

文章编号: 1674-7054(2016)02-0153-06

无乳链球菌对罗非鱼粘液的粘附特性

刘海天 赵光军 郭晓慧 张永政 周永灿 蔡岩 谢珍玉 郭伟良 王世锋

(海南大学 海洋学院/热带生物资源教育部重点实验室, 海口 570228)

摘要: 利用间接 ELISA 方法研究罗非鱼不同部位的粘液、作用时间、温度、pH 及盐度等因子对无乳链球菌粘附作用的影响。结果表明: 无乳链球菌对罗非鱼不同部位粘液的粘附能力受温度、粘附时间和 pH 值影响较大, 受盐度影响较小。孵育温度为 35 ℃、孵育时间为 120 min 时, 无乳链球菌对肠道粘液的粘附能力最强, 粘附量达到 4.052×10^7 cfu · mL⁻¹; 其次是体表粘液, 粘附量为 6.480×10^6 cfu · mL⁻¹; 鳃粘液的粘附能力最弱, 为 2.825×10^6 cfu · mL⁻¹。当孵育时间少于 180 min 时, 粘附量与孵育时间呈正相关; 粘附量在 35 ℃下孵育 180 min 时, 趋于饱和, 达到 5×10^8 cfu · mL⁻¹。无乳链球菌对不同部位粘液粘附的最适 pH 值不同, 肠道粘液、体表粘液和鳃粘液粘附力最强的 pH 值分别为 5.0、7.0 和 8.0。

关键词: 无乳链球菌; 罗非鱼; 病原菌; 粘附

中图分类号: S 965.125

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.2016.02.002

近年来, 由无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)引起的罗非鱼链球菌病影响范围广、累积死亡率高、造成的经济损失大, 成为阻碍我国罗非鱼产业可持续发展的最主要因素^[1]。无乳链球菌等细菌性病原感染水产动物时, 首先需与宿主粘液接触而粘附, 进而完成定植、入侵、繁殖、产生毒素并最终导致机体发病^[2]。目前, 对罗非鱼源无乳链球菌的研究主要集中在分离、鉴定、基因分型、生物学特性和致病性等方面^[3-5], 有关无乳链球菌粘附特性的研究, 仅见刘志刚等^[6]的报道。研究病原菌体外粘附试验的方法主要有显微镜计数法、放射性标记法、酶联免疫吸附实验法(ELISA)和荧光标记法等^[7]。其中, 间接 ELISA 法利用抗原与抗体的特异性反应来检测粘附细菌的数量, 具有非特异性粘附小、安全性高、操作简单等特点^[8-9], 目前已广泛应用于水产病原检测^[10]。笔者利用本实验室建立的间接 ELISA 法^[11], 研究粘附作用时间、温度、pH 及盐度等因素对无乳链球菌粘附罗非鱼体表、鳃及肠道粘液的影响, 旨在了解无乳链球菌的粘附特性, 为今后进一步研究无乳链球菌对罗非鱼的致病机理及疾病防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料 尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)由海南文昌罗非鱼养殖场提供, 体长(15.2 ± 0.8) cm, 体质量(100 ± 15) g, 健康无患病史, 在实验室暂养 7 d 后用于各项实验。无乳链球菌为本实验室 2009 年从海南琼海患病罗非鱼体内分离并保存的强致病菌株 LFY-5。

1.2 实验方法

1.2.1 菌液制备 将无乳链球菌接种于脑心浸液培养液(BHI, 青岛日水公司), 37 ℃, 180 r · min⁻¹恒温振荡培养 18 h^[12], 于 4 ℃, 3 000 r · min⁻¹离心 10 min 收集菌体, 再用无菌磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4)重

收稿日期: 2016-03-03

基金项目: 海南省重点科技计划项目(ZDXM20120005); 海南省科技兴海专项(2015XH02); 海洋药源生物种质资源库建设项目(12PYY001SF08-HNDX-1); 2014 年海南大学中西部高校提升综合实力项目(M8K3124001001003003)

