经实验证实是鳗鲡的致病菌,保存于本实验室的 -80°C 超低温冰箱。实验用鳗鲡($\sim 500\text{ g}$)购自集美水产品市场,鱼体健康,活力强,观察 24 h 后取体表黏液。主要试剂:OPD- H_2O_2 溶液由 A 液和 B 液混合而成,A 液为 0.1 mol/L 柠檬酸溶液,B 液为 0.2 mol/L Na_2HPO_4 溶液,临用前取 A 液 4.86 mL 与 B 液 5.14 mL 混合,再加入 OPD 4 mg 充分溶解后加入 $30\%(\text{V/V})\text{H}_2\text{O}_2$ $20\text{ }\mu\text{L}$ 即可。

抗血清:由本实验室参考常规方法^[18]制备,将灭活后的嗜水气单胞菌耳静脉注射免疫新西兰兔(购自上海实验兔养殖场),末次注射后 14 d 检测抗血清效价,达到 $1\ 2\ 560$ 以上即从颈动脉采血提取抗血清后分装保存于 -80°C 超低温冰箱。

1.2 鳗鲡表皮黏液制备

参考 Balebona 等^[19]的方法制备鳗鲡表皮黏液,即用钝塑料片刮取健康鳗鲡表皮背部及腹部黏液后放置 4°C 冰箱过夜,次日取出后用无菌 PBS 混匀, 4°C 、 $20\ 000\text{ g}$ 离心 2 次,每次 30 min,以去除颗粒状物质;上清依次用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 、 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌。表皮黏液蛋白浓度采用 Bradford 法^[20]测定并调整到 1 mg/mL 分装后保存于 -20°C 备用。

1.3 菌株培养及菌悬液制备

嗜水气单胞菌接种于 LB 培养基, 28°C 活化并

培养至对数期后 $4\ 000\text{ g}$ 离心 5 min 收集菌体,无菌 PBS 洗涤 2 次后制成 $\text{OD}_{550}\approx 0.2$ (约 10^8 CFU/mL)的菌悬液备用。

1.4 体外黏附及间接 ELISA 检测

体外黏附的方法参考文献[21]并稍作改进,即在 96 孔酶标板中按 $100\text{ }\mu\text{L/孔}$ 的量加入表皮黏液, 4°C 包被 18~20 h 后弃去残留黏液,再用 $200\text{ }\mu\text{L}$ 无菌 PBS 清洗 2 次后加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 菌悬液(约 10^8 CFU/mL),以无菌 PBS 作阴性对照,置于 28°C 孵育 150 min;孵育后用无菌 PBS 清洗 2 次以除去未黏附的细菌。参照鄢庆彬等^[22]经改良的间接 ELISA 法检测该菌黏附量:将清洗后的 96 孔酶标板上黏附的菌置于 60°C 烘干,并在同等条件下设置阳性对照($100\text{ }\mu\text{L}$ 菌液直接烘干);用 PBS-Tween 洗涤 3 次,每次 3 min;每孔加满小牛血清, 37°C 封闭 1 h,后用 PBS-T 洗涤 3 次;每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 的菌抗血清, 37°C 温育 1 h,后用 PBS-T 洗涤 3 次;每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ HRP-羊抗兔 IgG, 37°C 温育 1 h,后用 PBS-T 洗涤 4 次;每孔加入新配制的 OPD- H_2O_2 底物 $100\text{ }\mu\text{L}$,暗处室温反应 30 min;每孔加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ (2 mol/L) H_2SO_4 终止反应;测定 OD_{492} ,结果用 OD_{492} 表示。

1.5 OD_{492} 检测黏附的灵敏度

将菌浓度调至 $\text{OD}_{550}=0.2$ (平板菌落计数法计数的结果约为 $5.2\times 10^8\text{ CFU/mL}$)后依次进行 2 倍稀释 10 次,每个稀释度取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 菌悬液加入酶标板孔,每组做 6 个平行,以加入无菌 PBS 的孔为阴性对照孔,以不加任何试剂孔为空白对照孔。将酶标板置于 60°C 烘干使细菌固定于酶标孔中,其余步骤参照改良的间接 ELISA 法^[22]进行,并设定 $(\text{OD}_{492\text{ 样品}}-\text{OD}_{492\text{ 空白}})/(\text{OD}_{492\text{ 阴性对照}}-\text{OD}_{492\text{ 空白}})>2$ 者为阳性。最后以 OD_{492} 为纵坐标,以黏附的菌浓度(CFU/mL)对数值为横坐标作图。

1.6 理化因子对嗜水气单胞菌黏附的影响

1.6.1 菌浓度与黏附量的关系 制备菌悬液并调整菌浓度约 10^7 CFU/mL 后依次进行 2 倍稀释 6 次,然后按 1.4 的方法进行试验,比较不同菌浓度与黏液黏附量的关系。作出菌浓度(x)与黏附量(y)的

