

DOI: 10.12264/JFSC2024-0273

黄颡鱼源海豚链球菌 ZQ2205 菌株的生物学特性、致病性及其全基因组分析

何坚城, 马壮, 吴文豪, 郭梓泓, 陈名达, 张家豪, 苏友禄, 江飏

仲恺农业工程学院动物科技学院, 广东省水环境与水产品安全工程技术研究中心, 广州市水产病害与水禽养殖重点实验室, 广东 广州 510225

摘要: 海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)是我国黄颡鱼(*Tachysurus fulvidraco*)养殖业中危害最严重的细菌性病原体, 为阐明其生物学特性、致病性及其全基因组信息学特征, 为该病的诊断和防控提供理论支撑, 本研究选取了黄颡鱼源海豚链球菌 ZQ2205 菌株为研究对象, 对其生长特性、致病力及全基因组序列进行了分析。研究表明, 菌株 ZQ2205 为革兰氏阳性菌, 呈单链状排列, 呈 β 溶血。该菌株具有脂肪、淀粉和蛋白酶活性, 无纤维素酶活性, 并对酸碱和盐度适应范围较广, 能够在 pH 为 7~9 及添加 NaCl 调整盐度为 0~40 的脑心浸出液肉汤培养基中生长, 在 pH 为 9 及盐度为 0~20 范围生长最佳。药敏实验表明, ZQ2205 对恩诺沙星和链霉素耐药, 对氧氟沙星、四环素、氯霉素和复方新诺明 4 种药物中度敏感。攻毒实验显示, 剂量低至 0.5 CFU/g 即可造成黄颡鱼幼鱼全部死亡, 对鱼肝脏、脾脏、肾脏、鳃、脑组织可造成显著损伤, 其中, 脾脏和肾脏是菌载量最高的器官。全基因组测序显示, ZQ2205 基因组大小为 2128105 bp, GC 含量为 36.83%, 编码 2035 个基因, 共发现 18 种毒力因子, 主要功能包括黏附、免疫调节、营养代谢因素及胞外酶, 预测到 21 个抗生素耐药基因和 18 个抗生素靶基因, 主要涉及青霉素、达托霉素、利福霉素、磺胺类和喹诺酮类等抗菌药物。综上所述, 黄颡鱼源海豚链球菌 ZQ2205 具有强致病性、多重耐药性, 且对环境适应性强, 其全基因组信息揭示了毒力和耐药性特征, 对该病防控具有重要意义。

关键词: 黄颡鱼; 海豚链球菌; 生物学特性; 致病性; 全基因组

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2025)02-0228-18

黄颡鱼(*Tachysurus fulvidraco*)作为一种高价值的淡水养殖物种, 因其肉质鲜美、无肌间刺在我国水产养殖业中占据重要地位, 2023 年其年产量达 62 万 t^[1-2]。近年来, 尽管育种技术取得了显著进步, 黄颡鱼养殖业的发展却相对缓慢。深入探究发现, 日益严峻的病害问题已经成为阻碍黄颡鱼养殖业发展的主要瓶颈^[3]。其中, 海豚链球菌病的肆虐尤为突出, 其严重性迫使一些地区养殖户不得不调整养殖策略, 转养其他鱼类品种。本课题组于 2022 年 3 月至 2023 年 9 月, 在广东省黄颡鱼主养区对黄颡鱼病害进行了细菌性病原监

测, 发现海豚链球菌在检测出的所有病灶优势菌株中占比最高, 达 32.9% (68/210)(数据未发表)。鉴于此, 深入研究黄颡鱼的病害问题, 特别是针对海豚链球菌病的防控, 对于促进黄颡鱼养殖业的可持续发展具有重要的意义。

海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)作为水产养殖的重要致病菌, 自 1976 年由 Pier 等^[4]首次从亚马逊淡水海豚(*Inia geoffrensis*)中分离以来, 其生物学特性和致病机制逐步成为研究热点。早期研究集中在海豚链球菌的分离、鉴定及流行病学特征上, 揭示出其对黄颡鱼、卵形鲳鲹(*Trachinotus*

收稿日期: 2024-10-10; 修订日期: 2024-11-12.

基金项目: 2022 年中央成品油价格调整对渔业补助预算资金项目(粤财农〔2022〕119 号).

作者简介: 何坚城(2001-), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产健康养殖与病害防控. E-mail: 16620031854m@sina.cn

通信作者: 江飏, 博士, 讲师, 研究方向为鱼类病害诊断与防控. E-mail: jiangbiao@zhku.edu.cn

ovatus)、斑点叉尾鮰(*Ictalurus punctatus*)、银鼓鱼(*Selenotoca multifasciata*)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)以及欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)等多种鱼类具有强致病性,能引发诸如败血症、脑膜炎、眼球发炎、多器官出血等一系列严重症状^[5-12]。随着研究的深入,海豚链球菌的致病机理逐渐被揭示,该菌具有高度的侵袭性,能迅速侵入鱼体的鳃部、肾脏等重要器官,并具备穿透血脑屏障的能力,对鱼脑神经系统造成严重损害,同时诱发全身性出血的病理反应^[13-14]。在这一过程中,溶血素 S^[15]、表面毒力因子 SiM 蛋白^[16]、荚膜多糖^[17]等胞外产物被认为扮演了关键角色。在病害防控方面,接种疫苗是预防链球菌病最为有效的方法,目前海豚链球菌灭活疫苗^[18]、减毒疫苗^[19]、亚单位疫苗^[20]和 DNA 疫苗^[21]均有研究,并具有一定保护效果。近年来,分子生物学技术的应用也极大地推动了海豚链球菌研究的发展,通过基因组分析,解析了其毒力基因和耐药基因分布,为疫苗开发和疾病防控策略的制定提供了科学依据^[22]。

海豚链球菌在我国黄颡鱼养殖业中已成为最具破坏性的细菌性病原体之一,尽管该菌作为水产养殖领域的关键致病菌已受到广泛重视,且其对多种鱼类的致病机理正逐步得到阐明,但专门针对黄颡鱼来源的海豚链球菌的研究仍显不足。因此,深入分析黄颡鱼源海豚链球菌的生物学特性及其全基因组,明确其致病机制,并探究其与感染其他宿主的海豚链球菌之间的差异,对其制定有效的防控策略和疫苗开发具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验菌株与动物

本研究所使用的菌株 ZQ2205 通过本实验室前期开展的黄颡鱼细菌性病原监测,从佛山地区的患病黄颡鱼中分离获得,发病的池塘连续多日出现大量黄颡鱼死亡,累计死亡率约为 8%,病鱼表现为下颌及鳍条出血、脾脏及肾脏肿大出血等症状。实验所用黄颡鱼(4.71±1.71) g 购自广州市联合鱼苗发展有限公司,饲养于中国水产科学院南海

研究所珠海实验基地,实验前在帆布池暂养 2 周。

1.2 细菌形态观察和生理生化鉴定

挑取复苏并纯化后的菌株 ZQ2205 单菌落,采用三线法接种在 5%绵羊血琼脂平板上,于 30 ℃ 条件下培养约 16 h,肉眼观察菌落形态,并使用革兰氏染色试剂对血琼脂平板上的细菌进行染色,在显微镜下观察菌体颜色及形态并拍照。此外,用无菌棉签刮取平板上的菌落至电镜固定液中进行固定,委托武汉塞维尔生物科技有限公司对样品进行透射电镜和扫描电镜拍摄分析。参照链球菌生理生化鉴定试剂盒说明书,对菌株 ZQ2205 的生理生化特性进行检测,参考《常见细菌系统鉴定手册》^[23]对检测结果进行比较。

1.3 16S rDNA 序列分析

采用细菌 16S rDNA 通用引物(上游引物 16 S-27 F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',下游引物 16 S-1492 R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')对提取的菌株 DNA 进行 PCR 扩增,扩增产物经过 1%琼脂糖凝胶电泳检测后送至广州天一辉远生物科技有限公司进行测序服务。测序完成后,将所得的 16S rDNA 序列与 NCBI 数据库中存储的细菌基因序列进行比对,并使用 MEGA 11 软件中的邻接法构建系统发育树。

1.4 胞外产物酶活性鉴定

采用点样法测定菌株 ZQ2205 的胞外产物蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶和纤维素酶活性,方法如下:

蛋白酶活性检测参照景如贤等^[24]的脱脂奶平板法;脂肪酶活性检测参照李牧^[25]所描述的方法;淀粉酶活性检测:将菌株接种至含有 2%淀粉的 BHI 培养基平板上,于 28 ℃ 条件下培养 24 h,利用 0.1%卢戈氏碘液进行染色。通过观察菌落周围形成透明区圈,以透明圈的出现判断是否具备淀粉酶活性。纤维素酶活性检测:将在含 1%羧甲基纤维素的 BHI 平板上接种菌株,于 28 ℃ 条件下培养 24 h,随后,使用 0.5%的刚果红染液对平板进行染色 15~20 min。若菌落周围出现明显的透明圈,则确认该菌株具备纤维素酶活性,能够降解纤维素。

1.5 生长特性

在 BHI 液体培养基中分别加入适量 HCl

(1 mol/L)和 NaOH (1 mol/L)溶液调节培养基 pH 至 3、5、7、7.4、9 和 11; 在 BHI 液体培养基中分别添加 NaCl 调整盐度为 0、5、10、20、40 和 80。以 3%接种量将浓度为 5.54×10^8 CFU/mL 的 ZQ2205 菌悬液接种于正常和上述各 pH 及盐度的 BHI 液体培养基中, 置于 96 孔板中, 放入 VL0L00D0 酶标仪(赛默飞世尔科技公司, 美国), 设置在 28 °C 以 180 r/min 持续震荡培养 24 h, 每小时以 OD 600 nm 进行读数。设置不添加菌液的 BHI 液体培养基作为对照。

1.6 药物敏感性实验

采用纸片琼脂扩散法, 参考 2020 年美国临床和实验室标准化协会(CL-SI)推荐的操作标准及判定方法检测分离菌对左氧氟沙星、氧氟沙星、恩诺沙星、四环素、多西环素、氯霉素、氟苯尼考、红霉素、克拉霉素、阿奇霉素、克林霉素、头孢曲松、头孢吡肟、阿莫西林、链霉素、万古霉素、复方新诺明共 17 种药物的敏感性, 实验所用药敏纸片购买自比克曼生物科技有限公司。

1.7 毒力测定

菌株 ZQ2205 在 5%绵羊血琼脂平板上活化, 于 30 °C 条件下培养约 16 h, 随后选择若干单菌落并将其转移到 PBS 缓冲液中, 于 4 °C 条件下以 5000 r/min 的速度离心菌液, 并使用无菌 PBS 进行洗涤, 随后重悬菌液, 以制备初始菌悬液。利用紫外分光光度计测定菌落数与 OD 值的关系, 据此调整菌悬液浓度。通过 10 倍稀释法进一步稀释菌液至所需浓度, 最终攻毒剂量根据涂布计数结果确定, 分别采取了腹腔和肌肉注射方式进行攻毒, 每种攻毒方式将 360 尾健康的黄颡鱼幼鱼随机分为 6 组, 每组 3 个重复, 每重复 20 尾鱼, 同时以注射无菌 PBS 为空白对照组, 持续观察并记录鱼的死亡情况及临床症状。

