

水族箱气单胞菌的鉴定及致病特性分析

吴亚锋, 王旭远, 庞茂达, 陆承平, 刘永杰*

(南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 为了确定南京市某渔场发病鱼感染的病原, 本研究采集患鱼脏器, 采用平板培养、生化实验和特异性 *gyrB* 基因扩增测序等方法进行细菌的分离鉴定; 利用 PCR 技术检测分离株毒力基因的分布, 分析其生物学特性, 并进一步通过动物实验确定菌株致病力。结果分离到 1 株水族箱气单胞菌, 命名为 LK-25。该菌株携带 5 种主要毒力基因: 气溶素(*aer*)、细胞毒性肠毒素(*act*)、细胞兴奋性肠毒素(*alt*)、温敏胞外蛋白酶(*epr*)和丝氨酸蛋白酶(*ahp*), 其溶血性和溶蛋白能力较强, 对斑马鱼的半数致死量为 1.02×10^3 CFU/尾, 确定为强毒株。进化树分析表明, 水族箱气单胞菌与嗜水气单胞菌达卡亚种亲缘关系较近。本研究在国内首次报道发现水族箱气单胞菌, 为进一步预防该菌所引起的相关疾病的发生和传播提供理论基础。

关键词: 水族箱气单胞菌; 分离; 鉴定; 致病特性

中图分类号: S 917.1

文献标志码: A

气单胞菌属(*Aeromonas*)在细菌分类学上属于变形菌门(Proteobacteria), 气单胞菌目(Aeromonadales), 气单胞菌科(Aeromonadaceae), 是一种革兰氏阴性菌, 广泛分布于水体环境中, 能导致鱼类的出血性败血症, 是一类危害性极其严重的水产动物病原菌^[1-2]。同时, 气单胞菌还可引起人肠道和肠道外感染, 如败血症, 以及伤口、眼、骨关节、腹腔感染和其他感染^[3]。

1980 年, 气单胞菌属确定的成员只有 4 种: 嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)、豚鼠气单胞菌(*A. caviae*)、温和气单胞菌(*A. sobria*)以及杀鲑气单胞菌(*A. salmonicida*)。以后根据基因型及表型的差异, 不断发现新种, 目前至少确认 18 种。2010 年, 又有 4 个新种被鉴定, 即相异气单胞菌(*A. diversa*)、河流气单胞菌(*A. fluvialis*)、台湾气单胞菌(*A. taiwanensis*)和萨纳雷利气单胞菌(*A. sanarellii*)^[4]。水族箱气单胞菌(*A. aquariorum*)是 Martinez 等^[5]于 2008 年在观赏鱼中分离到的一个新种, 随后 Aravena 等^[6]发现该菌广泛存在于人腹泻的临床病例中。2012 年, Morinaga 等^[7]更是首次证实了该菌对人类细胞系具有细胞毒性, 能侵袭

宿主细胞, 引起感染, 导致腹泻。因此, 国外学者建议将水族箱气单胞菌列入人类致病菌中, 且认为其对人类的致病性与嗜水气单胞菌等同等重要^[8]。

作为新发现的一个气单胞菌种, 国内外对于水族箱气单胞菌的研究并不多。本实验更是首次在国内报道发现该菌, 并对该菌的生物学特性开展研究, 对于充分认识水族箱气单胞菌的特性与危害, 从而进一步做好该菌感染的防控工作具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 样品采集与参考菌株

发病鲫(*Carassius auratus*)(15 ~ 20 cm, 350 g 左右)采自南京市禄口某渔场, 体表充血, 鳞片脱落, 腹部肿胀。参考菌株 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, 经 16S rRNA 和 *gyrB* 基因测序鉴定为嗜水气单胞菌^[9]。

1.2 主要试剂

PCR Mix 液, 购自 Vazyme 公司; DNA 提取试剂盒、PCR 产物回收试剂盒, 购自大连宝生物公司; 绵羊脱纤维红细胞购自南京便诊生物科技有限公

收稿日期: 2014-11-24 修回日期: 2015-01-14

资助项目: 国家自然科学基金(31372454); 江苏省水产三新工程(D2013-5-4)

