



鳖源铜绿假单胞菌的分离鉴定及多位点序列与全基因组分析

何宏港¹, 吴悠¹, 刘乃瑜¹, 王至诚¹, 刘静霞^{1*}, 罗毅^{1,2*}

- 1 华中农业大学水产学院, 农业农村部淡水生物繁育重点实验室/农业动物遗传育种与繁育教育部重点实验室, 湖北 武汉 430070
- 2 农业微生物学国家重点实验室, 华中农业大学, 湖北 武汉 430070

何宏港, 吴悠, 刘乃瑜, 王至诚, 刘静霞, 罗毅. 鳖源铜绿假单胞菌的分离鉴定及多位点序列与全基因组分析. 微生物学报, 2022, 62(7): 2751–2767.

He Honggang, Wu You, Liu Naiyu, Wang Zhicheng, Liu Jingxia, Luo Yi. Identification, multilocus sequence typing and whole-genome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from diseased *Trionyx sinensis*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(7): 2751–2767.

摘要:【目的】查明引起湖北仙桃某中华鳖养殖场中华鳖发病死亡的病原及其特征。【方法】本研究分离患病中华鳖的病原, 并结合形态特征、生理生化试验、16S rRNA 基因鉴定, 鉴定分离菌株; 通过人工回归感染试验、药敏试验、全基因组测序与分析对分离菌株的致病性和耐药性进行研究; 通过多位点序列分型(multilocus sequence type, MLST)分析, 对分离菌株的流行情况进行探究。【结果】从患病中华鳖肝脏等部分分离到 3 株优势菌株 HX8、FG10 和 GC20, 16S rRNA 基因同源性和生化特征分析鉴定为铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。回归感染试验证实该菌株是引起本次中华鳖患病的病原菌。3 株分离株的药敏实验结果基本一致, 均对诺氟沙星、恩诺沙星等 8 种抗生素敏感, 对氟苯尼考、多西环素、磺胺异恶唑等 6 种抗生素耐药。MLST 鉴定表明, 3 株分离株均属于序列型(sequence type, ST) 252 型, eBURST 分析进一步显示 ST252 型与一些 ST 共同构成了克隆复合体(clonal complexes, CC) CC252, 且 ST252 是 CC252 的原始序列型(founder ST)。全基因组测序结果显示, FG10 的全基因组大小为 5.65 Mb, GC 含量为 65.3%, 共预测到 5 956 个编

基金项目: 湖北省重点研发计划(2020BBB122); 中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室开放课题(2020SKLBC-KF06)

Supported by the Key Research and Development Plan of Hubei Province (2020BBB122) and by the Opening Foundation of State Key Laboratory of Biocontrol (Sun Yat-Sen University) (2020SKLBC-KF06)

*Corresponding authors. E-mail: LIU Jingxia, ichliu@mail.hzau.edu.cn; LUO Yi, luoyi@mail.hzau.edu.cn

Received: 12 November 2021; Revised: 10 February 2022; Published online: 25 February 2022

码序列(CDS), GenBank 登录号为 JAJGXC000000000。通过与毒力因子数据库(the virulence factor database, VFDB)比对, 预测到 873 个毒力相关因子, 主要与黏附、分泌系统以及毒素等相关。通过与耐药基因数据库(the comprehensive antibiotic resistance database, CARD)比对, 结果显示 FG10 中含有喹诺酮类、碳青霉烯类、肽类等抗生素的耐药相关基因。【结论】本研究分离获得了中华鳖的病原细菌铜绿假单胞菌, MLST 分析推测了其流行情况, 基因组数据揭示了其毒力及耐药基因, 为防控水产养殖中铜绿假单胞菌感染提供了一定的参考依据。

关键词: 中华鳖; 铜绿假单胞菌; 分离鉴定; 多位点序列分型; 全基因组; 毒力及耐药

Identification, multilocus sequence typing and whole-genome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from diseased *Trionyx sinensis*

HE Honggang¹, WU You¹, LIU Naiyu¹, WANG Zhicheng¹, LIU Jingxia^{1*}, LUO Yi^{1,2*}

1 Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Ministry of Education, College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

2 State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

Abstract: [Objective] This study aims to determine and characterize the pathogen of the diseased *Trionyx sinensis* in a farm in Xiantao, Hubei Province. **[Methods]** The suspicious pathogenic bacteria were isolated from the diseased *T. sinensis* and identified based on the morphological, physiological, and biochemical characteristics and the phylogenetic tree constructed with the 16S rRNA gene sequence. The artificial infection tests, drug sensitivity tests, multilocus sequence typing (MLST), eBURST analysis, and whole-genome sequencing were then carried out for the isolates. **[Results]** Three predominant strains, HX8, FG10, and GC20, were isolated from the diseased *T. sinensis* and all identified as *Pseudomonas aeruginosa*. Artificial infection tests confirmed that the isolates were the pathogen causing the disease of *T. sinensis*. Drug sensitivity tests demonstrated that the three isolates were sensitive to eight antibiotics (such as enrofloxacin and norfloxacin) and resistant to six antibiotics (such as florfenicol, doxycycline, and sulfagan). According to the results of MLST, the three isolates all belonged to sequence type 252 (ST252). The further eBURST analysis showed that ST252 formed a clonal complex CC252, of which ST252 was the founder ST. The whole genome of strain FG10 had a size of 5.65 Mb, the average G+C content of 65.3%, and 5 956 coding sequences. The whole genome has been deposited at GenBank under the accession number JAJGXC000000000. In comparison with the virulence factor database (VFDB), 873 virulence-related genes were predicted, which were mainly associated with adhesion, secretion systems, and toxin. In comparison with the comprehensive antibiotic resistance database (CARD), some drug (such as fluoroquinolone, carbapenem, and peptide) resistance related-genes were predicted. **[Conclusion]** We isolated and identified the pathogens of the diseased *T. sinensis* and preliminarily analyzed the prevalence and predicted the genes related to the

virulence and drug resistance of *P. aeruginosa*, which provided a basis for the prevention and control of infections caused by *P. aeruginosa* in aquaculture.

Keywords: *Trionyx sinensis*; *Pseudomonas aeruginosa*; isolation and identification; multilocus sequence typing; whole genome; virulence and drug resistance

中华鳖(*Trionyx sinensis*)又名甲鱼, 隶属于爬行纲(*Reptilia*)龟鳖目(*Tesudines*)鳖科(*Trionychidae*)动物, 是我国珍贵淡水名特优水产养殖动物之一, 主要分布于我国的长江、黄河流域和华南地区, 尤在湖北、湖南、江西、安徽、江苏等省产量较高^[1]。近年来, 由于高密度集约化养殖导致中华鳖多种病原性疾病大量暴发^[2]。目前已知鳖的病原菌有很多种, 有研究表明嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)可导致中华鳖患红脖子病、红底板、出血性肠道坏死、疔疮、腐皮病等^[3], 费氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)会导致中华鳖患败血症^[4], 其他报道的病原菌还包括爱德华氏菌(*Edwardsiella*)^[5]、温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)和豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*)等^[6]。

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是一种常见的条件致病菌, 属于好氧革兰氏阴性菌, 在自然界分布广泛, 是土壤中最常见的细菌之一, 也存在于水、空气、人的皮肤、呼吸道和肠道等, 当机体体表受损或者抵抗力下降时, 会侵染机体^[7]。铜绿假单胞菌可引起人群严重的感染, 是医院病人发生感染的第三大致病菌^[8]。畜牧家禽中的猪、牛、羊、马、犬、兔、鸡等体内均可分离出该菌, 在实验动物中也有发现^[9]。国内已报道从患病的猪^[10]、奶牛^[11]、水貂^[12]的病灶中分离出了铜绿假单胞菌, 可见该菌已成为威胁畜禽业发展的重要病原之一。但该菌在水产养殖上并不常见, 仅有感染石龟^[13] (*Mauremys japonica*)、广西拟黄喉水龟^[14]

(*Mauremys guangxiensis*)的报道。

多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)是一种基于核酸序列测定的细菌分型方法, 这种方法通过 PCR 扩增多个管家基因片段并测定其序列, 分析菌株的变异情况^[15]。截至目前, 铜绿假单胞菌 MLST 数据库已经收录了 22 806 条序列, 等位基因谱 MLST 序列 3 655 条, 菌株信息 7 714 个(<https://pubmlst.org/organisms/pseudomonas-aeruginosa>)。