1.8 组织细菌载量分析和组织病理学观察

利用无菌生理盐水将菌株配制成浓度为 4.8×10^5 CFU/mL 的菌悬液, 选取 80 尾健康鱼, 每尾肌肉注射 0.05 mL 的菌液, 分别在注射第 0、6、12、24、48 和 72 h 随机捞取 9 尾鱼进行解剖, 采集皮肤、肌肉、胃、肠、鳃、脑、心脏、脾脏、肝脏和肾脏, 将同一时间点采集的 3 尾鱼的相同

组织合并保存于冻存管中, 迅速液氮冷冻后转移至-80 °C 超低温冰箱中保存。将收集的组织进行称重并研磨, 使用通用 DNA 提取试剂盒(诺唯赞, 中国)按照革兰氏阳性菌的操作步骤提取组织的总 DNA。利用本课题组设计的海豚链球菌特异性引物(上游引物 F: 5'-CTTGATGGCCCGTGTA-ACAG-3', 下游引物 R: 5'-ACGTCTTGGCTCTACACGAT-3', 荧光探针 P: 5'-FAM-ACTTTATC-CGCTTCAGCGGCATCATCA-TAMRA-3'), 对提取的 DNA 样品进行实时荧光定量 PCR (qPCR)分析, 以测定菌载量。每个样品进行 3 次技术重复。

选取攻毒后出明显症状的 3 尾鱼进行解剖, 采集脾脏、肝脏、尾肾、心脏、中肠、脑和鳃组织, 固定在 10%的中性福尔马林溶液中。将固定后的组织送往武汉塞维尔生物科技有限公司制片和 H.E 染色, 通过显微镜(Mshot ML31-B, 中国)观察组织结构, 并使用显微镜专用相机(MSX2, 中国)拍照记录。

1.9 全基因组序列测定与拼接

使用全基因组提取试剂盒(诺唯赞, 中国), 提取菌株 ZQ2205 全基因组, 经过纯度和浓度检测合格后, 将测序、数据质量控制和数据筛选任务委托给苏州帕诺米克生物医药科技有限公司。首先构建不同插入片段大小的文库, 并采用 Illumina NovaSeq 测序平台, 通过二代测序技术(NGS)进行高通量测序。同时, 采用 PacBio Sequel 平台, 运用第三代单分子测序技术, 对相同文库进行独立且互补的测序。采用 FastQC 对二代测序数据进行质量控制, 进一步进行接头污染去除和质量校正, 确保获得高质量的测序数据。

运用 HiFiasm、Unicycler 和 Flye 等工具, 对 Pacbio 测序平台产出的原始下机数据进行组装, 构建连续的 contig 序列。在此基础上, 为了提升组装精准度, 进一步利用二代测序产生的高质量数据, 通过使用 Walker 等^[26]提出的 pilon 算法进行迭代校正, 优化三代 contig 组装结果。将校正后的数据整合, 完成目标物种完整基因组序列拼接。对拼接得到的完整序列进行全面评估, 并通过已知质粒序列比对, 验证所得序列的准确性和完整性。

1.10 基因组蛋白编码基因功能注释和基因组圈图绘制

采用 diamond 软件来完成蛋白编码基因的序列比对, 分别在 COG 数据库、KEGG 数据库进行比对及注释。将基因组序列、预测得到的编码基因信息以及非编码 RNA 预测结果综合整理, 按照 GenBank 标准格式规范构建 GBK 文件。完成整合后, 对整个基因组进行环形图谱绘制。

1.11 基因组组分分析

运用 GeneMarkS 软件对完整的基因组序列进行蛋白质编码基因预测分析。使用 tRNAscan-SE 工具对整个基因组范围内的 tRNA 基因进行预测, 使用 Barrnap 软件对整个基因组范围内的 rRNA 基因进行预测。通过对比 Rfam 数据库对非编码 RNA 进行预测。使用 hmmscan 软件, 基于 HMM 模型对基因组序列中可能编码的 CAZy 酶家族成员进行预测。使用 BLAST 软件将基因组编码蛋白序列与 VFDB 数据库进行比对, 预测基因组中可能存在的毒力因子相关基因; 将基因组编码蛋白序列与 CARD 数据库进行比对, 预测基因组中可能存在的抗生素抗性相关基因。

1.12 统计分析

实验结果用 Microsoft Excel 初步分析整理, 采用 SPSS20.0 软件对所得数据进行单因素方差分析(ANOVA), Tukey 多重比较差异的显著性, $P<0.05$ 为显著性差异, 数据以平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)来表示, 使用 GraphPad Prism 9.5 进行作图。

2 结果与分析

2.1 病原菌形态

菌株 ZQ2205 在 30 ℃ 条件下培养 16 h 后, 于血琼脂平板上形成乳白色、光滑湿润、边缘整齐圆形菌落(直径为 0.5~1.0 mm), 伴完全透明的 β 溶血圈(图 1a)。该菌革兰氏染色后呈现为蓝紫色, 为单链状或成对排列的革兰氏阳性球菌(图 1b)。扫描电镜显示菌体饱满, 二链或链锁状的球形或卵圆形, 直径 0.6~1.0 μm(图 1d)。透射电镜可见细胞膜界限清晰, 边缘光滑, 相互间连接紧密, 胞质均匀, 有清晰的二分裂痕迹(图 1c)。

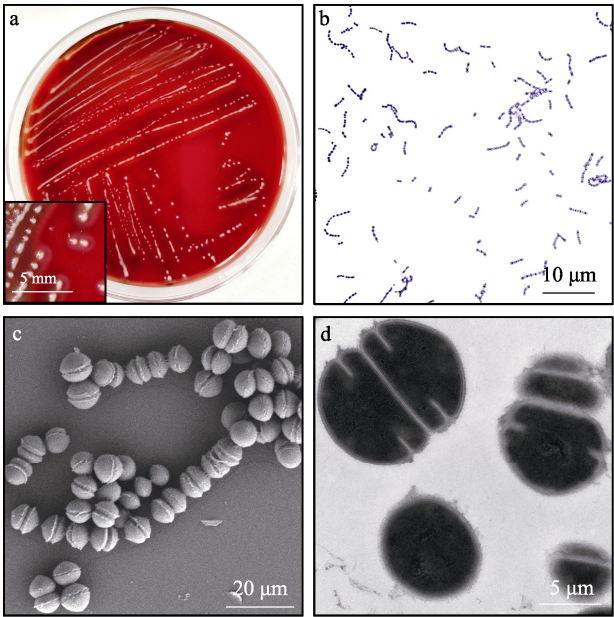


图 1 菌株 ZQ2205 菌落与菌体形态
a. 菌落形态; b. 革兰氏染色; c. 透射电镜; d. 扫描电镜。
Fig. 1 Colony and bacterial morphology of strain ZQ2205
a. Colony morphology; b. Gram staining; c. Transmission electron microscopy (TEM); d. Scanning electron microscopy (SEM).

2.2 生理生化鉴定

菌株 ZQ2205 在 10 ℃ 能够生长, 在 45 ℃、pH 为 9.6 以及 6.5% NaCl 的条件下不生长, 能够水解七叶灵、蕈糖以及甘露醇, 不能分解山梨醇、核糖、乳糖以及棉籽糖。13 项指标测定结果, 除了核糖肉汤, 其他 12 项与《常见细菌系统鉴定手册》中海豚链球菌的结果一致(表 1)。

表 1 菌株 ZQ2205 生理生化特征
Tab. 1 Physiological and biochemical characteristics of strain ZQ2205

检测项目 test item	ZQ2205	海豚链球菌 ^[23] <i>Streptococcus iniae</i>
10 ℃	+	+
45 ℃	-	-
pH 9.6	-	-
6.5% NaCl	-	-
溶血 hemolytic reaction	β	β
VP 实验 VP test	-	-
七叶灵 esculin	+	+
蕈糖 mushroom sugar	+	+
山梨醇 sorbitol	-	-
核糖肉汤 ribose broth	-	+
乳糖 lactose	-	-
甘露醇 mannitol	+	+
棉籽糖 raffinose	-	-

2.3 16S rDNA 序列分析

NCBI 比对显示, 菌株 ZQ2205 16S rDNA 序列与海豚链球菌相似率在 99% 以上。系统发育树结果显示菌株 ZQ2205 与其他 4 株海豚链球菌 HG2021-1 (相似率为 99.86%)、SB1 (相似率为 99.86%)、VN2396 (相似率为 99.71%)、ATCC

29178 (相似率为 99.71%) 紧密相邻, 共同聚为一支, 与停乳链球菌(*S. dysgalactiae*)和无乳链球菌(*S. agalactiae*)等其他链球菌也形成较近分支, 而杀鱼爱德华氏菌(*Edwardsiella piscicida*)和维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)等细菌则位于远端(图 2)。

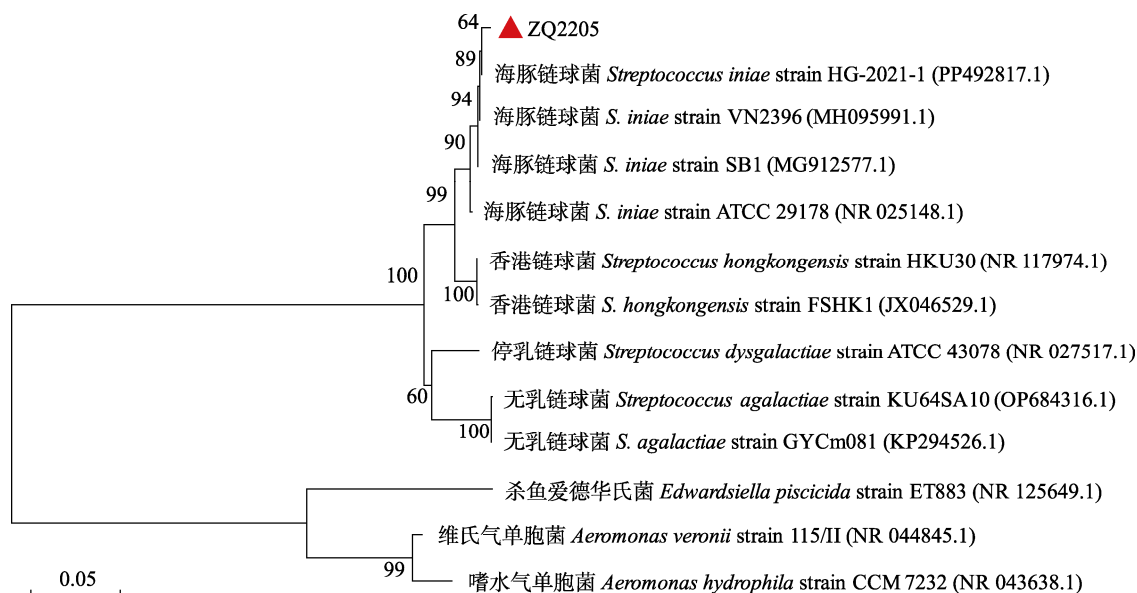


图 2 基于 16S rDNA 的菌株 ZQ2205 系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain ZQ2205 based on 16S rDNA

2.4 胞外产物酶活性

菌株 ZQ2205 具有脂肪酶活性, 可在含有 1% 吐温 80 的 BHI 固体培养基培养形成直径(11.11 ± 0.71) mm 的白色沉淀圈(图 3a、e); 经 0.1% 卢戈氏碘液染色处理, 在含 2% 淀粉成分的 BHI 固体培养基上可产生直径为(17.47 ± 0.68) mm 的明显的透明圈(图 3b、e), 显示该菌具有淀粉酶活性; 然而, 该菌不具有纤维素酶活性, 在含 1% 羧甲基纤维素的 BHI 平板上, 未观察到透明圈(图 3c); 此外, 在含 2% 脱脂奶的 BHI 平板上, 菌落周围出现了直径为(14.64 ± 1.83) mm 的透明圈(图 3d、e), 显示该菌具有蛋白酶活性。

