

DOI: 10.12264/JFSC2021-0325

## 2 株亚东鲑源气单胞菌的鉴定及其致病性与药敏特性分析

陈美群<sup>1</sup>, 扎西拉姆<sup>1</sup>, 孙帅杰<sup>2</sup>, 张驰<sup>1</sup>, 周建设<sup>1</sup>, 王且鲁<sup>1</sup>, 王万良<sup>1</sup>

1. 西藏自治区农牧科学院水产科学研究所, 西藏 拉萨 850032;

2. 河南农业大学动物科技学院, 河南 郑州 450046

**摘要:** 亚东鲑(*Salmo trutta fario*)是西藏地区重要的冷水性经济鱼类之一。为明确亚东鲑暴发性死亡的原因, 对从患病亚东鲑体内分离得到的 2 株优势细菌 B1、A3-2 进行种类鉴定、毒力基因检测、动物回归感染、耐药基因检测和药敏试验。结果显示, 2 株优势细菌鉴定为杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*) B1 和温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*) A3-2。杀鲑气单胞菌 B1 对亚东鲑具有较强的致病性, 而温和气单胞菌 A3-2 对亚东鲑未表现出致病性。杀鲑气单胞菌 B1 携带有 10 种毒力基因: 外毒素(*AerA*、*Act* 和 *hly* 基因)、胞外酶(*gcat*、*ahyB* 和 *Lip* 基因)、Ⅲ型分泌系统(*aexT*、*aopP* 和 *ascF-G* 基因)、鞭毛(*Fla* 基因); 温和气单胞菌 A3-2 携带有 5 种毒力基因: 外毒素(*Act* 和 *Alt* 基因)、胞外酶(*gcat* 基因)、Ⅲ型分泌系统(*aexT* 和 *aopP* 基因)。杀鲑气单胞菌 B1 对头孢曲松、阿莫西林、氟苯尼考、环丙沙星、四环素、链霉素等 21 种抗菌药物敏感, 仅对万古霉素耐药; 温和气单胞菌 A3-2 对头孢曲松、氟苯尼考、环丙沙星、吡哌酸、四环素、链霉素等 17 种抗菌药物敏感, 对青霉素、阿莫西林、磺胺异噁唑、复方新诺明、万古霉素等 6 种药物耐药。杀鲑气单胞菌 B1 含有 *AmpC*、*gyrA* 和 *parC* 等 3 种耐药基因; 温和气单胞菌 A3-2 含有 *AmpC*、*gyrA*、*parC* 和 *tetE* 等 4 种耐药基因, 2 种气单胞菌的耐药基因检出结果与耐药表型基本一致。杀鲑气单胞菌 B1 是引起亚东鲑暴发性死亡的重要病原菌, 本研究为亚东鲑养殖过程中杀鲑气单胞菌的感染特征、疫苗研制和疾病防控提供了基础数据。

**关键词:** 亚东鲑; 杀鲑气单胞菌; 温和气单胞菌; 毒力基因; 耐药基因; 药敏谱

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)06-0914-14

亚东鲑(*Salmo trutta fario*), 别名花点鱼、河鲑、猫鱼、山溪高尾鲑等, 属鲑形目(*Salmoniformes*)、鲑科(*Salmonidae*)、鲑亚科(*Salmoninae*)、鲑属, 该物种原产于欧洲、非洲北部和西亚等地, 我国仅自然分布于西藏亚东县亚东河流域, 其肉质鲜美, 无肌间刺, 富含氨基酸、不饱和脂肪酸和多种维生素等, 现已成为一种重要的地方性高附加值水产养殖品种<sup>[1-4]</sup>。近年来, 滥捕和栖息地破坏造成野生亚东鲑种群数量锐减, 1992 年该鱼被列为西藏自治区二级重点保护水生动物<sup>[5]</sup>。人工规模化驯养是亚东鲑资源保护和种群恢复的重要方式, 但随之引起的亚东鲑幼鱼体质差、死亡率较高、病害频发, 尤其以烂鳃病和疔

疮病为主的细菌性病害及以水霉病为主的真菌性疾病对亚东鲑规模化养殖造成了巨大经济损失, 故开展病害研究对亚东鲑规模化健康养殖及其种质资源保护具有重要意义。

迄今, 亚东鲑的研究主要集中在年龄与生长繁殖特性<sup>[6]</sup>、胚胎发育<sup>[7]</sup>、营养品质分析<sup>[8-9]</sup>、养殖生物学特性<sup>[10-11]</sup>、药物影响<sup>[12-13]</sup>、分子生物学和遗传多样性研究<sup>[14-15]</sup>等方面, 国外对亚东鲑的微生物性疾病、病毒和寄生虫均有报道<sup>[16-18]</sup>, 而国内针对其暴发性死亡症的病原菌致病力与毒力基因型鲜有报道<sup>[19]</sup>。

2019 年 8 月西藏自治区农牧科学院水产科学研究所养殖基地人工驯养的亚东鲑出现暴发性死

收稿日期: 2021-07-15; 修订日期: 2021-08-24.

基金项目: 西藏自治区自然科学基金项目[XZ2019ZRG-80(Z)].

作者简介: 陈美群(1986-), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向为鱼病防治. E-mail: cmq1986007@163.com

亡, 主要临床症状为患病部位肌肉组织溶解坏死、出血; 腹部表皮和鳃有充血、出血现象; 腹腔内有多量含血的腹水, 肝脏出现大量黑色斑块; 数天内就达到了约 40% 的发病率和死亡率, 人工养殖的亚东鲑经常暴发此类疾病, 对人工规模化养殖亚东鲑造成了较大损失, 故开展病害研究对其规模化健康养殖具有重要意义。本研究以西藏自治区农牧科学院水产科学研究所养殖基地人工驯养的暴发性死亡亚东鲑为材料, 对从患病亚东鲑体内分离得到的 2 株优势细菌进行种类鉴定、毒力基因检测、动物回归感染、耐药基因检测和药敏试验, 以期明确其暴发性死亡的原因, 为该病的临床诊断和科学防治提供参考依据, 进而为亚东鲑规模化健康养殖提供技术保障。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

患病亚东鲑体重为 $(595.7 \pm 86.79)$  g/尾, 采自西藏自治区农牧科学院水产科学研究所养殖基地, 养殖水温为 13~15 °C, 溶解氧为 5.05~6.46 mg/L, pH 为 6.8~8.1。患病亚东鲑临床症状主要表现为摄食减少、反应迟钝、患病部位肌肉组织溶解坏死、出血; 腹部表皮和鳃有充血、出血现象; 尾鳍出现断裂、溃烂; 腹腔内有含血的腹水, 肝脏出现大量黑色斑块。健康亚东鲑取自西藏雅鲁藏布江渔业资源繁育基地, 体质量为 $(260.10 \pm 36.98)$  g/尾。胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)、营养琼脂(NA)和营养肉汤培养基(LB)购于北京陆桥技术股份有限公司。微量生化鉴定管和药敏纸片购于杭州微生物试剂有限公司。细菌 DNA 提取和 PCR 试剂盒购于大连宝生物工程有限公司。扩增引物委托湖南吾泰生物科技有限公司合成。

### 1.2 病原菌的分离与鉴定

**1.2.1 病原菌的分离纯化** 取症状典型的濒死亚东鲑, 无菌条件下从体表肌肉溃疡处、肝脏、鱼鳍等病灶处挑取部分组织于无菌的 100 mL 三角瓶中, 加入 25 mL 灭菌生理盐水, 于摇床上 150 r/min 常温震荡 30 min, 取 1 mL 上清液用灭菌生理盐水稀释成  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  的菌悬液, 分别取 100  $\mu$ L 上述菌悬液涂布于 TSA、NA 和 LB 平板上, 每种

培养基设 3 个重复, 15 °C 下培养 24~48 h。用灭菌的接种针挑取不同培养基上形态差异较大的优势菌落, 反复划线于 NA 固体培养基上直至获得纯培养物, 两株优势菌分别编号为 B1 和 A3-2, 纯培养物用 25% 甘油于 -80 °C 保存备用。

**1.2.2 病原菌的形态学、生理生化和分子生物学鉴定** 将分离获得的纯培养物 B1 和 A3-2 分别接种于 NA 平板上, 15 °C 下培养 24 h 后进行形态学观察。生理生化指标包括精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、6% 胨水、硫化氢、枸橼酸盐、MR 试验、VP 试验、尿素、木糖、蔗糖、水杨苷、葡萄糖产气、甘露醇和动力试验等, 参照试验说明书进行。纯培养物 B1 和 A3-2 的 16S rRNA 目的基因扩增采用通用引物 27F/1492R, 扩增程序如下: 95 °C 变性 10 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 90 s, 32 个循环数; 72 °C 延伸 10 min。取 2  $\mu$ L 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行目的基因的检测, 检测合格后的目的基因扩增产物送交湖南吾泰生物科技有限公司测序, 测序结果采用 EzBioCloud 数据库进行序列的 BLAST 比对, 进行核苷酸序列相似性分析, 获取相近菌株的 16S rRNA 基因序列, 利用 MEGA 6.0 中的邻接法(neighbor-joining)构建系统进化树。

