

南京地区某渔场嗜水气单胞菌流行菌株的鉴定及分子分型

曹青, 张向阳, 庞茂达, 王楠楠,
FURQAN Awan, 陆承平, 刘永杰*

(南京农业大学动物医学院, 江苏南京 210095)

摘要: 为确定南京地区某渔场异育银鲫出血性败血症的病原体, 采集该渔场3个饲养塘口患病鱼脏器进行细菌分离培养, 基于气单胞菌DNA促旋酶B亚单位(*gyrB*)基因序列设计引物, PCR扩增后测序进行细菌鉴定; 同时, 对病原菌生物学特性如溶血性、蛋白酶活性、生物被膜形成能力、运动能力以及对斑马鱼的毒力等进行分析, 并进行多位点序列分型(MLST)。结果在3个饲养塘口均分离到嗜水气单胞菌, 分别命名为GL-15、GL-17和GL-18; MLST分型显示三株分离菌均为ST251型; 生物学特性实验表明, 均有溶血性、蛋白酶活性以及运动性, 生物被膜形成能力较强, OD₅₉₅均超过0.5, 对斑马鱼的LD₅₀在 $1.4 \times 10^3 \sim 3.9 \times 10^3$ CFU/尾, 属强毒株。本研究为有效防控南京地区嗜水气单胞菌引发的出血性败血症的暴发流行提供了依据。

关键词: 嗜水气单胞菌; 鉴定; ST251; 生物学特性

中图分类号: S 941.42

文献标志码: A

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)为革兰阴性菌, 属于气单胞菌科(Aeromonadaceae), 气单胞菌属(*Aeromonas*), 广泛分布于水体环境, 是引起鱼类运动性气单胞菌败血症(motile *Aeromonas* septicemia, MAS)的主要病原体, 同时也是两栖类、爬行类以及哺乳类动物的重要病原体。目前, 研究者已从多种发病水生动物体内分离得到嗜水气单胞菌^[1-5]。我国在1989—1991年期间曾暴发了由嗜水气单胞菌引起的淡水鱼出血性败血症, 给水产养殖业带来严重的经济损失^[6-7]。2009年在美国的阿拉巴马州、密西西比州以及堪萨斯州等地区也相继暴发了MAS^[8-10]。近年来, 随着水产养殖规模化和集约化程度的提高, 嗜水气单胞菌引起的病害也更加频繁和严重。

2015年9月, 南京市江宁区某渔场异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)先后出现以鳃出血、腹部出血为主要特征的疫情, 该病传播速度快、发病率和死亡率均较高。本研究采集患病鱼脏器

进行细菌分离鉴定、分子分型及生物学特性分析, 为更有效地预防和控制MAS的暴发流行提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 病料与参考菌株

采集南京市江宁区某渔场3个饲养塘口患病异育银鲫的鳃、肾脏、脾脏、心脏及肠。

参考菌株为嗜水气单胞菌NJ-35, 菌种保藏号为CGMCC No.8319, 为2010年于南京禄口分离到的一株强毒株。

1.2 试剂、培养基及实验动物

细菌基因组DNA提取试剂盒、PCR产物回收试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司; PCR Mix液购自博尔迪生物科技有限公司; 偶氮酪蛋白购自Sigma公司; 三卡因间氨基苯酸乙脂甲磺酸盐购自杭州动物药品厂; 微量生化反应管购自

收稿日期: 2016-08-09 修回日期: 2016-09-26

资助项目: 国家自然科学基金(31372454); 江苏省水产三新工程项目(D2015-13)

通信作者: 刘永杰, E-mail: liuyongjie@njau.edu.cn

上海伊华医学科技有限公司;其余试剂为进口或国产分析纯。

LB培养基:10%胰蛋白胨,10%氯化钠,5%酵母提取物。

80日龄的AB系斑马鱼(*Danio rerio*)购自南京夫子庙水产市场,体长3~4 cm。

1.3 气单胞菌的检测

细菌分离培养及形态染色 用接种环分别蘸取鳃、肾脏、脾脏、心脏及肠等病料,划线接种于LB固体培养基,28 °C培养24 h;挑取单个菌落,再次划线接种于LB固体培养基进一步纯化。经两次分离纯化后的菌落,进行革兰氏染色。

