

河流弧菌(*Vibrio fluvialis*)对大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)鳃粘液粘附特性研究*

朱苏琴¹ 纪荣兴¹ 苏永全² 王 军² 覃映雪¹
马 英¹ 邹文政¹ 李海平¹ 鄢庆枇¹

(1. 集美大学水产学院 农业部东海海水健康养殖重点实验室 厦门 361021;
2. 厦门大学海洋与环境学院 厦门 361005)

提要 采用间接 ELISA 法(最低检测值约 10^4 cfu)研究不同培养条件、不同培养阶段、抗体处理、营养饥饿等对河流弧菌粘附作用的影响。结果表明,经 TSB 培养的菌体的粘附作用极显著强于 TSA 培养的菌体的粘附作用($P < 0.01$);河流弧菌能很好地粘附于大黄鱼粘液,粘附量随菌浓度升高而增大并符合饱和粘附动力学: $y = 0.1782\ln(x) - 1.6923$ ($R^2 = 0.9810$);不同生长阶段河流弧菌的粘附能力不同,在培养初期阶段细菌的粘附量先是随着培养时间的延长而增大,并在培养 24h 后粘附量达到最大,而后随着培养时间的延长其粘附量急剧下降;抗体处理后河流弧菌的粘附量显著低于对照组($P < 0.05$);营养饥饿菌体的粘附量明显降低。以上结果表明:海水中的河流弧菌能很好地粘附于大黄鱼鳃粘液,其粘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。

关键词 河流弧菌, 大黄鱼, ELISA, 鳃粘液, 粘附作用

中图分类号 S432.1

大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)是我国当前海水网箱养殖的主要品种之一,目前随着养殖规模的不断扩大,包括弧菌病在内的各种病害发生日趋频繁,给养殖业造成巨大的经济损失(鄢庆枇等, 2001; 王军等, 2001; 王娟等, 2010)。

河流弧菌(*Vibrio fluvialis*)广泛存在于河流和出海口环境水域,是海水养殖主要的病原菌之一(Baffone *et al*, 2001),可引起鱼、虾、贝等多种养殖动物的疾病(邹文政等, 2010),给养殖业带来严重的经济损失。河流弧菌还可通过不洁海产品导致人类严重的流行性腹泻,被认为是一种全球性的人兽共患的新型病原菌(Lai *et al*, 2006)。基于该菌对水产动物和人类健康都造成严重危害,因此对其致病机理的研究具有十

分重要的意义。

病原菌对鱼类的感染途径很多,已报道鱼类的消化道、鳃、表皮可能是细菌的侵染部位(Marco-Noales *et al*, 2001)。鱼类的肠道、鳃和表皮都覆盖一层由外胚层球状细胞分泌的粘液层(Pickering, 1974)。由于粘液层位于鱼体的最外层,因此病原菌对粘液的粘附是其感染鱼类并发挥毒力的先决条件(Acord *et al*, 2005)。了解病原菌对鱼类粘液的粘附特性并对其粘附作用进行有效的阻断,对于疾病的防治有着重要的意义。

目前研究致病菌对鱼类粘液粘附作用的方法主要有同位素示踪法和显微镜计数法,其中显微镜计数法的工作量很大,而同位素示踪法涉及放射性污

* 公益性行业(农业)科研专项, 200903029 号; 国家“863”计划项目, 2007AA09Z115 号; 农业部产业技术体系项目, 200907100001 号; 福建省杰出青年基金项目, 2011J06014 号。朱苏琴, E-mail: xiaoturen.2010@163.com

通讯作者: 鄢庆枇, 博士, 教授, E-mail: yanqp@jmu.edu.cn

收稿日期: 2010-12-25, 收修改稿日期: 2011-02-25

染,都难以推广应用,制约着相关研究的发展。因此,建立低污染、高效率的研究方法是研究致病菌对鱼类粘液粘附作用的关键。

本文通过优化 ELISA 试验条件,建立了适用于细菌在鱼类粘液上粘附量检测的间接 ELISA 方法,并用该方法研究了河流弧菌对大黄鱼鳃粘液的粘附特性,以期致病菌粘附作用研究提供一种快速、简便、灵敏的新方法,同时为探讨河流弧菌对大黄鱼粘液的粘附规律,乃至对大黄鱼的致病机理提供有价值的参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验菌株及培养条件

