

乌鳢源舒伯特气单胞菌生物学特性及其药物敏感性分析

莫金凤¹, 姜 兰², 吴灶和^{1*}

(1. 仲恺农业工程学院广州市水产病害与水禽养殖重点实验室, 广东广州 510225;

2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东广州 510380)

摘要: 为了解乌鳢源舒伯特气单胞菌WL-4菌株的生理生化、生长特性、致病因子等生物学特征, 以及其对多种药物的敏感性, 使用细菌生化鉴定仪检测菌株的生理生化特性, 比较不同温度、盐度及pH条件下菌株的生长特征; 通过人工回归感染分析菌株的致病性, 测定相关的毒力因子并采用PCR方法扩增毒力基因; 采用微量二倍稀释法测试菌株对20种抗菌药物的最小抑菌浓度。结果发现, 与模式菌株(ATCC43700)相比, 两菌株的大部分生理生化特性相同, 16S rRNA基因比对, 相似度达99.9%; WL-4菌株的最适生长温度为30℃, 最适生长盐度为5, 最适生长pH为7; 29℃时, 腹腔注射感染乌鳢苗种的半数致死浓度(LC₅₀)为1.2×10⁶ CFU/mL; 该菌株具有溶血性、蛋白酶活性和脂肪酶活性; WL-4菌株对磺胺类及酰胺醇类等8种药物具有耐药性, 而对多西环素、新霉素、氨苄西林等12种药物敏感。研究表明, WL-4菌株的生物学特征与其引起的乌鳢内脏类结节病的发生情况相吻合, 致病菌的药物敏感性与药物使用情况存在相关性。

关键词: 舒伯特气单胞菌; 生长特性; 毒力因子; 药物敏感性

中图分类号: S 941

文献标志码: A

舒伯特气单胞菌归属温和气单胞菌复合群^[1]。舒伯特气单胞菌广泛存在于淡水、海水、土壤、鱼类和脊椎动物中, 可引起人类皮肤和组织感染^[2]、坏死性筋膜炎败血症^[3]等, 亦可引起养殖鱼类的内脏类结节病^[4-7], 是一种人—鱼共患条件性致病菌。目前对水产养殖中舒伯特气单胞菌的研究主要集中在病原菌的分离鉴定及快速检测方法^[4-9]等方面, 有关水产源舒伯特气单胞菌的生长特性、致病因子等方面的研究还较少。

舒伯特气单胞菌WL-4菌株是刘春等^[7]2011年在广东省中山地区养殖场分离的一株可引起乌鳢类结节病的病原菌, 本实验对该菌株的生理生化特征、生长特性、毒力因子等生物学特性及药物敏感性进行分析比较, 以期对舒伯特气单胞菌引起的乌鳢类结节病的有效防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验菌株 WL-4菌株为分离自乌鳢的舒伯特气单胞菌, 由中国水产科学研究院珠江水产研究所鱼病室分离保存^[7]; ATCC43700(舒伯特气单胞菌模式菌株), 购自美国标准生物制品收藏中心(ATCC)。

实验鱼 乌鳢, 体质量规格分别为(25±5)g和(120±20)g, 购自广东省佛山市顺德乌鳢养殖场, 在实验室水族箱暂养20 d以上, 采用镜检方法确定无寄生虫感染后用于攻毒试验。

试剂 ID32GN生化检测试剂条购自法国Biomerieux公司; Bacterial DNA Kit试剂盒购自美国OMEGA公司; 大豆酪蛋白琼脂(TSA)培养基、LB肉汤培养基、5%绵羊血平板等购自广东环凯微生物科技有限公司。

收稿日期: 2016-01-20 修回日期: 2016-02-23

资助项目: 广州市科技计划(201300000207); 广东省科技计划(2011B020307001)

通信作者: 吴灶和, E-mail: wuzaohe@163.com

1.2 仪器设备

ATB细菌半自动鉴定仪(法国Biomerieux公司), 麦氏比浊仪(法国Biomerieux公司)。

人工感染实验在室内1 m×1 m×0.5 m水泥池进行,具充氧和控温设备。

1.3 生理生化特性和16 S rRNA序列分析

生理生化特性测定 将菌株分别接种于TSA培养基,30 °C静置培养24 h,采用ID32GN生化试剂条,用ATB细菌半自动鉴定仪进行测定。

16 S rRNA基因序列 采用Bacterial DNA Kit试剂盒提取细菌的基因组DNA,放置在4 °C冰箱中备用。

16 S rRNA的扩增引物参考文献[10]合成;反应条件为95 °C预变性5 min,95 °C 30 s,55 °C退火30 s,72 °C延伸60 s,完成30个循环后于72 °C延伸10 min;PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测后委托广州艾基生物技术有限公司测序,测序结果上传至NCBI的Blast检索系统进行基因序列分析。

1.4 生长特性

生长曲线 参考韩文瑜等^[11]的方法,取30 °C条件下在LB肉汤中(160±5) r/min振荡培养8 h的WL-4新鲜菌液,用麦氏比浊仪将菌液浓度调整至 3.0×10^8 CFU/mL作为种子菌液,移取20 mL种子菌液接种于180 mL无菌肉汤培养基的250 mL三角烧瓶中,设3个平行,置30 °C培养箱中(160±5) r/min振荡培养,每间隔0.5~2 h,分别取5 mL培养液,测定OD₆₀₀值。以时间为横坐标,OD₆₀₀值为纵坐标绘制WL-4菌株的生长曲线。

