



患病异育银鲫中嗜冷黄杆菌的分离鉴定及组织病理学观察

姜虎成¹, 李润波², 赵彦华¹, 徐晓雁², 孙梦玲¹, 夏爱军^{1*}, 薛晖^{1*}

(1. 江苏省淡水水产研究所, 江苏 南京 210017;

2. 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: 为确定越冬期内江苏多地异育银鲫暴发性死亡的原因, 本研究利用高通量测序比较了健康样品和患病样品的微生物群落多样性和结构组成的差异, 分析了异育银鲫病害暴发过程中的细菌类型及特性。结果显示, 在属水平上, 患病样品中黄杆菌属丰度最高。在种水平上, 患病样品中嗜冷黄杆菌的丰度最高, 分别达到 63.01% 和 61.31%, 显著高于健康组的 1.55%。根据微生物群落特征分析结果, 从患病样品体表的病灶处分离出优势病原菌 NJ01, 通过细菌形态学、生理生化分析、16S *rDNA* 序列比对确定 NJ01 菌株为嗜冷黄杆菌。人工感染 NJ01 菌株 14 d 后, 1.7×10^6 和 1.7×10^7 CFU/mL 两组的死亡率达到 100%, 感染症状和自然发病症状一致。组织病理学观察发现, 病鱼的肌细胞坏死, 间质中充满了淋巴细胞; 肝脏中细胞溶解坏死, 细胞核消融; 在脾脏中发现脾细胞散在坏死, 伴随着充血的症状; 肾小管上皮脱落, 肾间质存在大量淋巴细胞。药物敏感实验结果显示, NJ01 菌株对头孢西叮、头孢哌酮、庆大霉素和克拉霉素等敏感。研究表明, 优势菌 NJ01 是致病菌, 可通过扰乱机体正常的免疫和代谢功能导致疾病的发生。本研究首次报道了嗜冷黄杆菌在异育银鲫中的致病性, 这将为大宗淡水鱼“越冬综合征”的药物防治及其致病机理研究提供参考依据。

关键词: 异育银鲫; 嗜冷黄杆菌; 扩增子分析; 分离鉴定; 致病性; 耐药性

中图分类号: S 941.42

文献标志码: A

嗜冷黄杆菌 (*Flavobacterium psychrophilum*) 隶属于拟杆菌门 (Bacteroidetes) 黄杆菌属 (*Flavobacterium*), 是一种细长杆状且滑动运动的革兰氏阴性菌^[1]。作为一种低温致病菌, 最先从银鲑 (*Oncorhynchus kisutch*) 病灶中分离^[2]。嗜冷黄杆菌在 4~23 °C 下培养可增殖, 15~18 °C 为最适生长温度^[3]。嗜冷黄杆菌可产生包含溶血素和胞外蛋白酶的外毒素, 损害宿主组织^[4]。病鱼在感染初期通常出现体表发黑、游动缓慢等症状。中期停止摄食、漂浮于水面并在鳞片脱落处出现溃烂。后

期出现出血和肌肉腐烂等症状, 最终彻底死亡^[4]。目前, 嗜冷黄杆菌除了引起鲑科 (*Salmonidae*) 鱼类患病之外, 亦可以感染欧洲鳗鲡 (*Anguilla anguilla*)、香鱼 (*Plecoglossus altivelis*)、鲤 (*Cyprinus carpio*) 等^[5]。

异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 是我国重要的淡水经济鱼类, 在养殖过程中受到嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)^[6]、维氏气单胞菌 (*A. veronii*)^[7]、副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)^[8] 和腐败希瓦氏菌 (*Shewanella putrefaciens*)^[9] 等多种

收稿日期: 2023-09-13 修回日期: 2024-01-15

资助项目: 江苏省农业科技自主创新资金 [CX(23)1007]; 国家现代农业产业技术体系专项 (CARS-45)

第一作者: 姜虎成 (照片), 从事水产动物疫病防控与健康养殖研究, E-mail: hcjiang@163.com

通信作者: 夏爱军, 从事绿色养殖和遗传育种研究, E-mail: xia1966@citiz.net;

薛晖, 从事水产动物疫病防控研究, E-mail: jsxuehui@163.com



致病菌的危害。目前, 有关嗜冷黄杆菌的研究还未见报道。

病原菌的常规检测方法主要依赖于细菌培养、纯化和鉴定等^[10], 但检测方法周期长、操作繁琐, 且在现有条件下 99% 以上的微生物都无法进行培养^[11]。近年来, 高通量技术因其不依赖于培养技术和检测准确等优点在微生物检测和鉴定中得到了广泛的应用^[12]。16S *rRNA* 测序通过对细菌的高变区测定, 可以获得样品中细菌的组成和丰度, 逐渐被应用到样品中未知病原菌的筛选工作中^[13]。

自 2019 年春季开始, 大宗淡水鱼“越冬综合征”的新发疫病在江苏省大宗鱼养殖区密集性暴发。该病发生时间为 2—4 月下旬, 水温为 8~16 °C, 导致草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、鲤、鲫等多个品种的大规模死亡。2023 年 2 月, 实验从江苏浦口、江都两地发病池塘随机挑选病鱼进行研究, 利用 16S *rRNA* 测序技术对健康和患病样品的微生物多样性和结构组成差异进行判断, 根据微生物群落分析结果, 从患病样品体表的病灶处分离出优势病原菌。结合分子鉴定及理化特性分析, 探析此次异育银鲫暴发性死亡的关键病原菌的类型及特性。本研究是国内首次从异育银鲫体内分离出嗜冷黄杆菌, 这将为大宗淡水鱼“越冬综合征”的药物防治及其致病机理研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

患病异育银鲫来源于江苏浦口和江都的养殖场, 分别命名为 PL 和 JL。健康异育银鲫取自江都养殖场未发病池塘, 并命名为 LC。回感实验使用的异育银鲫来源于江苏省淡水水产研究所扬中基地, 随机挑选健康鱼 60 尾, 实验室暂养 2 周。本研究获得了江苏省淡水水产研究所实验动物管理和使用伦理委员会批准, 实验过程中操作人员严格遵守《中国实验动物管理条例》伦理规范, 并按照江苏省淡水水产研究所伦理委员会制定的规章制度执行。

TYES 培养基购自上海科玛嘉微生物技术有限公司, 革兰氏染色用试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司, 细菌生化微量鉴定管购自青岛海博生物技术有限公司, PCR 相关试剂购自宝生物工程(大连)有限公司, 实验用引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。药敏分析试剂购自杭州滨

河微生物试剂有限公司。

1.2 肝脏中细菌 16S *rRNA* 测序

肝脏在鱼类的代谢和免疫中发挥重要作用。嗜水气单胞菌、弧菌和链球菌等^[14-16] 常见致病菌可以通过血液循环等途径侵袭肝脏部位, 通过比较患病和健康异育银鲫肝脏中微生物组成, 可以高效地筛选出潜在的致病菌。本实验选取患病濒死异育银鲫的肝脏组织 0.2 g, 重复 3 次, 液氮速冻后寄送贝纳科技有限公司(武汉)进行测序。使用细菌 DNA 提取试剂盒提取微生物 DNA, 纯化并扩增, 上机测序 24~48 h 后通过 GUPPY (5.0.16) 进行 base calling 和 barcode 识别, 通过去除接头序列、序列质量过滤和引物序列识别 3 个步骤后获得 clean 序列。使用 LAST 软件将序列与 Silva (Release 138) 数据库比对构建特征表, 最终使用 QIIME2 (version 2022.3) 软件^[17] 过滤低丰度特征并以最小序列条数抽平。针对测序结果, 对病原菌进行初步的预测和分离培养。

1.3 菌株的分离纯化

在无菌条件下, 对病鱼体表病灶、肝脏细菌进行分离。结合 16S *rRNA* 测序结果, 初步判断致病菌为嗜冷黄杆菌, 将其接种于 TYES 平板上, 培养温度设定在 15 °C, 培养 72~96 h。挑选平板上具有生长优势的单菌落继续划线 3 次获得单一菌落, 测序验证后保存在 -80 °C 冰箱。

