

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.15007

嗜水气单胞菌在浸泡感染团头鲂的组织动态分布

陆春云^{1,2}, 谢骏^{1,2}, 习丙文², 梁利国², 夏飞², 潘良坤²

1. 南京农业大学 无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081

摘要: 利用具有绿色荧光蛋白基因标记的嗜水气单胞菌(WJ-8^{GFP})对团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)进行浸泡攻毒试验, 探究温度对浸泡感染后嗜水气单胞菌在团头鲂各组织分布的影响。实验设立 A 组(水温 25℃), B 组(水温 32℃), C 组(水温 25℃), 其中 C 组为对照组。用菌株 WJ-8^{GFP} 对实验组 A、B 进行浸泡攻毒, 试验组 C 不进行攻毒处理, 攻毒后分别于 2 h、4 h、8 h、12 h、24 h 采集各组鱼血液、脾、肾、鳃、肠道、肌肉, 培养法统计分析各组织器官上的荧光细菌数量。实验结果显示, 在各取样时间段实验组 A(25℃)和实验组 B(32℃)团头鲂各组织在均能检测到荧光嗜水气单胞菌, 对照组未检测到嗜水气单胞菌; 最高菌量出现在鳃, 且鳃上嗜水气单胞菌数量显著大于其他组织($P<0.05$), 其次是脾、肾; 组织内的菌量随时间大体呈现先上升后下降的趋势; B 实验组中各组织菌量显著大于 A 实验组 ($P<0.05$)。研究结果表明, 鳃是嗜水气单胞菌浸泡感染团头鲂的主要组织器官, 与 25℃相比较, 在水温 32℃时团头鲂被嗜水气单胞菌感染的风险更高。

关键词: 嗜水气单胞菌; 浸泡感染; 绿色荧光蛋白; 团头鲂; 组织分布

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)05-1068-07

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)属于气单胞菌科, 气单胞菌属, 为嗜温兼性厌氧革兰氏阴性短杆菌, 是一种人、畜和鱼共患的条件性致病菌, 普遍存在于各种水体和土壤中^[1-3]。目前研究结果表明, 嗜水气单胞菌能导致多种水产动物出现败血症^[4-6]。该病具有危害养殖种类多, 流行范围广, 发病率高的特点, 给淡水养殖业造成了严重的经济损失。嗜水气单胞菌引发疾病的决定因素复杂多样, 除其自身的外毒素、胞外蛋白酶、菌毛和脂多糖等多种毒力因子外, 还受到养殖环境温度、pH、离子浓度等因素影响^[7-8]。嗜水气单胞菌的严重致病性及其复杂的致病机理使得该菌受到广泛关注。

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)隶属鲤

形目(Cypriniformes), 鲤科(Cyprinidae), 鲴亚科(Abramidae), 鲴属, 俗称武昌鱼, 凭借其食性广、生长快、易捕捞、品质好、肉质鲜美等优势, 成为我国池塘、网箱养殖的主要品种之一^[9-10]。由嗜水气单胞菌引起的细菌性败血症是团头鲂养殖过程中危害最大的疾病之一^[11]。在夏季高温时段, 团头鲂容易出现大面积细菌性出血病并伴随大批量死亡^[12-13]。本研究主要通过对健康团头鲂进行浸泡攻毒试验, 探讨不同温度下嗜水气单胞菌在团头鲂体内各组织间感染分布变化, 以期充分了解团头鲂的细菌性出血病发病机制和嗜水气单胞菌的致病因子提供基础数据, 为该病的防控提供一定的理论基础。

收稿日期: 2015-01-05; 修订日期: 2015-03-13.

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金项目(CARS-46-10).

作者简介: 陆春云(1987-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为水产动物疾病与营养. E-mail: luchunyun1987@sina.cn

通信作者: 谢骏, 研究员. E-mail: xiej@ffrc.cn; 习丙文, 副研究员. E-mail: xibw@ffrc.cn

1 材料与方法

1.1 嗜水气单胞菌 WJ-8^{GFP} 的制备

嗜水气单胞菌菌株 WJ-8 为实验室保存的分离自江苏某养殖场患细菌性出血病的团头鲂^[14], 含卡那霉素抗性的绿色荧光蛋白质粒 pEGFPuv-Kar 由本实验室保存提供。通过电击转化法将质粒 pEGFPuv-Kar 导入嗜水气单胞菌 WJ-8 菌株^[15], 在卡那霉素抗性 LB 平板上培养, 挑选具有绿色荧光标记的嗜水气单胞菌 WJ-8^{GFP}。在荧光显微镜(Nikon eclipse Ti-S)(400×)下观察并拍摄图片。