温度对生长的影响 取在LB肉汤中(30 °C)振荡(160±5)r/min培养6 h的WL-4菌液,接种于LB肉汤培养基上,用麦氏比浊仪将细菌浓度调整至 3×10^7 CFU/mL,分装于无菌玻璃管中,将初液分装于无菌玻璃管中,每管5 mL,共100管,每个温度设10管平行,分别于5、10、15、20、25、30、35、40、45和50 °C恒温培养箱中静置培养,4 h后用麦氏比浊仪测定培养的菌液浓度。

pH值对生长的影响 将WL-4菌株分别接种于pH值为4、5、6、7、8、9、10、11的LB培养基中,调整菌液浓度为 3.0×10^7 CFU/mL,分装于无菌玻璃管中,每个pH值设10管平行,30 °C恒

温培养箱中静置培养,4 h后用麦氏比浊仪测定培养的菌液浓度。同时于静置培养前后,分别将细菌培养初液分别点种在TSA平板上,于30 °C静置培养24 h,观察细菌存活情况。

盐度对生长的影响 将WL-4菌株分别接种于盐度为0、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60的LB培养基中,分别调整菌液浓度为 3.0×10^7 CFU/mL,分装于无菌玻璃管中,每管5 mL,每个盐度设10管平行,30 °C恒温培养箱中静置培养,4 h后用麦氏比浊仪测定培养的菌液浓度。同时于静置培养前后,将细菌培养初液分别点种在TSA平板上,于30 °C静置培养24 h,观察细菌存活情况。

1.5 菌株的毒力特性

菌株对乌鳢的致病性 取纯化培养的细菌菌株,接种于LB肉汤培养基,30 °C振荡(160±5) r/min培养8h,用0.65%无菌生理盐水将菌液稀释成 4.8×10^7 、 1.2×10^7 、 3×10^6 和 7.5×10^5 CFU/mL 4个菌液浓度,腹腔注射感染健康乌鳢(25±5) g,0.2 mL/尾,每组10尾,对照组注射等量的0.65%无菌生理盐水。实验期间水温(29±1) °C,每天观察实验鱼的症状及记录死亡情况,连续观察7 d,使用SPSS16.0 for Windows软件辅助计算细菌的半数致死浓度(LC₅₀)。

温度对WL-4菌株致病性的影响 取纯化培养的菌株,接种于LB肉汤,30 °C振荡(160±5) r/min培养8h,用0.65%无菌生理盐水将菌液稀释成 1.5×10^6 CFU/mL,腹腔注射感染健康乌鳢(120±20) g,0.2 mL/尾,分为两组,每组50尾。分别控制实验水温为(29±1) °C和(23±1) °C,每天观察实验鱼的症状及记录死亡情况,连续记录7 d,计算不同水温下实验鱼的感染死亡率。

1.6 细菌的致病因子

溶血性、蛋白酶活性与脂肪酶活性测定 溶血性参考血平板法^[12],将菌株接种在5%绵羊血平板上,30 °C静置培养24 h,出现溶血圈则判断为具有溶血性。

蛋白酶活性参考脱脂奶平板法^[13],将菌株接种在含1%脱脂奶的TSA培养基平板上,30 °C静置培养24 h,若菌落周围出现清晰、透明的溶蛋白圈,则判断为具有蛋白酶活性。

脂肪酶活性参考文献[14]的方法,将菌株接

种在含1%吐温80的TSA培养基平板上, 30 °C静置培养24 h, 若菌落周围有白色沉淀带出现, 则判断为具有脂肪酶活性。

毒力基因检测 采用Bacterial DNA Kit试剂盒提取细菌的基因组DNA, 放置在4 °C冰箱中备用。

根据文献[6]合成溶血素(haemolysin, hly)、弹性蛋白酶(elastase, ela)和脂肪酶(lipase, lip)基因的扩增引物(表1)。反应条件为94 °C预变性5 min, 94 °C 30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸1.5 min, 完成30个循环后于72 °C延伸10 min。

表1 舒伯特气单胞菌溶血素、弹性蛋白酶和脂肪酶基因引物信息

Tab. 1 The primers of haemolysin gene, elastase gene and lipase gene

目的基因 target gene	PCR引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')
hly	F:ACTTCTCATAACCCCTGGAA
	R:CTGAACTCGTAGGGTAGGAG
ela	F:ACACGGTCAAGGAGATCAACGG
	R:GCTGGTGTGGCCAGCAGCAGGTAG
lip	F:ATCTTCTCCGAATGGTTCGG
	R:GCTGCCAGGACTGGGTCTTG

1.7 药物敏感性试验

选取7大类20种广谱抗菌药物, 其中包括磺胺类4种[磺胺间甲氧嘧啶(SMM)、磺胺二甲嘧啶/甲氧苄啶(S2/TMP)、磺胺嘧啶/甲氧苄啶(SD/TMP)、磺胺甲唑/甲氧苄啶(SXT)]、四环素类2种[四环素(TE)、多西环素(DO)]、喹诺酮类4种[萘啶酸(NA)、诺氟沙星(NOR)、恩诺沙星(ENR)、环丙沙星(CIP)]、氨基糖苷类4种[新霉素(N)、庆大霉素(CN)、阿米卡星(AK)、链霉素(S)]、β内酰胺类2种[氨苄西林(AMP)、头孢噻肟(CTX)]、酰胺醇类3种[甲砒霉素(THI)、氟苯尼考(FFC)、氯霉素(C)]、呋喃类1种[呋喃妥因(F)]。采用微量二倍稀释法测定药物对WL-4菌株的最小抑菌浓度(MIC), 参照美国国家临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)标准^[15-16]判断菌株的药物敏感性。

