

研究报告

大口黑鲈白皮病病原菌的分离鉴定及药物敏感性试验

谭爱萍¹, 赵飞^{*1}, 郭忠宝², 邓玉婷¹, 张瑞泉¹, 赖迎迢¹, 黄志斌¹, 姜兰¹

1 中国水产科学研究院珠江水产研究所 农业农村部渔用药物创制重点实验室 广东省水产动物免疫技术重点实验室, 广东 广州 510380

2 广西水产科学研究院, 广西 南宁 530021

谭爱萍, 赵飞, 郭忠宝, 邓玉婷, 张瑞泉, 赖迎迢, 黄志斌, 姜兰. 大口黑鲈白皮病病原菌的分离鉴定及药物敏感性试验[J]. 微生物学通报, 2022, 49(5): 1741-1758

Tan Aiping, Zhao Fei, Guo Zhongbao, Deng Yuting, Zhang Ruiquan, Lai Yingtiao, Huang Zhibin, Jiang Lan. Isolation, identification, and antimicrobial susceptibility test of the pathogen from largemouth bass (*Micropterus salmoides*) with white skin disease[J]. Microbiology China, 2022, 49(5): 1741-1758

摘要:【背景】近年, 广东、广西等多地养殖的大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)在苗种期间极易暴发白皮病, 并且与已报道的症状不同, 严重危害大口黑鲈苗种的生产。【目的】确定大口黑鲈苗种白皮病的病原, 通过分析生长特性、毒力因子、致病性、组织病理与敏感药物筛选试验, 为该病的研究与防控提供科学参考。【方法】从患白皮病大口黑鲈的病灶处分离细菌, 结合形态观察、生理生化指标、16S rRNA 基因和 *gyrB* 基因序列分析等鉴定菌株; 绘制菌株的生长曲线, 分析温度、盐度及 pH 对生长的影响; 采用平板法检测菌株毒力因子活性, PCR 方法检测携带毒力基因的情况; 通过浸泡感染试验验证菌株的致病性及其组织病理特征; 采用微量稀释法测定菌株对水产常用的 10 种抗菌药物和 6 种消毒剂的敏感性。【结果】从患病的大口黑鲈白皮处肌肉分离纯化到优势菌株 ZJS18004, 经形态特征、生理生化特性、16S rRNA 基因和 *gyrB* 基因序列分析, 鉴定为维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*); 菌株 ZJS18004 的最适生长温度为 30 °C, 最适 pH 值为 8.0, 最适盐度为 5‰; 在 30 °C 时的生长曲线显示 0-1 h 是迟缓期, 1-5 h 是对数期; 菌株 ZJS18004 具有溶血性、蛋白酶和脂肪酶活性, 携带 *aer*、*act*、*fla*、*ahyB*、*exu* 和 *lip* 等 6 种毒力基因; 感染试验证明菌株 ZJS18004 在 23、28 和 33 °C 对健康大口黑鲈均具有较强的致病性, 与自然发病症状相似, 致病力强弱与细菌浓度和水温密切相关; 菌株 ZJS18004 感染造成大口黑鲈肌肉组织溶解, 肝、脾、肾脏组织细胞坏死等明显病理损伤; 菌株 ZJS18004 对盐酸多西环素、硫酸新霉素、甲砒

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFD0900103); 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2021SJ-XT3, 2020TD45); 广东省自然科学基金(2020A1515011584)

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2019YFD0900103); Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2021SJ-XT3, 2020TD45); Natural Science Foundation of Guangdong Province (2020A1515011584)

*Corresponding author: E-mail: zhaofei@prfri.ac.cn

Received: 2021-09-19; Accepted: 2021-10-27; Published online: 2022-02-23

霉素、氟苯尼考等4种抗菌药物敏感;三氯异氰尿酸对菌株ZJS18004的体外抑杀菌效果最好,其次是苯扎溴铵。【结论】维氏气单胞菌是大口黑鲈苗种白皮病的主要病原菌,通过分析该菌的生长特性、致病力、组织病理和敏感药物筛选试验,为进一步解析维氏气单胞菌的致病机制和开展精准防控研究打下坚实的基础。

关键词:大口黑鲈;维氏气单胞菌;生长特性;毒力基因;药物敏感性

Isolation, identification, and antimicrobial susceptibility test of the pathogen from largemouth bass (*Micropterus salmoides*) with white skin disease

TAN Aiping¹, ZHAO Fei^{*1}, GUO Zhongbao², DENG Yuting¹, ZHANG Ruiquan¹, LAI Yingtiao¹, HUANG Zhibin¹, JIANG Lan¹

¹ Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology; Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, Guangdong, China

² Guangxi Academy of Fishery Sciences, Nanning 530021, Guangxi, China

Abstract: [Background] In recent years, largemouth bass (*Micropterus salmoides*) has been prone to white skin disease during seed stage in Guangdong, Guangxi, and other places, with the symptoms obviously different from those reported clinically, which seriously endangers the production of largemouth bass seeds. [Objective] To provide scientific reference for the research and treatment of white skin disease of largemouth bass, we identified the pathogen and analyzed its growth characteristics, virulence factors, pathogenicity, and antibiotic susceptibility as well as the fish histopathological changes caused by it. [Methods] The pathogen was isolated from the focus of largemouth bass suffering from white skin disease and identified based on the morphological characteristics, physiological and biochemical indexes, and 16S rRNA and *gyrB* gene sequence analysis. Further, the growth curve of the strain was established, and the effects of temperature, pH, and salinity on the growth were analyzed. The activities of virulence factors were detected by plate method, and the virulence genes were screened out by PCR method. The pathogenicity of the strain and histopathological changes caused by it were confirmed by immersion challenge experiments. The susceptibility of strain to 10 antibiotics and 6 disinfectants commonly used in aquaculture was determined with microdilution method. [Results] The dominant strain ZJS18004 was isolated from the largemouth bass with white skin disease, which was identified as *Aeromonas veronii*. The optimum growth conditions of ZJS18004 were 30 °C, pH 8.0, and salinity 5‰. The growth curve at 30 °C showed that 0–1 h and 1–5 h were the retardation phase and logarithmic phase, respectively. Strain ZJS18004 caused hemolysis, had protease and lipase activities, and carried six virulence genes including *aer*, *act*, *fla*, *ahyB*, *exu*, and *lip*. The results of challenge experiments showed that ZJS18004 had strong pathogenicity to healthy largemouth bass at 23 °C, 28 °C, and 33 °C. The tested fish exhibited disease signs similar to those in natural

infections. The pathogenicity was closely correlated with the bacterial concentration and water temperature. The infection of ZJS18004 caused obvious pathological damage such as muscle tissue lysis and necrosis of the liver, spleen, and kidney. The antimicrobial susceptibility assay revealed that ZJS18004 was susceptible to doxycycline hyclate, neomycin sulphate, thiamphenicol, and florfenicol. Six commonly used aquatic disinfectants had certain bactericidal effects on ZJS18004 *in vitro*, among which trichloroisocyanuric acid ranked first, followed by benzalkonium bromide. **[Conclusion]** *A. veronii* was the major pathogen of white skin disease attacking largemouth bass. The results of the present study will build a solid foundation for further analyzing the pathogenic mechanism of *A. veronii* and carrying out the research on accurate prevention and control.

Keywords: *Micropterus salmoides*; *Aeromonas veronii*; growth characteristics; virulence gene; antibiotic susceptibility

大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)俗称加州鲈, 属鲈形目太阳鱼科黑鲈属, 是一种肉质鲜美、无肌间刺、抵抗力强、生长快、适温广的经济鱼类。大口黑鲈原产于北美洲密西西比河流域, 1983年引进我国, 1985年人工繁育成功, 现已成为我国重要的名优淡水养殖品种之一, 2020年的养殖产量已经超过60万t^[1-3]。然而随着养殖规模的扩大和养殖密度的提高, 病害问题日趋严重, 细菌、病毒和寄生虫等疾病频发, 严重制约大口黑鲈养殖业的可持续发展^[4]。维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)隶属气单胞菌科气单胞菌属, 在自然界中分布广泛, 不仅可引起淡海水养殖鱼、虾、蟹和两栖爬行类等几乎所有水产养殖动物感染发病, 症状主要表现为体表充血或出血或溃烂, 而且也能够引起人类出现败血症、腹泻及伤口感染, 是一种能引起人-畜-鱼共患病的病原菌^[5-7]。目前, 维氏气单胞菌已成为危害国内外水产养殖的主要细菌性病原之一。张德锋等^[8]分析2009–2014年从我国南方地区15种患病淡水养殖鱼类分离的143株气单胞菌的流行特征, 发现维氏气单胞菌占分离菌株的比例最高, 达56%。相似的是, Uzun等^[9]对2009–2011年黑海区域的鲈源细菌性病原进行的多样性分析显示维氏气单胞菌所

占比例最高, 达65.2%。

近年, 广东、广西等多地养殖的大口黑鲈在苗种期间极易出现皮肤发白、呈毛絮状、溃疡且鳃丝黏液增多的病症, 俗称“白皮病”。该病与已报道的大口黑鲈的细菌、病毒及寄生虫等病害的症状都存在较大的差异^[10-16], 主要危害大口黑鲈苗种, 流行于春夏季, 以2–5月苗种培育期最为常见, 传染性强、发病急, 发病2–3d即开始死亡, 死亡率高达80%。然而, 至今关于大口黑鲈白皮病尚未见报道, 亟待查明病原, 进行病原的生长特性、毒力因子和致病性分析及安全有效的防控方法研究等。基于此, 本研究对患白皮病的大口黑鲈苗种进行了病原菌分离鉴定, 并对分离菌株的生长特性、毒力因子、致病力及其组织病理等开展了相关分析, 同时也进行了水产常用抗菌药物和消毒剂的筛选试验, 旨在为大口黑鲈苗种白皮病的研究与防治提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样 品