### 1.3 病原菌致病力分析

**1.3.1 毒力基因检测** 分别提取菌株 B1、A3-2 基因组 DNA, 选取气单胞菌属中已报道的 18 种毒力基因<sup>[20-25]</sup>进行 PCR 检测, 引物信息见表 1。PCR 反应体系和扩增程序参照 1.2.2 进行, 目的基因用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

**1.3.2 人工感染试验** 菌株 B1 和 A3-2 分别在 LB 培养基里于 15 °C 下培养 48 h, 采用平板菌落计数法调节菌悬液浓度至  $1 \times 10^8$  cfu/mL<sup>[24]</sup>。健康亚东鲑于试验养殖池暂养 1 周后, 按照注射菌种分为 B1 组、A3-2 组和对照组, 每组 12 尾鱼。试验 B1 组和 A3-2 组每尾鱼腹腔注射 0.3 mL 对应菌悬液, 对照组注射 0.3 mL 无菌生理盐水。试验期间全天持续泵气增氧, 水温为 $(9.3 \pm 1.0)$  °C, 溶解氧为 $(5.5 \pm 0.5)$  mg/L, 每 2 天换水 1 次。注射后每 12 h 观察 1 次, 观察记录发病情况, 连续观察 15 d, 并从濒死的亚东鲑中再分离和鉴定病原菌。

表 1 毒力基因引物信息<sup>[20-25]</sup>  
Tab. 1 The list of virulence gene primers<sup>[20-25]</sup>

| 毒力基因<br>virulence gene | 引物序列(5'-3')<br>primer sequence (5'-3')                 | 目的产物/bp<br>product size | 退火温度/℃<br>annealing temperature |
|------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| <i>hly</i>             | F: GGCCGGTGGCCCGAAGATACGGG<br>R: GGCGGCGCCGGACGAGACGGG | 597                     | 62                              |
| <i>AerA</i>            | F: GCAGAACCCATCTATCCAG<br>R: TTTCTCCGGTAACAGGATTG      | 252                     | 56                              |
| <i>Act</i>             | F: AGAAGGTGACCACCAAGAACA<br>R: AACTGACATCGGCCTTGAACTC  | 232                     | 66                              |
| <i>Alt</i>             | F: TGACCCAGTCCTGGCACGGC<br>R: GGTGATCGATCACCACCAGC     | 442                     | 66                              |
| <i>Ast</i>             | F: TCTCCATGCTTCCCTTCCACT<br>R: GTGTAGGGATTGAAGAAGCCG   | 331                     | 56                              |
| <i>aexT</i>            | F: GGCGCTTGGGCTCTACAC<br>R: GAGCCCGCGACTCTTCAG         | 535                     | 55                              |
| <i>ascV</i>            | F: GCCCGTTTGCCTATCAA<br>R: GCGCCGATATCGGTACCC          | 807                     | 55                              |
| <i>aopP</i>            | F: GAGAGTTGGCTAGCGGTGAG<br>R: TCCTCATGGAGCGACTCCAG     | 490                     | 58                              |
| <i>ascF-G</i>          | F: ATGAGGTCATCTGCTCGCGC<br>R: GGAGCACAACCATGGCTGAT     | 789                     | 55                              |
| <i>gcat</i>            | F: CTCCTGGAATCCCAAGTATCAG<br>R: GGCAGGTTGAACAGCAGTATCT | 237                     | 55                              |
| <i>tapA</i>            | F: ATGACCTCTAGCCCCAATA<br>R: ACCCGATTGATTTCTGCC        | 550                     | 55                              |
| <i>Fla</i>             | F: TCCAACCGTYTGACCTC<br>R: GMYTGGTTGCGR ATGGT          | 608                     | 53                              |
| <i>Ser</i>             | F: CACCGAAGTATTGGGTCAGG<br>R: GGCTCATGCGTAACTCTGGT     | 350                     | 55                              |
| <i>exu</i>             | F: AGACATGCACAACCTCTTCC<br>R: GATTGGTATTGCCTTGCAAG     | 323                     | 61                              |
| <i>ahyB</i>            | F: ACACGGTCAAGGAGATCAAC<br>R: CGCTGGTGTGGCCAGCAGG      | 513                     | 53                              |
| <i>eprCAI</i>          | F: GCTCGACGCCAGCTCACC<br>R: GGCTCACCGACTTGGAATTCG      | 387                     | 55                              |
| <i>Lip</i>             | F: ATCTTCTCCGACTGGTTTCGG<br>R: CCGTGCCAGGACTGGGTCTT    | 382                     | 62                              |
| <i>laf</i>             | F: GGTCTGCGACTCCAACCTC<br>R: GCTCCAGACGGTTGATG         | 550                     | 66                              |

1.4 药敏试验

采用纸片扩散法检测菌株 B1 和 A3-2 对 8 大类 24 种抗菌药物的敏感性。在无菌条件下, 稀释菌悬液至  $1\times 10^8$  cfu/mL, 取 100  $\mu$ L 涂布于 NA 平板中, 等距离贴上不同药敏纸片, 重复 3 次。15  $^{\circ}$ C 培养 18~24 h 后测量抑菌圈直径(mm), 参照 CLSI 抗微生物药物敏感性试验执行标准确定菌株的敏感性。

1.5 耐药基因的检测

将菌株 B1 和 A3-2 进行 32 种耐药基因<sup>[26-30]</sup>的 PCR 扩增检测, 引物信息见表 2。32 种耐药基因分为 7 大类: 喹诺酮类耐药基因、四环素类耐药基因、酰胺醇类耐药基因、氯霉素类耐药基因、 $\beta$ -内酰胺类耐药基因、氨基糖苷类耐药基因、磺胺类耐药基因。PCR 反应体系和扩增程序参照 1.2.2 进行, 目的基因用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测。

表 2 耐药基因引物信息<sup>[26-30]</sup>  
Tab. 2 The list of drug-resistant gene primers<sup>[26-30]</sup>

| 基因类别<br>gene category                                      | 基因<br>gene           | 引物序列(5'-3')<br>primer sequence (5'-3')                    | 目的产物/bp<br>product size | 退火温度/℃<br>annealing temperature |
|------------------------------------------------------------|----------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| 喹诺酮类耐药(PMQR)基因<br>quinolone resistance genes               | <i>qnrA</i>          | F: ATTTCTCACGCCAGGATTTG<br>R: GATCGGCAAAGGTCAGGTCA        | 516                     | 58                              |
|                                                            | <i>qnrB</i>          | F: GATCGTGAAAGCCAGAAAGG<br>R: ACGATGCCTGGTAGTTGTCC        | 469                     | 58                              |
|                                                            | <i>qnrS</i>          | F: ACGACATTCGTCAACTGCAA<br>R: TAAATTGGCACCCCTGTAGGC       | 417                     | 56                              |
|                                                            | <i>qnrC</i>          | F: GGGTGTACATTTATTGAATCG<br>R: CACCTACCCATTTATTTTCA       | 307                     | 55                              |
|                                                            | <i>qnrD</i>          | F: CGAGATCAATTTACGGGAATA<br>R: AACAAGCTGAAGCGCCTG         | 465                     | 50                              |
|                                                            | <i>aac(6')-Ib-cr</i> | F: TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA<br>R: CTCGAATGCCTGGCGTGTTC     | 482                     | 55                              |
|                                                            | <i>oqxAB</i>         | F: CCCTGGACCGCACATAAAG<br>R: AAAGAACAAGATTCACCGCAAC       | 523                     | 57                              |
|                                                            | <i>qepA</i>          | F: GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG<br>R: CTCCTGCCCCGAGTATCGTG        | 306                     | 60                              |
| 喹诺酮类耐药决定区(QRDR)<br>quinolone resistance determination area | <i>gyrA</i>          | F: CCATGAGCGTGATCGTAGGA<br>R: CTTTGGCACGCACATAGACG        | 665                     | 62                              |
|                                                            | <i>parC</i>          | F: GTTCAGCGCCGCATCATCTAC<br>R: TTCGGTGTAACGCATTGCCGC      | 245                     | 56                              |
| 四环素类耐药基因<br>tetracycline resistance genes                  | <i>tetA</i>          | F: GCTACATCCTGCTTGCC TTC<br>R: GCATAGATCGCCGTGAAGAG       | 211                     | 60                              |
|                                                            | <i>tetB</i>          | F: TCATTGCCGATACCACCTCAG<br>R: CCAACCATCATGCTATTCCATCC    | 391                     | 60                              |
|                                                            | <i>tetC</i>          | F: CTGCTCGCTTCGCTACTTG<br>R: GCCTACAATCCATGCCAACC         | 897                     | 60                              |
|                                                            | <i>tetD</i>          | F: TGTGCTGTGGATGTTGTATCTC<br>R: CAGTGCCGTGCCAATCAG        | 844                     | 59                              |
|                                                            | <i>tetE</i>          | F: ATGAACCGCACTGTGATGATG<br>R: ACCGACCATTACGCCATCC        | 744                     | 59                              |
|                                                            | <i>floR</i>          | F: GCTTCACTGGCGATGGATATTTA<br>R: CAAAGTAATGAATATCGCCTGCC  | 450                     | 58                              |
| 酰胺醇类耐药基因<br>amide alcohol resistance genes                 | <i>catA</i>          | F: AAAAAATTATATCCGACTCTCTTA<br>R: CTTGAATCGATAAGGGAATATAG | 420                     | 61                              |
|                                                            | <i>cmlA</i>          | F: TGCCAGCAGTGCCGTTTAT<br>R: CACCGCCCAAGCAGAAAGTA         | 900                     | 59                              |
| 氯霉素类耐药基因<br>chloramphenicol resistance genes               | <i>catB</i>          | F: CCSAAYATCAARGTWGGGCG<br>R: GGCATGAYCATRGCCTCMGA        | 320                     | 55                              |
|                                                            | <i>cmlA</i>          | F: GTTGCGGGTACTCCCTTGCC<br>R: GGCCACCTCCAGTAGAACG         | 240                     | 55                              |

