

拮抗菌对病原性溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)粘附 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)表皮粘液的影响*

郭国军^{1,2} 鄢庆彬¹ 邹文政¹ 周仁孙¹ 陈昌生¹ 陈强³

(1. 集美大学水产学院 厦门 361021; 2. 郑州牧业工程高等专科学校 郑州 450011;

3. 中国海洋大学水产学院 青岛 266003)

提要 采用 ³H-TdR 同位素示踪法研究了病原性溶藻弧菌和 9 株拮抗菌对大黄鱼表皮粘液的粘附动力学。结果表明, 10 株细菌的粘附作用都符合饱和粘附动力学特征; R4、R13 和 R32 等 3 株拮抗菌的最大粘附量高于溶藻弧菌; 9 株拮抗菌的分离常数都高于溶藻弧菌; R32 的亲指数大于溶藻弧菌, 其余 8 株拮抗菌的亲指数都小于溶藻弧菌。测定了 9 株拮抗菌对病原性溶藻弧菌粘附大黄鱼表皮粘液的竞争、排斥和置换作用, 结果显示: 9 株拮抗菌在竞争条件下都能极显著减少溶藻弧菌对表皮粘液粘附($P < 0.01$); 在粘附排斥方面, R4、R13、J26、J28、J312、Y59 等 6 株拮抗菌能显著排斥病原性溶藻弧菌对大黄鱼表皮粘液的粘附作用($P < 0.05$); 在粘附置换方面, J26、J28 等 2 株拮抗菌能极显著($P < 0.01$)降低病原性溶藻弧菌对大黄鱼表皮粘液的粘附量。研究结果表明, 病原性溶藻弧菌对大黄鱼表皮粘液有较强的粘附作用; 9 株拮抗菌能够抑制溶藻弧菌对大黄鱼表皮粘液的粘附作用, 其中竞争作用效果最好, 排斥作用次之, 置换作用的效果最差; 拮抗菌对病原菌粘附的抑制效果受多种因素的影响, 各菌株的粘附动力学参数有重要的影响作用。

关键词 大黄鱼, 溶藻弧菌, 拮抗菌, 表皮粘液, 粘附

中图分类号 S432.1

大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)是我国近海特有的主要经济鱼类和当前最主要海水养殖鱼类、我国六大优势出口水产品之一。近年来, 随着大黄鱼养殖规模的不断扩大, 养殖密度不断提高, 养殖环境不断恶化, 病害频繁发生且日趋严重, 其中由弧菌属细菌引起的疾病, 因其发病率高、流行范围广、危害最为严重, 每年都给养殖从业者造成了极大的经济损失(鄢庆彬等, 2001; 林克冰等, 1999)。鱼类细菌性疾病传统的防治方法是使用抗生素。抗生素的大量使用导致微生态环境失衡, 抗药性细菌大量繁殖(Miranda *et al*, 2002), 同时还有药物残留, 造成环境污染, 最终影响人类健康。益生菌作为一种新型的生物防治方法, 不产生抗药性、无污染、主要在于维护微生态平衡, 是一种环境友好型抗生素替代品(Gatesoupe, 1999; Irianto *et al*,

2002)。目前筛选益生菌主要根据体外拮抗试验, 例如益生菌产生抑菌化合物(Jöborn *et al*, 1997; Gram *et al*, 1999)和铁载体(Gram *et al*, 1999), 或者与病原菌竞争营养而抑制病原菌(Dopazo *et al*, 1988), 但是这并不是筛选优良益生菌唯一的标准。一种良好的益生菌应该能够按常规的方法被摄入, 或者能够定植并在动物体内或环境中存活, 因此, 诸如生长特点(Vine *et al*, 2004a, b)、菌株对粘液层的粘附能力(Chabrilón *et al*, 2005a, c)等也是筛选益生菌的很好的标准。表层粘液是鱼类的一层重要防御屏障, 同时, 表层粘液也是细菌粘附其寄主体内或体表而定植进而发生感染的重要通道(Montgomery *et al*, 1994), 因此, 阻止病原菌对表层粘液的粘附能够有效防治细菌性鱼病。但是, 目前有关益生菌对病原菌粘附鱼类粘液的影响研究

