

研究报告

质粒介导的美人鱼发光杆菌美人鱼亚种理化特性与毒力差异

李京泽^{1,2}, 于永翔², 刘定远², 王春元², 王印庚², 杨新月², 张正^{*2}

1 中国海洋大学 水产学院, 山东 青岛 266003

2 中国水产科学研究院黄海水产研究所 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室,
山东 青岛 266071

李京泽, 于永翔, 刘定远, 王春元, 王印庚, 杨新月, 张正. 质粒介导的美人鱼发光杆菌美人鱼亚种理化特性与毒力差异[J]. 微生物学通报, 2024, 51(8): 2831-2843.

LI Jingze, YU Yongxiang, LIU Dingyuan, WANG Chunyuan, WANG Yingeng, YANG Xinyue, ZHANG Zheng. Physiological and biochemical characteristics and virulence of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* mediated by a plasmid[J]. Microbiology China, 2024, 51(8): 2831-2843.

摘要: 【背景】美人鱼发光杆菌美人鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, PDD)是一种可导致多种海洋生物患病的病原菌, 比较基因组测序分析表明, 具有高致病性的PDD菌株内携带大质粒 pPDD1608, 基因注释分析表明该质粒携带多种毒力基因和分泌系统相关基因, 而对于其功能机制缺乏报道。【目的】以一株高致病性PDD为研究对象, 通过诱导缺失突变获得质粒缺失菌株, 比较分析野生菌株与质粒缺失株的表型与致病性相关特征差异, 明确该质粒对PDD理化表型和致病力的影响。【方法】建立变温-SDS质粒去除方法, 构建菌株PDD1608的质粒缺失株 Δ pPDD1608; 利用TSB固体培养基及扫描电镜观察分析菌株PDD1608与 Δ pPDD1608的表观形态特征; 通过细菌微量生化鉴定管测定菌株PDD1608与 Δ pPDD1608的生理生化表型; 利用K-B纸片扩散法测定菌株PDD1608与 Δ pPDD1608的药物敏感性; 使用指示培养基测定菌株PDD1608与 Δ pPDD1608的体外磷脂酶活性和溶血性; 通过注射感染许氏平鲷测定菌株PDD1608与 Δ pPDD1608的致病力。【结果】变温-SDS法可有效去除菌株PDD1608的大质粒, 并基于全基因组序列信息建立了特异位点PCR质粒去除效果检测方法; 理化检测结果表明, 质粒缺失株与野生株的药物敏感性与生理生化特性并无差异, 但质粒缺失株的溶血性与磷脂酶活性显著降低; 注射感染试验表明, 野生株对许氏平鲷表现为高致病性, 实验鱼在24 h内全部死亡, 而质粒缺失株对许氏平鲷致病性较低, 24 h死亡率仅为56.6%。【结论】通过对野生株与质粒缺失株溶血能力、磷脂酶活性及对许氏平鲷致病力的研究证实,

资助项目: 山东省自然科学基金(ZR2020QC216, ZR2021MC027); 青岛市关键技术攻关及产业化示范类项目(22-3-3-hygg-3-hy, 23-1-3-hygg-22-hy)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2020QC216, ZR2021MC027), and the Qingdao Key Technology Research and Industrialization Demonstration Project (22-3-3-hygg-3-hy, 23-1-3-hygg-22-hy).

*Corresponding author. E-mail: zhangzheng@ysfri.ac.cn

Received: 2023-11-16; Accepted: 2024-01-18; Published online: 2024-02-27

毒力质粒 pPDD1608 是介导菌株 PDD1608 具有高致病力的重要元件。为后续深入分析该毒力质粒及染色质介导的 PDD 致病和毒力蛋白分泌机制提供了技术支撑与理论基础。

关键词：美人鱼发光杆菌美人鱼亚种；毒力质粒；质粒消除；胞外酶活性；致病性

Physiological and biochemical characteristics and virulence of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* mediated by a plasmid

LI Jingze^{1,2}, YU Yongxiang², LIU Dingyuan², WANG Chunyuan², WANG Yingeng², YANG Xinyue², ZHANG Zheng^{*2}

1 Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong, China

2 State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, Shandong, China

Abstract: [Background] *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (PDD) can infect a variety of marine animals to cause diseases. Comparative genome analysis revealed that PDD strains harboring a large plasmid pPDD1608 exhibit strong pathogenicity. Furthermore, gene annotation analysis unveiled the presence of virulence genes and secretion system-related genes in this plasmid. However, there is a dearth of studies examining the functions of this plasmid. [Objective] In this study, a highly pathogenic PDD strain was selected and its plasmid-deleted mutant was generated through induced mutagenesis. The phenotypic characteristics and pathogenicity were compared between the wild type and the mutant to reveal the role of this plasmid in the phenotype and pathogenicity of PDD. [Methods] The plasmid-deleted strain Δ pPDD1608 was successfully constructed by the temperature variation-SDS method. Then, the phenotypes of PDD1608 and Δ pPDD1608 cultured on the TSB plates were observed by scanning electron microscopy. The physiological and biochemical characteristics were measured by the microbiobiochemical tests and compared between PDD1608 and Δ pPDD1608. The antibiotic susceptibility of PDD1608 and Δ pPDD1608 was determined by the K-B disk diffusion method. The phospholipase and hemolytic activities of the two strains were measured by the indicator media *in vitro*. The pathogenicity of PDD1608 and Δ pPDD1608 was assessed through the artificial challenge test by injection in *Sebastes schlegeli*. [Results] The large plasmid of PDD1608 was effectively eliminated by the temperature variation-SDS method, and a gene-specific PCR method was established based on the whole genome sequence of PDD1608. The experimental results revealed no discernible disparities in antibiotic susceptibility or physiological and biochemical characteristics between PDD1608 and Δ pPDD1608. However, Δ pPDD1608 showed reduced hemolytic and phospholipase activities. Furthermore, the artificial challenge test demonstrated that PDD1608 displayed higher pathogenicity towards *S. schlegeli*,

resulting in the death of all the tested fish within 24 h, whereas Δ pPDD1608 exhibited lower pathogenicity towards *S. schlegeli*, causing a 24-h mortality rate of 56.6%. **[Conclusion]** The comparison on hemolytic and phospholipase activities and pathogenicity between Δ pPDD1608 and PDD1608 confirmed that the plasmid pPDD1608 played a crucial role in mediating the high pathogenicity of PDD1608.