作者简介: 刘海天(1986-), 男, 海南大学海洋学院 2013 级硕士研究生. E-mail: syjlht@163.com

通信作者: 王世锋(1977-), 副教授. 研究方向: 水产病害. E-mail: shifeng_15@163.com

悬并洗涤 2 次后,以 OD_{600} 测定菌液浓度 4°C 保存备用。

1.2.2 罗非鱼粘液的制备 参照文献[13]的方法提取罗非鱼体表粘液和鳃粘液,参照文献[14]的方法提取罗非鱼肠道粘液。将获得的粘液样品分别于 4°C $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 2 次,每次 30 min,去除颗粒性杂质,保留上清液。再依次用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 和 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 的滤膜过滤以去除其他杂质与细菌;以蛋白定量试剂盒测定粘液蛋白浓度 4°C 保存备用,或于 -20°C 长期保存^[10]。

1.2.3 无乳链球菌体外粘附检测方法 参考文献[15]的方法进行 ELISA 检测,具体步骤如下:将 $100\text{ }\mu\text{L}$ 罗非鱼粘液加入 96 孔酶标板 4°C 静置 20 h,弃去残液,用无菌生理盐水清洗 2 次,以生理盐水作为阴性对照。加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 无乳链球菌菌液($1\times 10^7\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$) 35°C 粘附 120 min,去除上层液体, 60°C 烘干,然后用无菌生理盐水清洗 2 次。加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 的 10% 小牛血清(北京索莱宝公司),于 37°C 封闭 1 h,去除上层液体,再用无菌生理盐水洗涤 3 次。加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 比例为 1 : 100 的兔抗无乳链球菌血清(抗体效价为 1 : 25 600,由北京六合华大公司代理制备),于 37°C 培养 1 h,去除上层液体,然后用 PBST(在 1 L PBS 中加入 0.5 mL Tween-20 配制而成)洗涤 3 次。加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 比例为 1 : 2 000 的 HRP-羊抗兔 IgG(北京索莱宝公司),于 37°C 培养 1 h,去除上层液体,用 PBST 洗涤 3 次。加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 新配制的 $\text{OPD}-\text{H}_2\text{O}_2$ (北京索莱宝公司),置于暗处 37°C 孵育 20 min。加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ 的 H_2SO_4 终止反应。用酶标仪在 490 nm 波长下测定吸光值 OD_{490} 。

1.2.4 菌液浓度与 OD_{490} 关系 以无菌 PBS 制备以下浓度的无乳链球菌菌液: 1×10^{10} , 5×10^9 , 1×10^9 , 5×10^8 , 1×10^8 , 5×10^7 , 1×10^7 , 5×10^6 , 1×10^6 , 5×10^5 , 1×10^5 , 5×10^4 , 1×10^4 , 5×10^3 , 1×10^3 , $5\times 10^2\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 将上述不同浓度的无乳链球菌菌液 $100\text{ }\mu\text{L}$ 加入无菌 96 孔板中, 60°C 烘干,然后用无菌生理盐水清洗 2 次。加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 的 10% 小牛血清,于 37°C 封闭 1 h,去除上层液体,再用无菌生理盐水洗涤 3 次。加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 比例为 1 : 100 的兔抗无乳链球菌血清,于 37°C 培养 1 h,去除上层液体,然后用 PBST 洗涤 3 次。加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 比例为 1 : 2 000 的 HRP-羊抗兔 IgG,于 37°C 培养 1 h,去除上层液体,用 PBST 洗涤 3 次。加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 新配制的 $\text{OPD}-\text{H}_2\text{O}_2$,置于暗处 37°C 孵育 20 min。加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ 的 H_2SO_4 终止反应。用酶标仪在 490 nm 波长下测定吸光值 OD_{490} 。以确定菌浓度和 OD_{490} 的关系。

1.2.5 无乳链球菌对不同部位粘液粘附能力的测定 以无菌 PBS 将提取的罗非鱼体表粘液、鳃粘液、肠道粘液统一调整蛋白质量浓度至 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,按照 1.2.3 方法测定无乳链球菌对罗非鱼体表、鳃和肠道粘液的粘附情况。

1.2.6 不同粘附时间条件下对无乳链球菌粘附作用的测定 以 1.2.3 方法分别测定粘附时间为 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 min 的粘附效果,确实粘附时间对无乳链球菌粘附罗非鱼体表、鳃和肠道粘液的影响。

1.2.7 不同温度条件下对无乳链球菌粘附作用的测定 按照 1.2.3 方法分别测定不同温度(15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 $^{\circ}\text{C}$, 无乳链球菌需先在相应温度下预温 30 min)对无乳链球菌粘附罗非鱼体表、鳃和肠道粘液的影响。