* 国家 863 计划项目, 2007AA09Z115 号; 厦门市科技项目, 3502Z20073019 号。郭国军, 讲师, E-mail: gjqzhn@sohu.com

通讯作者: 陈昌生, E-mail: cschen@jmu.edu.cn

收稿日期: 2008-11-18, 收修改稿日期: 2009-01-22

非常之少(Chabrillón *et al.*, 2005a, c; Vine *et al.*, 2004 a, b)。

本文采用 $^3\text{H-TdR}$ 同位素标记方法研究了本实验室分离的 9 株拮抗菌和病原性溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)对大黄鱼表皮粘液的粘附动力学和 9 株拮抗菌对溶藻弧菌粘附大黄鱼表皮粘液粘附的影响,以期从抑制病原菌对鱼类粘液粘附作用的角度探讨 9 株拮抗菌的益生价值,并探讨粘附作用在益生菌筛选中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 菌株

病原菌:溶藻弧菌(ND-01),本实验室分离自患病大黄鱼(鄢庆彬等,2001)。

拮抗菌:R4、R13、R32、J26、J28、J312、Y56、Y58、Y59,均为健康大黄鱼中分离菌株,保存于本实验室的 -80°C 超低温冰箱。

1.2 粘液制备

50 尾体重 300—500g 的健康大黄鱼购自宁德市水产技术推广站实验渔场养殖网箱。参考 Chabrillón 等(2004)的方法制备表皮粘液。用钝塑料片刮取大黄鱼表皮背部粘液,然后放入灭菌陈海水中混匀, 4°C 、20000g 离心 2 次,每次 30min,以去除颗粒物质;然后依次用 $0.45\mu\text{m}$ 、 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌。根据 Bradford 法(Bradford, 1976)将蛋白质浓度调整到 1mg/ml 左右分装保存于 -80°C 超低温冰箱待用。

1.3 粘附试验

1.3.1 菌株培养及放射性标记 溶藻弧菌和拮抗菌培养于含 2%NaCl 胰蛋白胨大豆培养液(TSB),每毫升培养液加入 $10\mu\text{l}$ $^3\text{H-胸腺嘧啶核苷} (^3\text{H-TdR}$, 购自中科院应用物理研究所), 28°C 培养 15h 后 $2000\times\text{g}$ 离心 10min 收集菌体,无菌海水清洗 2 次后根据 OD_{550} 值调节菌浓度。

1.3.2 体外粘附试验 参考 Vesterlund 等(2005)方法,在 96 孔酶标板各孔加入 $150\mu\text{l}$ 表皮粘液, 4°C 包被 18—20h 后弃去残余粘液,用 $200\mu\text{l}$ 无菌陈海水清洗 2 次;加入 $150\mu\text{l}$ 已放射性标记的菌液, 28°C 孵育 90min;然后用 0.85% 无菌生理盐水清洗 2 次除去未粘附的细菌;加入 $150\mu\text{l}$ 1% SDS 0.1mol/L NaOH 溶液, 60°C 保温 1h 以回收粘附的菌体;回收液移至 20ml 闪烁瓶中,测定前 12h 加入 10ml 闪烁液,用液体闪烁计数仪(BECKMAN COULTER LS6500)测定放射活性(dpm),以 1% SDS- 0.1mol/L NaOH 溶液 $150\mu\text{l}$ 作为空白对照。

1.3.3 拮抗菌和溶藻弧菌的粘附动力学 参照 Bordas 等(1996)方法,按 1.3.1 方法制备拮抗菌和溶藻弧菌悬液,根据 OD_{550} 值将菌悬液稀释成 5 个浓度梯度(菌浓度为 10^7 — 10^8 cells/ml),按 1.3.2 的方法进行粘附试验。每个浓度各作三个平行,以 PBS 作对照。

1.3.4 拮抗菌对溶藻弧菌粘附的影响 参考 Jin 等(1996)的方法测定拮抗菌对溶藻弧菌粘附的影响。

粘附排斥:在已包被表皮粘液的酶标板各孔中加入 10^8 cells/ml 左右未标记的拮抗菌 $150\mu\text{l}$, 28°C 孵育 90min, PBS 洗 2 次以洗去未粘附的拮抗菌细胞,然后加入 10^8 cells/ml 左右 $^3\text{H-TdR}$ 标记的溶藻弧菌 $150\mu\text{l}$, 28°C 孵育 90min。