1.1.1 菌株 WJ-8^{GFP} 对团头鲂的毒力检测 从南泉养殖基地取 60 尾均重为(80±5) g 的健康团头鲂, 随机分成 6 组, 每组 10 尾, 1~5 组为实验组, 6 组为对照组, 每组设 3 个重复, 早晚各投喂 1 次, 日换水 1 次, 暂养 7 d 后用于攻毒试验。将菌株 WJ-8^{GFP} 接种于 LB 液体培养基中, 摇床 160 r/min、30℃ 培养 18 h, 将菌株悬液依次稀释为 10⁷ CFU/mL、10⁶ CFU/mL、10⁵ CFU/mL、10⁴ CFU/mL、10³ CFU/mL, 使用一次性灭菌注射器对团头鲂进行腹腔注射, 对照组用同样方法注射灭菌生理盐水, 每尾鱼注射 0.2 mL。试验观察 14 d, 每日定时投喂并换水, 记录死亡鱼尾数, 计算细菌对团头鲂的半致死量(LD₅₀)。

1.1.2 质粒稳定性检测 在无菌条件下, 将 WJ-8^{GFP} 接种于 LB 液体培养基(含卡那霉素 60 μg/mL)培养过夜, 再将菌液接种于不含卡那霉素的 LB 液体培养基, 每次接种量为 1/1000(体积比), 每 24 h 转接 1 次, 转接同时稀释菌液涂抹平板, 放置于 30℃ 生化培养箱培养 18 h, 置于荧光显微镜下观察结果。质粒稳定率=绿色荧光菌落数/总菌落数×100 %。

1.2 实验用鱼

从南泉养殖基地取 90 尾大小均匀的团头鲂[(80±5) g], 置于水族缸进行暂养。实验分成 3 组: A、B 和 C, 其中实验组 A 缸 30 尾, 水温 25℃; 实验组 B 缸 30 尾, 水温 32℃; 实验组 C 缸 30 尾, 水温 25℃(实验组 C 为对照组, 不进行攻毒处理)。每天早晚各投喂 1 次, 上午换 1 次水, 换水量不超

过 1/5, 饲养 14 d 后, 确定鱼体健康无病用于浸泡攻毒试验。

1.3 人工感染和组织样本采集

将试验组 A 和试验组 B 中的鱼分别转移到水温相同的周转箱 A1、B1 做攻毒试验, 同时向周转箱 A1、B1 加入 WJ-8^{GFP} 菌液, 使菌液浓度达到 10⁵ CFU/mL; 浸泡 30 min 后将鱼分别转移回与试验组 A 和 B 相对应的水族缸中。整个过程不再换水和投喂饵料, 并保持水温不变。浸泡攻毒后分别于 2 h、4 h、8 h、12 h、24 h 对团头鲂血液、脾、肾、鳃、肠道、肌肉进行采样, 每个试验组随机采 3 尾鱼。采样前使用麻醉剂三卡因甲基磺酸盐(MS-222, Sigma, 200 mg/L)将鱼麻醉。血液取自尾静脉; 鳃用灭过菌的生理盐水冲洗 3 遍以去掉附着其表面的细菌; 肠道取中段并用镊子轻轻刮去食糜; 肌肉取自鱼体腹部。将取得的组织样本装入 2 mL 无菌离心管并称重, 按 1 g/mL 的比例加入无菌生理盐水进行匀浆。用无菌生理盐水将血液、匀浆液梯度稀释, 并选取稀释 10 倍的稀释液, 取 100 μL 均匀涂抹于 LB 营养琼脂平板(含卡那霉素 60 μg/mL), 放置 27℃ 生化培养箱中培养 24 h。在荧光显微镜(Nikon Ti-S)下观察菌落, 记录具有绿色荧光标记的细菌数。

1.4 数据分析

实验数据用 SPSS 18.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan 多重比较处理, $P < 0.05$ 表示差异显著, 实验结果以平均值±标准误($\bar{x} \pm SE$)表示。