1.2.8 不同 pH 条件下对无乳链球菌粘附作用的测定 将无乳链球菌分别重悬在 pH 值为 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 的 PBS 当中,并将菌液浓度调整为 $1\times 10^7\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$,其他条件不变,按 1.2.3 方法分别测定不同 pH 值对无乳链球菌粘附罗非鱼体表、鳃和肠道粘液的影响。

1.2.9 不同盐度条件下对无乳链球菌粘附作用的测定 将无乳链球菌分别重悬在盐度为 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 的氯化钠溶液当中,并调整菌浓度为 $1\times 10^7\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$,其他条件不变,按 1.2.3 方法分别测定不同盐度对无乳链球菌粘附罗非鱼体表、鳃和肠道粘液的影响。

1.2.10 数据处理 以上所有实验均设 3 个平行组,所得数据用 Excel(Excel 2003),SPSS(SPSS 19.0)绘制图表及统计分析 $0.01 < P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 菌液浓度对无乳链球菌粘附作用的影响 从图 1 可知,随着菌液浓度的升高其吸光值逐渐升高,菌

液浓度对数值与 OD_{490} 呈正相关, 其关系式为 $y = 0.1746x - 0.3663$, 相关系数为 $R^2 = 0.9506$, 因此, 可以通过 OD_{490} 来判断菌液浓度的大小。

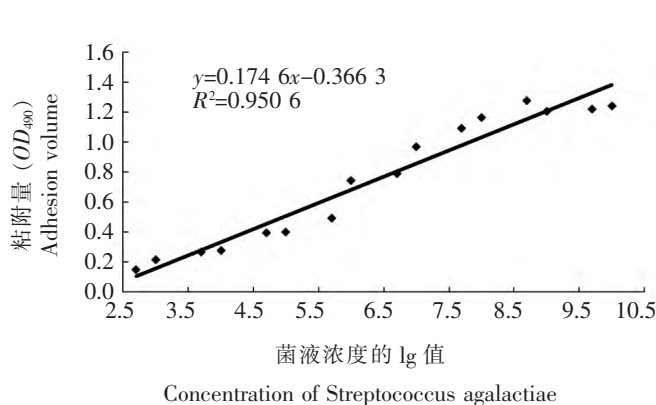


图1 菌浓度与 OD_{490} 的关系

Fig.1 Relationship between OD_{490} and *Streptococcus agalactiae* concentration

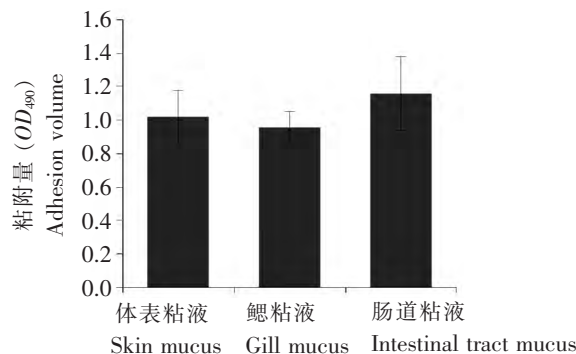


图2 无乳链球菌对不同部位罗非鱼粘液的粘附效果

Fig.2 The effect of *S. agalactiae* on adhesion of different mucus from *O. niloticus*

2.2 不同部位粘液对无乳链球菌粘附作用的影响 从图2可知, 无乳链球菌对罗非鱼不同部位粘液的粘附效果不同, 对不同来源粘液的粘附量由高至低依次分别为: 肠道粘液 4.052×10^7 cfu $\cdot$ mL $^{-1}$ 、体表粘液 6.480×10^6 cfu $\cdot$ mL $^{-1}$ 、鳃粘液 2.825×10^6 cfu $\cdot$ mL $^{-1}$, 但无乳链球菌对不同部位粘液的粘附量没有达到显著差异 ($P > 0.05$)。

2.3 粘附时间对无乳链球菌粘附作用的影响 从图3可知, 在粘附时间 180 min 以内, 无乳链球菌对罗非鱼体表、鳃和肠道粘液的粘附量随粘附时间的延长而增加, 在 180 min 时达到最大值, 此时, 无乳链球菌在罗非鱼体表粘液、鳃粘液和肠道粘液的粘附量依次分别为: 1.398×10^8 , 1.147×10^8 , 1.820×10^8 cfu $\cdot$ mL $^{-1}$ 。粘附时间超过 180 min 后, 无乳链球菌在各种粘液中的粘附量均有一定程度的下降。t 检验分析表明, 在 30 ~ 180 min 的孵育时间内, 无乳链球菌对罗非鱼粘液的粘附量随着时间的延长显著增加 ($P < 0.05$)。在孵育时间 180 min 与 210 min 两组之间无乳链球菌对罗非鱼粘液的粘附量无显著差异 ($P > 0.05$), 表明无乳链球菌的粘附量趋于饱和。

