

引用格式:陈斌.半刺厚唇鱼源达卡气单胞菌的鉴定及其毒力基因与耐药性分析[J].福建农林大学学报(自然科学版),2025,54(4):502-512.

CHEN B. Identification of *Aeromonas dhakensis* isolated from *Acrossocheilus hemispinus* and analysis on its virulence genes and antimicrobial resistance [J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2025,54(4):502-512.

半刺厚唇鱼源达卡气单胞菌的鉴定及其毒力基因与耐药性分析

陈斌

(福建省淡水水产研究所,福建福州 350002)

摘要:【目的】查明半刺厚唇鱼腐皮病的发病原因,为该病的研究和防治提供参考。【方法】对患病鱼进行病原菌的分离、鉴定,开展病原回归感染试验、药敏试验,并对菌株毒力基因和耐药基因进行PCR扩增。【结果】从患病鱼体内分离到一株优势菌,命名为 AhL210623NA,通过菌株形态特征观察、生理生化特性测定及 16S rDNA 和 *gyrB* 测序分析,将该菌鉴定为达卡气单胞菌(*Aeromonas dhakensis*);回归感染试验结果显示,该菌能引起健康半刺厚唇鱼发病,症状与自然发病相似,菌株半致死浓度为 6.19×10^6 CFU \cdot mL⁻¹;毒力基因扩增结果显示,该菌携带 *hlyA*、*aerA*、*alt*、*act*、*ahpA*、*epr*、*Hcp* 7 个毒力基因,不携带 *ast*、*exu*、*lip*、*ascV* 4 个毒力基因;药敏试验结果显示,该菌对 24 种药物中的氨基糖苷类、多粘菌素类、四环素类、喹诺酮类、氯霉素类及 β -内酰胺类的头孢噻肟均高度敏感,对 β -内酰胺类的头孢他啶、大环内酯类的红霉素中度敏感,对 β -内酰胺类的青霉素、氨苄西林、羧苄西林、苯唑西林,大环内酯类的罗红霉素,糖肽类的万古霉素和磺胺类的复方新诺明均耐受;耐药基因扩增结果显示,该菌只携带耐药基因 *sul1*,而不携带耐药基因 *qnrA*、*qnrS*、*tetA*、*tetC*、*ant3*、*strA*、*tem*、*ctxM*。【结论】首次从半刺厚唇鱼体内分离到达卡气单胞菌,该菌毒性相对较强,但对常见抗生素耐药性较弱,可选择的治疗药物较多。

关键词:半刺厚唇鱼;达卡气单胞菌;毒力基因;耐药基因;药物敏感性

中图分类号:Q941

文献标识码:A

文章编号:1671-5470(2025)04-0502-11

DOI:10.13323/j.cnki.j.fafu(nat.sci.).202406036



开放科学(资源服务)
标识码(OSID)

Identification of *Aeromonas dhakensis* isolated from *Acrossocheilus hemispinus* and analysis on its virulence genes and antimicrobial resistance

CHEN Bin

(Freshwater Fisheries Research Institute of Fujian, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract:【Objective】The cause of rot skin disease on *Acrossocheilus hemispinus* was find out, to provide reference for the research and prevention of this disease.【Method】The pathogen of deseased *Acrossocheilus hemispinus* was isolated and identified, and then verified by recurrent infection test. Antimicrobial resistance of the pathogen was analyzed by drug susceptibility test, and its virulence genes and drug resistance genes were identified by PCR.【Result】Bacterial strain AhL210623NA, isolated from individual tissue of *Acrossocheilus hemispinus* with rot skin disease, was identified as *Aeromonas dhakensis* by morphological observation, physiological and biochemical identification, and sequence analysis of 16S rDNA and *gyrB* gene. Recurrent infection experiment showed the strain caused similar symptoms on healthy *Acrossocheilus hemispinus*, which verified the strain as the pathogen of rot skin disease. The lethal dose (LD₅₀) of the strain was 6.19×10^6 CFU \cdot mL⁻¹. And it carried 7 virulence genes of *hlyA*, *aerA*, *alt*, *act*, *ahpA*, *epr* and *Hcp*, but no *ast*, *exu*, *lip* nor *ascV*. Antibiotic sensitivity test showed that AhL210623NA was highly sensitive to aminoglycosides, polymyxins, tetracyclines, quinolones, chloramphenicols and cefotaxime of β -lactam, moderately sensitive to ceftazidime of β -lactams and erythromycin of macrolides, but resistant to penicillin, ampicillin, carboxpicillin and benzoxicillin of β -lactams, roxithromycin of

收稿日期:2024-06-22 修回日期:2024-07-14

基金项目:福建省种业创新和产业化工程项目(2021FJSCZY04);福建省海洋服务与渔业高质量发展专项(FJHY-YYKJ-2022-2-7)。

通信作者:陈斌(1986—),男,农艺师,硕士。研究方向:水产动物病害分子免疫学。Email:1549361186@qq.com。

macrolides, vancomycin of glycopeptides, cotrimoxazole of sulfamylamides. Resistance gene detection showed that the strain only carried *sul1* gene, but not *qnrA*, *qnrS*, *tetA*, *tetC*, *ant3*, *strA*, *tem* and *ctxM* genes. 【Conclusion】*Aeromonas dhakensis* was isolated from *Acrossocheilus hemispinus* for the first time. This bacterium has relatively strong toxicity, but has weak resistance to common antibiotics, indicating there are many treatment drugs available.

Key words: *Acrossocheilus hemispinus*; *Aeromonas dhakensis*; virulence gene; antibiotic resistance gene; antibiotic sensitivity

半刺厚唇鱼 (*Acrossocheilus hemispinus*) 隶属鲤科 (Cyprinidae) 鲃亚科 (Barbinae) 光唇鱼属 (*Acrossocheilus*), 在福建省和湖南省的各江河水系分布较广^[1]。该鱼喜爱水流湍急、石砾底质的山区溪流, 常以石块上的苔藓和藻类、水生昆虫、底栖无脊椎动物为食。幼鱼体表有竖向条纹, 6月龄后条纹逐渐消失, 成鱼体长 10~20 cm; 肉质鲜美, 深受闽、浙地区民众喜爱, 经济价值较高, 是福建省推广养殖的品种之一。目前对半刺厚唇鱼的研究主要集中在人工繁育^[2-3]、养殖模式探索^[4-5]、肌肉营养成分分析^[6]、饲料研发^[7]、病害防治^[8-10]等方面, 且病害方面的研究只有小瓜虫病、嗜酸性卵甲藻病和扁弯口吸虫病的药物筛选和治疗; 关于半刺厚唇鱼感染达卡气单胞菌 (*Aeromonas dhakensis*) 的研究尚无报道。达卡气单胞菌是一种重要的动物和人类病原体, 近年来流行趋势逐渐增强。目前已报道亚达伯拉象龟 (*Aldabrachelys gigantea*)^[11]、罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*)^[12]、越南条纹鲶 (*Pangasius hypophthalmus*)^[13]、湾鳄 (*Crocodylus porosus*)^[14]、非洲蜗牛 (*Lissachatina fulica*)^[15]、海狮 (*Zalophus californianus*)^[16]、乌鳢 (*Channa argus*)^[17]、海豚 (*Delphinidae*)^[18] 等均为达卡气单胞菌的感染宿主; 该菌还可以引起人类严重的败血症, 甚至导致死亡^[17]; 该菌也曾在孟加拉国患腹泻的儿童体内被分离到^[19]; 研究还发现, 达卡气单胞菌可以引起胆道感染, 且恶性肿瘤和肝硬化是达卡气单胞菌败血症常见并发症^[20]。2013—2018年浙江省温州市某教学医院从菌血症患者体内分离出 58 株气单胞菌, 其中, 26 株被鉴定为达卡气单胞菌^[21], 可见, 该菌的致病率之高, 危险性之强。关于达卡气单胞菌不同基因型和血清型的研究相对较少, Lau et al^[22]以管家基因 (*gyrB*、*gro1*、*GLTA*、*metG*、*PPSA* 和 *recA*) 为基础, 利用多位点序列分型将马来西亚 47 株不同来源的达卡气单胞菌分为 36 个序列类型。