1.4 菌株形态观察

按照常规方法将菌株接种到 TYSE 液体培养基中, 15 °C 恒温培养, 4 d 后在显微镜下观察菌落形态结构。

对细菌进行革兰氏染色。首先将菌液稀释到载玻片上, 过火焰 1~2 次固定。滴加结晶紫染色液染色 1 min 后水洗。滴加碘液后染色 1 min, 水洗。滴加脱色剂 20 s 后水洗。滴加番红染色剂 1 min 后水洗。晾干后用油镜观察细菌形态特征及染色特性。

将菌液在 4 °C, 12 000 r/min 下离心 2 min, 使其沉淀在底部, 吸干多余液体后, 加入电镜固定液吹打均匀, 送至赛维尔生物科技(南京)有限公司, 使用扫描电镜观察细菌超微形态。

1.5 菌株的理化特性

参考嗜冷黄杆菌已有文献并结合《常用细菌

系统鉴定手册》中的方法^[18], 对病原菌、产生的酶类和水解活性等理化特性进行鉴定。使用接种针挑选已经分离纯化的同一菌落接种于生化试管中, 并按照说明置于 15 °C 的细菌培养箱中培养 24~72 d。结束后通过观察颜色和状态变化, 判断结果阴性或阳性。

1.6 16S *rRNA* 序列扩增

接种纯化后的菌液于液体培养基中, 15 °C 振荡培养 4 d, 取菌液 2 mL, 提取病原菌 DNA 并使用细菌 16S *rRNA* 通用引物 (27F: 5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAG-3', 1492R: 5'-TACGGCTAC CTTGTTACGAC -3') 进行 PCR 扩增。PCR 体系为 50 μ L: 模板 1 μ L, 引物 27F/1492R (10 μ mol/L) 各 2 μ L, 2 \times Taq Plus PCR Master Mix 25 μ L, ddH₂O 20 μ L。PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 90 s, 循环扩增 35 次, 72 °C 延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳检测, 并将 PCR 产物送通用生物 (安徽) 股份有限公司测序。PCR 产物经过测序后, 通过 NCBI 中的 Nucleotide blast 进行序列同源性分析, 并使用 MEGA 11 软件^[19] 构建系统发育树。

1.7 回感实验

将菌液加入 0.9% 无菌生理盐水中配制成细菌悬液, 浓度分别 1.7 $\times 10^7$ 、1.7 $\times 10^6$ 、1.7 $\times 10^5$ 和 1.7 $\times 10^4$ CFU/mL。实验鱼随机分为 5 组, 每组 10 尾。4 个感染组分别在尾柄处肌肉注射 200 μ L 菌液, 对照组注射等体积浓度为 0.9% 的生理盐水。暂养于 180 L 的塑料水箱, 实验期间水温维持在 (10 \pm 1) °C, 自然光照。连续观察 14 d, 每天记录异育银鲫的发病症状, 并记录死亡数量, 濒死实验鱼及时剖检和分离病原菌。

1.8 组织病理观察

分别取对照组和 1.7 $\times 10^7$ CFU/mL 感染组异育银鲫的体表病灶、肝脏、脾脏和中肾组织进行苏木精伊红 (H.E) 染色, 观察组织病理变化情况。用 4% 多聚甲醛固定后, 经包埋、切片、脱蜡、染色、分化、返蓝、复染、脱水、透明、封片处理后, 使用尼康 EclipseCi-E100 显微镜观察和 DS-U3 拍照。

1.9 药物敏感性分析

药物敏感性测定采用纸片扩散法, 选取 20 种

常用抗菌药物。将嗜冷黄杆菌接种于 TYES 液体培养基中, 15 °C, 150 r/min 振荡培养 4 d。扩培的菌液在 4 °C, 12 000 r/min 的条件下离心 2 min, 收集菌液沉淀后用无菌生理盐水将菌液浓度调至 1 $\times 10^7$ CFU/mL, 吸取 30 μ L 菌液均匀涂布在 TYES 固体培养基上, 用镊子夹取药敏纸片贴于培养基表面, 将温度调至嗜冷黄杆菌的生长范围内, 15 °C 恒温培养 72 h, 培养后取出平板, 使用游标卡尺测量抑菌圈直径, 按照判定标准判定。

2 结果

2.1 典型症状

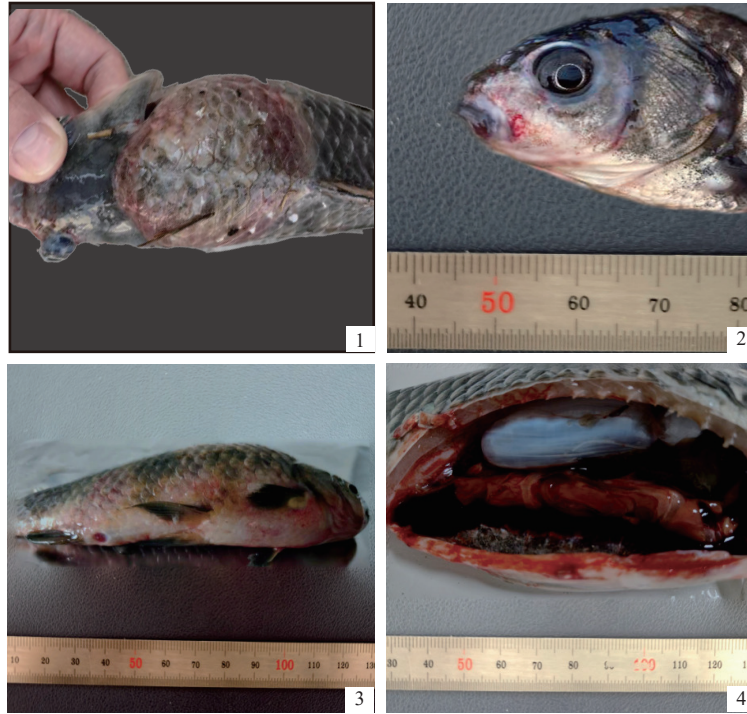
2023 年 2 月, 江苏浦口和江都养殖池塘出现异育银鲫暴发性死亡。发病池塘水温为 (10 \pm 1) °C, pH 值为 7.5 \pm 0.2。病鱼个体差异大, 体重为 50~500 g。病症表现为上浮, 身体摇摆, 体表出血, 严重者在尾部和背部出现环状糜烂且眼球突出 (图版 I-1)、嘴巴溃烂 (图版 I-2)、部分病鱼伴随肛门红肿 (图版 I-3)。解剖后可观察到腹部内有大量腹水, 肠道弹性差、肠壁薄、很容易被扯断 (图版 I-4)。

2.2 16S *rRNA* 测序

对患病样品和健康样品进行 16S *rRNA* 测序后, 共获得了 1 066 276 条序列, 每个样品产生 88 389 条序列, 平均产生 118 475 条序列。9 个样品的平均序列长度为 1 282~1 416 bp, 碱基质量评分 (phred score) 为 20.30~20.42 (表 1)。

通过对病鱼肝脏微生物 16S *rRNA* 测序, 发现在不同的种属水平上存在显著差异 ($P < 0.05$)。在属水平上, 黄杆菌在病鱼肝脏中丰度最高 (图 1-a)。在种水平上, 病鱼中嗜冷黄杆菌的丰度约 60%, 而健康鱼的肝脏中嗜冷黄杆菌的丰度却很低 (图 1-b)。

在属和种水平上分别挑选了两种重要的菌, 并对丰度进行比较 (图 2)。在属水平上, JL 和 PL 两组的肝脏中黄杆菌属和鲸杆菌属的丰度没有显著差异, 但与健康组肝脏中的丰度存在显著差异 ($P < 0.05$, 图 2-a, b)。在种水平上, LC 组肝脏中嗜冷黄杆菌和索氏鲸杆菌的丰度与 JL 和 PL 两组患病鱼的肝脏微生物丰度呈现显著差异。嗜冷黄杆菌在 JL 和 PL 两组中的相对丰度分别为 63.01% 和 61.31%, 显著高于健康组 LC 的 1.55%, 这与属水平的结果一致 ($P < 0.05$, 图 2-c, d)。



图版 I 自然发病异育银鲫临床症状

1. 环状糜烂且眼球突出; 2. 嘴角溃烂; 3. 出血且肛门红肿; 4. 腹水且肠道透明失去弹性。

Plate I Clinical signs of diseased *C. auratus gibelio*

1. annular erosion and exophthalmos; 2. angular cheilitis; 3. bleeding and genital swelling; 4. ascites and loss of intestinal elasticity.

