

文章编号:1000-0615(2012)07-1119-07

DOI:10.3724/SP.J.1231.2012.27916

杂交鳢(斑鳢♀×乌鳢♂)内脏类结节病病原菌的分离、鉴定与特性分析

刘春, 李凯彬, 王庆, 常藕琴, 梁慧丽, 王芳, 潘德博, 石存斌, 吴淑勤*

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380)

摘要: 从广东佛山、广州两地养殖场患内脏类结节病杂交鳢(*Channa maculata* ♀ × *C. argus* ♂)内脏器官分离到2株细菌, 纯化培养后获得2个分离株, 编号为WL-1和WL-2, 对分离菌株进行了细菌鉴定、致病性分析及药敏实验。应用常规生理生化鉴定和ATB系统细菌自动鉴定仪对分离菌株进行细胞形态学、理化特性分析, 初步判定所分离菌为舒伯特气单胞菌。采用16S rRNA基因、DNA促旋酶的B亚单位蛋白(*gyrB*)基因对分离菌株进行DNA分子鉴定, 结果显示, 两个菌株间的16S rRNA基因序列相同, *gyrB*基因序列同源率为99.7%; 分离菌株与GenBank上登录的舒伯特气单胞菌16S rRNA基因序列和*gyrB*基因序列同源性均最高, 达99%以上; 分离菌株在系统进化树上与舒伯特气单胞菌聚为一族, 进一步确认分离株为舒伯特气单胞菌。人工感染健康鱼后出现与自然发病相似的内脏类结节病症状, 从发病鱼内脏组织再分离的细菌特性与原感染菌相同。综合理化特性分析、基因鉴定和人工感染实验确认舒伯特气单胞菌是杂交鳢内脏类结节病的致病菌。药敏实验发现分离菌株对头孢唑啉、庆大霉素等14种药物敏感; 对青霉素G、苯唑西林2种药物耐受。

关键词: 杂交鳢; 舒伯特气单胞菌; 16S rRNA基因; *gyrB*基因; 鉴定; 致病性

中图分类号: S 943

文献标志码: A

舒伯特气单胞菌(*Aeromonas schubertii*)属气单胞菌科(Aeromonadaceae), 气单胞菌属(*Aeromonas*), 为革兰氏阴性杆菌, 单极鞭毛, 运动极为活泼。该菌广泛存在于淡水、海水、土壤、鱼类和脊椎动物肠道中, 人类接触后可引起感染, 是急性腹泻的重要致病菌。在食品、食物中毒的病样和腹泻患者中检出过该菌^[1-2], 也有在感染伤口上分离到该菌的报道^[3-4], 目前该菌在水产养殖上作为致病菌的报道还很少。

鳢科(Channidae)鱼类是我国重要的淡水经济鱼类^[5-6], 在我国分布广泛, 其肉质细嫩, 味道鲜美, 具有较高的营养价值, 其中斑鳢(*Channa maculata*)和乌鳢(*C. argus*)是我国外贸出口的重要淡水经济鱼类。杂交鳢(*Channa maculata* ♀ × *C. argus* ♂)是以斑鳢为母本, 乌鳢为父本杂交获得, 生长快、易

于驯食人工配合饲料且耐运输。近年来, 杂交鳢在珠江三角洲地区养殖规模逐步扩大, 成为重要的养殖品种^[7-8]。

自然条件下, 鳢科鱼类抗病能力极强, 但是在高密度养殖条件下, 养殖水体水质会较差, 鳢科鱼类患病也时有发生, 结节病是近年来鳢科鱼类常见疾病之一, 该病发病率高, 死亡率大, 已给不少养殖场造成重大损失, 目前报道的结节病病原主要为诺卡氏菌^[9-11]。2011年8月本实验室研究人员接到广东佛山、广州地区养殖场杂交鳢内脏类结节病病例, 症状疑似诺卡氏菌感染, 但细菌分离得到类似气单胞菌的菌株, 未分离到诺卡氏菌。本研究采用细菌形态观察、生理生化鉴定、16S rRNA和*gyrB*序列基因序列分析等方法对分离菌株进行了分类鉴定, 确认了该次杂交鳢类结节病为舒伯特

