

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20230211001

http://www.yykxjz.cn/

刘定远, 王春元, 于永翔, 王印庚, 李京泽, 张晓松, 秦蕾, 张正. 美人鱼发光杆菌美人鱼亚种 *dly* 基因缺失株构建及其生物学特性研究. 渔业科学进展, 2024, 45(3): 182-192

LIU D Y, WANG C Y, YU Y X, WANG Y G, LI J Z, ZHANG X S, QIN L, ZHANG Z. Construction and biological characteristics of the *dly*-deleted mutant strain of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(3): 182-192

美人鱼发光杆菌美人鱼亚种 *dly* 基因缺失株 构建及其生物学特性研究*

刘定远^{1,2} 王春元² 于永翔² 王印庚² 李京泽²
张晓松² 秦蕾¹ 张正^{2①}

(1. 江苏海洋大学 江苏 连云港 222005;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 山东 青岛 266071)

摘要 美人鱼发光杆菌美人鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, PDD)是广泛分布于全球海洋环境中的一种致病菌。本研究以实验室保存的一株高致病性 PDD 菌株(PDD1608)作为对象,初步探究毒力基因 *dly* 对 PDD 菌株的生物学特性和致病力的影响。利用 λ Red 重组技术成功构建毒力基因 *dly* 缺失株 Δdly PDD1608::Cm,比较野生株和缺失株的生长、涌动性、药物敏感性、生理生化特性、生物被膜形成能力、菌株及胞外产物(extracellular products, ECP)的溶血性和磷脂酶活性等生物学特性。选用海水青鲷鱼(*Oryzias melastigma*)作为实验动物,通过人工感染实验测定野生株和缺失株及其 ECP 对海水青鲷鱼的致病性。结果显示,毒力基因 *dly* 缺失后导致 PDD 菌株生长变慢,涌动性、溶血性和磷脂酶活性均降低;野生株和缺失株的药物敏感性和生理生化特性未产生变化;与野生株相比,缺失株的生物被膜形成能力有显著差异($P<0.05$);人工感染实验表明,缺失株及其 ECP 对海水青鲷鱼的致病性降低。毒力基因 *dly* 影响 PDD 菌株的生长、涌动性、溶血性和磷脂酶活性等多种生物学特性,并且与 PDD 菌株及其 ECP 的致病力强弱密切相关。

关键词 美人鱼发光杆菌美人鱼亚种; 缺失株; 胞外产物; 生物学特性; 致病性

中图分类号 S917.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2024)03-0182-11

美人鱼发光杆菌美人鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, PDD)是一种在全球海洋环境中广泛分布的革兰氏阴性病原菌,可感染多种海洋生物如鱼类、软体动物以及哺乳动物(Takahashi *et al*, 2008)。2016、2017年间,山东省长岛深远海网箱养殖的许氏平鲷(*Sebastes schlegelii*)先后2次暴发疾病,病鱼表现

出鳍基出血和皮肤溃疡等临床症状,经过组织剖检、细菌分离鉴定和人工感染实验验证,证实 PDD 是造成网箱养殖许氏平鲷暴发大规模疾病的主要致病菌(Zhang *et al*, 2019)。目前, PDD 在海水养殖产业内的致病案例逐渐增多,且致病宿主多样化,对我国海水养殖行业的健康发展造成了新的危害(施琳妮, 2019)。

* 山东省自然科学基金(ZR2021MC027; ZR2020QC216)和山东省重点研发计划(科技示范工程)(2021SFGC0701)共同资助。刘定远, E-mail: 83966953@qq.com

① 通信作者: 张正, 研究员, E-mail: zhangzheng@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2023-02-11, 收修改稿日期: 2023-02-26

国内外研究表明, PDD 的毒力因子主要由胞外蛋白酶类, 胞外溶血素以及细胞毒素三大类组成 (Terceti *et al*, 2016), 细菌毒力因子是导致宿主感染、产生病理损伤和避开宿主防御的主要因素 (Austin *et al*, 2007)。溶血素在多种致病菌中均有发现 (Labella *et al*, 2020), 是多种致病菌的重要毒力因子之一, 尤其在弧菌属 (*Vibrio*) 细菌中普遍存在, 如哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 就具有多种溶血素 (Zhang *et al*, 2001)。宿主感染 PDD 后的症状通常表现为出血性败血症 (吴同奎等, 2018), 因此, 针对 PDD 致病机理的研究多集中于其溶血能力的研究。现有的研究结果显示, PDD 产生的毒素分别为毒性质粒 pPHDD1 编码产生的毒素 damselysin (Dly) 和 phobalysin P (PhlyP) (Rivas *et al*, 2011), 以及染色体 I 编码产生的磷脂酶 (phospholipase) (PlpV) 和溶血素 (phobalysin C, PhlyC) (Terceti *et al*, 2017), 同时, 质粒编码的溶血素与染色体编码的溶血素之间的协同作用同样对菌株的溶血能力及毒力具有重要影响 (Vences *et al*, 2017)。

本实验室目前分离收集到 45 株 PDD, 经过 *dly*、*PhlyP*、*PhlyC* 和 *PlpV* 等多个毒力基因的鉴定结合动物感染实验, 将收集保存的 PDD 菌株分为强毒株、中毒株和弱毒株 (刘潇等, 2021), 其中, 具有高致病性的强毒株的实验室编号为 PDD1608 和 PDD1605, 与其他中毒株和弱毒株相比, 高致病性的强毒株含有上述 4 种毒力基因且溶血性最强, 对宿主具有很强的致病力。中毒株和弱毒株未携带毒力基因 *dly* 和 *PhlyP*, 对宿主的致病力与强毒株相比明显降低, 并且中、弱毒株分别表现为弱溶血活性和无溶血活性。本研究以其中的 1 株高致病性强毒株 PDD1608 作为对象, 通过构建野生株 PDD1608 毒力基因 *dly* 缺失株, 比较野生株和缺失株的生长、耐药性、生理生化

表型和菌株及其胞外产物 (extracellular products, ECP) 的溶血性、磷脂酶活性等多种生物学特性, 同时, 进行野生株和缺失株及其 ECP 对海水青鳉鱼 (*Oryzias melastigma*) 的人工感染实验并计算 LD₅₀, 以期为 PDD 致病机制研究和疫苗研发提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

实验选取的菌株 PDD1608 现存于中国水产科学研究院黄海水产研究所海水养殖病原菌株库内, 分离自海水网箱养殖患病许氏平鲈的体表溃疡处 (Zhang *et al*, 2019)。质粒 pACYC184 和 pCVD442 购自武汉森灵生物科技有限公司; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) β 2155 购自宝赛生物公司。

1.2 主要试剂及引物

高保真酶 PrimeSTAR[®] Max DNA polymerase 购自宝日医生生物技术 (北京) 有限公司; 20×PBS 缓冲液和革兰氏染色液购自北京索莱宝科技有限公司; 限制性内切酶 *Sma* I 购自赛默飞世尔科技公司; T4 DNA 连接酶、细菌 DNA 提取试剂盒、胶回收 DNA 纯化试剂盒和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 无菌脱纤维绵羊血购自南京森贝伽生物科技有限公司; 抗菌药物药敏纸片购自杭州微生物试剂有限公司; 生化鉴定管和 50% 卵黄乳液购自青岛海博生物技术有限公司; NaCl 购自国药集团化学试剂有限公司; 胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB) 和 TCBS 琼脂培养基购自北京陆桥技术股份有限公司; 琼脂、LB 培养基和引物 (表 1) 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司提供。

