

文章编号:1000-0615(2008)03-0441-07

## 病原性河流弧菌对青石斑鱼体表黏液黏附特性的研究

王晓露, 邹文政, 鄢庆枇, 郭国军, 陈强

(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)

**摘要:**采用<sup>3</sup>H-TdR同位素示踪法研究了河流弧菌对不同处理后的青石斑鱼表皮黏液的黏附作用。结果显示:青石斑鱼表皮黏液经40、60和80℃热处理10 min后河流弧菌的黏附率出现显著性升高,而100℃处理10 min则能极显著降低河流弧菌的黏附作用;蛋白酶K和胰蛋白酶处理黏液对河流弧菌的黏附作用没有显著影响,高碘酸处理则能极显著提高河流弧菌的黏附率;8种碳水化合物中的葡萄糖、甘露糖、甘露醇、麦芽糖能极显著促进河流弧菌的黏附作用,乳糖、果糖及蔗糖能显著性促进河流弧菌的黏附作用;半乳糖则没有显著性影响;高浓度的细胞表面提取物能显著抑制河流弧菌的黏附作用,但较低浓度的细胞表面提取物反而有一定的促进作用;青石斑鱼表皮黏液经Sephadex G-100分离得到3个洗脱峰,河流弧菌对第1个洗脱峰的黏附作用最强。研究结果表明,病原性河流弧菌对青石斑鱼表皮黏液有较强的黏附作用;青石斑鱼表皮黏液中存在特异性黏附受体;黏液中的主要黏附受体是热稳定性较高、耐蛋白酶K和胰蛋白酶的大分子物质。

**关键词:**河流弧菌;青石斑鱼;表皮黏液;黏附作用

**中图分类号:**Q 949.321 **文献标识码:**A

细菌性疾病是影响鱼类养殖的最重要因素之一<sup>[1]</sup>。鱼类的肠道、鳃和表皮都是病原菌可能的侵入位点,在这些部位都覆盖一层由外胚层球状细胞分泌的黏液层<sup>[2]</sup>。鱼类的黏液层具有一定的抗菌活性,是鱼类非特异性免疫的重要组成<sup>[3]</sup>。由于黏液层位于鱼体的最外层,因此病原菌对黏液的黏附是其感染鱼类的第一个关键步骤,对黏液的黏附能力是病原菌毒力的一个重要因素<sup>[4]</sup>。了解病原菌对鱼类黏液的黏附特征有助于发现适当的措施抑制病原菌的黏附作用,对于疾病的防治有着重要的意义。近十年来,病原菌对鱼类黏液的黏附作用引起了国内外学者的重视。已经研究了鳗李斯特菌(*Listonella anguillarum*)<sup>[5]</sup>、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)<sup>[6]</sup>等病原菌对金头鲷(*Sparus aurata*)黏液的黏附作用。黏液特性对于

病原菌的黏附具有非常重要的影响,但是,目前有关水产病原菌对鱼类黏液的黏附研究主要集中于黏附动力学<sup>[5]</sup>以及理化因子<sup>[7]</sup>、拮抗菌<sup>[8]</sup>等对黏附作用的影响,尚未有着重从鱼类黏液特性来探讨病原菌黏附作用的研究报道。

青石斑鱼(*Epinephelus awoara*)是一种名贵海水产鱼类,是我国南方海水网箱养殖的主要品种<sup>[9]</sup>。近年来,随着青石斑鱼养殖规模的不断扩大,各种病害的发生日趋频繁,并造成了严重的经济损失<sup>[9-11]</sup>。河流弧菌(*V. fluvialis*)是青石斑鱼的主要病原菌之一<sup>[11]</sup>。河流弧菌是一种广泛分布于近岸海域的嗜盐性革兰氏阴性菌,能引起多种水产动物的疾病<sup>[12]</sup>,并可通过污染食品引起食物中毒,引发肠胃炎等疾病<sup>[13]</sup>。虽然河流弧菌对养殖动物和人类健康都有严重危害,但是对其致病机

收稿日期:2007-02-04

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2002AA639600);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:王晓露(1983-),女,福建永泰人,硕士研究生,主要从事水产病害研究。E-mail:wxl.1314@163.com

