

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
52(5):558-565; 4 May 2012
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

一种新的异育银鲫病原——腐败希瓦氏菌

秦蕾, 张晓君, 毕可然

淮海工学院海洋学院, 连云港 222005

摘要: 【目的】江苏盐城一家养殖场的异育银鲫暴发疾病, 通过对病原进行研究, 旨在为该病的防治提供理论依据和参考。【方法】从病鱼体表病灶和内脏中分离出优势菌株, 经人工感染试验证实为病原菌。采用传统的形态、生理生化表型鉴定与 16S rDNA 序列分析相结合的方法确定菌株的分类地位。运用 K-B 琼脂法对病原菌株进行药物敏感性测定。【结果】综合菌株形态、生理生化表型以及 16S rDNA 序列分析的结果, 确定该分离株为腐败希瓦氏菌 (*Shewanella putrefaciens*)。回接感染试验证实腐败希瓦氏菌即是导致此次异育银鲫发病死亡的致病原, 其半数致死量 (LD_{50}) 为 2.1×10^3 cfu/g。该株腐败希瓦氏菌对吡哌酸、萘啶酸、氟哌酸、氟啶酸、氟苯尼考、利福平、美满霉素、氟罗沙星、恩诺沙星、复达欣、菌必治、先锋 IV、罗红霉素和左氟沙星等抗生素敏感。【结论】首次报道了异育银鲫一种新的病原, 说明腐败希瓦氏菌作为一种潜在的新病原也可能对异育银鲫的养殖造成威胁。

关键词: 异育银鲫, 腐败希瓦氏菌, 16S rDNA, 药物敏感性

中图分类号: S941.42 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012)05-0558-08

异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 是以兴国红鲤 (*Cyprinus carpio* var. *singunensis*) 的精子刺激方正银鲫 (*Carassius auratus gibelio* Bloch) 的卵细胞培育而成的鲫鱼新品系。由于它具有肉质细嫩鲜美, 环境适应能力强和生长快等优点, 目前已经成为我国鲫鱼养殖中的主要品系。然而随着异育银鲫养殖业的快速发展, 病害问题也日渐突出, 每年给养殖业者带来的经济损失巨大。目前所报道的主要有细菌性疾病, 其病原主要有嗜水气单胞菌^[1]、温和气单胞菌^[1-2]、类志贺邻单胞菌^[3]和鲍曼不动杆菌^[4]; 以及由碘孢虫、粘体虫和单级虫感染所致的粘孢子虫病^[5]; 除此之外, 陆宏达等报道了类疱疹病毒所引发的异育银鲫上皮瘤病^[6]。疾病问题已成为制约异育银鲫养殖产业发展的重要因素之一。本文首

次报道了一种由腐败希瓦氏菌 (*S. putrefaciens*) 感染所致的异育银鲫疾病, 对其临床症状、病原及其药物敏感性进行了研究, 旨在为该病的防治提供理论依据和参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 患病异育银鲫: 病鱼取自江苏盐城一家异育银鲫养殖场; 人工回接感染试验所用健康银鲫购自江苏连云港一家淡水鱼养殖场。

1.1.2 主要试剂和仪器: TSB 培养基和细菌微量生化鉴定管 (北京陆桥技术有限责任公司); TaqDNA 聚合酶和 dNTP 混合物 (生工生物工程 (上海) 有限

基金项目: 江苏省海洋生物技术重点建设实验室开放课题 (2008HS018); 淮海工学院博士科研启动基金项目 (KQ07051)

作者简介: 秦蕾 (1978 -), 女, 山东烟台人, 博士, 副教授, 主要从事水产动物疾病的预防研究工作。Tel: +86-518-85895427; E-mail: qinlei1978@163.com