表 1 PDD 毒力基因 *dly* 缺失株构建的引物信息

Tab.1 Primers for the virulence gene *dly*-deleted mutant strain construction

引物 Primes	序列(5'~3') Sequence(5'~3')	产物大小 Product size/bp
<i>dly</i> -5F	GATAGTAATGACCGCTGAATGTGATATTAATAGC	893
<i>dly</i> -5R	GGATCTAATTGATGAGAGATTTTCAAGTC	
<i>dly</i> -3F	CGTTTTTATTTTCATAAGTAAATGTCCATATAACC	990
<i>dly</i> -3R	GTTGAGCAGAAGATTGCAGATAGAAATATA	
<i>dly</i> -CmF	GACTTGAAAATCTCTCATCAATTAGATCCGAGCTGCTTCGAAGTTCCTA	1 071
<i>dly</i> -CmR	GGTTATATGGACATTTACTTATGAAAATAAAAACGCATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTC	
<i>dly</i> -outF	GAGCACCTGTGTTTACTGGAGG	3 058
<i>dly</i> -outR	GTGCAGGGACAATATTGCCAACAG	
<i>dly</i> -inF	GATAGCCATGTATCAATTAATTGTTGTG	335
<i>dly</i> -inR	CTAGAGCATACTGTTTCGATTACCA	

1.3 缺失株构建

以美人鱼发光杆菌美人鱼亚种野生株 PDD1608 基因组 DNA 为模版,用引物 *dly*-5F/5R 和 *dly*-3F/3R 扩增 *dly* 基因上、下游同源臂片段;用引物 *dly*-CmF/*dly*-CmR 从 pACYC184 质粒上扩增氯霉素抗性基因 (Cm 抗性基因)作为替换 *dly* 基因的片段,通过融合 PCR 技术将 *dly* 基因上、下游同源臂片段和 Cm 抗性基因片段连接构成为打靶片段 $\Delta dly1608::Cm$,再将其克隆入自杀质粒 pCVD442,获得打靶质粒 pCVD442- $\Delta dly1608::Cm$ 。

通过电转化法 (Lee *et al.*, 2009) 将打靶质粒 pCVD442- $\Delta dly1608::Cm$ 转入大肠杆菌 DH5 α λ pir,在双抗 LB 平板(氨苄青霉素和氯霉素含量分别为 50 μ g/mL 和 17 μ g/mL)上,于 37 $^{\circ}$ C 培养至单克隆形成。单克隆经测序验证正确后,将其接种于 3 mL 双抗 LB 液体培养基(氨苄青霉素和氯霉素含量分别为 50 μ g/mL 和 17 μ g/mL),在 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 条件下过夜培养,次日使用试剂盒纯化提取质粒 DNA。

将打靶载体 pCVD442- $\Delta dly1608::Cm$ 电转化进入大肠杆菌 β 2155 菌株,涂布于含 100 μ g/mL 氨苄青霉素和 0.5 mmol/L 二氨基庚二酸(DAP,阿拉丁试剂)的 LB 平板,37 $^{\circ}$ C 培养至单克隆菌落形成,此克隆即为用于接合实验的供体菌株 *E. coli* β 2155/pCVD442- $\Delta dly1608::Cm$ 。

供体菌株 *E. coli* β 2155/pCVD442- $\Delta dly1608::Cm$ 和野生株 PDD1608 分别过夜培养,各取 500 μ L 菌液混合,进行接合实验,取 50 μ L 接合后的菌液涂布于含有氯霉素(10 μ g/mL)的 1.5% NaCl LB 平板,30 $^{\circ}$ C 培养至单克隆形成,随机挑取数个($n \geq 5$)单克隆菌体,用引物 *dly*-inF/*dly*-inR、*dly*-outF/*dly*-outR 对单克隆菌体进行 2 次 PCR 产物测序验证,引物 *dly*-inF/*dly*-inR 检测结果阴性,而引物 *dly*-outF/*dly*-outR 检测结果阳性的单克隆菌株即为毒力基因 *dly* 缺失株,命名为 $\Delta dlyPDD1608::Cm$ 。

1.4 野生株和 *dly* 基因缺失株的表型测定

菌液制备:将菌株 PDD1608 和 Δdly PDD1608::Cm 划线接种于含 1.5% NaCl 的 TSB 固体培养基,于 28 $^{\circ}$ C 培养箱内静置培养,挑取 2 株菌的单菌落分别接种于 10 mL 含 1.5% NaCl 的 TSB 液体培养基中,于 28 $^{\circ}$ C、180 r/min 条件下过夜培养,调整各菌株 $OD_{600\text{nm}}=0.6$ 。

1.4.1 生长曲线测定 将制备的菌液按 1:100 比例稀释接种于 96 孔板中,每孔 300 μ L,每株菌做 3 个平行,含 1.5% NaCl 的 TSB 液体培养基为空白对照。

用全自动生长曲线分析仪(型号: Bioscreen C $^{\circ}$ Pro)每隔 2 h 测 1 次 $OD_{600\text{nm}}$ 值,绘制生长曲线。

1.4.2 涌动性(swarming)检测 用移液枪分别吸取 3 μ L 菌液垂直滴加到半固体 TSB 培养基(含 0.6% 琼脂)中,每株菌设 5 个平行,将平板正置放于 28 $^{\circ}$ C 生化培养箱中培养 24 h,观察记录各菌株涌动圈大小。

1.4.3 生理生化特性测定 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菌株 PDD1608 和 Δdly PDD1608::Cm 的生理生化特性测定,于 28 $^{\circ}$ C 培养 24~48 h 后观察不同菌株的生理生化反应实验结果。

1.4.4 生物被膜形成能力测定 将菌液按 1:100 稀释。取 200 μ L 稀释后的菌液添加至无菌 96 孔板中,每株菌设 3 个平行,以新鲜 TSB 液体培养基作为阴性对照。96 孔板加盖后用封口膜密封,静置于 28 $^{\circ}$ C 生化培养箱中培养 48 h,吸净菌液,使用无菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)清洗添加过菌液的加样孔,自然风干后,每孔加 200 μ L 甲醇固定 15 min,吸净甲醇,晾干后用 1% 结晶紫溶液染色 5 min,使用 ddH $_2$ O 清洗 3 次。完全干燥后,使用 95% 乙醇溶液溶解黏附的被膜,使用酶标仪测定 $OD_{595\text{nm}}$ 值(Zhang *et al.*, 2021)。

1.5 药物敏感性实验

采用 K-B 纸片扩散法进行菌株 PDD1608 和 Δdly PDD1608::Cm 的抗生素药敏实验,用灭菌镊子夹取药敏纸片(购自杭州微生物试剂有限公司)贴于涂有菌液的平板之上,28 $^{\circ}$ C 生化培养箱中静置培养 12 h,测量抑菌圈直径,药敏实验结果与美国临床实验室标准化协会(CLSI)标准对比,从而判定不同菌株的药物敏感度。