通讯作者:鄢庆枇,E-mail:yanqp@jmu.edu.cn

理的研究却非常之少,还未见有河流弧菌对鱼类黏液黏附作用的研究报道。

本文以从患病青石斑鱼分离的病原性河流弧菌为研究对象,研究河流弧菌对经不同处理后的青石斑鱼表皮黏液的黏附作用,以期了解河流弧菌对青石斑鱼表皮黏液的黏附特性,为探讨河流弧菌对青石斑鱼的致病机理和疾病的科学防治提供有价值的参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

河流弧菌为患病石斑鱼中分离的病原菌株<sup>[11]</sup>,保存于本实验室的-80℃超低温冰箱。

20尾体重300~500g的健康青石斑鱼购自厦门某养殖渔排。

<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷(<sup>3</sup>H-TdR)购自中科院应用物理研究所,放射性比活度为30 Ci·mmol<sup>-1</sup>,放射性浓度1 mCi·mL<sup>-1</sup>。

闪烁液:6 g·L<sup>-1</sup> 2,5-二苯基■唑(PPO,购自Sigma);0.1 g·L<sup>-1</sup> 1,4-双-[5-苯基■唑基-2-]-苯(POPOP,购自中科院应用物理研究所)溶于二甲苯、无水乙醇混合液(V:V=3:2)中。

### 1.2 试验方法

**青石斑鱼表皮黏液制备** 参考 Bordas 等<sup>[6]</sup>的方法,用钝塑料片刮取青石斑鱼表皮背部黏液,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 滤膜过滤除菌。根据 Bradford<sup>[14]</sup>的方法测定蛋白质浓度,将蛋白含量调整到1 mg·mL<sup>-1</sup>左右,保存于4℃冰箱待用。

**菌株培养及放射性标记** 河流弧菌接种于2% NaCl 胰蛋白胨大豆培养液(TSB),每毫升培养液加入10 μL <sup>3</sup>H-TdR,25℃培养12 h,然后于4℃、2 000 g 离心10 min,收集菌体,用0.85%无菌生理盐水清洗菌体2次,根据 OD<sub>550</sub>值估算菌液浓度,将菌浓度调整到10<sup>8</sup> cell·mL<sup>-1</sup>左右待用。

**标记菌的放射性测定** 将标记的菌悬液 OD<sub>550</sub>调至0.185(2.8×10<sup>8</sup> cell·mL<sup>-1</sup>),先稀释10倍后再2倍稀释8次,取各稀释度菌液150 μL 测定放射性,以150 μL 1% SDS 0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 溶液作为空白对照。

**体外黏附试验** 参考 Vesterlund 等<sup>[15]</sup>的方法,将表皮黏液加入96孔酶标板中,每孔150 μL,

4℃包被18~20 h后弃去残留黏液,用200 μL 无菌海水清洗2次;加入150 μL <sup>3</sup>H-TdR 标记的菌悬液,25℃孵育150 min;0.85%无菌生理盐水清洗2次除去未黏附的细菌;加入150 μL 1% SDS 0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 溶液,60℃保温1 h,以回收黏附的菌体;将回收液加入20 mL 闪烁瓶中,测定前12 h 加入10 mL 闪烁液,用液体闪烁计数仪(Beckman Coulter LS6500)测定放射活性(DPM)。

**黏液热处理后河流弧菌的黏附作用** 黏液分别于40、60、80和100℃水浴处理10 min,然后按上述方法进行黏附试验,以未经热处理的黏液作为对照。

**黏液经蛋白酶及高碘酸处理后河流弧菌的黏附作用** 用无菌生理盐水配制1 mg·mL<sup>-1</sup>蛋白酶K、胰蛋白酶溶液及10 mmol·L<sup>-1</sup>高碘酸溶液,分别取150 μL 加入已包被黏液的酶标板各孔中,25℃作用1 h,无菌生理盐水清洗2次,然后按上述方法进行黏附试验,以生理盐水处理的黏液为对照。

**黏液经碳水化合物处理后河流弧菌的黏附作用** 用无菌生理水配制1 mg·mL<sup>-1</sup>的葡萄糖、甘露醇、甘露糖、乳糖、半乳糖、果糖、麦芽糖、蔗糖等8种碳水化合物溶液,分别加150 μL 到经表皮黏液包被的酶标板各孔中,25℃处理1 h,用无菌生理盐水清洗2次,按上述方法进行黏附试验,以生理盐水处理的黏液为对照。

