

## 研究报告

## 鳊源致病性舒伯特气单胞菌的分离鉴定及药敏试验

陈红莲<sup>1,2</sup>, 王永杰<sup>\*1,2</sup>, 鲍俊杰<sup>1,2</sup>, 孙雯<sup>1,2</sup>, 张静<sup>1,2</sup>, 侯冠军<sup>1,2</sup>, 程云生<sup>1,2</sup>

1 安徽省农业科学院水产研究所, 安徽 合肥 230031

2 水产增殖安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230031

陈红莲, 王永杰, 鲍俊杰, 孙雯, 张静, 侯冠军, 程云生. 鳊源致病性舒伯特气单胞菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 微生物学通报, 2023, 50(7): 2983-2994.

CHEN Honglian, WANG Yongjie, BAO Junjie, SUN Wen, ZHANG Jing, HOU Guanjuan, CHENG Yunsheng. Identification and susceptibility test of pathogenic *Aeromonas schubertii* isolated from *Siniperca chuatsi*[J]. Microbiology China, 2023, 50(7): 2983-2994.

**摘要:**【背景】舒伯特气单胞菌(*Aeromonas schubertii*)广泛分布于淡、海水水体和底泥中, 致病株已在我国养殖鲤科鱼类中流行, 也感染其他经济鱼类, 导致暴发性死亡。【目的】对病鳊(*Siniperca chuatsi*)的病原进行鉴定, 确定分离菌的致病性及药物敏感性, 为该病临床治疗提供参考。【方法】采集病鳊脾肾组织进行 PCR 或 RT-PCR 扩增其常见病毒, 采集病鳊肝脏和腹水分离培养细菌, PCR 扩增代表菌株的 *gyrB*、16S rRNA 和毒力基因, 鉴定其生理生化特征, 并进行药物敏感性试验和人工感染试验。【结果】病鳊的传染性脾肾坏死病毒、鳊蛙病毒、鳊弹状病毒检测结果为阴性, 肝脏和腹水均存在大量细菌; 代表菌株 Gui210820 被鉴定为舒伯特气单胞菌, 携带溶血素、气溶素、弹性蛋白酶和磷脂酶毒力基因, 腹腔注射感染鳊的半数致死浓度( $LD_{50}$ )为  $3.16 \times 10^5$  CFU/mL; 菌株 Gui210820 对四环素、卡那霉素、复方新诺明等 6 种抗菌药物耐药, 对强力霉素中介, 对恩诺沙星、新霉素、氟苯尼考等 11 种抗菌药物敏感。【结论】本试验从病鳊组织分离到致病性舒伯特气单胞菌, 水产准许用药物恩诺沙星、新霉素、氟苯尼考可以用于本次疾病的临床治疗。

**关键词:** 鳊; 舒伯特气单胞菌; 毒力基因; 致病性; 药物敏感性

资助项目: 安徽省农业科学院科研团队计划项目(2022YL010); 中央级公益性科研院所基本科研业务费院级统筹项目, 动物疫病数据中心; 肥西县科技局项目([2022]14)

This work was supported by the Scientific Research Team Program of Anhui Academy of Agricultural Sciences (2022YL010), the Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, National Data Center of Animal Health, and the Project of Science and Technology Bureau of Feixi County ([2022]14).

\*Corresponding author. E-mail: hfwangyongjie@163.com

Received: 2022-10-14; Accepted: 2022-12-19; Published online: 2023-02-07

## Identification and susceptibility test of pathogenic *Aeromonas schubertii* isolated from *Siniperca chuatsi*

CHEN Honglian<sup>1,2</sup>, WANG Yongjie<sup>\*1,2</sup>, BAO Junjie<sup>1,2</sup>, SUN Wen<sup>1,2</sup>, ZHANG Jing<sup>1,2</sup>,  
HOU Guanjun<sup>1,2</sup>, CHENG Yunsheng<sup>1,2</sup>

1 Fisheries Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, Anhui, China

2 Anhui Province Key Laboratory of Aquaculture & Enhancement, Hefei 230031, Anhui, China

**Abstract:** [Background] *Aeromonas schubertii* is ubiquitous in fresh water, seawater, and sediment. The pathogenic strains have been prevalent in cultured Channidae fish in China and infected other economic fishes, leading to death outbreak. [Objective] The pathogen was isolated and identified from the diseased *Siniperca chuatsi*. The pathogenicity and drug sensitivity of the isolate were determined, thereby providing references for the clinical treatment of this disease. [Methods] The spleen and kidney tissues of the diseased *S. chuatsi* were collected for polymerase chain reaction (PCR) or real-time PCR (RT-PCR) amplification of common viruses. The liver and ascites of the diseased *S. chuatsi* were pooled for the bacterial isolation and cultivation. The *gyrB*, 16S rRNA and virulence genes of the representative strain were amplified by PCR, and their physiological and biochemical characteristics were identified. The susceptibility test and the artificial infection test were carried out. [Results] The detection results of infection spleen and kidney necrosis virus, *Siniperca chuatsi* ranairidovirus and *Siniperca chuatsi* rhabdovirus in the diseased *S. chuatsi* were negative, but large amount bacteria were observed from the liver and ascites. The representative strain Gui210820 was confirmed as *A. schubertii*, and carried the virulence genes of hemolysin, aerolysin, elastase and lipase. The median lethal concentration ( $LD_{50}$ ) of *S. chuatsi* infected by peritoneal injection was  $3.16 \times 10^5$  CFU/mL. The Gui210820 strain was resistant to 6 kinds of antibiotics such as tetracycline, kanamycin, and cotrimoxazole, and sensitive to 11 kinds of antibiotics, including doxycycline, enrofloxacin, neomycin, and florfenicol. [Conclusion] In this study, pathogenic *A. schubertii* has been isolated from the tissues of the diseased *S. chuatsi*. Aquatic approved drugs enrofloxacin, neomycin, and florfenicol can be used for the clinical treatment of this bacterial disease.