患白皮病的大口黑鲈苗种(体长5–8 cm)来自广西南宁市某养殖场, 主要症状为皮肤发白、

呈毛絮状、浅层溃疡且鳃丝粘液增多。健康大口黑鲈苗种(体长 7-10 cm)购自广东佛山市某养殖场,在实验室暂养 2 周后,通过对鱼苗的行为观察、镜检、剖检等方式确定无病原感染后用于人工感染实验。

模式菌株维氏气单胞菌 ATCC 51208 和 ATCC 49904 购自中国微生物菌种保藏中心。质控菌株大肠埃希菌(*Escherichia coli*) ATCC 25922 为华南农业大学兽医学院药理教研室惠赠。

1.1.2 主要试剂和仪器

选择已批准在水产养殖中可使用的 10 种抗菌药物进行敏感性试验,药物包括恩诺沙星(enrofloxacin, ENR)、环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)、磺胺间甲氧嘧啶(sulfamonomethoxine, SMM)、复方磺胺二甲嘧啶(sulfadimethoxypyrimidine/trimethoprim, SM2/TMP)、复方磺胺甲噁唑(sulfamethoxazole/trimethoprim, SXT)、盐酸多西环素(doxycycline hyclate, DOX)、硫酸新霉素(neomycin sulfate, NEO)、甲砒霉素(thiamphenicol, THI)、氟苯尼考(flornfenicol, FFC)和氟甲喹(flumequine, FLU)。根据以上抗菌药物的常规使用浓度并参照美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)标准^[17]设计不同的药物浓度梯度,委托天津市金章科技发展有限公司制备成冻干型药物 MIC 测试盒,置于-20 °C 保存备用。选择 6 种水产常用消毒剂进行药物敏感性试验,消毒剂包括三氯异氰尿酸粉(有效氯为 30%)、苯扎溴铵溶液(45%)、戊二醛苯扎溴铵溶液(戊二醛 10%, 苯扎溴铵 10%)、戊二醛溶液(20%)、聚维酮碘溶液(有效聚维酮碘为 20%)、蛋氨酸碘溶液(有效碘为 5.0%),广州先得生物技术有限公司。

胰蛋白胨大豆琼脂(tryptose soya agar, TSA)、LB 肉汤、水解酪蛋白胨(Mueller-Hinton,

MH)肉汤,青岛海博生物技术有限公司;RS (Rimmler-Shotts agar)培养基, Oxoid 公司;5%绵羊血平板,广东环凯微生物科技有限公司;通用型组织固定液,武汉赛维尔生物科技有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;2×Taq Master Mix,康为世纪生物有限公司;DNA Marker 分子量标准,宝生物工程(大连)有限公司;琼脂糖, Biowest 公司。细菌鉴定分析仪、细菌生化鉴定板、麦氏比浊仪,生物-梅里埃公司;透射电子显微镜,日本电子株式会社。

1.2 细菌分离鉴定

1.2.1 细菌分离培养

用 0.65%的无菌生理盐水将患病大口黑鲈的白皮处冲洗干净,无菌条件下从皮下浅层肌肉采样,接种在 TSA 平板上,于 30 °C 恒温培养 18 h,挑取优势菌落,纯化获得 1 株菌株,编号为 ZJS18004,并用脱脂牛奶作保护剂真空冷冻干燥,置-80 °C 保存备用。

1.2.2 细菌形态特征

将菌株 ZJS18004 分别划线接种于 RS 和 TSA 平板上,于 30 °C 恒温培养 18 h,观察细菌的生长情况和菌落形态;同时从 TSA 平板挑取单菌落制成涂片,经革兰氏染色后,光学显微镜下观察细菌的形态和染色特性;制作悬菌液,经 3%磷钨酸负染后于透射电子显微镜观察细菌的大小形态。

1.2.3 生理生化试验

菌株 ZJS18004 于 30 °C 恒温培养 18 h,参照使用说明,接种于 AST-GN 65 细菌鉴定试剂条,使用细菌鉴定分析仪测定生理生化指标。

1.2.4 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列分析

将菌株 ZJS18004 接种至 LB 肉汤中,30 °C、180 r/min 振荡培养 18 h,10 000 r/min 离心 2 min 收集菌体,参照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说

说明书提取细菌总 DNA。参考 Borrell 等^[18]和 Yáñez 等^[19]设计合成 16S rRNA 基因通用引物 27F 和 1492R 及促旋酶亚基基因(*gyrase subunit B*, *gyrB*)引物, 以细菌总 DNA 为模板, 分别进行 PCR 扩增, 引物信息见表 1。PCR 产物送广州艾基生物技术有限公司进行测序。运用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)的 BLAST 程序进行序列同源性检索分析; 利用 MEGA 7.0 软件采用邻接(neighbor-joining, NJ)法(1 000 次 bootstrap 重复)构建系统发育树。

1.3 细菌生长特性分析

1.3.1 生长曲线

参考莫金凤等^[20]的方法, 将菌株 ZJS18004

接种至 LB 肉汤中, 30 °C、180 r/min 培养 8 h, 以 0.65% 无菌生理盐水将菌液浓度调整至 3.0×10^8 CFU/mL 作为种子菌液, 备用。分别取 20 mL 种子菌液接种于 180 mL LB 肉汤中, 设 3 个平行, 于 30 °C、180 r/min 培养, 每间隔 0.5–2.0 h 取 5 mL 培养液, 测定 OD_{600} 。以时间为横坐标, OD_{600} 为纵坐标绘制菌株 ZJS18004 的生长曲线。

1.3.2 温度对生长的影响

参考 Zhao 等^[21]的方法, 按照 1:10 的比例将菌株 ZJS18004 种子菌液接种于 LB 肉汤中, 每管 5 mL, 每个温度设 3 管平行, 分别于 5、10、15、20、25、30、35、40、45 和 50 °C 静

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	产物长度 Product length (bp)
16S rRNA-27F	AGAGTTGATCATGGCTCAG	1 500
16S rRNA-1492R	GGTTACCTTGTTACG ACTT	
<i>gyrB</i> -F	TCCGGCGGTCTGCACGGCGT	1 130
<i>gyrB</i> -R	TTGTCCGGGTTGTAICTCGTC	
<i>aer</i> -F	CCTATGGCCTGAGCGAGAAG	431
<i>aer</i> -R	CCAGTTCAGTCCCACCACT	
<i>act</i> -F	AGAAGGTGACCACCACCAAGAACA	232
<i>act</i> -R	AACTGACATCGGCCTTGAACTC	
<i>ast</i> -F	TCTCCATGCTTCCCTTCCACT	331
<i>ast</i> -R	GTGTAGGGATTGAAGAAGCCG	
<i>alt</i> -F	TGACCCAGTCCTGGCACGGC	442
<i>alt</i> -R	GGTGATCGATCACCACCAGC	
<i>fla</i> -F	TCCAACCGTYTGACCTC	608
<i>fla</i> -R	GMYTGGTTGCGRATGGT	
<i>exu</i> -F	(A/G)GACATGCACAACCTCTTCC	323
<i>exu</i> -R	GATTGGTATTGCC(C/T)TGCAA(C/G)	
<i>lip</i> -F	CA(C/T)CTGGT(T/G)CCGCTCAAG	247
<i>lip</i> -R	GT(A/G)CCGAACCAGTCGGAGAA	
<i>ahyB</i> -F	ACACGGTCAAGGAGATCAAC	513
<i>ahyB</i> -R	CGCTGGTGTGGCCAGCAGG	
<i>ser</i> -F	CACCGAAGTATTGGGTCAGG	350
<i>ser</i> -R	GGCTCATGCGTAACTCTGGT	
<i>gacT</i> -F	CTCCTGGAATCCCAAGTATCAG	237
<i>gacT</i> -R	GGCAGGTTGAACAGCAGTATCT	

置培养, 4 h 后用麦氏比浊仪测定各管的菌液浓度。同时, 在静置培养前后, 分别取 100 μ L 细菌培养液均匀涂在 TSA 平板上, 于 30 $^{\circ}$ C 静置培养 24 h, 观察记录细菌存活情况。

1.3.3 pH 对生长的影响

分别配制 pH 值为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 和 13.0 的 LB 肉汤, 然后按照 1:10 的比例接种菌株 ZJS18004 种子菌液, 每管 5 mL, 每个 pH 值设 3 管平行, 于 30 $^{\circ}$ C 静置培养, 4 h 后测定各管的菌液浓度。同时, 在静置培养前后, 分别取 100 μ L 细菌培养液均匀涂在 TSA 平板上, 于 30 $^{\circ}$ C 静置培养 24 h, 观察记录细菌存活情况。

