

文章编号:1000-0615(2009)02-0318-08

河流弧菌对牙鲆表皮粘液的趋化作用

邹文政, 纪荣兴, 义家波, 鄢庆彬

(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:病原菌对粘液的趋化作用在其对粘液层定植过程中起着重要作用,趋化作用是病原菌的毒力机制之一。为了解病原性河流弧菌对牙鲆表皮粘液的趋化作用,本文采用改良的毛细管法研究了细菌浓度、孵育时间、孵育温度、pH、NaCl浓度、碳水化合物等对河流弧菌趋化作用的影响。试验结果表明,在较低浓度下,河流弧菌对牙鲆表皮粘液的趋化量随着菌浓度的升高而增大;在室温下河流弧菌的趋化量随着孵育时间的延长而增加,60 min 趋于饱和;孵育温度在4~15℃范围内趋化作用随温度升高而增强,15℃时达最大值;pH为8时细菌的趋化性最强;NaCl浓度超过0.8%,河流弧菌的趋化性随着浓度升高而显著减弱($P < 0.05$);8种碳水化合物中甘露醇、乳糖、甘露糖能够极显著地促进河流弧菌对牙鲆表皮粘液的趋化作用($P < 0.01$)。以上结果说明,牙鲆表皮粘液对河流弧菌有较强的趋化作用,该趋化作用受环境因子的影响较大;本文所揭示的河流弧菌趋化特性将对养殖牙鲆疾病防治提供有价值的参考。

关键词:河流弧菌;牙鲆;表皮粘液;趋化作用

中图分类号:Q 579.1; S 917

文献标识码:A

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)肉质鲜美、营养价值高及生长速度快,是我国北方海水鱼类养殖的主导优良品种,在福建、广东等地也有规模化养殖。近年来,随着牙鲆养殖规模的不断扩大,其发病率越来越高,弧菌病的危害尤其严重^[1-2],其中河流弧菌(*Vibrio fluvialis*)是养殖牙鲆的主要病原之一^[3-4]。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^[5]。

病原菌对鱼类的感染途径很多,已报道消化道、鳃、表皮是细菌主要的侵染部位^[6]。在鱼类容易被病原菌侵入的这些部位的表面都覆盖一层粘液。粘液层位于鱼体的最表面,是鱼体与周围的微生物最先发生相互作用的场所。一方面,鱼类的粘液中含有抗体、溶菌酶和抗菌肽等抗菌物质,能够抑制或杀灭一部分病原菌^[7];另一方面,某些病原菌能够很好地粘附于鱼类的粘液层,以利于进一步侵入^[8],有的病原菌甚至可以将粘液

作为碳源加以利用^[9]。已有研究结果表明,病原菌对粘液的趋化作用在其对粘液层定植过程中起着重要作用^[10],趋化作用是病原菌的毒力机制之一^[11]。因此,了解病原菌对粘液的趋化特性,不仅有助于揭示病原菌致病机制而且对于疾病防治也有着重要意义,因为人们可以有针对性地采取适当措施来抑制病原菌的趋化作用^[12],这在抗生素的使用因药物残留等毒副作用而受到越来越多限制的今天显得尤为重要。虽然病原菌的趋化性在医学领域已有较多研究,但是在水产领域这方面的研究才刚刚起步,目前国际上只有零星的研究报道,如 Bordas 等^[13]测定了鳗弧菌(*V. anguillarum*)和溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)对金头鲷(*Sparus aurata*)体表、鳃和肠粘液的趋化能力; Larsen 等^[14]研究了温度、盐度、饥饿等生长因素对鳗弧菌动力与趋化的影响。这些研究虽已证实病原菌对鱼类粘液存在趋化作用,但还不足以阐明病原菌对鱼类粘液的趋化规律。

收稿日期:2007-8-25 修回日期:2008-04-01

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2007AA09Z115);福建省科技项目(2006F5066);福建省科学基金项目(B0440002);厦门市海洋与渔业局科技项目(200707)