(待续 to be continued)

(续表 2 Tab. 2 continued)

| 基因类别<br>gene category                        | 基因<br>gene         | 引物序列(5'-3')<br>primer sequence (5'-3')                | 目的产物/bp<br>product size | 退火温度/℃<br>annealing temperature |
|----------------------------------------------|--------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| β-内酰胺类耐药基因<br>β-lactam resistance genes      | <i>IMP</i>         | F: CTACCGCAGCAGAGTCTTTG<br>R: AACCAGTTTTGCCTTACCAT    | 587                     | 55                              |
|                                              | <i>AmpC</i>        | F: CGACAGCAGGTGGAT<br>R: GGTTAAGGTTGGCATG             | 510                     | 50                              |
|                                              | <i>OXA-24</i>      | F: TTGCGCATGACCTT<br>R: TAGCTTGCTCCACCC               | 175                     | 48                              |
|                                              | <i>OXA-23</i>      | F: TGTCATAGTATTCGTCGTT<br>R: TTCCCAAGCGGTAAA          | 453                     | 48                              |
|                                              | <i>aph(3')-Ia</i>  | F: TGA CTGGGCACAACAGACAA<br>R: CGGCGATACCGTAAAGCAC    | 677                     | 55                              |
|                                              | <i>acc(6')-Ib</i>  | F: ATGACCTTGCCATGCTCTATGA<br>R: CGAATGCCTGGCGTGTTT    | 486                     | 55                              |
| 氨基糖苷类耐药基因<br>aminoglycoside resistance genes | <i>ant(3'')-Ia</i> | F: ATCTGGCTATCTTGCTGACA<br>R: TATGACGGGCTGATACTGG     | 284                     | 55                              |
|                                              | <i>aac(3)-IIa</i>  | F: ACCCTACGAGGAGACTCTGAATG<br>R: CCAAGCATCGGCATCTCATA | 384                     | 55                              |
|                                              | <i>Sul1</i>        | F: CATTGCCTGGTTGCTTCAT<br>R: ATCCGACTCGCAGCATTT       | 238                     | 55                              |
| 磺胺类耐药基因<br>sulfonamides resistance genes     | <i>Sul2</i>        | F: CATCATTTTCGGCATCGTC<br>R: TCTTGCGGTTTCTTTCAGC      | 793                     | 55                              |
|                                              | <i>Sul3</i>        | F: AGATGTGATTGATTGGGAGC<br>R: TAGTTGTTTCTGGATTAGAGCCT | 443                     | 55                              |
|                                              | <i>floR</i>        | F: CACGTTGAGCCTCTATAT<br>R: ATGCAGAAGTAGAACGCG        | 868                     | 55                              |

2 结果与分析

2.1 菌株 B1 和 A3-2 的分离与鉴定结果

从患病亚东鲑的皮肤、鱼鳍和肝脏等组织中共分离到气单胞菌属(*Aeromonas*)、无色杆菌属(*Achromobacter*)、马赛菌属(*Massilia*)、鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、微小杆菌属(*Exiguobacterium*)、不动杆菌属(*Prolinoborus*)、金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)等 9 属 11 种细菌<sup>[19]</sup>, 分离得到 2 株优势菌株 B1 和 A3-2, 2 株优势菌在营养琼脂培养基上 15 ℃培养 24 h 后可形成 1~2 mm 的中央凸起、边缘整齐、表面光滑、灰白色的圆形菌落。生理生化鉴定结果(表 3)表明菌株 B1 与杀鲑气单胞菌的生理生化特性基本一致, A3-2 菌株与温和气单胞菌的生理生化特

性基本一致。16S rRNA 基因鉴定结果显示: 菌株 B1 (MT576565)与 *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658<sup>T</sup> 的同源性高达 99.65%, 菌株 A3-2 (MT576566)与 *Aeromonas sobria* ACC 43979<sup>T</sup> 的同源性高达 100%, 且系统发育树聚类一致(图 1)。综合菌体形态学、生理生化特征和 16S rRNA 基因测序结果, 2 株优势菌分别鉴定为杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*) B1 和温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*) A3-2。

2.2 菌株 B1 和 A3-2 毒力基因和致病性分析结果

菌株 B1 和 A3-2 的毒力基因检测结果显示(图 2), 在检测的 18 种毒力基因中 *A. salmonicida* B1 携带 10 种毒力基因: 外毒素(*AerA*、*Act* 和 *hly* 基因)、胞外酶(*gcat*、*ahyB* 和 *Lip* 基因)、Ⅲ型分泌系统(*aexT*、*aopP* 和 *ascF-G* 基因)和鞭毛(*Fla* 基因);

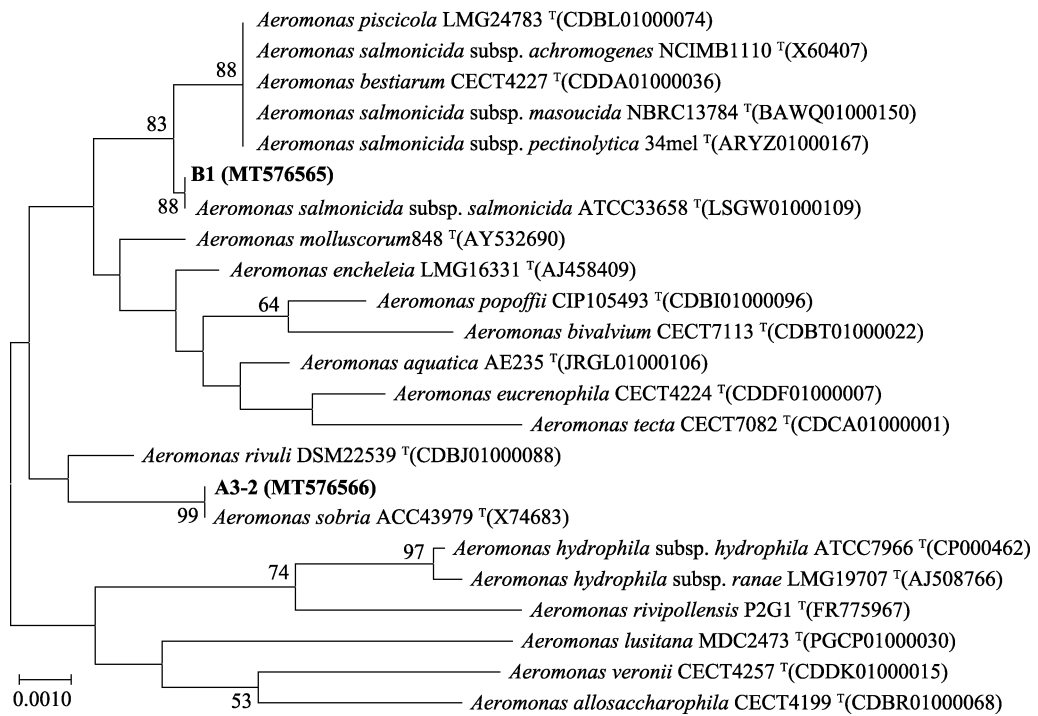


图 1 菌株 B1 和 A3-2 的 16S rRNA 基因系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene of strains B1 and A3-2