1.3.4 盐度对生长的影响

分别配制盐度为 0‰、5‰、10‰、15‰、20‰、25‰、30‰、35‰、40‰、45‰、50‰ 的 LB 肉汤, 然后按照 1:10 的比例接种菌株 ZJS18004 种子菌液, 每管 5 mL, 每个盐度设 3 管平行, 于 30 $^{\circ}$ C 静置培养, 4 h 后测定各管的菌液浓度。同时, 在静置培养前后, 分别取 100 μ L 细菌培养液均匀涂在 TSA 平板上, 于 30 $^{\circ}$ C 静置培养 24 h, 观察记录细菌存活情况。

1.4 细菌毒力因子分析

1.4.1 溶血性、蛋白酶与脂肪酶活性分析

参照何山等^[22]的方法, 用 0.65% 的无菌生理盐水将菌株 ZJS18004 的种子菌液浓度调整至 1.5×10^8 CFU/mL 作为实验菌液, 分别取 1 μ L 实验菌液点种在 5% 绵羊血平板、含 1% 脱脂牛奶的 TSA 平板和含 1% 吐温-80 的 TSA 平板, 设 3 个平行, 30 $^{\circ}$ C 静置培养 36 h, 测定溶血圈、蛋白和脂肪水解圈的直径。

1.4.2 毒力基因分析

参照 Nawaz 等^[23]设计合成维氏气单胞菌的气溶素基因(*aer*)、细胞毒性肠毒素基因(*act*)、热稳定性肠毒素基因(*ast*)、热不稳定性肠毒素

基因(*alt*)、鞭毛蛋白基因(*fla*)、核酸酶基因(*exu*)、磷脂酶基因(*lip*)、弹性蛋白酶基因(*ahyB*)、丝氨酸蛋白酶基因(*ser*)和胆固醇酰基转移酶基因(*gacT*)等 10 种毒力基因的 PCR 引物(表 1)。以菌株 ZJS18004 的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后送广州艾基生物技术有限公司进行测序验证。

1.5 菌株的致病力分析

1.5.1 菌株在不同浓度时的致病力

将菌株 ZJS18004 接种于 LB 肉汤, 30 $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养 20 h, 测定菌液浓度, 在 1.0 m \times 1.0 m \times 0.5 m 的水族箱中进行浸泡感染实验, 水温控制在 23 $^{\circ}$ C。实验分为 6 组, 每组实验鱼 30 尾, 其中 5 个感染组将大口黑鲈分别置于细菌浓度为 6.00×10^7 、 3.00×10^7 、 1.50×10^7 、 7.50×10^6 、 3.75×10^6 CFU/mL 的水体中进行长期浸泡感染, 对照组的水体中不加菌液, 感染后连续饲养 9 d, 每天换水量约为 10%, 观察、记录实验鱼的发病症状和死亡情况, 并从濒死鱼病灶处进行细菌再分离和鉴定, 同时固定对照组和实验组的肌肉、肝、脾和肾组织进行组织病理观察。此外, 在感染过程中, 挑取人工感染后 3 尾出现症状的病鱼与 30 尾健康鱼混养在一起, 连续饲养 9 d, 观察、记录实验鱼的感染、发病症状和死亡情况。

1.5.2 菌株在不同温度时的致病力

分别设置 3 种不同的水温(23、28 和 33 $^{\circ}$ C), 采用相同的细菌浓度(3.75×10^6 CFU/mL)进行浸泡感染, 同时分别设置不同水温下的对照组, 每组实验鱼 30 尾, 连续饲养 9 d, 观察、记录实验鱼的发病死亡情况。

1.6 药物敏感性试验

1.6.1 抗菌药物的敏感性试验

参照说明书, 用 0.65% 无菌生理盐水将菌株 ZJS18004 的菌液浓度调整为 1.5×10^8 CFU/mL,

吸取 10 μ L 加入 12 mL MH 肉汤中混匀制成悬菌液, 然后接种到定制的冻干型 96 孔药板中, 100 μ L/孔, 同时设不接种细菌的 MH 肉汤阴性对照和无药有菌的阳性对照各 2 个孔。用大肠埃希菌 ATCC 25922 作为质控菌株, 监测定制药板的药物浓度可信度。将接种好的药板置于湿盒中, 35 $^{\circ}$ C 孵育 24 h, 观察记录结果。参照美国临床和实验室标准协会(CLSI)标准^[17], 判断菌株 ZJS18004 对各种药物的敏感性。

1.6.2 消毒剂的敏感性试验

采用二倍稀释法, 用 0.65% 无菌生理盐水将受试的水产消毒剂稀释成不同浓度(均以有效成分计); 使用圆底 96 孔板, 每孔分别加入 100 μ L 已稀释好的不同浓度的消毒剂溶液, 再加入 100 μ L 制备好的菌悬液, 使最终接种浓度为 $(0.5-1.0) \times 10^5$ CFU/mL; 同时设不接种细菌的 MH 肉汤阴性对照和无药有菌的阳性对照各 2 个孔。将接种好的药板置于湿盒中, 35 $^{\circ}$ C 孵育 24 h。孵育结束后从所有无细菌生长的各孔中分别取 100 μ L, 涂布于 TSA 平板上, 30 $^{\circ}$ C 恒温静置培养 24 h, 确认是否有菌存活。若阳性对照孔细菌生长良好, 阴性对照孔无菌生长, 则无细菌生长的孔内所含最低药物浓度即为最低抑菌浓度(MIC), 平板上无菌生长的最低消毒剂浓度为最低杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)。

2 结果与分析

2.1 细菌分类鉴定

2.1.1 细菌的形态与生理生化特性

从患白皮病的大口黑鲈的尾部皮下肌肉分离得到优势菌株 ZJS18004, 革兰氏阴性, 在 RS 平板上呈亮黄色, 在 TSA 平板上呈乳白色, 菌落湿润光滑、边缘整齐且中央微凸。通过透

射电镜观察菌体呈短杆状(1 720 nm \times 900 nm)、单鞭毛、两端钝圆(图 1)。采用细菌鉴定分析仪对菌株 ZJS18004 和 2 株维氏气单胞菌模式菌株进行 47 项生理生化指标分析, 结果显示, 菌株 ZJS18004 与 2 株模式菌株的 42 项生理生化指标完全相同(表 2), 初步判定其为维氏气单胞菌。

2.1.2 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列分析

PCR 扩增获得菌株 ZJS18004 的 16S rRNA 和 *gyrB* 基因片段大小分别为 1 453 bp (GenBank 登录号为 OK036711)和 1 073 bp (GenBank 登录号为 OK044148)。BLAST 结果显示 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列与维氏气单胞菌的相似性最高, 分别达到 99.72%和 99.81%。分别根据 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列构建系统发育树, 结果显示菌株 ZJS18004 与维氏气单胞菌聚为一簇(图 2), 进一步确定菌株 ZJS18004 为维氏气单胞菌。

2.2 细菌生长特性分析

菌株 ZJS18004 在 30 $^{\circ}$ C 时的生长曲线(图 3)显示 0-1 h 是迟缓期, 1-5 h 是对数期。菌株 ZJS18004 生长状况检测结果显示, 在温度 10-45 $^{\circ}$ C 范围内均可生长, 最适生长温度为 30 $^{\circ}$ C

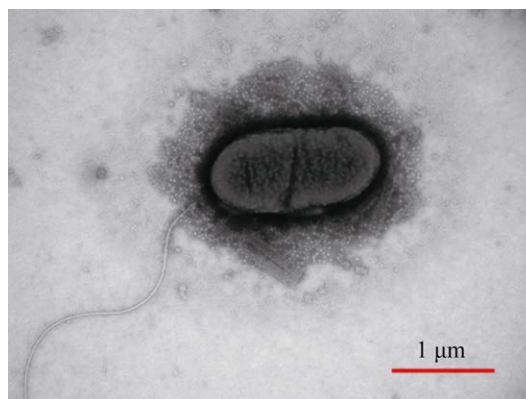


图 1 透射电镜下的菌株 ZJS18004 形态
Figure 1 Morphology of strain ZJS18004 observed by transmission electron microscopy.