2021年福建某养殖厂的半刺厚唇鱼暴发了腐皮病, 严重影响了该鱼的商品价值, 给该厂带来一定的经济损失。本研究对患病半刺厚唇鱼开展病原菌的

分离、鉴定、药敏试验, 以及毒力基因和耐药基因分析, 旨在为该鱼细菌性疾病的研究和防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验鱼 半刺厚唇鱼, 活力较强, 体长 12~14 cm, 体质量 25~30 g, 购自福建省南平市顺昌县兆兴鱼种养殖有限公司。

1.1.2 试剂 营养肉汤、营养琼脂、革兰氏染色液均购自北京陆桥技术有限责任公司; 海洋动物组织 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 药敏纸片购于杭州微生物试剂有限公司。引物合成、基因测序均由北京擎科生物科技有限公司完成。

1.1.3 仪器 正置显微镜 (BX43) 购于日本 Olympus Corporation; 超净工作台 (SW-CJ-2F) 购于苏州安泰空气技术有限公司; 恒温摇床 (TSQ-280) 购于上海精宏实验设备有限公司; PCR 仪 (C1000 TOUCH) 购于伯乐生命医学产品有限公司。

1.2 病原菌的分离

取患病半刺厚唇鱼, 选择体表溃烂部位和内脏器官进行病原菌分离, 接种环蘸取组织, 划线接种于营养琼脂培养基上, 28℃培养 24 h, 重复纯化 2 次后, 接种于营养肉汤培养基上, 28℃、200 r·min⁻¹ 摇床中培养 12 h, 然后采用丙三醇法^[23]将菌种保存于 -80℃ 冰箱。

1.3 回归感染试验

本试验已获得福建省淡水水产研究所实验动物中心动物实验伦理的审批, 获批日期为 2021 年 7 月 1 日, 伦理审批编号为: 闽淡水动 2021-001。

取健康半刺厚唇鱼暂养 7 d。取 -80℃ 保存的菌种, 划线于营养琼脂培养基上, 28℃培养 12 h, 刮取菌苔于无菌生理盐水中, 制成细菌悬液, 并用 10 倍稀释法稀释成 5 个浓度梯度。试验鱼随机分 5 组, 每组 15 尾, 背部肌肉注射 0.2 mL 细菌悬液, 空白对照组注射生理盐水, 每个试验组 3 次重复。试验持续 14 d, 保持水温 25~27℃, 观察发病症状, 记录死亡数, 从濒死半刺厚唇鱼体内再次进行病原菌的分离、鉴定。采用改

良寇氏法^[24]计算菌株对半刺厚唇鱼的半致死浓度(LD₅₀),即 $\lg(LD_{50}) = X_m - i \left[\sum_{j=1}^5 P(j) - 0.5 \right]$, 其中: X_m 为死亡率 100% 试验组的浓度对数值; i 为相邻两组对数剂量之差; $\sum_{j=1}^5 P(j)$ 为各组死亡率之和。

1.4 菌株鉴定

1.4.1 形态观察 复苏菌株,将其接种于营养琼脂培养基上,28 ℃ 培养 12 h,观察菌落形态特征,并制备革兰氏染色涂片,观察菌体形态特征。

1.4.2 生理生化鉴定 复苏菌株,将其接种于营养

琼脂培养基上,28 ℃ 培养 18~24 h,参考鉴定系统说明书进行上样,通过 VITEK 2 COMPACT 全自动微生物鉴定系统对分离菌的生理生化特性进行鉴定。

1.4.3 分子生物学鉴定 复苏菌株,提取其全基因组 DNA,以此为模板,参照文献[25-26]对细菌 16S rDNA 和 *gyrB* 进行 PCR 扩增,引物序列见表 1,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测,观察扩增条带大小,送北京擎科生物科技有限公司测序。在 NCBI 数据库中比对所测序列的同源性,利用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树。

表 1 气单胞菌 16S rDNA 和 *gyrB* 引物序列

Table 1 Primer sequence of 16S rDNA and *gyrB* gene of *Aeromonas*

基因 Gene	序列(5'-3') Sequence	长度/bp Length	退火温度/℃ Annealing temperature	参考文献 Reference
16S rDNA	AGAGTTTGATCTCGCTCAG TACGGCTACCTTGTACGAC	1 465	58	[25]
<i>gyrB</i>	TCCGGCGGTCTGCACGGCGT TTGTCCGGTGTACTCGCTC	1 124	58	[26]

1.5 毒力基因扩增

合成已报道的气单胞菌 11 个毒力基因引物,以分离菌株基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,引物序列见表 2,反应体系和反应条件参考文献[27-33],PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测,阳性产物送北京擎科生物科技有限公司测序。毒力基因分别为:溶

血素基因(*hlyA*)、气溶素基因(*aerA*)、热稳定性肠毒素基因(*ast*)、热不稳定性肠毒素基因(*alt*)、细胞毒性肠毒素基因(*act*)、丝氨酸蛋白酶基因(*ahpA*)、热敏感胞外蛋白酶基因(*epr*)、核酸酶基因(*exu*)、磷脂酶基因(*lip*)、III型分泌系统保守基因(*ascV*)、IV型分泌系统溶血素共调解蛋白基因(*Hcp*)。

