

赵怡阳, 阎晓菲, 王涛, 等. 新疆部分地区夏季患病白斑狗鱼维氏气单胞菌和温和气单胞菌的分离鉴定及抗生素敏感性研究 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (7): 115-124.

ZHAO Y Y, YAN X F, WANG T, et al. Isolation, identification, and antibiotic susceptibility of *Aeromonas veronii* and *Aeromonas sobria* from diseased *Esox lucius* during summer in certain regions of Xinjiang [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (7): 115-124.

新疆部分地区夏季患病白斑狗鱼维氏气单胞菌和温和气单胞菌的分离鉴定及抗生素敏感性研究

赵怡阳¹, 阎晓菲^{2,3*}, 王涛^{2,3}, 刘冲^{2,3}, 曹新玉^{2,3}

(1. 新疆农业大学动物医学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052;

2. 新疆农业大学生命科学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052;

3. 新疆极端环境生物生态适应与进化重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘要: 为探明新疆白斑狗鱼 (*Esox lucius*) 发生细菌性败血症的原因, 本研究调查了新疆呼图壁、乌鲁木齐米东区 5 个养殖鱼塘白斑狗鱼发病情况。通过对病鱼的临床症状与病理变化观察、高通量测序分析, 以及病原的分离鉴定、毒力基因检测和回归感染试验, 明确病原的种类及致病特点; 采用 Kirby-Bauer 纸片扩散法分析病原菌对 16 种抗生素的敏感性, 检测养殖场常用的氟苯尼考、恩诺沙星和多西环素最小抑菌浓度和最小杀菌浓度。结果: 在患病白斑狗鱼的脏器中分离出 4 个优势菌株, 分别是 3 株维氏气单胞菌 (*Aeromonas veronii*) 和 1 株温和气单胞菌 (*Aeromonas sobria*), 携带黏附素 (*ahal*)、细胞毒性肠毒素 (*act*)、丝氨酸蛋白酶 (*ahp*) 3 种毒力基因。人工回归感染后, 2 种病原菌混合感染对鱼的致病性损伤更严重, 半数致死量 (LD₅₀) 为 1.5×10⁵ CFU/mL。维氏气单胞菌对麦迪霉素、头孢噻吩以及喹诺酮类、氯霉素类、四环素类等 12 种抗生素敏感, 对复方新诺明、万古霉素、青霉素和新霉素 4 种抗生素耐药; 温和气单胞菌对万古霉素以及喹诺酮类、氯霉素类、四环素类等 13 种抗生素敏感, 对头孢噻吩、青霉素和新霉素 3 种耐药。恩诺沙星、多西环素和氟苯尼考对维氏气单胞菌菌株抑菌效果最好, 多西环素对温和气单胞菌菌株抑菌效果最好。综上, 本研究首次报道了维氏气单胞菌和温和气单胞菌在新疆地区白斑狗鱼中的致病性及对不同抗生素的敏感性, 为新疆地区白斑狗鱼细菌性败血症的诊断与防控提供了重要参考。

关键词: 白斑狗鱼; 维氏气单胞菌; 温和气单胞菌; 分离鉴定; 致病性; 抗生素

中图分类号: S852.6 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)07-0115-10

Isolation, identification, and antibiotic susceptibility of *Aeromonas veronii* and *Aeromonas sobria* from diseased *Esox lucius* during summer in certain regions of Xinjiang

ZHAO Yiyang¹, YAN Xiaofei^{2,3*}, WANG Tao^{2,3}, LIU Chong^{2,3}, CAO Xinyu^{2,3}

(1. College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China;

2. College of Life Sciences, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China;

3. Xinjiang Key Laboratory for Ecological Adaptation and Evolution of Extreme Environment Biology, Urumqi 830052, China)

Abstract: To investigate the causes of bacterial septicemia *Esox lucius* in Xinjiang, this study examined the incidence of the disease in five aquaculture ponds located in the Hutubi and Midong Districts of Urumqi. Through clinical symptom observation, pathological examination, high-throughput sequencing analysis, pathogen isolation and identification, virulence gene detection, and challenge tests, the pathogenic species and their characteristics were identified. The Kirby-Bauer disk diffusion method was employed to analyze the susceptibility of the pathogens to 16 antibiotics. Additionally, the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of commonly used antibiotics, including florfenicol, enrofloxacin, and doxycycline, were measured on the farms. And, four dominant bacterial

收稿日期: 2024-06-29; 修回日期: 2025-04-20

基金项目: 新疆维吾尔自治区高校基本科研业务费项目 (XJEDU2022 Z003)

第一作者: 赵怡阳, 女, 硕士生

* 通信作者: 阎晓菲, 副教授, 硕导, 主要从事水产病害与防控方面的研究, E-mail: yanxf83@163.com。

strains were isolated from the organs of the diseased *Esox lucius*, comprising three strains of *Aeromonas veronii* and one strain of *Aeromonas sobria*, all of which carried three virulence genes: adhesin (*ahal*), cytotoxic enterotoxin (*act*), and serine protease (*ahp*). The artificial challenge tests showed that co-infection with the two pathogens resulted in more severe pathogenic damage, with a median lethal dose (LD_{50}) of 1.5×10^5 CFU/mL. *A. veronii* was susceptible to 12 antibiotics, including midecamycin, cephalothin, quinolones, chloramphenicol, and tetracyclines, and so on, but it exhibited resistance to sulfamethoxazole-trimethoprim, vancomycin, penicillin, and neomycin. *A. sobria* was susceptible to 13 antibiotics, including vancomycin, quinolones, chloramphenicol, and tetracyclines, and so on, but it was resistant to cephalothin, penicillin, and neomycin. Enrofloxacin, doxycycline, and florfenicol demonstrated the strongest inhibitory effects on *A. veronii*, while doxycycline was most effective against *A. sobria*. This study has been the first to report the pathogenicity of *A. veronii* and *A. sobria* in *Esox lucius* in Xinjiang, as well as their susceptibility to various antibiotics. This research provided important references for diagnosis and control of bacterial septicemia in *Esox lucius* in Xinjiang.

