

封琦,王权,王建国,等.土霉素对中华绒螯蟹原体的体外抑菌试验及其抑菌机理[J].江苏农业科学,2013,41(6):179-181.

土霉素对中华绒螯蟹原体的体外 抑菌试验及其抑菌机理

封琦¹,王权¹,王建国¹,叶建生¹,王文²,顾伟²,沈辉³,朱云干¹

(1.江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 225300; 2.南京师范大学生命科学学院水产科学研究所,江苏南京 210046;

3.江苏省海洋水产研究所,江苏南通 226007)

摘要:为了控制中华绒螯蟹颤抖病的发生,采用土霉素对中华绒螯蟹螺原体进行体外抑菌试验研究,并对其作用机理进行了探讨。结果表明:中华绒螯蟹螺原体对土霉素极其敏感,最小抑菌浓度(MIC)、最小杀菌浓度(MBC)分别为0.04、0.62 mg/L;随着土霉素浓度的加大,螺原体的运动性受到抑制,指数生长期滞后,菌体最大数量减小,菌体细胞膜出现破损。研究也为中华绒螯蟹颤抖病的治疗提供了理论依据。

关键词:中华绒螯蟹螺原体;MIC;MBC;抑菌机理

中图分类号: S947.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)06-0179-03

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis* Milne-Edwards)俗称河蟹,为我国特有的名贵水产品之一。随着养殖规模的不断扩大,其病害频频暴发^[1]。自1994年以来中华绒螯蟹颤抖病给中华绒螯蟹养殖业造成了巨大的经济损失^[2]。笔者所在课题组自1999年起对中华绒螯蟹颤抖病进行了病原学及病理学方面的研究,并开展了病原分离培养鉴定等一系列工作,最终确定中华绒螯蟹颤抖病的病原为中华绒螯蟹螺原体(*Spiroplasma eriocheiris*)^[3-4]。为了遏制病害暴发以减少经济损失,笔者就中华绒螯蟹颤抖病的防治研究进行了一些初步的探索。吴霆等初步筛选出了最为敏感的药物SI-1,并利用SI-1对中华绒螯蟹进行急性毒性试验和回感治疗试验研究,证明SI-1是治疗螺原体感染病蟹安全有效的药物^[5]。笔者后来进行的土霉素试验表明,土霉素比SI-1成本低,效果更好^[6],因此本研究采用土霉素进行相关的防治研究。

1 材料与方法

1.1 药物敏感性试验

1.1.1 R2液体培养基的配制 R2液体培养基中含:PPLO 15 g/L、蔗糖 80 g/L、胎牛血清 150 mL/L、青霉素 100 万单位/L。

1.1.2 抗生素母液的配制 盐酸土霉素标准品,98% 色谱纯,购自美国Sigma公司,溶于甲醇制成浓度为1 000 mg/L的母液,置于-20℃,使用前采用R2液体培养基逐级稀释并配制各浓度组的测试液。

1.1.3 试验方法 采用Bruun等描述的标准稀释方法:在995 μL各药液浓度组中分别接种5 μL螺原体菌液,使药液

中菌液量达到100万CFU/mL,30℃恒温培养48 h后分别吸取5 μL药菌混合液接种至500 μL灭菌的R2培养基中,经30℃恒温培养168 h^[7]。设3组平行,重复试验3次,每次试验均设阳性和阴性对照。

最小抑菌浓度(MIC)判别准则:经30℃恒温培养48 h后,根据培养基中酚红指示剂的颜色变化进行判断,当阳性对照已经呈现阳性时,此时呈现阴性的最小药物浓度定为该药物对螺原体的最小抑菌浓度。

最小杀菌浓度(MBC)的测定:当菌药混合液重新接入灭菌R2培养基,经30℃恒温培养168 h后,仍然呈阴性的最小药物浓度定为该药物对螺原体的最小杀菌浓度,判断为最小杀菌浓度的培养基均用相差显微镜观察有无螺原体加以佐证。