表 3 菌株 B1 和 A3-2 的生理生化特征

Tab. 3 Biochemical and physiological characteristics of strains B1 and A3-2

| 测试项目<br>test item                     | B1 菌株<br>strain B1 | 杀鲑气单胞菌 <sup>[24,31-33]</sup><br><i>Aeromonas salmonicida</i> | A3-2 菌株<br>strain A3-2 | 温和气单胞菌 <sup>[34-37]</sup><br><i>Aeromonas sobria</i> |
|---------------------------------------|--------------------|--------------------------------------------------------------|------------------------|------------------------------------------------------|
| 革兰氏染色 gram staining                   | —                  | —                                                            | —                      | —                                                    |
| 运动性 motility                          | —                  | —                                                            | +                      | +                                                    |
| 鸟氨酸脱羧酶 ornithine decarboxylase enzyme | —                  | —                                                            | —                      | —                                                    |
| 赖氨酸脱羧酶 lysine decarboxylase enzyme    | —                  | +                                                            | +                      | +                                                    |
| 精氨酸双水解酶 arginine dihydrolase enzyme   | +                  | +                                                            | +                      | +                                                    |
| 6% NaCl 胨水 6% NaCl peptone water      | —                  | —                                                            | —                      | —                                                    |
| 水杨苷 salicin                           | —                  | d                                                            | —                      | —                                                    |
| 枸橼酸盐 citrate                          | —                  | —                                                            | —                      | —                                                    |
| 葡萄糖产气 glucose produces gas            | —                  | d                                                            | +                      | —                                                    |
| 蔗糖 sucrose                            | +                  | d                                                            | +                      | +                                                    |
| 甘露醇 mannitol                          | +                  | +                                                            | +                      | d                                                    |
| 硫化氢 H <sub>2</sub> S                  | —                  | d                                                            | —                      | —                                                    |
| M.R 反应 M.R reaction                   | —                  | +                                                            | +                      | —                                                    |
| V-P 反应 V-P reaction                   | —                  | —                                                            | +                      | d                                                    |
| 尿素 urea                               | —                  | —                                                            | —                      | —                                                    |
| 棉子糖 raffinose                         | —                  | —                                                            | —                      | —                                                    |
| 山梨醇 sorbitol                          | —                  | —                                                            | —                      | d                                                    |
| 侧金盏花醇 adonitol                        | —                  | —                                                            | —                      | —                                                    |
| 木糖 xylose                             | —                  | —                                                            | —                      | —                                                    |

注: + 为阳性; — 为阴性; d 为菌株间有差异.

Note: + denotes positive; — denotes negative; d denotes there were differences among strains.

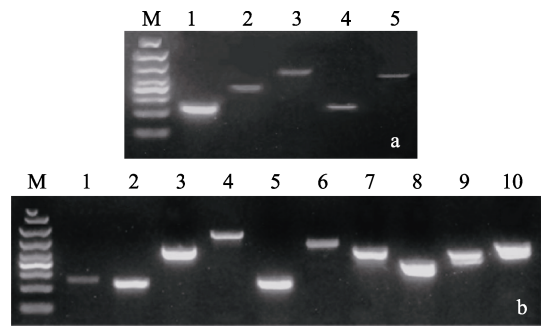


图 2 菌株 A3-2 (a)和 B1 (b)的毒力基因 PCR 鉴定结果

Fig. 2 PCR amplification of virulence genes of strain A3-2 (a) and B1 (b)

a. M. DL1000, 1. *act*, 2. *alt*, 3. *aexT*, 4. *gcat*, 5. *aopP*;  
b. M. DL1000, 1. *aerA*, 2. *act*, 3. *aexT*, 4. *ascF-G*,  
5. *gcat*, 6. *fla*, 7. *ahyB*, 8. *lip*, 9. *aopP*, 10. *hlyA*.

*A. sobria* A3-2 携带 5 种毒力基因: 外毒素(*Act* 和 *Alt* 基因)、胞外酶(*gcat* 基因)和Ⅲ型分泌系统(*aexT* 和 *aopP* 基因)。*A. salmonicida* B1 菌株未检出外毒素(*Alt* 和 *Ast* 基因)、黏附因子(*tapA* 基因)、胞外酶(*Ser*、*exu* 和 *eprCAI* 基因)、Ⅲ型分泌系统(*ascV* 基因)和鞭毛(*laf* 基因)等 8 种毒力基因; *A. sobria*

A3-2 菌株未检出外毒素(*AerA*、*hly* 和 *Ast* 基因)、黏附因子(*tapA* 基因)、胞外酶(*ahyB*、*Lip*、*Ser*、*exu* 和 *eprCAI* 基因)、Ⅲ型分泌系统(*ascF-G* 和 *ascV* 基因)和鞭毛(*Fla* 和 *laf* 基因)等 13 种毒力基因。*A. salmonicida* B1 较 *A. sobria* A3-2 携带更多的毒力基因种类和数量。

人工感染试验结果显示, *A. salmonicida* B1 接种亚东鲑 1 d 后, 鱼体游动缓慢、反应迟缓且食欲减退, 第 6 天亚东鲑死亡 6 尾, 第 12 天亚东鲑全部死亡, 死亡率为 100% (表 4)。解剖死亡亚东鲑发现腹腔出血伴有大量腹水, 肝脏充血和鳃溃烂并有出血点(图 3), 与自然发病亚东鲑的主要症状基本相似; 但没有复制出慢性自然感染病例在濒死时出现的患病部位肌肉组织溶解坏死、出血和尾鳍出现断裂、溃烂症状, 这可能与人工感染时注射的细菌浓度高、病程为急性感染有关。*A. sobria* A3-2 接种亚东鲑未表现出任何病症及死亡现象, 对照组均健康存活(表 4、图 3)。对人工感

表 4 人工感染试验结果  
Tab. 4 The results of artificial infection

| 组别<br>group             | 菌液浓度/CFU/mL<br>bacterial<br>concentration | 试验鱼数量/尾<br>number of<br>test fish | 死亡鱼数量/尾 number of dead fish |     |     |     |     |      |      |      |              | 死亡率/%<br>mortality |
|-------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|------|------|------|--------------|--------------------|
|                         |                                           |                                   | 1-5 d                       | 6 d | 7 d | 8 d | 9 d | 10 d | 11 d | 12 d | 累计<br>add up |                    |
| <i>A.salmonicida</i> B1 | 1×10 <sup>8</sup>                         | 12                                | 0                           | 6   | 3   | 2   | 0   | 0    | 0    | 1    | 12           | 100                |
| <i>A. sobria</i> A3-2   | 1×10 <sup>8</sup>                         | 12                                | 0                           | 0   | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    | 0    | 0            | 0                  |
| 对照 control              | 灭菌生理盐水<br>sterilized saline water         | 12                                | 0                           | 0   | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    | 0    | 0            | 0                  |

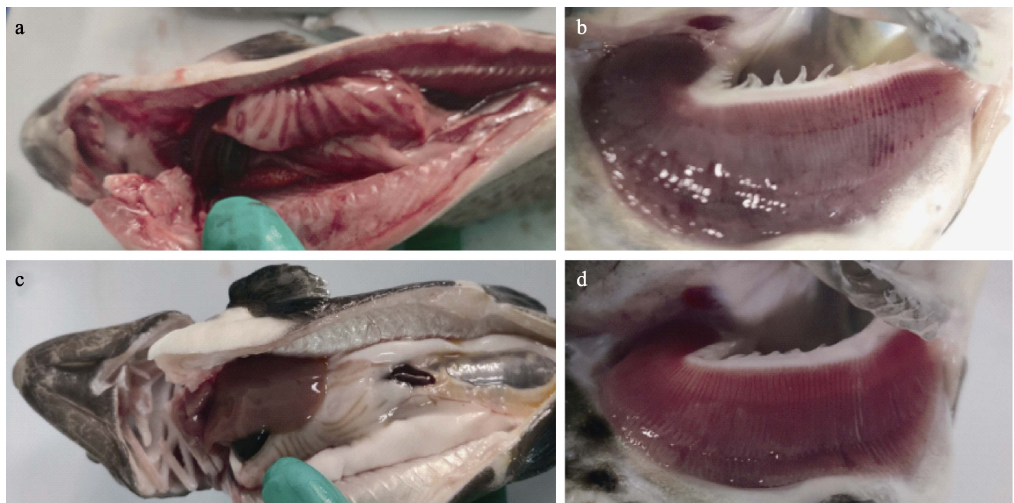


图 3 感染菌株 B1 (a 和 b)和对照组(c 和 d)亚东鲑的临床特征

Fig. 3 Clinical syndromes of *Salmo trutta fario* infected with strain B1 (a and b) and control group (c and d)

染的亚东鲑再次进行病原菌分离, 获得 *A. salmonicida* 菌株, 故 *A. salmonicida* B1 是本次亚东鲑发病的主要病原菌。

2.3 菌株 B1 和 A3-2 的药敏特征及耐药基因检测结果

药敏试验判定参照美国临床和实验室标准化协会(CLSI)公布的抗菌药物敏感试验执行标准及相关文献<sup>[20,30,34]</sup>, 杀鲑气单胞菌 B1 对头孢呋辛、头孢曲松、氨曲南、阿莫西林、氟苯尼考、环丙沙星、四环素、链霉素等 21 种抗菌药物敏感, 对甲氧苄氨嘧啶和利福平中度敏感, 对万古霉素已

产生耐药性(表 5)。温和气单胞菌 A3-2 对头孢曲松、氨曲南、氟苯尼考、环丙沙星、吡哌酸、四环素、链霉素、大观霉素等 17 种抗菌药物敏感, 对甲氧苄氨嘧啶中度敏感, 对青霉素、阿莫西林、磺胺异噁唑、复方新诺明、万古霉素和利福平已产生耐药性(表 5)。菌株 B1 和 A3-2 的 7 大类 32 种耐药基因 PCR 扩增鉴定结果显示(图 4), 杀鲑气单胞菌 B1 携带 *AmpC*、*gyrA* 和 *parC* 3 种耐药基因, 温和气单胞菌 A3-2 中检测到 *AmpC*、*gyrA*、*parC* 和 *tetE* 4 种耐药基因, 2 种气单胞菌的耐药基因检出结果与耐药表型基本一致(表 6)。

