

一株从草鱼中分离的嗜水气单胞菌的病原学及基因组特征

王艺¹, 刘文珍², 傅松哲^{1*}, 吴葵³,
夏与晴¹, 华昕彤¹, 刘鹰¹, 欧阳敏²

(1. 大连海洋大学, 水产设施养殖与装备工程技术研究中心, 辽宁大连 116023;

2. 江西省水产品质量安全监测中心, 江西 南昌 330046;

3. 南昌市疾病预防控制中心, 江西 南昌 330038)

摘要: 为确定南昌地区某渔场草鱼出血性败血症的病原体及病原特征, 从患病草鱼的肝脏病灶中分离出一株致病菌A1310。对分离菌进行了形态特征、理化特性等表型生物学检验、人工感染实验及对抗菌药物的敏感性实验, 并对其进行了全基因组测序、基于多序列位点分型(multilocus sequence typing, MLST)的系统进化分析及毒力基因分析。结果显示, 生理生化鉴定证明该菌为嗜水气单胞菌, 当浓度达 1.0×10^6 CFU/mL时, 对草鱼有致病性; 对供试20种抗菌药物中的青霉素等7种耐药, 对卡那霉素等5种敏感; A1310株基因组框架序列共包含96个与毒力和防御相关基因, 其中多药耐药性外排泵基因占大多数, 约为22%; 与美国斑点叉尾鲷分离株(S15-242、S15-458、S15-591、S15-700)聚类为同一进化分支; 比较基因组分析发现, A1310具有一个删减版的VI型分泌系统(type VI secretion system, T6SS), 基因数量为标准VI型分泌系统的80%, 缺少vgrG和vca0109基因的部分片段。综上所述, 来源于草鱼的嗜水气单胞菌菌株A1310, 与美国斑点叉尾鲷分离株具有亲缘关系, 含有多个已报道的嗜水气单胞菌的毒力基因。本研究不仅丰富了嗜水气单胞菌的生物学性状内容, 也为嗜水气单胞菌的有效检验、防治和深入研究提供一定的参考, 对草鱼的疾病防控具有一定意义。

关键词: 草鱼; 嗜水气单胞菌; 生物学性状; T6SS相关毒力基因

中图分类号: S 941.4

文献标志码: A

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)属于气单胞菌科(Aeromonadaceae), 气单胞菌属(*Aeromonas*), 普遍存在于淡水及海洋中^[1-2], 是一种典型的人—兽—鱼共患病病原^[3]。在20世纪80年代末, 曾导致我国上海、江苏、湖北等多个省市养殖的淡水鱼类大量死亡, 是造成养殖户经济损失的重要病原, 国内外水产界一直对其高度重视^[4]。

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)属鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae)、草鱼属(*Ctenoph-*

aryngodon), 作为我国四大家鱼之一, 深受广大消费者喜爱, 具有较高的经济价值^[5]。但随着近些年来养殖规模的扩大, 各种流行性病害也随之发生, 给草鱼养殖业造成了巨大的经济损失, 而嗜水气单胞菌是造成草鱼病害暴发的主要病原之一。2014年7月, 笔者对江西南昌某养殖场相继死亡的草鱼进行了检验。分别以其病变组织为材料做细菌学检验。结果显示, 分离菌株为气单胞菌属的嗜水气单胞菌。为了丰富该菌在生物学性状及分子生物学等方面的研究, 笔

收稿日期: 2018-01-30 修回日期: 2018-04-24

资助项目: 国家重点研发计划项目(2017YFD0701700, 2017YFB0404000); 国家自然科学基金(31672673, 31472312)

通信作者: 傅松哲, E-mail: fusongzhe@dlou.edu.cn

者就草鱼的发病情况、病鱼的临床表现、病原嗜水气单胞菌的主要形态与理化特性、致病性、对抗菌药物的敏感性和多序列位点分型进行了研究,并对病原菌进行了全基因组测序,旨在为嗜水气单胞菌的有效检验、防治和进一步研究提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 细菌分离

对病死草鱼进行病理检验,以1尾病死草鱼的肝脏、脾脏和肾脏为样品进行细菌分离,经革兰氏染色镜检后划线接种于普通琼脂培养基,于28℃培养48 h,将分离菌移接于普通营养琼脂斜面保存供检验用。

1.2 细菌形态、菌落特征与理化特性检查

取纯培养菌移接于普通营养琼脂斜面培养(28℃培养24 h)制备成涂片标本,经革兰氏染色镜检细菌形态特征;取纯培养菌,分别接种于普通营养琼脂、血液营养琼脂培养基平板及致病性嗜水气单胞菌鉴别培养基(*Aeromonas hydrophila* medium, AHM)试管(28℃培养24 h),检查生长情况及菌落特征。取纯培养菌,按常规理化特性测定方法,分别接种于细菌理化鉴定用培养基,主要参照《常见细菌系统鉴定手册》^[6]及《人及动物病原细菌学》^[7]进行。

1.3 人工感染实验

实验于江西省水产品质量安全监测中心养殖系统中开展。实验用鱼选用12尾体长在200 mm左右的健康草鱼,暂养1周。将分离菌接种于普通固体培养基,28℃培养12 h。用无菌生理盐水配制成浓度为 1.0×10^6 CFU/mL的菌液。将所选鱼分为1个对照组和1个实验组,每组6尾。实验组经肌肉注射0.2 mL的菌液,对照组注射0.2 mL无菌生理盐水。于隔离的实验养殖箱中分别养殖,每天观察鱼的活动情况。可引起实验组鱼发病死亡并能重新分离回收到病原感染菌,则说明分离菌具有致病性。

1.4 药物敏感性测定

经鉴定后的菌株,采用常规琼脂扩散(K-B)法进行20种抗菌药物敏感性测定,参照《全国临床检验操作规程》,以抑菌圈直径大小作为

敏感与耐药的判定指标^[8]。药敏纸片为杭州天和微生物试剂有限公司产品。

1.5 全基因组测序

DNA提取 取纯培养菌分别接种于普通琼脂培养基,28℃培养12 h,按少量细菌基因组DNA提取试剂盒(大连宝生物工程有限公司生产,批号9765)所述方法提取DNA作为PCR模版DNA。通过琼脂糖电泳和测定OD值鉴定所提DNA质量。