1.6 菌株及 ECP 溶血活性和磷脂酶活性测定

1.6.1 菌液制备和 ECP 的提取 菌株 PDD1608 和 Δdly PDD1608::Cm 在 TSB 平板上活化并纯化培养后,挑取 2 株菌的单菌落,接种于 50 mL 的液体 TSB 培养基中,于 28 $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养 10 h 制备种子液。分别取 5 mL 种子液稀释至 10^5 CFU/mL 备用。参考李永杰等(2022)的方法,进行 10^9 CFU/mL 高浓度菌液和 ECP 原液的制备,并对 ECP 原液进行有无活菌的检验,吸取 100 μ L 的 ECP 原液涂布于 TSB 平板,经检验,培养基上无菌落长出,将 ECP 原液分装进 50 mL 离心管中备用。

1.6.2 菌株及 ECP 的溶血性测定 在含有 1.5% NaCl 的 TSB 中添加 5% (V/V) 脱纤维绵羊血,并在平板中央放置一枚牛津杯制备成打孔绵羊血平板,用于

测定菌株及 ECP 的溶血能力(刘潇等, 2021)。每个绵羊血平板的牛津杯孔中分别加入 100 μL 的菌液和 ECP 原液进行溶血性的测定, 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中静置 24~48 h, 及时观察并拍照记录, 对照组为无菌 TSB 液体培养基, 重复实验 3 次。

1.6.3 菌株及 ECP 的磷脂酶活性测定 在含有 1.5% NaCl 的 TSB 中添加 3% (V/V) 卵黄乳液, 并在平板中央放置一枚牛津杯制备成打孔卵黄平板, 用于测定菌株及 ECP 分解卵磷脂的能力(刘潇等, 2021)。每个卵黄平板的牛津杯孔中分别加入 100 μL 的菌液和 ECP 原液进行卵磷脂分解能力的测定, 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中静置 24~48 h, 及时观察并拍照记录, 对照组为无菌 TSB 液体培养基, 重复实验 3 次。

1.7 菌株及 ECP 的致病力验证

从山东省青岛市某公司购买健康海水青鲮鱼, 平均体长为 2.5 cm, 平均体重为 55 mg。参照海水青鲮鱼饲养方法(Wittbrodt *et al.*, 2002; Takao *et al.*, 2010), 养殖系统为充分曝气的水循环系统, 水温为(23 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$, 每日投喂 1 次卤虫(*Artemia salina*) 饵料, 投喂量以 5 min 内吃完为宜。320 尾实验鱼在水循环和增氧条件下暂养 7 d, 实验前 24 h 停止喂食。

参照 1.6 制备 10⁹ CFU/mL 的高浓度菌液和 ECP 原液, 菌液经 10 倍稀释法涂布、计算后, 记录初始菌液浓度; 使用 BCA 蛋白浓度试剂盒测定 ECP 的蛋白浓度。

实验选用海水青鲮鱼作为宿主, 在对鱼体进行背部肌肉轻微创伤后, 分别进行 PDD1608、 Δdly PDD1608::Cm 菌液及 ECP 的浸浴攻毒实验。每

个菌液的攻毒实验设定 5 个浓度梯度(10⁸、10⁷、10⁶、10⁵ 和 10⁴ CFU/mL), 每个梯度攻毒实验组 10 条海水青鲮鱼, 设置 2 组平行实验, 使用无菌 PBS 作为对照。每个菌株 ECP 的攻毒实验设定 5 个浓度梯度(1、1/2、1/4、1/8 和 1/16 ECP 原液), 每个实验组 10 条海水青鲮鱼, 设置 2 组平行实验, 以无菌 PBS 为对照实验组。

于攻毒后 2、4、6、8、12、16、20、24、48、72、96、120、144 和 168 h 进行观察, 及时记录不同浓度组的死亡数量, 直至连续 3 d 以上未出现死亡后可结束实验, 参考 Bliss 算法计算半数致死量 LD₅₀。

1.8 数据处理及分析

本研究中, 生长曲线测定、涌动性、生物被膜测定和宿主攻毒感染等实验中得到的数据, 均利用统计学软件 Graphpad Prism8 进行数据汇总、分析及作图。

2 结果

2.1 缺失株 Δdly PDD1608::Cm 的鉴定

利用 λ Red 重组法构建获得 *dly* 基因缺失株, 随机挑取单克隆菌落($n>10$)进行 PCR 鉴定。用检测毒力基因 *dly* 的引物 *dly*-inF/*dly*-inR 进行 PCR 扩增, 结果见图 1a。野生株 PDD1608 作为阳性对照扩增出 335 bp 的目的片段(编号 23), 挑取的 22 个单克隆(编号 1~22)菌落中有 19 个未扩增出目的片段, 3 个单克隆扩增出目的片段(编号 2、5、11)。从未扩增出条带的单克隆菌落中选取一个单克隆(1 号单克隆)进行毒力基因

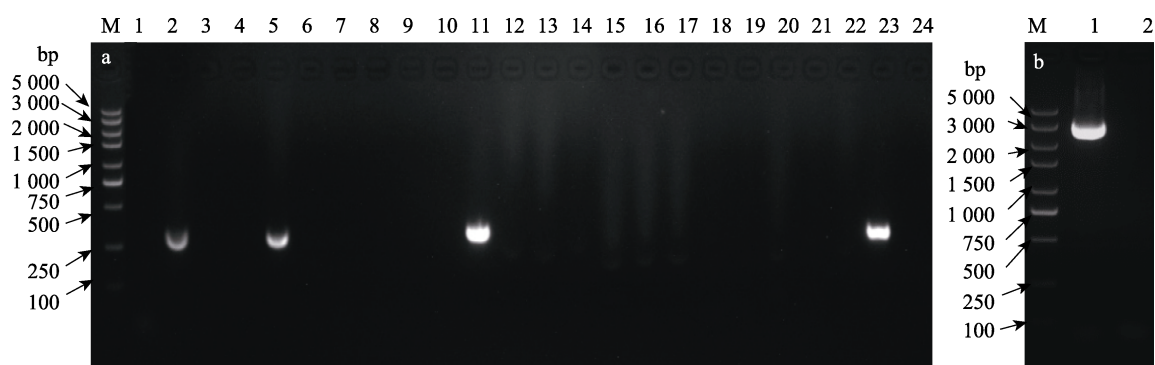


图 1 *dly* 基因缺失株的鉴定结果

Fig.1 Results of *dly*-deleted mutant strain identification

a: 单克隆菌落毒力基因 *dly* 琼脂糖凝胶电泳检测结果;

b: 1 号单克隆菌落毒力基因 *dly* 的上下游同源臂(含 Cm 基因片段)琼脂糖凝胶电泳检测结果。

a: Agarose gel electrophoresis test of monoclonal colony virulence genes *dly*;

b: Agarose gel electrophoresis test of the upstream and downstream homology arms (containing Cm gene fragment) of the No.1 monoclonal colony virulence gene *dly*.

dly 外部基因的检测, 利用引物 *dly-outF/dly-outR* 进行 PCR 扩增得到 3 058 bp 的目的片段(图 1b), 经过测序验证后, 表明毒力基因 *dly* 缺失株构建成功, 命名为 Δdly PDD1608::Cm。