表 2 气单胞菌 11 个毒力基因引物序列

Table 2 Primer sequence of 11 virulence genes of *Aeromonas*

基因 Gene	序列(5'-3') Sequence	退火温度/℃ Annealing temperature	长度/bp Length	参考文献 Reference
<i>hlyA</i>	GGCGTGATTTCGACAAGGAGA ACATCCAGATTCGGCACGA	58	1 203	[27]
<i>aerA</i>	CCTATGGCCTGAGCGAGAAG CCAGTTCCAGTCCCACCACT	58	431	[28]
<i>ast</i>	ATCGTCAGCGACAGCTTCTT CTCATCCCTTGGCTTGTGT	58	504	[29]
<i>alt</i>	TGACCCAGTCCCTGGCACGGC GGTGATCGATCACCACCAGC	58	442	[30]
<i>act</i>	GAGAAGGTGACCACCAAGAACA AACTGACATCGGCCTTGAAGTC	58	232	[30]
<i>ahpA</i>	TGCCCATCGCTTCAGTTCA GTGCGGCTGAACATGTAGTCA	58	719	[27]
<i>epr</i>	CTAGGAGCGGGCA ATGACACTCTTGCTGACCACCC	58	432	[31]
<i>exu</i>	GGACATGCACAACCTCTTCC GATTGGTATTGCCTTGCAAG	58	323	[28]
<i>lip</i>	ATCTTCTCCGACTGGTTCGG CCGTGCCAGGACTGGTCTT	63	382	[32]
<i>ascV</i>	GTAAGCAGATGAGTATCGATGG GAGACCCGGGTGACGATAAT	48	331	[33]
<i>Hcp</i>	ATTCCGTCGGCAACATCTTC GGATCAGTTGGGTGAAGTCAGAC	57	390	[33]

1.6 耐药性分析

1.6.1 药物敏感性试验 复苏菌株,将其接种于营养琼脂培养基上,28 ℃培养 12 h,刮取菌苔于无菌生理盐水中,制备浓度为 1.0×10^8 CFU · mL⁻¹ 的细菌悬液,取 100 μL 细菌悬液,均匀涂布于营养琼脂培养基上,贴药敏纸片,28 ℃培养 24 h 后,测量抑菌圈直径。参照杭州微生物试剂有限公司的《药敏试验纸片法的抑菌范围解释标准》将药敏结果判定为高度敏感(S)、中度敏感(I)或耐药(R)。

表3 气单胞菌9个耐药基因引物序列

Table 3 Primer sequence of 9 resistance genes of *Aeromonas*

基因 Gene	序列(5'-3') Sequence	退火温度/℃ Annealing temperature	长度/bp Length	参考文献 Reference
<i>qnrA</i>	ATTTCTCACGCCAGGATTTG GATCGGCAAAGGTCAGGTCA	49.4	519	[34]
<i>qnrS</i>	ACGACATTCGTCAACTGCAA TAAATTGGCACCCCTGTAGGC	51.0	417	[34]
<i>tetA</i>	GTAATTCTGAGCACTGTGCG CTGCCTGGACAACATTGCTT	50.2	956	[34]
<i>tetC</i>	TCTAACAAATGCGCTCATCGT GTTTGAAGGCTCTCAAGGGC	50.5	588	[34]
<i>ant3</i>	GTGGATGGCGGCTGAAGCC ATTGCCCACTCGGCAGCG	58.7	526	[34]
<i>strA</i>	TTGAATCGAACTAATAT CTAGTATGACGTCTGTGCG	40.0	1 640	[34]
<i>sul1</i>	CGGCGTGGGCTACCTGAACG GCCGATCGCGTGAAGTTCCG	59.1	433	[34]
<i>tem</i>	AAAGATGCTGAAGATCA TTTGGTATGGCTTCATTC	45.0	425	[34]
<i>ctxM</i>	GTGCAGTACCAGTA AAGTTATGG CGCAATATCATTTGTTGTTGCC	49.4	538	[34]

1.6.2 耐药基因扩增 合成已报道的9个耐药基因引物,以分离菌株基因组DNA为模板进行PCR扩增,引物序列见表3,反应体系和反应条件参考文献[34],PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测,阳性产物送北京擎科生物科技有限公司测序。耐药基因分别为:氨基糖苷类药物耐受基因 *ant3*、*strA*、 β -内酰胺类药物耐受基因 *tem*、*ctxM*,四环素类药物耐受基因 *tetA*、*tetC*,喹诺酮类药物耐受基因 *qnrA*、*qnrS*,磺胺类药物耐受基因 *sul1*。

2 结果与分析

2.1 半刺厚唇鱼发病环境及临床症状

患病鱼养殖于土池中,发病时水面生长大量红色裸藻,水温 30 ℃左右,pH 值 8.85。患病鱼为1龄鱼,体质量 30 g 左右,症状主要表现为活力差,上浮水面,体表溃疡,溃疡周围有明显的出血圈(图1),病程长,死亡率约 20%。

2.2 分离菌株的鉴定

2.2.1 形态特征 从患病鱼体表溃烂部位和内脏器官上分离到一株优势菌,命名为 AhL210623NA,菌株在营养琼脂培养基上生长速度快,菌落大,圆形,中央微凸起,黄白色半透明,表面光滑湿润,边缘整齐(图2A)。菌体呈短杆状,革兰氏染色呈阴性,无芽孢,大小为 $(0.5 \sim 0.6) \mu\text{m} \times (0.8 \sim 1.0) \mu\text{m}$ (图2B)。



图1 患病鱼临床症状

Fig.1 Clinical symptoms of diseased fish

2.2.2 生理生化特性 通过 VITEK 2 COMPACT 全自动微生物鉴定系统对菌株 AhL210623NA 进行生理生化鉴定(表4),结合补充的 VP 试验和 Esculin 试验,将菌株鉴定为嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*);但查阅相关文献^[35-36]发现,生理生化鉴定无法准确区分嗜水气单胞菌和达卡气单胞菌。