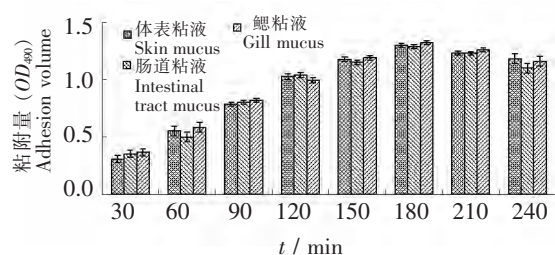


图3 粘附时间对无乳链球菌粘附罗非鱼粘液的影响

Fig.3 Influence of incubation time on adhesion of *S. agalactiae* to tilapia mucus

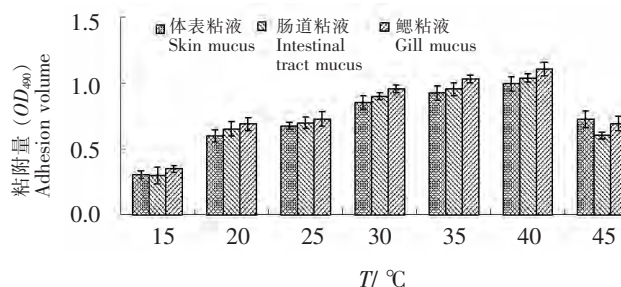


图4 孵育温度对无乳链球菌粘附罗非鱼粘液的影响

Fig.4 Influence of incubation temperature on adhesion of *S. agalactiae* to tilapia mucus

2.4 温度对无乳链球菌粘附作用的影响 从图4可知, 当孵育温度小于 40 °C 时, 无乳链球菌对罗非鱼体表、鳃和肠道粘液的粘附量均随着温度的升高而增加; 孵育温度超过 40 °C 后, 其粘附量随着温度的升高急剧减少。t 检验分析表明, 无乳链球菌对罗非鱼粘液的粘附量呈梯度变化, 在 15 °C 时无乳链球菌对罗非鱼粘液的粘附量最低, 与其他各组均具有显著性差异 ($P < 0.05$); 在 20、25、45 °C 时, 无乳链球菌对罗非鱼粘液的粘附量无显著性差异, 但均显著高于 15 °C 实验组, 且显著低于 30、35、40 °C 实验组; 在 30 ~ 40 °C 时, 无乳链球菌对罗非鱼粘液的粘附量均显著高于 15 ~ 25 °C 以及 45 °C 时的粘附量 ($P < 0.05$), 各组之间除 30 °C 和 40 °C 实验组外 ($P < 0.05$), 其他各组两两之间均没有显著差异。

2.5 pH 值对无乳链球菌粘附作用的影响 从图 5 可知,在实验 pH 范围内,无乳链球菌对罗非鱼体表、鳃和肠道粘液的粘附量随着 pH 的上升而先上升后下降,不过,pH 值对无乳链球菌粘附作用的影响因罗非鱼粘液的来源不同而存在差异,其中,无乳链球菌粘附体表粘液的最适 pH 为 7,粘附量为 5.254×10^7 cfu · mL⁻¹;对鳃粘液的最适 pH 为 8,粘附量为 4.289×10^7 cfu · mL⁻¹;对肠道粘液的最适 pH 为 5,粘附量为 2.057×10^8 cfu · mL⁻¹。*t* 检验分析表明,在 pH 5~8 时,无乳链球菌对罗非鱼粘液的粘附量均显著高于 pH 为 1、2 和 10 时($P < 0.05$)。在 pH 为 1、2 和 10 各组之间无乳链球菌对罗非鱼粘液的粘附量则无显著差异($P > 0.05$)。