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

司;偶氮酪蛋白购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司,其余试剂为进口或国产分析纯。

1.3 细菌的分离培养

剖开后,病鱼肝脏出血、溃烂,腹腔有积水。无菌采取肝、鳃、脾、肾等脏器,接种环火焰灭菌后蘸取病料,划线接种于普通琼脂平板,28 ℃培养 24 h^[10]。

1.4 细菌形态特征观察和生化特性检查

取纯培养菌进行革兰氏染色镜检;用接种环挑取普通琼脂平板上单个菌落少许,涂于氧化酶试纸片上,观察颜色变化;同时将待测菌株接种于

半固体培养基中,28 ℃培养 24 ~ 48 h,观察结果;挑取单菌落接种于 LB 液体培养基中,28 ℃培养 8 h,用接种环接种于葡萄糖、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 ℃培养 18 ~ 24 h,观察生化管颜色变化。

1.5 分离菌株的分子鉴定

按试剂盒说明书,提取细菌基因组 DNA,作为扩增看家基因 *gyrB* 的 DNA 模板。采用 *gyrB* 特异性引物^[11](表 1),对分离菌株的 *gyrB* 基因片段进行扩增。

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	引物序列(5'-3') primers sequence(5'-3')	退火温度/℃ annealing temperature	目的片段大小/bp product sizes
<i>gyrB</i>	P1:TCCGGCGGTCTGCACGGCGT	64	1 100
	P2:TTGTCCGGG TTGTACTCGTC		
<i>aer</i>	P1:AACCGAACTCTCCAT	54	301
	P2:CGCCTTGTCTTGTGA		
<i>act</i>	P1:GAGAAGGTGACCACCAAGAACA	42	232
	P2:AACTGACATCGGCCTTGAAGTC		
<i>epr</i>	P1:CACCGCATTGGATTGCTC	57	320
	P2:TGACCAACAGCGGGGACAA		
<i>alt</i>	P1:TGACCCAGTCCTGGCACGGC	60	442
	P2:GGTGATCGATCACCACCAGC		
<i>ahp</i>	P1:TATAACGGCGTGATGAAC	50	740
	P2:CGTAGAACTTGTGGGAGAG		
<i>ascV</i>	P1:GTAAGCAGATGAGTATCGATGG	48	331
	P2:GAGACCCGGGTGACGATAAT		
<i>hcp</i>	P1:ATTCCGTCGGCAACATCTTC	57	390
	P2:GGATCAGTTGGGTGAAGTCAGAC		

反应体系为 25 μL,包括:Mix 12.5 μL,上下游引物(10 pmol)各 1 μL,模板 1 μL,用 ddH₂O 调整终体积至 25 μL。反应参数为 94 ℃预变性 2 min;94 ℃变性 30 s,64 ℃退火 60 s,72 ℃延伸 90 s,共进行 30 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min。

取 2 μL PCR 产物做 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察结果。将 PCR 产物回收后送交上海英骏有限公司进行测序。测序后使用 BLAST 软件进行同源性分析,并用 MEGA 5.1 软件生成邻接法进化树。

1.6 毒力基因检测

选取气单胞菌 5 个主要的胞外毒力因子,包括气溶素(*aer*)、细胞毒性肠毒素(*act*)、细胞兴奋性肠毒素(*alt*)、温敏胞外蛋白酶(*epr*)和丝氨酸蛋白酶(*ahp*),参考文献方法^[9]合成引物。此外,根据Ⅲ型分泌系统保守 *ascV* 基因(GenBank:JQ690891.1)和Ⅵ型分泌系统溶血素共调节蛋白(Hcp)基因(NC_009348.1)序列自行设计并合成 2 对引物。7 个检测