拟合曲线, 并参考 Lee 等^[23]提出的黏附动力学方程即 $1/e_x = 1/e_m + k_x/e_m x$ 分析细菌的黏附动力学, 其中 e_x 为黏附到黏液位点上的菌浓度, e_x 最大值即为 e_m , x 为添加的菌浓度, 以添加的菌浓度(CFU/mL)的倒数和结合到黏液上的菌浓度(CFU/mL)的倒数作图, 得出一元线性方程即黏附动力学方程, 其 y 轴、 x 轴截距分别为 $1/e_m$ 、 $-1/k_x$ ^[23]。由此计算出嗜水气单胞菌对鳗鲡表皮黏液的最大黏附量(e_m)和分离常数(k_x)。

1.6.2 孵育时间对黏附的影响 将孵育时间分别设定为 30、60、90、120、150、180、240 min, 按 1.4 的方法研究孵育时间对嗜水气单胞菌黏附的影响。

1.6.3 温度对黏附的影响 将孵育温度设定为 4、12、20、28、37、44℃。按 1.4 的方法进行试验, 研究温度对嗜水气单胞菌黏附的影响。

1.6.4 pH 对黏附的影响 制备初始 pH 分别为 5.8、6.2、6.6、7、7.4、7.8 的 PBS 溶液, 用于清洗、配制菌悬液, 然后按 1.4 的方法进行黏附试验, 比较不同 pH 对嗜水气单胞菌黏附的影响。

1.6.5 Na⁺对黏附的影响 用蒸馏水配置 0、5、15、25、35 g/L 的 NaCl 溶液并以此溶液制备菌悬液, 进行黏附试验, 比较不同 NaCl 浓度对嗜水气单胞菌黏附的影响。

1.6.6 Mg²⁺对黏附的影响 用 PBS 配制 1、3、6 g/L 的 MgCl₂ 溶液, 用于制备菌悬液, 以未加 MgCl₂ 的样品为对照组, 然后分别按 1.4 的方法进行试验, 比较 MgCl₂ 浓度对细菌黏附的影响。

1.6.7 碳源处理对黏附的影响 用无菌水配制质量浓度为 1 mg/mL 的葡萄糖、麦芽糖、α-乳糖、甘露醇、木糖、蔗糖、果糖等 7 种碳水化合物溶液, 分别加 100 μL 到经表皮黏液包被的酶标板各孔中, 在 28℃ 孵育 30 min, 用无菌 PBS 清洗 2 次, 然后按 1.4 的方法进行黏附试验, 以无菌 PBS 处理孔为对照。

1.7 数据处理

数据采用 EXCEL 和 SPSS 等软件进行分析, 结果以平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示。

2 结果与分析

2.1 黏附的灵敏度

由图 1 可知, OD₄₉₂ 值与黏附菌量的对数值存在线性关系($R^2=0.973$), OD₄₉₂ 随着黏附的菌浓度的升高而升高, 说明 OD₄₉₂ 可以作为反映细菌黏附量的指标。另外, 本方法得出的阴性对照孔 OD₄₉₂ 为 0.373, 空白孔 OD₄₉₂ 为 0.050, 根据 $(OD_{492} \text{ 样品} - OD_{492} \text{ 空白}) / (OD_{492} \text{ 阴性对照} - OD_{492} \text{ 空白}) > 2$ 者为阳性, 经过拟合计算, 本研究中所采用的间接 ELISA 法对黏附菌的最低检测浓度约为 9.92×10^5 CFU/mL, 因研究中每孔所加的菌量为 100 μL, 所以对黏附菌的最低检出量为 9.92×10^4 CFU。

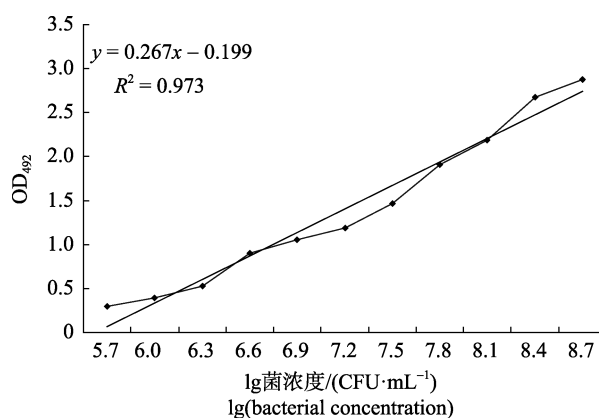


图 1 OD₄₉₂ 与菌浓度的关系

Fig. 1 Relationship of OD₄₉₂ and bacterial concentration

2.2 菌浓度与黏附量的关系

由图 2 可知, 嗜水气单胞菌对鳗鲡表皮黏液的黏附量随着菌浓度的升高而逐渐增大直至接近饱和。菌浓度(x)与黏附量(y)的拟合曲线为 $y = 0.135 \ln(x) - 0.936$ ($R^2=0.986$)。由此计算出嗜水气单胞菌对鳗鲡表皮黏液的最大黏附量(e_m)和分离常数(k_x)分别为 1×10^7 CFU/mL 和 1.75×10^8 CFU/mL。