2.5 生长特性

图 4 结果表明, 菌株 ZQ2205 在第 12 至 14 小时进入平台期, pH=9 时生长最佳, 而 pH ≤ 5 或 pH ≥ 11 几乎停滞(图 4a)。盐度为 0~20, 菌株生长速率、进入平台期的时间均无显著差异, 但 40 时

生长速率和平台期菌落数显著降低, 80 时细菌无法生长(图 4b)。

2.6 药物敏感性测定

药敏分析结果显示, 菌株 ZQ2205 对左氧氟沙星、多西环素、氟苯尼考、红霉素、克拉霉素、阿奇霉素、克林霉素、头孢曲松、头孢吡肟、阿莫西林和万古霉素 11 种药物敏感, 对氧氟沙星、四环素、氯霉素和复方新诺明 4 种药物中度敏感; 对恩诺沙星和链霉素耐药(表 2)。

2.7 毒力测定

在本研究中, 通过腹腔或肌肉注射方式对黄颡鱼进行攻毒处理的实验组, 在实验的第 1 天即出现了死亡现象, 并在接下来的 3 d 内死亡率显著上升(图 5), 各组间无显著差异($P > 0.05$)。在接种剂量低至 0.5 CFU/g 时, 黄颡鱼在感染后 4 d 的死亡率也达到了 100% (对应图 5a 中 4.8×10 CFU/mL 曲线)。

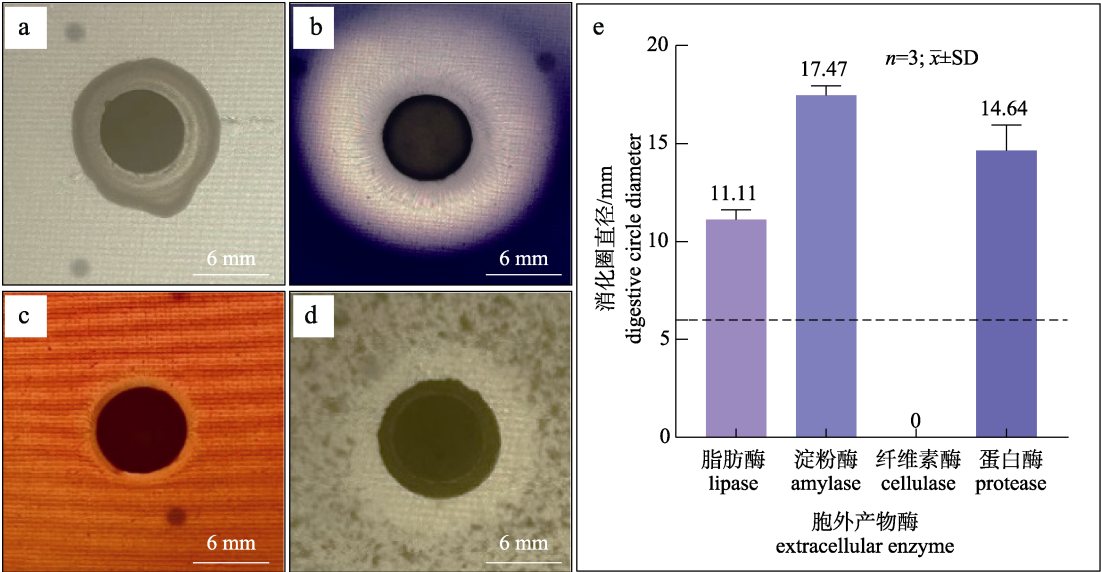


图 3 菌株 ZQ2205 胞外产物酶活性
a. 脂肪酶活性; b. 淀粉酶活性; c. 纤维素酶活性; d. 蛋白酶活性; e. 沉淀带或透明圈直径。
Fig. 3 The extracellular enzyme activity of strain ZQ2205
a. Lipase activity; b. Amylase activity; c. Cellulase activity; d. Protease activity; e. The diameter of precipitation zone or transparent ring.

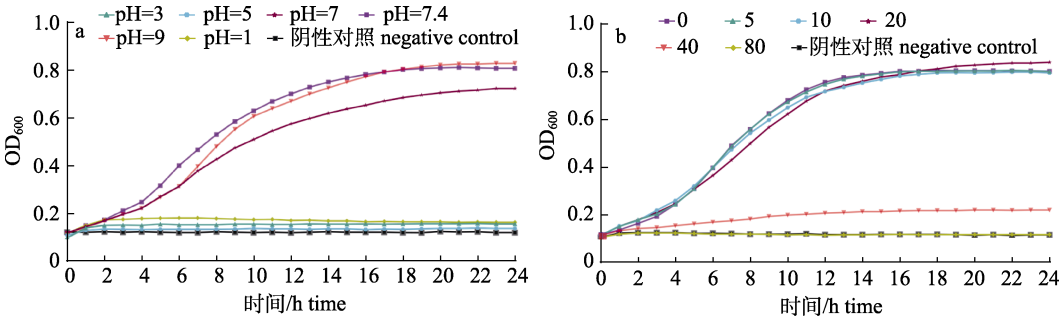


图 4 菌株 ZQ2205 的生长曲线
a. pH; b. 盐度。
Fig. 4 Growth curve of strain ZQ2205
a. pH; b. Salinity.

2.8 组织细菌载量变化

肌肉注射攻毒后 6 h, 黄颡鱼各组织均可检测到海豚链球菌, 其中, 皮肤中的菌载量最高, 达到 3.98×10^5 CFU/g (图 6)。第 12 小时, 各组织菌载量差异较小, 皮肤仍是最高的器官, 心脏组织次之。第 24 小时, 各组织的的菌载量均显著增加 ($P<0.05$), 其中脾脏和肾脏中菌载量尤为突出, 分别达到了 6.51×10^9 CFU/g 和 2.75×10^8 CFU/g, 同时, 观察到鱼开始出现死亡。第 48 小时, 多数组织菌载量达最大值, 半数鱼死亡, 脾脏和肾脏菌载量最高。72 h 仅少数鱼存活, 除肝脏、心脏

和肌肉外, 其他组织菌载量下降。

2.9 临床症状和组织病理变化

菌株 ZQ2205 对黄颡鱼进行人工攻毒感染后, 导致黄颡鱼发生急性死亡现象, 所有攻毒感染后死亡的黄颡鱼均能在其体内肝、脾、肾和脑等组织中分离出海豚链球菌。约 40%受感染黄颡鱼在病程中会表现出链球菌病的典型症状, 如口腔、下颌及鳍条基部区域发生出血(图 7a、b), 同时伴有脾脏肿大和出血症状(图 7c)。

对有典型病症的病鱼进行组织病理分析显示, 肝脏变性坏死, 炎性细胞浸润(图 8b); 脾脏坏死

表 2 菌株 ZQ2205 药敏实验结果
Tab. 2 Results of antibiotic sensitivity test of strain ZQ2205

抗菌药物 antimicrobial drug		药物含量 (μg/piece) disk content	抑菌圈直径/mm diameter of inhibition	抑菌圈直径判断标准/mm the standard of inhibition zone diameter			结果 result
				敏感(S) susceptible	中度敏感(I) intermediate	耐药(R) resistant	
喹诺酮类 quinolones	左氧氟沙星 levofloxacin	5	18	≥17	14–16	≤13	S
	氧氟沙星 ofloxacin	5	15	≥16	13–15	≤12	I
	恩诺沙星 enrofloxacin	10	18	≥29	22–28	≤21	R
四环素类 tetracyclines	四环素 tetracycline	30	21	≥23	19–22	≤18	I
	多西环素 doxycycline	30	22	≥16	13–15	≤12	S
酰胺醇类 chloramphenicols	氯霉素 chloramphenicol	30	20	≥21	18–20	≤17	I
	氟苯尼考 florfenicol	30	22	≥18	13–17	≤12	S
大环内酯类 macrolides	红霉素 erythromycin	15	23	≥21	16–20	≤15	S
	克拉霉素 clarithromycin	15	22	≥21	17–20	≤16	S
	阿奇霉素 azithromycin	15	18	≥18	14–17	≤13	S
林可霉素类 lincomycin	克林霉素 clindamycin	2	22	≥19	16–18	≤15	S
头孢烯类 cephalexin	头孢曲松 ceftriaxone	30	29	≥24	–	–	S
	头孢吡肟 cefepime	30	29	≥24	–	–	S
β-内酰胺类 β-lactams	阿莫西林 amoxicillin	25	27	≥18	14–17	≤13	S
氨基糖苷类 aminoglycosides	链霉素 streptomycin	10	0	≥15	12–14	≤11	R
糖肽类抗生素 glycopeptide antibiotics	万古霉素 vancomycin	30	18	≥17	–	–	S
磺胺类 sulfonamides	复方新诺明 bactrim	23.75/1.25	15	≥20	11–19	≤10	I

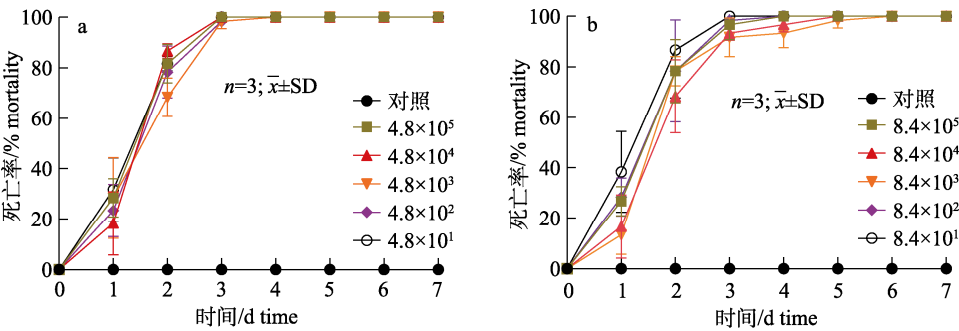


图 5 菌株 ZQ2205 攻毒后黄颡鱼的死亡率
a. 肌肉攻毒, b. 腹腔攻毒.

Fig. 5 The mortality rate of *Tachysurus fulvidraco* post infection of strain ZQ2205
a. Intramuscular infection; b. Intraperitoneal infection.