病原性河流弧菌分离自患病大黄鱼(鄢庆枇等,2001),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胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB), 28°C 培养12h后在 4°C 、2000g离心10min收集菌体,用无菌生理盐水将菌浓度调整至约 10^8cfu/ml ($OD_{550} = 0.15$)待用。

1.2 鳃粘液的制备

参考 Lumsdem 等(1993)方法制备鳃粘液,切除鳃弓,放在 4°C 无菌海水中浸泡2h,期间搅动几次,20000g离心2次,每次30min,以去除颗粒物质,上清液依次用 $0.45\mu\text{m}$ 、 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌,用Bradford(1976)法测定蛋白质浓度,并调整到 1mg/ml 后分装保存于 -80°C 超低温冰箱待用。

1.3 体外粘附试验

参考 Vesterlund 等(2005)方法,取96孔酶标板,每孔加入 $100\mu\text{l}$ 粘液, 4°C 包被18—20h后弃去残留粘液,用 $200\mu\text{l}$ 无菌海水清洗2次;加入 $100\mu\text{l}$ 菌(10^8cfu/ml), 28°C 孵育120min;以生理盐水作阴性对照,然后用0.85%无菌生理盐水清洗2次以除去未粘附的菌;采用鄢庆枇等(2001)改良后的间接ELISA方法测定该菌,粘附量用 OD_{492} 表示。

1.4 粘附量与 OD 关系测定

将菌浓度调至 $OD_{550} = 0.2$,约 $2.6 \times 10^8\text{ cells/ml}$ 后,依次进行二倍稀释10次后,按照改良的间接ELISA法(鄢庆枇等,2001)进行试验,以确定菌浓度与 OD_{492} 值的关系。

1.5 菌浓度对河流弧菌粘附影响测定

按2.1的方法制备菌悬液,将菌悬液进行二倍系列稀释7次,按1.3的方法进行粘附试验,测定并了解菌浓度对粘附作用的影响。

1.6 不同条件下河流弧菌对鳃粘液的粘附作用

1.6.1 不同培养条件下河流弧菌的粘附试验 将河流弧菌用胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)和胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)分别培养,按2.3的方法进行粘附试验。

1.6.2 不同培养阶段河流弧菌的粘附试验 将已活化的河流弧菌在TSB分别培养5h、7h、12h、24h、36h、72h后按1.3方法进行粘附试验。

1.7 菌体的不同处理对粘附的影响试验

1.7.1 抗体处理后河流弧菌的粘附试验 取河流弧菌兔抗血清按10%的量加入TSB菌悬液中,在 28°C 孵育30min,离心后以灭菌生理盐水清洗2次,按1.3方法进行粘附试验,以生理盐水作对照。

1.7.2 营养饥饿河流弧菌的粘附试验 按2.3的方法,TSB制备菌悬液,在 28°C 条件下将菌悬液饥饿0d、1d、2d、3d、4d、5d、10d,按1.3方法进行粘附试验。

1.8 统计学分析

试验结果以平均数 \pm 标准差表示,用SPSS17.0统计学软件进行 t 检验, $P < 0.05$ 为显著差异, $P < 0.01$ 为极显著差异。

2 结果与分析

2.1 粘附量与 OD_{492} 关系的确定

如图1所示, OD_{492} 随着菌浓度的升高而升高,两者存在线性关系。因此通过测定 OD_{492} 可反映细菌粘附量。由于本方法中测得的阴性对照的 OD_{492} 约为0.324,空白孔的 OD_{492} 为0.040,根据 $(OD_{\text{样品}} - OD_{\text{空白}}) / (OD_{\text{阴性对照}} - OD_{\text{空白}}) > 2$ 者为阳性,本试验所采用的方法的菌浓度的最低检测限约为 $9.76 \times 10^5\text{ cells/ml}$,由于使用菌液 $100\mu\text{l}$,因此本方法对粘附菌量的最低检