2.3 孵育时间对黏附的影响

由图 3 可知, 嗜水气单胞菌对鳗鲡表皮黏液的黏附量受孵育时间影响显著, 总体而言随孵育时间的延长呈先升高后降低的趋势, 并在孵育时间为 150 min 时达到峰值, 此时的黏附量极显著高于其他孵育时间的黏附量($P < 0.01$), 其后黏附量随着孵育时间的进一步延长而下降。

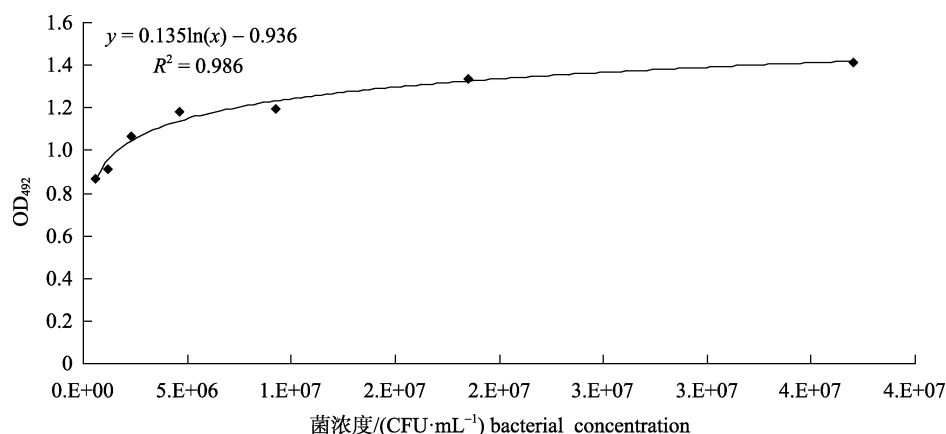


图 2 菌浓度与黏附量的关系

Fig. 2 Relationship between adhesive bacteria number and bacterial concentration

2.4 温度对黏附的影响

温度对嗜水气单胞菌黏附鳗鲡表皮黏液的影响情况如图 4 所示, 总体而言, 温度在 4~44℃ 范围内黏附量总体呈先增加后减少的趋势; 温度为

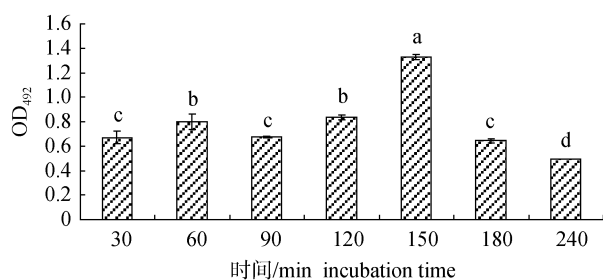


图 3 孵育时间对细菌黏附的影响

柱上不同字母表示组间存在显著性差异($P < 0.05$).

Fig. 3 Influence of incubation time on adhesion of *Aeromonas hydrophila*

Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

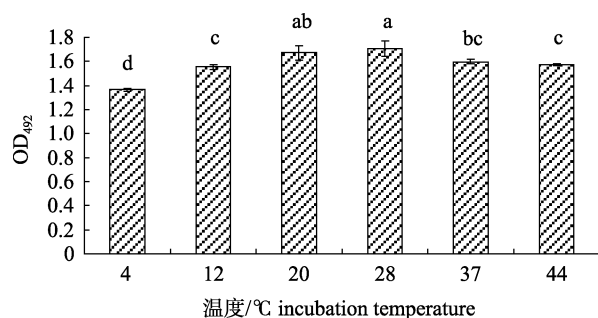


图 4 温度对细菌黏附的影响

柱上不同字母表示组间存在显著性差异($P < 0.05$).