2 结果与分析

2.1 绿色荧光蛋白在嗜水气单胞菌中的表达

以 WJ-8 为载体通过电击转化法将重组质粒 pEGFPuv-Kar 导入菌株, 获得绿色荧光蛋白标记的嗜水气单胞菌株 WJ-8^{GFP}, 在荧光显微镜下可以观察到较强的绿色荧光(图 1)。

2.2 菌株 WJ-8^{GFP} 对团头鲂的半致死量

对团头鲂进行腹腔注射后, 根据各实验组 14 d 内鱼体死亡情况(表 1), 由 Reed-Muench 法^[16]计算得出 WJ-8^{GFP} 对团头鲂的半致死量为 7.90×10^2 CFU/g。

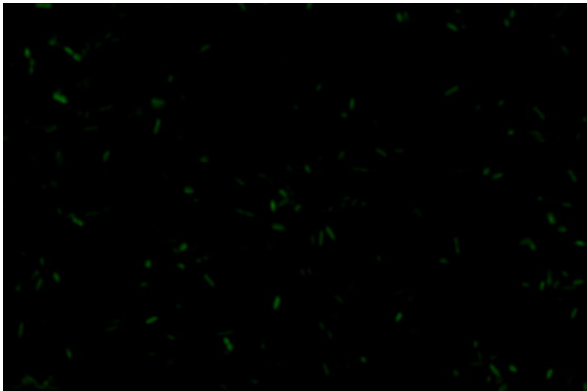


图 1 GFP 标记的嗜水气单胞菌 WJ-8^{GFP} 在荧光显微镜下的形态(400×)

Fig. 1 Morphology of WJ-8^{GFP} in fluorescent microscope (400×)

2.3 质粒的稳定性检测结果

WJ-8^{GFP} 在 LB 液体培养基中传代培养, 传至第 12 代质粒稳定性仍为 100%, 到第 16 代质粒稳定性开始低于 50%, 至第 21 次, 质粒稳定性降为 5%(表 2)。

2.4 嗜水气单胞菌 WJ-8^{GFP} 在团头鲂体内的感染分布

浸泡攻毒试验过程中, 实验组 A(25℃)和实验组 B(32℃)团头鲂活动正常, 未出现死亡, 体表亦未出现明显出血症状, 解剖可发现脾、肾出现轻微的肿胀和充血, 且实验组 B 该现象比实验组 A 明显。对照组 C(25℃)团头鲂活动正常, 解剖发现体内组织正常, 未检测到嗜水气单胞菌。

团头鲂浸泡感染嗜水气单胞菌 WJ-8^{GFP} 后不同组织的细菌计数如图 2 所示, 最高菌量出现在鳃, 其次是肠、肾和脾, 而血液、肌肉中的菌量则较小。在实验组 A 中, 各样本组织中 WJ-8^{GFP} 的菌量明显小于实验组 B 中的量, 其中最高菌量出现在攻毒后 8 h 的鳃(1.23×10^4 CFU/g), 其次是 2 h 的肾(1.95×10^3 CFU/g)、4 h 的肠道(1.63×10^3 CFU/g), 脾、肌肉和血液的菌量最低。在实验组 B 中, 浸泡攻毒后 8 h 在鳃出现最高菌量(1.98×10^4 CFU/g), 其次是同样浸泡 8 h 后的肠

表 1 不同浓度 WJ-8^{GFP} 腹腔注射引起的团头鲂死亡率
Tab. 1 The mortality of the *Megalobrama amblycephala* challenged with WJ-8^{GFP}

组别 group	WJ-8 ^{GFP} 浓度/(CFU·mL ⁻¹) concentrations of WJ-8 ^{GFP}	死亡鱼尾数 ¹ no. of dead fish ¹	试验鱼尾数 ² no. of challenged fish ²	死亡率/% mortality
1	10 ⁷	30(10/10/10)	30(10/10/10)	100
2	10 ⁶	24(9/7/8)	30(10/10/10)	80
3	10 ⁵	6(2/2/2)	30(10/10/10)	20
4	10 ⁴	0(0/0/0)	30(10/10/10)	0
5	10 ³	0(0/0/0)	30(10/10/10)	0
6	无菌生理盐水 sterile saline	0(0/0/0)	30(10/10/10)	0

注: 1. 括号内数字分别表示第 1 次、第 2 次和第 3 次攻毒后死亡鱼尾数; 2. 括号内数字分别表示第 1 次、第 2 次和第 3 次试验鱼尾数。
Note: 1. Values in brackets mean dead fish numbers after the first, second and third challenges; 2. Values in brackets mean fish numbers in the first, second and third challenge experiments.