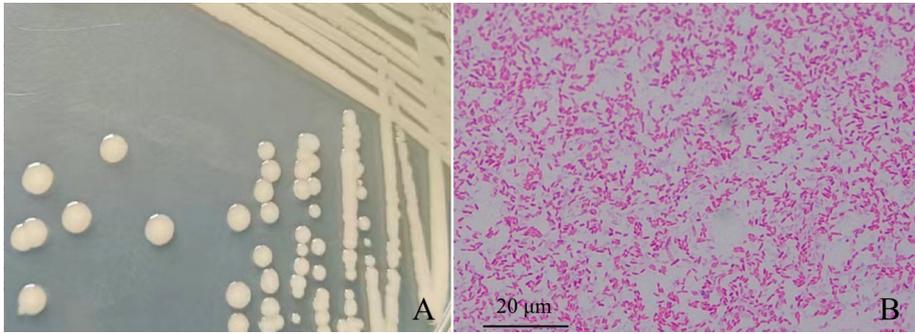


图 2 菌株 AhL210623NA 菌落 (A) 和菌体 (B) 特征

Fig.2 Colony (A) and morphological characteristics (B) of strain AhL210623NA

表 4 AhL210623NA 生理生化特性¹⁾

Table 4 Physiological and biochemical characteristics of AhL210623NA

测定项目 Measuring item	结果 Result	测定项目 Measuring item	结果 Result
丙氨酸-苯丙氨酸-脯氨酸芳胺酶 Ala-Phe-Pro-arylamidase	+	D-葡萄糖 D-glucose	+
H ₂ S 产生 H ₂ S production	+	D-甘露糖 D-mannose	+
β -葡萄糖苷酶 β -glucosidase	-	酪氨酸芳胺酶 Tyrosine arylamidase	+
L-脯氨酸芳胺酶 L-proline arylamidase	+	柠檬酸盐 Citrate	-
蔗糖 Saccharose	+	N-乙酰- β -半乳糖苷酶 β -N-acetyl-galactosaminidas	-
L-乳酸产碱 L-lactate alkalinisation	+	组氨酸同化 Histidine assimilation	-
氨基乙酸芳胺酶 Glycine arylamidase	-	Ellman 试剂 Ellman reagent	+
O/129 耐受 O/129 resistance	-	D-纤维二糖 D-cellobiose	-
侧金盏花醇 Adonitol	-	Y-谷氨酰转移酶 Y-glutamyl-transferase	-
β -N-乙酰葡萄糖苷酶 β -N-acetyl-glucosaminidase	+	β -木糖苷酶 β -xylosidase	-
D-麦芽糖 D-maltose	+	尿素酶 Urease	-
脂酶 Lipase	+	丙二酸盐 Malonate	-
D-塔格糖 D-tagatose	-	α -半乳糖苷酶 α -galactosidase	-
α -葡萄糖 α -glucosidase	-	Courmarate 试剂 Courmarate reagent	+
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-	L-乳酸盐同化 L-lactate assimilation	-
谷氨酸-甘氨酸-精氨酸芳胺酶 Glu-Gly-Arg-arylamidase	+	β -半乳糖苷酶 β -galactosidase	+
吡咯烷基 Pyrrolydonyl-arylamidase	-	发酵/葡萄糖 Fermentation/glucose	+
谷酰胺酶 pNA Glutamyl arylamidase pNA	-	β -丙氨酸芳胺酶 pNA β -alanine arylamidase pNA	-
D-甘露醇 D-mannitol	+	D-山梨醇 D-sorbitol	-
古老糖 Palatinose	+	5-酮-葡萄糖苷 5-keto-D-gluconate	-
D-海藻糖 D-trehalose	+	磷酸酶 Phosphatase	-
琥珀酸盐产碱 Succinate alkalinisation	+	β -葡萄糖苷酸酶 β -glucuronidase	-
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	-	乙酰甲基甲醇 Acetyl methyl carbinol	+
L-苹果酸盐同化 L-malate assimilation	-	七叶苷 Esculin	+
L-阿拉伯醇 L-arabitol	-		

¹⁾ “+”表示阳性,“-”表示阴性;测定项目的全称参考 VITEK 2 GN 鉴定卡成分目录。

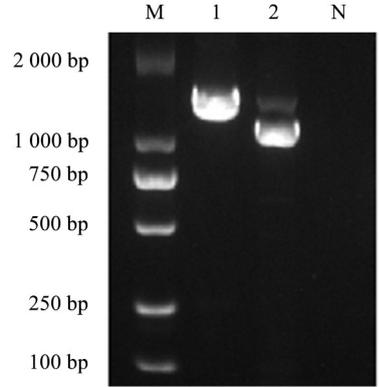
“+” denotes positive, “-” denotes negative; the full names of the testing items are referred to the catalogue from VITEK 2 Gram-negative identification card.

2.2.3 分子生物学鉴定 PCR 扩增菌株 AhL210623NA 的 16S rDNA、*gyrB* 序列, 分别获得大小为 1 465、1 124 bp 的预期片段(图 3)。Blast 同源比对发现: 其 16S rDNA 序列与 NCBI 数据库中的达卡气单胞菌(*A. dhakensis*) 202108C2(登录号 OQ283678.1)、嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*) Ah201416(登录号 KR006248.1)、豚鼠气单胞菌(*A. caviae*) PaKu10(登录号 MK841331.1) 等的 16S rDNA 基因序列同源性

均为 100%, 说明该菌株为气单胞菌属; 其 *gyrB* 序列与数据库中的达卡气单胞菌 TN3(登录号 LR963112.1)、TN4(登录号 LR963122.1)、TN5(登录号 LR963117.1) 等的同源性均为 99.9%。利用 MEGA 7.0 软件构建的系统发育树(图 4) 显示, 该菌株与达卡气单胞菌聚为一支, 因此确定该菌为达卡气单胞菌。

2.3 分离菌株的回归感染

AhL210623NA 回归感染后发病鱼症状和自然发病情况基本一致, 鱼体注射菌液的部位出现溃烂, 伤口和鳍条根部出血明显。由表 5 可知: 当注射菌液浓度 $\geq 3.1 \times 10^8$ CFU · mL⁻¹ 时, 24 h 内死亡率可达 100%, 属急性死亡, 无特殊症状; 随着注射菌液浓度的降低死亡率逐渐减小, 当注射菌液浓度 $\leq 3.1 \times 10^5$ CFU · mL⁻¹ 时, 半刺厚唇鱼未出现死亡。经改良寇氏法计算, 菌株 AhL210623NA 对半刺厚唇鱼的 LD₅₀ 为 6.19×10^6 CFU · mL⁻¹。再次从濒死半刺厚唇鱼体内分离到优势菌株, 其形态特征、生理生化特性, 16S rDNA 和 *gyrB* 测序结果与 AhL210623NA 完全一致, 说明 AhL210623NA 是半刺厚唇鱼腐皮病的病原。



M. 2 000 Marker; 1. 16S rDNA; 2. *gyrB*; N. 阴性对照 Negative control。

图 3 16S rDNA 和 *gyrB* 核酸电泳图
Fig.3 Electrophoresis of PCR products of 16S rDNA and *gyrB* gene

