文章编号:1000-0615(2012)08-1290-07 DOI:10.3724/SP.J.1231.2012.28058

引起养殖许氏平鲉死亡的鳗利斯顿氏菌的分离鉴定及致病性

王庚申[1,2], 王印庚[1*], 张 正[1], 廖梅杰[1], 陈 君[1,2],
张辰仓[1], 刘志伟[3], 李德军[4]

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;
3. 山东省博兴县水产局, 山东 博兴 256500; 4. 山东省胶南市渔业技术推广站, 山东 胶南 266400)

摘要: 从患病许氏平鲉的病灶处分离得到一株优势菌, 记为 SS-1。通过两点背部肌肉注射进行人工感染实验, 证明该菌对健康许氏平鲉的半数致死浓度为 9.6×10^6 CFU/mL, 可感染许氏平鲉的多种内脏和组织。细菌形态学和生理生化特征测定结果显示, 菌株 SS-1 为革兰氏阴性, 短杆状, 极生单鞭毛; 氧化酶阳性、接触酶阳性、硝酸盐还原阳性、吲哚产生阳性、V-P 试验阳性、精氨酸双水解酶阳性、H_2S 产生阴性等, 与鳗利斯顿氏菌特征相符。16S rRNA 基因序列分析结果表明, 该菌与鳗利斯顿氏菌的同源性达到了 99%, 因此,将菌株 SS-1 鉴定为鳗利斯顿氏菌。

关键词: 许氏平鲉; 鳗利斯顿氏菌; 细菌鉴定; 致病性
中图分类号: S 941.42 **文献标志码**: A

许氏平鲉(*Sebastes schlegelii*), 俗称黑鲪、黑头、黑石鲈, 隶属辐鳍亚纲(Actinopterygii)、鲉形目(Scorpaeniformes)、鲉科(Scorpaenidae)、平鲉属(*Sebastes*)。在我国, 该鱼种主要分布于渤海、黄海以及东海海区, 属暖温性底层鱼类。由于其具有肉质鲜美、生长快、抗逆性强、耐低温等特点, 现已成为我国北方地区海水网箱养殖重要的经济鱼类之一。然而, 随着养殖规模的不断扩大, 集约化程度的不断提高, 加之养殖管理的粗陋和疾病防控技术水平的限制, 造成许氏平鲉病害时有发生, 且呈现出发病率高、疾病种类增加的趋势[1-4], 给广大养殖业者造成了较大的经济损失, 严重影响了许氏平鲉网箱养殖产业的健康发展。

2011 年 8 月, 青岛沿海水域进入高温期, 水温达到 25 ℃左右, 某养殖场网箱养殖的许氏平鲉发生大批量死亡, 累积死亡率达到 30%。死亡个体体长 20~25 cm, 体质量 350~500 g, 已接近上市规格。患病鱼主要症状为摄食停止, 游动缓慢或侧翻, 鳃丝充血、发红, 体表多处有充血点, 严重者充血几乎遍及全身并有溃疡, 鳍条也呈明显充血和溃烂之状(图 1); 鱼体腹部膨胀, 个别患病鱼肛门充血红肿。解剖病鱼可见, 腹腔内有血色积水, 脾、肾肿大, 呈糜烂状、易破碎, 肝、胆肿胀, 其肝脏有充血现象; 肠道中有黄绿色脓液、无食物。从濒死病鱼的病灶处分离、培养出一株优势菌记为 SS-1, 经人工感染实验证明该菌株对健康的许氏平鲉有较强的致病性, 并表现出与自然发病鱼相似的症状, 由此确定该菌为引起许氏平鲉发病的致病菌, 并鉴定为鳗利斯顿氏菌(*Listonella anguillarum*)。本实验对病原菌的形态特征、生理生化特性、16S rRNA 基因序列同源性、致病性及药物敏感性进行了研究, 旨在探究许氏平鲉发病的致病原及其特性, 为该病的诊断与防治提供科学依据和参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

患病许氏平鲉取自青岛某网箱养殖场, 体长 20~25 cm。健康许氏平鲉购于青岛薛家岛某网箱养殖场, 体长 15~20 cm, 暂养 7 d 后用于人工感染实

收稿日期: 2012-03-27 **修回日期**: 2012-05-11
资助项目: “十一五”国家科技支撑计划(2006BAD09A11); “十二五”国家科技支撑计划(2012BAD17B03); 福建省海洋与渔业厅重点项目([2009]2-12)
通讯作者: 王印庚, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