收稿日期: 2011-12-29

修回日期: 2012-03-13

资助项目: 公益性行业(农业)科研专项经费项目(200903045); 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-46)

通讯作者: 吴淑勤, E-mail: wushuqin001@21cn.com

气单胞菌感染所致。本研究旨在探讨杂交鳢内脏类结节病病原,为其病害的深入研究及制定安全有效的病害防控措施奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

发病鱼样本采自广东的佛山、广州地区养殖场,体质量 100~200 g。主要症状为鱼体内肝、脾、肾等器官出现白色类结节。

健康杂交鳢(100~150 g),由中山市裕荣水产养殖公司提供。

1.2 主要试剂

大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存。5% 绵羊血琼脂平板、细菌生化微量鉴定管等购自广州环凯微生物有限公司;胶回收 Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0、DNA Taq 酶、dNTP、限制性内切酶、T₄连接酶、DNA 分子 Marker 为宝生物工程(大连)有限公司产品;Plasmid Mini Kit I 为 Omega 公司产品;细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司;琼脂糖等相关试剂购自威佳科技有限公司。

1.3 病原菌的分离与培养

取患病杂交鳢,以无菌操作取肝、肾、脾等组织,接种在 5% 绵羊血琼脂上,28 ℃培养 10 d,选择优势菌菌落纯化培养,获得的细菌用于形态观察、生理生化分析、分子鉴定和人工感染实验。

1.4 病原菌形态观察

将纯化的菌株接种于 5% 绵羊血琼脂平板,28 ℃培养 24 h 后,观察菌落特征。经革兰氏染色,光学显微镜观察细菌形态,同时用无菌水洗下少量菌落,经 2% 磷钨酸负染,在 Philips CM10 型透射电镜观察菌体形态及大小。

1.5 病原菌理化特性鉴定

纯化的细菌在血平板上 28 ℃培养 24 h,根据革兰氏染色结果,采用 ATB 系统细菌自动鉴定仪(法国 Bio-merieux 公司) ID32 STREP 鉴定卡进行细菌鉴定,并应用细菌生化微量鉴定管进行细菌的常规生理生化测定,鉴定结果参照文献[12-13]的标准判断细菌的种类。

1.6 16S rRNA 和 gyrB 基因序列测定与分析

DNA 的制备 纯化的细菌在血平板上 28 ℃培养 24 h,经 0.65% 无菌生理盐水洗涤到 1.5 mL 离

心管中,12 000 r/min 离心 1 min,弃上清。按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取细菌基因组 DNA。

基因序列的 PCR 扩增与测序 根据 GenBank 登录的气单胞菌 16S rRNA 基因和 gyrB 基因设计 PCR 扩增引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成。用于扩增 16S rRNA 基因的上游引物为 PSF: 5'-AGAGTTTGATCCTGGTCAGAACGAACGCT-3',下游引物为 PSR: 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCC-3';扩增 gyrB 基因上游引物为 PYP: 5'-GGGGTCGGTGT CTCGGTTGTTA-3',下游引物为 PYR: 5'-CACCC TTGCGACGAGTCATCT-3'。以细菌基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,反应条件为 96 ℃ 预变性 3 min,94 ℃ 30 s,55 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 2 min,完成 30 个循环后于 72 ℃ 延伸 6 min。

扩增产物经琼脂糖胶回收纯化,与 T₄ 载体连接,转化感受态细胞大肠杆菌 DH5 α ,转化子用试剂盒 Plasmid Mini Kit T₄ 提取质粒,EcoR I 和 Hind III 酶切鉴定插入片段大小,挑取阳性转化子送博尚生物技术有限公司用 ABI PRISM 3730 全自动荧光测序仪完成序列测定。