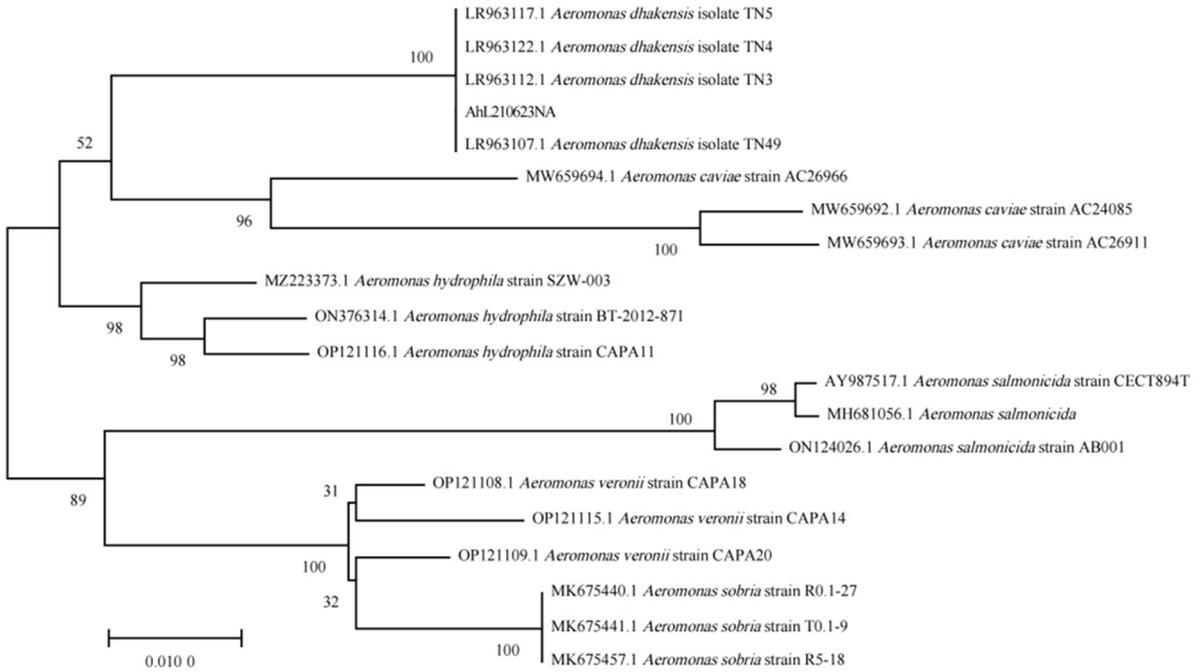


图 4 基于 *gyrB* 序列的系统进化树
Fig.4 Phylogenetic tree based on *gyrB* sequence

表 5 AhL210623NA 回归感染试验结果
Table 5 Results of recurrent infection test of AhL210623NA

组别 Group	菌液浓度/(CFU · mL ⁻¹) Bacterial concentration	累计死亡率/% Cumulative mortality				
		1 d	2 d	3 d	4 d	5~14 d
1	3.1×10^9	100	100	100	100	100
2	3.1×10^8	100	100	100	100	100
3	3.1×10^7	60	80	80	80	80
4	3.1×10^6	40	40	40	40	40
5	3.1×10^5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0

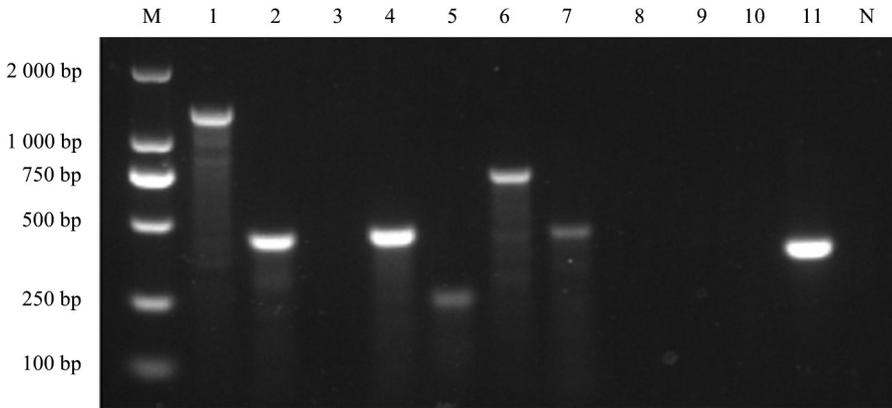
2.4 毒力基因分析

本试验共扩增了 11 个毒力基因,其中, *hlyA*、*aerA*、*alt*、*act*、*ahpA*、*epr*、*Hcp* 7 个基因的扩增结果呈阳性, *ast*、*exu*、*lip*、*ascV* 4 个基因的扩增结果呈阴性(图 5)。阳性 PCR 产物送北京擎科生物科技有限公司测序,确认扩增条带为目标毒力基因。

2.5 耐药性分析

药物敏感性试验结果表明,菌株 AhL210623NA

对 24 种药物中的氨基糖苷类、多粘菌素类、四环素类、喹诺酮类、氯霉素类药物均高度敏感;对 β -内酰胺类的头孢噻肟高度敏感,头孢他啶中度敏感,其他耐受;对大环内酯类的红霉素中度敏感,罗红霉素耐受;对糖肽类的万古霉素和磺胺类的复方新诺明均耐受(表 6)。



M.2 000 marker; 1. *hlyA*; 2. *aerA*; 3. *ast*; 4. *alt*; 5. *act*; 6. *ahpA*; 7. *epr*; 8. *exu*; 9. *lip*; 10. *ascV*; 11. *Hcp*; N. 阴性对照(Negative control)。

图 5 毒力基因核酸电泳图

Fig.5 Electrophoresis of PCR products of virulence genes

表 6 AhL210623NA 药敏试验结果¹⁾

Table 6 Drug susceptibility test of AhL210623NA

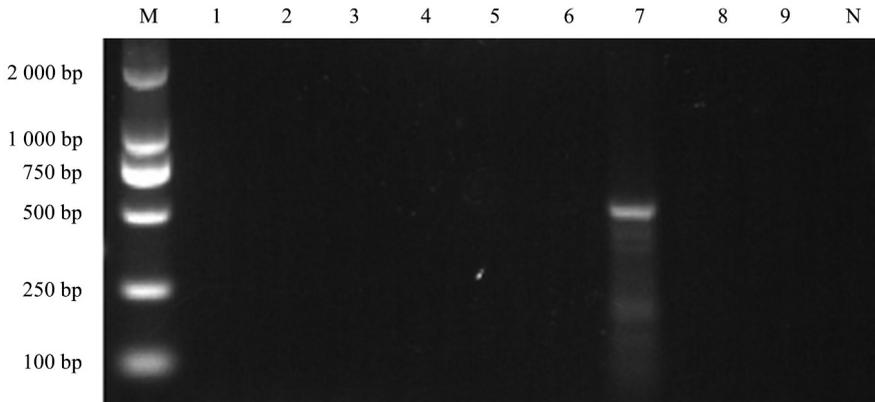
药物分类 Drug classification	药物名称 Drug name	抑菌圈直径/mm Diameter of antibacterial circle	敏感性 Sensibility
β -内酰胺类 β -lactam	青霉素 Penicillin	0	R
	氨苄西林 Ampicillin	0	R
	羧苄西林 Carbenicillin	0	R
	苯唑西林 Oxacillin	0	R
	头孢噻肟 Cefotaxime	33.89	S
	头孢他啶 Ceftazidime	17.66	I
	氨基糖苷类 Aminoglycosides	庆大霉素 Gentamicin	23.57
多粘菌素类 Polymyxins	妥布霉素 Tobramycin	23.29	S
	链霉素 Streptomycin	26.74	S
	新霉素 Neomycin	23.20	S
	卡那霉素 Kanamycin	24.55	S
	多粘菌素 B Polymyxin B	15.18	S
大环内酯类 Macrolides	红霉素 Erythromycin	19.91	I
	罗红霉素 Roxithromycin	18.72	R
四环素类 Tetracycline	四环素 Tetracycline	19.75	S
	多西环素 Doxycycline	20.62	S
	喹诺酮类 Quinolones	氧氟沙星 Ofloxacin	31.52
氯霉素类 Chloramphenicol	环丙沙星 Ciprofloxacin	38.81	S
	诺氟沙星 Norfloxacin	37.05	S
	依诺沙星 Enoxacin	35.03	S
	恩诺沙星 Enrofloxacin	37.43	S
	氟苯尼考 Flufenicol	32.13	S
糖肽类 Glycopeptides	万古霉素 Vancomycin	12.27	R
磺胺类 Sulfonamides	复方新诺明 Cotrimoxazole	20.89	R