Keywords: *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*; virulence plasmid; plasmid elimination; extracellular enzyme activity; pathogenicity

美人鱼发光杆菌美人鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, PDD)是一种全球范围内广泛分布的革兰氏阴性细菌,该菌于1981年首次分离自雀鲷科鱼类斑鳍光鳃鱼(*Chromis punctipinnis*)体表溃疡处,最初被命名为 *Vibrio damsela*^[1],此后被报道分离于大菱鲆、半滑舌鳎、许氏平鲉等多种患病海洋鱼类^[2-4]。PDD 感染引起的典型症状主要表现为皮肤溃疡及肝、肾、脾等内脏组织的局灶性坏死,对鱼类、甲壳动物、软体动物及鲸目动物等多种海洋动物均具有致病力^[5-7]。

作为一种染色体外独立复制的遗传因子,细菌质粒通常参与控制包括致病力、药物敏感性、代谢能力、鞭毛形成与运动能力在内的多种细菌表型特征。质粒虽对于细菌的繁殖及生长不是必需的,但某些质粒上具有的特异性基因对细菌致病力、侵染力及耐药性均有影响。有研究表明,携带毒力质粒可显著增强病原菌对宿主的侵染力及致病力^[8-9]。消除细菌质粒是确定细菌某些表型特征是否由质粒控制的重要验证手段^[10]。目前常见的质粒消除方法有高温、电穿孔、紫外照射等物理消除方法,吡啶橙、溴化乙锭、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)等嵌合染料与表面活性剂处理的化学消除方法,以及利用转座子或质粒不相容原理的分子生物学消除方法^[11]。同时,除单一方法进行质粒消除外,也有多种处理方法结合应用以消除细菌质粒的报道,如高温-高 SDS 浓度处理法、变温-SDS 处

理法等^[12-13]。

随着对 PDD 研究的不断深入,发现质粒是介导其致病性差异的重要元件,具有强溶血性表型的 PDD 菌株携带有特定的毒力质粒^[14]。PDD 的毒力质粒中携带有溶血素基因(*dly* 及 *hlyA_{pl}*)、III型分泌系统(type III secretion system, T3SS)相关基因及转铁蛋白受体基因等多种毒力因子的编码基因^[6,15]。本研究选取实验室保存的高致病性 PDD 菌株为对象,该菌株含有大小约 162 kb 的质粒,并携带有 *dly* 及 *hlyA_{pl}* 等毒力因子编码基因。通过进行质粒消除研究,分析该质粒对 PDD 菌株生物学特性及毒力的影响,为进一步研究质粒介导的 PDD 生理代谢功能及建立针对高致病性 PDD 菌株的快速检测与防控技术提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 样品

美人鱼发光杆菌美人鱼亚种菌株 PDD1608,分离自海水网箱养殖的患病许氏平鲉体表溃疡处,现保存于中国水产科学研究院黄海水产研究所国家海洋渔业生物种质资源库微生物资源库内,该菌株在前期工作中已被证实对许氏平鲉、大菱鲆等多种海水养殖动物具有高致病性^[16]。同时,该菌株已完成全基因组测序并上传 NCBI,染色体及其质粒的储存号分别为 CP079237、CP079238 及 CP079239。

实验用许氏平鲉购自山东省威海市某养殖

场,体长为(10.77±0.48) cm,体重为(24.54±1.38) g。于自然光周期条件下在 300 L 玻璃钢桶内暂养 7 d,日投饵量为鱼体重 1%,日换水量 30%,确定鱼体健康后用于人工感染实验。

1.2 培养基和主要试剂、仪器

TSB 液体培养基参考李永杰等^[17]进行配制,TSB 固体培养基、绵羊血平板与卵黄平板培养基参考刘潇等^[16]进行配制。

SDS,生工生物工程(上海)股份有限公司;脱纤维绵羊血,南京森贝伽生物科技有限公司;50%卵黄乳液与细菌微量生化鉴定管,青岛海博生物技术有限公司;细菌 DNA 提取试剂盒,南京诺唯赞生物科技股份有限公司;抗菌药物药敏纸片,杭州微生物试剂有限公司。

PCR 仪,艾本德公司;凝胶紫外成像仪,北京天根生化科技有限公司;酶标仪,上海伯乐生命医学产品有限公司。

1.3 菌株 PDD1608 质粒缺失株的构建

菌株 PDD1608 的质粒消除参考刘开放^[12]的实验方法并进行适当改进。选取 SDS 作为化学消除剂,采用去离子水配制 TSB 液体培养基并加入终浓度为 20 mg/mL 的 SDS,在无菌 96 孔板中进行 2 倍梯度稀释,获得分别含有 20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.312 5、0.156 25、0.078 125 mg/mL SDS 的 9 组 TSB 液体培养基。先将 PDD1608 接种于 100 mL TSB 液体培养基中,28 °C、180 r/min 振荡培养过夜后使菌体浓度达到 10⁸ CFU/mL。按照 1%接种量将菌液接种至含有不同 SDS 浓度梯度的 TSB 液体培养基中,28 °C、180 r/min 振荡培养过夜。采用酶标仪测定 96 孔板中细菌生长的终浓度,并吸取适量菌液通过涂布培养法检验不同浓度 SDS 的抑菌情况,最终确定 SDS 的最佳添加浓度。

取纯化后的 PDD1608 单菌落接种于 TSB 液体培养基中,28 °C、180 r/min 培养过夜后,吸

取 0.5 mL 培养后菌液接种于 50 mL 含 SDS 的 TSB 培养基中,于 37 °C、180 r/min 条件下培养 16–20 h,随后吸取 0.5 mL 培养后菌液转入 50 mL 不含 SDS 的 TSB 培养基于 40 °C、180 r/min 条件下培养 16–20 h,重复交替每 4 次传代为一个周期。

1.4 菌株 PDD1608 质粒消除效果检测

每个培养周期后吸取 100 μL 菌液稀释涂布于 TSB 绵羊血平板 28 °C 培养过夜,对出现弱溶血性的菌株进行分离纯化,并对其大质粒 pPDD1608 特异基因进行 PCR 检测以确定质粒消除情况。检测目的基因参考 PDD1608 的全基因组信息,对 PDD 特异基因(*ureC*)、毒力质粒复制起始位点(*Ori_pPHDD1*)以及 PDD1608 质粒基因组序列信息内多个特异性位点进行扩增(表 1),以 PDD1608 野生株作为阳性对照。使用细菌 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成,PCR 检测方法参考刘潇等^[16]的方法并进行适当改进。PCR 反应体系(50 μL):2×TSINGKE Master Mix 25 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL,模板 DNA (100 ng/μL) 1 μL,无菌水 22 μL。PCR 扩增条件中的延伸时间与退火温度根据引物进行调整,片段长度每增加 250 bp,延伸时间增加 15 s,不足 250 bp 的部分按照 250 bp 增加延伸时间,片段长度与退火温度见表 1。例如,*ureC* 基因的 PCR 扩增条件为:95 °C 5 min;95 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s,30 个循环;72 °C 10 min,4 °C 保存。PCR 产物通过 1%琼脂糖凝胶电泳(110 V,30 min)检测,委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,并对其在 PDD1608 质粒基因组中的同源性序列进行比对确定。对于 PCR 检测结果为阴性的菌株,经过连续传代并重复上述 PCR 检测实验,确保菌株质粒缺失并能稳定传代。获得的稳定传代质粒缺失株命名为 ΔpPDD1608。