表 1 测序数据信息

样品名 sample	原始读长 raw reads	过滤后读长 clean reads	平均序列长度/bp mean_len	平均质量值 mean_Q
JL01	88 389	68 556	1 400	20.30
JL02	106 376	90 959	1 405	20.33
JL03	114 527	91 345	1 406	20.31
LC01	116 484	74 390	1 282	20.42
LC02	107 380	61 919	1 335	20.41
LC03	161 197	82 062	1 342	20.42
PL01	114 474	93 999	1 416	20.42
PL02	157 454	121 673	1 396	20.35
PL03	99 995	73 850	1 397	20.33

2.3 菌株分离纯化及形态观察

从自然发病异育银鲫的体表病灶处分离纯化出 1 株优势菌, 命名编号为 NJ01。分离的初代菌株在普通琼脂培养基上生长缓慢, 在 TYES 平板上生长良好, 形成圆形、隆起、光滑黏稠的黄色菌落 (图版 II -1)。在培养液中静置后, 在底部形成黄色沉淀 (图版 II -4)。革兰氏染色后显示为红色, 鉴定为革兰氏阴性菌 (图版 II -2, 3)。扫描电

<https://www.china-fishery.cn>

镜下观察可见细菌呈现两端钝圆, 长杆状形态, 无鞭毛 (图版 II -5, 6)。这些与嗜冷黄杆菌的外观及形态特征一致。

2.4 分离菌株的生理生化鉴定

分离的菌株能够滑动运动, 可以产生黄色素, 过氧化酶和氧化酶呈阳性, 能水解明胶和酪氨酸。不能利用葡萄糖、果糖、阿拉伯糖、半乳糖、七叶苷、水杨苷, 不能水解淀粉, 不能氧化发酵, 不能还原硝酸盐, 不能产生硫化氢, M.R 实验、V-P 实验、吲哚实验呈阴性, 不能在 40 °C 条件下生长 (表 2)。这与嗜冷黄杆菌报道的鉴定方法标准相一致^[3], 菌株 NJ01 具备嗜冷黄杆菌的基本生化特征。

2.5 16S rRNA 序列比对

利用细菌通用引物进行 16S rRNA 的扩增, 获得 1 500 bp 的片段, 经测 Blastn 在线比对, 发现菌株 NJ01 的 16S rRNA 序列与 NCBI 数据库的嗜冷黄杆菌 (GenBank 登录号: NR_040914.1) 的 16S rRNA 序列同源性为 98.67%。基于 16S rDNA 序列构建菌株 NJ01 的系统发育树。可知菌株

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

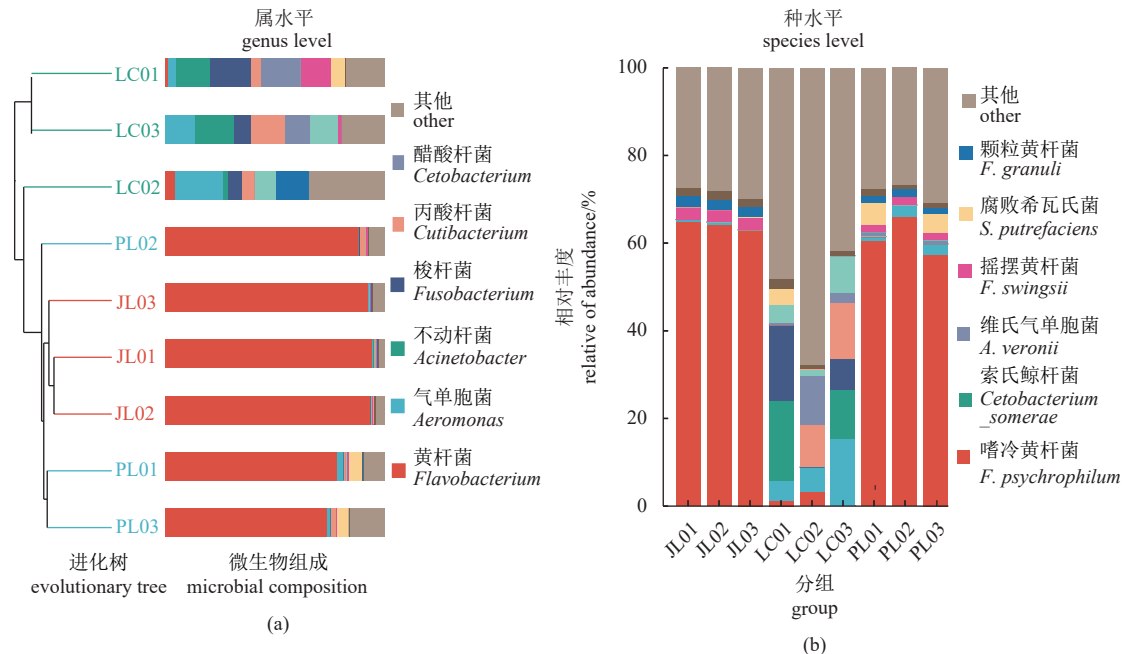


图1 肝脏微生物组成与丰度

(a) 进化树及属水平微生物组成; (b) 种水平微生物组成。JL.江都样品, PL.浦口样品, LC.对照样品, 下同。

Fig. 1 Composition and abundance of liver microorganisms

(a) the composition of evolutionary trees and genus-level microorganisms; (b) species-level microbial composition. JL. Jiangdu sample, PL. Pukou sample, LC. control sample, the same below.

NJ01 与嗜冷黄杆菌聚为一支 (图 3), 表明分离到的菌株为嗜冷黄杆菌。

综上所述, 结合分离菌株的形态特征、生理生化特征、16S *rRNA* 序列测定与系统发育树, 可以判定分离到的 NJ01 株为嗜冷黄杆菌。

2.6 复感实验致病性及病理组织观察

回归感染研究发现, 对照组在 14 d 内体征良好, 无死亡。不同浓度的感染组均出现死亡现象, 复现了不同程度的病症。病鱼体表发黑并出现疥疮, 腹腔解剖后, 观察到肝脏糜烂、肠道弹性差, 与养殖池塘中的病鱼症状一致。此外, 从感染组病鱼病灶处再次分离出了嗜冷黄杆菌。4 个浓度感染组中, 1.7×10^7 CFU/mL 组致死率最高, 在 2 d 时就开始出现死亡, 7 d 时实验鱼全部死亡。 1.7×10^6 CFU/mL 组在 8 d 的死亡量最大, 9 d 时实验组鱼全部死亡。 1.7×10^5 CFU/mL 组和 1.7×10^4 CFU/mL 组分别在 7 和 8 d 时才开始出现死亡, 在 14 d 时仍有实验鱼存活 (图 4)。

2.7 组织病理学观察

选取 1.7×10^7 CFU/mL 组出现明显病症的异育银鲫进行组织病理学观察, 发现肌肉、肝脏、脾

脏和中肾出现了严重的损伤。对照组肌纤维整齐, 细胞间无炎症细胞 (图版 III-1); 感染组病灶处肌肉出现纤维萎缩, 肌浆溶解呈现蜂窝状, 同时伴有淋巴细胞的浸润 (图版 III-2)。对照组肝细胞呈椭圆形且排列紧密, 细胞核清晰, 大小一致且位于细胞一侧 (图版 III-3); 感染组大部分肝细胞核消失, 部分细胞溶解, 细胞与细胞间的边界模糊不清 (图版 III-4)。对照组脾脏中淋巴细胞与红细胞形态清晰, 脾细胞结构完整 (图版 III-5); 感染组脾细胞分散坏死, 间质中红细胞增多, 出现充血 (图版 III-6)。对照组肾小球和肾小管结构正常 (图版 III-7); 感染组肾小管上皮脱落, 肾间质中有炎症因子浸润 (图版 III-8)。