2019 年 10 月, 在湖北省仙桃市某中华鳖养殖场, 一些中华鳖个体发生严重感染并死亡。为探究引起此次中华鳖感染发病的病原, 我们从患病中华鳖肝脏、肠道及血液样本中分离获得 3 株优势菌, 通过形态学观察、生理生化反应、16S rRNA 基因鉴定等方法, 发现 3 株菌株均为铜绿假单胞菌, 并进一步对该菌株的致病力、耐药特征及 MLST 分型进行了鉴定, 最后对其全基因组进行了测定、并对其毒力以及耐药基因进行了分析。本研究旨在为中华鳖疾病的有效防治、及对中华鳖源铜绿假单胞菌的深入研究提供参考和依据。

1 材料与方法

1.1 患病个体解剖与细菌分离纯化

患病中华鳖于 2019 年 10 月取自湖北仙桃某中华鳖养殖场。在无菌环境下, 用酒精擦拭体表后, 对中华鳖进行剖检, 记录病变情况。取肝脏等样品磨成匀浆后, 进行梯度稀释, 每个梯度取 100 μ L, 用涂布器均匀涂在 LB 固体培养基上, 于 28 $^{\circ}$ C 恒温培养 48 h。挑选优势

菌落移接于 LB 琼脂平板上保存供检验用。

1.2 生理生化鉴定

取待检测菌落于生理盐水中, 制备成 0.5 麦氏浊度(McFarland, 约 10^8 CFU/mL)的菌悬液, 取 100 μ L 菌悬液加至肠杆菌科细菌生化鉴定管(购自杭州微生物试剂有限公司)中, 封口。按说明书进行操作, 参考说明书对结果的阳性和阴性进行分类。

1.3 分离株的分子鉴定

利用碱裂解法提取细菌总 DNA, 所用引物和反应体系参照 Clarridge 方法扩增分离株 16S rRNA 基因^[16]。PCR 产物送武汉擎科生物技术有限公司测序, 将序列上传至 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)进行比对分析, 利用 MEGA X 软件对序列进行遗传进化树的构建。

1.4 人工感染实验

实验用中华鳖购自湖北仙桃一中华鳖养殖场, 为 2 年龄健康中华鳖, 体重在 1 000 g 左右, 暂养一周。将 3 株分离株接种于普通固体培养基, 28 °C 培养 12 h。用无菌生理盐水将分离株配制成浓度为 1.0×10^6 CFU/mL 的菌悬液。将所选中华鳖随机分为 1 个对照组和 3 个实验组, 每组 10 只, 实验组经腹腔注射 200 μ L 的菌液, 对照组注射 200 μ L 无菌生理盐水, 于隔离的养殖缸中养殖。每 12 h 观察并记录中华鳖的活动与死亡情况, 连续观察 7 d, 并用 Graphpad prism 8.0.2 软件绘制生存曲线。

1.5 细菌耐药性实验

采用常规琼脂扩散(K-B)法对分离株进行 14 种抗菌药物敏感性测定, 依据 CLSI 药敏试验标准鉴定手册^[17], 以抑菌圈直径大小作为敏感与耐药的判定指标^[18]。药敏纸片均购自杭州微生物试剂有限公司。

1.6 多位点序列分型

根据 PubMLST 数据库(<https://pubmlst.org/organisms/pseudomonas>), 选择 7 个管家基因(*ascA*、*aroE*、*guaA*、*mutL*、*nuoD*、*ppsA* 和 *trpE*)针对铜绿假单胞菌进行多位点序列分型。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 57 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 最终延伸 10 min, 结果采用 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 并送武汉擎科生物技术有限公司测序。利用 eBURST v.3 (<http://eburst.mlst.net>)预测不同序列型(sequence type, ST)之间的关系。

1.7 全基因组测序及分析

将菌株挑取单菌落接种到 100 mL 液体 LB 培养基中, 经 28 °C 摇床培养至对数生长期, 离心收集菌体, 将菌体送至武汉菲沙基因信息有限公司, 由公司进行 DNA 提取, 采用 Illumina 高通量测序平台进行测序。测序结果组装后, 利用 COG 数据库对菌株全基因组进行基因功能注释。通过与毒力因子数据库 VFDB (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>)进行比对获得菌株毒力基因的注释结果^[19]; 利用抗性基因数据库 CARD (<http://arpcard.Mcmaster.ca>, Version 1.1.3)对菌株耐药基因进行预测^[20]。

2 结果与分析

2.1 患病鳖的病症

所检患病中华鳖为 3 年龄成年鳖, 体重 1 600 g 左右。鳖患病表现为: 发病前期食欲下降、不进食, 随后出现了体表出血、背部唇边腐烂(图 1A), 偶伴有便血现象(图 1B), 解剖后发现患病鳖腹腔有出血和大量腹水(图 1C), 肝脏脂肪化和肿大, 有些肝脏伴有发黑症状(图 1D)。

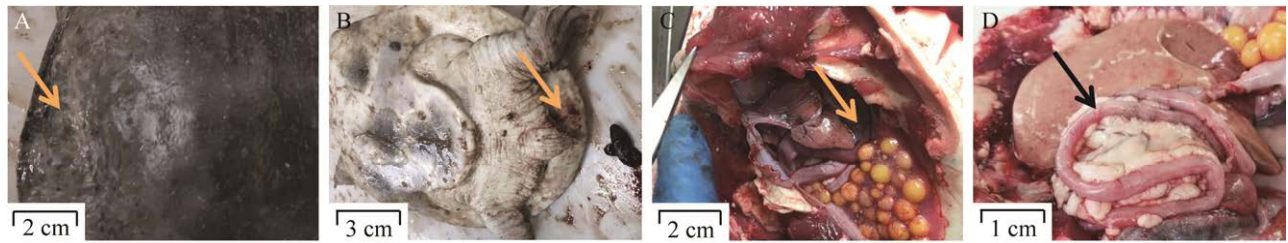


图 1 濒死甲鱼的病症

Figure 1 The clinical signs of moribund *T. sinensis*. A: rotten back shell; B: ulcerated pores on the back shell, excreted blood clot; C: haemorrhage and ascites in the abdominal cavity; D: liver steatosis and tumefaction.

组织切片结果显示：与健康中华鳖相比，患病的中华鳖肝脏中有红细胞渗出和铁血黄素沉积，肠道中绒毛膜出血并有脱落现象，表明患病的中华鳖肝脏和肠道出现了病变(图 2)。

2.2 致病菌的分离及形态特征

从患病中华鳖的肝脏等样本中均分离到形态特征一致的优势菌。培养 48 h 观察，其菌落特征为扁平、湿润，呈亮绿色；扫描电镜观察

发现，其菌体呈短杆状(图 3)。将分离获得的 3 株优势菌株进行纯化，分别命名为 HX8、FG10 和 GC20。

2.3 分离株的鉴定

2.3.1 生理生化鉴定

生化鉴定结果显示，所分离菌株与分离自林麝的铜绿假单胞菌 SP-N^[21]以及分离自雏鸡的铜绿假单胞菌菌株^[22]生化特性基本一致(表 1)。

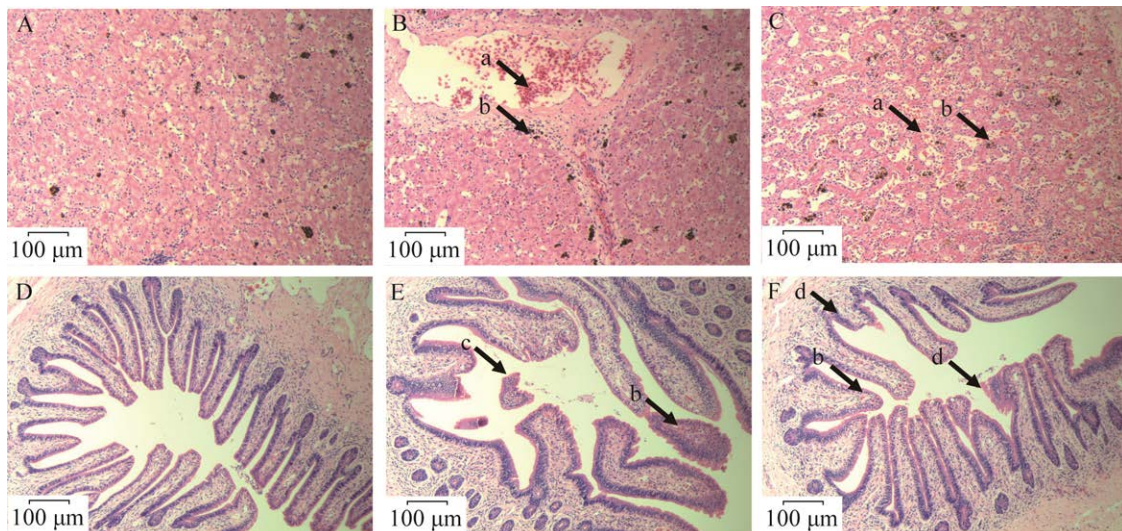


图 2 中华鳖组织病理切片

Figure 2 Histopathological section of soft-shelled turtle. A, B, C are slices of liver, while D, E, and F are slices of intestinal. A, D are healthy samples, while B, C, E, F are infection samples. a: erythrocyte effusion; b: hemosiderin deposition; c: shedding of intestinal chorionic membrane; d: chorionic hemorrhage.