通讯作者:鄢庆彬, Tel:0592-6183028, E-mail:yanqb@jmu.edu.cn

本研究病原性河流弧菌对牙鲆表皮粘液的趋化性,探讨养殖水体中相关环境因子对病原菌趋化作用的影响,以期了解河流弧菌对牙鲆表皮粘液的趋化特性,进而了解河流弧菌感染牙鲆的早期阶段的某些特征,并为牙鲆河流弧菌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

河流弧菌分离于患病牙鲆^[4],保存于本实验室的 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱。

30尾外观无伤、健康活泼、体重 $400\sim 500\text{ g}$ 的牙鲆购自福建东山某牙鲆养殖场。

1.2 牙鲆表皮粘液制备

参考 Bordas 等^[15]方法,用钝塑料片刮取牙鲆表皮背部粘液,然后放入灭菌陈海水中混匀; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $20\ 000\text{ r/min}$ 离心2次,每次30 min,以去除颗粒物质;然后依次用 $0.45\ \mu\text{m}$ 、 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌。用灭菌陈海水将蛋白质含量调至 1 mg/mL 后保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用。

1.3 菌株培养及放射性标记

将经 TCBS 琼脂活化的河流弧菌接种于含 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(^3H -TdR,购自中科院应用物理研究所), $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养12 h后于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $6\ 000\times\text{g}$ 离心5 min收集菌体,然后用 0.85% 灭菌生理盐水清洗2次,去上清液,将细菌悬浮于趋化缓冲液(0.01 mol/L pH 7.0 磷酸钾盐缓冲液, 0.001 mol/L MgSO_4 , $0.000\ 1\text{ mol/L}$ EDTA)中,菌浓度调整到 $\text{OD}_{550}=0.05$ (相当于 $2.36\times 10^7\text{ cells/mL}$ 左右)待用。

1.4 标记菌的放射活性与菌浓度的关系

将标记的菌悬液经适当系列稀释后,取 150 mL 各稀释度菌液测定放射活性,以 1% SDS 0.1 mol/L NaOH 溶液作为空白对照。

1.5 趋化试验

参照 Toole 等^[16]方法,并作适当改进。具体步骤:玻璃毛细管(内径 0.3 mm)一端吸入 $5\ \mu\text{L}$ 的粘液后,另一端热熔封闭,然后插入装有 0.3 mL 菌悬液的 1 mL 注射器中,室温下保持水平状态孵育 60 min ;然后取出毛细管,用灭菌水冲洗表面,折断毛细管,将内含物吹入 20 mL 闪烁瓶中,然后加入 $150\ \mu\text{L}\ 1\%$ SDS 0.1 mol/L NaOH

溶液。测定前 12 h 加入 10 mL 闪烁液[6 g/L 2,5-二苯基噁唑(PPO,购自 Sigma)]; 0.1 g/L 1,4-双-[5-苯基噁唑基-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,用液体闪烁计数仪(BECKMAN COULTER LS6500)测定放射活性(dpm)。

1.6 菌浓度对河流弧菌趋化作用的影响

按1.3方法制备菌悬液,将菌悬液以2倍梯度稀释5次,按1.5的方法进行趋化试验,测定不同浓度河流弧菌对牙鲆表皮粘液的趋化情况。

1.7 孵育时间对河流弧菌趋化作用的影响

按1.5的方法进行,将孵育时间分别设定为 30 、 45 、 60 、 90 、 120 min ,测定不同孵育时间河流弧菌对牙鲆表皮粘液的趋化情况。

1.8 理化因子对河流弧菌趋化的影响

温度对趋化作用的影响 按1.5的方法进行试验,将孵育温度设定为 5 、 10 、 15 、 20 、 25 、 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$,比较不同温度下河流弧菌对牙鲆表皮粘液的趋化情况。

NaCl 浓度对趋化作用的影响 分别配制 NaCl 终浓度为 0% 、 0.8% 、 1.8% 、 2.7% 、 3.6% 的趋化缓冲液,按1.3方法制备菌悬液,按1.5的方法进行趋化试验。

pH 对趋化作用的影响 分别配制 pH 为 5 、 6 、 7 、 8 、 9 的趋化缓冲液用于制备菌悬液,然后按1.5的方法进行趋化试验,探讨不同 pH 值时河流弧菌对牙鲆表皮粘液的趋化情况。