1.2 药物抑制螺原体菌运动试验

1.2.1 螺原体菌液选择 选择处于对数生长期、菌体较分散且螺旋数适中(3~6个)的中华绒螯蟹螺原体菌液用于试验。

1.2.2 试验方法 分别取50 μL各浓度梯度(1、2、4、10、20、40 μg/mL)药物与菌液等体积混匀,室温(20~25℃)下静置30 min;对照组用空白溶剂与菌液混匀。取5 μL滴片,静置几秒,待菌体沉降后于光镜下观察菌体形态及其螺旋运动性,同时拍照记录。

1.2.3 观察计数 先观察对照组,而后由高浓度向低浓度观察,每片观察5~10个视野,选取半数菌体变形/制动的药物浓度为其变形/制动浓度(EC₅₀)。

1.3 药物对螺原体生长的影响

1.3.1 不同药液浓度的测试培养基配制 R2液体培养基的配制方法同“1.1.1”,将土霉素母液用R2液体培养基逐级稀释制成各浓度组的测试液。溶剂对照采用与测试液最高浓度组等量的甲醇替代,阴性和阳性对照均采用纯R2液体培养基。

1.3.2 螺原体的计数方法——颜色改变单位法(colour change unit,CCU) 颜色改变单位法(CCU):通常用于个体很小、用一般比浊法无法计数的微生物的计数,比如螺原体等,因为这种微生物的液体培养物是清亮透明的,因此无法用比浊法来计数;此外,螺原体固体培养的菌落很小,而且形成

收稿日期:2012-10-18

基金项目:江苏农牧科技职业学院重点支持项目(编号:ZD201109)。

作者简介:封琦(1982—),男,江苏泰兴人,博士,从事渔药代谢方面的研究。E-mail: fengqi1982326@163.com。

通信作者:王权,副教授,主要从事水产养殖方面的教学与研究工作。E-mail: foxquist@jsahvc.edu.cn。

菌落的时间很长(有的长达 17 d 以上),不适宜菌落形成单位法(colony forming unit,CFU)计数,因此需要用特殊的计数方法,即 CCU 法,它是以微生物在培养基中的代谢活力为指标来计算微生物相对含量的,一般来说,比浊法和菌落计数法可以满足绝大多数细菌的计数,但是对螺原体这样比较特殊的微生物,用 CCU 法比较合适^[8]。CCU 法的具体流程:(1)取 12 支无菌 dorf 管,每管装 0.9 mL R2 液体培养基;(2)在第 1 管加入 0.1 mL 待测菌液,充分混匀,从中吸取 0.1 mL 加入第 2 管,依次类推,进行 10 倍梯度稀释,直到最后 1 管;(3)于 30 ℃ 恒温培养,以培养基颜色发生改变的最后 1 管作为待测菌液的 CCU,也就是中华绒螯蟹螺原体的最大代谢活力,比如第 8 管最后出现颜色改变,待测菌液的相对浓度就是 1 亿 CCU/mL。

1.3.3 生长曲线的绘制 取 10 μL 对数生长期的螺原体菌液,接种于各浓度组的测试液中,每组平行接 3 管,于 30 ℃ 恒温培养,每 12 h 取 10 μL 留电镜观察超微结构变化;同时用 CCU 法按 1:10 进行梯度稀释培养,观察各稀释管颜色变化,连续观察 3 d,重复 3 次以上,绘制生长曲线。

1.4 超微结构的损伤观察

螺原体的 TEM 观察 将各浓度、不同时间点的样品分别与 4% 戊二醛等体积混合均匀,4 ℃ 固定 2 h,用 2% 磷钨酸钠负染 10~15 s,用日立 H-600 型透射电镜观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 土霉素对螺原体的 MIC 和 MBC