**黏液经细胞表面提取物处理后河流弧菌的黏附作用** 参考 Chabrillón 等<sup>[5]</sup>的方法,4℃、6 000 g 离心30 min,收集对数生长期河流弧菌细胞,用pH 7.2、0.2 mol·L<sup>-1</sup> PBS 洗涤2次后重悬浮。冰镇菌悬液用超声波细胞破碎仪于10脉冲处理30 s 后于4℃、27 000×g 离心1 h,去除细菌细胞及碎片,上清液即为河流弧菌细胞表面提取物。根据 Bradford<sup>[14]</sup>法测定所制备的提取物的蛋白质浓度并进行2倍系列稀释,往已包被表皮黏液的酶标板各孔中分别添加不同稀释度提取物150 μL,25℃处理1 h。然后按上述方法进行黏附试验,以0.2 mol·L<sup>-1</sup> PBS 处理的黏液为对照。

**河流弧菌对黏液不同组分的黏附作用** 参考文献<sup>[16]</sup>的方法,填充 Sephadex G-100 凝胶层析柱,按柱体积的5%(6 mL)上样表皮黏液,洗脱液为0.02 mol·L<sup>-1</sup> PBS(pH 7.2),洗脱流速为1 mL·min<sup>-1</sup>,利用蛋白质纯化系统(Amersham

pharmacia biotech ÅKTA prime) 进行样品洗脱、收集及峰值记录。根据所记录的  $OD_{280}$  值将收集的样品合并,按相同比例用透析袋浓缩后,测定所合并的各组分的  $OD_{280}$ 。取各组分  $150 \mu\text{L}$  包被于酶标板,经 2% 脱脂奶粉封闭后,按上述的方法进行黏附试验,以 2% 脱脂奶粉包被的各孔为对照。

试验每一处理均设 3 组平行,结果以平均数  $\pm$  标准偏差表示,用 EXCEL、SPSS 进行统计学分析。

## 2 结果

### 2.1 标记菌的放射活性与菌浓度的关系

将标记细菌的放射活性及浓度分别取对数值作图,可知放射性活性随着菌浓度的升高而升高,两者存在线性关系 ( $R^2 = 0.9906$ ) (图 1)。因此通过测定放射性活性可反映细菌黏附量,并求出细菌的黏附率。图中横线表示空白对照的放射性活性,与放射性活性-菌浓度量化曲线的交叉点的菌浓度约为  $10^5 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,因此本试验所采用的方法的菌浓度的最低检测限约为  $10^5 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。由于每个样品使用菌液为  $150 \mu\text{L}$ ,因此本方法对黏附菌量的最低检测限约为  $1.5 \times 10^4 \text{ cells}$ 。

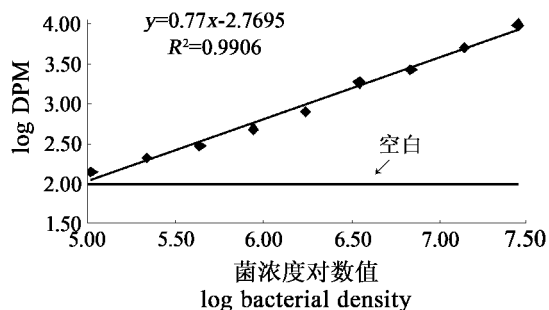


图 1 标记菌的放射活性与菌浓度的量化关系

Fig.1 Relationship between the DPM and the density of isotope labeled *V. fluvialis* suspension

### 2.2 黏液不同处理对河流弧菌黏附作用的影响

**热处理** 图 2 所示,青石斑鱼表皮黏液分别经 40、60 和 80  $^{\circ}\text{C}$  处理 10 min 后,河流弧菌黏附率与对照组相比有显著提高 ( $P < 0.05$ ),3 个不同温度处理组的黏附率之间没有显著性差异;经 100  $^{\circ}\text{C}$  处理 10 min 后,河流弧菌对青石斑鱼表皮黏液的黏附率极显著 ( $P < 0.01$ ) 低于对照组和其它 3 个处理组。