序列分析与系统发育树的构建 测得序列采用 GenBank 数据库中的 BLAST 进行相似性比较。根据返回的结果,从 GenBank 数据库选取与所分析的细菌基因序列同源性较高的已知相关序列,采用 MEGA 4.0 软件进行多重序列匹配分析,用邻接法(Neighbor-Joining,NJ)构建系统发育树,并通过自举分析进行置信度检测,自举数集 1 000。

1.7 人工感染实验

收集培养 24 h 的细菌,经 0.65% 无菌生理盐水洗涤并配制成细菌悬液,分别稀释成 1×10^8 、 1×10^7 、和 1×10^6 CFU/mL 3 个浓度,肌肉注射健康杂交鳢。注射 0.2 mL/尾,10 尾/组,对照组注射等量无菌生理盐水。实验期间水温 28~31 ℃,每天观察及记录实验鱼的症状和死亡情况,连续观察 7 d。从上述人工感染出现明显症状的病鱼再次分离菌株和进行感染实验。

1.8 细菌药敏试验

以纸片法在 5% 绵羊血平板上进行,28 ℃ 恒温培养 24 h 后观察抑菌圈有无并测量直径,根据文献[14]的标准判定细菌对药物的敏感性。

2 结果

2.1 细菌的分离

病鱼组织样品接种在 5% 绵羊血平板上, 28 °C 培养 24 h 后形成较为均一的菌落, 培养 10 d 的接种平板均未见类似诺卡氏菌的菌落。挑选 24 h 培养的优势菌进行纯化培养, 从病鱼样品中共分离出 2 个菌株, 编号为 WL-1、WL-2。

2.2 菌株的形态特征及生理生化指标

分离菌在 5% 绵羊血培养基 28 °C 培养 24 h 后菌落直径为 0.8~2.2 mm, 灰白色、中央隆起、圆形、湿润, 表面光滑, 边缘整齐, β-溶血。经革兰氏染色, 判定为革兰氏阴性菌(图 1)。电镜下观察, 发现菌体杆状、有极生单鞭毛, 大小为(0.3~0.8) μm × (1.2~2.2) μm(图 2)。

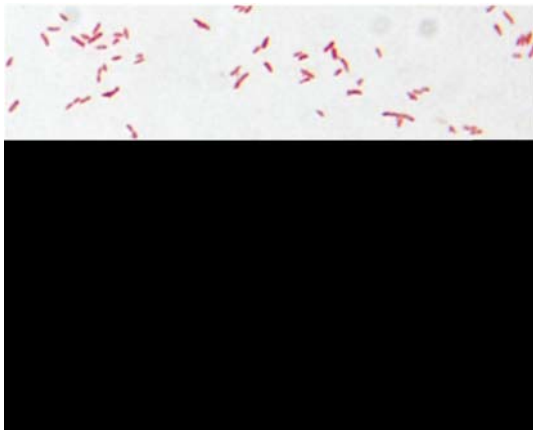


图 1 患病杂交鳢病原菌的革兰氏染色照片
Fig. 1 Gram stain of pathogenic bacteria in diseased hybrid snakehead

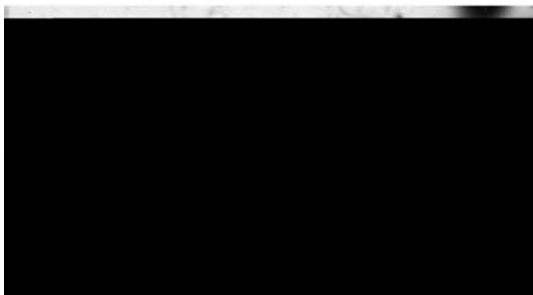


图 2 患病杂交鳢病原菌的透射电镜照片
Fig. 2 Transmission electron micrograph of pathogenic bacteria in diseased hybrid snakehead

生理生化测定显示, 分离菌株葡萄糖产酸, 精氨酸双水解酶、海藻糖, 麦芽糖, 酚红阳性; 七叶苷、水杨苷、赖氨酸脱羧酶、阿拉伯糖、蔗糖、靛基质、甘露醇阴性(表 1)。