¹⁾ S. 高度敏感; I. 中度敏感; R. 耐药。

S. Highly sensitive; I. Moderately sensitive; R. Resistant.

本试验共扩增了9个耐药基因,只有 *sul1* 的扩增结果呈阳性,其余8个耐药基因的扩增结果均呈

阴性(图6)。



M. DL2000 marker; 1. *qnrA*; 2. *qnrS*; 3. *tetA*; 4. *tetC*; 5. *ant3*; 6. *strA*; 7. *sul1*; 8. *tem*; 9. *ctxM*; N. 阴性对照 Negative control。

图6 耐药基因核酸电泳图

Fig.6 Electrophoresis of PCR products of resistance genes

3 讨论与结论

因生理生化特性相似、16S rDNA 序列差异较小,气单胞菌属内种的准确鉴定曾经是一个难题,目前比较可靠的方法是通过 *gyrB*、*rpoD* 等管家基因进行鉴定。本研究通过 VITEK 2 COMPACT 全自动微生物鉴定系统对菌株 AhL210623NA 进行生理生化鉴定,结果显示该菌为嗜水气单胞菌,而通过 *gyrB* 序列进行分子生物学鉴定,显示该菌为达卡气单胞菌。这与很多已有的研究结果一致:贺桃凤等^[35]将生理生化表型鉴定为嗜水气单胞菌的菌株重新通过管家基因进行鉴定,结果 67.2% 的菌株被鉴定为达卡气单胞菌;Bertran et al^[37]通过菌株核心基因组比对将嗜水气单胞菌分离株重新鉴定为达卡气单胞菌;Huang et al^[17]最初使用 VITEK-2 将一株从人体分离的病原菌鉴定为嗜水气单胞菌,而之后的全基因组测序结果显示该分离株是达卡气单胞菌;Kitagawa et al^[20]发现,达卡气单胞菌在表型上常被误认为是嗜水气单胞菌或温和气单胞菌(*A. sobria*),通过 MALDI-TOF MS 系统鉴定时也常被错误鉴定为豚鼠气单胞菌、嗜水气单胞菌或间氏气单胞菌(*A. jandaei*),所以通过 *rpoD* 和 *gyrB* 测序重新分析了 2011 年 1 月至 2017 年 12 月广岛大学医院分离自菌血症患者的 19 株气单胞菌,发现其中包含 4 株(21.1%)之前被错误鉴定的达卡气单胞菌。

气单胞菌致病性的强弱与其携带的毒力因子多少有关,常见的毒力因子有侧鞭毛(*laf*)、极性鞭

毛(*fla*)、菌毛(*fim*)等,在病原的黏附和定殖过程中发挥作用,而 *hlyA*、*aerA*、*alt* 等能够编码多种毒素,引起宿主溶血,改变细胞通透性,甚至裂解细胞,从而加剧宿主的发病症状^[38-39]。本研究发现,菌株 AhL210623NA 只携带 *hlyA*、*aerA*、*alt*、*act*、*ahpA*、*epr*、*Hcp* 7 个毒力基因,但不携带 *ast*、*exu*、*lip*、*ascV* 4 个毒力基因。渠风甜等^[40]通过基因比对分析发现,55 株达卡气单胞菌普遍携带 *fliN*、*ast*、*alt*、*gcat*、*lip*、*aerA*、*hlyA* 7 个毒力基因;韩语等^[41]对海南地区患病暹罗鳄(*Crocodylus siamensis*)体内分离的 3 株达卡气单胞菌进行了毒力基因扩增,发现 *fla*、*alt*、*aer* 等基因检出率较高,尤其 *lip* 和 *ela* 2 个毒力基因检出率高达 100%;潘纪汶等^[42]通过毒力基因扩增发现,1 株牛蛙(*Rana catesbeiana*)源达卡气单胞菌携带 7 个毒力基因 *ascV*、*aer*、*act*、*ast*、*lip*、*ela* 和 *fla*。这些研究与本研究结果基本一致,但以上 3 项研究中达卡气单胞菌 *lip* 基因的检出率均为 100%,而本研究未检出 *lip* 基因。张代琴^[43]对 34 株达卡气单胞菌 *lip* 基因进行扩增,其中有 32 株携带该基因,阳性率 94.12%。可见,达卡气单胞菌存在不携带 *lip* 基因的可能。

药敏试验结果显示,分离菌株 AhL210623NA 对磺胺类的复方新诺明耐受,且 PCR 扩增出磺胺类耐药基因 *sul1*,两项试验结果相符;分离菌株对氨基糖苷类、四环素类、喹诺酮类药物均高度敏感,且 PCR 未扩增出喹诺酮类耐药基因 *qnrA*、*qnrS*,四环素类耐药基因 *tetA*、*tetC*,氨基糖苷类耐药基因 *ant3*、*strA*,两项试验结果相符;分离菌株对 β -内酰

胺类的头孢噻肟高度敏感,对头孢他啶中度敏感,同时 PCR 未扩增出 β -内酰胺类耐药基因 *tem*、*ctxM*,两项试验结果亦相符,但是,分离菌株对其他 β -内酰胺类药物耐受,因此推测该菌株对青霉素、氨苄西林、羧苄西林、苯唑西林的耐药性与耐药基因 *tem*、*ctxM* 无关,菌株可能还存在其他的 β -内酰胺类耐药基因。细菌的耐药表型与耐药基因之间关系复杂,两者不能完全对等,耐药基因的表达常常受到外界环境的影响,以上结果表明分离菌株对磺胺类、氨基糖苷类、四环素类、喹诺酮类的耐药表型与耐药基因 100% 相符,但对 β -内酰胺类的耐药表型与耐药基因相关性较低。

综上所述,半刺厚唇鱼腐皮病的病原为达卡气单胞菌。该菌对半刺厚唇鱼的 LD₅₀ 低,可导致患病鱼严重出血,且携带 7 个毒力基因,毒性相对较强;但只携带 1 个耐药基因,对常见抗生素耐药性较弱,可选择的治疗药物较多。

参考文献 (References)