2 结果

2.1 菌株的生理生化特性

WL-4与ATCC43 700菌株的大部分主要生理生化特性相同, 如甘露醇、水杨素、蔗糖等均为阴性; 仅柠檬酸盐、戊酸盐、葵酸盐、组氨酸和丙氨酸的生化反应不同(表2)。PCR扩增WL-4和ATCC43 700菌株的16 SrRNA基因, 获得长度约1500 bp的片段, 测序后通过序列比对, 两菌株的相似度达99.9%。结合生理生化特性及16 SrRNA序列分析结果, 证实WL-4菌株确为舒伯特气单胞菌^[17]。

2.2 菌株的生长特征

WL-4菌株的生长曲线 30 °C时WL-4菌株生长良好, 0~1 h是菌株的迟缓期, 1~5 h是菌株的对数生长期(图1)。

温度对WL-4 菌株生长的影响 WL-4菌株在5 °C~50 °C的温度范围内, 均可生长, 最适的生长温度是30 °C(图2)。

pH值对WL-4菌株生长的影响 增菌培养前各pH值的细菌初液在TSA平板上均可培养出相似的单一菌落, 增菌培养4 h后除pH值为4和11的培养物在TSA平板上没有细菌菌落生长外, 其余的都培养出相似的单一菌落。WL-4菌株在pH5~10的范围内均可生长, 最适生长pH值为7(图3), 而pH值为4和11时会导致细菌死亡。

盐度对WL-4菌株生长的影响 增菌培养前各盐度的细菌初液在TSA平板上均可培养出相似的单一菌落, 增菌培养4 h后盐度为0~30的培养物在TSA平板上都培养出相似的单一菌落, 而盐度为35~60的培养物在TSA平板上培养的菌落随盐度升高而稀疏, 特别是盐度为60时只能观察到细小的三两个单菌落, 说明WL-4菌株在0~30的盐度范围内能够生长, 最适生长盐度为5, 盐度高于35时对该菌株的生长有抑制作用(图4)。

2.3 菌株对乌鳢的致病性

实验水温为(29±1)°C时, 攻毒1 d, 感染了WL-4菌的乌鳢就开始死亡, 腹部表面出现红肿现象, 第一、二天死亡的乌鳢内脏白点不明显, 较小且模糊, 第三天死亡的乌鳢内脏(肝、脾、肾等)出现明显的白点; 从肝脏白点中分离出优势菌株, 经鉴定是舒伯特气单胞菌, 再次人工感染也出现类似的症状。通过SPSS

表 2 舒伯特气单胞菌 ATCC43 700 株和 WL-4 株的生理生化特性

Tab. 2 Biochemical and physiological characteristics of *A. schubertii* ATCC43 700 strain and WL-4 strain

生化项目 biochemical item	结果(阳性+/阴性-) positive(+)/negative(-) result		生化项目 biochemical item	结果(阳性+/阴性-) positive(+)/negative(-) result	
	ATCC43700	WL-4		ATCC43700	WL-4
	L-阿拉伯糖 L-arabinose	-		-	水杨素 salicine
乙酸盐 sodium acetate	-	-	丝氨酸同化 L-serine	-	-
丙二酸盐 sodium malonate	-	-	蔗糖 D-saccharose	-	-
丙酸盐同化 acidepropionique	-	-	L-鼠李糖 L-rhamnose	-	-
D-山梨醇 D-sorbitol	-	-	脯氨酸 L-proline	-	-
衣康酸盐同化 acideitaconique	-	-	D-葡萄糖 D-glucose	+	+
2-酮基葡萄糖 potassium 2-cétogluconate	-	-	D-核糖 D-ribose	+	+
辛二酸盐同化 acide subérique	-	-	糖原 glycogène	+	+
5-酮基葡萄糖酸盐 potassium 5-cétogluconate	-	-	N-乙酰-葡萄糖胺 N-acétyl-glucosamine	+	+
3-羟基-丁酸盐 acide 3-hydroxybutyrique	-	-	4-羟基-苯甲酸同酸 4-hydroxybenzoïque	+	+
DL-乳酸盐同化 acidelactique	-	-	3-羟基-苯甲酸同酸 3-hydroxybenzoïque	-	-
D-蜜二糖 D-melibiose	-	-	柠檬酸盐利用 trisodium citrate	+	-
肌醇 inositol	-	-	组氨酸同化 L-histidine	+	-
L-岩藻糖 L-fucose	-	-	戊酸盐同化 acidecalérique	+	-
D-甘露醇 D-mannitol	-	-	葵酸盐 acidecaprique	+	-
D-麦芽糖 D-maltose	+	+	丙氨酸同化 L-alanine	+	-
氧化酶 oxidase	+	+	溶血 hemolysis	+	+

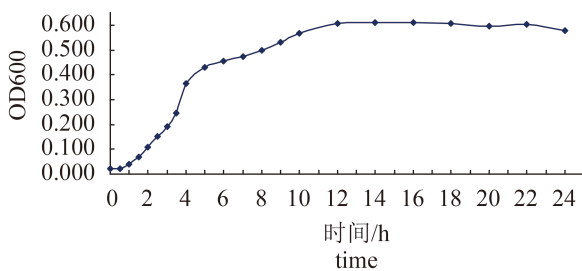


图 1 30 °C 时舒伯特气单胞菌 WL-4 菌株的生长曲线
Fig. 1 Growth curve of *A. schubertii* WL-4 strain at 30 °C

16.0 for Windows 软件辅助计算 WL-4 菌株的 LC₅₀, 结果为 1.2×10⁶ CFU/mL(表 3)。而感染了 ATCC43 700 菌的乌鳢没有死亡, 实验结束后解剖, 内脏也没有出现相关的病变症状。

使用 1.5×10⁶ CFU/mL 浓度的 WL-4 菌液腹腔注射感染健康乌鳢, 水温在 (29±1)°C 时, 乌鳢的死亡率达 66%, 而水温为 (23±1)°C 时, 感染的乌鳢

