

王 琰,刘金兰. 环境胁迫因子对蜡样芽孢杆菌毒力基因表达和致病性的影响[J]. 江苏农业科学,2018,46(12):38-43.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.12.008

# 环境胁迫因子对蜡样芽孢杆菌毒力基因表达和致病性的影响

王 琰, 刘金兰

(天津农学院水产学院/天津市水产生态及养殖重点实验室,天津 300384)

**摘要:**为明确培养温度、pH 值和亚硝酸盐浓度对蜡样芽孢杆菌毒力基因表达和致病性的影响,利用反转录 PCR (RT-PCR)对 *hblC*、*CytK*、*plcR*、*nheA*、*bceT* 等 5 种毒力基因的表达进行了研究,同时运用正交试验研究其对斑马鱼致病性的影响。结果显示,蜡样芽孢杆菌毒力基因表达受温度、pH 值和亚硝酸盐浓度的影响,其中 *hblC*、*CytK*、*plcR*、*nheA* 在 35 ℃ 时高效表达,而 *bceT* 则在 25 ℃ 高效表达;*hblC*、*CytK*、*plcR*、*bceT* 在 pH 值为 8.5 时高效表达,而 *nheA* 在 pH 值为 7.2 时高效表达;*hblC*、*CytK*、*plcR*、*bceT*、*nheA* 均在亚硝酸盐浓度为 3.0 mg/L 时高效表达。通过正交试验得出 *hblC*、*plcR*、*nheA* 在第 9 组条件下高效表达,即温度 25 ℃、pH 值 6.0、亚硝酸盐浓度 0.75 mg/L;而 *bceT* 在第 1 组条件下高效表达,即温度 35 ℃、pH 值 8.5、亚硝酸盐浓度 0.75 mg/L;*CytK* 在第 4 组条件下高效表达,即温度 25 ℃、pH 值 8.5、亚硝酸盐浓度 1.5 mg/L。正交试验条件下基因表达的研究结果得到斑马鱼攻毒试验结果的支持。

**关键词:**蜡样芽孢杆菌;毒力基因表达;温度;pH 值;亚硝酸盐;致病性

**中图分类号:** S941.42 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)12-0038-06

蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*, Bc) 属芽孢杆菌科 (Bacillaceae) 芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 革兰氏阳性杆菌,部分菌株为条件致病菌<sup>[1]</sup>。蜡样芽孢杆菌普遍存在于陆上动物中,可以引起人类的腹泻<sup>[1]</sup>、牲畜的腹泻和乳房炎等疾病<sup>[2-3]</sup>,还会引起水生动物(如中华鳖<sup>[4]</sup>、刺参<sup>[5]</sup>、斑点叉尾鲷<sup>[6]</sup>和黄颡鱼<sup>[7]</sup>)致病死亡。因此,蜡样芽孢杆菌不仅危害动物的健康,影响其经济价值;更严重时会影响人类健康。蜡样芽孢杆菌具有多种毒力基因,包括溶血素 *BL* 基因 (*hblC*)、肠毒素 *T* 基

因 (*bceT*)、细胞毒素 *K* 基因 (*CytK*)、多效调控因子 (*plcR*)、非溶血性肠毒素 (*nheA*)、呕吐基因 (*ces*),这些毒力基因在细菌致病过程中起重要作用<sup>[8]</sup>。

鱼病的发生是宿主、病原和环境三者相互作用的结果。环境胁迫可以分为急性胁迫和慢性胁迫,指的是鱼类所处的生存环境产生急剧变化而对其产生刺激,从而能打破鱼类正常的生理功能,对其健康造成不利影响<sup>[9]</sup>。在鱼类养殖过程中,温度、pH 值、亚硝酸盐浓度等是影响鱼体正常生长的重要胁迫因子。由于鱼类是水生变温动物,它的生长发育与水环境温度密切相关。温度不仅直接影响正常的生长发育与鱼体生理功能,而且间接制约了水体中氨氮和溶解氧等理化因子的含量<sup>[10]</sup>。pH 值作为不可忽视的胁迫因子之一,过高或过低都会对鱼体产生影响<sup>[11]</sup>。亚硝酸盐浓度过高可以降低鱼体血液载氧能力,造成组织缺氧,甚至导致窒息死亡<sup>[12-14]</sup>。

收稿日期:2017-01-21

作者简介:王 琰(1991—),女,河南安阳人,硕士研究生,研究方向为水产动物疾病与免疫。E-mail:wangyan.333@qq.com。

通信作者:刘金兰,教授,研究方向为水产动物疾病与免疫。E-mail:ljlant115@163.com。

[19] Wattam A R, Williams K P, Snyder E E, et al. Analysis of ten *Brucella* genomes reveals evidence for horizontal gene transfer despite a preferred intracellular lifestyle[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(11):3569-3579.

[20] 赵忠鹏, 吴 朔, 罗德炎, 等. 羊种布鲁氏菌疫苗株 M5 和强毒株 16M 的比较蛋白质组学研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2007, 23(12):1172-1175.

[21] 曲 勍, 王玉飞, 徐 杰, 等. 羊布鲁氏菌外膜蛋白质的组成鉴定[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2009, 35(5):805-811.

[22] 杨艳玲, 盛雪玲, 唐 婕, 等. 羊布鲁氏菌强毒株 16M 与疫苗株 M5 外膜蛋白蛋白质组学研究[J]. *中国兽医学报*, 2010, 30(10):1334-1342.

[23] 吴 朔, 赵忠鹏, 罗德炎, 等. 布鲁氏菌外膜蛋白免疫蛋白质组学方法的建立[J]. *免疫学杂志*, 2008, 24(4):385-388.

[24] 唐 婕, 杨艳玲, 王兴龙, 等. 牛布鲁氏菌膜蛋白的免疫抗原筛

选[J]. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(7):136-139.

[25] Krab I M, Parmeggiani A. EF-Tu, a GTPase odyssey [J]. *Biochimica et Biophysica acta*, 1998, 1443(1/2):1-22.

[26] Kamla V, Henrich B, Hadding U. Phylogeny based on elongation factor Tu reflects the phenotypic features of mycoplasmas better than that based on 16S rRNA[J]. *Gene*, 1996, 171(1):83-87.

[27] Silverman J M, Reiner N E. Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes [J]. *Cellular Microbiology*, 2011, 13(1):1-9.

[28] Sharma J, Mishra B B, Li Q, et al. TLR4-dependent activation of inflammatory cytokine response in macrophages by *Francisella* elongation factor Tu[J]. *Cellular Immunology*, 2011, 269(2):69-73.

[29] 王方昆. 马耳他型布氏杆菌弱毒疫苗株 M5-90 致弱分子机制的研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2011.

研究蜡样芽孢杆菌大多集中在食品领域,在水产上相对较少,关于其毒力基因表达的研究非常缺乏。开展环境胁迫因子对细菌毒力基因表达的研究,将有助于阐明细菌的流行病规律、蜡样芽孢杆菌感染的发生机理,以及提供有效的生态学防治措施。本试验将研究温度、pH值和亚硝酸盐浓度这3种常见环境胁迫因子的变化对蜡样芽孢杆菌5种毒力基因表达的影响,同时运用正交试验研究其对斑马鱼致病性的影响,以期能明确养殖条件变化对蜡样芽孢杆菌致病性的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

试验用 *Bc* 分离自有典型临床出血症状的半滑舌鲷,经检验含溶血素 BL 基因(*hblC*)、肠毒素 T 基因(*bceT*)、细胞毒素 K 基因(*CytK*)、多效调控因子(*plcR*)、非溶血性肠毒素(*nheA*),由天津农学院水产动物病害实验室保种。斑马鱼购自天津市中环花鸟鱼虫市场,长度为 3.0~3.5 cm,均健康无病,经过 1 周暂养,待试验鱼稳定后,用于试验。

### 1.2 培养基

1.2.1 单因素培养基 (1)温度组(T)。将 2216E 海水液体培养基调 pH 值为 7.2,不加亚硝酸盐。(2)pH 值组(P)。将 2216E 海水液体培养基 pH 值分别调为 6.0、7.2、8.5,不加亚硝酸盐。(3)亚硝酸盐浓度组(Y)。在 pH 值为 7.2 的 2216E 海水液体培养基中加入亚硝酸盐使其浓度为 0.75、1.50、3.00 mg/L。

1.2.2 正交试验设计 采用正交试验设计方法设计 3 因素(温度、pH 值、亚硝酸盐浓度)3 水平,因素与水平见表 1。在基础 2216E 海水液体培养基中按照表 2 方案进行配制。

表 1 环境胁迫因子正交试验因素水平

水平	因素		
	A:温度(℃)	B:pH 值	C:亚硝酸盐浓度(mg/L)
1	25	6.0	0.75
2	30	7.2	1.50
3	35	8.5	3.00

表 3 *Bc* 毒力基因引物序列及扩增产物长度

目的基因	引物序列(5'→3')	退火温度(℃)	扩增长度(bp)
<i>hblC</i>	CCTATCAATACTCTCGCAA;TTTCCTTTGTATACGCTGC	56	699
<i>bceT</i>	TTACATTACCAGGACGTGCTT;TGTTTGTGATTGTAATTCAGG	56	400
<i>CytK</i>	CGACGTCAAGTTGTAACA;CGTGTGTAATAACCCAGTT	56	537
<i>plcR</i>	CTATTATTATATGTGAGATGAATTGTATGGTAA;AGACGTTTGGATGTTACTCC	56	581
<i>nheA</i>	TACGCTAAGGAGGGCA;GTTTTTATTGCTTCATCGCT	56	477
16S rRNA	GCGGCGTGCCTAATACATGC;CTCAGGTGGCTACGCATCG	56	267

1.3.3 *Bc* 致病性试验 根据表 2 的正交试验方案,进行正交试验。调试好试验水体各项指标后,在 2216E 海水液体培养基培养,调试最终浓度为  $10^8$  CFU/mL 的 *Bc* 对鱼体进行养殖中毒试验。根据 7 d 内试验鱼体死亡情况,记录其死亡率(%)。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素对 *Bc* 毒力基因表达的影响

2.1.1 温度对 *Bc* 毒力基因表达的影响 从表 4 和图 1 至图

表 2 环境胁迫因子正交试验方案

序号	A:温度(℃)	B:pH 值	C:亚硝酸盐浓度(mg/L)
1	35	8.5	0.75
2	25	7.2	3.00
3	35	6.0	3.00
4	25	8.5	1.50
5	30	8.5	3.00
6	35	7.2	1.50
7	30	7.2	0.75
8	30	6.0	1.50
9	25	6.0	0.75

### 1.3 试验方法

1.3.1 细菌培养 在 3 组(每组 3 个重复)单因素培养基中,分别加入 100 μL 保存在 -20℃ 的 *Bc* 菌株。T 组分别在 25、30、35℃ 摇床 180 r/min 培养 12 h;P 组和 Y 组在 30℃ 摇床 180 r/min 培养 12 h。

在配制好的 9 组正交试验培养基中,分别加入 100 μL 保存在 -20℃ 的 *Bc* 菌株。按照表 2 的设计,分别在对应温度的摇床 180 r/min 培养 12 h。

1.3.2 RNA 的制备和反转录 将经过“1.3.1”节方法培养的细菌菌液 1.0 mL,放入 1.5 mL 无核酸酶的离心管中离心留沉淀及 100 μL 上清,充分振荡悬浮细菌,直至没有细胞团块。然后按照飞捷(RNAfast200)RNA 提取说明书步骤进行 RNA 提取。对提取的 RNA 样品均进行凝胶电泳成像检测,检验提取的 RNA 中无基因组 DNA 污染。

将提取的 RNA 测浓度之后,按照 TIANScript RT Kit 试剂盒说明书进行反转录。PCR 扩增所用引物参照表 3。PCR 反应体系(20 μL)包括:2 × *Taq* PCR Mix(天根)10 μL,25 μmol 的引物各 1 μL,模板 DNA 1 μL,用灭菌超纯水调整终体积至 20 μL。PCR 反应条件:94℃ 预变性 4 min;94℃ 变性 30 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,共 35 个循环;72℃ 8 min。通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果。

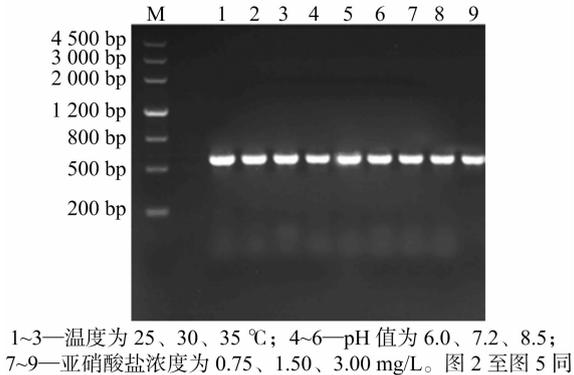
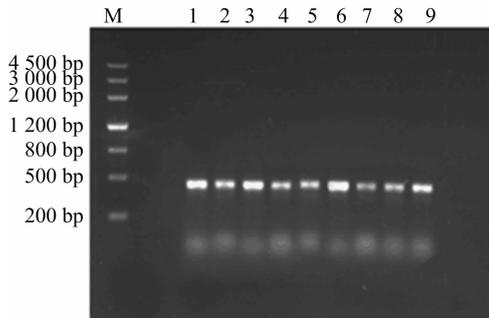
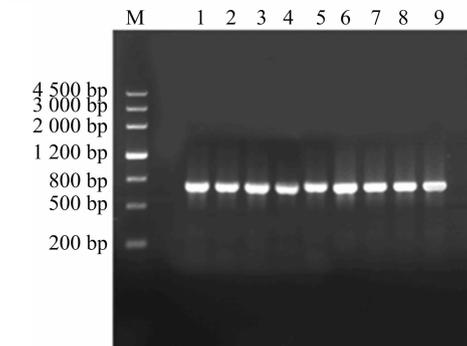
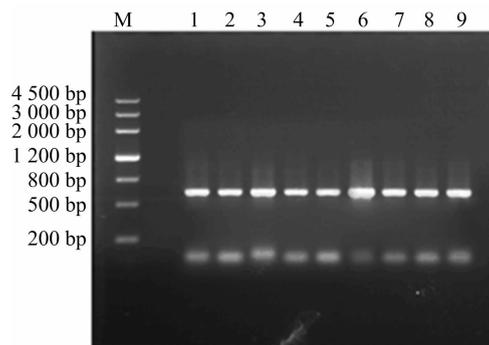
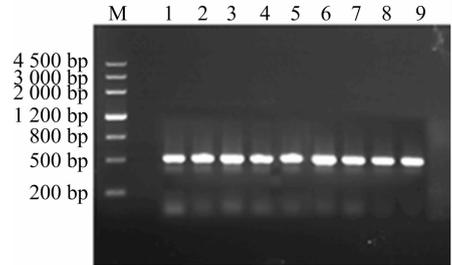
5 可以看出,在温度梯度下,*CytK* 和 *plcR* 差异不显著,其中 *CytK* 和 *plcR* 35℃ 时基因表达较强;*bceT* 在温度为 25℃ 时基因表达显著高于 30、35℃,30、35℃ 间差异不明显;*nheA* 在温度为 30、35℃ 时基因表达显著高于 25℃,但 30℃ 的基因表达与 35℃ 时差异不显著;*hblC* 在温度为 25、35℃ 时基因表达显著高于 30℃,而 25、35℃ 基因表达间差异不显著。

2.1.2 pH 值对 *Bc* 毒力基因表达的影响 从表 5 和图 1 至图 5 可以看出,在 pH 值梯度下,*CytK* 和 *nheA* 基因表达均差异不显著,其中 *CytK* 在 pH 值为 8.5 时基因表达较强,*nheA*

表4 不同温度值对 *Bc* 毒力基因表达的影响

温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	基因表达的电泳半定量结果				
	<i>CytK</i>	<i>becT</i>	<i>hblC</i>	<i>plcR</i>	<i>nheA</i>
25	0.55 ± 0.04a	0.56 ± 0.06a	0.62 ± 0.04a	0.55 ± 0.06a	0.56 ± 0.01b
30	0.46 ± 0.04a	0.36 ± 0.01b	0.47 ± 0.03b	0.52 ± 0.03a	0.85 ± 0.07a
35	0.58 ± 0.03a	0.39 ± 0.04b	0.65 ± 0.04a	0.64 ± 0.00a	0.92 ± 0.05a

注:同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著( $P < 0.05$ )。表5、表6同。

图1 单因素对 *CytK* 基因表达的影响图2 单因素对 *becT* 基因表达的影响图3 单因素对 *hblC* 基因表达的影响图4 单因素对 *plcR* 基因表达的影响图5 单因素对 *nheA* 基因表达的影响

1~3—温度为 25、30、35  $^{\circ}\text{C}$ ；4~6—pH 值为 6.0、7.2、8.5；  
7~9—亚硝酸盐浓度为 0.75、1.50、3.00 mg/L。图 2 至图 5 同

在 pH 值为 7.2 时基因表达较强；*becT*、*hblC* 和 *plcR* 均在 pH 值为 8.5 时基因表达显著高于 pH 值为 7.2 和 6.0，而 pH 值为 7.2、6.0 间基因表达差异不显著。

2.1.3 亚硝酸盐浓度对 *Bc* 毒力基因表达的影响 从表 6 和图 1 至图 5 可以看出，*CytK* 在亚硝酸盐浓度为 3.00 mg/L 时的基因表达显著高于 0.75、1.50 mg/L，而浓度为 0.75、1.50 mg/L 间差异不显著；*hblC*、*nheA* 均在浓度为 1.50、3.00 mg/L 时基因表达显著高于 0.75 mg/L 时，并且均在 3.00 mg/L 时基因表达略高于 1.50 mg/L 时；*becT* 和 *plcR* 均在浓度 3.00 mg/L 时基因表达显著高于浓度为 1.50、0.75 mg/L 时。

## 2.2 正交试验对 *Bc* 毒力基因表达的影响

影响 *CytK* 基因表达的因素依次为亚硝酸盐浓度 > 温度 > pH 值，三者之间均无显著差异(表 8)，基因表达最高组是第 4 组，即温度 25  $^{\circ}\text{C}$ 、pH 值 8.5、亚硝酸盐浓度 1.50 mg/L(表 7)；影响 *becT* 基因表达的因素依次为温度 > 亚硝酸盐浓度 > pH 值，三者之间差异不显著(表 9)，基因表达最高组是第 1 组，即温度 35  $^{\circ}\text{C}$ 、pH 值 8.5、亚硝酸盐浓度 0.75 mg/L(表 7)；影响 *hblC* 基因表达的因素依次为温度 > pH 值 > 亚硝酸盐浓度，三者间差异不显著，基因表达最高组是第 9 组，即温度 25  $^{\circ}\text{C}$ 、pH 值 6.0、亚硝酸盐浓度 0.75 mg/L(表 7)；影响 *plcR* 基因表达的因素依次为温度 > 亚硝酸盐浓度 > pH 值，三者间差异不显著(表 11)，基因表达最高组是第 9 组，即温度 25  $^{\circ}\text{C}$ 、pH 值 6.0、亚硝酸盐浓度 0.75 mg/L(表 7)；影响 *nheA* 基因表达的因素依次为温度 > 亚硝酸盐浓度 > pH 值，三者间差异不显著(表 12)，基因表达最高组是第 9 组，即温度 25  $^{\circ}\text{C}$ 、pH 值 6.0、亚硝酸盐浓度 0.75 mg/L(表 7)。第 1 组至第 9 组 *Bc* 毒力基因表达结果见图 6 至图 14。

## 2.3 环境胁迫因子对 *Bc* 致病性的影响

影响 *Bc* 致死率的因素为温度 > 亚硝酸盐浓度 > pH 值，三者之间无显著差异，其致死率最高组为第 9 组，即温度 25  $^{\circ}\text{C}$ 、pH 值 6.0、亚硝酸盐浓度 0.75 mg/L(表 13、表 14)。

## 3 讨论与结论

### 3.1 单因素对 *Bc* 毒力基因表达的影响

表5 不同pH值对*Bc*毒力基因表达的影响

pH值	基因表达的电泳半定量结果				
	<i>CytK</i>	<i>becT</i>	<i>hblC</i>	<i>plcR</i>	<i>nheA</i>
6.0	0.49 ± 0.01a	0.33 ± 0.01b	0.46 ± 0.02b	0.45 ± 0.01b	0.72 ± 0.05a
7.2	0.46 ± 0.01a	0.36 ± 0.01b	0.47 ± 0.03b	0.52 ± 0.03b	0.85 ± 0.07a
8.5	0.53 ± 0.05a	0.53 ± 0.03a	0.74 ± 0.02a	0.76 ± 0.02a	0.83 ± 0.01a

表6 不同亚硝酸盐值对*Bc*毒力基因表达的影响

亚硝酸盐浓度 (mg/L)	基因表达的电泳半定量结果				
	<i>CytK</i>	<i>becT</i>	<i>hblC</i>	<i>plcR</i>	<i>nheA</i>
0.75	0.53 ± 0.02b	0.21 ± 0.03c	0.40 ± 0.01b	0.17 ± 0.00c	0.74 ± 0.01b
1.50	0.47 ± 0.03b	0.31 ± 0.02b	0.61 ± 0.01a	0.45 ± 0.01b	0.94 ± 0.02a
3.00	0.66 ± 0.01a	0.40 ± 0.01a	0.66 ± 0.06a	0.80 ± 0.01a	0.95 ± 0.02a

表7 *Bc*毒力基因表达正交试验结果

组别	因素			电泳半定量结果				
	A:温度(℃)	B:pH值	C:亚硝酸盐浓度(mg/L)	<i>CytK</i>	<i>becT</i>	<i>hblC</i>	<i>plcR</i>	<i>nheA</i>
1	35	8.5	0.75	0.78	1.21	0.72	0.51	1.02
2	25	7.2	3.0	0.73	1.05	0.60	0.54	0.77
3	35	6.0	3.00	0.57	0.83	0.58	0.51	0.73
4	25	8.5	1.50	0.90	0.92	1.01	0.71	0.80
5	30	8.5	3.00	0.59	0.80	0.84	0.59	0.65
6	35	7.2	1.50	0.81	0.81	0.79	0.83	0.83
7	30	7.2	0.75	0.72	0.72	0.46	0.46	0.58
8	30	6.0	1.50	0.85	0.55	0.52	0.51	0.73
9	25	6.0	0.75	0.70	1.00	1.06	1.01	1.09

表8 *CytK*正交试验结果方差分析

来源	Ⅲ型方差	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
温度	0.007	2	0.003	0.536	0.651
pH值	0.005	2	0.002	0.381	0.724
亚硝酸盐浓度	0.077	2	0.038	6.045	0.142
误差	0.013	2	0.006		

表9 *becT*正交试验结果方差分析

来源	Ⅲ型方差	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
温度	0.160	2	0.080	8.025	0.111
pH值	0.052	2	0.026	2.593	0.278
亚硝酸盐浓度	0.069	2	0.035	3.469	0.224
误差	0.020	2	0.010		

表10 *hblC*正交试验结果方差分析

来源	Ⅲ型方差	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
温度	0.126	2	0.063	0.971	0.507
pH值	0.088	2	0.044	0.679	0.595
亚硝酸盐浓度	0.016	2	0.008	0.126	0.888
误差	0.130	2	0.065		

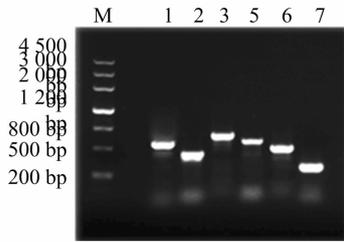
表11 *plcR*正交试验结果方差分析

来源	Ⅲ型方差	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
温度	0.084	2	0.042	0.553	0.644
pH值	0.010	2	0.005	0.066	0.938
亚硝酸盐浓度	0.033	2	0.017	0.217	0.822
误差	0.152	2	0.076		

表12 *nheA*正交试验结果方差分析

来源	Ⅲ型方差	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
温度	0.096	2	0.048	2.256	0.307
pH值	0.026	2	0.013	0.604	0.623
亚硝酸盐浓度	0.048	2	0.024	1.132	0.469
误差	0.042	2	0.021		

为明确环境对*Bc*毒力基因表达的影响,本试验选择了温度、pH值和亚硝酸盐浓度3种环境胁迫因子进行研究。研究结果显示,*Bc*毒力基因的表达总体上是受温度、pH值和亚硝酸盐浓度影响。试验结果表明,在温度、pH值和亚硝酸盐浓度3种环境胁迫因子影响下,*CytK*与*PlcR*均在3种因子得最高值时表达高效,原因在于*CytK*基因的表达是由*CytK*启动子序列上的*plcR*调节因子所控制,同时在*CytK*的氨基酸末端序列含有1个分泌信号的多肽,这种多肽能调控*CytK*毒素的分泌<sup>[15]</sup>。同时*hblC*也在3种因子的最高值时表达高效,与近年来在广东顺德、中山、惠州出现的中华鳖暴发病症状(腹甲有出血斑,颈部充血肿大,竖起身体浮于水面,以7月左右为发病的高峰期)<sup>[4]</sup>相一致。发病池塘夏季水温较高,水中可能出现缺氧,造成中华鳖身体浮于水面。*becT*作为肠毒素基因在温度25℃时表达高效,与黄颡鱼患病时胃、肠道发白,肠内无食,并且该病在每年的9—10月流行现象<sup>[7]</sup>相一致,而*becT*在pH值和亚硝酸盐最高值时表达高效,水体中鱼类死亡造成pH值和亚硝酸盐含量增高,进而加速*becT*基因表达。温度和亚硝酸盐浓度对*nheA*的影响要大于pH值,非溶血性肠毒素(*nhe*)的蛋白质成分与*hbl*区别很大,不具有明显的溶血性<sup>[15]</sup>,但和*hblC*一致是在温度和亚硝酸盐最高值



M—Maker III；1—*CytK*；2—*bceT*；3—*hblC*；  
5—*plcR*；6—*nheA*；7—16S rRNA。图7至图14同  
图6 第1组 *Bc* 毒力基因表达的影响

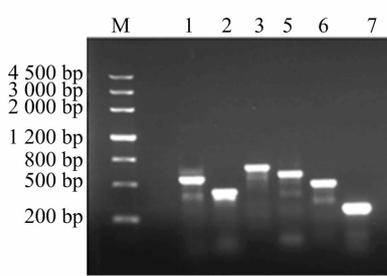


图7 第2组 *Bc* 毒力基因表达的影响

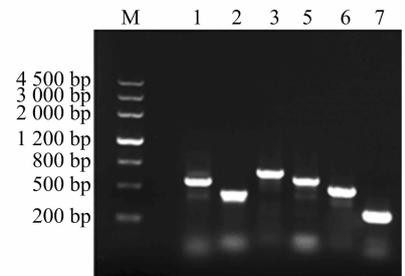


图8 第3组 *Bc* 毒力基因表达的影响

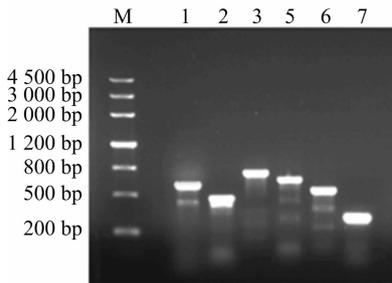


图9 第4组 *Bc* 毒力基因表达的影响

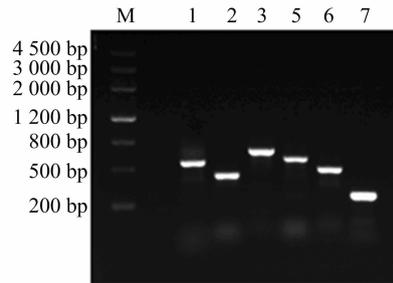


图10 第5组 *Bc* 毒力基因表达的影响

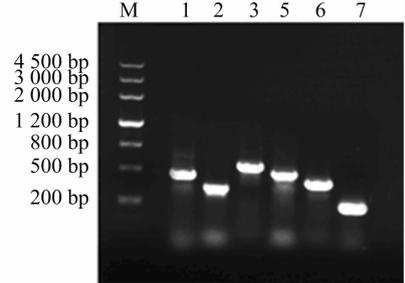


图11 第6组 *Bc* 毒力基因表达的影响

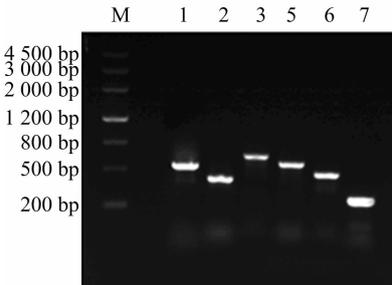


图12 第7组 *Bc* 毒力基因表达的影响

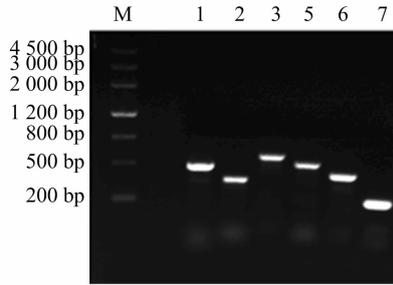


图13 第8组 *Bc* 毒力基因表达的影响

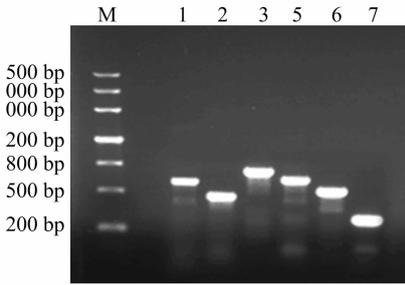


图14 第9组 *Bc* 毒力基因表达的影响

表13 环境胁迫因子对 *Bc* 致病性正交试验结果

组别	因素			死亡率 (%)
	A: 温度 (°C)	B: pH 值	C: 亚硝酸盐浓度 (mg/L)	
1	35	8.5	0.75	53.33
2	25	7.2	3.00	46.67
3	35	6.0	3.00	6.67
4	25	8.5	1.50	43.33
5	30	8.5	3.00	40.00
6	35	7.2	1.50	46.67
7	30	7.2	0.75	3.33
8	30	6.0	1.50	50.00
9	25	6.0	0.75	66.67

表14 环境胁迫因子对 *Bc* 致病性正交试验结果方差分析

来源	Ⅲ型方差	自由度	均方	F 值	P 值
温度	0.075	2	0.038	0.35	0.74
pH 值	0.027	2	0.013	0.12	0.89
亚硝酸盐浓度	0.036	2	0.018	0.17	0.86
误差	0.22	2	0.11		

时表达高效,共同作用毒力基因表达。

### 3.2 正交试验对 *Bc* 毒力基因表达的影响

环境中同时存在或先后降临的胁迫因素往往不是一种,而是多种。不同的胁迫因素之间有相互作用<sup>[16]</sup>。因此正交

试验能反映环境胁迫因子共同作用下对 *Bc* 毒力基因表达的影响。运用正交试验研究环境胁迫因子不同比例条件下的 *Bc* 毒力基因表达,从而找到其表达高效时环境胁迫因子的配比。根据试验结果, *CytK* 基因表达量最高为第4组,即温度 25 °C、pH 值 8.5、亚硝酸盐浓度 1.5 mg/L;而 *bceT* 基因表达量最高为第1组,即温度 35 °C、pH 值 8.5、亚硝酸盐浓度 0.75 mg/L; *hblC*、*plcR*、*nheA* 基因表达量最高均为第9组,即温度 25 °C、pH 值 6.0、亚硝酸盐 0.75 mg/L。在温度较低时,弱碱和强碱均能使毒力基因表达高效,因此在温度较低时,要控制水中的 pH 值来降低基因表达;当温度较高时,强碱更能使毒力基因表达高效。而水中亚硝酸盐的含量在 0.75、1.5 mg/L 水平时更能使毒力基因表达高效。

### 3.3 环境胁迫因子对 *Bc* 致病性的影响

环境胁迫因子对鱼体的各种刺激对鱼类具有致死性<sup>[17]</sup>,毋庸置疑其会严重影响水产经济;即使是亚致死性的胁迫,也足以引起鱼类的应激反应。虽说应激反应是机体的一种保护性反应,但由于血液皮质激素水平升高,使机体在对应激原的反应时有可能抑制机体特异性和非特异性的防御能力,并导致对病原的敏感性增高<sup>[18]</sup>。正交试验结果表明,影响 *Bc* 致死率的因素影响由大到小依次为温度 > 亚硝酸盐 > pH 值,其中温度对致病性影响最强烈。低温会严重影响热带和亚热带生活的水生动物<sup>[19]</sup>。这印证了在第9组(温度 25 °C、pH 值

6.0、亚硝酸盐浓度 0.75 mg/L 时,斑马鱼的致死率最高。斑马鱼在 pH 值为 6.0 时死亡率率高,因为低 pH 值对鱼的感官和呼吸器官有毒害作用,使其摄食能力下降、耗氧量升高、生存能力减弱。此外,过低 pH 值会导致渗透压调节机制失调,打破血液酸碱平衡,从而阻碍鱼体生理生化机制的正常运作<sup>[20]</sup>。亚硝酸盐的毒性作用是由于亚硝酸盐进入血液后,将血红蛋白分子的  $\text{Fe}^{2+}$  氧化成为  $\text{Fe}^{3+}$ ,抑制血液的载氧能力,从而造成组织缺氧、神经麻痹甚至窒息死亡<sup>[21-22]</sup>,加速鱼类死亡。本试验虽然显示环境胁迫因子对斑马鱼的致死率没有显著影响,但是在正交试验条件下环境胁迫因子对 *Bc* 毒力基因表达起支持作用,为预测实际养殖池塘中发病率的大小和其发病的危险程度提供相关参考,以便于早做调节,减少损失。

#### 参考文献:

- [1] 陆湘华,崔 昌,王远萍,等. 蜡样芽孢杆菌食物中毒的研究进展[J]. 传染病信息,2015,28(4):251-254.
- [2] 赵振宇,戴荣四,刘东友,等. 一株猪源致病性蜡样芽孢杆菌的分离与鉴定[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),2014,6(3):311-315.
- [3] 陈亚明. 奶牛乳房炎致病菌分离鉴定及快速诊断试剂盒的研发与应用[D]. 南宁:广西大学,2014.
- [4] 谭爱萍,赵 飞,姜 兰,等. 中华鳖致病性蜡样芽孢杆菌的分离鉴定与特性分析[J]. 广东农业科学,2011,38(20):115-119.
- [5] 骆艺文,郝志凯,王印庚,等. 一株引起刺参“腐皮综合征”的蜡样芽孢杆菌[J]. 水产科技情报,2009,36(2):60-63.
- [6] 陈红莲,王永杰,陈 宇,等. 患爆发性败血症斑点叉尾鲷病原的分离与鉴定[J]. 安徽农业大学学报,2014,41(1):24-29.
- [7] 胡宗云,宋文华,张 涛,等. 黄颡鱼“红头病”病原菌蜡状芽孢杆菌分离鉴定及药敏分析[J]. 水产学杂志,2016,29(4):33-37.
- [8] 周帼萍,袁志明. 蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)污染及其对食品安全的影响[J]. 食品科学,2007,28(3):357-361.
- [9] 王文博,李爱华. 环境胁迫对鱼类免疫系统影响的研究概况[J].

水产学报,2002,26(4):368-374.

- [10] 许友卿,陈 哲,丁兆坤. 低温对鱼类的影响及其预防[J]. 广东农业科学,2012,39(15):132-136.
- [11] 张甫英,李辛夫. 低 pH 对鱼类胚胎发育、鱼苗生长及鳃组织损伤影响的研究[J]. 水生生物学报,1992,16(2):175-182,196.
- [12] 李 波,樊启学,张 磊,等. 不同溶氧水平下氨氮和亚硝酸盐对黄颡鱼的急性毒性研究[J]. 淡水渔业,2009,39(3):31-35.
- [13] 周光正. 氨和亚硝酸盐对于对虾幼虫的毒性[J]. 海洋湖沼通报,1991(2):95-98.
- [14] 王明学,雷和江,卢 光,等. 亚硝酸盐对团头鲂鱼种血红蛋白和耗氧率的影响[J]. 淡水渔业,1997,27(1):14-16.
- [15] 刘 勇. 对大米中呕吐型蜡样芽孢杆菌的多位点序列分型和毒力评价研究[D]. 武汉:武汉轻工业大学,2014.
- [16] 吴 亚,金翠霞. 环境胁迫与生物防御反应[J]. 生态学杂志,1990,9(5):46-49.
- [17] 李亚南,陈全震,邵健忠,等. 鱼类免疫学研究进展[J]. 动物学研究,1995,16(1):83-94.
- [18] Wilson M R, Marcuz A, van Ginkel F, et al. The immunoglobulin M heavy chain constant region gene of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*: an unusual mRNA splice pattern produces the membrane form of the molecule[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(17): 5227-5233.
- [19] Stoner A W, Ottmar M L, Copeman L A. Temperature effects on the molting, growth, and lipid composition of the newly-settled red king crab[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2010, 393(1/2): 138-147.
- [20] 叶诗尧. 嗜水气单胞菌分离鉴定、分型及环境因子影响的研究[D]. 上海:上海海洋大学,2014.
- [21] Alderson R. The effect of ammonia on the growth of juvenile Dover sole, *Solea solea* (L.) and turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) [J]. Aquaculture, 1979, 17(4): 291-309.
- [22] 王明学,吴卫东,刘福军,等.  $\text{Cl}^-$  在  $\text{NO}_2^-$ -N 对鲢毒性实验中的拮抗作用初探[J]. 淡水渔业,1995,25(6):3-5.

(上接第 32 页)

- [24] 赵云蛟,李 丹,徐玉璋,等. 中华菊头蝠 *MHC II - DRB* 基因遗传多态性及进化[J]. 兽类学报,2014,34(3):262-269.
- [25] Yang Q L, Huang X Y, Yuan J H, et al. Polymorphisms in the *SLA - DQA* and *DRA* gene exon 2 and their association with piglet diarrhea in Chinese Yantai black pig[J]. Philippine Agriculturist, 2015, 98(3): 253-261.
- [26] Huang X Y, Yang Q L, Yuan J H, et al. Polymorphism and haplotype analyses of swine leukocyte antigen *DQA* exons 2, 3, 4, and their associations with piglet diarrhea in Chinese native pig[J]. Genetics & Molecular Research, 2015, 14(3): 10461-10472.
- [27] Bautista E M, Ferman G S, Gregg D, et al. Constitutive expression of alpha interferon by skin dendritic cells confers resistance to infection

by Foot-and-Mouth disease virus[J]. Journal of Virology, 2005, 79(8): 4838-4847.

- [28] Tissot R G, Beattie C W, Jr A M, et al. Common swine leukocyte antigen (*SLA*) haplotypes in NIH and Sinclair miniature swine have similar effects on the expression of an inherited melanoma [J]. Animal Genetics, 1993, 24(3): 191-193.
- [29] Molina R M, Cha S H, Chittick W, et al. Immune response against porcine reproductive and respiratory syndrome virus during acute and chronic infection [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2013, 126(3/4): 283-292.
- [30] Wimmers K, Schellander K, Ponsuksili S. *BF*, *HP*, *DQB* and *DRB* are associated with haemolytic complement activity, acute phase protein reaction and antibody response in the pig [J]. Veterinary Immunology & Immunopathology, 2004, 99(3/4): 215-228.