

# 一株鲈鱼源致病性鳗鱼诺卡氏菌 XXLX2 的分离鉴定及比较基因组分析

刘宸源, 尚钰坤, 毛会丽, 李赛博, 王乾坤, 张苻苻, 朱黎星, 张子怡, 申长春, 关建义  
新乡医学院生命科学技术学院, 河南 新乡 453003

**摘要:** 分离、鉴定河南新乡某养殖场大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 患病的病原菌, 了解分离菌致病性, 结合耐药基因注释分析药敏结果, 对其基因组结构、毒力因子与近缘菌株进行比较分析, 以期寻找共同的免疫保护抗原功能基因。结合菌落形态特征、理化特性分析, 并基于 16S rRNA 基因序列比对鉴定分离菌, 对其进行溶血试验、人工回归感染试验、药敏试验及全基因组测序分析。分离菌 XXLX2 鉴定为鳗鱼诺卡氏菌 (*Nocardia seriolae*), 其在血平板上无溶血圈现象, 经回归感染试验计算出其对大口黑鲈的半数致死量 ( $LD_{50}$ ) 为  $1.49 \times 10^5$  CFU·mL<sup>-1</sup>, 且被感染鱼与自然患病鱼的症状相符。XXLX2 菌株对多黏菌素 B、红霉素和  $\beta$ -内酰胺类抗生素显示出抗性, 耐药基因和药敏试验结果基本一致。通过基因组比较分析, XXLX2 菌株与 EM150506、NK201610020 和 UTF1 等 3 株不同来源的鳗鱼诺卡氏菌具有较近的亲缘关系, 且具有较好的共线性; XXLX2 菌株与 3 株鳗鱼诺卡氏菌在毒力因子的比对中存在一定差异, 但整体具有较高的保守性。通过对 XXLX2 菌株进行基因组注释与比较分析, 为进一步探索鳗鱼诺卡氏菌致病机制及基因工程疫苗研究提供了基础数据支撑。

**关键词:** 大口黑鲈; 鳗鱼诺卡氏菌; 全基因组测序; 毒力基因; 药敏试验

中图分类号: S 941.42

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



## Isolation and identification of a pathogenic *Nocardia seriolae* strain XXLX2 from seabass and comparative genomic analysis

LIU Chenyuan, SHANG Yukun, MAO Huili, LI Saibo, WANG Qiankun, ZHANG Xingxing, ZHU Lixing, ZHANG Ziyi, SHEN Changchun, GUAN Jianyi

School of Life Science and Technology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China

**Abstract:** We isolated and identified the pathogen causing disease in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) from a farm in Xinxiang, and investigated its pathogenicity. We combined the annotation of drug-resistant genes to analyze drug sensitivity results, and compared its genome structure, virulence factors and closely related strains to search for the common immune protective antigen functional genes. By the analyses of colony morphology and physicochemical properties, and based on the identification of isolated bacteria through 16S rRNA gene sequence alignment, we conducted hemolysis test, artificial regression infection test, drug sensitivity test, and whole genome sequencing analysis, then identified the isolated bacteria XXLX2 which was identified as *Nocardia seriolae*, without hemolysis circle on blood agar plates. The median lethal dose ( $LD_{50}$ ) for largemouth bass was  $1.49 \times 10^5$  CFU·mL<sup>-1</sup> through regression infection tests, and the symptoms of infected bass were consistent with those of naturally diseased bass. The XXLX2 strain exhibited resistance to polymyxin B, erythromycin, and  $\beta$ -lactam antibiotics, and the

收稿日期: 2024-10-31; 修回日期: 2025-02-12

基金项目: 河南省科技厅科技攻关项目 (202102110261, 212102110383); 河南省现代农业产业技术体系建设专项资金资助 (HARS-23-16-T)

作者简介: 刘宸源 (2000—), 男, 硕士研究生, 研究方向为病原微生物的基因诊断及感染免疫学。E-mail: 3261837270@qq.com

通信作者: 关建义 (1969—), 男, 教授, 博士, 研究方向为病原微生物。E-mail: jianyiguan@163.com

results of drug resistance gene and drug sensitivity test were generally consistent. Through genome comparison analysis, the XXLX2 strain showed close phylogenetic relationship and good collinearity with three strains of *N. seriolae* from different sources, namely EM150506, NK201610020, and UTF1. There were certain differences in the comparison of virulence factors between the XXLX2 strain and the three strains of *N. seriolae*, but generally, they exhibited high conservation. Genomic annotation and comparative analysis of the XXLX2 strain provide basic data support for further exploration of the pathogenic mechanism of *N. seriolae* and research on genetically engineered vaccines.

**Keywords:** *Micropterus salmoides*; *Nocardia seriolae*; Whole genome sequencing; Virulence gene; Drug sensitivity test

鳜鱼诺卡氏菌 (*Nocardia seriolae*) 属于放线菌目、诺卡氏菌属, 是一种兼性胞内丝状杆菌, 遍布于自然环境中<sup>[1-2]</sup>。在水产养殖领域, 鳜鱼诺卡氏菌易于侵袭免疫力低下的鱼体, 是引起鱼类诺卡氏菌病的主要致病菌<sup>[3-4]</sup>。该菌通过鱼类体表伤口、鳞片脱落处以及鳃等部位感染宿主, 其发病过程缓慢, 潜伏期较长, 不易被及时发现, 导致宿主在患病后期因缺乏有效的治疗手段, 病死率极高<sup>[5-6]</sup>; 病鱼的主要症状为游动失稳、厌食、反应迟缓和腹部肿胀, 鳍下和局部体表皮肤溃烂出血, 伴有显著的炎症反应, 后期病鱼体表发黑, 体内出现肉芽肿斑点病症, 主要表现在多器官表面长出大量的白色或淡黄色结节<sup>[3,7-8]</sup>。近年关于鳜鱼诺卡氏菌感染淡水鱼、海水鱼的报道日益增多<sup>[8]</sup>, 主要有乌鳢 (*Channa argus*)<sup>[9]</sup>、大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*)<sup>[10]</sup>、大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*)<sup>[11]</sup>、卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*)<sup>[12]</sup> 和日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*)<sup>[13]</sup> 等。目前, 防治鱼类诺卡氏菌病没有商品化疫苗, 定期投放抗生素类药物仍是治疗该病的主要手段<sup>[5,11]</sup>, 长期不规范的大量使用抗生素, 致使许多鳜鱼诺卡氏菌产生耐药性<sup>[11]</sup>。这不仅增加了治疗的难度, 还可能对人类健康和环境造成潜在威胁<sup>[1-4]</sup>。因此, 开发新型、有效的治疗手段, 如疫苗或生物制剂, 对于控制和预防鱼类诺卡氏菌病具有重要意义<sup>[6-7]</sup>。同时, 加强对养殖环境的监控和管理, 提高养殖鱼类的免疫力, 也是减少该病发生的有效措施。

鳜鱼诺卡氏菌的致病机理复杂, 其致病性由多种毒力基因共同调控, 从而诱发宿主体产生多种不良病症, 但关于鲈鱼源鳜鱼诺卡氏菌的全基因组及主要致病因子的报道较少。本实验室从河南省新乡市某养殖场自然感染严重的大口黑鲈体内分离出一株沙粒状菌, 通过形态学观察、理化性质检测、16S rRNA 基因序列比对、药敏性测试以及回归感染试验对其生物学特性进行分析。同时, 本研究对

分离菌的基因组序列进行归类 and 基因注释, 分析耐药基因功能, 挖掘毒力相关基因, 并与不同地区的鳜鱼诺卡氏菌进行基因组比较分析, 以期找出不同地域鳜鱼诺卡氏菌共同的免疫保护抗原功能基因, 为后续研发针对鳜鱼诺卡氏菌的基因工程疫苗奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验用鱼

健康大口黑鲈体质量 (40±5.5) g, 购自河南省新乡市银丰养殖场。在实验室水箱饲喂驯化 1 周 [温度 (25±2) °C], 试验前随机抽选 10 尾健康鲈鱼进行取血涂板、解剖和镜检, 确保无鳜鱼诺卡氏菌感染、无携带寄生虫。

### 1.2 病原菌分离纯化

在无菌环境下解剖自然患病严重的大口黑鲈, 在其病变心脏和脊柱肌肉结节病灶处取样, 划线接种于 BHI 琼脂培养基 (广东环凯微生物科技有限公司) 上, 倒置于 28 °C 恒温培养箱中 7 d 后, 挑取优势菌群中单菌落重复纯化培养 3 次。将纯化后的菌液与 50% 无菌甘油按 1 : 1 体积比各取 600 μL 在 1.5 mL 无菌 EP 管中混匀, 贴塑封膜并置于 -80 °C 冰箱中保存。