土霉素对螺原体的药敏试验结果预示了它在中华绒螯蟹颤抖病治疗上运用的广阔前景。其 MIC、MBC 分别为 0.04、

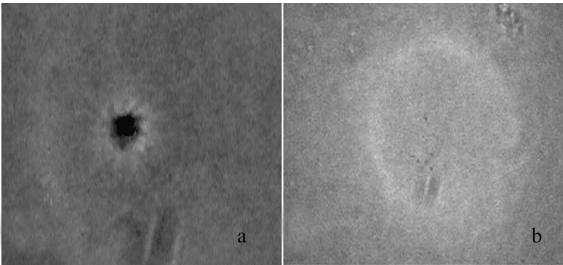
0.62 mg/L,远低于一些水产养殖中常用的中草药以及抗生素浓度^[5],同时也低于针对螺原体的特效药酰基肽类抗菌素 Herbicolin A 的浓度^[9]。

2.2 土霉素对螺原体的运动性抑制作用

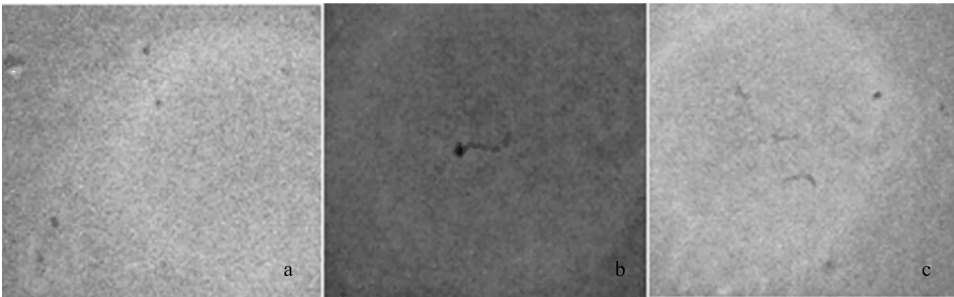
当土霉素在 25~40 mg/L 浓度范围时,螺原体的运动性受到显著抑制。其 EC₅₀ 约为 30 mg/L,在此浓度下约有一半的螺原体丧失运动性。在相差显微镜下可以看到,正常对数生长期的菌体呈螺旋状的丝状体,运动性最为强烈,除最常见的螺旋式运动外,还可见屈伸式、折叠式等多种运动形式;而用药组则呈现菌体皱缩、丝状体消失、运动性减弱等特征,详见图 1、图 2。

2.3 土霉素对螺原体生长的影响

由图 3 可以看出,对照组在培养 12 h 后就进入对数生长期,0.5 μg/mL 浓度组在培养 24 h 后进入对数期,而 2 μg/mL 浓度组则滞后到 36 h。菌体最大数量则随着用药浓度的升高而逐渐下降。由此可见,在体外纯培养条件下,土霉素对螺原体的生长抑制作用很显著。



a.正常组 b.用药组(用药后3~5 s)
图1 正常对数生长期(a)与用药组(b)的螺原体形态及运动性差异



a.全变形,圆球或豆点状 b.半变形,蝌蚪状,部分螺旋 c.正常,多数螺旋形态
图2 光镜下观察到的螺原体形态渐变

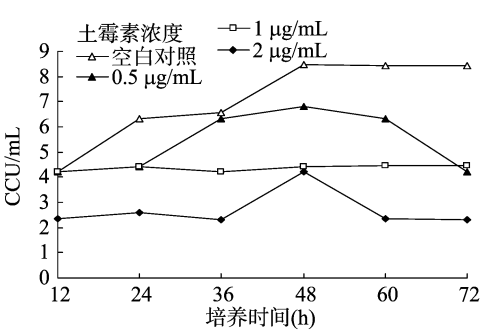
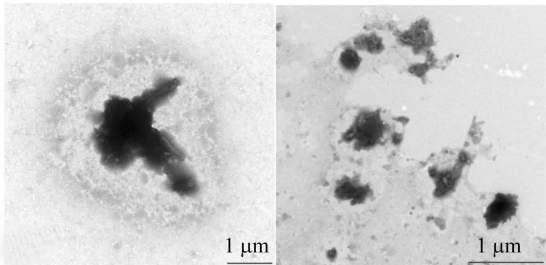


