

哈维氏弧菌 TS-628 菌株趋化性研究

刘力铭¹ 钱爱霞² 鄢庆彬¹ 覃映雪^{1*}

(¹集美大学水产学院, 厦门, 361021)

(²江苏省如东县海洋与渔业局, 226400)

摘 要 采用平板趋化和毛细管趋化的方法, 研究了病原性哈维氏弧菌 TS-628 菌株的趋化性。哈维氏弧菌对青石斑鱼肌肉、表皮黏液、肠黏液及血清的趋化性研究结果表明, 该菌对青石斑鱼肌肉提取物的趋化性最强, 且哈维氏弧菌的趋化运动明显受到温度、pH 及盐度等环境因子的影响。哈维氏弧菌对青石斑鱼肌肉 18 种主要氨基酸的趋化性研究表明, 该菌对其中多种氨基酸均表现出很强的趋化性, 但氨基酸浓度也会对该菌的趋化性造成影响, 浓度过高趋化性反而减弱。

关键词 趋化性 哈维氏弧菌 青石斑鱼

中图分类号 S917.1 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2010)06-0104-06

Chemotaxis of *Vibrio harveyi* TS-628

LIU Li-ming¹ QIAN Ai-xia² YAN Qing-pi¹ QIN Ying-xue^{1*}

(¹Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021)

(²Oceans & Fisheries Bureau of Rudong, Jiangsu, 226400)

ABSTRACT In this paper, chemotaxis of *Vibrio harveyi* TS-628 strain was studied by drop assay and capillary assay. The study of chemotaxis of *V. harveyi* to muscle extract, cutaneous mucus, intestinal mucus, serum of *Epinephelus awoara* showed that *V. harveyi* displayed stronger chemotaxis to muscle extract than to the other tissues and the chemotaxis of *V. harveyi* was remarkably affected by temperature, pH, and NaCl concentration. Furthermore, chemotaxis of *V. harveyi* to 18 amino acids in *E. awoara* muscle was studied. The results indicated that *V. harveyi* had strong chemotaxis to many kinds of amino acids, and the most attractive amino acid was Valanine. However, the concentration of amino acid also showed affection on the chemotaxis of *V. harveyi*.

KEY WORDS Chemotaxis *V. harveyi* *E. awoara*

趋化性是有运动能力的微生物对多种化学物质的浓度梯度产生趋向或离避响应的定向移动行为, 在诸如感染的发病机制、微生物除污、生物膜的形成等方面具有重要意义(李燕等 2006)。因此, 近年来关于微生物趋化性的研究得到部分学者的重视, Larsen 等(2001)的研究表明, 溶藻弧菌 *Vibrio anguillarum* 对彩虹鲑、

福建省青年创新基金项目(2006F3096)和集美大学科研基金共同资助

* 通讯作者。E-mail: yxqin@jmu.edu.cn, Tel: (0592)6180204

收稿日期: 2010-02-01; 接受日期: 2010-03-23

作者简介: 刘力铭(1982-), 男, 硕士研究生, 主要从事水生病害研究。E-mail: llm8527@163.com, Tel: (0592)6181420

鳕鱼和比目鱼的鳃、体表及肠的黏液都具有趋化性。El-Feki 等(2003)也发现寄生水霉对鱼类的代谢产物、鱼体组织中的氨基酸、糖类及脂肪酸具有趋化性,这是其寄生于宿主的重要因素。O'Toole 等(1996)的研究则表明,鱼类病原菌鳗弧菌的趋化性是其感染宿主所必需。由此可见趋化性是许多运动性病原生物毒性的一个重要特点,并且病原菌的趋化性与致病性之间有着密切联系。然而,关于微生物趋化性的研究目前主要集中在环境微生物方面(文 阳等 2007; 赵 非等 2004; Pandey *et al.* 2002; Ortega-Calvo *et al.* 2003),国内关于水产病原微生物趋化性的研究仅见邹文政等(2009)及鄢庆枇等(2008)关于河流弧菌趋化性的报道。

