

文章编号: 1674-5566(2023)06-1216-08

DOI: 10.12024/jsou.20220603885

药敏试验与比较基因组揭示嗜水气单胞菌耐药潜力

芦运超^{1,2,3}, 邱军强^{1,2,3}, 胡 鲲^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 国家水生动物病原库, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306)

摘要: 为了揭示嗜水气单胞菌的耐药潜力, 运用微量肉汤稀释法和比较基因组学方法对其进行了分析。结果显示: 恩诺沙星、硫酸新霉素、氟苯尼考、盐酸多西环素对 3 株菌株有抑制作用, 而磺胺间甲氧嘧啶对 3 株菌株均无抑制作用。菌株的耐药表型未与耐药基因一一对应, 某些菌株虽然未注释到耐药基因, 也可以表现出相关耐药表型; 自测的 3 株菌株基因组大小差异较大, 亲缘关系非近缘, 但耐药基因数量基本一致; 经 ANI (平均核苷酸一致性) 计算后, 基因组比较分析发现嗜水气单胞菌基因组具有较强的可变性, 即使是近缘菌株, 其基因组间仍有较大差异; 系统发育分析显示, 不同宿主来源的菌株在进化树上呈现分散分布, 近缘菌株分布在不同国家和地区; 所有菌株在 CARD (综合抗生素耐药性数据库) 中共注释到 21 种耐药基因, 其中 7 种耐药基因为所有菌株共享。造成这一现象的原因, 很可能是由于嗜水气单胞菌基因组较强的可变性以及其宿主分布的广泛性, 菌株间进行频繁的基因交流, 促进了耐药基因在整个物种的快速扩散, 所以即使菌株间基因组变化较大, 但耐药基因在菌株间的变化较小。

关键词: 嗜水气单胞菌; 药敏试验; 全基因组测序; 比较基因组; 系统发育; 耐药基因

中图分类号: S 941

文献标志码: A

嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 为革兰氏阴性杆菌, 其分布广泛, 是人-兽-鱼共患的条件致病菌^[1-2]。嗜水气单胞菌在水产动物中主要引发细菌性败血症、肠炎等, 且具有传染性^[3]; 该菌感染人类后, 同样可以引发患者出现胃肠炎和败血症等病症^[4]。目前治疗嗜水气单胞菌引起的疾病常常采用抗生素类抗菌药。然而, 多年欠规范的抗生素应用已造成大量菌株产生耐药性^[1]。耐药菌不仅使相应浓度的抗生素失去抑菌作用, 其自身的传播也导致了耐药基因的扩散^[5]。

植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 在不同生境中表现出适应性进化^[6], 而相应的研究在嗜水气单胞菌中还鲜有报道。对嗜水气单胞菌耐药性的研究, 目前大多集中于使用药敏检测和聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction,

PCR) 扩增部分耐药基因^[7], 或者对少数菌株进行基因组比较分析^[8]。与 PCR 扩增部分基因相比, 全基因组测序有着更全面的检测范围, 而增加样本数量可以减小统计误差, 使研究结果更加准确。

本研究首先对 3 株嗜水气单胞菌进行药敏试验, 这 3 株菌分离自发病的鱼类, 前期已经过 16S rDNA 和 gyrB 测序将其鉴定到种水平; 然后对其进行全基因组测序, 并将下载自 NCBI (National Center for Biotechnology Information Search database, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的 118 株菌株基因组进行重新注释, 以探究耐药基因在基因组中的分布规律, 从而在表型和基因组两个层面证实该菌的耐药潜力, 为水产业和临床对该菌的防治提供参考依据。

收稿日期: 2022-06-01 修回日期: 2022-10-28

基金项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”专项课题 (2019YFD0900102); 国家淡水水产种质资源库项目 (FGRC: 18537)

作者简介: 芦运超 (1994—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水生动物医学。E-mail: 1687685754@qq.com

通信作者: 胡 鲲, E-mail: khu@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部 (CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

1 材料与方法

1.1 菌株来源

数据集包括3株新测序的嗜水气单胞菌基因组序列,以及118株NCBI数据库已公布的基因组序列。新测序菌株背景信息:菌株104、117分离自江苏省南京市,宿主为鲫(*Carassius auratus*);菌株A058分离自福建省厦门市,宿主为乌鳢(*Channa argus*)。公共序列背景信息:NCBI数据库中具有宿主和地理来源信息的基因组序列。

1.2 药物敏感性测定

取保藏的菌液纯培养(30℃培养24h),参照《药敏分析试剂板》说明书进行操作,观察并记录菌株的最小抑菌浓度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC),取3组实验平行。实验结果依据美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的分界点值判断敏感、中介或耐药。药敏板购自南京菲恩医疗科技公司。