**Keywords:** *Siniperca chuatsi*; *Aeromonas schubertii*; virulence genes; pathogenicity; drug susceptibility

鳊(*Siniperca chuatsi*)又名翘嘴鳊、桂花鱼,外形与石斑相似,隶属鲈形目(Perciformes)鲈科(Serranidae)鳊属(*Siniperca*),湖北、安徽、江苏、浙江等省份为主产区<sup>[1]</sup>。鳊肉质细嫩,无肌间刺,营养丰富,臭鳊鱼深受国内外消费者青睐,市场对鳊需求不断增加。近年来,鳊饲

料投喂养殖技术逐渐成熟,养殖产业快速发展。2016年以来,我国养殖鳊产量均在30万t以上<sup>[1]</sup>。同时细菌性、病毒性疾病和寄生虫病不断发生,其中,细菌性疾病对鳊的危害不断被报道。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)引起鳊败血症<sup>[2]</sup>。柱状黄杆菌(*Flavobacterium*

*columnare*)引起鳊烂鳃<sup>[3-4]</sup>。鲍氏不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、维氏气单胞菌(*A. veronii*)、迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)均能引发鳊出现暴发性疾病<sup>[5-9]</sup>。病毒性疾病也给鳊产业带来严重危害, 传染性脾肾坏死病毒(infection spleen and kidney necrosis virus, ISKNV)和鳊蛙病毒(*Siniperca chuatsi ranairidovirus*, SCRIV)在鳊中引发的疾病流行最广、危害最大<sup>[10-12]</sup>。鳊弹状病毒(*Siniperca chuatsi rhabdovirus*, SCRIV)等也给鳊产业发展带来危害<sup>[13]</sup>。

2021年安徽省池州市养殖的鳊出现暴发性死亡, 患病鳊表现败血症症状: 口腔周围、鳃盖、鳍条基部出血, 肝脏肿大, 颜色变淡, 部分鱼有出血点, 少量腹水, 胃、肠道无食物。本团队从现场取回患病鳊进行病原鉴定, 旨在找出引发此次鳊暴发性疾病的病原, 为该病的科学防治提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

患病鳊取自安徽省池州市某养殖场, 体重约(50±10) g。人工感染的健康鳊购于安徽省滁州市养殖场, 体重约(50±5) g。

Mueller-Hinton (MH)琼脂、脑心浸液肉汤(BHI)琼脂, 杭州百思生物技术有限公司; 微量生化管、革兰氏染色液、芽孢染色液、药敏纸片, 杭州天和微生物试剂有限公司; 5%绵羊血平板, 广东环凯微生物科技有限公司; SteadyPure 病毒 DNA/RNA 提取试剂盒和 Evo M-MLV 一步法 RT-PCR 试剂盒, 广州瑞真生物技术有限公司; 细菌基因组 DNA 抽提试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成; PCR 相关试剂, TaKaRa 公司。

梯度 PCR 仪, 耶拿分析仪器股份有限公司; 全自动凝胶成像仪, 上海培清科技有限公司; 双层恒温振荡器, 常州金坛精达仪器制造有限公司; 生物安全柜, 益世科(上海)企业发展有限公司; 浊度仪, 上海博取仪器有限公司; 恒温低温培养箱, 普和希健康医疗器械(上海)有限公司。

### 1.2 样本采集

取活病鳊 10 尾, 无菌取肝、脾和肾, 每尾鳊的肝、脾、肾和腹水各装进一个 1.5 mL 离心管。

### 1.3 细菌分离纯化

取 10 尾病鳊适量肝组织混合为一个样本, 匀浆, 用 BHI 培养液 10 倍系列稀释, 每个稀释度涂布 3 个 BHI 琼脂平板, 将腹水涂布 5 个 BHI 琼脂平板, 28 °C 培养, 在肝组织和腹水涂布平板各随机挑取 5 个单菌落进一步鉴定。

### 1.4 病毒鉴定

取 10 尾病鳊的脾、肾组织分别进行研磨, 用 SteadyPure 病毒 DNA/RNA 提取试剂盒提取核酸作为 PCR、RT-PCR 扩增模板。ISKNV、SCRIV、SCRV 的 PCR 引物及反应体系和条件参照梁红茹等<sup>[14]</sup>的方法进行, SCRIV 使用 Evo M-MLV 一步法 RT-PCR 试剂盒进行扩增。用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

### 1.5 细菌感染试验

取 10 mL 28 °C、125 r/min 培养过夜的鳊源 Gui210820 菌液, 10 000 r/min 离心 1 min, 用 0.65% 无菌生理盐水制成菌悬液, 使用浊度仪将菌液浓度调至 10<sup>8</sup> CFU/mL, 10 倍倍比系列稀释至 10<sup>5</sup> CFU/mL。取健康鳊暂养 2 周, 随机分为 5 组(10 尾/组), 1-4 组每尾鳊胸腔注射稀释菌悬液 0.1 mL; 第 5 组每尾鳊注射 0.1 mL 生理盐水。各组试验鳊养在 95 cm×50 cm×50 cm 玻璃缸中, 试验期间水温为(27±2) °C。感染后连续观察 14 d, 记录鳊发病和死亡情况, 按照 Reed-Muench 法

计算其半数致死浓度( $LD_{50}$ )<sup>[15]</sup>。从濒死鳊鱼肝分离 10 株细菌,测定其 16S rRNA 基因序列,将获得序列与菌株 Gui210820 的 16S rRNA 基因序列进行比对。

### 1.6 细菌生理生化鉴定

参照文献[16-17]进行菌株 Gui210820 的革兰氏染色、芽孢染色和其他生理生化特征鉴定。生理生化鉴定在微量生化管里进行。将菌株 Gui210820 接种于 5%绵羊血平板上,28 °C 培养,出现溶血圈则判断为具有溶血性。

### 1.7 细菌 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列测定和系统发育学分析

用 BHI 肉汤培养基于 28 °C、125 r/min 振荡培养 1.3 的 10 株分离菌过夜,取培养液 1 mL,10 000 r/min 离心 1 min,去上清,沉淀用细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取核酸作为 PCR 模板。16S rRNA 和 *gyrB* 基因 PCR 的扩增引物和扩增程序参考陈红莲等<sup>[18]</sup>的方法进行,用 1.2% 琼脂糖凝胶对扩增产物进行电泳。10 株分离菌 16S rRNA 基因和代表菌株 Gui210820 的 *gyrB* 基因阳性 PCR 产物直接送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