### 1.3 病原菌的鉴定

#### 1.3.1 分离菌形态特征观察

在 BHI 琼脂培养基上划线接种分离纯化后的细菌, 于 28 °C 恒温倒置培养 5 d, 观察菌落形态、大小和颜色; 并在光学显微镜下观察纯化菌株的革兰氏染色情况。

#### 1.3.2 分离菌的理化性质检测

根据细菌微量生化鉴定指标说明及《伯杰氏细菌鉴定手册》<sup>[14]</sup> 的方法, 并将鳜鱼诺卡氏菌 JCM3360 作为参考菌株, 通过使用细菌生化鉴定管 (青岛海博生物技术有限公司) 检测分离菌的各项生理生化指标。

### 1.3.3 分离菌 16S rRNA 序列测定及系统发育树构建

使用细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒 [宝日医生物技术 (北京) 有限公司] 提取分离菌全基因组 DNA 用作扩增模板, 利用 2×Taq MasterMix (康为世纪生物科技股份有限公司) DNA 聚合酶和通用 16S rRNA 引物 (上游引物 5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3'、下游引物 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'), 进行目的基因片段体外扩增。PCR 反应设定: 95 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 29 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 暂存。经琼脂糖凝胶电泳检测目标片段约 1 500 bp, 随后将胶回收纯化后的 PCR 产物送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。将测序结果输入 NCBI 数据库完成同源性比对分析, 借助 MEGA 11.0 软件选择邻接 (Neighbor Joining, NJ) 法构建系统进化树。

### 1.4 溶血试验

将保藏分离菌接种至 5 mL BHI 培养基中, 在 28 °C、180 r·min<sup>-1</sup> 的恒温摇床上进行培养, 3 d 后将菌悬液通过打孔法加在血琼脂平板 (BKMAM-LAB) 上。以本实验室具备溶血活性的嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) XDMG 作为阳性对照, 而 BHI 培养基作为阴性对照。每组样品孔中均加入 100 μL 的样本, 将平板正置放在 28 °C 恒温培养箱中, 分别在 24 和 120 h 后观察平板上是否出现溶血圈现象。

### 1.5 回归感染试验

取分离菌活化于 BHI 培养基中, 置于 28 °C、180 r·min<sup>-1</sup> 恒温培养 5 d 后离心收集菌体。健康大口黑鲈随机分为 6 组 (5 个感染组, 1 个对照组), 每组 20 尾, 采用 0.65% (w) 无菌生理盐水将菌液调整为  $1.5 \times 10^4$ 、 $1.5 \times 10^5$ 、 $1.5 \times 10^6$ 、 $1.5 \times 10^7$  和  $1.5 \times 10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup> 5 个浓度梯度, 感染组每尾由腹腔进针注射 0.2 mL 菌液, 对照组注射等体积 0.65% (w) 无菌生理盐水。试验期控制各水箱水下温度为 (25±2) °C, 正常曝气、饲喂, 每次换取水箱中一半水量, 持续观察 21 d, 并对各组死亡鱼体数及临床症状进行记录, 依据改良寇氏法<sup>[15]</sup> 计算半数致死量 (LD<sub>50</sub>)。同时, 21 d 内随机抽取各感染组死亡病鱼进行解剖观察和病变组织筛菌, 重新分离纯化致病菌, 确定是否为试验菌感染。

### 1.6 药物敏感性试验

使用 PBS 将 1.4 中培养的菌调整至  $1.0 \times 10^8$

CFU·mL<sup>-1</sup> 后, 取 2 mL 菌液 (1%, φ) 接种至灭菌后冷却到 45~55 °C 的 200 mL BHI 琼脂培养基中, 轻轻振荡混匀, 迅速依次倒入无菌培养皿中, 待培养基完全凝固后, 使用无菌镊子将 26 种药敏片 (杭州微生物试剂有限公司) 分别放置于相应的培养基平板上, 用塑封膜对平板封口, 放于 28 °C 恒温箱正置培养 4 d, 测量抑菌圈直径, 判断结果。每种药敏片做 3 组平行实验, 设置空白对照组。

### 1.7 分离菌全基因组测序及基因功能注释分析

使用 DNA 提取试剂盒提取分离菌基因组 DNA, 送至上海美吉生物科技有限公司进行全基因组测序。通过统计分析和质控, 采用 unicycler 和 pilonjin 软件进行数据组装和优化, 成功获得完整的细菌基因组序列。使用 Glimmer 预测基因组的开放阅读框 (Open reading frame, ORF)。利用 tRNAscan-SE v2.0<sup>[16]</sup> 和 Barrnap 软件分别对基因组中包含的 tRNA 和 rRNA 进行预测。通过序列比对工具 (Basic local alignment search tool, BLAST) 在 NCBI 非冗余蛋白数据库 (Non-redundant protein database, NR), 综合的抗生素抗性基因数据库<sup>[17]</sup> (Comprehensive antibiotic resistance database, CARD), 毒力因子数据库<sup>[18]</sup> (Virulence factor database, VF-DB) 对 ORF 翻译的氨基酸进行注释。

### 1.8 比较基因组分析

结合系统发育树将分离菌株基因组与其聚在同一分支菌株的基因组进行 BLAST 比对, 筛选出近缘菌株, 对分离菌株与近缘菌株的基因组特征进行比较分析, 并通过 minimap2 (2.28-r1209) 进行物种间基因组序列比对, 选用 asm-to-ref mapping 模式构建共线性分析图。此外, 利用 DNAMAN 软件对分离菌株和近缘菌株毒力因子的核酸及氨基酸序列进行差异分析。

## 2 结果

### 2.1 患病大口鲈鱼剖检症状

大口黑鲈患病前期症状不明显, 随着病情的发展, 鲈鱼腹部开始肿胀, 其胸鳍部位及泄殖孔处红肿, 体表溃烂出血, 腹腔有黄色液体且在心脏表面和脊柱肌肉处有散在白色或淡黄色结节 (图 1)。

### 2.2 致病菌形态特征

从自然患病大口黑鲈心脏白色结节处分离纯化的优势菌株, 被命名为 XXLX2。将 XXLX2 菌株划



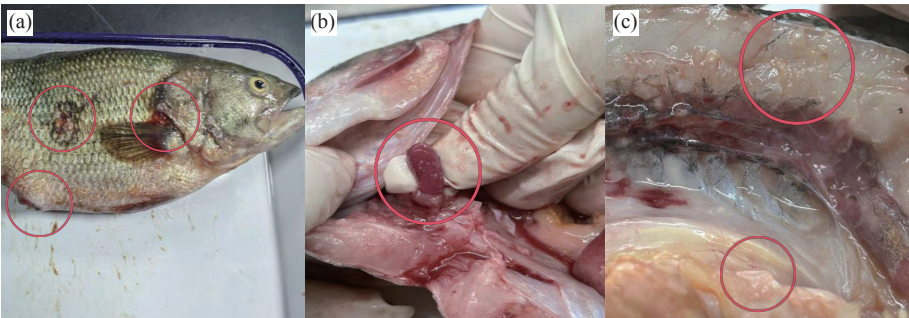


图1 患病大口黑鲈临床症状  
注：a. 患病鱼胸鳍及泄殖孔红肿、体表溃疡；b. 患病鱼心脏表面结节；c. 患病鱼脊柱肌肉处散在白色或淡黄色结节。

Fig. 1 Clinical characteristics of diseased *M. salmoides*

Note: a. The pectoral fins and genital orifice of the infected sea bass are red and swollen, with ulcers on the body surface; b. Nodules are present on the surface of the heart of the infected sea bass; c. White or pale yellow nodules are scattered in the spinal muscle of the infected sea bass.

线于 BHI 琼脂培养基上，28 ℃ 培养 5 d 后可观察到显著白色或淡黄色沙粒状单菌落，表面干燥、质硬，菌落后期酷似雪花质感，不透明且为不规则形状 (图 2-a)。将其活化于 BHI 液体培养基中 4 d，观察到菌液澄清，菌体在试管底部呈絮状沉淀。菌体在 100 倍显微镜下呈短杆或长杆丝状，革兰氏染色为蓝色阳性菌 (图 2-b)。

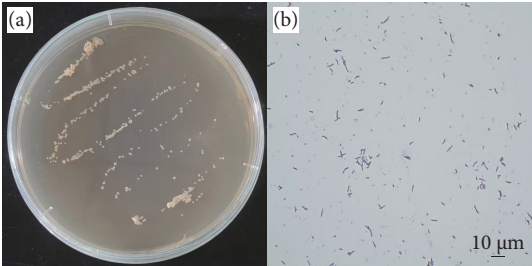


图2 XXLX2 生长菌落形态和革兰氏染色结果  
注：a. BHI 培养基上白色或淡黄色菌落；b. XXLX2 菌株革兰氏染色为蓝色阳性菌。

Fig. 2 Morphological and gram staining result of strain XXLX2

Note: a. White or pale yellow colonies on BHI medium; b. The XXLX2 strain is Gram-positive, staining blue with Gram staining.