Keywords: *Esox lucius*; *Aeromonas veronii*; *Aeromonas sobria*; isolation and identification; pathogenicity; antibiotic

白斑狗鱼 (*Esox lucius*) 隶属鲑形目 (Salmoniformes)、狗鱼科 (Esocidae)、狗鱼属 (*Esox*), 是世界上著名的亚冷水性、肉食性淡水鱼类, 抗寒能力较强, 最适宜生长温度为 $18 \sim 20$ °C^[1], 分布于亚洲的中国, 欧洲的俄罗斯、波兰、意大利, 北美洲的加拿大、美国等湖泊河流中^[2]。白斑狗鱼在我国仅分布于新疆额尔齐斯河上游^[3], 是新疆特有土著经济鱼类, 俗称“乔尔泰”, 在新疆乌鲁木齐、昌吉、石河子等地区进行大量人工养殖。在夏季平均气温 $28 \sim 35$ °C 的高温时节, 白斑狗鱼容易发生细菌性败血症, 患病鱼体表有不同程度溃烂充血, 内脏器官肿大伴有出血点, 死亡率较高, 对白斑狗鱼养殖业危害较严重。目前白斑狗鱼细菌性败血症的病原菌已报道的有嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)^[4]、杀鲑气单胞菌史氏亚种 (*A. salmonida* subsp. Smith)^[5], 对于其他病原菌还未见报道。

气单胞菌能产生多种毒力因子, 如丝氨酸蛋白酶 (*ahp*)、溶血素 (*hly*)、热不稳定性肠毒素 (*alt*)、细胞毒性肠毒素 (*act*)、气溶素 (*aer*)、黏附素 (*ahal*) 等, 导致细菌性败血症的发生^[6-7]。其中维氏气单胞菌 (*A. veronii*) 可感染黄颡鱼^[8]、黄鳝^[9]、大口黑鲈鱼^[10]、草鱼^[11]等淡水鱼类, 引起内脏器官充血肿大、腹水、体表溃烂等症状^[12]; 温和气单胞菌 (*A. sobria*) 可感染长丝裂腹鱼、大口黑鲈鱼、细鳞鱼等淡水鱼类^[13-15], 引起体表溃烂、口腔内充血红肿, 肠道内出现渗血点等症状^[16-17]。一直以来, 水产养殖细菌性疾病的防治多依赖于抗生素药物, 但其超量、违规使用药物的现象较普遍, 造成耐药性及药物残留严重超标等问题^[18], 因此针对病原菌进行药物敏感性检测, 筛选出更敏感的抗菌药物, 可有效减少水产养殖业经济损失。课题组前期对养殖鱼塘的白斑狗鱼细菌性败血症流行病学调查发现, 该病是由多种病原菌混合感染导致。本研究首先从患病白斑狗鱼脏器中分离出优势病原菌, 对分离菌株进行理化特

性分析及分子鉴定, 最后通过致病性研究及药物敏感性检测, 明确白斑狗鱼细菌性败血症的病原种类及特性, 以期为该病的早期预测预警和有效防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 病料来源

2023年8月, 采集自新疆呼图壁、乌鲁木齐米东区5个养殖鱼塘体表部分充血红肿的患病濒死白斑狗鱼19尾, 体长 (29.5 ± 7.5) cm, 体重 (401 ± 324) g。

1.2 试验动物

健康白斑狗鱼160尾购自新疆五家渠某大型养殖场, 平均体重 (100 ± 2.6) g, 于19 °C水箱中饲养14 d待用。

1.3 主要试剂

脑心浸液 (BHI) 琼脂及肉汤培养基、RS培养基、AHM 鉴定培养基、革兰染色剂购自青岛海博生物技术有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、D2000 Marker 购自北京天根生化科技有限公司; 生化微量鉴定管、药敏纸片购自杭州滨和微生物试剂有限公司。用于菌种鉴定的16S rDNA 通用引物 A1^[19]、A2^[20] 以及毒力基因 *ahp*^[21]、*hly*^[21]、*aer*^[22]、*ahal*^[23]、*act*^[24] 的引物, 由上海生工生物工程股份有限公司合成 (见表1)。

1.4 高通量测序检测病原菌

选取患病未死及死亡1~2 h的白斑狗鱼7尾, 分别编号为①~⑦, 取其部分肝、脾、肾共计9个病料样本, 液氮速冻送至南京奥青生物技术有限公司进行高通量测序。按照不同病料分组为肝脏组 (N1组)、脾脏组 (N2组) 和肾脏组 (N3组) (表2), 采用 QIIME2 和 R 软件 (v4.0.5) 对病料中的细菌进行属水平分析。根据各病料测序结果, 对病原菌进行初步的预测和分离培养。

表1 16S rDNA 及毒力基因引物序列信息

引物名称	引物序列 (5'→3')	目的片段长度/bp
16S rDNA 通用引物 A1	F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1 500
	R: GGTACCTTGTTACGACTT	
16S rDNA 通用引物 A2	F: AGAGTTTAGTCTGGCTCAG	1 431
	R: TACGGTTACCTTGTTACGACTT	
<i>ahp</i>	F: GTTAGCGTTGGCAATCTCG	874
	R: CGCTGGAGTAGGAGGAACG	
<i>hly</i>	F: TGACAGGCAAGTAGAATAACGC	1 815
	R: TGTCCGCCTTCCACTCCC	
<i>aer</i>	F: CAAGAACAAGTTCAGTGGCCA	309
	R: ACGAAGGTGTGGTTCCAGT	
<i>ahal</i>	F: CTATGAAAAAGACAATTCTGGCT	1 132
	R: AGGCTAGATTAGAAGTTGTATTG	
<i>act</i>	F: AGAAGGTGACCACCAAGAAACA	232
	R: AACTGACATCGGCCTTGAATC	

表2 7条患病白斑狗鱼病料高通量测序分组

组别	肝脏	脾脏	肾脏
N1	①②③④⑦	-	-
N2	-	④⑤	-
N3	-	-	④⑥

注：①~⑦为7条患病白斑狗鱼编号。

1.5 病原菌分离纯化及形态学观察

基于高通量测序结果，无菌取病鱼和健康鱼的部分内脏，分别划线接种于BHI琼脂培养基，28℃培养24h，挑取优势单菌落纯化培养，将优势单菌落接种于RS鉴定培养基、血琼脂培养基、AHM半固体鉴定培养基，28℃培养18~24h，并且对纯化的优势单菌落进行革兰染色，在光学显微镜下观察细菌形态特征及染色特性。