碳水化合物对趋化作用的影响 用趋化缓冲液分别配制 1 mg/mL 的甘露醇、甘露糖、乳糖、半乳糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、葡萄糖等8种碳水化合物溶液,再用于制备菌悬液,然后按1.5的方法进行趋化试验。

1.9 数据处理

试验中的每一处理均设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 标记菌的放射性与菌量的关系

标记菌的放射活性随着菌数的增加而升高,两者存在线性关系($R^2=0.999\ 6$)(图1),因此通过测定放射性活性可反映趋化细菌量。本方法的

检测灵敏度(最低可检出菌量)约为 4 660 cells。

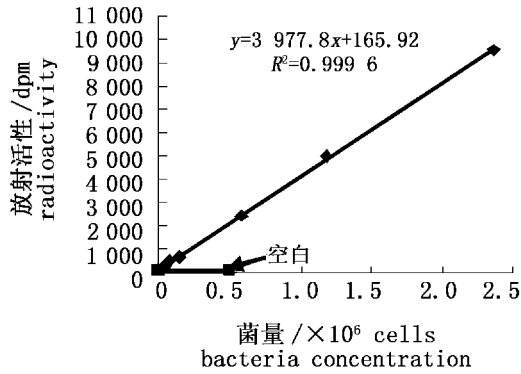


图1 标记菌的放射活性与菌量的关系
Fig.1 Relationship between radioactivity and bacteria number

2.2 菌浓度对河流弧菌趋化作用的影响

在室温下孵育时间 1 h, 河流弧菌对牙鲆表皮粘液的趋化量先随着菌浓度的升高而增大(图 2), 经 t 检验, 菌浓度每升高约 2 倍, 河流弧菌的趋化量有极显著提高($P < 0.01$); 当菌浓度为 5×10^6 cells/mL 时, 河流弧菌的趋化量达到最大, 继续升高菌浓度, 河流弧菌的趋化量则出现显著降低($P < 0.05$)。

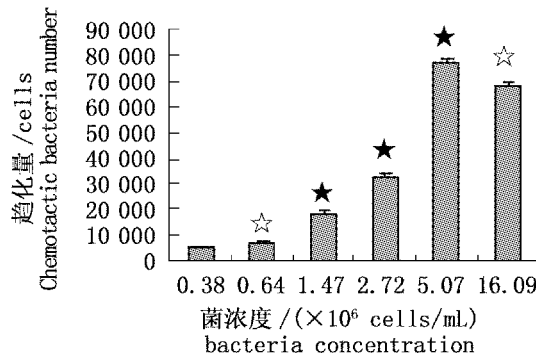


图2 不同菌浓度河流弧菌的趋化量
(★)☆:表示与前一组存在(极)显著差异,下同

Fig.2 Chemotactic bacteria numbers of *V. fluvialis* at different densities

(★)☆: means (extremely) significant difference from the former, same in the following figures

2.3 不同孵育时间对河流弧菌趋化作用的影响

孵育时间对河流弧菌趋化作用的影响见图 3。河流弧菌对牙鲆体表粘液的趋化量随着孵育时间的延长而增加, 孵育时间达 60 min 后, 细菌趋化量趋于饱和。经 t 检验, 孵育时间 45 min 试验组较 30 min 试验组存在显著性差异($P <$

0.05), 孵育时间 60 min 试验组较 45 min 试验组存在极显著性差异($P < 0.01$)。孵育时间超过 60 min 后, 趋化量趋于稳定。

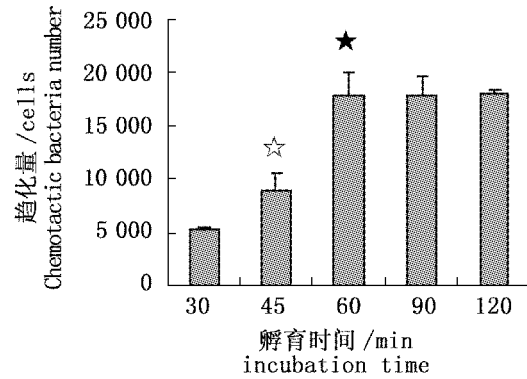


图3 不同孵育时间时河流弧菌的趋化量
Fig.3 Influence of incubation time on chemotaxis of *V. fluvialis*