2.8 菌株对常见抗生素的敏感程度

菌株 NJ01 对 9 类 20 种常用抗生素的敏感性实验结果显示, 其对青霉素 G、氨苄西林、头孢西叮、头孢哌酮、庆大霉素、克拉霉素、诺氟沙星、氧氟沙星、复古新诺明和链霉素敏感。对头孢噻吩、头孢呋辛、头孢他啶、头孢吡肟、氨曲南、妥布霉素和多黏菌素 B 耐药。对红霉素中度耐药 (表 3)。

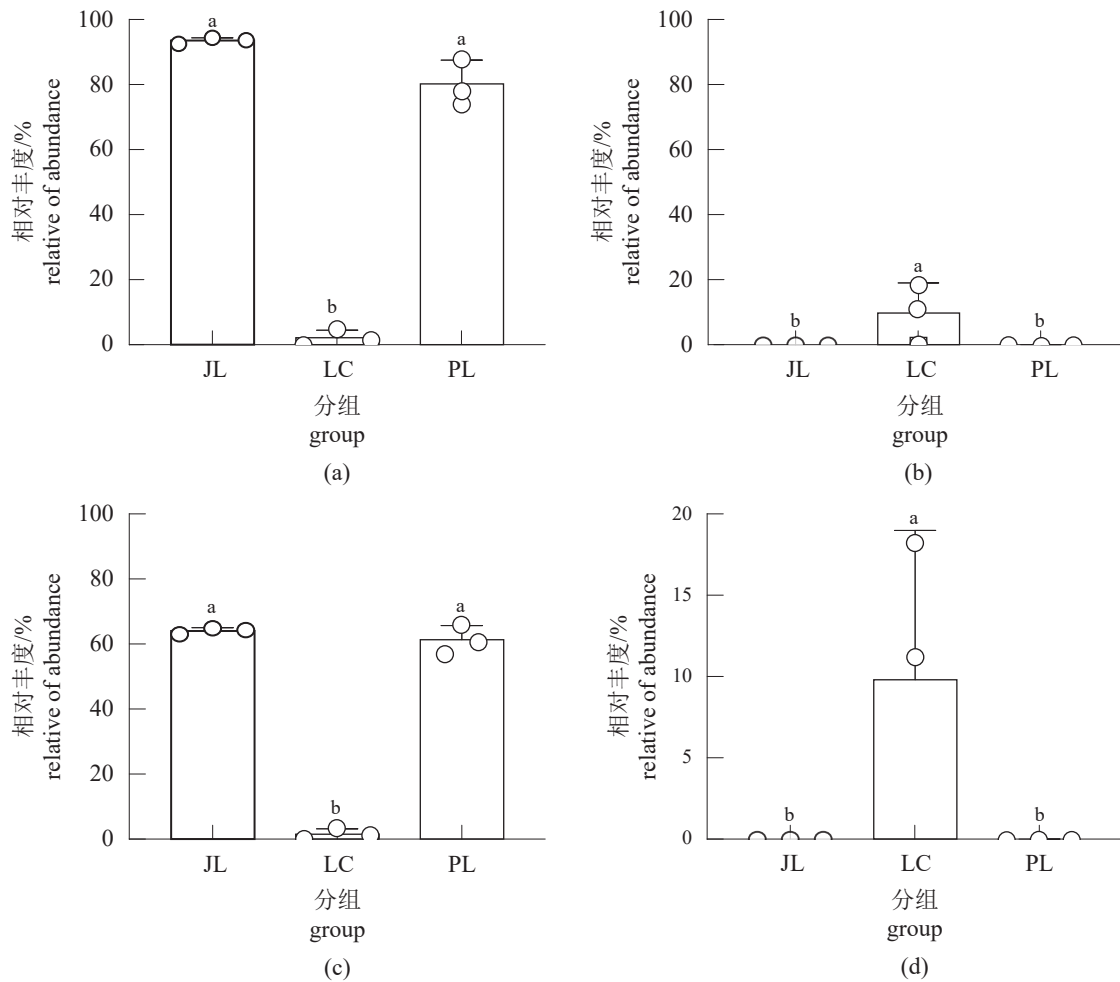


图2 不同水平上微生物的相对丰度

(a) 黄杆菌属, (b) 鲸杆菌属, (c) 嗜冷黄杆菌, (d) 索氏鲸杆菌。不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 2 Relative abundance of microorganisms at different levels

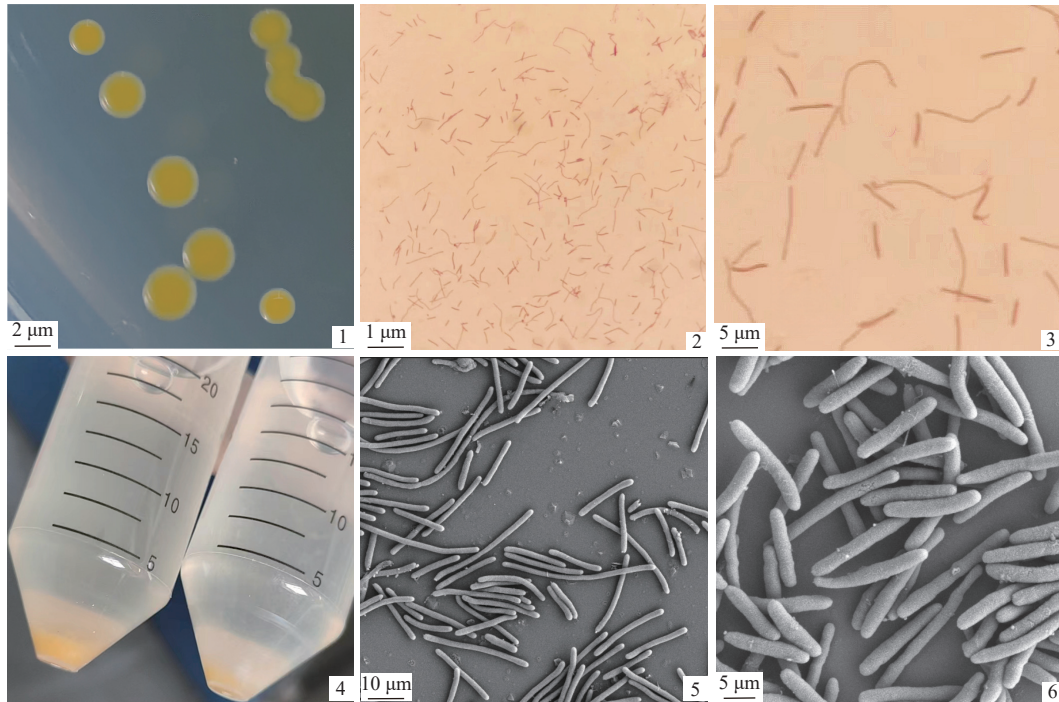
(a) *Flavobacterium*, (b) *Cetobacterium*, (c) *F. psychrophilum*, (d) *C. somerae*. Different letters represent significant differences ($P < 0.05$).

3 讨论

3.1 嗜冷黄杆菌的研究进展

嗜冷黄杆菌首先在鲑鳟鱼类中分离出, 当水温在 10~15 °C 时会导致严重的鱼类疾病暴发, 因此又被称为细菌性冷水病 (bacterial cold water disease, BCWD) [20]。随着冷水鱼类养殖业的发展, 该菌在地理分布上逐步扩大。先前主要在欧洲、南美洲和亚洲部分地区报道 [21-22], 近年来, 在我国甘肃省、辽宁省和青海省等地发现并分离出来 [4]。嗜冷黄杆菌传染能力极强, 不仅可以水平传播, 也能垂直传播 [23-24], 使得感染宿主的范围更广。嗜冷黄杆菌不仅可以感染鲑鳟鱼类, 还可以感染鲤科鱼类。作为一种低温致病菌, 嗜冷黄杆菌的培养条件较为特殊, 相关的研究报道也较少。国

外学者对嗜冷黄杆菌的研究多集中在鲑鳟鱼类上 [25]。近年来, 国内学者也报道了有关鲑鳟鱼来源嗜冷黄杆菌的分离与鉴定研究。柴静茹等 [3] 首先从患病虹鳟 (*O. mykiss*) 溃烂病灶处分离出了嗜冷黄杆菌 CH06, 对其生物学特性进行了研究。陈福广等 [26] 对嗜冷黄杆菌 CH06 进行了基因组进化及毒力基因的分析, 系统发育进化树显示 CH06 菌株与美国 CSF259-93 株和加拿大 FPG101 株的亲缘关系较近, 且 CH06 菌株中存在 I 型分泌系统 (type I secretion system, T1SS) 和 IX 型分泌系统 (type IX secretion system, T9SS)。刘媛媛等 [27] 对中国青海省和东北地区分离的 7 种不同来源的嗜冷黄杆菌进行了药物敏感性分析。这些都推动了我国鱼类来源嗜冷黄杆菌研究的进展。然而, 在大宗淡水鱼类中还未见嗜冷黄杆菌分离鉴定的相



图版 II 菌株 NJ01 的形态观察

1. 菌落形态; 2-3. 革兰氏染色观察; 4. 液体培养基沉淀; 5-6. 扫描电镜观察。

Plate II Morphological observation of NJ01

1. colony morphology; 2-3. gram staining inspection; 4. liquid medium precipitation; 5-6. scanning electron microscopy inspection.