1.6 病原菌生理生化鉴定

将纯化优势单菌落分别接种于杭州滨和微生物试剂有限公司的细菌微量生化反应管，30℃培养24~48h，观察颜色和状态变化，根据菌株产生的酶类和水解活性，参考《常见细菌系统鉴定手册》初步判定病原菌的种类。

1.7 16S rDNA 分子鉴定与毒力基因检测

根据细菌基因DNA提取试剂盒说明书提取病原菌DNA作为模板，进行16S rDNA通用引物A1、A2和*ahp*、*hly*、*aer*、*act*、*ahal*5种毒力基因序列扩增。PCR反应体系为25μL：2×Taq plus PCR master Mix

12.5μL，上下游引物各1μL，模板DNA1μL，ddH₂O补足。扩增条件见表3。阴性对照以ddH₂O为DNA模板。采用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物，将16S rDNA通用引物A1、A2扩增产物送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序。通过NCBI网站的BLAST进行序列同源性比对（<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>），利用MEGA 11.0软件，使用最大似然法（Maximum Likelihood）构建系统发育树。

1.8 人工回归感染试验

将纯化维氏气单胞菌和温和气单胞菌接种于BHI液体培养基，30℃、220 r/min过夜培养后，4℃、4 000 r/min离心5 min，经无菌生理盐水洗涤后再次离心，重复3次得到菌悬液，同时取维氏气单胞菌和温和气单胞菌的菌悬液1:1制备为混合菌（JZM）进行人工感染试验。将维氏气单胞菌、温和气单胞菌和混合菌悬液分别用麦氏比浊管和生理盐水稀释至1×10⁸、1×10⁷、1×10⁶、1×10⁵、1×10⁴ CFU/mL共5个浓度。对3种菌悬液按照稀释浓度进行试验分组，每组健康白斑狗鱼10尾，每尾腹腔注射1 mL细菌悬液，对照组每尾腹腔注射1 mL无菌生理盐水，连续观察5 d，记录试验组和对照组的发病鱼数、死亡鱼数及临床症状，根据寇氏法^[29]计算出病原菌的半数致死量（LD₅₀），并选取濒死个体进行剖检及病原菌分离鉴定。

表 3 16S rDNA 及毒力基因扩增及反应体系

引物名称	扩增条件
16S rDNA 通用引物 A1	94 °C 预变性 10 min; 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 90 s, 32 个循环; 72 °C 延伸 10 min
16S rDNA 通用引物 A2	94 °C 预变性 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 36 个循环; 72 °C 延伸 10 min
<i>ahp</i>	94 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min
<i>hly</i>	94 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 2 min
<i>aer</i>	
<i>ahal</i>	94 °C 预变性 3 min; 94 °C 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min
<i>act</i>	

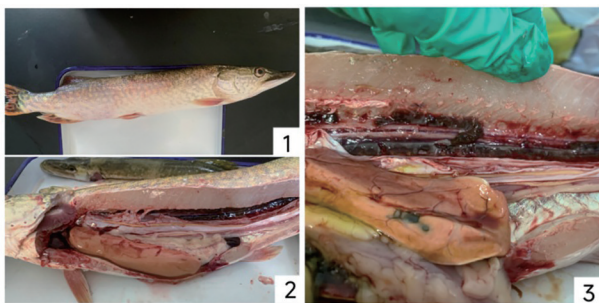
1.9 病原菌药物敏感性分析及抑菌浓度测定

采用标准 Kirby-Bauer 纸片扩散法, 对分离菌株用无菌生理盐水稀释至 1×10^8 CFU/mL, 均匀涂布于 BHI 琼脂培养基上, 将 16 种抗生素药敏纸片均匀贴在培养基表面, 30 °C 培养 24 h, 测量并记录抑菌圈直径, 判定分离菌株对抗生素的耐药性。针对养殖中常用的氟苯尼考、恩诺沙星和多西环素进行抑菌浓度测定。配制 1×10^8 CFU/mL 病原菌悬液, 通过倍比稀释进行最小抑菌浓度 (MIC) 和最小杀菌浓度 (MBC) 的测定, 药物浓度梯度为 256、128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125、0 $\mu\text{g/mL}$ 。

2 结果与分析

2.1 患病白斑狗鱼临床症状及病理变化

在患病初期, 鱼离群游动缓慢, 在出水口周围徘徊, 疾病高峰期死亡率较高, 呈急性死亡趋势。患病鱼体表腹部、下颌和肌肉组织充血, 鳃边缘、腹部和鳍基部充血较严重, 剖检观察到含有少量腹水, 肝脏肿大呈土黄色、脾脏黑紫色 (见图 1)。



1. 鱼体、腹部部分充血; 2. 肝脏肿大呈土黄色、脾脏呈黑紫色; 3. 肾脏充血易碎。

图 1 患病白斑狗鱼临床症状及病理变化

2.2 患病白斑狗鱼内脏病原菌高通量测序分析

病料菌群组成结果分析中, 气单胞菌属的相对丰度以 N3 组最高, 其次为 N1 组, 最后为 N2 组, 表明

气单胞菌在肾脏丰度最高, 其次为肝脏, 最后为脾脏 (见图 2)。在 N1 组的①号和②号鱼肝脏, N2 组的④号和⑤号鱼脾脏, N3 组的⑥号鱼肾脏均检测出气单胞菌 (见图 3)。根据测序结果分别选取以上患病鱼的肾脏、肝脏和脾脏进行病原菌的分离鉴定。

2.3 病原菌形态学观察

根据高通量测序结果, 在患病白斑狗鱼的肝脏、脾脏和肾脏组织中分离 4 株优势菌, 在 BHI 琼脂培养基上呈圆形湿润光滑、中央隆起、灰白色半透明菌落。镜检见末端钝圆的革兰阴性杆菌, 与气单胞菌的形态特征一致。分离菌株在 RS 培养基上呈圆形光滑、中央隆起、黄色且不透明菌落; 在绵羊血琼脂上生长良好, 菌落呈灰白色, 为典型的 β 溶血。初步鉴定 4 个分离菌株为气单胞菌, 分别命名为 JZ1 ~ JZ4。