生化特性鉴定 用接种环挑取单个菌落少许,涂于氧化酶试纸片上并观察颜色变化;同时挑取单菌落接种于LB液体培养基中,28 °C培养8 h,用接种环蘸取细菌培养物分别接种于葡萄糖、蔗糖、阿拉伯糖、七叶苷、鸟氨酸脱羧

酶等微量生化反应管中,28 °C培养18~24 h,观察生化管颜色变化。

***gyrB*基因扩增测序** 按照试剂盒说明书提取细菌基因组,基于气单胞菌管家基因DNA促旋酶B亚单位(*gyrB*)进行PCR检测。*gyrB*上下游引物分别为P1:5'-TCCGGCGGTCTGCACGGCGT-3',P2:5'-TTGTCCGGGTTGTACTCGTC-3'^[3],目的基因片段大小为1100 bp。反应体系为15 μL,包括基因组模板2 μL,上下游引物各1 μL,PCR Mix为7.5 μL,ddH₂O为3.5 μL。PCR扩增程序为95 °C预变性5 min;95 °C变性30 s,59 °C复性30 s,72 °C延伸70 s,共30个循环;72 °C终延伸10 min。取5 μL PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,PCR产物回收后由上海金唯智生物科技有限公司测序。

1.4 多位点序列分型(MLST)

根据Martino等^[12]研究结果,选择*gyrB*、*groL*、*gltA*、*metG*、*ppsA*和*recA*6个管家基因利用相关引物^[12](表1)进行片段扩增、MLST分析。

表1 PCR反应引物及目的片段大小

Tab. 1 The primer sequences and product sizes

目的基因 target genes	序列(5'-3') primers sequence (5'-3')	退火温度/°C annealing temperature	目的片段大小/bp product sizes
<i>gyrB</i>	P1: GGGGTCTACTGCTTACCAA	59	477
	P2: CTTGTCCGGGTTGTACTCGT		
<i>groL</i>	P1: CAAGGAAGTTGCTTCCAAGG	56	510
	P2: CATCGATGATGGTGGTGTTTC		
<i>gltA</i>	P1: TTCCGTCTGCTCTCCAAGAT	58	495
	P2: GAAGATCACGGTGAACATGG		
<i>metG</i>	P1: TGGCAACTGATCCTCGTACA	57	504
	P2: TCTTGTGGCCATCTCTTCC		
<i>ppsA</i>	P1: AGTCCAACGAGTACGCCAAC	60	537
	P2: TCGGCCAGATAGAGCCAGGT		
<i>recA</i>	P1: AGAACAAACAGAAGGCACTGG	57	561
	P2: AACTTGAGCGGTTACCAC		

PCR反应体系(40 μL):25 μL 2×Mix,2 μL上游引物,2 μL下游引物,4 μL DNA模板,7 μL ddH₂O。反应参数为95 °C预变性5 min;95 °C变性1 min,按照表1退火温度退火30 s,72 °C延伸45 s,30个循环;72 °C终延伸10 min。取5 μL PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,PCR产物回收后

由上海金唯智生物科技有限公司测序。

将测得序列进行拼接后上传至<http://pubmlst.org/aeromonas>数据库,与数据库中序列进行MLST分析,得到每个管家基因的等位基因型。若与数据库中序列存在差异,再次进行PCR及测序后经确认定义为1个新的等位基因型,新的等

位基因需再次递交到MLST数据库得到编号。按照 $gyrB$ - $groL$ - $gltA$ - $metG$ - $ppsA$ - $recA$ 的顺序将等位基因号排列即可得到等位基因谱, 又称为序列型(sequence type, ST), 也就是该菌株的多位点序列型。

1.5 斑马鱼致病性试验

细菌过夜培养后, 用无菌PBS (10 mmol/L, pH 7.2)洗涤3次, 之后用无菌PBS进行10倍系列稀释, 调节浓度至 $5.0 \times 10^1 \sim 5.0 \times 10^8$ CFU/mL。每10尾斑马鱼为一组, 共分成8组, 另取一组作为对照。除对照组外, 每组斑马鱼分别按同一浓度腹腔注射0.02 mL菌液, 使各组的细菌量分别为 $10 \sim 10^8$ CFU。阴性对照组斑马鱼腹腔注射0.02 mL PBS。每天定时观察记录斑马鱼死亡情况, 持续一周。数据根据Bliss算法进行斑马鱼半数致死量(LD₅₀)的计算。