基因组测序及组装 经电泳合格的DNA样品,用Covaris超声波DNA破碎仪随机打断成长度约为350 bp的片段,用于后续DNA文库的构建。使用北京诺禾致源科技股份有限公司Illumina MiSeq测序仪的2×350 bp配对测序技术,对基因组DNA测序。基因组拼接使用软件Velvet version 1.0.8和VelvetOptimiser进行从头组装^[9]。

基因组分析及注释 用Rast(<http://rast.nmpdr.org/rast.cgi>)对基因组的序列进行注释并归类其功能类别^[10];使用ProgressManve 2.3.1软件鉴定不能与参考基因组匹配的独特基因;使用BLASTn在GenBank非冗余核苷酸数据库中搜索重叠群,确定独特基因的功能。

1.6 菌种分类位置确定

根据细菌形态、培养及理化特性测定的结果,主要依据《Bergey's Manual of Determinative Bacteriology》(9th ed)^[11]、《Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish》^[12]及有关资料,并结合细菌发育学分析的结果,判定分离菌的种属分类位置。

1.7 细菌多位点序列分型(MLST)

共选取64株菌为研究对象,其中1株菌为本实验分离菌A1310,其余62株嗜水气单胞菌和1株杀鲑气单胞菌(*A. salmonicida*)CBA100的序列于NCBI基因组数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/1422>)中获得。将各菌株基因组信息上传至MLST 1.8(<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>)进行分析,通过比较*eno*、*gltB*、*lepA*、*nrdA*、*nuoL*、*nus*和*rpoB*这7个基因位点处的等位基因的差异,确定63株嗜水气单胞菌的聚类,并得到比对后各菌株7个基因的等位基因序列信息。以得到的等位基因序列为基础,利用MEGA 6.0软件中的Neighbor Joining Tree方法构建系统发育树。

1.8 毒力基因注释和分析

嗜水气单胞菌的常见毒力基因(气溶素基因 *areA*、溶血素基因 *hlyA*、热敏感细胞肠毒素 *alt*、热稳定细胞肠毒素基因 *ast*)和T6SS相关毒力基因(*vasH*、*clpB*、*vgrG*、*vasK*、*vca0121*、*vca0119*、*vca0118*、*clpV*、*vasF*、*vca0114*、*vca0113*、*vca0112*、*vca0111*、*vasA*、*vca0109*、*vca0108*、*vca0107*、*Hcp*等)对其起到了关键性作用^[13]。下载通过RAST注释的供试菌全基因组,从NCBI中查找嗜水气单胞菌毒力基因的序列,通过RAST中的BLAST进行毒力基因与供试菌全基因组的双序列比对,寻找其是否含有相关的毒力基因。

2 结果

2.1 感染草鱼的主要病理变化

所检草鱼的体长200 mm,发病前期食欲下降、不进食,随后出现体表充血、乱游、乱窜、眼球突出、肛门红肿等症状。有些鱼出现肌肉充血、腹部肿大,有积水、肠黏膜充血等症状。

2.2 病变组织中细菌的分离与纯培养

从被检鱼的肝脏、肾脏和脾脏中均分离到了形态特征一致的大量优势细菌。培养24 h检查,其菌落特征为圆形、边缘光滑、不透明、中央隆起、灰白色或淡黄色,直径多在1.5~3.0 mm左右,培养48 h后多在4 mm左右,生长良好。随机取1个菌落做纯培养,编号为A1310(图1)。置于4 °C冰箱中保存供检验用。

2.3 纯培养菌的生物学性状

形态特征与培养特性 此株供试培养菌经革兰氏镜检,均为革兰氏阴性、散在的杆菌。

经EM负染色标本检查,菌体着生极端单鞭毛。

此株供试纯培养菌在普通营养琼脂上的菌落特征,与从被检草鱼肝脏、肾脏和脾脏中的所检细菌一致,且生长良好。AHM紫色半固体培养基中,供试菌呈刷状生长,培养基混浊,表明细菌有运动力。试管顶部淡黄色,底部仍为紫色,原因是嗜水气单胞菌发酵甘露醇而不发酵肌醇,不产生鸟氨酸脱羧酶。

理化性状 此株供试纯培养菌,所测主要理化性状的反应结果与标准菌株一致(表1)。

2.4 分离菌的致病性

供试菌株肌肉注射感染健康草鱼后,实验组鱼感染后48~144 h全部死亡,并表现出肌肉充血、腹部积水、肠黏膜充血等症状,对照组在10 d观察期内均无死亡。对被感染的死亡鱼进行细菌学检验,均能够分离到同供试菌相似的菌落。取此分离菌进行纯培养,并进行形态特征及主要理化特性的复核鉴定,结果均与供试菌一致。实验证明分离菌为引起本次草鱼死亡的病原菌且具有相当强的致病性。

2.5 药物敏感性

采用常规琼脂扩散(纸片)法对供试菌进行20种常用抗生素的耐药性检测。28 °C培养24 h后,以抑菌圈直径的大小判定结果:直径在20 mm以上的菌株为高度敏感;10~20 mm为中度敏感;10 mm以下为耐药。结果显示,该株菌对青霉素、羧苄西林、头孢拉定、氨苄西林、头孢唑啉、苯唑西林、头孢氨苄7种药物耐受,而对卡那霉素、哌拉西林、庆大霉素、丁胺卡那、头孢曲松5种药物敏感(表2)。

