

高丝氨酸内酯酶 AI-96 对嗜水气单胞菌 NJ-1 浸浴攻毒斑马鱼保护效应的研究

何凤旭, 张美超, 徐 俐, 杨雅麟, 李 青, 周志刚*

(中国农业科学院饲料研究所,农业部饲料生物技术重点开放实验室,北京 100081)

摘要:为评价斑马鱼口服高丝氨酸内酯酶 AI-96 对嗜水气单胞菌 NJ-1 浸浴攻毒的保护效应,实验设置基础料与实验料两组饲料,实验料是在基础料中按 3 U/g 饲料添加 N 酰基高丝氨酸内酯酶 AI-96(以下简称 AI-96),通过高浓度(2.5×10^8 cfu/mL)及低浓度(0.7×10^8 cfu/mL)两组剂量的嗜水气单胞菌 NJ-1(以下简称 NJ-1)分别浸浴攻毒斑马鱼,在 12 h、24 h、3 d、7 d 和 14 d 取鳃丝、肠道壁、肝和肾样,采用实时荧光定量 PCR 法检测取样器官中 NJ-1 量,并统计攻毒周期内的死亡率,来评价高丝氨酸内酯酶 AI-96 的保护力。结果显示:在攻毒周期内所取组织内均检测到 NJ-1,按菌数肠 > 鳃 > 肝 > 肾,其中高 NJ-1 剂量未加酶组各组织 NJ-1 数量均分别明显高于低剂量处理组。在高剂量攻毒条件下,加酶组各组织 NJ-1 数量均显著低于未加酶处理组($P < 0.05$),鳃除外;在低剂量攻毒条件下,未加酶组的 NJ-1 数量在鳃(3 d)、肠(0.5、1、3、7 及 14 d)、肝(3 d)和肾(7 d)显著高于加酶组($P < 0.05$),其余差异不显著($P > 0.05$)。此外无论在高、低剂量攻毒条件下,加酶组的死亡率均低于未加酶组,其中低剂量攻毒 7 d 及以后其死亡率显著低于对照($P < 0.05$)。结果表明,口服 AI-96 可以有效预防 NJ-1 $\leq 0.7 \times 10^8$ cfu/mL 范围内的侵袭。

关键词: N 酰基高丝氨酸内酯酶;嗜水气单胞菌;浸浴攻毒;实时荧光定量 PCR

中图分类号: S 943

文献标志码: A

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)属革兰氏阴性菌,是我国淡水养殖鱼类爆发性流行病主要病原,给我国水产养殖业带来巨大经济损失^[1-2]。近年来研究表明,该菌的致病性与其所产生的血溶素、气溶素、基质金属蛋白酶、生物膜形成、S 层蛋白、胞外酶等多种毒力因子有关,而这些毒力因子(或部分)受到其分泌信号高丝氨酸内酯 N-丁酰高丝氨酸内酯(C4-HSL)和 N-己酰高丝氨酸内酯(C6-HSL)的调控^[3-5]。

人们已经从一些原核生物和真核生物中鉴定出一些群体感应(以下简称 QS)淬灭酶和抑制剂,研究表明,QS 淬灭酶可以降解细菌 QS 系统的信号分子 AHL,干扰细菌 QS 系统,抑制病原菌毒力基因表达,该类酶主要包括酰基高丝氨酸内

酯酶和酰基高丝氨酸氨基转移酶^[6-8]。陈瑞东等^[9]采用嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila* ATCC7966)与 N-酰基高丝氨酸内酯酶 B546 腹腔注射鲤(*Cyprinus carpio*),可以显著提高存活率,但是由于该酶在室温条件下保存不稳定,且腹腔注射方式很难大规模在水产养殖中实施应用。张美超等^[10]来源于苍白杆菌的 N-酰基高丝氨酸内酯转移酶 AIO6 与嗜水气单胞菌(*A. hydrophila* ATCC7966)共培养,同时监测溶血素、细胞肠毒素、胞外蛋白酶、丝氨酸蛋白酶及磷脂酶 Pho 等 5 个致病因子的表达情况,结果表明在共培养 8 ~ 12 h 时 AIO6 对毒力因子的表达都具有明显的下调作用($P < 0.05$)。Cao 等^[11]研究获得 N-酰基高丝氨酸内酯酶 AI-96,酶学性质研究表明较适