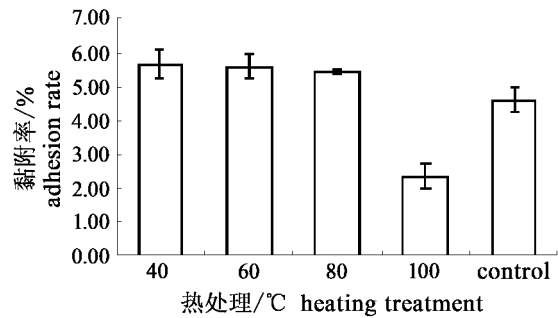


图 2 河流弧菌对经热处理后青石斑鱼表皮黏液的黏附作用

Fig.2 Adhesion of *V. fluvialis* to the skin mucus of *E. awoara* after heating

**蛋白酶及高碘酸处理** 青石斑鱼表皮黏液经蛋白酶 K、胰蛋白酶和高碘酸处理后,河流弧菌的黏附率都出现不同程度的升高(图 3),其中高碘酸处理组河流弧菌黏附率极显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ),也显著高于其它 2 个处理组 ( $P < 0.05$ ),胰蛋白酶和蛋白酶 K 处理组的黏附率亦大于对照试验组,但没有显著性差异 ( $P > 0.05$ )。同时蛋白酶 K 和胰蛋白酶处理组之间也不存在显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

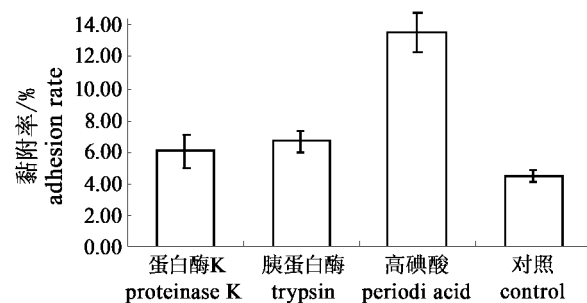


图 3 河流弧菌对经蛋白酶和高碘酸处理后青石斑鱼表皮黏液的黏附作用

Fig.3 Adhesion of *V. fluvialis* to the skin mucus of *E. awoara* pretreated by proteinase and periodic acid

**碳水化合物处理** 如图 4,包被在酶标板上的表皮黏液经不同碳水化合物处理后,河流弧菌对青石斑鱼表皮黏液的黏附率与对照组相比都有所增强。经  $t$  检验,经葡萄糖、甘露糖、甘露醇和麦芽糖处理后河流弧菌黏附率极显著高于对照组 ( $P < 0.01$ );乳糖、果糖和蔗糖处理组与对照组存在显著差异 ( $P < 0.05$ );半乳糖试验组的黏附率与对照组不存在显著差异 ( $P > 0.05$ )。

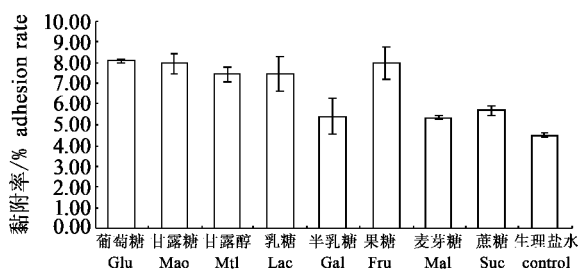


图4 碳水化合物对河流弧菌黏附青石斑鱼表皮黏液的影响

Fig.4 Influence of carbohydrate on the adhesion of *V. fluvialis* to the skin mucus of *E. awoara*

细胞表面提取物处理 所制备的河流弧菌细胞表面提取物的蛋白浓度为  $2.88 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。河流弧菌细胞表面提取物的处理能影响河流弧菌对青石斑鱼表皮黏液的黏附作用,但不同浓度提取物的影响作用不同(图5)。青石斑鱼表皮黏液经高浓度( $> 0.70 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )提取物处理后,河流弧菌的黏附率显著低于对照组( $P < 0.05$ ),而较低浓度( $0.0875 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与 $0.70 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间)提取物处理却能提高河流弧菌的黏附率,更低浓度( $< 0.0875 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )提取物的处理对河流弧菌黏附率没有显著影响( $P > 0.05$ )。

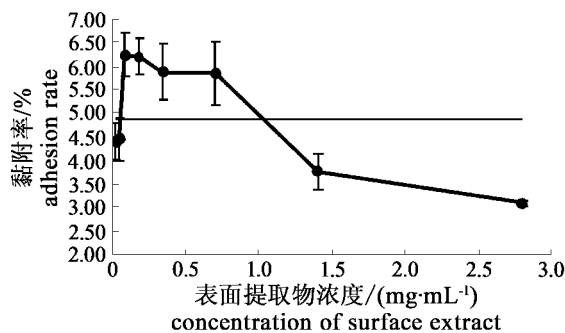


图5 河流弧菌对经细胞表面提取物处理的青石斑鱼表皮黏液的黏附情况

Fig.5 Adhesion of *V. fluvialis* to skin mucus of *E. awoara* pretreated by the surface extract