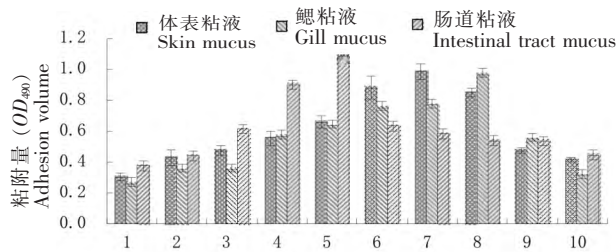


图 5 pH 值对无乳链球菌粘附罗非鱼粘液的影响
Fig.5 Influence of pH on adhesion of *S. agalactiae* to tilapia mucus

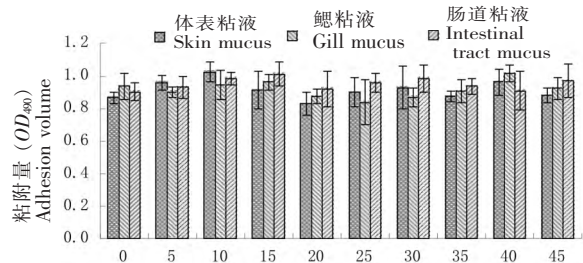


图 6 盐度对无乳链球菌粘附罗非鱼粘液的影响
Fig.6 Influence of salinity on adhesion of *S. agalactiae* to tilapia mucus

2.6 盐度对无乳链球菌粘附作用的影响 从图 6 可知,在实验盐度范围内,在同一盐度条件下,无乳链球菌对不同粘液的粘附量均没有显著性差异;对同一种粘液,盐度对无乳链球菌的粘附作用具有一定的影响。当盐度为 5 和 10 时,无乳链球菌对罗非鱼体表粘液的粘附量显著高于 0、20、35 盐度组($P < 0.05$),与其他各组则没有显著性差异($P > 0.05$);在盐度为 40 时,无乳链球菌对罗非鱼鳃粘液的粘附量显著高于 5、20 和 30 盐度组($P < 0.05$);在所有盐度组之间,无乳链球菌对罗非鱼肠道粘液的粘附量均没有显著性差异($P > 0.05$)。由此可知,盐度对无乳链球菌粘附罗非鱼体表、鳃及肠道粘液有一定的影响,但总体而言影响不大。

3 讨论

无乳链球菌是革兰氏阳性球菌,不仅是罗非鱼等水产动物的主要致病菌之一^[16-18,19],也能感染人类和许多畜禽,并引起严重疾病^[19-22]。与绝大多数致病菌一样,无乳链球菌侵染罗非鱼时需要先通过粘附作用定植于罗非鱼体表或腔道的粘液,然后才能侵入上皮细胞,并最终扩散到罗非鱼全身引起罗非鱼发病^[23]。因此,病原菌的粘附作用对其感染宿主十分重要,开展相关研究对了解其致病机理和探索防控策略等均有重要意义。

无乳链球菌对罗非鱼粘液的粘附作用与粘附时间密切相关。本研究结果表明,当粘附时间低于 180 min 时,无乳链球菌对罗非鱼粘液的粘附量与粘附时间呈正相关;但当粘附作用时间超过 180 min 后,无乳链球菌对罗非鱼粘液的粘附量可能因得到峰值而不再增加。该结果与陈强等对溶藻弧菌粘附大黄鱼体表粘液的研究结果相似,其粘附量也是 180 min 时达到峰值^[7]。产生该结果的原因可能是病原与宿主粘液的粘附作用是通过可逆的非特异性结合或不可逆的受体配体特异性结合^[23],当非特异性结合达到动态平衡或特异性结合的受体用完后,粘附量不再随时间的延长而增加。胡彩虹等^[2]以罗非鱼的上皮细胞为培养模型,研究了嗜水气单胞菌分别对罗非鱼的皮肤上皮细胞、鳃上皮细胞和肠道上皮细胞的粘附作用,发现嗜水气单胞菌对鳃上皮细胞的粘附率最高,对肠道上皮细胞的粘附率最低。而笔者对无乳链球菌粘附不同罗非鱼粘液的研究结果与胡彩虹等的结果则刚好相反,无乳链球菌对肠道粘液的粘附量最高,而对鳃粘液的粘附量最低。说明不同病原菌对宿主不同部位的粘附作用可能存在一定的差异,这是否预示无乳链球菌更容易通过罗非鱼肠道感染,还需进一步研究。大量的研究表明,水温是影响罗非鱼无乳链球菌病发生的主要环境因子,该病爆发的高峰为水温 30℃ 以上时,而水温低于 20℃ 则较少发