1.3 菌株培养与基因组制备

挑取单菌落,纯培养后,按照《磁珠法基因组DNA抽提试剂盒》说明书提取基因组DNA。将检测质量合格的样品送交测序公司(生工生物,上海)进行全基因组重测序。

1.4 基因组测序及组装

提取的DNA样品基于Illumina HiSeq测序平台,文库片段为350bp左右,进行双末端PE150测序,平均测序深度为212×。

使用Trimmomatic v0.36软件过滤尾端低质量序列(Q<20)^[9]。去掉长度短于50bp和包含超过5个N的序列。然后使用SPAdes v3.13.0进行序列组装^[10]。菌株104、117、A058测序结果已上传GenBank数据库,登录号分别为JANADH000000000、JANADI000000000、JANADJ000000000。

1.5 基因预测和功能注释

本研究基于Prokka软件进行基因组的基因预测和功能注释^[11]。

1.6 基因组分类及比较分析

为了确定所获得基因组是否为嗜水气单胞菌,使用FastANI v1.32分析所有基因组两两之间的ANI(Average nucleotide identity)^[12]。

使用OrthoFinder软件,基于马尔可夫聚类算法(Markov Cluster Algorithm, MCL)进行聚类并检测基因组两两之间共享的蛋白家族^[13],考虑到计算成本,基于蛋白家族聚类结果对自测基因组以及和自测基因组ANI大于98%的参考基因组进行比较分析,然后基于ANI大于98%对基因组进行去冗余,并使用自制R脚本分析泛基因组(Pan genome)和核心基因组(Core genome)的大小随抽样水平的变化。

1.7 系统发育分析

使用PhyloPhlAn3.0构建串联蛋白系统发育树^[14]。使用RAxML v8.2.12构建最大似然树,bootstrap重复100次^[15]。维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)的基因组被用作外类群。构建的进化树使用iTOL进行可视化^[16]。

1.8 耐药因子分析

使用BLASTp模式,将菌株基因组预测的蛋白序列比对到CARD^[17](The Comprehensive Antibiotic Resistance Database, <https://card.mcmaster.ca/>)数据库,仅保留identity大于0.4以及coverage大于0.9的比对结果。

2 结果与分析

2.1 药敏试验

5种抗菌药物对3株自测菌株的MIC见表1。结果显示:3株菌均对磺胺间甲氧嘧啶耐药;而在其他4种受试药物中,菌株104对盐酸多西环素耐药,菌株117对硫酸新霉素耐药,菌株A058对恩诺沙星、氟苯尼考耐药。这4种受试药物对3株菌株均有抑制作用,抑制率为66.7%。

表1 3株嗜水气单胞菌的MIC测定结果

Tab. 1 MIC test results of 3 strains of *A. hydrophila*

药物 Drug	mg/L		
	104	117	A058
恩诺沙星 Enrofloxacin	0.125	0.5	4
硫酸新霉素 Neomycin sulfate	0.5	8	1
氟苯尼考 Florfenicol	0.5	4	8
盐酸多西环素 Doxycycline hydrochloride	16	4	2
磺胺间甲氧嘧啶 Sulfamethoxypyrimidine	512	1 024	1 024

2.2 自测菌株基因组基本特征

3株菌株GC%介于61.41%~61.49%之间,与数据库中其他该菌基因组GC%基本一致,3株菌

基因组大小和编码基因数量相差较大,但注释到的耐药基因数量比较接近,菌株104、117、A058分别预测到了67、62、68个耐药基因,见表2。

表2 104、117、A058基因组概况
Tab. 2 Profile of genome of strain 104, 117, A058

Sample ID 样品ID	G+C/%	Gene_num 基因数量	All_len 全长	Max_len 最大长度	Contig_num 重叠群数量	N50
104	61.42	4 836	4 997 127	54 548	1 378	6 262
117	61.41	4 355	4 725 678	458 152	77	175 450
A058	61.49	4 524	4 849 717	808 401	38	459 219

2.3 基因组分类及比较分析

经ANI计算,数据集共收集到115株嗜水气单胞菌基因组^[18]。与所测菌株104、117和A058最相似的基因组分别为GCA_000708065.1、GCA_001057275.1和GCA_020639395.1,对应的ANI分别为98.7%、97.3%和98.0%。