### 2.3 河流弧菌对黏液不同组分的黏附情况

青石斑鱼的表皮黏液经过 Sephadex G-100 凝胶层析柱分离,得到3个洗脱峰,收集这3个峰(G100a、G100b、G100c)浓缩后的黏附试验所得到的黏附率结果为:G100a > G100c > G100b(图6)。同时,河流弧菌对分离组分 G100a、G100c 的黏附率大于对照组,而河流弧菌对分离组分 G100b 的

黏附率小于脱脂奶粉对照组。经组间 *t* 检验, G100a 与 G100b 存在极显著差异( $P < 0.01$ ), G100a 与 G100c 间存在显著差异( $P < 0.05$ ),然而 G100b 与 G100c 间差异不显著( $P > 0.05$ )。

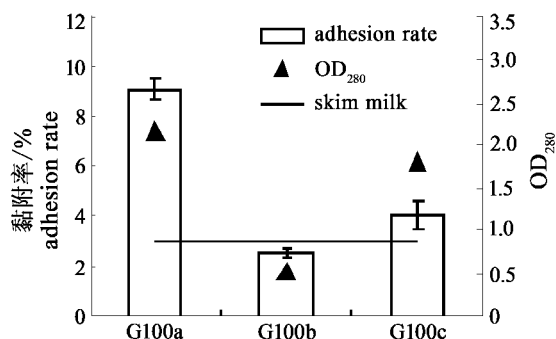


图6 河流弧菌对表皮黏液各组分的黏附情况  
Fig.6 Adhesion of *V. fluvialis* to different fractions of the skin mucus of *E. awoara*

### 3 讨论

细菌对鱼类黏液的黏附是指细菌与黏液通过生物化学作用产生的特异性黏连,对黏液的黏附是病原菌感染鱼体致病的前提之一。河流弧菌对青石斑鱼表皮黏液的黏附率为5%左右,黏附量高达每孔  $1.26 \times 10^7$  个,大大高于鳗李斯特菌 DC11R2 对金头鲷体表黏液2%的黏附率和每孔  $4.67 \times 10^4$  个的黏附量<sup>[5]</sup>。由此可见,河流弧菌对青石斑鱼表皮黏液有较强的黏附作用,有利于其对青石斑鱼感染致病。

已有研究结果表明溶藻弧菌  $56 \text{ }^\circ\text{C}$  处理 5 min 后其黏附作用就出现极显著降低<sup>[17-18]</sup>,而黏液热处理对病原菌黏附作用的影响尚未见报道。病原菌是通过自身表面的黏附素与相应受体相结合而发生黏附作用<sup>[19]</sup>。青石斑鱼表皮黏液经 40、60 和  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  处理 10 min 后并不能抑制河流弧菌对它的黏附作用,而  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  处理 10 min 后河流弧菌的黏附作用出现极显著降低。这说明青石斑鱼表皮黏液中河流弧菌的黏附受体具有较高的热稳定性,虽然目前还不清楚黏附受体的具体化学成分。青石斑鱼表皮黏液中黏附受体的热稳定性有利于今后的分离与纯化。

溶藻弧菌经蛋白酶 K、胰蛋白酶和高碘酸处理后,对大黄鱼表皮黏液的黏附量显著减少<sup>[18]</sup>,鱼类黏液经蛋白酶和高碘酸处理对病原菌黏附作用的影响未见报道。本试验将青石斑鱼表皮黏液经