通过 NCBI 的 BLAST 检索系统进行菌株 Gui210820 的 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列同源性比对。从 NCBI 上获取嗜水气单胞菌、舒伯特气单胞菌(*A. schubertii*)、豚鼠气单胞菌(*A. caviae*)、脆弱气单胞菌(*A. trota*)、简达气单胞菌(*A. jandaei*)、中间气单胞菌(*A. media*)、嗜矿泉气单胞菌(*A. eucrenophila*)、动物气单胞菌(*A. bestiarum*)、波波夫气单胞菌(*A. popoffii*)、鳗鱼气单胞菌(*A. encheleia*)、杀鲑气单胞菌(*A. salmonicida*)、异常嗜糖气单胞菌(*A. allosaccharophila*)、维氏气单胞菌、温和气单胞菌(*A. sobria*)参考株和鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*) (作为外群)的 16S rRNA 和 *gyrB* 基

因序列<sup>[18]</sup>,使用 Clustal X2 软件对 16S rRNA 和 *gyrB* 基因分别进行多序列匹配排列,使用 MEGA 6 软件采用邻接法(neighbor joining method)构建系统发育树,并通过 1 000 次的自举分析(bootstrap)进行置信度检测。

### 1.8 细菌毒力基因扩增

溶血素基因 *hlyA*、气溶素基因 *aer*、弹性蛋白酶基因 *ela* 和磷脂酶基因 *lip* 的扩增引物和扩增程序参考何山等<sup>[19]</sup>的方法进行,用 1.2% 琼脂糖凝胶对扩增产物进行电泳。阳性 PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

### 1.9 细菌药敏试验

参考 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)的 M100 S30 文件标准中纸片扩散法进行操作及结果判断<sup>[20]</sup>。制备菌株 Gui210820 的  $10^8$  CFU/mL 菌悬液,用无菌棉签蘸取适量菌液,均匀涂布于 MH 琼脂平板,将 18 种抗菌药敏纸片贴于培养基表面,每平板 4 个,28 °C 培养 24 h,记录抑菌圈的直径(含药敏片)。

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌分离结果

肝组织和腹水涂布的 BHI 琼脂平板上生长了大量菌落,菌落的大小、形态和色泽一致。菌落圆形、边缘整齐、灰白色、中间隆起,大小为 1–2 mm。

### 2.2 病毒鉴定结果

病鳊脾肾组织 ISKNV、SCRIV 的 PCR 和 SCRIV 的 RT-PCR 检测结果均为阴性。

### 2.3 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列测定和系统发育学分析结果

将 10 株分离菌的 16S rRNA 基因序列进行比对分析,发现序列一致。代表菌株 Gui210820 的 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列被切除引物后,获得长度分别为 1 467 bp 和 1 167 bp,在 NCBI

上的登录号分别为 OP328816 和 OP328817。在 NCBI 上进行同源性搜索发现, 该菌 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列与气单胞菌属成员相应序列相似性高, 其中 16S rRNA 基因序列与多株舒伯特气单胞菌(LF1708、WL1483、CDC-2446-81)

相应序列相似性达 100%, *gyrB* 基因序列与舒伯特气单胞菌 WL1483 株相应序列相似性达 100%。16S rRNA 和 *gyrB* 基因系统发育树均显示菌株 Gui210820 与舒伯特气单胞菌聚集, 置信度均达 100% (图 1)。

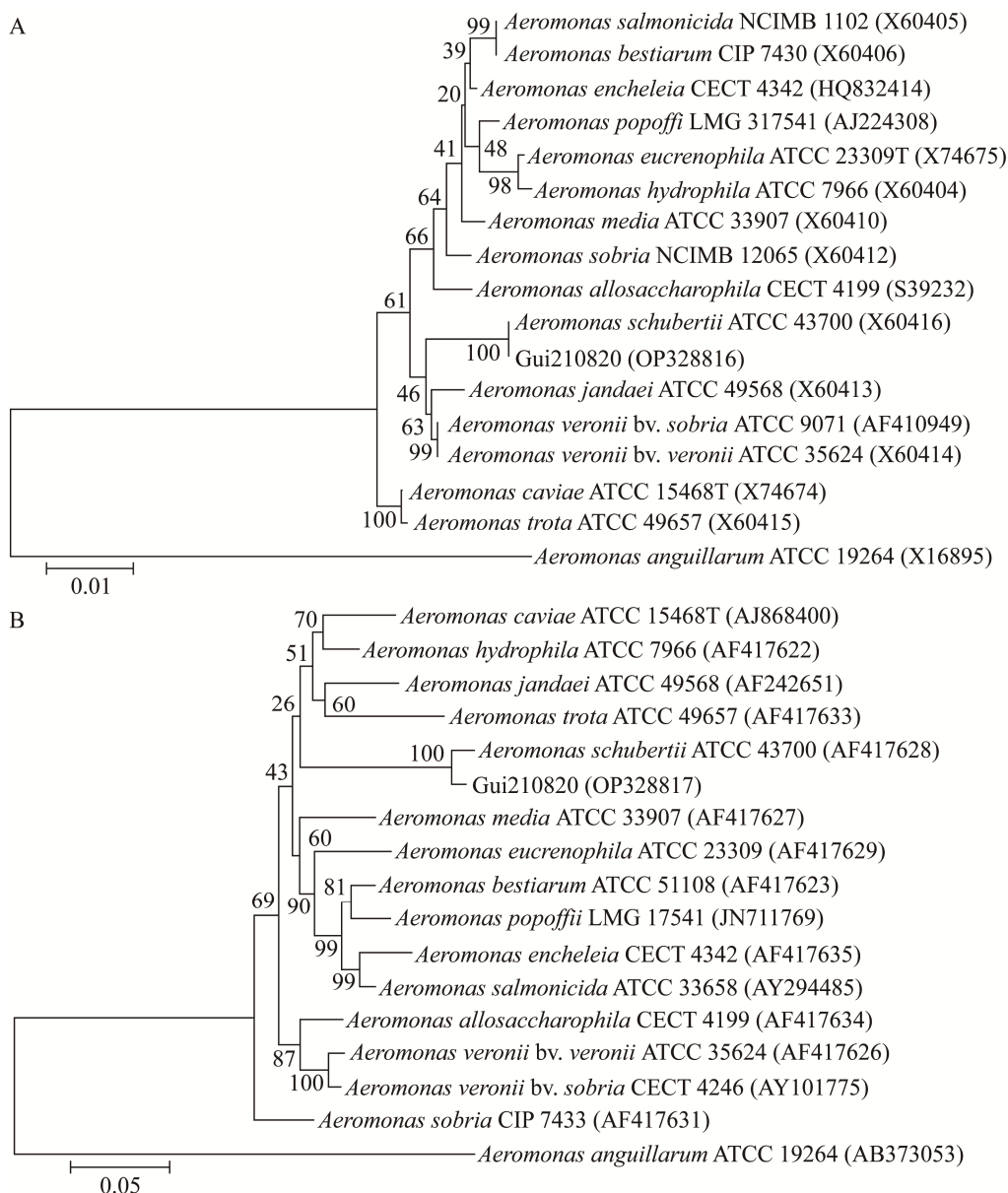


图 1 菌株 Gui210820 与相关菌株基于 16S rRNA (A) 和 *gyrB* (B) 基因序列的系统发育树 括号内数值为菌株在 GenBank 中登录号; 分支点上数字为重复 1 000 次自展值; 标尺为核苷酸替换率