表 2 菌株 ZJS18004 的部分生理生化特征

Table 2 Some physiological and biochemical characteristic of strain ZJS18004

Test item	ATCC 51208	ATCC 49904	ZJS 18004	Test item	ATCC 51208	ATCC 49904	ZJS 18004
丙氨酸-苯丙氨酸-脯氨酸芳胺酶 Ala-Phe-Pro-arylamidase	+	-	+	侧金盏花醇 Adonitol	-	-	-
吡咯烷基芳胺酶 L-pyrrolydonyl-arylamidase	+	-	-	阿拉伯醇 L-arabitol	-	-	-
纤维二糖 D-cellobiose	+	-	-	β -半乳糖苷酶 β -galactosidase	+	+	+
H ₂ S 产生 H ₂ S production	-	-	-	β -N-乙酰葡萄糖苷酶 Acetyl- β -glucosaminidase	+	+	+
谷氨酰芳胺酶 Glutamyl arylamidase pNA	-	-	-	葡萄糖 D-glucose	+	+	+
γ -谷氨酰转移酶 Glutamyl- γ -transferase	-	-	+	葡萄糖发酵 Glucose fermentation	+	+	+
β -葡萄糖苷酶 β -glucosidase	-	-	-	D-麦芽糖 D-maltose	+	+	+
D-甘露醇 D-mannitol	+	+	+	D-甘露糖 D-mannose	+	+	+
β -木糖苷酶 β -xylosidase	-	-	-	β -丙氨酸芳胺酶 β -alanine arylamidase	-	-	-
L-脯氨酸芳胺酶 L-proline arylamidase	+	+	+	脂酶 Lipase	+	+	+
古老糖 Palatinose	-	-	-	酪氨酸芳胺酶 Tyrosine arylamidase	+	+	+
尿素酶 Urease	-	-	-	D-山梨醇 D-sorbitol	-	-	-
蔗糖 Sucrose	+	+	+	D-塔格糖 D-tagatose	-	-	-
D-海藻糖 D-trehalose	+	+	+	柠檬酸盐(钠) Citrate (sodium)	-	-	+
丙二酸盐 Malonate	-	-	-	5-酮-D-葡萄糖苷 5-keto-D-gluconate	-	-	-
乳酸盐产碱 L-lactate alkalization	-	-	-	α -葡萄糖 α -glucosidase	-	-	-
琥珀酸盐产碱 Succinate alkalization	+	+	+	N-乙酰- β -半乳糖氨酶 β -N-acetyl-galactosaminidase	-	-	-
α -半乳糖苷酶 α -galactosidase	-	-	-	磷酸酶 Phosphatase	-	+	-
氨基乙酰芳胺酶 Glycine arylamidase	+	+	+	鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-	-	-
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	-	-	-	组氨酸同化 L-histidine assimilation	-	-	-
COURMARATE	+	+	+	β -葡萄糖苷酸酶 β -glucuronidase	-	-	-
O/129 耐受 O/129 resistance	+	+	+	谷氨酸-甘氨酸-精氨酸芳胺酶 Glu-Gly-Arg-arylamidase	+	+	+
L-苹果酸盐同化 L-malate assimilation	-	-	-	ELLMAN	+	+	+
L-乳酸盐同化 L-lactate assimilation	-	-	-				

注: +: 阳性; -: 阴性

Note: +: Positive; -: Negative.

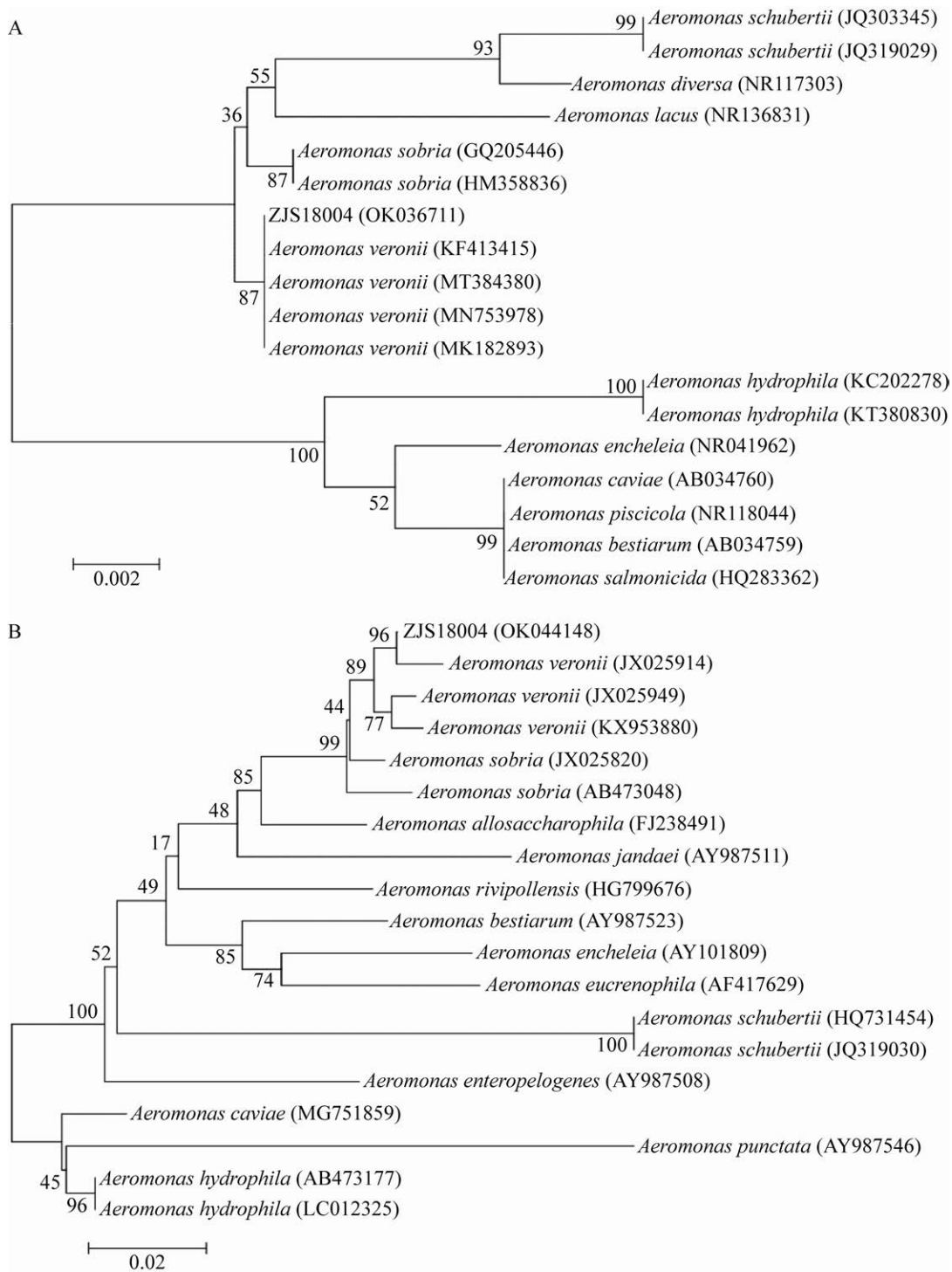


图2 基于菌株 ZJS18004 和其他气单胞菌的 16S rRNA 基因序列(A)和 *gyrB* 基因序列(B)构建的系统发育树。节点处的数字为 bootstrap 值; 括号内的数字为 GenBank 登录号; 标尺下方数字代表遗传距离

Figure 2 Phylogenetic trees based on 16S rRNA and *gyrB* gene sequences of strain ZJS18004 and other *Aeromonas* strains. The numbers at the branch points represent the bootstrap values. The numbers in parentheses are GenBank accession numbers. The number under the scale bar indicates the genetic distance.

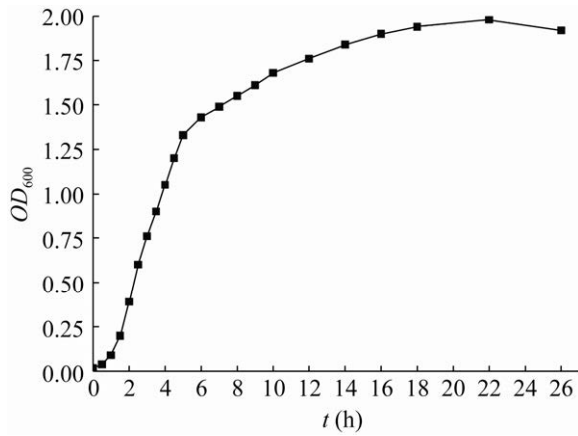


图3 菌株 ZJS18004 在 30 °C 时的生长曲线
Figure 3 Growth curve of strain ZJS18004 at 30 °C.

(图 4); 在 pH 4.0–10.0 范围内均可生长, 最适 pH 值为 8.0 (图 5); 在盐度 0–45‰ 范围内均可生长, 最适生长盐度为 5‰ (图 6)。

2.3 细菌毒力因子分析

菌株 ZJS18004 在相应的平板上经 30 °C 恒温静置培养 36 h 后, 分别出现明显的溶血圈、蛋白和脂肪水解圈(图 7), 直径分别为(0.75±0.05) cm、

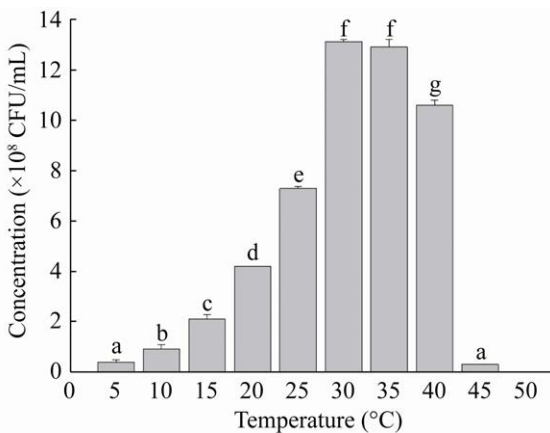


图4 温度对菌株 ZJS18004 生长的影响 不同小写字母表示组间具有显著性差异($P<0.05$)

Figure 4 Effect of temperature on growth of strain ZJS18004. Different lowercase letters indicated significant differences among different groups ($P<0.05$).

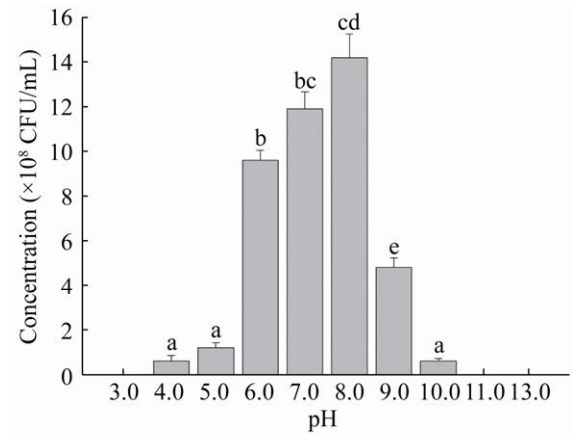


图5 pH 对菌株 ZJS18004 生长的影响 不同小写字母表示组间具有显著性差异($P<0.05$)

Figure 5 Effect of pH on growth of strain ZJS18004. Different lowercase letters indicated significant differences among different groups ($P<0.05$).