表 2 菌株 NJ01 的生理生化指标

Tab. 2 Physiological and biochemical characteristics of NJ01

生化项目 characteristic	菌株NJ01 NJ01 isolate	嗜冷黄杆菌 <i>F. psychrophilum</i>
滑动运动 gliding motility	+	+
黄色素 flexirubin-like pigments	+	+
40 °C生长 growth at 40 °C	-	-
葡萄糖 gluzyme	-	-
果糖 fructose	-	-
阿拉伯糖 L-arabinose	-	-
半乳糖 galactose	-	-
七叶苷 esculin	-	-
水杨苷 salicin	-	-
葡萄糖氧化发酵 O/F	-	-
淀粉水解 starch hydrolysis	-	-
酪蛋白水解 casein hydrolysis	+	+
明胶水解 gelatin hydrolysis	+	+
氧化酶 oxidase	+	+
过氧化氢酶 catalase	+	+
硝酸盐还原 nitrate reduction	-	-
硫化氢生成 H ₂ S production	-	-
M.R实验 M.R test	-	-
V-P实验 V-P test	-	-
吲哚 indole	-	-

注：“+”表示阳性，“-”表示阴性。

Notes: “+” means positive reaction, “-” means negative reaction.

关报道。因此, 开展异育银鲫嗜冷黄杆菌的相关研究对越冬期内大宗淡水鱼暴发性死亡的防治具有重要的意义。

3.2 嗜冷黄杆菌的分离鉴定

致病菌的鉴定对病害的防治至关重要。传统的细菌鉴定方法需要严格的培养条件且无法对未知致病菌进行有效筛选。16S *rRNA* 测序弥补了这些缺点, 并且可以对传统鉴定结果进行有效的检验^[28]。16S *rRNA* 测序最初用于研究环境和生物样本中的微生物群落多样性, 近些年来, 逐步在人类和动物疾病诊断中发挥重要作用^[29]。Watanabe 等^[30]利用 16S *rRNA* 测序筛选出了脓血症的潜在致病菌。Xia 等^[31]通过 16S *rRNA* 测序发现链球菌和假单胞菌等 7 类与肺炎相关的细菌。在动物疾病诊断中, Usui 等^[32]发现牛乳腺炎的几种致病菌, 主要包括大肠杆菌和链球菌。针对水产养殖中暴发的病害, 16S *rRNA* 测序将在致病菌的鉴定中发挥重要作用。

根据测序结果, 挑选嗜冷黄杆菌和索氏鲸杆菌这 2 种重要的细菌, 从属和种水平上进行了丰度的比较。在属水平上, 鲸杆菌属的丰度在健康

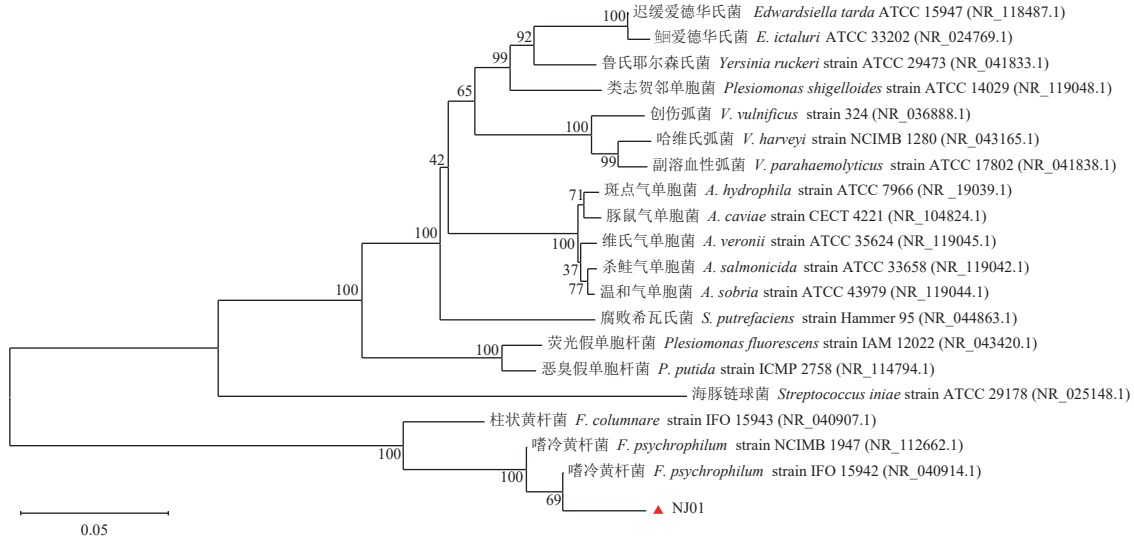


图3 基于16S rRNA序列构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis based on 16S rRNA sequences

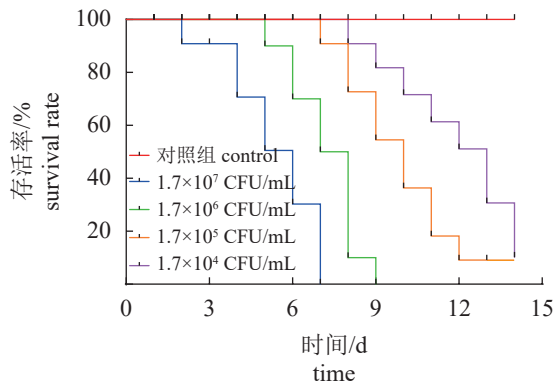


图4 人工感染实验结果

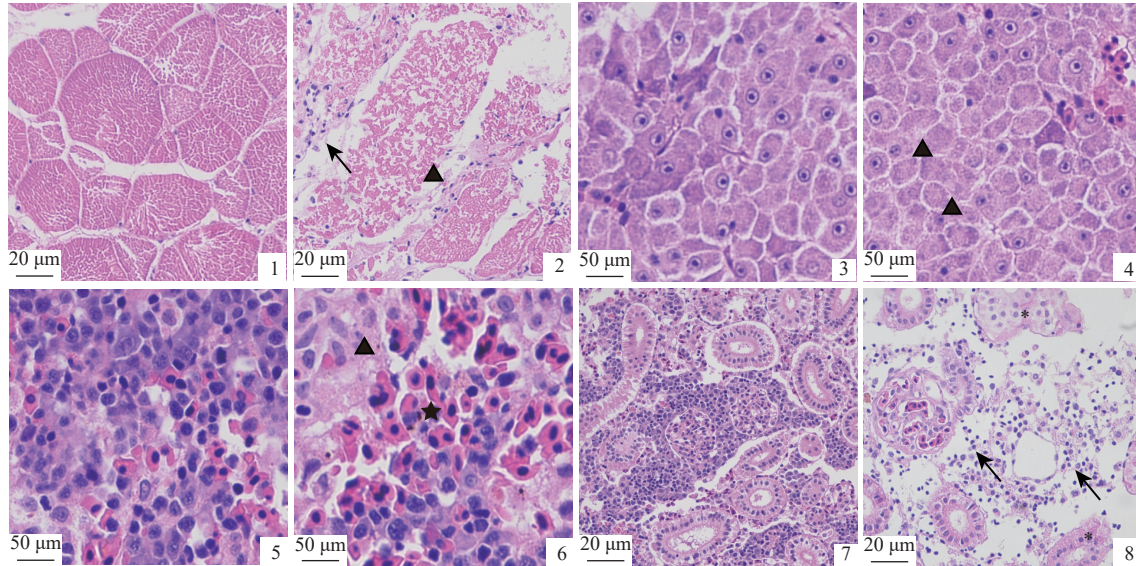
Fig. 4 Results of the artificial infection experiment

