

文章编号: 1000-0615(2019)03-0671-08

DOI: 10.11964/jfc.20171011013

## L-半胱氨酸提高嗜水气单胞菌对氟苯尼考的敏感性

赵贤亮<sup>1,2</sup>, 靳朝晖<sup>1</sup>, 黄莎妮<sup>1</sup>, 陈鹤<sup>1</sup>, 李莉<sup>1</sup>, 孔祥会<sup>1,2\*</sup>

(1. 河南师范大学水产学院, 河南新乡 453007;

2. 河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453007)

**摘要:** 抗菌药物的应用能对细菌感染性疾病进行有效地控制和治理, 但水产动物养殖中滥用和误用抗菌药物导致耐药细菌的产生、养殖水环境污染和养殖动物药物残留等一系列问题, 应对和解决抗菌药物在水产动物养殖中的滥用问题已经刻不容缓。本研究通过抗菌药物杀菌、组织细菌清除、细菌攻毒、鱼体存活率统计和药物敏感性检测等方法, 探究外源L-半胱氨酸添加对氟苯尼考杀菌作用的影响。体外杀菌结果显示, 4.00 mmol/L L-半胱氨酸可使20.00~200.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氟苯尼考对嗜水气单胞菌的杀菌效率提高1.9~11.1倍, 其联合用药的杀菌作用具有剂量和时间依赖效应。组织细菌清除结果显示, 相比单独使用氟苯尼考, L-半胱氨酸与氟苯尼考合剂对鱼体肝脏、脾脏和肾脏组织中嗜水气单胞菌的清除能力提高4~16倍。细菌攻毒后, 采用注射和口服L-半胱氨酸或/和氟苯尼考进行治疗, 结果发现L-半胱氨酸与氟苯尼考合剂可大幅提高黄河鲤对嗜水气单胞菌的抗感染能力。同时, 单独添加L-半胱氨酸也能促进组织细菌的清除和鱼体的抗感染能力。细菌MIC测定结果显示, 添加1.00~4.00 mmol/L L-半胱氨酸使嗜水气单胞菌对氟苯尼考的敏感性提高2~4倍。由此推测, L-半胱氨酸可能通过增强嗜水气单胞菌对氟苯尼考的敏感性, 从而提高抗菌药物对鱼体细菌感染的防治效果。研究表明, L-半胱氨酸作为氟苯尼考的增效剂不仅可提高抗菌药物的防治效果, 而且可大幅降低抗菌药物的使用量, 对嗜水气单胞菌的防控具有一定的实际应用价值。

**关键词:** 嗜水气单胞菌; L-半胱氨酸; 氟苯尼考; 敏感性

**中图分类号:** S 941.42

**文献标志码:** A

近年来, 中国水产养殖业的发展取得了举世瞩目的成就, 养殖总产量居世界第一<sup>[1]</sup>。然而, 高密度、集约化的养殖模式, 加速了水产养殖动物微生物病害的发生, 不合理用药导致的药物残留问题, 不仅给渔业生产带来巨大的经济损失, 也影响了水产品的质量及人类的健康。研究发现, 目前人工养殖的水产动物疾病有180种以上, 每年因水产养殖病害造成的经济损失都在100亿元以上, 其中细菌性疾病最为普遍, 其发病区域广、流行时间长、控制难度

大, 因此所造成的经济损失占病害损失的70%以上<sup>[2]</sup>。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是淡水中最常见的一种病原微生物, 在河流、湖泊、池塘、动物体内等环境中广泛存在, 属条件性致病菌, 当环境条件恶劣或机体抵抗力下降时, 可导致鱼类、两栖类、爬行类等冷血动物和哺乳动物发病, 引发水生动物细菌性出血病、体表溃疡征以及哺乳动物腹泻等, 是一种典型的人、畜、鱼共患病病原菌<sup>[3-4]</sup>。

我国是抗菌药物生产和使用大国, 抗菌药

收稿日期: 2017-10-28 修回日期: 2018-03-09

资助项目: 国家自然科学基金(31502204); 河南省科技计划项目(172102310545); 广东省海洋生物技术重点实验室开放基金(GPKLMB201701); 河南师范大学优秀青年科学基金(5101229279105); 河南省水产动物免疫与疾病防控创新型科技团队(201706081)

通信作者: 孔祥会, E-mail: xhkong@htu.cn

物广泛应用于医疗卫生和农业养殖领域,在治疗细菌感染性疾病中起着重要的作用。但是,养殖工作者对于科学规范用药的意识不强,养殖过程中普遍存在抗菌药物误用、滥用情况,且水产致病菌耐药性监测数据的缺乏<sup>[5]</sup>,导致水产养殖过程中药物过度使用,进而引发一系列的细菌耐药、药物残留和水环境污染等问题。因此,应对和解决抗菌药物在水产动物养殖中的滥用问题已经刻不容缓<sup>[6]</sup>。