竞争粘附: 10^8 cells/ml 左右未标记的拮抗菌和 10^8 cells/ml 左右 $^3\text{H-TdR}$ 标记的溶藻弧菌等体积混合均匀后取 $150\mu\text{l}$ 加入到已包被表皮粘液的酶标板各孔中, 28°C 孵育 180min。

粘附置换:在已包被表皮粘液的酶标板各孔中加入 10^8 cells/ml 左右标记的溶藻弧菌 $150\mu\text{l}$, 28°C 孵育 90min, PBS 洗 2 次后加入 10^8 cells/ml 左右未标记的拮抗菌 $150\mu\text{l}$, 28°C 孵育 90min。

按 1.3.2 的方法洗涤、回收粘附细菌、测定放射活性。每组做三个平行,以 PBS 代替未标记的拮抗菌作为对照,用 SPSS 进行方差分析显著性差异, $P < 0.05$ 代表有显著性差异, $P < 0.01$ 代表有极显著差异。

2 结果

2.1 溶藻弧菌和拮抗菌对大黄鱼表皮粘液的粘附动力学

由于 $^3\text{H-TdR}$ 标记细菌的放射活性与细菌量呈直线关系,因此通过测定放射性活性可反映细菌的粘附量。溶藻弧菌和拮抗菌对大黄鱼表皮粘液的粘附量随着菌浓度的升高而增加,并有趋于饱和的趋势(表 1),加入细菌数的倒数和粘附细菌数的倒数符合直线方程(表 2)。根据 Belas 等(1982)的标准,本文所测试的 10 株菌对大黄鱼表皮粘液的粘附作用都属于饱和粘附。

细菌和粘液中粘附位点之间结合处于一种动态平衡过程(Lee *et al.*, 2000),即:

细菌 + 粘附位点 $\xrightleftharpoons[k_x]{k_{-1}}$ 细菌粘附位点复合物
这个过程相当于酶催化反应中酶和底物结合而不形成产物的过程。如果以 x 表示加入菌的数量, e 表示粘液中的粘附位点, e_x 则表示粘附到粘附位点上的细菌, $(e - e_x)$ 表示空余粘附位点的数量, k_x 表示分离常数,

根据平衡方程, 则 $k_x = (k - 1) / (k + 1) = (e - e_x) x / e_x$ 。本方程可以推导为计算粘附量的方程, 即 $e_x = e \cdot x / (k_x + x)$, 当细菌粘附达到饱和时, 粘附位点全部被占领, e_x 达到最大(即 e_m)。方程可进一步推导为 $e_x = e_m \cdot x / (k_x + x)$, 本方程可转换为 $1/e_x$ 和 $1/x$ 的直线方程: $1/e_x = 1/e_m + k_x/e_m \cdot x$, 该直线在 Y 轴上的截距为 $1/e_m$, 在 X 轴上的截距为 $-1/k_x$ (Lee *et al.*, 2000)。

根据直线方程可求出各菌株的粘附动力学参数 e_m 、 k_x 及 $e_m \cdot k_x^{-1}$ (表 3)。其中 $e_m \cdot k_x^{-1}$ 为亲和指数, 该指数与细菌浓度无关, 可用来表示细菌与粘附位点粘附力的强弱。各菌株的最大粘附量介于 $(4.064 - 8.617) \times 10^6$ cells/well 之间, R4、R13 和 R32 等 3 株拮抗菌的最大粘附量高于溶藻弧菌; 9 株拮抗菌的分离常数都高于溶藻弧菌, 并且各菌株的分离常数都高于自身的最大粘附量, 总体上呈现最大粘附量越高的菌株其分离常数也越大的趋势。9 株拮抗菌中只有 R32 的亲和指数大于病原性溶藻弧菌, 其余 8 株拮抗菌的亲和指数都小于溶藻弧菌的亲和指数。