Figure 1 Phylogenetic tree of strain Gui210820 and related strains based on 16S rRNA (A) and *gyrB* (B) gene sequence. Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; Numbers at the nodes indicate the level of bootstrap values based on 1 000 replications; The scale bar substitutions per nucleotide position.

## 2.4 回归感染试验结果

菌株 Gui210820 注射感染鳊后,  $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$  CFU/mL 组鳊第 1 天开始死亡, 第 6 天达到最高累计死亡率, 分别为 100%、90%、70%,  $10^5$  CFU/mL 组鳊第 2 天开始死亡, 第 7 天达到最高累计死亡率 30% (图 2)。菌株 Gui210820 对鳊的  $LD_{50}$  为  $3.16 \times 10^5$  CFU/mL。对照组未发生死亡。人工感染鳊的疾病症状与自然患病鳊的症状相似, 鳃盖、鳍条基部出血(图 3A), 肝脏肿大, 出血, 少量腹水(图 3B)。从濒死鳊肝分离细菌的 16S rRNA 基因与原分离菌的相应序列一致。

## 2.5 生理生化鉴定结果

菌株 Gui210820 被鉴定为革兰氏阴性菌, 细菌短杆状, 两端钝圆, 无芽孢。菌株 Gui210820 的 28 个生理生化特征与舒伯特气单胞菌的相应特征相符(表 1)。主要特征包括鸟氨酸脱羧酶、吲哚阴性, 不发酵葡萄糖, 不分解甘露醇、蔗糖、七叶苷、阿拉伯糖, 发生溶血。

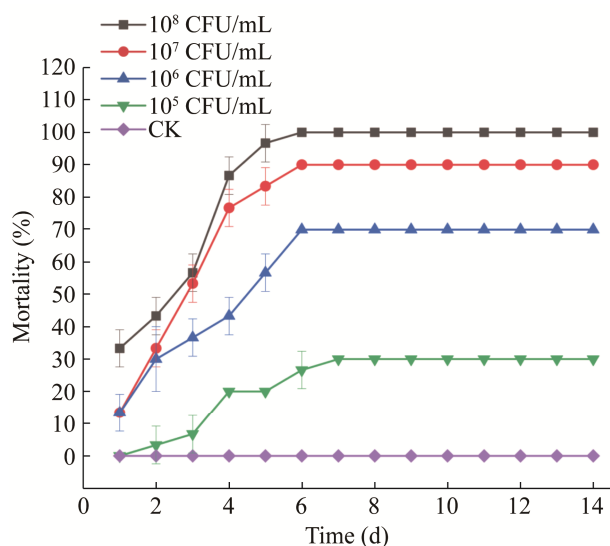


图 2 菌株 Gui210820 对鳊的感染试验 CK: 生理盐水

Figure 2 Infection test of strain Gui210820 to *Siniperca chuatsi*. CK: Normal saline.

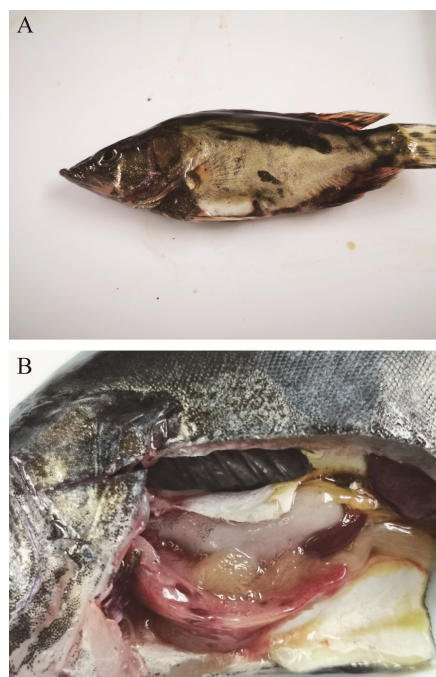


图 3 感染菌株 Gui210820 患病鳊的体表(A)和体内(B)症状

Figure 3 The surface (A) and internal (B) symptoms of the diseased *Siniperca chuatsi* infected strain Gui210820.

## 2.6 毒力基因扩增结果

PCR 扩增 Gui210820 菌株 *hlyA*、*aer*、*ela* 和 *lip* 毒力基因均为阳性, 电泳结果见图 4, 切除引物后获得序列长度分别为 333、391、495 和 207 bp, 在 NCBI 上的登录号分别为 OP328818、OP328819、OP328820 和 OP328821。在 NCBI 上同源性搜索发现, 4 个毒力基因序列与气单胞菌属成员相应序列相似性高, 与舒伯特气单胞菌 WL1483 株相应序列相似性达 100%。

## 2.7 药物敏感试验结果

菌株 Gui210820 对 18 种抗菌药物中环丙沙星、恩诺沙星、萘啶酸、新霉素、妥布霉素、庆大霉素、氟苯尼考、链霉素、头孢噻肟、氨曲南、多黏菌素 B 敏感; 对强力霉素中度敏感; 对四环素、卡那霉素、复方新诺明、利福平、头孢噻吩、甲氧苄啶耐药(表 2)。

表 1 菌株 Gui210820 生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain Gui210820