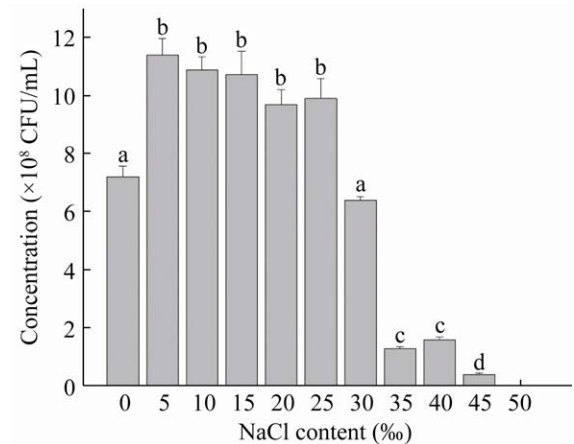


图6 盐度对菌株 ZJS18004 生长的影响 不同小写字母表示组间具有显著性差异($P<0.05$)

Figure 6 Effect of salinity on growth of strain ZJS18004. Different lowercase letters indicated significant differences among different groups ($P<0.05$).

(1.76±0.08) cm 和(1.31±0.06) cm, 证明菌株 ZJS18004 具有溶血性、蛋白酶与脂肪酶活性。

毒力基因的 PCR 检测结果(图 8)显示, 菌株 ZJS18004 携带 6 种毒力基因, 包括气溶素基因(*aer*)、细胞毒性肠毒素基因(*act*)、鞭毛蛋白

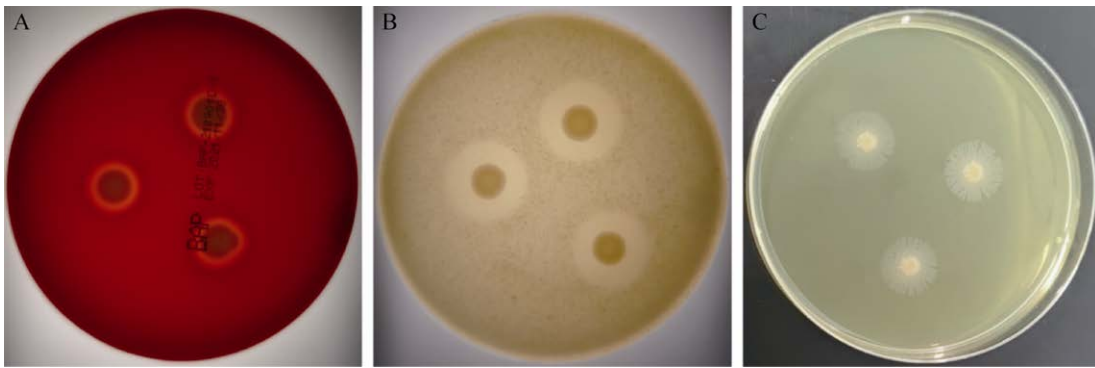


图 7 菌株 ZJS18004 毒力因子表型特征 A: 溶血活性; B: 蛋白酶活性; C: 脂肪酶活性

Figure 7 Phenotypic characteristics of virulence factors for strain ZJS18004. A: Hemolytic activity; B: Protease activity; C: Lipase activity.

结构基因(*fla*)、弹性蛋白酶基因(*ahyB*)、核酸酶基因(*exu*)和脂肪酶基因(*lip*)。

2.4 菌株致病性分析

浸泡感染结果(图 9)显示, 在 23 °C 时, 在感染后第 1 天, 6.00×10^7 CFU/mL 组的大口黑鲈全部出现急性死亡, 表现为体色暗黑, 鳃丝肿胀粘液多, 部分皮肤发白; 其他感染组的鱼在第 4 天开始出现皮肤发白和死亡, 至第 9 天, 所有感染组的死亡率均达到 100%。浸泡感染的大口黑鲈苗种出现皮肤发白或呈毛絮状, 与自然发病的症状相类似(图 10), 并能从濒死鱼的浅层肌肉分离出同样的细菌。采用病鱼与健康鱼混养模拟自然感染, 实验鱼在感染后第 4 天

也出现皮肤发白和死亡现象, 第 7 天死亡率达 100%。在整个实验过程中, 对照组的大口黑鲈未出现发病症状, 未出现死亡。

组织病理结果(图 11)显示, 与对照组大口黑鲈相比, 感染组肌肉组织出现局部溶解(图 11B); 肝脏中少量肝细胞弥散性坏死, 胞核固缩深染, 少量炎性细胞浸润(图 11D); 脾脏组织内细胞排列相对疏松, 存在较大的坏死灶, 坏死细胞胞核固缩深染或碎裂溶解(图 11F); 肾

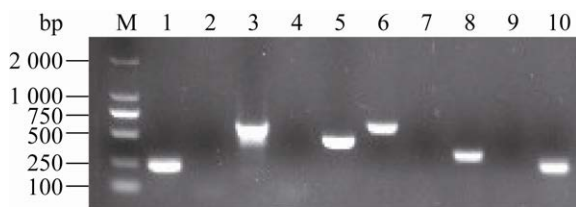


图 8 菌株 ZJS18004 毒力基因 PCR 扩增结果

Figure 8 PCR amplification results of virulence genes in strain ZJS18004. M: DNA Marker; 1: *act*; 2: *alt*; 3: *ahyB*; 4: *gacT*; 5: *aer*; 6: *fla*; 7: *ser*; 8: *exu*; 9: *ast*; 10: *lip*.

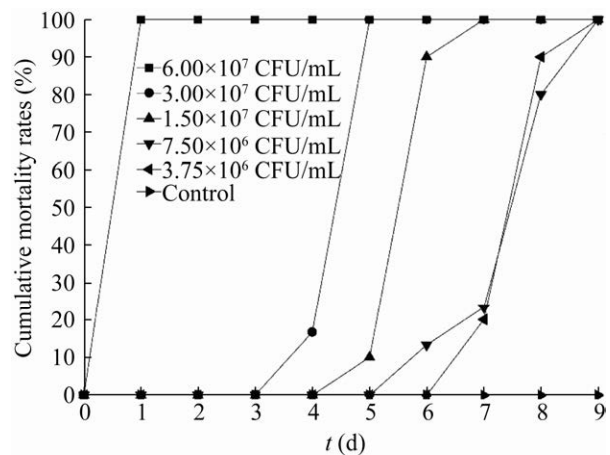


图 9 在 23 °C 时菌株 ZJS18004 人工感染的累积死亡率

Figure 9 Cumulative mortality rates of largemouth bass artificial infected with strain ZJS18004 at 23 °C.



图 10 大口黑鲈白皮病症状 A: 健康大口黑鲈; B: 自然发病大口黑鲈; C: 人工感染发病大口黑鲈
Figure 10 Clinical signs of largemouth bass with white skin disease. A: The healthy largemouth bass; B: The natural infected largemouth bass; C: The artificial infected largemouth bass.

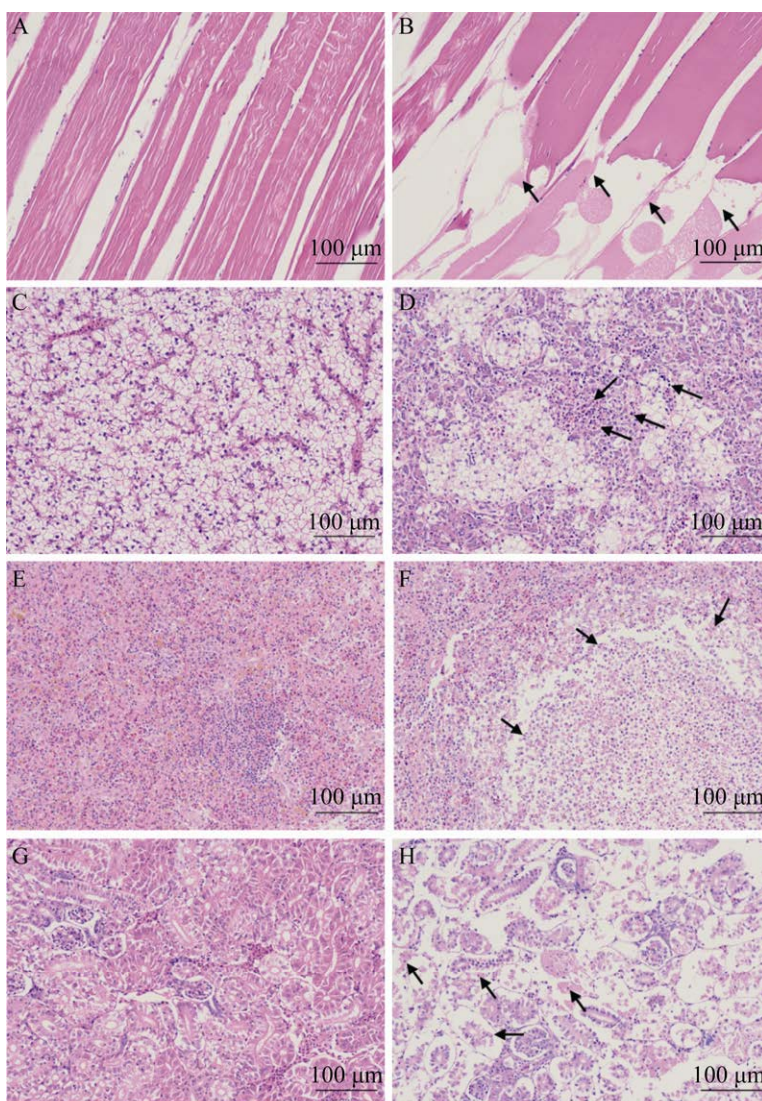


图 11 菌株 ZJS18004 感染大口黑鲈的组织病理变化 A、C、E 和 G: 对照组的肌肉、肝、脾和肾;
B、D、F 和 H: 感染组的肌肉、肝、脾和肾

Figure 11 Histopathological changes in largemouth bass infected with strain ZJS18004. A, C, E and G: Muscle, liver, spleen, and kidney from control group; B, D, F and H: Muscle, liver, spleen, and kidney from infected group.