性脾炎, 炎性细胞浸润、出血及坏死(图 8d); 肾脏炎性细胞浸润, 肾小管及肾小球细胞肿胀增生(图 8f); 鳃组织上皮细胞增生肿胀, 鳃小片融合, 炎性细胞浸润(图 8h); 脑组织炎症反应, 脑血管扩张伴炎性细胞浸润(图 8j); 心脏组织无明显病理变化(图 8l)。

2.10 基因组组装与分析

测序与基因组组装分析显示, 菌株 ZQ2205

基因组(GenBank 登录号为 CP162310)由单一环状染色体构成, 总长度为 2128105 bp, GC 含量为 36.83%。该基因组的 N50 和 N20 长度分别为 12923 bp 和 18777 bp。基因组中包含 2035 个蛋白编码基因, 占基因组总长度的 87.51%。此外, 还鉴定出 18 个核糖体 RNA (rRNA)、68 个转运 RNA (tRNA)和 34 个非编码 RNA (ncRNA)(图 9)。

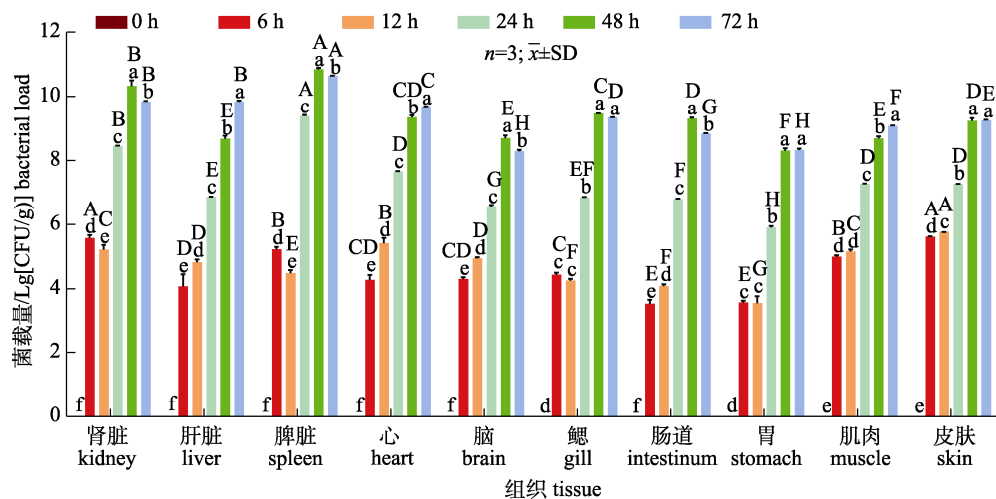


图 6 黄颡鱼感染菌株 ZQ2205 后不同时间点各组织菌载量

图内不同小写字母表示不同时间点同一组织菌载量差异显著($P<0.05$); 不同大写字母表示同时点不同组织菌载量差异显著($P<0.05$).

Fig. 6 Bacterial load in various tissues of *Tachysurus fulvidraco* at different time points after infection of strain ZQ2205. Different lowercase letters indicate statistically significant differences of bacterial load among different time point at the same tissue ($P<0.05$); Different uppercase letters indicate statistically significant differences of bacterial load among different tissues at the same time point ($P<0.05$).

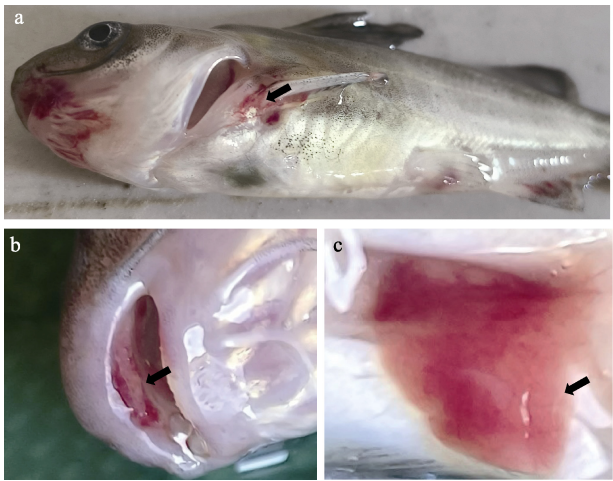


图 7 黄颡鱼人工感染菌株 ZQ2205 临床症状

a. 黑色箭头指示下颌和鳍条出血点; b. 黑色箭头处指示口腔出血点; c. 黑色箭头指示脾脏肿大出血点.

Fig. 7 The symptoms of *Tachysurus fulvidraco* artificially infected with strain ZQ2205

a. The black arrow indicates bleeding spots on the lower jaw and fin rays; b. The black arrow points to bleeding spots in the oral cavity; c. The black arrow indicates an enlarged spleen with hemorrhagic spots.

2.11 蛋白编码基因功能注释分析

通过与 COG 数据库的比对分析, ZQ2205 共有 1842 个基因(占全基因组的 90.52%)获得功能注释, 主要与复制、重组和修复功能的基因相关

(L), 其次是碳水化合物的运输和代谢(G)以及翻译、核糖体结构和生物发生(J)。此外, 21.66%的基因被归类为功能未知(S)(图 10)。

KEGG KAAS 注释 ZQ2205 蛋白编码基因结果显示, 代谢功能基因最多(687 个), 主要参与碳水化合物和氨基酸代谢; 细胞过程基因 69 个, 涉及原核生物细胞群落功能; 环境信息处理基因 214 个, 以信号转导和膜转运为主; 遗传信息处理基因 181 个, 涉及翻译、复制和修复; 人类疾病相关基因 74 个, 与细菌感染、神经功能及内分泌代谢有关; 有机体系相关基因 28 个(图 11)。

2.12 基因组组分分析

组分分析结果显示菌株 ZQ2205 的基因组编码了 71 个 CAZy 酶类基因。以糖苷水解酶(35 个, 49.30%)和糖基转移酶(24 个, 33.80%)为主。此外, 还包括碳水化合物酯酶共 9 个; 多糖裂解酶共 2 个, 以及碳水化合物结合相关的酶 1 个(图 12a)。通过 VFDB 数据库共预测到 18 种毒力因子(表 3), 主要分布于免疫调节和黏附类别, 可能参与细菌侵袭和黏附(图 12b), 包括酪氨酸蛋白激酶、cAMP、透明质酸合成酶以及延伸因子 EF-Tu 等蛋白。该菌株还鉴定出 39 个抗生素抗性相关基因, 占总蛋

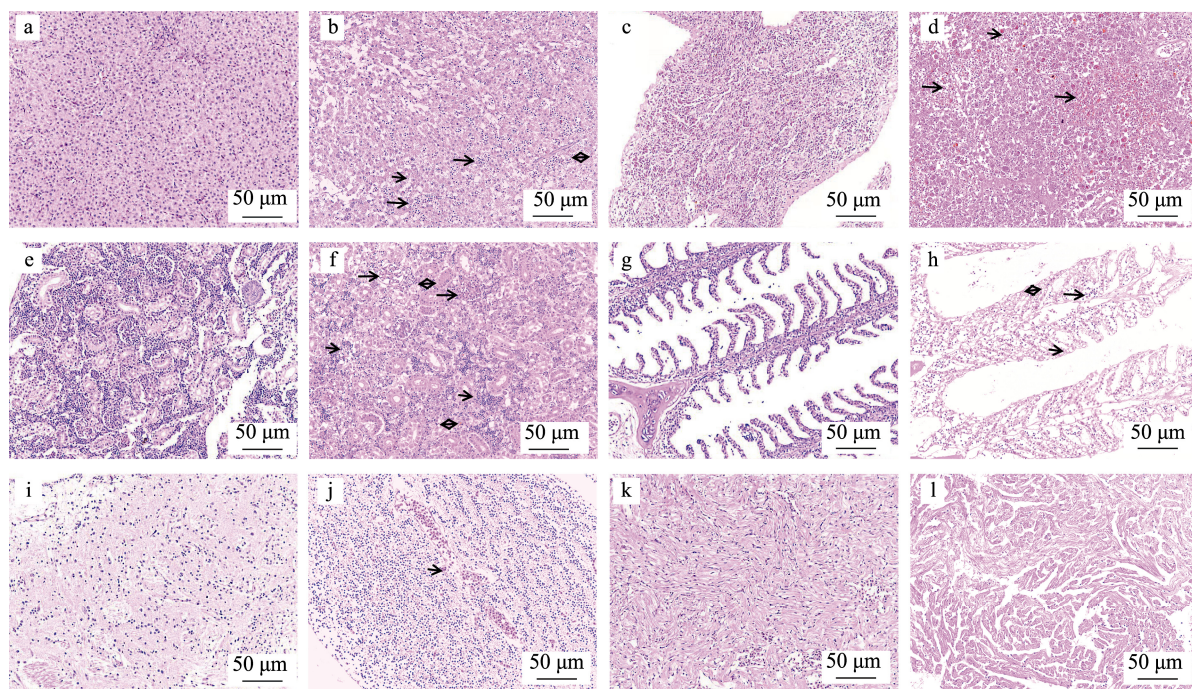


图 8 黄颡鱼人工感染菌株 ZQ2205 组织病理学观察(400×)

a. 健康鱼肝组织; b. 患病鱼肝组织, “→”表示肝细胞变性、坏死, 排列紊乱, “→”表示肝血窦淤血, “↔”表示炎性细胞浸润; c. 健康鱼脾组织; d. 患病鱼脾组织, “→”表示坏死性脾炎, 炎性细胞浸润, “→”表示脾脏出血、灶状坏死; e. 健康鱼肾组织; f. 患病鱼肾组织, “→”表示炎性细胞浸润, “→”表示肾小球内皮增生、肿胀, “↔”表示肾小管上皮细胞肿胀; g. 健康鱼鳃组织; h. 患病鱼鳃组织, “→”表示鳃丝上皮细胞增生、肿胀, “→”表示炎性细胞浸润, “↔”表示鳃小片融合; i. 健康鱼脑组织; j. 患病鱼脑组织, “→”表示脑组织炎症反应, 血管扩张, 炎性细胞浸润; k. 健康鱼心脏组织; l. 患病鱼心脏组织。

Fig. 8 Histopathological observation of *Tachysurus fulvidraco* artificially infected with strain ZQ2205(400×)

a. Liver of healthy fish; b. Liver of diseased fish, the “→” indicates hepatic cell degeneration, necrosis, and disordered arrangement, “→” indicates congestion in hepatic sinusoids, “↔” indicates infiltration by inflammatory cells; c. Spleen of healthy fish; d. Spleen of diseased fish, the “→” indicates necrotizing splenitis, inflammatory cell infiltration, “→” indicates spleen hemorrhage, focal necrosis; e. Kidney of healthy fish; f. Kidney of diseased fish, the “→” indicates inflammatory cell infiltration, “→” indicates glomerular endothelial hyperplasia, swelling, “↔” indicates renal tubular epithelial cell swelling; g. Gill of healthy fish; h. Gill of diseased fish, the “→” indicates proliferation and swelling of gill filament epithelial cells, “→” indicates inflammatory cell infiltration, “↔” indicates fusion of gill lamellae; i. Brain of healthy fish; j. Brain of diseased fish, the “→” indicates brain tissue inflammation, vasodilation, inflammatory cell infiltration; k. Heart of healthy fish; l. Heart of diseased fish.