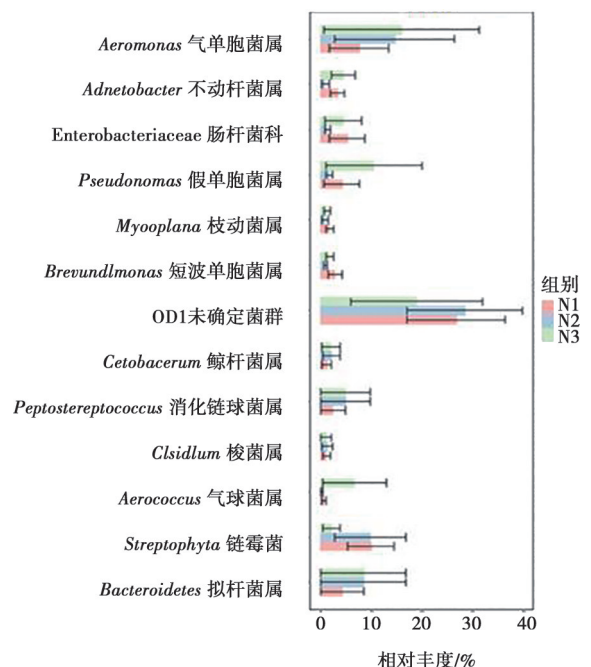


图 2 患鱼不同脏器高通量测序分析病原菌的属水平相对丰度

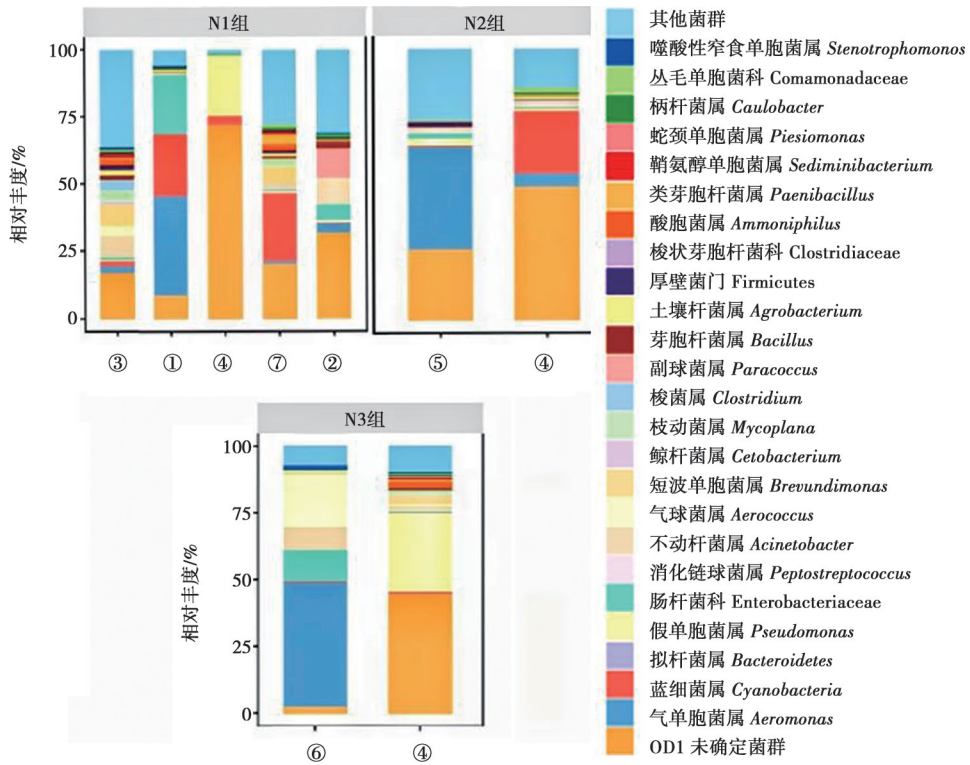


图3 患病鱼不同个体高通量测序分析病原菌的属水平相对丰度

2.4 病原菌生理生化特性

分离菌株 JZ2 能利用七叶素，不能利用 H₂S，与温和气单胞菌生理生化特性一致；分离菌株 JZ3 能利用苯丙氨酸，JZ1 和 JZ4 能利用鸟氨酸和苯丙氨酸，

不能利用 H₂S，与维氏气单胞菌生理生化特性一致（见表 4）。基于生理生化鉴定结果，初步判定分离菌株 JZ2 为温和气单胞菌，JZ1、JZ3 和 JZ4 为维氏气单胞菌。

表 4 分离菌株生理生化特征鉴定结果

生化项目	维氏气单胞菌 ^[25]	温和气单胞菌 ^[25]	分离菌株				生化项目	维氏气单胞菌 ^[25]	温和气单胞菌 ^[25]	分离菌株			
			JZ1	JZ2	JZ3	JZ4				JZ1	JZ2	JZ3	JZ4
鸟氨酸	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
精氨酸	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
赖氨酸	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
蔗糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
尿素	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
七叶苷	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	
葡萄糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
H ₂ S	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
甘露醇	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
麦芽糖	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
木糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
侧金盏花醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
靛基质	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
硝酸盐还原	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
苯丙氨酸	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	
氧化酶	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
精氨酸双水解	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
乳糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
VP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

注：“+”表示阳性，“-”表示阴性。下同。

2.5 分子鉴定及系统发育树分析

利用通用引物 A1 和 A2 进行 16S rDNA 扩增，结果显示，分离菌株 JZ1~JZ4 在 1 500 bp 处有单一条带与预期大小一致（见图 4）；测序后序列与维氏气

单胞菌、温和气单胞菌参考株 16S rDNA 序列的同源性均在 99.63% 以上。构建的系统发育树显示，分离菌株 JZ1、JZ3 和 JZ4 与维氏气单胞菌（OR687219.1、KY767507.1、MF716707.1）序列亲缘关系较近，聚

类形成一个分支；分离菌株 JZ2 与温和气单胞菌 (KC210798.1、MF216284.1、MF185225.1) 序列亲缘关系较近，聚类形成一个分支；分离菌株均与嗜水气单胞菌 (MG984624.1)、荧光假单胞菌 (FJ972536.1)、舒伯特气单胞菌 (LN849807.1)、铜绿假单胞菌 (AM419153.2) 亲缘关系较远，聚类形成不同分支。判定分离菌株 JZ1、JZ3、JZ4 为维氏气单胞菌，JZ2 为温和气单胞菌 (见图 5)。