蛋白酶 K 和胰蛋白酶处理后,河流弧菌的黏附率反而出现轻微的升高,而高碘酸处理更能显著提高河流弧菌的黏附率。高碘酸在酸性条件下可氧化带有邻接羟基的化合物,如糖和多元醇等<sup>[20]</sup>,说明被高碘酸氧化的黏液暴露出更多的黏附位点或者高碘酸破坏了抑制病原菌黏附的化学成分,使河流弧菌更容易黏附于表皮黏液上。Fast 等<sup>[21]</sup>研究发现虹鳟和鲑鱼的表皮黏液具有蛋白酶、碱性磷酸酶及溶菌酶的活性。可能是由于黏液本身有蛋白酶活性,因此其中的黏附受体不容易被蛋白酶 K 和胰蛋白酶降解。细菌黏附过程由细菌表面黏附素与黏液中特异性受体共同完成的<sup>[22]</sup>。许多病原微生物利用宿主主体细胞表面的糖类复合物作为黏附受体,包括鞘糖脂(GSLs)<sup>[23-24]</sup>。Acord 等<sup>[4]</sup>研究表明在 37 种碳水化合物处理下,鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)对 AGS 细胞的黏附有不同程度的抑制或增强。本文的结果表明 8 种糖类都能增强河流弧菌对青石斑鱼表皮黏液的黏附,其中葡萄糖、甘露糖、甘露醇和麦芽糖作用极显著,其原因有待进一步研究。

根据占位性屏蔽作用原理,找出特异性黏附位点,可以利用竞争作用抑制河流弧菌对黏液层的黏附。Chabrilón 等<sup>[5]</sup>研究发现用蛋白浓度为 204.6、20.46、2.046  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的鳗李思特菌表面提取物处理黏液能够显著抑制鳗李思特菌对金头鲷表皮黏液的黏附作用,并由此认为可以采用亚单位疫苗抑制病原菌的黏附作用。本文研究表明高浓度的河流弧菌表面提取物抑制其对青石斑鱼表皮黏液的黏附,这可能是因为提取物中的鞭毛和细胞膜分子等结构和河流弧菌竞争黏附位点造成的,而在一定范围内(蛋白的浓度小于 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),河流弧菌的表面提取物对弧菌的黏附有促进作用,其具体原因尚不清楚。Vine 等<sup>[25]</sup>也发现候选益生菌能够促进溶藻弧菌和嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)对小丑鱼(*Amphiprion percula*)黏液的黏附作用,并认为可能是先加入的候选益生菌改变了黏液的结构,产生了更多更好的黏附位点。这种解释在这里是否适用还有待进一步研究。本文的研究结果表明:如果采用细胞表面提取物来抑制河流弧菌对青石斑鱼表皮黏液的黏附作用,一定要使用高浓度的细胞提取物。

青石斑鱼表皮黏液经 G-100 分离后得到 3 个

主要组分,其中河流弧菌对 G100a 有较强的黏附作用,说明河流弧菌对青石斑鱼表皮黏液的黏附是特异性黏附。由于蛋白质经凝胶层析柱分离过程中较大分子量的蛋白质最先被洗出,因此,G100a 中的蛋白质的分子量要大于另外两个组分。由此可以认为大黄鱼表皮黏液中亲和力最强的黏附受体主要是较大分子量的物质。

根据本文的研究结果,可以认为:病原性河流弧菌对青石斑鱼表皮黏液有较强的黏附作用;青石斑鱼表皮黏液中存在特异性黏附受体;黏液中的主要黏附受体是热稳定性较高、耐蛋白酶 K 和胰蛋白酶的大分子物质;高浓度的细胞表面提取物能抑制河流弧菌的黏附作用。

#### 参考文献:

- [1] Wall V W, Kreger A S, Richardson S H. Production and partial characterization of a *Vibrio fluvialis* cytotoxin [J]. *Infection and Immunity*, 1984, 46(3):773 - 777.
- [2] Pckering A D. The distribution of mucous cells in the epidermis of the brown trout *Salmo trutta* (L.) and the char *Salvelinus alpinus* (L.) [J]. *Journal of Fish Biology*, 1974, 6:111 - 118.
- [3] Alexander J B, Ingram G A. Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish[J]. *Annual Review of Fish Diseases*, 1992, 2:249 - 279.
- [4] Acord J, Maskell J, Sefton A. A rapid microplate method for quantifying inhibition of bacterial adhesion to eukaryotic cells[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, 60(1):55 - 62.
- [5] Chabrilón M, Bordas M A, Moriñigo M A, et al. Kinetics of adhesion of *Listonella anguillarum* to the mucus of gilt-head seabream, and the implication of surface components [J]. *Aquaculture Research*, 2004, 35(4):403 - 409.
- [6] Bordas M A, Balebona M C, Zorrilla I, et al. Kinetics of adhesion of selected fish-pathogenic *Vibrio* strains to skin mucus of gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.) [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(10):3650 - 3654.
- [7] Balebona M C, Moriñigo 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):113 - 120.
- [8] Chabrilón M, Rico R M, Balebona M C, et al. Interactions of microorganisms isolated from gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., on *Vibrio harveyi*, a pathogen