基因所用的引物序列、退火温度及片段大小如表 1 所示,反应体系与“分离菌株的分子鉴定”内容一致。

1.7 溶血活性

挑取 LB 平板上生长的单菌落,于 28 ℃振荡培养 12 h 后,1:100 扩大培养 24 h,取 1 mL 细菌培养液经 10 000 r/min 高速离心 10 min 后取上清液,用孔径 0.22 μm 的滤膜过滤上清液,做溶血价测定。再将细菌沉淀用生理盐水清洗 2 遍,稀释 10 倍后测 OD₆₀₀,再根据 OD₆₀₀来定量调整上清液的浓度。调整浓度后取 100 μL 用生理盐水在 96 孔微量反应板上作倍比稀释,再加入 100 μL 的 1% 绵羊脱纤维红细胞混合,同时以只加红细胞的灭菌生理盐水作为空白对照,轻微振荡,置于 37 ℃温箱中 1 h,4 ℃过夜。次日,阳性孔加入 100 μL 1% Triton 来裂解红细胞,1 000 r/min 离心 5 min,取 100 μL 上清液于 540 nm 处测定吸光度值。溶血单位以 mL/10⁸ CFU 或 mL/OD 单位上清液表示,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。实验重复 3 次^[12]。

1.8 蛋白酶活性

接种菌株于 LB 液体培养基中,28 ℃ 振荡培养 24 h,分别取 2 mL 菌液,12 000 r/min 离心 10 min,用 0.22 μm 的滤器过滤上清液,−20 ℃ 保存备用。

用偶氮酪蛋白为底物的方法进行胞外蛋白酶活性的测定^[13]。将上清液 10 μL 加入 100 μL 5 mg/mL 偶氮酪蛋白(用 50 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl Buffer 配制),混匀后放入 37 ℃ 温箱作用 2 h,每个样做 3 个重复。然后,加入 500 μL 10% TCA 终止反应,冰浴 30 min。将混合液 12 000 r/min 离心 10 min,取 500 μL 上清液加入 500 μL 1 mol/L NaOH,混匀后测 OD₄₄₂。以 OD 值的 0.001 为 1 个酶活力单位。

1.9 斑马鱼致病性实验

80 日龄左右的 AB 系斑马鱼(*Danio rerio*)购自南京夫子庙动物市场,体长 3~4 cm,体质量 3 g 左右。观察 1 周,确认斑马鱼健康后进行实验。实验期间,水温为 25~28 ℃。

菌株于 LB 液体培养基中 28 ℃ 过夜培养后,1:100 稀释接种于新的 LB 培养基中,培养 6 h,菌液离心(5 000 r/min,5 min),弃去上清液,用无菌 PBS(10 mmol/L,pH 7.4)洗涤 3 次,并依次调整菌体浓度至 5×10⁷,5×10⁶,5×10⁵,5×10⁴,5×10³ 和 5×10² CFU/mL。每个浓度均腹腔注射斑马鱼,每组 10 尾,每尾 0.02 mL,同时设等量生理盐水为空白对照。观察 1 周,记录结果^[14],按照 Bliss 法计算半数致死量(LD₅₀)。

2 结果

2.1 细菌的分离与生化特性

在 LB 固体培养基上,从发病鲫的肝脏中分离获得一株细菌,命名为 LK-25。菌落呈圆形、中央微凸、表面光滑、淡黄色。革兰氏染色呈阴性。镜检,菌体呈短杆状,无芽孢,无荚膜。

生化实验结果符合 Beaz 等^[15]对于水族箱气单胞菌的描述(表 2),且大多数结果与参考菌株嗜水气单胞菌 NJ-35 的检测结果一致。

表 2 生化实验结果
Tab.2 The biochemical characteristics

菌株 strain	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 ornithine
LK-25	+	+	+	+	—	—	+	+	—	—
NJ-35	+	+	+	+	+	—	—	+	—	+

注:— 表示阴性;+ 表示阳性
Notes:— means negative reaction; + means positive reaction

2.2 细菌的分子鉴定

分离菌株的 PCR 扩增结果中,条带大小和预期目的大小一致(图 1)。*gyrB* 基因序列比对结果表明,与目的基因序列同源性最高的菌株为水族箱气单胞菌 MDC 47,为 99%。

进化树分析表明,水族箱气单胞菌 LK-25 与嗜水气单胞菌达卡亚种(*A. hydrophila dhakensis*)亲缘关系较近,最大相似度 96%(图 2)。