表 5 菌株 B1 和 A3-2 的药物敏感性结果  
Tab. 5 The antibiotics susceptibility results of strains B1 and A3-2

| 抗菌药物<br>antibiotic           | 药量/<br>(μg/片)<br>dose | 抑菌圈直径标准/mm<br>standard diameter of inhibited zone |                                |                 | 抑菌圈直径/mm<br>diameter of<br>inhibited zone |      | 敏感性<br>susceptibility |      |
|------------------------------|-----------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------|-------------------------------------------|------|-----------------------|------|
|                              |                       | 耐药<br>resistant                                   | 中介<br>intermediately resistant | 敏感<br>sensitive | B1                                        | A3-2 | B1                    | A3-2 |
| 头孢呋辛 cefuroxime              | 30                    | ≤14                                               | 15–17                          | ≥18             | 50                                        | 39   | 敏感                    | 敏感   |
| 头孢曲松 ceftriaxone             | 30                    | ≤19                                               | 20–22                          | ≥23             | 50                                        | 42   | 敏感                    | 敏感   |
| 氨曲南 aztreonam                | 30                    | ≤17                                               | 18–20                          | ≥21             | 52                                        | 39   | 敏感                    | 敏感   |
| 青霉素 penicillin               | 10U                   | ≤11                                               | 12–14                          | ≥15             | 31                                        | 0    | 敏感                    | 耐药   |
| 阿莫西林 amoxicillin             | 20                    | ≤13                                               | 14–17                          | ≥18             | 40                                        | 12   | 敏感                    | 耐药   |
| 氟苯尼考 florfenicol             | 30                    | ≤19                                               | 20–22                          | ≥23             | 42                                        | 30   | 敏感                    | 敏感   |
| 环丙沙星 ciprofloxacin           | 5                     | ≤15                                               | 16–20                          | ≥21             | 45                                        | 39   | 敏感                    | 敏感   |
| 恩诺沙星 enrofloxacin            | 10                    | ≤12                                               | 13–16                          | ≥17             | 42                                        | 33   | 敏感                    | 敏感   |
| 吡哌酸 pipemidic acid           | 30                    | ≤21                                               | 22–28                          | ≥29             | 38                                        | 34   | 敏感                    | 敏感   |
| 四环素 tetracycline             | 30                    | ≤11                                               | 12–14                          | ≥15             | 25                                        | 21   | 敏感                    | 敏感   |
| 土霉素 terramycin               | 30                    | ≤11                                               | 12–14                          | ≥15             | 27                                        | 20   | 敏感                    | 敏感   |
| 多西环素 doxycycline             | 30                    | ≤11                                               | 12–14                          | ≥15             | 24                                        | 19   | 敏感                    | 敏感   |
| 链霉素 streptomycin             | 10                    | ≤11                                               | 12–14                          | ≥15             | 22                                        | 23   | 敏感                    | 敏感   |
| 庆大霉素 gentamycin              | 10                    | ≤12                                               | 13–14                          | ≥15             | 28                                        | 24   | 敏感                    | 敏感   |
| 卡那霉素 kanamycin               | 30                    | ≤13                                               | 14–17                          | ≥18             | 32                                        | 26   | 敏感                    | 敏感   |
| 大观霉素 spectinomycin           | 100                   | ≤14                                               | 15–17                          | ≥18             | 31                                        | 29   | 敏感                    | 敏感   |
| 妥布霉素 tobramycin              | 10                    | ≤12                                               | 13–14                          | ≥15             | 29                                        | 27   | 敏感                    | 敏感   |
| 丁胺卡那霉素 amikacin              | 30                    | ≤14                                               | 20–22                          | ≥17             | 29                                        | 27   | 敏感                    | 敏感   |
| 磺胺异噁唑 sulfisoxazole          | 300                   | ≤12                                               | 13–16                          | ≥17             | 34                                        | 0    | 敏感                    | 耐药   |
| 甲氧苄氨嘧啶 trimethoprim          | 5                     | ≤10                                               | 11–15                          | ≥16             | 14                                        | 15   | 中介                    | 中介   |
| 复方新诺明 trimethoprim-sulbactam | 23.75/1.25            | ≤10                                               | 11–16                          | ≥17             | 31                                        | 0    | 敏感                    | 耐药   |
| 万古霉素 vancomycin              | 30                    | ≤14                                               | 13–16                          | ≥17             | 0                                         | 0    | 耐药                    | 耐药   |
| 多粘菌素 B polymyxin B           | 300U                  | ≤8                                                | 9–11                           | ≥12             | 19                                        | 19   | 敏感                    | 敏感   |
| 利福平 rifampicin               | 5                     | ≤16                                               | 17–19                          | ≥20             | 17                                        | 10   | 中介                    | 耐药   |

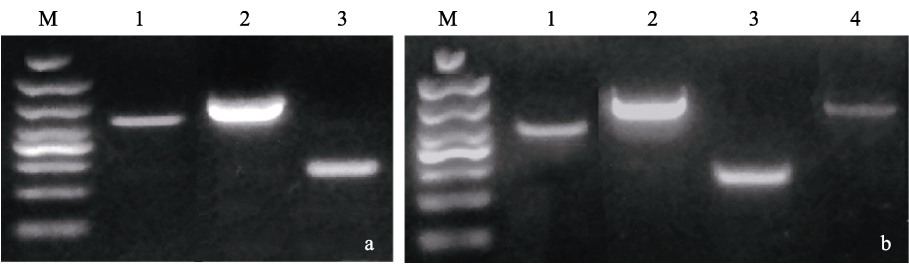


图 4 菌株 B1 (a)和 A3-2 (b)的耐药基因 PCR 鉴定结果  
Fig. 4 PCR amplification of drug-resistant genes of strain B1 (a) and A3-2 (b)  
M. DL1000; 1. *AmpC*, 2. *gyrA*, 3. *parC*, 4. *tetE*.

表 6 菌株杀鲑气单胞菌 B1 和温和气单胞菌 A3-2 耐药基因型与耐药表型比较分析

Tab. 6 Comparative analysis of drug-resistant genotypes and phenotypes of *Aeromonas Salmonicida* B1 and *Aeromonas Sobria* A3-2

| 类别<br>category        | 杀鲑气单胞菌 B1 <i>A. salmonicida</i> B1 |                                                    | 温和气单胞菌 A3-2 <i>A. sobria</i> A3-2 |                                                    |
|-----------------------|------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------------------|
|                       | 耐药基因<br>drug-resistant genes       | 药物敏感性表型<br>drug sensitivity phenotype              | 耐药基因<br>drug-resistant genes      | 药物敏感性表型<br>drug sensitivity phenotype              |
| 喹诺酮类 quinolones       | <i>gyrA</i> , <i>parC</i>          | 敏感 sensitive                                       | <i>gyrA</i> , <i>parC</i>         | 敏感 sensitive                                       |
| 四环素类 tetracyclines    | —                                  | 敏感 sensitive                                       | <i>tetE</i>                       | 敏感 sensitive                                       |
| 氯霉素类 chloramphenicols | —                                  | 敏感 sensitive                                       | —                                 | 敏感 sensitive                                       |
| β-内酰胺类 β-lactam       | <i>AmpC</i>                        | 敏感 sensitive                                       | <i>AmpC</i>                       | 敏感和耐药<br>sensitive and resistant                   |
| 氨基糖苷类 aminoglycosides | —                                  | 敏感 sensitive                                       | —                                 | 敏感 sensitive                                       |
| 磺胺类 sulfonamides      | —                                  | 敏感和中介<br>sensitive and intermediately<br>resistant | —                                 | 中介和耐药<br>intermediately resistant<br>and resistant |
| 多肽类 polypeptide       | ND                                 | 敏感和耐药<br>sensitive and resistant                   | ND                                | 敏感和耐药<br>sensitive and resistant                   |
| 利福霉素类 rifamycins      | ND                                 | 中介 intermediately resistant                        | ND                                | 耐药 resistant                                       |

注: — 为阴性; ND 为未检测。  
Note: — denotes negative; ND denotes no detection.