收稿日期:2012-01-16 修回日期:2012-10-18

资助项目:科技部农业科技成果转化资金项目(2010GB23260591);天津市农业科技成果转化与推广项目(201004040);中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室开放基金(2011FB05);北京市鲟鱼、鳊鱼产业技术体系资助

通信作者:周志刚,E-mail:zhou_zg@msn.com

宜于水产养殖环境应用,有效性及剂量效应实验结果表明该酶的添加量为 3.0 ~ 4.0 U/g 饲料。但该研究尚需完善之处包括:(1)攻毒用嗜水气单胞菌浸浴浓度选择单一,缺乏不同浓度间比较,无法反应复杂的生产实践环境;(2)缺乏靶组织病原菌丰度变化数据,产生保护效应的生物学基础不清晰。因此,本研究拟丰富这两处的数据,为 AI-96 水产养殖实践应用提供支撑。

1 材料与方法

1.1 攻毒菌株

嗜水气单胞菌 NJ-1 (NJ-1) 从患病鲫鱼体内分离,由南京农业大学刘永杰老师提供, LB 培养基 28 °C 恒温培养 24 h。

1.2 溶血素部分基因获得及 Q-PCR 引物设计

根据 NCBI 上提交的嗜水气单胞菌溶血素序列,用 MEGA 4.0 软件找到保守区,设计特异性引物,扩增出其保守区序列,将目的基因连接 pEasy T3 载体,挑选出阳性克隆测序,将获得的溶血素基因序列用 Primer Premier 5.0 软件设计 Q-PCR 特异性引物,并通过 NCBI 数据库进行同源比对验证。引物序列由北京擎科新业生物科技有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 引物

Tab.1 The primers for fluorescence quantitative PCR

引物名称 primer name	引物序列 primer sequence
Hemolysin QF	5'CTACCACCACCTCCCTGTCGCAATCC3'
Hemolysin QR	5'TCCAGTCCCACCACTTCACTTCACCC3'

1.3 实验用鱼

实验用斑马鱼 (*Danio rerio*) 购自北京中蔬大森林市场,选取 30 日龄左右的健康斑马鱼 1 000 尾,暂养于中国农业科学院饲料研究所农业部饲料生物技术重点开放实验室水产养殖室内。每天换水 10%,投喂基础饲料 1 次(饱食),暂养 14 d 后开始实验,实验期间水温维持在 25 ~ 28 °C。

1.4 实验饲料

实验设计基础料和实验料。实验料是在基础料里加入来源于芽孢杆菌 AI-96 原核表达纯化的 N 酰基高丝氨酸内酯酶,使其最终酶活为 3 U/g 饲料,酶活测定参考文献 [9] 的方法,饲料配方见表 2。

表 2 基础饲料原料成分及配比
Tab.2 Ingredients, formulaiton for the basal diet

原料 ingredients	组成 component	%
脱脂鱼粉 fish meal		44.60
大豆粕 soybean meal		24.00
面粉 flour		24.00
豆油 soybean oil		2.00
磷酸二氢钙 calcium dihydrogen phosphate		2.20
Vc 磷酸酯 magnesium ascorbyl phosphate		0.10
硅型氯化胆碱 silicon choline chloride		0.30
多矿 ^[12] mineral mix		0.20
多维 ^[12] vitamin mix		0.20
膨润土 bentonite		2.40

1.5 实验设计

实验设计 6 个处理组,分别是 A: 饲喂基础饲料, B: 饲喂含淬灭酶基础料, C: 饲喂基础饲料 + 2.5×10^8 cfu/mL NJ-1 浸浴攻毒, D: 饲喂含淬灭酶基础料 + 2.5×10^8 cfu/mL NJ-1 浸浴攻毒, E: 饲喂基础饲料 + 0.7×10^8 cfu/mL NJ-1 浸浴攻毒, F: 饲喂含淬灭酶基础料 + 0.7×10^8 cfu/mL NJ-1 浸浴攻毒。预实验表明嗜水气单胞菌浸浴攻毒半致死剂量(14 d)为 1.4×10^8 cfu/mL, 为了评估 AI-96 酶保护效应,因此选择 2 倍半致死剂量与 1/2 半致死剂量的 NJ-1, 分别是 2.5×10^8 和 0.7×10^8 cfu/mL。每个处理组 8 个平行,其中每组 5 个平行用于攻毒结果观察,另外 3 个平行用于取样。10 L 实验缸加入经曝气处理的自来水 3 L,放入 20 尾斑马鱼,每隔两天换水并重新加入新培养 NJ-1 菌株。实验鱼每天于 9:00 和 15:00 进行饱食投喂,发现死鱼立即捞出,并记录。