没有死亡, 实验结束后解剖, 内脏也没有出现明显的病变症状(表 4)。

2.4 致病因子

舒伯特气单胞菌溶血性、蛋白酶活性及脂肪酶活性结果 WL-4 和 ATCC43 700 菌株在 5% 绵羊血平板上 30 °C 静置培养 24 h 后, 菌落周围均出现了溶血圈(图 5-a); 在 1% 脱脂奶 TSA 平板上 30 °C 培养 24 h 后, 菌落周围均出现清晰透明的圈(图 5-b); 在 1% 吐温 80 TSA 培养基中 30 °C 培养 24 h 后, 菌落周围均出现白色沉淀带(图 5-c); 表明两株菌株均具有溶血性、蛋白酶活性和脂肪酶活性。

舒伯特气单胞菌溶血素、弹性蛋白酶及脂肪酶基因的扩增 通过 PCR 扩增, 在 ATCC43 700 菌株上获得 379 bp 片段的 *hly* 基因, 与 GenBank 上登录的嗜水气单胞菌(*Sb*)*hemolysin* 基因的同源性达 92%(图 6); 从 WL-4 菌株和 ATCC43 700 菌株上分别获得 515 和 499 bp 片段的 *ela* 基因, 分别与 GenBank

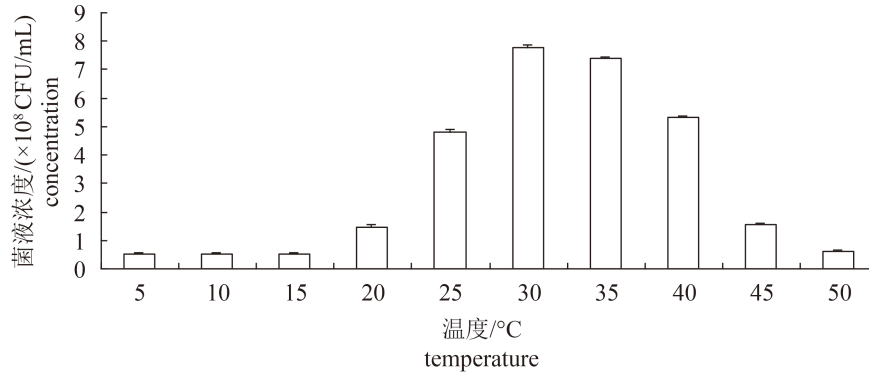


图2 温度对舒伯特气单胞菌WL-4菌株生长的影响

Fig. 2 Effect of temperature on the growth of *A. schubertii* WL-4 strain

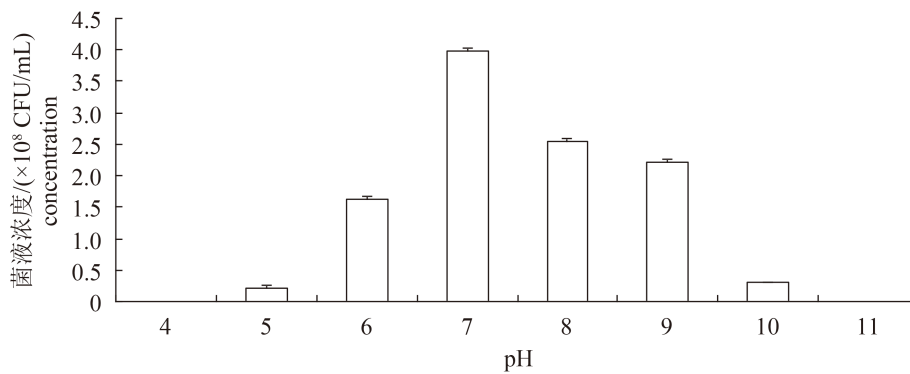


图3 30°C时pH值对舒伯特气单胞菌WL-4菌株生长的影响

Fig. 3 Effect of pH on the growth of *A. schubertii* WL-4 strain at 30 °C

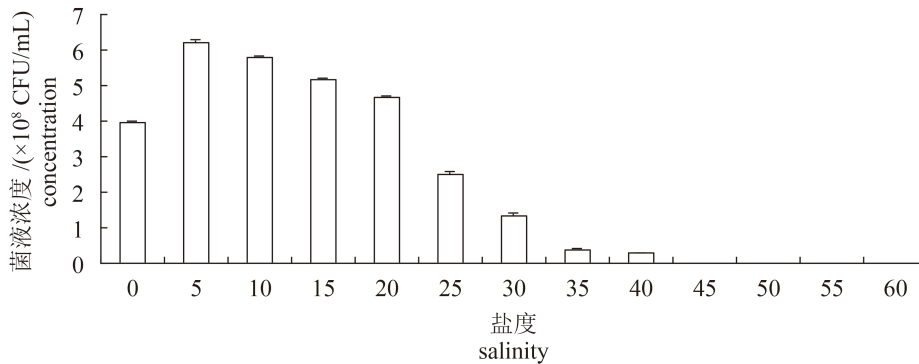


图4 30°C时盐度对舒伯特气单胞菌WL-4菌株生长的影响

Fig. 4 Effect of salinity on the growth of *A. schubertii* WL-4 strain at 30 °C

上登录的舒伯特气单胞菌(ZS20100725)*elastase*基因的同源性达99%和GenBank上登录的舒伯特气单胞菌(ATCC43 700)*elastase*基因的同源性达99%(图7);而在ATCC43 700菌株及WL-4菌株上均未扩增到脂肪酶基因。