特性 Character	Gui210820	舒伯特气单胞菌* <i>Aeromonas schubertii</i> *
氧化酶 Oxidase	+	+
接触酶 Catalase	+	+
O-F 实验 O-F test	F	F
运动性 Motility	+	+
棉籽糖 Raffinose	-	-
肌醇 Inositol	-	-
麦芽糖 Maltose	+	+
木糖 Xylose	-	-
阿拉伯醇 Arabitol	-	-
丙二酸盐 Malonate	-	-
鼠李糖 Rhamnose	-	-
硝酸盐还原	+	+
Nitrate reduction		
葡萄糖: 产气	-	-
Glucose: gas production		
尿素 Urea	-	-
甘露醇 Mannitol	-	-
吲哚 Indole	-	-
蔗糖 Sucrose	-	-
七叶苷 Esculin hydrolysis	-	-
阿拉伯糖 Arabinose	-	-
溶血 Hemolysis	+	+
H <sub>2</sub> S 产生 H <sub>2</sub> S production	-	-
KCN 生长 KCN growth	-	-
纤维二糖 Cellobiose	-	-
水杨苷 Salicin	-	-
O/129 (R)	+	+
赖氨酸脱羧酶	+	d
Lysine decarboxylase		
精氨酸双水解酶	+	+
Arginine dihydrolase		
鸟氨酸脱羧酶	-	-
Ornithine decarboxylase		

+: 阳性; -: 阴性; d: 不同株有不同反应; \*: 指菌株生理生化特征来自文献[17]

+: Positive; -: Negative; d: Different reaction in different strains; \*: Physiological and biochemical characteristics of *A. schubertii* are taken from the reference [17].

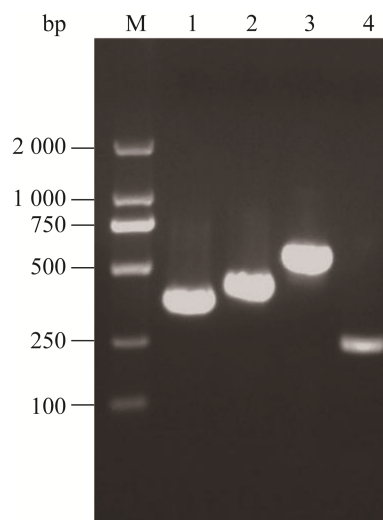


图 4 菌株 Gui210820 毒力基因 PCR 扩增产物电泳图

Figure 4 Electrophoresis map of PCR amplified-virulence genes products of strain Gui210820. M: DL2000 DNA Marker; 1: *hlyA*; 2: *aer*; 3: *ela*; 4: *lip*.

### 3 讨论与结论

本研究中病鳎的 ISKNV、SCRIV、SCRV 检测结果为阴性,但从病鳎肝脏和腹水中分离到大量细菌,10 株分离菌获得的 16S rRNA 基因序列一致,代表菌株 Gui210820 的 28 个生理生化特征与舒伯特气单胞菌的相应特征相符<sup>[17]</sup>,16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列与舒伯特气单胞菌 WL1483 株相应序列完全一致,进化树分析与舒伯特气单胞菌参考株 ATCC43700 聚集,鉴定该菌为舒伯特气单胞菌。菌株 Gui210820 对鳎的半数致死浓度为  $3.16 \times 10^5$  CFU/mL,确定本次从病鳎中分离的细菌为致病性舒伯特气单胞菌。

舒伯特气单胞菌又称舒氏气单胞菌隶属气单胞菌科(*Aeromonadaceae*)气单胞菌属<sup>[17]</sup>。1981 年该菌首次在受伤病人脓肿中发现<sup>[21]</sup>,逐渐形成一种人、兽和鱼共患病病原<sup>[22]</sup>。舒伯特气单胞菌广泛分布于淡、海水的水体和底泥中<sup>[23-24]</sup>。2009 年以来,致病性舒伯特气单胞菌主要在我

表 2 菌株 Gui210820 药物敏感试验结果

Table 2 Drug sensitivity test results of strain Gui210820

药物种类	抗菌药物	抑菌圈直径	敏感性
Category of antibiotics	Antibiotics	Diameter of inhibition (mm)	Sensitivity
喹诺酮类 Quinolones	环丙沙星 Ciprofloxacin	31.61±0.51	S
	恩诺沙星 Enrofloxacin	31.28±0.67	S
	萘啶酸 Nalidixic acid	34.06±0.56	S
四环素类 Tetracyclines	四环素 Tetracycline	9.19±0.82	R
	强力霉素 Doxycycline	14.75±0.31	I
氨基糖苷类 Minoglycosides	新霉素 Neomycin	21.62±0.42	S
	妥布霉素 Tobramycin	31.36±0.63	S
	卡那霉素 Kanamycin	6.00	R
	庆大霉素 Gentamicin	32.86±0.51	S
	链霉素 Streptomycin	20.50±0.32	S
磺胺类 Sulfonamides	复方新诺明 Trimethoprim sulfamethoxazole	6.00	R
	甲氧苄啶 Trimethoprim	6.00	R
利福平类 Rifampicin	利福平 Rifampicin	14.84±0.46	R
氯霉素类 Chloramphenicols	氟苯尼考 Florfenicol	18.67±0.55	S
β-内酰胺类 β-lactams	头孢噻吩 Cephalothin	6.00	R
	头孢噻肟 Cefotaxime	34.09±0.59	S
	氨曲南 Aztreonam	45.16±0.50	S
多肽类 Polypeptides	多黏菌素 B Polymyxin B	20.89±0.43	S

S: 高度敏感; I: 中度敏感; R: 耐药

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

国养殖鲤科鱼类中流行,感染乌鳢、斑鳢、杂交鳢和罗非鱼后,肝、脾和肾组织出现类结节症状<sup>[3,25-30]</sup>。该菌也引发其他经济鱼类发病,感染鳖、淡红墨头鱼和虹鳟出现败血症和体表溃烂症状<sup>[31-33]</sup>。本研究中舒伯特气单胞菌自然感染鳊和人工感染鳊症状相似,均只出现了败血症症状。

菌株 Gui210820 携带 *hlyA*、*aer*、*ela* 和 *lip* 毒力基因,4 个基因序列与 2014 年从乌鳢中分离的强致病性舒伯特气单胞菌 WL1483 株相应序列完全一致<sup>[34]</sup>。气单胞菌的致病力被认为是多个毒力基因协同作用的结果<sup>[35-36]</sup>。*hlyA* 编码的溶血素形成共聚体以管道形式插入细胞膜上,导致溶血<sup>[37]</sup>。*aer* 编码的蛋白是维氏气单胞菌入侵肠道的一个关键毒力因子,敲除 *aer* 基

