

不同来源美人鱼发光杆菌美人鱼亚种菌株表型差异性分析

施琳妮^{1,2}, 于永翔², 姜 勇³, 张 正², 王印庚², 廖梅杰², 荣小军²

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食品产出过程功能实验室, 青岛 266071; 3. 青岛国家海洋科学研究中心, 山东 青岛 266071)

摘要: 美人鱼发光杆菌美人鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*)可感染多种海水养殖动物发病, 为研究不同菌株之间的表型差异性, 作者对不同来源的 25 株美人鱼发光杆菌美人鱼亚种菌株的溶血特性、生理生化特征、药物敏感性以及 5 种最敏感抗生素的最小抑菌浓度进行了分析。结果表明: (1)25 株菌株在 TSB 培养基上均为白色不透明圆形菌落, TCBS 培养基上菌落显绿色, 直径为 1~2 mm, 革兰氏染色均为阴性; (2)25 株菌对 3% 胰胨水、无盐胰胨水、葡萄糖、肌醇、3% NaCl、ONPG 以及精氨酸双水解酶等 22 种生化反应呈现出高度一致性, 对于丙二酸盐、赖氨酸脱羧酶、尿素酶以及西蒙氏枸橼酸盐表现出明显差异; (3)所有菌株中仅有 2 株菌表现出 β 溶血, 23 株菌表现出 α 溶血; (4)25 株菌对丁胺卡那、链霉素、复方新诺明、乙酰螺旋霉素以及苯唑青霉素 5 种抗生素均表现出耐药性; 对萘啶酸、氟罗沙星、菌必治、头孢噻肟、盖伯斯林以及洛美沙星 6 种抗生素均表现敏感性; 对恩诺沙星等 27 种抗生素的药物敏感性存在显著差异; (5)5 种抗生素的 MIC 检测结果表明, 25 株菌对萘啶酸以及环丙沙星的 MIC 基本一致, 浓度分别是 2.5~10 $\mu\text{g/mL}$ 以及低于 2.5 $\mu\text{g/mL}$, 对多粘菌素 B、氧氟沙星以及洛美沙星 3 种抗生素差异较大。通过本研究证实不同来源的美人鱼发光杆菌美人鱼亚种菌株表型特征存在明显差异。

关键词: 美人鱼发光杆菌美人鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*); 溶血性; 抗生素耐药; 生理生化特征

中图分类号: S947 文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2019)06-0015-10

DOI: 10.11759/hyxx20190115001

美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damsela*)是一种海洋生物致病菌, 包括美人鱼亚种以(*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*)以及杀鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*)两个亚种。美人鱼亚种 1981 年从患病的热带鱼类 *Chromis punctipinnis* 上首先分离得到, 最初被称为 *Vibrio damsela*^[1]。随后在海鲷、大菱鲆、鳗鱼^[2-4]等多种生物中均有美人鱼发光杆菌引发疾病的报道。感染美人鱼发光杆菌美人鱼亚种后的典型特征一般表现为出血性败血症^[5]。同时, 美人鱼发光杆菌美人鱼亚种亦会造成人类感染, 进而导致坏死性筋膜炎等疾病, 是一种人类和海洋生物的共同致病菌^[6]。

同一种细菌的不同菌株间往往存在明显的表型差异, 这是微生物研究中普遍存在的现象。而对于病原菌而言, 研究其表型差异可以为解析其致病机制和进行菌株鉴定提供重要的依据。如水稻白枯叶细菌^[7]、油橄榄青枯病菌^[8]等植物病原菌的研究发现, 生理生化表型特征差异明显的不同菌株, 其致病力

也显著不同。本文选取的研究对象美人鱼弧菌美人鱼亚种是近二十年来海水养殖的新发病原之一。在美人鱼发光杆菌美人鱼亚种的致病性研究过程中, 溶血素是被报道最多的重要毒力因子之一。美人鱼发光杆菌美人鱼亚种的溶血素基因主要分为两类, 一类是质粒编码的溶血素 Dly 和 Phly P, 一类是染色体编码的溶血素 Phly C^[9]。染色体编码的溶血素 Phly C 存在于所有具有溶血效应的美人鱼发光杆菌美人鱼亚种菌株中, 但其对溶血毒力的贡献较小^[10], 而可以编码溶血素 Dly 和 Phly P 的质粒 pPHDD1 的存在则是美人鱼亚种中具有高溶血能力菌株的典型特

收稿日期: 2019-01-15; 修回日期: 2019-03-16

基金项目: 山东省重大科技创新工程项目(2018YFJH0730)

[Foundation: The Key Projects of Science and Technology Innovation of Shandong Province, No.2018YFJH0703]

作者简介: 施琳妮(1992-), 女, 山东烟台人, 硕士研究生, 主要从事水产动物病害防控研究, 电话: 17667848251, E-mail: 403521461@qq.com; 张正, 通信作者, 博士, 副研究员, 电话: 13969812587, E-mail: zhangzheng@ysfri.ac.cn