图 1　许氏平鲉皮肤溃疡病
Fig. 1　Skin hemorrhagic ulcer of *S. schlegelii*

验。试验期间水温 14~16 ℃, 盐度 22~25。

细菌分离鉴定与培养所用 TSA 培养基、TCBS 琼脂培养基依据《微生物学实验》[5](第三版)进行配制。ID 32E 鉴定试条购自生物梅里埃公司, 细菌生化反应微量鉴定管、药敏试纸购自杭州微生物试剂有限公司。

1.2　病原菌的分离与纯化

取体表溃疡、鳃丝和肝、脾、肾等处组织制作成水浸片, 置于 Nikon E800 光学显微镜下观察, 初步分析可疑致病原。

选取具有典型发病症状的濒死病鱼, 用灭菌生理盐水将体表清洗 2 次, 在无菌操作台内进行解剖, 取体表溃疡、鳃丝和肝、脾、肾等处组织, 分别进行组织匀浆, 平板划线法接种于 TSA 和 TCBS 培养基平板, 28 ℃培养 48 h。然后, 挑取形态、色泽一致的优势菌落(记为 SS-1)进行纯化培养, 纯化 3 次后, –80 ℃保存备用。

1.3　人工感染实验

健康的许氏平鲉暂养期间充气、投饵、换水, 随时清除活力弱、不健康的鱼及水中的残饵和粪便。试验前一天停止投饵, 选择规格一致的健康鱼作为试验动物。

分别用浓度为 1.83×10^8, 1.83×10^7, 1.83×10^6, 1.83×10^5, 1.83×10^4 CFU/mL 的 SS-1 菌悬液, 采用两点背部肌肉注射法对许氏平鲉进行人工感染。每个浓度设两个平行组, 每组随机放 6 尾鱼, 每尾鱼注射 0.2 mL 菌悬液, 并设两个对照组, 对照组的鱼注射 0.2 mL1.5%灭菌生理盐水。试验在 75 L 塑料水槽中进行, 试验期间充气, 每天换水量为 100%, 不投喂。连续观察 14 d, 随时记录发病症状及死亡情况。采用 Reed-Muench 法[6]计算半数致死浓度 LC_{50}。

1.4　病原菌的鉴定

将致病菌 SS-1 纯化培养后, 进行革兰氏染色和电镜负染, 以观察细菌个体形态、大小和鞭毛结构, 按《常见细菌系统鉴定手册》[7]所述方法进行初步鉴定。

采用法国 ID 32E 鉴定试剂条以及细菌微量检定管对菌株 SS-1 进行生理生化指标检测, 具体操作方法严格参照产品说明进行。

1.5　细菌 16S rDNA 基因序列同源性分析

PCR 模板 DNA 的制备: 将菌株 SS-1 接种于 TSA 培养基上, 28 ℃培养 24 h, 按细菌基因组 DNA 提取试剂盒所述的方法制备提取 DNA, 作为 PCR 模板 DNA。

根据细菌 16S rDNA 设计通用扩增引物, 扩增基因的正向引物 27F: 5′-AGAGTTTGATC(C/A) TGGCTCAG-3′, 反向引物 1492R: 5′-TACGG (C/T) TACCTTGTTACGACTT-3′。25μL 反应体系中: 10×PCR 缓冲液 2.5 μL, 2.5 × dNTP 混合物 2 μL, 上游引物 0.5 μL, 下游引物 0.5 μL, 2.5 U/L 的 Taq DNA 聚合酶 0.2μL, 模板 DNA 1 μL, 灭菌蒸馏水补足反应体系。

PCR 反应条件为第一阶段 94 ℃变性 5 min , 第二阶段 94 ℃平衡 30 s, 55 ℃退火 30 s , 72℃延伸 1 min, 此阶段 30 个循环, 第三阶段 72℃温育 10 min。PCR 的扩增产物由华大基因公司进行纯化和测序; 序列分析处理: 将菌株的 16S rRNA 序列与互联网 NCBI 的基因库中细菌的 16S rRNA 序列比对, 采用 ClustalX 软件进行多序列匹配排列, 然后用 Mega 进行统计和聚类分析, Neighbor-joining 法构建细菌的系统发育树[8-9]。