2.6 全基因组测序及毒力、防御基因注释分析

测序结果经组装后显示,共有108个Scaffolds

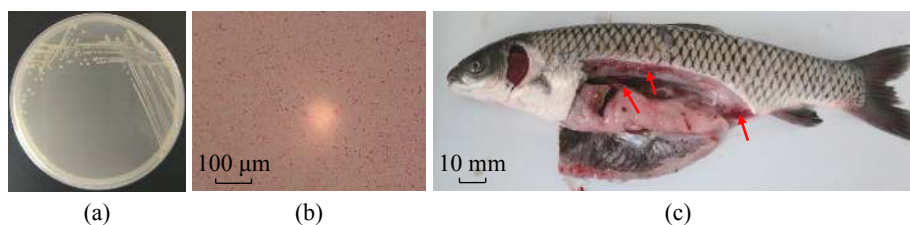


图1 A1310的形态与攻毒后草鱼症状

(a)菌落形态;(b)革兰氏染色结果;(c)攻毒后草鱼的症状,其中红色箭头表示攻毒后的出血点

Fig. 1 Morphological and gram staining results of A1310

(a) colonial morphology of VPAHPND-F2; (b) gram staining of VPAHPND-F2; (c) symptoms of *C. idella* before and after the attack, and the red arrows indicate the bleeding points after the attack

附表 1 A1310株的生理生化性状

·续附表1·

Tab. 1 Physiological and biochemical characteristics of the isolate strain A1310

特性 characteristics	A1310	嗜水气单胞菌 ^[1] <i>A. hydrophila</i>
卵磷脂酶 lecithin	-	-
接触酶 contact enzymes	+	+
O-F试验 O-F test	F	F
葡萄糖产酸 glucose, acid	+	+
葡萄糖产气 glucose, gas	+	+
乳糖 lactose	+	+
麦芽糖 maltose	+	+
甘露醇 mannitol	+	+
甘露糖 mannose	+	+
蔗糖 sucrose	-	d
阿拉伯糖 arabic candy	+	+
阿拉伯醇 arabianol	-	-
木糖 xylose	+	+
半乳糖 galactose	+	+
山梨醇 sorbitol	-	d
山梨糖 sorbose	-	-
卫茅醇 wei alcohol	-	d
赤鲜醇 fresh red alcohol	-	-
苦杏仁苷 amygdalin	-	.
鼠李糖 rhamnose	-	-
糊精 dextrin	+	+
肌醇 inositol	-	-
侧金盏花醇 side calendula alcohol	-	-
水杨苷 salicin	+	+
胆汁七叶苷 biloots	-	d
β-半乳糖苷酶 β-galactosidase	+	+
丙二酸盐 malonate	-	-
枸橼酸盐 citrate	+	+
醋酸盐 acetate	+	+
酒石酸盐 tartrate	+	+
黏液酸盐 mucilage acid salt	+	+
苯丙氨酸脱氨酶 phenylalanine deaminase	-	-
蕈糖 fungal sugar	+	+
棉子糖 raffinose	-	d

特性 characteristics	A1310	嗜水气单胞菌 ^[1] <i>A. hydrophila</i>
果糖 fructose	+	+
蜜二糖 melibiose	-	d
纤维二糖 cellobiose	-	d
甲基红 methyl red	+	+
葡萄糖铵 ammonium glucose	+	+
H ₂ S产生 H ₂ S production	+	+
硝酸盐还原 nitrate reduction	+	+
α-甲基-D-葡萄糖苷 α-methyl-D-glucoside	-	-
吲哚 indole	+	+
尿素酶 urease	-	-
酪蛋白酶 caseinase	+	+
明胶液化 gelatin liquefaction	+	+
淀粉酶 amylase	+	+
DNA酶 DNase	+	+
氧化酶实验 oxidase experiments	+	+
赖氨酸脱羧酶 lysine decarboxylase	+	+
无盐胰胨水 salt-free trypton water	+	.
6%氯化钠胰胨水 6% sodium chloride tryptose water	+	.
8%氯化钠胰胨水 8% sodium chloride tryptose water	+	.
10%氯化钠胰胨水 10% sodium chloride tryptose water	-	.
3%氯化钠甘露醇 3% sodium chloride mannitol	-	.
V-P实验 V-P experiment	+	+

注：“+” 阳性反应；“-” 阴性反应；“d” 种间存在差异；“O” 氧化型，“F” 发酵型；“.” 可变的

Notes: “+” positive control; “-” negative control; “d” significant difference; “O” oxidized type, “F” fermentation type; “.” variable

(>500 bp), 总长度为4 773 193 bp, 最长Scaffolds为446 909 bp, 最短Scaffolds为537 bp, 序列GC含量均为58.6%; N50 Scaffolds长度为224 058 bp, N90 Scaffolds值为66 295 bp。

注释后供试菌的全基因组序列中, 共有4 449个基因, 其中含有96个与毒力和防御相关基因。结果显示, 多药耐药性外排泵基因占大多数, 约为22%; 其次是铜耐受基因和大肠菌素V与细菌素生产群基因, 分别为11.4%和10.4%; 此外还包括1个多抗生素耐药MAR基因座和4个对氟喹诺酮类药物的耐药性基因(图2, 图中数字

表 2 分离菌株 A1310 的药敏实验结果
Tab. 2 Drug sensitive test of the isolate A1310

序号 serial number	名称 name	抑菌圈直径/mm bacteriostatic ring diameter	药物敏感性 drug sensitivity
1	青霉素 penicillin	6.62	R
2	红霉素 erythromycin	12.74	I
3	卡那霉素 kanamycin	23.8	S
4	头孢他定 ceftazidime	19.04	I
5	哌拉西林 piperacillin	24.04	S
6	米诺环 minocycline	15.76	I
7	庆大霉素 gentamicin	22.18	S
8	羧苄西林 carbenicillin	7.82	R
9	头孢呋辛 cefuroxime	12.66	I
10	丁胺卡那 amikacin	26.02	S
11	多西环素 doxycycline	10.44	I
12	头孢拉定 cefradine	7.12	R
13	氨苄西林 ampicillin	6.62	R
14	四环素 tetracycline	10.32	I
15	头孢哌酮 cefoperazone	19.28	I
16	头孢唑啉 cefazolin	6.96	R
17	苯唑西林 oxacillin	6.84	R
18	新霉素 neomycin	19.18	I
19	头孢曲松 ceftriaxone	20.84	S
20	头孢氨苄 cephalexin	6.64	R