表 1 用于 PDD 菌株检测的引物信息

Table 1 The primers information for PDD strains detection

引物名称	序列	退火温度	片段长度	参考文献
Primer name	Sequence (5'→3')	Annealing temperature (°C)	Fragment length (bp)	Reference
<i>ureC</i> -5'	TCCGGAATAGGTAAAGCGGG	60	448	[18]
<i>ureC</i> -3'	CTTGAATATCCATCTCATCTGC			
<i>dly</i> -5'	CCTATGGGACATGAATGG	55	549	[19]
<i>dly</i> -3'	GCTCTAGGCTAAATGAATC			
<i>hlyA_{pI}</i> -5'	GCTATAAATGAATAAGAAAA	53	767	[20]
<i>hlyA_{pI}</i> -3'	TTGAAGCTAACTCAAAAA			
<i>Ori_{pPHDD1}</i> -F	TGGAATAACTATGAGTAACA	57	3 052	[21]
<i>Ori_{pPHDD1}</i> -R	CATTACCAAACATCTACAT			
<i>p145</i> F	TTCGGTTGCCCTAGATATAC	54	700	This study
<i>p145</i> R	CTCTACCTTACTTGCCTCAT			
<i>p290</i> F	GTTAAGAACGCAACTAACGA	54	761	This study
<i>p290</i> R	AGTAGATTTTGTCTGCTTG			
<i>p560</i> F	ATTAACAACAGCGTGGATTC	54	756	This study
<i>p560</i> R	TTTGTCCCTGTTTGTCTATC			
<i>p635</i> F	ACTATAGCGAAAAGTCTGCT	54	796	This study
<i>p635</i> R	CTTGTTGAATAGCTTGCTCA			
<i>p720</i> F	TGAAGGAAATGAACTAGCCA	54	788	This study
<i>p720</i> R	CAAACTTTGTCCATCACCT			
<i>p765</i> F	GTTGAAGCATTGACTACACA	54	897	This study
<i>p765</i> R	TAACTCGTCCCTGTATTGAG			

1.5 野生株与质粒缺失株的形态特征

将纯化好的 PDD1608 野生株和 Δ pPDD1608 质粒缺失株单菌落分别于 TSB 固体培养基上进行划线培养, 置于 28 °C 培养 48 h 后观察菌落生长情况及菌落形态, 并通过扫描电镜观察并分析 PDD1608 与 Δ pPDD1608 细胞形态差异。

1.6 野生株与质粒缺失株的生理生化特征

采用细菌微量生化鉴定管进行 PDD1608 野生株和质粒缺失株的生理生化表型测定, 将纯化好的 PDD1608 和 Δ pPDD1608 单菌落分别接种于微量生化鉴定管内, 置于 28 °C 培养 24–48 h 后观察并记录实验结果。

1.7 野生株与质粒缺失株的抗生素药物敏感性

采用 K-B 纸片扩散法对 PDD1608 野生株和 Δ pPDD1608 质粒缺失株进行药敏试验。将提前纯化培养好的野生株和质粒缺失株菌体于无菌 1.5% NaCl 溶液中进行重悬, 制成 10^6 CFU/mL 的菌悬液, 吸取 100 μ L 菌悬液涂布于 TSB 固体培养基。将药敏纸片贴于涂菌的平板上, 28 °C 倒置培养 24 h, 测量抑菌圈直径并判定菌株对药物的敏感情况。实验结果的判定依据美国临床和实验室标准协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 抗生素敏感试验标准, 将耐药情况分为敏感 S (sensitive)、中介 I

(intermediate)、耐药 R (resistant)^[22]。

1.8 野生株与质粒缺失株的溶血和磷脂酶活性检测

溶血和磷脂酶活性使用绵羊血平板与卵黄平板进行检测。取纯化培养好的 PDD1608 野生株及 Δ pPDD1608 质粒缺失株菌体重悬于无菌 1.5% NaCl 溶液中制成 10^8 CFU/mL 的菌悬液, 分别向绵羊血平板、卵黄平板孔中加入 100 μ L 菌悬液进行溶血性及磷脂酶活性的测定, 对照组为等量的无菌 TSB 液体培养基, 在 28 $^{\circ}$ C 恒温静置培养 24–48 h, 及时观察并记录实验结果。

1.9 野生株与质粒缺失株的致病性分析

采用人工注射感染许氏平鲈的方式验证 PDD1608 野生株及 Δ pPDD1608 质粒缺失株的致病性差异。取 90 条健康许氏平鲈随机分成 3 组, 每组 30 条。两个实验组的每尾鱼分别注射浓度为 3×10^8 CFU/mL 的野生株和质粒缺失株活菌液 100 μ L, 对照组注射等量的无菌 1.5% NaCl 溶液。注射感染后每 12 h 记录死亡数量, 直至连续 4 d 以上未再出现死亡后停止记录。

2 结果与分析

2.1 PDD1608 质粒缺失株的最佳诱导条件

在培养基中加入不同梯度的 SDS 质粒消除剂后, 菌株 PDD1608 的生长特性如图 1 所示。

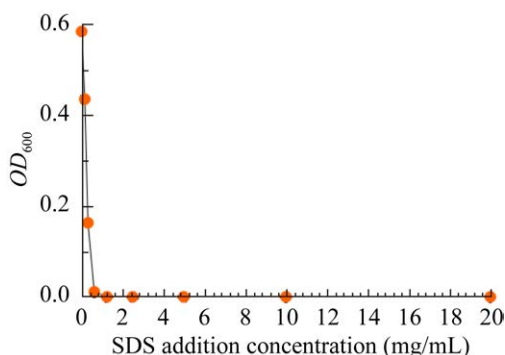


图 1 不同 SDS 浓度对菌株 PDD1608 生长的影响
Figure 1 The impact of different SDS concentration on the growth of strain PDD1608.