1.6　药物敏感实验

将待测菌株 SS-1 接种于 TSA 培养基, 28 ℃培养 24 h, 用灭菌生理盐水洗下, 制成浓度约为 10^9 CFU/mL 的菌悬液。取 0.1 mL 菌悬液涂布于 TSA 平板, 将药敏纸片贴于该培养基上, 28 ℃培养 24 h 后, 测量抑菌圈直径大小。

2　结果

2.1　病原菌的分离

水浸片观察结果显示, 体表溃疡、鳃丝和肝、脾、肾等处组织都有大量活动的短杆状细菌, 未发现寄生虫等其他可疑致病原。

从濒死病鱼体表溃疡组织分离出两株细菌 SS-1 和 SS-2, 前者优势度为 70%, 后者优势度为 25%; 鳃丝中分离出多种细菌, SS-1 菌株不占优势; 从肝、脾、肾等处分离到一株与 SS-1 菌落形态、

菌体形态完全一致的细菌, 优势度为 100%。根据细菌分布和优势度分析, 将 SS-1 作为疑似致病菌, 开展后期的人工感染实验。菌株 SS-1 在 TSA 平板上 28 ℃培养 48 h, 菌落形态为圆形、光滑湿润、中央隆起、边缘规则、不透明、淡黄色、直径多在 2.0 mm 左右, 生长良好。在 TCBS 平板上 28 ℃培养 48 h, 菌落形态为圆形、湿润、中央隆起、不透明、黄色、直径在 1.2 mm 左右。

2.2 人工感染实验

用疑似致病菌 SS-1, 两点背部肌肉注射进行人工感染, 实验鱼从第 2 天开始出现死亡, 主要症状为: 注射部位鳞片竖起, 充血发红, 感染区组织明显肿胀。解剖可见注射部位肌肉组织红肿发炎, 有大量的脓液流出; 整个腹腔器官充血明显, 有血色腹水; 肝脏肿胀, 表面有大量出血点; 脾脏、肾脏均轻微肿大, 脾脏糜烂; 胃肠充血, 部分个体有白便。1.83×10^8 组在感染 7 d 后全部死亡; 1.83×10^7 组在第 3~12 天内全部死亡; 1.83×10^6 组在感染后的 6~10 d 内死亡 4 尾, 死亡率 33.3%。1.83×10^5 组和 1.83×10^4 组未发生死亡; 对照组在 14 d 内表现正常, 未发生病变和死亡(表 1)。

从人工感染实验发病死亡的许氏平鲉体表充血病灶、鳃丝和肝、脾、肾等处再次分离细菌, 并获得与 SS-1 菌落形态完全一致的细菌, 符合科赫法则, 实验证明所分离细菌 SS-1 为此次引起许氏平鲉大量死亡的致病菌。另外, 分析结果显示两点背部肌肉注射细菌 SS-1 对许氏平鲉的半数致死浓度为 9.6×10^6 CFU/mL。

表 1 许氏平鲉两点肌肉注射感染试验结果
Tab.1 Mortality of *S. schlegelii* infected by intramuscular injection

实验分组 group	细菌浓度/(CFU/mL) bacteria concentration	实验尾数 number	注射剂量/mL injection dosage	死亡时间/d time to death	死亡数 number of death	死亡率/% mortality rate
SS-1	1.83×10^8	12	0.2	2-7	12	100
	1.83×10^7	12	0.2	3-12	12	100
	1.83×10^6	12	0.2	6-10	4	33.3
	1.83×10^5	12	0.2	–	0	0
	1.83×10^4	12	0.2	–	0	0
对照组 control	生理盐水 1.5% saline	12	0.2	–	0	0

2.3 病原菌的鉴定

病原菌 SS-1 为革兰氏阴性菌, 短杆状, 稍弯曲, 两端钝圆, 极生单鞭毛(图 2)。根据细菌形态, 以及氧化酶阳性、接触酶阳性, 硝酸盐还原阳性、吲哚产生阳性、H_2S 产生阴性, V.P 试验阳性, 鸟氨酸脱羧酶阴性、赖氨酸脱羧酶阴性、精氨酸双水解酶阳性, 利用葡萄糖、甘露糖、海藻糖和蔗糖产酸等特征(表 2), 参考《伯杰氏细菌鉴定手册》[10](第九版)和有关文献[11-12], 判断该菌株的生理生化特征与鳗利斯顿氏菌相符。