2.6 病原菌毒力基因检测

对 4 个菌株进行气单胞菌属的常见毒力基因检测，维氏气单胞菌 JZ1、JZ4 均携带 *ahal*、*act* 基因；温和气单胞菌 JZ2、维氏气单胞菌 JZ3 携带 *ahal*、*act*、*ahp* 基因，4 个菌株均不具有 *aer*、*hly* 基因 (见图 6)。因此，维氏气单胞菌 JZ1、JZ4 的毒力基因型为 *ahal*⁺*act*⁺，维氏气单胞菌 JZ3 的毒力基因型为 *ahal*⁺*act*⁺*ahp*⁺；温和气单胞菌 JZ2 的毒力基因型为 *ahal*⁺*act*⁺*ahp*⁺。

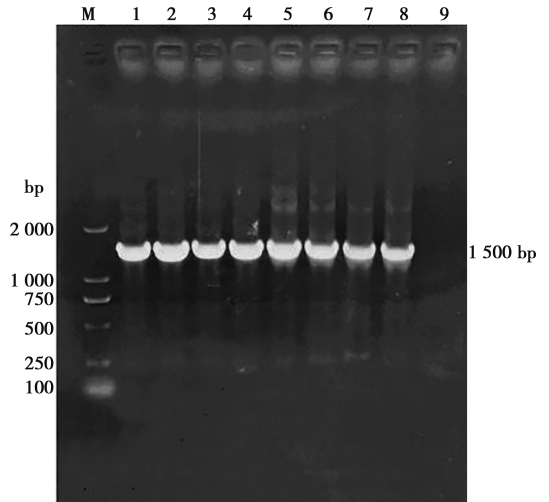
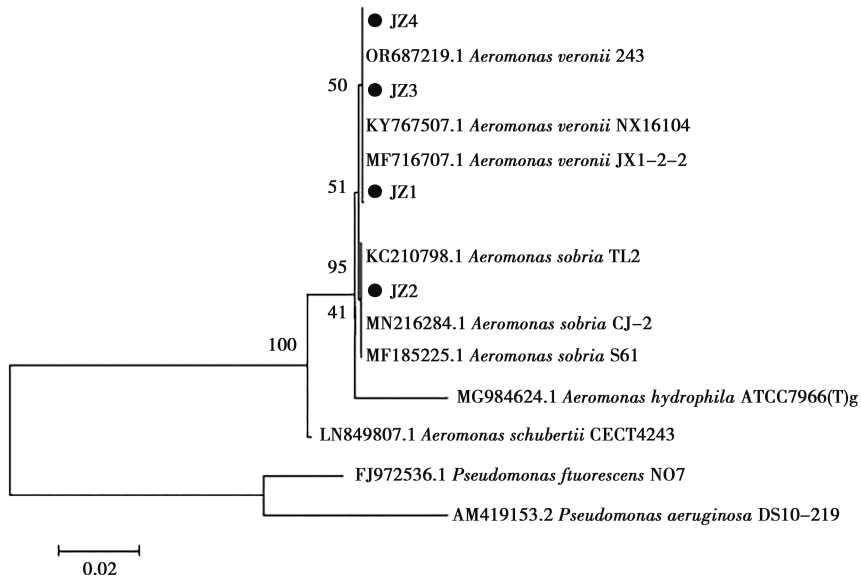


图 4 分离菌株 JZ1~JZ4 的 16S rDNA 基因 PCR 扩增产物



注：●为本试验分离株。

图 5 基于 16S rDNA 基因序列构建的系统进化树

2.7 人工回归感染试验

人工感染后的白斑狗鱼在体表腹部、下颌部均出现大面积充血，有腹水，肝脏均肿大呈土黄色，肾脏充血易碎，其中混合菌 JZM 携带 3 种毒力基因 *ahp*⁺*ahal*⁺*act*⁺，致病性最强，平均致死率为 66%，LD₅₀ 为 1.5×10⁵ CFU/mL；维氏气单胞菌菌株 JZ1 只携带 2 种毒力基因 *ahal*⁺*act*⁺，平均致死率为 62%，LD₅₀ 为 2.5×10⁵ CFU/mL；温和气单胞菌菌株 JZ2 携带 3 种毒力基因 *ahp*⁺*ahal*⁺*act*⁺，平均致死率为 64%，LD₅₀ 为

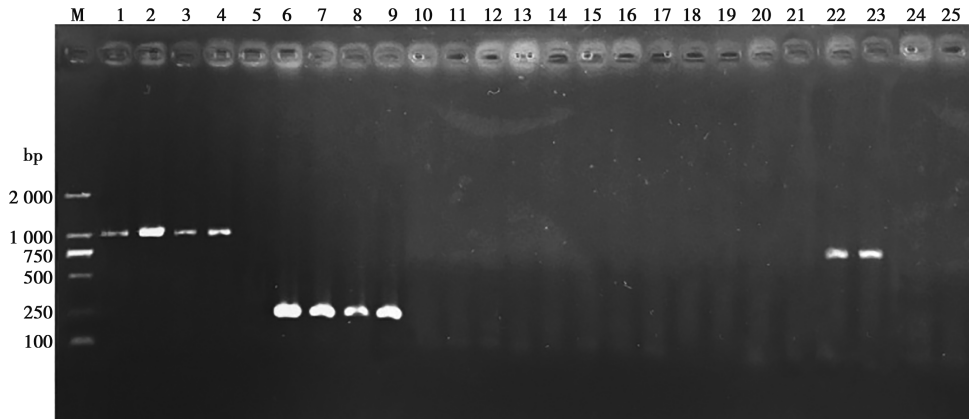
1.9×10⁵ CFU/mL (见表 5)。从发病鱼体内分离出的菌株，其形态、生化及分子鉴定结果与攻毒菌株一致。

2.8 病原菌药物敏感性及抑菌浓度测定

根据抑菌圈直径大小判定维氏气单胞菌 JZ1、JZ3 和 JZ4 对复方新诺明、万古霉素、青霉素和新霉素耐药，对麦迪霉素、头孢噻吩以及喹诺酮类、氯霉素类、四环素类药物敏感；温和气单胞菌 JZ2 对头孢噻吩、青霉素和新霉素耐药，对万古霉素以及喹诺酮