2.3 XXLX2 菌株的理化特征

大口黑鲈源分离菌株 XXLX2 的理化试验结果 (表 1) 显示，其能利用柠檬酸盐和 D-葡萄糖作为唯一碳源维持生长，过氧化氢酶试验和七叶苷水解试验呈阳性，明胶液化试验呈阴性，不还原硝酸盐且不水解淀粉。XXLX2 菌株的理化特性与鳜鱼诺卡氏菌参考菌株 JCM3360 基本相符，属于诺卡氏菌属的一般特征。

2.4 XXLX2 菌株 16S rRNA 基因序列分析

分离菌 XXLX2 的 16S rRNA 基因扩增凝胶电泳图谱如图 3，在 1 000~2 000 bp 之间出现单一

表1 XXLX2 生理生化特征  
Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain XXLX2

生化项目 Biochemical item	XXLX2	鳜鱼诺卡氏菌 JCM3360 <i>N. seriolae</i> JCM3360
唯一碳源利用 Utilization of a single carbon source		
甘露醇 Mannitol	—	—
D-葡萄糖 D-glucose	+	+
阿拉伯糖 Arabinose	—	—
柠檬酸盐 Citrate	+	+
山梨醇 Sorbitol	—	—
酶活性 Enzymatic activity		
过氧化氢酶 Catalase	+	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	—	—
溶菌酶 lysozyme	—	—
氧化酶 Oxidase	—	—
尿素酶 Urease	—	—
水解活性 Hydrolytic activity		
七叶苷 Esculin hydrate	+	+
淀粉 Starch	—	—
明胶液化 Gelatin hydrolysis	—	—
温度耐受 Temperature tolerance		
37 ℃ 生长 Grow at 37 ℃	—	—
45 ℃ 生长 Grow at 45 ℃	—	—

注：“+”表示阳性反应；“—”表示阴性反应。  
Note: "+" represents a positive reaction; "-" represents a negative reaction.

清晰条带，测序数据表明目标 DNA 片段长度为 1 391 bp，经 BLAST 在线比对分析，XXLX2 菌株

与 NCBI 数据库中的鲈鱼诺卡氏菌 (GenBank 登录号分别为 CP017839.1、CP063662.1、AP017900.1、EU595589.1) 16S *rRNA* 基因序列的同源性高至 99.93%。基于 16S *rRNA* 基因序列在种属水平上借助 MEGA 11.0 软件选择邻接法构建系统进化树 (图 4), 发现 XXLX2 菌株和鲈鱼诺卡氏菌株自然聚为同一分支, 综合菌株形态特征和生理生化特性, 鉴定其属于鲈鱼诺卡氏菌。

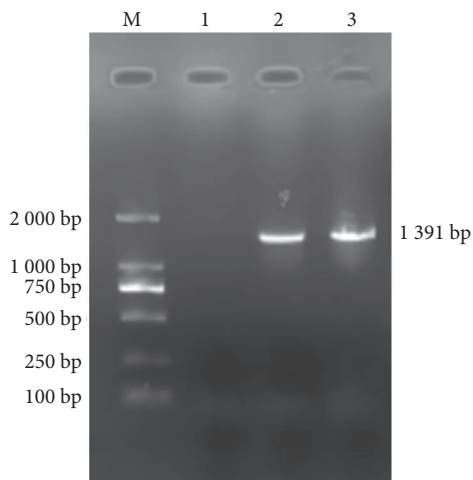


图3 XXLX2 菌株的 16S *rRNA* 扩增结果  
注: M. DL 2000 DNA Marker; 1. 阴性对照;  
2—3. XXLX2 (1391 bp)。

Fig. 3 PCR amplification results of strain XXLX2 16S *rRNA*  
Note: M. DL 2000 DNA Marker; 1. Negative control;  
2—3. XXLX2 (1391 bp).

## 2.5 XXLX2 菌株溶血试验结果

如图 5 所示, 将阴性对照 BHI 培养基、已活

化好的 XXLX2 菌株菌悬液和阳性对照嗜水气单胞菌 XDMG 通过打孔法加在血琼脂平皿中, 28 ℃ 培养 24 h 后, 阳性对照嗜水气单胞菌 XDMG 出现明显溶血圈, 并于 120 h 后溶血圈变大。XXLX2 菌株与阴性对照一致, 均无溶血圈现象。

## 2.6 大口黑鲈回归感染试验

使用 XXLX2 菌株对大口黑鲈进行人工注射感染 (表 2), 在水温 (25±2) ℃ 环境条件下, 对照组大口黑鲈未出现任何症状, 21 d 内均没有死亡; 在攻毒 2 d 后, 除  $1.5 \times 10^4$  CFU·mL<sup>-1</sup> 感染组外, 其余感染组的大口黑鲈表现出反应迟缓的不良症状; 其中,  $1.5 \times 10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup> 感染组大口黑鲈在攻毒第 4 天出现死亡, 此后死亡数量逐渐增加, 至第 10 天全部死亡; 攻毒第 5 天,  $1.5 \times 10^6$  和  $1.5 \times 10^7$  CFU·mL<sup>-1</sup> 2 个感染组开始出现死亡, 至第 15 天所有剩余个体均死亡; 剩余 2 个浓度感染组鲈鱼在攻毒第 8—第 11 天相继出现死亡, 至攻毒第 21 天,  $1.5 \times 10^5$  CFU·mL<sup>-1</sup> 感染组存活 8 尾鱼, 最低浓度感染组存活 15 尾鱼。通过统计各感染组大口黑鲈死亡数量, 按照改良寇氏法计算其 LD<sub>50</sub> 为  $1.49 \times 10^5$  CFU·mL<sup>-1</sup>。回归感染试验中的死亡病鱼体表发黑, 胸鳍及腹鳍下皮肤组织红肿, 殖泄孔周围溃疡。解剖发现部分鱼体腹腔流出淡黄色液体, 心脏、肝脏和脊柱附近肌肉组织出现明显的白色结节, 与之前自然患病鲈鱼症状类似。此外, 从上述鲈鱼病灶处分离纯化致病菌, 通过对其菌落形态

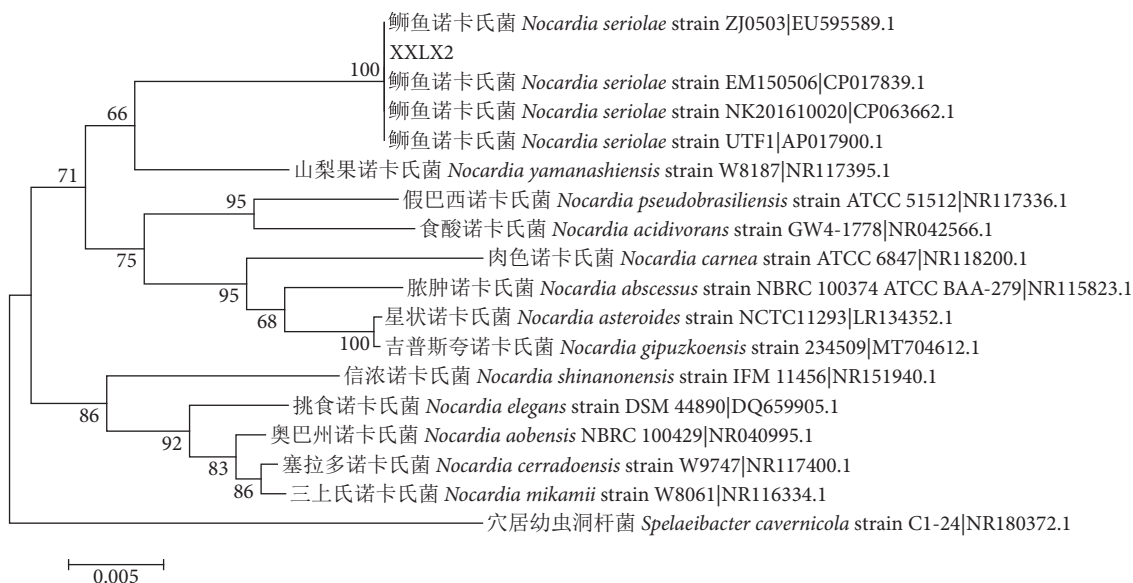


图4 XXLX2 菌株系统发育树  
Fig. 4 Phylogenetic tree of strain XXLX2

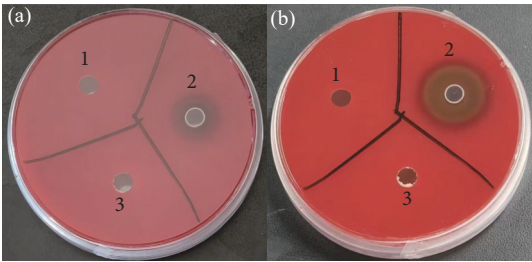


图5 XXLX2 菌株的溶血试验  
注: a. 24 h 溶血实验图; b. 120 h 溶血实验图;  
1. 阴性对照孔; 2. 阳性对照孔; 3. XXLX2 菌株加样孔。

Fig. 5 Hemolysis test of strain XXLX2

Note: Figure a shows the 24-hour hemolysis experiment, and Figure b shows the 120-hour hemolysis experiment; in both figures, 1 represents the negative control well, 2 represents the positive control well, and 3 represents the sample well with XXLX2 strain added.