近年来,有学者提出通过调节细菌代谢环境能显著影响抗菌药物对细菌的杀菌能力<sup>[7]</sup>。小分子代谢物,如葡萄糖、果糖、甘露醇、维生素C、丙氨酸等均通过调节细菌胞内代谢状态来影响细菌对抗菌药物的敏感性<sup>[8-12]</sup>。Allison等<sup>[8]</sup>发现,添加特定代谢物到胞外环境可增强氨基糖苷类抗菌药物的杀菌能力。外源添加葡萄糖与氨基糖苷类抗菌药物可在2 h内杀灭99.9%的细菌,但单独使用抗菌药物并不会明显的杀菌效果。研究还发现,果糖也能明显促进氨基糖苷类对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的杀菌作用。Barraud等<sup>[9]</sup>研究发现,10~40 mmol/L甘露醇可提高铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)对妥布霉素的敏感性达1 000倍。Vilchère等<sup>[10]</sup>发现,将异烟肼和L-半胱氨酸添加到对异烟肼敏感的结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)培养基中,导致培养基中细菌全部死亡。同时,维生素C与异烟肼极大提高了对多耐结核分枝杆菌的杀灭能力。Peng等<sup>[11]</sup>发现,外源性葡萄糖或丙氨酸能激活TCA循环,促进NADH和质子动力势的产生,从而恢复耐药菌对卡那霉素的敏感性,高效杀死多重耐药菌。Su等<sup>[12]</sup>同样发现,外源添加果糖也能提高多重耐药迟缓爱德华菌(*Edwardsiella tarda*)对卡那霉素的敏感性。这些能显著提高细菌对抗菌药物敏感性的小分子物质可提高抗菌药物的作用效果,被称为新型的药物增效剂。与传统抗菌药物增效剂相比,小分子物质增效剂的优势在于利用现有抗菌药物,不需要研发新型抗菌药物即可应对细菌耐药的问题,同时,这些物质为生物体的代谢产物,是生命活动的重要参与者,不存在药物安全问题。基于上述原因,近年来利用小分子物质来增强细菌对抗菌药物的敏感性的研究逐渐受到重视。

氟苯尼考是新一代氯霉素类抗菌药物,广泛应用于畜牧养殖动物的疾病防治。然而,动

物性食品中氟苯尼考残留事件时有报道,大量氟苯尼考耐药菌株被检出,且耐药水平和耐药率快速升高<sup>[13-15]</sup>。近年来,课题组开展了抗菌药物增效剂和代谢物调节鱼体免疫方面的研究,前期工作中筛选到L-半胱氨酸对氟苯尼考的杀菌具有明显的促进作用。因此,本研究以黄鱼鲤(*Cyprinus carpio haematopterus*)为对象,在体外和体内分别开展L-半胱氨酸对氟苯尼考作用的影响,以期深入探究L-半胱氨酸与氟苯尼考合剂在动物疾病防治中的应用,为水产动物病害防控及抗菌药物的合理使用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细菌菌株及培养条件

实验用嗜水气单胞菌菌株(Ah01菌株)<sup>[16]</sup>由河南师范大学水产学院水产动物疾病研究室分离保存。细菌在脑心浸液肉汤(BHI)固体培养基上28 °C培养16 h,挑取单菌落于新鲜BHI液体培养基中过夜培养,再用无菌生理盐水(0.85%)清洗菌体3次,调整菌液终浓度至OD<sub>600</sub>=0.6,制备好的菌液用于抗菌药物杀菌实验和人工感染实验。

### 1.2 最低抑菌浓度(MIC)测定

氟苯尼考最低抑菌浓度测定采用微量肉汤稀释法进行。将2倍梯度稀释的氟苯尼考分别加到经灭菌的96孔板中,第1至第11孔加药液,每孔10 μL,第12孔不加药液作为生长对照。过夜培养的菌液经BHI培养基1:1 000稀释后,向每孔中加100 μL菌液(每孔约1×10<sup>5</sup>~2×10<sup>5</sup> CFU),密封后置28 °C培养箱中培养16~20 h,以能抑制细菌生长的最小药物质量浓度为最低抑菌质量浓度,实验重复3次。

### 1.3 添加外源L-半胱氨酸的抗菌药物杀菌实验

抗菌物体外杀菌实验依据Allison等<sup>[8]</sup>的方法,将制备好的菌液悬浮于M9基本培养基中(含10.00 mmol/L乙酸钠,1.00 mmol/L硫酸镁,0.10 mmol/L氯化钙),调整菌液终浓度至OD<sub>600</sub>=0.6。加入适量的L-半胱氨酸和抗菌药物于试管中,加含菌液的M9培养基至5 mL体系,28 °C培养。在特定的时间点(如无特殊说明为6 h),取100 μL样品,采用系列稀释法,取10 μL稀释好的菌液进行点板。平板放置于BHI固体培养基上28 °C培养16 h,计算菌落形成单位(CFU)。不经过抗菌药物和代谢物处理的样品作为起始细菌

数, 每平板含20~200个菌落的数据可用于统计分析。细菌存活率(percent survival)是抗菌药物或和*L*-半胱氨酸处理后的细菌CFU与对照组细菌CFU的百分比。