2.2 野生株和缺失株的表型差异

2.2.1 生长差异比较

菌株 PDD1608 和 Δdly PDD1608::Cm 在 TSB 液体培养基中经过全自动生长曲线分析仪 32 h 的检测记录($OD_{600\text{ nm}}$)后, 导出数据并绘制生长曲线。结果显示, 野生株 PDD1608 生长速度较快, 在 2~10 h 内处于生长对数期阶段。缺失株 Δdly PDD1608::Cm 生长速度与野生株 PDD1608 生长速度相比有所降低, 在 8~16 h 内处于对数生长期(图 2)。由此得出, *dly* 基因的缺失在一定程度上减缓了 PDD1608 菌株在 TSB 液体培养基中的生长速度。

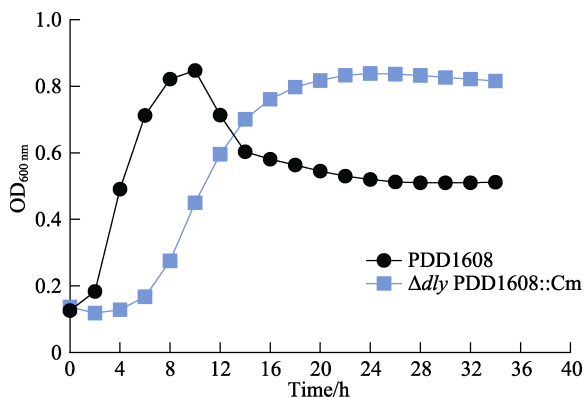


图 2 野生株 PDD1608 和缺失株 Δdly PDD1608::Cm 的生长曲线

Fig.2 Growth curves of wild type strain PDD1608 and mutant strain Δdly PDD1608::Cm

2.2.2 涌动性差异

菌株 PDD1608 和 Δdly PDD1608::Cm 在 28 °C 培养 24 h, 测量对比发现, *dly* 基因缺失后, 缺失株 Δdly PDD1608::Cm 与野生株 PDD1608 相比涌动性降低, 有极显著差异($P<0.01$) (图 3)。

2.2.3 生理生化特性分析

菌株 PDD1608 和 Δdly PDD1608::Cm 的 26 种生化鉴定管结果显示, 2 株菌 26 种生化鉴定管的结果一致, 毒力基因 *dly* 缺失后对菌株的生理生化表型未造成改变(表 2)。

2.2.4 生物被膜形成能力比较

使用结晶紫染色法对 PDD1608 和 Δdly PDD1608::Cm 两株菌的生物被膜形成测定结果显示, 与野生株 PDD1608 相比, Δdly PDD1608::Cm 的生物被膜形成能力显著下降($P<0.05$)(图 4), 这表明毒力基因 *dly* 可能参与调控了 PDD 菌株生物被膜的形成。

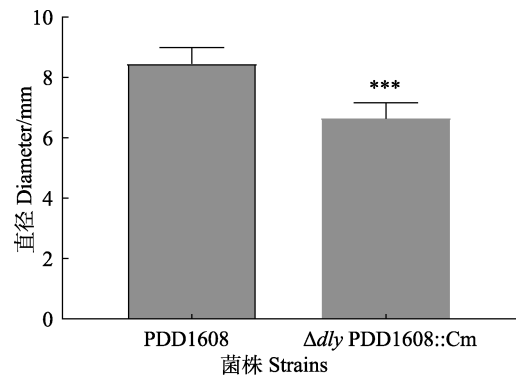


图 3 野生株 PDD1608 和缺失株 Δdly PDD1608::Cm 涌动性分析

Fig.3 Swarming motility of wild type strain PDD1608 and mutant strain Δdly PDD1608::Cm

***表示差异极显著($P<0.01$)。

*** indicate highly significant difference ($P<0.01$).

2.3 药物敏感性实验分析

菌株 PDD1608 和 Δdly PDD1608::Cm 的 38 种抗生素药敏结果显示, 毒力基因 *dly* 缺失后, 菌株对氯霉素的敏感性减弱, 氯霉素抗性减弱的原因是构建缺失株 Δdly PDD1608::Cm 的过程中插入了氯霉素抗性基因(Cm); 其他 37 种抗生素药敏实验的结果不存在差异(表 3)。

2.4 菌株及 ECP 的溶血活性和磷脂酶活性的差异

野生株 PDD1608 及 ECP 表现出极强的溶血活性和磷脂酶活性, 而缺失株 Δdly PDD1608::Cm 及 ECP 的溶血性和磷脂酶活性较低, 与野生株 PDD1608 的实验结果相比, 溶血活性和磷脂酶活性均表现为降低(图 5)。结果表明, 毒力基因 *dly* 的缺失对 PDD1608 的溶血活性和磷脂酶活性产生较为显著的影响, 导致溶血活性和磷脂酶活性降低。

2.5 菌株及 ECP 的致病力差异

菌株 PDD1608 和 Δdly PDD1608::Cm 对海水青鳉鱼的攻毒实验测得 2 株菌的 LD_{50} 分别为 1.31×10^5 CFU/mL 和 1.71×10^7 CFU/mL, 毒力基因 *dly* 缺失株的 LD_{50} 升高, 是野生株的 130.53 倍。同时, 2 株菌攻毒后的生存曲线表明, 相同攻毒浓度条件下, 缺失株的致死速率降低, 且低浓度条件下, 缺失株攻毒的海水青鳉鱼存活率明显高于野生株(图 6a~b), 说明毒力基因 *dly* 的缺失影响了菌株 PDD1608 的致病性, 导致其毒力降低。

菌株 PDD1608 和 Δdly PDD1608::Cm 胞外产物 ECP 的攻毒实验测得 2 株菌 ECP 的 LD_{50} 分别为 101.46 μ g/mL 和 110.19 μ g/mL, 缺失株 ECP 的 LD_{50}

表 2 野生株 PDD1608 和缺失株 Δdly PDD1608::Cm 的生理生化特性

Tab.2 The physiological and biochemical characteristics of wild type strain PDD1608 and mutant strain Δdly PDD1608::Cm

项目 Item	菌株 Strain		项目 Item	菌株 Strain	
	PDD1608	Δdly PDD1608::Cm		PDD1608	Δdly PDD1608::Cm
3% NaCl 葡萄糖 3% NaCl glucose	+	+	肌醇 Inositol	-	-
3% NaCl 明胶 3% NaCl gelatine	-	-	6% NaCl 胰胨水 6% NaCl pepton water	-	-
鼠李糖 Rhamnose	-	-	山梨醇 Sorbitol	-	-
10% NaCl 胰胨水 10% NaCl pepton water	-	-	3% NaCl 赖氨酸脱羧酶 3% NaCl lysine decarboxylase	+	+
3% NaCl 甘露醇 3% NaCl mannitol	+	+	Kovacs 试剂 Kovacs reagent	-	-
丙二酸盐 Malonate	-	-	苦杏仁苷 Amygdalin	-	-
0% NaCl 无盐胰胨水 0% NaCl pepton water	-	-	木糖 Xylose	-	-
3% NaCl 鸟氨酸脱羧酶 3% NaCl ornithine decarboxylase	-	-	3% NaCl 阿拉伯糖 3% NaCl Arabionse	-	-
3% NaCl 精氨酸双水解酶 3% NaCl arginine dihydrolase	+	+	3% NaCl 硫化氢 3% NaCl hydrogen sulfide	-	-
西蒙氏枸橼酸盐 Simmont citrate	-	-	3% NaCl 尿素酶 3% NaCl urease	-	-
蜜二糖 Melibiose	+	+	3% NaCl 乳糖 3% NaCl lactose	-	-
3% NaCl 胰胨水 3% NaCl pepton water	+	+	3% NaCl 蔗糖 3% NaCl sucrose	-	-
3% NaCl MR-VP	-	-	3% NaCl ONPG	-	-

注：“+”为阳性，“-”为阴性。
Note: “+” means positive, “-” means negative.