小管广泛损伤, 肾小管上皮细胞脱离基底膜且排列紊乱, 并伴有上皮坏死(图 11H)。

不同温度条件下浸泡感染结果(图 12)显示, 感染后第 7 天开始, 实验鱼开始发病死亡, 至第 9 天死亡率达 100%, 并且随着水温的递增, 死亡相对更快, 出现的症状与自然发病的相似, 也能从濒死鱼的浅层肌肉分离出同样的细菌。

2.5 药敏试验

菌株 ZJS18004 对 10 种国标抗菌渔药的敏感性测试结果(表 3)显示, 菌株 ZJS18004 对盐酸多西环素(DOX)、硫酸新霉素(NEO)、甲砒霉素(THI)、氟苯尼考(FFC)这 4 种药物敏感, 对环丙沙星(CIP)中等耐药, 对恩诺沙星(ENR)、磺胺间甲氧嘧啶(SMM)、复方磺胺二甲嘧啶(SM2/TMP)、复方磺胺甲噁唑(SXT)、氟甲喹(FLU)这 5 种药物均表现为耐药。

菌株 ZJS18004 对 6 种常见水产消毒药物的敏感性测试结果(表 4)显示, 同一药物对菌株 ZJS18004 的最小抑菌浓度和最小杀菌浓度是相同的, 即 MIC/MBC 的值均为 1。三氯异氰尿酸

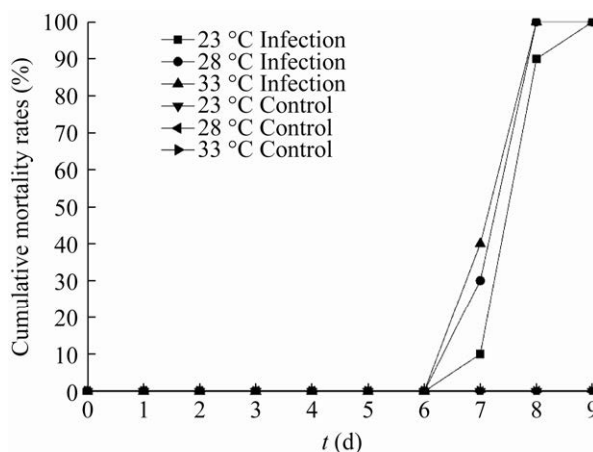


图 12 在不同温度时菌株 ZJS18004 人工感染造成的累积死亡率

Figure 12 Cumulative mortality rates of largemouth bass infected with strain ZJS18004 at different water temperatures.

对菌株 ZJS18004 的体外抑杀菌效果最好, MIC 和 MBC 值均为 0.56 mg/L, 其次为苯扎溴铵(4.23 mg/L), 然后是戊二醛苯扎溴铵(4.76 mg/L)、蛋氨酸碘(60.00 mg/L)、聚维酮碘(240.31 mg/L)和浓戊二醛(240.31 mg/L)。

表 3 菌株 ZJS18004 对 10 种抗菌药物的敏感性

Table 3 Susceptibility of strain ZJS18004 to 10 kinds of antimicrobial agents

抗菌药物 Antimicrobial agents	MIC 值 MIC value (mg/L)	敏感性 Susceptibility
恩诺沙星 Enrofloxacin	8	R
环丙沙星 Ciprofloxacin	2	I
磺胺间甲氧嘧啶 Sulfamonomethoxine	>512	R
复方磺胺二甲嘧啶 Sulfadimethoxypyrimidine/Trimethoprim	>20/4	R
复方磺胺甲噁唑 Sulfamethoxazole/Trimethoprim	>76/4	R
盐酸多西环素 Doxycycline hyclate	4	S
硫酸新霉素 Neomycin sulphate	≤1	S
甲砒霉素 Thiamphenicol	≤2	S
氟苯尼考 Florfenicol	≤1	S
氟甲喹 Flumequine	>32	R

注: R: 耐药; I: 中介; S: 敏感

Note: R: Resistant; I: Intermediate; S: Susceptible.

表 4 菌株 ZJS18004 对 6 种水产消毒剂的敏感性

Table 4 Sensitivity of strain ZJS18004 to 6 kinds of aquatic disinfectants

消毒剂 Disinfectant	MIC 值 MIC value (mg/L)	MBC 值 MIC value (mg/L)	MIC/MBC
三氯异氰尿酸 Trichloroisocyanuric acid	0.56	0.56	1
戊二醛苯扎溴铵 Glutaraldehyde benzalkonium bromide	4.76	4.76	1
聚维酮碘 Povidone iodine	240.31	240.31	1
苯扎溴铵 Benzalkonium bromide	4.23	4.23	1
蛋氨酸碘 Iodine methionine	60.00	60.00	1
戊二醛 Glutaraldehyde	240.31	240.31	1

3 讨论与结论

本研究从患白皮病的大口黑鲈分离到菌株 ZJS18004, 结合形态观察、生理生化指标、16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列分析等结果鉴定菌株 ZJS18004 为维氏气单胞菌。维氏气单胞菌是一种重要的人-畜-鱼共患病的条件性致病菌, 广泛存在于各种环境中, 特别是淡水养殖池塘, 对水产养殖业的危害呈显著上升趋势。近年, 已有维氏气单胞菌感染大口黑鲈引起发病死亡报道^[13-16], 但病鱼症状主要是体表充血或出血或溃烂、肛门红肿、内脏出血或肿大, 而维氏气单胞菌 ZJS18004 引起大口黑鲈苗种的主要临床症状为皮肤发白或呈毛絮状, 体表无明显充血或出血, 内脏也未见出血或肿大症状。症状不同可能是由于菌株之间的生物学特性存在差异, 继而也可能导致对药物敏感性的不同。基于此, 本研究针对菌株 ZJS18004 生长特性、毒力因子和致病性等方面开展详细的分析, 同时进行抗菌药物的筛选试验, 旨在为大口黑鲈苗种白皮病的深入研究与精准用药提供参考。

与已报道的鱼源维氏气单胞菌的生长特性相似^[24-26], 菌株 ZJS18004 具有广温和广盐特性, 在 10–45 °C 和 0–45‰ 的盐度下均能生长。采用人工浸泡感染或病鱼与健康鱼混养, 均能引起健康大口黑鲈感染发病, 与自然发病鱼的

症状相似, 进一步确认菌株 ZJS18004 是大口黑鲈苗种白皮病的主要病原菌。维氏气单胞菌的感染和水温密切相关, 大多数都发生在高温时节, 主要流行季节为 5–9 月^[5-7]。在本试验中, 不同的水温(23、28 和 33 °C)条件下, 菌株 ZJS18004 毒力的强弱与水温高低相关。菌株毒力与生长、代谢及毒力基因表达等多因素相关^[7], 菌株 ZJS18004 在高温时毒力较强的详细机制仍待进一步研究。

气单胞菌致病过程主要包括粘附-侵袭-体内增殖及毒素的分泌等, 菌株毒力的强弱与多种毒力因子的分泌、表达和调控等紧密相关。溶血素、蛋白酶和脂肪酶是气单胞菌的重要毒力因子, 在病原菌的侵袭、繁殖过程中发挥至关重要作用。罗志飞等^[27]报道嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophilia*)强毒株具有溶血和蛋白酶活性, 而弱毒株不溶血、不溶蛋白。斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)^[28]、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)^[29]和青虾(*Macrobrachium nipponense*)^[30]源的致病性维氏气单胞菌胞外产物都具有溶血、蛋白酶和脂肪酶活性, 进一步比较分析发现菌株毒力强弱与溶血、蛋白酶活性大小相关。与以上研究结果相似, 菌株 ZJS18004 也具有溶血性、蛋白酶和脂肪酶活性, 并且表现出较强的致病力。这些研究表明, 溶血活性、蛋白酶和脂肪酶活性在维氏气单胞菌致病过程