组(LC)中显著高于患病组(JL和PL)。鲸杆菌属是鱼类肠道中一种消化糖类和蛋白质的重要菌群^[33]。研究表明,肝脏和肠道的菌群可以通过体循环相互传递^[34]。本实验中,患病组肝脏中索氏鲸杆菌的丰度显著下降,推测患病异育银鲫对营养物质的消化吸收出现了问题。在水产养殖中,黄杆菌属中的常见致病菌有柱状黄杆菌^[35]和嗜冷黄杆菌。柱状黄杆菌的适宜生长温度为15~35℃^[36],这与江苏地区越冬期内越冬综合征暴发的水温(10℃)存在差异。同时,16S rRNA测序结果显示,嗜冷黄杆菌在患病组肝脏中的丰度均在60%以上,因此,初步判断此次暴发性死亡的关键致病菌为嗜冷黄杆菌。结合参考文献中该菌的生长特性,选择TYES培养基进行培养,通过形态观察、理化指标和16S rRNA测定,均与嗜冷

黄杆菌的生物学特征一致。

3.3 嗜冷黄杆菌的致病性

嗜冷黄杆菌是一种条件致病菌,越冬期内鱼类的体质虚弱、免疫力低下,更易被水体中的病原微生物侵袭。结合冬末春初的水温,人工复感的温度设定在(10±1)℃,这与该菌自然暴发时的水温一致^[37]。人工复感方法有浸泡、腹腔注射和肌肉注射,不同的感染方式对实验可重复性和结果有着重要的影响。浸泡可以模拟自然条件下鱼类的感染情况,但是其作用时间长,感染效果差,可重复性低。Decostere等^[38]使用嗜冷黄杆菌浸泡虹鳟,未发现虹鳟表现出临床症状和死亡。腹腔注射可以使细菌直接接触内脏器官,细菌在体内快速繁殖,但是感染效率受细菌的毒力作用机制影响较大。Fredriksen等^[39]使用浓度为5.0×10⁷ CFU/mL的嗜冷黄杆菌腹腔注射虹鳟,感染效果差且并未发现死亡情况。弹性蛋白是上皮组织中弹性纤维的主要成分,主要存在于鱼类体表中。嗜冷黄杆菌可以分泌弹性蛋白酶水解鱼类体表中的弹性蛋白,进而通过体表和肌肉侵袭到鱼体内^[40]。柴静茹等^[41]通过肌肉注射虹鳟后,发现体表出现了明显的症状。综上所述,肌肉注射嗜冷黄杆菌可以更快更好地感染异育银鲫。因此,本实验采用肌肉注射的方式对健康异育银鲫进行回感。为了探究嗜冷黄杆菌对不同组织的影响,选取免疫器官(脾脏和肝脏)、代谢器官(中肾)和病灶肌肉进行了病理观察。Starliper^[5]观察了嗜冷黄杆菌侵袭虹鳟后的肌肉组织,发现了肌细胞固缩、



图版 III 人工回感异育银鲫的组织病理学观察

1. 健康鱼肌肉组织; 2. 患病鱼肌肉组织, 有淋巴细胞浸润(箭头), 肌浆溶解呈蜂窝状(三角形); 3. 健康鱼肝脏组织; 4. 患病鱼肝脏组织, 肝细胞核消失(三角形); 5. 健康鱼脾脏组织; 6. 患病鱼脾脏组织, 脾细胞散在坏死(三角形), 伴有充血症状(五角星); 7. 健康鱼中肾组织; 8. 患病鱼中肾组织, 肾间质中有淋巴细胞浸润(箭头), 肾小管上皮脱落(*).

Plate III Histopathological observation of infected *C. auratus gibelio*

1. muscle of healthy *C. auratus gibelio*; 2. muscle of diseased *C. auratus gibelio*, lymphocyte infiltration (arrow) and sarcolysis honeycomb (triangle); 3. liver of healthy *C. auratus gibelio*; 4. liver of diseased *C. auratus gibelio*, disappearance of hepatocyte nucleus (triangle); 5. spleen of healthy *C. auratus gibelio*; 6. spleen of diseased *C. auratus gibelio*, splenocytes scattered necrotic (triangular), accompanied by hyperemia (pentagram); 7. middle kidney of healthy *C. auratus gibelio*; 8. middle kidney of diseased *C. auratus gibelio*, lymphocyte infiltration in the renal interstitium (arrow) and exfoliation of renal tubular epithelium (*).

表 3 病原菌对常用抗生素敏感度实验

Tab. 3 Sensitivity test of pathogenic bacteria to common antibiotics

药物分类 classification of antibiotics	抗菌药物 antibiotics	药物剂量/ μg dose of antibiotics	敏感度 sensitivity
青霉素类 penicillin class	青霉素G penicillin G	10	26(S)
	氨苄西林 ampicillin	10	20(S)
头孢菌素类 cephalosporins	头孢噻吩 cefotaxime	30	0(R)
	头孢唑林 cefazolin	30	12(R)
	头孢呋辛 cefuroxime	30	0(R)
	头孢西丁 cefoxitin	30	18(S)
	头孢他啶 ceftazidime	30	0(R)
	头孢哌酮 cefoperazone	75	24(S)
	头孢吡肟 cefepime	30	0(R)
单环 β -内酰胺类 monocyclic β -lactam	氨曲南 aztreonam	30	0(R)
氨基糖苷类 aminoglycosides	妥布霉素 tobramycin	10	0(R)
	庆大霉素 gentamicin	10	21(S)
大环内酯类 macrolides	克拉霉素 clarithromycin	15	21(S)
	红霉素 erythromycin	15	16(I)
多肽类 polypeptides	多粘菌素B polymyxin B	30	0(R)
	万古霉素 vancomycin	30	14(R)
喹诺酮类 quinolones	诺氟沙星 norfloxacin	10	28(S)
	氧氟沙星 ofloxacin	5	38(S)
磺胺类 sulfonamides	复古新诺明 (SMZ/TMP) retro new norming (SMZ/TMP)	23.75 μg SMZ/1.25 μg TMP	26(S)
抗结核类 anti-tuberculosis	链霉素 streptomycin	10	18(S)

注: R. 耐药, I. 中介, S. 敏感。
Notes: R. resistant, I. intermediate, S. sensitive.

坏死和淋巴细胞浸润等现象, 这与肌肉溃烂等临床症状吻合。柴静茹等^[3]的研究表明, 虹鳟的肝细胞出现了肿胀和空泡化, 这与异育银鲫的病理学损伤并不相同, 推测可能与注射剂量和物种差异有关。Ekman^[42]发现, 虹鳟感染嗜冷黄杆菌后, 其脾细胞坏死并充血; 肾脏表现出肾脏小管上皮和造血组织坏死等病变, 与本实验异育银鲫的脾肾病理损伤特点一致, 这意味着嗜冷黄杆菌会对鱼类造血和代谢功能造成损害。综上所述, 嗜冷黄杆菌可以作用于异育银鲫多个组织, 并造成严重的病理学损伤, 扰乱机体正常的免疫和代谢等功能, 最终导致异育银鲫的死亡。