表 1 分离菌株的生理生化特征

Tab. 1 Biochemical and physiological characteristics of the isolated strains

| 鉴定项目 identified items | WL-1 | WL-2 |
|--------------------------------|------|------|
| 氧化酶 oxidase | + | + |
| sensitivity to O/129 (10 μg) | R | R |
| sensitivity to O/129 (150 μg) | R | R |
| 6.5%氯化钠 growth in 6.5%NaCl | - | - |
| 葡萄糖产酸 glucose, Acid | + | + |
| 七叶苷 esculin | - | - |
| 水杨苷 salicin | - | - |
| 赖氨酸脱羧酶 lysine decarboxylase | - | - |
| L-阿拉伯糖 L-Arabinose | - | - |
| 精氨酸双水解酶 arginine dihydrolase | + | + |
| 蔗糖 sucrose | - | - |
| 靛基质 indole | - | - |
| 甘露醇 mannitol | - | - |
| 鸟氨酸脱羧酶 ornithine decarboxylase | - | - |
| 纤维二糖 cellobiose | - | - |
| 鼠李糖 rhamnose | - | - |
| 肌醇 myo-inositol | - | - |
| 侧金盏花醇 adonitol | - | - |
| 麦芽糖 maltose V.P | + | + |
| D-阿拉伯醇 D-Arabitol | - | - |
| 海藻糖 trehalose | + | + |
| 酚红 phenolsulfonphthalein | + | + |
| 溶血 hemolysis | + | + |

注: +. 阳性反应; -. 阴性反应; R. 抗性。

Notes: +. positive; -. negative; R. resistance.

综合常规生化测定及 ATB 系统细菌自动鉴定仪 (ID32 STREP) 分析的结果, 初步鉴定分离菌株为舒伯特气单胞菌。

2.3 基因序列分析与系统发育树的构建

经引物 PSF 和 PSR 扩增 2 个分离菌株的 16S rRNA 基因, 均获得长度为 1 407 bp 的片段; 经引物 PYP 和 PYR 扩增 2 个分离菌株的 gyrB 基因, 均获得长度为 800 bp 左右的片段。序列比对分析结果显示所检测的 2 个菌株 16S rRNA 基因同源率为 100%, 与 GenBank 上登录的舒伯特气单胞菌 (HQ407423) 同源率最高, 为 99.9%; 2 个菌株的 gyrB 基因同源率为 99.7%, 与 GenBank 上登录的舒伯特气单胞菌 (HQ731455) 也具有高度同源性 (> 99%), 选取 WL-2 作为代表菌株, 登录其 16S rRNA 基因序列和 gyrB 基因序列到 GenBank, 登录号分别为 JQ319029 和 JQ319030, 根据 WL-2 菌株 16S rRNA 和 gyrB 基因序列与 GenBank 已登录的其它气单胞菌属序列分别建立系统进化树, 结果显示, WL-2 菌株均与舒伯特气单胞菌聚为一簇 (图 3 和图 4)。

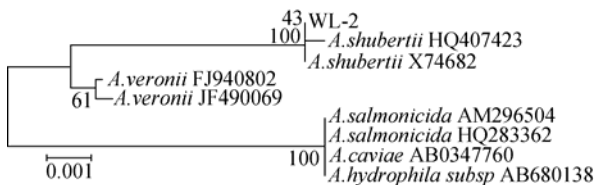


图3 分离株 WL-2 与其他同属不同种气单胞菌 16S rRNA 聚类分析的结果

节点处数值为自展置信值, 自展重复 1 000 次。

Fig. 3 Phylogenetic relationship among the *Aeromonas* species based on analysis of 16S rRNA gene sequences

The degree of confidence for each branch point was determined by bootstrap analysis(1 000 repetitions).