#### 1.4 实验鱼及鱼体组织细菌清除实验

黄河鲤购于河南省水产科学研究院鱼类繁育场, 体质量30~50 g。实验前随机选取5尾鱼, 取肝脏和脾脏组织进行细菌计数分析, 确保实验鱼健康, 可用于细菌感染性研究。无菌生理盐水稀释菌液至 $1 \times 10^7$  CFU/mL, 于腹鳍基部注射0.1 mL Ah01菌悬液。依据Peng等<sup>[1]</sup>的方法, 细菌感染24 h后, 黄河鲤随机分为4组, 每组6尾, 分别为对照组、10.00 mg/kg *L*-半胱氨酸组、25.00 mg/kg 氟苯尼考组、10.00 mg/kg *L*-半胱氨酸与25.00 mg/kg 氟苯尼考合剂组。抗菌药物或和*L*-半胱氨酸处理24 h后, 取鱼体肝脏、肾脏、脾脏组织并称重, 加入适量生理盐水充分研磨, 按“添加外源*L*-半胱氨酸的抗菌药物杀菌实验”方法进行梯度稀释和平板计数, 检测组织中的细菌含量(CFU/g)。

#### 1.5 给药及细菌攻毒实验

选择2倍LD<sub>50</sub>的剂量, 即100 μL  $5.0 \times 10^7$  CFU/mL的Ah01进行攻毒。依据Chen等<sup>[7]</sup>的方法, 240尾健康黄河鲤在注射嗜水气单胞菌1 h后, 分别采取口服灌喂及腹腔注射2种方式进行给药治疗。每种给药方式均分为4个组: 生理盐水作为对照组、10.00 mg/kg *L*-半胱氨酸组、25.00 mg/kg 氟苯尼考组、10.00 mg/kg *L*-半胱氨酸与25.00 mg/kg 氟苯尼考合剂组, 每组30尾鱼, 给药体积均为100 μL/尾。抗菌药物或和*L*-半胱氨酸给药后, 每12 h观察实验鱼死亡情况, 持续观察72 h, 统

计实验鱼死亡率。保护率=[1-(实验组死亡率/对照组死亡率)]×100%。

#### 1.6 数据分析

实验数据均以平均值±标准差(mean±SD)表示, 采用SPSS 22.0统计软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)。细菌存活率、细菌含量及实验鱼累积死亡率分析、作图采用GraphPad Prism 5软件,  $P < 0.05$ 为差异显著, 用“\*”标记,  $P < 0.01$ 为差异极显著, 用“\*\*”标记。

## 2 结果

### 2.1 *L*-半胱氨酸对氟苯尼考杀菌作用的影响

采用微量肉汤稀释法对本实验室分离到的Ah01进行最低抑菌质量浓度测定, 发现其MIC为5.00 μg/mL(表1)。与以往分离到的嗜水气单胞菌相比, 此菌株对氟苯尼考表现出一定程度的耐药性。为了探究*L*-半胱氨酸对Ah01药物敏感性的影响, 选择4.00 mmol/L *L*-半胱氨酸与不同剂量的氟苯尼考联合用药, 计算细菌的存活率。结果发现, 在没有抗生素的情况下, 4.00 mmol/L *L*-半胱氨酸对细菌的生长无显著影响。当20.00~200.00 μg/mL的氟苯尼考作用于细菌时, 添加*L*-半胱氨酸可极显著降低细菌的存活率( $P < 0.01$ ), 与对照组相比, 联合组杀菌的倍数分别提高1.9、2.2、3.0、4.1、7.8和11.1倍。同时发现, 4.00 mmol/L *L*-半胱氨酸与40.00 μg/mL氟苯尼考联合使用, 其杀菌作用同单独使用120.00 μg/mL氟苯尼考相似, 即达到同样的杀菌效果, *L*-半胱氨酸的添加可以减少氟苯尼考2倍的使用量(图1-a)。

表1 添加不同浓度*L*-半胱氨酸后氟苯尼考对嗜水气单胞菌的MIC值  
Tab. 1 The minimal inhibitory concentration (MIC) value of florfenicol against *A. hydrophila* at

	different <i>L</i> -cysteine concentrations			
	对照组 control	1.00 mmol/L <i>L</i> -半胱氨酸 <i>L</i> -cysteine	2.00 mmol/L <i>L</i> -半胱氨酸 <i>L</i> -cysteine	4.00 mmol/L <i>L</i> -半胱氨酸 <i>L</i> -cysteine
氟苯尼考 florfenicol	5.00	2.50	1.25	1.25

为了研究*L*-半胱氨酸的剂量效应, 选取0.13~4.00 mmol/L *L*-半胱氨酸分别联合40.00 μg/mL和80 μg/mL氟苯尼考进行细菌杀菌实验。结果发现, 在40.00 μg/mL氟苯尼考条件下, 0.50 mmol/L *L*-半胱氨酸即可极显著增加氟苯尼考杀菌作用( $P < 0.01$ ), 且随着浓度的增加, 其杀菌作用越来越强。在80.00 μg/mL氟苯尼考条件下, 0.25 mmol/L