当 SDS 添加浓度 ≥ 0.625 mg/mL 时, 菌株 PDD1608 完全停止生长, 表明 0.625 mg/mL 的 SDS 添加浓度是抑制菌株 PDD1608 生长的最低浓度。SDS 添加浓度 ≤ 0.15625 mg/mL 时抑菌效果不明显, 添加浓度为 0.3125 mg/mL 时, 菌株 PDD1608 生长受到明显抑制但并未完全停止生长, 因此选取 0.3125 mg/mL 作为后续质粒消除的 SDS 添加浓度。

2.2 菌株 PDD1608 质粒消除效果检测

采用变温-SDS 处理法在传代培养 3 个周期即交替接种传代 12 次后, 对质粒特异性基因 PCR 扩增结果表明, 获得的质粒缺失株除 PDD 特异基因 *ureC* 外, 其质粒复制起始位点基因 *Ori_pPHDD1*、质粒毒力基因 *dly* 和 *hlyA_{pl}*、质粒特异基因 (*p145*、*p290*、*p560*、*p635*、*p720*、*p765*) 扩增结果均为阴性, 野生株基因扩增结果均为阳性, 表明该方法对 PDD1608 内的质粒具有较佳的去除效果(图 2)。同时, 质粒消除的菌株经过连续传代后再次经 PCR 检测结果依然为阴性, 确定为可稳定传代的质粒缺失株。

2.3 野生株与质粒缺失株的形态特征比较

野生株 PDD1608 及质粒缺失株 Δ pPDD1608 的形态特征如图 3 所示。经 48 h 培养后, 二者在平板上单菌落均呈现浅黄色不透明状, 边缘光滑, 扁平、圆形。电镜观察二者菌体均呈短杆状、两端钝圆。观察结果表明质粒 pPDD1608 的缺失并未对菌株的形态造成明显改变。

2.4 野生株与质粒缺失株的生理生化特征比较

野生株 PDD1608 及质粒缺失株 Δ pPDD1608 的生理生化特征鉴定结果如表 2 所示。野生株和质粒缺失株除葡萄糖、鼠李糖、尿素酶及 V-P 试验生化反应呈阳性外, 其余生化反应均表现为阴性, 表明质粒 pPDD1608 的缺失并未对所测定的 PDD 菌株 26 种生理生化表型造成改变。

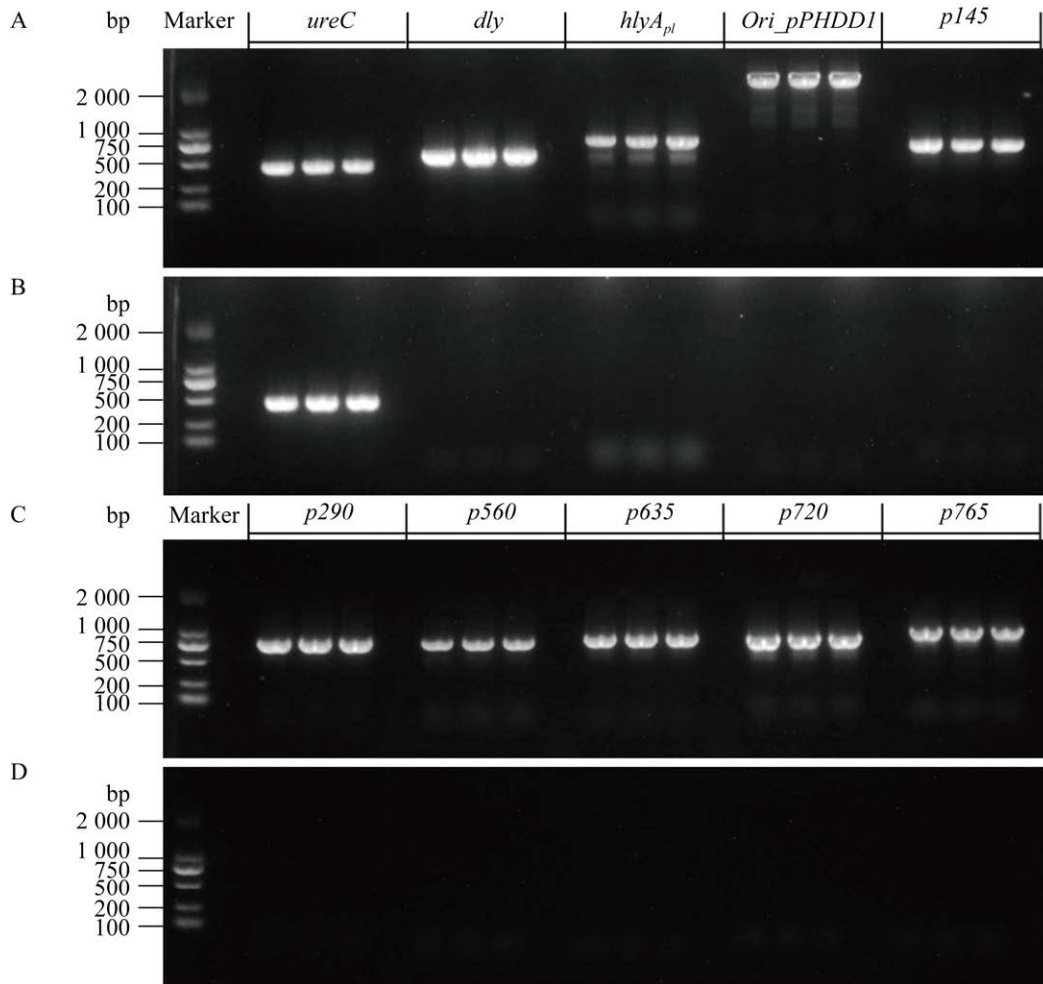


图 2 菌株 PDD1608 和 Δ pPDD1608 不同基因的 PCR 检测结果 A: 菌株 PDD1608 的 *ureC*、*dly*、*hlyA_{pt}*、*Ori_pPHDD1*、*p145*。B: 菌株 Δ pPDD1608 的 *ureC*、*dly*、*hlyA_{pt}*、*Ori_pPHDD1*、*p145*。C: 菌株 PDD1608 的 *p290*、*p560*、*p635*、*p720*、*p765*。D: 菌株 Δ pPDD1608 的 *p290*、*p560*、*p635*、*p720*、*p765*

Figure 2 PCR detection results of different genes in strain PDD1608 and Δ pPDD1608. A: *ureC*, *dly*, *hlyA_{pt}*, *Ori_pPHDD1*, *p145* of strain PDD1608. B: *ureC*, *dly*, *hlyA_{pt}*, *Ori_pPHDD1*, *p145* of strain Δ pPDD1608. C: *p290*, *p560*, *p635*, *p720*, *p765* of strain PDD1608. D: *p290*, *p560*, *p635*, *p720*, *p765* of strain Δ pPDD1608.