中发挥关键作用。气单胞菌的致病力可能与携带毒力基因的种类和数量呈一定的相关性^[23]。Nawaz 等^[23]建立了气单胞菌的 10 种重要毒力基因的 PCR 检测方法, 分析发现 81 株斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)源的维氏气单胞菌携带毒力基因的数量和种类存在明显差异, 其中携带 *lip*、*gcaT*、*ser*、*fla*、*aer* 和 *act* 基因的菌株比例较高, 达到 78%–97%, 却未检测到 *exu* 和 *ahyB* 基因。参照 Nawaz 等^[23]的方法, 一些研究者分析了鱼源致病性维氏气单胞菌对这 10 种毒力基因的携带情况, 结果发现草鱼^[31]源致病性维氏气单胞菌携带 6 种毒力基因(*act*、*aer*、*lip*、*exu*、*fla*、*ser*), 鳙(*Aristichthys nobilis*)^[32]源维氏气单胞菌携带 5 种毒力基因(*act*、*aer*、*lip*、*fla*、*ahyB*), 可知不同菌株携带的毒力基因的数量或种类并不完全一致。另外一些研究只检测了部分毒力基因, 但也清晰地发现鲫(*Carassius gibelio*)^[33]、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)^[34]和金鱼(*Carassius auratus*)^[35]源的致病性维氏气单胞菌携带毒力基因均存在差异。因此, 本研究采用相同的 PCR 方法检测菌株 ZJS18004 携带相关毒力基因的情况, 结果显示菌株 ZJS18004 携带 *aer*、*act*、*fla*、*ahyB*、*exu*、*lip* 等 6 种毒力基因, 说明可能是多种毒力基因相互协同作用调控菌株毒力。菌株 ZJS18004 的毒力基因检测结果与具有溶血性、蛋白酶和脂肪酶活性毒力因子的表型分析和人工感染试验结果相一致, 表明具有较强的致病性。气溶素是气单胞菌主要毒力因子, 由 *aer* 基因编码, 具有很强的溶血性、细胞毒性和肠毒性, 可裂解宿主细胞^[36]。致病性维氏气单胞菌 *aer* 基因的携带率高达 90%以上^[23]。细胞毒性肠毒素能够与宿主上皮细胞作用诱导产生过量的一氧化氮和活性氧, 严重损害细胞膜^[37]。鞭毛蛋白是气单胞菌的重要结构, 促进细菌的运动、粘附

和定殖^[38]。胞外蛋白酶主要破坏宿主的免疫系统, 有助于细菌的侵袭能力, 也为细菌的生长繁殖提供营养, 增强致病力^[39]。这些研究初步说明了维氏气单胞菌的致病性与多种毒力因子的协同作用相关, 但是不同地域或宿主来源的菌株可能携带毒力基因的种类、数量或毒力基因的表达量等都存在差异。关于维氏气单胞菌的致病性与毒力基因的相关性尚不清晰, 有待进一步研究解析。

目前水产养殖准许使用的抗菌药物主要有磺胺二甲嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶钠、磺胺甲噁唑、氟苯尼考、恩诺沙星、氟甲喹、甲砒霉素、硫酸新霉素和盐酸多西环素等 12 种。本研究测定了菌株 ZJS18004 对 10 种国标抗菌药物的敏感性, 结果显示对氟苯尼考、甲砒霉素、盐酸多西环素和硫酸新霉素这 4 种药物敏感, 但对磺胺二甲嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶新霉素、磺胺甲噁唑、恩诺沙星和氟甲喹均表现为耐药, 与其他研究者从大口黑鲈^[13-16]和其他鱼类^[31-35]分离的致病性维氏气单胞菌的药敏试验结果均有所差异, 这可能与不同宿主来源、地域、养殖环境及养殖者的用药习惯有关。6 种常见水产消毒药物对菌株 ZJS18004 具有一定的体外抑杀菌效果, 并且同一药物的最小抑菌浓度和最小杀菌浓度相同, 其中三氯异氰尿酸效果最好, 其次是苯扎溴铵。以上结果说明, 国家批准使用的氟苯尼考、甲砒霉素、盐酸多西环素和硫酸新霉素等抗菌药和三氯异氰尿酸、苯扎溴铵、戊二醛苯扎溴铵等消毒剂对菌株 ZJS18004 都具有较好的杀灭作用, 这些药物可以用于大口黑鲈苗种白皮病的防控。

综上所述, 本研究确定维氏气单胞菌是大口黑鲈苗种白皮病的主要病原菌, 病原菌的致病性与生长特性、毒力基因、水温等密切相关, 但是其致病机制仍待进一步研究。目前, 国家

批准使用的氟苯尼考、甲矾霉素、盐酸多西环素和硫酸新霉素等抗菌药和三氯异氰尿酸、苯扎溴铵等消毒剂可用于大口黑鲈苗种白皮病的精准防控。

REFERENCES

- [1] 苏胜彦, 张林兵, 李海洋, 郜灿, 贺鑫晋, 田灿, 李建林, 王美垚, 唐永凯. 基于微卫星标记的大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 原种和养殖群体遗传多样性和结构分析[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2020, 46(6): 687-698
Su SY, Zhang LB, Li HY, Gao C, He XJ, Tian C, Li JL, Wang MY, Tang YK. Genetic diversity and structure analyses of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) original and cultured populations based on microsatellite markers[J]. Journal of Zhejiang University: Agriculture and Life Sciences, 2020, 46(6): 687-698 (in Chinese)
- [2] Sun CF, Li J, Dong JJ, Niu YC, Hu J, Lian JM, Li WH, Li J, Tian YY, Shi Q, et al. Chromosome-level genome assembly for the largemouth bass *Micropterus salmoides* provides insights into adaptation to fresh and brackish water[J]. Molecular Ecology Resources, 2021, 21(1): 301-315
- [3] 农业农村部渔业渔政管理局. 2021 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2021: 33
Bureau of Fisheries of Ministry of Agriculture and Rural Affairs. 2021 China Fishery Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2021: 33 (in Chinese)
- [4] 夏焱春, 曹铮, 蔺凌云, 潘晓艺, 姚嘉赟, 刘忆瀚, 尹文林, 沈锦玉. 大口黑鲈主要病害研究进展[J]. 中国动物检疫, 2018, 35(9): 72-76
Xia YC, Cao Z, Lin LY, Pan XY, Yao JY, Liu YH, Yin WL, Shen JY. Research progress on main diseases of largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. China Animal Health Inspection, 2018, 35(9): 72-76 (in Chinese)
- [5] Ghenghesh KS, Ahmed SF, El-Khalek RA, Al-Gendy A, Klena J. *Aeromonas*-associated infections in developing countries[J]. Journal of Infection in Developing Countries, 2008, 2(2): 81-98
- [6] Silver AC, Williams D, Faucher J, Horneman AJ, Gogarten JP, Graf J. Complex evolutionary history of the *Aeromonas veronii* group revealed by host interaction and DNA sequence data[J]. PLoS One, 2011, 6(2): e16751
- [7] 康元环, 张冬星, 杨滨瑾, 张贺亮, 孙武文, 单晓枫, 钱爱东. 维氏气单胞菌最新研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2018, 34(5): 452-459, 465
Kang YH, Zhang DX, Yang BT, Zhang HL, Sun WW, Shan XF, Qian AD. Latest research progress on *Aeromonas veronii*[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2018, 34(5): 452-459, 465 (in Chinese)
- [8] 张德锋, 刘礼辉, 李宁求, 任燕, 林强, 石存斌, 吴淑勤. 我国南方地区鱼源气单胞菌不同种类的流行特征[J]. 水产科学, 2015, 34(11): 673-682
Zhang DF, Liu LH, Li NQ, Ren Y, Lin Q, Shi CB, Wu SQ. Epidemic characteristics of different species of *Aeromonas* in diseased fish in Southern China[J]. Fisheries Science, 2015, 34(11): 673-682 (in Chinese)
- [9] Uzun E, Ogut H. The isolation frequency of bacterial pathogens from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the Southeastern Black Sea[J]. Aquaculture, 2015, 437: 30-37
- [10] 邓国成, 谢骏, 李胜杰, 白俊杰, 陈昆慈, 马冬梅, 江小燕, 劳海华. 大口黑鲈病毒性溃疡病原的分离和鉴定[J]. 水产学报, 2009, 33(5): 871-877
Deng GC, Xie J, Li SJ, Bai JJ, Chen KC, Ma DM, Jiang XY, Lao HH. Isolation and preliminary identification of the pathogen from largemouth bass ulcerative syndrome[J]. Journal of Fisheries of China, 2009, 33(5): 871-877 (in Chinese)
- [11] 马冬梅, 邓国成, 白俊杰, 李胜杰, 江小燕, 杨小静. 大口黑鲈肝脾肿大病原研究[J]. 中国水产科学, 2011, 18(3): 654-660
Ma DM, Deng GC, Bai JJ, Li SJ, Jiang XY, Yang XJ. Pathogen of disease characterized by swollen liver and spleen in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(3): 654-660 (in Chinese)
- [12] Ma DM, Deng GC, Bai JJ, Li SJ, Yu LY, Quan YC, Yang XJ, Jiang XY, Zhu ZM, Ye X. A strain of *Siniperca chuatsi* rhabdovirus causes high mortality among cultured largemouth bass in South China[J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2013, 25(3): 197-204
- [13] 龙波, 王均, 贺扬, 赵敏, 王二龙, 崔静雯, 邓绿洲, 刘韬, 曾宇鲲, 汪开毓, 等. 加州鲈源维氏气单胞菌的分离、鉴定及致病性[J]. 中国兽医学报, 2016, 36(1): 48-55
Long B, Wang J, He Y, Zhao M, Wang EL, Cui JW, Deng LZ, Liu T, Zeng YK, Wang KY, et al. Isolation, identification and pathogenicity of *Aeromonas veronii*