图3 土霉素对中华绒螯蟹螺原体生长的影响

2.4 用药后螺原体的电镜观察

由图 4 可以看出,在正常对数生长期,螺原体大量繁殖,加上其螺旋结构,新老个体常缠绕在一起而形成大小不一的

团体,团状边缘可见螺旋形或丝状菌体的附着。而在用药 72 h 后(2 μg/mL),部分菌体萎缩成圆球形,细胞膜粗糙,偶有破损,还有些螺原体菌体膨胀变形或膜破裂。



a.正常对数生长期 b.用药后72 h
图4 正常对数生长期(a)与用药后72 h(2 μg/mL)(b)的螺原体电镜负染图片

3 结论与讨论

螺原体特效药物的筛选工作由来已久,自 Stanek 等发现螺原体抵御药物作用的能力与有细胞壁的微生物类似^[10]以来,人们就试图寻找一些杀菌效果既好又使用安全、廉价且易于被各国食品药品管理机构所接受的药物。Freundt 等找到一种肽类抗生素 Herbicolin A 对支原体、溶脲脲原体、无胆甾原体的生长有明显抑制作用,其 MIC 在 1.5 ~ 100 mg/mL 之间^[9];有关蜜蜂“爬蜂病”的研究表明,蜜蜂螺原体对四环素类敏感;Malembic 等发现柑橘顽固病螺原体抗体对其生长抑制作用明显^[11]。本研究中药敏试验发现,土霉素对虾蟹颤抖病疗效显著,对虾蟹螺原体有明显的抑制作用,其 MIC 及 MBC 显著低于其他已经报道的药物。土霉素作为美国食品药品监督管理局(FDA)首批批准的少数几种渔用抗生素之一,具备使用安全、廉价、广谱抗菌、易于分布到血液及大部分组织等优良特点,在颤抖病防治研究中有着广阔的前景。依据我国农业部现行的 NY/T 755—2003《绿色食品 渔药使用准则》,目前已允许土霉素用于鱼类肠炎病、弧菌病的防治。

土霉素的抑菌机理也随着技术的进步、知识的积累在不断发展。Connamacher 等认为,四环素类抗生素的作用部位在 30S 核糖体亚基及 poly U 位点^[12]。Day 则认为,结合部位在 70S 核糖体的 50S 和 30S 亚基及 poly U 和 poly A 位点上^[13]。Schifferli 等认为,四环素类能够通过改变病原微生物表面的粘连分子结构排布,从而降低侵染过程中病原血细胞凝集和吸附宿主的能力^[14]。Wells 等发现立氏埃立克体,一种专性细胞内寄生物,能够抑制溶酶体与吞噬体融合,而四环素能够解除这种抑制作用^[15],他认为有某种蛋白存在于立氏埃立克体细胞壁中,该蛋白的缺失改变了病原外表的离子和疏水特性,从而潜在影响了病原和吞噬体壁之间的相互作用,该蛋白的缺失与溶酶体和吞噬体的结合都导致了吞噬体内病原形态退化。王文等也曾经一度认为,中华绒螯蟹螺原体是类立克次体,其主要侵染中华绒螯蟹血淋巴小颗粒细胞并形成包涵体,从而抑制其与溶酶体结合^[16]。土霉素在中华绒螯蟹体内的作用机理可能与此类似。

Rasmussen 等认为,在生理 pH 值条件下,四环素类存在 2 种基本形式:一种以低能、亲脂相象存在,主要通过跨膜吸收;另一种以高能、亲水两性离子结构存在,主要结合在核糖体上;由此四环素可分为两类,一类主要作用于核糖体,另一类则以膜为主要作用部位,通过抑制生物大分子前体物质的吸收来发挥作用^[17]。在药物作用后,螺原体螺旋结构消失或萎缩成团,细胞膜不光滑,结构欠完整。这可能是由于土霉素作用于膜所造成的。