1.6 生物被膜形成能力测定

实验前需先制备菌悬液。细菌在LB培养基中28 °C、180 r/min条件下培养12 h, 使OD₆₀₀达到1.0, 用新鲜LB液体培养基将菌液按1:1000的比例进行稀释。

在96孔细胞板中每孔加入200 μL的菌悬液, 每株菌重复接种8孔, 阴性对照孔仅加入LB液体培养基, 将96孔板平置于28 °C恒温培养箱静置培养24 h。之后弃培养物上清液, 用无菌PBS清洗3次, 之后用200 μL甲醇固定15 min, 弃固定液室温干燥15 min, 再加入200 μL 1.6%结晶紫染色10 min, ddH₂O冲洗5次。待完全干燥后每孔加入200 μL 90%酒精溶液溶解结晶紫, 10 min后通过测定其OD₅₉₅的值以确定试验菌株生物被膜形成能力。实验独立重复3次。

1.7 运动能力测定

游动能力测定 将细菌在LB固体培养基上划线培养12 h, 然后用无菌牙签挑取少量菌体, 点种到琼脂浓度为0.3%的LB平板中央, 每株菌设立三组平行, 用封口膜将LB平板周围封口后再将平板正向放置于28 °C恒温培养箱中培养24 h。培养结束后测定菌落边缘到菌落中心的迁移距离。实验独立重复3次。

群集运动能力测试 将细菌在LB固体培养基上划线培养12 h, 然后用无菌牙签在划线平板上挑取少量菌体, 点种到琼脂浓度为0.5%的

LB平板中央。LB平板在室温下干燥12~24 h, 然后正向置于28 °C恒温培养箱中培养24 h。培养结束后测定菌落边缘到菌落中心的迁移距离。实验独立重复3次。

1.8 细菌胞外产物活性的测定

溶血活性的测定 将试验菌株在LB液体培养基中培养18 h, 再用无菌生理盐水将菌液浓度调节至 1.0×10^8 CFU/mL, 11 000 r/min离心10 min, 将上清液用0.22 μm过滤膜过滤。将过滤后的上清液用无菌生理盐水在96孔板中进行倍比稀释。设立3个重复, 同时设立阴性和阳性对照, 阴性对照中每孔加入100 μL生理盐水, 阳性对照中每孔加入100 μL蒸馏水。取100 μL 2%的兔红细胞混合, 轻微震荡混匀, 置于37 °C恒温箱1 h后再置于4 °C冰箱中过夜。以50%红细胞溶解的待测样品最高稀释倍数即为该样品的溶血价。实验独立重复3次。

蛋白酶活性的测定 将试验菌株在LB液体培养基中培养18 h, 用LB液体培养基将菌液浓度调节至 1.0×10^9 CFU/mL, 11 000 r/min离心10 min, 将上清液用0.22 μm过滤膜过滤。在50 mmol/L pH 8.0的Tris-HCl中加入酪蛋白配制成0.5%(wt/vol)的溶液, 取250 μL的酪蛋白与等体积上清液在2 mL的EP管中混合, 每株菌设立三组平行。置于37 °C恒温箱中作用2 h, 然后加入500 μL预冷的10%(wt/vol)TCA冰浴30 min, 11 000 r/min离心10 min。取500 μL上清液加入等体积1 mol/L NaOH, 混匀取200 μL转移至新的96孔板中, 测定每孔OD₄₄₀的值。实验独立重复3次。

1.9 统计学分析

数据采用Microsoft Excel 2015和SPSS Statistics v20.0软件进行分析处理。

2 结果

2.1 病原菌的鉴定

从3个塘口饲养的异育银鲫脏器中均分离到细菌, 分别命名为GL-15、GL-17和GL-18。3株菌革兰氏染色结果均为革兰氏阴性短杆菌。将3株菌以及参考菌株NJ-35分别接种于葡萄糖、蔗糖、阿拉伯糖、七叶苷、鸟氨酸脱羧酶等多种微量生化反应管中, 28 °C培养18~24 h后结果显示, 3株菌与参考菌株NJ-35生化特性相同, 表现为氧化