及 16S rRNA 测序结果 BLAST 比对分析, 发现该菌为鳊鱼诺卡氏菌, 表明 XXLX2 菌株是引起回归感染试验中鲈鱼患病的致病菌。

2.7 XXLX2 菌株药敏试验结果

药敏试验结果显示 XXLX2 菌株对氯霉素、万

古霉素、链霉素等 13 种抗生素敏感, 对  $\beta$ -内酰胺类氨苄西林、四环素类多西环素以及喹诺酮类环丙沙星 3 种抗生素中度敏感, 对阿莫西林、多黏菌素 B 和红霉素等 10 种抗菌药物表现出耐受(表 3)。

2.8 XXLX2 菌株基因组的特性

通过第二代 Illumina 平台与第三代 PacBio 平台测序技术的联合应用, 对 XXLX2 菌株全基因组开展测序。所得基因组大小为 8 122 565 bp (图 6), G+C 含量为 68.14%, 基因组中共预测到 7 635 个编码基因, 所有编码基因的总长度为 7 186 452 bp, 编码区总长度占全基因组的比例为 88.48%。包含短散在重复序列 SINEs 17 个, 长散在重复序列 LINEs 12 个, DNA 转座子 2 个, 串联重复 (Tandem Repeat, TR) 序列 224 个。同时也发现 12 个 rRNA, 包括 5S rRNA 4 个, 16S rRNA 4 个, 23S rRNA 4 个; 63 个 tRNA 以及 37 个 sRNA。

表2 XXLX2 菌株的人工感染实验结果  
Table 2 Artificial infection experiment results of strain XXLX2

菌量 Concentration/ (CFU·mL <sup>-1</sup> )	注射剂量 Injection dose/ mL	试验数 Number of tests	观察时间及死亡数量 Observation time and number of deaths							死亡总数 Total deaths/ 尾	累积死亡率 Cumulative mortality/%
			3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	18 d	21 d		
1.5×10 <sup>8</sup>	0.2	20	0	5	3	0	0	0	0	20	100
1.5×10 <sup>7</sup>	0.2	20	0	2	5	7	3	0	0	20	100
1.5×10 <sup>6</sup>	0.2	20	0	0	2	9	5	0	0	20	100
1.5×10 <sup>5</sup>	0.2	20	0	0	1	3	4	0	0	12	60
1.5×10 <sup>4</sup>	0.2	20	0	0	0	1	0	2	1	5	25
0.65% (w) 氯化钠 NaCl	0.2	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0

2.9 耐药基因及毒力基因注释

根据 CARD 数据库的注释结果 (Identity ≥ 60%), XXLX2 菌株中包含 28 个抗生素耐药基因 (表 4), 这些基因涉及多肽类、大环内酯类、氨基糖苷类、四环素类、梭链孢烷类、阿尔法霉素类、吡嗪类、水杨酸类、利福霉素类以及头孢菌素类等抗生素。耐药基因的作用机制主要包括抗生素靶标改变、抗生素外排和抗生素失活。

XXLX2 菌株中鉴定出 26 个有明确二级分类的毒力基因 (相似性 ≥ 60%, 覆盖率 ≥ 90%)。其中, 与营养和代谢相关的毒力基因包括异柠檬酸裂解酶基因 *icl*、MbtH 家族蛋白基因 *mbtH*、硝酸还原酶

$\alpha/\beta$  亚基 *narG/H* 和天冬氨酸 1-脱羧酶基因 *panD*。与黏附相关的毒力基因包括伴侣蛋白基因 *groEL* 和延展因子基因 *tufA*。编码调控或免疫调节相关的毒力基因包含双组分转录调节因子 *devR/S*、双功能 (P) PPGPP 合成酶/水解酶基因 *relA*、RNA 聚合酶  $\sigma$  因子 *sigA*、金属依赖性转录调节因子 *ideR*、反应调节转录因子 *mprA*、转录调节蛋白基因 *phoP*、热休克蛋白转录抑制因子 *hspR*、柔红霉素 ABC 转运体渗透酶基因 *ddrA* (表 5)。上述基因在菌株对环境压力的调控中发挥作用, 并与菌株在宿主体内持续生存的能力紧密相关。预测到的编码菌株抗逆性相关的毒力基因包括超氧化物歧化酶基因 *sodA*、尿



表3 XXLX2 菌株耐药性检测结果  
Table 3 Results of drug resistance detection of strain XXLX2

抗菌药种类 Types of antibiotic	抗菌药 Antibiotics	结果 Result	抗菌药种类 Types of antibiotic	抗菌药 Antibiotics	结果 Result
β-内酰胺类 β-lactams	阿莫西林 Amoxicillin	R	氨基糖苷类抗生素 Aminoglycosides	卡那霉素 Kanamycin	S
β-内酰胺类 β-lactams	美罗培南 Meropenem	R	氨基糖苷类抗生素 Aminoglycosides	阿米卡星 Amikacin	S
β-内酰胺类 β-lactams	头孢氨苄 Cephalexin	R	磺胺类抗菌药物 Sulfonamides	复方新诺明 Paediatric compound sulfamethoxazole tablets	S
β-内酰胺类 β-lactams	头孢拉定 Cephadrine	R	磺胺类抗菌药物 Sulfonamides	磺胺异噁唑 Sulfisoxazole	S
β-内酰胺类 β-lactams	头孢哌酮 Cefoperazone	R	四环素类 Tetracyclines	多西环素 Doxycycline	I
β-内酰胺类 β-lactams	头孢曲松 Ceftriaxone	R	四环素类 Tetracyclines	米诺环素 Minocycline	S
β-内酰胺类 β-lactams	青霉素 Penicillin	R	四环素类 Tetracyclines	四环素 Tetracycline	S
β-内酰胺类 β-lactams	氨苄西林 Ampicillin	I	利福霉素类 Rifamycins	利福平 Rifampicin	S
多肽类抗生素 Polypeptides	多黏菌素 B Polymixin B	R	喹诺酮类 Quinolones	恩诺沙星 Enrofloxacin	S
大环内酯类抗生素 Macrolides antibiotics	红霉素 Erythromycin	R	喹诺酮类 Quinolones	氧氟沙星 Ofloxacin	S
氯霉素类抗生素 Chloram phenicols	氯霉素 Chloramphenicol	S	喹诺酮类 Quinolones	环丙沙星 Ciprofloxacin	I
糖肽类抗生素 Glycopeptides	万古霉素 Vancomycin	S	喹诺酮类 Quinolones	恩诺沙星 Enrofloxacin	S
氨基糖苷类抗生素 Aminoglycosides	链霉素 Streptomycin	S	喹诺酮类 Quinolones	诺氟沙星 Norfloxacin	R

注：S. 敏感；I. 中介；R. 耐药。  
Note: S. Sensitivity; I. Intermediary; R. Resistant.