收稿日期: 2011-10-23; 修回日期: 2012-02-02

公司);麦康凯,SS培养基和药敏纸片(杭州微生物试剂有限公司);脱纤维羊血(杭州新锐生物工程有限公司);麦氏比浊仪(法国梅里埃)。

1.2 现场取样

现场观察患病异育银鲫的临床表现,然后随机取10条病鱼进行无菌解剖并记录其宏观病理变化。与此同时,对每条病鱼分别取其鳃、皮肤、肝脏以及肾脏等器官组织制成水浸片做显微镜检。最后随机取5条症状明显的病鱼,塑料袋充氧迅速带回实验室做进一步检查。

1.3 病原菌的分离

75%的酒精擦拭鱼表,无菌条件下解剖病鱼,分别取其体表病灶、肝脏和肾脏等组织少许,灭菌生理盐水冲洗后剪碎做TSB琼脂平板划线分离,28℃恒温培养24h,从平板上形态一致的优势菌落中选取单个菌落,再次进行平板划线,直至获得纯培养。将纯培养菌株接TCBS、麦康凯、SS培养基以及血平板培养,观察其生长情况。最后将纯培养菌株用含15%甘油的保种液-70℃保藏。

1.4 病原菌的分类鉴定

1.4.1 形态学观察:将菌株培养12h后进行革兰氏染色观察。同时将细菌制成菌悬液,用0.5%的磷酸酸负染,透射电镜观察其形态、大小和鞭毛着生等情况。

1.4.2 生理生化鉴定:参照《常见细菌系统鉴定手册》^[7]中的细菌鉴定方法,对菌株各项生理生化项目进行手工测定,每项测试均重复两次并设置对照,部分测试项目需延长培养时间至5d;同时采用细菌微量生化鉴定管对待测菌株进行各项生化指标的测定,以此来补充并验证手工鉴定的准确性。

1.4.3 16S rDNA序列分析:以菌株SYY-1基因组DNA为模板,用细菌通用引物27f和1492r^[8]进行16S rDNA序列的PCR扩增。PCR体系含1×PCR缓冲液,2mmol/L MgCl₂,200μmol/L dNTP混合物,0.4μmol/L引物,0.5μL TaqDNA聚合酶,1μL DNA模板和34.5μL ddH₂O。扩增条件为:94℃ 3min;94℃ 1min,50℃ 1min,72℃ 2min,30个循环;72℃ 10min。扩增产物交由生工生物工程(上海)有限公司测序。测序结果在GenBank中进行Blast,同时使用EzTaxon server 2.1^[9]进行比对分析,然后从比对结果中选取相关种属的模式菌株和非模式菌株的序列,通过Mega 4软件进行多序列匹配分析,

采用邻位相连法(Neighbor-joining method)构建系统发育树,所建发育树各分支的置信度由Bootstrap进行1000次循环检验。

1.5 人工回接感染试验

健康异育银鲫平均体重约47g(体长约14cm),循环水饲养,水温27±1℃,每天早晚各投饵一次,暂养1周开始实验。分6个实验组,每组用鱼8尾,设一平行。用MS-222将鱼麻醉后采用腹腔接种法,每组注射SYY-1菌液浓度分别为9×10⁸、9×10⁷、9×10⁶、9×10⁵、9×10⁴和9×10²cfu/mL,每尾0.2mL。同时设对照组,注射同等量灭菌生理盐水。实验共进行28天,每天定时观察记录鱼发病死亡情况,对刚死亡的病鱼在无菌条件下立即进行细菌分离,如果重新分离到接种菌株且菌量大为优势单一菌株,就可以认为鱼发病死亡是由菌株SYY-1感染所致。采用Karber法计算菌株的LD₅₀^[10]。