Fig. 4 Influence of temperature on adhesion of *Aeromonas hydrophila*

Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

20~28℃ 时, 细菌黏附量达到峰值, 与其他温度下的 OD_{492} 值均存在显著差异($P < 0.05$). 当孵育温度进一步升高至 37~44℃ 时, 细菌黏附量出现下降。

2.5 pH 对黏附的影响

图 5 表明, pH 对嗜水气单胞菌的黏附有一定影响, 当 pH 在 5.8~6.6 的弱酸性条件下时, 嗜水气单胞菌对鳗鲡黏液的黏附量随 pH 的升高而升高, 并在 pH 为 6.6 时达到峰值; 当 pH 进一步升高至 7~7.8 时, 细菌黏附量则随着 pH 的升高而显著降低($P < 0.05$). 可见, 弱酸性环境有利于嗜水气单胞菌对鳗鲡表皮黏液的黏附。

2.6 Na⁺对黏附的影响

图 6 所示, 与 NaCl 质量浓度为 0 g/L 组相比, 嗜水气单胞菌的黏附量在 NaCl 质量浓度为 5 g/L 时黏附量没有显著提高($P > 0.05$), 当 NaCl 质量浓度

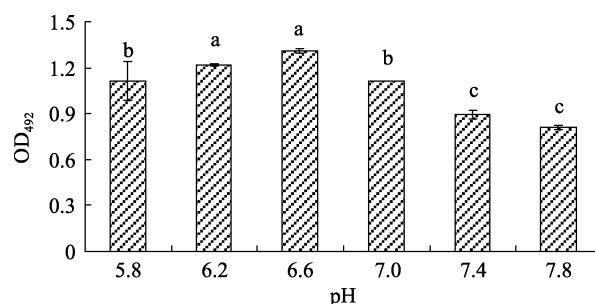


图 5 pH 对细菌黏附的影响

柱上不同字母表示组间存在显著性差异($P < 0.05$).

Fig. 5 Influence of pH on adhesion of *Aeromonas hydrophila*

Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

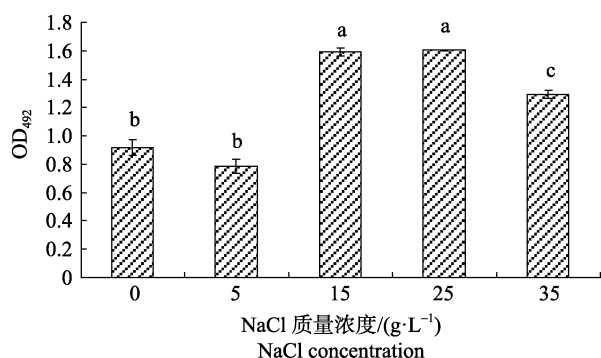


图6 NaCl对细菌黏附的影响

柱上不同字母表示组间存在显著性差异($P<0.05$).

Fig. 6 Influence of NaCl concentration on adhesion of *Aeromonas hydrophila*

Bars with different letters are significantly different ($P<0.05$).

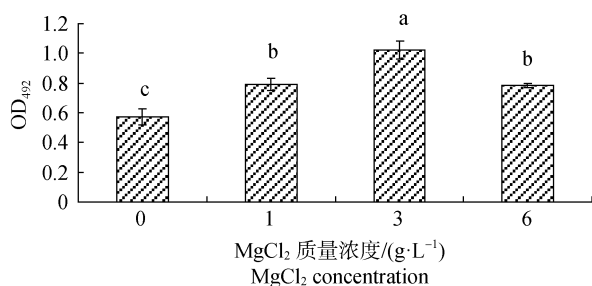
为 15~25 g/L 时嗜水气单胞菌的黏附量显著增加($P<0.05$), 并于 25 g/L 达到最大, 而 NaCl 质量浓度为 35 g/L 时细菌的黏附量有所下降。

2.7 Mg^{2+} 对黏附的影响

图 7 所示, 嗜水气单胞菌在镁离子的作用下黏附量与未添加镁离子组相比均有显著的提高($P<0.05$), 其中 $MgCl_2$ 质量浓度在 3 g/L 时达到最大, 其他 $MgCl_2$ 浓度下细菌的黏附量没有显著区别($P>0.05$), $MgCl_2$ 浓度低于或高于 3 g/L, 细菌黏附均有所下降。

2.8 碳源对细菌黏附的影响

从图 8 看出, 7 种不同碳源对嗜水气单胞菌的黏附作用都有不同程度的影响, 葡萄糖和麦芽糖能显著提高嗜水气单胞菌的黏附量($P<0.05$), 果糖则显著降低嗜水气单胞菌的黏附量($P<0.05$), α -乳糖、甘露醇、木糖、蔗糖对黏附没有显著影响。

图7 $MgCl_2$ 对细菌黏附的影响

柱上不同字母表示组间存在显著性差异($P<0.05$).

Fig. 7 Influence of $MgCl_2$ concentration on adhesion of *Aeromonas hydrophila*

Bars with different letters are significantly different ($P<0.05$).