因的维氏气单胞菌感染斑马鱼(*Danio rerio*),死亡率比野生株明显下降<sup>[38]</sup>。张旭杰等<sup>[35]</sup>对 6 个发病鱼塘中分离的 30 株嗜水气单胞菌进行毒力基因分析,发现强毒株均同时携带 *hlyA* 和 *aer* 基因。同时携带 *hlyA* 和 *aer* 基因对嗜水气单胞菌毒力起倍增的作用<sup>[39]</sup>。弹性蛋白酶也被认为是嗜水气单胞菌的关键毒力因子,敲除 *ela* 基因的嗜水气单胞菌感染虹鳟,死亡率显著下降<sup>[40]</sup>。刘永杰等<sup>[41]</sup>通过腹腔注射纯化的弹性蛋白酶,发现能致死小鼠。气单胞菌 *lip* 编码的脂酶被证实对动物和细胞没有毒性,不是气单胞菌关键毒力因子<sup>[42]</sup>,但促进宿主细胞膜病变,能增加感染的严重性<sup>[43]</sup>。

本文鳊源舒伯特气单胞菌对四环素、卡那霉素、复方新诺明、甲氧苄胺嘧啶、利福平、

头孢噻吩耐药。这个结果与 2014 年以来鳊源舒伯特气单胞菌对四环素、卡那霉素耐药的结果<sup>[29-30]</sup>一致, 与部分鳊源舒伯特气单胞菌对磺胺类和头孢噻吩耐药的结果<sup>[19,30,44]</sup>一致。本文鳊源舒伯特气单胞菌对 11 种抗菌药物敏感, 包括鳊源菌株普遍反映耐药的妥布霉素和链霉素<sup>[29-30,45]</sup>。本研究对鳊源致病性舒伯特气单胞菌进行分离鉴定和毒力基因及耐药性检验, 发现代表菌株携带多个毒力基因, 水产准许使用药物恩诺沙星、新霉素和氟苯尼考可以用于本次鳊疾病治疗。

## REFERENCES

- [1] 国家特色淡水鱼产业技术体系. 中国鳊鱼产业发展报告[J]. 中国水产, 2021(4): 23-32.  
National modern agriculture industry technology system. Development report of mandarin fish industry in China[J]. China Fisheries, 2021(4): 23-32 (in Chinese).
- [2] 陈昌福, 李静. 翘嘴鳊细菌性败血症病原菌的分离及其致病力的研究[J]. 华中农业大学学报, 1996, 15(4): 370-373.  
CHEN CF, LI J. Studies on virulence and isolation of pathogenic bacteria causing bacterial septicemia in mandarin fish (*Siniperca chuatsi* basilewsky)[J]. Journal Huazhong (Central China) Agricultural University, 1996, 15(4): 370-373 (in Chinese).
- [3] 陈昌福, 史维舟, 赵桂珍, 李明政. 翘嘴鳊烂鳃病原菌的分离及初步鉴定[J]. 华中农业大学学报, 1995, 14(3): 263-266.  
CHEN CF, SHI WZ, ZHAO GZ, LI MZ. Isolation and identification of pathogenic bacteria causing roted gill disease in mandarin fish (*Siniperca chuatsi* basilewsky)[J]. Journal Huazhong (Central China) Agricultural University, 1995, 14(3): 263-266 (in Chinese).
- [4] 黄文芳, 李海燕, 张剑英. 翘嘴鳊烂鳃病原的研究[J]. 微生物学通报, 1999, 26(4): 246-250.  
HUANG WF, LI HY, ZHANG JY. The pathogen of bacterial gill disease in mandarin fish *Siniperca chuatsi*[J]. Microbiology, 1999, 26(4): 246-250 (in Chinese).
- [5] 顾天钊, 陆承平, 陈怀青. 鲍氏不动杆菌: 鳊鱼暴发性死亡的新病原[J]. 微生物学通报, 1997, 24(2): 104-106.  
GU TZ, LU CP, CHEN HQ. Acine to bacter baumannii a novel pathogen of acute epidemic in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)[J]. Microbiology, 1997, 24(2): 104-106 (in Chinese).
- [6] 安伟, 肖雨, 高晓华, 张明辉, 张崇文, 邵玲, 何正侃. 鳊源致病性荧光假单胞菌的分离与鉴定[J]. 动物学杂志, 2014, 49(5): 760-765.  
AN W, XIAO Y, GAO XH, ZHANG MH, ZHANG CW, SHAO L, HE ZK. Isolation and identification of pathogenic *Pseudomonas fluorescens* from *Siniperca chuatsi*[J]. Chinese Journal of Zoology, 2014, 49(5): 760-765 (in Chinese).
- [7] 高金伟, 梁利国, 王亚冰, 谢骏. 鳊源致病性维氏气单胞菌的鉴定及药敏试验[J]. 微生物学通报, 2016, 43(12): 2686-2692.  
GAO JW, LIANG LG, WANG YB, XIE J. Identification and susceptibility test of pathogenic *Aeromonas veronii* isolated from *Siniperca chuatsi*[J]. Microbiology China, 2016, 43(12): 2686-2692 (in Chinese).
- [8] 吴勇亮, 苗鹏飞, 于辉, 谭淑雯, 杨虹, 彭钟琴, 杨映. 鳊鱼致病性迟缓爱德华氏菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 南方农业学报, 2018, 49(4): 794-799.  
WU YL, MIAO PF, YU H, TAN SW, YANG H, PENG ZQ, YANG Y. Isolation, identification and drug susceptibility test of pathogenic *Edwardsiella tarda* in *Siniperca chuatsi*[J]. Journal of Southern Agriculture, 2018, 49(4): 794-799 (in Chinese).
- [9] 邓汝森, 张建州, 张浩权, 黎家明, 罗世诚, 颜广智, 陈盛楠, 黄良宗. 鳊源维氏气单胞菌的分离鉴定及毒力基因分析[J]. 动物医学进展, 2022, 43(2): 35-40.  
DENG RS, ZHANG JZ, ZHANG HQ, LI JM, LUO SC, YAN GZ, CHEN SN, HUANG LZ. Isolation, identification and virulence gene analysis of *Aeromonas vinieri* from *Siniperca chuatsi*[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2022, 43(2): 35-40 (in Chinese).
- [10] HE J, DENG M, WENG SP, LI Z, ZHOU SY, LONG QX, WANG XZ, CHAN SM. Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus[J]. Virology, 2001, 291(1): 126-139.
- [11] LIU XD, CHEN N, GAO XJ, ZHANG YY, LI XX, ZHANG Y, BING XW, HUANG HZ, ZHANG XJ. The infection of red seabream iridovirus in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) and the host immune related gene