征^[11],同时质粒上编码的溶血素与染色体编码的溶血素之间的协同和附加作用同样对菌株的溶血能力及毒力大小具有重要影响^[12]。但不同美人鱼发光杆菌美人鱼亚种菌株间的是否存在溶血素相关基因的明显差异,以及这种差异能否直接表现在表型特征上,目前尚缺乏深入的研究。

近几年来,在我国已经报道了银鲳、半滑舌鳎、龙胆石斑鱼^[13-15]等多种海水养殖鱼类因感染美人鱼发光杆菌而发病的案例。美人鱼发光杆菌逐渐成为危害海水养殖的重要病原之一,在南方和北方都对我国海水养殖产业的健康发展构成了新的威胁。但不同宿主和地域来源的美人鱼发光杆菌菌株是否存在明显的表型和致病性差异,还没有相对全面的参考数据。本研究以实验室保存的分离自许氏平鲈 *Sebaste sschlegelii*、大菱鲆 *Scophthalmus maximus*、

鲍鱼 *Albalone*、大泷六线鱼 *Hexagrammos*, 褐点石斑鱼 *Epinephelus*、珍珠龙胆石斑鱼 *Epinephelus. Sp.*、牙鲆 *Paralichthys olivaceus* 等不同养殖生物的多株美人鱼发光杆菌菌株为研究对象,对它们的生理生化特征、药物敏感性以及溶血特性等多项表型特征的差异性进行了分析验证,相关研究结果可为美人鱼发光杆菌病的快速检测、天然弱毒菌株的筛选以及疫苗的制备奠定工作基础。

1 材料与方法

1.1 试验菌株来源及亚种鉴定

试验用美人鱼发光杆菌菌株来源于黄海水产研究所病原库内保存的菌株,共 25 株,其分离宿主和分离时间如表 1 所示。所有菌株使用胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)琼脂培养基进行活化待用。

表 1 不同来源 25 株美人鱼发光杆菌美人鱼亚种的菌株来源

Tab. 1 Different strains of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*

菌株编号	宿主	分离区域	分离年份	菌株编号	宿主	分离区域	分离年份
A	大菱鲆	山东莱州	2013.05	N	牙鲆	山东胶南	2009.06
B	许氏平鲈	山东长岛	2017.05	O	牙鲆	山东胶南	2009.07
C	许氏平鲈	山东长岛	2016.06	P	许氏平鲈	山东长岛	2018.07
D	许氏平鲈	山东长岛	2016.07	Q	大泷六线鱼	山东长岛	2018.07
E	许氏平鲈	山东长岛	2016.09	R	许氏平鲈	山东长岛	2018.08
F	许氏平鲈	山东长岛	2016.11	S	褐点石斑鱼	海南崖城	2016.11
G	许氏平鲈	山东长岛	2016.08	T	珍珠龙胆石斑鱼	海南昌江	2016.11
H	许氏平鲈	山东长岛	2017.01	U	珍珠龙胆石斑鱼	海南昌化	2016.11
I	大菱鲆	江苏赣榆	2012.06	V	褐点石斑鱼	海南万宁	2016.12
J	大菱鲆	江苏赣榆	2010.06	W	珍珠龙胆石斑鱼	海南昌江	2016.12
K	许氏平鲈	山东长岛	2017.06	X	大菱鲆	河北黄骅	2009.06
L	许氏平鲈	山东长岛	2017.05	Y	鲍鱼	山东青岛	2010.08
M	牙鲆	山东胶南	2009.05				

因美人鱼发光杆菌亚种之间理化指标差异过大,没有对比的意义,因此作者在进行表型差异研究之前,用 16S rRNA 以及 *ureC* 基因对 25 株菌株进行美人鱼发光杆菌亚种鉴定^[16]。其中 16S rRNA 基因的引物序列为: F 5'-GCTTGAAGAGATTCGAGT-3'R 5'-CACCTCGCGGTCTTGCTG-3', *ureC* 基因的引物序列为: F5'-TCCGGAATAGGTAAAGCGGG-3'R 5'-CTTG AATATCCATCTCATCTGC-3'。PCR 反应条件为: 95℃ 预变性 4 min, 95℃ 变性 1 min, 60℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 40 S, 30 个循环, 最后 72℃ 温育 5 min, 4℃ 保存。以大肠杆菌 DNA 以及无酶超纯水做阴性及空白对照。

1.2 生理生化特性分析

纯化后的菌株用革兰氏染色液试剂盒(购自北京索莱宝科技有限公司)进行染色后,显微镜观察菌株形态。用购自青岛海博生物技术有限公司的细菌微量生化鉴定管进行不同菌株的生理生化特性测定, 28℃ 培养 24~48 h 后观察不同菌株的生理生化反应实验结果。

1.3 药物敏感性测试

采用 K-B 纸片扩散法^[17]进行不同菌株的抗生素药敏实验,药敏纸片购自杭州微生物试剂有限公司,

以抑菌圈的直径与美国临床实验室标准化协会(CLSI)标准^[18]对比来判断其药物敏感度。

1.4 溶血能力测定

将活化菌株在 TSB 琼脂培养基上纯化培养, 分别挑取单菌落于 1.5 % NaCl 溶液中制成 1×10^8 cfu/mL 的菌悬液, 于无菌操作台上使用点种法点种于血平板之上(血平板由 TSB 琼脂培养基灭菌后降温至 55℃ 再添加 5% 脱纤维绵羊血制成)。点种结束后, 将血平板倒置于恒温培养箱中, 28℃ 培养 24~48 h, 记录溶血现象。