2.4 人工感染实验

分离的 2 株细菌进行健康杂交鳢人工感染实验, 实验结果见表 2。注射高浓度菌液(1×10^8 、 1×10^7 CFU/mL)的两个试验组第 2 天开始出现死亡, 死亡鱼类腹腔有少量腹水, 肝、脾、肾肿大, 内脏无类结节症状, 初步判断为急性死亡; 第 3 天死亡的杂交鳢, 肝脏开始出现自然发病鱼相似的类结节症状(图 5), 观察至第 7 天, 未死亡鱼剖检也出现内脏类结节症状。从感染试验鱼肝、脾、肾等组

织中分离的细菌与原感染菌形态、生化特性相同。

人工感染分离得到的菌株再次感染健康杂交鳢, 获得与初次感染相似的症状, 两次人工感染分离的菌株形态、生化特性相同, 空白对照组均健康存活。

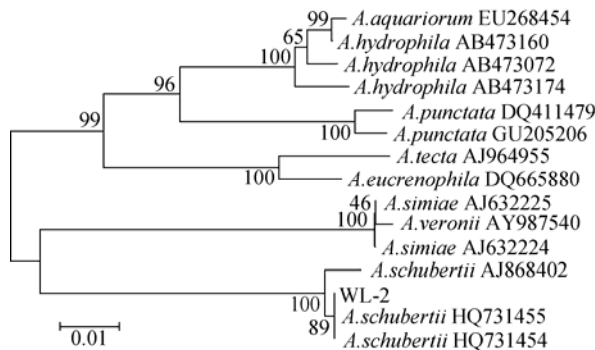


图4 分离株 WL-2 与其他同属不同种气单胞菌 gyrB 基因聚类分析的结果

节点处数值为自展置信值, 自展重复 1 000 次。

Fig. 4 Phylogenetic relationship among the *Aeromonas* species based on analysis of gyrB gene sequences

The degree of confidence for each branch point was determined by bootstrap analysis(1 000 repetitions).

表 2 分离菌株人工感染实验结果

Tab. 2 Artificial infection results of the isolated strains

| 注射菌株 bacteria strain injected | 菌液浓度/(CFU/mL) concentration | 数量 number | 累计死亡尾数/尾 accumulative death number | | | | | | | 死亡率/% mortality |
|-------------------------------------|--------------------------------|--------------|---------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------------------|
| | | | 1 d | 2 d | 3 d | 4 d | 5 d | 6 d | 7 d | |
| WL-1 | 0(对照 control) | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 1×10^8 | 10 | 0 | 3 | 4 | 5 | 6 | 6 | 7 | 70 |
| | 1×10^7 | 10 | 0 | 2 | 4 | 4 | 4 | 5 | 6 | 60 |
| | 1×10^6 | 10 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 | 4 | 5 | 50 |
| WL-2 | 0(对照 control) | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 1×10^8 | 10 | 0 | 3 | 4 | 5 | 5 | 6 | 8 | 80 |
| | 1×10^7 | 10 | 0 | 1 | 3 | 4 | 4 | 4 | 6 | 60 |
| | 1×10^6 | 10 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 3 | 5 | 50 |



图5 发病杂交鳢肝脏类结节症状

(a) 自然发病杂交鳢; (b) 人工感染发病杂交鳢。

Fig. 5 The diseased fish with symptom of sarcoidosis in liver

(a) The natural infected Hybrid Snakehead; (b) The artificial infected hybrid snakehead.