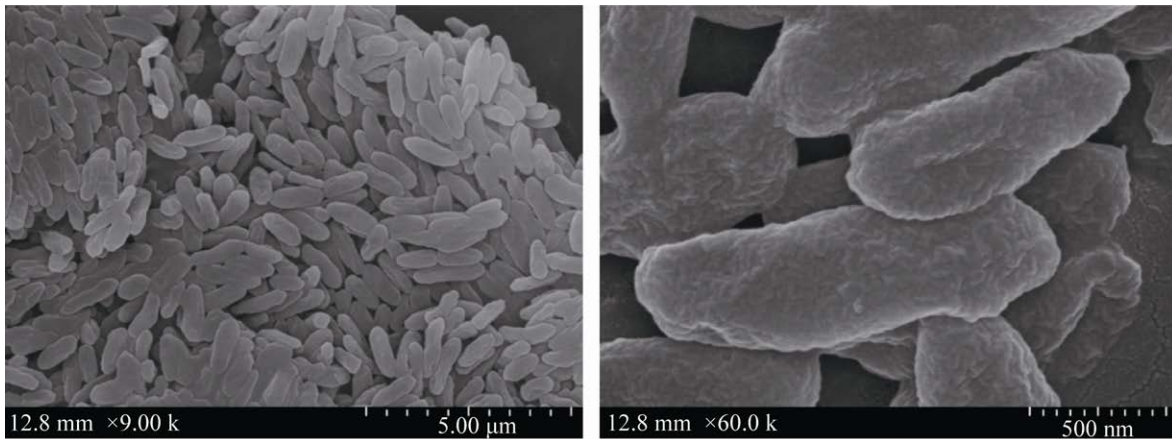


图3 菌株 FG10 扫描电镜观察

Figure 3 SEM observation results of strain FG10.

表1 分离株的生理生化特性

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain HX8, FG10 and GC20

Biochemical project	HX8	FG10	GC20	SP-N ^[21]	HQ041011 ^[22]
Glucose	-	-	-	-	+
Citrate utilization	+	+	+	+	+
Arginine double hydrolysis	+	+	+	*	+
Maltose	-	-	-	-	-
Semi-solid agar (motility)	+	+	+	*	+
DNA enzyme	+	+	+	*	+
Acetamide	+	+	+	+	+
Carbamide	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	-	*	-
Glucose (gas)	-	-	-	*	-
Lysine	-	-	-	*	*
Ornithine	+	+	+	*	*
Raffinose	-	-	-	*	-
Sorbitol	-	-	-	*	-
Peptone water	-	-	-	-	*
H ₂ S (gas)	-	-	-	-	-
Glucoside	-	-	-	*	*

+: positive; -: negative; *: no determination.

2.3.2 16S rRNA 同源性分析

对3个分离株的16S rRNA基因片段进行扩增,获得了约1 500 bp的目标条带,将测序结果分别上传到NCBI获取登录号,BLAST比对结果发现:3株分离株与铜绿假单胞菌PAO1 (GenBank: MT772097)的16S rRNA基因的序列一致性为99.7%–99.9%。进一步构建细菌16S rRNA基因系统发育树,结果显示:菌株HX8、FG10、GC20同属一个分支,且在铜绿假单胞菌所在分支中(图4)。以上结果表明:3株分离株均为铜绿假单胞菌。

2.4 分离株对中华鳖的人工回归感染

将3株分离株分别腹腔注射感染健康中华鳖。实验组中华鳖感染后前2天均未出现死亡,第3天均死亡1只,在第5天每组死亡2只,7d内全部死亡;对照组在7d内均无死亡(图5)。死亡个体表现出唇边腐烂、腹部积水、肠道充血、肝脏发黑等症状,与自然发病个体病症相似。从实验组死亡中华鳖的肝脏均能分离到与攻毒菌株形态一致的菌落,对其进行16S rRNA基因鉴定,结果显示均为对应的攻毒菌株。以上回归感染数据表明:3株分离株是导致此次中华鳖死亡的主要病原菌。

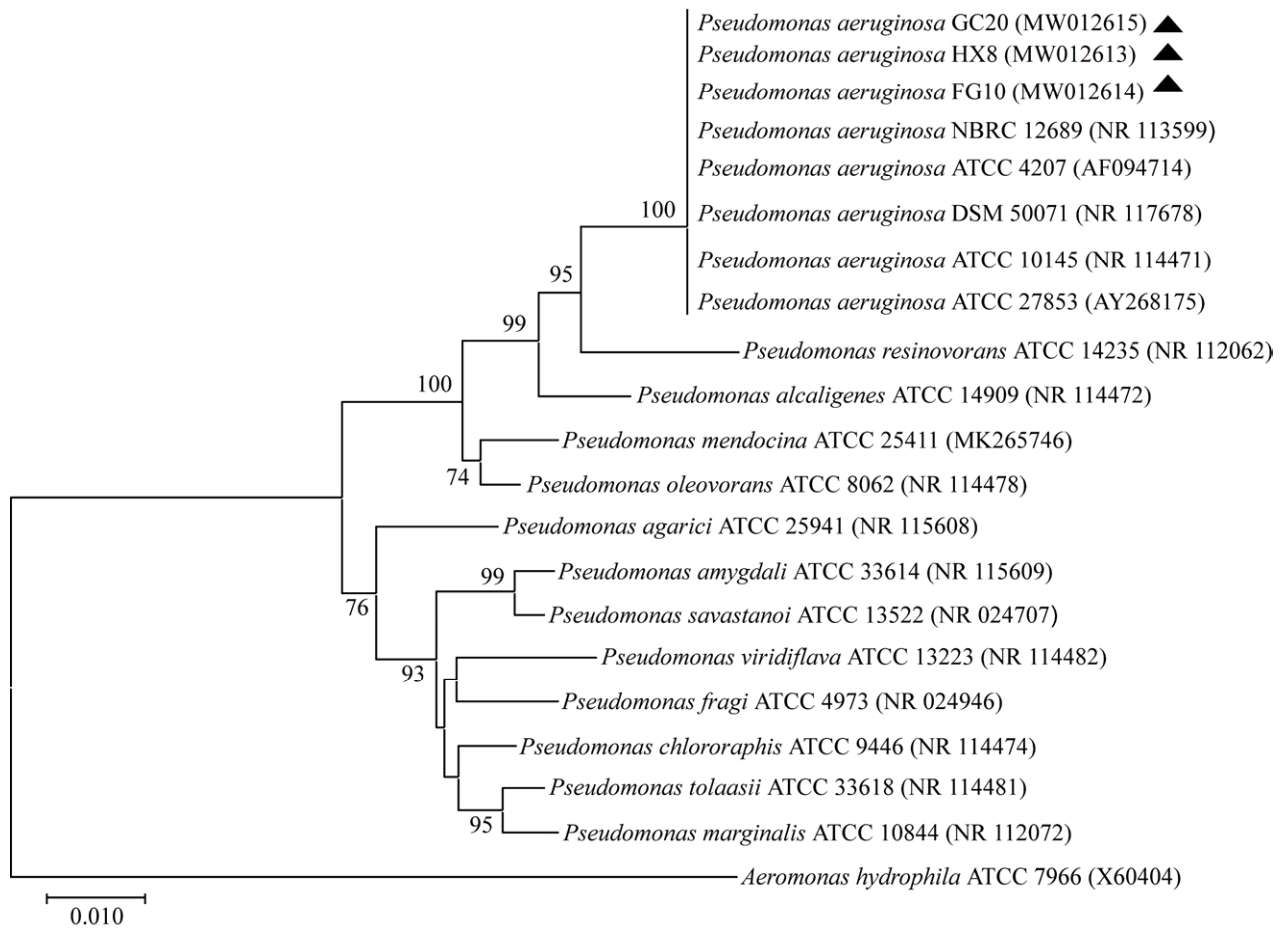


图 4 基于 16S rRNA 基因序列的 N-J 系统发育树

Figure 4 Neighbor-joining (N-J) tree based on the comparison of 16S rRNA gene sequences of *Pseudomonas* spp. GenBank accession numbers are given in parentheses. Genetic distances were constructed using *p*-distance model. Horizontal bar, genetic distance of 0.01.