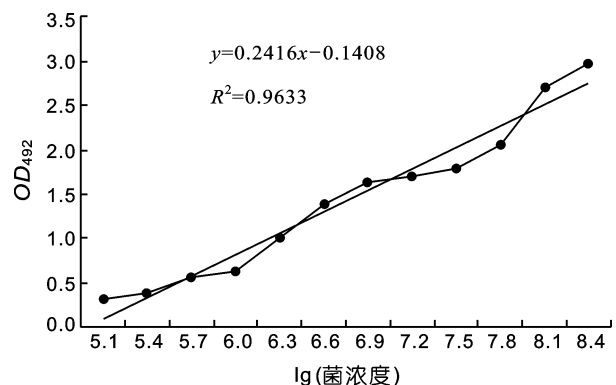


图1 菌浓度与 OD_{492} 的关系

Fig.1 Relationship between OD_{492} and bacterial concentration

测限约为 9.76×10^4 cells。

2.2 菌浓度对河流弧菌粘附的影响

河流弧菌对大黄鱼鳃粘液的粘附量随着菌浓度的升高而增大, 由图 2 可知, 高浓度时粘附量增加比低浓度时的粘附量增加幅度更慢, 其粘附有趋于饱和之势。菌浓度(x)与粘附量(y)的拟合曲线为 $y = 0.1782 \ln(x) - 1.6923$ ($R^2 = 0.981$)。由于该菌的粘附为饱和粘附, 其粘附动力学可用公式 $1/e_x = 1/e_m + k_x/e_m x$ (Lee *et al.*, 2000)表示, e 表示粘液中的粘附位点, e_x 表示结合到粘附位点上的菌浓度, x 表示添加的菌浓度, e_x 最大价值用 e_m 表示。以添加的菌浓度的倒数和粘附的菌浓度的倒数作图, 可得到一个线性关系, 由此可得出该菌的最大粘附量(e_m)、分离常数(k_x)及粘附亲和力(e_m/k_x)分别为: 1×10^7 、 4.17×10^7 、0.2395。

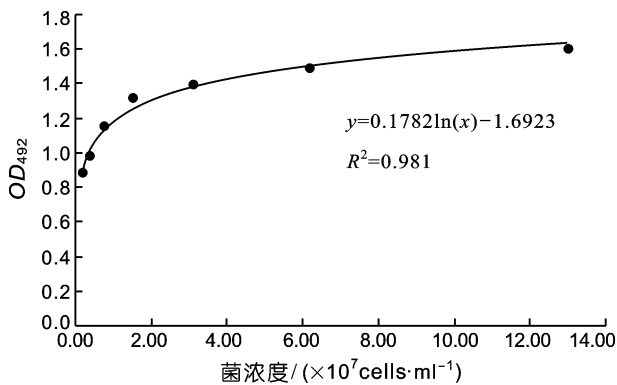


图 2 菌浓度对河流弧菌粘附的影响

Fig.2 Influence of bacterial concentration on adhesion of *V. fluvialis*

2.3 不同条件下对河流弧菌粘附的影响

2.3.1 不同培养条件对河流弧菌粘附的影响

河流弧菌对大黄鱼粘液的粘附作用随不同培养条件而异, 在菌液浓度同为约 10^8 cells/ml 条件下, 经 TSB 培养的河流弧菌对大黄鱼鳃粘液的粘附量(约为 7.17×10^6 cells/ml)极显著高于经 TSA 培养的河流弧菌的粘附量(约为 5.14×10^6 cells/ml), 经 t 检验, 两者存在极显著差异($P < 0.01$)。TSA 培养条件下菌的粘附量为 TSB 条件下粘附量的 70%。

2.3.2 菌体的不同培养阶段对粘附的影响

河流弧菌的不同培养阶段对鳃粘液粘附作用的影响如图 3 所示, 菌体在培养 5—24h 时, 其粘附量随着培养时间的延长而呈上升趋势, 菌粘附量在培养约 24h 时达到最大, 约为 7.3×10^5 cells。当培养时间至 36h 以上时, 菌体的粘附量急剧下降。经 t 检验, 培养时间为