*L*-半胱氨酸即可极显著增加氟苯尼考的杀菌作用( $P < 0.01$ ), 且增效作用具有浓度梯度效应(图1-b)。

进一步研究*L*-半胱氨酸与氟苯尼考联合作用的时间效应, 选取4.00 mmol/L *L*-半胱氨酸分别与40.00 μg/mL和80.00 μg/mL氟苯尼考联合杀菌, 设置联合药物与细菌的作用时间为0~10 h。从结果可以看出, 随着作用时间的延长, 氟苯尼



考与L-半胱氨酸合剂组的细菌存活率下降越来越明显。在作用10 h时，两种联合用药组相比单独抗菌药物组的杀菌作用分别提高2.7倍和7倍(图1-c)。

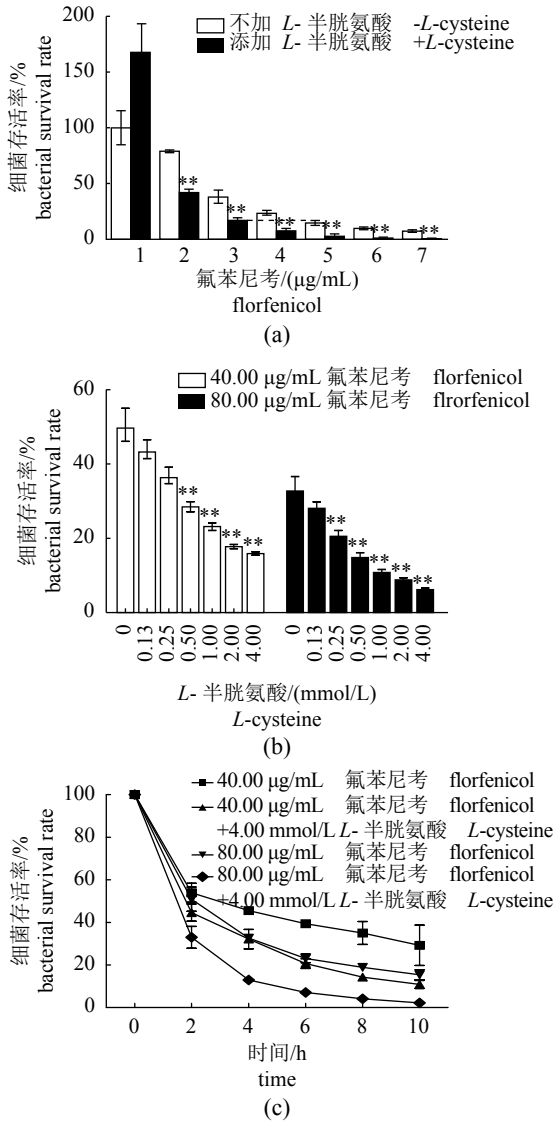


图1 L-半胱氨酸提高氟苯尼考的杀菌作用

(a) 不同浓度氟苯尼考与L-半胱氨酸联合的杀菌作用。虚线表示4 mmol/L L-半胱氨酸与40 μg/mL氟苯尼考联合使用，其杀菌作用同单独使用120 μg/mL氟苯尼考相似；(b) 不同浓度的L-半胱氨酸与氟苯尼考的联合杀菌作用；(c) L-半胱氨酸与氟苯尼考联合用药的时间梯度效应

Fig. 1 L-cysteine enhancing the bactericidal effect of florfenicol

(a) percent survivl of *A. hydrophila* at different concentration of florfenicol cooperates with L-cysteine. 1. 0 μg/mL, 2. 20.00 μg/mL, 3. 40.00 μg/mL, 4. 80.00 μg/mL, 5. 120.00 μg/mL, 6. 160.00 μg/mL, 7. 200.00 μg/mL; (b) bacterial survival rate of *A. hydrophila* at different concentration of L-cysteine cooperates with florfenicol; (c) time gradient test of *A. hydrophila* in condition of florfenicol cooperates with L-cysteine

## 2.2 L-半胱氨酸与氟苯尼考联合用药对清除鱼体细菌能力的影响

健康黄河鲤鱼于腹腔注射亚致死剂量的Ah01，即注射剂量为100 μL 1.0×10<sup>7</sup> CFU/mL细菌时，24 h内未见实验鱼有明显发病症状。10.00 mg/kg L-半胱氨酸或/和25.00 mg/kg氟苯尼考治疗后，与对照组相比，联合用药组中实验鱼肝组织中的细菌含量下降约16倍(图2-a)。在脾脏组织中，L-半胱氨酸组、氟苯尼考组和L-半胱氨酸与氟苯尼考合剂组的细菌含量均有明显下降(P<0.01、P<0.05和P<0.01)，特别是L-半胱氨酸与氟苯尼考合剂组的细菌含量下降约10倍(图2-b)。在肾脏组织中，仅L-半胱氨酸与氟苯尼考合剂组的细菌含量明显下降(P<0.01)，与对照组相比其组织细菌约减少4倍(图2-c)。结果显示，L-半胱氨酸在鱼体内也具有增强氟苯尼考杀菌作用的效果，联合使用时能极显著提高机体对病原菌的清除能力(P<0.01)。同时发现，L-半胱氨酸单独使用时也可以促进机体对细菌感染的清除(图2-a, 2-b)。