1.6 采样处理

在实验的 0.5、1、3、7、14 d 时,从每个取样缸内取出 2 尾斑马鱼。在无菌条件下剖取鳃丝、肠道壁^[12]、肝、肾组织,将同组组织样等量混合,使用匀浆器研磨充分, -20 °C 保存。

1.7 DNA 提取

DNA 提取方法采用溶菌酶与 CTAB 联用法^[13],其步骤如下:样品中加入 200 μ L 10 mg/mL 溶菌酶,37 °C 保温 1 h,再加 5 μ L 20 mg/mL 蛋白酶 K 混匀,37 °C 保温 1 h;再加入 1 mL CTAB 裂解液(2% CTAB, 1.4 mol/L NaCl, 0.02 mol/L EDTA, 0.1 mol/L Tris-Cl, 0.2% 巯基乙

醇,2% SDS)于 65 ℃ 保温 2 h,每隔 30 分钟轻轻上下摇匀。再加等体积的酚、氯仿、异戊醇(25:24:1),置于 10 000 r/min 离心 5 min,取上清液加 1 倍体积的乙丙醇和 1/10 体积的 NaAc(pH 4.6),于 -20 ℃ 下静置 10 min 后于 12 000 r/min 离心 10 min。将提取的 DNA 采用 Tiangen 普通 DNA 产物纯化试剂盒纯化,1.5% 琼脂糖胶检测 DNA。

1.8 荧光定量 PCR

SYBR GREEN 购于东阳纺,荧光定量 PCR 反应体系为 20 μL,10 μL mastermix,0.5 μmol/L Hemolysin QF,0.5 μmol/L Hemolysin QR,1 μL 模板。实时定量采用两步 PCR 扩增法,95 ℃ 10 s,预变性,95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,循环数 40,反应结束后,对获得的信号和数据进行处理。

标准曲线的制备,将标准品质粒作 10 倍系列稀释。得到 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 copies/μL 系列标准模板。采用引物进行荧光定量 PCR,得到各自的 C_i 值,以 C_i 值为纵坐标,以起始模板浓

度的对数为横坐标,制作标准曲线。

1.9 数据分析

数据用 SPSS 12.0 软件进行方差分析,显著性分析采用单因素方差分析,显著性水平设 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 溶血素部分基因获得及 Q-PCR 引物设计