2.5 药物敏感性

WL-4菌株对磺胺类(磺胺间甲氧嘧啶、复方

磺胺甲唑、复方磺胺二甲嘧啶和复方磺胺嘧啶)、酰胺醇类(氟苯尼考、甲砒霉素、氯霉素)及链霉素这8种药物具有耐药性,对喹诺酮类(萘啶酸、诺氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星)、氨基糖苷类(新霉素、庆大霉素、阿米卡星)、四环素类(多西环素、四环素)、 β -内酰胺类(氨苄西林、头孢噻肟)及呋喃妥因等12种药物敏感;而ATCC43 700菌株除了对氨苄西林具有耐药性外,对其余

表 3 29 °C时舒伯特气单胞菌WL-4菌株和ATCC43 700菌株对乌鳢的人工感染结果

Tab. 3 Artificial infection results of *A. schubertii* WL-4 strain and ATCC43 700 strain at 29 °C

菌株名称 strain	菌液浓度/(CFU/mL) concentration	数量/尾 number	累计死亡数/尾 accumulative death number							死亡率% mortality	LC ₅₀ / (CFU/mL)
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d		
WL-4	4.8×10 ⁷	10	10	10	10	10	10	10	10	100	1.2×10 ⁶
	1.2×10 ⁷	10	10	10	10	10	10	10	100		
	3×10 ⁶	10	1	5	6	7	7	7	70		
	7.5×10 ⁵	10	0	1	1	3	4	4	40		
	0(对照 control)	10	0	0	0	0	0	0	0		
ATCC43 700	4.8×10 ⁷	10	0	0	0	0	0	0	0	0	无 none
	1.2×10 ⁷	10	0	0	0	0	0	0	0		
	3×10 ⁶	10	0	0	0	0	0	0	0		
	0(对照 control)	10	0	0	0	0	0	0	0		

表 4 不同温度下舒伯特气单胞菌WL-4菌株对乌鳢的人工感染结果

Tab. 4 Artificial infection results of *A. schubertii* WL-4 strain at different temperature

感染温度/°C infection temperature	菌液浓度/(CFU/mL) concentration	数量/尾 number	累计死亡数/尾 accumulative death number							死亡率/% mortality
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	
29±1	1.5×10 ⁶	50	0	13	26	32	33	33	33	66
23±1	1.5×10 ⁶	50	0	0	0	0	0	0	0	0

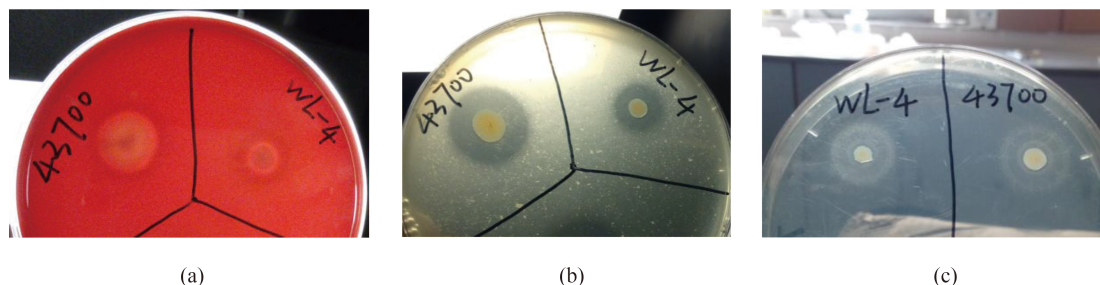


图 5 舒伯特气单胞菌WL-4和ATCC43 700菌株毒力因子表型结果

(a)溶血性; (b)蛋白酶活性; (c)脂肪酶活性

Fig. 5 Phenotypic determination of virulence factors of *A. schubertii* WL-4 strain and ATCC43 700 strain

(a) hemolytic; (b) positive for protease; (c) positive for lipase

19种药物都敏感(表5)。

3 讨论

WL-4菌株的生长特性测试结果显示, 菌株的最适生长温度为30 °C、最适生长盐度为5、最适生长pH值为7; 到目前为止, 舒伯特气单胞菌引起水产动物患病的报道均为淡水养殖鱼类和

蟹类^[4-7, 18-19], 而正常情况淡水养殖水环境的pH值大多在6.5~8.5; 还未见有海水动物受舒伯特气单胞菌感染发病的报道, 这与高盐度能抑制舒伯特气单胞菌生长的实验结果相吻合; 人工感染实验结果显示, 感染病原菌后的乌鳢在(29±1)°C的条件下时会发病死亡, 而在(23±1)°C的条件下未发病死亡。细菌性病原引发

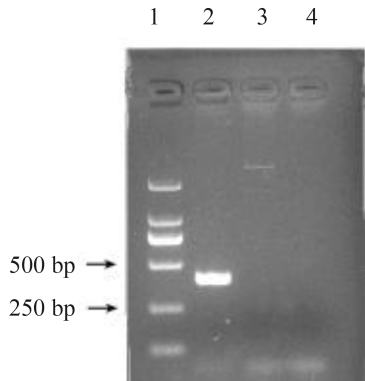


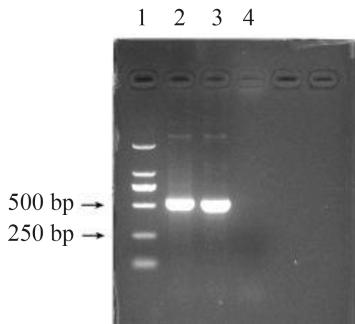
图6 舒伯特气单胞菌 *hly* 基因PCR结果

1. DNA Marker; 2. ATCC43700; 3. WL-4; 4. 阴性对照

Fig. 6 PCR amplification of haemolysin gene of

A. schubertii WL-4 and ATCC43 700 strains

1. DNA Marker; 2. ATCC43700; 3. WL-4; 4. negative control



1. DNA Marker; 2. ATCC 43700; 3. WL-4; 4. 阴性对照

图7 *ela* 基因PCR结果

Fig. 7 PCR amplification of elastase gene of

A. schubertii WL-4 and ATCC43700 strains

1. DNA Marker; 2. ATCC43700; 3. WL-4; 4. negative control

的水生动物疾病的暴发流行特征，与菌株的生长特性关系密切，高温养殖季节应提前预防舒伯特气单胞菌感染引起乌鳢类结节病的发生；运输和投放乌鳢苗种时，可考虑用偏酸性或碱性消毒剂浸泡消毒，抑制病原菌的生长；同时可适当提高养殖水体pH值以防控病害的暴发。