1.5 最小抑菌浓度检测

根据 K-B 药敏纸片法的测试结果, 挑选多粘菌素 B、氧氟沙星、环丙沙星、洛美沙星以及萘啶酸 5 种美人鱼发光杆菌美人鱼亚种较为敏感的药物进行最小抑菌浓度的检测。

制备 1×10^8 cfu/mL 浓度的菌悬液, 并以 10 倍梯度稀释至 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 cfu/mL 共 5 个梯度, 分别接种于无菌酶标板孔内, 每孔 180 μ L, 每个梯度设置 3 个平行, 加入 5 μ L 1% TTC 溶液, 28℃ 恒温培养。为使药物对细菌生长抑制效果有足够时间得以体现^[19], 每隔 1.5 h 观察 TTC 变色现象以确定接菌密度。

将筛选出的 5 种药物多粘菌素 B、萘啶酸、氧氟沙星、环丙沙星、洛美沙星溶解制成 320、320、80、80、80 μ g/mL 的原液, 以二倍稀释法进行梯度稀释, 分别稀释 8 个梯度, 用 0.22 μ m 孔径滤膜过滤除菌。分别加 20 μ L 到酶标板标定的药敏检测区域中, 每组设两个重复, 空白对照及阴性对照组中加入 20 μ L 无菌纯水。将待测菌株制成 1×10^6 cfu/mL 菌悬液, 无菌操作下加入到药敏检测区域和阴性对照区中, 每孔加 180 μ L, 空白对照加无菌 TSB 培养基 180 μ L, 三个区域均加入 5 μ L TTC 溶液。

2 实验结果

2.1 菌株形态及亚种鉴定

25 株菌株在 TSB 培养基上培养 24~48 h 后, 均呈白色不透明的圆形菌落, 表面光滑, 中部略微隆起, 直径多在 1~2 mm(图 1-a), 革兰氏染色阴性(图 1-b)。测试的全部菌株均能在 TCBS(图 1-c)上生长。透射电镜(图 1-d)下, 所有菌株都呈现杆状、单根极生鞭毛, 菌体大小约为 $(1.8 \sim 2.2) \mu\text{m} \times (0.5 \sim 0.8) \mu\text{m}$ 。25 株菌利用 16S rRNA 以及 ureC 基因引物(图 2)扩增

后均出现两条条带, 条带大小分别为 267 bp 和 448 bp, 鉴定为美人鱼发光杆菌美人鱼亚种。

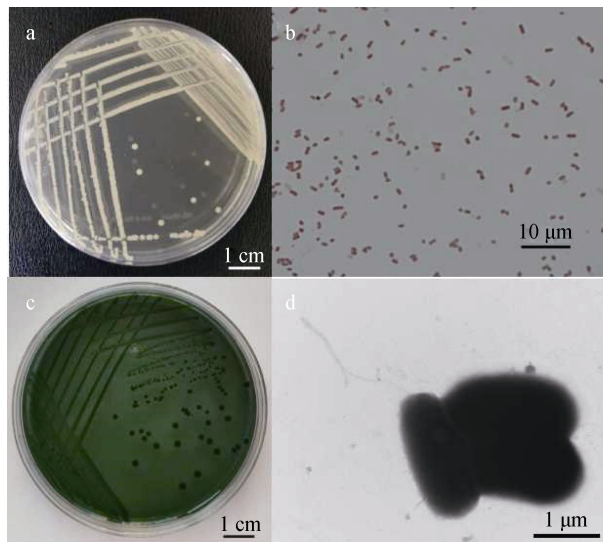


图 1 美人鱼发光杆菌美人鱼亚种菌株形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of *Photobacterium damsela* subsp. *Damsela* strains

注: a: TSB 生长的菌落形态; b: 革兰氏染色形态; c: TCBS 生长的菌落形态; d: 透射电镜下的菌株形态

2.2 生理生化特性分析

所测试的 25 株菌生理生化特性如表 2 所示。25 株菌对于 3% 胰胨水、无盐胰胨水、葡萄糖、肌醇、3% NaCl ONPG 以及精氨酸双水解酶等 22 种生化试管的反应呈现了高度的一致性, 对于丙二酸盐、尿素酶、赖氨酸脱羧酶以及西蒙氏枸橼酸盐 4 种生化特性则呈现出较大的差异性。