2.3 毒力基因的检测

7 种毒力基因的存在情况如图 3 所示。除 *ascV* 和 *aer* 外,水族箱气单胞菌 LK-25 存在其他 5 种毒力基因,说明该菌具有潜在的致病性。

2.4 细菌溶血价的测定

调整菌液浓度约为 1.0×10⁹ CFU/mL,测得 LK-25 的溶血价为 1:8,而参考菌株 NJ-35 的溶血价为 1:32。

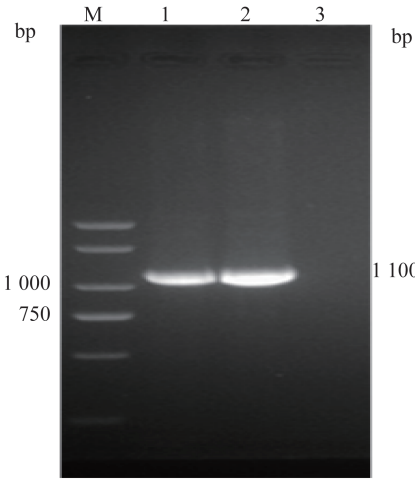


图 1 *gyrB* 基因的 PCR 检测
M. DNA 分子质量标准; 1. 菌株 LK-25; 2. 菌株 NJ-35; 3. 阴性对照

Fig.1 PCR detection of *gyrB*
M. Marker DL2000; 1. LK-25; 2. NJ-35; 3. negative control

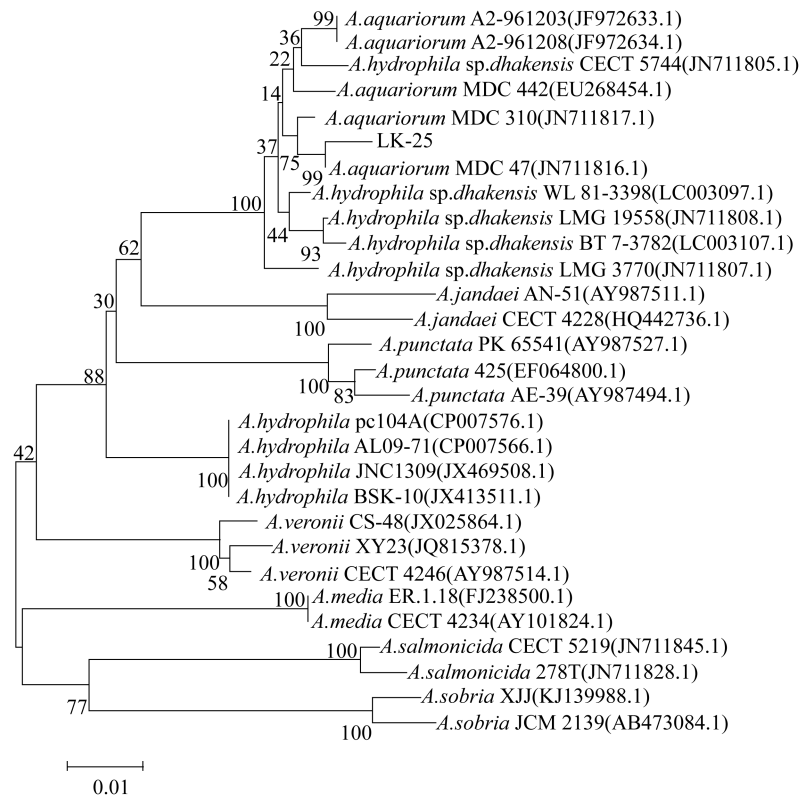


图 2 气单胞菌属细菌的遗传演化分析
Fig. 2 Phylogenetic analysis of *Aeromonas* species

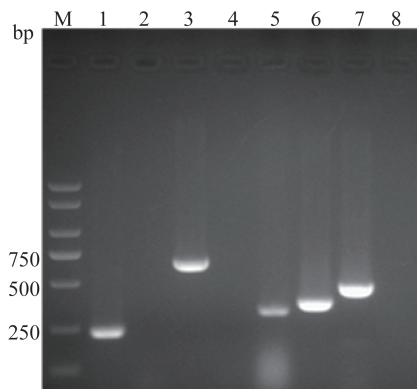


图 3 毒力基因的 PCR 检测
M. DNA 分子质量标准; 1. *act*; 2. *ascV*; 3. *ahp*; 4. *aer*; 5. *epr*; 6. *hcp*; 7. *alt*; 8. 阴性对照