哈维氏弧菌是海水鱼类养殖业中较为常见的一种条件致病菌,具有极生单鞭毛,有运动性(Qin *et al.* 2006)。据报道该菌能引起海水网箱养殖的青石斑鱼、尖吻鲈、刺鲷及巨石斑等多种鱼类的弧菌病,由该菌引发的病害给世界各地的海水养殖业带来重大经济损失(Austin *et al.* 2006),但其致病机制尚未明了。本文以患病青石斑鱼分离到的病原菌哈维氏弧菌 TS-628 菌株为研究对象,研究了该菌对青石斑鱼肌肉提取液、血清、体表黏液、肠黏液及青石斑鱼肌肉中 18 种主要氨基酸的趋化性运动的特征及相关影响因子,从而对哈维氏弧菌的趋化性运动有一个初步了解,为深入研究细菌趋化性在致病性方面的作用提供理论依据,为控制哈维氏弧菌感染、提高青石斑鱼的抗病性奠定基础。

1 材料和方法

1.1 生物材料

菌株:哈维氏弧菌 TS-628 菌株分离自患溃疡病的青石斑鱼(Qin *et al.* 2006)。青石斑鱼购自厦门市第八市场,体重 300~500 g,鱼体健康,活力良好。

1.2 样品采集

青石斑鱼表皮黏液和肠黏液的采集主要参照 Bordas 等(1996)和 Balebona 等(1998)的方法。

1.2.1 肌肉样品的制备方法

无菌条件下取适量青石斑鱼肌肉放入装有 4 000 r/min 离心去除块状物,收集上清液,依次用 0.45 和 0.22 μm 滤膜过滤,滤液用无菌 PBS 稀释至蛋白质含量为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 血清采集

无菌条件下尾静脉采血,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 待血清析出,取血清测蛋白含量后保存备用。

1.3 平板趋化实验

参照 Khanna 等(2006)的方法做适当修改,即细菌在 TSB 液体培养基中生长至对数期,4 000 r/min 离心 10 min,取上清液,加 PBS 趋化缓冲液重悬,洗涤两次,再同样速度离心,最后加趋化缓冲液振荡混匀,制成菌浓度约 10^{10} CFU/ml 的菌悬液。取 0.5 ml 该菌悬液加入培养皿中央并与冷却至约 45 $^{\circ}\text{C}$ 的趋化培养基(含 0.3% 琼脂的 PBS 趋化缓冲液)混匀,待凝固后在趋化平板中央加入待测样品 200 μl ,置 30 $^{\circ}\text{C}$ 孵育,每隔 2 h 观察 1 次并拍照记录结果。

1.4 毛细管趋化实验

1.4.1 青石斑鱼肌肉提取液、血清、表皮黏液及肠黏液的趋化性

参考 Zaval'skii 等(2003)的方法,即将细菌 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h 后,离心收集菌体,然后用 0.85% 无菌生理盐水清洗 3 次,用趋化缓冲液(pH 7.0, 2% NaCl)将菌浓度调整到 $OD_{590} = 0.05$ 。于玻璃毛细管(内径为 0.3 mm)一端吸入 5 μl 的肌肉提取液等样品后,另一端封闭并插入装有 0.3 ml 菌悬液的 1 ml 注射器中,30 $^{\circ}\text{C}$ 下保持水平状态孵育 60 min;取出毛细管,用灭菌水洗去外表面的菌液,然后将毛细管内的样品吹出,用平板菌落计数法计数。