2.4 菌株 SS-1 的 16S rRNA 基因序列同源性分析及系统发育树构建

菌株 SS-1 的 16S rDNA 经过 PCR 扩增后, 目的片段大小大约 1500 bp。序列测定后得到扩增的 16S rRNA 的基因序列长度为 1490 bp(GenBank 登录号为 JQ904785)。将测序结果在 GenBank 中进行 Blast 比对分析发现, 该菌株与鳗利斯顿氏菌同源性最高, 达到 99%。将菌株 SS-1 的 16S rRNA 基因序

图 2 菌株 SS-1 的透射电镜照片(标尺为 200nm)
Fig. 2 Electronic microphotograph of the bacterial strain SS-1(bar=200nm)

表 2　菌株 SS-1 生理生化特征

Tab. 2　Physiological and biochemical characteristics of the bacterial strain SS-1

检测项目 items	SS-1	鳗利斯顿氏菌[10] *L. anguillarum*	检测项目 items	SS-1	鳗利斯顿氏菌[10] *L. anguillarum*
革兰氏染色 gram stain	–	–	柠檬酸盐利用 citrate utilization	–	–
鞭毛染色 flagella	m	m	淀粉酶 amylase	+	+
运动性 motility	+	+	脂酶 lipase	+	+
色素产生 pigmentation	–	–	明胶酶 gelatinase	+	+
O/129/(10 μg) O/129(10 μg)	S	S	脲酶 urease	–	–
O/129/(150 μg) O/129(150 μg)	S	S	葡萄糖苷酸酶 glucoronidase	–	–
TCBS 生长 growth on TCBS	+	+	鸟氨酸脱酸酶 ornithine decarboxylase	–	–
0% NaCl 生长 growth on 0% NaCl	–	+	精氨酸双水解酶 arginine digydrolase	+	+
1% NaCl 生长 growth on 1% NaCl	+	+	赖氨酸脱羧酶 lysine decarboxylase	–	–
3% NaCl 生长 growth on 3% NaCl	+	+	甘露醇 mannitol	+	+
6% NaCl 生长 growth on 6% NaCl	–		甘露糖 mannose	+	+
4 ℃生长 growth on 4 ℃	–	–	麦芽糖 maltose	+	+
28 ℃生长 growth on 28 ℃	+	+	蔗糖 sucrose	+	+
37 ℃生长 growth on 37 ℃	+	+	古老糖 palatinose	–	
42 ℃生长 growth on 42 ℃	–	–	侧金盏花醇 adonitol	–	
氧化酶 oxidase	+	+	乳糖 lactose	–	–
接触酶 catalase	+	+	海藻糖 trehalose	+	+
O-F 试验 O-F test	F	F	鼠李糖 rhamnose	–	–
硝酸盐还原 nitrate reduction	+	+	肌醇 inositol	–	–
吲哚产生 indole production	+	+	纤维二糖 cellobise	+	
V-P 试验 V-P test	+	d	阿拉伯糖醇 arabinitol	–	–
M-R 试验 M-R test	+	d	D-山梨醇 D-sorbitol	+	+
H_2S 产生 H_2S production	–	-	β-半乳糖苷酶 β-galactosidase	+	+
酚红 phenol red	–		阿拉伯醇 arabitol	–	–
丙二酸盐利用 malonate utilization	+	+	阿拉伯糖 arabinose	–	–
醋酸盐利用 acetate utilization	+	+	葡萄糖产酸 acid from glucose	+	+

注: + .阳性; –.阴性; m.极生单鞭毛; S.敏感; F.发酵型; d.多于 10%的菌株为阳性或者阴性。

Notes: +. positive, -. negative, m. polar flagellum, S. sensitive, F. fermentation, d. more than 10% was positive or negative.