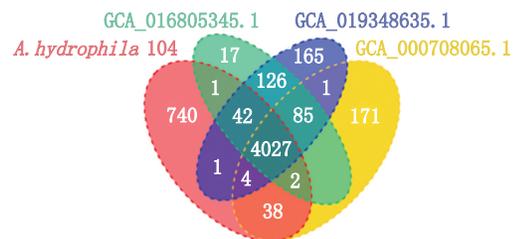
基因组的比较分析揭示了嗜水气单胞菌基因组的多样性(图1)。以自测菌株104为例,数据库中和该基因组ANI大于98%的有3株,这4个基因组共享4 027个基因。尽管如此近缘,菌株104独有740个基因,而GCA_000708065.1、GCA_019348635.1和GCA_016805345.1也分别独有171、165、17个基因。此外,还有很多基因只分布在两个基因组(图1a)。

对整个物种的泛基因组分析显示(图1b),嗜水气单胞菌的基因组平均包含大约4 200~4 300个基因,变化不是很大。对ANI大于98%的27个非冗余基因组进行分析发现,随着抽样深度的增加泛基因组(即所有基因组贡献的基因总数)不断增加,超过了7 600个基因,且并没有收敛。而核心基因组(所有基因组共享的基因)则逐渐减少,最终收敛至大约3 400个基因。

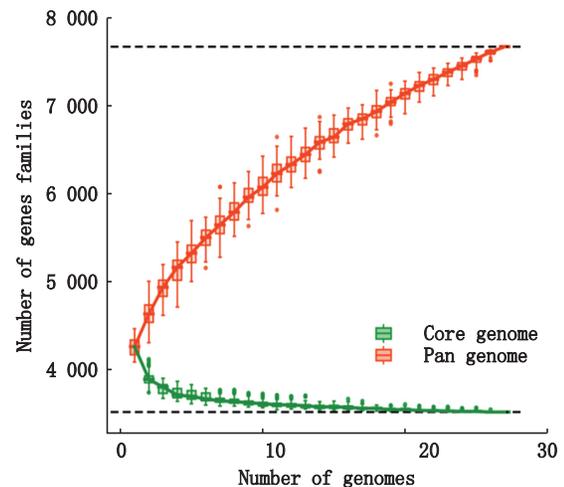
2.4 系统发育分析

本研究基于串联蛋白构建了嗜水气单胞菌的系统发育树,除了一些很近缘的节点外,绝大多数节点的支持率高于0.7(图2)。在系统发育树上,自测的3个基因组散布在不同枝系上,与菌株104和A058最相似的基因组与ANI的分析结果一致。可能由于算法不同,与菌株117最近缘的为GCA_003014775.1,其与菌株117的ANI为97.0%。分析这些基因组的宿主,可以看到除了非常近缘的一些以鱼类为宿主的菌株外,以鱼为宿主和以人或其他哺乳类为宿主的嗜水气

单胞菌在进化树上均是分散分布的。尤其是不同类型的嗜水气单胞菌均可在环境样品中被发现。



(a) 菌株104和最近缘基因组(ANI>98%)的比较分析
Result of comparative analysis of strain 104 and its closest genome(ANI>98%)