2.3 溶血能力差异分析

所有 25 株菌中, 仅有两株菌表现了极强的 β 溶血特性(图 3-a), 而其余 23 株菌均表现了 α 溶血即部分溶血特性(图 3-b)。

2.4 抗生素药敏实验分析

25 株菌抗生素药敏结果如表 3 所示。在所测试的 38 种抗生素药物中, 25 株菌对丁胺卡那、链霉素、复方新诺明、苯唑青霉素以及乙酰螺旋霉素 5 种抗生素均表现出了药物抗性; 对氟罗沙星、萘啶酸、洛美沙星、头孢胺噻肟、菌必治以及盖伯斯林 6 种抗生素均表现出高度或中度敏感; 对其余 27 种抗生素均有菌株的敏感性与大部分菌株呈现相反的现象, 菌株之间表现了明显的药物敏感差异性。

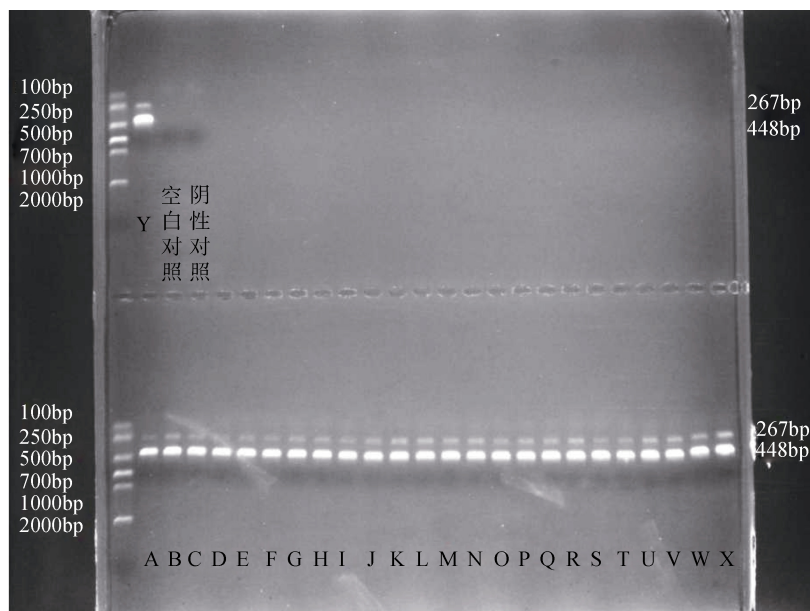


图 2 不同菌株多重 PCR 产物的琼脂糖电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of the multiplex-PCR products obtained for the different strains

注: 267 bp 和 448 bp 分别对应 16s rRNA 和 *ureC* 基因扩增片段大小; 编号 A-Y 代表不同菌株; 空白对照添加无酶超纯水; 阴性对照添加大肠杆菌 DNA

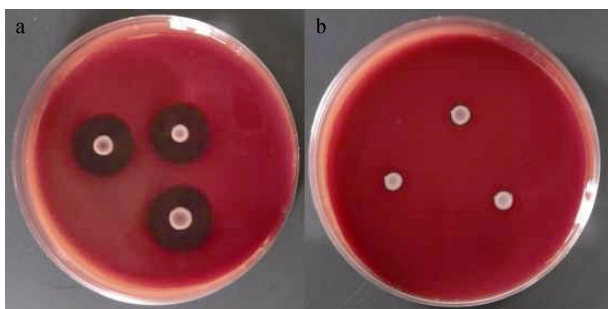


图 3 不同美人鱼发光杆菌美人鱼亚种菌株的溶血表现

Fig. 3 The hemolyzing characteristics of different strains of *Photobacterium damsela* subsp. *Damsela*

a: β 全溶血; b: α 半溶血

2.5 最小抑菌浓度分析

如表 4 所示, 添加不同浓度的萘啶酸后, 多数菌株的最小抑菌浓度均在 2.5~10 μg/mL, 菌株 A 最小抑菌浓度在 20 μg/mL, 菌株 K、T 以及 W 的最小抑菌浓度则高于 320 μg/mL。添加不同浓度的环丙沙星后, 除菌株 K 和 W 外, 其余 24 株菌株最小抑菌浓度均低于 2.5 μg/mL 之间。添加不同浓度的洛美沙星、氧氟沙星以及多粘菌素 B 后, 16 株菌株的最小抑菌浓度差异较大, 其最小抑菌浓度从 0.625~160 μg/mL 均有分布。

表 2 不同来源菌株理化反应特性表

Tab. 2 The Physic-biochemical Characteristics of Different Strains

项目	菌株编号																			
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
无盐胰胨水	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3%NaCl 胰胨水	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6%NaCl 胰胨水	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10%NaCl 胰胨水	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3%NaCl 葡萄糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3%NaCl 蔗糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
3%NaCl 甘露醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
3%NaCl 阿拉伯糖	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3%NaCl 乳糖	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

续表

项目	菌株编号																			
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
山梨醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
苦杏仁苷	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
肌醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
丙二酸盐	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+
鼠李糖	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
蜜二糖	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3%NaCl ONPG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3%NaCl 尿素酶	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
木糖	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3%NaCl 鸟氨酸脱羧酶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3%NaCl 赖氨酸脱羧酶	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+
3%NaCl 精氨酸双水解酶	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Kovacs 试剂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3%NaCl MR-VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3%NaCl 明胶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
西蒙氏枸橼酸盐	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3%NaCl 硫化氢产生	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注：“+”为阳性；“-”为阴性；A-Y 为菌株编号