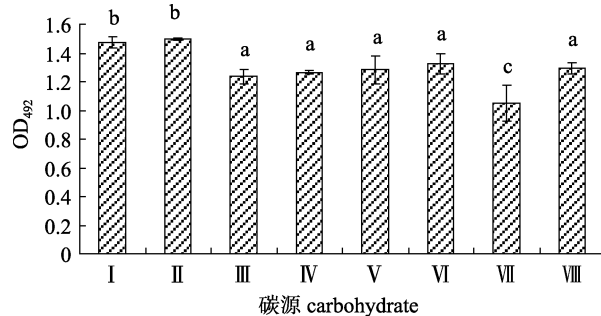


图8 碳源对细菌黏附的影响

柱上不同字母表示组间存在显著性差异($P<0.05$).

I: 葡萄糖, II: 麦芽糖, III: α -乳糖, IV: 甘露醇, V: 木糖, VI: 蔗糖, VII: 果糖, VIII: 未处理.

Fig. 8 Influence of carbohydrates on adhesion of *Aeromonas hydrophila*

Bars with different letters are significantly different ($P<0.05$).

I: Glucose, II: Maltose, III: α -Lactose, IV: Mannitol, V: Xylose, VI: Sucrose, VII: Fructose, VIII: PBS.

3 讨论

鱼的表皮黏液是鱼类非特异性免疫屏障之一, 可保护鱼体免受外界细菌侵染, 而细菌则能根据宿主和外环境生长条件的不同, 迅速调整并适应环境, 进而调节毒力基因以侵染宿主, 譬如合成黏附素等。因此研究致病菌与宿主表皮黏液的相互作用对了解致病菌的致病机理具有重要意义。

3.1 嗜水气单胞菌的黏附动力学

本研究建立的间接 ELISA 法检测灵敏度约为 9.92×10^4 CFU, 与放射性标记法^[24]相当, 却克服了同位素示踪法存在的放射性污染问题, 此外采用 96 孔酶标板, 与传统的革兰氏染色法相比, 大大提高了工作效率。

本研究结果还揭示, 嗜水气单胞菌对鳗鲡表皮黏液的黏附量随着菌浓度的升高而逐渐增大, 直至接近饱和, 这可能与鳗鲡表皮黏液中存在有限数量的特异黏附受体有关, 随着菌浓度的增加, 黏液中越来越多的受体被细菌结合以至达到饱和状态。已有研究证实, 鱼类黏液中存在有限数量的细菌特异性黏附受体^[25-26], 如牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)表皮黏液具有有限的黏附受体, 河流弧菌(*Vibrio fluvialis*)对其最大黏附量为 1.01×10^7 CFU/mL^[26], 与本研究嗜水气单胞菌对鳗鲡表皮的最大黏附量(e_m)为 1.0×10^7 相当。此外, 从嗜

水气单胞菌对鳗鲡表皮黏液的黏附动力学方程得到的黏附分离常数(k_x)为 1.75×10^8 CFU/mL, 大于河流弧菌对牙鲆表皮黏液的黏附分离常数 (4×10^7 CFU/mL)^[26], 而 k_x 反映了细菌从黏附介质的脱离速度^[23], 由此解释了嗜水气单胞菌对鳗鲡表皮黏液的黏附强度随时间延长而降低的原因。

3.2 理化因子对嗜水气单胞菌黏附的影响

本研究中嗜水气单胞菌对鳗鲡表皮黏附达到峰值的时间为 150 min, 低于溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)对大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)表皮黏液黏附的饱和时间(180 min)^[24], 由此推测嗜水气单胞菌对鳗鲡表皮黏液的亲合性可能更强。

温度为 20~28℃时嗜水气单胞菌对鳗鲡表皮黏液的黏附作用最强, 这可能与该温度接近嗜水气单胞菌生长繁殖的最适水温有关。温度作为细菌生长过程中的一个重要环境因子, 能够调节菌体细胞之间的物理交互作用, 从而影响细菌黏附力^[27]。Yan 等^[25]研究发现温度影响黏液与细菌活力, 溶藻弧菌在温度适宜时对大黄鱼肠黏液黏附作用较强。此外, 嗜水气单胞菌的所有毒力基因皆可能受温度调节, Ho 等^[28]通过电镜观察嗜水气单胞菌在 TSA 培养基所产生的菌毛形态, 发现 37℃几乎不产生弯形菌毛, 22℃则大部分为弯形菌毛。于 22℃提纯弯形菌毛, 发现该菌毛对几种脊椎动物都具有致病性。Merino 等^[29]研究了温度对嗜水气单胞菌 Serotype O:34 脂多糖(LPS)形成的影响, 发现 37℃产生 R 型脂多糖, 20℃产生 R 型和 S 型脂多糖, 且 20℃培养的细菌毒性比 37℃培养的细菌毒性强, 说明温度影响与细菌毒力有关的 S 型脂多糖的产生。因此, 推测温度可能通过影响菌毛、LPS 等黏附素的合成, 进而影响细菌黏附力, 这一推测还需要进一步研究证实。