类、氯霉素类、四环素类药物敏感（见表6）。针对养殖场常用的氟苯尼考、恩诺沙星、多西环素对 JZ1 的 MIC 分别为 8、4、8 μg/mL，MBC 分别为 128、64、128 μg/mL；对 JZ2 的 MIC 分别为 8、8、4 μg/mL，MBC 分别为 128、128、64 μg/mL；对 JZ3

的 MIC 分别为 8、8、4 μg/mL，MBC 均为 128 μg/mL；对 JZ4 的 MIC 分别为 4、8、8 μg/mL；MBC 分别为 64、128、128 μg/mL，表明恩诺沙星对 JZ1 抑菌效果最好，多西环素对 JZ2、JZ3 抑菌效果最好，氟苯尼考对 JZ4 抑菌效果最好（见表7、表8）。



M. D2000 Marker; 1~4. JZ1~JZ4 PCR 扩增 *ahal*; 6~9. JZ1~JZ4 PCR 扩增 *act*; 11~14. JZ1~JZ4 PCR 扩增 *hly*; 16~19. JZ1~JZ4 PCR 扩增 *aer*; 21~24. JZ1~JZ4 PCR 扩增 *ahp*; 5、10、15、20、25. 阴性对照。

图6 菌株 JZ1~JZ4 PCR 扩增 *ahal*、*act*、*hly*、*aer*、*ahp* 毒力基因产物

表5 菌株毒力基因及其致病力的相关性

菌株	细菌种类	毒力基因					平均致死率/%	LD ₅₀ / (CFU · mL ⁻¹)
		<i>aer</i>	<i>hly</i>	<i>ahp</i>	<i>ahal</i>	<i>act</i>		
JZ1	维氏气单胞菌	-	-	-	+	+	62	2.5×10 ⁵
JZ2	温和气单胞菌	-	-	+	+	+	64	1.9×10 ⁵
JZM	维氏气单胞菌+温和气单胞菌	-	-	+	+	+	66	1.5×10 ⁵

表6 4株分离菌株的抗生素敏感性检测结果

抗生素	JZ1 株		JZ2 株		JZ3 株		JZ4 株	
	抑菌圈直径/mm	敏感度	抑菌圈直径/mm	敏感度	抑菌圈直径/mm	敏感度	抑菌圈直径/mm	敏感度
氟苯尼考	34	S	30	S	35	S	31	S
环丙沙星	30	S	40	S	30	S	30	S
强力霉素	27	S	26.5	S	25.5	S	27	S
米诺环素	25.5	S	24	S	25.5	S	26	S
青霉素	6	R	6	R	6	R	6	R
新霉素	15	R	15	R	17	R	15	R
恩诺沙星	30	S	40	S	30	S	27	S
卡那霉素	20	S	22.5	S	19	S	17	I
四环素	31	S	32.5	S	27	S	28	S
左氟沙星	35	S	40	S	31	S	28	S
庆大霉素	20	S	23.5	S	17	S	17	S
麦迪霉素	18.5	S	15	I	19.5	S	19	S
复方新诺明	22	R	24	I	21	R	21	R
氯霉素	35.5	S	34	S	32	S	34	S
头孢噻吩	27.5	S	10	R	26.5	S	23	S
万古霉素	9	R	13	S	6	R	9	R

注：R 表示耐药，I 表示中介，表示 S 敏感。

表 7 3 种抗生素对 4 株分离菌株的 MIC

菌株	抗生素	药液浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)											
		256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
JZ1	氟苯尼考	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	恩诺沙星	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	多西环素	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
JZ2	氟苯尼考	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	恩诺沙星	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	多西环素	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
JZ3	氟苯尼考	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	恩诺沙星	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	多西环素	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
JZ4	氟苯尼考	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	恩诺沙星	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	多西环素	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

注：“-”表示无肉眼可见的细菌生长，“+”表示有肉眼可见的细菌生长。下同。

表 8 3 种抗生素对 4 株分离菌株的 MBC

菌株	抗生素	药液浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)											
		256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
JZ1	氟苯尼考	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	恩诺沙星	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	多西环素	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
JZ2	氟苯尼考	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	恩诺沙星	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	多西环素	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
JZ3	氟苯尼考	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	恩诺沙星	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	多西环素	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
JZ4	氟苯尼考	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	恩诺沙星	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	多西环素	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

3 讨论

本研究对患病鱼内脏器官进行高通量测序,发现除了未确定菌群和其他菌群外,气单胞菌、假单胞菌、梭菌、变形杆菌和消化球菌属的相对丰度占比较大。这些菌群包含条件致病菌和致病菌,其中梭状芽胞杆菌、消化球菌、变形杆菌等属于鱼类肠道中的正常优势菌群^[26-27],假单胞菌多为鱼类的特定腐败菌^[28],可能是在分离内脏器官的操作中污染所致。气单胞菌属于鱼类条件致病菌,在水质、环境及鱼类自身免疫力低下时可以导致鱼类感染发病。目前,已有报道白斑狗鱼细菌性败血症中气单胞菌的感染,但均

为单独感染,如嗜水气单胞菌^[4, 29]、杀鲑气单胞菌史氏亚种^[5],但本研究检测出患鱼存在维氏气单胞菌和温和气单胞菌两种细菌混合感染,与上述报道不同。细菌性败血症病原菌有单种感染也有混合感染,在其他养殖鱼中发现由多个病原菌混合感染的情况较多,如印度鲤暴发的细菌性败血症由嗜水气单胞菌、铜绿假单胞菌混合感染引起^[30];广东肇庆地区鲮鱼败血症由嗜水气单胞菌和温和气单胞菌混合感染引起^[31]。细菌性败血症病原菌的复杂性可能取决于养殖环境、鱼类自身和细菌内在因素相互作用。