3 讨论

杀鲑气单胞菌是一种主要引起鲑科鱼类疔疮病的病原菌,可感染鲤(*Cyprinus carpio*)<sup>[24]</sup>、鲫(*Carassius auratus*)<sup>[31]</sup>、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[32]</sup>和美洲红点鲑(*Salvelinus fontinalis*)<sup>[33]</sup>等多种鱼类。温和气单胞菌是一种常见的人-兽-鱼共患条件致病菌<sup>[34,38-39]</sup>,可导致腹水病、烂鳃病、皮肤溃烂病和败血症等多种鱼类疾病<sup>[34-35]</sup>。本研究从患病亚东鲑体内分离得到杀鲑气单胞菌 B1 和温和气单胞菌 A3-2 等 2 株优势菌,人工感染试验表明杀鲑气单胞菌 B1 为此次亚东鲑患病的主要病原菌,但温和气单胞菌 A3-2 却没有表现出致病性,气单胞菌的致病性与毒力因子密切相关,对其毒力因子的研究是该菌防治的重要基础。毒力基因检测结果显示杀鲑气单胞菌 B1 携带有 *AerA*、*Act*、

*hly*、*gcat*、*ahyB*、*Lip*、*aexT*、*aopP*、*ascF-G* 和 *Fla* 等 10 种毒力基因,而温和气单胞菌 A3-2 仅携带 *Act*、*Alt*、*gcat*、*aexT* 和 *aopP* 等 5 种毒力基因,杀鲑气单胞菌 B1 较温和气单胞菌 A3-2 携带更多的毒力基因种类和数量,这可能是杀鲑气单胞菌 B1 和温和气单胞菌 A3-2 致病性差异的主要原因。前人研究表明携带 *hly* 和 *AerA* 基因的气单胞属菌株均表现出较强的致病性<sup>[22,40-42]</sup>,*hly* 和 *AerA* 作为胞外毒素有较强的溶血性、肠毒性和细胞毒性,是机体组织出现溃疡、出血、坏死等严重病理变化的主要原因之一<sup>[25,43-44]</sup>。鞭毛蛋白(*Fla*)参与细菌的吸附、侵袭及定居,其作为黏附素可对宿主的黏附作用起到重要作用,也是重要毒力因子<sup>[45]</sup>。此外,酯酶(*Lip*)和弹性蛋白酶(*ahyB*)等的存在都会增强菌体的毒力<sup>[25]</sup>。Ⅲ型分泌系统(TTSS)作为

近年来细菌致病机制的研究热点, 其相关基因 *ascF-G*、*aopP*、*aexT* 在本研究中也检出。Ⅲ型分泌系统是在许多革兰氏阴性菌中发现的毒力因子, 并对鱼源杀鲑气单胞菌的毒性至关重要, 这种针状的蛋白质结构允许效应因子从细菌的细胞质直接转位到宿主细胞, 一旦进入宿主细胞, 效应因子就会破坏各种细胞功能, 从而促进细菌的致病性<sup>[46-47]</sup>。越来越多的研究表明细菌的致病性并不与某种特定的毒力基因产生必然的因果关系<sup>[21]</sup>, 而是由多种毒力基因共同作用的结果, 毒力基因种类的不同是导致不同菌株间致病力差异的重要因素<sup>[48-51]</sup>, 这可能是菌株杀鲑气单胞菌 B1 表现出较强致病性, 而菌株温和气单胞菌 A3-2 却没有表现出致病性的主要原因。

药敏试验结果显示杀鲑气单胞菌 B1 对试验所选的头孢呋辛、头孢曲松、氨曲南、阿莫西林、氟苯尼考、环丙沙星、四环素、链霉素等 21 种抗菌药物敏感, 对万古霉素耐药, 这与来源于鲤和美洲红点鲑源的杀鲑气单胞菌耐药谱区别较大<sup>[24,33]</sup>; 温和气单胞菌 A3-2 对头孢呋辛、头孢曲松、氨曲南、氟苯尼考、环丙沙星、吡哌酸、四环素、链霉素、大观霉素等 17 种抗菌药物敏感, 对青霉素、阿莫西林、磺胺异噁唑、复方新诺明、万古霉素等 6 种药物耐药, 这与斑点叉尾鲷、长丝裂腹鱼源的温和气单胞菌耐药谱有一定差异<sup>[34,36]</sup>; 杀鲑气单胞菌 B1 和温和气单胞菌 A3-2 表现出较高的药物敏感性, 这可能与西藏地区较为干净的药物环境有较大关系。

耐药基因检测结果表明杀鲑气单胞菌 B1 和温和气单胞菌 A3-2 携带的耐药基因均很少, 在 7 大类 32 种耐药基因中, 只检测到了 4 种耐药基因, 主要为  $\beta$ -内酰胺类 *AmpC* 耐药基因、喹诺酮类耐药决定区(QRDR) *gyrA* 和 *parC* 基因和四环素类 *tetE* 耐药基因。从表 6 可看出, 未检测到携带此类耐药基因的菌株一般都对此类抗生素敏感, 但杀鲑气单胞菌 B1 和温和气单胞菌 A3-2 均检测到了喹诺酮类耐药决定区(QRDR)基因, 但对试验所选的 3 种喹诺酮类药物均敏感, 其原因可能是菌株虽携带有 QRDR 基因, 但是它们的 QRDR 靶位点均未发生突变, 就不能表现出相应的耐药性,

这与薛慧娟等<sup>[27]</sup>的研究结果相符。薛慧娟等研究发现喹诺酮类敏感菌株虽检测出有 QRDR 基因, 但 QRDR 靶位点未发生突变, 就没有表现出对喹诺酮类抗生素耐药; 而 24 株喹诺酮类耐药菌株均有 QRDR 区域的突变。杀鲑气单胞菌 B1 和温和气单胞菌 A3-2 均检测到  $\beta$ -内酰胺类 *AmpC* 耐药基因, 温和气单胞菌 A3-2 表现出对部分  $\beta$ -内酰胺类药物耐药, 而杀鲑气单胞菌 B1 对试验所选的 5 种  $\beta$ -内酰胺类药物均敏感, 这可能与机体内复杂的作用机制有关, 一些耐药基因存在未表达或表达量偏低等现象。温和气单胞菌 A3-2 检测到四环素类 *tetE* 耐药基因, 但对试验所选的四环素类药物未表现出耐药性, 这与朱永肖<sup>[22]</sup>的研究结果相一致, 即携带 *tetE* 基因型的菌株对四环素类药物的耐药率并非 100%。综上所述, 菌株杀鲑气单胞菌 B1 和温和气单胞菌 A3-2 的耐药基因检出结果与耐药表型基本一致, 但个别药物敏感性结果与其耐药基因鉴定结果稍有差异, 这可能与菌株存在其他未检测的耐药基因以及菌体内耐药基因的诱导性表达有关<sup>[22,27]</sup>。

本次亚东鲑暴发性患病主要与病原菌杀鲑气单胞菌 B1 具有直接的关系, 该菌携带有 10 种毒力基因, 且携带有可致病的关键基因; 此外可能与机械损伤、温度等有关。本次亚东鲑鱼体是从日喀则市亚东县长途运输至西藏自治区农牧科学院水产科学研究所养殖基地, 在长途运输过程中容易造成亚东鲑鱼体的机械损伤, 导致亚东鲑体表黏膜脱落或损伤而引起病原菌大量滋生。此外, 本次亚东鲑患病主要发生在夏季, 此时养殖池水温较高(约 13~15 °C), 该温度条件更适宜杀鲑气单胞菌的繁殖。因此, 在亚东鲑的人工养殖过程中, 应当加强养殖管理, 做到水温调节、及时消毒和病鱼隔离等, 坚持预防为主的原则, 以减少病害的发生。

#### 4 结论

杀鲑气单胞 B1 是本次引起亚东鲑暴发性死亡的重要病原菌, 该菌携带有外毒素(*AerA*、*Act* 和 *hly* 基因)、胞外酶(*gcat*、*ahyB* 和 *Lip* 基因)、Ⅲ型分泌系统(*aexT*、*aopP* 和 *ascF-G* 基因)和鞭毛