嗜水气单胞菌多生活于淡水环境中, 在 pH 为 6~11 范围内均可生长, 最适 pH 为 7.27。但本研究发现嗜水气单胞菌对鳗鲡表皮的黏附量在 pH 为 6.2~6.6 的弱酸性条件下达到峰值, 说明嗜水气单胞菌的最适生长 pH 与最佳黏附 pH 并不一致。pH 在细菌黏附过程中的重要性已得到证实, 如 Gordon 等^[30]研究表明, 细菌黏附基质表面及

其在细胞表面的沉降率皆依赖于 pH, pH 不仅改变菌体聚合物的黏性, 且影响细菌表面的双电层厚度。还有研究发现, pH 对细菌黏附力的影响具有种属特异性, 菌种不同作用效果不同^[31]。

从本研究可知, NaCl 质量浓度为 0~25 g/L 时, 细菌的黏附量随 NaCl 质量浓度的升高而增大, 并在 15~25 g/L 的盐度范围内黏附量达到峰值, 而进一步提高 NaCl 浓度则抑制细菌的黏附。这可能是由于细菌在黏附过程需要通过运动寻找黏附受体, 而鞭毛是细菌的运动器官, Na^+ 的动势是细菌鞭毛运动的动力源^[32], 因此一定浓度的 NaCl 可提高细菌黏附能力。但也有研究显示, 高盐条件下摩尔渗透压对黏附具有明显的抑制作用^[13], 本研究也发现当 NaCl 质量浓度升至 35 g/L 时, 黏附量显著降低, 这可能就是因为高盐度条件下, 渗透压达到一定阈值会抑制细菌的黏附。

本研究还发现, Mg^{2+} 能促进嗜水气单胞菌的黏附, 且在 MgCl_2 质量浓度为 3 g/L 时黏附量最大, 而 MgCl_2 浓度升高至 6 g/L 则细菌的黏附量显著下降。这可能是由于细菌不仅能与宿主特异性结合, 也能通过 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等二价阳离子与宿主连接, 促成细菌胞外多糖的合成及聚合, 从而提高细胞表面黏附力^[33-34]。如 Song 等^[35]就发现 Mg^{2+} 能促进荧光假单胞菌(*pseudomonas fluorescens*)的早期黏附。但过高浓度二价阳离子会产生竞争的离子交换机制, 使得阳离子与细菌表面负电荷中和, 减少了细菌与矿物基质表面的桥接, 因而细菌在高离子浓度的海水中会出现黏附率下降^[36]。这可能也是本研究中 MgCl_2 质量浓度提高到 6 g/L 时细菌黏附量受到抑制的原因。

本研究结果还提示, 葡萄糖和麦芽糖能显著提高嗜水气单胞菌的黏附量, 果糖则显著降低嗜水气单胞菌的黏附量, 说明碳源影响嗜水气单胞菌的黏附。鱼体黏液层由碳水化合物、水、无机盐等多种物质组成^[37], 嗜水气单胞菌外膜蛋白具有碳水化合物结合性, 在黏附过程中可发挥糖-蛋白结合作用, 从而有利于黏附^[38]。还有研究发现, 黏附过程由病原体蛋白与宿主靶细胞表面的碳水化合物结合所介导, 当细菌表面的黏附蛋白

首先与添加的多价态碳水化合物结合, 则会阻断细菌与宿主靶细胞的结合, 从而减少致病菌对宿主的感染^[39]。如 Acord 等^[40]发现鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella phimurium*) 在低聚糖影响下, 对 AGS 细胞的黏附存在增强或抑制的不同作用。本研究中不同碳源对嗜水气单胞菌黏附的影响不同, 可能是因为不同碳源对表皮黏液与细菌的黏合作用不同。至于碳源对嗜水气单胞菌黏附的机制则有待进一步研究。

综上所述本研究结果揭示, 嗜水气单胞菌对鳊鲶表皮黏液具有较好的黏附作用, 且细菌的黏附能力与多个环境因子密切相关, 温度、pH、阳离子浓度等均可显著影响嗜水气单胞菌的黏附作用, 了解嗜水气单胞菌黏附的规律对该菌的致病机理及病害防治具有重要理论意义。

参考文献:

- [1] Schroers V, Van Der Marel M, Neuhaus H, et al. Changes of intestinal mucus glycoproteins after peroral application of *Aeromonas hydrophila* to common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. Aquaculture, 2009, 288(3-4): 184-189.
- [2] Hazen T C, Fliermans C B. Distribution of *Aeromonas hydrophila* in natural and man-made thermal effluents [J]. Appl Environ Microbiol, 1979, 38: 166-168.
- [3] 邱军强, 杨先乐, 程训佳. 嗜水气单胞菌毒力因子特性及作用机理研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2009, 4(8): 616-618.
- [4] Swain P, Behura A, Dash S, et al. Serum antibody response of Indian major carp, *Labeo rohita* to three species of pathogenic bacteria: *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* and *Pseudomonas fluorescens*[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2007, 117: 137-141.
- [5] Wu C C, Liu C H, Chang Y P, et al. Effects of hot-water extract of *Toona sinensis* on immune response and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Oreochromis mossambicus*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 29(2): 258-263.
- [6] Janda J M, Abbott S L. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions [J]. Clin Infect Dis, 1998, 27(2): 332.
- [7] Figueras M J, Guarro J, Martinez-Murcia A. Clinically relevant *Aeromonas* species [J]. Clin Infect Dis, 2000, 30(6): 988-989.
- [8] Grześkowiaka L, Collado M C, Vesterlunda S, et al. Adhesion abilities of commensal fish bacteria by use of mucus model system: Quantitative analysis[J]. Aquaculture, 2011, 318: 33-36.
- [9] Marel M V, Schroers V, Neuhaus H, et al. Chemotaxis towards, adhesion to, and growth in carp gut mucus of two *Aeromonas hydrophila* strains with different pathogenicity for common carp, *Cyprinus carpio* L. [J]. J Fish Dis, 2008, 31(5): 321-330.
- [10] Pianetti A, Battistelli M, Barbieri F, et al. Changes in adhesion ability of *Aeromonas hydrophila* during long exposure to salt stress conditions[J]. J Appl Microbiol, 2012, 113(4): 974-982.
- [11] Canals R, Ramirez S, Vilches S, et al. Polar flagellum biogenesis in *Aeromonas hydrophila*[J]. J Bacteriol, 2006, 188(2): 542-555.
- [12] 庄培德, 杨金先, 吴学敏, 等. 鳊源嗜水气单胞菌主要黏附素基因克隆表达及产物黏附功能分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27 (2): 112-123.
- [13] Balci Azar J L, Vendrell D, Blas I, Et al. *In vitro* competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens[J]. Vet Microbiol, 2007, 122(3-4): 373-380.
- [14] Balebona M C, Moriño M A, Faris A, et al. Influence of salinity and pH on the adhesion of pathogenic *Vibrio* strains to *Sparus aurata* skin mucus [J]. Aquaculture, 1995, 132 (1-2): 113-120.
- [15] Blay G L, Fliss I, Lacroix C. Comparative detection of bacterial adhesion to Caco-2 cells with ELISA, radioactivity and plate count methods[J]. J Microbiol Methods, 2004, 59(2): 211-221.
- [16] Toranzo A E, Romalde J L, Magarinos B, et al. Present and future of aquaculture vaccines against fish bacterial diseases[J]. Options Mediterraneennes, 2009, 86: 155-175.
- [17] 樊海平, 吴斌, 曾占壮, 等. 日本鳊鲶体表溃疡病原菌的分离、鉴定及单克隆抗体制备[J]. 中国水产科学, 2009, 16(2): 295-301.
- [18] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000: 1-22.
- [19] 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: 4269-4275.