白编码基因的 1.62%, 包括耐药和靶基因, 涵盖多种抗生素类别, 如青霉素、达托霉素、利福霉素、磺胺类和喹诺酮类等抗生素及抗菌药物类别。

3 讨论

3.1 菌株 ZQ2205 的生物学特性

海豚链球菌是一种极具危害的条件致病菌, 已证实能感染包括黄颡鱼在内的多种养殖鱼类, 导致全身性出血病症, 对水产养殖业造成巨大损失^[10-12]。鉴于当前针对黄颡鱼源海豚链球菌的研究较为匮乏, 本研究对从广东佛山地区患病黄颡鱼上分离获得的一株疑似海豚链球菌菌株

ZQ2205 进行了全面的生物学特性分析。革兰氏染色和电镜结果显示其为球状革兰氏阳性菌, 结合生理生化鉴定结果和 16S rDNA 序列分析及进化树构建表明该菌株为海豚链球菌。杨移斌等^[5]和 Xu 等^[22]报道的黄颡鱼源海豚链球菌形态与刘佳^[27]、Pirollo 等^[12]学者报道的其他鱼源海豚链球菌形态, 均呈现为光滑、圆润、边缘整齐的乳白色菌落, 为革兰氏阳性球菌, 呈长链状排列, 并展现出 β 溶血现象, 与本研究对黄颡鱼源海豚链球菌菌株 ZQ2205 的形态学研究结果一致, 表明了不同鱼源的海豚链球菌形态学特征无明显差异。

生理生化鉴定结果显示 ZQ2205 与标准链球

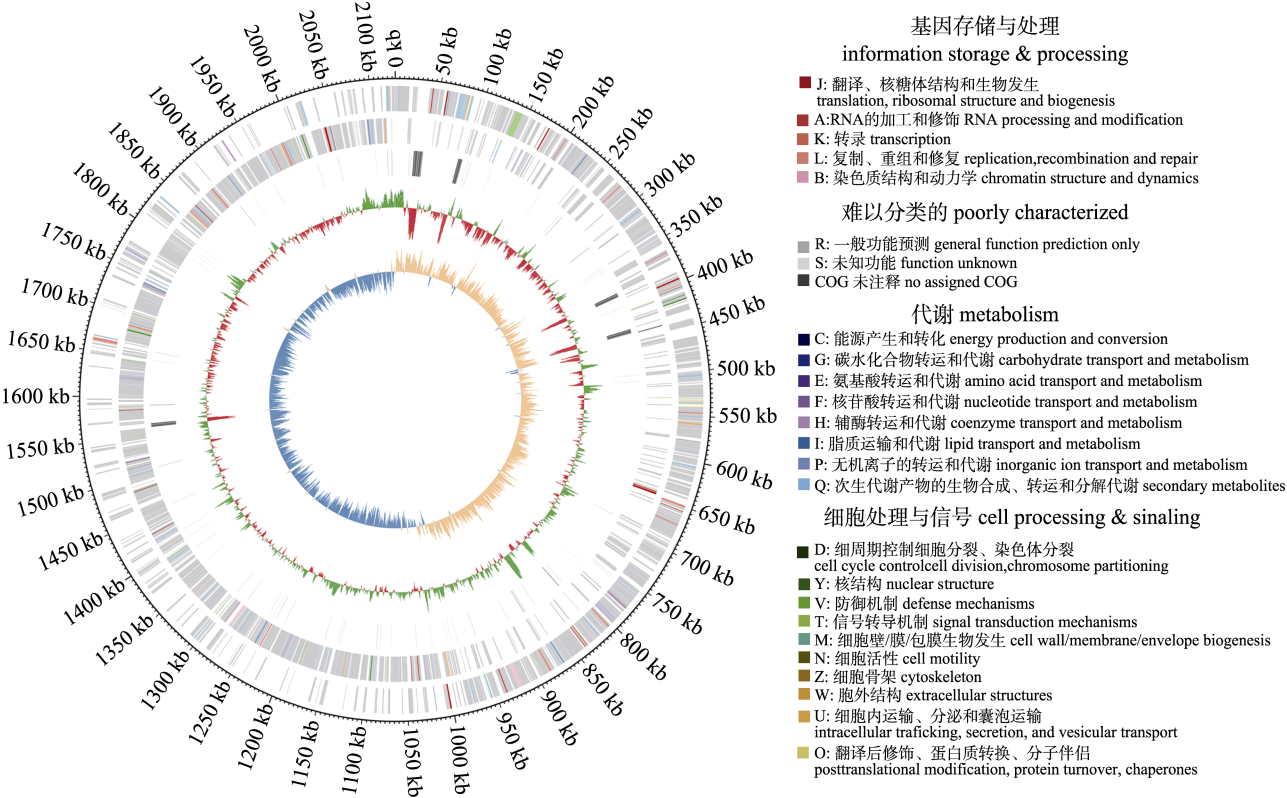


图 9 菌株 ZQ2205 全基因组图

从外圈到内圈, 第一圈代表长度刻度。第二圈和第三圈表示基因组上基因的分布, 不同颜色表示基因不同的 COG 注释。第四圈表示非编码 RNA; 第五圈表示 GC 含量; 第六圈表示 GC-skew, $(G-C)/(G+C) > 0$, 用黄色表示; $(G-C)/(G+C) < 0$, 用蓝色表示。

Fig. 9 Circular genome map of strain ZQ2205

From outside to inside, the first circle represents the length scale. Circles two and three represents the distribution of genes on the genome, and different colors represent different COG annotations of the genes. The fourth circle represent non-coding RNA. The fifth circle is the GC content. The sixth circles is GC skew, when $(G-C)/(G+C) > 0$ is indicated by yellow and $(G-C)/(G+C) < 0$ is indicated by blue.

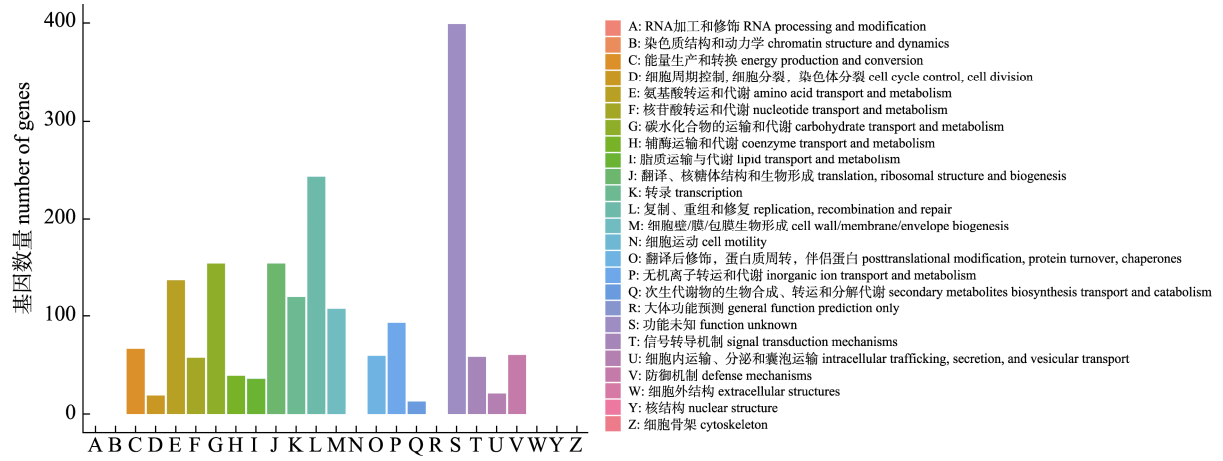


图 10 菌株 ZQ2205 的 COG 功能分类

Fig. 10 Gene distribution based on COG function classification of strain ZQ2205

菌相比, 核糖肉汤项目结果不一致, 呈现为阴性。本研究与 Liu 等^[28]在黄颡鱼中分离的海豚链球菌

的核糖肉汤结果一致, 而与 Guo^[6]、刘佳^[27]、Xu 等^[22]的实验结果存在差异。生理生化鉴定中核糖

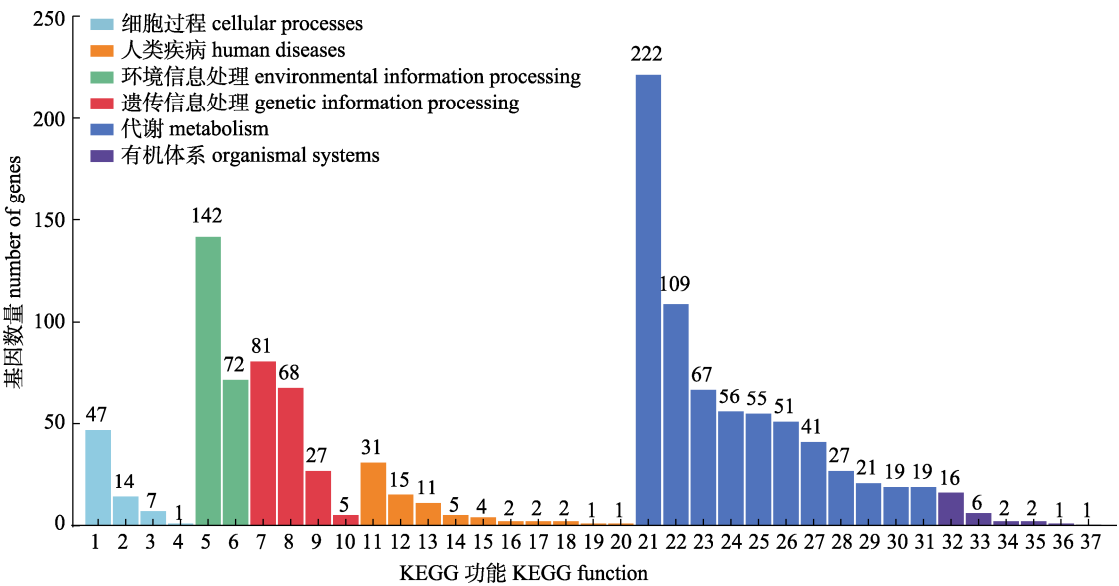


图 11 菌株 ZQ2205 的 KEGG 功能分类

1. 细胞群落-原核生物; 2. 细胞的生长和死亡; 3. 运输和分解代谢; 4. 细胞运动; 5. 膜转运; 6. 信号转导; 7. 翻译; 8. 复制与修复; 9. 折叠、分选和降解; 10. 转录; 11. 耐药性: 抗菌药物; 12. 感染性疾病: 细菌; 13. 癌: 概述; 14. 耐药性: 抗肿瘤; 15. 内分泌及代谢性疾病; 16. 神经退行性疾病; 17. 免疫性疾病; 18. 心血管疾病; 19. 传染病: 病毒性; 20. 传染病: 寄生虫病; 21. 碳水化合物代谢; 22. 氨基酸代谢; 23. 能量代谢; 24. 辅因子和维生素的代谢; 25. 核苷酸代谢; 26. 脂质代谢; 27. 糖的生物合成和代谢; 28. 异生素的生物降解和代谢; 29. 其他次生代谢产物的生物合成; 30. 萜类和聚酮类化合物的代谢; 31. 其他氨基酸的代谢; 32. 内分泌系统; 33. 衰老; 34. 神经系统; 35. 环境适应; 36. 免疫系统; 37. 消化系统。

Fig. 11 Gene distribution based on KEGG function classification of strain ZQ2205

1. Cellular community-prokaryotes; 2. Cell growth and death; 3. Transport and catabolism; 4. Cell motility; 5. Membrane transport; 6. Signal transduction; 7. Translation; 8. Replication and repair; 9. Folding, sorting and degradation; 10. Transcription; 11. Drug resistance: antimicrobial; 12. Infectious disease: bacteria; 13. Cancer: overview; 14. Drug resistance: antineoplastic; 15. Endocrine and metabolic disease; 16. Neurodegenerative disease; 17. Immune disease; 18. Cardiovascular disease; 19. Infectious disease: viral; 20. Infectious disease: parasitic; 21. Carbohydrate metabolism; 22. Amino acid metabolism; 23. Energy metabolism; 24. Metabolism of cofactors and vitamins; 25. Nucleotide metabolism; 26. Lipid metabolism; 27. Glycan biosynthesis and metabolism; 28. Xenobiotics biodegradation and metabolism; 29. Biosynthesis of other secondary metabolites; 30. Metabolism of terpenoids and polyketides; 31. Metabolism of other amino acids; 32. Endocrine system; 33. Aging; 34. Nervous system; 35. Environmental adaptation; 36. Immune system; 37. Digestive system.