## 2.3 L-半胱氨酸与氟苯尼考合剂对实验鱼抗感染能力的影响

在体内细菌清除的基础上，进一步研究L-半胱氨酸与氟苯尼考合剂对实验鱼抗感染作用的影响。细菌攻毒结果显示，当注射剂量为100 μL 5.0×10<sup>7</sup> CFU/mL细菌时，24 h即开始出实验鱼死亡情况，48 h以后实验鱼死亡率稳定在90%左右。死亡实验鱼体表现为胸鳍、腹鳍等基部及肛门充血，是典型的嗜水气单胞菌感染症状。

采用腹腔注射的给药方式进行治疗，结果显示，生理盐水对照组在24 h即开始出实验鱼死亡现象，72 h时鱼体累积死亡率高达90%；氟苯尼考单独治疗效果并不明显，72 h时累积死亡率为57.6%；仅注射L-半胱氨酸组的鱼体死亡率明显低于抗菌药物组，36 h时出实验鱼死亡情况，其累积死亡率约为30%；存活率最高的为L-半胱氨酸与氟苯尼考合剂组，最早在36 h出实验鱼体死亡，72 h累积死亡率仅有13.3%，即联合用药的保护率为85.2%(图3-a)。

口服给药的结果与注射组相似，实验鱼累积死亡率表现为对照组>氟苯尼考组>L-半胱氨酸组>L-半胱氨酸与氟苯尼考合剂组，前3组的死亡情况均发生在24 h，L-半胱氨酸与氟苯尼考合剂组的死亡情况发生在36 h，其累积死亡率为20%，

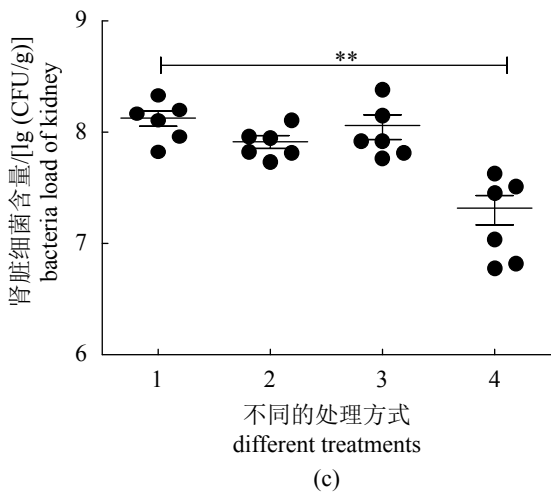
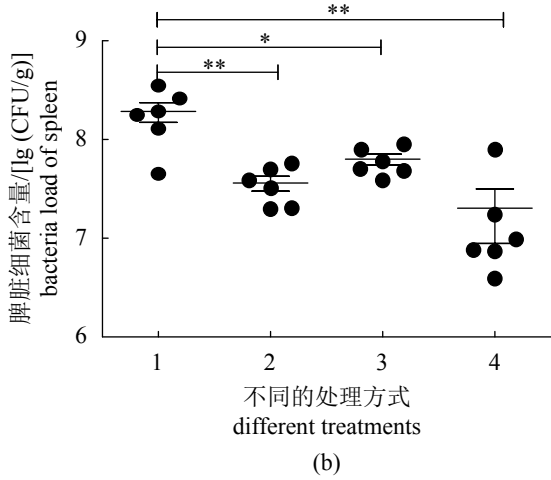
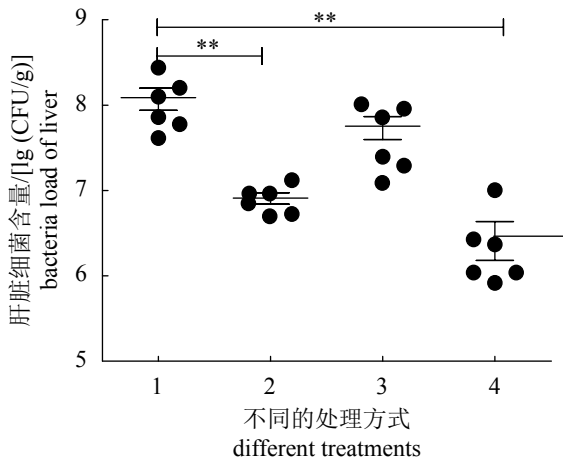


图2 L-半胱氨酸联合氟苯尼考作用后黄河鲤肝脏(a)、脾脏(b)和肾脏(c)中Ah01细菌含量

1. 对照, 2. L-半胱氨酸, 3. 氟苯尼考, 4. L-半胱氨酸+氟苯尼考

Fig. 2 The contents of *A. hydrophila* in liver (a), spleen (b) and kidney (c) of *C. carpio haematopterus* in condition of florfenicol cooperating with L-cysteine