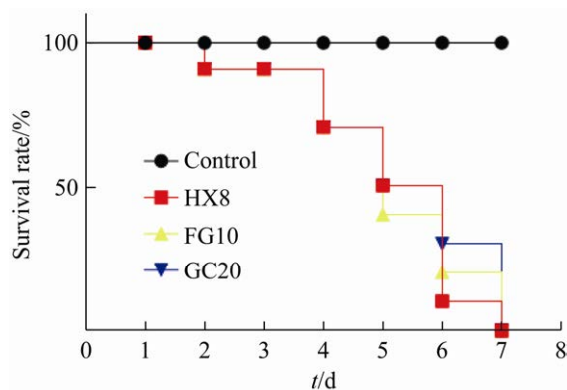


图 5 3 株铜绿假单胞菌对中华鳖的致病力

Figure 5 Pathogenicity of three *P. aeruginosa* isolates to *T. sinensis*.

2.5 分离株的药敏性

依据 CLSI 药敏试验标准鉴定手册^[18]及《中华人民共和国兽药典》^[23]中予以公布的水产用药物, 对 3 株分离菌株进行了药敏实验。结果显示: 3 株分离株均对哌拉西林-他唑巴坦、头孢吡肟、头孢他啶、美罗培南、左氧氟沙星、诺氟沙星敏感, 而对多西环素、氟苯尼考以及磺胺异唑耐受(表 2)。

2.6 分离株的 MLST 鉴定及 eBURST 分析

MLST 鉴定结果显示, 3 株分离的铜绿假单胞菌序列型均为 ST252 型。在铜绿假单胞菌的

表 2 3 株分离菌株药敏实验结果

Table 2 Drug sensitivity test results of 3 isolates

Antimicrobial class	Antimicrobial agent	Disk content/ μg	Zone diameter/mm (phenotype)			Zone diameter (mm) interpretive criteria		
			HX8	FG10	GC20	S	I	R
Penicillins and β -lactam/ β -lactamase inhibitor combination	Piperacillin-tazobactam	100/10	26	26	28	≥ 21	15–20	≤ 14
			S	S	S			
Cephems	Cefepime	30	30	30	31	≥ 18	15–17	≤ 14
			S	S	S			
	Cefotaxime	30	26	25	25	≥ 18	15–17	≤ 14
			S	S	S			
Monobactams	Aztreonam	30	18	25	27	≥ 22	16–21	≤ 15
Carbapenems	Meropenem	10	29	35	29	≥ 19	16–18	≤ 15
			S	S	S			
Aminoglycosides	Gentamicin	10	12	14	12	≥ 15	13–14	≤ 12
Quinolones	Ciprofloxacin	5	9	6	11	≥ 21	16–20	≤ 15
			R	R	R			
	Levofloxacin	5	26	30	30	≥ 17	14–16	≤ 13
			S	S	S			
Antibiotics for aquatic products	Neomycin	30	12	12	13	≥ 17	13–16	≤ 12
			R	R	I			
	Doxycycline	30	9	9	11	≥ 16	13–15	≤ 12
			R	R	R			
	Florfenicol	30	6	6	6	≥ 18	13–17	≤ 12
			R	R	R			
	Sulfagan	300	6	6	6	≥ 17	13–16	≤ 12
			R	R	R			
	Enrofloxacin	5	22	24	23	≥ 21	16–20	≤ 15
			S	S	S			
	Norfloxacin	10	25	25	30	≥ 17	13–16	≤ 12
			S	S	S			

S: susceptible; I: intermediate; R: resistant.

MLST 数据库中 (<https://pubmlst.org/organisms/pseudomonas>), 共记录了 33 株 ST252 型铜绿假单胞菌菌株, 其中分离自澳大利亚 6 株, 法国 5 株, 巴西 4 株, 英国 1 株, 分离自痰、支气管、感染的软组织等人(医)源环境。本研究首次从中国分离出铜绿假单胞菌 ST252 型菌株, 并表明该型的分离株可以导致养殖中华鳖发生严重感染并死亡。

eBURST 分析是一种根据序列型运算来分析发现菌株亲缘关系的一种生物信息学分析方法, 它依据菌株的序列型将菌株分为不同的克隆谱系, 进而研究菌株间的进化关系。从 MLST 数据库、已发表全基因组或文献中共获得铜绿假单胞菌分型菌株 7 116 个, 分属 3 515 个 ST 型。

从分离地点来看, 分离自法国的最多, 有 725 个, 澳大利亚其次, 有 712 个。法国最流

行的序列型是 ST308 型, 共有 94 个分离株; 澳大利亚最流行的序列型是 ST274 型, 共有 29 个分离株。分离自中国的铜绿假单胞菌菌株有 352 株, 分属于 324 个 ST 型, 这些 ST 型参与形成了 38 个克隆复合体(clonal complexes, CC), 其中, CC277、CC235、CC1239、CC740、CC2370、CC3284、CC252 是主要的克隆复合体。

从分离源来看, 铜绿假单胞菌菌株主要是医源(人源)菌株, 其次是从环境水体中分离的, 主要分离源包括感染的软组织、感染的尿路、痰、血、支气管灌洗、水等, 表明铜绿假单胞菌主要的流行区域是医院和环境水体。

eBURST 分析显示, 本研究分离的 3 株菌株所属的 ST252 型, 其与分离自荷兰的 ST489、澳大利亚的 ST924 与 ST1107、法国、加拿大与澳大利亚的 ST9、英国的 ST118 亲缘关系较近,

构成了 CC252; 其中 ST252 是 CC252 的原始序列型(founder ST)(图 6)。

2.7 铜绿假单胞菌 FG10 全基因组测序及注释

为进一步分析肇源铜绿假单胞菌的全基因组特征, 我们对菌株 FG10 进行了全基因组测序。对原始的测序片段(reads)进行序列组装, 共得到 125 个重叠群(contigs), 基因组覆盖度为 98.5%, FG10 全基因组序列总长度为 5.65 Mb, GC 含量为 65.30%, 共预测到 5 956 个基因。菌株 FG10 基因组上传到 NCBI 获得 GenBank 登录号为 JAJGXC000000000。

COG 数据库注释结果显示, 菌株 FG10 共有 4 292 个基因获得注释, 注释结果分属于 24 类(图 7)。其中, 参与氨基酸转运和代谢的有 394 个、转录的有 384 个、参与无机离子转运和代谢的

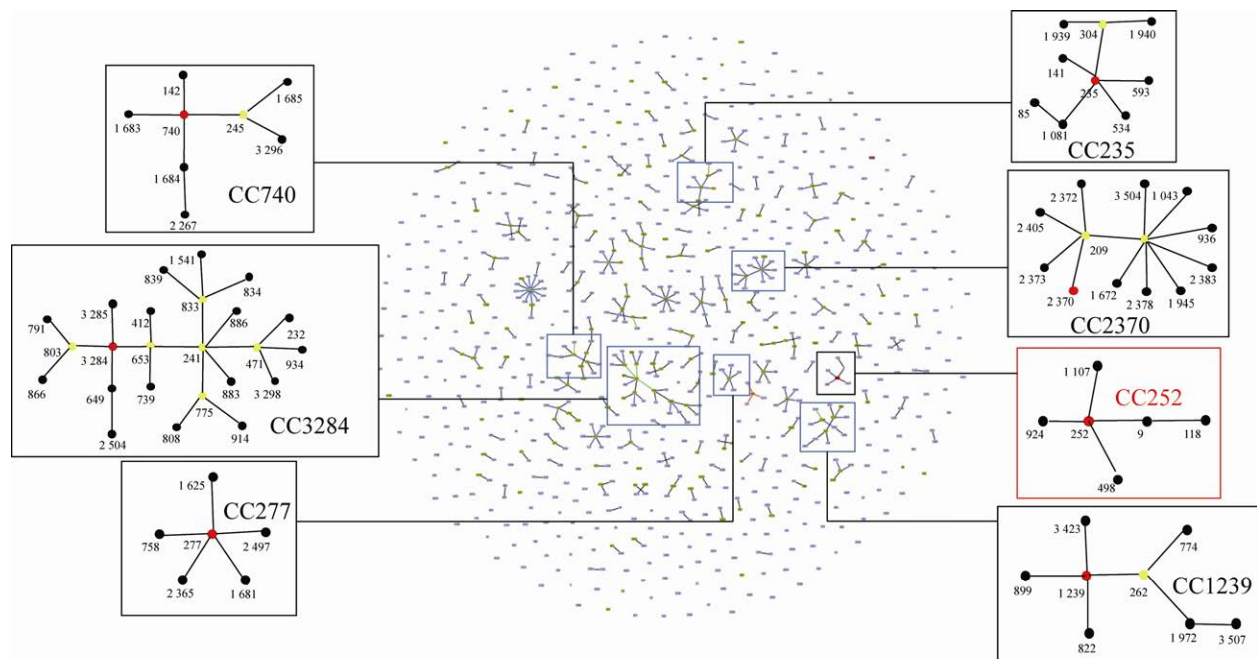


图 6 利用 eBURST 对 *P. aeruginosa* 菌株进行归属谱系分析

Figure 6 The lineage classification of *P. aeruginosa* strains analyzed by eBURST. Each black dot represents a different sequence type, and the lines between the black dots form different clonal complexes (CC252, CC235, CC277, CC1239, CC2370, CC3284). The original sequence type is marked in red, and the original sequence type of the subgroup is marked in yellow. The red box indicates CC252 which ST252 belongs to in this study.