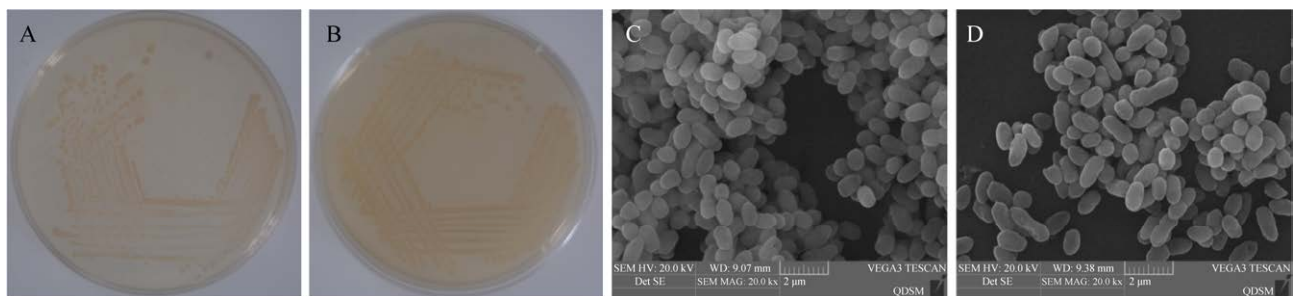


图 3 PDD1608 和 Δ pPDD1608 的形态特征 A: 菌株 PDD1608 在 TSB 固体培养基上的菌落形态。B: 菌株 Δ pPDD1608 在 TSB 固体培养基上的菌落形态。C: 菌株 PDD1608 电镜观察结果。D: 菌株 Δ pPDD1608 电镜观察结果

Figure 3 Morphological features of strain PDD1608 and Δ pPDD1608. A: Colony morphology of strain PDD1608 on TSB solid medium. B: Colony morphology of strain Δ pPDD1608 on TSB solid medium. C: Observation results of strain PDD1608 under electron microscopy. D: Observation results of strain Δ pPDD1608 under electron microscopy.

表 2 野生株 PDD1608 与质粒缺失株 Δ pPDD1608 生理生化特征差异

Table 2 Physiological and biochemical characteristics analysis of PDD1608 and Δ pPDD1608 strains

Item	PDD1608	Δ pPDD1608
10% NaCl pancreatic peptone water	-	-
6% NaCl pancreatic peptone water	-	-
3% NaCl pancreatic peptone water	-	-
Salt free pancreatic peptone water	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-
Glucose	+	+
Rhamnose	+	+
Amygdalin	-	-
Lactose	-	-
Lysine decarboxylase	-	-
Melibiose	-	-
Mannitol	-	-
Inositol	-	-
Sucrose	-	-
Sorbitol	-	-
Xylose	-	-
Urease	+	+
Gelatin	-	-
Arabitol	-	-
MR-VP	-	-
Malonate	-	-
Simons citrate	-	-
H ₂ S	-	-
Indole	-	-
V-P test	+	+
Oxidase	-	-

-: Negative; +: Positive.

2.5 野生株与质粒缺失株的抗生素药物敏感性分析

野生株 PDD1608 及质粒缺失株 Δ pPDD1608 的 30 种抗生素药物敏感性结果如表 3 所示。野生株和质粒缺失株对米诺环素、多西环素、萘啶

酸和复方新诺明等 19 种抗生素均表现出高度或中度敏感，而对其余 11 种抗生素表现出药物抗性。结果表明质粒 pPDD1608 的缺失未造成 PDD 菌株对测定的抗生素药物敏感性的改变，也间接证实该质粒上携带的相关抗生素耐药基因未表达或不是介导 PDD 抗生素药物抗性的主效基因。

2.6 野生株与质粒缺失株的溶血和磷脂酶活性检测结果

野生株 PDD1608 表现出极强的溶血性和磷脂酶活性，而质粒缺失株 Δ pPDD1608 相较于野生株，在绵羊血平板上溶血圈和在卵黄平板上呈现的不透明环直径明显减小，但并未完全消失，溶血环和磷脂酶环半径分别由 5.56 mm 和 7.65 mm 降至 1.90 mm 和 4.15 mm，表现为弱溶血性与弱磷脂酶活性(图 4)。实验结果证实，质粒 pPDD1608 的缺失对 PDD1608 的毒力相关代谢表型造成了明显的影响。

2.7 野生株与质粒缺失株对许氏平鲈的致病性结果

人工感染实验表明，野生株 PDD1608 组实验鱼 12 h 内死亡率为 76.6%，24 h 内全部死亡。质粒缺失株 Δ pPDD1608 组实验鱼 12 h 死亡率为 53.3%，24 h 死亡率为 56.6%，72 h 死亡率为 63.3%，并直至 168 h 内未出现新的死亡个体。对照组许氏平鲈实验期间状态正常，未出现死亡。实验结果表明，在相同菌液浓度条件下，野生株 PDD1608 活菌液注射感染许氏平鲈后，短时间内就造成了实验鱼的全部死亡，表现出极强的致病力。而质粒缺失株 Δ pPDD1608 菌株注射感染许氏平鲈后的存活率明显高于野生株，证明质粒 pPDD1608 的缺失对 PDD 的致病力影响显著，导致其毒力明显降低(图 5)，证实质粒 pPDD1608 是 PDD 的关键毒力元件。

表 3 野生株 PDD1608 与质粒缺失株 Δ pPDD1608 抗生素药物敏感性差异Table 3 Antibiotic sensitivity analysis of PDD1608 and Δ pPDD1608 strains

抗生素药物 Antibiotic	抑菌圈判断标准		抑菌圈直径		结果判定	
	Judgment		Antibacterial circle diameter (mm)		Result	
	R	S	PDD1608	Δ pPDD1608	PDD1608	Δ pPDD1608
红霉素 Erythromycin	≤13	≥23	9.8	9.3	R	R
米诺环素 Minocycline	≤12	≥16	17.8	16.0	S	S
多西环素 Doxycycline	≤10	≥14	17.7	15.2	S	S
四环素 Tetracycline	≤11	≥15	15.8	15.0	S	S
新霉素 Neomycin	≤17	≥23	10.8	10.2	R	R
萘啶酸 Nalidixic acid	≤13	≥19	27.7	22.3	S	S
链霉素 Streptomycin	≤11	≥15	7.7	5.3	R	R
卡那霉素 Kanamycin	≤13	≥18	10.3	10.0	R	R
庆大霉素 Gentamicin	≤12	≥15	9.8	9.7	R	R
丁胺卡那 Amikacin	≤13	≥18	8.7	6.3	R	R
利福平 Rifampicin	≤16	≥20	16.7	16.5	I	I
复方新诺明 Compound sulfamethoxazole	≤10	≥16	17.5	18.2	S	S
新生霉素 Novobiocin	≤17	≥22	20.2	17.5	I	I
多黏菌素 B Polymyxin B	≤11	≥12	9.8	10.0	R	R
环丙沙星 Ciprofloxacin	≤15	≥21	24.2	21.3	S	S
氧氟沙星 Ofloxacin	≤12	≥16	22.3	18.8	S	S
诺氟沙星 Norfloxacin	≤12	≥17	17.8	20.0	S	S
头孢唑肟 Ceftizoxime	≤21	≥25	26.7	27.2	S	S
头孢噻肟 Cefotaxime	≤22	≥26	28.2	26.5	S	S
氨苄西林 Ampicillin	≤13	≥17	0.0	0.0	R	R
头孢氨苄 Cefalexin	≤14	≥18	15.7	16.2	I	I
氯霉素 Chloramphenicol	≤12	≥18	21.0	21.3	S	S
恩诺沙星 Enrofloxacin	≤15	≥19	23.0	19.2	S	S
氟苯尼考 Florfenicol	≤12	≥18	21.3	22.3	S	S
甲氧苄啶 Trimethoprim	≤10	≥16	16.8	18.2	S	S
氨苄西林-舒巴坦 Ampicillin-sulbactam	≤14	≥20	19.0	17.8	I	I
甲砒霉素 Thiamphenicol	≤12	≥18	0.0	0.0	R	R
氟甲喹 Flumequine	≤10	≥20	26.5	29.2	S	S
磺胺间甲氧嘧啶 Sulfamonomethoxine	≤12	≥17	0.0	0.0	R	R
磺胺二甲嘧啶 Sulfamethazine	≤12	≥17	0.0	0.0	R	R

R: 耐药; I: 中介; S: 敏感

R: Resistant; I: Intermediate; S: Sensitive.