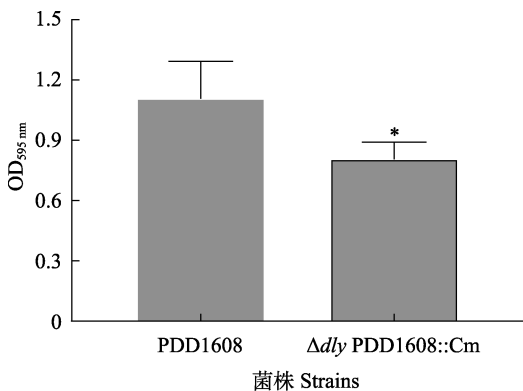


图 4 野生株 PDD1608 和缺失株 Δdly PDD1608::Cm 生物被膜形成能力

Fig.4 Biofilm formation ability of wild type strain PDD1608 and mutant strain Δdly PDD1608::Cm

*表示差异显著($P < 0.05$)。

* indicate significant difference ($P < 0.05$).

与野生株 ECP 相比, 提高了 0.09 倍, 但二者的致死时间存在明显差异(图 6c~d), 缺失株 ECP 在相同稀

释倍数条件下对海水青鳞鱼的致死速率降低, 说明毒力基因 *dly* 的缺失对 PDD 菌株胞外产物 ECP 的毒力产生了一定影响, 结合溶血活性的实验结果, 推测 *dly* 基因的缺失降低了 PDD 菌株胞外产物 ECP 的溶血能力, 进而降低了 PDD 菌株 ECP 的致病性。

菌株的致病性结果和菌株 ECP 的致病性结果具有正相关性, 野生株 PDD1608 及其 ECP 的致病性均高于缺失株 Δdly PDD1608::Cm 及其 ECP 的致病性, 说明毒力基因 *dly* 对菌株 PDD1608 的致病性存在促进作用。

3 讨论

PDD 在海洋环境中广泛分布, 最初在 1981 年以 *Vibrio damsela* 命名报道(Love *et al*, 1981), 经 Smith 等(1991)进一步研究后, 将其命名修改为美人鱼发光杆菌美人鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*)。近 10 多年来, 有关 PDD 对海洋动物致病的报道逐渐增多, 且 PDD 致病的宿主种类也呈现多

表 3 野生株 PDD1608 和缺失株 $\Delta dlyPDD1608::Cm$ 的的抗生素敏感性实验结果

Tab.3 Antibiotic susceptibility test results of wild type strain PDD1608 and mutant strain $\Delta dly PDD1608::Cm$

抗生素 Antibiotic	菌株 Strain		抗生素 Antibiotic	菌株 Strain	
	PDD1608	$\Delta dlyPDD1608::Cm$		PDD1608	$\Delta dlyPDD1608::Cm$
丁胺卡那 Amikacin	R	R	新生霉素 Novobiocin	S	S
链霉素 Streptomycin	R	R	四环素 Tetracycline	S	S
苯唑青霉素 Oxacillin	R	R	强力霉素 Doxycyclin	S	S
复方新诺明 SMZ-TMP	S	S	美满霉素 Minocycline	S	S
乙酰螺旋霉素 Spiramycin II	R	R	先锋 IV Cefalexin	R	R
氟罗沙星 Fleroxacin	S	S	克拉霉素 Clarithromycin	R	R
萘啶酸 Nalidixic Acid	S	S	青霉素 Penicillin	R	R
洛美沙星 Lomefloxacin	S	S	红霉素 Erythromycin	R	R
头孢胺噻肟 Cefotaxime	S	S	新霉素 Neomycin	R	R
菌必治 Ceftriaxone	S	S	氨苄青霉素 Ampicillin	R	R
盖伯斯林 Ceftizoxime	S	S	先锋必 Cefobid	R	R
氟苯尼考 Florfenicol	S	S	卡那霉素 Kanamycin	R	R
氧氟沙星 Ofloxacin	S	S	庆大霉素 Gentamycin	R	R
氟哌酸 Norfloxacin	S	S	恩诺沙星 Enrofloxacin	S	S
多粘菌素 b Bpolymyxin b	R	R	痢特灵 Furazolidone	R	R
环丙沙星 Ciprofloxacin	S	S	利福平 Rofampicin	R	R
头孢他啶 Ceftazidime	S	S	阿奇霉素 Azithromycin	R	R
氯霉素 Chloramphenicol	S	R	先锋 VI Cefradine	R	R
先锋 V Cefazolin	S	S	吡哌酸 Pipemidic	I	I

注：R 为不敏感；I 为中度敏感；S 为高度敏感。

Note: R is insensitive; I is moderately sensitive; and S is highly sensitive.

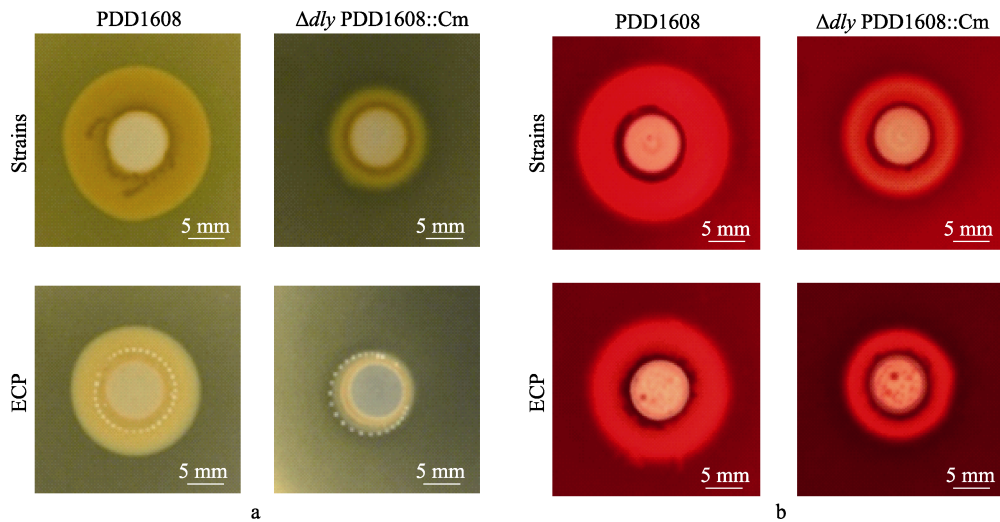


图 5 野生株 PDD1608 和缺失株 $\Delta dlyPDD1608::Cm$ 及其 ECP 的磷脂酶活性和溶血活性
Fig.5 Phospholipase and hemolytic activities of wild type strain PDD1608 and mutant strain $\Delta dly PDD1608::Cm$ and their ECP

a: 2 个菌株及其 ECP 的磷脂酶活性；b: 2 个菌株及其 ECP 的溶血活性。

a: Phospholipase activity of the two strains and their ECP; b: Hemolytic activity of the two strains and their ECP.