- of farmed Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup) [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2005, 28(9):531 - 537.
- [9] 覃映雪,池信才,苏永全,等. 网箱养殖青石斑鱼的溃疡病病原[J]. *水产学报*, 2004, 28(3):297 - 302.
- [10] 汪彦■,许斌福,林天龙,等. 一例引起青石斑鱼严重死亡的病因探讨[J]. *福建师范大学学报(自然科学版)*, 2001, 17(2):88 - 91.
- [11] 鄢庆枇,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.
- [12] Tall B D, Fall S, Pereira M R, *et al.* Characterization of *Vibrio fluvialis*-like strains implicated in limp lobster disease[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(12):7435 - 7446.
- [13] Kothary M H, Lowman H, McCardell B A, *et al.* Purification and characterization of enterotoxigenic El Tor-like hemolysin produced by *Vibrio fluvialis* [J]. *Infection and Immunity*, 2003, 71(6):3213 - 3220.
- [14] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72:248 - 254.
- [15] Vesterlund S, Palta J, Karp M, *et al.* Measurement of bacterial adhesion-in vitro evaluation of different methods [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, 60(2):225 - 233.
- [16] 汪家政,范 明. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社, 2000.
- [17] 鄢庆枇,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, 30(2):254 - 259.
- [18] 鄢庆枇,陈 强,马 ■,等. 溶藻弧菌对大黄鱼表皮黏液的黏附特性研究[J]. *海洋学报*, 2006, 28(6):100 - 105.
- [19] 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(3):55 - 59.
- [20] 袁 野,应向贤,范光先,等. 高碘酸氧化法直接测定发酵液中赤藓糖醇[J]. *无锡轻工大学学报*, 2000, 19(1):72 - 75.
- [21] Fast M D, Sims D E, Burka J F, *et al.* Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and atlantic salmon[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2002, 132:645 - 657.
- [22] 王 健,毕殿洲. 生物黏附材料的研究进展[J]. *沈阳药科大学学报*, 2002, (5):373 - 383.
- [23] Leffler H, Svanborg-Eden C. Chemical identification of a glycosphingolipid receptor for *Escherichia coli* attaching to human urinary tract epithelial cells and agglutinating human erythrocytes [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1980, 8:127 - 134.
- [24] Karlsson K A. Animal glycosphingolipids as membrane attachment sites for bacteria [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1989, 58:309 - 350.
- [25] Vine N G, Leukes W D, Kaiser H, *et al.* Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2004, 27(6):319 - 326.

## Characteristics of adherence of pathogenic *Vibrio fluvialis* to the skin mucus of *Epinephelus awoara*

WANG Xiao-lu, ZOU Wen-zheng, YAN Qing-pi, GUO Guo-jun, CHEN Qiang

(Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety,  
Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** In order to understand the adhesion characteristic of pathogenic *Vibrio fluvialis* to the skin mucus of *Epinephelus awoara*, isotope tracer method was introduced to investigate the bacterial adhesion of the pathogen to the mucus after different treatment. A significant enhancement in the adhesion rate of *V. fluvialis* to the skin mucus was observed after heating the mucus at 40, 60 and 80 °C for 10 min. However, an extremely significant inhibition in the bacterial adhesion was observed when the mucus had been heated at 100 °C for 10 min. No remarkable effect on the bacterial adhesion was found after treating the mucus with protease K and trypsin, whereas the bacterial adhesion was extremely significantly enhanced by treating the mucus with periodic acid; It was observed that pretreating the mucus with glucose, mannose, mannitol and maltose enhanced the bacterial adhesion extremely significantly, and other 3 carbohydrates enhanced the bacterial adhesion significantly; while galactose could not enhance the bacterial adhesion significantly. Surface extract of *V. fluvialis* with high concentration inhibited the bacterial adhesion significantly, whereas the surface extract with relative low concentration enhanced the bacterial adhesion. 3 protein peaks were obtained by fractionating the mucus with a Sephadex G-100 column, and the strong adhesion was observed to the first peak. The results indicated that: pathogenic *V. fluvialis* adhere to the skin mucus of *E. awoara* strongly; there were specific adhesive receptors within the mucus; the adhesive receptors were likely to be macromolecules with relative stability to heating and protease.

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