药物敏感性实验结果显示，ATCC43 700菌株除对氨苄西林耐药外，对其余19种药物均敏感；而WL-4菌株对磺胺类(SMM、SXT、SM2/TMP、SD/TMP)及酰胺醇类(FFC、THI、C)等药物均产生了耐药性，这可能与这些药物在水产养殖中使用普遍且时间较长有关。李爱华^[20]也认为，多数情况下细菌对某种药物产生抗性只发生在该药物引入使用之后，耐药菌株比例

随药物使用的增加而增加。同时，WL-4菌株对新霉素、多西环素、恩诺沙星、诺氟沙星等水产准许使用的药物仍具有较强的敏感性；在水产养殖高温季节可使用新霉素、多西环素、恩诺沙星、诺氟沙星等对舒伯特气单胞菌引起的乌鳢类结节病进行防控。此外，绝大多数的气单胞菌对氨苄西林均具有固有的耐药性，常在培养基中添加氨苄西林用于筛选培养气单胞菌；但WL-4菌株却对其敏感，氨苄西林对WL-4菌株作用的特性及新药开发与利用的可行性均有待进一步深入研究和探讨。

本研究涉及的WL-4菌株是刘春等^[7]2011年在广东省中山地区养殖场分离到的一株引起乌鳢患类结节病的病原菌，对乌鳢具有致病性；而舒伯特气单胞菌模式菌株ATCC43 700来源于人的前额脓肿^[21]，对小鼠有致死性^[22]。溶血素、弹性蛋白酶和脂肪酶是气单胞菌重要的毒力因子。气单胞菌溶血素是一种成孔毒素，作用于细胞膜，造成结构和功能的紊乱，使大量细胞内的成分泄露，导致细胞死亡，与致病性有密切关系^[23-25]。弹性蛋白酶是胞外蛋白酶的一种，以降解不溶性弹性蛋白为特征，刘永杰等^[26]证明了弹性蛋白酶是嗜水气单胞菌的一种重要毒力因子。脂肪酶被认为与微生物营养代谢有关，是一种细菌的毒力因子，抵抗白细胞^[27]。虽然，WL-4和ATCC43 700菌株都具有溶血性、蛋白酶活性和脂肪酶活性，但本试验只扩增到WL-4菌株的*ela*基因，而ATCC43 700菌株扩增出了*hly*和*ela*基因。WL-4菌株没能扩增到*hly*基因，可能该菌株的溶血素由其他基因编码或者由多基因编码；也可能该菌株的溶血性不是由溶血素主导，比如气溶素也具有溶血性，Kannan等^[28]就曾从粪便样本中分离到具有气溶素的舒伯特气单胞菌；Yutaka等^[29]从虾样品分离的舒伯特气单胞菌扩增到气溶素基因；程方俊^[30]在国内首次成功克隆了感染淡水鱼类的温和气单胞菌的脂肪酶基因；但舒伯特气单胞菌脂肪酶基因还未见有成功克隆的报道。不同来源舒伯特气单胞菌的致病性存在差异，或许与菌株的毒力基因存在差异有关，目前关于舒伯特气单胞菌致病因子的相关报道较少，致病因子表型与基因型间的联系及致病因子与致病性间的关系都值得进一

表 5 舒伯特气单胞菌WL-4菌株MIC及药物敏感性结果

Tab. 5 MIC results and susceptibility of *A. schubertii* WL-4 strain

药物名称 drug	药物敏感性折点/(mg/L) breakpoint		MIC结果/(mg/L)及药物敏感性 MIC results and susceptibility			
	敏感(S) sensitivity	耐药(R) resistance	ATCC43 700		WL-4	
磺胺间甲氧嘧啶 SMM	≤256	≥512	≤8	S	>512	R
磺胺甲噁唑/甲氧苄啶 SXT/TMP	≤2/38	≥4/76	≤9.5/0.5	S	>76/4	R
磺胺二甲嘧啶/甲氧苄啶 SM2/TMP	—	—	≤2.5/0.5	S	>20/4	R
磺胺嘧啶/甲氧苄啶 SD/TMP	—	—	≤2.5/0.5	S	>20/4	R
多西环素 DO	≤4	≥16	≤0.5	S	≤0.5	S
四环素 TE	≤4	≥16	≤0.5	S	≤0.5	S
萘啶酸 NA	≤8	≥32	≤0.5	S	8	S
环丙沙星 CIP	≤1	≥4	≤0.004	S	0.5	S
诺氟沙星 NOR	≤4	≥16	≤0.03	S	1	S
恩诺沙星 ENR	≤0.5	≥4	≤0.008	S	0.5	S
新霉素 N	≤4	≥16	≤1	S	≤1	S
庆大霉素 CN	≤4	≥16	1	S	≤0.25	S
阿米卡星 AK	≤16	≥64	1	S	≤0.5	S
链霉素 S	—	—	4	—	32	R
氨苄西林 AMP	≤8	≥32	32	R	4	S
头孢噻肟 CTX	≤8	≥64	0.06	S	0.12	S
氯霉素 C	≤32	≥32	≤2	S	64	R
氟苯尼考 FFC	≤2	≥8	≤1	S	32	R
甲砒霉素THI	—	—	≤2	S	>32	R
呋喃妥因 F	≤32	≥128	≤4	S	≤4	S