表 2 嗜水气单胞菌 WJ-8^{GFP} 稳定性检测结果
Tab. 2 Stability experiments of WJ-8^{GFP}

传代数 passage number	稳定性/% stability	传代数 passage number	稳定性/% stability	传代数 passage number	稳定性/% stability
1	100	8	100	15	55
2	100	9	100	16	35
3	100	10	100	17	20
4	100	11	100	18	15
5	100	12	100	19	12
6	100	13	95	20	8
7	100	14	93	21	5

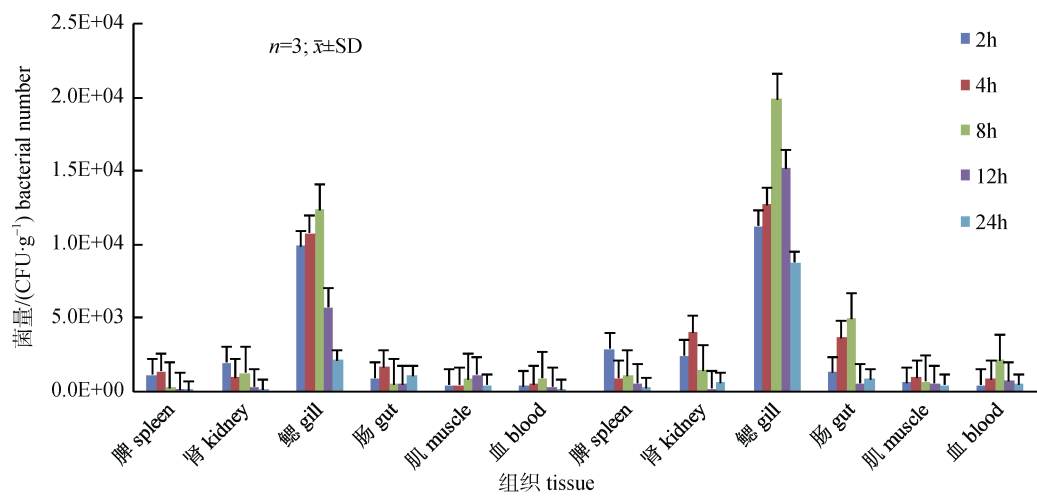


图 2 浸泡攻毒后不同时间团头鲂各组织中的 WJ-8^{GFP} 菌量

Fig. 2 The numbers of WJ-8^{GFP} in *Megalobrama mablycephala* tissue samples after bath challenge

道(4.93×10^3 CFU/g), 接着是 4 h 的肾(3.98×10^3 CFU/g)和 2 h 的脾(2.87×10^3 CFU/g), 肌肉和血液的菌量最低。整个实验过程, 菌量的大小总体呈现先上升后下降的趋势, 对各个样本组织的菌量总数进行比对, 实验组 B 显著大于实验组 A ($P<0.05$)。

3 讨论

嗜水气单胞菌对水产养殖动物危害极大, 特别是其引起的细菌性败血症给团头鲂的养殖造成了重大的经济损失。近年来, 随着团头鲂细菌性疾病引发的病害日趋严重化, 病原菌感染鱼体机制方面的研究正受到科研工作者的广泛关注。Amaro 等^[17]曾利用微生物培养法研究鱼类体表病原菌的感染情况, 即通过选择培养基对体表病原菌进行分离, 进而定量分析。Svendsen 等^[18]利用放射性示踪技术来追踪病原菌, 进而探讨病原菌的侵染途径。不过这两种方法都有弊端, 前者从样品采集到细菌培养工作量都很大; 后者虽然能有效区分鱼体组织内被感染的病原菌, 但很难分辨活菌与死亡菌, 不利于实验数据的统计分析。而本研究采用的嗜水气单胞菌 WJ-8^{GFP}, 经导入携带卡那抗性的荧光质粒后具有良好的稳定性和荧光性, 在荧光显微镜下可以清楚地看到组织中的病原菌, 而且可以快速有效地区分活菌与死亡