酶、鸟氨酸脱羧酶试验阳性, 水解水杨苷, 发酵葡萄糖、蔗糖、甘露醇、阿拉伯糖等, 符合嗜水气单胞菌的生化特性(表2)。PCR扩增3株

菌的*gyrB*基因, 其检测结果呈阳性(图1)。将PCR产物回收后测序, 结果表明3株菌均为嗜水气单胞菌。

表2 分离株生化特性

Tab. 2 The biochemical characteristics of the isolated strains

菌株 strains	生化指标 biochemical indicators									
	氧化酶 oxidase	葡萄糖 glucose	蔗糖 sucrose	甘露醇 mannitol	阿拉伯糖 arabinose	乳糖 lactose	枸橼酸钠 sodium citrate	水杨苷 salicin	肌醇 inositol	鸟氨酸脱羧酶 ornithine decarboxylase
NJ-35	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
GL-15	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
GL-17	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
GL-18	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+

注: “-”表示阴性; “+”表示阳性

Notes: “-” means negative reaction; “+” means positive reaction

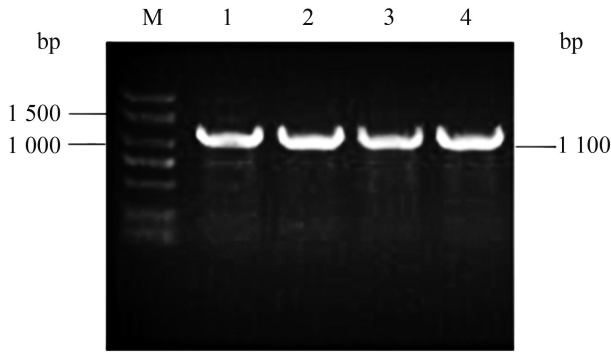


图1 气单胞菌的*gyrB*基因扩增

M. DNA分子量标准; 1. 菌株NJ-35; 2. 菌株GL-15; 3. 菌株GL-17; 4. 菌株GL-18

Fig. 1 The *gyrB* amplification of *Aeromonas*

M. DL2000 DNA Marker; 1. NJ-35; 2. GL-15; 3. GL-17; 4. GL-18

2.2 多位点序列分型(MLST)

对分离到的3株嗜水气单胞菌进行ST251分型, PCR扩增 *gyrB*、*groL*、*gltA*、*metG*、*ppsA*和*recA* 6个管家基因。将PCR产物测序, 然后将此6个管家基因的序列提交至*Aeromonas* spp. MLST数据库(<http://pubmlst.org/Aeromonas/>), 结果显示此3株菌均属ST251型(表3)。

2.3 LD₅₀测定

斑马鱼致病性试验结果显示, 3株分离菌对斑马鱼的LD₅₀与参考菌株NJ-35相似, 均小于1.0×10⁶ CFU/尾。根据濮俊逸等^[13]的研究, 这3株菌可判定为强毒株(表4)。

表3 嗜水气单胞菌的多位点序列分型

Tab. 3 MLST (ST) typing of *A. hydrophila* strains

菌株 strains	MLST (ST)	等位基因 alleles					
		<i>gyrB</i>	<i>groL</i>	<i>gltA</i>	<i>metG</i>	<i>ppsA</i>	<i>recA</i>
GL-15	ST251	210	214	112	211	221	217
GL-17	ST251	210	214	112	211	221	217
GL-18	ST251	210	214	112	211	221	217

表4 嗜水气单胞菌对斑马鱼的半数致死量

Tab. 4 LD₅₀s of *A. hydrophila* strains in zebra fish

剂量/(CFU/尾) dosage	菌株 strains			
	GL-15	GL-17	GL-18	NJ-35
10 ⁵	0/10	1/10	0/10	2/10
10 ⁴	3/10	4/10	2/10	3/10
10 ³	7/10	8/10	5/10	7/10
10 ²	9/10	8/10	9/10	8/10
10 ¹	10/10	10/10	10/10	10/10
半数致死量				
LD ₅₀	2.4×10 ³	3.7×10 ³	1.4×10 ³	3.1×10 ³