列与遗传距离较近的菌株 16S rRNA 基因序列构建系统发育树, 结果表明,菌株 SS-1 与鳗利斯顿氏菌(AY662308.1)聚为一支(图 3)。

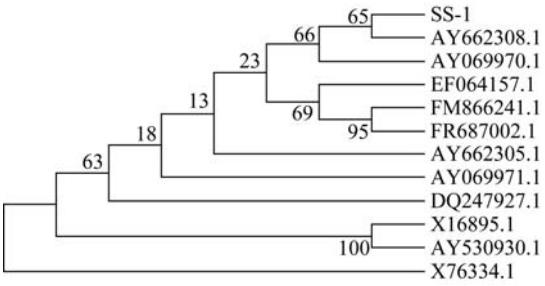

图 3　菌株 SS-1 16S rRNA 基因序列聚类分析结果

Fig. 3　16S rRNA cluster analysis based on the 16S rRNA sequence of strain SS-1

2.5　药物敏感实验结果

本实验测定了菌株 SS-1 对 25 种抗生素药物的敏感性, 结果显示该菌对复达欣、氟罗沙星、萘啶酸、新生霉素等抗生素药物高度敏感; 对庆大霉素、阿奇霉素、复方新诺明等药物中度敏感; 对青霉素、舒普深、头孢拉定、氨苄青霉素、乙酰螺旋霉素等多种药物具有抗性。

3　讨论

通过两点背部肌肉注射进行人工感染, 实验鱼出现明显的发病症状, 且与自然发病鱼的症状相似。从感染发病个体的病灶处分离得到与自然发病相同的菌株, 符合科赫法则, 由此证明菌株 SS-1 是引起许氏平鲉大量死亡的致病菌。另外对菌株

表 3 构建系统发育树的参比菌株及其数据库存取号

Tab.3 The bacterial strains for phylogenetic dendrogram constructed and their access number on GenBank

参比菌株 compared strains	数据库登录号 accession number	参比菌株 compared strains	数据库登录号 accession number
Listonella anguillarum	AY662305.1	*Listonella anguillarum*	AY662308.1
Listonella anguillarum	FM866241.1	*Listonella anguillarum*	AY530930.1
Listonella anguillarum	EF064157.1	*Listonella anguillarum*	AY069970.1
Listonella anguillarum	AY069971.1	*Vibrio vulnificus*	X76334.1
Listonella anguillarum	FR687002.1	*Listonella anguillarum*	DQ247927.1
Vibrio anguillarum	X16895.1	SS-1	JQ904785

表 4 菌株 SS-1 药敏实验结果

Tab. 4 Sensitivity of the bacterial strain SS-1 to some antibiotic medicines

药物名称 name of antibiotic	药物含量/(μg/片) contents	抑菌圈直径/(mm) sterilizing diameter	敏感度 sensitivity
青霉素 penicillin	10	7	R
菌必治 rocephin	30	30	S
红霉素 erythromycin	15	17	M
萘啶酸 nalidixie acid	30	29	S
新霉素 neomycin	30	13	R
链霉素 streptomycin	10	10	R
吡哌酸 pipemidic acid	30	20	R
复达欣 ceftazidine	30	28	S
舒普深 cefoperazone	75	9	R
头孢唑林 cefazolin	30	9	R
头孢拉定 cephradine	30	7	R
洛美沙星 lomefloxacin	18	23	S
氟罗沙星 fleroxacin	5	24	S
克拉霉素 clarithromycin	15	19	S
丁胺卡那 amikacin	30	14	R
庆大霉素 gcntamycin	10	14	M
阿奇霉素 azithromycin	15	16	M
新生霉素 novobiocin	30	31	S
卡那霉素 kanamycin	30	13	R
二甲胺四环素 minomycin	30	27	S
头孢唑肟 ceftizoximc	30	23	S
苯唑西林 oxacillin	1	7	R
氨苄青霉素 ampicillin	10	7	R
复方新诺明 cotrimoxawlc	25	29	M
乙酰螺旋霉素 acetylspiramycin	30	11	R

注: S.敏感; M.中度敏感; R.抗性。

Notes: S.sensitive; M. mid-sensitive; R.resistant.

SS-1 进行 16S rRNA 基因序列同源性分析, 结果显示与鳗利斯顿氏菌的 16S rRNA 基因序列相似度达到了 99%, 同时结合形态学和生理生化实验结果, 将此菌鉴定为鳗利斯顿氏菌(*Listonella anguillarum*)。由于病鱼的典型症状为体表充血溃疡和鳍条溃烂, 故称之为皮肤溃疡病。目前关于鳗利斯顿氏菌引起许氏平鲉发病死亡的报道在国内尚属首次。

鳗利斯顿氏菌是水产养殖环境中广泛存在的一种条件致病菌, 该菌原来被归类到弧菌属, 名为鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*), 在 1909 年首次命名[13]。1985 年, MacDonnell 等[14]把其纳入利斯顿