2.4 不同理化因子对河流弧菌趋化作用的影响

不同温度对河流弧菌趋化作用的影响 在 5 ~ 15 °C 间河流弧菌对牙鲆表皮粘液的趋化量随温度升高而增多, 15 °C 时趋化量最大(图 4)。经 t 检验, 其中在 15 °C 试验组的趋化量极显著高于 10 °C 试验组($P < 0.01$), 显著高于 20 °C 试验组($P < 0.05$)。

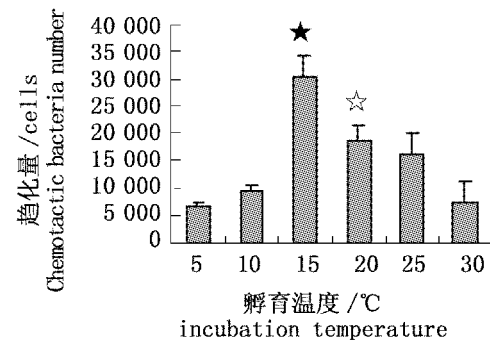


图4 孵育温度对河流弧菌趋化作用的影响
Fig.4 Influence of incubation temperature on chemotaxis of *V. fluvialis*

NaCl 浓度对河流弧菌趋化作用的影响

NaCl 浓度在 0.8% 时, 河流弧菌对牙鲆表皮粘液的趋化量达高峰(图 5), 经 t 检验, 其与对照组(趋化缓冲液不含 NaCl)、1.8% NaCl 试验组均存在极显著性差异($P < 0.01$); NaCl 浓度超过 0.8%, 河流弧菌对牙鲆表皮粘液的趋化随着 NaCl 浓度的升高而降低, 当 NaCl 浓度达到 3.6%, 趋化量较对照组存在显著性差异($P <$

0.05)。

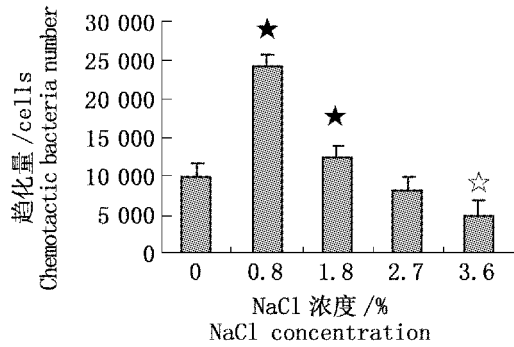


图5 NaCl浓度对河流弧菌趋化作用的影响

☆:表示与对照组存在显著差异

Fig. 5 Influence of NaCl concentration on chemotaxis of *V. fluvialis*

☆:means significant difference from control group

pH值对河流弧菌趋化作用的影响 当趋化缓冲液pH值为5和8的时候,河流弧菌对牙鲆表皮粘液具有较强的趋化性(图6),pH值为6、7、9时,趋化效果较差。经 t 检验,pH 5试验组较pH 6试验组存在显著性差异($P < 0.05$),pH 8试验组较pH 7、9试验组均存在极显著性差异($P < 0.01$);由此可见,在中性偏弱碱性条件下,河流弧菌对牙鲆表皮粘液的趋化较强。

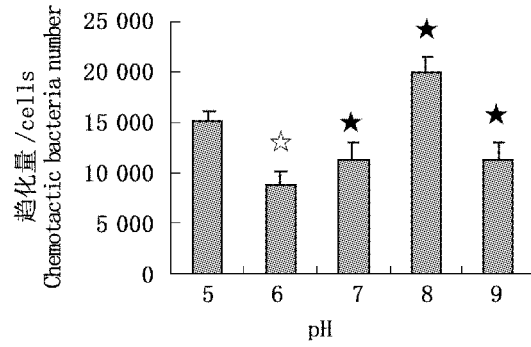


图6 不同pH值对河流弧菌趋化作用的影响

☆:表示与对照组存在显著差异

Fig. 6 Influence of pH on chemotaxis of *V. fluvialis*

☆:means significant difference from control group

不同碳水化合物对河流弧菌趋化作用的影响 8种碳水化合物对河流弧菌趋化影响见图7。由图可知,甘露醇(mannitol)、乳糖(lactose)、甘露糖(semiose)能够有效地促进河流弧菌对牙鲆表皮粘液的趋化作用,经 t 检验,前两者与对照组(不含碳水化合物)均存在显著性差异($P < 0.05$);而在半乳糖(galactose)、麦芽糖(maltose)、蔗糖(saccharose)、果糖(fructose)、葡萄糖(glucose)介质下,河流弧菌对牙鲆表皮粘液的趋化作用明显减弱,经 t 检验,其中对照组较半乳糖、葡萄糖试验组存在着显著性差异($P < 0.05$)。