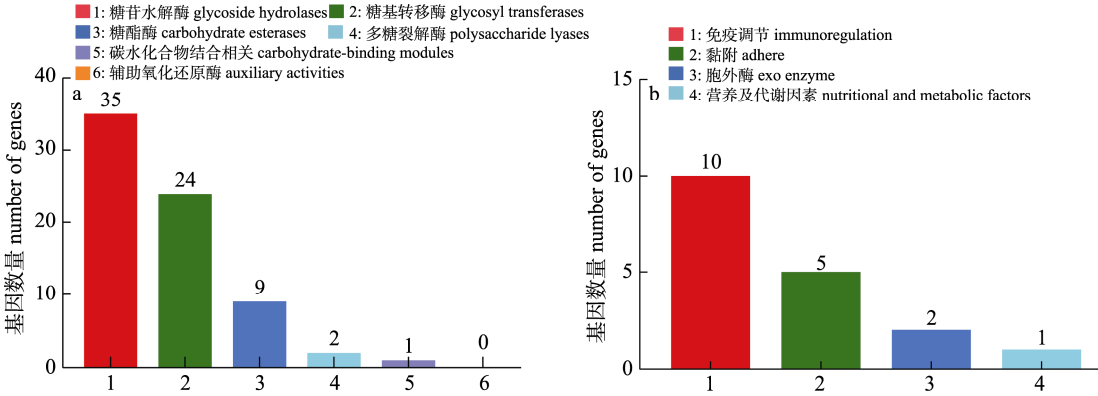


图 12 基因组组分分析

a. CAZy 功能分类图; b. 毒力因子归类统计.

Fig. 12 Genomic components analysis

a. CAZy function classification diagram; b. Statistics of virulence factor results.

肉汤项目的差异可能指示了不同地区来源的菌株, 具有不同的糖利用能力。病原菌通过分泌系统将蛋白质或毒素转运到细胞外, 这是其致病过程中的关键步骤^[29]。胞外分泌蛋白包含许多种酶类物

表 3 毒力因子结果统计
Tab. 3 Statistics of virulence factor results

类别 category	毒力因子 virulence factor	相关基因 related gene
免疫调节 immune modulation	葡萄糖-1-磷酸胸苷酰转移酶 glucose-1-phosphate thymidyltransferase	<i>wbtL</i>
	酪氨酸蛋白磷酸酶 CpsB tyrosine-protein phosphatase CpsB	<i>GBS_RS06605</i>
	荚膜多糖生物合成蛋白 Cps4B capsular polysaccharide biosynthesis protein Cps4B	<i>cps4B</i>
	酪氨酸蛋白激酶 tyrosine-protein kinase	<i>GBS_RS06595</i>
	半乳糖基转移酶 galactosyl transferase	<i>wbtB</i>
	Cps4E	<i>cps4E</i>
	UDP-葡萄糖 6-脱氢酶 UDP-glucose 6-dehydrogenase	<i>ugd</i>
	UTP-葡萄糖-1-磷酸核苷酸基转移酶 HasC	<i>hasC</i>
	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase HasC	
	UDP-葡萄糖 6-脱氢酶 Hasb UDP-glucose 6-dehydrogenase HasB	<i>hasB</i>
黏附 adherence	透明质酸合成酶 Has A hyaluronan synthase HasA	<i>hasA</i>
	层粘连蛋白结合表面蛋白 laminin-binding surface protein	<i>lmb</i>
	纤维连接蛋白 FBP54 fibronectin-binding protein Fbp54	<i>fbp54</i>
	纤连蛋白结合蛋白样蛋白 A Fibronectin-binding protein-like protein A	<i>pavA</i>
	延伸因子 EF-Tu elongation factor Tu	<i>tufA</i>
胞外酶 exo enzyme	伴侣蛋白 GroEL chaperonin GroEL	<i>groEL</i>
	cAMP 因子 CAMP factor	<i>cfa/cfb</i>
	脱氧核糖核酸酶, 噬菌体相关 deoxyribonuclease, phage associated	<i>mf2</i>
营养及代谢因素 nutritional/metabolic factor	锰 ABC 转运蛋白, 锰结合黏附蛋白 manganese ABC transporter, manganese-binding adhesion liprotein	<i>psaA</i>

质, 如脂肪酶、淀粉酶和蛋白酶等^[30]。本研究对胞外酶活性的研究揭示了 ZQ2205 菌株具有脂肪酶、淀粉酶及蛋白酶活性, 缺乏纤维素酶活性。张旭丽^[30]研究发现海豚链球菌胞外产物具有蛋白酶、淀粉酶、卵磷脂酶和脂肪酶活性, 与本研究一致, 然而, 陈德芳等^[31]的研究发现, 斑点叉尾鲷源海豚链球菌的胞外产物具有蛋白酶和 DNA 酶活性, 但不具备淀粉酶和脂肪酶活性, 这表明不同宿主来源的海豚链球菌在胞外产物酶活性方面存在差异。多项研究证明病原菌的胞外产物中具有多种酶活性, 其中蛋白酶的活性对病原菌的致病性具有重要作用, 其可通过分解宿主蛋白, 直接导致组织损伤, 从而增强菌株的毒力^[32-35]。

细菌生长曲线是描述细菌在特定条件下生长变化规律的曲线, 能在一定程度上反映细菌对环境的适应性^[36]。本研究发现 ZQ2205 的最适 pH 为 7~9, 在盐度为 0~20 以内生长速率相近。而 Xu 等^[22]研究发现分离自湖北省宜昌市的黄颡鱼源海豚链球菌 2022SI08, 其生长最适 pH 为 7, 最适盐度为 10, 与之相比 ZQ2205 对碱性和盐度具有

更高的适应性, 说明不同地区的海豚链球菌对环境适应性有所差异, 这一差异可能解释了海豚链球菌为何能够广泛感染淡水和海水鱼类, 并进一步凸显了其较强的环境适应能力。

3.2 菌株 ZQ2205 致病性

鱼类感染模型被广泛用于水产病原菌致病性的评估^[37-39]。当半数致死量(LD50)值在 $1.7\times10^4\sim1.0\times10^6$ CFU/g 范围内时, 病原菌可被确认为高毒力^[40]。本研究通过将 ZQ2205 注射感染黄颡鱼, 发现 ZQ2205 菌株对黄颡鱼具有极高的致死率, 即使在极低剂量(0.5 CFU/g)下也能引发全部受试鱼的死亡, 表明其为一株高毒力菌株。Xu 等^[22]研究发现高毒力海豚链球菌 2022SI08 感染黄颡鱼后的 LD₅₀ 为 9.53×10^5 CFU/g。杨移斌等^[5]发现高毒力海豚链球菌 si222 对黄颡鱼的 LD50 为 2.63×10^4 CFU/g。与之相比, 本研究分离的黄颡鱼源海豚链球菌 ZQ2205 菌株的毒力更强, 原因可能在于本研究使用的攻毒模型为幼鱼模型, 免疫力较弱导致, 但这些研究均表明海豚链球菌对黄颡鱼具有高致病性。根据以往报道, 链球菌引起的疾病

可导致败血症、脑膜炎、全眼炎、肾脏出血、脾脏巨噬细胞多灶浸润、鳃肉芽肿性炎症和肝脏肝坏死^[6]。本研究使用 ZQ2205 对黄颡鱼进行人工感染后,多为急性发病死亡,部分鱼感染后在口腔、下颌及鳍条基部区域发生出血,同时伴有脾脏肿大和出血症状,组织病理结果显示肝脏、脾脏、肾脏、脑部和鳃丝均出现明显炎症反应,与链球菌感染的典型临床症状和病理变化一致^[6]。进一步研究感染后各组织的菌载量,结果表明在所有受感染器官中,脾脏和肾脏成为海豚链球菌最易定植的组织。在关于鲟感染海豚链球菌后的组织病理学研究中,同样也发现脾脏和肾脏在感染进程中易受损伤^[41]。这可能由于海豚链球菌在突破宿主的免疫防御体系后,优先选择在脾脏和肾脏中迅速增殖有关,但具体的作用机制仍需进一步探究。以上结果表明海豚链球菌 ZQ2205 具有高度致病性与该菌株的特性相符合。

3.3 海豚链球菌 ZQ2205 的全基因组序列分析

全基因组测序已被广泛用于可视化细菌病原体的高分辨率特征^[42]。近年来,许多致病性海豚链球菌的基因组信息已被公布,以证实其基因组多样性^[22,27,43-44]。本研究通过全基因组测序,发现 ZQ2205 基因组总长度为 2128105 bp,包含 2035 个 CDS、18 个 rRNA 基因及 68 个 tRNA 基因,与目前许多 NCBI 已收录的其他海豚链球菌相近,GC 含量为 36.83%,符合链球菌共有的低 GC 含量特征^[27,43]。但 Xu 等^[22]研究发现海豚链球菌 2022SI08 的全基因组大小为 1776777 bp,平均 GC 含量为 37.1%,包含 1909 个 CDS、3 个 rRNAs 和 35 个 tRNAs。此外,Vilas-Boas 等^[44]发现从巴西患病罗非鱼中分离到的海豚链球菌 UEL-Si 1 全基因组大小为 2395193 bp,GC 含量为 36.3%,包含 2426 个 CDS。这些结果表明,菌株 ZQ2205 的基因组特征与部分其他研究者分离的菌株在基因组全长、非编码 RNA 数量及 GC 含量等方面有所差异,这种现象可能是微生物所面临的环境和营养胁迫的差异导致的^[45]。

细菌的致病性与多个毒力基因的存在密切相关,这些毒力基因编码毒力因子,对病原体的侵袭和存活起着重要作用^[46]。据报道,海豚链球菌

对多种毒力决定因子呈阳性反应,包括酶磷酸葡萄糖糖化酶、荚膜多糖、多糖去乙酰化酶和溶细胞素链溶酶 S,这些决定因子在克服宿主免疫系统、避免吞噬摄取、促进细胞黏附和侵袭等方面发挥着重要作用,并诱导细菌感染后的细胞死亡^[47]。在化脓性链球菌中,毒力基因 *Fbp54* 普遍表达,该基因编码的纤维连接蛋白可作为细菌细胞和宿主细胞之间的桥接分子,促进细菌定植^[48]; *tufA* 基因编码的 EF-Tu 在多种致病微生物中可作为纤维连接蛋白/层粘连蛋白结合蛋白,与宿主细胞相黏附^[49],此外,铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的 EF-Tu 在体外和体内小鼠肺炎模型中能够促进中性粒细胞凋亡^[50],有学者认为,来自肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)的 EF-Tu 可能具有类似的作用,能够使宿主中性粒细胞功能降低^[51]; Zhu 等^[52]的研究发现在阪崎克罗诺杆菌(*Cronobacter sakazakii*)中,毒力基因 *GroEL* 编码的伴侣蛋白 GroEL 能够增强细菌对干燥和高温环境的适应能力,并能够促进细菌在短时间内黏附,产生炎症。荚膜多糖可借助理作用使得海豚链球菌防止被吞噬,具有调节和抑制吞噬细胞的吞噬,阻止宿主补体因子 C3a 的沉积和增强溶血素 S 的生成等功能^[53]。在本研究中通过 VFDB 预测揭示了 ZQ2205 菌株携带的 18 种潜在毒力因子,主要涉及黏附、免疫调节、营养代谢及胞外酶功能,该菌基因组包含毒力因子如 *Fbp54*、*TufA*、*GroEL* 及与荚膜多糖合成相关的基因,为深入理解其致病机制提供了重要参考。本研究中菌株 ZQ2205 高毒力和高适应性可能是多个毒力基因共同作用的结果,这些基因可能在定植、免疫逃逸及组织损伤中发挥关键作用,然而不同毒力基因对毒力的作用程度以及毒力基因的致病机制仍需进一步探究。