24h 时的粘附量与 12h 的粘附量不存在显著差异($P > 0.05$), 且极显著高于其它试验组的粘附量($P < 0.01$)。

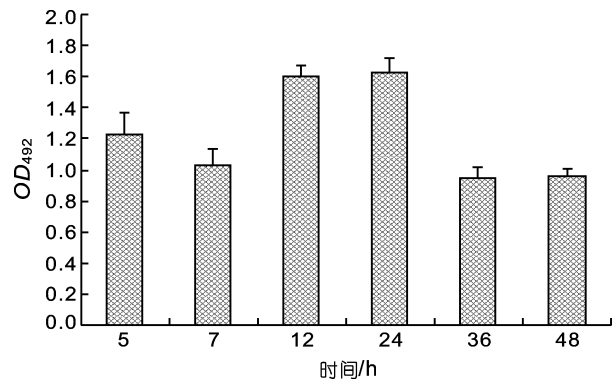


图 3 不同培养阶段对河流弧菌粘附的影响

Fig.3 Influence of culture stage on adhesion of *V. fluvialis*

2.4 菌体不同处理对河流弧菌粘附的影响

2.4.1 抗体处理对河流弧菌粘附的影响

经兔抗河流弧菌 O 抗体处理后, 河流弧菌对大黄鱼鳃粘液的粘附量显著降低, 其粘附量为 4.22×10^6 cells/ml, 为对照组粘附量(7.21×10^6 cells/ml)的 58%。经 t 检验, 抗体处理组与对照组的粘附量存在显著差异($P < 0.05$)。

2.4.2 营养饥饿对河流弧菌粘附的影响

营养饥饿对河流弧菌粘附的影响如图 4 所示。菌体经饥饿处理后其粘附大黄鱼表皮粘液的粘附能力呈明显的下降趋势。河流弧菌在无菌生理盐水的条件下饥饿 1d 后, 其粘附量降为 0d 时粘附量的 70%; 之后仍迅速下降, 在第 3 天粘附量为 0d 的 40%, 继续饥饿处理至第 10 天粘附量与第 3 天相同。

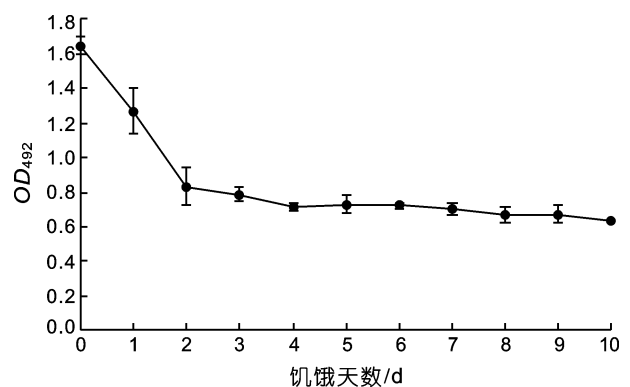


图 4 营养饥饿对河流弧菌粘附的影响

Fig.4 Influence of starvation on adhesion of *V. fluvialis*

3 讨论

本试验采用酶标板进行粘附试验, 与采用显微

镜直接计数相比,大大提高了效率,且克服了最常用的放射性同位素法的安全性问题。本实验采用的ELISA法的灵敏度(最低检测值约为 9.76×10^4 cells)与常用的放射性标记法的灵敏度(陈强等, 2007)相当。

因此,本实验采用的ELISA法,是测定病原菌对鱼类粘液粘附量的一种简便、快速、准确度高的新方法,可为今后研究粘附提供有价值的参考。

3.1 不同培养条件对河流弧菌粘附的影响

经 TSB 培养的河流弧菌对大黄鱼鳃粘液的粘附量高于经 TSA 培养的河流弧菌的粘附量。Kogure 等(1998)研究表明细菌的运动能力是决定其粘附性的一个重要因素。因此这可能是由于在 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。研究表明,端鞭毛的运动性强于侧鞭毛,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(Belas *et al*, 1982)。由此可解释 TSB 中所培养的细菌运动能力更强,从而其粘附量更多。由于在 TSB 中培养的河流弧菌对大黄鱼鳃粘液的粘附能力较强,因此,本研究其余试验皆采用 TSB 培养的河流弧菌。

3.2 菌体的不同培养阶段对粘附的影响

细菌表面成分主要含有脂多糖、蛋白质、肽聚糖等有利于细菌对受体吸附带负电荷基团的成分(Brierley, 1991)。较早的研究也发现,在革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌以及古细菌的细胞壁表面均发现存在一种与细菌的粘附有关的表面层蛋白(Takao *et al*, 2002)。已有研究表明,表面蛋白和细菌脂磷壁酸的合成均与其生长进程相关,表面蛋白的合成随着细菌生长的进程而增加,且稳定期合成量最多,之后随着生长进程的继续增加,合成量又呈下降趋势(尤萍等, 2004)。这解释了河流弧菌在稳定期时对大黄鱼粘液的粘附量达到最大,而衰亡期的细菌粘附能力很弱。