表 3 不同美人鱼发光杆菌美人鱼亚种菌株的抗生素敏感性测试

Tab. 3 Antibiotic resistance test of different *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* strains

抗生素种类	菌株编号																			
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
丁胺卡那	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆
链霉素	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆
苯唑青霉素	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆
复方新诺明	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆
乙酰螺旋霉素	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆
氟罗沙星	■	■	■	■	■	■	■	★	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	★
萘啶酸	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
洛美沙星	■	■	★	■	■	★	★	★	★	★	★	■	★	★	★	■	★	★	★	■
头孢胺噻肟	■	■	★	■	★	■	■	★	■	■	★	■	★	■	■	■	■	■	★	■
菌必治	■	■	■	■	■	■	■	★	■	■	★	■	★	■	■	■	■	■	★	■
盖伯斯林	■	■	■	■	★	■	■	★	■	■	■	■	★	■	■	■	■	★	★	■
氟苯尼考	■	■	■	■	★	■	■	★	■	■	■	■	■	■	■	■	■	◆	■	■
氧氟沙星	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	★	■	★	■	■	◆
氟哌酸	■	■	■	■	■	■	■	★	★	■	■	■	★	★	■	■	■	■	◆	■
多粘菌素 B	■	★	■	■	★	★	★	★	★	★	★	◆	★	■	■	■	■	★	★	■
环丙沙星	■	■	■	■	■	■	■	■	■	◆	■	■	■	★	★	■	★	■	★	◆
头孢他啶	■	■	■	★	★	■	■	◆	★	★	◆	★	★	■	■	■	■	■	■	◆

续表

抗生素种类	菌株编号																			
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
氯霉素	★	■	★	■	■	■	★	■	◆	◆	★	■	■	◆	◆	■	■	■	★	■
先锋 V	■	★	■	★	■	■	■	■	■	■	◆	■	◆	★	★	■	■	■	◆	■
新生霉素	■	★	◆	■	◆	★	■	★	◆	★	★	■	■	■	■	■	◆	★	◆	■
四环素	◆	■	★	■	■	■	■	■	◆	◆	■	■	■	◆	◆	■	★	■	◆	■
强力霉素	◆	■	■	■	■	■	■	■	◆	◆	■	■	■	◆	◆	■	■	■	◆	■
美满霉素	◆	★	★	★	★	★	◆	★	◆	◆	★	★	■	◆	◆	■	★	◆	◆	★
先锋 IV	■	★	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	■	◆	★	★	★	★	★	◆	★
克拉霉素	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	★	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆
青霉素	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆
红霉素	★	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	★	◆	◆	◆	◆
新霉素	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆
氨苄青霉素	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	★	◆	◆
先锋必	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	★
卡那霉素	◆	★	◆	■	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆
庆大霉素	◆	★	◆	★	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	★	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆
恩诺沙星	◆	★	◆	◆	★	★	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆
痢特灵	★	■	◆	◆	◆	★	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	■	◆
利福平	◆	★	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	■	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	★
阿奇霉素	◆	★	◆	★	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	★	◆	◆	◆	◆	◆	◆	■	◆
先锋 VI	◆	★	◆	◆	★	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	★	★	★	◆	★	★	◆
吡哌酸	◆	★	◆	★	◆	★	◆	◆	★	◆	◆	★	◆	★	◆	★	◆	◆	★	★

注: ◆为抗性; ■为高度敏感; ★为中度敏感; A-Y 为菌株编号

表 4 不同来源美人鱼发光杆菌美人鱼亚种菌株对 5 种抗生素的最小抑菌浓度(μg/mL)

Tab. 4 The 5 Antibiotics MIC of Different *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* Strains (μg/mL)

菌株编号	抗生素种类				
	萘啶酸	多粘菌素 B	氧氟沙星	环丙沙星	洛美沙星
A	20	5	5	2.5	10
B	5	5	5	0.625	10
C	5	5	5	2.5	10
D	2.5	160	0.625	≤0.625	0.625
E	2.5	5	0.625	≤0.625	0.625
F	10	10	2.5	≤0.625	2.5
G	2.5	5	1.25	≤0.625	1.25
H	2.5	2.5	0.625	≤0.625	0.625
I	2.5	10	0.625	≤0.625	1.25
J	2.5	20	≤0.625	≤0.625	≤0.625
K	≥320	2.5	≥80	≥80	≥80
L	10	10	5	2.5	10

续表

菌株编号	抗生素种类				
	萘啶酸	多粘菌素 B	氧氟沙星	环丙沙星	洛美沙星
M	20	5	10	2.5	20
N	5	5	0.625	≤0.625	2.5
O	10	80	2.5	≤0.625	2.5
P	10	5	5	2.5	10
Q	10	10	5	2.5	10
R	2.5	40	≤0.625	≤0.625	1.25
S	10	20	2.5	≤0.625	2.5
T	≥320	160	5	2.5	20
U	10	20	5	2.5	20
V	5	10	2.5	≤0.625	1.25
W	≥320	2.5	≥80	40	≥80
X	2.5	80	0.625	≤0.625	2.5
Y	2.5	20	1.25	≤0.625	1.25