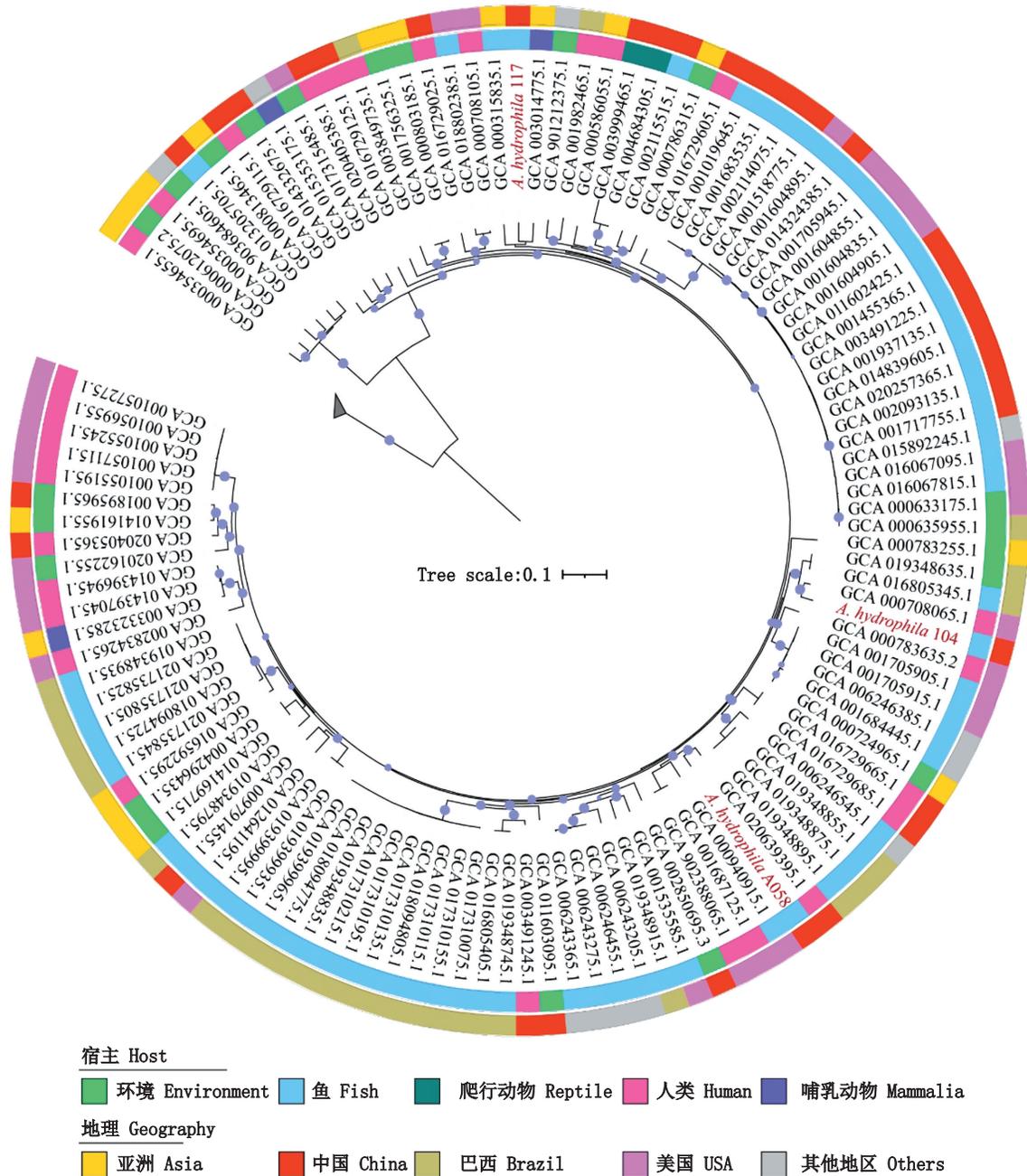


(b) 嗜水气单胞菌的泛基因组分析
Result of pan-genome analysis of *A. hydrophila*

图1 自测嗜水气单胞菌与数据库参考基因组的比较分析

Fig. 1 Comparative analysis of self-sequenced *A. hydrophila* and database reference genomes

嗜水气单胞菌在地域上也呈现分散分布,如同一地区分布着不同亲缘关系的菌株,而近缘菌株也可在不同的国家和地区被检测到(图2),菌株按来源分类见表3和表4。



灰色圆点表示节点支持率(bootstrap value)超过0.7的节点,内圈彩色条带表示宿主,外圈彩色条带表示菌株地理位置。
The gray dots represent the nodes whose bootstrap value exceeds 0.7, the inner colored bands represent the hosts, and the outer colored bands indicate the geographic locations of the strains.

图2 自测嗜水气单胞菌与数据库参考基因组的进化树

Fig. 2 In the evolutionary tree of self-sequenced *A. hydrophila* and database reference genome

表3 菌株分离地点统计

Tab. 3 Statistics of isolation locations of strains

中国 China	美国 America	巴西 Brazil	亚洲 Asia	其他国家 Others	总计 Total
35	29	29	17	11	121

注:亚洲代表除中国以外的亚洲国家和地区;其他国家代表除前面提到的国家和地区的其他国家。

Notes: Asia stands for Asian countries and regions other than China; Others stands for other countries in addition to the countries and regions mentioned above.

表4 菌株的宿主来源统计

Tab. 4 Statistics of strains in different host sources

鱼源 Fish	人源 Human	环境 Environment	哺乳类 Mammals	爬行类源 Reptiles	总计 Total
66	29	21	3	2	121