(*Fla* 基因)等多种重要的毒力基因,具有较强的致病性,可采用头孢曲松、阿莫西林、氟苯尼考、恩诺沙星、多西环素等药物防治由杀鲑气单胞菌引起的亚东鲑疾病。

### 参考文献:

- [1] Meng W, Yang T Y, Hai S, et al. Study of DNA barcoding based on the mitochondrial *COI* gene sequences in *Salmo trutta* fraio[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2010, 23(1): 6-10. [孟玮, 杨天燕, 海萨, 等. 基于线粒体 *COI* 基因序列的亚东鲑 DNA 条形码研究[J]. 水产学杂志, 2010, 23(1): 6-10.]
- [2] MacCrimmon H R, Marshall T L, Gots B L. World distribution of brown trout, *Salmo trutta*: Further observations[J]. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 1970, 27(4): 811-818.
- [3] Elliott J M. Wild brown trout *Salmo trutta*: An important national and international resource[J]. Freshwater Biology, 1989, 21(1): 1-5.
- [4] Lei S Y. The artificial breeding for *Salmo trutta fario*, genetic variation in breeding populations of *Erythroculter ilishaeformis* and their transcriptome analysis[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017. [雷双永. 亚东鲑人工繁育和翘嘴红鲌育种群体遗传差异分析及两种鱼的转录组学研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.]
- [5] Peng S S. Fish and Fishery in Tibet[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1995: 32-33. [彭仕盛. 西藏鱼类及其资源[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 32-33.]
- [6] Wang W L, Mu Z B, Zeng B H, et al. Research status and prospects of salmon *trutta*[J]. Tibet Journal of Agricultural Sciences, 2019, 41(S1): 197-200. [王万良, 牟振波, 曾本和, 等. 亚东鲑的研究现状及展望[J]. 西藏农业科技, 2019, 41(S1): 197-200.]
- [7] Hao F H, Chen Y F, Cai B. Embryonic development of *Salmo trutta fario* from Yadong River, Tibet[J]. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(3): 289-296. [豪富华, 陈毅峰, 蔡斌. 西藏亚东鲑的胚胎发育[J]. 水产学报, 2006, 30(3): 289-296.]
- [8] You H Z, Bao H Y, Gu D X, et al. Analysis and comparison of nutrient components in the muscle of trout from Gansu[J]. Freshwater Fisheries, 2020, 50(4): 18-25. [尤宏争, 包海岩, 谷德贤, 等. 甘肃地区几种鲑鳟鱼肌肉营养成分比较与评价[J]. 淡水渔业, 2020, 50(4): 18-25.]
- [9] Zhelyazkov G, Stratev D. Meat quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta fario*) farmed in Bulgaria[J]. Journal of Food Quality and Hazards Control, 2019, 6(1): 37-40.
- [10] Wang W L, Zhang B B, Zhou J S, et al. Effects of different water temperature on growth and survival of juvenile *Salmo trutta*[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2019, 46(1): 24-27. [王万良, 张忞忞, 周建设, 等. 不同水温对亚东鲑幼鱼生长及存活的影响[J]. 水产科技情报, 2019, 46(1): 24-27.]
- [11] Wang Q L, Wang J L, Liu F, et al. Effect of different stocking density on growth performance of sub-adult of *Salmo trutta*[J]. Journal of Aquaculture, 2020, 41(4): 8-10. [王且鲁, 王金林, 刘飞, 等. 不同养殖密度对亚东鲑亚成鱼生长性能的影响[J]. 水产养殖, 2020, 41(4): 8-10.]
- [12] Schmieg H, Burmester J K Y, Kraiss S, et al. Interacting effects of polystyrene microplastics and the antidepressant amitriptyline on early life stages of brown trout (*Salmo trutta f. fario*)[J]. Water, 2020, 12(9): 2361.
- [13] Corum O, Er A, Durna Corum D, et al. Pharmacokinetics and bioavailability of ceftriaxone in brown trout (*Salmo trutta fario*) after intravenous and intramuscular administration[J]. Aquaculture, 2019, 500: 272-277.
- [14] Hu G, Wang F, Zhou J S, et al. Study on genetic diversity and germplasm sources of wild Yadong salmon population [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2016, 47(1): 58-65. [户国, 王芳, 周建设, 等. 野生亚东鲑群体遗传多样性及其种质来源研究[J]. 东北农业大学学报, 2016, 47(1): 58-65.]
- [15] Chen X W, Wang J, Yue W C, et al. Integrated transcriptome provides resources and insights into the adaptive evolution of colonized brown trout (*Salmo trutta fario*) in the Tibetan Plateau[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2020, 51(3): 763-774.
- [16] Delghandi M R, Menanteau-Ledouble S, Waldner K, et al. *Renibacterium salmoninarum* and *Mycobacterium* spp.: Two bacterial pathogens present at low levels in wild brown trout (*Salmo trutta fario*) populations in Austrian rivers[J]. BMC Veterinary Research, 2020, 16(1): 40.
- [17] Arndt D, Fux R, Blutke A, et al. Proliferative kidney disease and proliferative darkening syndrome are linked with brown trout (*Salmo trutta fario*) mortalities in the pre-alpine Isar River[J]. Pathogens (Basel, Switzerland), 2019, 8(4): 177.
- [18] Fux R, Arndt D, Langenmayer M C, et al. Piscine *Orthoreovirus* 3 is not the causative pathogen of proliferative darkening syndrome (PDS) of brown trout (*Salmo trutta fario*)[J]. Viruses, 2019, 11(2): 112.
- [19] Chen M Q, Zhang C, Pan Y Z, et al. Preliminary identification of bacterial pathogens in skin lesions of *Salmo trutta fario*[J]. Tibet Science and Technology, 2020(9): 20-23+26. [陈美群, 张驰, 潘瑛子, 等. 亚东鲑皮肤病灶

- 中细菌性病原微生物的初步鉴定[J]. 西藏科技, 2020(9): 20-23+26.]
- [20] Zhang M, Wang Z G, Gao F, et al. Isolation, identification and pathogenicity analysis of *Aeromonas hydrophila* from *Pseudocrossocheilus bamaensis*[J]. Journal of Southern Agriculture, 2020, 51(9): 2051-2060. [张曼, 王振光, 高峰, 等. 巴马拟缨鱼源嗜水气单胞菌分离鉴定及其致病力分析[J]. 南方农业学报, 2020, 51(9): 2051-2060.]
- [21] He Q L, Mao G F, Wang Z. Analysis of antibiotic resistance and detection of virulence genes in clinical *Aeromonas*[J]. Chinese Journal of Disinfection, 2016, 33(12): 1173-1175. [何秋丽, 茅国峰, 王卓. 临床分离气单胞菌耐药性及毒力基因检测[J]. 中国消毒学杂志, 2016, 33(12): 1173-1175.]
- [22] Zhu Y X. The study on the virulence and resistance of *aeromonas* in the Yellow River drainage basin of Henan[D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2018. [朱永肖. 河南沿黄渔区气单胞菌的毒力与耐药性研究[D]. 新乡: 河南师范大学, 2018.]
- [23] Li S F, Chen X, Chen Y. Distribution characteristics and virulence gene analysis of intestinal and extraintestinal *Aeromonas*[J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2017, 35(7): 503-506. [李淑妃, 陈晓, 陈瑜. 肠道内、外感染气单胞菌的菌种分布特征及毒力基因分析[J]. 临床检验杂志, 2017, 35(7): 503-506.]
- [24] Yang X, Pan J M, Zhang P, et al. Molecular typing and virulence gene detection of achromogenes sub species of *Aeromonas salmonicida*[J]. Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition), 2021, 42(1): 24-29. [杨霞, 潘吉脉, 张飘, 等. 鲤源杀鲑气单胞菌无色亚种的分离鉴定及毒力基因检测[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2021, 42(1): 24-29.]
- [25] Zhu R L, Ma T, Chen L, et al. Isolation, identification and virulence genes detection of *Aeromonas veronii* from *Aristichthys nobilis*[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2017, 44(2): 229-233. [朱若林, 马腾, 陈露, 等. 鳊鱼维氏气单胞菌的分离鉴定及其毒力基因检测[J]. 安徽农业大学学报, 2017, 44(2): 229-233.]
- [26] Guo X Z, Zhang R Q, Jiang L, et al. Detection and analysis of quinolone resistance and resistance-associated genes in bacteria isolated from tilapias sold in the supermarkets[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2018, 25(5): 1032-1039. [郭学中, 张瑞泉, 姜兰, 等. 罗非鱼水产品中的喹诺酮类药物耐药菌和耐药基因检测分析[J]. 中国水产科学, 2018, 25(5): 1032-1039.]
- [27] Xue H J, Deng Y T, Jiang L, et al. Antimicrobial susceptibility and mutations of QRDR in *Aeromonas hydrophila* isolated from aquatic animals[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2012, 39(23): 149-153. [薛慧娟, 邓玉婷, 姜兰, 等. 水产动物源嗜水气单胞菌药物敏感性及其 QRDR 基因突变分析[J]. 广东农业科学, 2012, 39(23): 149-153.]
- [28] Zhao M. Antimicrobial agents resistance and its genetic determinants in *Aeromonas veronii* isolated from channel catfish (*Ictalurus punctatus*)[D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2013. [赵敏. 四川地区斑点叉尾鲷源维氏气单胞菌的耐药性以及耐药基因检测分析[D]. 雅安: 四川农业大学, 2013.]
- [29] Wang J Z, Zhong J P, Jin F X, et al. Virulence of resistant *Aeromonas hydrophila* and six kinds of antibiotic resistance components genes[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2018, 34(10): 912-919, 943. [王建忠, 钟建平, 金法祥, 等. 耐药嗜水气单胞菌毒力与六类抗菌药物耐药元件基因研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2018, 34(10): 912-919, 943.]
- [30] Qiao Y. Study on the major pathogenic bacteria resistance of aquaculture in the coastal regions of Jiangsu Province[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015. [乔毅. 江苏省沿海地区水产养殖主要致病菌耐药性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.]
- [31] Lian Z Y, Bai J, Hu X C, et al. Detection and characterization of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* infection in crucian carp *Carassius auratus*[J]. Veterinary Research Communications, 2020, 44(2): 61-72.
- [32] Diao J, Li L, Wang X L, et al. Isolation, identification and virulence factor detection of pathogenic *Aeromonas salmonicida* from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2018, 33(4): 435-443. [刁菁, 李乐, 王晓璐, 等. 虹鳟致病性杀鲑气单胞菌的分离鉴定及其毒力因子的检测[J]. 大连海洋大学学报, 2018, 33(4): 435-443.]
- [33] Liu Y H, Sun X Y, Zhang Y B, et al. Studies of pathogenic bacteria causing ulcer disease of brook charr (*Salvelinus fontinalis*)[J]. Freshwater Fisheries, 2010, 40(4): 62-65. [刘艳辉, 孙晓雨, 张雅斌, 等. 美洲红点鲑溃烂病的病原菌研究[J]. 淡水渔业, 2010, 40(4): 62-65.]
- [34] Yang Y B, Xu N, Dong J, et al. Isolation and identification of *Aeromonas sobria* from *Ictalurus punctatus* and its antimicrobial susceptibility[J]. China Fishery Quality and Standards, 2017, 7(4): 45-50. [杨移斌, 胥宁, 董靖, 等. 斑点叉尾鲷病原中温和气单胞菌的分离鉴定及药敏特性分析[J]. 中国渔业质量与标准, 2017, 7(4): 45-50.]
- [35] Ba C Y, Zhang Y B, Zhang P J, et al. Isolation, identification and drug sensitivity test of *Aeromonas sobria* from *Oncorhynchus keta*[J]. Chinese Veterinary Science, 2016, 46(6): 775-780. [巴翠玉, 张雅斌, 张培军, 等. 大麻哈鱼温和气单胞菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 中国兽医科学,