病原菌的致病性是多种毒力基因共同作用的结果,本研究检测了维氏气单胞菌和温和气单胞菌的 5

种相关毒力基因 (*ahp*、*hly*、*aer*、*act*、*ahal*)，其中 *ahp* 具有间接或直接致病性，*ahal* 具有黏附作用，均可在致病过程中直接破坏宿主组织或增强细菌对宿主的侵袭和扩散能力；*act*、*aer*、*hly* 具有溶血活性、肠毒性，可以裂解细胞并损坏组织，其产生的毒素能参与重要的发病机制^[32]。本研究中检测出的毒力基因与引起的病症相符合，如发病鱼均有体表及内脏器官出血红肿现象。本研究4株分离菌株具有 *act*、*ahp* 和 *ahal* 等3种毒力基因，与相关报道的结果相似^[33-35]，但与庞月^[36]、田浪等^[37]报道的锦鲤和斑点叉尾鲴的致病性维氏气单胞菌具有 *aer* 的结果不一致。本研究试验鱼体表和内脏病变程度与检测的分离菌株所表达的毒力基因种类相对应，以含有3种毒力基因混合菌株感染的试验鱼症状最严重，平均死亡率和 LD₅₀ 均较高，而仅含有2种毒力基因的菌株试验鱼的平均死亡率和 LD₅₀ 的值相对较低，由此可见，混合菌株感染对白斑狗鱼的致病性相较于单种细菌感染更强，并且4株分离菌株均含有 *act*，可能是导致患病白斑狗鱼出现体表、内脏充血的主要毒力基因，菌株毒力的强弱与致病性的差异还需要进一步研究。

细菌性败血症的防治主要使用抗生素^[38]、噬菌体^[39]、疫苗^[40]等。抗生素在水产养殖的多种细菌性疾病防治中广泛运用^[41]，为避免耐药性，常采用 Kirby-Bauer 纸片扩散法检测药物敏感性。本研究选择16种抗生素检测4株分离菌的药物敏感性，结果发现两种气单胞菌对氟苯尼考、环丙沙星、强力霉素等10种抗生素敏感，与已报道过的维氏气单胞菌与温和气单胞菌的药敏结果相似^[42-44]，表明水产养殖中对于维氏气单胞菌和温和气单胞菌的防治多以氯霉素类、喹诺酮类和四环素类为主。两种气单胞菌对新霉素耐药，与雷宁等^[45]报道的大口黑鲈感染的维氏气单胞菌对新霉素敏感性不同，表明本研究分离的菌株已对新霉素产生抗药性。针对养殖场使用的氟苯尼考、恩诺沙星和多西环素进行抑菌浓度检测，发现上述3种药物对3株维氏气单胞菌有不同的抑菌效果，恩诺沙星、氟苯尼考对温和气单胞菌菌株的抑菌效果不如多西环素。由此可见，水产养殖用药应通过药敏试验科学选择药物，规避误用滥用药物，通过联合用药、交替用药来减少耐药风险并且影响菌株毒力作用，提高鱼类品质，降低对养殖环境破坏，为实现精准防控提供用药参考。

综上，本研究从患病白斑狗鱼脏器中分离鉴定出维氏气单胞菌3株、温和气单胞菌1株，具有毒力基因 *ahal*、*act*、*ahp*，2种病原菌混合感染对白斑狗鱼的致病性损伤更严重。通过药敏试验检测出分离菌株对氟苯尼考、环丙沙星、强力霉素等敏感。本研究报

道了新疆地区白斑狗鱼的维氏气单胞菌和温和气单胞菌混合感染及其致病特性和耐药特性，为养殖白斑狗鱼细菌性败血症的有效防控提供理论依据。

参考文献：

- [1] 海萨·艾也力汗, 杜劲松, 胡建勇, 等. 白斑狗鱼冬季生长性能评价及选育系现实遗传力的初步估计 [J]. 淡水渔业, 2015, 45 (3): 105-108.
- [2] LARSSON P, TIBBLIN P, KOCH-SCHMIDT P, et al. Ecology, evolution, and management strategies of northern pike populations in the Baltic Sea [J]. *Ambio*, 2015, 44 (3), 451-61.
- [3] LUAN P, HUO T, MA B, et al. Genomic inbreeding and population structure of northern pike (*Esox lucius*) in Xinjian, China [J]. *Ecol Evol*, 2021; 11 (10): 5657-5668.
- [4] 王高学, 黄增荣. 白斑狗鱼“败血症”病原及组织病理研究 [J]. 水产学报, 2006, 30 (3): 383-389.
- [5] 秦莉, 殷建国, 张薇, 等. 白斑狗鱼 (*Esox lucius*) 致病性嗜水气单胞菌的分离与鉴定 [J]. 渔业科学进展, 2014, 35 (5): 40-45.
- [6] SADIQUE A, NEOGI S B, BASHAR T, et al. Dynamics, diversity, and virulence of *Aeromonas* spp. in homestead pond water in coastal Bangladesh [J]. *Front Public Health*, 2021, 9: 692166.
- [7] IGBINOSA I H, BESHIRU A, ODJADJARE E E, et al. Pathogenic potentials of *Aeromonas* species isolated from aquaculture and abattoir environments [J]. *Microb Pathog*, 2017, 107: 185-192.
- [8] 王润萍, 许航荣, 潘杰, 等. 黄颡鱼源维氏气单胞菌的分离、鉴定及特性分析 [J]. 核农学报, 2023, 37 (7): 1344-1351.
- [9] 陈红莲, 江河, 胡王, 等. 黄鲢病原性维氏气单胞菌温和生物变种的分离与鉴定 [J]. 生物技术通报, 2014, 30 (3): 130-136.
- [10] ZHU X, QIAN Q, WU C, et al. Pathogenicity of *Aeromonas veronii* causing mass mortality of Largemouth bass (*Micropterus salmoides*) and its induced host immune response [J]. *Microorganisms*, 2022, 10 (11): 2198.
- [11] MALLIK S K, JOSHI N, SHAHI N, et al. Characterization and pathogenicity of *Aeromonas veronii* associated with mortality in cage farmed grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes, 1844) from the Central Himalayan region of India [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2020, 113 (12): 2063-2076.
- [12] 宫金烁, 魏俊锋, 王英旭, 等. 不同途径感染维氏气单胞菌对鲫鱼先天免疫的影响 [J]. 吉林农业大学学报, 2023: 1-10. DOI: 10.13327/j. jilau. 2021. 0133.
- [13] 杨超, 董凌健, 刘志刚, 等. 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.
- [14] 郭玉丹, 杜迎春, 何亚鹏, 等. 细鳞鱼温和气单胞菌 LAMP 检测方法的建立 [J]. 畜牧与兽医, 2021, 53 (1): 101-105.
- [15] 雷雪平, 耿毅, 邓龙君, 等. 长丝裂腹鱼温和气单胞菌的分离鉴定及药敏检测 [J]. 水产科学, 2019, 38 (1): 109-114.
- [16] 耿毅, 汪开毓, 吴麟, 等. 齐口裂腹鱼败血症的病原分离与鉴定 [J]. 水利渔业, 2004, 244 (4): 71-73.
- [17] 徐海圣, 舒妙安. 黄鲢温和气单胞菌病原的分离鉴定及免疫应答 [J]. 中国兽医学报, 2003, 23 (3): 240-242.