Fig. 3 PCR detection of virulence genes
M. Marker DL2000; 1. *act*; 2. *ascV*; 3. *ahp*; 4. *aer*; 5. *epr*; 6. *hcp*; 7. *alt*; 8. negative control

2.5 胞外蛋白酶活性

以酪蛋白为底物测出的 LK-25 胞外蛋白酶活性为 48 个活性单位,是参考菌株 NJ-35 的 3 倍,说明该菌株的胞外蛋白酶活性较强。

2.6 斑马鱼致病性实验

经计算,水族箱气单胞菌 LK-25 对斑马鱼的 LD_{50} 为 1.02×10^3 CFU/尾(表 3)。根据濮俊毅等^[16]对细菌致病力的分类,LK-25 株被归为强致病力菌株。

3 讨论

近 30 年来,气单胞菌属细菌的种类不断增加。生化实验是细菌鉴定的传统方法,但对于气单胞菌,由于其菌株和表型差异,单纯用生化实验结果来判断并不十分可靠。水族箱气单胞菌在发现时并不利用乳糖,故 Figueras 等^[17]将这个指标作为与嗜水气单胞菌区分的依据。然而 Beaz 等^[15]研究发现,11 株水族箱气单胞菌均能很好地利用乳糖。Aravena 等^[6]对 215 株气单胞菌进行基因型特性分析,发现通过表型鉴定出来的 104 株嗜水气单胞菌中,有 35 株通过基因型确定为水族箱气单胞菌。本实验中,LK-25 的生化实验结果与嗜水气单胞菌很相似,均不能分解乳糖产生乳酸。为进一步确认,经看家基因 *gyrB*

表 3 斑马鱼致病性实验
Tab.3 The virulence assay in zebrafish with strain LK-25

剂量/(CFU/尾) dosage	数量/尾 numbers	感染后动物死亡数/尾 death number post inoculation							死亡率/% mortality
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	
1×10^6	10	9	1	0	0	0	0	0	100
1×10^5	10	7	3	0	0	0	0	0	100
1×10^4	10	0	1	2	0	2	0	0	70
1×10^3	10	0	1	1	1	3	0	0	60
1×10^2	10	0	0	0	1	1	0	0	20
1×10^1	10	0	0	0	0	0	0	0	0
LD ₅₀ = 1.02 × 10 ³ CFU/尾									

测序,鉴定为水族箱气单胞菌。但基因序列BLAST 比对发现,与几株嗜水气单胞菌达卡亚种具有较高的同源性。2009 年,Martínez 等^[18]基于 *gyrB* 和 *rpoD* 构建的进化树分析认为,嗜水气单胞菌达卡亚种应该归于水族箱气单胞菌;随后在 2013 年,Beaz 等^[15]运用多位点序列分析(MLST)技术,基于保守基因 *gyrB*、*rpoD*、*recA*、*dnaJ* 和 *gyrA* 基因测序构建的进化树分析支持了此观点。本研究的实验结果再次说明这两种菌的亲缘关系很近,容易混淆,需要进行分子生物学鉴定。

气单胞菌的基因组编码多种致病因子,主要包括气溶素、溶血素、肠毒素、胞外蛋白酶、Ⅲ型和Ⅵ型分泌系统等^[19-20]。毒力基因检测表明,LK-25 具有细胞毒性肠毒素、细胞兴奋性肠毒素、温敏胞外蛋白酶、丝氨酸蛋白酶以及Ⅵ型分泌系统效应蛋白 Hcp 等,同时具有溶血性和较高的溶蛋白活性。这些特点符合 Morinaga 等^[7]报道的水族箱气单胞菌具有很高细胞毒性,能引起败血症这一结论。另外,本研究的斑马鱼致病性实验也证实水族箱气单胞菌具有较强的致病性。

近年来,在人类医学临床上水族箱气单胞菌感染的病例不断被报道^[21]。Shin 等^[8]更是首次在临床上报道了水族箱气单胞菌使肝硬化病人致死的病例,因而受到越来越多的关注。而在我国,关于水族箱气单胞菌这个新种的研究尚未见报道。本研究是国内首次对该菌进行分离鉴定和相关特性的分析,并证实该菌具有较强的致病力。

参考文献:

[1] Tan A P, Deng Y T, Jiang L, *et al.* Analysis of antimicrobial susceptibility and plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Aeromonas* isolated

from turtles[J]. *Journal of Fisheries of China*,2014, 38(7):1018 – 1025. [谭爱萍,邓玉婷,姜兰,等.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.]