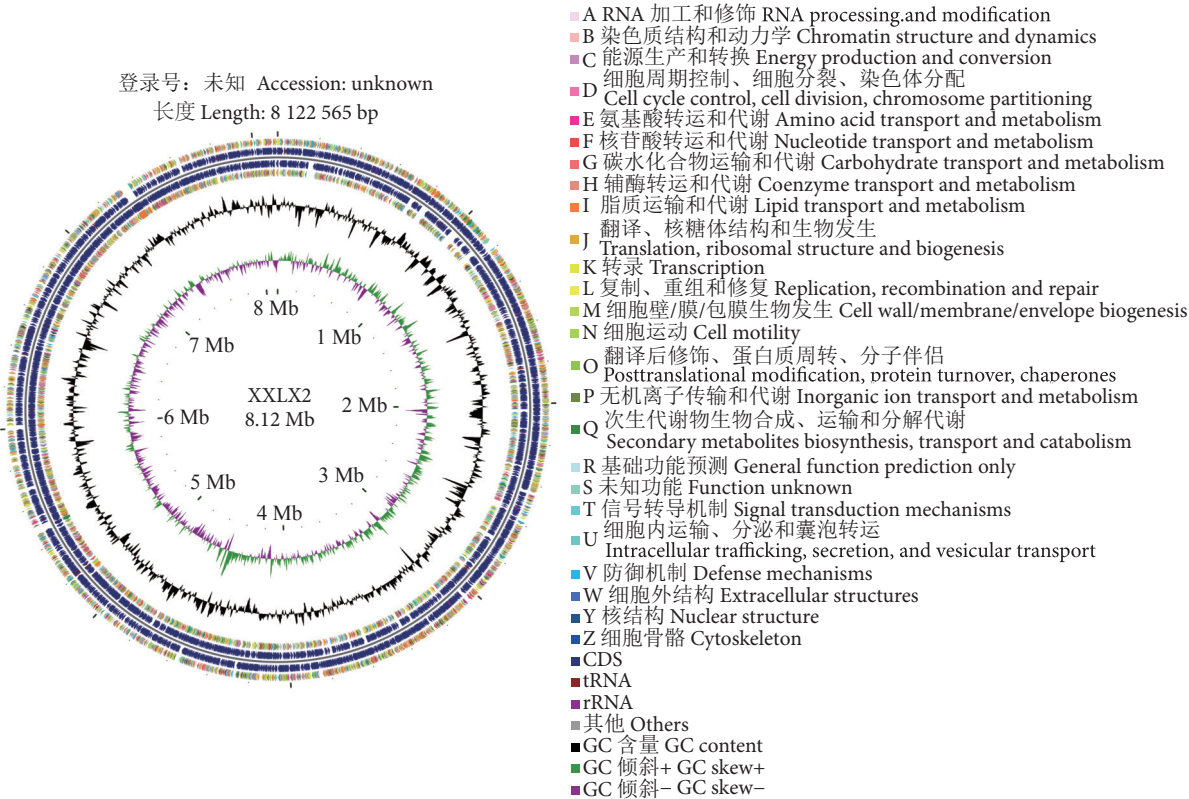


表4 XXLX2 菌株的耐药基因的分类情况  
Table 4 Classification of resistance genes in strain XXLX2

耐药基因分类 Resistance gene classification	相关基因 Related gene
肽抗生素 Peptide antibiotic	<i>almE</i>
大环内脂类抗生素 Macrolide antibiotic	<i>macB</i>
氨基糖苷类抗生素 Aminoglycoside antibiotic	<i>baeS</i>
四环素抗生素 Tetracycline antibiotic	<i>tetA</i> (58)
梭链孢烷抗生素 Fusidane antibiotic	<i>fusA</i>
吡嗪抗生素 Pyrazine antibiotic	<i>pncA</i> , <i>tex</i>
水杨酸抗生素 Salicylic acid antibiotic	<i>folC</i> , <i>thyA</i>
利福霉素抗生素 Rifamycin antibiotic	<i>rpoB</i> , <i>rbpA</i>
头孢菌素 Cephalosporin	<i>penP</i>

表5 XXLX2 菌株的毒力基因的分类情况  
Table 5 Classification of virulence genes in XXLX2 strain

毒力因子二级分类 Second-level classification of virulence factors	相关基因 Related gene	基因数量 Gene number
营养/代谢因素相关毒力因子 Nutritional/Metabolic factor	<i>icl</i> , <i>mbtH</i> , <i>narG/H</i> , <i>panD</i>	7
黏附相关毒力因子 Adherence	<i>groEL</i> , <i>tufA</i>	3
调控相关毒力因子 Regulation	<i>devR/S</i> , <i>relA</i> , <i>sigA</i> , <i>ideR</i> , <i>mprA</i> , <i>phoP</i> , <i>hspR</i>	11
免疫调节相关毒力因子 Immune modulation	<i>ddrA</i>	1
抗逆性相关毒力因子 Stress survival	<i>soda</i> , <i>urea</i> , <i>katG</i> , <i>ahpC</i>	4

素酶亚基 *ureA*、过氧化氢酶基因 *katG* 和烷基氢过氧化物还原酶亚基 *ahpC*。这些基因与菌株在抵御

氧化应激以及维持细胞内亚硝化物质与去亚硝化防御系统平衡方面密切相关。

2.10 比较基因组分析

2.10.1 XXLX2 菌株与近缘菌株基因组概况

基于 2.4 中系统发育树, 将 XXLX2 菌株与进化树同一分支菌株的基因组进行 BLAST 在线比对, 由 NCBI 上数据分析发现, XXLX2 菌株基因组与鳜鱼诺卡氏菌 EM150506、鳜鱼诺卡氏菌 NK201610020 和鳜鱼诺卡氏菌 UTF1 的基因组数据相似性较高 (BLAST 比对相似性分别为 99.93%、99.92% 和 99.99%)。同时, 本试验将 XXLX2 菌株基因组与 3 株亲缘关系较近的鳜鱼诺卡氏菌基因组的一般特征进行了比较分析 (表 6)。通过对比发现这 4 株菌基因组大小介于 8.12~8.31Mb, GC 含量介于 68.10%~68.14%; XXLX2 菌株编码基因数少于另外 3 株菌, 且其 rRNA 和 tRNA 数量与 3 株鳜鱼诺卡氏菌存在差异。

2.10.2 共线性分析

将 XXLX2 菌株基因组与不同来源的 3 株鳜鱼诺卡氏菌 (EM150506、NK201610020、UTF1) 的基因组进行共线性分析, 结果见图 7, 通过基因组间的连线分析, 可见 XXLX2 菌株与韩国鳜源分离株 EM150506 和国内乌斑杂交鳢源分离株 NK201610020 在基因组整体上展现出较高的共线性。同时, XXLX2 菌株与鳜鱼诺卡氏菌 UTF1 基因组间的匹配关系非常紧密, 表示共线性程度最高, 但是以 XXLX2 菌株的基因组序列作为参考, 与另外 3 株鳜鱼诺卡氏菌的基因排列顺序存在一定差异。

2.10.3 毒力因子比对分析

为分析 4 株鳜鱼诺卡氏菌在致病机制方面的差异与共性, 以 XXLX2 菌株作为参考菌株, 与 3 株鳜鱼诺卡氏菌 (EM150506、NK201610020、UTF1)

表6 4 株鳜鱼诺卡氏菌基因组的一般特征  
Table 6 General characteristics of four *N. seriolae* genomes

菌株 Strain	基因组大小 Genome size/Mb	GC 含量 GC Content/%	编码基因 Cds	rRNA	tRNA	年份 Year	来源 Source	来源地 Source location
鳜鱼诺卡氏菌 <i>N. seriolae</i> EM150506	8.30	68.10	7 794	12	65	2015	患病日本鳢 <i>Diseased Anguilla japonica</i>	韩国 South Korea
鳜鱼诺卡氏菌 <i>N. seriolae</i> NK201610020	8.31	68.10	7 812	3	64	2013	乌斑杂交鳢 <i>Hybrid Snakehead</i>	中国广东 Guangdong, China
鳜鱼诺卡氏菌 <i>N. seriolae</i> UTF1	8.12	68.10	7 697	4	63	2014	五条鳢 <i>Seriola quinqueradiata</i>	日本 Japan
鳜鱼诺卡氏菌 <i>N. seriolae</i> XXLX2	8.12	68.14	7 635	12	63	2023	大口黑鲈 <i>Micropterus salmoides</i>	中国新乡 Xinxiang, China



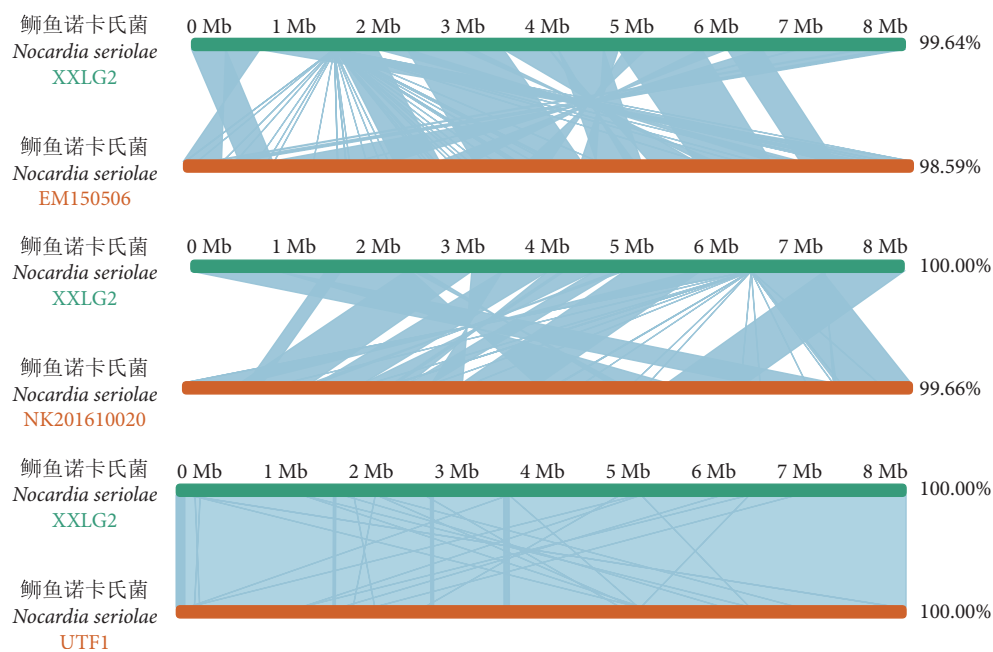


图7 共线性分析结果

Fig. 7 Collinear analysis results

进行毒力基因核苷酸水平与氨基酸水平的序列对比(表 7)。结果表明 XXLX2 菌株与 3 株鳊鱼诺卡氏菌在 *tufA* (gene2326)、*narG* (gene3969)、*narH* (gene3970)、*sigA* (gene5031)、(gene5123)、*ideR* (gene5134) 和 *ahpC* (gene5154) 等毒力基因核苷酸水平上高度保守。XXLX2 菌株与鳊鱼诺卡氏菌 (NK201610020 和 UTF1) 相比, 在 *groEL* (gene0458)、*tufA* (gene0757, gene2326)、*mbtH* (gene0773)、*ureA* (gene3618)、*narG* (gene3969,