- [18] 李强, 刘青林, 刘萌硕, 等. 我国关于抗生素淡水生物水质基准研究的文献调研 [J]. 生态毒理学报, 2024, 19 (3): 1-14.
- [19] 宋华丽. 加州鲈维氏气单胞菌的分离鉴定和 *OmpA* 基因缺失株的构建 [D]. 新乡: 河南师范大学, 2020.
- [20] 陈铭. 黄颡鱼温和气单胞菌的特性研究及溶血素基因的克隆与表达 [D]. 重庆: 西南大学, 2009.
- [21] 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.
- [22] 朱大玲. 嗜水气单胞菌毒力基因及基因工程疫苗 [D]. 北京: 中国科学院研究生院 (水生生物研究所), 2006.
- [23] 龙苏, 韩书煜, 牛志伟, 等. 胡子鲶致病性气单胞菌的分离鉴定及其致病力与毒力基因型相关性 [J]. 水产学报, 2016, 40 (3): 308-317.
- [24] 彭鑫, 屠海慧, 罗金萍, 等. 罗氏沼虾源维氏气单胞菌的分离鉴定、毒力基因检测及组织病理学观察 [J]. 水生生物学报, 2023, 47 (6): 883-894.
- [25] 房海, 陈翠珍, 张晓君. 水产养殖动物病原菌学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2010: 411-437.
- [26] 黄丽, 祁岑, 蒋红明, 等. 基于高通量测序分析石斑鱼冷藏期间的微生物菌群结构变化 [J]. 食品科技, 2024, 49 (4): 169-177.
- [27] 刘静聪, 冯立芳, 吴诗媛, 等. 比较基因组学分析鱼源荧光假单胞菌的致腐和适应性 [J]. 水产学报, 2022, 46 (7): 1178-1187.
- [28] 秦振宇, 肖睿铭, 梁书利, 等. 鳊鱼肠道菌群多样性及潜在益生菌的分离鉴定 [J]. 现代食品科技, 2023, 39 (5): 41-52.
- [29] LEE W S, WENDY W. Antibiotic and heavy metal resistance of *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* isolated from red hybrid tilapia (*Oreochromis* spp.) coinfecting with motile aeromonas septicemia and edwardsiellosis [J]. Veterinary World, 2017, 10 (7): 803-807.
- [30] LALTLANMAWIA C, HIMADRI S, LIJA G, et al. Identification and analysis of pathogenic bacteria causing outbreaks in Indian major carp aquaculture of Tripura [J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2023, 35 (4): 263-279.
- [31] 许政生, 梁文浪. 鲢鱼细菌性败血症的防治 [J]. 水产养殖, 2019, 40 (3): 50-51.
- [32] CHOPRA A K, XU X, RIBARDO D, et al. The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* induces proinflammatory cytokine production and activates arachidonic acid metabolism in macrophages [J]. Infect Immun, 2000, 68 (5): 2808-2818.
- [33] 裴立硕, 刘彬, 韩卓然, 等. 鲤致病性维氏气单胞菌的分离鉴定及生物学特性分析 [J]. 南方农业学报, 2023, 54 (7): 2184-2194.
- [34] 邹文腾, 刘振红, 杨靖璇, 等. 基于细菌全基因组的大口黑鲈源维氏气单胞菌 AV040 株致病性与耐药性解析 [J]. 浙江农业学报, 2023, 35 (9): 2068-2078.
- [35] 彭小倩, 任朝颖, 邓雪玥, 等. 杂交鲟源温和气单胞菌的分离鉴定及生物学特性的研究 [J]. 淡水渔业, 2023, 53 (3): 62-70.
- [36] 庞月, 郭美玲, 刘芯睿, 等. 锦鲤源维氏气单胞菌的鉴定及致病性分析 [J]. 天津农学院学报, 2022, 29 (4): 36-42.
- [37] 田浪, 温贵兰, 张升波, 等. 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.
- [38] CÍZEK A, DOLEJSKÁ M, SOCHOROVÁ R, et al. Antimicrobial resistance and its genetic determinants in *Aeromonas* isolated in ornamental (koi) carp (*Cyprinus carpio koi*) and common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Vet Microbiol, 2010, 142 (3/4): 435-439.
- [39] DANG T H O, XUAN T T, DUYEN L T, et al. Protective efficacy of phage PVN02 against haemorrhagic septicemia in striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus* via oral administration [J]. Journal of Fish Diseases, 2021, 44, 1255-1263.
- [40] 孙承文, 巩华, 赖迎超, 等. 维氏气单胞菌 CA07 株灭活疫苗生产工艺的优化 [J]. 中国生物制品学杂志, 2023, 36 (1): 76-80.
- [41] MOSER C, LERCHE C J, THOMSEN K, et al. Antibiotic therapy as personalized medicine - general considerations and complicating factors [J]. Apmis, 2019, 127, 361-371.
- [42] 王巧煌. 鳊源气单胞菌毒力基因及其耐药性分析 [J]. 大连海洋大学学报, 2024, 39 (3): 1-15.
- [43] 韩语, 潘纪汶, 王昕, 等. 泥鳅维氏气单胞菌的毒力基因与耐药特性分析 [J]. 水产科学, 2022, 41 (4): 564-572.
- [44] 吴开年, 王利, 李晨阳. 鱼源温和气单胞菌对氨基糖苷类和四环素类抗生素的耐药性分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45 (4): 1059-1066.
- [45] 雷宁, 郝贵杰, 黄爱霞, 等. 大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 致病性维氏气单胞菌的分离鉴定及其特性分析 [J]. 海洋与湖沼, 2022, 53 (5): 1180-1188.