3 分析与讨论

美人鱼发光杆菌美人鱼亚种是一种能感染多种海洋生物的致病菌,自 1981 年首次从患病雀鲷科鱼中分离出来后,陆续有多种海洋生物分离出美人鱼发光杆菌的报道。Hassanzadeh 等^[20]于伊朗波斯湾内的六带鲆(*Caranx sexfasciatus*)中分离出美人鱼发光杆菌美人鱼亚种,且证实了其具有溶血性。Vaseeharan 等^[21]从印度东海岸患有黑腮症状的斑节对虾(*Penaeus monodon*)中分离出的病原菌被证实为美人鱼发光杆菌美人鱼亚种。我国也曾有美人鱼发光杆菌感染不同养殖生物发病的报道,如 Liu 等^[22]报道美人鱼发光杆菌可感染脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)致使肝胰腺苍白、虾体呈白色并大量死亡;Zhao 等^[23]报道的美人鱼发光杆菌感染卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)幼鱼后,使病鱼腹部膨大、腹鳍以及尾鳍等充血溃疡,并大量死亡。在全球范围内,美人鱼发光杆菌已成为一种可感染多种海水养殖生物发病的新兴病原,对水产养殖的健康发展构成了新的威胁。

本研究采用的 25 株菌美人鱼发光杆菌美人鱼亚种菌株分别分离自我国的大菱鲆、许氏平鲉、石斑鱼、大泷六线鱼、牙鲆等不同海水养殖生物,对这些菌株表型差异性进行分析,有助于更好的了解我国美人鱼发光杆菌的分布情况,为更加深入的研究其致病机理和进行科学的防控奠定基础。生理生化特性的检测结果表明,25 株菌对 22 种理化指标表现出了高度的一致性,仅有 4 种理化指标存在差异,证明

美人鱼发光杆菌美人鱼亚种的生理生化表现特征相对稳定,受不同分离地域和宿主的影响有限。而根据抗生素药物敏感性以及 5 种典型抗生素最小抑菌浓度的测试结果来看,来源不同的 25 株菌株除对苯唑青霉素等 11 种抗生素的敏感性无较大差异外,对其余 27 种抗生素的敏感性差异均较为明显。而 25 株菌对 5 种敏感抗生素的 MIC 也存在明显差异。这一现象表明,不同宿主和不同养殖环境来源的同一种病原菌其药物敏感性相比自身的生理生化特性,可能更容易受到外界环境的影响。潘琳等^[24]针对 26 株乳球菌(*Lactococcus*)的 MIC 研究结果中指出,养殖生物的地域环境、养殖模式、摄食习性、使用抗生素的种类和剂量等都会造成病原菌的耐药性差异。需要说明的是,本实验所测试 MIC 的 5 种试验药物是依据抗生素药物敏感性的初步实验结果选取,仅为进一步深入分析不同美人鱼发光杆菌菌株之间的药物敏感差异性,其中的部分药物已被国家列为禁用渔药。因此,相关研究结果仅做科研参考,不具有生产指导意义。

本次研究发现,不同美人鱼发光杆菌美人鱼亚种菌株之间的溶血能力差异显著,25 株菌株中仅有 2 株表现了极强的溶血性,而其余的绝大部分菌株溶血能力并不突出。感染美人鱼发光杆菌后的主要症状为出血性败血症,因此目前多数研究重点关注于美人鱼发光杆菌溶血素的产生机制,溶血性是很多细菌性病原致病力的主要判断指标之一,曾有多种弧菌被证实其感染养殖生物后引起败血症,如牟海

津等^[25]发现副溶血弧菌(*Vibrio Parahemolyticus*)胞外产物中的溶血素导致对虾(*Penaeus orientalis*)败血症,梁利国等^[26]发现存在溶血素基因的温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)能引起黄金鲫(*Carassius auratus auratus*)患有体表出血等症状。多项研究表明美人鱼发光杆菌美人鱼亚种中存在着编码溶血素 Dly、Phly P 以及 Phly C 等^[9]溶血基因以及编码磷脂酶 Plp V 等具有溶血活性物质的基因。对此,本研究有关美人鱼发光杆菌菌株的致病力鉴定的重要依据就是表型溶血能力的差异。而明确溶血能力和菌株致病力之间的对应关系,不仅可以快速进行高致病性美人鱼发光杆菌美人鱼亚种毒株的检测,对于海水养殖产业中科学预防美人鱼发光杆菌的感染具有重要的指导意义;同时可以以此筛选出天然的弱毒株,以此为基准进行美人鱼发光杆菌疫苗的研究,从而实现对美人鱼发光杆菌病更加高效、安全的预防。通过本研究,证实了我国美人鱼发光杆菌美人鱼亚种不同菌株的分布存在表型特征的多样性,而对其表型差异性产生的机制及影响因素进行深入研究,这也是今后值得探究的科学问题。

参考文献:

- [1] Milton L, Teebken-Fisher D, Hose J E, et al. *Vibrio damsela*, a marine bacterium, causes skin ulcers on the damselfish *Chromis punctipinnis*[J]. Science, 1981, 214(4525): 1139-1140.
- [2] Vera P, Navas J I, Fouz B. First isolation of *Vibrio damsela* from sea bream (*Sparus aurata*)[J]. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 1991, 3(11): 112-113.
- [3] Fouz B, Larsen J L, Nielsen B, et al. Characterization of *Vibrio damsela* strains isolated from turbot *Scophthalmus maximus* in Spain[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1992, 12(3): 155-166.
- [4] Ketterer P J. Deaths in captive eels (*Anguilla reinhardtii*) due to *Photobacterium* (*Vibrio*) *damsela*. [J]. Australian Veterinary Journal, 1992, 69(8): 203-204.
- [5] 吴同奎, 靳晓敏, 王洪彬, 等. 美人鱼发光杆菌溶血素 Hly_{ch} 基因的原核表达及免疫血清制备[J]. 动物医学进展, 2018, 10(39): 31-35.
Wu Tonglei, Jin Xiaomin, Wang Hongbin, et al. Prokaryotic expression and preparation of immune serum of Hly_{ch} gene of *Photobacterium damsela*[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2018, 10(39): 31-35.
- [6] Rivas A J, Lemos M L, Osorio C R. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, a bacterium pathogenic for marine animals and humans[J]. Frontiers in Microbiology, 2013, 4: 1-6.
- [7] 韦石泉, 郑怀民, 李桂珍. 水稻白叶枯细菌致病力差异的鉴别及其生理生化反应的研究[J]. 微生物学杂志, 1982, 1: 6-15.
Wei Shiquan, Zhen Huaimin, Li Guizhen. Identification of pathogenicity differences of *Xanthomonas oryzae* and study on their physiological and biochemical reactions[J]. Journal of Microbiology, 1982, 1: 6-15.
- [8] 邓惠勤. 油橄榄青枯病菌菌落形态与致病关系[J]. 林业科技通讯, 1980, 8: 21-23.
Deng Huiqin. Relationship between colony morphology and pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum*[J]. Forest Science and Technology, 1980, 8: 21-23.
- [9] 陈吉祥, 杨慧, 颜显辉, 等. 致病性哈维氏弧菌溶血素基因克隆及其检测[J]. 中国水产科学, 2005, 12(5): 580-587.
Chen Jixiang, Yang Hui, Yan Xianhui, et al. Cloning of hemolysin gene from a pathogenic *Vibrio harveyi* SF1 and its detection in diseased marine animals and marine environments[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2005, 12(5): 580-587.
- [10] Terceti M S, Rivas A J, Alvarez L, et al. RstB Regulates Expression of the *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* Major Virulence Factors Damselysin, Phobalysin P and Phobalysin C[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1-11.
- [11] Rivas A J, von Hoven G, Neukirch C, et al. Phobalysin, a small beta-Pore-Forming toxin of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*[J]. Infect Immun, 2015, 83(11): 4335-4348.
- [12] Vences A, Rivas A J, Lemos M L, et al. Chromosome-encoded hemolysin, phospholipase, and collagenase in plasmidless isolates of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* contribute to virulence for fish[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(11): 1-16.
- [13] Rivas A J, Balado M, Lemos M L, et al. Synergistic and additive effects of chromosomal and Plasmid-Encoded hemolysins contribute to hemolysis and virulence in *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*[J]. Infection and Immunity, 2013, 81(9): 3287-3299.
- [14] Tao Z, Shen C, Zhou S, et al. An outbreak of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* infection in cultured silver pomfret *Pampus argenteus* in Eastern China[J]. Aquaculture, 2018, 492: 201-205.
- [15] 杨楠, 张志强, 吴同奎, 等. 半滑舌鳎源美人鱼发光杆菌美人鱼亚种分离鉴定[J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(2): 19-25.
Yang Nan, Zhang Zhiqiang, Wu Tonglei, et al. Isolation and Identification of *Photobacterium damsela* subsp. *Damsela* from Tongue Sole[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2018, 52(2): 19-25.