本研究进一步表明了土霉素在中华绒螯蟹颤抖病防治中的广阔前景,后续工作将围绕土霉素在中华绒螯蟹体内的药动学研究展开,探讨科学给药方式及安全用药方法。

参考文献:

[1] 魏泽能. 河蟹颤抖病的流行病学调查[J]. 淡水渔业, 1999, 29 (11): 16 - 17.

[2] 黄琪琰. 河蟹颤抖病的研究现状(上)[J]. 科学养鱼, 2000(10): 13 - 14.

[3] 顾志峰, 王 文, 杜开和, 等. 中华绒螯蟹“颤抖病”病原、病理学初步研究[J]. 湖泊科学, 2000, 12(4): 367 - 372.

[4] Wang W, Gu W, Gasparich G E, et al. *Spiroplasma eriocheiris* sp. nov., associated with mortality in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(4): 703 - 708.

[5] 吴 霆, 顾 伟, 王 文. 中华绒螯蟹颤抖病药物治疗的初步研究[J]. 水产科学, 2008, 27(7): 325 - 329.

[6] Liang T M, Feng Q, Wu T, et al. Use of oxytetracycline for the treatment of tremor disease in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2009, 84(3): 243 - 250.

[7] Bruun M S, Schmidt A S, Madsen L, et al. Antimicrobial resistance patterns in Danish isolates of *Flavobacterium psychrophilum* [J]. Aquaculture, 2000, 187(3/4): 201 - 212.

[8] Tully J G, Whitcomb R F, Rose D L, et al. *Spiroplasma mirum*, a new species from the rabbit tick (*Haemaphysalis leporispalustris*) [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1982, 32(1): 92 - 100.

[9] Freundt E A, Winkelmann G. Activity of heribicolin A against Mycoplasma, Acholeplasma, Ureaplasma, and Spiroplasma species [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1984, 26(1): 112 - 114.

[10] Stanek G, Hirschl A, Laber G. Sensitivity of various spiroplasma strains against ethanol, formalin, glutaraldehyde, and phenol [J]. Zentralbl Bakteriell, Mikrobiol Hyg B, 1981, 174(4): 348 - 354.

[11] Malembic S, Saillard C, Bové J M, et al. Effect of polyclonal, monoclonal, and recombinant (single - chain variable fragment) antibodies on in vitro morphology, growth, and metabolism of the phytopathogenic mollicute *Spiroplasma citri* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(5): 2113 - 2119.

[12] Connamacher R H, Mandel H G. Binding of tetracycline to the 30S ribosomes and to polyuridylic acid [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1965, 20(1): 98 - 103.

[13] Day L E. Tetracycline inhibition of cell - free protein synthesis I. Binding of tetracycline to components of the system [J]. Journal of Bacteriology, 1966, 91(5): 1917 - 1923.

[14] Schifferli D M, Beachey E H. Bacterial adhesion: modulation by antibiotics with primary targets other than protein synthesis [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1988, 32(11): 1609 - 1613.

[15] Wells M Y, Rikihisa Y. Lack of lysosomal fusion with phagosomes containing *Ehrlichia risticii* in P388D1 cells: abrogation of inhibition with oxytetracycline [J]. Infection and Immunity, 1988, 56(12): 3209 - 3215.

[16] 王 文, 顾志峰, 朱宁宁, 等. 患颤抖病中华绒螯蟹体内类立克次体侵染的光镜和电镜观察[J]. 中国水产科学, 2001, 8(4): 32 - 35.

[17] Rasmussen B, Noller H F, Daubresse G, et al. Molecular basis of tetracycline action: identification of analogs whose primary target is not the bacterial ribosome [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1991, 35(11): 2306 - 2311.