以嗜水气单胞菌 NJ-1 基因组 DNA 为模板顺利获得 NJ-1 溶血素部分基因序列(图 1),测序结果表明其为嗜水气单胞菌的溶血素基因,与已报的嗜水气单胞菌 ATCC7966 同源性为 97%,通过 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计,设计结果见表 2。验证结果表明,A、B 两个对照组在 35 个循环以后才出现目的条带,NJ-1 攻毒在 30 个循环内就可被检测,另基线选择点 32 个循环阈值,因此 A、B 组的结果未能体现,同时证明嗜水气单胞菌在正常鱼体内含量很低(图 2,图 3)。

```
GGGCAGTGGCAAATAAGCGGTCTGGCCAACGGCTGGGTAATAATGGGGCCGGGTATAATGGTGA
AATAAAACCGGGCTCGGCGTCCAATACCTGGTGTACCCGATCAATCCTGTTACCGGAGAAATAC
CAACCTTGTCAGCTCTGGATATCCAGACGGTGACGAAGTGGACGTGCAGTGGCGACTGGTACAC
GACAGCGGAATTTTATCAAGCCAACCAGCTATCTGGCGCATTATCTCGTTATGCCTGGGTGGGT
GGCAATCACAGCCAATATGTCGGTGAAGACATGGACGTGACCCGTGATGGCGATGGCTGGGTGAT
CCGTGGCAACAATGACGGCGGTTGCGAGGGGTATCGTTGTGGCGAGAAGACGGCCATCAAGGTCA
GCAATTTTTCGTACAACCTGGACCCTGACAGCTTCAAACATGGTGATGTGACCCAGTCTGATCGCC
AGTGGTCAAGACGGTGGTGGGCTGGGCGATCAACGACAGCGACACCCCGCAATCCGGCTATGAT
GTCACCCTGCGTTACGATACCGCCACCAACTGGTCCAAGACCAATACCTATGGCCTGAGCGAGAA
GGTGACCACCAAGAACAAGTTCAAAGTGGCCACTGGTAGGGGAAACCGAACTCTCCATCGAGATTG
CGGCCAACCAAGTCCCTGGGCTCCCGAAGCGGGGAGCTACCACCACCTCCCTGTCGCAATCCGTG
CGGCCGACGGTGCCGGCCCGCTCCAAGATCCCGGTGAAGATCGAGCTCTACAAGGCTGACATCTC
CTATCCCTATGAATCAAAGCCGATGTCAGCTATGACCTGACCCTGAGCGGCTTCTGCGCTGGGG
CGGCAATGCCTGGTATACCCATCCGACAACCGCCGAACTGGAACCACACCTTCGTCATCGGGC
CGTACAAGGACAAGGCGAGCAGCATTCGTTACCAAGTGGGACAAGCGCTATATCCCGGGTG AAGTG
AAGTGGTGGGACTGGAAGTGGACCATAACAGCAGAACGGCCTGTCTACCATGCAGAACAATCTGGC
CAGAGTGCTGCGCCCGGTGCGGGCGGGGATCACCGCGATTTTCAGTGCCGAGAGCCAGTTTGCCG
GCAACATCGAGATCGGTGCTCCGGTCCGCTCGCGGCAGACAGCAAGG
```

图 1 嗜水气单胞菌 NJ-1 溶血素部分基因测序结果

Fig. 1 Partial sequence result of *A. hydrophila* NJ-1 hemolysin

2.2 组织样病原菌丰度检测

实时荧光定量 PCR 测定斑马鱼经浸浴攻毒

14 d 内鳃、肠、肾、肝组织中 NJ-1 菌数见图 2。结果表明,各组织内 NJ-1 丰度随着取样时间发生变

化,总趋势肠 > 鳃 > 肝 > 肾,其中高剂量攻毒未加酶组组织样检测到的病原菌 NJ-1 丰度高于低剂量处理组。

在高剂量攻毒条件下,鳃 NJ-1 丰度处于 $10^3 \sim 10^4$,在 0.5 和 1 d 时加酶组 NJ-1 丰度明显低于未加酶组 ($P < 0.05$),3 和 14 d 时无明显差异 ($P > 0.05$),而 7 d 时加酶组却显著高于未加酶组 ($P < 0.05$);肠未加酶组 NJ-1 丰度均明显高于加酶组 ($P < 0.05$),未加酶组 NJ-1 丰度随着取样周期呈下降趋势,而加酶组 NJ-1 丰度基本维持不变;肝 NJ-1 趋势更明显,随取样周期未加酶组 NJ-1 丰度呈显著下降趋势,且未加酶组 NJ-1 丰度均显著高于加酶组 ($P < 0.05$);肾不加酶组 NJ-1 丰度均高于加酶组 ($P < 0.05$),且 7 d 加酶组与不加酶处理的 NJ-1 丰度均显著高于其它取样时间点 ($P < 0.05$) (图 2)。

在低剂量攻毒条件下,鳃 NJ-1 丰度在 10^3 左右,未加酶组在 0 ~ 1 d 时呈上升现象,而后呈缓慢下降趋势,0.5、1 和 7 d 时加酶组 NJ-1 丰度显著低于未加酶组 ($P < 0.05$);肠 NJ-1 丰度为 $10^3 \sim 10^5$,取样周期内不加酶组 NJ-1 丰度均显著高于加酶组 ($P < 0.05$),其中未加酶组在 1 和 3 d 时缓慢下降,7 d 时显著上升 ($P < 0.05$),而 14 d 时又恢复到攻毒后初始水平;肝 NJ-1 丰度无论加酶与否均维持于 10^2 水平,除 3 d 时未加酶显著上升外 ($P < 0.05$),其余时间点均无显著差异 ($P > 0.05$);肾 NJ-1 丰度在 0.5 ~ 3 d 时呈缓慢下降趋势 ($P > 0.05$),7 d 时加酶与不加酶组 NJ-1 呈显著上升趋势 ($P > 0.05$),而 14 d 时恢复到 3 d 水平,整个攻毒周期内加酶组 NJ-1 丰度均显著低于未加酶组 ($P < 0.05$) (图 2)。