- [16] 张晓君, 秦国民, 陈翠珍, 等. 龙胆石斑鱼源美人鱼发光杆菌的生物学特性与系统发育学分析[J]. 渔业科学进展, 2009, 30(3): 38-43.
Zhang Xiaojun, Qin Guomin, Chen Cuizhen, et al. Biological characterization and phylogenetic analysis of *Photobacterium damsela* subsp. *Damsela* from diseased *Epinephelus lanceolatus* L.[J]. Progress in Fishery Sciences. 2009, 30(3): 38-43.
- [17] Osorio C R, Toranzo A E, Romalde J L, et al. Multiplex PCR assay for ureC and 16s rRNA genes clearly discriminates between both subspecies of *Photobacterium damsela*[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2000, 40: 117-183.
- [18] 崔惠敬, 孟玉霞, 冯文倩, 等. 养殖大菱鲆肠道中大菱鲆弧菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 水产科学. 2017, 36(2): 125-131.
Cui Huijing, Meng Yuxia, Feng Wenqian, et al. Identification and antimicrobial susceptibility test of *Vibro Scophthalmi* isolated from the intestine of cultured turbot *Scophthalmus Maximus*[J]. Fisheries Science. 2017, 36(2): 125-131.
- [19] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement[S]. CLSI document M100-S25, 2015.
- [20] 刁菁, 杨秀生, 叶海斌, 等. 一种水产迟钝爱德华氏菌快速药敏检测方法的研究[J]. 水产科学. 2014, 33(1): 22-28.
Diao Jing, Yang Xiusheng, Ye Haibin, et al. A rapid sensitive detection method of pathogen *Edwardsiella tarda*[J]. Fisheries Science, 2014, 33(1): 22-28.
- [21] Hassanzadeh Y, Bahador N, Baseri-Salehi M. First time isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from *Caranx sexfasciatus* in Persian Gulf[J]. Iran J Microbiol. 2015, 3(7): 178-184.
- [22] Vaseeharan B, Sundararaj S, Murugan T, et al. *Photobacterium damsela* ssp. *damsela* associated with diseased black tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius in India[J]. Letters in Applied Microbiology, 2007, 45(1): 82-86.
- [23] Liu F, Liu G X, Li F H. Characterization of two pathogenic *Photobacterium* strains isolated from *Exopalaemon carinicauda* causing mortality of shrimp[J]. Aquaculture, 2016, 464: 129-135.
- [24] Zhao D H, Sun J J, Liu L, et al. Characterization of two phenotypes of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* isolated from diseased juvenile *Trachinotus ovatus* reared in Cage Mariculture[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2009, 40(2): 281-289.
- [25] 潘琳, 陈霞, 邵玉宇, 等. 乳球菌属对抗生素最小抑菌浓度的分析[J]. 现代食品科技, 2016, 32(12): 125-132.
Pan Lin, Chen Xia, Shao Yuyu, et al. Analysis of minimum inhibitory concentration of antibiotics against *Lactococcus* strains[J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(12): 125-132.
- [26] 牟海津, 李筠, 包振民, 等. 副溶血弧菌胞外产物对中国对虾的致病性分析[J]. 海洋与湖沼, 2000, 31(3): 273-280.
Mu Haijin, Li Jun, Bao Zhenmin, et al. Pathogenicity of extracellular products of vibrio *Parahaemolyticus* to *Penaeus Chinensis*[J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2000, 31(3): 273-280.
- [27] 梁利国, 马昕羽, 谢骏. 西利鲟嗜水气单胞菌与其他3株气单胞菌间的免疫交叉反应[J]. 水生态学杂志, 2013, 34(5): 76-81.
Liang Ligu, Ma Xiyu, Xie Jun. Isolation, Identification and detection of hemolysin of *Aeromonas sobria* from *Carassius auratus auratus*[J]. Journal of Hydroecology, 2013, 34(5): 76-81.

Studies on the phenotypic differences of different *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* strains

SHI Lin-ni^{1, 2}, YU Yong-xiang², JIANG Yong³, ZHANG Zheng², WANG Yin-geng², LIAO Mei-jie², RONG Xiao-jun²

(1. College of Fishers and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao, National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China; 3. National Marine Science Research Center, Qingdao 266071, China)

Received: Jan. 15, 2019

Key words: *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*; Hemolysis; Phenotypic characteristics

Abstract: *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* is an important pathogen to cause different kinds of marine animal disease. In this study, 25 strains of this bacterium which isolated from different host and region were selected to analyze their difference of physiology, biochemistry, drug resistance and MIC of 5 antibiotic. The results showed that different phenotypic characteristics existed among the 25 strains. They are: (1) All these strains formed whites and opaque colonies on TSB agar and green colonies on TCBS medium with diameter 1-2mm, and they were all Gram-negative (2) There were 22 biochemical reactions characteristics similar among the 25 strains, including 3% peptone water, salt-free peptone water, glucose, inositol, 3% NaCl, ONPG and arginine dihydrolase *et al.* The 4 biochemical reaction of malonate, urease, lysine decarboxylase and simmont citrate were different. (3) Only 2 strains showed beta hemolysis, the others 23 strains showed alpha hemolysis, . (4) All 25 strains showed resistance to 5 antibiotics of Amikacin, Streptomycin, SMZ-TMP, Acetylspiramycin and Oxacillin, and susceptibility to 6 antibiotics of Nalidixic acid, Fleroxacin, Cetriaxone Sodium, Cefotaxime, Ceftizoxime and Lomefloxacin. The differences of drug susceptibility existed in the others 27 antibiotics including Enrofloxacin and so on. (5) The MIC of these 25 strains were almost the same to 2 antibiotics of Nalidix acid and Ciprofloxacin, but significant difference to 3 antibiotics of Polymyxin B, Ofloxacin and Lomefloxacin. This study confirmed that the phenotypic characteristics of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* strains which isolated from different host and region were significantly different.

(本文编辑: 康亦兼)