3.4 海豚链球菌 ZQ2205 的耐药性分析

海豚链球菌目前主要通过抗菌药物进行防治^[54],但抗菌药物的过度使用导致细菌耐药性问题愈发严峻。其中抗生素抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)的存在是细菌出现耐药性的重要原因^[55]。抗生素耐药相关基因可通过质粒结合、噬菌体转导、细胞外 DNA 转化等途径在菌株间水

平转移^[56]。罗福广等^[57]对海豚链球菌展开的耐药性调查表明海豚链球菌对磺胺嘧啶、新霉素的耐药率极高。白明焕^[58]对四川鲟源海豚链球菌的耐药性调查也表明四川鲟源海豚链球菌对多种抗菌药物的耐药率较高。本研究药物敏感性实验结果发现菌株 ZQ2205 对多种抗生素表现出敏感性, 这表明该菌株在理论上可以通过这些药物进行治疗。然而, ZQ2205 同时也对某些药物表现出中度敏感(复方新诺明等)和耐药性(恩诺沙星和链霉素), 这可能限制了这些药物在临床治疗中的有效性。从抗生素抗性基因鉴定的角度来看, 菌株 ZQ2205 携带了 39 个抗生素抗性相关基因, 这些基因的存在可能是该菌株对某些抗生素表现出中度敏感或耐药性的原因, 如喹诺酮类和类磺胺类等。然而也发现了菌株具有一些抗生素抗性基因, 但无产生耐药性, 如 ZQ2205 具有喹诺酮类药物的耐药基因, 但仍对喹诺酮类药物左氧氟沙星敏感。赵晓伟等^[59]的研究也发现大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)源恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) D2 存在多个喹诺酮类和氨基糖苷类耐药基因, 但并未对多种喹诺酮类和氨基糖苷类药物产生耐药性。这可能跟抗生素抗性基因在扩散传播的过程中, 抗性基因发生突变造成细菌耐药表型缺失有关^[60]。此外, 抗生素抗性基因在菌株内低表达, 也可能是菌株 ZQ2205 对多种抗生素表现出敏感性的重要因素。菌株 ZQ2205 具有多种抗生素类别抗性相关基因, 因此实际治疗中需要更加谨慎地选择抗生素, 科学用药, 以免诱导耐药性的产生。

综上所述, 本课题组分离鉴定出一株对黄颡鱼具有高致病性的海豚链球菌 ZQ2205。通过深入研究, 不仅阐明了 ZQ2205 菌株的生物学特性和致病性, 还完成了其全基因组信息的解析, 从而揭示了该菌株的强毒力、广泛的组织侵袭能力以及对环境适应性特征。研究结果将有助于对海豚链球菌的致病机制的理解, 为后续进一步探讨毒力因子和耐药基因的具体作用机制、探究不同环境因子对海豚链球菌感染的影响, 以及全面揭示其致病过程和制定有效防控策略提供数据支持和理论依据。

参考文献:

- [1] Huang Y H, Wen Y H, Cao J M, et al. Effects of replacing fish meal with maggot meal on meat quality of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(2): 392-401. [黄燕华, 文远红, 曹俊明, 等. 蝇蛆粉替代鱼粉对黄颡鱼肌肉品质的影响[J]. 中国水产科学, 2013, 20(2): 392-401.]
- [2] Administrative Department for Fisheries the Ministry for Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook 2024[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2024: 25. [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2024 年中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2024: 25.]
- [3] Zeng J. Immunoprophylaxis technology of main bacterial diseases of yellow-head catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2021. [曾佳. 黄颡鱼主要细菌性疾病免疫预防技术的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2021.]
- [4] Pier G B, Madin S H. *Streptococcus iniae* sp. nov., a beta-hemolytic *Streptococcus* isolated from an Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1976, 26(4): 545-553.
- [5] Yang Y B, Xu N, Yang Q H, et al. Isolation, identification and antibiotic sensitivity of *Streptococcus iniae* from *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2017, 29(6): 903-909. [杨移斌, 胥宁, 杨秋红, 等. 黄颡鱼源海豚链球菌分离、鉴定及药敏特性[J]. 浙江农业学报, 2017, 29(6): 903-909.]
- [6] Guo S, Mo Z Q, Wang Z, et al. Isolation and pathogenicity of *Streptococcus iniae* in offshore cage-cultured *Trachinotus ovatus* in China[J]. Aquaculture, 2018, 492: 247-252.
- [7] Chen D F, Wang K Y, Geng Y, et al. Pathological changes in cultured channel catfish *Ictalurus punctatus* spontaneously infected with *Streptococcus iniae*[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2011, 95(3): 203-208.
- [8] Yang L D, Jia X L, Huang Z C, et al. Isolation, identification and virulence gene detection of *Streptococcus iniae* in silver scat (*Selenotoca multifasciata*)[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2023, 38(2): 233-241. [杨林狄, 贾新蕾, 黄增朝, 等. 银鼓鱼海豚链球菌的分离、鉴定及毒力基因检测[J]. 大连海洋大学学报, 2023, 38(2): 233-241.]
- [9] Al-Harbi A H. Whole-genome sequence of *Streptococcus iniae* strain AH1, isolated from hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*)[J]. Microbiology Resource Announcements, 2022, 11(6): e0008722.
- [10] Lahav D, Eyngor M, Hurvitz A, et al. *Streptococcus iniae*

- type II infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2004, 62(1-2): 177-180.
- [11] Baeck G W, Kim J H, Gomez D K, et al. Isolation and characterization of *Streptococcus* sp. from diseased flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju Island[J]. Journal of Veterinary Science, 2006, 7(1): 53-58.
- [12] Pirollo T, Perolo A, Mantegari S, et al. Mortality in farmed European eel (*Anguilla anguilla*) in Italy due to *Streptococcus iniae*[J]. Acta Veterinaria Scandinavica, 2023, 65(1): Article No.5.
- [13] Evans J J, Shoemaker C A, Klesius P H. Distribution of *Streptococcus iniae* in hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) following nare inoculation[J]. Aquaculture, 2001, 194(3-4): 233-243.
- [14] Xu W, Shi H, Wang W, et al. Isolation and identification of *Streptococcus iniae* in *Larimichthys polyactis*[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2022, 44(7): 725-730. [徐伟, 施慧, 汪玮, 等. 小黄鱼海豚链球菌的分离鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2022, 44(7): 725-730.]
- [15] Wang H, Peng S, Chen D F. Research progress on the virulence factors of *Streptococcus hemolysin S*[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2017, 33(3): 287-292. [王虹, 彭爽, 陈德芳. 链球菌毒力因子溶血素 S 的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2017, 33(3): 287-292.]
- [16] Locke J B, Aziz R K, Vicknair M R, et al. *Streptococcus iniae* M-like protein contributes to virulence in fish and is a target for live attenuated vaccine development[J]. PLoS One, 2008, 3(7): e2824.
- [17] Locke J B, Colvin K M, Datta A K, et al. *Streptococcus iniae* capsule impairs phagocytic clearance and contributes to virulence in fish[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(4): 1279-1287.
- [18] Shang Z, Tang L, Wang L H, et al. Isolation and identification of *Streptococcus iniae* from *Selenotoca multifasciata* and immune effect of inactivated vaccine[J]. Periodical of Ocean University of China, 2024, 54(4): 38-50. [尚忠, 唐磊, 王连慧, 等. 多纹钱蝶鱼源海豚链球菌的分离鉴定及灭活疫苗的免疫效果[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2024, 54(4): 38-50.]
- [19] Locke J B, Vicknair M R, Ostland V E, et al. Evaluation of *Streptococcus iniae* killed bacterin and live attenuated vaccines in hybrid striped bass through injection and bath immersion[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2010, 89(2): 117-123.
- [20] Jia X L. Evaluation of the immune effects of *Streptococcus iniae* EsxA subunit vaccine and DNA vaccine in *Trachinotus ovatus*[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2023. [贾新蕾. 海豚链球菌 EsxA 亚单位疫苗和核酸疫苗对卵形鲳鲹的免疫效果评价[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2023.]
- [21] Sun Y. Construction and analysis of an experimental *Streptococcus iniae* DNA vaccine[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010. [孙云. 海豚链球菌 DNA 疫苗的构建及其免疫效应分析[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2010.]
- [22] Xu H S, Zhu N B, Chen Y L, et al. Pathogenicity of *Streptococcus iniae* causing mass mortalities of yellow catfish (*Tachysurus fulvidraco*) and its induced host immune response[J]. Frontiers in Microbiology, 2024, 15: 1374688.
- [23] Dong X Z, Cai M Y. Handbook of common bacterial systematic identification[M]. Beijing: Science Press, 2001: 261. [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: 261.]
- [24] Jing R X, Zheng Y M, Zhang N, et al. Detection of virulence factors and quorum sensing signal molecules of aquatic bacteria from Yellow River carp[J]. Microbiology China, 2021, 48(6): 2049-2060. [景如贤, 郑亚萌, 张宁, 等. 黄河鲤鱼水产细菌的分离及其毒力因子和群体感应信号分子的检测[J]. 微生物学通报, 2021, 48(6): 2049-2060.]
- [25] Li M. Screening and heterologous expression of *Stenotrophomonas maltophilia* lipase, and its application in enzymatic preparation of *l*-menthol[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013. [李牧. 嗜麦芽糖寡养单胞菌脂肪酶的筛选、异源表达及在催化制备 *l*-薄荷醇中的应用[D]. 杭州: 浙江大学, 2013.]
- [26] Walker B J, Abeel T, Shea T, et al. Pilon: An integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e112963.
- [27] Liu J. Isolation, identification, and whole genome sequencing of *Streptococcus iniae* from yellowfin seabream (*Sparus latus*)[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2022. [刘佳. 黄鳍鲷源海豚链球菌的分离、鉴定与全基因组测序[D]. 武汉: 华中农业大学, 2022.]
- [28] Liu J X, Yang F, Peng S, et al. Molecular characterization and pathogenicity of *Streptococcus iniae* in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. Aquaculture Research, 2020, 51(12): 5259-5264.
- [29] Jia Y Y, Li Q, Wang X L, et al. Isolation, identification and nuclease activity of extracellular secretory protein of *Klebsiella pneumoniae* in mink[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2021, 50(3): 142-147. [贾艳艳, 李琦, 王晓利, 等. 貂源肺炎克雷伯菌的分离鉴定及胞外分泌蛋白的核酸酶活性分析[J]. 河南农业科学, 2021, 50(3): 142-147.]
- [30] Zhang X L. Vaccine preparation and characterization of