- isolated from *Micropterus salmoides*[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2016, 36(1): 48-55 (in Chinese)
- [14] 赵武义. 加州鲈源维氏气单胞菌的鉴定与分析[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2018
Zhao WY. Identification and whole genome sequencing of *Aeromonas veronii* from *Micropterus salmoides*[D]. Ya'an: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2018 (in Chinese)
- [15] 杨超, 董浚键, 刘志刚, 孙成飞, 赵飞, 叶星. 大口黑鲈源维氏气单胞菌的分离鉴定[J]. 南方水产科学, 2021, 17(3): 54-61
Yang C, Dong JJ, Liu ZG, Sun CF, Zhao F, Ye X. Isolation and identification of *Aeromonas veronii* from diseased *Micropterus salmoides*[J]. South China Fisheries Science, 2021, 17(3): 54-61 (in Chinese)
- [16] Pei C, Song HL, Zhu L, Qiao D, Yan Y, Li L, Zhao XL, Zhang J, Jiang XY, Kong XH. Identification of *Aeromonas veronii* isolated from largemouth bass *Micropterus salmoides* and histopathological analysis[J]. Aquaculture, 2021, 540: 736707
- [17] Clinical and Laboratory Standard Institute. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria: M45A-A2[M]. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010: 12-13
- [18] Borrell N, Acinas SG, Figueras MJ, Martínez-Murcia AJ. Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1997, 35(7): 1671-1674
- [19] Yáñez MA, Catalán V, Apráiz D, Figueras MJ, Martínez-Murcia AJ. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(Pt 3): 875-883
- [20] 莫金凤, 姜兰, 吴灶和. 乌鳢源舒伯特气单胞菌生物学特性及其药物敏感性分析[J]. 水产学报, 2016, 40(3): 484-494
Mo JF, Jiang L, Wu ZH. Biological characteristics and drug susceptibility of *Aeromonas schubertii* WL-4 isolated from snakehead[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(3): 484-494 (in Chinese)
- [21] Zhao F, He S, Tan AP, Guo XZ, Jiang L, Cui LF, Deng YT, Zhang RQ. Isolation, identification and character analysis of *Streptococcus dysgalactiae* from *Megalobrama terminalis*[J]. Journal of Fish Diseases, 2020, 43(2): 239-252
- [22] 何山, 谭爱萍, 姜兰, 赵飞, 刘付翠, 张瑞泉, 邓玉婷. 四株杂交鳢致病性舒伯特气单胞菌特性及致病性比较[J]. 微生物学通报, 2019, 46(10): 2630-2644
He S, Tan AP, Jiang L, Zhao F, Liu FC, Zhang RQ, Deng YT. Comparative on characteristics and pathogenicity of four strains of *Aeromonas schubertii* isolated from snakehead hybrid[J]. Microbiology China, 2019, 46(10): 2630-2644 (in Chinese)
- [23] Nawaz M, Khan SA, Khan AA, Sung K, Tran Q, Kerdahi K, Steele R. Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish[J]. Food Microbiology, 2010, 27(3): 327-331
- [24] 汪开毓, 范方玲, 肖丹, 牟巧凤, 黄锦炉. 鱼源维氏气单胞菌的生物特性和基因分型[J]. 中国兽医科学, 2011, 41(4): 367-374
Wang KY, Fan FL, Xiao D, Mou QF, Huang JL. Biological characteristics and genotyping of *Aeromonas veronii* from fish[J]. Chinese Veterinary Science, 2011, 41(4): 367-374 (in Chinese)
- [25] 单晓枫, 康元环, 夏京津, 龙继兵, 陈龙, 王惠, 曹亮, 孟庆峰, 钱爱东. 不同动物源性维氏气单胞菌生物学特性比较研究[J]. 中国兽医杂志, 2015, 51(3): 82-85
Shan XF, Kang YH, Xia JJ, Long JB, Chen L, Wang H, Cao L, Meng QF, Qian AD. Comparative studies on biological characteristics of *Aeromonas veronii* from different hosts[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2015, 51(3): 82-85 (in Chinese)
- [26] Chen F, Sun JF, Han ZR, Yang XJ, Xian JN, Lyu AJ, Hu XC, Shi HY. Isolation, identification and characteristics of *Aeromonas veronii* from diseased crucian carp (*Carassius auratus gibelio*)[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2742
- [27] 罗志飞, 胡萌, 陆承平, 刘永杰. 3株嗜水气单胞菌弱毒株的毒力相关特性分析[J]. 中国兽医学报, 2012, 32(1): 48-51, 57
Luo ZF, Hu M, Lu CP, Liu YJ. Virulence-associated characterization analysis of three strains of *Aeromonas hydrophila*[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2012, 32(1): 48-51, 57 (in Chinese)
- [28] 贺扬, 华丽, 汪开毓, 陈德芳, 王均, 王二龙, 王兴丽, 杨倩, 吴学婧, 何洁, 等. 高致病性维氏气单胞菌胞外产物对斑点鲷的致病性[J]. 水产学报, 2016, 40(3): 457-467
He Y, Hua L, Wang KY, Chen DF, Wang J, Wang EL, Wang XL, Yang Q, Wu XJ, He J, et al. Investigation on the pathogenicity of extracellular products of a high

- virulence *Aeromonas veronii* strain isolated from *Ictalurus punctatus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(3): 457-467 (in Chinese)
- [29] 任燕, 高彩霞, 曾伟伟, 王庆, 王英英, 李莹莹, 尹纪元, 常藕琴, 石存斌. 两株草鱼源维氏气单胞菌菌株的主要表型特征及致病力比较[J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41(2): 145-150
Ren Y, Gao CX, Zeng WW, Wang Q, Wang YY, Li YY, Yin JY, Chang OQ, Shi CB. Pathogenicity and main phenotype characteristics of two *Aeromonas veronii* isolated from diseased grass carp[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2019, 41(2): 145-150 (in Chinese)
- [30] 单晓枫, 张海月, 孙武文, 康元环, 陈龙, 张冬星, 安鼎杰, 田佳鑫, 钱爱东. 青虾源维氏气单胞菌胞外产物生物学特性及蛋白成分分析[J]. 中国兽医杂志, 2017, 53(4): 105-107, 124
Shan XF, Zhang HY, Sun WW, Kang YH, Chen L, Zhang DX, An DJ, Tian JX, Qian AD. Bioactivity analysis of extracellular products of *Aeromonas veronii* strain isolated from freshwater shrimp[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2017, 53(4): 105-107, 124 (in Chinese)
- [31] 高彩霞, 任燕, 王庆, 曾伟伟, 李莹莹, 王英英, 常藕琴, 石存斌, 张德锋, 方珍珍. 草鱼源致病性维氏气单胞菌的分离鉴定及药物敏感性分析[J]. 安徽农业大学学报, 2018, 45(3): 409-415
Gao CX, Ren Y, Wang Q, Zeng WW, Li YY, Wang YY, Chang OQ, Shi CB, Zhang DF, Fang ZZ. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of pathogenic *Aeromonas veronii* isolated from grass carp[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2018, 45(3): 409-415 (in Chinese)
- [32] 朱若林, 马腾, 陈露, 崔晓羽, 张嫣然, 孙创, 彭开松, 张晓华, 鲍传和. 鳙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
Zhu RL, Ma T, Chen L, Cui XY, Zhang YR, Sun C, Peng KS, Zhang XH, Bao CH. Isolation, identification and virulence genes detection of *Aeromonas veronii* from *Aristichthys nobilis*[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2017, 44(2): 229-233 (in Chinese)
- [33] Sun JJ, Zhang XJ, Gao XJ, Jiang Q, Wen Y, Lin L. Characterization of virulence properties of *Aeromonas veronii* isolated from diseased gibel carp (*Carassius gibelio*)[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(4): 496
- [34] 田浪, 温贵兰, 张升波, 杨佰启, 李昌红, 徐丽, 林汉卿, 管国丹. 斑点叉尾鮰源致病性维氏气单胞菌的分离与生物学特性鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(11): 3203-3210
Tian L, Wen GL, Zhang SB, Yang BQ, Li CH, Xu L, Lin HQ, Guan GD. Isolation and biological characterization of the pathogenic *Aeromonas veronii* from *Ictalurus punctatus*[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2018, 45(11): 3203-3210 (in Chinese)
- [35] Shameena SS, Kumar K, Kumar S, Kumar S, Rathore G. Virulence characteristics of *Aeromonas veronii* biovars isolated from infected freshwater goldfish (*Carassius auratus*)[J]. Aquaculture, 2020, 518: 734819
- [36] Abrami L, Fivaz M, Glauser PE, Sugimoto N, Zurzolo C, Van Der Goot FG. Sensitivity of polarized epithelial cells to the pore-forming toxin aerolysin[J]. Infection and Immunity, 2003, 71(2): 739-746
- [37] Krzymińska S, Mokracka J, Koczura R, Ćwiertnia A, Kaznowski A. *Aeromonas* spp.-mediated cell-contact cytotoxicity is associated with the presence of type III secretion system[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2012, 101(2): 243-251
- [38] Merino S, Wilhelms M, Tomás JM. Role of *Aeromonas hydrophila* flagella glycosylation in adhesion to Hep-2 cells, biofilm formation and immune stimulation[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(12): 21935-21946
- [39] Cascón A, Yugueros J, Temprano A, Sánchez M, Hernanz C, Luengo JM, Naharro G. A major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*[J]. Infection and Immunity, 2000, 68(6): 3233-3241