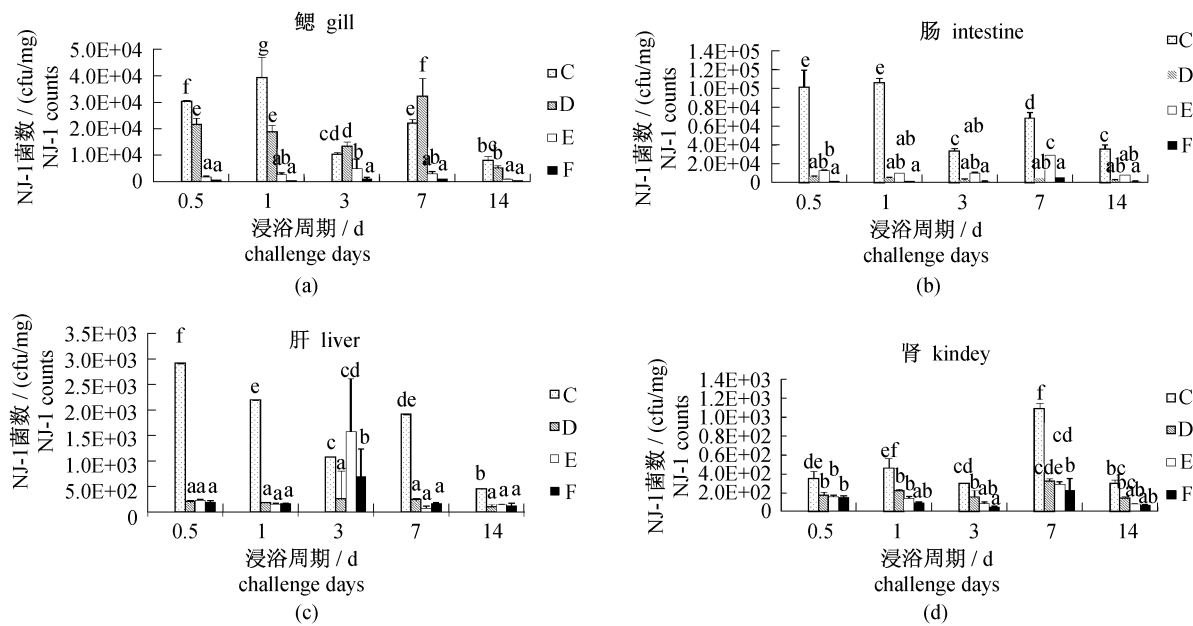


图 2 NJ-1 浸浴攻毒斑马鱼实时荧光定量 PCR 检测各组织嗜水气单胞菌丰度
肩标不同字母的表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 2 The quantitative results of *A. hydrophila* by quantitative real-time PCR in zebrafish organs after bath challenge

A different letter above the columns with a figure means significant difference existed ($P < 0.05$).

2.3 浸浴攻毒死亡统计

通过 NJ-1 浸浴攻毒评价淬灭酶对斑马鱼的保护效率,A、B 组在实验过程中均无死亡现象出现,表明淬灭酶 AI-96 对鱼体无毒性(图 3)。在 NJ-1 攻毒后的 2 ~ 5 d 时间内攻毒处理组的死亡率呈急剧上升趋势,在 6 ~ 9 d 时间段内死亡情况

有所趋缓,至 10 d 后趋于稳定。低剂量攻毒各组中,饲喂酶的斑马鱼(F 组)死亡率与对照饲料 E 组相比在 7 d 后的死亡率呈显著性下降 ($P < 0.05$);高剂量攻毒各组,D 组死亡率略低于 C 组 ($P > 0.05$)。