1.4.2 温度对哈维氏弧菌趋化性的影响

将孵育温度分别设为 4、10、15、20、25、30、35、40 °C，其余操作同 1.4.1。

1.4.3 pH 对哈维氏弧菌趋化性的影响

制备菌悬液的 PBS 趋化缓冲液的 pH 分别调至 5.0、6.0、7.0、7.4、7.8、9.0，其余操作同 1.4.1。

1.4.4 盐度对哈维氏弧菌趋化性的影响

将 PBS 趋化性缓冲液 NaCl 浓度分别调至 0.5%、1%、2%、2.5%、3%、3.5%、4.0%，其余操作同 1.4.1。

1.4.5 哈维氏弧菌对青石斑鱼肌肉 18 种主要氨基酸的趋化性

毛细管中吸入的样品为浓度 5 mg/ml 的各种氨基酸溶液，其余操作同 1.4.1。

1.4.6 缬氨酸浓度对哈维氏弧菌趋化性的影响

毛细管中吸入的样品浓度分别为 5、10、20、30、40 mg/ml 的缬氨酸，其余操作同 1.4.1。

1.5 数据处理

为区别随机运动与趋化性运动造成的误差，每次操作均设 3 组平行和对照组，对照组毛细管中加入的不是样品而是相应的无菌 PBS 趋化缓冲液，其他操作均相同。获得的数据进行统计学处理，最终的趋化性以 R 值表示： $R = \text{待测样品中的细菌数} / \text{对照组中的细菌数}$ ， R 值大于 2 则可说明哈维氏弧菌对样品出现正趋化性。

2 结果

2.1 哈维氏弧菌对青石斑鱼肌肉提取液、血清、表皮黏液和肠黏液的平板趋化

结果显示，在孵育 6h 后哈维氏弧菌在肌肉提取液的趋化平板上出现了肉眼隐约可见的趋化圈，当孵育时间达 10h 时趋化圈变得更为明显，但趋化圈的直径较小，而其他样品的趋化平板上均未出现肉眼可见的趋化圈（图 1）。

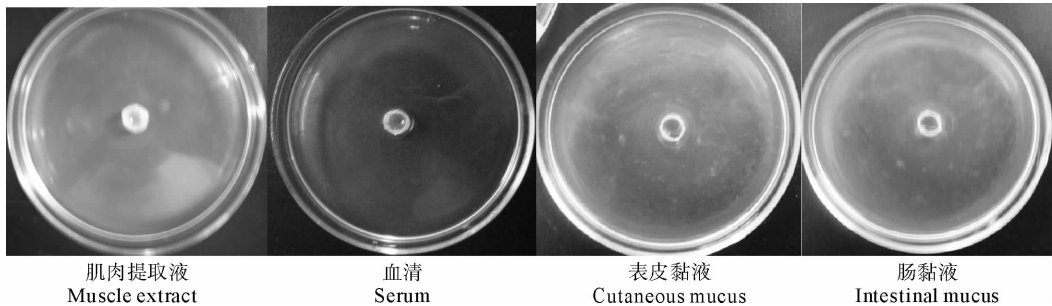


图 1 哈维氏弧菌对青石斑肌肉提取液、血清、表皮黏液和肠黏液的平板趋化
Fig. 1 Chemotaxis of *V. harveyi* to muscle extract, serum, cutaneous mucus, and intestinal mucus of *E. awoara* on chemotaxis plate

2.2 哈维氏弧菌对青石斑鱼肌肉提取液、血清、表皮黏液和肠黏液的毛细管趋化

采用毛细管趋化的方法获得哈维氏弧菌对青石斑鱼肌肉提取液的趋化系数 R ，结果如图 2 所示。该菌对肌肉提取液的趋化系数最高，达到 14.80，对表皮黏液的趋化系数次之，为 10.13，而对血清的趋化系数最低，只有 3.53。经 t 检验，哈维氏弧菌对肌肉提取物的 R 值与对表皮黏液的 R 值存在显著差异 ($P < 0.05$)，与对血清和肠黏液 R 值间均存在极显著差异 ($P < 0.01$)。结合平板趋化试验的结果，说明该菌对青石斑鱼肌肉提取物的趋化性最强。

2.3 温度对哈维氏弧菌趋化性的影响

以青石斑鱼肌肉提取液为样品，研究温度对该菌趋化性的影响，结果如图 3 所示。在 5~30 °C 范围内，哈

维氏弧菌的趋化性随温度的升高显著增强,并在 30~35 °C 时趋化强度达到峰值,之后随着温度进一步升高至 40 °C 时趋化性急剧减弱, R 值仅为 4.52。经 t 检验,哈维氏弧菌在 30、35 °C 时的 R 值间没有显著差异而与其他温度下的 R 值均存在显著($P < 0.05$)或极显著差异($P < 0.01$),说明该菌在 30~35 °C 间趋化性最强。