- [1] 湖南省水产科学研究所.湖南鱼类志[M].长沙:湖南人民出版社,1976.
Hunan Fisheries Science Institute. Hunan fish[M]. Changsha: Hunan People Press, 1976.
- [2] 刘丽丽,郑欣欣,尤永隆,等.半刺厚唇鱼的人工繁殖试验[J].淡水渔业,2010,40(2):57-61. DOI: 10.3969/j.issn.1000-6907.2010.02.011.
LIU L L, ZHENG X X, YOU Y L, et al. Experiment on the artificial propagation of *Acrossocheilus hemispinus*[J]. Freshwater Fisheries, 2010, 40(2): 57-61. DOI: 10.3969/j.issn.1000-6907.2010.02.011.
- [3] 秦志清,樊海平,薛凌展,等.半刺厚唇鱼人工繁育技术研究[J].福建农业学报,2017,32(5):486-490. DOI: 10.19303/j.issn.1008-0384.2017.05.004.
QIN Z Q, FAN H P, XUE L Z, et al. Breeding and aquaculture of *Acrossocheilus hemispinus*[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2017, 32(5): 486-490. DOI: 10.19303/j.issn.1008-0384.2017.05.004. DOI: 10.19303/j.issn.1008-0384.2017.05.004.
- [4] 秦志清,樊海平,林建斌,等.半刺厚唇鱼水泥池养殖技术[J].科学养鱼,2018(9):41-42. DOI: 10.14184/j.cnki.issn1004-843x.2018.09.023.
QIN Z Q, FAN H P, LIN J B, et al. Culture technology of *Acrossocheilus hemispinus* in cement pit [J]. Scientific Fish Farming, 2018(9): 41-42. DOI: 10.14184/j.cnki.issn1004-843x.2018.09.023.
- [5] 秦志清,樊海平,林建斌,等.土池主养半刺厚唇鱼关键技术及效果研究[J].福建农业科技,2019(8):46-48. DOI: 10.13651/j.cnki.fjnykj.2019.08.011.
- [6] QIN Z Q, FAN H P, LIN J B, et al. Study on the key techniques and effects of mono-culture *Acrossocheilus hemispinus* in earthen ponds[J]. Fujian Agricultural Science and Technology, 2019(8):46-48. DOI: 10.13651/j.cnki.fjnykj.2019.08.011.
- [7] 林建斌,梁萍,秦志清,等.野生与养殖半刺厚唇鱼肌肉营养成分比较分析[J].中国饲料,2017(22):27-30. DOI: 10.15906/j.cnki.cn11-2975/s.20172207.
LIN J B, LIANG P, QIN Z Q, et al. Comparative analysis of muscle nutrients between wild and cultured *Acrossocheilus hemispinus*[J]. China Feed, 2017(22):27-30. DOI: 10.15906/j.cnki.cn11-2975/s.20172207.
- [7] 梁萍,秦志清,林建斌,等.饲料中不同蛋白质水平对半刺厚唇鱼幼鱼生长性能及消化酶活性的影响[J].中国农学通报,2018,34(2):136-140. DOI: 10.11924/j.issn.1000-6850.casb17090056.
LIANG P, QIN Z Q, LIN J B, et al. Effect of feed protein levels on growth performance and digestive enzyme activity of juvenile *Acrossocheilus hemispinus*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2018, 34(2):136-140. DOI: 10.11924/j.issn.1000-6850.casb17090056.
- [8] 陈斌.八种渔药对半刺厚唇鱼小瓜虫病的治疗效果[J].湖北农业科学,2021,60(6):90-94. DOI: 10.14088/j.cnki.issn0439-8114.2021.06.018.
CHEN B. The therapeutic effect of 8 kinds of aquaculture drugs on the *Acrossocheilus hemispinus* infected *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2021, 60(6): 90-94. DOI: 10.14088/j.cnki.issn0439-8114.2021.06.018.
- [9] 秦志清,樊海平,薛凌展,等.半刺厚唇鱼嗜酸性卵甲藻病的防治[J].科学养鱼,2017(4):64-65. DOI: 10.14184/j.cnki.issn1004-843x.2017.04.038.
QIN Z Q, FAN H P, XUE L Z, et al. Prevention and treatment of *Acrossocheilus hemispinus* infected *Oodinium acidophilum*[J]. Scientific Fish Farming, 2017(4):64-65. DOI: 10.14184/j.cnki.issn1004-843x.2017.04.038.
- [10] 樊海平,薛凌展,邓志武.半刺厚唇鱼扁弯口吸虫病的发现与治疗[J].科学养鱼,2015(5):61. DOI: 10.14184/j.cnki.issn1004-843x.2015.05.039.
FAN H P, XUE L Z, DENG Z W. Discovery and treatment of *Clinostomum complanatum* disease on *Acrossocheilus hemispinus*[J]. Scientific Fish Farming, 2015(5): 61. DOI: 10.14184/j.cnki.issn1004-843x.2015.05.039.
- [11] ZHAO C X, QIN P P, LI S, et al. Exploring *Aeromonas dhakensis* in Aldabra giant tortoises: a debut report and genetic characterization [J]. BMC Microbiology, 2024,

- 24(1):76. DOI: 10.1186/s12866-024-03203-w.
- [12] PENG X, ZHONG Z X, ZHONG H, et al. Histopathological observation and comparative transcriptome analysis reveal immune response mechanisms to *Aeromonas dhakensis* infection in *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023, 142: 109151. DOI: 10.1016/j.fsi.2023.109151.
- [13] ERICKSON V I, KHOI L M, HOUNMANOU Y M G, et al. Comparative genomic analysis of *Aeromonas dhakensis* and *Aeromonas hydrophila* from diseased striped catfish fingerlings cultured in Vietnam [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 141254781. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1254781.
- [14] SIDDIQUI R, AKBAR N, SOARES N C, et al. Mass spectrometric analysis of bioactive conditioned media of bacteria isolated from reptilian gut [J]. *Future Science OA*, 2023, 9(5): 861. DOI: 10.2144/fsoa-2023-0030.
- [15] OKAFOR A C, OGBO F C, CABAL ROSEL A, et al. Genome sequence of OXA-726-encoding *Aeromonas dhakensis* *Igbk* (sequence type 1171) from an edible snail traded in Nigeria [J]. *Microbiology Resource Announcements*, 2022, 11(7): e0034322. DOI: 10.1128/mra.00343-22.
- [16] JIN S, GUAN T, HU M, et al. Isolation, identification and virulence gene characterization of *Aeromonas dhakensis* isolated from sea lion (*Zalophus californianus*) [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2022, 74(6): 932-940. DOI: 10.1111/lam.13688.
- [17] HUANG M X, CHEN H T, LI C N, et al. Rapid fulminant progression and mortality secondary to *Aeromonas dhakensis* septicemia with hepatitis B virus infection following the ingestion of snakehead fish in China's mainland; a case report [J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2020, 17(12): 743-749. DOI: 10.1089/fpd.2019.2780.
- [18] PÉREZ L, ABARCA M L, LATIF-EUGENÍN F, et al. *Aeromonas dhakensis* pneumonia and sepsis in a neonate Risso's dolphin *Grampus griseus* from the Mediterranean Sea [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2015, 116(1): 69-74. DOI: 10.3354/dao02899.
- [19] CHEN P L, LAMY B, KO W C. *Aeromonas dhakensis*, an increasingly recognized human pathogen [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 793. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00793.
- [20] KITAGAWA H, OHGE H, YU L S, et al. *Aeromonas dhakensis* is not a rare cause of *Aeromonas* bacteremia in Hiroshima, Japan [J]. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2020, 26(2): 316-320. DOI: 10.1016/j.jiac.2019.08.020.
- [21] SUN Y, ZHAO Y J, XU W Y, et al. Taxonomy, virulence determinants and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp. isolated from bacteremia in southeastern China [J]. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 2021, 10(1): 43. DOI: 10.1186/s13756-021-00911-0.
- [22] LAU T T V, TAN J M A, PUTHUCHEARY S D, et al. Genetic relatedness and novel sequence types of clinical *Aeromonas dhakensis* from Malaysia [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2020, 51(3): 909-918. DOI: 10.1007/s42770-020-00239-8.
- [23] 曹会生, 李丽影. 丙三醇菌种保存法 [J]. *微生物学通报*, 1995, 22(5): 310-311.
- CAO H S, LI L Y. Preservation method of strains in glycerol [J]. *Microbiology China*, 1995, 22(5): 310-311.
- [24] 罗明刚. 小鼠啮乙醇急性与蓄积性中毒试验研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2010.
- LUO M G. Researches on olaquinox acute and cumulation toxicological analysis on mice [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2010.
- [25] JENSEN S, BERGH O, ENGER O, et al. Use of PCR-RFLP for genotyping 16S rRNA and characterizing bacteria cultured from halibut fry [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2002, 48(5): 379-386. DOI: 10.1139/w02-033.
- [26] YÁÑEZ M A, CATALÁN V, APRÁIZ D, et al. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53: 875-883. DOI: 10.1099/ij.s.0.02443-0.
- [27] 熊静, 赖晓健, 余钦, 等. 7株鳃鲙致病性气单胞菌毒力基因胞外产物及其活性比较 [J]. *华中农业大学学报*, 2017, 36(1): 76-85. DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2017.01.012.
- XIONG J, LAI X J, YU Q et al. Analysis of virulence genes, extracellular products and activities among seven *Aeromonas* strains isolated from eels [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2017, 36(1): 76-85. DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2017.01.012.
- [28] 边宇. 致病性维氏气单胞菌多重PCR检测方法的建立及初步应用 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2013.
- BIAN Y. Establishment and preliminary application of multiplex PCR diagnostic method on *Aeromonas veronii* [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2013.
- [29] 付乔芳, 邱军强, 胡鲲, 等. 嗜水气单胞菌国内分离株的毒力因子分布与致病性相关性分析 [J]. *生物学杂志*, 2011, 28(6): 53-57. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1736.2011.06.053.
- FU Q F, QIU J Q, HU K, et al. The analyse of virulence