表 3 溶藻弧菌和 9 株拮抗菌的最大粘附量(e_m)、分离常数(k_x)与亲和指数($e_m \cdot k_x^{-1}$)

Tab.3 The maximum number of adhered bacterial cells (e_m), dissociation constant (k_x), and affinity index ($e_m \cdot k_x^{-1}$) of *V. alginolyticus* and 9 strains of antagonistic bacteria

菌株	e_m (cells/well)	k_x (cells/well)	$e_m \cdot k_x^{-1}$
R4	8.617×10^6	8.566×10^7	0.101
R13	6.002×10^6	5.159×10^7	0.116
R32	8.115×10^6	5.345×10^7	0.152
J26	4.646×10^6	5.814×10^7	0.080
J28	5.228×10^6	6.432×10^7	0.081
J312	4.196×10^6	8.195×10^7	0.051
Y56	4.717×10^6	5.504×10^7	0.086
Y58	5.005×10^6	6.284×10^7	0.080
Y59	4.064×10^6	5.584×10^7	0.073
溶藻弧菌	5.412×10^6	3.994×10^7	0.135

2.2 拮抗菌对溶藻弧菌粘附的影响

测定了 9 株拮抗菌对病原性溶藻弧菌粘附大黄鱼表皮粘液的竞争、排斥和置换作用, 结果显示:

在粘附竞争方面, 9 株拮抗菌都能极显著抑制病原性溶藻弧菌对大黄鱼表皮粘液的粘附作用 ($P < 0.01$) (图 1)。

在粘附排斥方面, R4、R13、R32、J26、J28、Y59 等 6 株拮抗菌能显著排斥病原性溶藻弧菌对大黄鱼

表皮粘液的粘附作用 ($P < 0.05$), 其余 3 株拮抗菌都不能显著降低溶藻弧菌的粘附量(图 2)。

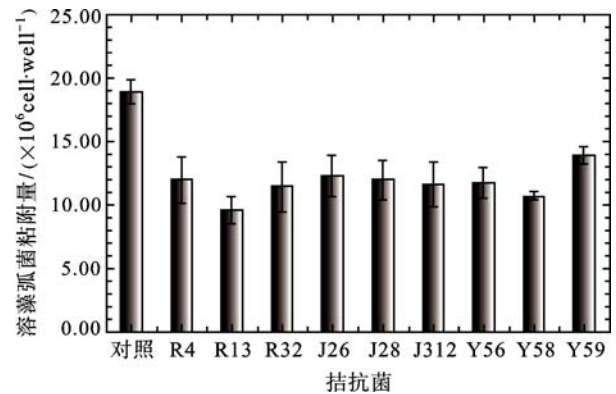


图 1 拮抗菌对溶藻弧菌的粘附竞争作用

Fig.1 Adhesion competition between 9 strains of antagonistic bacteria and *V. alginolyticus*

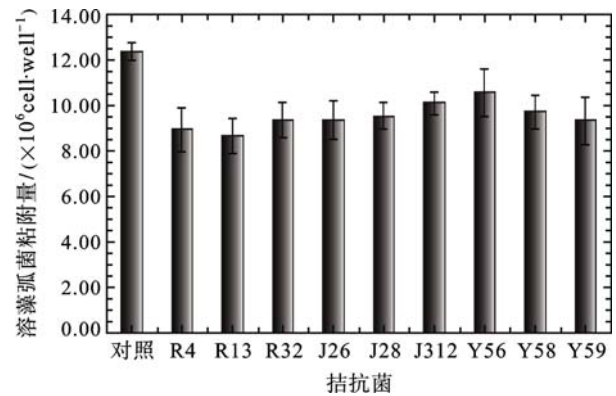


图 2 拮抗菌对溶藻弧菌的粘附排斥作用

Fig.2 Adhesion exclusion of 9 strains of antagonistic bacteria to *V. alginolyticus*

在粘附置换方面, J26、J28 等 2 株拮抗菌能极显著性 ($P < 0.01$) 降低病原性溶藻弧菌对大黄鱼表皮粘液的粘附量, R4、R13、R32、J312、Y56、Y58 和 Y59 能在一定程度上降低病原性溶藻弧菌的粘附量, 但都没有达到显著性差异(图 3)。