2.5 药敏试验

分离菌株对头孢唑林、庆大霉素、链霉素、四环素、阿米卡星、红霉素、呋喃妥因、诺氟沙星、环丙沙星、头孢氨苄、卡那霉素、洛美沙星、利福平、大观霉素 14 种药物敏感;对青霉素、苯唑西林 2 种药物耐受(表 3)。

表 3 分离菌株对 16 种药物的敏感性
Tab. 3 Chemotherapeutants sensitivities of the isolated strains

| 抗菌药物 chemotherapeutants | 含药量/($\mu\text{g}/\text{片}$) contents | 敏感性 sensitivity | |
|----------------------------|--|--------------------|------|
| | | WL-1 | WL-2 |
| 青霉素 G penicillin G | 10 | R | R |
| 苯唑西林 oxacillin | 1 | R | R |
| 头孢唑林 cefazolin | 30 | S | S |
| 庆大霉素 gentamicin | 10 | S | S |
| 链霉素 streptomycin | 10 | S | S |
| 四环素 tetracycline | 30 | S | S |
| 阿米卡星 amikacin | 30 | S | S |
| 红霉素 erythromycin | 15 | S | S |
| 呋喃妥因 nitrofurantoin | 300 | S | S |
| 诺氟沙星 norfloxacin | 10 | S | S |
| 环丙沙星 ciprofloxacin | 5 | S | S |
| 头孢氨苄 cefalexin | 30 | S | S |
| 卡那霉素 kanamycin | 30 | I | I |
| 洛美沙星 lomefloxacin | 10 | S | S |
| 利福平 rifampicin | 5 | I | I |
| 大观霉素 spectinomycin | 100 | S | S |

注: S.敏感; I.中等敏感; R.抗性。

Notes: S.sensitive; I.intermediate; R.resistant.

3 讨论

本研究从患病杂交鳢体内分离到的菌株,采用形态学特征观察、主要生理生化指标测定,结合 16S rRNA 基因、gyrB 基因序列分析对分离菌株进行鉴定,确定该分离菌株为舒伯特气单胞菌。人工感染实验发现分离菌感染健康鱼的发病症状与自然发病症状相同,证明分离菌为致病菌。因此,可以确定舒伯特气单胞菌为杂交鳢内脏类结节病致病菌。

引起鳢科鱼类结节病的病原有诺卡氏菌^[9-11]、分枝杆菌^[15]和类立克次氏体^[16]。其中诺卡氏菌病是近年来养殖鳢科鱼类常见暴发病,该病发病率高,死亡率大,已给不少鳢科鱼类养殖场造成重大损失,该病主要症状为体表出血,溃疡,严重者形成瘰管;肾脏、肝脏、脾脏、心脏、鳃、肌肉等器官表面形成白色或黄色小结节^[11]。本研究中类结节病症状与诺卡氏菌感染引起结节症状有所不同:类结节病

症状主要表现为在肝、脾、肾等器官形成平滑、柔软、边缘界限不清晰的白色点状坏死灶,发病时间较短,而诺卡氏菌感染则形成边缘界限清晰,比正常组织更硬的白色结节,其结节形成时间较长,到发病后期机体的所有器官几乎都能观察到,在养殖过程中应注意区分两种症状,避免引起误诊。

为了进一步验证病原菌的种属,本研究采用了 16S rRNA 基因、gyrB 基因对分离菌株进行 DNA 分子鉴定。细菌 16S rRNA 基因具有高度保守性而被广泛地应用于细菌鉴定。但同属不同种间的 16S rRNA 基因通常具有很高的同源性,因此 16S rRNA 基因适用于属及属以上分类单位的亲缘关系鉴定,对于亲缘关系较近的细菌常因分辨率不够而较难区分^[17]。本实验 16S rRNA 基因的分析结果也出现类似现象:菌株的 16S rRNA 的序列与已知舒伯特气单胞菌的同源性非常高,为 99.9%,但与同属不同种的菌株同源性也有高达 98.9%,因此本研究进一步分析了 gyrB 基因。gyrB 基因属于信号通路中与 DNA 复制、限制、修饰和修复有关的蛋白编码基因,呈单拷贝,多数细菌中都存在,编码 DNA 促旋酶的 B 亚单位蛋白,gyrB 对细菌 DNA 的转录和复制很重要。因不显现频繁的基因横向转移并且基于该基因序列的分析与 DNA 杂交同源性分析有较好的一致性,近年来常被选用于细菌系统发育分析及细菌鉴定^[18-20]。本研究中分离菌株 WL-2 的 gyrB 基因序列与已知的舒伯特气单胞菌的同源性达 99.2%以上,与同属不同种的气单胞菌同源性则低于 90%,显示出较高的分辨率。