氏菌属(*Listonella*)。该菌能引起大多数水产养殖动物疾病, 据报道已有 40 多种水产动物能够被其感染[15]。莫照兰等[16]报道鳗弧菌可以引起牙鲆体表皮肤出血溃烂。王成义等[12]报道鳗利斯顿氏菌是引起香鱼体表出血溃烂、肛门红肿、腹部膨胀等症状的致病菌。

张晓君等[17-18]报道通过腹腔注射或肌肉注射可以引起半滑舌鳎和鲤的体表出血、腹部膨胀、腹腔腹水等症状, 但肌肉注射并未引起肌肉组织的液化腐烂。肖慧等[11,19]研究指出, 鳗弧菌可以引起鲈鱼苗创伤红肿发炎、溃烂等症状, 菌浴感染鲈鱼苗半致死浓度为 2.5×10^7 CFU/mL, 发病症状与本次人工感染许氏平鲉症状极为相似。其半致死浓度与本实验(9.6×10^6 CFU/mL)相比略高, 而明显不同是本实验低浓度组(1.83×10^5 和 1.83×10^4 组)未发生死亡。分析原因可能是与不同菌株之间的毒力不同或不同宿主对该菌的耐受力不同有关; 另外, 本次实验温度仅在 14~16 ℃范围内, 较低水温可能使细菌繁殖力和致病力不足, 以致低浓度组未发生死亡现象。

通过对细菌分离结果进行分析发现, 从体表溃疡、鳃丝、肝、脾和肾等处组织均分离得到鳗利斯顿氏菌, 说明该菌会造成许氏平鲉多种内脏和组织的感染, 这与 Olsson 等[20]报道鳗弧菌引起大菱鲆全身性感染的结果相符。

鳗利斯顿氏菌是条件致病菌, 广泛存在于养殖水体中和正常鱼体表[13], 感染途径主要包括皮肤、鳃、侧线以及肠道等[15]。当养殖环境恶化, 气温异常, 鱼体损伤, 营养不良导致鱼体抵抗力下降时, 极易感染发病。因此, 在养殖过程中应时刻注意水质变化情况, 减少运输和养殖过程中鱼体的机械损伤; 并对投喂饵料进行监控, 预防不新鲜的饵料污染养殖环境或引起鱼类疾病; 加强“以防为主, 治疗为辅, 防治结合”的防病意识, 在疾病高发期之前做好预防工作, 杜绝或减少疾病的发生。

参考文献:

[1] 李青龙, 绳秀珍, 李强. 海水网箱养殖许氏平鲉本尼登虫病的流行病学调查[J]. 齐鲁渔业, 2007, 34(9): 6–7.

[2] 绳秀珍, 邢婧, 战文斌, 等. 4 种海水鱼淋巴囊肿组织的病理特征比较[J]. 中国水产科学, 2007, 14(5): 849–855.

[3] 孟鹏, 战文斌, 绳秀珍. 从患病黑鲷分离病原菌 HV0811 的鉴定及其系统发育分析[J]. 海洋科学, 2010, 34(5): 48–54.

[4] 林春媛, 刘志伟, 王印庚, 等. 网箱养殖许氏平鲉疾病的国内外研究进展[J]. 河北渔业, 2011, 8: 50–54.

[5] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京:高等教育出版社, 1999.

[6] 安德森 D P. 鱼类免疫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1984.

[7] 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.

[8] 戴欣, 陈月琴, 周惠, 等. 海洋细菌的分子鉴定分类[J]. 中山大学学报, 2000, 39(1): 68–71.

[9] 王国良, 徐益军, 金珊. 乌鳢致病诺卡氏菌的鉴定及系统发育分析[J]. 水产学报, 2008, 32(3): 440–454.

[10] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A. Bergey’s manual of determinative bacteriology 9th Edition[M]. London: William and Wilkins, 1994.

[11] 肖慧, 李军, 王祥红, 等. 鲈鱼苗烂鳃、烂尾病病原菌的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1999, 29(1): 87–93.

[12] 王成义, 闫茂仓, 陈少波, 等. 基于 16S rRNA 和 recA 香鱼鳗利斯顿氏菌的分离鉴定[J]. 海洋通报, 2010, 29(1): 84–90.