3.3 抗体处理对河流弧菌粘附的影响

兔抗河流弧菌抗体组的粘附量存在极显著差异($P < 0.01$)。粘附素是具有粘附作用的,位于各种细菌表面结构,并能介导致病菌对真核细胞表面粘附的大分子物质,弧菌具有多种粘附素如菌毛、纤毛、脂多糖(LPS)、胞外多糖、外膜蛋白(OMP)等等(Wang *et al*, 2000)。河流经抗血清处理后对大黄鱼粘液的粘附量显著减少,由于抗血清中存在能与河流弧菌的菌体抗原相结合的免疫球蛋白分子,导致细菌表面的粘附素无法与粘液中的粘附受体相结合,封闭了菌体表面的粘附位点,发挥了生物占位性保护作用

(Michetti *et al*, 1999),从而降低了粘附作用。本研究结果说明河流弧菌对大黄鱼粘液的作用是特异性的结合。

3.4 营养饥饿对河流弧菌粘附的影响

河流弧菌经饥饿处理后,其对大黄鱼鳃粘液的粘附能力呈显著的下降趋势,第 3d 其粘附量即为正常菌体的 40%。Morton 等(1994)研究表明,细菌在生长过程中蛋白质合成受其营养条件的调节,处于饥饿状态时会显著阻碍菌体蛋白质的合成。这可能就影响了处于菌体细胞表面与粘附有关的蛋白质的合成及其相关结构的形成,从而降低了其粘附能力。饥饿可能还会导致菌体无法提供其鞭毛或菌毛运动所需的能量,由此降低了菌体的运动能力,这可能也是导致其粘附量下降的原因之一。该研究结果也说明了在寡营养水体中弧菌病不易爆发的原因。

总之,根据本文研究的结果,可认为病原性河流弧菌能够较好地粘附于大黄鱼鳃粘液,这有利于进一步感染、致病。其粘附作用不仅受细菌培养条件、营养状况等自身因素的显著影响,还与其环境因子密切相关。本研究结果有助于了解河流弧菌的流行病学和致病机理。

参 考 文 献

- 王 军, 苏永全, 张朝霞等, 2001. 闽南地区养殖大黄鱼细菌性疾病的病原生物学研究. 厦门大学学报(自然科学版), 40(1): 85—91
- 王 娟, 封永辉, 蔡立胜等, 2010. 来自大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)肠道的弧菌拮抗菌的筛选与鉴定. 海洋与湖沼, 41(5): 707—713
- 尤 萍, 马玉龙, 2004. 双歧杆菌对肠上皮细胞黏附作用的研究及应用展望. 饲料工业, 5(4): 42—45
- 邹文政, 纪荣兴, 鄢庆枇等, 2010. 河流弧菌(*Vibrio fluvialis*)感染后牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)血清抗菌物质的研究. 海洋与湖沼, 41(4): 477—482
- 陈 强, 鄢庆枇, 邹文政等, 2007. 环境因子对溶藻弧菌粘附大黄鱼表皮粘液影响的研究. 海洋与湖沼, 38(4): 361—366
- 鄢庆枇, 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: 191—196
- Acord J, Maskell J, Sefton A, 2005. A rapid microplate method for quantifying inhibition of bacterial adhesion to eukaryotic cells. *Journal of Microbiological Methods*, 60(1): 55—62
- Baffone W, Citterio B, Vittoria E *et al*, 2001. Determination of several potential virulence factors in *Vibrio* spp. isolated from sea water. *Food Microbiology*, 18(5): 479—488
- Belas M R, Colwell R R, 1982. Adsorption kinetics of laterally and polarly flagellated *Vibrio*. *Journal of Bacteriology*, 151(3): 1568—1580
- Bradford N M, 1976. A rapid and sensitive method for the quan-