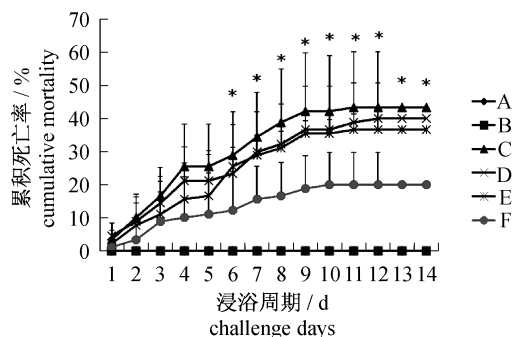


图3 斑马鱼各处理组浸浴攻毒累积死亡率

* 表示 E 与 F 处理组在取样点内差异显著。

Fig. 3 The cumulative mortality rate of zebrafish by bath challenge

* mean the significantly differences are exist between E and F group at the sampled point.

3 讨论

本研究通过嗜水气单胞菌的毒力因子血溶素基因作为待检靶基因成功实现了鱼体各组织嗜水气单胞菌的定量,具有检测快、敏感性高、特异性强等优点,最小检出率达到 100 cfu/mL 水平。这一方法早前已应用于不同环境样的定性或定量检测,显现对于常规细菌培养分离技术的明显优势^[1,14-15],因此该方法的实施为快速准确定量分析不同环境中嗜水气单胞菌的丰度提供了保障。

研究表明,水产动物的体表、鳃及肠道是病原菌的首要入侵部位,然后再进入肝脏、脾脏、肾脏或皮下等各组织器官,最终实现感染致死^[16-19]。本研究中通实时荧光定量 PCR 在斑马鱼各组织器官中均检测到受试病原菌,其总丰度趋势肠 > 鳃 > 肝 > 肾,显示肠道是嗜水气单胞菌在斑马鱼中的主要侵染部位。鳃感染嗜水气单胞菌在 6、24 和 48 h 取肠道样,通过免疫组织化学定位法发现在 48 h 内随着感染时间变化其肠道组织中嗜水气单胞菌数量呈现上升趋势^[17],本研究中高剂量攻毒条件下在感染的 24 h 内亦发现类似结果。研究表明嗜水气单胞菌的病灶主要在肝、肾两器官,而对肠的影响较小^[20-23],这与本实验结果相符合:攻毒初期虽然肠道内检测出大量嗜水气单胞菌,而其死亡率却维持在较低水平。

近些年,以降解革兰氏阴性菌群体感应信号分子(AHL)来防治水产细菌性病原菌的新策略受到广泛关注。含信号分子降解和产多聚 β 羟

基丁酸的细菌可以有效保护丰年虾对抗 *Vibrio harveyi* 感染^[24];饲料中添加 N 酰基高丝氨酸内酯降解富集物(ECs)可以有效地提高沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)的存活率而对其生长无影响^[25];通过腹腔注射淬灭酶与嗜水气单胞菌后显著降低斑马鱼的死亡率^[9]。本研究结果也证实淬灭酶 AI-96 可以有效地降低由病原菌 NJ-1 感染斑马鱼引起的死亡率。上述研究却缺少淬灭酶阻断病原菌入侵各组织器官的丰度变化数据,本研究为国际上首次报道。本研究数据表明,口服淬灭酶 AI-96 后斑马鱼各组织内病原菌丰度均显著低于对照,鳃与肠道表现最为突出。鳃和肠道作为物理性防御的第一道屏障,极易受到病原菌的入侵,养殖条件下检测出的病原菌数量高于其它器官组织^[26]。有研究表明信号分子 AHL 可调控病原菌生物膜的形成、迁移能力及相关毒力因子的表达^[27-28],淬灭酶 AI-96 降解信号分子 AHL 后影响 NJ-1 所调控的相关因子的表达,影响其在宿主内的生存、繁殖和入侵能力,最终体现宿主免疫保护率提升。本研究高剂量攻毒,虽然 AI-96 可以显著降低肠道病原菌 NJ-1 的丰度,但却未表现显著免疫保护率改善,推测原因是短时间内病原菌数量过高,而淬灭酶 AI-96 瞬时效应有限,导致一部分病原菌成功侵染宿主体内,并逐步蓄积,最终导致死亡。因此,高比活淬灭酶的研制或最适添加量,以及受阻断的病原菌细菌是否会诱导宿主产生特异性免疫将会是下一步研究的重点。