注: - 磺胺二甲嘧啶/甲氧苄啶、磺胺嘧啶/甲氧苄啶、链霉素和甲砒霉素在CLSI中没有相关的耐药判定标准

Notes: -, no interpretive criteria provided for sulphamethazine/trimethoprim, sulfadiazine/trimethoprim, streptomycin and thiamphenicil in CLSI

步研究。

编委推荐:

聂品(中国科学院水生生物研究所, 研究员)

何建国(中山大学生命科学学院, 教授)

参考文献:

- [1] 胡静仪, 王金良. 气单胞菌属分类与鉴定方法[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2004, 25(5): 478-479.
- Hu J Y, Wang J L. Classification and identification methods of Aeronmonas[J]. Foreign Medical (section of Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine), 2004, 25(5): 478-479(in Chinese).
- [2] Chao C M, Lai C C, Tang H J, *et al.* Skin and soft-tissue infections caused by *Aeromonas* species [J]. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2013, 4(32): 543-547.
- [3] Kao T L, Kao M L. A fatal case of necrotizing *Aeromonas schubertii* fasciitis afer penetrating injury [J]. American Journal of Emergency Medicine, 2012, 30: 258. e3-258. e5.
- [4] Liu J Y, Li A H. First case of *Aeromonas schubertii* infection in the freshwater cultured snakehead fish, *Ophiocephalus argus*(Cantor), in China [J]. Journal of Fish Diseases, 2012, 35: 335-342.
- [5] 罗霞, 邓国成, 廖国礼, 等. 斑鳢内脏白点病原的分

- 离鉴定[J]. 大连海洋大学学报, 2012, 27(2): 95–100.
- Luo X, Deng G C, Liao G L, *et al.* Isolation and identification of causative pathogen for visceral white spot in Taiwan snakehead *Channa maculate*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2012, 27(2): 95–100(in Chinese).
- [6] Chen Y F, Liang R S, Zhuo X L, *et al.* Isolation and characterization of *Aeromonas schubertii* from diseased snakehead, *Channa maculate* (Lacepède) [J]. Journal of Fish Diseases, 2012, 35(6): 421–430.
- [7] 刘春, 李凯彬, 王庆等. 杂交鳢(斑鳢♀×乌鳢♂)内脏类结节病原菌的分离、鉴定与特性分析[J]. 水产学报, 2012, 36(7): 1119–1125(in Chinese).
- Liu C, Li K B, Wang Q, *et al.* Isolation, identification and characterization of *Aeromonas shubertii* from hybrid snakehead (*Channa maculate* ♀×*C. argus* ♂)[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(7): 1119–1125(in Chinese).
- [8] 刘春, 李凯彬, 王庆, 等. 一种致病性鳢源舒伯特气单胞菌的双重PCR检测引物组、试剂盒及方法[P]. CN20120467910.
- Liu C, Li K B, Wang Q, *et al.* Double PCR detection primer group, kit and method of one pathogenic *Aeromonas shubertii* from snakehead[J]. CN201210467910(in Chinese).
- [9] 沈锦玉, 潘晓艺, 尹文林, 等. 一种舒伯特气单胞菌快速检测试剂盒及其检测方法[P]. CN201310482323.
- Shen J Y, Pan X Y, Yin W L, *et al.* Rapid detection kit and test method of *Aeromonas shubertii*[P]. CN201310482323(in Chinese).
- [10] Borrell N, Acinas S G, Figueras M, *et al.* Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16s rRNA genes [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1997, 35(7): 1671–1674.
- [11] 韩文瑜, 何昭阳, 刘玉斌. 病原细菌检验技术[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1992.
- Han W Y, He Z Y, Liu Y B. The inspection technology of pathogenic bacteria[M]. Changchun: Jilin Science and Technology Press, 1992(in Chinese).
- [12] 陈永富, 林丹娟. 水产品致病性气单胞菌的毒力检测与分析[J]. 浙江万里学院学报, 2009, 22(2): 62–66.
- Chen Y F, Lin D J. Detection and analysis of pathogenic *Aeromonas* in seafood[J]. Journal of Zhejiang Wanli University, 2009, 22(2): 62–66(in Chinese).
- [13] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 致病性嗜水气单胞菌检验方法: GB/T 18652-2002[S]. 北京: 中国标准出版社, 2002: 16–20.
- Methods for Detection of Pathogenic *Aeromonas Hydrophila*. Test method of pathogenic *Aeromonas hydrophila*: GB/T 18652-2002[S]. Beijing: China Standards Press, 2002: 16–20(in Chinese).
- [14] Voanmaele S, Defoirdt T, Cleenwerck I, *et al.* Characterization of the virulence of *Harveyi* clade vibrios isolated from a shrimp hatchery *in vitro* and *in vivo*, in a brine shrimp (*Artemia franciscana*) model system [J]. Aquaculture, 2015, 43: 528–32.
- [15] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-fifth informational supplement: M100-S25 [M]. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015: 44–50.
- [16] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria: M45A-A2 [M]. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010: 12–13.
- [17] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- Dong X Z, Cai M Y. Manual system identification of common bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001(in Chinese).
- [18] 余华, 何智, 严玉宝, 等. 温泉鱼致病性类志贺邻单胞菌和舒氏气单胞菌的分离鉴定和药敏试验[J]. 中国动物检疫, 2009, 26(7): 37–39.
- Yu H, Hu Z, Yan Y B, *et al.* Identification of *Plesiomonas shigelloides* and *Aeromonas shubertii* from doctor fish(*Garrarufa*) and antibiotics sensitivity[J]. China Animal Health Inspection, 2009, 26(7): 37–39(in Chinese).
- [19] 李福荣, 潘兹书, 肖玉玲等. 鳖腐皮病、疖疮病、水泡病致病细菌的研究[J]. 河南大学学报(自然科学版), 1994, 24(3): 89–93.
- Li F R, Pan Z S, Xiao Y L, *et al.* Study on germs causing disease of skin rot, furuncles and blisters of turtles[J]. Journal of Henan University(Natural Science), 1994, 24(3): 89–93(in Chinese).
- [20] 李爱华. 水产养殖中使用的抗菌药物及细菌耐药性[J].