*gene6279*)、*narH* (gene3970, gene6280)、*devR* (gene4531)、*sigA* (gene5031, gene5123)、*ideR* (gene5134) 和 *ahpC* (gene5154) 等 14 个毒力基因的核苷酸水平上同源性达到了 99% 以上, 存在碱基缺失、插入或替换现象。经比较 *sodA* (gene0071)、*devR* (gene2757) 以及 *panD* (gene7262) 3 个毒力基因的碱基序列, 发现 XXLX2 菌株与 3 株鳊鱼诺卡氏菌在这 3 个基因上的同源性相对较低, 存在一些显著的碱基序列差异。

表7 以 XXLX2 菌株为参考菌株各菌株毒力基因序列同源性及编码氨基酸序列保守性

Table 7 Homology of virulence gene sequences and conservation of encoded amino acid sequences among various strains with XXLX2 strain as reference strain

毒力基因 Virulence gene	菌株 Strain		
	鳊鱼诺卡氏菌 <i>N. seriolae</i> EM150506	鳊鱼诺卡氏菌 <i>N. seriolae</i> NK201610020	鳊鱼诺卡氏菌 <i>N. seriolae</i> UTF1
<i>sodA</i> gene0071	38.51/100	38.51/93.64	38.51/93.64
<i>groEL</i> gene0458	43.67/100	100/100	100/100
<i>icl</i> gene0540	100/100	41.75/100	41.75/100
<i>tufA</i> gene0757	40.87/100	100/100	100/100
<i>mbtH</i> gene0773	35.65/100	100/100	100/100
<i>ddrA</i> gene0950	44.90/100	44.90/100	100/100
<i>devS</i> gene1627	39.75/100	100/—	39.75/—
<i>tufA</i> gene2326	100/100	100/100	100/100
<i>devR</i> gene2757	41.92/100	41.92/100	41.92/100
<i>ureA</i> gene3618	43.71/100	100/100	100/—

续表 7

to be continued

毒力基因 Virulence gene	菌株 Strain		
	鳊鱼诺卡氏菌 <i>N. seriolae</i> EM150506	鳊鱼诺卡氏菌 <i>N. seriolae</i> NK201610020	鳊鱼诺卡氏菌 <i>N. seriolae</i> UTF1
<i>narG</i> gene3969	99.92/99.84	99.95/99.92	100/100
<i>narH</i> gene3970	100/100	100/100	100/100
<i>katG</i> gene4240	100/98.90	43.92/98.08	100/98.90
<i>devR</i> gene4531	42.84/100	100/100	100/100
<i>relA</i> gene4643	43.09/100	100/100	43.09/99.49
<i>sigA</i> gene5031	100/100	100/96.58	99.93/—
<i>sigA</i> gene5123	100/100	100/100	100/97.2
<i>ideR</i> gene5134	100/100	100/100	100/100
<i>ahpC</i> gene5154	100/100	100/100	100/100
<i>sigA</i> gene6030	37.08/100	100/96.93	37.08/95.11
<i>narG</i> gene6279	43.54/99.92	100/100	100/100
<i>narH</i> gene6280	42.64/100	100/100	100/100
<i>mprA</i> gene6919	100/100	45.54/100	45.54/100
<i>phoP</i> gene7108	99.86/99.59	42.67/100	42.67/93.88
<i>panD</i> gene7262	39.77/99.28	39.77/100	39.31/100
<i>hspR</i> gene7390	100/100	43.75/100	43.75/100

注: “—”表示未比对到氨基酸序列; “/”前表示基因序列同源性比对结果; “/”后表示编码氨基酸序列保守性比对结果。  
Note: “—” represents that no amino acid sequence was aligned; the part before “/” represents the homology comparison result of the gene sequence; and the part after “/” represents the conservation comparison result of the encoded amino acid sequence.

在 26 个毒力基因编码的氨基酸层面, XXLX2 菌株与 3 株鳊鱼诺卡氏菌之间表现出了高度的保守性(表 7)。经过比对分析发现, 在 *sodA* (gene0071) 基因编码的氨基酸序列上, XXLX2 菌株与鳊鱼诺卡氏菌(NK201610020 和 UTF1)相比, 在编码的甲硫氨酸和丙氨酸之间, XXLX2 菌株多出了 13 个氨基酸。同样, 在 *phoP* (gene7108) 基因编码的氨基酸序列上, XXLX2 菌株相较鳊鱼诺卡氏菌 UTF1 在编码的甲硫氨酸和亮氨酸之间多了 14 个氨基酸。此外, 相较鳊鱼诺卡氏菌(NK201610020 和 UTF1), 在 *sigA* (gene5031, gene6030) 基因编码的氨基酸序列上, XXLX2 菌株也出现了类似的差异。尽管存在这些差异, XXLX2 菌株与这 3 株鳊鱼诺卡氏菌在其他毒力基因编码的氨基酸序列上依然保持了高度的一致性, 仅有个别氨基酸发生了替换。

3 讨论

3.1 大口黑鲈源病原菌分离与鉴定

鳊鱼诺卡氏菌作为一种细胞壁较为厚实的寄生

性微生物, 在自然界中分布广泛, 包括土壤、湖泊以及腐败的动植物组织等环境<sup>[1-2]</sup>。该菌种能够穿透宿主细胞并在其内部进行繁殖, 导致结节等感染性疾病的产生。特别是对于鲈鱼, 鳊鱼诺卡氏菌具有显著的致病性, 在室外养殖的条件下, 该菌广泛存在于水体中, 感染鲈鱼并诱发诺卡氏菌病, 给鲈鱼养殖业带来了严重的经济损失<sup>[2-4]</sup>。本研究从自然感染的大口黑鲈心脏结节部位分离并纯化出一种优势菌株, 通过结合菌落形态学、理化特性分析, 并依据 16S *rRNA* 基因序列构建的系统发育树, 确定该菌株为鳊鱼诺卡氏菌, 命名为 XXLX2。

在实验室环境下, 鳊鱼诺卡氏菌的生长速度相对较慢, 通常需要较长时间的培养才能累积足够的菌体量, 以供后续的研究与实验。本研究在培养鳊鱼诺卡氏菌 XXLX2 的过程中, 观察到其在血琼脂平板上的生长周期较短(3~4 d), 而相较于 TSA 平板(6~7 d), XXLX2 菌株在 BHI 琼脂培养基上的生长速度(4~5 d)显著加快, 这可能与鳊鱼诺卡氏菌易于通过血液循环进行迁移感染的致病机制有

关<sup>[19]</sup>。同时,在 25~28 ℃ 条件下培养,XXLX2 菌株生长状态最佳,而在 37~45 ℃ 培养条件下,其生长受到明显抑制,这一现象可能与该菌株的自然生存环境及其宿主的体温存在关联。经溶血试验验证,XXLX2 菌株不产生溶血素,无法通过破坏红细胞获取营养,但该菌株能够利用培养基中的蛋白质、碳水化合物及其他有机物质作为其营养来源。此外,当鲈鱼诺卡氏菌感染宿主时,因其不会使红细胞破裂,可以逃避机体早期基于溶血反应的免疫识别,从而有更多机会在血液循环中扩散到其他部位,并在定植部位形成肉芽肿性病变<sup>[19-20]</sup>。