参考文献:

- [1] 高建忠. 嗜水气单胞菌的检测方法比较[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(31): 13555 - 13556.
- [2] 吴宗福, 龚晖, 陈红燕, 等. 嗜水气单胞菌重组 β-hemA-ISCMS 对鳃的浸泡免疫效果[J]. 水产学报, 2007, 31(3): 374 - 379.
- [3] Swift S, Lynch M J, Fish L, et al. Quorum sensing-dependent regulation and blockade of exoprotease production in *Aeromonas hydrophila* [J]. Infection and Immunity, 1999, 67(10): 5192 - 5199.
- [4] Bi Z X, Liu Y J, Lu C P. Contribution of AhyR to virulence of *Aeromonas hydrophila* J-1 [J]. Research in Veterinary Science, 2007, 83(2): 150 - 156.
- [5] Grade C, Bjarnsholt T, Givskov M, et al. Quorum sensing regulation in *Aeromonas hydrophila* [J]. Journal of Molecular Biology, 2010, 396(4): 849 - 857.

- [6] 邱健,贾振华,李承光,等. 群体感应淬灭酶的研究进展[J]. 微生物学通报,2006,33(4):139-145.
- [7] Liu D, Thomas P W, Momb J, *et al.* Structure and specificity of a quorum-quenching lactonase (AiiB) from *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Biochemistry*, 2007,46(42):11789-11799.
- [8] Dong Y H, Gusti A R, Zhang Q, *et al.* Identification of quorum-quenching N-Acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002,68(4):1754-1759.
- [9] Chen R, Zhou Z, Cao Y, *et al.* High yield expression of an AHL-lactonase from *Bacillus* sp. B546 in *Pichia pastoris* and its application to reduce *Aeromonas hydrophila* mortality in aquaculture [J]. *Microbial Cell Factories*, 2010,39:2-10.
- [10] 张美超,曹雅男,姚斌,等. 淬灭酶 AiiO-AIO6 酶学性质及对嗜水气单胞菌毒力因子的表达调控[J]. 水产学报,2011,35(11):1720-1728.
- [11] Cao Y N, He S X, Zhou Z G, *et al.* Thermostable N-acyl homoserine lactonase from *Bacillus* sp. AI96 attenuates *Aeromonas hydrophila* infection in zebrafish by oral administration [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012,78(6):1899-1908.
- [12] NRC (National Research Council), Nutrient requirements of fish and shrimp [M]. National Academy of Sciences, Washington, DC, USA, 2011:327.
- [13] He S X, Zhou Z G, Liu Y C, *et al.* Effects of dietary antibiotic growth promoters on the intestinal autochthonous microbiota of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂) [J]. *Archives of Microbiology*, 2010,192(12):985-994.
- [14] Lee D Y, Lauder H, Cruwys D, *et al.* Development and application of an oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR for detection of waste water bacterial pathogens [J]. *Science of the total Environment*, 2008,398(1-3):203-211.
- [15] 敖弟书,吴中明,王玉,等. 迟钝爱德华菌感染大鲵的研究[J]. 四川动物,2010,29(3):411-415.
- [16] Magarinos B, Romalde J L, Noya M, *et al.* Adherence and invasive capacities of the fish pathogen *Pasteurella piscicida* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1996,138(1):29-34.
- [17] Ringø E, Løvmo L, Salinas I, *et al.* Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish; a review [J]. *Aquaculture Research*, 2010,41(4):451-467.
- [18] Ling S H, Wang X H, Lim T M, *et al.* Use of green fluorescent protein (GFP) to study the invasion pathways of *Edwardsiella tarda* in *in vivo* and *in vitro* fish models [J]. *Microbiology*, 2000,146(17-19):7-19.
- [19] Ling S H, Wang X H, Lim T M, *et al.* Green fluorescent protein-tagged *Edwardsiella tarda* reveals portal of entry in fish [J]. *Fems Microbiol Lett*, 2001,94(2):239-243.
- [20] 郭松林,冯建军,熊静,等. 嗜水气单胞菌在欧洲鳊体内的免疫组织化学定位与病理观察[J]. 华中农业大学学报,2011,30(4):494-499.
- [21] Chu W H, Lu C P. *In vivo* fish models for visualizing *Aeromonas hydrophila* invasion pathway using GFP as a biomarker [J]. *Aquaculture*, 2008,277(3-4):152-155.
- [22] Maki J S, Patel G, Mitchell R. Experimental pathogenicity of *Aeromonas* spp. for the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* [J]. *Current Microbiology*, 1998,36(1):19-23.
- [23] 宋铁英,龚晖, Khomyakova T I, 等. 嗜水气单胞菌 ZN1 攻击鳊体内的组织病理观察[J]. 福建农业学报,2008,23(1):25-30.
- [24] Van Cam D T, Van Hao N, Dierckens K, *et al.* Novel approach of using homoserine lactone-degrading and poly-β-hydroxybutyrate-accumulating bacteria to protect *Artemia* from the pathogenic effects of *Vibrio harveyi* [J]. *Aquaculture*, 2009,291(1-2):23-30.
- [25] Nhan D T, Cam D T, Wille M, *et al.* Quorum quenching bacteria protect *Macrobrachium rosenbergii* larvae from *Vibrio harveyi* infection [J]. *Applied Microbiology*, 2010,109(3):1007-1018.
- [26] Farto R, Milton D L, Bermúdez M B, *et al.* Colonization of turbot tissues by virulent and avirulent *Aeromonas salmonicida* subsp. *-salmonicida* strains during infection [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2011,95(2):167-173.
- [27] Kozlova E V, Khajanchi B K, Sha J, *et al.* Quorum sensing and c-di-GMP-dependent alterations in gene transcripts and virulence-associated phenotypes in a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2011,50(5):213-223.
- [28] Kozlova E V, Khajanchi B K, Popov V L, *et al.* Impact of QseBC system in c-di-GMP-dependent quorum sensing regulatory network in a clinical isolate SSU of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2012,53(3-4):115-124.