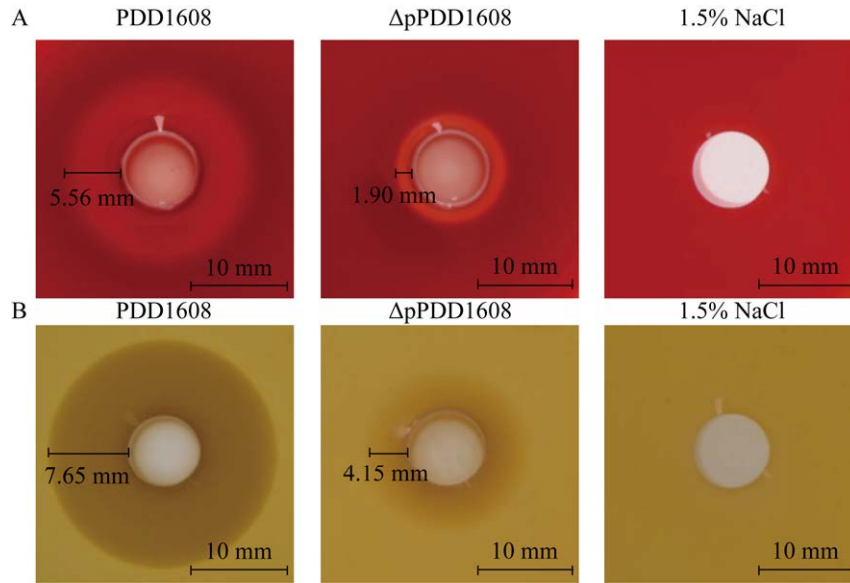


图4 野生株 PDD1608 及质粒缺失株 Δp PDD1608 溶血活性及磷脂酶活性差异 A:溶血活性测定结果. B: 磷脂酶活性测定结果

Figure 4 Phospholipase and hemolytic activity analysis of strain PDD1608 and Δp PDD1608. A: Hemolytic activity. B: Phospholipase activity.

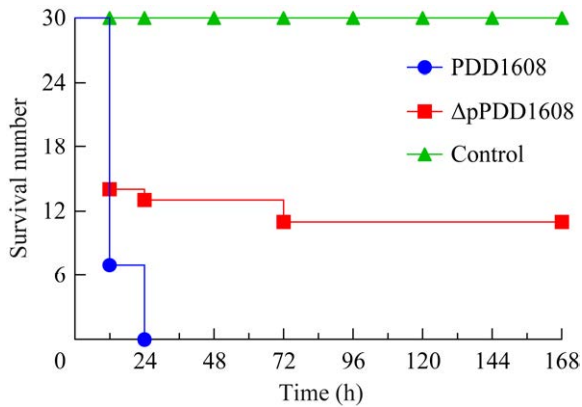


图5 注射 PDD1608 和 Δp PDD1608 感染许氏平鲈实验结果

Figure 5 Experimental results of injecting PDD1608 and Δp PDD1608 to infect the *Sebastes schlegeli*.

3 讨论与结论

本实验室前期的研究发现, 来源不同的 PDD 菌株溶血性、磷脂酶活性、致病力、生理生化表型及耐药性存在不同程度的差异^[23]。国

外的研究也发现, 具有强溶血性与强致病力的 PDD 菌株携带有毒力大质粒, 其携带毒力基因 *dly* 与 *hlyA_{pl}*, 也有报道毒力质粒编码 T3SS 与铁转运相关蛋白受体等毒力因子, 表明其在多方面影响 PDD 菌株对宿主的致病力^[6,14,24]。尽管对 PDD 毒力质粒结构与功能已有一些研究, 但对于 PDD 毒力质粒的去除方法, 以及毒力质粒缺失对菌株形态学特征、生理代谢特性和致病力强弱的影响还缺乏相关报道。

某些质粒会在细菌生长过程中自发丢失, 但多数质粒在细菌内的存在较为稳定, 并且由于质粒本身结构的高度异质性, 导致并无通用性的质粒消除方法^[11,24]。同时, 验证质粒消除与否的方法较多, 如直接提取质粒并进行凝胶电泳验证、PCR 验证质粒特异基因及通过细菌表型验证等方法^[25-27]。野生株 PDD1608 携带一个 162 kb 毒力大质粒, 为了避免大质粒消除过程中对基因组产生较大影响, 本研究选择 SDS 结合变温法连

续传代对 PDD1608 菌株的质粒进行消除, 通过对质粒特异性基因进行 PCR 检测以验证质粒消除情况。PCR 检测结果表明, 该方法成功构建了 PDD1608 能够稳定传代的质粒缺失株 $\Delta pPDD1608$, 为 PDD 质粒消除效果的进一步研究奠定了基础。

在以往对某些细菌质粒的研究中, 质粒或质粒携带的特定基因缺失对细菌形态学特征、生理生化特性及抗药性等方面的影响均有广泛报道。Rabel 等^[28]发现在质粒基因 *trbE* 突变的情况下, 大肠杆菌产生菌毛能力完全丧失。Hao 等^[29]通过消除肠杆菌科有关质粒使其对碳青霉烯类抗生素重新敏感。也有研究发现, 质粒消除后对原细菌的生理生化特性无明显影响^[30-31]。本研究在获得能够稳定传代的质粒缺失株 $\Delta pPDD1608$ 后, 对野生株与质粒缺失株进行形态学、药物敏感性与生理生化特征比较。结果表明, 相较于野生株, 质粒缺失株菌落与菌体形态、生理生化特性与抗生素药物敏感性检验均未出现明显差异, 推断该质粒对菌株 PDD1608 基础生理生化特性的调控与表型无明显影响, 属于 PDD 生理代谢非必要遗传结构元件。