3.4 嗜冷黄杆菌的耐药性

目前, 有关嗜冷黄杆菌的防控主要有疫苗和药物两种方式。疫苗包括亚单位疫苗、灭活疫苗、减毒疫苗, 但大多处在实验阶段^[43]。在实际生产中使用抗菌药物是防控细菌性疾病最直接和简便的方法。美国密歇根州和英国分离的菌株都对红霉素敏感^[44-45], 而本研究中分离到的嗜冷黄杆菌 NJ01 对红霉素中度敏感, 这可能是由于取样地养殖水域中红霉素过度使用使得嗜冷黄杆菌产生了耐药性。柴静茹等^[3]的实验发现, 嗜冷黄杆菌 CH06 和 CH07 对氨苄西林敏感, 这与本研究结果一致。此外, 研究发现菌株 NJ01 对头孢噻吩、头孢呋辛、头孢他啶、头孢吡肟、氨曲南、妥布霉素和多黏菌素 B 耐药, 对青霉素 G、头孢西汀、头孢哌酮、庆大霉素、克拉霉素、诺氟沙星、氧氟沙星、复古新诺明和链霉素敏感。由于氧氟沙星、诺氟沙星和氨苄西林为水产禁用药, 故在养殖过程中建议使用庆大霉素、克拉霉素、头孢西汀、头孢哌酮等。值得注意的是, 随着抗生素的广泛使用, 许多菌株已经开始对药物产生耐药性^[46]。因此, 在进行药物治疗时切忌大量投放抗生素, 应该在专业人员的指导下科学使用药物, 避免病原菌产生耐药性。此外, 大宗淡水鱼类养殖中嗜冷黄杆菌防控的报道仍然空白, 在未来的研究中, 需要深入探索嗜冷黄杆菌的致病机制, 进而提出科学有效的防控方法。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

[1] Bernardet J F, Bowman J P. The genus *Flavobacterium* [M]//Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, et al. The

<https://www.china-fishery.cn>

prokaryotes. New York: Springer, 2006: 481-531.

- [2] Borg A F. Studies on myxobacteria associated with diseases in salmonid fishes[M]. University of Washington, 1948.
- [3] 柴静茹, 王荻, 卢彤岩, 等. 虹鳟源嗜冷黄杆菌的分离鉴定及致病性 [J]. 水产学报, 2021, 45(6): 929-939.
- Chai J R, Wang D, Lu T Y, et al. Isolation, identification and pathogenicity of *Flavobacterium psychrophilum* from *Oncorhynchus mykiss*[J]. Journal of Fisheries of China, 2021, 45(6): 929-939 (in Chinese).
- [4] 柴静茹. 虹鳟源嗜冷黄杆菌的生物学特性及其致病性研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2021.
- Chai J R. Biological characteristics and pathogenicity of *Flavobacterium psychrophilum* recovered from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2021 (in Chinese)
- [5] Starliper C E. Bacterial coldwater disease of fishes caused by *Flavobacterium psychrophilum*[J]. *Journal of Advanced Research*, 2011, 2(2): 97-108.
- [6] 陆文浩, 陈辉, 黄春贵. 异育银鲫气单胞菌病原菌鉴定和药敏试验 [J]. 广东海洋大学学报, 2009, 29(1): 26-30.
- Lu W H, Chen H, Huang C G. Identification and drug sensitive test of the pathogen of aeromonas disease from hybridized prussian carp (*Carassius auratus gibelio*♀×*Cyprinus carpio*♂)[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2009, 29(1): 26-30 (in Chinese).
- [7] 夏飞, 梁利国, 谢骏. 异育银鲫病原维氏气单胞菌的分离鉴定及药敏试验 [J]. 淡水渔业, 2012, 42(5): 22-26.
- Xia F, Liang L G, Xie J. Isolation, identification and susceptibility test of the pathogenic *Aeromonas veronii* from *Carassius auratus gibelio*[J]. *Freshwater Fisheries*, 2012, 42(5): 22-26 (in Chinese).
- [8] 孟小亮, 贺中华, 田甜, 等. 3 种不同血清型副溶血弧菌对异育银鲫的急性毒性研究 [J]. 齐鲁渔业, 2009, 26(4): 1-3.
- Meng X L, He Z H, Tian T, et al. The acute toxicity test about the different serological type of *Vibrio parahaemolyticus* for *Carassius auratus gibelio* var. Songpu[J]. *Shandong Fisheries*, 2009, 26(4): 1-3 (in Chinese).
- [9] 秦蕾, 张晓君, 毕可然. 一种新的异育银鲫病原——腐败希瓦氏菌 [J]. 微生物学报, 2012, 52(5): 558-565.
- Qin L, Zhang X J, Bi K R. A new pathogen of gibel carp *Carassius auratus gibelio*-*Shewanella putrefaciens*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(5): 558-565 (in Chinese).
- [10] 阎冰, 洪葵, 许云, 等. 宏基因组克隆——微生物活性物质筛选的新途径 [J]. 微生物学通报, 2005, 32(1): 113-117.

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- Yan B, Hong K, Xu Y, *et al.* Metagenome cloning—a new approach for novel microbial bioactive compounds discovery[J]. *Microbiology China*, 2005, 32(1): 113-117 (in Chinese).
- [11] Kellenberger E. Exploring the unknown: the silent revolution of microbiology[J]. *EMBO Reports*, 2001, 2(1): 5-7.
- [12] 何鲷鲷, 孙强, 范航, 等. 基于 rDNA 靶向测序和鸟枪法测序相结合的致病菌筛查 [J]. 中国病原生物学杂志, 2017, 12(12): 1169-1174.
- He T T, Sun Q, Fan H, *et al.* Pathogen screening based on a combination of rDNA targeted sequencing and shotgun sequencing[J]. *Journal of Parasitic Biology*, 2017, 12(12): 1169-1174 (in Chinese).
- [13] Miao J J, Han N, Qiang Y J, *et al.* 16SPIP: a comprehensive analysis pipeline for rapid pathogen detection in clinical samples based on 16S metagenomic sequencing[J]. *BMC Bioinformatics*, 2017, 18(Suppl 16): 568.
- [14] Luo X, Fu X Z, Liao G L, *et al.* Isolation, pathogenicity and characterization of a novel bacterial pathogen *Streptococcus uberis* from diseased mandarin fish *Siniperca chuatsi*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 107: 380-389.
- [15] Peng W, Shi Y, Li G F, *et al.* *Tetraodon nigroviridis*: a model of *Vibrio parahaemolyticus* infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 56: 388-396.
- [16] Grizzle J M, Kiryu Y. Histopathology of gill, liver, and pancreas, and serum enzyme levels of channel catfish infected with *Aeromonas hydrophila* complex[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1993, 5(1): 36-50.
- [17] Bolyen E, Rideout J R, Dillon M R, *et al.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(8): 852-857.
- [18] 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: 364-399.
- Dong X Z, Cai M Y. Handbook of systematic identification of common bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001: 84-85 (in Chinese).
- [19] Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [20] Holt R A. Cytophaga psychrophila, the causative agent of bacterial cold-water disease in salmonid fish[D]. Corvallis: Oregon State University, 1987.
- [21] Fujiwara-Nagata E, Chantry-Darmon C, Bernardet J F, *et al.* Population structure of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* at whole-country and model river levels in Japan[J]. *Veterinary Research*, 2013, 44(1): 34.
- [22] Oplinger R W, Wagner E J. Control of *Flavobacterium psychrophilum*: tests of erythromycin, streptomycin, osmotic and thermal shocks, and rapid pH change[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2013, 25(1): 1-8.
- [23] Madetoja J, Nyman P, Wiklund T. *Flavobacterium psychrophilum*, invasion into and shedding by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2000, 43(1): 27-38.
- [24] Kumagai A, Nawata A. Mode of the intra-ovum infection of *Flavobacterium psychrophilum* in salmonid eggs[J]. *Fish Pathology*, 2010, 45(1): 31-36.
- [25] Barnes M E, Brown M L. A review of *Flavobacterium psychrophilum* biology, clinical signs, and bacterial cold water disease prevention and treatment[J]. *The Open Fish Science Journal*, 2011, 4(9): 1-9.
- [26] 陈福广, 李绍茂, 卢彤岩. 一株虹鳟源嗜冷黄杆菌 CH06 的基因组进化及毒力相关基因分析 [J]. 水产学报, 2022, 46(4): 594-604.
- Chen F G, Li S W, Lu T Y. Genomic evolution and virulence-associated genes of the *Flavobacterium psychrophilum* CH06 isolated from *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2022, 46(4): 594-604 (in Chinese).
- [27] 刘媛媛, 宋健, 樊丹, 等. 11 株虹鳟源嗜冷黄杆菌药物敏感性分析 [J]. 江西农业大学学报, 2022, 44(4): 976-987.
- Liu Y Y, Song J, Fan D, *et al.* Analysis on antimicrobial susceptibility of 11 *Flavobacterium psychrophilum* isolates recovered from salmonids[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2022, 44(4): 976-987 (in Chinese).
- [28] Muhamad Rizal N S, Neoh H M, Ramli R, *et al.* Advantages and limitations of 16S *rRNA* next-generation sequencing for pathogen identification in the diagnostic microbiology laboratory: perspectives from a middle-income country[J]. *Diagnostics*, 2020, 10(10): 816.
- [29] Deurenberg R H, Bathoorn E, Chlebowicz M A, *et al.* Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention[J]. *Journal of Biotechnology*, 2017, 243: 16-24.
- [30] Watanabe N, Kryukov K, Nakagawa S, *et al.* Detection of pathogenic bacteria in the blood from sepsis patients using 16S *rRNA* gene amplicon sequencing analysis[J]. *PLoS One*, 2018, 13(8): e0202049.
- [31] Xia L P, Bian L Y, Xu M, *et al.* 16S *rRNA* gene sequencing is a non-culture method of defining the specific bacterial etiology of ventilator-associated pneumonia[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2015, 8(10): 18560-18570.