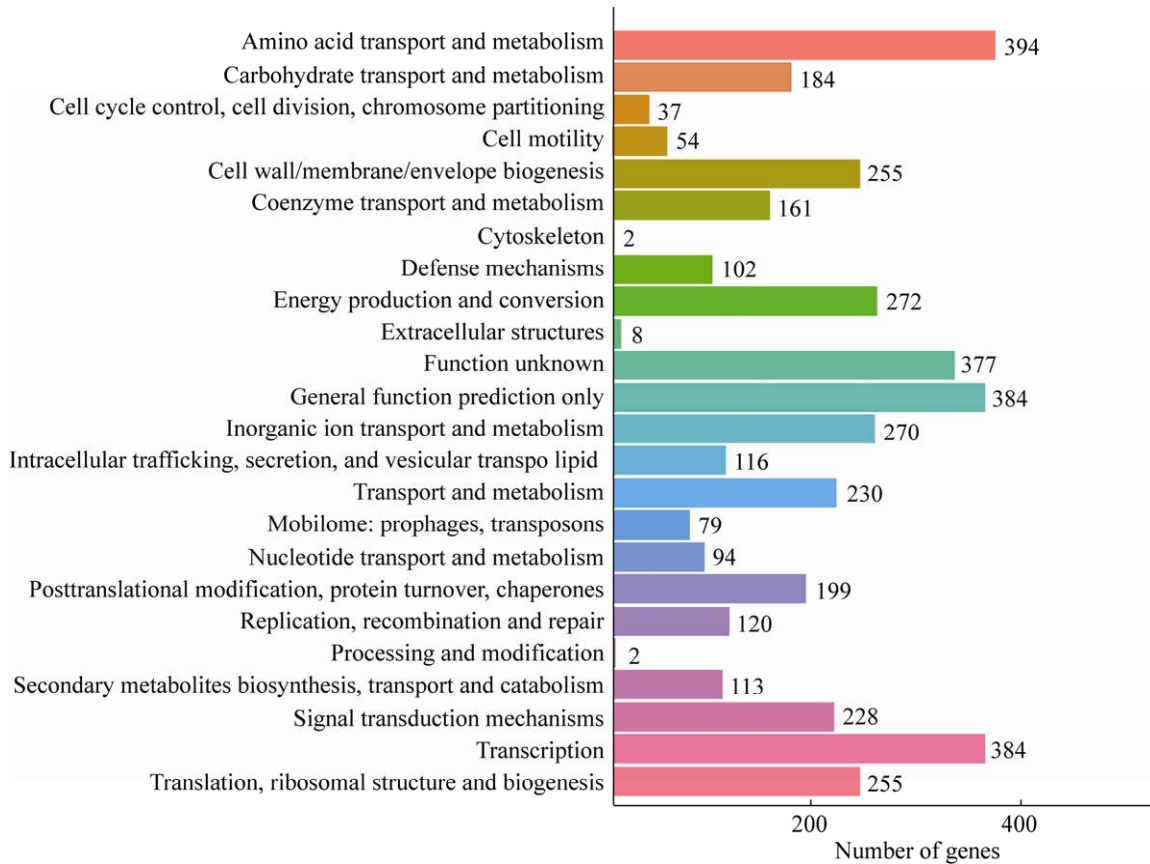


图7 菌株 FG10 的 COG 功能分类

Figure 7 Gene distribution based on COG classification of strain FG10.

有 270 个、能量产生和转换的有 272 个。此外，有 377 个基因 COG 分类缺乏明显特征，功能尚不明确。

2.8 铜绿假单胞菌 FG10 的毒力基因分析

依据 VFDB 数据库，在 FG10 全基因组中共预测到 873 个毒力相关基因，分别与黏附、毒素、分泌系统、铁摄取系统和双组分系统等相关(表 3)。其中，155 个基因与黏附(adherence)相关，如趋化基因 *ctpH* (locus_tag: *FG10620252_01334*)、膜脂蛋白基因 *tpn32* (locus_tag: *FG10620252_02040*)、长链醇脱氢酶基因 (locus_tag: *FG10620252_04042*)等。有 113 个基因参与分泌系统(secretion system)形成，FG10 中存在 II 型、III 型和 VI 型分泌系统，其中有 19 个

基因参与了 III 型分泌系统的形成，转录激活子 *exsA* (locus_tag: *FG10620252_05848*)负责调控 III 型分泌系统所有基因的表达^[24]；参与形成 VI 型分泌系统的基因有 49 个，其中，VI 型分泌系统的分子伴侣蛋白基因 *clpV* 有 3 个拷贝 (locus_tag: *FG10620252_01258*、*05610*、*05796*)，该基因参与蛋白质的新陈代谢过程，如细胞因子的代谢、蛋白质修饰、蛋白质代谢的正负调节和受体生物合成过程等，调节菌株的致病力^[25]。与毒素(toxin)相关的基因有 49 个，其中包含 4 个拷贝的腺苷酸环化酶基因 *cya* (locus_tag: *FG10620252_05631*、*03346*、*02503*、*04963*)，该基因编码的蛋白是参与碳水化合物和氨基酸代谢的重要蛋白质之一，同时对细菌的菌毛和

鞭毛的表达有一定影响^[26]。有 52 个基因与铁摄取系统(iron uptake system)相关, 有研究表明, 细菌毒力与细菌铁载体获得铁的能力有关, 细菌获得铁的效率越高, 毒力越高, 致病性越高^[27]。有 21 个基因与胁迫蛋白(stress protein)相关, 其中包含有 5 个拷贝的 *clpC* 基因(locus_tag: *FG10620252_02588*、*01840*、*04744*、*01198*、*01461*)和 2 个拷贝的 *clpP* 基因(locus_tag: *FG10620252_04783*、*05944*), 这 2 个基因参与调节蛋白水解, 以此来应激细菌生长、细胞分裂及分化、生物被膜形成和蛋白质分泌等基本过程^[28]。

2.9 铜绿假单胞菌 FG10 的耐药基因分析

为深入研究菌株 FG10 的耐药特征, 对 FG10 的主要耐药基因进行了预测(表 4)。结果显示: FG10 基因组含有与肽类、三氯生类、喹诺酮类、苯酚类、碳青霉烯类、磷霉素类以及双环霉素类等抗生素相关耐药基因, 并且核苷酸一致性极高(95.8%–100.0%)。这些基因主要通过改变抗生素靶点(antibiotic target alteration)以及抗生素外排(antibiotic efflux)的方式来对抗生素产生耐药性, 其中, 基因 *FG10620252_01262* 通过抗生素外排的方式对喹诺酮类抗生素产生耐药性。

表 4 菌株 FG10 中的主要耐药基因

Table 4 The main antibiotic resistance genes from strain FG10

Genes	AMR gene family	Drug class	Resistance mechanism	Identity/%
<i>FG10620252_00638</i> , <i>FG10620252_04474</i>	Phosphoethanolamine transferase; Pmr	Peptide	Antibiotic target alteration; antibiotic efflux	100.0
<i>FG10620252_01055</i>	RND antibiotic efflux pump	Triclosan	Antibiotic efflux	95.8
<i>FG10620252_01262</i>	RND antibiotic efflux pump	Fluoroquinolone	Antibiotic efflux	100.0
<i>FG10620252_02049</i> , <i>FG10620252_04656</i>	OXA beta-lactamase	Carbapenem	Antibiotic inactivation	100.0
<i>FG10620252_02353</i>	Chloramphenicol acetyltransferase CAT	Phenicol	Antibiotic inactivation	100.0
<i>FG10620252_03362</i>	Fosfomycin thiol transferase	Fosfomycin	Antibiotic inactivation	100.0
<i>FG10620252_04683</i>	MFS antibiotic efflux pump	Bicyclomycin	Antibiotic efflux	100.0