菌并统计病原菌数量。本研究结果显示, 在探讨病原菌对鱼体的感染途径上, 应用具有绿色荧光蛋白标记的病原菌是行之有效的方法。

在水环境中鳃是鱼类与外界接触的重要组织器官^[19], 鳃上布满毛细血管, 大量的毛细血管增加了鱼体鳃组织的受细菌感染的可能性, Chu 等^[20]研究表明, 鳃和受伤的表皮是病原菌进入鱼体的主要途径。在本研究中, 实验组 A 和实验组 B 的最高菌量均出现在浸泡攻毒 8 h 的鳃组织中, 而且整个实验过程, 鳃组织中的菌量显著高于其他组织上的菌量, 表明鳃确实是病原菌侵入鱼体的重要器官之一, 这与 Chu 等^[20]的研究结果一致。相关研究表明, 在抵抗病原感染中肾可以有效清除血液中的细菌^[21]。研究结果显示, 实验组 A 和实验组 B 肾的菌量分别在 2 h 和 4 h 达到最大量, 在达到最大菌量后的 4~24 h 其菌量下降明显, 这可能与肾的细菌排除机制有关。相似的生理机制同样发生在血液系统, 实验组 A 和实验组 B 的血液在攻毒后 2 h 均可检测到嗜水气单胞菌, 且在 8 h 菌量达到最大, 而 24 h 的菌量均为最小值, 这与 Tatner 等^[22]的研究结论一致。

嗜水气单胞菌是条件致病菌, 正常情况下在水体中可以与鱼共存而不引发疾病^[23], 只有在特定的条件下, 如温度、溶氧和 pH 等的变化, 才有可能引起鱼体发病^[24]。本研究主要探讨不同温度

下嗜水气单胞菌对鱼体的侵染情况。目前国内外关于嗜水气单胞菌致病温度的研究均有报道,沈锦玉等^[25]通过室内培养,发现嗜水气单胞菌生长的最适温度为25~30℃。熊焰等^[26]研究表明在30~35℃时嗜水气单胞菌能够迅速繁殖,分泌大量的血溶素使其毒力更强。Rahman等^[27]研究表明在17℃和25℃时嗜水气单胞菌对金鱼的致死率最大。本研究通过在不同温度下嗜水气单胞菌感染团头鲂组织动态分布分析表明,32℃各组织菌量显著大于25℃。水温在32℃时嗜水气单胞菌的活力更强,更容易感染团头鲂,嗜水气单胞菌感染团头鲂的过程,主要是通过鳃进入体内,然后主要攻击脾、肾等组织器官。

参考文献:

- [1] Rodríguez I, Novoa B, Figueras A. Immune response of zebrafish (*Danio rerio*) against a newly isolated bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 25(3): 239–249.
- [2] Rao J J, Li S S, Huang K H, et al. Development of multiplex polymerase chain reaction for detection of pathogenic *Aeromonas hydrophila* and its preliminary application[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(5): 749–755. [饶静静, 李寿崧, 黄克和, 等. 致病性嗜水气单胞菌多重PCR检测方法的建立[J]. *中国水产科学*, 2007, 14(5): 749–755.]
- [3] Zhang M C, Cao Y N, Yao B, et al. Characteristics of quenching enzyme AiiO-AIO6 and its effect on *Aeromonas hydrophila* virulence factors expression[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(11): 1720–1728. [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.]
- [4] Li Y Y, Cao H P, Deng L, et al. Isolation of pathogenic bacteria *Aeromonas hydrophila* from *Acipenser baerii* and immune effect of its whole cell vaccine[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2008, 43(6): 1–9. [李圆圆, 曹海鹏, 邓璐, 等. 西伯利亚鲟源嗜水气单胞菌致病菌的分离及其全菌苗的免疫效果[J]. *动物学杂志*, 2008, 43(6): 1–9.]
- [5] Guo S L, Guan R Z, Feng J J, et al. Influences of blood and biochemical parameters on American eels (*Anguilla rostrata*) challenged by *Aeromonas hydrophila*[J]. *Journal of Jimei University: Natural Science*, 2010, 15(2): 93–97. [郭松林, 关瑞章, 冯建军, 等. 嗜水气单胞菌感染对美洲鳗鲡血液和生化指标的影响[J]. *集美大学学报: 自然科学版*, 2010, 15(2): 93–97.]
- [6] Ming J H, Xie J, Xu P, et al. Effects of emodin, vitamin C and their combination on biochemical parameters and two HSP70s mRNA expression of Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*) infected with *Aeromonas hydrophila*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(3): 588–601. [明建华, 谢骏, 徐跑, 等. 大黄素、维生素C及其配伍对团头鲂感染嗜水气单胞菌后生理生化指标的影响[J]. *中国水产科学*, 2011, 18(3): 588–601.]
- [7] Zhu D L, Li A H, Wang J G, et al. The correlation between the distribution pattern of virulence genes and the virulence of *Aeromonas hydrophila* strains[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2006, 45(1): 82–85. [朱大玲, 李爱华, 汪建国, 等. 嗜水气单胞菌毒力与毒力基因分布的相关性[J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2006, 45(1): 82–85.]
- [8] Vilches S, Urgell C, Merino S, et al. Complete type III secretion system of a mesophilic *Aeromonas hydrophila* strain[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(11): 6914–6919.
- [9] Ren M C, Liao Y J, Xie J, et al. Dietary arginine requirement of juvenile blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*[J]. *Aquaculture*, 2013, 414–415: 229–234.
- [10] Ming J H, Xie J, Xu P, et al. Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih)[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2010, 28(3): 407–418.
- [11] Li S W, Chang Y M, Liang L Q, et al. Rapid isolation of microsatellites from genome of bluntnose black bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(2): 187–192. [李绍成, 常玉梅, 梁利群, 等. 团头鲂微卫星标记的快速制备[J]. *中国水产科学*, 2006, 13(2): 187–192.]
- [12] Li A H, Cai T Z, Wu Y S, et al. Investigation on drug resistance of fish bacterial pathogen—*Aeromonas hydrophila* in China[J]. *Microbiology China*, 2001, 28(1): 58–63. [李爱华, 蔡桃珍, 吴玉深, 等. 我国鱼类病原——嗜水气单胞菌的耐药性研究[J]. *微生物学通报*, 2001, 28(1): 58–63.]
- [13] Tian T, Hu H G, Chen C F. Identification and pathogenicity of bacterial pathogens isolated in an outbreak of bacterial disease of bluntnose black bream, *Megalobrama amblycephala*[J]. *Journal of Huangzhong Agricultural University*, 2010, 29(3): 341–345. [田甜, 胡火庚, 陈昌福. 团头鲂细菌性败血症病原菌分离鉴定及致病力研究[J]. *华中农业大学学报*, 2010, 29(3): 341–345.]
- [14] Xia F, Liang L G, Xie J. Isolation, identification and drug susceptibility of a pathogenic bacterial strain from bluntnose black bream *Megalobrama amblycephala*[J]. *Fisheries Science*, 2012, 31(10): 606–610. [夏飞, 梁利国, 谢骏. 团头鲂