注: 抑菌圈直径包括药敏纸片直径 6 mm; R. 耐药, S. 敏感, I. 中介
Notes: the diameter of antibacterial circle includes a diameter of 6 mm of the drug-sensitive paper; R. drug resistance, S. sensitive, I. intermediary

表示基因个数)。

2.7 细菌多位点序列分型

本实验使用 MLST 1.8(<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>)对 64 株菌进行分析, 并使用 MEGA 6.0 软件中的 N-J 法, 绘制基于 *eno*、*gltB*、*lepA*、*nrdA*、*nuoL*、*nus* 和 *rpoB* 这 7 个管家基因的系统发育树(图 3)。

系统发育树显示, 所有的嗜水气单胞菌包括 A1310 聚为一个大类, 与杀鲑气单胞菌 CBA100

具有较远的遗传距离, 因此结合生化鉴定, 清晰表明 A1310 属于嗜水气单胞菌。63 株嗜水气单胞菌分为 4 个簇, 而聚类单元呈现出较大的多样性, 共 38 个。其中第二大簇的 15 株菌构成最主要的聚类, 菌株分别来自中国和美国; 同属第二大簇的 5 株菌包括美国分离株 S15-242、S15-458、S15-591、S15-700 和供试菌 A1310 构成第二大聚类; 另有第一大簇中 4 株美国分离菌(48 AHDY、50 AHDY、52 AHDY、56 AHDY)、3 株马来西亚分离菌(M052、M053、M062)、2 株美国分离菌(AL97-91、MN98-04)和 2 株马来西亚分离菌(14、116), 分别构成 4 种聚类; 其余聚类均只含 1 株菌。基于多位点基因的种系发生分析表明, 嗜水气单胞菌具有高度的遗传多样性。而本实验供试菌 A1310 属于第二大簇, 与斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)美国分离株(S15-242、S15-458、S15-591、S15-700)亲缘关系最近, 与大多数中国分离株亲缘关系较近。

2.8 VI 型分泌系统相关毒力基因注释

供试菌 A1310 测序完整, 通过对毒力基因进行双序列比对及注释, 发现供试菌的 *aerA*、*hlyA*、*ast*、*alt* 等毒力基因保守, 与 III 型分泌系统(type III secretion system, T3SS)相关的基因(*acr1*、*acr2* 等)均不完整或缺失, 而与 VI 型分泌系统(type VI secretion system, T6SS)相关的毒力基因组成了不完整的 T6SS, 组成此分泌系统的毒力基因分别位于注释后的 scaffolds A131001000001.1、A131001000005.1、A131001000010.1、A131001000012.1、A131001000018.1。图 4 为供试菌株 A1310 及另外 4 株菌组成的 5 种类型的 T6SS 相关毒力基因图谱。

结果显示, 供试菌 A1310 中含有至少 80% 的完整 T6SS 所需的核心蛋白, 缺少一段 *vgrG* 和一段 *vca0109* 基因。ZC1 和 S14-452 含有 2 个独立的 T6SS 相关基因簇, 而 J-1 有一个完整 T6SS 集群。相反, S14-690 形成了缺乏大部分核心 T6SS 基因的不同亚克隆。

3 讨论

嗜水气单胞菌作为一种条件致病菌, 是淡水养殖动物重要的病原菌之一^[14], 主要危害草鱼^[5]、牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)^[15]、鲫(*Carassius carassius*)^[16]、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)^[17]、中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)^[18]等, 可引起水产动物

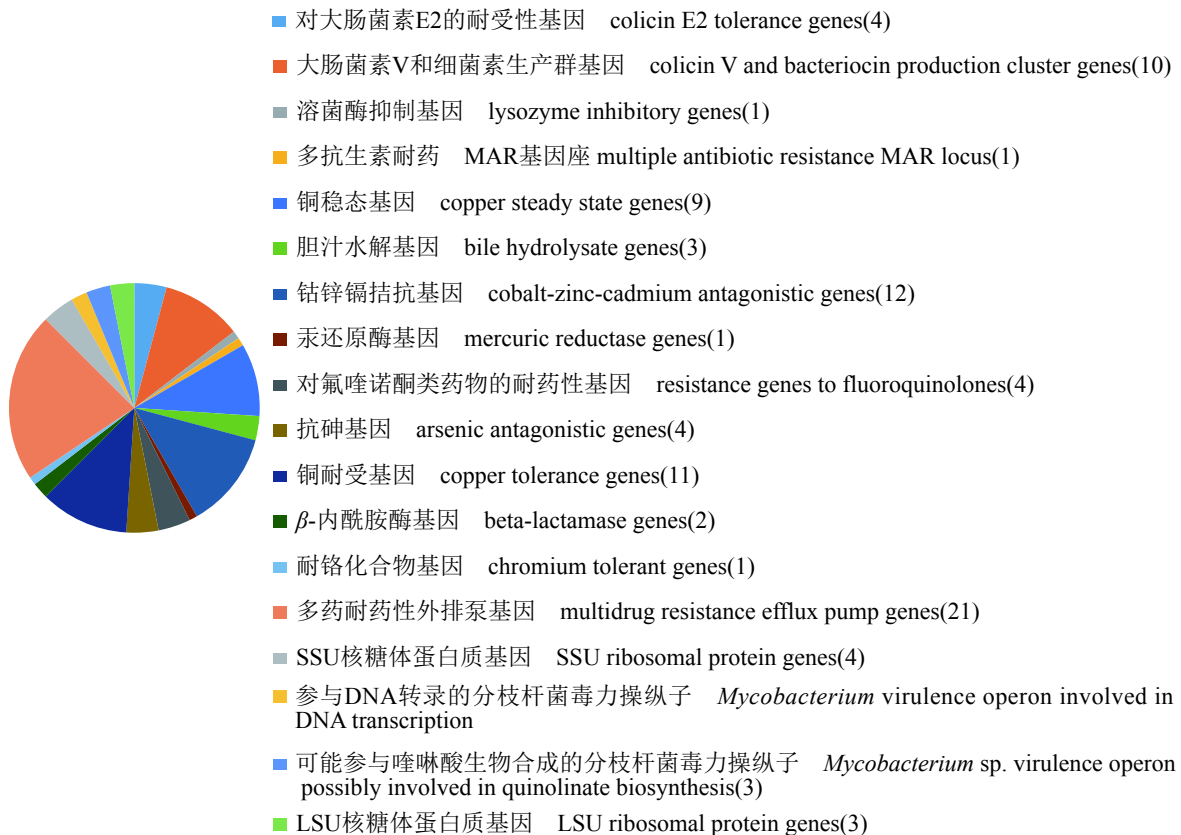


图2 Gene Ontology功能注释下A1310毒力与防御相关基因分布比例图

Fig. 2 Gene Ontology functional notes of A1310 toxicity and defense related genes