注:哺乳类代表除人类以外的哺乳类。

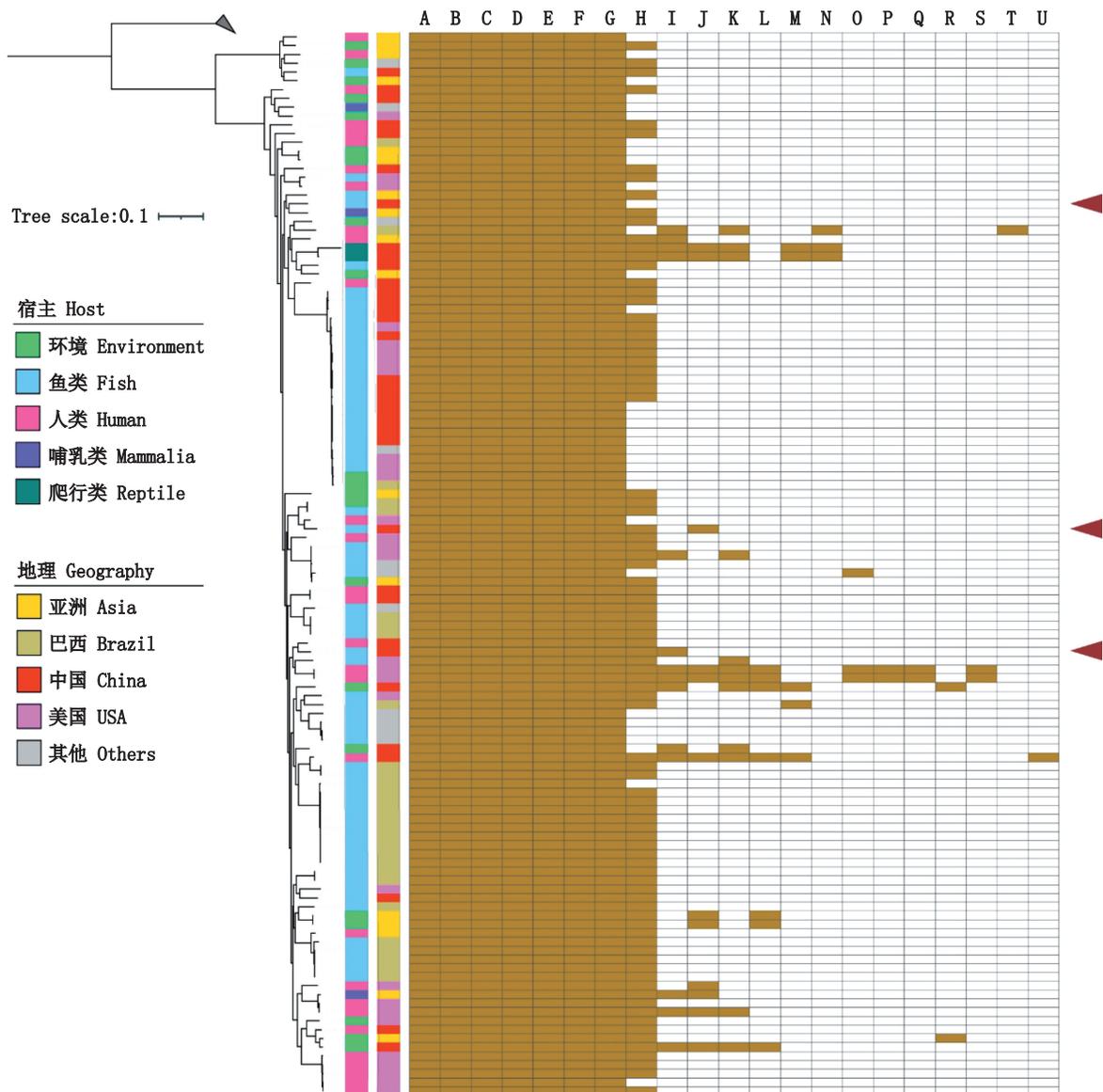
Notes: Mammals represent mammals other than humans.

2.5 耐药基因分析

在嗜水气单胞菌中共检测到了21种耐药基

因,其中7种为所有菌株共享(包括抗碳青霉烯类、头孢菌素类、二氨基嘧啶类、氟喹诺酮类、青霉烷类、氯霉素类、四环素类药物的耐药基因),此外,埃尔福霉素的耐药基因也在很多菌株中被发现。在3株自测的菌株中,除共有的耐药基因外,菌株104中还检测到了抗埃尔福霉素和抗大环内酯类药物的耐药基因,菌株A058中检测到了抗埃尔福霉素和抗氨基糖苷类药物的耐药基因。与菌株104亲缘最近的为GCA_000708065.1,其中未检测到非共

有基因,而在与菌株117和A058亲缘最近的GCA_003014775.1、GCA_020639395.1中,检测到了抗埃尔福霉素的耐药基因。以菌株的分离来源统计,携带耐药基因数量较多的几个基因组宿主全部为非鱼源菌株,而菌株的地理来源主要集中在美国和中国。总体上看,除了少数几个基因组检测到的耐药基因种类较多(例如:GCA_001982465.1、GCA_002850695.3、GCA_902388065.1)外,其余的大部分都共享一个耐药基因集合。