- 病原嗜水气单胞菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 水产科学, 2012, 31(10): 606–610.]
- [15] Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set)[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [16] Brow W F. Variance estimation in reed-muench fifty percent end-point determination[J]. Am J Hyg, 1964, 79(1): 37–46.
- [17] Amaro C, Biosca E G, Fouz B, et al. Evidence that water transmits *Vibrio vulnificus* biotype-2 infections to eels[J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(3): 1133–1137.
- [18] Svendsen Y S, Dalmo R A, Bøgvold J. Tissue localization of *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., following experimental challenge[J]. J Fish Dis, 1999, 22(2): 125–131.
- [19] da Cruz A L, Prado T M, da Silva Maciel L A, et al. Environmental effects on the gills and blood of *Oreochromis niloticus* exposed to rivers of Bahia, Brazil[J]. Ecotox Environ Safe, 2015, 111: 23–31.
- [20] Chu W H, Lu C P. *In vivo* fish models for visualizing *Aeromonas hydrophila* invasion pathway using GFP as a bio-marker[J]. Aquaculture, 2008, 277(3–4): 152–155.
- [21] Ferguson H W, Claxton M J, Moccia R D, et al. The quantitative clearance of bacteria from the bloodstream of rainbow trout (*Salmo gairdneri*)[J]. Vet Pathol, 1982, 19(6): 687–699.
- [22] Tatner M F, Johnson C M, Horne M T. The tissue localization of *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, following three methods of administration[J]. J Fish Biol, 1984, 25(1): 95–108.
- [23] Song T Y, Gong H, Khomyakova T I, et al. Pathological changes on *Anguilla anguilla* tissues after *Aeromonas hydrophila* injection[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2008, 23(1): 25–30. [宋铁英, 龚晖, Khomyakova T I, 等. 嗜水气单胞菌 ZN1 攻击鳗鲡后的组织病理观察[J]. 福建农业学报, 2008, 23(1): 25–30.]
- [24] Hu J, Li A H, Hu C Y, et al. Effect of temperature and pH on expression of virulence factors from *Aeromonas hydrophila*[J]. Journal of Nanjing University of Science and Technology, 2006, 30(3): 375–380. [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, 2006, 30(3): 375–380.]
- [25] Shen J Y, Chen Y Y, Shen Z H, et al. Study on pathogen of outbreaks of infections disease of fishes in Zhejiang Province: I. Isolation, pathogenicity, physiological and biochemical and biochemical characteristics of *Aeromonas hydrophila*[J]. Bulletin of Science and Technology, 1993, 9(6): 397–401. [沈锦玉, 陈月英, 沈智华, 等. 浙江养殖鱼类暴发性流行病病原的研究: I. 嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)的分离、致病性及生理生化特性[J]. 科技通报, 1993, 9(6): 397–401.]
- [26] Xiong Y, Zhou Y, Wang K Y. Effects of factors on the haemolysin of *Aeromonas hydrophila*[J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 1997, 27(7): 25–25. [熊焰, 周煜, 汪开毓. 影响嗜水气单胞菌溶血素产生的因素[J]. 中国兽医科技, 1997, 27(7): 25–25.]
- [27] Rahman M H, Suzuki S, Kawai K. The effect of temperature on *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish, *Carassius auratus*[J]. J Appl Ichthyol, 2001, 17(6): 282–285.

Infection kinetics of *Aeromonas hydrophila* in the blunt-snout bream, *Megalobrama amblycephala*

LU Chunyun^{1,2}, XIE Jun^{1,2}, XI Bingwen², LIANG Ligu², XIA Fei², PAN Liangkun²

1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

2. Key Laboratory of Genetic Breeding and Aquaculture Biology of Freshwater Fishes, Ministry of Agriculture; Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China

Abstract: Fish disease has become an increasingly prominent problem in aquaculture development and causes severe economic damage to fisheries. *Aeromonas hydrophila* is an important fish pathogen that causes hemorrhaging and septicemia in many cultured fishes. The infection kinetics of *A. hydrophila* in blunt-snout bream *Megalobrama amblycephala* were investigated with a strain, *A. hydrophila* WJ-8, that was transformed with a plasmid encoding green fluorescent protein (pEGFPuv-Kar). The purpose of this investigation was to fully elucidate the pathogenesis of septicemia in blunt-snout bream and provide basic data on pathogenic factors of *A. hydrophila*. Fish were divided into three experimental groups: group A, water temperature 25°C; group B, water temperature 32°C; and group C (control group), water temperature 25°C. Fish were allowed to acclimatize for two weeks before experiment proceeded. *Aeromonas hydrophila* WJ-8^{GFP} was cultured in LB medium that contained kanamycin (60 µg/mL) at 27°C for 24 h, and bacteria was counted and then transferred to a fish culture tank at a final concentration of 10⁵ CFU/mL. The bacteria bath challenge was maintained for 30 min for groups A and B but not for group C. Then, fish were transferred to tanks with clean water and the original water temperature was maintained. The bacterial counts from the blood, spleen, kidney, gills, intestine, and muscle were detected at 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, and 24 h after challenge. Bacteria were detected in both infected groups (A and B) but not in the uninfected control group (C) at all times during the experiment. An increased number of bacteria was observed in the gills of fish in groups A and B ($P<0.05$), whereas large numbers of bacteria were also noted in the spleen, kidney, and intestine. There were more bacteria that attached to and proliferated on the fish gills at 32°C than 25°C. The bacterial counts for group B were significantly higher than those of groups A and C ($P<0.05$). These results indicate that the gill serves as an important infectious route of *A. hydrophila* in blunt-snout bream, and high water temperature is associated with heightened infection risk.

Key words: *Aeromonas hydrophila*; bath challenge; green fluorescent protein; *Megalobrama amblycephala*; infection kinetics

Corresponding author: XIE Jun, E-mail: xiej@ffrc.cn; XI Bingwen, E-mail: xibw@ffrc.cn