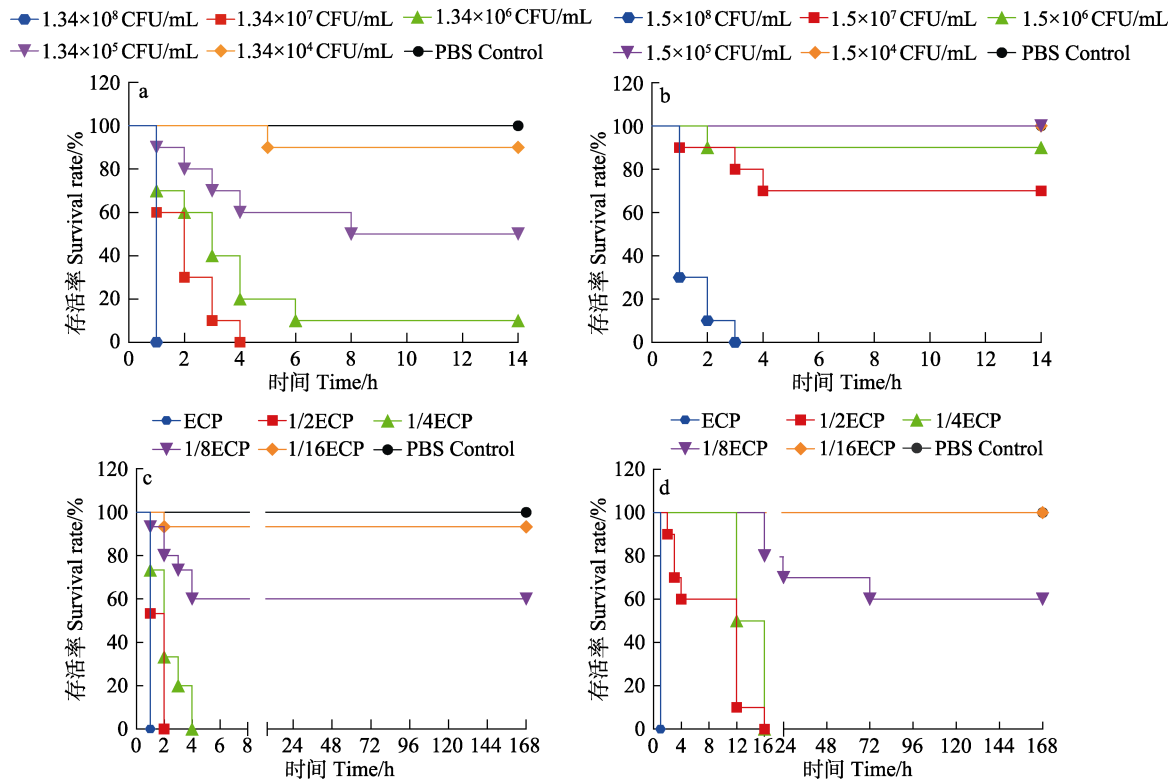


图 6 野生株 PDD1608 和缺失株 Δdly PDD1608::Cm 及其 ECP 人工感染实验结果

Fig.6 Artificial infection test results of wild type strain PDD1608 and mutant strain Δdly PDD1608::Cm and their ECP

a: 野生株 PDD1608; b: 缺失株 Δdly PDD1608::Cm; c: 野生株 PDD1608 ECP; d: 缺失株 Δdly PDD1608::Cm ECP.
a: PDD1608; b: Δdly PDD1608::Cm; c: PDD1608 ECP; d: Δdly PDD1608::Cm ECP.

样性, 宿主包括六带鲈(*Caranx sexfasciatus*) (Yashgin *et al*, 2015)、斑节对虾(*Penaeus monodon*) (Vaseeharan *et al*, 2007)、脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*) (Liu *et al*, 2016)和半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) (Shao *et al*, 2019)等。因此, 需要深入研究 PDD 的致病机制, 以期有针对性地建立防控技术措施, 降低其对海洋生物的危害。

研究表明, 位于质粒 pPHDD1 上的毒力基因 *dly*、*PhlyP* 和位于染色体的毒力基因 *PhlyC* 为 PDD 菌株溶血性相关基因, 且毒力基因 *dly* 具有一定磷脂酶-D 的活性(Osorio *et al*, 2000)。位于染色体的毒力基因 *PlpV* 为磷脂酶活性相关基因, 这 4 种毒力基因与 PDD 菌株致病力强弱密切相关(Rivas *et al*, 2015)。为深入研究实验室保存的高致病性野生株 PDD1608 的致病机制, 选择构建溶血性相关基因 *dly* 的缺失株 Δdly PDD1608::Cm, 进行生长特性、药物敏感性、溶血活性、磷脂酶活性和菌株致病性等多个验证实验, 探究 *dly* 基因在 PDD1608 致病过程中的关键作用。

本研究发现, *dly* 基因缺失未改变菌落形态特征, 但导致缺失株的生长速度变慢, 缺失株进入对数生长期的时间比野生株推迟 6 h 左右。而在其他学者的相

关研究中也存在类似情况, 如延凯娜等(2020)构建的肠出血型大肠杆菌 *vsG* 基因缺失株生长速度与野生株相比有所减慢, 而张海洋等(2021)构建的副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) VP2918 基因缺失株、彭新亮等(2022)构建的溶藻弧菌(*V. alginolyticus*) *VcrV* 基因缺失株等的生长速度与野生株相比未产生变化。由此推测, PDD1608 菌株的 *dly* 基因与生长调控基因之间可能存在协同效应, 但 *dly* 基因是如何参与 PDD 菌株生长的调控机制还需进行深入的研究。

PDD 菌株在海水环境中生存适应能力很强, 并且对多种海洋动物都有致病性, 因此, 需要挑选合适的抗生素来抑制其生长繁殖或消杀, 但滥用抗生素会导致耐药细菌的出现(Santos *et al*, 2018)。因此, 本研究选取了 38 种抗生素和 26 种生理生化鉴定管, 对野生株 PDD1608 和缺失株 Δdly PDD1608::Cm 进行定性和定量实验, 目的是为了更好的研究毒力基因 *dly* 对菌株的耐药和理化特性的影响。*dly* 基因缺失株与野生株相比, 药物敏感性和生理生化特性的结果并未有差异, 缺失株对氯霉素药物敏感性降低是由于在构建 *dly* 基因缺失株的过程中, 通过引入外源 Cm 抗性基因将 *dly* 基因替换, 从而降低了缺失株对氯霉素的敏感