[2] Lin R T,Zhou Z Y, Wang X L, *et al.* Cloning and sequence analysis of the 16S rRNA gene of *Aeromonas salmonicida* in goat [J]. *Journal of Southwest University: Natural Science Edition*,2011, 33(8):46 – 51. [林如涛,周作勇,王小林,等.羊源杀鲑气单胞菌 16S rRNA 基因的克隆测序及分析. *西南大学学报:自然科学版*,2011, 33 (8): 46 – 51.]

[3] Zhang Y F, Hang X G, Zhang X J. Research progress on *Aeromonas hydrophila* [J]. *Journal of Anhui Agricultural Science*,2009,37(26):12389 – 12390. [张玉芬,亢喜刚,张秀军.嗜水气单胞菌研究进展. *安徽农业科学*,2009,37(26):12389 – 12390.]

[4] Lu C P. *Veterinary Microbiology* [M]. Beijing: China Agriculture Press,2013:127 – 130. [陆承平.兽医微生物学.北京:中国农业出版社,2013:127 – 130.]

[5] Martínez M A J, Saavedra M J, Mota V R, *et al.* *Aeromonas aquariorum* sp. nov., isolated from aquaria of ornamental fish[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*,2008, 58(5):1169 – 1175.

[6] Aravena R M, Harnett G B, Riley T V, *et al.* *Aeromonas aquariorum* is widely distributed in clinical and environmental specimens and can be misidentified as *Aeromonas hydrophila* [J]. *Journal of Clinical Microbiology*,2011,49(8):3006 – 3008.

[7] Morinaga Y, Yanagihara K, Eugenin F L, *et al.* Identification error of *Aeromonas aquariorum*: A causative agent of septicemia [J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*,2013,76(1):

- 106 – 109.
- [8] Shin G W, You M J, Cho H S, *et al.* Severe sepsis due to *Aeromonas aquariorum* in a patient with liver cirrhosis [J]. Japanese Journal of Infectious Diseases, 2013, 66(6) : 519 – 522.
- [9] 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.
- [10] Jiang C Y, Huang J H, Chen M, *et al.* Isolation of *Aeromonas hydrophila* in some pools of Nanjing and detection of the virulence-associated genes [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2010, 42(6) : 4 – 7. [蒋春阳, 黄金虎, 陈默, 等. 南京地区池塘水中嗜水气单胞菌的分离鉴定与相关毒力基因检测. 畜牧与兽医, 2010, 42(6) : 4 – 7.]
- [11] Yanez M A, Catalan V, Apraiz D, *et al.* Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(3) : 875 – 883.
- [12] Luo Z F, Hu M, Lu C P, *et al.* Virulence-associated characterization analysis of three strains of *Aeromonas hydrophila* [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2012, 32(1) : 48 – 51. [罗志飞, 胡萌, 陆承平, 等. 3 株嗜水气单胞菌弱毒株的毒力相关特性分析. 中国兽医学报, 2012, 32(1) : 48 – 51.]
- [13] Inamura H, Nakai T, Muroga K. An extracellular protease produced by *Vibrio anguillarum* [J]. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 1985, 51(2) : 1915 – 1920.
- [14] Hu M, Pan Z H, Lu C P, *et al.* Biological characterization of epidemic *Aeromonas hydrophila* strains [J]. Chinese Veterinary Science, 2013, 43(5) : 441 – 445. [胡萌, 潘子豪, 陆承平, 等. 嗜水气单胞菌流行菌株的生物学特性. 中国兽医科学, 2013, 43(5) : 441 – 445.]
- [15] Beaz H R, Martínez M A, Figueras M J. Reclassification of *Aeromonas hydrophila* subsp. dhakensis Huys *et al.* 2002 and *Aeromonas aquariorum* Martínez-Murcia *et al.* 2008 as *Aeromonas dhakensis* sp. nov. comb nov. and emendation of the species *Aeromonas hydrophila* [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2013, 36(3) : 171 – 176.
- [16] Pu J Y, Huang X X, Lu C P. Virulence detection of *Streptococcus suis* type 2 in zebrafish [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2007, 40(11) : 2655 – 2658. [濮俊毅, 黄新新, 陆承平. 用斑马鱼检测猪链球菌 2 型的致病力. 中国农业科学, 2007, 40(11) : 2655 – 2658.]
- [17] Figueras M J, Alperi A, Saavedra M J, *et al.* Clinical relevance of the recently described species *Aeromonas aquariorum* [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2009, 47(11) : 3742 – 3746.
- [18] Martínez M A, Monera A, Alperi A, *et al.* Phylogenetic evidence suggests that strains of *Aeromonas hydrophila* subsp. dhakensis belong to the species *Aeromonas aquariorum* sp. nov. [J]. Current Microbiology, 2009, 58(1) : 76 – 80.
- [19] Li Q, Yang H J, He Y, *et al.* Characterization and multilocus sequence typing of *Aeromonas* strains isolated in Tianjin area [J]. Microbiology China, 2013, 40(8) : 1365 – 1374. [李倩, 杨洪江, 何洋, 等. 天津地区气单胞菌分离株的鉴定与多位点序列分型. 微生物学通报, 2013, 40(8) : 1365 – 1374.]
- [20] Bönemann G, Pietrosiuk A, Mogk A. Tubules and donuts: A type VI secretion story [J]. Molecular Microbiology, 2010, 76(4) : 815 – 821.
- [21] Wu C J, Tsai P J, Chen P L, *et al.* *Aeromonas aquariorum* septicemia and enterocolitis in a cirrhotic patient [J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2012, 74(4) : 406 – 408.