病^[6,24]。刘志刚等^[6]对无乳链球菌粘附惰性基质的研究表明,水温 37 ℃时无乳链球菌的粘附量显著高于其他温度组。本研究结果与刘志刚等的研究结果相似,水温 40 ℃以下时无乳链球菌对罗非鱼粘液的粘附量与温度呈正相关,且温度为 30~40 ℃时,无乳链球菌的粘附量均显著高于其他实验温度组,说明该温度下无乳链球菌更易粘附于罗非鱼粘液并使罗非鱼感染患病,与生产上罗非鱼链球菌爆发高峰相符。pH 值影响病原菌对宿主粘液的粘附能力。朱苏琴等^[25]对河流弧菌粘附大黄鱼粘液的研究表明,pH 值 3~6 时,河流弧菌对大黄鱼各部位粘液的粘附能力较强,且在 pH 值为 6 时粘附量最大,而 pH 值 7~9 时,其粘附能力显著下降^[25]。本研究结果也表明,该病原菌的粘附同样受 pH 值显著影响,且对不同部位粘液的影响情况不同,对体表粘液的粘附量在 pH 为 7.0 时最大,而对鳃粘液和肠道粘液则分别在 pH 为 8.0 和 pH 为 5.0 时最大。这可能是由于罗非鱼不同部位粘液的组成不同,从而使无乳链球菌与不同部位粘液发生粘附作用的粘附素不同所致。本研究结果表明,在 0~45 的实验盐度范围内,盐度对无乳链球菌粘附罗非鱼粘液的能力影响总体不大。该结果与生产中采用调节盐度对防控罗非鱼无乳链球菌病效果不明显的结果一致。已有研究也表明,无乳链球菌不仅能感染淡水鱼类,还同样可感染海水鱼类并引起严重疾病^[19,26]。

参考文献:

- [1] 王蓓,简纪常,鲁义善,等. 罗非鱼源无乳链球菌 ZQ0910 转录调控因子 *rovS* 基因的克隆及表达研究[J]. 水产学报, 2013, 37(4): 584–592.
- [2] 胡彩虹,夏枚生,熊莉,等. 载铜蒙脱石对嗜水气单胞菌粘附尼罗罗非鱼上皮细胞的影响[J]. 水产学报, 2005, 29(5): 619–623.
- [3] 卢迈新,黎炯,叶星,等. 广东与海南养殖罗非鱼无乳链球菌的分离、鉴定与特性分析[J]. 微生物学通报, 2010, 37(5): 66–74.
- [4] 郭玉娟,张德锋,樊海平,等. 中国南方地区罗非鱼无乳链球菌的分子流行病学研究[J]. 水产学报, 2012, 36(3): 399–406.
- [5] 黄锦炉. 罗非鱼无乳链球菌病原学、病理学及 *cpsE* 基因的原核表达研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2012.
- [6] 刘志刚,可小丽,卢迈新,等. 温度对尼罗罗非鱼无乳链球菌毒力的影响[J]. 水产学报, 2013, 37(11): 1733–1741.
- [7] 陈强,鄢庆枇,邹文政,等. 环境因子对溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)粘附大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)表皮粘液影响的研究[J]. 海洋与湖沼, 2007, 38(4): 361–366.
- [8] Marel M V D, Schroers V, Neuhaus H, et al. Chemotaxis towards, adhesion to, and growth in carp gut mucus of two *Aeromonas hydrophila* strains with different pathogenicity for common carp, *Cyprinus carpio* L[J]. Journal of Fish Diseases 2008 31: 321–30.
- [9] 鄢庆枇,邹文政,纪荣兴,等. 河流弧菌(*Vibrio fluvialis*)对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)粘液的趋化和粘附作用[J]. 海洋与湖沼, 2008, 39(4): 362–367.
- [10] 朱苏琴,纪荣兴,苏永全,等. 河流弧菌(*Vibrio fluvialis*)对大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)鳃粘液粘附特性研究[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(2): 389–393.
- [11] 赵光军. 拮抗菌的筛选及其对无乳链球菌粘附罗非鱼粘液的拮抗作用研究[D]. 海口: 海南大学, 2014.
- [12] 陈贺,吴灶和,王蓓,等. 罗非鱼源无乳链球菌培养基及培养条件的优化[J]. 广东海洋大学学报, 2012, 32(3): 49–54.
- [13] Grzeskowiak L, Collado M C, Vesterlund S, et al. Adhesion abilities of commensal fish bacteria by use of mucus model system: Quantitative analysis[J]. Aquaculture 2011 318: 33–6.
- [14] 曾东,王益平,倪学勤,等. 几株益生菌对鲤前肠黏液的体外黏附特性[J]. 水产学报, 2010, 34(1): 147–152.
- [15] 吴晓春,邓灯,程顺峰,等. 鱼肠道弧菌间接 ELISA 快速检测法的建立[J]. 水产科学, 2013, 32(5): 284–288.
- [16] 刘礼辉,张德锋,李宁求,等. 鲢鱼源无乳链球菌的鉴定、血清型分析及药敏试验[J]. 南方农业学报, 2015, 46(11): 2053–2058.
- [17] Chen M, Li L P, Wang R, et al. PCR detection and PFGE genotype analyses of streptococcal clinical isolates from tilapia in China[J]. Veterinary Microbiology 2012, 159: 526–30.
- [18] 余泽辉,张佳,耿毅,等. 齐口裂腹鱼无乳链球菌的分离鉴定及其感染的病理损伤[J]. 中国水产科学, 2014, 26(1): 1244–1252.