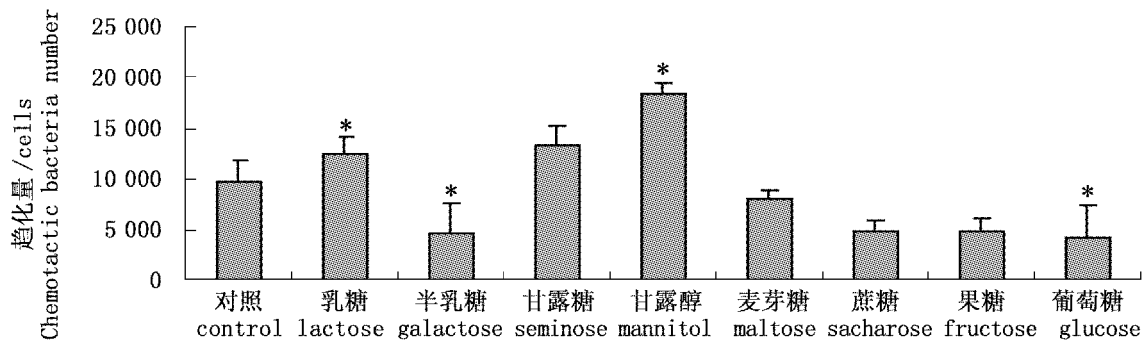


图7 碳水化合物对河流弧菌趋化现象的影响

*:表示与对照组存在显著性差异

Fig. 7 Influence of carbohydrates on chemotaxis of *V. fluvialis*

*:means significant difference from control group

3 讨论

目前,国内外研究细菌趋化性的方法主要有:游动平板法(swarm plate assay)^[17]、滴定分析法

(drop assay)、琼脂糖塞子法(agarose plug assay)^[18]、毛细管法(capillary assay)^[19]、数量分析法(quantification assay)^[20]等,其中毛细管法最为常用。用毛细管法研究细菌的趋化性时,通常采

用平板菌落计数法对趋化细菌进行计数。平板计数法工作量较大,而且细菌趋化时间较长(≥ 1 h),这段时间内细菌的繁殖、死亡等都将导致误差。本文率先将同位素($^3\text{H-TdR}$)示踪法引入细菌的趋化性研究,此方法的检测灵敏度约为4 660 cells,虽然低于平板计数法,但完全能够满足病原弧菌对鱼类粘液趋化作用的定量研究。Bordas 等用平板计数法研究发现5株病原弧菌对金头鲷表皮粘液、肠粘液和鳃粘液的趋化量介于 $7.0 \times 10^4 \sim 2.7 \times 10^6$ cells^[13],这表明 $^3\text{H-TdR}$ 示踪法可以用于不同弧菌对鱼类粘液的趋化研究。由此可见, $^3\text{H-TdR}$ 示踪法比平板计数法快速、简便得多,而且不受趋化后细菌繁殖或死亡等因素的影响,非常适合用于细菌趋化性研究。

起始菌浓度是影响细菌趋化作用的一个重要参数,Keller 等^[21]在描述趋化细胞群体在有刺激物梯度存在情况下的时间空间关系的一维数学模型($Jc = -\mu \frac{\partial b}{\partial x} + xb \frac{\partial a}{\partial x}$, Jc 是细菌群体通量, b 是细菌浓度, a 是吸引剂浓度, μ 是随机运动系数, χ 是细胞趋化系数)时,认为起始菌浓度直接与细菌群体通量关联。Bainer 等^[22]对大肠杆菌(*E. coli*)的趋化性的研究表明菌浓度直接影响细菌趋化性的迁移时间,并认为最大起始菌浓度应控制在 10^7 cells/mL内,过高的起始菌浓度(如 10^8 cells/mL),由于细菌的沉降反而降低了趋化应答水平。本文中,起始菌浓度超过某阈值(5.07×10^6 cells/mL)时,降低了河流弧菌的趋化应答,这也间接表明起始菌浓度在时空上影响了河流弧菌的趋化迁移和趋化通量,从而使得在孵育1 h时高浓度菌组的趋化量反而低于低浓度菌组的趋化量。