急性败血症，导致内脏器官出血或局部皮肤溃烂等症状^[1]。本研究从具有典型发病症状的濒死草鱼肝脏、肾脏、脾脏组织分离到1个菌株。对该菌株进行了常规的形态特征、生理生化特性等表型生物学性状检验及人工感染实验，并结合了基因组测序分析鉴定，判定引起本次草鱼出血性败血症的病原菌为气单胞菌科、气单胞属的嗜水气单胞菌。

对病原菌进行分子分型，以便于进一步在全球范围内进行病原菌流行病学研究^[19]。由于16S *rRNA*基因的高度保守性，16S *rRNA*基因序列分析法只能适用于种间的分型研究，而不适用于进行种内菌株之间的分型和进化研究^[20]。而MLST技术因其分辨力高、重复性高、成本低、数据全球共享及方便结果交流等因素，成为被广泛应用的微生物分型研究的“黄金标准”^[21-22]。该方法是一种研究微生物遗传进化及分子分型的技术，可在分子水平上将种内的菌株进行分类，进而阐明其遗传进化关系^[22]。目前，国内对于嗜水气单胞菌进行MLST分析的研究极少^[23]，本实验供

试菌A1310与斑点叉尾鲷美国分离株(S15-242、S15-591、S14-458、S13-700)亲缘关系最近，与大多数中国分离株亲缘关系较近，推测可能供试菌A1310为美国分离株的同源株，结合T6SS相关毒力基因图谱可知，A1310与J-1的T6SS十分相似，且二者在进化树中同属第二大类，由此可推测同源性与毒力基因的相似性有关。

同时，也对嗜水气单胞菌基因组的致病因子遗传多样性进行了精准分析。通过对毒力基因进行双序列比对及注释，发现供试菌的、*hlyA*、*ast*、*alt*等毒力基因保守，而与T6SS相关的毒力基因组成了不完整的T6SS。T6SS属于细菌毒力因子之一，作为近年来新发现的分泌系统，成为了研究的热点。致病菌必须分泌一些蛋白性质的毒力因子以满足在宿主体内生存、繁殖和扩散所需的条件^[24]。而由于大多数致病蛋白作用于真核宿主细胞，因此需要有效的分泌系统来将这些致病因子分泌到细菌表面或尽可能将其转运出细胞并进入宿主细胞中^[25]。该分泌系统属于细菌毒力因子之一，细菌可以通过分泌系