- [19] 黄婷,李莉萍,王瑞 等. 卵形鲳鲹感染无乳链球菌与海豚链球菌的研究[J]. 大连海洋大学学报. 2014 29(2): 161–166.
- [20] 常瑞祥,王旭荣,杨志强 等. 无乳链球菌黏附因子研究进展[J]. 动物医学进展, 2014 35(2): 101–104.
- [21] Lopez-sanchez M J, Sauvage E, Cunha D, et al. The highly dynamic CRISPR1 system of *Streptococcus agalactiae* controls the diversity of its mobilome[J]. Mol Microbiol 2012 85: 1057–1071.
- [22] Suri R, Palmer K, Ross J, et al. S104 Exposure to welding fume and adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to A549 alveolar cells[J]. Thorax 2012 67: A51.
- [23] Benhamed S, Guardiola F A, Mars M, et al. Pathogen bacteria adhesion to skin mucus of fishes[J]. Veterinary Microbiology 2014 171: 1–12.
- [24] 温周瑞. 气候变化对鱼类病毒病和细菌病的影响[J]. 当代水产 2013(8): 76–77.
- [25] 朱苏琴. 河流弧菌对大黄鱼粘液的粘附作用研究[D]. 厦门: 集美大学, 2012.
- [26] 祝璟琳,杨弘. 鱼源无乳链球菌致病机理研究进展[J]. 广东海洋大学学报, 2013(6): 92–96.

Adhesion of *Streptococcus agalactiae* to the Mucus of Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

LIU Haitian, ZHAO Guangjun, GUO Xiaohui, ZHANG Yongzheng, ZHOU Yongcan, CAI Yan,
XIE Zhenyu, GUO Weiliang, WANG Shifeng

(Ocean College, Hainan University / Ministry of Education Key Laboratory of Tropical Biological Resources, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: Bacterial adhesion is the first step of pathogenic infection. In order to explore the adhesion of pathogen *Streptococcus agalactiae* to the mucus of tilapia (*Oreochromis niloticus*), the effects of the mucus sources (from skin, gill or intestines), incubation time, incubation temperature, pH, and salinity on the bacterial adhesion were investigated using the indirect ELISA method. The results show that the adhesion of *S. agalactiae* to the mucus of tilapia was sensitive to incubation time, incubation temperature and pH, but not to salinity. When the incubation time was up to 120 min and the incubation temperature was 35 °C, *S. agalactiae* produced maximum adhesion in the intestinal tract mucus (4.052×10^7 cfu $\cdot$ mL⁻¹), then in the skin mucus (6.480×10^6 cfu $\cdot$ mL⁻¹) and the least in the gill mucus (2.825×10^6 cfu $\cdot$ mL⁻¹). When the incubation time was less than 180 min, the adhesion was positively correlated with the incubation time. When the incubation time was 180 min or longer, the adhesion reached saturation at 5×10^8 cfu $\cdot$ mL⁻¹. *S. agalactiae* had a maximum adhesion to the mucus of the skin, gill and intestinal tract at pH 5.0, 7.0 and 8.0, respectively. These results will help us further understand the infection mechanism of pathogenic *S. agalactiae* in tilapia.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*; tilapia; pathogen; adhesion