气单胞菌对水产养殖业的危害已得到普遍的认同^[21-22],其中嗜水气单胞菌也有报道能感染引起养殖鱼类类结节病^[23-24],舒伯特气单胞菌作为水产动物致病菌的报道比较少,李福荣等^[25]从鳖(*Trionyx sinensis*)腐皮病分离到的舒伯特气单胞菌能回归感染健康鳖,并导致其死亡;余华等^[26]认为舒伯特气单胞菌是导致淡红墨头鱼(*Garra rufa*)死亡的病原菌,目前还未见有舒伯特气单胞菌引起水产动物类结节病病例的报道。本研究首次报道了舒伯特气单胞菌引起杂交鳢内脏类结节病,人工感染实验发现该病发病前期没有任何症状或症状不明显,发病时间较短,对杂交鳢具有较高致病性和致死性。因此,进一步开展病原菌的流行病学

调查,了解其发病规律,确认危害情况,同时研究安全、有效的治疗方法,将有助于杂交鳢内脏类结节病的有效防控,保证我国杂交鳢养殖产业的健康可持续发展。

参考文献:

- [1] 高海英,潘慧英,王芳. 江阴市首次从食品中检出舒伯特气单胞菌[J]. 中国卫生检验杂志, 2002, 12(3): 329.
- [2] 刘燕,陈道利,霍开兰. 气单胞菌污染直接入口食品的调查分析[J]. 现代预防医学, 2001, 28(4): 526-527.
- [3] 冷如意,郭思建. 从骨折术后伤口感染患者脓液中分离出 1 株舒伯特气单胞菌[J]. 中国现代医学杂志, 1996, 6(6): 73.
- [4] Amy M C, Marii M A, Fanning G R, *et al.* Characterization of *Aeromonas schubertii* strains recently isolated from traumatic wound infections[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1989, 27(8): 1826-1830.
- [5] 聂国兴,傅艳茹,张浩,等. 乌鳢肌肉营养成分分析[J]. 淡水渔业, 2002, 32(2): 46-47.
- [6] 杨四秀,蒋艾青. 斑鳢的含肉率及肌肉营养成分分析[J]. 河北渔业, 2007, (12): 10-12.
- [7] 刘文奎,樊启学,朱邦科,等. 乌鳢养殖技术之一: 雄性乌鳢与雌性斑鳢杂交试验[J]. 中国水产, 2007, 37(3): 37-39.
- [8] 刘文奎,樊启学,朱邦科,等. 饵料密度对杂交鳢仔鱼生长、存活的影响[J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(3): 367-370.
- [9] 王国良,金珊,徐益军. 养殖乌鳢诺卡氏菌病及其病原研究[J]. 水生生物学报, 2009, 33(2): 277-283.
- [10] 曹铮,沈锦玉,谢荣林. 乌鳢结节病病原——诺卡氏菌的分离与鉴定[J]. 水生生物学报, 2009, 33(2): 338-341.
- [11] 常藕琴,石存斌,潘厚军,等. 乌鳢诺卡氏菌病的组织病理学[J]. 水产学报, 2008, 32(2): 209-214.
- [12] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, *et al.* Bergey's manual of determinative bacteriology[M]. 9th edn. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994.
- [13] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [14] 中华人民共和国卫生部. 纸片法抗菌药物敏感试验标准 WS/T 125-1999 [S]. 1999.
- [15] Enrico T, Alessandro B, Elena B, *et al.* identification of the newly described *Mycobacterium poriferae* form tuberculous lesions of snakehead fish (*Channa striatus*) [J]. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases, 1996, 19(1): 25-29.
- [16] 郭琼林,贾伟章,韩先朴,等. 我国淡水养殖乌鳢的类立克次体感染[J]. 自然科学进展, 2004, 14(1): 59-64.
- [17] Stackbrandt E, Goodfellow M. Nucleic acid techniques in bacterial systematics[M]. New York: A Willey-Interscience Publication, 1991.
- [18] Yamamoto S, Harayama S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains[J]. Applied Environmental Microbiology, 1995, 61(3): 1104-1109.
- [19] 侯晓丽,曹清毅,潘劲草,等. 霍乱弧菌和副溶血弧菌分离株的 *gyrB* 基因系统发育分析[J]. 微生物学报, 2006, 46(6): 884-889.
- [20] Mara K, Peter K, Bozena M K, *et al.* Genetic relationships of *Aeromonas* strains inferred from 16S rRNA, *gyrB* and *rpoB* gene sequences[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56(12): 2743-2751.
- [21] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病[J]. 水产学报, 1992, 16(3): 282-288.
- [22] 钱冬,陈月英,沈锦玉,等. 引起鱼类爆发性流行病的嗜水气单胞菌的血清型、毒力及溶血性[J]. 微生物学报, 1996, 35(6): 460-464.
- [23] 梅广海,朱永生,曹格,等. 越冬罗非鱼细菌性类结节病的初步研究[J]. 水产科学, 2002, 21(4): 9-11.
- [24] 金珊,王国良,赵青松,等. 鲈细菌性类结节病的病原及血液病理研究[J]. 水产学报, 2004, 28(6): 703-708.
- [25] 李福荣,潘兹书,肖玉玲,等. 鳖腐皮病、疔疮病、水泡病致病细菌的研究[J]. 河南大学学报, 1994, 24(3): 89-93.
- [26] 余华,何智,严玉宝. 温泉鱼致病性类志贺单胞菌和舒氏气单胞菌的分离鉴定和药敏试验[J]. 中国动物检疫, 2009, 26(7): 37-39.