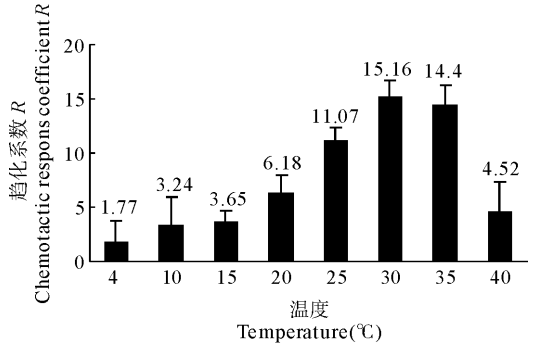
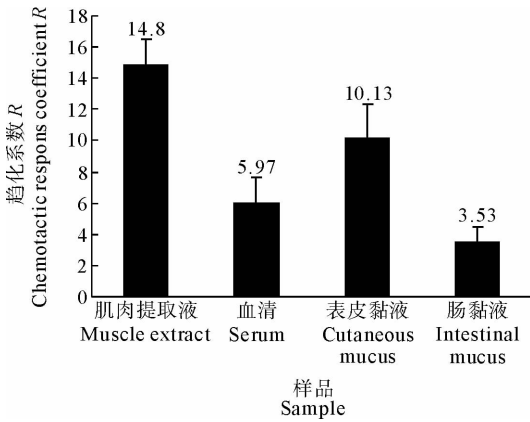


图 2 哈维氏弧菌对青石斑鱼肌肉提取液、血清、表皮黏液和肠黏液的毛细管趋化

图 3 温度对哈维氏弧菌趋化性的影响

Fig. 2 Chemotaxis of *V. harveyi* to muscle extract, serum, cutaneous mucus, and intestinal mucus of *E. awoara* by capillary assay

Fig. 3 Affection of temperature on chemotaxis of *V. harveyi*

2.4 pH 对哈维氏弧菌趋化性的影响

以青石斑鱼肌肉提取液为样品,研究 pH 对哈维氏弧菌趋化性的影响。结果表明,pH 可显著影响该菌的趋化性,在 pH 5.0~7.4 的条件下,该菌趋化性呈增强趋势,之后随着 pH 的进一步升高细菌的趋化性减弱(图 4)。总体而言,哈维氏弧菌在弱碱性条件下的趋化性要强于在酸性条件及强碱性条件下的趋化性。经 t 检验,哈维氏弧菌在 pH 为 7.4 和 7.8 时趋化系数 R 间没有显著性差异,与其他 pH 下的 R 值间有显著差异($P < 0.05$)或极显著差异($P < 0.01$),说明该菌在 pH 7.4~7.8 的弱碱性条件下趋化性较强。

2.5 盐度对哈维氏弧菌趋化性的影响

同样以青石斑鱼肌肉提取液为样品,研究 NaCl 浓度对哈维氏弧菌趋化性的影响,结果如图 5 显示。NaCl 浓度也可明显影响该菌的趋化性,NaCl 浓度为 0.5% 时只有很弱的趋化性。NaCl 浓度为 0.5%~2.5% 时,随

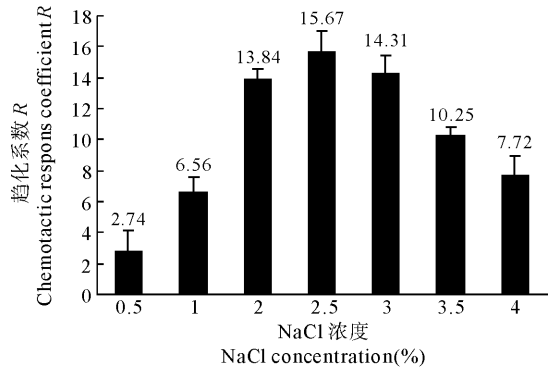
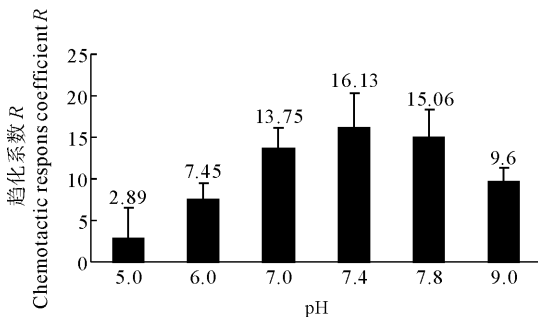