图中字母A-U表示的药物:碳青霉烯、头孢菌素、二氨基嘧啶、氟喹诺酮、青霉烷、苯丙醇、四环素、埃尔福霉素、氨基糖苷、大环内酯、磺胺、单环β内酰胺、头霉素、消毒剂 and 插层染料、链阳性菌素、林可胺类、恶唑烷酮、肽、短截北风菌素、吡啶染料、青霉烯;黄色矩形代表含有对应的耐药基因;红色三角形指向的为新测序的菌株。

The drugs indicated by letters A-U in the figure are: carbapenem, cephalosporin, diaminyrimidine, fluoroquinolone, penam, phenicol, tetracycline, elfamycin, aminoglycoside, macrolide, sulfonamide, monobactam, cephamycin, disinfecting_agents_and_intercalating_dyes, streptogramin, lincosamide, oxazolidinone, peptide, pleuromutilin, acridine_dye, pene; The yellow rectangle indicates that the strain contains resistance genes. The red triangle points to the newly sequenced strains.

图3 嗜水气单胞菌耐药基因的分布
Fig. 3 The distribution of drug resistance genes of *A. hydrophila*

3 讨论

嗜水气单胞菌作为常见的革兰氏阴性菌,其暴发可导致水产动物大量死亡。而抗生素的应用,对嗜水气单胞菌的防治具有重要意义。目前,我国已批准的水产用抗生素有5大类共12种^[19]。嗜水气单胞菌对这5类抗生素的耐药性研究已有发表。蔡丽娟等^[20]对嗜水气单胞菌进行四环素诱导试验,持续诱导4代后,菌株对四环素产生了耐药性。本研究在5类抗生素中各选择1种作为实验药物,并结合基因检测来探究菌株的耐药性,结果显示,所有菌株均注释到了抗四环素类和抗氟喹诺酮类的耐药基因,并且菌株104、A058表现了对应的耐药表型;而对这两类药未表现耐药性的菌株,可能与其基因的表达量或受其它基因对耐药基因的调控有关^[21],如在GCA_001982465.1中,因整合子携带的外源基因突变致使菌株对头孢噻肟和阿莫西林的耐药情况发生显著改变^[22]。菌株117对氨基糖苷类耐药、菌株A058对氟苯尼考耐药以及3株菌对磺胺类耐药,虽然没有检测到耐药基因,也表现出了耐药表型。这种情况在数据库菌株中也有出现,菌株GCA_003999465.1对阿奇霉素、红霉素和林可霉素等耐药,但并未检测到相应的耐药基因^[23]。原因可能是由于CARD数据库主要是用于注释人类用药物的耐药基因,而水产用药物的耐药基因收录不完全,或者是由于数据库所用的算法还有待优化^[24]。

比较基因组揭示了嗜水气单胞菌基因组较强的可变性,经ANI计算后发现,菌株间即使彼此亲缘关系很近,各基因组也含有大量特有基因。GHATAK^[24]以ANI大于95%为分型标准,收集的泛基因组为9 181个,其中核心基因有大约3 500个。本研究发现,仅在ANI大于98%的近缘菌株中,核心基因也可以减少到3 400个,嗜水气单胞菌基因组可能含有数量庞大的非共有基因,即存在非常多样的代谢类型。

串联蛋白因其携带的遗传信息多,又不存在突变的干扰,能够使建树结果更加准确^[25]。在系统发育方面,虽然菌株的取样范围广泛,但嗜水气单胞菌并未分化成几个明显的谱系,而是呈现为众多彼此进化距离较短的分支,这表明菌株间进行着高频的基因重组^[26]。

本研究中自测的3株及其最近缘菌株间虽然地理或宿主来源已产生较大变化,但耐药基因在菌株中的分布仍基本一致,可能是由于这3对菌株彼此分离的时间较短。对于携带较多耐药基因的菌株(如GCA_004684305.1、GCA_001687125.1、GCA_003491245.1)在其基因组中注释到了质粒等遗传物质,而遗传元件可以将外源耐药基因整合进菌株基因组^[27]。因此,相较于移动范围较小且相对稳定的鱼源宿主环境,变化更加剧烈的生境(人类和环境)中分离的菌株,更有可能获得多样的外源耐药基因。COELHO等^[28]对14种主要栖息地的13 174个宏基因组数据进行统计,结果证实耐药基因在不同生境中广泛存在,且在不同生境和物种中的分布具有不保守性。鉴于耐药基因在环境中的分布特征和嗜水气单胞菌宿主的广泛分布,以及该菌基因组的高度可变,所有菌株仍共享7种耐药基因;而出现这种现象的原因,通常情况下是有强烈的环境选择,使只有具有相应基因的个体能够存活下来^[29],或者是菌株间频繁的基因交流促进了耐药基因在整个物种的快速扩散,导致其在整个物种的分布无明显差异。考虑到嗜水气单胞菌基因组广泛的地理来源,后一种解释更加合理。