### 3.2 XXLX2 菌株的动物回归试验结果

本实验采用分离纯化的鲈鱼诺卡氏菌 XXLX2 对大口黑鲈进行回归感染,观察到被感染鱼体心脏、肝脏和脾脏等内脏器官出现白色肉芽肿结节,与自然患病鲈鱼症状相符。然而,在鲈鱼的鳃部及脊柱肌肉组织中并未发现结节病症,这可能与鲈鱼诺卡氏菌的感染途径和感染时间存在一定的关联性<sup>[21]</sup>。对上述病灶组织取样筛菌,通过观察菌落形态及进行 16S rRNA 基因测序结果 BLAST 比对分析,确定复筛到鲈鱼诺卡氏菌,即 XXLX2 菌株是大口黑鲈患病的致病菌。同时,本研究进行了为期 21 d 的持续观察与记录,结果表明,对照组鲈鱼存活率为 100%;2 个低浓度组鲈鱼累计死亡率分别为 60% 和 25%;在 3 个高浓度试验组 ( $1.5 \times 10^6$ 、 $1.5 \times 10^7$  和  $1.5 \times 10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup>) 中,在观察期间全部死亡,且高浓度感染组的患病黑鲈多数体表发黑,眼球红肿突出,解剖后可见大量黄色腹水,肝脏颜色加深,鱼体内多处出现肉芽肿结节。在自然环境中,鲈鱼诺卡氏菌在宿主体内具有较长的潜伏期,由此引发的诺卡氏菌病表现为一种慢性疾病<sup>[1-4]</sup>。然而,实验室内的急性攻毒试验显示,随着注入鱼体内的菌株菌体量的增加,宿主的发病期会提前,生理功能受损,导致病情加剧,直至死亡。本研究中 XXLX2 菌株对大口黑鲈的 LD<sub>50</sub> 为  $1.49 \times 10^5$  CFU·mL<sup>-1</sup>,与吕丽丽等<sup>[22]</sup>报道的加州鲈也是大口黑鲈分离菌 NI 的 LD<sub>50</sub> 不同,这种差异可能是由于不同时期、不同体质量鱼类的免疫能力,以及实验环境或半数致死量算法不一致所引起的。

### 3.3 基于全基因组序列的鲈鱼诺卡氏菌同源性比对分析

随着生物信息学的快速发展,全基因组测序技

术不断精进,现已广泛应用于菌种的鉴定与分析领域。通过基因组的比较分析,能够揭示病原菌在分子层面的遗传进化关系,并为菌种鉴别与分类、致病基因挖掘以及与宿主互作机制的研究提供重要的数据支撑<sup>[21,23]</sup>。本研究采用 Illumina 与 PacBio 测序技术对鲈鱼诺卡氏菌 XXLX2 进行基因组测序与分析,研究发现,XXLX2 菌株的基因组大小、GC 含量、编码基因、rRNA 及 tRNA 数量相较 3 株鲈鱼诺卡氏菌 (EM150506、NK201610020、UTF1) 存在差异,这些差异可能源于菌株的地理分布、宿主特异性以及进化过程中的遗传变异。

通过将 XXLX2 菌株的基因组与从 NCBI 数据库中挑选出的 3 株鲈鱼诺卡氏菌 (EM150506、NK201610020、UTF1) 的基因组进行共线性比较分析,结果显示,尽管是 4 株分离自不同时期、不同宿主的鲈鱼诺卡氏菌,但 XXLX2 菌株与 3 株菌基因组的共线性程度很高,表明鲈鱼诺卡氏菌在进化层面上的基因组序列较为保守,此结论与张美超<sup>[21]</sup>等研究相一致。此外,XXLX2 菌株与 3 株鲈鱼诺卡氏菌的基因片段排列顺序存在一定差异,这些差异可能与菌株所处的地理环境及对不同宿主内环境的适应性相关。

### 3.4 XXLX2 菌株耐药性基因及药敏试验分析

经由药敏试验,XXLX2 菌株对  $\beta$ -内酰胺类抗生素表现出显著的耐药性,进一步分析耐药基因发现,XXLX2 菌株携带有 *penP* 基因,该基因编码的  $\beta$ -内酰胺酶能够破坏抗生素的  $\beta$ -内酰胺环结构,从而降低其抗菌效力<sup>[11,23]</sup>。同时,XXLX2 菌株对多黏菌素 B 和红霉素亦显示出耐药性,这可能与菌株内存在的肽类抗生素基因 *almE* 和大环内酯类耐药基因 *macB* 有关。*almE* 基因编码的多黏菌素抗性操纵子相关蛋白,通过改变菌株细胞壁和表面电荷等机制,增强了对多黏菌素类抗生素的耐药性<sup>[11,22-24]</sup>。而 *macB* 基因编码的 ABC 转运 ATP 结合蛋白,通过识别并结合红霉素,形成复合物,并利用 ATP 水解释放的能量,驱动复合物排出细胞外,导致细菌对红霉素产生耐药性<sup>[11,24]</sup>。在上述 3 类抗生素上,XXLX2 菌株表现出抗性表型与基因型高度一致。XXLX2 菌株还含有 *baeS*、*tetA*(58)、*rpoB*、*rbpA* 等耐药基因,但其对氨基糖苷类、四环素类及利福霉素类药物保持敏感性。这种细菌抗性表型与基因型的不一致性,可能是由于耐药基因



未表达或表达受到抑制,导致菌株在实际药物环境下未能有效表现出耐药性。

此外,大量研究表明从不同地区、不同宿主中筛选出的鳙鱼诺卡氏菌,在针对特定抗生素的敏感性方面,呈现出一定的差异性<sup>[25-26]</sup>,这种差异性使得通过常规药物防治诺卡氏菌病变得颇具挑战。因此,研发安全有效的疫苗是解决鱼类诺卡氏菌病的最有效途径。

### 3.5 XXLX2 菌株毒力因子及比较分析

毒力因子作为病原菌致病能力的核心要素,在鳙鱼诺卡氏菌 XXLX2 中亦发挥着重要作用。本研究通过基因组注释及比较分析,发现 XXLX2 菌株携带有多种毒力因子编码基因,如 *tufA*、*sodA*、*groEL*、*icl*、*narG/H*、*katG*、*sigA*、*ideR* 及 *ahpC* 等,这些毒力基因在不同菌株间的分布及表达水平差异,可能是导致鳙鱼诺卡氏菌致病性差异的重要原因。通过将 XXLX2 菌株的毒力基因与 3 株鳙鱼诺卡氏菌 (EM150506、NK201610020、UTF1) 进行比对分析发现,XXLX2 菌株与 3 株鳙鱼诺卡氏菌在 *sodA* (gene0071)、*devR* (gene2757) 以及 *panD* (gene7262) 3 个基因序列上的同源性相对较低,但 XXLX2 菌株与 3 株菌在上述基因编码的氨基酸序列上却具有较高的一致性。此外,XXLX2 菌株相较 3 株鳙鱼诺卡氏菌在部分毒力基因编码的氨基酸序列上具有一定差异,如在 *sodA* 基因编码的氨基酸序列中,XXLX2 菌株额外包含的 13 个氨基酸可能通过增强超氧化物歧化酶的催化活性或结构稳定性,进而增强菌株的抗氧化能力和生存能力。同时,这可能是由于不同菌株间生存环境的差异,从而导致了 XXLX2 菌株在遗传演化上的独特性。4 株菌在 *tufA* (gene2326)、*narG* (gene3969)、*narH* (gene3970)、*sigA* (gene5031, gene5123)、*ideR* (gene5134) 和 *ahpC* (gene5154) 等毒力基因的核苷酸及氨基酸水平上均表现出高度的保守性,据此推断,这些基因在鳙鱼诺卡氏菌的遗传演化过程中发生变异的概率相对较小,且对于细菌在宿主内的存活和传播至关重要<sup>[27-30]</sup>。此外,这些基因在不同鳙鱼诺卡氏菌菌株中可能具有相似的调控机制和功能表达,为鳙鱼诺卡氏菌的致病机理提供了新的视角。

XXLX2 菌株存在 *katG*、*ahpC*、*narG*、*narH* 和 *ideR* 等基因,其中,过氧化氢酶能够削弱吞噬

细胞的氧化杀伤机制,当过氧化氢酶基因 (*katG*) 活性受到抑制时,*ahpC* 与 *ahpD* 在菌株的抗氧化防御体系中发挥着关键作用<sup>[23,31]</sup>。同时,*narG* 和 *narH* 基因有助于鳙鱼诺卡氏菌在低氧条件下(如接受刺激信号的巨噬细胞内)存活,并为其提供潜伏期生存所需的能量<sup>[24,32]</sup>。*IdeR* 蛋白通过与  $\text{Fe}^{2+}$  结合形成复合体,以调控多种基因的表达水平,进而参与铁代谢过程<sup>[33]</sup>。相关研究报道,结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 缺失 *IdeR* 蛋白会呈现持续摄入铁元素,进而引发毒性铁过载现象,并导致菌株毒力减弱<sup>[34]</sup>。另有研究表明<sup>[35]</sup>,在 BHI 培养基中连续培养 200 代后的巴西诺卡氏菌 (*N. brasiliensis*) HUJEG-1 基因组发生缺失,缺失部分涵盖编码毒力因子的基因,如硝酸盐还原酶基因、过氧化氢酶基因、超氧化物歧化酶基因及铁依赖调节蛋白基因,经实验验证,该菌株毒力减弱,推测上述基因的缺失与其毒力降低密切相关。同时,XXLX2 菌株与 3 株鳙鱼诺卡氏菌在 *katG*、*ahpC*、*narG*、*narH* 和 *ideR* 等基因的核苷酸及氨基酸序列上保持较高一致性,这种高保守性揭示上述基因编码的蛋白可能在鳙鱼诺卡氏菌中具有重要的生物学作用,需要进一步研究以发现其功能和免疫学意义。此外,本研究表明 XXLX2 菌株具备相对全面的毒力基因和功能蛋白,以其为疫苗株研发的基因工程疫苗应用范围较广。