图 4 pH 对哈维氏弧菌趋化性的影响

图 5 NaCl 浓度对哈维氏弧菌趋化性的影响

Fig. 4 Affection of pH on chemotaxis of *V. harveyi*

Fig. 5 Affection of NaCl concentration on chemotaxis of *V. harveyi*

着 NaCl 浓度升高趋化系数总体呈现急剧上升趋势,之后 NaCl 浓度继续升高但细菌的趋化性总体呈下降趋势。经 t 检验,NaCl 浓度为 2%、2.5% 和 3% 时该菌的 R 值间没有显著差异,但与其他 NaCl 浓度下的 R 值存在极显著差异($P < 0.01$),说明该菌在 NaCl 浓度为 2%~3% 时趋化性较强。

2.6 哈维氏弧菌对青石斑鱼肌肉主要氨基酸的毛细管趋化

采用毛细管趋化的方法表明,哈维氏弧菌对青石斑鱼肌肉 18 种主要氨基酸均具有趋化性,结果如图 6 所示,哈维氏弧菌对 Val 的趋化系数大,达到 39.64,与其他氨基酸的 R 值间存在显著($P < 0.05$)或极显著差异($P < 0.01$),对 Met 的趋化性次之,趋化性最弱的是 Asp。

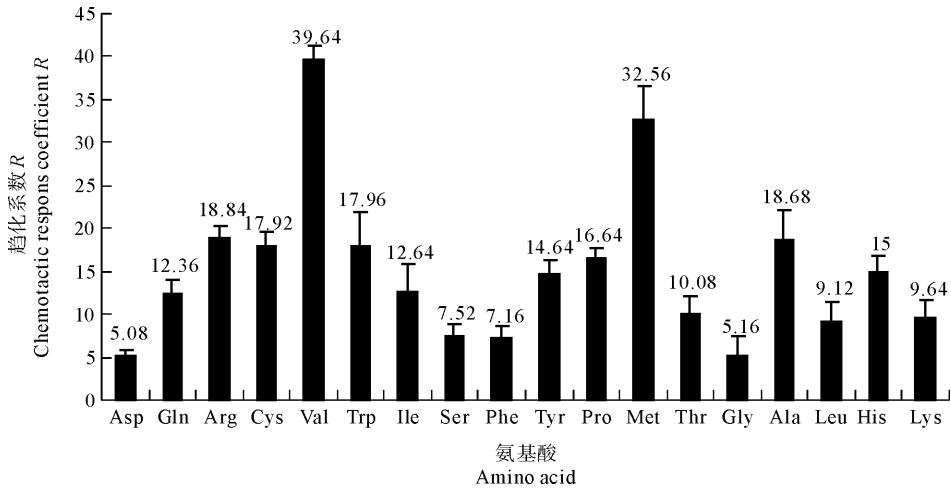


图 6 哈维氏弧菌对青石斑鱼肌肉 18 种主要氨基酸的毛细管趋化

Fig. 6 Chemotaxis of *V. harveyi* to 18 kinds of amino acids

2.7 Val 浓度对哈维氏弧菌趋化性的影响

以 Val 为样品,研究不同浓度的 Val 对哈维氏弧菌趋化性的影响,结果如图 7 所示。经统计学 t 检验,Val 浓度为 10 mg/ml 时, R 值与 5 和 20 mg/ml 时的 R 值没有显著性差异,但与其他浓度下的 R 值均存在极显著差异($P < 0.01$),表明 Val 的浓度可显著影响细菌的趋化性,浓度过高对细菌的趋化性将产生抑制作用。