1. control, 2. L-cysteine, 3. florfenicol, 4. L-cysteine+florfenicol

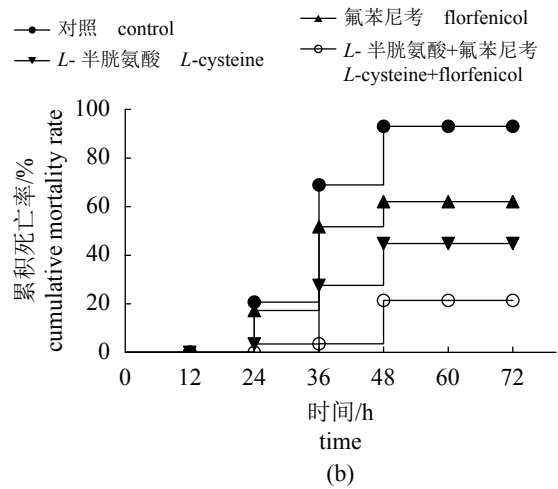
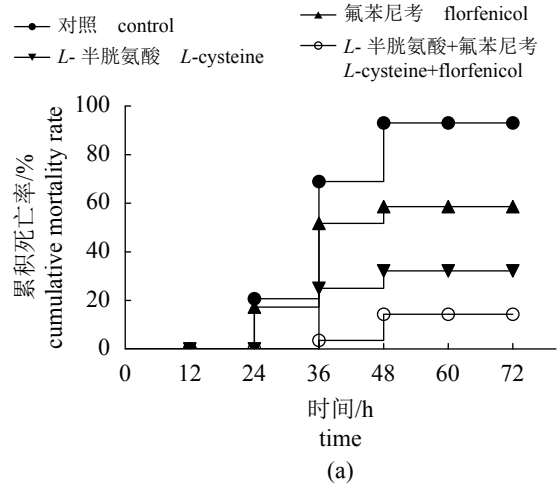


图3 细菌攻毒后, 注射(a)或口服(b) L-半胱氨酸和氟苯尼考后实验鱼的累积死亡率

Fig. 3 The cumulative mortality rate of *C. carpio haematopterus* after treatment with florfenicol cooperating with L-cysteine by intraperitoneally injected (a) or orally administrated (b), respectively

即联合用药的保护率为77.8%(图3-b)。上述结果表明, L-半胱氨酸与氟苯尼考联合用药不仅可大幅提高实验鱼对嗜水气单胞菌感染的抵抗能力, 还可推迟实验鱼的感染死亡时间。

### 2.4 L-半胱氨酸提高细菌对氟苯尼考的敏感性

氟苯尼考对Ah01菌株的MIC值为5.00 μg/mL, 在分别添加1.00~4.00 mmol/L L-半胱氨酸后, MIC值下降为1.25~2.50 μg/mL(表1)。结果发现, L-半胱氨酸使嗜水气单胞菌对氟苯尼考的敏感性提高了2~4倍。综上所述, L-半胱氨酸可能是通过影响嗜水气单胞菌对氟苯尼考的敏感性, 从而

增强氟苯尼考在体外和体内的杀菌作用,提高联合用药后鱼体的抗感染能力。

### 3 讨论

本研究首次报道L-半胱氨酸作为一种新型的水产药物增效剂,与氟苯尼考联合作用可高效杀灭嗜水气单胞菌,大大提高黄河鲤细菌感染后的存活率。L-半胱氨酸作为氨基酸类营养物质,本身不具有抑制细菌生长的作用,反而在一定程度上能促进细菌生长。另外,L-半胱氨酸作为一种含硫的半必需氨基酸,是鱼体代谢通路中非常重要的一个枢纽物质,涉及到多条重要的代谢通路,不仅参与合成还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH),也可分解产生亚牛磺酸、牛磺酸等产物,在机体免疫和抵御氧化应激反应中起着十分重要的作用<sup>[18-19]</sup>。在体内功能实验中,发现L-半胱氨酸单独作用能明显提高机体对细菌的清除率和鱼体的存活率,推测L-半胱氨酸可能具有调节鱼体免疫系统的作用。因此,L-半胱氨酸作为一种天然的小分子物质,其外源添加具有安全无污染的优势<sup>[20]</sup>。在水产动物细菌性疾病防治中,将L-半胱氨酸与氟苯尼考联合使用,不仅可提高抗菌药物药效,还可有效降低抗菌药物的使用量,在水产养殖病害防治中具有良好的应用前景。