菌株的耐药表型是多种复杂的机制共同作用的结果,本研究仅在表型和基因组层面对其进行了分析。在样本收集方面,菌株的取样也存在局限性,在地理来源方面,中国、美国、巴西来源的菌株较多,其他国家和地区的菌株较少;在宿主来源方面,鱼源菌株偏多,而其他来源菌株较少。对嗜水气单胞菌耐药性的研究,今后还需要进一步扩大数据集和合理的分类样本,从而使研究结果更加准确可靠。

参考文献:

- [1] Clinical microbiology reviews: 2010 instructions to authors [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2010, 23(1): 1-12.
- [2] ROGES E M, GONÇALVES V D, CARDOSO M D, et al. Virulence-associated genes and antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolates from animal, food, and human sources in Brazil [J]. *BioMed Research International*, 2020, 2020: 1052607.
- [3] LIU J, GAO S S, DONG Y H, et al. Isolation and characterization of bacteriophages against virulent *Aeromonas hydrophila* [J]. *BMC Microbiology*, 2020, 20(1): 141.

- [4] SHA J, LU M P, CHOPRA A K. Regulation of the cytotoxic enterotoxin gene in *Aeromonas hydrophila*: characterization of an iron uptake regulator [J]. *Infection and Immunity*, 2001, 69(10): 6370-6381.
- [5] 苏志国, 张衍, 代天娇, 等. 环境中抗生素抗性基因与 I 型整合子的研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2018, 45(10): 2217-2233.
- SU Z G, ZHANG Y, DAI T J, et al. Antibiotic resistance genes and class 1 integron in the environment: research progress [J]. *Microbiology China*, 2018, 45(10): 2217-2233.
- [6] 刘亚华, 李伟程, 余中节, 等. 不同分离源植物乳杆菌的群体基因组分析 [J]. *微生物学通报*, 2019, 46(12): 3388-3401.
- LIU Y H, LI W C, YU Z J, et al. Population genetics of *Lactobacillus plantarum* isolated from different environments [J]. *Microbiology China*, 2019, 46(12): 3388-3401.
- [7] SALEH A, ELKENANY R, YOUNIS G. Virulent and multiple antimicrobial resistance *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) in Egypt with sequencing of some virulence-associated genes [J]. *Biocontrol Science*, 2021, 26(3): 167-176.
- [8] JIN L, CHEN Y, YANG W G, et al. Complete genome sequence of fish-pathogenic *Aeromonas hydrophila* HX-3 and a comparative analysis: insights into virulence factors and quorum sensing [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 15479.
- [9] BOLGER A M, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [10] BANKEVICH A, NURK S, ANTIPOV D, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing [J]. *Journal of Computational Biology*, 2012, 19(5): 455-477.
- [11] SEEMANN T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(14): 2068-2069.
- [12] GORIS J, KONSTANTINIDIS K T, KLAPPENBACH J A, et al. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(1): 81-91.
- [13] EMMS D M, KELLY S. OrthoFinder: solving fundamental biases in whole genome comparisons dramatically improves orthogroup inference accuracy [J]. *Genome Biology*, 2015, 16(1): 157.
- [14] ASNICAR F, THOMAS A M, BEGHINI F, et al. Precise phylogenetic analysis of microbial isolates and genomes from metagenomes using PhyloPhlAn 3.0 [J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 2500.
- [15] STAMATAKIS A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(9): 1312-1313.
- [16] LETUNIC I, BORK P. Interactive tree of life (iTOL) v4: recent updates and new developments [J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(W1): W256-W259.
- [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 Research*, 2020, 48(D1): D517-D525.
- [18] JAIN C, RODRIGUEZ-R L M, PHILLIPPY A M, et al. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 5114.
- [19] 何海龙, 王云山, 李正伟, 等. 水产养殖用抗生素使用注意事项 [J]. *黑龙江水产*, 2022, 41(4): 63-64.
- HE H L, WANG Y S, LI Z W, et al. Precautions for antibiotic use in aquaculture [J]. *Northern Chinese Fisheries*, 2022, 41(4): 63-64.
- [20] 蔡丽娟, 朱丽敏, 刘凯, 等. 低剂量四环素诱导嗜水气单胞菌产生耐药性的分析 [J]. *安徽农业科学*, 2013, 41(17): 7564, 7567.
- CAI L J, ZHU L M, LIU K, et al. Analysis on resistance induction of *Aeromonas hydrophila* by low dose tetracycline's continuous stimulation [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2013, 41(17): 7564, 7567.
- [21] 刘建华, 付赛赛, 王亚云, 等. 环丙沙星诱导对临床耐药菌株主动外排基因转录的影响 [J]. *畜牧兽医学报*, 2017, 48(9): 1753-1760.
- LIU J H, FU S S, WANG Y Y, et al. Transcription changes of active efflux system in clinical multidrug-resistant *E. coli* strains induced by ciprofloxacin selective pressure [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2017, 48(9): 1753-1760.
- [22] DROPA M, GHIGLIONE B, MATTÉ M H, et al. Molecular and biochemical characterization of CTX-M-131, a natural Asp240Gly variant derived from CTX-M-2, produced by a *Providencia rettgeri* clinical strain in São Paulo, Brazil [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015, 59(3): 1815-1817.
- [23] 刘俊琦. 蛇源 ST516 型嗜水气单胞菌鉴定及其对黏菌素耐药机制研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2020.
- LIU J Q. Identification of snake-original ST516 *Aeromonas hydrophila* and its mechanisms of colistin resistance [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2020.
- [24] GHATAK S, BLOM J, DAS S, et al. Pan-genome analysis of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii* and *Aeromonas caviae* indicates phylogenomic diversity and greater pathogenic potential for *Aeromonas hydrophila* [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2016, 109(7): 945-956.