## 4 结论

本研究从患病大口黑鲈心脏白色结节处分离纯化到 XXLX2 菌株,经菌落形态学、理化特性分析,并依据 16S rRNA 基因序列比对鉴定为鳙鱼诺卡氏菌。动物回归感染试验表明,XXLX2 菌株会诱发大口黑鲈心、肝和脾等内脏器官病变,测定其半数致死量为  $1.49 \times 10^5 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结合耐药基因及药敏试验结果表明 XXLX2 菌株对多黏菌素 B、红霉素和  $\beta$ -内酰胺类抗生素表现出抗性表型与基因型的高度一致性。XXLX2 菌株基因组序列保守,在 4 株鳙鱼诺卡氏菌基因组的比较分析中,揭示了不同地域的鳙鱼诺卡氏菌在毒力因子方面存在的差异与共性,旨在探索不同地域鳙鱼诺卡氏菌共有的免疫保护抗原功能基因,为后续研发鳙鱼诺卡氏菌 XXLX2 基因工程疫苗提供分子水平数据支持。

## 参考文献:

- [1] 张媛, 张媛媛, 李振军, 等. 诺卡氏菌研究进展[J]. 中国人兽共患病报, 2012, 28(6): 628-634.
- [2] 袁思平, 王国良, 金珊. 养殖鱼类致病诺卡氏菌研究进展[J]. 微生物学通报, 2006, 33(2): 137-141.
- [3] 王文基, 陈建林, 侯素莹, 等. 鲈鱼诺卡氏菌感染乌斑杂交鳊的组织病理学研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(10): 4439-4446.
- [4] 夏立群, 汪美, 赖杰彬, 等. 鲈鱼诺卡氏菌感染斑马鱼模型的建立与组织病理学研究[J]. 热带生物学报, 2016, 7(4): 409-416.
- [5] MAEKAWA S, YOSHIDA T, WANG P C, et al. Current knowledge of nocardiosis in teleost fish[J]. *J Fish Dis*, 2018, 41(3): 413-419.
- [6] ZHOU Z Y, BAI S J, LU C W, et al. *Nocardia seriolae* mediates liver granulomatous chronic inflammation in *Micropterus salmoides* through pyroptosis[J]. *J Fish Dis*, 2023, 46(4): 321-332.
- [7] WANG W J, CHEN J L, LIAO B S, et al. Identification and functional characterization of histone-like DNA-binding protein in *Nocardia seriolae* (NsHLP) involved in cell apoptosis[J]. *J Fish Dis*, 2019, 42(5): 657-666.
- [8] HOU S Y, CHEN G Q, WANG W J, et al. Identification of a cell-wall peptidase (NlpC/P60) from *Nocardia seriolae* which induces apoptosis in fathead minnow cells[J]. *J Fish Dis*, 2020, 43(5): 571-581.
- [9] TENG J, ZHAO Y, MENG Q L, et al. Transcriptome analysis in the spleen of northern snakehead (*Channa argus*) challenged with *Nocardia seriolae*[J]. *Genomics*, 2022, 114(3): 110357.
- [10] WANG G L, YUAN S P, JIN S. Nocardiosis in large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson)[J]. *J Fish Dis*, 2005, 28(6): 339-345.
- [11] LEI X P, ZHAO R X, GENG Y, et al. *Nocardia seriolae*: a serious threat to the largemouth bass *Micropterus salmoides* industry in Southwest China[J]. *Dis Aquat Organ*, 2020, 142: 13-21.
- [12] 夏立群, 黄郁葱, 鲁义善. 卵形鲳鲹主要病害及其研究进展[J]. 安徽农学通报 (上半月刊), 2012, 18(23): 140-143, 150.
- [13] KIM B S, PARK J W, KANG G S, et al. First report of *Nocardia* infection in cultured Japanese eel, *Anguilla japonica*[J]. *J Fish Dis*, 2018, 41(12): 1921-1927.
- [14] HOLT J G, KRIEG N R, SNEATH P H A. Bergey's manual of determinative bacteriology[M]. 9th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1993: 175-225.
- [15] 顾兵, 张政, 李玉萍, 等. 半数致死量及其计算方法概述[J]. 中国职业医学, 2009, 36(6): 507-508, 511.
- [16] CHAN P P, LOWE T M. tRNAscan-SE: searching for tRNA genes in genomic sequences[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1962: 1-14.
- [17] ALCOCK B P, RAPHENYA A R, LAU T T Y, et al. CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(D1): D517-D525.
- [18] LIU B, ZHENG D D, ZHOU S Y, et al. VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors[J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(D1): D912-D917.
- [19] WANG F, WANG X G, LIU C, et al. Transparent tiger barb *Puntius tetrazona*, a fish model for in vivo analysis of nocardial infection[J]. *Vet Microbiol*, 2017, 211: 67-73.
- [20] 吴迪, 阮泽超, 王跃斌, 等. 小黄鱼 (*Larimichthys polyactis*) 鲈鱼诺卡氏菌的分离及鉴定[J]. 海洋与湖沼, 2023, 54(4): 1182-1190.
- [21] 张美超, 邓玉婷, 赵飞, 等. 一株鳊源诺卡氏菌致病性与全基因组分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(6): 2193-2211.
- [22] 吕丽丽, 梅飞, 曹守林, 等. 加州鲈源鲈鱼诺卡氏菌的分离鉴定及致病性[J]. 微生物学通报, 2021, 48(12): 4765-4775.
- [23] YASUIKE M, NISHIKI I, IWASAKI Y, et al. Analysis of the complete genome sequence of *Nocardia seriolae* UTF1, the causative agent of fish nocardiosis: the first reference genome sequence of the fish pathogenic *Nocardia* species[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0173198.
- [24] HAN H J, KWAK M J, HA S M, et al. Genomic characterization of *Nocardia seriolae* strains isolated from diseased fish[J]. *Microbiologyopen*, 2019, 8(3): e00656.
- [25] 朱志东, 吕莉, 邓剑壕, 等. 鱼类诺卡氏菌病的研究进展[J]. 水产养殖, 2018, 39(1): 48-52.
- [26] 陈言峰, 范祖游, 王子涛, 等. 水产动物诺卡氏菌病防控技术的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(13): 170-172.
- [27] WENG T T, CHEN G Q, LI N, et al. Identifying the *in vivo*-induced antigenic genes is a strategy to develop DNA vaccine against *Nocardia seriolae* in hybrid snakehead (*Channa maculata* ♀ × *Channa argus* ♂)[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2024, 147: 109410.
- [28] CAO S L, CHANG J J, YUE X Z, et al. Potential virulence factors of *Nocardia seriolae* AHLQ20-01 based on whole-genome analysis and its pathogenicity to largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *J Fish Dis*, 2023, 46(4): 333-345.
- [29] GEBICKA L, KRYCH-MADEJ J. The role of catalases in the prevention/promotion of oxidative stress[J]. *J Inorg Biochem*, 2019, 197: 110699.
- [30] HOU S Y, WANG W J, CHEN G Q, et al. Identification of a secreted superoxide dismutase (SOD) from *Nocardia seriolae* which induces apoptosis in fathead minnow (FHM) cells[J]. *J Fish Dis*, 2021, 44(1): 63-72.
- [31] 罗愿, 邓玉婷, 赵飞, 等. 9 株鱼源诺卡氏菌生物学特征和致病性比较[J]. 微生物学通报, 2021, 48(8): 2733-2749.
- [32] KHAN A, SARKAR D. Nitrate reduction pathways in mycobacteria and their implications during latency[J]. *Microbiology*, 2012, 158(Pt 2): 301-307.
- [33] 谢龙祥. 结核分枝杆菌表观遗传与耐药新机理研究[D]. 重庆: 西南大学, 2017: 109.
- [34] PANDEY R, RODRIGUEZ G M. IdeR is required for iron homeostasis and virulence in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Mol Microbiol*, 2014, 91(1): 98-109.
- [35] GONZALEZ-CARRILLO C, MILLAN-SAUCEDA C, LOZANO-GARZA H G, et al. Genomic changes associated with the loss of *Nocardia brasiliensis* virulence in mice after 200 *in vitro* passages[J]. *Infect Immun*, 2016, 84(9): 2595-2606.