注: 分母为感染斑马鱼总数, 分子为存活斑马鱼数量

Notes: Denominator represents the total number of infected zebrafish; numerator represents the number of living zebra fish

2.4 生物被膜形成能力

实验通过测定每孔OD₅₉₅对各菌株的生物被

膜形成能力进行评估(图2)。3株细菌产生物被膜的能力显著高于参考菌株NJ-35, 且差异极显著($P<0.001$); 3株菌之间生物被膜形成能力也存在一定的差异, GL-17的 OD_{595} 值显著高于其他2株菌($P<0.001$)。

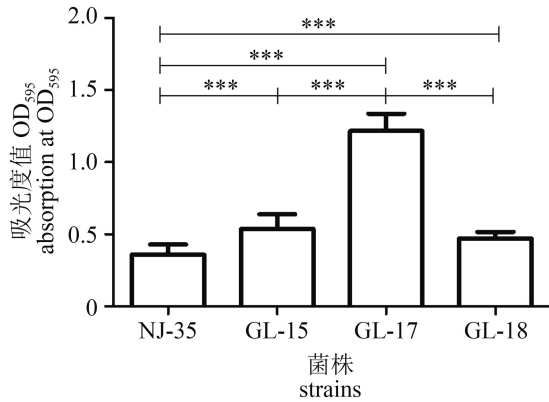


图2 不同嗜水气单胞菌菌株的生物被膜形成能力

***代表菌株间差异极显著($P<0.001$), 下同

Fig. 2 Biofilm formation of different *A. hydrophila* strains

*** indicates significant difference between the two strains ($P<0.001$), the same below

2.5 运动能力

各菌株的游动能力结果表明, 3株菌的迁移距离介于3.1~5.8 mm之间, 均小于参考菌株NJ-

35的迁移距离($P<0.05$ 或 $P<0.01$)(图3)。群集运动能力结果显示, 3株菌的迁移距离介于5.6~6.5 mm之间, 与NJ-35相似(图4); 其中GL-15和GL-17与NJ-35相比无显著性差异($P>0.05$), GL-18与NJ-35之间存在显著性差异($P<0.05$)。说明3株分离株均具有良好的运动能力。

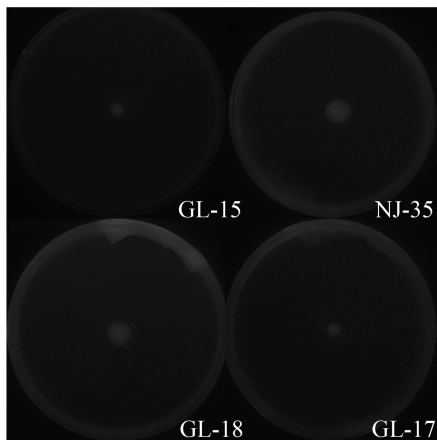
2.6 细菌胞外产物的活性

调整菌液浓度为 1.0×10^8 CFU/mL, 4株菌的培养上清滤过除菌后测定溶血活性。其中, GL-18的溶血价与参考菌株NJ-35相同, 均为1:16; GL-15和GL-17的溶血价为1:8。

各菌株蛋白酶活性比较结果显示, 3株分离菌胞外产物的 OD_{440} 值介于0.32~0.51, 与NJ-35相比差异极显著($P<0.01$), 说明3株分离菌胞外蛋白酶的活性较强(图5)。

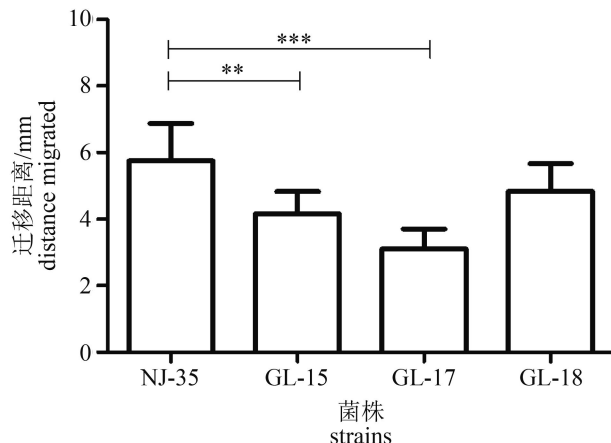
3 讨论

随着我国水产养殖规模化和集约化程度的提高, 嗜水气单胞菌对水产养殖业造成的经济损失也越来越严重。有研究表明, 嗜水气单胞菌中国流行株NJ-35、J-1和美国流行株ML09-119、AL09-71及pc104A均属于ST251型菌株, 同时也证明ST251型菌株为我国主要流行菌株^[1]。本研究对近期引发异育银鲫出血性败血症的病原体