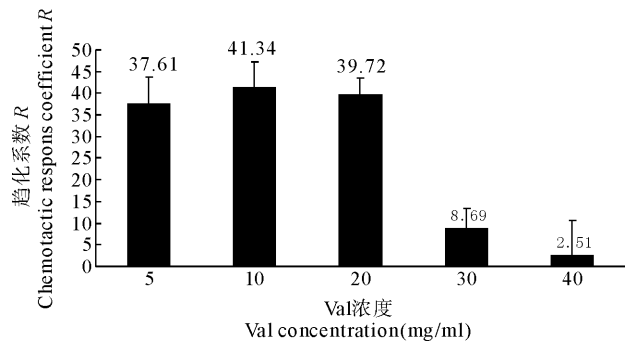


图 7 Val 浓度对哈维氏弧菌趋化性的影响

Fig. 7 Affection of Val concentration on chemotaxis of *V. harveyi*

3 讨论

哈维氏弧菌 TS-628 菌株是 2002 年厦门同安湾网箱养殖石斑鱼暴发溃疡病的条件致病菌,这种溃疡病的最主要症状就是鱼的体表受损后鱼体就很容易被感染,以至鱼体背部和尾部肌肉严重溃烂导致鱼的死亡(Qin *et al.* 2006)。本文对该菌趋化性的研究表明,哈维氏弧菌 TS-628 菌株对青石斑鱼的肌肉具有较强的趋化性,特别是对肌肉当中的 Val 等氨基酸,这一现象在一定程度上反映哈维氏弧菌 TS-628 菌株感染青石斑鱼引发溃疡病的机制,即鱼体表皮一旦受损,肌肉暴露在外,肌肉当中的 Val 等氨基酸可释放到水体中作为信号因子,刺激水体中的哈维氏弧菌对鱼体产生强的趋化作用,从而大大增加感染致病的机率。

已有研究表明温度、盐度、pH 等理化因子对弧菌趋化性有显著影响。如 Bordas 等(1998)研究鳗弧菌和溶藻弧菌对黑鲷表皮黏液、肠黏液和鳃黏液的趋化性时发现,盐度和温度均对鳗弧菌和溶藻弧菌的趋化性产生影响。邹文政等(2009)的研究也发现,温度、NaCl 浓度等因子也会对河流弧菌的趋化性产生显著影响。从本实

验的结果上看,温度、盐度及 pH 这 3 个因子也对哈维氏弧菌的趋化性有明显影响,哈维氏弧菌在温度为 30~35 °C、pH 为 7.4~7.8、NaCl 浓度为 2%~3% 时呈现强趋化性,与其最适生长条件基本一致,可能是在最适生长条件下细菌的代谢最为旺盛,可为细菌的趋化性运动提供充足的能量来源。另外,哈维氏弧菌 TS-628 菌株趋化性最强时的这些环境因子参数与青石斑鱼暴发溃疡病时海区的水文特征接近,在病害暴发时的海区水文条件表现为表层水温在 25 °C 以上、海水盐度达到 30,而在大量降水、气温下降后石斑鱼的溃疡病就逐渐消失(Qin *et al.* 2006),说明该菌的趋化性与其致病性可能存在重要联系。

从哈维氏弧菌 TS-628 菌株对青石斑鱼肌肉中的 18 种主要氨基酸的趋化性结果看,该菌对 Val、Met、Arg、Ala 等氨基酸具有较强的趋化性,其中对 Val 的趋化性最强, Met 次之,最弱的则是 Asp。根据张本等(1991)测定的青石斑鱼肌肉氨基酸含量可知,青石斑鱼肌肉中 Glu 含量最高,达到 123.09 mg/g, Asp 含量次之,为 80.58 mg/g,而 Val 的含量居中,为 38.17 mg/g, Met 在青石斑鱼肌肉中的含量则较低,为 22.95 mg/g。可见哈维氏弧菌趋化性的强弱与氨基酸浓度并不相关,并且在氨基酸浓度对细菌趋化性的影响试验也说明, Val 浓度过高反而会抑制哈维氏弧菌的趋化性。但 Val 是否就是哈维氏弧菌的趋化信号因子,它在哪方面的生理生化特性刺激了哈维氏弧菌的趋化运动,以及什么样的物质可抑制哈维氏弧菌的趋化性以及丧失了趋化性的细菌致病性会有何变化等等都有待进一步的研究。