[13] Austin B, Austin D A. Bacterial Fish Pathogens: disease in farmed and wild fish[M]. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1987.

[14] MacDonell M T, Colwell R R. Phylogeny of the Vibrionaceae, and recommendation of two new genera, *Listonella* and *Shewanella*[J].Systematic and Applied Microbiology, 1985, 6(2): 171–182.

[15] 杨少丽, 王印庚, 董树刚. 海水养殖鱼类弧菌病的研究进展[J]. 海洋水产研究, 2005, 26(4): 75–83.

[16] 莫照兰, 茅云翔, 陈师勇, 等. 一株牙鲆皮肤溃烂症病原菌的鉴定[J]. 微生物学报, 2002, 42 (3): 263–269.

[17] 张晓君, 秦国民, 阎斌伦, 等. 半滑舌鳎病原鳗利斯顿氏菌表型及分子特征研究[J]. 海洋学报, 2009, 31(5): 112–122.

[18] 张晓君, 阎斌伦, 邴旭文, 等. 鲤病原鳗利斯顿氏菌的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 淡水渔业, 2009, 35(5): 47–54.

[19] 肖慧, 唐学玺, 陈吉祥, 等. 鳗弧菌 W-1 对花鲈鱼苗致病性的初步研究[J]. 海洋科学, 2008, 32(3): 36–39.

[20] Olsson J C, Jöborn W A, Westerdahl A, *et al*. Survival, persistence and proliferation of *Vibrio anguillarum* in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*(L.), intestine and faeces[J]. Journal of Fish Diseases, 1998, 21(1): 1–9.

Isolation, identification and pathogenicity of *Listonella anguillarum* from diseased cultured *Sebastes schlegelii*

WANG Geng-shen[1, 2], WANG Yin-geng[1*], ZHANG Zheng[1], LIAO Mei-jie[1], CHEN Jun[1, 2], ZHANG Chen-cang[1], LIU Zhi-wei[3], LI De-jun[4]

(1. *Yellow Sea Fisheries Research Institute*, *Chinese Academy of Fishery Sciences*, *Qingdao* 266071, *China*;
2. *College of Fisheries and Life Sciences*, *Shanghai Ocean University*, *Shanghai* 201306, *China*;
3. *Boxing Aquatic Products Bureau of Shandong Province*, *Boxing* 256500, *China*;
4. *Jiaonan Fishery Technical Extension Centre of Shandong Province*, *Jiaonan* 266400, *China*)

Abstract: *Sebastes schlegelii* is an important economic fish cultured in North China. In recent years, *S. schlegelii* aquaculture has developed rapidly along the northern coast of China. The expansion and intensification of *S.schlegelii* farming has led to the occurrence of some diseases. In August 2011, an epizootic occurred among cultured *S.schlegelii* in a cage culture farm in Qingdao, which caused cumulative mortality rate 30%. To make certain the causative pathogen, we studied the etiology and virulence of *S. schlegelii* so as to provide basic data for the farming industry of *S. schlegelii.* In this study, we used the morphological, physiological and biochemical methods to identify the isolated bacterium. Meanwhile, to ensure the results accurately, the phylogenetic analyses were also used. A dominant bacterium strain SS-1 was isolated from the skin, gill, liver, spleen, kidney of the diseased *S. schlegelii*. Artificial infection test with intramuscular injection method proved that the median lethal concentration (LC_{50}) value of bacterium strain SS-1 in *S. schlegelii* was 9.6×10^6 CFU/mL. This bacterium could cause severe infections in several tissues and organs of the fish. The results of morphological, physiological & biochemical characteristics tests showed that strain SS-1 was gran-negative, rod bacteria, polar flagellum, and the results of oxidase, contact enzyme, nitrate reduction, producing indol, V-P test and arginine digydrolase test were positive; producing H_2S test was negative. The morphological, physiological & biochemical characteristics indicated that SS-1 could be identified as *Listonella anguillarum*. The sequence analysis of 16S rRNA gene of strain SS-1 was identical with *L. anguillarum* and the homogeneity is 99%. This paper reported for the first time that *L. anguillarum* caused the disease of *S. schlegelii* in China, which will provide reference in fish health management and disease control.

Key words: *Sebastes schlegelii*; *Listonella anguillarum*; bacterial identification; pathogenicity

Corresponding author: WANG Yin-geng. E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn