

引文格式: 康振亚, 郭向辉, 向菲, 等. pH 对拟态弧菌感染相关表型及胞外产物特性的影响[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2023, 38(1): 87-94. DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).202207002

pH 对拟态弧菌感染相关表型及胞外产物特性的影响*

康振亚^{1#}, 郭向辉^{1#}, 向菲¹, 秦振阳¹, 耿毅^{1**}, 欧阳萍¹, 陈德芳², 黄小丽²
(1. 四川农业大学 动物医学院, 四川 成都 611130; 2. 四川农业大学 动物科技学院, 四川 成都 611130)

摘要: 【目的】研究 pH 对拟态弧菌 (*Vibrio mimicus*) 感染相关表型及胞外产物特性的影响。【方法】测定不同 pH (6.0、7.0、8.0、8.5 和 9.0) 下拟态弧菌的增殖、泳动、自聚集和生物膜形成以及胞外产物 (extracellular products, ECPs) 的蛋白质量浓度、酶活性、溶血性、细胞毒性和毒力等特性。【结果】pH 6.0~9.0 范围内, 随着 pH 值升高, 拟态弧菌的增殖先增强后减弱, pH 8.5 时增殖最强; 自聚集、生物膜形成和 ECPs 毒力先减弱后增强, pH 8.5 时显著减弱 ($P<0.05$); 泳动以及 ECPs 蛋白质量浓度和细胞毒性减弱, pH 6.0 时显著强于其他 pH ($P<0.05$); ECPs 酶活性和溶血性呈波动性, 酶活性在 pH 6.0 时最强、pH 8.0 时最弱, 溶血性在 pH 8.0 时最强、pH 8.5 时最弱。转录组分析显示: 拟态弧菌 pH 8.5 较 pH 7.0 时, 与 ATP 合成相关的糖酵解、TCA 循环和氧化磷酸化等过程的基因表达上调, 而与 ADP 合成相关的嘌呤合成基因、与蛋白质合成相关的核糖体亚基合成基因以及与蛋白分泌和膜运输相关的基因表达下调。【结论】pH 对拟态弧菌感染相关表型及 ECPs 特性具有明显影响, 且 pH 可能是通过调节拟态弧菌能量代谢与膜运输等过程影响其相关生物学特性。

关键词: pH; 拟态弧菌; 生物学特性; 转录组分析

中图分类号: S941.42 文献标志码: A 文章编号: 1004-390X (2023) 01-0087-08

Effects of pH on Infection Phenotypes and Extracellular Products Properties of *Vibrio mimicus*

KANG Zhenya¹, GUO Xianghui¹, XIANG Fei¹, QIN Zhenyang¹, GENG Yi¹,
OUYANG Ping¹, CHEN Defang², HUANG Xiaoli²

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;
2. College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: [Purpose] To study the effect of pH on the phenotypes and extracellular products properties of *Vibrio mimicus* infection. [Methods] The proliferation, swimming motility, self-aggregation, biofilm formation, and the protein mass concentration, enzyme activity, hemolytic, cytotoxicity and virulence of extracellular products (ECPs) of *V. mimicus* were determined under different pH (6.0, 7.0, 8.0, 8.5, 9.0) conditions. [Results] At pH 6.0-9.0, with the increase of pH value, the prolifera-

收稿日期: 2022-07-02

修回日期: 2023-02-20

网络首发日期: 2023-03-23

*基金项目: 四川省应用基础项目 (21YYJC2011); 四川省淡水鱼产业技术体系创新团队建设项目 (SCCXTD-15)。

作者简介: #对本文贡献等同, 为并列第一作者。康振亚 (1996—), 女, 山西朔州人, 在读硕士研究生, 主要从事水生动物病原学与病理学研究。E-mail: 875997029@qq.com; 郭向辉 (1995—), 男, 河南项城人, 在读硕士研究生, 主要从事水生动物病原学与病理学研究。E-mail: 1137489494@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 耿毅 (1974—), 男, 四川安岳人, 博士, 教授, 主要从事动物病原学与病理学研究。E-mail: gengyisicau@126.com

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20230321.1839.003.html>



tion of *V. mimicus* increased first and then decreased with the strongest at pH 8.5; self-aggregation, biofilm formation and virulence of ECPs weakened first and then increased with the weakest power at pH 8.5 ($P<0.05$); swimming motility and protein mass concentration and cytotoxicity of ECPs showed a weakening trend, which pH 6.0 was significantly stronger than other pH value ($P<0.05$); in addition to the ECPs enzyme activities and hemolysis were fluctuated, which the strongest enzyme activity was at the pH 6.0 and the weakest enzyme activity at the pH 8.0; hemolytic was the strongest at pH 8.0 and the weakest at pH 8.5. Transcriptome analysis showed that: by comparing pH 7.0 and 8.5, the expression of genes related to ATP synthesis such as glycolysis pathway, TCA cycle, and oxidative phosphorylation was up-regulated in pH 8.5, while the expression of genes related to ADP synthesis such as purine synthesis and ribosomal subunit synthesis was down-regulated. [**Conclusion**] pH has obvious influence on the *V. mimicus* infection-related phenotypes and ECPs characteristics, which may affect these related biological characteristics by regulating energy metabolism and membrane transport.

Keywords: pH; *Vibrio mimicus*; biological characteristics; transcriptome analysis

水环境是水生生物的生存环境, 良好的水质是水生生物健康生存的基础, 水质变化导致的应激不仅会影响水生动物, 同时也会影响病原菌, 增加疾病发生的风险。疾病的发生是环境—病原—宿主间相互作用的结果, 目前已有大量研究报道了水生动物在温度、pH、氨氮与亚硝酸盐等环境因子胁迫下对病原的易感性增强^[1-2], 也有研究表明环境因子如温度、渗透压、pH、活性氧、氮化合物和无机离子浓度等因子对细菌毒力也有明显影响^[3], 如 18 °C 时香鱼假单胞菌 (*Pseudomonas plecoglossicida*) 对大黄鱼的致病性强于 25 °C, 此时细菌 T6SS 和铁摄取系统相关基因的表达较 25 °C 显著上调^[4]; 嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 毒力基因溶血素 (AHH)、气溶素 (*AerA*)、外膜蛋白 (OMP) 和黏附素 (*Aha*) 在 15 °C 与 pH 7.0 时高效表达, 但在 4 °C 与 pH 9.0 时则受到抑制^[5]。pH 不仅影响细菌毒力基因的表达, 也会对细菌增殖、生物膜形成和胞外产物 (extracellular products, ECPs) 活性与致病性产生重要影响。研究表明: 嗜水气单胞菌最适生存 pH 值为 6.5^[6], 当环境 pH 值低于 4 时不能形成生物膜^[7], pH 7.5 时其分泌的 ECPs 酶活性最强, 且对对虾和鲫鱼等有较强的致病性^[8]。

拟态弧菌 (*Vibrio mimicus*) 广泛存在于水环境中, 可感染鳌虾、蟹、龟和多种鱼类, 尤其对以黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 和南方鲇 (*Silurus meridionalis*) 等为代表的淡水鲇形目鱼类危害最为严重^[9]。目前对于该菌的主要毒力因子种类、胞外产物和基因组特性^[10]、感染鱼类的病理

损伤特点及病原的分布规律^[11]等进行了较为深入的研究, 这些研究为阐释拟态弧菌的致病机制提供了重要的支撑。pH 是一项重要的水质指标, 其变化对拟态弧菌感染与致病相关特性的影响尚不清楚, 因此, 本研究在水生动物正常生长的 pH 范围 (6.0~9.0) 内, 研究不同 pH 对拟态弧菌感染相关表型及胞外产物特性的影响, 以期为进一步揭示其感染与致病机制提供依据, 同时也为养殖生产中通过调节水体 pH 来防控拟态弧菌病提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌种与试验动物

拟态弧菌 SCCF01 株由四川农业大学鱼病研究中心保存; 供试斑马鱼购自成都某斑马鱼养殖基地, 体长 (2.95 ± 0.20) cm。

1.2 主要试剂

LB 培养基、琼脂、卵黄琼脂和明胶购自青岛海博生物有限公司; M199 培养基购自 HyClone; BCA 蛋白浓度检测试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司; CCK-8 细胞活性检测试剂盒购自上海生工生物科技有限公司。

1.3 pH 对拟态弧菌感染相关表型的影响

1.3.1 对增殖的影响

采用吸光光度法测定 pH 对拟态弧菌增殖的影响。分别取新鲜拟态弧菌菌液 ($OD_{600}=1.0$) 500 μ L 接种于 50 mL 不同 pH (6.0、7.0、8.0、8.5 和 9.0) 的 LB 肉汤 ($n=3$), 振荡培养, 每 2 h 测量 OD_{600} 值, 连续测量 24 h, 绘制生长曲线。

1.3.2 对泳动的影响

分别取新鲜拟态弧菌菌液 0.5 μL 接种于不同 pH (6.0、7.0、8.0、8.5 和 9.0) 且含 0.3% 琼脂的 LB 半固体培养基 ($n=3$), 28 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 48 h 后测量菌圈直径。

1.3.3 对自聚集的影响

采用吸光度法检测菌株的自聚集。分别取新鲜拟态弧菌菌液 100 μL 接种至 10 mL 不同 pH (6.0、7.0、8.0、8.5 和 9.0) 的 LB 肉汤 ($n=3$), 28 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 48 h, 测定上清液 OD_{600} 值, 并计算自聚集率。自聚集率 $=[1 - (A_t/A_0)] \times 100\%$, 式中: A_t 为特定时间的吸光度; A_0 为初始吸光度^[12]。

1.3.4 对生物膜形成的影响

参考 LUO 等^[13]的方法, 采用微孔板法检测生物膜形成。分别取新鲜拟态弧菌菌液 10 μL 加入不同 pH (6.0、7.0、8.0、8.5 和 9.0) 的 190 μL LB 肉汤 ($n=3$), 静置培养 48 h, 经结晶紫染色、无菌磷酸缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 清洗和醋酸溶解后测定 OD_{570} 值。

1.4 pH 对拟态弧菌胞外产物 (ECPs) 特性的影响

1.4.1 对 ECPs 蛋白质质量浓度的影响

分别取新鲜拟态弧菌菌液 ($\text{OD}_{600}=1.0$) 4 mL 接种至不同 pH (6.0、7.0、8.0、8.5 和 9.0) 的 400 mL LB 肉汤 ($n=3$), 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 48 h 后调整各组拟态弧菌菌液 OD_{600} 值为 1.0; 采用饱和硫酸铵法^[14]提取拟态弧菌 ECPs, 并采用 PBS 定容至 1 mL, 通过 BCA 蛋白浓度检测试剂盒测量其蛋白质质量浓度。

1.4.2 对 ECPs 酶活性的影响

采用琼脂扩散法^[14]检测 ECPs 的酪蛋白酶、卵磷脂酶和明胶酶活性。ECPs 质量浓度为 0.25 mg/mL, 加样量为 30 μL ; 28 $^{\circ}\text{C}$ 正置培养 24 h 后分别测量平板透明圈直径。

1.4.3 对 ECPs 溶血性的影响

采用微量板法检测溶血性^[14]。将 ECPs 质量浓度调至 1.0 mg/mL 后连续稀释 2 倍, 每孔加入等量 1% 小鼠红细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育过夜, 以 50% 以上的红细胞被溶解作为判定标准测定溶血效价 (即使 50% 红细胞溶解的样品最高稀释度)。

1.4.4 对 ECPs 细胞毒性的影响

参考 DHARANEEDHARAN 等^[15]的方法, 用 M199 培养基 (含 L 丙氨酸-L-谷氨酸) 将 ECPs 质

量浓度调整至 1.0 mg/mL 后, 加入铺满鲤上皮瘤细胞 (epithelioma papulosum cyprini, EPC) 的细胞瓶, 以 M199 培养基为阴性对照, 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中静置过夜, 采用 CCK-8 试剂盒检测细胞活性。

1.4.5 对 ECPs 毒力的影响

将斑马鱼 120 尾随机分为 6 组, 每组 20 尾。试验组分别注射不同 pH 条件下培养的拟态弧菌 ECPs (1.0 mg/mL), 每尾腹腔注射 50 μL ; 对照组腹腔注射等量无菌 PBS。每隔 12 h 观察 1 次, 试验期 7 d。

1.5 pH 对拟态弧菌转录水平的影响

根据感染相关表型与胞外产物特性的研究结果, 选择毒力较强 (pH 7.0) 与毒力较弱 (pH 8.5) 条件下培养的拟态弧菌进行转录组分析。细菌在 28 $^{\circ}\text{C}$ 、130 r/min 培养 18 h 后将 OD_{600} 值调为 1.0, 取 50 mL 提取总 RNA 后送至上海美吉生物科技有限公司进行转录组测序, 提取方法参考 JIA 等^[16], 每个处理设置 3 个生物学重复。使用 Bowtie2 将读码映射到 *V. mimicus* SCCF01 (登录号: CP016383.1) 的参考基因组, 差异基因筛选标准为 $P < 0.05$, $\log_2\text{FC} \geq 2$ 。采用 fasta 软件进行数据质控, 采用 DESeq2 进行基因间差异表达分析, 所有分析均使用上海美吉生物科技有限公司的 I-Sanger 云平台 (www.i-sanger.com) 进行。

1.6 数据统计与分析

所有数据使用 Excel 与 GraphPad Prism 进行统计与处理。

2 结果与分析

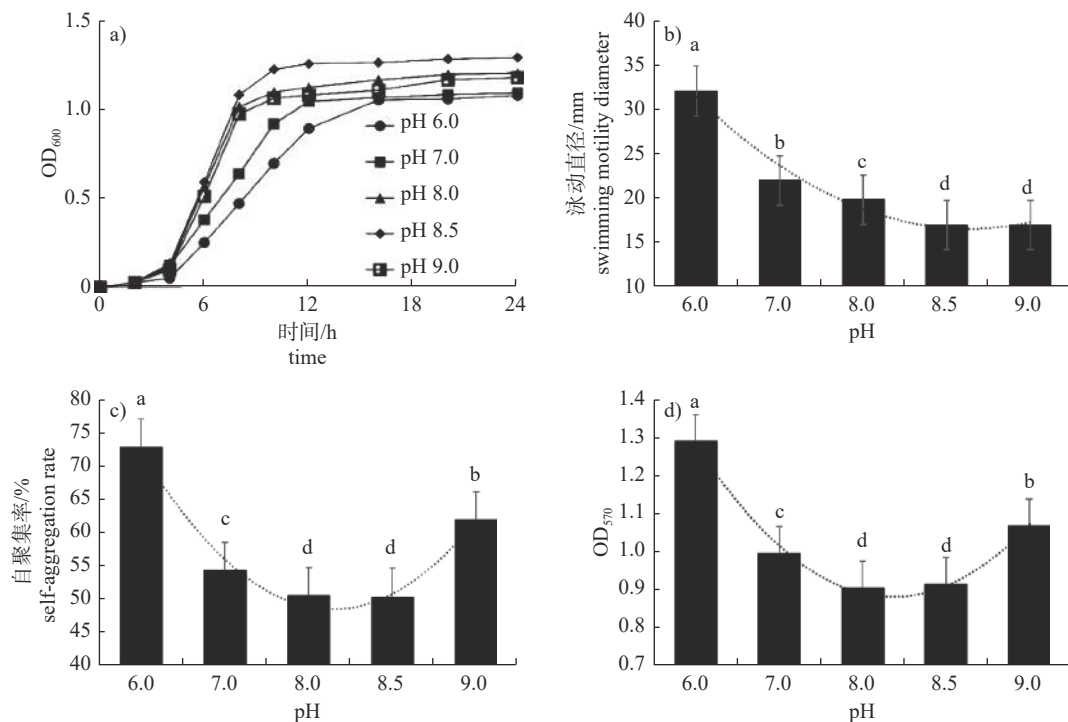
2.1 pH 对拟态弧菌感染相关表型的影响

由图 1 可知: 随着 pH 的升高, 拟态弧菌的增殖先增强后减弱, 泳动呈减弱趋势, 而自聚集和生物膜形成呈先减弱后增强的趋势。环境 pH 6.0 时, 拟态弧菌在增殖 12 h 后进入平台期, pH 7.0 时增殖 10 h 进入平台期, pH 8.0~9.0 均在约 8 h 进入平台期, pH 8.5 时增殖速度最快; pH 6.0 时拟态弧菌的泳动、自聚集和生物膜形成均显著强于其他 pH ($P < 0.05$), pH 8.5 时最弱。

2.2 pH 对拟态弧菌 ECPs 特性的影响

2.2.1 对 ECPs 蛋白质质量浓度的影响

由表 1 可知: pH 6.0 时 ECPs 蛋白质质量浓度



注: a) 增殖, b) 泳动性, c) 自聚集, d) 生物膜形成; 不同小写字母表示组间差异显著 ($P<0.05$), 下同。

Note: a) proliferation, b) swimming motility, c) self-aggregation, d) biofilm formation; different lowercase letters indicate significant differences among groups ($P<0.05$), the same as below.

图 1 不同 pH 培养后拟态弧菌的感染特性

Fig. 1 Infection characteristics of *Vibrio mimicus* after cultured in different pH

表 1 不同 pH 培养拟态弧菌后提取的 ECPs 质量浓度

Tab. 1 Mass concentration of extracellular products of *Vibrio mimicus* in different pH cultures

pH	$c/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$
6.0	3.11 ± 0.11 a
7.0	2.82 ± 0.10 a
8.0	2.52 ± 0.15 a
8.5	1.82 ± 0.13 b
9.0	1.72 ± 0.12 b

注: 不同小写字母表示组间差异显著 ($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letters indicate significant differences among groups ($P<0.05$).

最高, pH 7.0 时 ECPs 蛋白质量浓度次之, pH 9.0 时提取的 ECPs 蛋白质量浓度最低。

2.2.2 对 ECPs 酶活性、溶血性和细胞毒性的影响

由图 2 可知: 随着 pH 的升高, ECPs 酶活性和溶血性呈波动变化, 但细胞毒性呈现逐渐减弱的趋势。pH 6.0 时, ECPs 酶活性强于其他 pH 处理, 但溶血性较弱, 效价为 1:16; pH 7.0 时, ECPs 酶活性仅次于 pH 6.0 处理, 卵磷脂酶活性与 pH 6.0 时无显著差异, 溶血效价为 1:32; pH 8.0 时, ECPs 酶活性最弱, 但溶血性最强,

效价为 1:256; pH 8.5 时溶血性最弱, 溶血效价为 1:8; pH 9.0 时, 明胶酶活性最弱, 溶血效价为 1:16。各 pH 条件下培养拟态弧菌的 ECPs 对 EPC 都具有明显的细胞毒性, 与 M199 组的 OD_{450} 值相比差异显著 ($P<0.05$), 且随 pH 的升高 OD_{450} 值增大, ECPs 细胞毒性逐渐减弱。

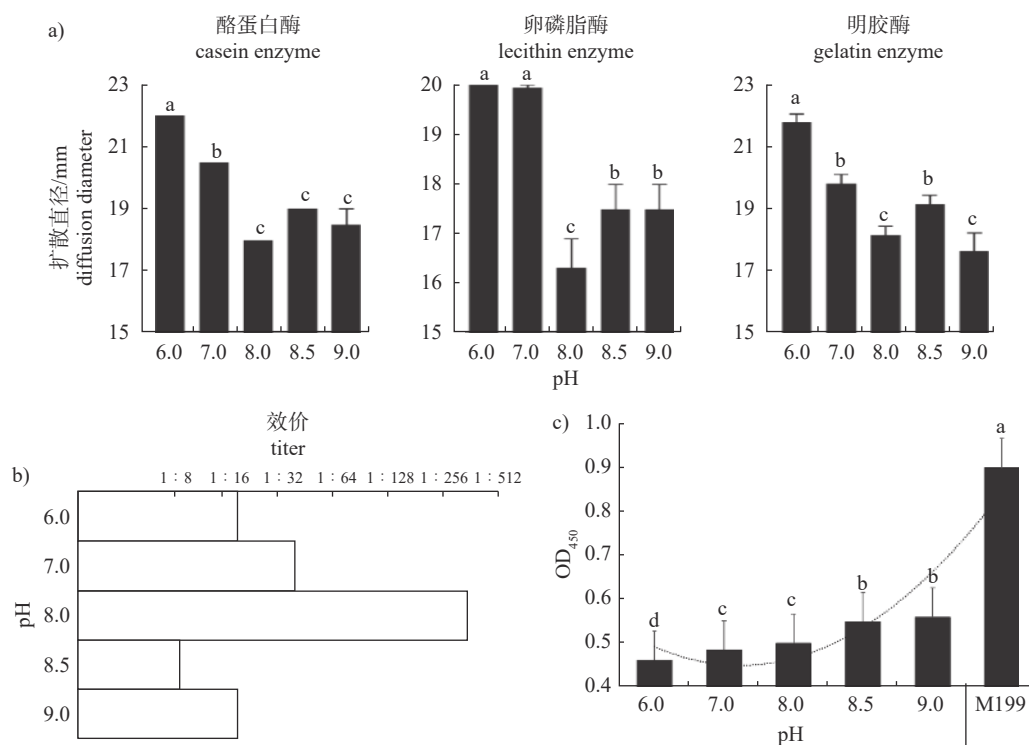
2.2.3 对 ECPs 毒力的影响

由图 3 可知: pH 对拟态弧菌 ECPs 的毒力具有明显的影响, pH 6.0 与 pH 7.0 ECPs 攻毒斑马鱼后 6 h 开始死亡, 死亡鱼均表现为胸鳍基部、腹部出血, 肛门红肿, 攻毒后 12 h 死亡率为 100%; pH 8.5 ECPs 攻毒后 8 h 开始死亡, 12 h 后停止死亡, 试验结束时死亡率为 30%; pH 8.0 与 pH 9.0 ECPs 攻毒 12 h 后开始死亡, 试验结束时死亡率为 50%。

2.3 pH 对拟态弧菌转录水平的影响

2.3.1 转录组原始数据质控评估

vm7-1、vm7-2、vm7-3、vm8.5-1、vm8.5-2 和 vm8.5-3 转录组数据的测序产量如表 2 所示, 其碱基数均大于 2 G。Q20 均大于 98%, 表明本试验测序数据质量合格, 可以进一步对基因表达情

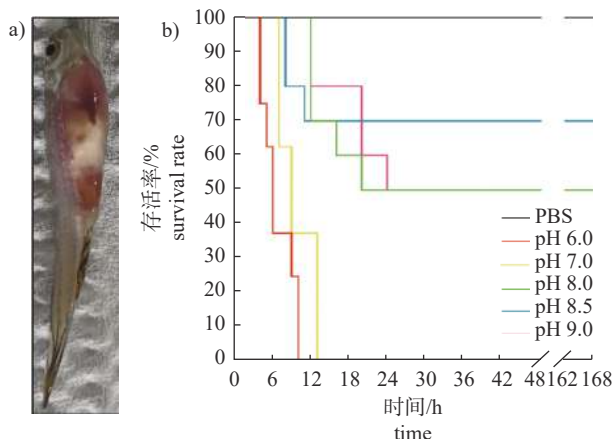


注: a) 酶活性; b) 溶血性; c) 细胞毒性。

Note: a) enzyme activity; b) hemolytic; c) cytotoxicity.

图 2 ECPs 酶活性、溶血性与细胞毒性

Fig. 2 *In vitro* enzymatic activity, hemolytic and cytotoxicity of ECPs



注: a) 攻毒后斑马鱼症状; b) 斑马鱼生存曲线。

Note: a) symptoms of zebrafish after challenge; b) zebrafish survival curve.

图 3 ECPs 对斑马鱼的致病性

Fig. 3 Pathogenicity of extracellular products to zebrafish

况进行定量分析。

2.3.2 差异表达基因统计与 KEGG 富集分析

分析结果显示: pH 8.5 与 pH 7.0 培养的拟态弧菌转录结果相比, 共有 47 个基因表达有显著性差异 (图 4a), 其中包括 16 个上调基因和 31 个

下调基因 (图 4b)。根据差异基因的 KO 编号将基因分别注释到 KEGG 通路, 结果 (图 4c) 显示: 差异基因主要富集于碳水化合物代谢、核苷酸代谢、膜转运和翻译等过程。

2.3.3 基因表达量差异分析

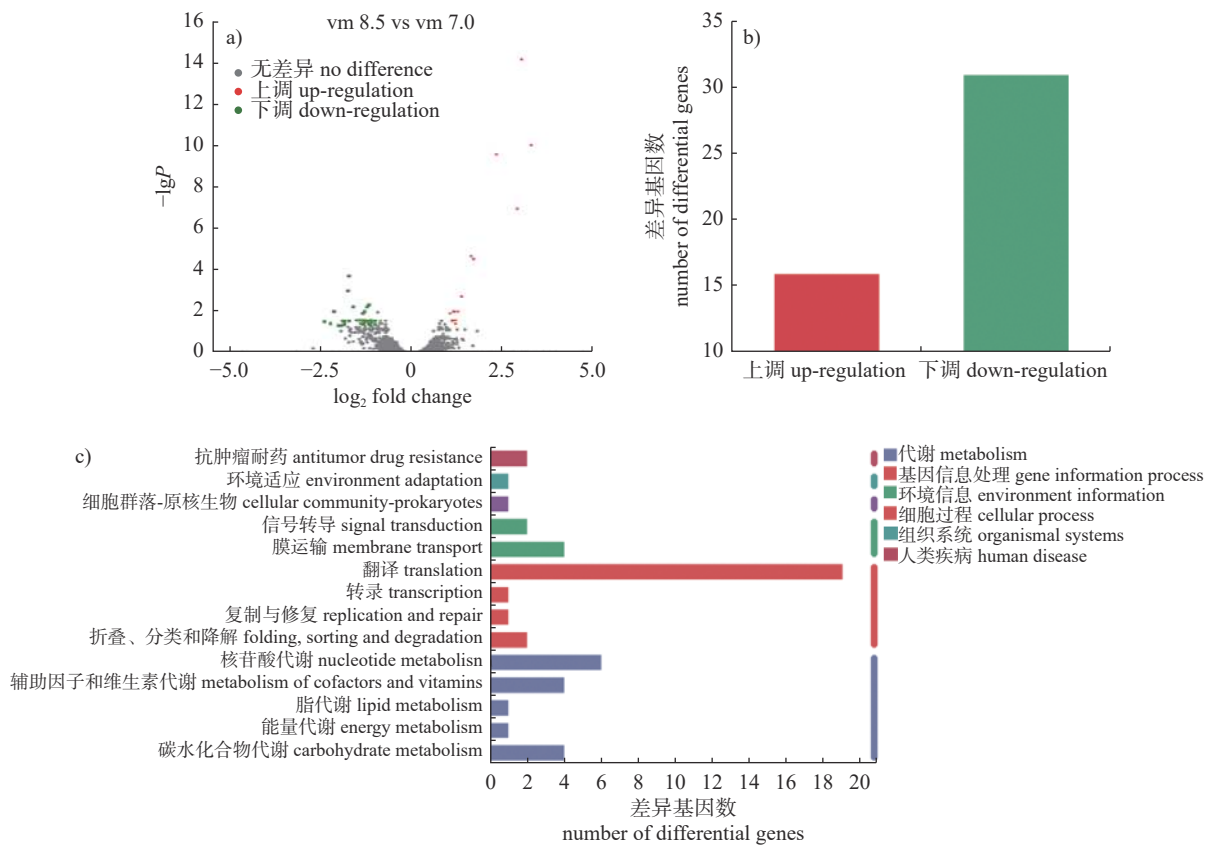
分析差异基因表达显示: 与 pH 7.0 处理相比, 拟态弧菌 pH 8.5 处理后部分基因表达上调, 但更多的基因表达显著下调 (图 5a)。pH 8.5 时, 拟态弧菌参与碳水化合物代谢和能量代谢过程中的糖酵解和氧化磷酸化相关基因 (3-磷酸甘油脱氢酶 *vm16550* 和 *pdhR* 等) 以及参与转运调控的 DeoR 家族蛋白和铜离子转运蛋白等基因表达显著上调 ($P < 0.05$) (图 5b~f); 而参与核苷酸代谢和辅助因子与维生素代谢的腺苷酸激酶 *vm10210*、磷酸核糖基甘氨酸酰胺甲酰基转移酶 *vm03760* 以及参与翻译和转运过程的核糖体装配基因 *rspN*、外膜蛋白 *ompW* 和前蛋白转位酶亚基 *secY* 等基因表达显著下调 ($P < 0.05$) (图 5g~j)。

3 讨论

环境变化影响微生物的数量与分布, 研究表

表 2 pH 7.0 和 pH 8.5 处理拟态弧菌转录组测序数据质量评估
Tab. 2 Quality assessment of *V. mimicus* transcriptome sequencing data at pH 7.0 and pH 8.5

样品 sample	mRNA长度/bp length of mRNA	原始数据质量评估/% quality assessment of raw data		测序产量/bp clean reads	待分析碱基数 clean bases
		Q20	Q30		
vm7-1	124.6	98.77	96.26	27 165 408	3 385 676 131
vm7-2	123.5	98.88	96.55	26 983 066	3 332 774 405
vm7-3	125.0	98.61	95.85	27 141 086	3 391 786 776
vm8.5-1	117.5	98.90	96.58	28 449 398	3 343 764 073
vm8.5-2	118.8	98.82	96.37	28 241 014	3 354 626 322
vm8.5-3	121.3	98.76	96.26	27 863 870	3 378 879 868

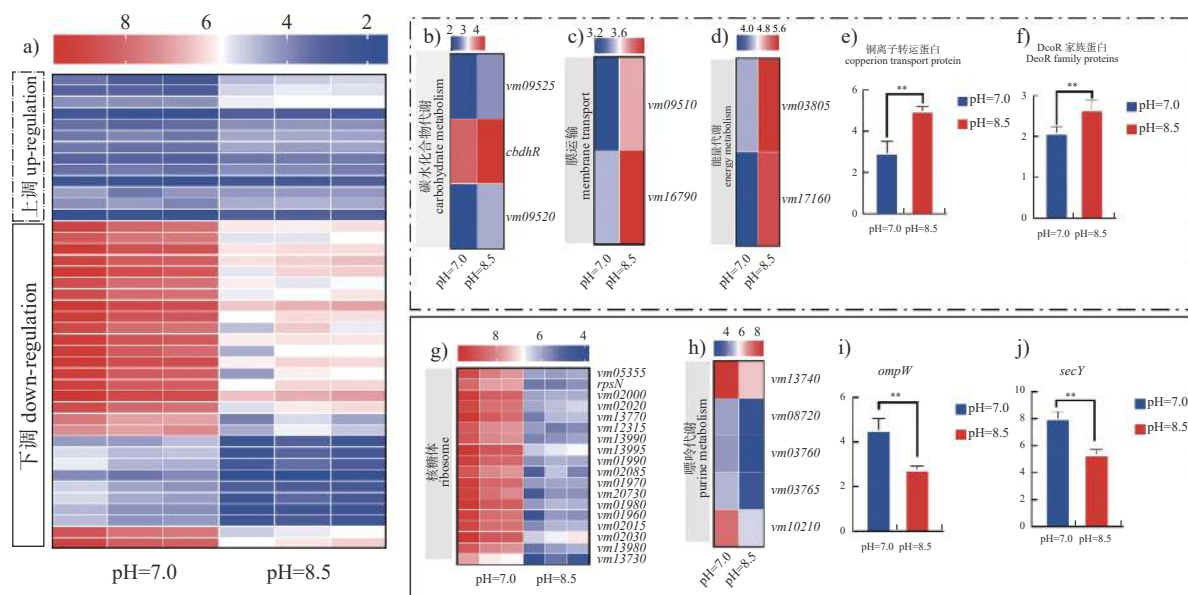


注：a) 差异基因火山图；b) 差异基因柱形图；c) 差异基因富集 KEGG 代谢通路。
Note: a) differential gene volcano plot; b) differential gene bar chart; c) differential gene enrichment KEGG metabolic pathway.

图 4 差异基因富集分析
Fig. 4 Enrichment analysis of differential gene

明：创伤弧菌、副溶血弧菌和霍乱弧菌等致病性弧菌的数量与生存环境变化密切相关，低温、低盐和低磷酸盐环境中的弧菌丰度较低、数量较少；水温在 20 ℃ 以上、环境中离子强度、盐度和酸碱度适宜的环境中弧菌种类丰富^[17]。不同弧菌最适生长 pH 不同，霍乱弧菌为 pH 7.1，而副溶血弧菌为 pH 8.0^[18]，本研究 pH 在 6.0~8.5 范围内，随着 pH 升高，拟态弧菌增殖力逐渐上升，

pH 8.5 时增殖力最强。一般认为细菌致病性取决于细菌的入侵数量与毒力，虽然本研究未开展 pH 对拟态弧菌黏附和入侵力影响的测定，但发现在 pH 8.0~8.5 条件下，拟态弧菌的 ECPs 蛋白质量浓度、酶活性及其对斑马鱼的毒力相对较低。ECPs 是细菌重要的毒力因子，其中的多糖等物质可帮助病原黏附在宿主表面，蛋白酶等破坏组织和器官等完整性，从而协助病原吸附和入



注: a) 显著差异基因整体表达情况; b)~f) 显著上调基因; g)~j) 显著下调基因。***表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

Note: a) the overall expression of significantly different genes; b)~f) significantly up-regulated genes; g)~j) significantly down-regulated gene; *** indicates extremely significant difference ($P < 0.01$).

图 5 差异基因表达量分析

Fig. 5 Analysis of differential gene expression levels

侵,并在宿主体内繁殖、免疫逃避和扩散^[19]。本研究表明:不同 pH 条件下,拟态弧菌产生 ECPs 特性具有明显差异,尤其是 pH 8.5 时其毒力最弱,这可以作为养殖生产中开展水质 pH 调控抵御拟态弧菌感染的参考。

生物膜也称为生物被膜,其形成与细菌运动、自聚集和胞外产物分泌等特性有关^[20]。本研究中,随着 pH 升高,拟态弧菌的运动性、自聚集、ECPs 分泌和生物膜形成减弱。生物膜形成既可帮助细菌抵抗不利环境,也可协助细菌免疫逃避造成病原的持续感染,病原可经生物膜定植于宿主后躲避免疫系统识别^[21]。研究表明:环境因子如温度、pH 和离子强度等影响细菌生物被膜的形成^[22],极端的酸性与碱性环境中形成的生物膜对环境胁迫有更强的抵抗力^[23]。本研究中,pH 6.0~8.5 时生物膜形成能力随 pH 升高而减弱,pH 6.0 时该能力最强,此时其 ECPs 分泌量、泳动和自聚集均最强,表明拟态弧菌的感染特性随 pH 的升高而降低。

代谢是机体产生能量的重要途径,ATP 与 ADP 为其关键底物,且 ADP 对 ATP 呈负反馈调节^[24]。能量代谢对细菌 DNA 合成与生长具有重要意义,其代谢中间产物能够调节 DNA 复制的启动^[25]。pH 8.5 时,拟态弧菌 3-磷酸甘油脱氢酶

vm16550 和 *pdhR* 等参与糖酵解的基因表达显著上调,细菌增殖较快,而参与 ADP 合成的腺苷酸激酶 *vm10210* 和磷酸核糖基甘氨酸酰胺基转移酶 *vm03760* 等基因表达下调,可能是 ADP 负反馈调节发挥了作用,但具体原因还需进一步研究。pH 8.5 时,拟态弧菌生物膜形成、胞外蛋白酶分泌和 ECPs 毒力减弱,此时参与多肽翻译的核糖体亚基 30S 与 50S 基因以及参与物质跨膜运输的 *secY* 和 *ompW* 基因表达下调。细菌核糖体亚基 30S 和 50S 协作参与多肽链的翻译过程^[26]; *secY* 蛋白协助蛋白质穿过内膜参与其分泌过程^[27],外膜蛋白 *ompW* 参与疏水性小分子和铁的转运以及细菌对环境的应激调节^[28]。pH 8.5 时,拟态弧菌感染相关表型、ECPs 蛋白质质量浓度及其酶活性等特性减弱可能与相关基因表达下调有关。

4 结论

pH 对拟态弧菌感染相关表型及 ECPs 特性具有明显影响,pH 8.0~8.5 条件下其感染与致病相关特性处于较低水平;pH 可能是通过调节拟态弧菌能量代谢与膜运输等过程影响相关生物学特性。

【参考文献】

[1] 陆春云,习丙文,叶诗尧,等. 多个环境因素对嗜水气单

- 胞菌感染团头鲂致病力的影响[J]. 生态学杂志, 2015, 34(7): 2025. DOI: [10.13292/j.1000-4890.20150612.004](https://doi.org/10.13292/j.1000-4890.20150612.004).
- [2] 臧学磊. 三种环境因子胁迫下罗非鱼(*GIFT Oreochromis niloticus*)机体免疫力的变化及其对海豚链球菌易感性的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2010.
- [3] GUINEY D G. Regulation of bacterial virulence gene expression by the host environment[J]. The Journal of Clinical Investigation, 1997, 99(4): 565. DOI: [10.1172/JCI119196](https://doi.org/10.1172/JCI119196).
- [4] HUANG L X, LIU W J, JIANG Q L, et al. Integration of transcriptomic and proteomic approaches reveals the temperature-dependent virulence of *Pseudomonas plecoglossicida*[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2018, 8: 207. DOI: [10.3389/fcimb.2018.00207](https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00207).
- [5] 胡靖, 李爱华, 胡成钰, 等. 温度和pH值对嗜水气单胞菌毒力基因表达的影响[J]. 南京理工大学学报(自然科学版), 2006, 30(3): 375. DOI: [10.3969/j.issn.1005-9830.2006.03.030](https://doi.org/10.3969/j.issn.1005-9830.2006.03.030).
- [6] 潘吉脉, 吴良涛, 杨霞, 等. 温度、pH、盐度和碳氮源对嗜水气单胞菌GZ1株生长的影响[J]. 水产学杂志, 2019, 32(4): 63. DOI: [10.3969/j.issn.1005-3832.2019.04.010](https://doi.org/10.3969/j.issn.1005-3832.2019.04.010).
- [7] 毛秀秀, 覃映雪, 邹文政, 等. 致病性嗜水气单胞菌生物膜的形成特性[J]. 中国水产科学, 2011, 18(2): 371. DOI: [10.3724/SP.J.1118.2011.00371](https://doi.org/10.3724/SP.J.1118.2011.00371).
- [8] 储卫华, 陆承平. 培养条件对嗜水气单胞菌胞外蛋白酶合成与分泌的影响[J]. 南京农业大学学报, 2001, 24(3): 65. DOI: [10.3321/j.issn:1000-2030.2001.03.016](https://doi.org/10.3321/j.issn:1000-2030.2001.03.016).
- [9] GENG Y, LIU D, HAN S, et al. Outbreaks of vibriosis associated with *Vibrio mimicus* in freshwater catfish in China[J]. Aquaculture, 2014, 433: 82. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2014.05.053](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.053).
- [10] YU Z H, GENG Y, WANG K Y, et al. Complete genome sequence of *Vibrio mimicus* strain SCCF01 with potential application in fish vaccine development[J]. Virulence, 2017, 8(6): 1028. DOI: [10.1080/21505594.2016.1250996](https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1250996).
- [11] 邓梦玲, 韩帅, 耿毅, 等. 南方鲇拟态弧菌的分离、鉴定及其感染的病理损伤[J]. 中国兽医学报, 2015, 35(3): 394.
- [12] 张家宝, 马轲, 刘真真, 等. 鸡源卷曲乳杆菌Y68的分离鉴定及其体外益生特性评估[J]. 动物营养学报, 2022, 34(5): 3339. DOI: [10.3969/j.issn.1006-267x.2022.05.059](https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-267x.2022.05.059).
- [13] LUO G, HUANG L X, SU Y Q, et al. *fliA*, *fliB* and *fliC* regulate adhesion by controlling the expression of critical virulence genes in *Vibrio alginolyticus*[J]. Emerging Microbes & Infections, 2016, 5(8): e85. DOI: [10.1038/emi.2016.82](https://doi.org/10.1038/emi.2016.82).
- [14] 李玉英. 蟹源拟态弧菌外毒素的生物学特性研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2003.
- [15] DHARANEEDHARAN S, HARIKRISHNAN R, BALASUNDARAM C, et al. *In vitro* antioxidant and antimicrobial activity of *Rubus coreanus* ethanolic extract, a potent biotherapeutic component for aquaculture[J]. The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgheh, 2013, 65(1): 1. DOI: [10.1071/MF12245](https://doi.org/10.1071/MF12245).
- [16] JIA S, LI T, ZHANG X X. Integrated metagenomic and metatranscriptomic analyses of ultraviolet disinfection effects on antibiotic resistance genes and bacterial communities during wastewater treatment[J]. Ecotoxicology, 2021, 30(8): 1610. DOI: [10.1007/s10646-020-02313-1](https://doi.org/10.1007/s10646-020-02313-1).
- [17] EILER A, JOHANSSON M, BERTILSSON S. Environmental influences on *Vibrio* populations in northern temperate and boreal coastal waters (Baltic and Skagerrak Seas)[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(9): 6004. DOI: [10.1128/AEM.00917-06](https://doi.org/10.1128/AEM.00917-06).
- [18] 胡兴娟, 沈飏, 张文斌. pH值及盐度对副溶血弧菌与霍乱弧菌生长影响的研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(22): 4855.
- [19] 牟海津, 刘志鸿. 水产动物病原菌致病性胞外产物的研究进展[J]. 中国水产科学, 2000, 7(2): 93. DOI: [10.3321/j.issn:1005-8737.2000.02.021](https://doi.org/10.3321/j.issn:1005-8737.2000.02.021).
- [20] LIMOLI D H, JONES C J, WOZNAK D J. Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function[J]. Microbiology Spectrum, 2015, 3(3): 223. DOI: [10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014).
- [21] 王全民, 马遥, 刘丽钧, 等. 霍乱弧菌生物被膜发育与环境调控[J]. 生物工程学报, 2017, 33(9): 1533. DOI: [10.13345/j.cjb.170052](https://doi.org/10.13345/j.cjb.170052).
- [22] BRYERS J D. Medical biofilms[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2008, 100(1): 1. DOI: [10.1002/bit.21838](https://doi.org/10.1002/bit.21838).
- [23] YIN W, WANG Y T, LIU L, et al. Biofilms: the microbial “protective clothing” in extreme environments[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(14): 3423. DOI: [10.3390/ijms20143423](https://doi.org/10.3390/ijms20143423).
- [24] AXEL M, CHRISTOPH V B. ATP synthesis at physiological nucleotide concentrations[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 3070. DOI: [10.1038/s41598-019-38564-0](https://doi.org/10.1038/s41598-019-38564-0).
- [25] JAMESON K H, WILKINSON A J. Control of initiation of DNA replication in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*[J]. Genes, 2017, 8(1): 22. DOI: [10.3390/genes8010022](https://doi.org/10.3390/genes8010022).
- [26] RAMAKRISHNAN V. Ribosome structure and the mechanism of translation[J]. Cell, 2002, 108(4): 557. DOI: [10.1016/s0092-8674\(02\)00619-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00619-0).
- [27] BHATTACHARYA D, DAS J. The *secY* gene of *V. cholerae*: identification, cloning and characterization[J]. Gene, 1997, 196(1/2): 261. DOI: [10.1016/S0378-1119\(97\)00238-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00238-2).
- [28] XIAO M F, LAI Y, SUN J, et al. Transcriptional regulation of the outer membrane porin gene *ompW* reveals its physiological role during the transition from the aerobic to the anaerobic lifestyle of *Escherichia coli*[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 799. DOI: [10.3389/fmicb.2016.00799](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00799).

责任编辑: 何馨成