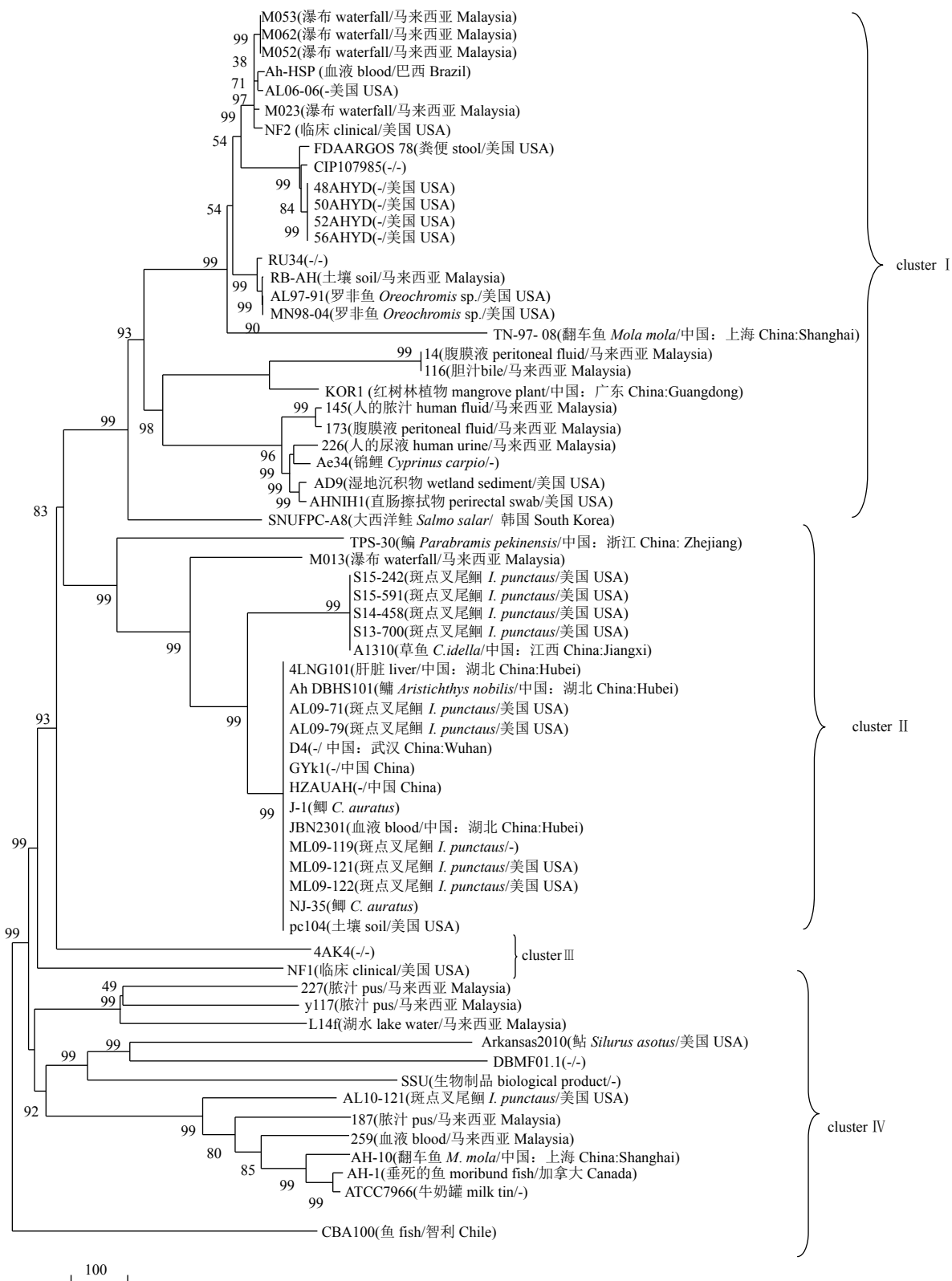


图 3 63株嗜水气单胞菌基于MLST分析的Neighbor-joining系统发育树

图中括号内从左至右分别为菌株在NCBI中的登录号、分离源、分离地, 分支上数字为自举值

Fig. 3 Neighbor-joining phylogenetic tree based on MLST analysis of 63 strains of *A. hydrophila*

The numbers in parentheses from left to right in the figure are the accession number of the strain in NCBI, the source of separation, the number of branches in isolation, the bootstrap value

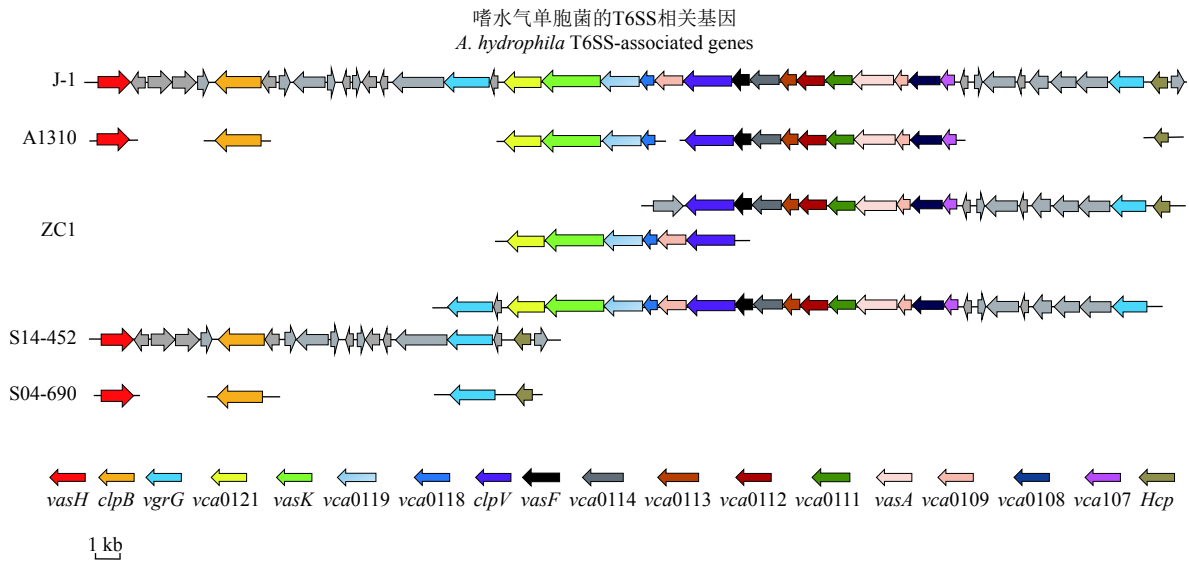


图 4 5种嗜水气单胞菌T6SS相关毒力基因图谱

Fig. 4 T6SS-associated gene profiles of five *A. hydrophila* strains

分泌蛋白毒素，进入外界环境后直接与宿主细胞发生毒性作用^[26-27]。T6SS在革兰氏阴性菌中的主要作用是增强细菌对外界环境的适应性，是细菌对宿主细胞的致病力的媒介^[28-29]。

实验结果显示，供试菌A1310含有至少80% T6SS相关的核心蛋白。而J-1有一个完整的T6SS基因簇，ZC1和S14-452含有2个独立的T6SS相关基因簇，S14-690缺乏大部分核心T6SS基因。有研究表明，菌株的致病力与毒力因子携带量有关^[30-31]。因此推测，分离株缺乏完整的功能性T6SS将导致毒力在这些菌株中减弱。然而，有研究表明，S04-690与ZC1菌株相比毒性较强^[13]。根据T6SS在气单胞菌SSU和肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)中的研究结果^[32-33]，推测缺少几种T6SS蛋白的美国分离株能够更好地逃避宿主免疫反应。未来的研究旨在阐明这些T6SS组分的作用，以及缺失或重排的T6SS对嗜水气单胞菌毒力的影响。此外，全基因组分析结果显示，A1310全基因组中包括1个多抗生素耐药MAR基因座和4个对氟喹诺酮类药物的耐药性基因。因而，为了避免滥用渔药而导致副作用的发生，更加明确地对该病原菌进行防治，在实际用药中应结合耐药性实验结果，有针对性地筛选适合的药物来预防和治疗由该菌引起的疾病，同时还应合理地安排用药量或寻求窄谱抗生素^[34]。

通过本次对病原嗜水气单胞菌较系统地鉴定，丰富了该菌在形态特征、培养特性、理化

特性等表型生物学、系统发育学及毒力因子等方面的内容，为该菌的有效检验提供了参考依据，并为嗜水气单胞菌的有效检验、防治和深入研究提供了一定的参考，对草鱼的病害防控有一定的指导意义。

参考文献:

- [1] 于学辉, 王远微, 汤承, 等. 嗜水气单胞菌的研究进展[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2007, 33(3): 507-514.
Yu X H, Wang Y W, Tang C, *et al.* Progress in studies on *Aeromonas hydrophila*[J]. Journal of Southwest University for Nationalities (Natural Science Edition), 2007, 33(3): 507-514(in Chinese).
- [2] Sahoo P K, Mahapatra K D, Saha J N, *et al.* Family association between immune parameters and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection in the Indian major carp, *Labeo rohita*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 25(1-2): 163-169.
- [3] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述[J]. 水产学报, 1992, 16(3): 282-288.
Lu C P. Pathogenic *Aeromonas hydrophila* and the fish diseases caused by it[J]. Journal of Fisheries of China, 1992, 16(3): 282-288(in Chinese).
- [4] 田甜. 鱼源嗜水气单胞菌的分离鉴定及耐药性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
Tian T. Isolation and identification of *Aeromonas hydro-*

- phila* strains from freshwater fish and their antibacterial resistance[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2010(in Chinese).
- [5] 陆英杰, 杜玉东, 王志彪, 等. 疑似草鱼嗜水气单胞菌的分离鉴定及药敏试验[J]. *中国畜牧兽医*, 2013, 40(7): 62-65.
- Lu Y J, Du Y D, Wang Z B, *et al.* Identification and drug sensitive test of suspected grass carp *Aeromonas hydrophila*[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2013, 40(7): 62-65(in Chinese).
- [6] 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.
- Cai M Y, Dong X Z. Common bacterial system identification manual[M]. Beijing: Science Press, 2001(in Chinese).
- [7] 杨正时, 房海. 人及动物病原细菌学[M]. 石家庄: 河北科学技术出版社, 2003.
- Yang Z S, Fang H. Human and animal pathogenic bacteriology[M]. Shijiazhuang: Hebei Science and Technology Press, 2003(in Chinese).
- [8] 叶应妩, 王毓三. 全国临床检验操作规程[M]. 南京: 东南大学出版社, 1991.
- Ye Y F, Wang Y S. National clinical inspection procedures[M]. Nanjing: Southeast University Press, 1991(in Chinese).
- [9] Zerbino D R, Birney E. Velvet. Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs[J]. *Genome Research*, 2008, 18(5): 821-829.
- [10] Aziz R K, Bartels D, Best A A, *et al.* The RAST server: rapid annotations using subsystems technology[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 75.
- [11] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, *et al.* Bergy's manual of determinative bacteriology[M]. 9th ed. Baltimore: A Waverly Company, 1994.
- [12] Austin B, Austin D A. Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish[M]// *Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish*. E. Horwood, Halsted Press, 1999.
- [13] Rasmussen-Ivey C R, Hossain M J, Odom S E, *et al.* Classification of a hypervirulent *Aeromonas hydrophila* pathotype responsible for epidemic outbreaks in warm-water fishes[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1615.
- [14] 肖丹, 曹海鹏, 胡鲲, 等. 淡水养殖动物致病性嗜水气单胞菌ERIC-PCR分型与耐药性[J]. *中国水产科学*, 2011, 18(5): 1092-1099.
- Xiao D, Cao H P, Hu K, *et al.* ERIC-PCR genotyping and drug resistant analysis of pathogenic *Aeromonas hydrophila* from freshwater animals[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(5): 1092-1099(in Chinese).
- [15] 李楠, 孙祎敏, 田莉瑛, 等. 嗜水气单胞菌的分离培养及鉴定[J]. *河北师范大学学报(自然科学版)*, 2009, 33(2): 240-243.
- Li N, Sun Y M, Tian L Y, *et al.* The isolation and identification of *Aeromonas hydrophila*[J]. *Journal of Hebei Normal University (Natural Science Edition)*, 2009, 33(2): 240-243(in Chinese).
- [16] 王春燕. 异育银鲫败血病病原体的诊断及毒力和药敏实验[J]. *生物学杂志*, 2002, 19(6): 30-31.
- Wang C Y. The pathogenicity and drug sensitivity tests of bacterial septicemia from *Carassius auratus gibelio*[J]. *Journal of Biology*, 2002, 19(6): 30-31(in Chinese).
- [17] 陈翠珍, 张晓君, 房海, 等. 鱼气单胞菌感染症及其病原的检验与分析[J]. *华北农学报*, 2000, 15(S1): 178-184.
- Chen C Z, Zhang X J, Fang H, *et al.* Examination and analysis on the infection by *Aeromona* of fish and pathogeny[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2000, 15(S1): 178-184(in Chinese).
- [18] 周剑光, 杨先乐, 艾晓辉. 中华鳖疔疮、红脖子、赤斑病并发症的病原研究[J]. *水产学报*, 1999, 23(3): 270-277.
- Zhou J G, Yang X L, Ai X H. Pathogen of the furunculosis, red neck and red spot complicating diseases of *Trionyx sinensis*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1999, 23(3): 270-277(in Chinese).
- [19] 李雪, 金莉莉, 王秋雨. 病原微生物分子分型技术研究进展[J]. *中国公共卫生*, 2007, 23(3): 373-374.
- Li X, Jin L L, Wang Q Y. Advances in molecular typing techniques of pathogenic microorganisms[J]. *Chinese Public Health*, 2007, 23(3): 373-374(in Chinese).
- [20] 毕春霞, 闫志勇, 王斌. 16S rRNA基因及16S~23S rRNA基因区间在临床细菌学检验中的应用[J]. *青岛医学院学报*, 2003, 39(4): 493-495, 498.
- Bi C X, Yan Z Y, Wang B. Application of 16S rRNA