- expression profiles[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 74: 474-484.
- [12] 梁红茹, 黄瑜聪, 付小哲, 林强, 刘礼辉, 牛银杰, 黄志斌, 林鑫, 李宁求. 鳊蛙病毒及鳊弹状病毒双重 PCR 检测方法的建立及应用[J]. *中国预防兽医学报*, 2021, 43(3): 290-295.
- LIANG HR, HUANG YC, FU XZ, LIN Q, LIU LH, NIU YJ, HUANG ZB, LIN L, LI NQ. Development of a duplex PCR for the detection of *Siniperca chuatsi* ranairidovirus and *Siniperca chuatsi* rhabdovirus[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2021, 43(3): 290-295 (in Chinese).
- [13] TAO JJ, GUI JF, ZHANG QY. Isolation and characterization of a rhabdovirus from co-infection of two viruses in mandarin fish[J]. *Aquaculture*, 2007, 262(1): 1-9.
- [14] 梁红茹, 马赛亚, 付小哲, 林强, 刘礼辉, 牛银杰, 黄志斌, 林鑫, 李宁求. 传染性脾肾坏死病毒、鳊鱼蛙病毒和鳊弹状病毒三重 PCR 检测方法的建立[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2021, 49(11): 17-24.
- LIANG HR, MA SY, FU XZ, LIN Q, LIU LH, NIU YJ, HUANG ZB, LIN L, LI NQ. Establishment of multiple PCR assay for detecting infectious spleen and kidney necrosis virus, *Siniperca chuatsi* ranairidovirus and *Siniperca chuatsi* rhabdovirus[J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2021, 49(11): 17-24 (in Chinese).
- [15] REED LJ, MUENCH H. A simple method of estimating fifty percent endpoints[J]. *American Journal of Epidemiology*, 1938, 27(3): 493-497.
- [16] 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 XZ, CAI MY. *Handbook of Identification of Common Bacterial Systems*[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [17] BRENNER DJ, KRIEG NR, STALEY JT. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (second edition Part B)[M]. Dordrecht Heidelberg London New York: Springer-verlag, 2005.
- [18] 陈红莲, 江河, 胡王, 凌俊, 段国庆. 黄鳝病原性维氏气单胞菌温和生物变种的分离与鉴定[J]. *生物技术通报*, 2014(3): 130-136.
- CHEN HL, JIANG H, HU W, LING J, DUAN GQ. Isolation and identification of pathogenic *Aeromonas veronii* biovar *sobria* from *Monopterus albus*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2014(3): 130-136 (in Chinese).
- [19] 何山, 谭爱萍, 姜兰, 赵飞, 刘付翠, 张瑞泉, 邓玉婷. 四株杂交鳊致病性舒伯特气单胞菌特性及致病性比较[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(10): 2630-2644.
- HE S, TAN AP, JIANG L, ZHAO F, LIU FC, ZHANG RQ, DENG YT. Comparative on characteristics and pathogenicity of four strains of *Aeromonas schubertii* isolated from snakehead hybrid[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(10): 2630-2644 (in Chinese).
- [20] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Thirtieth Informational Supplement[M]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020.
- [21] HICKMAN-BRENNER FW, FANNING GR, ARDUINO MJ, BRENNER DJ, FARMER JJ. *Aeromonas schubertii*, a new mannitol-negative species found in human clinical specimens[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1988, 26(8): 1561-1564.
- [22] 刘春, 曹际振, 张德锋, 王庆, 石存斌, 常藕琴, 林鑫. 舒伯特气单胞菌研究进展[J]. *动物医学进展*, 2021, 42(4): 95-99.
- LIU C, CAO JZ, ZHANG DF, WANG Q, SHI CB, CHANG OQ, LIN L. Advances in *Aeromonas schubertii*[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2021, 42(4): 95-99 (in Chinese).
- [23] 古小莉, 李纯厚. 大亚湾海洋异养细菌的初步研究[J]. *南方水产*, 2009, 5(4): 64-68.
- GU XL, LI CH. A preliminary study of heterotrophic bacteria in *Daya Bay*[J]. *South China Fisheries Science*, 2009, 5(4): 64-68 (in Chinese).
- [24] 江敏, 胡文婷, 凌云, 吴昊, 邢斌, 卢柳, 任治安. 滴水湖沉积物中可培养优势微生物种群初探[J]. *生物学杂志*, 2011, 28(4): 57-60.
- JIANG M, HU WT, LING Y, WU H, XING B, LU L, REN ZA. Preliminary study of cultivable dominant microorganisms in sediment of Dishui Lake[J]. *Journal of Biology*, 2011, 28(4): 57-60 (in Chinese).
- [25] 刘春, 李凯彬, 王庆, 常藕琴, 梁慧丽, 王芳, 潘德博, 石存斌, 吴淑勤. 杂交鳊(斑鳊♀×乌鳊♂)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.
- LIU C, LI KB, WANG Q, CHANG OQ, LIANG HL, WANG F, PAN DB, SHI CB, WU SQ. Isolation, identification and characterization of *Aeromonas schubertii* from hybrid snakehead (*Channa maculata*♀×*C. argus*♂)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(7): 1119-1125 (in Chinese).
- [26] 罗霞, 邓国成, 廖国礼, 杨小静, 赵长臣, 黄志斌, 苏建光. 斑鳊内脏白点病病原的分离鉴定[J]. *大连海洋大学学报*, 2012, 27(2): 95-100.