- tification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annual Biochemistry*, 72: 248—254
- Brierley C L, 1991. Metal immobilization using bacteria. New York: McGraw-Hill Book Co., 303—324
- Kogure K, Ikemoto E, Morisaki H, 1998. Attachment of *Vibrio alginolyticus* to glass surfaces is dependent on swimming speed. *Journal of Bacteriology*, 180(4): 932—937
- Lai C H, Wang C K, Chin C *et al*, 2006. Severe watery diarrhoea and bacteremia caused by *Vibrio fluvialis*. *Journal of Infection*, 52(3): 95—98
- 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
- Lumsdem J S, Ostland L E, Byrne P J *et al*, 1993. Detection of a distinct gill-surface antibody response following horizontal infection and bath challenge of brook trout *Salvelinus fontinalis* with *Flavobacterium branchiophilum*, the causative agent of bacterial gill disease. *Diseases of Aquatic Organisms*, 16: 21—27
- Marco-Noales E, Milan M, Fouzb B *et al*, 2001. Transmission to Eels, Portals of Entry, and Putative Reservoirs of *Vibrio vulnificus* Serovar E (Biotype2). *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10): 4717—4725
- Michetti P, Dorta G, Wiesel P H *et al*, 1999. Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* (Johnsonii) Lal on *Helicobacter pylori* infection in humans. *Digestion*, 60: 203—209
- Morton D S, Liver J D, 1994. Induction of carbon starvation-induced proteins in *Vibrio vulnificus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(10): 3653—3659
- Pickering A D, 1974. The distribution of mucous cells in the epidermis of the brown trout *Salmo trutta* (L.) and the char *Salvelinus alpinus* (L.). *Journal of Fish Biology*, 6: 111—118
- Takao M, Tomoko A, Eri S *et al*, 2002. Inhibition of binding of *Helicobacter pylori* to the glycolipid receptors by probiotic *Lactobacillus reuteri*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 32: 105—110
- Vesterlund S, Paltta J, Karp M *et al*, 2005. Adhesion of bacteria to resected human colonic tissue: quantitative analysis of bacterial adhesion and viability. *Research in Microbiology*, 156: 238—244
- Wang X H, Leung K Y, 2000. Biochemical characterization of different types of adherence of *Vibrio* species to fish epithelial cells. *Microbiology*, 146: 989—998

STUDY ON ADHESION CHARACTERISTICS OF *VIBRIO FLUVIALIS* TO THE GILL MUCUS OF *PSEUDOSCIAENA CROCEA*

ZHU Su-Qin¹, JI Rong-Xing¹, SU Yong-Quan², WANG Jun², QIN Ying-Xue¹,
MA Ying¹, ZOU Wen-Zheng¹, LI Hai-Ping¹, YAN Qing-Pi¹

(1. College of Fisheries, Jimei University; Key Laboratory of Healthy Mariculture for East China Sea, Ministry of Agriculture, Xiamen, 361021; 2. College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen, 361005)

Abstract In order to get a better understanding of adhesion of pathogenic *Vibrio fluvialis* to the gill mucus of *Pseudosciaena crocea*, the influences of culture condition, bacterial density, culture stage, antibody treatment on the bacterial adhesion were investigated by indirect ELISA, successfully established by modifying various conditions. The results showed that the adhesion ability of *V. fluvialis* incubated in TSB was extremely stronger than that of *V. fluvialis* incubated in TSA ($P < 0.01$); the adhesive quantity of *V. fluvialis* increased with bacterial densities and peaked at 180 min post-incubation under 25°C; a saturation kinetics hyperbola: $y = 0.1782\ln(x) - 1.6921$ ($R^2 = 0.9810$), was obtained by plotting adhered bacteria against the density of bacteria added; different adhesion abilities were showed when *V. fluvialis* at different culture stages. During 0 to 24 hour, the number of adhering bacteria increased with incubation time and reached peak at 24h, and then dropped sharply with the culture time extension. After the bacteria were treated with rabbit antiserum against O-antigen of *V. fluvialis*, the number of adhering bacteria reduced by 52%. All the results indicate that *V. fluvialis* can adhere to the skin mucus of *P. crocea* strongly in seawater by specific adhesion. However this kind of bacterial adhesion was not only remarkably influenced by environmental factors but also by culture conditions and nutrition level. These results are helpful for better understanding the characteristics of epidemiology and pathogenesis of *V. fluvialis*, which might be useful for the vibriosis control in fish culture.

Key words *Vibrio fluvialis*, *Pseudosciaena crocea*, ELISA, Gill mucus, Adhesion