9 株拮抗菌中只有 J26 和 J28 能在竞争、排斥和置换条件下都能显著抑制病原性溶藻弧菌对大黄鱼表皮粘液的粘附。

3 讨论

本文的结果表明, 病原性溶藻弧菌和 9 株拮抗菌对大黄鱼表皮粘液的粘附都符合 Langmuir's 饱和粘附动力学, 这意味着表皮粘液上的粘附受体能够达到粘附饱和, 尽管还不能区别粘液上特异性受体和

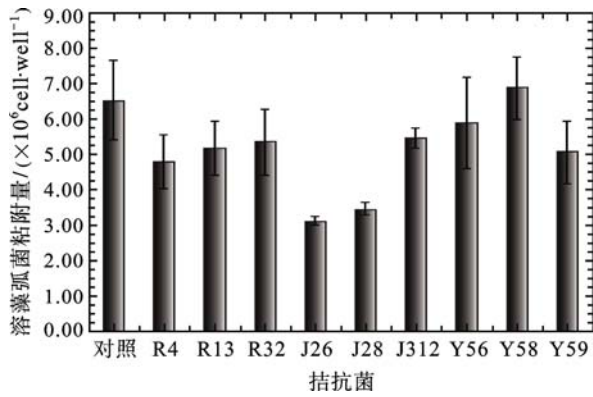


图3 拮抗菌对溶藻弧菌的粘附置换作用

Fig.3 Adhesion displacement of *V. alginolyticus* by 9 strains of antagonistic bacteria

非特异性受体。该结果与 Chabrilón 等(2004)研究的鳗弧菌和溶藻弧菌对金头鲷(*Sparus aurata*)表皮粘液的粘附结果相一致。R4、R13 和 R32 等 3 株拮抗菌的最大粘附量高于溶藻弧菌,这说明在大黄鱼表皮粘液中这 3 株拮抗菌的粘附受体较多。由于本文粘附试验所用的菌浓度远远高于自然水体中的浓度,因此用非浓度依赖的亲系数来表示细菌相对粘附能力(Gordon *et al.*, 1984)比其他学者(Chabrilón *et al.*, 2005c; Vine *et al.*, 2004 a, b)用粘附百分率表示粘附能力更为客观。本文测试的 9 株拮抗菌对表皮粘液亲和指数中只有 R32 高于病原性溶藻弧菌,这说明溶藻弧菌对表皮粘液的粘附能力较强,也说明大黄鱼的表皮可能是病原性溶藻弧菌的侵入部位之一。

益生菌对病原菌粘附的抑制作用有竞争、排斥和置换等 3 种形式。乳酸菌等益生菌减少病原菌粘附的主要机制是竞争作用(Todoriki *et al.*, 2001)。Chabrilón 等(2005a)研究发现分离自金头鲷的 4 株拮抗菌在竞争条件下能显著($P < 0.05$)降低美人鱼光杆菌杀鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida*)对塞内加尔鲷(*Solea senegalensis*)表皮粘液和肠粘液的粘附,而另外 1 株却没有显著影响。本文的 9 株拮抗菌都能极显著($P < 0.01$)抑制溶藻弧菌对表皮粘液的粘附。本文 9 株拮抗菌是分离自健康大黄鱼,对大黄鱼表皮粘液有较强的粘附作用,因此对病原弧菌粘附抑制作用较好。虽然人们倾向于认为在宿主体表定植的益生菌能够排斥病原菌的粘附定植,但是本文所研究的 9 株拮抗菌对病原性溶藻弧菌粘附大黄鱼表皮粘液的排斥作用不如竞争作用,只有 R4、R13、R32、J26、J28、Y59 等 6 株拮抗菌在排斥条件下能显著($P < 0.05$)降低病原性溶藻弧菌对大黄鱼表皮粘液的粘附作用。