- [20] 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.
- [21] Vesterlund S, Paltta J, Karp M, et al. Measurement of bacterial adhesion-in vitro evaluation of different methods[J]. *J Microbiol Methods*, 2005, 60(2): 225–233.
- [22] 鄢庆枇, 王军, 苏永全, 等. 大黄鱼病原菌—溶藻弧菌的 ELISA 快速检测研究[J]. *海洋科学*, 2001, 25(9): 47–49.
- [23] 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 *Enterobacteria*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(9): 3692–3697.
- [24] 陈强, 鄢庆枇, 邹文政, 等. 环境因子对溶藻弧菌粘附大黄鱼表皮粘液影响的研究[J]. *海洋与湖沼*, 2007, 38(4): 361–366.
- [25] 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(1–4): 21–30.
- [26] 邹文政, 鄢庆枇, 纪荣兴, 等. 河流弧菌对牙鲆表皮粘液黏附作用的研究[J]. *海洋学报*, 2008, 30(4): 154–159.
- [27] McEldowney S, Fletcher M. Effect of pH, temperature, and growth conditions on the adhesion of a gliding bacterium and three nongliding bacteria to polystyrene[J]. *Microb Ecol*, 1988, 16: 183–195.
- [28] Ho A S, Mietzner T A, Smith A J, et al. The pili of *Aeromonas hydrophila*: identification of an environmentally regulated “mini pilin.” [J]. *J Exp Med*, 1990, 172: 795–806.
- [29] Merino S, Camprub S, Tom S J M. Effect of growth temperature on outer membrane components and virulence of *Aeromonas hydrophila* strains of serotype O: 34 [J]. *Infect Immun*, 1992, 60(10): 4343–4349.
- [30] Gordon A S, Gerckakov S M, Udey L R. The effect of polarization on the attachment of marine bacteria to copper and platinum surfaces[J]. *J Microbiol*, 1981, 27(7): 698–703.
- [31] Nikolaev Y A, Plankunov V K. Biofilm—‘city of microbes’ or an analogue of multicellular organisms? [J]. *Microbiology*, 2007, 76: 125–138.
- [32] Atsumi T, McCarter L, Imae Y. Polar and lateral flagellar motors of marine *Vibrio* are driven by differentiation-motive forces [J]. *Nature*, 1992, 355: 182–184.
- [33] Hood M A, Winter P A. Attachment of *Vibrio cholerae* under various environmental conditions and to selected substrates [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 1997, 22(3): 215–223.
- [34] Özerdem A N, Elçi S, Atmaca S, et al. The effects of magnesium, calcium and EDTA on slime production by *Staphylococcus epidermidis* strains[J]. *Folia Microbiol*, 2003, 48: 649–653.
- [35] Song B, Leff L G. Influence of magnesium ions on biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* [J]. *Microbiol Res*, 2006, 161(4): 355–361.
- [36] Gordon A S, Millero F J. Electrolyte effects on attachment of an estuarine bacterium[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1984, 47: 495–499.
- [37] Peppas N A, Huang Y. Nanoscale technology of mucoadhesive interactions [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56(11): 1675–1687.
- [38] Subramanian K, Shankar R B, Meenakshisundaram S, et al. LamB-mediated adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to Hep-2 cells [J]. *Appl Microbiol*. 2008, 105(3): 715–722.
- [39] Pieters R J. Intervention with bacterial adhesion by multivalent carbohydrates [J]. *Med Res Rev*, 2007, 27(6): 796–816.
- [40] Acord J, Maskell J, Sefton A. A rapid microplate method for quantifying inhibition of bacterial adhesion to eukaryotic cells[J]. *J Microbiol Methods*, 2005, 60(1): 55–62.

Adhesion characteristics of *Aeromonas hydrophila* to eel skin mucus by indirect ELISA

LIN Guifang¹, YAN Qingpi¹, CHEN Wenbo¹, SU Yongquan², QIN Yingxue¹

1. Fisheries College, Jimei University; Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety, Xiamen 361021, China;

2. College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Abstract: Adhesion to the host mucus, which is closely related to the virulence of pathogenic bacteria, is the first crucial step in most infections. In this paper, the adhesion characteristics of *Aeromonas hydrophila* to eel (*Anguilla anguilla*) skin mucus was investigated by indirect ELISA. First, we confirmed that OD₄₉₂ can be used as an index to reflect the number of adhering bacteria. Second, we confirmed that the indirect ELISA method can detect bacteria with a sensitivity of 9.92×10^4 CFU. The number of adhering *A. hydrophila* on eel mucus rose with increased bacterial density; a saturation kinetics equation $y = 0.135 n(x) - 0.936 (R^2 = 0.986)$ was obtained by plotting the number of adhering bacteria against cell density. The factors affecting bacterial adhesion were then investigated. The results revealed that the number of adhering *A. hydrophila* increased with incubation time and reached a peak after 150 min. Temperature was one of the major factors affecting bacterial adhesion, with peak adhesion occurring at 20–28 °C. pH also influenced bacterial adhesion. In a weak acid with a pH of 6.2–6.6, the adhesion ability of *A. hydrophila* was remarkably enhanced. The optimum concentrations of Na⁺ and Mg²⁺ for *A. hydrophila* adhesion were 1.5–2.5 g/L and 3 g/L, respectively. In summary, the optimum conditions for the adhesion of *A. hydrophila* to eel skin mucus were 20–28 °C, pH 6.2–6.6, 1.5–2.5 g/L NaCl, 0.3 g/L MgCl₂, and 150 min incubation time. In addition, we found that bacterial adhesion was influenced by carbohydrates. Seven kinds of carbohydrates were investigated and the results indicate that glucose and maltose significantly enhance *A. hydrophila* adhesion ($P < 0.05$), while fructose inhibited it ($P < 0.05$). Understanding the mechanisms of *A. hydrophila* adhesion will help to further elucidate bacterial pathogenicity and help control fish disease.

Key words: *Aeromonas hydrophila*; adhesion; indirect ELISA; *Anguilla anguilla*; skin mucus

Corresponding author: QIN Yingxue. E-mail: yxqin@jmu.edu.cn