Isolation, identification and characterization of *Aeromonas schubertii* from hybrid snakehead (*Channa maculata* ♀ × *C. argus* ♂)

LIU Chun, LI Kai-bin, WANG Qing, CHANG Ou-qin, LIANG Hui-li,

WANG Fang, PAN De-bo, SHI Cun-bin, WU Shu-qin*

(Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: Hybrid snakehead (*Channa maculata* ♀ × *C. argus* ♂) is one of the most popular species cultured in the areas of eastern and southern China. With high density culture and rapid expanding production, problems of its diseases become more and more serious. A disease with white spots in internal organs of hybrid snakehead broke out in Fushan and Guangzhou in Guangdong Province in 2011. Bacteria pathogens were isolated from diseased hybrid snakehead cultured in pond. Two bacteria strains with strong virulence were chosen for identifications. The morphological, biochemical and physiological characteristics of the two isolates were studied by using conventional method, ATB Expression System(ID32 STREP) and other assays, and the characteristics of the isolated strains were in accordance with those of *Aeromonas schubertii*. Molecular analyses of 16S rRNA and *gyrB* genes were used for further identification. BLAST showed that 16S rRNA and *gyrB* genes of two strains possessed high similarities with their counterparts registered in GenBank and with each other. The virulent tests were carried out by using the pure culture of the isolated strains artificially infected hybrid snakehead, and the result indicated that the high concentration of bacteria ($\geq 1 \times 10^7$ CFU/mL) caused acute death, and infected diseased fish displayed symptom of sarcoïdosis after three days, while the control group showed no signs in 7d post-challenge. The morphological and biochemical characteristics of the re-isolated bacteria from the artificially infected diseased fish were the same as those of the original infected bacteria. Antibiotic sensitivity assays showed that among 16 antibiotics tested 14 were sensitive, and 2 were resistant.

Key words: *Channa maculata* ♀ × *C. argus* ♂; *Aeromonas schubertii*; 16S rRNA gene; *gyrB* gene; bacterial identification; pathogenicity

Corresponding author: WU Shu-qin. E-mail: wushuqin001@21cn.com