以往对 PDD 的研究结果表明, 除了毒力质粒所携带的毒力因子外, 其染色体中同样含有具溶血素活性与磷脂酶活性等毒力因子的编码基因 *hlyA_{ch}* 及 *plpV*, 因此无毒力质粒的 PDD 菌株仍有较弱的溶血能力与磷脂酶活性^[6]。本研究在对野生株与质粒缺失株的溶血能力及磷脂酶活性差异验证中, 相较于野生株, 质粒缺失株的溶血能力和磷脂酶活性均降低, 表现为弱溶血性与弱磷脂酶活性。之前的研究中, Rivas 等^[7]发现 *dly* 与 *hlyA_{ch}*、*hlyA_{pl}* 之间具有协同效应, *dly* 的存在会增强 *hlyA* 对宿主的溶血作用, *dly* 与 *hlyA_{pl}* 的缺失会导致 PDD 的溶血能力大幅减弱, 同时 *dly* 基因的缺失还会直接导致菌株磷脂酶活性大

幅降低。此外, Puentes 等^[15]发现 PDD 质粒上可能含有一种潜在的铁载体调控因子, 调控 PDD 在铁缺乏时的铁载体与其他毒力因子蛋白的合成。本研究证实了毒力质粒的缺失对 PDD1608 的溶血能力及磷脂酶活性产生了较大影响, 这与国外对 *dly* 与 *hlyA_{pl}* 等毒力基因的研究结果高度一致, 但由于染色体毒力因子的存在, 使其溶血能力和磷脂酶活性并未完全丧失。

在以往报道中除携带有毒力质粒的 PDD 菌株引起动物患病的案例外, 也存在无质粒菌株引起患病的案例, 但无质粒菌株溶血性、磷脂酶活性及对宿主致病力等方面明显低于含毒力质粒的菌株^[18-19,32]。Gupta 等^[33]研究发现, PDD 含毒力质粒菌株与无质粒菌株在相同剂量感染试验下, 对黄条魮 (*Seriola lalandi*) 的致死率差异显著。本研究中用野生株及质粒缺失株对许氏平鲉进行人工感染的结果显示, 在相同浓度菌液攻毒作用下两组实验鱼存活率同样差异明显, 野生株对许氏平鲉具有高致病力, 24 h 致死率达 100%, 而质粒缺失株致病力明显减弱但并非完全丧失, 7 d 致死率为 63.3%。本研究进一步证实了毒力质粒是介导 PDD1608 菌株强致病力的重要因素。

综上所述, 本研究建立了针对 PDD 的变温-SDS 质粒消除法, 实现对 PDD1608 菌株大型质粒的完全消除, 获得了能够稳定传代的质粒缺失株 $\Delta pPDD1608$, 并进一步证实该质粒的缺失对菌株的溶血能力、磷脂酶活性及致病性均有影响, 相关结果为进一步研究该质粒与 PDD 菌株致病力强弱的相关性提供了参考。同时, 获得的质粒缺失株可稳定传代, 也为后续深入分析该毒力质粒及染色质介导的 PDD 致病性和毒力蛋白分泌机制奠定了基础。

REFERENCES

- [1] LOVE M, TEEBKEN-FISHER D, HOSE JE, FARMER JJ 3rd, HICKMAN FW, FANNING GR. *Vibrio damsela*,

- a marine bacterium, causes skin ulcers on the damselfish *Chromis punctipinnis*[J]. *Science*, 1981, 214(4525): 1139-1140.
- [2] FOUZ B, LARSEN JL, NIELSEN B, BARJA JL, TORANZO AE. Characterization of *Vibrio damsela* strains isolated from turbot *Scophthalmus maximus* in Spain[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1992, 12: 155-166.
- [3] ZHANG Z, YU YX, WANG K, WANG YG, JIANG Y, LIAO MJ, RONG XJ. First report of skin ulceration caused by *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* in net-cage cultured black rockfish (*Sebastes schlegeli*) [J]. *Aquaculture*, 2019, 503: 1-7.
- [4] 杨楠, 张志强, 吴同垒, 王洪彬, 史秋梅, 高桂生. 半滑舌鳎源美人鱼发光杆菌美人鱼亚种的分离鉴定[J]. *中国兽药杂志*, 2018, 52(2): 19-25.
YANG N, ZHANG ZQ, WU TL, WANG HB, SHI QM, GAO GS. Isolation and identification of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from tongue sole [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2018, 52(2): 19-25 (in Chinese).
- [5] 吴同垒, 靳晓敏, 王洪彬, 陈玥, 张志强, 高桂生, 单晓枫, 史秋梅. 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, 39(10): 31-35.
WU TL, JIN XM, WANG HB, CHEN Y, ZHANG ZQ, GAO GS, SHAN XF, SHI QM. Prokaryotic expression and preparation of immune serum of *Hly_{ch}* gene of *Photobacterium damsela* [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2018, 39(10): 31-35 (in Chinese).
- [6] OSORIO CR, VENCES A, MATANZA XM, TERCETI MS. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, a generalist pathogen with unique virulence factors and high genetic diversity[J]. *Journal of Bacteriology*, 2018, 200(15): e00002-e00018.
- [7] RIVAS AJ, LEMOS ML, OSORIO CR. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, a bacterium pathogenic for marine animals and humans[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 283.
- [8] CHU WHW, TAN YH, TAN SY, CHEN YH, YONG M, LYE DC, KALIMUDDIN S, ARCHULETA S, GAN YH. Acquisition of regulator on virulence plasmid of hypervirulent *Klebsiella* allows bacterial lifestyle switch in response to iron[J]. *mBio*, 2023, 14(4): e0129723.
- [9] HALE TL. Genetic basis of virulence in *Shigella* species[J]. *Microbiological Reviews*, 1991, 55(2): 206-224.
- [10] 娄恺, 班睿, 赵学明. 细菌质粒的消除[J]. *微生物学通报*, 2002, 29(5): 99-103.
LOU K, BAN R, ZHAO XM. Plasmid curing in bacteria[J]. *Microbiology*, 2002, 29(5): 99-103 (in Chinese).
- [11] 冯俊, 张伟, 宋存江. 细菌内源质粒消除研究进展[J]. *微生物学报*, 2013, 53(11): 1142-1148.
FENG J, ZHANG W, SONG CJ. Progress in endogenous plasmid curing of bacteria—a review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(11): 1142-1148 (in Chinese).
- [12] 刘开放. 华南沿海哈维氏弧菌耐药性、质粒多样性及其相关性分析[D]. 海口: 海南大学硕士学位论文, 2017.
LIU KF. Resistance to Drugs, Plasmid diversity and its correlation analysis of *Vibrio harveyi* strains isolated from coastal areas of south China[D]. Haikou: Master's Thesis of Hainan University, 2017 (in Chinese).
- [13] 孙凤娇. 副溶血性弧菌 Chn25 菌株质粒和可移动元件消除及其对全基因组基因转录影响的研究[D]. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 2015.
SUN FJ. Impact of the deletion of plasmids and mobile genetic elements on the global-level gene transcription of *Vibrio parahaemolyticus* Chn25[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2015 (in Chinese).
- [14] RIVAS AJ, BALADO M, LEMOS ML, OSORIO CR. The *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* hemolysins damselysin and HlyA are encoded within a new virulence plasmid[J]. *Infection and Immunity*, 2011, 79(11): 4617-4627.
- [15] PUENTES B, BALADO M, BERMÚDEZ-CRESPO J, OSORIO CR, LEMOS ML. A proteomic analysis of the iron response of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* reveals metabolic adaptations to iron levels changes and novel potential virulence factors[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 201: 257-264.
- [16] 刘潇, 张正, 王丽芳, 于永翔, 王印庚, 廖梅杰, 谢国骊, 邢婧, 张浩, 王凯, 许悦. 海南地区与环渤海湾美人鱼发光杆菌美人鱼亚种水产动物分离株的表型与遗传特征分析[J]. *微生物学报*, 2021, 61(7): 2101-2111.
LIU X, ZHANG Z, WANG LF, YU YX, WANG YG, LIAO MJ, XIE GS, XING J, ZHANG H, WANG K, XU Y. Phenotypic and genetic diversity of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* isolated from aquatic animals in Hainan Province and Bohai Sea region[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(7): 2101-2111 (in Chinese).
- [17] 李永杰, 于永翔, 王印庚, 王春元, 刘定远, 张浩, 张正. 高致病性美人鱼发光杆菌美人鱼亚种胞外产物的毒力特性分析[J]. *微生物学报*, 2022, 62(8): 2995-3006.
LI YJ, YU YX, WANG YG, WANG CY, LIU DY, ZHANG H, ZHANG Z. Virulence of the extracellular products of highly pathogenic strains of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(8): 2995-3006 (in Chinese).
- [18] OSORIO CR, TORANZO AE, ROMALDE JL, BARJA JL. Multiplex PCR assay for ureC and 16S rRNA genes