性。因此推断,毒力基因 *dly* 不参与菌株 PDD 耐药基因的调控表达,同时,对菌株的理化特性没有影响。

但当毒力基因 *dly* 缺失后,缺失株的涌动性表现为极显著性降低($P < 0.01$),生物被膜形成能力显著性降低($P < 0.05$)。生物膜不仅有助于细菌附着于宿主细胞,同时,还能协助细菌逃避宿主免疫反应(Göçer *et al.*, 2017)。细菌生物膜形成与细菌的鞭毛具有一定关联性,有研究表明,鞭毛的调控蛋白对细菌的运动能力也有影响,如空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)鞭毛基因 *flgA* 产生插入突变后,细菌的运动性和依附于食物表面形成生物膜的能力显著降低(Kim *et al.*, 2015)。对溶藻弧菌的相关研究证实,基因 *FlhF* 能够正向调节极性鞭毛数量和细菌的涌动性(Kusumoto *et al.*, 2006)。本研究中,毒力基因 *dly* 缺失后,PDD 菌株的涌动性降低,生物膜形成能力降低,而涌动性和生物膜形成能力与细菌运动性相关,进而影响 PDD 菌株对宿主的黏附能力,最终,对 PDD 菌株的致病力产生影响。

本研究中,缺失株 $\Delta dlyPDD1608::Cm$ 的溶血性和磷脂酶活性与野生株 PDD1608 相比都有所降低,且缺失株 ECP 的溶血性和磷脂酶活性与野生株 ECP 相比也是降低的。各菌株及 ECP 的实验结果之间呈现正相关性,证实了毒力基因 *dly* 在野生株 PDD1608 中起到增强溶血性和磷脂酶活性的作用,*dly* 基因的缺失可能对 PDD 菌株胞外产物的成分产生了影响,一些溶血活性相关的产物减少,进而导致其 ECP 的溶血能力降低,这一实验结果与 Osorio 等(2000)的研究结果相类似。

本研究挑选了模式生物海水青鲷鱼作为人工感染实验的宿主,利用梯度稀释的菌液和 2 倍稀释的 ECP 分别进行鱼体创伤后的浸浴感染实验,最终测定野生株 PDD1608 和缺失株 $\Delta dlyPDD1608::Cm$ 的 LD_{50} 分别为 1.31×10^5 CFU/mL 和 1.71×10^7 CFU/mL, PDD1608 ECP 和缺失株 $\Delta dlyPDD1608::Cm$ ECP 的 LD_{50} 分别为 101.46 μ g/mL 和 110.19 μ g/mL。缺失株 $\Delta dlyPDD1608::Cm$ 的 LD_{50} 是野生株的 130.53 倍;缺失株 Δdly PDD1608::Cm ECP 的 LD_{50} 是野生株 ECP 的 1.09 倍。菌液和 ECP 的攻毒实验结果之间存在正相关性,缺失株及其 ECP 的致病性降低,表明 *dly* 基因的缺失影响了 PDD 菌株的毒力。

ECP 作为病原菌致病感染过程中的重要物质,其中包含多种产物,如溶血素、脂多糖和活性酶等,是细菌致病的关键毒力因子(Pablos *et al.*, 2010)。细菌通过黏附、寄生在宿主细胞和血液中,繁殖生长并产生 ECP 而引起宿主发病死亡,整个过程中,ECP 起到了极其重要的作用(Ben *et al.*, 2018)。因此,本研究中缺

失株 ECP 致病性降低,推测由于毒力基因 *dly* 参与调控 PDD 菌株毒力因子的表达和分泌,并且影响 PDD 菌株对宿主细胞及组织的侵染能力,这需要进行进一步的组织病理和细胞毒理实验来验证。

本研究结果有助于进一步了解毒力基因 *dly* 对 PDD 菌株生物学特性的影响,从而研究合适的防控措施来控制其传播和感染。而关于模式生物海水青鲷鱼的攻毒实验有助于为深入探究 PDD 菌株对宿主的致病机制和侵染过程提供动物参考模型,ECP 的相关实验结果可以为 PDD 亚单位疫苗的研发提供理论参考。

参 考 文 献

- AUSTIN B, AUSTIN D A. Bacterial fish pathogens: Diseases of farmed and wild fish (4th edition). Springer, 2007
- BEN H S, TAVARES R P M J, TACHIBANA L, *et al.* Fish pathogen bacteria: Adhesion, parameters influencing virulence and interaction with host cells. *Fish and Shellfish Immunol*, 2018, 80: 550–562
- GÖÇER H, EMIR D, ÖNGER M E, *et al.* Effects of bone cement loaded with teicoplanin, N-acetylcysteine or their combination on *Staphylococcus aureus* biofilm formation: An *in vitro* study. *Joint Diseases and Related Surgery*, 2017, 28(1): 13–18
- KIM J S, PARK C W, KIM J Y. Role of *flgA* for flagellar biosynthesis and biofilm formation of *Campylobacter jejuni* NCTC11168. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2015, 25(11): 1871–1879
- KUSUMOTO A, KAMISAKA K, YAKUSHI T, *et al.* Regulation of polar flagellar number by the *flhF* and *flhG* genes in *Vibrio alginolyticus*. *Journal of Biochemistry*, 2006, 139(1): 113–121
- LABELLA A M, ROSADO J J, BALADO M, *et al.* Virulence properties of three new *Photobacterium* species affecting cultured fish. *Journal of Applied Microbiology*, 2020, 129(1): 37–50
- LEE D J, BINGLE L E, HEURLIER K, *et al.* Gene doctoring: A method for recombineering in laboratory and pathogenic *Escherichia coli* strains. *BMC Microbiol*, 2009, 9(1): 252–265
- LI Y J, YU Y X, WANG Y G, *et al.* Virulence of the extracellular products of highly pathogenic strains of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(8): 2995–3006 [李永杰, 于永翔, 王印庚, 等. 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. *微生物学报*, 2022, 62(8): 2995–3006]
- LIU F, LIU G X, LI F H. Characterization of two pathogenic *Photobacterium* strains isolated from *Exopalaemon carinicauda* causing mortality of shrimp. *Aquaculture*, 2016, 464: 129–135
- LIU X, ZHANG Z, WANG L F, *et al.* Phenotypic and genetic diversity of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* isolated from aquatic animals in Hainan Province and Bohai

