

## 温度对尼罗罗非鱼无乳链球菌毒力的影响

刘志刚, 可小丽, 卢迈新\*, 朱华平, 高风英

(中国水产科学研究院珠江水产研究所,农业部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室,广东 广州 501380)

**摘要:** 为了解温度对鱼源无乳链球菌毒力的影响机制,本实验研究了温度对无乳链球菌毒力相关参数(生长、粘附、入侵、毒力基因表达以及对罗非鱼致死率)的影响。结果发现,不同培养温度下(25~40℃)无乳链球菌的生长速度不同,37℃为其最适生长温度,25℃时生长速度最慢;25~34℃内无乳链球菌粘附在惰性基质上的菌体对应的吸光值( $OD_{590nm}$ )之间无显著差异( $P>0.05$ ),37℃时显著增加,40℃时又急剧下降;罗非鱼在人工感染无乳链球菌后各时间点(6、12、24 和 48 h),鱼体脑组织中菌量随注射菌体培养温度的增加呈先上升后下降的趋势,且与不同培养温度下的无乳链球菌对罗非鱼的致死率呈正相关;无乳链球菌毒力基因的表达也与培养温度相关,*hly* 和 *cfb* 基因的表达量随菌体培养温度的升高先增加后降低,分别在 34 和 37℃处达到峰值,不同培养温度下无乳链球菌 *sip* 基因表达的变化幅度较小,而 *scpB* 基因的表达则随培养温度增加而下降;无乳链球菌对罗非鱼的致死率随其培养温度的升高呈先升高后降低趋势,低温(25 和 28℃)培养条件下的菌体对罗非鱼致死率较低(<20%),37℃时致死率最高  $66.67\% \pm 6.67\%$ 。以上结果表明温度参与无乳链球菌生长、粘附、转移、入侵和部分毒力基因表达的调控,它们共同影响无乳链球菌对罗非鱼的毒力。

**关键词:** 尼罗罗非鱼;无乳链球菌;温度;毒力

**中图分类号:** Q 938.8; S 965

**文献标志码:** A

罗非鱼具有生长快、食性杂、适应性强等特点,是联合国粮农组织推荐的世界性优良养殖鱼种之一。但近年来,随着养殖规模的扩大和养殖环境的恶化,导致罗非鱼链球菌病频繁暴发,严重阻碍了罗非鱼养殖业的健康发展。无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)是罗非鱼链球菌病的主要病原之一,其又称 B 族链球菌(Group B *Streptococcus*, GBS),具有较高的致病率和致死率。流行病学研究表明,该病原通常流行于我国南方 5—10 月份的高温期,且水温 30℃以上时易暴发,当水温在 20℃以下时则较少发病<sup>[1-3]</sup>,推测温度对无乳链球菌的毒力有重要影响。Rodkhum 等<sup>[4]</sup>通过研究不同水温条件下尼罗罗非鱼对 I a 血清型无乳链球菌的敏感性,发现高温条件下无乳链球菌更易侵染罗非鱼,进一步

说明温度是无乳链球菌致病力的重要影响因子,但其对温度具体的作用机制并未作阐述。Mereghetti 等<sup>[5]</sup>通过比较研究 40 和 30℃培养温度下人源无乳链球菌的转录组发现,40℃培养的菌株较 30℃的,其毒力相关基因、嘌呤代谢及铁摄取相关基因表达均呈显著上调趋势,新陈代谢相关基因则呈下调表达。Freitas Lione 等<sup>[6]</sup>研究表明人源无乳链球菌对人脐静脉内皮细胞(HUVECs)的粘附和入侵能力在 40℃条件下显著强于 37℃。说明温度可以调控无乳链球菌毒力基因及其他代谢相关基因的表达,改变其粘附及入侵能力,进而改变细菌整体毒力。病原菌毒力是侵袭力(包括粘附、定植、入侵、繁殖、扩散及抵抗宿主防御的能力等)和产毒性(包括内毒素和外毒素)的综合作用结果<sup>[7-8]</sup>。据此本实验通

收稿日期:2013-06-01 修回日期:2013-08-30

资助项目:现代农业产业技术体系建设专项(CARS-49);广州市科技计划(2013J4100078;201300000064)

通信作者:卢迈新,E-mail:mx-lu@163.com

过研究不同温度下菌株毒力基因表达、粘附力、感染力、致病性等,较系统的探讨了温度对罗非鱼无乳链球菌毒力的影响,以期为进一步深入了解温度对鱼源无乳链球菌毒力的调控机制奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验菌株

实验菌株 BSL2N#为本实验室分离并保存的致病性罗非鱼无乳链球菌,实验前在血琼脂平板上进行活化,在脑心浸出液培养基(BHI)中扩大培养。

### 1.2 实验用鱼与饲养条件

实验用尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*, GIFT strain)购于广东罗非鱼良种场,体质量为6~8 g,实验前在室内养殖条件下驯养2周。选用健康(实验前抽样检测,实验鱼不携带无乳链球菌、寄生虫等病原)、个体大小一致的尼罗罗非鱼,随机分为7组(6个处理组和1个对照组),每组3个重复,每个重复30尾鱼。隔天换水约1/3,溶氧保持在7.0 mg/L左右,pH 7.0~8.0,水温(30±2)℃,每天投喂饲料两次,每次约为鱼体质量的3%。

### 1.3 温度对无乳链球菌生长的影响

将无乳链球菌划线接种于血琼脂平板上,在28℃恒温培养箱中培养48 h。用灭菌牙签挑取单菌落于新鲜BHI液体培养基中,于28℃,200 r/min下振荡过夜扩大培养后置于4℃暂存,备用。按1:50(V/V)的比例将上述菌液接种于新鲜的BHI培养基中,分别置于25、28、31、34、37和40℃恒温摇床中,200 r/min振荡培养,每个温度下设置3个重复。每隔1 h检测一次菌液的吸光值( $OD_{600nm}$ ),直至菌液的吸光值稳定,绘制生长曲线。

### 1.4 温度对无乳链球菌粘附能力的影响

通过改良的微量滴定法<sup>[9-10]</sup>来检测不同温度下无乳链球菌对惰性基质的粘附能力。将28℃下扩大培养的无乳链球菌菌液于3 500 r/min下离心5 min,弃上清液,用新鲜的BHI液体培养基将菌液浓度调节至 $1 \times 10^6$  CFU/mL。分别向6块96孔无菌酶标板中加入200 μL的细菌悬液,以无菌BHI培养基为空白对照,每组设置各6个平行孔,盖上盖子后放入湿盒中,分别置于不同温度(25、28、31、34、37和40℃)下静置培养24 h。

倒去孔中培养基,每孔用250 μL的生理盐水洗涤3次除去游离的细菌。60℃烘箱中干燥后每孔加200 μL 1%的结晶紫染液染色5 min,弃去染液后用生理盐水洗涤3遍去除多余的染色剂。在空气中晾干后,每孔加入200 μL 33%(V/V)冰醋酸,待结晶紫充分溶解后置于酶标仪中在590 nm波长下检测各孔的吸光值。

### 1.5 温度对无乳链球菌入侵和转运能力的影响

将4℃暂存的无乳链球菌菌液以1:50(V/V)的比例接种于新鲜的BHI培养基中,分别置于培养箱中在不同温度(25、28、31、34、37和40℃)下200 r/min振荡培养至对数生长期( $OD_{600nm} = 1.2$ ),3 500 r/min离心5 min,收集菌体沉淀,分别用0.85%的生理盐水将菌液浓度调节至 $4.5 \times 10^8$  CFU/mL( $LD_{50}$ ,为预实验结果)。分别用不同温度下培养的无乳链球菌菌悬液对罗非鱼进行腹腔注射感染,每尾100 μL,对照组注射等量的生理盐水。分别在接种后6、12、24和48 h时,从各组中随机抽取3尾,无菌条件下取其脑组织,称重后以0.05 g/mL的比例加入生理盐水,用匀浆器(MICCRA D-1 30225)充分研磨。1 000 r/min低速离心1 min沉淀组织碎片后,取上清液进行稀释(稀释倍数根据预实验结果为100倍最佳),取100 μL涂布BHI琼脂平板,每个样品涂布3个平板。28℃恒温培养箱中培养24 h,观察菌落形成情况,统计菌落数目,并随机挑取10个菌落进行生理生化和16S rRNA基因分子鉴定。

### 1.6 温度对无乳链球菌毒力基因表达的影响

按照温度对无乳链球菌入侵和转运能力的影响中的步骤准备不同培养温度下处于生长对数期的无乳链球菌菌液,每个温度设置3个重复,分别从各组中取1.5 mL菌液置于离心管中,12 000 r/min离心5 min,收集菌体沉淀,置于液氮中冻存,备用。

用Pure Link™ RNA Mini Kit(Invitrogen)试剂盒抽提细菌RNA,提取步骤参照试剂盒说明书。用1%琼脂糖凝胶电泳检测所提取RNA的质量,并用核酸定量仪(Eppendorf)测定RNA浓度。用RNase-Free DNase(Promega)去除RNA中的痕量的DNA,步骤参照试剂盒说明书。通过对细菌RNA进行16S rRNA基因片段的PCR扩增来检测DNA去除效果,引物和程序与荧光定量PCR中一致,若扩增结果为阴性,则说明DNA

去除完全。

取 1  $\mu\text{g}$  RNA, 用 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) 试剂盒中随机引物对无乳链球菌 RNA 进行逆转录, 步骤参照试剂盒说明书, cDNA 于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。根据 GenBank 中已登录的罗非鱼无乳链球菌毒力因子 (CAMP 因子/促溶血因子 (CAMP factor-specific gene, Cfb); C5a 肽酶蛋白 (Streptococcal C5a peptidase from GBS, ScpB); 溶血素 (hemolysin/haemolysin, Hly); 表面免疫原性蛋白 (Surface Immunogenic Protein, Sip)) 及 16S 核糖体 RNA (16S ribosomal RNA, 16S rRNA) 基因序列, 设计

荧光定量 PCR 引物 (表 1)。荧光定量 PCR 反应体系 (20  $\mu\text{L}$ ) 包括: SYBR<sup>®</sup> Select Master Mix (ABI) 10  $\mu\text{L}$ , 上游引物和下游引物各 0.5  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{mol/L}$ ), cDNA 模板 0.5  $\mu\text{L}$  (0.05  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), 无菌双蒸水 8.5  $\mu\text{L}$ 。在 7300 Real-Time PCR System (ABI) 上进行荧光定量 PCR 反应, 反应程序如下:  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min;  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 15 s,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 40 个循环; 在  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  采集荧光信号。内参基因 16S rRNA 与毒力基因分不同孔同时进行 PCR 反应, 设置阴性对照 (不加 cDNA 模板), 每个样品设置 3 个重复,  $C_t$  值取其平均值。

表 1 检测罗非鱼无乳链球菌毒力因子的荧光定量 PCR 引物  
Tab. 1 Primers used in qPCR assays of expression of *S. agalactiae* virulence factors

引物名称 primer	引物序列 (5'-3') primer sequence	碱基数/bp length	参考序列 reference sequence	产物/bp product
16S rRNA-F	TGAGATGGACCTGCGTTGTAT	21		
16S rRNA-R	CATTGCCGAAGATTCCCTAC	20	JQ039368.1	153
cfb-F	TAGCTTAGTTATCCCAAATCCC	22		
cfb-R	TAAAGACTTCATTGCGTGCC	20	JQ289568.1	170
scpB-F	TTGCTAACGGAACCTACACCTATC	24		
scpB-R	AGAATGTTGCCGATGTTGCG	20	U56908.1	129
sip-F	TCGGAAGGTATGACACCAGAA	21		
sip-R	TTGACTAACAGCTTGCCCTTG	21	HQ878436.1	117
hly-F	AATGCTATCTCTTTGGCGGTATC	24		
hly-R	CGATCCCAAATAACTCTATGAAAGC	25	JX863673.1	158

### 1.7 温度对无乳链球菌致病力的影响

将不同温度下培养的处于生长对数期的无乳链球菌菌悬液, 用 0.85% 生理盐水调节浓度至  $4.5 \times 10^8$  CFU/mL, 分别对罗非鱼进行腹腔注射感染, 每尾 100  $\mu\text{L}$ , 对照组注射等量的生理盐水, 观察各组的死亡情况, 统计 7 d 内各组的总死亡率。为确定鱼体死亡是否由无乳链球菌感染引起, 取濒死鱼体进行无菌解剖观察和细菌分离。

### 1.8 数据处理与分析

采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法<sup>[11]</sup> 计算不同温度下无乳链球菌各毒力基因的相对表达量, 其中  $\Delta C_t = C_t$  (毒力基因) -  $C_t$  (内参基因);  $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$  (处理组) -  $\Delta C_t$  (对照组), 将  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  组定义为对照组, 其它温度组则为处理组。应用 SPSS 17.0 统计软件中单因素方差分析中 Duncan 检验方法对不同组别对应的粘附能力、入侵能力、毒力基因相对表达量和死亡率的相关数据进行显著性检验,  $P < 0.05$  为差异显著, 数值以 Mean  $\pm$  SD 的形式表示。

## 2 结果

### 2.1 不同温度下无乳链球菌的生长曲线

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$  和  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  温度下生长速度最快, 2 h 左右就达到对数生长期,  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  时虽比  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  时要较早达到稳定生长期, 但其吸光值 ( $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ) 低于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  吸光值。  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  时其生长速度最慢, 6.5 h 左右才到达对数生长期。  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  ~  $34\text{ }^{\circ}\text{C}$  内的生长曲线比较接近。不同温度下, 处于相同生长阶段的吸光值相近, 吸光值  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 1.2$  时, 都处于对数生长期 (图 1)。

### 2.2 不同温度下无乳链球菌对惰性基质的粘附能力

通过微量滴定法检测不同培养温度下无乳链球菌对惰性基质的粘附能力, 发现在  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  ~  $34\text{ }^{\circ}\text{C}$  内无乳链球菌粘附在惰性基质上的菌体对应的吸光值 ( $\text{OD}_{590\text{nm}}$ ) 之间无显著差异 ( $P > 0.05$ ),  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  时显著增加, 显著高于其它温度组

对应的吸光值 ( $P < 0.05$ ), 40 °C 时其吸光值又急剧下降(图 2)。

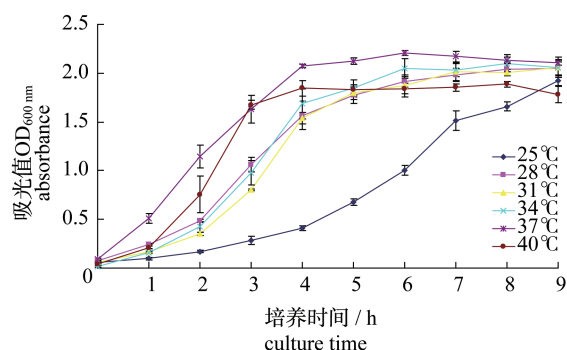


图 1 无乳链球菌在不同培养温度下的生长曲线  
Fig. 1 The growth curves of *S. agalactiae* at different culture temperatures

### 2.3 不同温度培养无乳链球菌对脑组织的侵染能力

实验组罗非鱼人工感染无乳链球菌后各时间点(6、12、24 和 48 h), 脑组织中都能分离到相同形态的细菌, 随机挑取 10 个菌落进行生理生化和 16S rRNA 基因分子鉴定, 确定为无乳链球菌, 对照组未分离到细菌。在感染后 6 h, 实验组鱼体脑组织中无乳链球菌量随注射细菌的培养温度增加呈现先上升后下降的趋势, 在 37 °C 时到达峰值, 40 °C 时脑组织中菌落数开始下降。感染 12 h 后, 各实验组鱼体脑组织中菌量进一步增加, 37 °C 组

仍显著高于其它温度组。感染 24 h 后, 25、28、31 和 40 °C 组的脑组织中菌落数都开始下降, 而 37 °C 组维持在 12 h 水平, 34 °C 组略有上升。感染 48 h 后, 各实验组鱼体脑组织中菌量都明显下降, 但仍表现为随无乳链球菌培养温度的升高呈现先上升后下降的趋势, 在 37 °C 时到达峰值, 40 °C 组开始下降(表 2)。

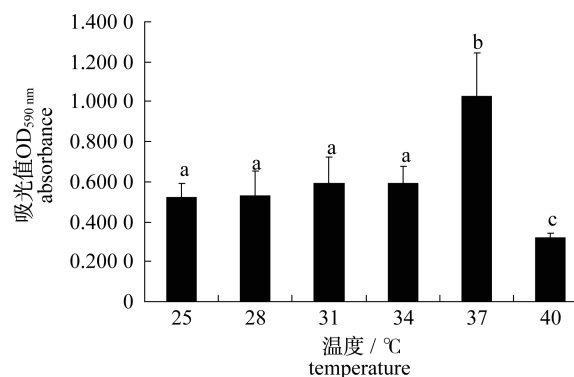


图 2 不同培养温度下无乳链球菌粘附惰性基质的能力

数值为 mean  $\pm$  SD ( $n = 6$ ); 各组上方字母不同表示组间差异显著,  $P < 0.05$ ; 字母相同表示组间无显著差异,  $P > 0.05$

Fig. 2 The adhesive capacity to the inert substrate of *S. agalactiae* at different incubation temperature

Data were shown as means  $\pm$  SD ( $n = 6$ ); Groups with the different letters showed significant difference,  $P < 0.05$ ; Groups with the same letter showed no significant difference,  $P > 0.05$

表 2 不同温度培养无乳链球菌人工感染尼罗罗非鱼后不同时间脑组织中无乳链球菌菌落数  
Tab. 2 The colony forming units in the brain of Nile tilapia at different hours after being infected with *S. agalactiae* incubated at different temperatures

感染时间/h hours post-infection	脑组织中无乳链球菌菌落数量 [Lg(CFU/g)] the colony forming units of <i>S. agalactiae</i> in the brain					
	25 °C	28 °C	31 °C	34 °C	37 °C	40 °C
6	5.32 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	5.53 $\pm$ 0.13 <sup>ab</sup>	5.70 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>	5.77 $\pm$ 0.24 <sup>b</sup>	6.38 $\pm$ 0.18 <sup>c</sup>	5.68 $\pm$ 0.28 <sup>ab</sup>
12	5.96 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	6.21 $\pm$ 0.15 <sup>ab</sup>	6.37 $\pm$ 0.24 <sup>ab</sup>	6.32 $\pm$ 0.39 <sup>ab</sup>	6.78 $\pm$ 0.12 <sup>c</sup>	6.52 $\pm$ 0.14 <sup>bc</sup>
24	5.56 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	5.38 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	6.17 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	6.66 $\pm$ 0.19 <sup>c</sup>	6.78 $\pm$ 0.12 <sup>c</sup>	6.03 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>
48	4.66 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	4.99 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	5.45 $\pm$ 0.12 <sup>c</sup>	5.66 $\pm$ 0.11 <sup>d</sup>	5.70 $\pm$ 0.07 <sup>d</sup>	4.77 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>

注: 表中数值均以 mean  $\pm$  SD 的形式表示, 数值右上角的字母用于表示不同温度组无乳链球菌感染罗非鱼后, 在同一时间点对应的脑组织中无乳链球菌菌落数量之间的差异, 字母相同则数值之间无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 字母不同则表明数值之间显著差异 ( $P < 0.05$ )

Notes: Values in the table have been showed in the form of Mean  $\pm$  SD. Letters in the top right corner of the values represent the statistical difference of the colony forming units from different groups at the same time after infection; Values with the same letter showed no significant difference ( $P > 0.05$ ), values with the different letters showed significant difference ( $P < 0.05$ )

### 2.4 不同温度下无乳链球菌毒力相关基因的表达水平

不同培养温度(25 ~ 40 °C)下, 对数生长期的无乳链球菌 *hly* 基因的表达水平随培养温度的增加呈先增加后降低, 34 °C 时达到峰值, 其相对表

达量为 4.58  $\pm$  0.34; 37 °C 时, *hly* 基因的表达水平开始下降, 并稳定在一定水平(图 3-a)。无乳链球菌的 *cfb* 基因的表达水平也具有随培养温度的升高先升高后下降的温度依赖性, 37 °C 时达到峰值, 表达量为 3.00  $\pm$  0.12, 40 °C 时 *cfb* 基因表达

水平下降,但它与 31 和 34 °C 时的表达水平之间并无显著差异(图 3-b)。*sip* 基因的表达水平受温度的影响不大,变化幅度较小,31 °C 时表达水平最高,但其相对表达量仅为  $1.34 \pm 0.11$ ,25、28、34 和 37 °C 之间并无显著差异,40 °C 时该基因

表达水平开始下降(图 3-c)。无乳链球菌 *scpB* 基因的表达水平随温度增加而下降,在 25 °C 时 *scpB* 基因的表达水平最高( $1.02 \pm 0.23$ ),37 °C 时最低( $0.26 \pm 0.08$ )(图 3-d)。

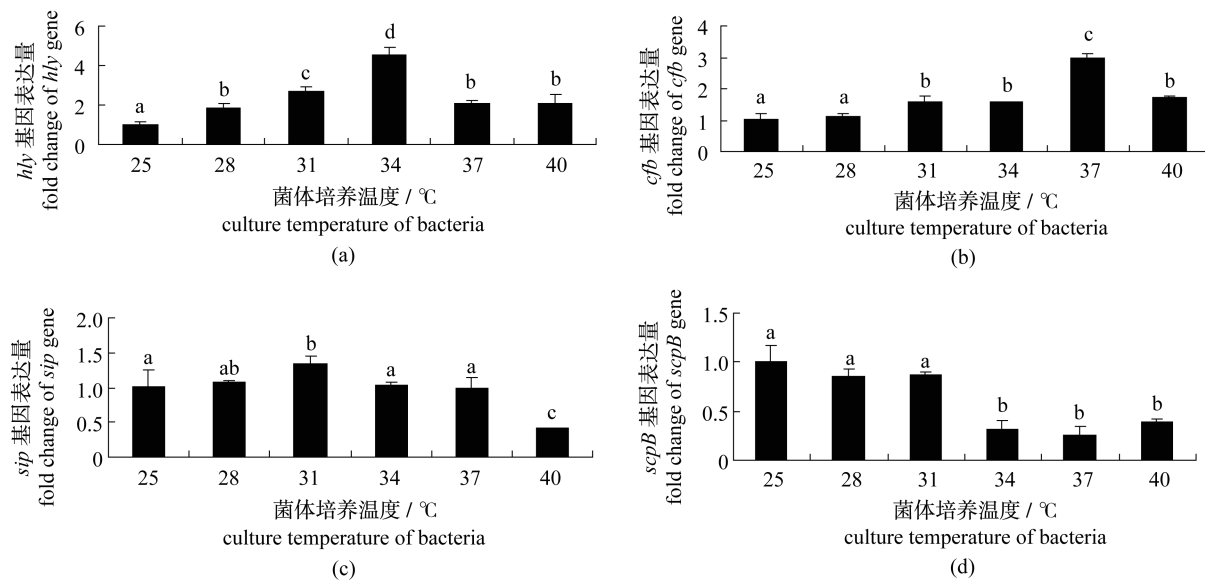


图 3 不同培养温度下无乳链球菌毒力基因的表达水平

(a) ~ (d) 分别为不同培养温度下无乳链球菌 *hly*、*cfb*、*sip* 和 *scpB* 基因的表达水平; 数值为  $\text{mean} \pm \text{SD}$  ( $n=3$ ), 柱子上方字母不同表示各组之间差异显著,  $P < 0.05$ ; 字母相同则表示各组之间无显著差异,  $P > 0.05$

Fig. 3 The expression levels of *S. agalactiae*'s virulence genes incubated at different temperature

(a) - (d) represented for the expression levels of *hly*, *cfb*, *sip* and *scpB* gene respectively; Data are shown as  $\text{means} \pm \text{SD}$  ( $n=3$ ), groups with the different letters showed significant difference,  $P < 0.05$ ; groups with the same letter showed no significant difference,  $P > 0.05$

## 2.5 罗非鱼感染不同温度培养的无乳链球菌后的死亡率

将不同温度培养的无乳链球菌,同等剂量注射感染罗非鱼。较低温度(25 和 28 °C)下培养的无乳链球菌引起罗非鱼的死亡率较低,低于 20%。当培养温度上升到 31 °C 时,无乳链球菌感染罗非鱼后的死亡率急剧增加,达到 60% 左右。37 °C 时的死亡率最高  $66.67\% \pm 6.67\%$ ,到 40 °C 时略有降低  $53.33\% \pm 6.67\%$ 。但在 31 ~ 40 °C 内,不同温度组罗非鱼死亡率并无显著差异(图 4)。取刚死亡鱼体进行无菌解剖,可见腹水、肝脏肿大充血、胆囊充盈、脑膜充血等无乳链球菌感染典型症状,从脑、肝、脾脏中可分离到无乳链球菌。

## 3 讨论

微生物的毒力是其在宿主体内繁殖,并由此而引起疾病的能力;病原菌毒力是侵袭力(包括

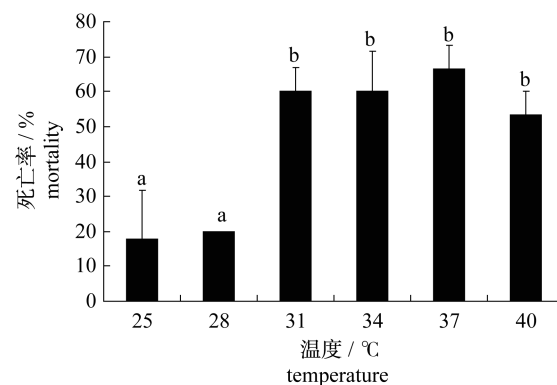


图 4 罗非鱼感染不同温度培养的无乳链球菌后的死亡率

数值 =  $\text{mean} \pm \text{SD}$  ( $n=3$ ), 柱子上方字母不同表示各组之间差异显著,  $P < 0.05$ ; 字母相同则表示各组之间无显著差异,  $P > 0.05$

Fig. 4 The fatality rate of tilapia infected with *S. agalactiae* incubated at different temperature

Data are shown as  $\text{means} \pm \text{SD}$  ( $n=3$ ), groups with the different letters showed significant difference,  $P < 0.05$ ; groups with the same letter showed no significant difference,  $P > 0.05$

粘附、定植、入侵、繁殖、扩散及抵抗宿主防御的能力等)和产毒性(包括内毒素和外毒素)的综合<sup>[7-8]</sup>。病原微生物毒力受到外界环境的影响,包括温度、渗透压、pH、离子浓度、铁的含量、生长阶段和种群密度等<sup>[12]</sup>。罗非鱼无乳链球菌是一种条件致病菌,当水温高于30℃时,该病容易暴发流行,水温低于20℃时则较少发病。为了解温度对无乳链球菌毒力的调控机制,本实验研究了不同培养温度下无乳链球菌毒力相关参数(生长、粘附、入侵、产毒和致死率)的变化。

实验结果表明,在无乳链球菌培养温度为25~40℃时,随着培养温度的升高,无乳链球菌的生长速度随之加快,进入生长稳定期的时间明显缩短,40℃时生长速度最快,但其达到稳定生长期时的吸光值( $OD_{600nm}$ )要低于37℃时的吸光值,这说明37℃是无乳链球菌的最适生长温度,其生长速度快,且具最大的生物量。微生物的最适生长温度是由温度对生物体内众多酶反应的综合作用决定的,从酶促反应动力学来看,温度升高,反应速率加快,营养物质消耗和生长代谢加快,产物分泌提前,但酶本身也很容易因热而丧失活性,温度超过一定限度,部分酶失活,菌体生长进入停滞状态<sup>[13]</sup>。

病原菌对组织细胞或粘膜的表面粘附是造成机体感染的首要步骤<sup>[14]</sup>。病原菌可以通过可逆的非特异性聚集及吸附和(或)不可逆的受体-配体特异性结合方式诱导在宿主表面的粘附<sup>[8]</sup>。Iordache等<sup>[9]</sup>利用微量滴定法评价不同温度和渗透压下弧菌的粘附能力。该方法是通过细菌在惰性基质上形成生物膜的能力来反映其非特异性吸附能力。当处于应激状态时(极端的营养缺乏或过剩、低pH值、高渗透压、氧化、抗菌剂和抗生素等),细菌为了抵抗不利环境,通过自身合成的水合多聚物粘附在固体表面,继续生长形成生物膜,这是细菌所具有的一种非常重要的环境适应机制<sup>[15]</sup>。本实验结果表明在25~34℃内无乳链球菌粘附在惰性基质上的菌体对应的吸光值( $OD_{590nm}$ )之间无显著差异( $P>0.05$ ),37℃时显著增加,40℃时又急剧下降。这可能是由于无乳链球菌在培养过程中大量增殖,培养基中营养缺乏,为了适应环境的变化,细菌在惰性基质上形成生物膜。细菌从游离状态到聚集形成成熟的生物膜过程中,也牵涉到复杂的调控机制,主要是由环

境信号应答和群体感应系统来完成的<sup>[16]</sup>;在这个调节过程中需要多种功能酶的参与,而酶的活性对温度非常敏感,无乳链球菌可能在25~34℃内相应酶的活性逐渐增加,37℃时酶活性最高,当温度继续升高到40℃时,酶的活性受到抑制,生物膜的形成也受到抑制。另外,病原菌形成生物膜有利于其内部的细菌逃避抗生素或机体免疫系统的作用,造成机体持续性感染或免疫性疾病<sup>[17]</sup>,所以病原菌形成生物膜的能力与其毒力关系紧密,本实验结果也表明无乳链球菌在37℃时形成生物膜能力最强,其对罗非鱼致死率也最高。

病原菌粘附于宿主后,在机体内进行增殖、转移并侵染靶器官,造成机体损伤。罗非鱼感染无乳链球菌后,典型症状之一是鱼在水面呈螺旋状游动,组织病理学研究表明确链球菌可侵袭鱼类脑部神经系统,这可能是造成病鱼失去平衡的主要原因<sup>[18-19]</sup>。本实验通过平板菌落计数法研究了不同温度培养的不同无乳链球菌腹腔注射罗非鱼后脑组织中无乳链球菌数量,结果表明罗非鱼在人工感染无乳链球菌后各时间点,鱼体脑组织中菌量随注射菌体培养温度的增加呈先上升后下降的趋势,且与不同温度培养的不同无乳链球菌感染后罗非鱼的死亡率呈正相关,这说明无乳链球菌在罗非鱼体内转移和对脑组织的入侵能力与细菌培养温度相关,且其转移和入侵力与无乳链球菌毒力成正相关。Freitas Lione等<sup>[6]</sup>通过研究分别在37和40℃温度下培养的人源无乳链球菌对人脐静脉内皮细胞(HUVECs)的粘附和入侵能力,结果表明无乳链球菌培养温度能够影响其对内皮细胞的粘附和细胞内存活能力;Iordache等<sup>[9]</sup>用高温和高渗条件下培养的弧菌腹腔注射接种小鼠后,利用平板计数法对小鼠脾脏中弧菌进行计数,结果发现温度和渗透压都会影响弧菌对小鼠脾脏细胞的入侵能力,入侵能力与其对宿主的致死率成正相关,本实验研究结果与这些研究结果类似。

研究表明,大多病原菌毒力基因的表达受到温度的调节。Konkel等<sup>[12]</sup>发现温度对志贺氏杆菌毒力基因表达的激活非常重要,志贺氏杆菌毒力基因在37℃下被激活表达,而在30℃下被抑制。Kariptas等<sup>[20]</sup>研究了不同温度对气单胞菌的毒力因子的影响,结果表明虽然所有分离株都能在4、25和37℃下产生溶血素、蛋白酶、酯酶和核酸酶,但在37和25℃培养条件下要比4℃时快。

Mereghetti 等<sup>[5]</sup>通过比较 30 和 40 °C 培养条件下无乳链球菌的全基因转录组发现,处于生长稳定期的无乳链球菌中大量的新陈代谢相关基因在 30 °C 时上调表达,而编码毒力的相关基因在 40 °C 时上调表达。无乳链球菌的毒力相关基因较多,目前研究表明大量表面蛋白参与粘附、入侵、逃避宿主免疫和致病性,包括 Alp 家族、β 蛋白质、ScpB、Lmb 蛋白、CAMP 因子、FbsA、Sip 蛋白和 Hly 等<sup>[21]</sup>。本实验对不同培养温度下(25 ~ 40 °C)处于生长对数期的无乳链球菌的 4 个毒力相关基因 *hly*、*cfb*、*sip* 以及 *scpB* 的表达水平进行了研究。

溶血素(hemolysin)由 *hly* 基因编码,是无乳链球菌重要的毒力因子之一。溶血素以低聚物形式结合在细胞膜上,形成孔道造成其结构和功能的紊乱,使大量细胞内成分泄漏,导致细胞死亡<sup>[22]</sup>。溶血素不仅溶解红细胞,还损害其它多种类型的真核细胞,它可破坏微血管内皮细胞和上皮细胞,并使巨噬细胞凋亡和生成一氧化氮,有利于细菌在组织内扩散<sup>[23]</sup>。本实验结果表明,无乳链球菌 *hly* 基因表达水平随培养温度的增加呈现先增加后降低的趋势,*hly* 表达量在 34 °C 时达到峰值,37 °C 时其开始下降,这说明无乳链球菌 *hly* 基因表达受温度的调控,但其表达水平与无乳链球菌的致死率在 37 °C 最高并不一致,这可能是由于无乳链球菌的毒力是多种毒力因子共同相互作用的结果,各毒力因子的表达并不一定都与病原菌整体毒力一一对应。*cfb* 基因编码无乳链球菌溶血促进因子(CAMP),它可与免疫球蛋白 IgG 和 IgM 的 Fc 片段结合,激活 IgG 和 IgM 的 Fab 片段<sup>[24]</sup>,在机体系统感染过程中能削弱宿主的免疫功能<sup>[25]</sup>,被认为是 GBS 主要致病因子之一<sup>[24-26]</sup>。本实验结果表明 *cfb* 基因随无乳链球菌培养温度的升高表达量先升高后降低,且与不同培养温度下无乳链球菌对罗非鱼的致死率呈正相关,进一步说明 CAMP 因子是无乳链球菌的重要毒力因子。Brodeur 等<sup>[27]</sup>通过免疫学筛选发现了 GBS 表面免疫原性蛋白 Sip (Surface immunogenic protein, Sip)。Sip 具有较强的免疫原性,是 GBS 重要的粘附和定植因子之一<sup>[28]</sup>。本实验表明 *sip* 基因的表达水平随培养温度上升其变化幅度较小,31 °C 时较高,但相对表达量仅为  $1.34 \pm 0.11$ ,*sip* 基因表达调控可能受温度影响较小。ScpB 是 GBS 表面高度保守的多功能蛋

白,在所有已知血清型的 GBS 中都有表达<sup>[29]</sup>。ScpB 可以阻止补体 C5a 与中性粒细胞结合,抑制炎症反应时调理吞噬细胞的化学攻击作用<sup>[30]</sup>。ScpB 还可与纤连蛋白结合,加速 GBS 对上皮细胞的侵袭,是重要的毒力因子和保护性抗原<sup>[31]</sup>。但是本实验结果表明在无乳链球菌对罗非鱼致死率最强时(37 °C),*scpB* 基因的表达量反而最低,致死率较低时(25 °C)表达量反而较高。有研究表明在一些无乳链球菌强毒株中 ScpB 没有活性或具有较弱活性,并推断 ScpB 在粘附和促进细菌入侵上的功能要比其酶活性更为重要<sup>[32]</sup>,这可能是无乳链球菌毒力较强时,ScpB 表达量反而较低的原因之一。Tamura 等<sup>[33]</sup>在研究 GBS 中 *glnQ* 基因功能时发现 ScpB 的表达可能是通过细胞质中谷氨酰胺水平进行调节,且这种调节是转录后水平的。这种转录后的调节方式使 ScpB 的 mRNA 水平与其蛋白量之间不成正比,从而可能出现无乳链球菌毒力和粘附力较强时 *scpB* 基因的转录水平反而较低的现象。

人工感染不同温度培养无乳链球菌后,罗非鱼的死亡率是病原菌毒力的直接体现。本实验结果表明,在 25 ~ 40 °C 内培养无乳链球菌注射感染(浓度为  $4.5 \times 10^8$  CFU/mL)罗非鱼后死亡率随培养温度的升高先上升,后下降,37 °C 对应的死亡率最高,这与 GBS 的生长速度、粘附力、转移入侵能力及 *cfb* 毒力基因表达随温度的变化规律相一致,进一步证明了其与病原毒力密切相关,它们共同调控着无乳链球菌的毒力。但罗非鱼的死亡率也受菌株、实验罗非鱼规格及攻毒剂量等因素影响,因此在后期工作中,我们将围绕该方向对不同培养温度下无乳链球菌的致病性做进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 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):766-774.
- [2] 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.
- [3] Ye X, Li J, Lu M X, et al. Identification and molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolated from pond-cultured tilapia in China [J]. Fisheries Science,2011,77(4):623-632.
- [4] Rodkhum C, Kayansamruaj P, Pirarat N. Effect of water temperature on susceptibility to *Streptococcus*

- agalactiae Serotype I a infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. The Thai Journal of Veterinary Medicine, 2011, 41(3): 309 - 314.
- [5] Mereghetti L, Sitkiewicz I, Green N M, et al. Remodeling of the *Streptococcus agalactiae* transcriptome in response to growth temperature [J]. PLoS One, 2008, 3(7): e2785.
- [6] Freitas Lione V O, Bittencourt Dos Santos M H, Ulisses Carvalho T M, et al. Fever temperature enhances mechanisms of survival of *Streptococcus agalactiae* within human endothelial cells [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2010, 26(4): 511 - 516.
- [7] 秦明安. 病原微生物的毒力 [J]. 新医学, 1983, 14(10): 535.
- [8] 石洁, 王长军. 病原菌逃避宿主细胞防御的策略 [J]. 微生物学通报, 2012, 39(1): 90 - 98.
- [9] Iordache C, Oprea E, Bleotu C, et al. The role of proteins expressed under the stress condition in virulence of some *vibrio* strains [J]. Romanian Archives of Microbiology and Immunology, 2008, 67(3-4): 85 - 91.
- [10] Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation [J]. Journal Microbiological Methods, 2000, 40(2): 175 - 179.
- [11] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402 - 408.
- [12] Konkel M E, Tilly K. Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes [J]. Microbes and Infection, 2000, 2(2): 157 - 166.
- [13] 陈坚, 李寅. 发酵过程优化原理与实践 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 1 - 355.
- [14] 胡守奎, 李槿年, 余为一. 蟹源致病性拟态弧菌的粘附及侵袭特性 [J]. 水产学报, 2004, 28(5): 541 - 546.
- [15] Donlan R M, Costerton J W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2002, 15(2): 167 - 193.
- [16] 唐俊妮, 史贤明, 王红宁, 等. 细菌生物膜的形成与调控机制 [J]. 生物学杂志, 2009, 26(2): 48 - 50, 53.
- [17] Kong K F, Vuong C, Otto M. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection [J]. International Journal of Medical Microbiology, 2006, 296(2-3): 133 - 139.
- [18] Kitao T, Aoki T, Sakoh R. Epizootic caused by  $\beta$ -haemolytic *Streptococcus* species in cultured freshwater fish [J]. Fish Pathology, 1981, 15(3-4): 301 - 307.
- [19] Filho C I, Müller E E, Pretto-Giordano L G, et al. Histological findings of experimental *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Brazilian Journal of Veterinary Pathology, 2009, 2(1): 12 - 15.
- [20] Kariptas E, Erdem B, Tulumoglu S. Effects of different temperatures on virulence factors and antimicrobial resistance of *Aeromonas* isolated from retail food [J]. Archiv für Lebensmittelhygiene, 2010, 61(2): 57 - 62.
- [21] 沈定树, 周雪艳. 无乳链球菌表面蛋白的研究进展 [J]. 中国微生态学杂志, 2007, 19(5): 472 - 473.
- [22] 陈希, 索占伟, 许剑琴, 等. 细菌溶血素的分类及代表性溶血素研究进展 [J]. 中国农学通报, 2008, 24(8): 16 - 22.
- [23] Jacobs A A, Loeffen P L, Van Den Berg A J, et al. Identification, purification and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis* [J]. Infection and Immunity, 1994, 62(5): 1742 - 1748.
- [24] Jrgens D, Sterzik B, Fehrenbach F J. Unspecific binding of group B streptococcal cocytolysin (CAMP factor) to immunoglobulins and its possible role in pathogenicity [J]. The Journal of Experimental Medicine, 1987, 165(3): 720 - 732.
- [25] Skalka B, Smola J. Lethal effect of CAMP-factor and UBERIS-factor-a new finding about diffusible exosubstances of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus uberis* [J]. Zentralbl Bakteriologie, 1981, 249(2): 190 - 194.
- [26] Bernheimer A W, Linder R, Avigad L S. Nature and mechanism of action of the CAMP protein of group B streptococci [J]. Infection and Immunity, 1979, 23(3): 838 - 844.
- [27] Brodeur B R, Boyer M, Charlebois I, et al. Identification of group B streptococcal Sip protein, which elicits cross-protective immunity [J]. Infection and Immunity, 2000, 68(10): 5610 - 5618.
- [28] 黎炯, 叶星, 可小丽, 等. 罗非鱼无乳链球菌 Sip 基因的克隆、表达及免疫原性分析 [J]. 水生生物学报, 2012, 36(4): 626 - 633.
- [29] Santillan D A, Rai K K, Santillan M K, et al. Efficacy of polymeric encapsulated C5a peptidase-



- based group B streptococcus vaccines in a murine model [ J ]. American Journal of obstetrics and Gynecology, 2011, 205 ( 3 ): 249. e1 - 249. e8.
- [ 30 ] Ulett G C, Maclean K H, Nekkhalapu S, *et al.* Mechanisms of Group B Streptococcal-Induced Apoptosis of Murine Macrophages [ J ]. The Journal of Immunology, 2005, 175 ( 4 ): 2555 - 2562.
- [ 31 ] Gleich-Theurer U, Aymanns S, Haas G, *et al.* Human serum induces streptococcal C5a peptidase expression [ J ]. Infection and Immunity, 2009, 77 ( 9 ): 3817 - 3825.
- [ 32 ] Lindahl G, Stalhammar-Carlemalm M, Areschoug T. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens [ J ]. Clinical Microbiology Reviews, 2005, 18 ( 1 ): 102 - 127.
- [ 33 ] Tamura G S, Nittayajarn A, Schoentag D L. A glutamine transport gene, *glnQ*, is required for fibronectin adherence and virulence of group B streptococci [ J ]. Infection and Immunity, 2002, 70 ( 6 ): 2877 - 2885.

## Effect of temperature on the virulence of *Streptococcus agalactiae* from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

LIU Zhigang, KE Xiaoli, LU Maixin\*, ZHU Huaping, GAO Fengying

( Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Science, Key Laboratory of

Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510380, China)

**Abstract:** In order to understand the influence and mechanism of temperature on the virulence of *Streptococcus agalactiae*, the effects of culture temperature on the virulence related parameters of *S. agalactiae* including bacteria growth, adhesion, invasion, expression of virulence genes and mortality rates of tilapia were studied. The results showed that the growth speeds of *S. agalactiae* at different temperatures ( 25 - 40 °C ) were different; 37 °C was the optimum growth temperature and the slowest growth speed appeared at 25 °C. The adhesive capacity of *S. agalactiae* reached the peak at 37 °C and decreased at 40 °C. There was no significant difference between the absorbance (OD<sub>590nm</sub>) of adhesive *S. agalactiae* incubated in the range of 25 - 34 °C. The number of colony forming units in the brain of tilapia infected artificially with *S. agalactiae* showed a temperature-dependent growth pattern. The number of colony forming units increased along with the increase of culture temperature and reached the peak at 37 °C, and then decreased at 40 °C. The number of colony forming units was positively associated with its mortality rate. The expression of virulence genes was also influenced by culture temperature. The expression level of *hly* and *cfb* genes showed a temperature-dependent expression pattern similar to the number of colony forming units. The expression of *hly* and *cfb* genes significantly increased and reached the peak at 34 °C and 37 °C, respectively, and then dropped rapidly while the culture temperature continued to rise. The expression of *sip* gene was minimally influenced by culture temperature while the expression of *scpB* gene decreased along with the increase of the culture temperature. The mortality rates of tilapia infected with *S. agalactiae* cultured at different temperatures showed temperature-dependence. The mortality rate increased along with the increase of culture temperature and peaked 66.67% ± 6.67% at 37 °C, and then slightly decreased at 40 °C. In conclusion, the culture temperature influenced the growth, adhesion, invasion and expression of some virulence genes of *S. agalactiae*, which may contribute to its virulence.

**Key words:** *Oreochromis niloticus*; *Streptococcus agalactiae*; temperature; virulence

**Corresponding author:** LU Maixin. E-mail: mx-lu@163.com