参 考 文 献

- 文 阳, 蒋建东, 邓海华, 蓝 鸿, 李顺鹏. 2007. 趋化信号转导基因 cheA 突变对 *Pseudomonas putida* DLL-1 甲基参硫磷的趋化性及原位降解的影响. 微生物学报, 47(3): 471~476
- 李 燕, 牟伯中. 2006. 细菌趋化性研究进展. 应用与环境生物学报, 12(1): 135~139
- 邹文政, 纪荣兴, 义家波, 鄢庆枇. 2009. 河流弧菌对牙鲆表皮黏液的趋化作用. 水产学报, 33(2): 318~325
- 张 本, 卢子襄, 章华忠, 邢谷潮. 1991. 石斑鱼肌肉氨基酸组成的初步研究. 海南大学学报(自然科学版), 9(2): 35~40
- 赵 非, 刘 虹, 王淑君, 牛桂兰, 周宁一. 2004. *Pseudomonas* sp. ZWL73 对 4-氯硝基苯及多种芳香烃化合物的趋化性. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 30(6): 624~627
- 鄢庆枇, 邹文政, 纪荣兴, 义家波. 2008. 河流弧菌 *Vibrio fluvialis* 对牙鲆 *Paralichthys olivaceus* 黏液的趋化和黏附作用. 海洋与湖沼, 39(4): 362~367
- Austin, B., and Zhang, X. H. 2006. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. Lett. Appl. Microbiol. 43 (2): 119~124
- Balebona, M. C., Andreu, M. J., Bordas, M. A., Zorrilla, I., Morinigo, M. A., and Borrego, J. J. 1998. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for cultured gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). Appl. Environ. Microbiol. 64: 4 269~4 275
- Bordas, M. A., Balebona, M. C., Zorrilla, I., Borrego, J. J., and Morinigo, M. A. 1996. Kinetics of adhesion of selected fish-pathogenic *Vibrio* strains of skin mucus of gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). Appl. Environ. Microbiol. 62(10): 3 650~3 654
- Bordas, M. A., Balebona, M. C., Rodriguez-Maroto, J. M., Borrego, J. J., and Morinigo, M. A. 1998. Chemotaxis of pathogenic *Vibrio* strains towards mucus surfaces of Gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). Appl. Environ. Microbiol. 64(4): 1 573~1 575
- El-Feki, M., Hatai, K., and Hussein, M. M. A. 2003. Chemotactic and chemokinetic activities of *Saprolegnia parasitica* toward different metabolites and fish tissue extracts. Mycoscience, 44: 159~162
- Khanna, M. R., Bhavsar, S. P., and Kapadnis, B. P. 2006. Effect of temperature on growth and chemotactic behaviour of *Campylobacter jejuni*. Lett. Appl. Microbiol. 43: 84~90
- Larsen, M. H., Larsen, J. L., and Olsen, J. F. 2001. Chemotaxis of *Vibrio anguillarum* to fish mucus: role of the origin of the fish mucus, the fish species and the serogroup of the pathogen. FEMS Microbiol. Ecol. 38: 77~80
- Ortega-Calvo, J. J., Marchenko, A. I., Vorobyov, A. V., and Borovick, R. V. 2003. Chemotaxis in polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria isolated from coal-tar- and oil-polluted rhizospheres. FEMS Microbiol. Ecol. 44(3): 373~381
- O'Toole, R., Milton, D. L., and Wolf-Watz, H. 1996. Chemotactic motility is required for invasion of the host by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. Mol. Microbiol. 19(3): 625~637
- Pandey, G., and Jain, R. K. 2002. Bacterial chemotaxis toward environmental pollutants: role in bioremediation. Appl. Environ. Microbiol. 68 (12): 5 789~5 795
- Qin, Y. X., Wang, J., Su, Y. Q., Wang, D. X., and Chen, X. Z. 2006. Studies on the pathogenic bacterium of ulcer disease in *Epinephelus awoara*. Acta Oceanologica Sinica, 25(1): 147~153
- Zaval'skii, L. Y., Marchenko, A. I., and Borovik, R. V. 2003. The study of bacterial chemotaxis to naphthalene. Microbiol. 72(3): 363~368