Effect of quorum-quenching enzyme from *Bacillus* sp AI-96 on *Aeromonas hydrophila* NJ-1 bath challenge in zebrafish

HE Suxu, ZHANG Meichao, XU Li, YANG Yalin, LI Qing, ZHOU Zhigang*

(Key Laboratory for Feed Biotechnology of the Ministry of Agriculture, Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100081, China)

Abstract: The aim of the present experiment was to study the effects of quorum-quenching enzyme AI-96 against *Aeromonas hydrophila* NJ-1 attack with the bath challenge in zebrafish. The experiments set two dietary groups for zebrafish, 1) basal diet as control, 2) enzyme-containing diet with 3 U/g food of AI-96. Zebrafish tissues (gill, liver, kidney and intestine) were sampled at day 0.5, 1, 3, 7 and 14 after co-bath challenge with live *Aeromonas hydrophila* NJ-1 at two doses (high 2.5×10^8 cfu/mL, low 0.7×10^8 cfu/mL). The populations of NJ-1 colonizing in the tissues were quantified by real time PCR, and accumulated mortality of zebrafish were recorded everyday. Results showed that after challenge, the NJ-1 were detectable in the tissues of the attacked zebrafish in the total population order of intestine > gill > liver > kidney. More NJ-1 colonized in the tissues in the high dosage challenge treatment than the low group. Interestingly, the diets containing AI-96 enzyme significantly decreased the colonizing populations of NJ-1 in the zebrafish ($P < 0.05$), compared with the counterparts fed with basal diets when the fish was challenged with 2.5×10^8 cfu/mL NJ-1. In 0.7×10^8 cfu/mL challenge treatment, the NJ-1 number colonizing in gill (3 d), intestine (0.5, 1, 3, 7, 14 d), liver (3 d) and kidney (7 d) were also lower in the fish treated with AI-96 containing diets than the ones with basal diets ($P < 0.05$). Moreover, these effects were more obvious in 0.7×10^8 cfu/mL challenge treatment after 7 d ($P < 0.05$). Therefore, the dietary AI-96 enzyme could improve the survival rate against NJ-1 attack in both challenge levels. For this reason, quorum-quenching enzyme could effectively protect zebrafish against *A. hydrophila* at 0.7×10^8 cfu/mL level in zebrafish.

Key words: N-acylhomoserine lactonase; *Aeromonas hydrophila*; bath challenge; real time PCR

Corresponding author: ZHOU Zhigang. E-mail: zhou_zg@msn.com