- [32] Usui M, Akiyoshi M, Fukuda A, *et al.* 16S *rRNA* nanopore sequencing for rapid diagnosis of causative bacteria in bovine mastitis[J]. *Research in Veterinary Science*, 2023, 161: 45-49.
- [33] 孟晓林, 李文均, 聂国兴. 鱼类肠道菌群影响因子研究进展 [J]. *水产学报*, 2019, 43(1): 143-155.
Meng X L, Li W J, Nie G X. Effect of different factors on the fish intestinal microbiota[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(1): 143-155. (in Chinese).
- [34] Bajaj J S, Ridlon J M, Hylemon P B, *et al.* Linkage of gut microbiome with cognition in hepatic encephalopathy[J]. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2012, 302(1): G168-G175.
- [35] 李晓超. 柱状黄杆菌的拮抗菌筛选及其对鲫鱼生长性能和免疫功能的影响 [D]. 长沙: 湖南师范大学, 2019.
Li X C. Screening of antagonistic bacteria against *Flavobacterium columnus* and its effects on growth performance and immune function of *Carassius auratus*[D]. Changsha: Hunan Normal University, 2019 (in Chinese).
- [36] 黎雪梅, 李小兵, 郑宗林, 等. 水生动物柱状黄杆菌的研究进展 [J]. *饲料与畜牧*, 2014(6): 31-37.
Li X X, Li X B, Zheng Z L, *et al.* Progress on *flavobacterium columnare* of aquatic organisms[J]. *Feed and Husbandry*, 2014(6): 31-37 (in Chinese).
- [37] Bernardet J F, Kerouault B. Phenotypic and genomic studies of "*Cytophaga psychrophila*" isolated from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in France[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(7): 1796-800.
- [38] Decostere A, Lammens M, Haesebrouck F. Difficulties in experimental infection studies with *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using immersion, oral and anal challenges[J]. *Research in Veterinary Science*, 2000, 69(2): 165-169.
- [39] Fredriksen B N, Furevik A, Gauthier D, *et al.* Intramuscular challenge of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with two Norwegian field strains of *Flavobacterium psychrophilum*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(2): 595-598.
- [40] Rochat T, Pérez-Pascual D, Nilsen H, *et al.* Identification of a novel elastin-degrading enzyme from the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(6): e02535-18.
- [41] 柴静茹, 王荻, 陈福广, 等. 肌肉注射感染嗜冷黄杆菌虹鳟的组织嗜性与动态分布 [J]. *中国水产科学*, 2021, 28(11): 1426-1435.
Chai J R, Wang D, Chen F G, *et al.* Tissue tropism and dynamic distribution of *Flavobacterium psychrophilum* in infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after intramuscular injection[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(11): 1426-1435 (in Chinese).
- [42] Ekman E. Natural and experimental infections with *Flavobacterium psychrophilum* in salmonid fish[D]. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 2003.
- [43] Gómez E, Méndez J, Cascales D, *et al.* *Flavobacterium psychrophilum* vaccine development: a difficult task[J]. *Microbial Biotechnology*, 2014, 7(5): 414-423.
- [44] van Vliet D, Loch T P, Smith P, *et al.* Antimicrobial susceptibilities of *Flavobacterium psychrophilum* isolates from the Great Lakes Basin, Michigan[J]. *Microbial Drug Resistance*, 2017, 23(6): 791-798.
- [45] Ngo T P H, Smith P, Bartie K L, *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Flavobacterium psychrophilum* isolates from the United Kingdom[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2018, 41(2): 309-320.
- [46] 刘媛媛. 不同来源嗜冷黄杆菌药物敏感性分析 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2022.
Liu Y Y. Analysis of drug sensitivity of *Flavobacterium psychrophilum* from different sources[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2022 (in Chinese).

Isolation, identification, and histopathological observation of *Flavobacterium psychrophilum* from diseased *Carassius auratus gibelio*

JIANG Hucheng¹, LI Runbo², ZHAO Yanhua¹, XU Xiaoyan²,
SUN Mengling¹, XIA Aijun^{1*}, XUE Hui^{1*}

(1. Freshwater Fisheries Research Institute of Jiangsu Province, Nanjing 210017, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In recent years, the diseases of *Carassius auratus gibelio* have occurred frequently, especially with the decrease of water temperature in winter and the decline of fish immunity, which made the pathogenic bacteria easy to invade the fish and led to the outbreak of fish disease and the decline of culture efficiency. To determine the cause of the sudden death of *C. auratus gibelio* in Jiangsu during the overwintering period, high-throughput sequencing was used to compare the diversity and structure of the microbial community between healthy samples and diseased samples. The types and characteristics of bacteria in the outbreak of disease were analyzed. The results showed that the abundance of *Flavobacterium* was the highest in the diseased samples at the genus level. At the species level, the abundance of *F. psychrophilum* in the diseased samples increased significantly, reaching 63.01% and 61.31% respectively, which was significantly higher than that in the healthy group (1.55%). According to the results of the analysis of microbial community characteristics, the dominant pathogen NJ01 was isolated from the lesions on the body surface of the diseased samples. Through bacterial morphology, physiological and biochemical analysis, and 16S *rDNA* sequence alignment, the NJ01 strain was identified as *F. psychrophilum*. After 14 days of artificial infection with the NJ01 strain, the mortality rate of the 1.7×10^6 and 1.7×10^7 CFU/mL groups reached 100%, and the symptoms of infection were consistent with those of natural disease. Histopathological observation showed that the muscle cells of the diseased fish were necrotic and the stroma was full of lymphocytes; the large cells in the liver were lytic and necrotic, and the nucleus melted; splenocytes were found with scattered necrosis in the spleen with symptoms of hyperemia; the renal tubular epithelium fell off; there were a lot of lymphocytes in the renal interstitium. The results of the drug sensitivity test showed that the NJ01 strain was sensitive to cefoxitin, cefoperazone, gentamicin, and clarithromycin. The conclusion was that the strain NJ01 was the pathogen for the death of *C. auratus gibelio*, which could disturb the normal immune and metabolic function, and consequently the pathological phenomena of tissues and organs or death appeared. In this study, the pathogenicity of *F. psychrophilum* in *C. auratus gibelio* is reported for the first time, which will provide a reference basis for the study of drug prevention and the pathogenesis of "overwintering mortality syndrome" in conventional freshwater fish.

Key words: *Carassius auratus gibelio*; *Flavobacterium psychrophilum*; amplifier analysis; isolation and identification; pathogenic; antimicrobial resistance

Corresponding authors: XIA Aijun. E-mail: xia1966@citiz.net;
XUE Hui. E-mail: jsxuehui@163.com

Funding projects: Jiangsu Agriculture Science and Technology Innovation Fund [CX (23)1007]; China Agriculture Research System (CARS-45)