Vine 等(2004a, b)研究的 5 株候选益生菌中有 4 株在排斥条件下能增加嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)和溶藻弧菌对康氏石鲈(*Pomadasys commersonni*)肠粘液的粘附。由于没有各菌株的粘附动力学参数,因此作者无法从粘附性能方面解释这一现象。9 株拮抗菌对病原性溶藻弧菌粘附大黄鱼表皮粘液的置换作用不如竞争作用和排斥作用显著,只有 J26 和 J28 在置换条件下能显著减少溶藻弧菌的粘附。Chabrilón 等(2005a, b, c)研究发现 Pdp5、Pdp9、Pdp11 和 51M6 在置换条件下也可以显著抑制美人鱼光杆菌杀鱼亚种、哈维氏弧菌和类鳗李斯特菌对塞内加尔鲷表皮粘液和肠粘液的粘附。

综合各菌株的粘附动力学参数可以看出:由于病原性溶藻弧菌对大黄鱼表皮粘液的分离常数最低,说明粘附的溶藻弧菌不易分离,所以拮抗菌对其粘附置换效果不佳;最大粘附量大于溶藻弧菌的各菌株都能显著排斥病原菌的粘附,这是由于拮抗菌的粘附将屏蔽病原菌的粘附位点。拮抗菌的粘附量越大,这种屏蔽作用也就越显著;拮抗菌的粘附竞争作用效果好于排斥作用,这是由于参与竞争作用的拮抗菌数量(10^8 cells/ml)大大高于参与排斥作用的拮抗菌数量(10^6 cells/well)。同时, J26 和 J28 的最大粘附量和粘附亲和指数都不高,却有显著的粘附置换作用, Y59 也有显著的粘附排斥作用,这些结果表明拮抗菌对病原菌粘附的抑制效果受多种因素的影响,如被粘附物表面的特异粘附受体,以及粘附素和粘附受体之间的相对空间位置、环境条件等对粘附也有一定的影响(Teuber, 2001)。9 株拮抗菌在竞争和排斥条件下对病原性溶藻弧菌粘附的抑制作用强于置换作用时的抑制效果,这说明这些拮抗菌如果用于弧菌病防治,其防病效果可能优于治病效果。

根据本文的研究结果,可以认为:病原性溶藻弧菌对大黄鱼表皮粘液有较强的粘附作用;9 株拮抗菌能够抑制溶藻弧菌对大黄鱼表皮粘液的粘附作用,其中竞争作用效果最好,排斥作用次之,置换作用的效果最差;拮抗菌对病原菌粘附的抑制效果受多种因素的影响,各菌株的粘附动力学参数有重要的影响作用。

参 考 文 献

- 林克冰, 周 宸, 刘家富等, 1999. 海水网箱养殖大黄鱼弧菌病的病原菌. 台湾海峡, 18(3): 342—346
 鄢庆彬, 王 军, 苏永全等, 2001. 网箱养殖大黄鱼弧菌病研