- factors-pathogenicity relationships of *Aeromonas hydrophila* strains isolated from China [J]. *Journal of Biology*, 2011, 28(6): 53-57. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1736.2011.06.053.
- [30] 胡萌. 江苏地区气单胞菌分离鉴定及强毒株生物学特性分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
HU M. Isolation and identification of *Aeromonas* from Jiangsu and characterizations of virulent strains [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012.
- [31] 郭婧. 嗜水气单胞菌分离菌株毒力基因型分析及胞外蛋白酶的表达、提取和蛋白研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2009. DOI: 10.7666/d.Y1763255.
GUO J. Analysis of types virulence genotypes in the different strains of *Aeromonas hydrophila* and expression, extraction and analysis of extracellular protease [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2009. DOI: 10.7666/d.Y1763255.
- [32] SEN K, RODGERS M. Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 97(5): 1077-1086. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2004.02398.x.
- [33] 吴亚锋. 南京地区气单胞菌的分离鉴定及嗜水气单胞菌菌株分型研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015. DOI: 10.7666/d.Y3184882.
WU Y F. Isolation and identification of *Aeromonas* from Nanjing and typing of *A. hydrophila* strains [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015. DOI: 10.7666/d.Y3184882.
- [34] DENG Y T, WU Y L, TAN A P, et al. Analysis of antimicrobial resistance genes in *Aeromonas* spp. isolated from cultured freshwater animals in China [J]. *Microbial Drug Resistance*, 2014, 20(4): 350-356. DOI: 10.1089/mdr.2013.0068.
- [35] 贺桃凤, 李医, 陈晓, 等. 用 *gyrB*、*rpoD* 基因扩增测序进行气单胞菌分类的探讨 [J]. *临床检验杂志*, 2015, 33(8): 569-572. DOI: 10.13602/j.cnki.jcls.2015.08.03.
HE T F, LI Y, CHEN X, et al. Genetically classification of *Aeromonas* strains identified by *gyrB* and *rpoD* gene [J]. *Chinese Journal of Clinical Laboratory Science*, 2015, 33(8): 569-572. DOI: 10.13602/j.cnki.jcls.2015.08.03.
- [36] 周妍妍, 南征, 闫东辉, 等. 3 种方法鉴定气单胞菌临床分离株效果分析 [J]. *疾病监测*, 2019, 34(1): 70-75. DOI: 10.3784/j.issn.1003-9961.2019.01.017.
ZHOU Y Y, NAN Z, YAN D H, et al. Effect analysis of three identification methods of clinically isolated *Aeromonas* [J]. *Disease Surveillance*, 2019, 34(1): 70-75. DOI: 10.3784/j.issn.1003-9961.2019.01.017.
- [37] BERTRAN X, RUBIO M, GÓMEZ L, et al. Taxonomic identification of different species of the genus *Aeromonas* by whole-genome sequencing and use of their species-specific β -lactamases as phylogenetic markers [J]. *Antibiotics*, 2021, 10(4): 354. DOI: 10.3390/antibiotics10040354.
- [38] FREIRE N B, MAGALHAES T C, NUNES SOARES R A, et al. Nutritional interference for phenotypic biofilm quantification in *Aeromonas* spp. isolates containing the *fla* gene [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 127: 198-201. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.11.044.
- [39] BEAZ-HIDALGO R, FIGUERAS M J. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2013, 36(4): 371-388. DOI: 10.1111/jfd.12025.
- [40] 渠凤甜, 周海健, 薛佳琦, 等. 虾源达卡气单胞菌全基因组分析和致病性研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(3): 24-36. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.03.004.
QU F T, ZHOU H J, XUE J Q, et al. Whole-genome analysis and pathogenicity of *Aeromonas dhakensis* isolated from shrimps [J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2023, 33(3): 24-36. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.03.004.
- [41] 韩语, 王昕, 潘纪汶, 等. 鳄鱼源气单胞菌的毒力基因与耐药特性分析 [J]. *热带生物学报*, 2021, 12(1): 96-102. DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2021.01.014.
HAN Y, WANG X, PAN J W, et al. Characteristics of virulence genes and antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. isolated from *Siamese crocodile* [J]. *Journal of Tropical Biology*, 2021, 12(1): 96-102. DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2021.01.014.
- [42] 潘纪汶, 王昕, 杨诺, 等. 牛蛙源达卡气单胞菌的分离鉴定及毒力特性分析 [J]. *畜牧与兽医*, 2021, 53(3): 77-83.
PAN J W, WANG X, YANG N, et al. Isolation, identification and virulence analysis of *Aeromonas dhakensis* from *Rana catesbiana* [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2021, 53(3): 77-83.
- [43] 张代琴. 气单胞菌菌种鉴定、感染临床特征以及耐药性与毒力基因的初步研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2022.
ZHANG D Q. Identification of *Aeromonas* species, clinical characteristics of *Aeromonas* infection and preliminary study on gene of antibiotic resistance and virulence [D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2022.

(责任编辑: 杨郁霞)