(a)

菌株在琼脂中的游动能力检测
bacterial swimming motility examination on agar plate



(b)

不同菌株迁移距离比较
comparison of distances migrated

图3 不同嗜水气单胞菌菌株的游动能力

*代表菌株间差异显著($P<0.05$), **代表菌株间差异极显著($P<0.01$), 下同

Fig. 3 Swimming motility of different *A. hydrophila* strains

* $P<0.05$ or ** $P<0.01$ indicate significant difference between the two strains. the same below

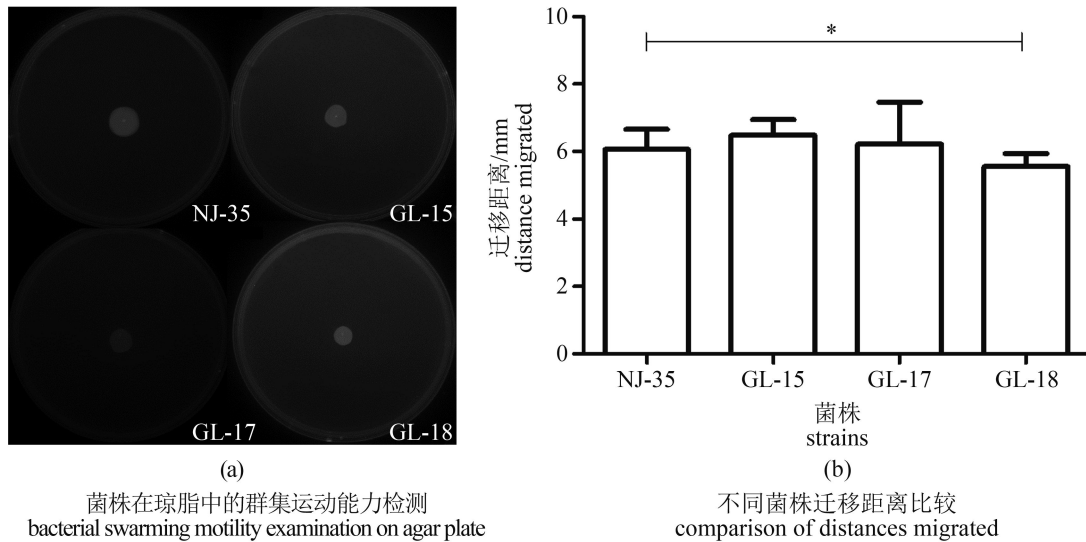


图4 不同嗜水气单胞菌菌株的群集运动能力

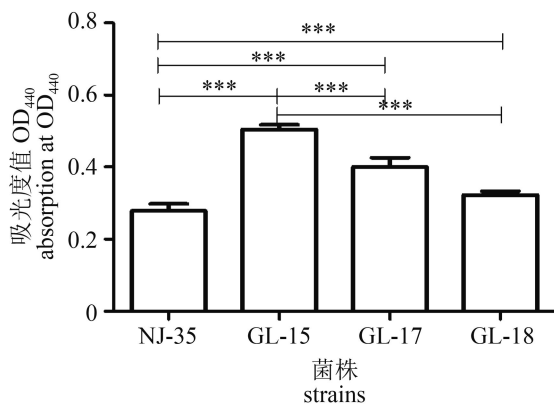
Fig. 4 Swarming motility of different *A. hydrophila* strains

图5 不同嗜水气单胞菌菌株胞外产物的蛋白酶活性

Fig. 5 Protease activity of extracellular products from different *A. hydrophila* strains