- 中国水产科学, 2002, 9(1):87-91.
- Li A H. Antibacterial drugs used in aquaculture and drug resistance of fish bacterial pathogens[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2002, 9(1): 87-91(in Chinese).
- [21] Hickman-Brenner F W, Fanning G R, Arduino M J, *et al.* *Aeromonas schubertii*, a new mannitol-negative species found in human clinical specimens [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1988, 26(8): 1561-1564.
- [22] Kokka R P, Lindquist D, Abbott S L, *et al.* Structural and pathogenic properties of *Aeromonas schubertii* [J]. Infection and Immunity, 1992, 60(5): 2075-2082.
- [23] 陈希, 索占伟, 许剑琴, 等. 细菌溶血素的分类及代表性溶血素研究进展[J]. 畜牧兽医科学, 2008, 24(8): 16-22.
- Chen X, Suo Z W, Xu J Q, *et al.* Review on classification and representative species of hemolysin[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2008, 24(8): 16-22(in Chinese).
- [24] Goebel W, Chakreorty T, Kreft J. Bacterial hemolysins as virulence factors [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1988, 54:453-463.
- [25] Nizet V. Streptococcal β -hemolysins: genetic and role in disease pathogenesis [J]. Trends in Microbiology, 2002, 10(12): 575-580.
- [26] 刘永杰, 陆承平. 嗜水气单胞菌弹性蛋白酶的纯化及特性分析[J]. 中国兽医学报, 2006, 26(1): 54-56.
- Liu Y J, Lu C P. Purification and characterization of elastase from *Aeromonas hydrophila* strain J-1[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2006, 26(1): 54-56(in Chinese).
- [27] Roloff J, Braconier J H, Nilsson E P. Interference of *Staphylococcus aureus* lipase with human granulocyte function [J]. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 1988, 7(4): 505-510.
- [28] Kannan S, Suresh K P, Karkuzhali K, *et al.* Direct detection of diarrheagenic *Aeromonas* from faeces by polymerase chain reaction (PCR) targeting aerolysin toxin gene [J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2001, 5(3): 91-94.
- [29] Yutaka Y, Kaoru H. Occurrence, molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp. in marine species of shrimps cultured at inland low salinity ponds Yutaka Yano [J]. Food Microbiology, 2015, 47: 21-27.
- [30] 程方俊. 黄颡鱼溃疡综合征病原菌及主要毒力因子研究[D]. 重庆: 西南大学, 2012.
- Cheng F J. Studies on ulcerative disease syndrome pathogen of *Pelteobagrus fulvidraco* and its major virulence factors[D]. Chongqing: Southwest University, 2012(in Chinese).

Biological characteristics and drug susceptibility of *Aeromonas schubertii* WL-4 isolated from snakehead

MO Jinfeng¹, JIANG Lan², WU Zaohe^{1*}

(1. Key Laboratory of Aquatic Disease & Waterfowl Breeding of Guangzhou,
Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China;

2. Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture, Pearl River Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: *Aeromonas schubertii* had caused snakehead disease with white spots in internal organs, which resulted in economic losses in snakehead industry. In this study, *A. schubertii* strain WL-4 which was isolated from the snakehead (*Channa maculate* ♀×*C. argus* ♂) was analyzed in relation with its physiology and biochemistry characteristics, its growth characteristics and virulence factors, and its susceptibility was tested against 20 antibiotics. Its physiology and biochemistry characteristics were tested by using bacterial biochemical identification instrument and its growth situation was analyzed at different temperatures, salinities and pH values. In comparison with the type strain, *A. schubertii* ATCC43700, *A. schubertii* WL-4 strain was almost same as the type strain in major physiological and biological characteristics. Moreover, 16S rRNA gene of *A. schubertii* WL-4 strain is 99.9% similar to that in *A. schubertii* ATCC43700. The results of growth characteristics showed that the WL-4 strain's optimum growth temperature was 30 °C, optimal salinity was 5 and optimum pH was 7. In addition, the WL-4 strain exhibited virulence to snakeheads (25±5)g in experimental challenges with LC₅₀ being 1.2×10⁶ CFU/mL. The WL-4 strain was positive for hemolytic activity, and elastase and lipase activity by phenotypic determination. Susceptibility tests, which detected the minimum inhibition concentration (MIC) of 20 antibacterial agents by trace double dilution method, showed that the strain WL-4 was resistant to sulfonamides and amide alcohols, and susceptible to enrofloxacin, norfloxacin, doxycycline, neomycin, ampicillin and so on. In conclusion, biological characteristics of the WL-4 strain were consistent with the occurrence of the disease with white spots in snakeheads' internal organs which were caused by *A. schubertii*. In addition, the results of antibacterial susceptibility tests may have an applied value in the control of *A. schubertii* infection agents in aquaculture.

Key words: *Aeromonas schubertii*; growth characteristics; virulence factors; drug susceptibility

Corresponding author: WU Zaohe. E-mail: wuzaohe@163.com

Funding projects: Science and Technology Plan of Guangzhou (201300000207); Science and Technology Plan of Guangdong province(2011B020307001).