- 2016, 46(6): 775-780.]
- [36] Lei X P, Geng Y, Deng L J, et al. Isolation, identification and antibiotic susceptibility of pathogenic bacterium *Aeromonas sobria* from fish *Schizothorax dolichonema*[J]. Fisheries Science, 2019, 38(1): 109-114. [雷雪平, 耿毅, 邓龙君, 等. 长丝裂腹鱼温和气单胞菌的分离鉴定及药敏检测[J]. 水产科学, 2019, 38(1): 109-114.]
- [37] Guo Y D, Du Y C, He Y P, et al. Establishment of a LAMP method for detecting *Aeromonas sobria* in *Brachymystax lenok*[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2021, 53(1): 101-105. [郭玉丹, 杜迎春, 何亚鹏, 等. 细鳞鱼温和气单胞菌 LAMP 检测方法的建立[J]. 畜牧与兽医, 2021, 53(1): 101-105.]
- [38] Song P N, Deng J, Hou T, et al. *Aeromonas sobria* peritonitis in a peritoneal dialysis (PD) patient: A case report and review of the literature[J]. BMC Nephrology, 2019, 20(1): 180.
- [39] Gauthier J, Vincent A T, Charette S J, et al. Strong genomic and phenotypic heterogeneity in the *Aeromonas sobria* species complex[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2434.
- [40] Liu M Z, Ye X, Tian Y Y, et al. Expression and immunogenicity analysis of the outer membrane protein W gene of *Aeromonas hydrophila*[J]. Microbiology China, 2011, 38(3): 437-445. [刘明智, 叶星, 田园园, 等. 嗜水气单胞菌外膜蛋白 W 基因的表达及其免疫原性分析[J]. 微生物学通报, 2011, 38(3): 437-445.]
- [41] Nong X W, Huang Y H, Long S, et al. Isolation, identification and virulence gene detection of pathogenic *Aeromonas sobria* from *Truogx sinensis*[J]. Journal of Southern Agriculture, 2015, 46(7): 1322-1328. [农新闻, 黄艳华, 龙苏, 等. 黄沙鳖致病性温和气单胞菌的分离鉴定及其毒力基因检测[J]. 南方农业学报, 2015, 46(7): 1322-1328.]
- [42] Wong C Y F, Heuzenroeder M W, Flower R L P. 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.
- [43] Fu G H, Xiao D, Hu K, et al. Multiplex PCR and ERIC-PCR genotype in virulence genes of *Aeromonas hydrophila* in Crucian carp[J]. Marine Fisheries, 2014, 36(6): 549-556. [符贵红, 肖丹, 胡鲲, 等. 鲫源嗜水气单胞菌毒力基因多重 PCR 检测及 ERIC-PCR 分子分型[J]. 海洋渔业, 2014, 36(6): 549-556.]
- [44] Zhu M, Wang X R, Li J, et al. Identification and virulence properties of *Aeromonas veronii* bv. *sobria* isolates causing an ulcerative syndrome of loach *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. Journal of Fish Diseases, 2016, 39(6): 777-781.
- [45] Wang H. Comparative study between biological characteristics of the different animal species *Aeromonas veronii* and four virulence genes[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2014. [王惠. 不同动物源性维氏气单胞菌的生物特性及四种毒力基因比较研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2014.]
- [46] Vanden Bergh P, Frey J. *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in the light of its type-three secretion system[J]. Microbial Biotechnology, 2014, 7(5): 381-400.
- [47] Marcoux P É, Vincent A T, Massicotte M A, et al. Systematic analysis of the stress-induced genomic instability of type three secretion system in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*[J]. Microorganisms, 2020, 9(1): 85.
- [48] Li J, Ni X D, Liu Y J, et al. Detection of three virulence genes *alt*, *ahp* and *aerA* in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with actual virulence to zebrafish[J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 110(3): 823-830.
- [49] Liu J, Huang Y H, Huang J, et al. Studies on the correlation with pathogenicity and virulence genes of *Aeromonas hydrophila* by *Truogx sinensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(4): 698-706. [刘杰, 黄艳华, 黄钧, 等. 黄沙鳖源嗜水气单胞菌的致病力与毒力基因型相关性[J]. 中国水产科学, 2015, 22(4): 698-706.]
- [50] Zhou Q L, Wang Y J, Xie J, et al. Distribution and virulence gene comparison of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish and water environment[J]. Polish Journal of Microbiology, 2013, 62(3): 299-302.
- [51] Long S, Han S Y, Niu Z W, et al. 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. [龙苏, 韩书煜, 牛志伟, 等. 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.]

## Identification of two *Aeromonas* strains from *Salmo trutta fario* and analysis of their pathogenicity and drug sensitivity characteristics

CHEN Meiqun<sup>1</sup>, Zhaxilamu<sup>1</sup>, SUN Shuaijie<sup>2</sup>, ZHANG Chi<sup>1</sup>, ZHOU Jianshe<sup>1</sup>, WANG Qielu<sup>1</sup>, WANG Wanliang<sup>1</sup>

1. Institute of Fisheries Science, Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Lhasa 850032, China;

2. College of Animal Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, China

**Abstract:** *Salmo trutta fario* is one of the important cold-water economic fishes in Tibet. *S. t. fario* is delicious; contains no muscle spines; and is rich in amino acids, unsaturated fatty acids, and vitamins. It has become an important local high value-added aquaculture species. Diseases occur frequently in cultured *S. t. fario*, especially bacterial diseases such as gill rot and furuncle disease and fungal diseases such as saprolegniasis, which has caused huge economic losses to the *S. t. fario* farming industry. Therefore, disease research is of great significance to the large-scale healthy culture of *S. t. fario*. To determine the cause of death of *S. t. fario*, two dominant strains B1 and A3-2 were isolated from diseased *S. t. fario* and analyzed for virulence gene, animal regression infection, drug resistance gene, and drug sensitivity. The two dominant strains were identified as *Aeromonas salmonicida* B1 and *Aeromonas sobria* A3-2. *A. salmonicida* B1 showed strong pathogenicity to *S. t. fario*, while *A. sobria* A3-2 showed no pathogenicity to *S. t. fario*. Ten virulence genes were detected in *A. salmonicida* B1, including those of exotoxin (*AerA*, *Act*, and *hly* genes), extracellular enzyme (*gcat*, *ahyB*, and *Lip* genes), secretion system of III type (*aexT*, *aopP*, and *ascF-G* genes), and flagella (*Fla* gene). Five virulence genes were detected in *A. sobria* A3-2, including those of exotoxin (*Act* and *Alt* genes), exoenzyme (*gcat* genes), and secretory system III (*aexT* and *aopP* genes). *A. salmonicida* B1 was sensitive to 21 antibiotics, such as ceftriaxone, amoxicillin, florfenicol, ciprofloxacin, tetracycline, and streptomycin, and was only resistant to vancomycin. *A. sobria* A3-2 was sensitive to 17 antimicrobial drugs, such as ceftriaxone, florfenicol, ciprofloxacin, pipemidic acid, tetracycline, and streptomycin and was resistant to 6 antibiotics, including penicillin, amoxicillin, sulfisoxazole, trimethoprim-sulbactam, and vancomycin. Three types of drug-resistant genes (*AmpC*, *gyrA*, and *parC*) were detected in *A. salmonicida* B1. Four types of drug-resistant genes (*AmpC*, *gyrA*, *parC*, and *tetE*) were detected in *A. sobria* A3-2. The drug-resistant genes detected in the two *Aeromonas* strains were basically consistent with the drug-resistant phenotype. *A. salmonicida* B1 was found to be an important pathogen causing fulminant death in *S. t. fario*. This study provides fundamental data on the infection characteristics of *A. salmonicida*, for vaccine development and disease prevention and control in the breeding process of *S. t. fario*.

**Key words:** *Salmo trutta fario*; *Aeromonas salmonicida*; *Aeromonas sobria*; virulence genes; drug-resistant genes; antibiotic sensitivity

**Corresponding author:** CHEN Meiqun. E-mail: cmq1986007@163.com