表 3 FG10 的毒力基因预测分类统计表

Table 3 Virulence genes of *P. aeruginosa* strain FG10 predicted by VFDB

Classification of virulence factors	Gene No.
Adherence	155
Secretion system	113
Toxin	49
Antiphagocytosis	21
Iron uptake system	52
Regulation	38
Two-component system	19
Genotoxin	14
Enzyme	71
Endotoxin	19
Stress protein	21
Invasion	15
Other	286

3 讨论

近几年, 有关铜绿假单胞菌的报道主要集中在医院内感染和畜牧家禽中的感染, 针对水产养殖中的研究比较少见。崔来宾等报道了铜绿假单胞菌可感染草鱼引起类似赤皮病的症状^[29]; 陶保华等在患病罗氏沼虾的腮部和肝胰腺组织中分离鉴定出了铜绿假单胞菌^[30]。何莘萍等从属于龟鳖目的黄喉拟水龟肝脏中分离出一株铜绿假单胞菌, 但在黄喉拟水龟其他多个组织器官

中未分离到病原细菌,推测铜绿假单胞菌是主要病原,并且感染的主要器官是肝脏^[14],而在本研究中,中华鳖的肝脏和肠道都出现了不同程度的组织病变(图 1 和图 2)。在过往报道的中华鳖细菌性疾病中,大多数病原为嗜水气单胞菌,出现反应迟钝、红底板、红脖子、腐皮病、出血性肠炎等症状^[3],在本研究中也出现了类似腐皮病和肠道出血的症状,说明虽然两种病原菌不同,但均能引起中华鳖出现相同的病症。

陶保华等研究表明,用分离的铜绿假单胞菌菌株 DM1 回归感染罗氏沼虾,DM1 菌株引发健康虾发病死亡的时间在 7–10 h,24 h 内完全死亡^[30]。本研究中经腹腔注射分离株菌悬液的健康中华鳖在感染早期(1–3 d)死亡较慢,但在 7 d 内全部死亡(图 5),显示健康中华鳖在攻毒感染后的病程相对较慢。这表明虽然铜绿假单胞菌对水产养殖动物感染后病程快慢有所差异,但均能导致较大规模死亡,需在养殖中加以重视。

在以往研究中,为了解铜绿假单胞菌的分子分型情况应用过多种方法,如 PFGE (pulse field gel electrophoresis)、EPIC-PCR (emulsion paired isolation and concatenation PCR)、RAPD (random amplified polymorphic DNA)等,这些方法均有一定局限性,而 MLST 技术有着众多优点,如成本低、重复性高、分辨率高等,因其数据在全球范围内共享所以在交流结果中更方便快捷,成为被广泛应用的微生物分型研究的“黄金标准”^[31]。在本研究中,MLST 分析结果表明 3 株分离株均属于 ST252 型。在数据库中,已知的 ST252 型菌株均分离于人(医)源和中国以外地区,本研究首次报道非人源(动物源)ST252 型菌株。根据 eBURST 的分析结果(图 6),ST252 型是 CC252 的原始序列型,暗示其可以

产生更多的变异型,本研究首次在中国发现了 ST252 型菌株,为以后的病原流行病学研究提供了帮助,具有公共卫生意义。

铜绿假单胞菌的基因组是细菌中已知的相对较大的基因组,铜绿假单胞菌模式菌株 PAO1 (GenBank: NC_002516)的基因组为 6.26 Mb。通常基因组越大的菌株,其代谢能力和耐受能力越强,更能适应多种环境^[32]。本研究通过全基因组测序及基因功能注释,结果显示菌株 FG10 同样具有较大的基因组,且参与细胞代谢与耐受的基因丰富(图 7),暗示菌株 FG10 可能具有较强的环境适应能力,提醒我们在养殖过程中应做好有效防控。

在 FG10 毒力基因分析结果中,黏附相关的基因在预测结果中占主要部分(占到全部预测毒力基因的 17.8%,表 3)。预测结果显示,FG10 基因组中存在许多与趋化作用相关的 ACF 家族基因,可与毒素共同调节菌毛相关基因簇的表达水平^[33]。菌毛形成增加可以促进生物被膜形成、增加细菌的黏附能力,从而增强细菌的致病力^[34–35]。分泌系统属于进攻性毒力因子,FG10 中存在 II 型、III 型和 VI 型分泌系统,II 型分泌系统(T2SS)参与很多毒力因子的分泌过程,向胞外分泌多种蛋白,如气溶素、蛋白酶等,通过这些蛋白毒力因子破坏宿主细胞,从而引起组织坏死;此外,T2SS 与细菌的运动性及生物被膜形成等方面也有很多联系^[36]。FG10 中存在 T2SS,推测其主要功能是将毒素和酶分泌到胞外^[37]。VI 型分泌系统(T6SS)在铜绿假单胞菌中是一种重要的分泌系统,可以促进生物被膜的形成,还可以将细胞内的多种蛋白毒力因子分泌到细胞外或者环境中,是影响铜绿假单胞菌致病性和耐药性的重要因素^[38]。有研究表明铜绿假单胞菌 T6SS 不仅可以转运

毒性蛋白, 还可以转运铁离子^[39]。大量研究还表明, 铜绿假单胞菌致病的关键因素是 T6SS 可以将毒力因子精准输送至宿主细胞^[40]。铁与致病菌的毒力、生物被膜形成等功能密切相关。在肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)中, 铁离子的浓度会作用于 III 型分泌系统(T3SS)的表达, T3SS 会介导肠道沙门氏菌对细胞的感染^[41], 铁稳态对于细菌的生存和繁殖极为重要, 所以铁元素摄取会受到铁摄取调节蛋白(*ferric uptake regulator*)的严格调控^[42], 细胞外游离铁的缺乏是限制入侵病原菌利用铁的有效手段^[43]。在铜绿假单胞菌中, 可以分泌产生可能位于膜上的铁还原酶, Fe^{3+} 会被还原成更容易溶解的 Fe^{2+} 形式, Fe^{2+} 的摄取将通过多个转运系统的协作来完成^[44-45]。FG10 中还存在多套双组分调控系统(表 3)。双组分调控系统是细菌感应并响应外界复杂环境最为重要的信号传导系统, 可以在病原菌感染过程中调控温度、镁离子、磷酸盐、渗透压和宿主激素等因素, 以此来调节对外界环境的适应性^[46-47]。病原菌在感染宿主的不同阶段对环境的适应性适应不仅需要一些特定的毒力因子的表达, 也需要对代谢过程进行严格的调控, 双组分调节系统在这些过程中都起到了重要作用^[48]。

芮萍等研究显示, 从患出血性肺炎的水貂中分离的铜绿假单胞菌对内酰胺类、碳青霉烯类、喹诺酮类的左氧氟沙星、氧氟沙星、环丙沙星均高度敏感, 庆大霉素也有一定抑菌效果^[49]。王永强等的研究显示, 从鸵鸟体内分离的铜绿假单胞菌对头孢类、内酰胺类、庆大霉素、环丙沙星、美罗培南、氨基糖苷类高度敏感, 对氟苯尼考、氯霉素耐药^[50]。以上药敏结果与本研究存在一定区别(表 2), 在本研究中 3 株分离株同样对头孢类、美罗培南等高度敏感, 但对环

丙沙星及庆大霉素耐药。不同地区和宿主的细菌耐药性有区别, 可能是与养殖中抗生素的使用环境有关, 所以需要合理地选择使用抗生素去治疗^[51]。

喹诺酮类抗生素是水产养殖中的常见药物, 目前在水产养殖中广泛应用^[52]。但由于长期不合理使用, 造成水产致病菌不可避免地产生耐药性, 导致在治疗水产动物细菌性疾病时无法对症下药, 给养殖者带来经济损失; 另一方面, 在养殖中抗生素用量的增加使得抗生素药物在水产动物体内残留的风险增高, 也使水体中抗生素含量超标, 给人类的食品安全带来隐患^[53-54]。本研究中, 3 株分离株对喹诺酮类抗生素(环丙沙星)均表现为耐药(表 2), 在菌株 FG10 中, 确实也预测到保守的喹诺酮类耐药基因(*locus_tag: FG10620252_01262*, 表 4)。以菌株 FG10 为例, 对喹诺酮类抗生素耐药的铜绿假单胞菌在水产养殖环境中的存在, 加之其可能存在强的环境适应能力, 推测对喹诺酮类抗生素耐药的铜绿假单胞菌很可能未来会在水产养殖上快速、广泛传播, 水产从业者应引起重视。

参考文献

- [1] 黄莉萍, 安莉丽, 李芳, 杨成年, 李虹, 吕光俊, 向泉, 孙翰昌, 翟旭亮, 朱成科. 中华鳖弗氏柠檬酸杆菌的鉴定及病理组织观察. 浙江农业学报, 2020, 32(7): 1176-1186.
Huang LP, An LL, Li F, Yang CN, Li H, Lv GJ, Xiang X, Sun HC, Zhai XL, Zhu CK. Identification and pathological observation of *Citrobacter freundii* from *Pelodiscus sinensis*. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2020, 32(7): 1176-1186. (in Chinese)
- [2] 薛明洋, 周勇, 梁宏伟, 李翔, 范玉顶, 曾令兵, 曲春娟, 孟彦. 一株中华鳖源嗜水气单胞菌的分离鉴定及毒力基因分析. 中国农学通报, 2021, 37(20): 152-159.