- clearly discriminates between both subspecies of *Photobacterium damsela*[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2000, 40(3): 177-183.
- [19] OSORIO CR, ROMALDE JL, BARJA JL, TORANZO AE. Presence of phospholipase-D (*dly*) gene coding for damselysin production is not a pre-requisite for pathogenicity in *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*[J]. Microbial Pathogenesis, 2000, 28(2): 119-126.
- [20] RIVAS AJ, LABELLA AM, BORREGO JJ, LEMOS ML, OSORIO CR. Evidence for horizontal gene transfer, gene duplication and genetic variation as driving forces of the diversity of haemolytic phenotypes in *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2014, 355(2): 152-162.
- [21] VENCES A, RIVAS AJ, LEMOS ML, HUSMANN M, OSORIO CR. 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): e00401-e00417.
- [22] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, M100, 31st ed[S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2021.
- [23] 施琳妮, 于永翔, 姜勇, 张正, 王印庚, 廖梅杰, 荣小军. 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[J]. 海洋科学, 2019, 43(6): 15-24.
- SHI LN, YU YX, JIANG Y, ZHANG Z, WANG YG, LIAO MJ, RONG XJ. Studies on the phenotypic differences of different *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* strains[J]. Marine Sciences, 2019, 43(6): 15-24 (in Chinese).
- [24] 龙海英, 刘衡川, 方梅. 质粒消除方法及消除效果的评价研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(3): 413-415.
- LONG HY, LIU HC, FANG M. Study of plasmid curing methods and appraisal of plasmid elimination effect[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2007, 17(3): 413-415 (in Chinese).
- [25] COOPER C, BUYUK F, SCHELKLE B, SAGLAM AG, CELIK E, CELEBI O, SAHIN M, HAWKYARD T, BAILLIE L. Virulence plasmid stability in environmentally occurring *Bacillus anthracis* from North East Turkey[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2017, 110(1): 167-170.
- [26] 贾爱卿, 刘维红, 郭爱珍, 陈焕春. 一株猪源鼠伤寒沙门氏菌的耐药性鉴定及其消除[J]. 微生物学报, 2006, 46(5): 789-795.
- JIA AQ, LIU WH, GUO AZ, CHEN HC. Characterization of *Salmonella typhimurium* multidrug resistance and the reversal of antimicrobial resistance[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2006, 46(5): 789-795 (in Chinese).
- [27] 刘红英, 杨霞, 陈陆, 王新卫, 许兰菊, 王川庆. 人源志贺菌毒力大质粒体外转移及致病性分析[J]. 中国公共卫生, 2011, 27(9): 1126-1128.
- LIU HY, YANG X, CHEN L, WANG XW, XU LJ, WANG CQ. Transfer of strong virulent plasmid of human *Shigella in vitro* and pathogenicity of plasmid-transferred[J]. Chinese Journal of Public Health, 2011, 27(9): 1126-1128 (in Chinese).
- [28] RABEL C, GRAHN AM, LURZ R, LANKA E. The VirB4 family of proposed traffic nucleoside triphosphatases: common motifs in plasmid RP4 TrbE are essential for conjugation and phage adsorption[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(3): 1045-1058.
- [29] HAO MJ, HE YZ, ZHANG HF, LIAO XP, LIU YH, SUN J, DU H, KREISWIRTH BN, CHEN L. CRISPR-Cas9-mediated carbapenemase gene and plasmid curing in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2020, 64(9): e00843-20.
- [30] 吴红萍, 张飞官, 孟甜, 陈永安, 李文芳, 王丙乾, 王锐萍. 温泉嗜热菌 LY 的分离鉴定及质粒的初步研究[J]. 生物技术, 2012, 22(6): 56-60.
- WU HP, ZHANG FG, MENG T, CHEN YA, LI WF, WANG BQ, WANG RP. Isolation and identification of A thermophilic hot spring strain LY and its plasmid research[J]. Biotechnology, 2012, 22(6): 56-60 (in Chinese).
- [31] 吴威, 郑经成, 闫广谋, 王思洮, 盛相鹏, 胡丹, 张阳阳, 韩文瑜. 蜡样芽孢杆菌 ATCC14579 毒力基因 *plcR* 缺失株的构建及其一般特性[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(4): 658-664.
- WU W, ZHENG JC, YAN GM, WANG ST, SHENG XP, HU D, ZHANG YY, HAN WY. Construction and general characteristics of the *plcR* mutation in *Bacillus cereus* ATCC14579[J]. Genomics and Applied Biology, 2010, 29(4): 658-664 (in Chinese).
- [32] TERCETI MS, OGUT H, OSORIO CR. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, an emerging fish pathogen in the black sea: evidence of a multiclonal origin[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(13): 3736-3745.
- [33] GUPTA N, PARTRIDGE GJ, BULLER NB, PILMER L, CURRIE A, LYMBERY AJ. Genetic diversity of Australian isolates of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* is associated with virulence to yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*)[J]. Aquaculture, 2021, 538: 736552.