细菌的趋化性是细菌通过将细胞外的化学信号转化为胞内各种信号控制鞭毛的运动方向,从而产生相对应的趋化性运动^[23],该过程需要一定的时间。Milner 等^[10]研究表明猪痢疾蛇形螺旋体(*Serpulina hyodysenteriae*)对猪胃粘附素(HGM)的趋化最适孵育时间为1 h,Aaron 等^[24]研究表明假单胞菌(*Pseudomonas putida* G7)对萘的趋化在60 min时达饱和,Toole 等^[16]研究鳗弧菌对鱼肠粘液的趋化孵育时间设为1 h,这些都与本文的结果一致。

Bordas 等^[13]研究表明鳗弧菌和溶藻弧菌对

黑鲷表皮粘液、鳃粘液和肠粘液的趋化温度与盐度有关,其中当温度为22℃、盐度为17时,鳗弧菌对黑鲷表皮粘液的趋化应答最强;当温度为27℃、盐度为17时,溶藻弧菌对黑鲷表皮粘液的趋化应答最强。Larsen 等^[14]认为温度对细菌的趋化具有显著的影响,研究结果显示鳗弧菌对丝氨酸最佳趋化温度为25℃,并推测与酶反应动力学一样,趋化过程中信号转导蛋白磷酸化(和/或甲基化)和感受器受温度的影响。本文中河流弧菌对牙鲆表皮粘液的最适趋化温度为15℃,这与河流弧菌的最适生长温度^[25]不一致,却与牙鲆最适繁殖水温(14~16℃)^[26]一致,其原因有待进一步研究。

Larsen 等^[14]研究也表明鳗弧菌(*V. anguillarum*)对丝氨酸趋化性随着趋化管内NaCl浓度的升高(0.8%~3.6% NaCl)而显著降低,并认为由于 Na^+ 干扰了最佳蛋白的折叠^[27],影响了信号蛋白转导路径,从而影响了细菌的趋化性;Bordas 等^[13]研究显示趋化管外盐度为3.5%(相对1.0%、1.7%)时,鳗弧菌和溶藻弧菌对黑鲷表皮粘液、鳃粘液和肠粘液几乎没有趋化作用,这与本文的结果相似。我们认为产生这种现象的原因可能是由于细菌的趋化性受趋化毛细管内外双重 Na^+ 的影响。河流弧菌属耐盐性细菌,最适于20~40 mmol/L NaCl下生长^[25], Na^+ 的动势是海洋弧菌端鞭毛运动的动力源^[28],而细菌的运动性是其趋化性的基础。当趋化管外NaCl浓度由0增加到0.8%时,河流弧菌的运动性增强,导致其对趋化管内粘液和海水的趋化量增加。但当趋化管外NaCl的浓度继续增加到河流弧菌的适宜范围时,由于对趋化管内海水的趋化作用减弱,导致趋化量减少。

目前,国内外关于pH对细菌的趋化影响机制尚无定论,Tso 等^[29]认为细菌的趋化性受趋化毛细管内外双重pH影响。本文结果说明细菌的趋化性强弱与细菌的生长最适pH^[25]有一定关系。此外,海水中的pH一般为7.5~8.6,这进一步说明天然海水的pH有利于河流弧菌对牙鲆表皮粘液的趋化。

Jeziore-Sassoon 等^[30]研究发现球形红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)对葡萄糖、果糖、甘露糖、甘露醇具有正趋化,而对甲基 α -D-葡萄糖、2-脱氧葡萄糖没有趋化,并认为碳水化合物主要