- Xue MY, Zhou Y, Liang HW, Li X, Fan YD, Zeng LB, Qu CJ, Meng Y. Isolation, identification and virulence gene analysis of an *Aeromonas hydrophila* from diseased *Pelodiscus sinensis*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2021, 37(20): 152–159. (in Chinese)
- [3] 郑杰夫, 张一柳, 钟蕾. 中华鳖源嗜水气单胞菌的研究进展. *水产科学*, 2016, 35(2): 191–198.
- Zheng JF, Zhang YL, Zhong L. Research advances on diseases of *Aeromonas hydrophila* in Chinese soft-shelled turtle *Trionyx sinensis*. *Fisheries Science*, 2016, 35(2): 191–198. (in Chinese)
- [4] 林启存, 朱丽敏, 李忠全, 许宝青, 谢楠. 中华鳖弗氏柠檬酸杆菌败血症病原分离鉴定与药敏试验. *水产科学*, 2008, 27(1): 42–43.
- Lin QC, Zhu LM, Li ZQ, Xu BQ, Xie N. Isolation, determination and antimicrobial susceptibility test of the *Citrobacter freundii* septicemia from soft shelled turtle *Trionyx sinensis*. *Fisheries Science*, 2008, 27(1): 42–43. (in Chinese)
- [5] Chung TH, Yi SW, Kim BS, Kim WI, Shin GW. Identification and antibiotic resistance profiling of bacterial isolates from septicemic soft-shelled turtles (*Pelodiscus sinensis*). *Veterinárni Medicina*, 2017, 62(3): 169–177.
- [6] 张棋, 吴志新, 李景, 胡明, 石焱, 任雨薇, 陈孝煊. 中华鳖肠道益生菌的筛选、鉴定与生长特性研究. *水生生物学报*, 2015, 39(2): 294–300.
- Zhang Q, Wu ZX, Li J, Hu M, Shi Y, Ren YW, Chen XX. The selection, identification, and characterization of the growth of probiotics from intestinal tract of Chinese softshell turtle (*Trionyx sinensis*). *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(2): 294–300. (in Chinese)
- [7] 陆承平. 兽医微生物学. 4 版. 北京: 中国农业出版社, 2007.
- [8] 徐洋洋. 铜绿假单胞菌致病性受信号分子调控及其机理研究. 西北大学博士学位论文, 2013: 13–23.
- [9] 房海, 陈翠珍, 张晓君. 水产养殖动物病原细菌学. 北京: 中国农业出版社, 2010.
- [10] 邱立, 王兴龙, 郝华芳, 杨增岐. 致仔猪肠壁囊泡性脓肿铜绿假单胞菌的生物学特性研究. *中国兽医学报*, 2012, 32(11): 1640–1644.
- Qiu L, Wang XL, Hao HF, Yang ZQ. The bio-characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from piglets with intestinal vesicles cysts. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2012, 32(11): 1640–1644. (in Chinese)
- [11] 张耀相, 邱立, 曹振莲, 张彦明. 奶牛铜绿假单胞菌的分离与鉴定. *动物医学进展*, 2007, 28(12): 110–112.
- Zhang YX, Qiu L, Cao ZL, Zhang YM. Isolation and identification of *Pseudomonas aeruginosa* from dairy cows. *Progress in Veterinary Medicine*, 2007, 28(12): 110–112. (in Chinese)
- [12] 邵西群, 胡博, 章秀婷, 白雪, 闫喜军, 杨福合. 水貂出血性肺炎病原铜绿假单胞菌的分子特征. *中国兽医科学*, 2014, 44(4): 340–345.
- Shao XQ, Hu B, Zhang XT, Bai X, Yan XJ, Yang FH. Molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from minks with haemorrhagic pneumonia. *Chinese Veterinary Science*, 2014, 44(4): 340–345. (in Chinese)
- [13] 赵忠添. 黄喉拟水龟“白眼病”治疗初报. *科学养鱼*, 2005(6): 69–70.
- Zhao ZT. Report on the treatment of white eye disease of *Mauremys mutica*. *Scientific Fish Farming*, 2005(6): 69–70. (in Chinese)
- [14] 何莘萍, 彭金霞, 韦媛媛, 张彬, 陈秀荔, 彭敏, 杨春玲, 李咏梅, 陈晓汉. 广西黄喉拟水龟铜绿假单胞菌的分离鉴定. *西南农业学报*, 2015, 28(5): 2306–2309.
- He PP, Peng JX, Wei BY, Zhang B, Chen XL, Peng M, Yang CL, Li YM, Chen XH. Isolation, identification and drug sensitivity test of *Pseudomonas aeruginosa* from *Mauremys mutica* cantor. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2015, 28(5): 2306–2309. (in Chinese)
- [15] Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(6): 3140–3145.
- [16] Clarridge JE. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 2004, 17(4): 840–862.
- [17] Jean BP, Melvin PW, George MF. Performance

- standards for antimicrobial susceptibility testing. 27th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017: 42–44.
- [18] 谭瑶, 赵清, 舒为群, 陈浩. K-B 纸片扩散法药敏试验. 检验医学与临床, 2010, 7(20): 2290–2291.
Tan Y, Zhao Q, Shu WQ, Chen H. K-B disc diffusion method drug sensitivity test. *Laboratory Medicine and Clinic*, 2010, 7(20): 2290–2291. (in Chinese)
- [19] 王超杰, 黎洁, 王旭, 王至诚, 王卫民, 罗毅. 鱼源致病菌皮特不动杆菌 Ap-W20 的全基因组序列及其毒力特征分析. 水产学报, 2020, 44(9): 1488–1501.
Wang CJ, Li J, Wang X, Wang ZC, Wang WM, Luo Y. Complete genome sequence of an emerging fish pathogen *Acinetobacter pittii* strain Ap-W20 and its virulence characteristics. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(9): 1488–1501. (in Chinese)
- [20] 王超杰, 王至诚, 康兴宇, 黎洁, 刘乃瑜, 王卫民, 罗毅. 一株分离自团头鲂的嗜水气单胞菌病原学及其与 ST251 型菌株的全基因组比较. 中国水产科学, 2021, 28(4): 503–516.
Wang CJ, Wang ZC, Kang XY, Li J, Liu NY, Wang WM, Luo Y. Aetiology characteristics of a pathogenic *Aeromonas hydrophila* strain isolated from *Megalobrama amblycephala* and genomic characterization with the epidemic ST251 clones. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(4): 503–516. (in Chinese)
- [21] 王豪. 两株林麝源铜绿假单胞菌生物学特性及胞外产物特性研究. 四川农业大学硕士学位论文, 2016.
- [22] 房海, 陈翠珍, 史秋梅, 张艳英, 张东林. 雏鸡铜绿假单胞菌的分离鉴定及生物学特性分析. 畜牧与兽医, 2010, 42(5): 71–74.
Fang H, Chen CZ, Shi QM, Zhang YY, Zhang DL. Isolation, identification and biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* from chicks. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2010, 42(5): 71–74. (in Chinese)
- [23] 中国兽药典编委会(Commission of Chinese veterinary pharmacopeia). 中华人民共和国兽药典: 2010 年版. 北京: 化学工业出版社, 2015.
- [24] 鞠晓红, 李瑶, 王月华, 冯宪敏. 铜绿假单胞菌 III 型分泌系统的研究进展. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(1): 83–87.
Ju XH, Li Y, Wang YH, Feng XM. Research progress of type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2015, 31(1): 83–87. (in Chinese)
- [25] 罗国栋. 嗜水气单胞菌 VI 型分泌系统分子伴侣蛋白 *ClpV* 基因的克隆及生物信息学分析. 山东农业大学硕士学位论文, 2018.
- [26] Thorner LK, Fandl JP, Artz SW. Analysis of sequence elements important for expression and regulation of the adenylate cyclase gene (*cya*) of *Salmonella typhimurium*. *Genetics*, 1990, 125(4): 709–717.
- [27] Shon AS, Bajwa RP, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence*, 2013, 4(2): 107–118.
- [28] Miller JM, Chaudhary H, Marsee JD. Phylogenetic analysis predicts structural divergence for proteobacterial ClpC proteins. *Journal of Structural Biology*, 2018, 201(1): 52–62.
- [29] 崔来宾, 叶星, 邓国成, 江小燕, 田园园, 白俊杰, 黎坚平. 草鱼铜绿假单胞菌的鉴定及药物敏感性分析. 大连海洋大学学报, 2010, 25(6): 488–494.
Cui LB, Ye X, Deng GC, Jiang XY, Tian YY, Bai JJ, Li JP. Identification and antibiotic sensitivity of pathogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa* isolated from diseased grass carp. *Journal of Dalian Ocean University*, 2010, 25(6): 488–494. (in Chinese)
- [30] 陶保华, 石和荣, 黄俊文, 王刚. 假单胞菌引起罗氏沼虾黄鳃、黑鳃病的研究. 中山大学学报: 自然科学版, 2000, 39(S1): 255–259.
Tao BH, Shi HR, Huang JW, Wang G. Studied on yellow and black gills of *Macrobrachium rosenbergii* caused by *Pseudoonas*. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2000, 39(S1): 255–259. (in Chinese)
- [31] 马木尔·阿克木汗, 姚晓慧, 刘英玉, 王舒丰, 杨紫嫣, 夏利宁. 新疆焉耆县不同动物源葡萄球菌耐药性及其亲缘关系分析. 动物医学进展, 2020, 41(7): 27–33.
Mamuer·Akemkhan, Yao XH, Liu YY, Wang SF, Yang ZY, Xia LN. Analysis of drug resistance and genetic relationship of *Staphylococcus* from different animal sources in Yanqi county of Xinjiang. *Progress in Veterinary Medicine*, 2020, 41(7): 27–33. (in Chinese)
- [32] 刘亚华, 李伟程, 余中节, 赵飞燕, 赵洁, 孙志宏, 张和平. 不同分离源植物乳杆菌的群体基因组分析. 微生物学通报, 2019, 46(12): 3388–3401.
Liu YH, Li WC, Yu ZJ, Zhao FY, Zhao J, Sun ZH,