- 究. 集美大学学报(自然科学版), 6(3): 191—196
- Belas M R, Colwell R R, 1982. Adsorption kinetics of laterally and polarly flagellated *Vibrio*. *Journal of Bacteriology*, 151(3): 1568—1580
- Bordas M A, Balebona M C, Zorrilla I *et al*, 1996. Kinetics of adhesion of selected fish-pathogenic *Vibrio* strains on skin mucus of gilt-head seabream (*Sparus aurata* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, 62(10): 3650—3654
- Bradford N M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annual Biochemistry*, 72(1): 248—254
- Chabrilón M, Bordas M A, Morinigo M A, 2004. Kinetics of adhesion of *Listonella anguillarum* to the mucus of gilt-head seabream, and the implication of surface components. *Aquaculture Research*, 35(4): 403—409
- Chabrilón M, Rico R M, Balebona M C *et al*, 2005a. Adhesion to sole, *Solea senegalensis* Kaup, mucus of microorganisms isolated from farmed fish, and their interaction with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Journal of Fish Diseases*, 28(4): 229—237
- Chabrilón M, Arijo S, Daz-Rosales P *et al*, 2005b. Interference of *Listonella anguillarum* with potential probiotic microorganisms isolated from farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.). *Aquaculture Research*, 37(1): 1—9
- Chabrilón M, Rico R M, Balebona M C *et al*, 2005c. Interactions of microorganisms isolated from gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., on *Vibrio harveyi*, a pathogen of farmed Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Journal of Fish Diseases*, 28(9): 531—537
- Dopazo C P, Lemos M L, Lodeiros C *et al*, 1988. Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. *Journal of Applied Bacteriology*, 65(2): 97—101
- Gatesoupe F J, 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180(1): 147—165
- Gordon A S, F J Millero, 1984. Electrolyte effects on attachment of an estuarine bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(3): 495—499
- Gram L, Melchiorson J, Spanggaard B *et al*, 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3): 969—973
- Irianto A, Austin B, 2002. Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases*, 25(11): 633—642
- Jöborn A, Olsson J C, Westerdhal A *et al*, 1997. Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. strain K1. *Journal of Fish Diseases*, 20(5): 383—392
- Jin L Z, Ho Y W, Ali M A *et al*, 1996. Effect of adherent *Lactobacillus* spp. on *in vitro* adherence of salmonellae to the intestinal epithelial cells of chicken. *Journal of Applied Bacteriology*, 81(2): 201—206
- Lee Y K, Lim C Y, Teng W L *et al*, 2000. Quantitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with *Enterobacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9): 3692—3697
- Miranda C D, Zemelman R, 2002. Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. *Aquaculture*, 212(1): 31—47
- Montgomery M T, Kirchman D L, 1994. Induction of chitin-binding proteins during the specific attachment of the marine bacterium *Vibrio harveyi* to chitin. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(12): 4284—4288
- Teuber M, 2001. Veterinary use and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 4(5): 493—499
- Todoriki K, Mukai T, Sato S, 2001. Inhibition of adhesion of food-borne pathogens to Caco-2 cells by *Lactobacillus* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 91(1): 154—159
- Vesterlund S, Palta J, Karp M *et al*, 2005. Measurement of bacterial adhesion—*in vitro* evaluation of different methods. *Journal of Microbiological Methods*, 60(2): 225—233
- Vine N G, Leukes W D, Kaiser H *et al*, 2004a. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *Journal of Fish Diseases*, 27(6): 319—326
- Vine N G, Leukes W D, Kaiser H, 2004b. *In vitro* growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. *FEMS Microbiological Letters*, 231(1): 145—152

INFLUENCE OF ANTAGONISTIC BACTERIA ON ADHESION OF PATHOGENIC *VIBRIO ALGINOLYTICUS* TO SKIN MUCUS OF *PSEUDOSCAENA CROCEA*

GUO Guo-Jun^{1,2}, YAN Qing-Pi¹, ZOU Wen-Zheng¹, ZHOU Ren-Sun¹,
CHEN Chang-Sheng¹, CHEN Qiang³

(1. Fisheries College of Jimei University, Xiamen, 361021; 2. Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering, Zhengzhou, 450011;
3. Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao, 266003)

Abstract The adhesion kinetics of pathogenic *Vibrio alginolyticus* and 9 strains of antagonistic bacteria to skin mucus of *Pseudoscaena crocea* were studied by using of ³H-TdR as isotope tracer. The results show that the adhesion of the 10 strains complies with saturation kinetics; the maximum number of adhered bacterial cells (e_m) is greater in strains R4, R13 and R32 than *V. alginolyticus*; the dissociation constant (k_x) of all the 9 strains of antagonistic bacteria is higher than that of *V. alginolyticus*; the affinity index of strain R32 is higher but lower in the rest 8 strains than that of *V. alginolyticus*. The conditions of competition, exclusion and displacement of the bacterial adhesion to the skin mucus by the 9 strains of antagonistic bacteria were also investigated. The results show that all of the 9 strains of antagonistic bacteria can remarkably reduce the adhesion *V. alginolyticus* to some extents under conditions of competition, exclusion, and displacement. Pathogenic *V. alginolyticus* can strongly adhere to the skin mucus of *P. crocea*; the 9 strains of antagonistic bacteria can inhibit the bacterial adhesion with the best result under competition condition. Inhibition to the bacterial adhesion depends on many factors of which bacterial adhesive kinetics is the most important one.

Key words *Pseudoscaena crocea*, *Vibrio alginolyticus*, Antagonistic bacteria, Skin mucus, Adhesion