通过细菌的糖代谢影响了趋化信号产生和电子传递活性。本文中 8 种碳水化合物对河流弧菌的趋化作用分别起到促进或抑制作用,这一方面可能是由于糖代谢影响了河流弧菌趋化信号产生和电子传递活性,另一方面可能是因为河流弧菌本身对半乳糖等 5 种碳水化合物具有较强的趋化性,从而使得河流弧菌在其介质下减弱了对粘液的趋化性。

从本文的结果可以看出,河流弧菌对牙鲆表皮粘液的具有较强的趋化性,这有利于河流弧菌对牙鲆的粘附、感染、致病。河流弧菌的趋化作用受环境因子的影响显著,最适温度、pH、盐度分别为 15 ℃、8.0、0.8%;碳水化合物能够促进(如甘露醇、乳糖、甘露糖)或抑制(如半乳糖、麦芽糖、蔗糖、果糖)河流弧菌对牙鲆表皮粘液的趋化作用。

参考文献:

- [1] 莫照兰,茅云翔,陈师勇,等.一株牙鲆皮肤溃烂病原菌的鉴定[J].微生物学报,2002,42(3):263-269.
- [2] 莫照兰,茅云翔,陈师勇,等.养殖牙鲆鱼苗腹水病原菌的鉴定及系统发育学分析[J].海洋与湖沼,2003,34(2):131-141.
- [3] 常建波,官向红,孙逢贤,等.养殖牙鲆弧菌病原菌初步研究[J].海洋水产研究,2001,22(1):37-41.
- [4] 鄢庆枇,邹文政,纪荣兴,等.应用荧光抗体技术检测牙鲆体内的河流弧菌[J].海洋科学,2006,30(4):16-19.
- [5] 义家波,鄢庆枇,邹文政,等.河流弧菌在天然海水与人工海水中的饥饿效应[J].水产学报,2008,32(2):266-272.
- [6] Marco-Noales E, Milan M, Fouz B, et al. Transmission to eels, portals of entry, and putative reservoirs of *Vibrio vulnificus* Serovar E (Biotype 2) [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(10): 4717-4725.
- [7] Nagashima Y, Sendo A, Shimakura K, et al. Antibacterial factors in skin mucus of rabbitfishes [J]. Journal of Fish Biology, 2001, 58(6): 1761-1765.
- [8] 王晓露,邹文政,鄢庆枇,等.病原性河流弧菌对青石斑鱼体表粘液粘附特性研究[J].水产学报,2008,32(3):441-448.
- [9] Garcia T, Otto K, Kjelleberg S, et al. Growth of *Vibrio anguillarum* in salmon intestinal mucus [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(3): 1034-1039.
- [10] Milner J A, Sellwood R. Chemotactic response to mucin by *Serpulina hyodysenteriae* and other porcine spirochetes; potential role in intestinal colonization [J]. Infection and Immunity, 1994, 62(9): 4095-4099.
- [11] Yao J, Allen C. Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* [J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(10): 3697-3708.
- [12] Tisa L S, Olivera B M, Adler J. Inhibition of *Escherichia coli* chemotaxis by omega-conotoxin, a calcium ion channel blocker [J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(5): 1235-1238.
- [13] Bordas M A, Balebona M C, Rodriguez-Maroto J M, et al. Chemotaxis of pathogenic *Vibrio* strains towards mucus surfaces of Gilt-Head Sea Bream (*Sparus aurata* L.) [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(4): 1573-1575.
- [14] Larsen M H, Blackburn M, Larsen J L, et al. Influences of temperature, salinity and starvation on the motility and chemotactic response of *Vibrio anguillarum* [J]. Microbiology, 2004, 150: 1283-1290.
- [15] Bordas M A, Balebona M C, Zorrilla I, et al. Kinetics of adhesion of selected fish-pathogenic *Vibrio* strains of skin mucus of gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.) [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(10): 3650-3654.
- [16] Toole R O, Lundberg S, Fredriksson S A, et al. The chemotactic response of *Vibrio anguillarum* to fish intestinal mucus is mediated by a combination of multiple mucus components [J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(4): 4308-4317.
- [17] Pandey G, Chauhan A, Samanta S K, et al. Chemotaxis of a *Ralstonia* sp. SJ98 toward co-metabolizable nitroaromatic compounds [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002, 299(3): 404-409.
- [18] Yu H S, Alam M. An agarose-in-plug bridge method to study chemotaxis in the Archaeon *Halobacterium salinarum* [J]. FEMS Microbiology Letters, 1997, 156(2): 265-269.
- [19] Marx R B, Aitken M D. A material-balance