- Zhang HP. Population genetics of *Lactobacillus plantarum* isolated from different environments. *Microbiology China*, 2019, 46(12): 3388–3401.
- [33] Hughes KJ, Everiss KD, Kovach ME, Peterson KM. Isolation and characterization of the *Vibrio cholerae acfA* gene, required for efficient intestinal colonization. *Gene*, 1995, 156(1): 59–61.
- [34] Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2016, 80(3): 629–661.
- [35] Li B, Zhao YL, Liu CT, Chen ZH, Zhou DS. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiology*, 2014, 9(9): 1071–1081.
- [36] Francetic O, Belin D, Brdaut C, Pugsley AP. Expression of the endogenous type II secretion pathway in *Escherichia coli* leads to chitinase secretion. *Embo Journal*, 2014, 19(24): 6697–6703.
- [37] Filloux A, Michel G, Bally M. GSP-dependent protein secretion in Gram-negative bacteria: the Xcp system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Reviews*, 1998, 22(3): 177–198.
- [38] Li YQ, Chen L, Zhang PS, Bhagirath AY, Duan KM. ClpV3 of the H3-type VI secretion system (H3-T6SS) affects multiple virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1096.
- [39] Wood TE, Howard SA, Wettstadt S, Filloux A. PAAR proteins act as the ‘sorting hat’ of the type VI secretion system. *Microbiology*, 2019, 165(11): 1203–1218.
- [40] 方雪瑶, 胡龙华, 杭亚平, 俞凤, 陈艳慧, 钟桥石. 铜绿假单胞菌VI型分泌系统的研究进展. *中国生物工程杂志*, 2018, 38(9): 88–93.
Fang XY, Hu LH, Hang YP, Yu F, Chen YH, Zhong QS. Research progress of type VI secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *China Biotechnology*, 2018, 38(9): 88–93. (in Chinese)
- [41] Jones MA, Hulme SD, Barrow PA, Wigley P. The *Salmonella* pathogenicity island 1 and *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion systems play a major role in pathogenesis of systemic disease and gastrointestinal tract colonization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the chicken. *Avian Pathology*, 2007, 36(3): 199–203.
- [42] Beauchene NA, Mettert EL, Moore LJ, Keleş S, Willey ER, Kiley PJ. O₂ availability impacts iron homeostasis in *Escherichia coli*. *PNAS*, 2017, 114(46): 12261–12266.
- [43] Dahyot S, Oxaran V, Niepceron M, Dupart E, Legris S, Destruel L, Didi J, Clamens T, Lesouhaitier O, Zerdoumi Y, Flaman JM, Pestel-Caron M. Role of the LytSR two-component regulatory system in *Staphylococcus lugdunensis* biofilm formation and pathogenesis. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 39.
- [44] Perry RD, Bobrov AG, Kirillina O, Rhodes ER, Actis LA, Fetherston JD. *Yersinia pestis* transition metal divalent cation transporters. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2012, 954: 267–279.
- [45] Cisternas IS, Salazar JC, García-Angulo VA. Overview on the bacterial iron-riboflavin metabolic axis. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1478.
- [46] Gellatly SL, Bains M, Breidenstein EBM, Strehmel J, Reffuveille F, Taylor PK, Yeung ATY, Overhage J, Hancock REW. Novel roles for two-component regulatory systems in cytotoxicity and virulence-related properties in *Pseudomonas aeruginosa*. *AIMS Microbiology*, 2018, 4(1): 173–191.
- [47] Gutu AD, Sgambati N, Strasbourger P, Brannon MK, Jacobs MA, Haugen E, Kaul RK, Johansen HK, Høiby N, Moskowitz SM. Polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* *phoQ* mutants is dependent on additional two-component regulatory systems. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57(5): 2204–2215.
- [48] 吕远志. 迟钝爱德华氏菌双组分系统的毒力调控机制. 华东理工大学博士学位论文, 2013.
- [49] 芮萍, 马增军, 贺英, 王秋悦, 张建文, 陈娟. 貂源铜绿假单胞菌对常用抗菌药物的耐药性检测. *畜牧与兽医*, 2013, 45(9): 61–63.
Rui P, Ma ZJ, He Y, Wang QY, Zhang JW, Chen J. Drug resistance to common antibiotics of *Pseudomonas aeruginosa* from mink. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2013, 45(9): 61–63. (in Chinese)
- [50] 王永强, 李偲, 范培超, 陈陆, 周虹, 刘镛. 1株鸵鸟铜绿假单胞菌的分离鉴定与进化树分析. *中国生物制品学杂志*, 2020, 33(10): 1111–1116.
Wang YQ, Li S, Fan PC, Chen L, Zhou H, Liu K. Isolation, identification and phylogenetic analysis of a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Chinese Journal of Biologicals*, 2020, 33(10): 1111–1116. (in Chinese)
- [51] 隗黎丽, 吴华东, 阮记明. 黄颡鱼鲰爱德华氏菌的分

- 离及鉴定. 江西农业大学学报, 2014, 36(1): 187–192.
- Wei LL, Wu HD, Ruan JM. Isolation and identification of *Edwardsiella ictaluri* from yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2014, 36(1): 187–192. (in Chinese)
- [52] 张石云, 宋超, 陈家长. 喹诺酮类抗生素在水产养殖中应用的研究进展. 江苏农业科学, 2019, 47(3): 32–36.
- Zhang SY, Song C, Chen JZ. Research progress of application of quinolones antibacterial drugs in aquaculture. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2019, 47(3): 32–36. (in Chinese)
- [53] 谭爱萍, 邓玉婷, 姜兰, 吴雅丽, 冯永永, 黄玉萍, 罗理, 王伟利. 养殖龟鳖源气单胞菌耐药性与质粒介导喹诺酮类耐药基因分析. 水产学报, 2014, 38(7): 1018–1025.
- Tan AP, Deng YT, Jiang L, Wu YL, Feng YY, Huang YP, Luo L, Wang WL. Analysis of antimicrobial susceptibility and plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Aeromonas* isolated from turtles. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(7): 1018–1025. (in Chinese)
- [54] 康兴宇, 王超杰, 王至诚, 王卫民, 罗毅. 耐喹诺酮类抗生素的鱼源嗜水气单胞菌中内生质粒 pAhW39 的克隆及功能. 水产学报, 2021, 45(5): 760–768.
- Kang XY, Wang CJ, Wang ZC, Wang WM, Luo Y. Cloning and functional identification of an endogenous plasmid pAhW39 from quinolone-resistant *Aeromonas hydrophila* isolated from fish. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(5): 760–768. (in Chinese)

(本文责编 张晓丽)