- extracellular products from *S. iniae* isolated from tilapia[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2010. [张旭丽. 罗非鱼海豚链球菌疫苗研制及胞外产物特性分析[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2010.]
- [31] Chen D F, Wang K Y, Wang J, et al. Pathogenicity on channel catfish *Ictalurus punctatus* by extracellular products of *Streptococcus iniae*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2013, 44(2): 326-331. [陈德芳, 汪开毓, 王均, 等. 海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)胞外产物对斑点叉尾(*Ictalurus punctatus*)的致病性[J]. 海洋与湖沼, 2013, 44(2): 326-331.]
- [32] Li Y N. Analysis of biological characteristics of extracellular products of *Vibrio mimicus* HSY-K0531 and evaluation of immune protection[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2021. [李亚楠. 拟态弧菌 HSY-K0531 株胞外产物生物学特性分析及免疫保护评价[D]. 长春: 吉林农业大学, 2021.]
- [33] Wu Q X, Liu X W. Characterization of extracellular production of *Shewanella smarflavi*[J]. Journal of Aquaculture, 2020, 41(5): 33-37. [吴秋仙, 刘学伟. 黄海希瓦氏菌胞外产物特性研究[J]. 水产养殖, 2020, 41(5): 33-37.]
- [34] Wang H B. Biological characteristics main analysis and immunoprotection evaluation of extracellular products of *Photobacterium damsela*[D]. Qinhuangdao: Hebei Normal University of Science & Technology, 2019. [王洪彬. 美人鱼发光杆菌胞外产物的主要生物学特性分析及免疫保护评价[D]. 秦皇岛: 河北科技师范学院, 2019.]
- [35] Zhang H Y, Kang Y H, Sun W W, et al. Bioactivity analysis of extracellular products of *Aeromonas veronii* strain isolated from *Channa Argus*[J]. Chinese Journal of Veterinary Drugs, 2016, 50(10): 6-9. [张海月, 康元环, 孙武文, 等. 乌鳢源维氏气单胞菌胞外产物的生物学活性分析[J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(10): 6-9.]
- [36] Sun H F. Molecular mechanism of environmental stress on the growth of drug resistant *Escherichia coli*[D]. Guiyang: Guizhou University, 2021. [孙海峰. 环境胁迫对耐药大肠杆菌生长影响的分子机制研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2021.]
- [37] Hao C S, Liu J, Wang Y, et al. Analysis of whole genome and pathogenicity of a strain of multi-drug resistant *A. veronii* isolated from Chinese giant salamander[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2023, 43(8): 1677-1683. [郝成森, 刘佳, 王艳, 等. 1 株大鲵源多重耐药维氏气单胞菌全基因组解析及其致病性[J]. 中国兽医学报, 2023, 43(8): 1677-1683.]
- [38] Wang Q H, Lin N, Yuan L H, et al. Isolation, identification, major virulence genes, and pathogenicity of *Yersinia ruckeri* from *Micropterus salmoides*[J]. Journal of Fisheries of China, 2022, 46(5): 825-835. [王巧煌, 林楠, 元丽花, 等. 大口黑鲈鲁氏耶尔森氏菌的分离鉴定、主要毒力基因及致病性研究[J]. 水产学报, 2022, 46(5): 825-835.]
- [39] Zhang M C, Deng Y T, Zhao F, et al. Pathogenicity and whole genome analysis of a *Nocardia seriolae* strain isolated from snakehead[J]. Microbiology China, 2022, 49(6): 2193-2211. [张美超, 邓玉婷, 赵飞, 等. 一株鳢源鳢诺卡氏菌致病性与全基因组分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(6): 2193-2211.]
- [40] Santos Y, Toranzo A E, Barja J L, et al. Virulence properties and enterotoxin production of *Aeromonas* strains isolated from fish[J]. Infection and Immunity, 1988, 56(12): 3285-3293.
- [41] Wang J B, Xu L P, Liu J N, et al. Histopathological study of sturgeon infected with *Streptococcus iniae*[J]. China Fisheries, 2021, 552(11): 94-96. [王静波, 徐立蒲, 刘建男, 等. 鲟感染海豚链球菌组织病理学研究[J]. 中国水产, 2021, 552(11): 94-96.]
- [42] Cao H P, Gu Y, Diao J, et al. Phenotypic and genomic characterization of pathogenic *Providencia rettgeri* from kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2022, 69(5): e2967-e2977.
- [43] Zhang B C, Zhang J, Sun L. *Streptococcus iniae* SF1: Complete genome sequence, proteomic profile, and immunoprotective antigens[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e91324.
- [44] Vilas-Boas L A, Headley S A, Gonçalves K B, et al. Complete genome sequence of *Streptococcus iniae* UEL-Si1, isolated in diseased Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from Northern Paraná, Southern Brazil[J]. Genome Announcements, 2017, 5(2): e01458-16.
- [45] Pang R, Xie T F, Wu Q P, et al. Comparative genomic analysis reveals the potential risk of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from ready-to-eat foods in China[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: Article No.186.
- [46] Senderovich Y, Ken-Dror S, Vainblat I, et al. A molecular study on the prevalence and virulence potential of *Aeromonas* spp. recovered from patients suffering from diarrhea in Israel[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e30070.
- [47] Deng M L, Yu Z H, Geng Y, et al. Outbreaks of Streptococcosis associated with *Streptococcus iniae* in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) in China[J]. Aquaculture Research, 2017, 48(3): 909-919.
- [48] Walker M J, Barnett T C, McArthur J D, et al. Disease manifestations and pathogenic mechanisms of Group A *Streptococcus*[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2014, 27(2): 264-301.
- [49] Fan W Y, Gu L Y, Gao Z Y, et al. Pathogenicity and

- genomic characteristics of a *Streptococcus pluranimalium* strain isolated from bovine[J]. Microbiology China, 2024, 51(11): 4644-4666. [范文雨, 顾兰英, 高之煜, 等. 一株牛源多动物链球菌致病性及基因组特性分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(11): 4644-4666.]
- [50] Dickinson R S, Murphy F, Doherty C, et al. *Pseudomonas* expression of an oxygen sensing prolyl hydroxylase homologue regulates neutrophil host responses in vitro and in vivo[J]. Wellcome Open Research, 2017, 2: 104.
- [51] Wall E C, Brownridge P, Laing G, et al. CSF levels of elongation factor tu is associated with increased mortality in Malawian adults with *Streptococcus pneumoniae* meningitis[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2020, 10: 603623.
- [52] Zhu D D, Fan Y F, Wang X Y, et al. Characterization of molecular chaperone GroEL as a potential virulence factor in *Cronobacter sakazakii*[J]. Foods, 2023, 12(18): 3404.
- [53] Miller J D, Neely M N. Large-scale screen highlights the importance of capsule for virulence in the zoonotic pathogen *Streptococcus iniae*[J]. Infection and Immunity, 2005, 73(2): 921-934.
- [54] Wang Y F. Epidemiological study and environmental driving factors of Streptococcosis in deep-water cage culture of *Trachinotus ovatus* in Beibu Gulf Sea[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2022. [王一帆. 北部湾海域深水网箱养殖卵形鲳鲹链球菌病的流行病学研究及环境驱动因素分析[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2022.]
- [55] Jian Z H, Zeng L, Xu T J, et al. Antibiotic resistance genes in bacteria: occurrence, spread, and control[J]. Journal of Basic Microbiology, 2021, 61(12): 1049-1070.
- [56] Li S R, Wang X N, Lu Y L, et al. Co-infections of *Klebsiella pneumoniae* and *Elizabethkingia miricola* in black-spotted frogs (*Pelophylax nigromaculatus*)[J]. Microbial Pathogenesis, 2023, 180: 106150.
- [57] Luo F G, Huang J, Wang Z Q, et al. Drug resistance and rational drug use of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus iniae* from fish[J]. Animal Breeding and Feed, 2024, 23(4): 1-12. [罗福广, 黄杰, 王志强, 等. 鱼源无乳链球菌和海豚链球菌耐药性及合理用药研究[J]. 养殖与饲料, 2024, 23(4): 1-12.]
- [58] Bai M H. Investigation on molecular epidemiology and antibiotic resistance of *Streptococcus iniae* from sturgeon in Sichuan Province[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2020. [白明焕. 四川鲟源海豚链球菌的分子流行病学与耐药性调查[D]. 雅安: 四川农业大学, 2020.]
- [59] Zhao X W, Xu H Z, Huang H, et al. Isolation, identification and whole genome analysis of *Pseudomonas putida* strain isolated from diseased turbot *Scophthalmus maximus*[J/OL]. Fisheries Science, 2024: 1-10. (2024-08-14) [2024-11-12]. <https://doi.org/10.16378/j.cnki.1003-1111.24010>. [赵晓伟, 许瀚之, 黄华, 等. 大菱鲆源恶臭假单胞菌的分离鉴定及全基因组分析[J/OL]. 水产科学, 2024: 1-10. (2024-08-14) [2024-11-12]. <https://doi.org/10.16378/j.cnki.1003-1111.24010>.]
- [60] Hong B, Ba Y B, Niu L, et al. Analysis on mismatch between antimicrobial resistance phenotype and genotype of *Vibrio parahaemolyticus*[C]// Chinese Institute of Food Science and Technology, Institute of Food Technologists. Food Summit in China 2017 14th Annual Meeting of CIFST. Wuxi: Jiangnan University, 2017: 29-30. [洪斌, 巴永兵, 牛丽, 等. 副溶血性弧菌耐药表型和基因型不对应性分析[C]//中国食品科学技术学会, 美国食品科技学会. 2017 中国食品科学技术学会第十四届年会暨第九届中美食品业高层论坛论文摘要集. 无锡: 江南大学, 2017: 29-30.]

Biological characteristics, pathogenicity, and whole genome bioinformatics analysis of *Streptococcus iniae* strain ZQ2205 isolated from *Tachysurus fulvidraco*

HE Jiancheng, MA Zhuang, WU Wenhao, GUO Zihong, CHEN Mingda, ZHANG Jiahao, SU Youlu, JIANG Biao

Guangdong Water Environment and Aquatic Products Safety Engineering Technology Research Center, Guangzhou Key Laboratory of Aquatic Diseases and Waterfowl Breeding, College of Animal Sciences and Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China

Abstract: *Streptococcus iniae* has become the most serious bacterial pathogen in the aquaculture of *Tachysurus fulvidraco* in China. In this study, we selected *S. iniae* strain ZQ2205 isolated from *T. fulvidraco* to elucidate the biological characteristics and whole-genome information of *S. iniae*, thereby providing theoretical support for disease diagnosis and prevention. The growth characteristics, pathogenicity, whole-genome sequencing, and gene composition were analyzed. The results indicated that strain ZQ2205 is a gram-positive bacterium, arranged in single chains, exhibiting β -hemolytic activity. The strain demonstrated lipase, amylase, and protease activities but lacked cellulase activity. It demonstrated a wide range of tolerance to pH and salinity, being able to grow in brain heart infusion (BHI) broth at pH values ranging from 7 to 9 and salinity from 0 to 40. Strain ZQ2205 showed optimal growth at a pH of 9 and salinity between 0 and 20. The antibiotic sensitivity test showed that ZQ2205 is resistant to enrofloxacin and streptomycin, while its response to ofloxacin, tetracycline, chloramphenicol and bactrim is intermediate. Infection experiments revealed that the challenge dose as low as 0.5 CFU/g caused 100% mortality in *T. fulvidraco* juveniles, causing significant damage to the liver, spleen, kidneys, gills, and brain tissues, with the highest bacterial loads observed in the spleen and kidneys. Whole-genome sequencing showed that the whole genome size of ZQ2205 was 2128105 bp with a GC content of 36.83%, encoding 2035 genes. Eighteen virulence factor genes were identified, primarily involved in immune modulation, adherence, exo enzyme, and nutritional and metabolic factors. Additionally, 21 antibiotic resistance genes and 18 antibiotic target genes were predicted, mainly associated with penicillins, daptomycin, rifamycins, sulfonamides, and quinolones. In summary, these findings demonstrated that *S. iniae* strain ZQ2205 possesses high pathogenicity and multidrug resistance and robust environmental adaptability. The whole genome information revealed characteristics of virulence and antibiotic resistance, which are of significant importance for preventing and controlling this disease.

Key words: *Tachysurus fulvidraco*; *Streptococcus iniae*; biological characteristics; pathogenicity; whole genome

Corresponding author: JIANG Biao. E-mail: jiangbiao@zhku.edu.cn