- approach for modeling bacterial chemotaxis to a consumable substrate in the capillary assay [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000, 68(3): 308-315.
- [20] Marx R B, Aitken M D. Quantification of chemotaxis to naphthalene by *Pseudomonas putida* G7[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(7): 2847-2852.
- [21] Keller E F, Segel L A. Model for chemotaxis[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 1971, 30(2): 225-234.
- [22] Bainer R, Park H, Cluzel P. A high-throughput capillary assay for bacterial chemotaxis[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 55(1): 315-319.
- [23] 李燕, 牟伯中. 细菌趋化性研究进展[J]. *应用与环境生物学报*, 2006, 12(1): 135-139.
- [24] Law A M J, Aitken M D. Continuous-flow capillary assay for measuring bacterial chemotaxis [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(6): 3137-3143.
- [25] Murray P R, Baron E J. *Vibrio Manual of Clinical Microbiology* 8th ed [M]. Washington, D. C.: ASM Press, 1999:497-502.
- [26] 朱鑫华, 王云峰, 刘栋. 温度对褐牙鲈资源补充特征的生态效应[J]. *海洋与湖沼*, 1999, 30(5): 477-485.
- [27] Hase C C, Mekalanos J J. Effects of changes in membrane sodium flux on virulence gene expression in *Vibrio cholerae* [J]. *Microbiology*, 1999, 96(6): 3183-3187.
- [28] Atsumi T, Mccarter L, Imae Y. Polar and lateral flagellar motors of marine *Vibrio* are driven by different ion-motive forces[J]. *Nature*, 1992, 355: 182-184.
- [29] Tso W W, Adler J. Negative Chemotaxis in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1974, 118(2): 560-576.
- [30] Jeziore-Sassoon Y, Hamblin P A, Bootle-Wilbraham C A, et al. Metabolism is required for chemotaxis to sugars in *Rhodobacter sphaeroides* [J]. *Microbiology*, 1998, 144(1): 229-239.

Chemotactic response of *Vibrio fluvialis* to the skin mucus of *Paralichthys olivaceus*

ZOU Wen-zheng, JI Rong-xing, YI Jia-bo, YAN Qing-pi

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

Abstract: Chemotaxis of pathogen toward the mucus layer of fish plays an important role in its colonization in the mucus. Chemotaxis is considered to be one of the virulent mechanisms of pathogenic bacterium. For a better understanding of the chemotactic response of pathogenic *Vibrio fluvialis* toward the skin mucus of *Paralichthys olivaceus* so that preventive measures can be devised to reduce the bacterial colonization, the influences of bacteria concentration, incubation time, and environmental factors, such as temperature, pH, salinity and carbohydrate, on the bacterial chemotaxis were investigated by the method of modified capillary assay and isotope tracer. The results showed that the bacteria number of chemotactic *V. fluvialis* toward skin mucus of *P. olivaceus* increased with the bacteria concentration and incubation time, respectively. Saturation of bacterial chemotaxis was obtained after incubating at room temperature for 60 min; the chemotactic bacteria increased with the incubation temperature from 5 °C to 15 °C and peaked at 15 °C, and optimal chemotaxis was observed at pH 8; the bacterial chemotaxis weakened with the increase of NaCl concentration from 0.8 % to 3.6 %. Among 8 kinds of carbohydrate tested, mannitol, lactose and seminose promoted the bacterial chemotaxis remarkably. The results indicate that pathogenic *V. fluvialis* has a strong chemotaxis toward the skin mucus of *P. olivaceus*, and this chemotaxis is influenced remarkably by environmental factors, such as temperature, pH value, salinity and carbohydrate. The chemotaxis characteristics revealed in this paper would be helpful for the design of effective prophylactic strategies for *P. olivaceus*' culture.

Key words: *Vibrio fluvialis*; *Paralichthys olivaceus*; skin mucus; chemotaxis