- [25] LOW S J, DŽUNKOVA M, CHAUMEIL P A, et al. Evaluation of a concatenated protein phylogeny for classification of tailed double-stranded DNA viruses belonging to the order Caudovirales [J]. *Nature Microbiology*, 2019, 4(8): 1306-1315.
- [26] 郑宏源, 闫琳, 杨超, 等. 溶藻弧菌群体基因组学研究 [J]. *遗传*, 2021, 43(4): 350-361.
- ZHENG H Y, YAN L, YANG C, et al. Population genomics study of *Vibrio alginolyticus* [J]. *Hereditas (Beijing)*, 2021, 43(4): 350-361.
- [27] DENG Y T, WU Y L, JIANG L, et al. Multi-drug resistance mediated by class 1 integrons in *Aeromonas* isolated from farmed freshwater animals [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 935.
- [28] COELHO L P, ALVES R, DEL RÍO Á R, et al. Towards the biogeography of prokaryotic genes [J]. *Nature*, 2022, 601(7892): 252-256.
- [29] WLASIUK G, NACHMAN M W. The genetics of adaptive coat color in gophers: coding variation at *Mclr* is not responsible for dorsal color differences [J]. *Journal of Heredity*, 2007, 98(6): 567-574.

Drug sensitivity test and comparative genome revealed the drug resistance potential of *Aeromonas hydrophila*

LU Yunchao^{1,2,3}, QIU Junqiang^{1,2,3}, HU Kun^{1,2,3}

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: To reveal the drug-resistance potential of *Aeromonas hydrophila*, the micro broth dilution method and comparative genomics method were used to analyze its drug-resistance potential in this study. The results showed that enrofloxacin, neomycin sulfate, florfenicol and doxycycline hydrochloride had inhibitory effects on the three strains, while sulfamethoxam had no inhibitory effect on the three strains. The resistance phenotype of the strains was not corresponding to the resistance genes one by one, and some strains could show related resistance phenotype even though the resistance genes were not annotated; The genomes of the three newly sequenced strains differed in size, and their genetic relationships were not close, but the number of drug-resistant genes was basically the same. After calculation of ANI (Average nucleotide identity), comparative analysis of genomes revealed that the genomes of *A. hydrophila* showed strong variability, and there were still large differences among genomes of even close strains. Phylogenetic analysis showed that the strains from different hosts were scattered in the evolutionary tree, and the related strains were distributed in different countries and regions. A total of 21 drug resistance genes were annotated in all strains in CARD (The Comprehensive Antibiotic Resistance Database), of which 7 were shared by all strains. The reason for this phenomenon is likely to be due to the strong variability of *A. hydrophila* genome and the wide distribution of its hosts. Frequent gene exchange between strains promotes the rapid spread of drug-resistance genes throughout the species, so even if the genome changes between strains are large, the changes of drug-resistance genes between strains are small.

Key words: *Aeromonas hydrophila*; drug sensitivity test; whole genome sequencing; comparative genome; phylogenetic development; resistance genes