- Sea region. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(7): 2101–2111 [刘潇, 张正, 王丽芳, 等. 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. *微生物学报*, 2021, 61(7): 2101–2111]
- LOVE M, TEEBKEN-FISHER D, HOSE J E, *et al.* *Vibrio damsela*, a marine bacterium, causes skin ulcers on the damselfish *Chromis punctipinnis*. *Science*, 1981, 214(4525): 1139–1140
- OSORIO C R, ROMALDE J L, BARJA J L, *et al.* Presence of phospholipase-D (*dly*) gene coding for damselysin production is not a pre-requisite for pathogenicity in *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Microbial Pathogenesis*, 2000, 28(2): 119–126
- PABLOS M, REMACHA M A, RODRÍGUEZ J M, *et al.* Identity, virulence genes, and clonal relatedness of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea and drinking water. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 2010, 29(9): 1163–1172
- PENG X L, JIAN J C, DING Y. Construction of *VcrV*-deleted mutant of *Vibrio alginolyticus* and its biological characteristics. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(8): 3062–3075 [彭新亮, 简纪常, 丁燊. 溶藻弧菌 *VcrV* 基因缺失株的构建及生物学特性. *生物工程学报*, 2022, 38(8): 3062–3075]
- RIVAS A J, BALADO M, LEMOS M L, *et al.* The *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* hemolysins damselysin and HlyA are encoded within a new virulence plasmid. *Infection and Immunity*, 2011, 79(11): 4617–4627
- RIVAS A J, VON HOVEN G, NEUKIRCH C, *et al.* Phobalysin, a small beta-pore-forming toxin of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Infection and Immunity*, 2015, 83(11): 4335–4348
- SANTOS L, RAMOS F. Antimicrobial resistance in aquaculture: Current knowledge and alternatives to tackle the problem. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2018, 52(2): 135–143
- SHAO P, YONG P, ZHOU W, *et al.* First isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from half-smooth tongue sole suffering from skin-ulceration disease. *Aquaculture*, 2019, 511: 734208
- SHI L N. Pathogenicity difference of different *Photobacterium damsela* subsp. *Damsela* strains to *Sebastes schlegelii*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2019 [施琳妮. 不同美人鱼发光杆菌美人鱼亚种菌株对许氏平鲉致病力差异分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2019]
- SMITH S K, SUTTON D C, FUERST J A, *et al.* Evaluation of the genus *Listonella* and reassignment of *Listonella damsela* (Love *et al.*) MacDonell and Colwell to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* comb. nov. with an emended description. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1991, 41(4): 529–534
- TAKAHASHI H, MIYA S, KIMURA B, *et al.* Difference of genotypic and phenotypic characteristics and pathogenicity potential of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* between clinical and environmental isolates from Japan. *Microbial Pathogenesis*, 2008, 45(2): 150–158
- TAKAO S, MINORU T, KAYO K, *et al.* The national bioresource project *Medaka* (NBRP *Medaka*): An integrated bioresource for biological and biomedical sciences. *Experimental Animals*, 2010, 59(1): 13–23
- TERCETI M S, OGUT H, OSORIO C R. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, an emerging fish pathogen in the Black Sea: Evidence of a multiclonal origin. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(13): 3736–3745
- 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. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 582
- VASEEHARAN B, SUNDARARAJ S, MURUGAN T, *et al.* *Photobacterium damsela* ssp. *damsela* associated with diseased black tiger shrimp *Penaeus monodon* fabricius in India. *Letters in Applied Microbiology*, 2007, 45(1): 82–86
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(11): 401–417
- WITTBRODT J, SHIMA A, SCHARTL M. *Medaka*—A model organism from the Far East. *Nature Reviews Genetics*, 2002, 3(1): 53–64
- WU T L, JIN X M, WANG H B, *et al.* Prokaryotic expression and preparation of immune serum of hlych gene of *Photobacterium damsela*. *Progress in Veterinary Medicine*, 2018, 39(10): 31–35 [吴同垒, 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. *动物医学进展*. 2018, 39(10): 31–35]
- YAN K N, WANG X Y, WAN C S. Construction of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 espG knockout strain and analysis of its biological characteristics. *Journal of Pathogen Biology*, 2020, 15(10): 1144–1150 [延凯娜, 王湘雨, 万成松. 肠出血型大肠埃希菌 O157:H7 espG 基因缺失株的构建及其生物学特性分析. *中国病原生物学杂志*, 2020, 15(10): 1144–1150]
- YASHGIN H, NIMA B, MAJID B S. First time isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from *Caranx sexfasciatus* in Persian Gulf, Iran. *Iranian Journal of Microbiology*, 2015, 7(3): 178–184
- ZHANG H Y, WANG Q, LIU S, *et al.* Gene deletion and functional analysis of vp2918 gene in *Vibrio parahaemolyticus*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(11): 3705–3714 [张海洋, 王权, 刘爽, 等. 副溶血弧菌 VP2918 基因缺失株的构建及功能研究. *微生物学报*, 2021, 61(11): 3705–3714]
- ZHANG X H, MEADEN P G, AUSTIN B. Duplication of hemolysin genes in a virulent isolate of *Vibrio harveyi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(7): 3161–3167
- ZHANG Y Q, DENG Y Q, FENG J, *et al.* CqsA inhibits the virulence of *Vibrio harveyi* to the pearl gentian grouper (♀*Epinephelus fuscoguttatus* × ♂*Epinephelus lanceolatus*). *Aquaculture*, 2021, 535: 736346

ZHANG Z, YU Y X, WANG K, *et al.* First report of skin ulceration caused by *Photobacterium damsela* subsp.

damsela in net-cage cultured black rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Aquaculture*, 2019, 503: 1–7

(编辑 马瑾艳)

Construction and Biological Characteristics of the *dly*-Deleted Mutant Strain of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*

LIU Dingyuan^{1,2}, WANG Chunyuan², YU Yongxiang², WANG Yingeng²,
LI Jingze², ZHANG Xiaosong², QIN Lei¹, ZHANG Zheng^{2①}

(1. *Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China*; 2. *Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academic of Fishery Sciences, Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071, China*)

Abstract As a pathogen, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (PDD) is distributed widely in the marine environment, and the host species of PDD are diverse. Although in the past decade the number of reports on the pathogenicity of PDD to marine animals has gradually increased, it is necessary to study this further in order to establish targeted prevention and technical control measures to reduce harm to marine organisms. In this study, a high-virulence PDD strain (PDD1608) was selected to explore the effect of the virulence gene *dly* on the biological characteristics and pathogenicity. The *dly*-deleted mutant strain Δdly PDD1608::Cm was successfully constructed using the λ Red recombination technique. The biological characteristics of the wild-type and mutant strains were compared, including growth, swarming motility, drug susceptibility, physiological and biochemical characteristics, biofilm formation ability, and hemolytic and phospholipase activity of extracellular products (ECP). Meanwhile, *Oryzias melastigma* was used as the target host, and the pathogenicity of wild-type and mutant strains and their ECPs to *O. melastigma* was detected by the artificial infection test. There was a positive correlation between the results of the bacterial solution and ECP challenge, indicating that deletion of the *dly* gene affects the virulence of the PDD strain. Deletion of the virulence gene *dly* resulted in slower growth of the PDD mutant strain; reduced swarming and hemolytic and phospholipase activity; no change in the drug susceptibility or physiological and biochemical characteristics of the wild type and mutant strains; compared with the wild type strain, significant different ($P < 0.05$) biofilm formation ability of the mutant strain; the artificial infection test showed that the pathogenicity of the mutant strain and its ECP decreased. The results of this study revealed that the virulence gene *dly* affects many biological characteristics of PDD strains, such as growth, swarming motility, and hemolytic and phospholipase activity, and it was found to be closely related to the pathogenicity of the PDD strain and ECP.

The results of this study contribute to further study of the influence of the virulence gene *dly* on the biological characteristics of the PDD strain in order to determine the appropriate prevention and control measures to curtail its spread and infection. The artificial infection test of the model organism *O. melastigma* helps provide an animal reference model for further exploration of the pathogenic mechanism and infection process of the PDD strain on the host. The results of the ECP experiments provide a theoretical reference for the research and development of PDD subunit vaccines.

Key words *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*; Mutant strain; Extracellular products; Biological characteristics; Pathogenicity

① Corresponding author: ZHANG Zheng, E-mail: zhangzheng@ysfri.ac.cn