Identification and pathogenic characteristics of *Aeromonas aquariorum*, a new member of the genus *Aeromonas*

WU Yafeng, WANG Xuyuan, PANG Maoda, LU Chengping, LIU Yongjie*

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

Abstract: *Aeromonas* is widely distributed in freshwater environments. Since the late 1980s, *Aeromonas* has caused serious economic losses to the aquaculture industry in our country. The published species names are increasing in the genus *Aeromonas*. In order to determine the disease-causing bacterium at one fish farm of Nanjing, some tissue samples from diseased fish were collected and the pathogenic bacteria were identified by means of bacterial culture, biochemical characterizations and *gyrB* gene sequencing. One strain of bacterium was isolated and named LK-25. The results of biochemical tests showed that the bacterial strain has many similarities compared with *A. hydrophila*. Then the strain was subjected to sequencing of the *gyrB* gene for species identification, and then it demonstrated that the strain shared 99% homology with the *A. aquariorum* strain MDC 47. The corresponding *gyrB* phylogenetic analysis including representative strains from some known *Aeromonas* species showed that *A. aquariorum* LK-25 was very closely related to the *A. hydrophila* ssp. *dhakensis*. The detection result of virulence factors indicated that *A. aquariorum* LK-25 strain carried five virulent genes, including *act*, *ahp*, *epr*, *hcp* and *alt* genes, which encoded the cytotoxin, serine proteases, extracellular protease, hemolysin co-mediate protein and cytotoxic enterotoxins, respectively. *A. aquariorum* LK-25 also showed strong hemolytic and proteolytic activities. The median lethal dose (LD₅₀) with 1.02×10^3 CFU/ml in zebrafish indicated that *A. aquariorum* LK-25 is a highly virulent strain. *A. aquariorum* was a new species originally isolated from ornamental fish in 2008, and widely distributed in clinical and environmental specimens. Recent reports highlighted the importance of this species in cases of gastroenteritis, soft tissue infections, bacteremia and peritoneal dialysates in human, suggesting its public health significance. To our knowledge, this was the first report of *A. aquariorum* in China. The study will lay a good foundation for a better understanding of the occurrence and spread of *A. aquariorum* infection.

Key words: *Aeromonas aquariorum*; isolation; identification; pathogenic characteristics

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