- LUO X, DENG GC, LIAO GL, YANG XJ, ZHAO CC, HUANG ZB, SU JG. Isolation and identification of causative pathogen for visceral white spot in Taiwan snakehead *Channa maculata*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2012, 27(2): 95-100 (in Chinese).
- [27] LIU JY, LI AH. First case of *Aeromonas schubertii* infection in the freshwater cultured snakehead fish, *Ophiocephalus argus* (Cantor), in China[J]. Journal of Fish Diseases, 2012, 35(5): 335-342.
- [28] CHEN YF, LIANG RS, ZHUO XL, WU XT, ZOU JX. Isolation and characterization of *Aeromonas schubertii* from diseased snakehead, *Channa maculata* (Lacepède)[J]. Journal of Fish Diseases, 2012, 35(6): 421-430.
- [29] 齐冬梅, 徐蕙, 易婷, 王汉清, 胡文军, 张震, 林旭堃. 乌鳢舒氏气单胞菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(2): 11-14.
- QI DM, XU H, YI T, WANG HQ, HU WJ, ZHANG Z, LIN XY. Isolation, identification and drug susceptibility of *Aeromonas schubertii* in snakeheaded fish[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2016, 50(2): 11-14 (in Chinese).
- [30] 张德锋, 刘春, 可小丽, 常藕琴, 卢迈新, 石存斌, 袁伟, 郝贵杰, 梁丽. 一株多重耐药鳃源舒氏气单胞菌的分离、鉴定及其耐药性分析[J]. 中国预防兽医学报, 2017, 39(12): 981-986.
- ZHANG DF, LIU C, KE XL, CHANG OQ, LU MX, SHI CB, YUAN W, HAO GJ, LIANG L. Isolation, identification and antimicrobial resistance of a multidrug-resistant *Aeromonas schubertii* isolated from snakehead fish[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2017, 39(12): 981-986 (in Chinese).
- [31] 李福荣, 潘兹书, 肖玉玲, 王文欣. 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 FR, PAN ZS, XIAO YL, WANG WX. Study on germs causing disease of skin rot, furuncles and blisters of turtles[J]. Journal of Henan University (Natural Science Edition), 1994, 24(3): 89-93 (in Chinese).
- [32] 余华, 何智, 严玉宝, 杨光友, 胡娟, 周岷江. 温泉鱼致病性类志贺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, HE Z, YAN YB, YANG GY, HU J, ZHOU MJ. Identification of *Plesiomonas shigelloides* and *Aeromonas schubertii* from doctor fish (*Garra rufa*) and antibiotics sensitivity[J]. Chinese Journal of Animal Health Inspection, 2009, 26(7): 37-39 (in Chinese).
- [33] AKAYLI T, ÇANAK Ö, BAŞARAN B. A study on *Aeromonas schubertii* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792)[J]. Bibad Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi, 2011, 4(1): 99-106.
- [34] LIU LH, LI NQ, ZHANG DF, FU XZ, SHI CB, LIN Q, HAO GJ. Complete genome sequence of the highly virulent *Aeromonas schubertii* strain WL1483, isolated from diseased snakehead fish (*Channa argus*) in China[J]. Genome Announcements, 2016, 4(1): e01567-e01515.
- [35] 张旭杰, 杨五名, 李彤彤, 李爱华. 湖北地区暴发病池塘中嗜水气单胞菌的遗传多样性和毒力特征研究[J]. 水生生物学报, 2013, 37(3): 458-466.
- ZHANG XJ, YANG WM, LI TT, LI AH. The genetic diversity and virulence characteristics of *Aeromonas hydrophila* isolated from fishponds with disease outbreaks in Hubei Province[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2013, 37(3): 458-466 (in Chinese).
- [36] 龙苏, 韩书煜, 牛志伟, 梁静真, 胡大胜, 黄钧, 李鸿骥, 刘齐, 苏江华. 胡子鲶致病性气单胞菌的分离鉴定及其致病力与毒力基因型相关性[J]. 水产学报, 2016, 40(3): 308-317.
- LONG S, HAN SY, NIU ZW, LIANG JZ, HU DS, HUANG J, LI HJ, LIU Q, SU JH. Isolation and identification of pathogenic *Aeromonas* in *Clarias fuscus* and analysis of the correlation between its pathogenicity and virulence genotypes[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(3): 308-317 (in Chinese).
- [37] MENZL K, MAIER E, CHAKRABORTY T, BENZ R. HlyA hemolysin of *Vibrio cholerae* O1 biotype E1 Tor. identification of the hemolytic complex and evidence for the formation of anion-selective ion-permeable channels[J]. European Journal of Biochemistry, 1996, 240(3): 646-654.
- [38] RAN C, QIN CB, XIE MX, ZHANG JX, LI J, XIE YD, WANG YB, LI SN, LIU LH, FU XZ, LIN Q, LI NQ, LILES MR, ZHOU ZG. *Aeromonas veronii* and aerolysin are important for the pathogenesis of motile aeromonad septicemia in cyprinid fish[J]. Environmental Microbiology, 2018, 20(9): 3442-3456.
- [39] WONG CYF, HEUZENROEDER MW, FLOWER RLP. Inactivation of two haemolytic toxin genes in *Aeromonas hydrophila* attenuates virulence in a suckling mouse model[J]. Microbiology (Reading, England), 1998, 144 (Pt 2): 291-298.
- [40] CASCÓN A, YUGUEROS J, TEMPRANO A, SÁNCHEZ M, HERNANZ C, LUENGO JM,

- NAHARRO G. A major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*[J]. Infection and Immunity, 2000, 68(6): 3233-3241.
- [41] 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 YJ, LU CP. Purification and characterization of elastase from *Aeromonas hydrophila* strain J-1[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2006, 26(1): 54-56 (in Chinese).
- [42] 巢伟. 嗜水气单胞菌 J-1 株脂酶性质分析及其克隆表达[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2007.
- CHAO W. Characterization and gene cloning, expression of a lipase of *Aeromonas hydrophila* J-1[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agriculture University, 2007 (in Chinese).
- [43] NAWAZ M, KHAN SA, KHAN AA, SUNG K, TRAN Q, KERDAHI K, STEELE R. Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish[J]. Food Microbiology, 2010, 27(3): 327-331.
- [44] 莫金凤, 姜兰, 吴灶和. 乌鳢源舒伯特气单胞菌生物学特性及其药物敏感性分析[J]. 水产学报, 2016, 40(3): 484-494.
- MO JF, JIANG L, WU ZH. Biological characteristics and drug susceptibility of *Aeromonas schubertii* WL-4 isolated from snakehead[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(3): 484-494 (in Chinese).
- [45] REN ZL, CAI Y, WANG SF, LIU SB, LI A, XIONG YF, TANG JQ, SUN Y, GUO WL, ZHOU YC. First case of *Aeromonas schubertii* infection in brackish water wild Nile *Tilapia*, *Oreochromis niloticus*, in China[J]. Aquaculture, 2019, 501: 247-254.