进行鉴定,确定由致病性嗜水气单胞菌引起,且MLST分型均为ST251型菌株,再次说明ST251型菌株的流行与MAS的暴发密切相关。

嗜水气单胞菌致病机制复杂,涉及到分泌系统、胞外产物、黏附因子、群体感应系统等多种毒力因子,这些毒力因子能够协同致病^[1]。气溶素是嗜水气单胞菌产生的主要毒素,可作为致病性嗜水气单胞菌的标志^[14]。嗜水气单胞菌可分泌多种蛋白酶,这些蛋白酶能够降解多种蛋白质,为细菌的生存和生长提供氨基酸,同时也能直接造成组织损伤,从而帮助细菌突破宿主体内的防御机制进行扩散,甚至可以灭活宿主血清中的补体,增强其逃避机体免疫机制

的能力。本研究中,检测的3株菌其胞外产物均有较强的蛋白酶活性,其中菌株GL-15的蛋白酶活性极显著高于其他2株菌及参考菌株NJ-35($P < 0.01$)。而在胞外产物溶血活性试验中,GL-17与GL-15的溶血价相同。在生物被膜形成能力试验中,GL-17菌株生物被膜形成能力较其他2株菌更强。但是,斑马鱼致病试验结果分析发现,3株菌均为强毒株。许多研究表明,菌株的致病力与毒力因子携带量存在一定的相关性^[15-17],但本研究检测的4株菌并未明显表现出这一相关性,可能与检测的毒力因子种类偏少,而菌株致病因素比较多且较为复杂,个别毒力因子的存在并不能明显表现出与菌株致病力差别有关。

综上所述,本研究确定了南京地区某渔场异育银鲫出血性败血症疫情由ST251型嗜水气单胞菌引起,对该型菌株致病性及致病机制的研究,对于预防和控制MAS的暴发流行具有重要意义,值得重视。

参考文献:

- [1] Janda J M, Abbott S L. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2010, 23(1): 35-73.
- [2] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 4版. 北京: 中国农业出版社, 2007: 127-131.
- Lu C P. *Veterinary Microbiology*[M]. 4th ed. Beijing: China Agriculture Press, 2007: 127-131 (in Chinese).

- [3] Hu M, Wang N, Pan Z H, *et al.* Identity and virulence properties of *Aeromonas* isolates from diseased fish, healthy controls, and water environment in China[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2012, 55(3): 224-233.
- [4] 刘荻, 史秀杰, 高隆英, 等. 进口锦鲤暴发病病原的 nested-PCR 鉴定[J]. *华中农业大学学报*, 2002, 21(5): 414-418.
- Liu H, Shi X J, Gao L Y, *et al.* Study on the aetiology of koi epizootic disease using the method of nested-polymerase chain reaction assay (nested-PCR)[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2002, 21(5): 414-418 (in Chinese).
- [5] 毛海涛, 韩远广, 李俊宁, 等. 1株锦鲤致病性嗜水气单胞菌的分离鉴定及生物学特性研究[J]. *畜牧与兽医*, 2015, 47(8): 13-18.
- Mao H T, Han Y G, Li J N, *et al.* Identification and biological characterization of an *Aeromonas hydrophila* strain isolated from *Cyprinus carpio haematopterus*[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2015, 47(8): 13-18 (in Chinese).
- [6] 陈怀青, 陆承平. 家养鲤科鱼暴发性传染病的病原研究[J]. *南京农业大学学报*, 1991, 14(4): 87-91.
- Chen H Q, Lu C P. Study on the pathogen of epidemic septicemia occurred in cultured cyprinoid fishes in southeastern China[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 1991, 14(4): 87-91 (in Chinese).
- [7] 徐伯亥, 殷战, 吴玉深, 等. 淡水养殖鱼类暴发性传染病致病细菌的研究[J]. *水生生物学报*, 1993, 17(3): 259-266.
- Xu B H, Yin Z, Wu Y S, *et al.* Studies on the taxonomy of pathogenic bacteria of the bacterial hemorrhagic septicemia in cultured fishes in freshwater[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1993, 17(3): 259-266 (in Chinese).
- [8] Hossain M J, Sun D W, McGarey D J, *et al.* An Asian origin of virulent *Aeromonas hydrophila* responsible for disease epidemics in United States-farmed catfish[J]. *Mbio*, 2014, 5(3): e00848-14.
- [9] Hossain M J, Waldbieser G C, Sun D W, *et al.* Implication of lateral genetic transfer in the emergence of *Aeromonas hydrophila* isolates of epidemic outbreaks in channel catfish[J]. *Plos One*, 2013, 8(11): e80943.
- [10] Pridgeon J W, Klesius P H. Molecular identification and virulence of three *Aeromonas hydrophila* isolates cultured from infected channel catfish during a disease outbreak in west Alabama (USA) in 2009[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2011, 94(3): 245-253.
- [11] Pang M D, Jiang J W, Xie X, *et al.* Novel insights into the pathogenicity of epidemic *Aeromonas hydrophila* ST251 clones from comparative genomics[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 09833.
- [12] Martino M E, Fasolato L, Montemurro F, *et al.* Determination of microbial diversity of *Aeromonas* strains on the basis of multilocus sequence typing, phenotype, and presence of putative virulence genes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(14): 4986-5000.
- [13] 濮俊毅, 黄新新, 陆承平, 等. 用斑马鱼检测猪链球菌 2型的致病力[J]. *中国农业科学*, 2007, 40(11): 2655-2658.
- Pu J Y, Huang X X, Lu C P, *et al.* Virulence detection of *Streptococcus suis* type 2 in zebrafish[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, 40(11): 2655-2658 (in Chinese).
- [14] Li J, Ni X D, Liu Y J, *et al.* Detection of three virulence genes *alt*, *ahp* and *aerA* in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with actual virulence to zebrafish[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2011, 110(3): 823-830.
- [15] 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.
- Fu Q F, Qiu J Q, Hu K, *et al.* The analyse of virulence factors-pathogenicity relationships of *Aeromonas hydrophila* strains isolated from China[J]. *Journal of Biology*, 2011, 28(6): 53-57 (in Chinese).
- [16] 邱军强, 杨先乐, 程训佳. 嗜水气单胞菌毒力因子特性及作用机理研究进展[J]. *中国病原生物学杂志*, 2009, 4(8): 616-619.
- Qiu J Q, Yang X L, Cheng X J. Advances in the characteristics and pathogenic mechanisms of virulence factors in *Aeromonas hydrophila*[J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2009, 4(8): 616-619 (in Chinese).
- [17] 李绍戊, 卢彤岩. 嗜水气单胞菌毒力因子研究进展[J]. *水产学杂志*, 2013, 26(5): 61-64.
- Li S W, Lu T Y. Research advances of virulence factors in bacterium *Aeromonas hydrophila*[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2013, 26(5): 61-64 (in Chinese).

Identification and molecular typing of the epidemic *Aeromonas hydrophila* strains in one farm of Nanjing

CAO Qing, ZHANG Xiangyang, PANG Maoda, WANG Nannan,
FURQAN Awan, LU Chengping, LIU Yongjie*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China)

Abstract: *Aeromonas hydrophila* is a Gram-negative bacterium, which is widely distributed in the water environment. Pathogenic strains can cause sepsis in a variety of aquatic animals. In Sept. 2015, crucian carp (*Carassius carassius*) in one farm of Nanjing showed symptoms of haemorrhagic septicaemia. Samples from diseased fish in three ponds were collected and the pathogenic bacteria were isolated. Three *A. hydrophila* isolates were identified based on sequencing of the housekeeping gene *gyrB*, and named GL-15, GL-17 and GL-18, respectively. Then the three *A. hydrophila* strains were typed using multilocus sequence typing (MLST) based on six housekeeping genes. Also, all the three isolates were analyzed for hemolytic and proteolytic characterizations and pathogenicity in zebrafish. The results showed that all the three strains presented hemolytic and proteolytic activities, and the abilities of biofilm formation in which OD_{595} is more than 0.5 and also had swarming and swimming motility. And they were highly virulent strains, with the LD_{50} values of 1.4×10^3 to 3.9×10^3 CFU. This study provided a basis for control of MAS caused by *A. hydrophila* in Nanjing area.

Key words: *Aeromonas hydrophila*; identification; ST251; biological characteristics

Corresponding author: LIU Yongjie. E-mail: liuyongjie@njau.edu.cn

Funding projects: National Nature Science Foundation of China (31372454); Aquatic Three New Projects in Jiangsu Province (D2015-13)