氟苯尼考是一种新型氯霉素类的广谱抗菌药物,由于其广谱、高效的特性而广泛使用于兽医临床和水产养殖领域。然而,由于生产实践中不规范用药,特别是养殖户乱用和滥用药物,致使动物性食品中氟苯尼考残留事件时有发生,大量氟苯尼考耐药菌株被检出,而且耐药水平和耐药率快速升高,抗菌药物的杀菌效果越来越差,这些问题已引起了人们的普遍关注<sup>[21]</sup>。因此,减少抗菌药物的使用量,提高氟苯尼考防治感染性疾病的能力是当前必需解决的问题。体外和体内的实验发现,与单独使用氟苯尼考相比,L-半胱氨酸联合氟苯尼考使用具有更好的杀菌效果和细菌清除能力。这一结果也表明,在鱼类细菌性病害防治中,要达到理想的防治效果,使用L-半胱氨酸可以显著降低氟苯尼考的使用量。L-半胱氨酸与氟苯尼考合剂具有更好的防治作用也在细菌攻毒实验中得到验证,不论是口服给药还是注射给药的方式,联合用药的效果均优于单独抗菌药物。总的来

说,这些结果证实了L-半胱氨酸可作为氟苯尼考的增效剂,其联合用药相比单独使用抗菌药物的杀菌效果显著提高。在联合用药实验中仅进行一次给药,而在实际生产过程中,抗菌药物的使用一般为1~2个疗程,可以预测L-半胱氨酸与氟苯尼考联合用药会有更大的优势。

近年来,诸多研究表明,细菌代谢水平与抗菌药物敏感性之间存在一定的联系,使用小分子物质能逆转细菌对抗菌药物的耐药性。Lee等<sup>[22]</sup>研究发现,暴露于诺氟沙星的细菌群体中,少部分细菌具有产生信号作用分子“叫噪”的能力,这种代谢物改变了其他绝大部分菌株对诺氟沙星的抗性;Hirakawa等<sup>[23]</sup>研究表明,2 mmol/L的叫噪能明显提高应激相关基因的表达,使其能抵抗外界环境的变化,增加应激后的存活率。Allison等<sup>[8]</sup>发现,在外源添加果糖、甘露醇或葡萄糖等一些物质,能够使静止期细菌persisters恢复对氨基糖苷类抗生素的敏感性。在本研究中,为了探究L-半胱氨酸对氟苯尼考的增效作用,采用微量肉汤稀释法对嗜水气单胞菌株Ah01进行最低抑菌质量浓度测定,结果显示,L-半胱氨酸可以使细菌对氟苯尼考的MIC降低2~4倍。由此推测,L-半胱氨酸可能通过提高细菌对氟苯尼考的敏感性,从而发挥其增效作用。

本次研究通过体外和体内实验相互验证,发现L-半胱氨酸作为氟苯尼考的增效剂,其联合用药能显著增强氟苯尼考对嗜水气单胞菌的清除能力,大幅提高鱼体的抗感染能力。在水产养殖业病原菌耐药性日趋普遍、养殖水环境和水产品药物残留问题日趋严重的情况下,提高抗菌药物的防治效果,同时大幅降低抗菌药物的使用量,有助于无公害水产养殖技术的推广,对水产养殖业的良性发展具有极大的意义。后续工作中,L-半胱氨酸调节细菌对氟苯尼考敏感性的分子机制,以及L-半胱氨酸对机体的免疫调节作用均有待更深入的研究。

### 参考文献:

- [1] Han D, Shan X J, Zhang W B, *et al.* A revisit to fishmeal usage and associated consequences in Chinese aquaculture[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2018, 10(2): 493-507.
- [2] Rodgers C J, Mohan C V, Peeler E J. The spread of pathogens through trade in aquatic animals and their