- gene and 16S~23S rRNA gene interval in clinical bacteriology[J]. *Acta Academiae Medicinae Qingdao Universitatis*, 2003, 39(4): 493-495, 498(in Chinese).
- [21] Gonzalez-Escalona N, Martinez-Urtaza J, Romero J, *et al.* Determination of molecular phylogenetics of *Vibrio parahaemolyticus* strains by multilocus sequence typing[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(8): 2831-2840.
- [22] 王晓伟. 不同地区自然发酵乳制品中瑞士乳杆菌的多位点序列分型研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2015.
- Wang X W. Multilocus sequence typing of lactobacillus helveticus from naturally fermented dairy products in different regions[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2015(in Chinese).
- [23] 吴亚锋. 南京地区气单胞菌的分离鉴定及嗜水气单胞菌菌株分型研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- Wu Y F. Isolation and identification of *Aeromonas* from Nanjing and typing of *A. hydrophila* strains[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015(in Chinese).
- [24] 王娜, 张小军, 刘永杰, 等. 嗜水气单胞菌III型分泌系统研究进展[J]. *河北科技师范学院学报*, 2011, 25(1): 21-24.
- Wang N, Zhang X J, Liu Y J, *et al.* Research progress of type III secretion system in *Aeromonas hydrophila*[J]. *Journal of Hebei Normal University of Science & Technology*, 2011, 25(1): 21-24(in Chinese).
- [25] 郝彬. 鳃弧菌VI型分泌系统(T6SS)的功能及调控研究[D]. 北京: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2012.
- Hao B. Research on the function and regulation of type VI secretion system (T6SS) in *Vibrio anguillarum*[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2012(in Chinese).
- [26] Young G M, Schmiel D H, Miller V L. A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(11): 6456-6461.
- [27] 徐晓蒙. 基于Ion Torrent平台测序数据的微生物全基因组序列组装及分析方法[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2015.
- Xu X M. Whole microbial genome assembly and analysis based on Ion Torrent sequencing data[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2015(in Chinese).
- [28] 李俊, 俞盈, 王豪举. 细菌VI型分泌系统的研究进展[J]. *微生物学报*, 2011, 51(3): 291-296.
- Li J, Yu Y, Wang H J. Advances in bacterial type VI secretion system-a review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(3): 291-296(in Chinese).
- [29] 张海方, 王敏. 细菌VI型分泌系统研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(35): 19908-19909, 19943.
- Zhang H F, Wang M. Research progress of type VI secretion system of bacteria[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, 38(35): 19908-19909, 19943(in Chinese).
- [30] 邱军强, 杨先乐, 程训佳. 嗜水气单胞菌毒力因子特性及作用机理研究进展[J]. *中国病原生物学杂志*, 2009, 4(8): 616-619.
- Qiu J Q, Yang X L, Cheng X J. Advances in the characteristics and pathogenic mechanisms of virulence factors in *Aeromonas hydrophila*[J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2009, 4(8): 616-619(in Chinese).
- [31] 李绍戊, 卢彤岩. 嗜水气单胞菌毒力因子研究进展[J]. *水产学杂志*, 2013, 26(5): 61-64.
- Li S W, Lu T Y. Research advances of virulence factors in bacterium *Aeromonas hydrophila*[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2013, 26(5): 61-64(in Chinese).
- [32] Suarez G, Sierra J C, Sha J, *et al.* Molecular characterization of a functional type VI secretion system from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2008, 44(4): 344-361.
- [33] Wang M, Luo Z, Du H, *et al.* Molecular characterization of a functional type VI secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhi[J]. *Current Microbiology*, 2011, 63(1): 22-31.
- [34] 梁利国, 谢骏. 青鱼病原嗜水气单胞菌分离鉴定、毒力因子检测及药敏试验[J]. *生态学杂志*, 2013, 32(12): 3236-3242.
- Liang L G, Xie J. Isolation and identification, virulence factor detection, and susceptibility test of pathogen *Aeromonas hydrophila* isolated from *Mylopharyngodon piceus*[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2013, 32(12): 3236-3242(in Chinese).

Etiology and genomic characteristics of an *Aeromonas hydrophila* strain isolated from *Ctenopharyngodon idella*

WANG Yi¹, LIU Wenzhen², FU Songzhe^{1*}, WU Kui³,
XIA Yuqing¹, HUA Xintong¹, LIU Ying¹, OUYANG Min²

(1. Aquacultural Engineering R & D Center, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

2. Institute of Supervision and Inspection on Aquatic Produce Quality of Jiangxi Province, Nanchang 330046, China;

3. Nanchang Center for Disease Control and Prevention, Nanchang 330038, China)

Abstract: In order to determine the pathogen and pathogenic characteristics of *Ctenopharyngodon idella* haemorrhagic septicemia in a farm of Nanchang, a strain of pathogenic bacteria A1310 was isolated from the liver lesions of the diseased *C. idella*. The phenotypic characteristics of the isolated strain A1310 included the morphological characteristics, physiological and biochemical characteristics, pathogenicity, susceptibility test. In addition, the whole genome sequencing, phylogeny-based on multilocus sequence typing (MLST) and virulence gene were examined. According to morphological, biochemical characteristics, the pathogen was identified as *Aeromonas hydrophilia*. Artificial infection experiments showed that it is pathogenic to *C. idella* after being infected with the 1.0×10^6 CFU/mL bacteria strains culture. Antibiotic sensitivity test using 20 antimicrobial agents showed that the isolate was resistant to 7 antibiotics including penicillin, but was sensitive to 5 antibiotics including Kanamycin. The A1310 strain genome sequence contains a total of 96 genes related to toxicity and defense, and most of them are multidrug resistance efflux pump genes, about 22%. MLST typing showed that this isolate was genetically related to the American channel catfish isolates (S15-242, S15-458, S15-591, S15-700). Moreover, the comparative genomic analysis showed that A1310 has at least 80% of the core proteins necessary for a complete T6SS, lacking a segment of *vgrG* and a segment of *vca0109*. In conclusion, *A. hydrophila* A1310 from *C. idella* was genetically related to the American channel catfish isolates genetically and contains multiple reported virulence genes of *A. hydrophilia*. This study broadened our knowledge to understand the biological traits of *A. hydrophilia*. This can provide some reference for the effective inspection, prevention, and in-depth study of *A. hydrophilia*, and it has some significance for the prevention and control of *C. idella* disease and will be a basis for the disease control during *C. idella* culture.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; *Aeromonas hydrophila*; biological traits; T6SS-associated genes

Corresponding author: FU Songzhe. E-mail: fusongzhe@dlou.edu.cn

Funding projects: National Key R & D Project (2017YFD0701700, 2017YFB0404000); National Natural Science Foundation of China (31672673, 31472312)