- products[J]. *Revue Scientifique Et Technique*, 2011, 30(1): 241-256.
- [ 3 ] Pathak S P, Bhattacharjee J W, Kalra N, *et al.* Seasonal distribution of *Aeromonas hydrophila* in river water and isolation from river fish[J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1988, 65(4): 347-352.
- [ 4 ] Rao Y V, Das B K, Jyotirmayee P, *et al.* Effect of *Achyranthes aspera* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 20(3): 263-273.
- [ 5 ] Zhang Q Q, Ying G G, Pan C G, *et al.* Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(11): 6772-6782.
- [ 6 ] Cabello F C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment[J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(7): 1137-1144.
- [ 7 ] Lee H H, Collins J J. Microbial environments confound antibiotic efficacy[J]. *Nature Chemical Biology*, 2012, 8: 6-9.
- [ 8 ] Allison K R, Brynildsen M P, Collins J J. Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides[J]. *Nature*, 2011, 473(7346): 216-220.
- [ 9 ] Barraud N, Buson A, Jarolimek W, *et al.* Mannitol enhances antibiotic sensitivity of persister bacteria in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e84220.
- [10] Vilchèze C, Hartman T, Weinrick B, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* is extraordinarily sensitive to killing by a vitamin C-induced Fenton reaction[J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 1881.
- [11] Peng B, Su Y B, Li H, *et al.* Exogenous alanine and/or glucose plus kanamycin kills antibiotic-resistant bacteria[J]. *Cell Metabolism*, 2015, 21(2): 249-262.
- [12] Su Y B, Peng B, Han Y, *et al.* Fructose restores susceptibility of multidrug-resistant *Edwardsiella tarda* to kanamycin[J]. *Journal of Proteome Research*, 2015, 14(3): 1612-1620.
- [13] 黄凯, 陈素娟, 黄骏, 等. 动物源性沙门氏菌的耐药性分析及氟苯尼考类耐药基因的鉴定[J]. *中国畜牧兽医*, 2015, 42(2): 459-466.
- Huang K, Chen S J, Huang J, *et al.* Analysis of antibiotic resistance of *Salmonella* isolated from animals and identification of its florfenicol resistant gene[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2015, 42(2): 459-466(in Chinese).
- [14] Miranda C D, Rojas R. Occurrence of florfenicol resistance in bacteria associated with two Chilean salmon farms with different history of antibacterial usage[J]. *Aquaculture*, 2007, 266(1-4): 39-46.
- [15] Page M G, Bush K. Discovery and development of new antibacterial agents targeting Gram-negative bacteria in the era of pandrug resistance: is the future promising?[J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2014, 18: 91-97.
- [16] 赵贤亮, 陈鹤, 杨潇, 等. 黄河鲤嗜水气单胞菌的分离、毒力及用药分析[J]. *水产科学*, 2017, 36(5): 642-646.
- Zhao X L, Chen H, Yang X, *et al.* Isolation, virulence, resistance and medication of *Aeromonas hydrophila* from common carp *Cyprinus carpio*[J]. *Fisheries Science*, 2017, 36(5): 642-646(in Chinese).
- [17] Chen X H, Zhang B W, Li H, *et al.* Myo-inositol improves the host's ability to eliminate balofloxacin-resistant *Escherichia coli*[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 10720.
- [18] Parcell S. Sulfur in human nutrition and applications in medicine[J]. *Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic*, 2002, 7(1): 22-44.
- [19] Kim Y G, Kim S K, Kwon J W, *et al.* Effects of cysteine on amino acid concentrations and transsulfuration enzyme activities in rat liver with protein-calorie malnutrition[J]. *Life Sciences*, 2003, 72(10): 1171-1181.
- [20] Li P, Mai K S, Trushenski J, *et al.* New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds[J]. *Amino Acids*, 2009, 37(1): 43-53.
- [21] Shah S Q A, Cabello F C, L'Abée-Lund T M, *et al.* Antimicrobial resistance and antimicrobial resistance genes in marine bacteria from salmon aquaculture and non-aquaculture sites[J]. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(5): 1310-1320.
- [22] Lee J H, Lee J. Indole as an intercellular signal in microbial communities[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2010, 34(4): 426-444.
- [23] Hirakawa H, Hayashi-Nishino M, Yamaguchi A, *et al.* Indole enhances acid resistance in *Escherichia coli*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2010, 49(3): 90-94.



## ***L*-cysteine improves the susceptibility of *Aeromonas hydrophila* to florfenicol**

ZHAO Xianliang<sup>1,2</sup>, JIN Zhaohui<sup>1</sup>, HUANG Shani<sup>1</sup>, CHEN He<sup>1</sup>, LI Li<sup>1</sup>, KONG Xianghui<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

2. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

**Abstract:** Antimicrobial agents play an important role in the prevention and treatment of bacterial infections. However, the extensive use of antimicrobial agents, particularly the misuse of antibiotics in the aquatic animal breeding, has led to various issues, such as antibiotic resistance, pollution of breeding environments, and presence of drug residues in livestock, which need to be addressed urgently. In this paper, the effects of exogenous *L*-cysteine on the susceptibility of *Aeromonas hydrophila* to florfenicol were studied. The *in vitro* bactericidal assay found that 4.00 mmol/L *L*-cysteine could significantly improve the bactericidal effect of florfenicol by 1.9-11.1 times and that the bactericidal effect increased with increasing *L*-cysteine concentration and exposure time. Tissue bacterial eradication experiments showed that the combination of *L*-cysteine and florfenicol could significantly eliminate *A. hydrophila* in liver, spleen and kidney tissue by 4-16 times compared to florfenicol alone. Oral administration or injection with *L*-cysteine or/and florfenicol showed that the combination of *L*-cysteine and florfenicol greatly increased the survival rate of infected fish. Moreover, we also found *L*-cysteine played a certain role in tissue bacteria eradication and fish immune protection. At last, we found that 1.00-4.00 mmol/L *L*-cysteine increased the susceptibility of *A. hydrophila* to florfenicol by 2-4 times. We speculate that *L*-cysteine may enhance the susceptibility of *A. hydrophila* to florfenicol and increase the bactericidal effect of florfenicol. In summary, *L*-cysteine as a synergistic agent of florfenicol, can not only improve the bactericidal effect, but also significantly reduce the use of antimicrobial agents. Therefore, we present a novel approach in fighting against *A. hydrophila* with practical application value.

**Key words:** *Aeromonas hydrophila*; *L*-cysteine; florfenicol; susceptibility

**Corresponding author:** KONG Xianghui. E-mail: xhkong@htu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31502204); Henan Science and Technology Program (172102310545); Foundation of Guangdong Provincial Key Laboratory of Marine Biotechnology (GPKLMB201701); Excellent Youth Foundation of Henan Normal University (5101229279105); Henan Province Innovative Research Team in Science and Technology (201706081)