1.6 药物敏感性测定

采用K-B琼脂法对菌株SYY-1进行药物敏感性测定,选用抗生素如下:吡哌酸(30μg)、萘啶酸(30μg)、氟哌酸(10μg)、氟啶酸(10μg)、新生霉素(30μg)、链霉素(10μg)、新霉素(30μg)、氟苯尼考(30μg)、利福平(5μg)、青霉素(10U)、乙酰螺旋霉素(30μg)、美满霉素(30μg)、阿奇霉素(15μg)、麦迪霉素(30μg)、吉他霉素(15μg)、万古霉素(30μg)、氟罗沙星(5μg)、恩诺沙星(5μg)、洁霉素(2μg)、菌必治(30μg)、先锋IV(30μg)、先锋V(30μg)、复达欣(30μg)、罗红霉素(15μg)、磺胺甲基异恶唑(300μg)和左氟沙星(5μg)。结果判定根据药品纸片的抑菌范围解释标准进行。

2 结果

2.1 患病异育银鲫临床表现及其现场检查情况

病鱼游动迟缓,停止摄食;鱼体尾部颜色变浅,腹部显黄色,胸鳍和臀鳍发红;随着病情的发展部分鱼腹部出现出血点;病鱼鳃贫血,腹部膨大;解剖可见腹腔积水,脾肿大,肝淤血;部分病鱼肠壁和腹腔壁发现有点状出血。该病的累积死亡率在一个月可达30%。水浸片检查发现每条病鱼体内均存在有大量短杆状的细菌,没有发现寄生虫和霉菌等其他微生物的存在。

2.2 病鱼细菌的分离及培养

从 5 条病鱼体内共分离得到 7 株优势细菌, 命名为菌株 SY Y。TSB 培养 24 h 后可见这 7 株菌呈现出相同的菌落形态: 菌落圆形, 直径 1 mm - 2 mm, 边缘整齐, 轻度凸起, 表面湿润、光滑, 不透明, 呈红褐色; TCBS 平板菌落呈绿色; 麦康凯培养基上形成半透明, 光滑, 灰白至浅橙色的菌落; SS 培养基生长极其缓慢, 培养 48 h 才出现少量半透明、淡红、中心带褐色的小菌落; 在绵羊血琼脂平板上只发生 α 溶血, 可见菌落周围出现草绿色溶血环, 不见 β 溶血现象。

2.3 分离菌株的形态及其生理生化表型

分离得到的 7 株菌 (SY Y) 表现出一致的特性: 革兰氏染色阴性, 无芽胞, 菌体短杆状, 大小为 $(0.3 - 0.5) \mu\text{m} \times (1.5 - 3.0) \mu\text{m}$, 极生单鞭毛 (图 1)。能液化明胶; 氧化酶和接触酶阳性; 产鸟氨酸脱羧酶, 但不能产生精氨酸双水解酶、赖氨酸脱羧酶和脲酶; 不发酵葡萄糖、乳糖、蜜二糖、海藻糖、果糖、阿拉伯糖、山梨醇、蔗糖、鼠李糖、肌醇、棉籽糖、水杨苷、侧金盏花醇、胆汁七叶苷、木糖和甘露糖、核糖和麦芽糖等糖醇类; VP 试验和甲基红阴性; 硝酸盐还原阳性; 能利用柠檬酸盐; 产硫化氢但不产吲哚; 适宜生长温度在 $28 - 30^\circ\text{C}$, 不能在高于 40°C 条件下生长; 盐度生长范围是 $0 - 9\%$ NaCl; pH 适宜范围是 $6 - 8$, pH 4 和 10 生长受到抑制 (表 1)。上述结果显示所分离到的 7 株菌应该是同一种细菌, 且与腐败希瓦氏菌 (*S. putrefaciens*) 表现出相似的表型特征。

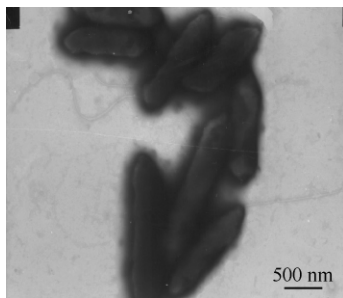


图 1 分离菌株的负染电镜照片

Fig. 1 Electron micrograph showing negative staining of isolates.

2.4 分离菌株的 16S rDNA 序列分析

以 SY Y-1 为代表菌株进行测序, 不包括引物结合区所扩增的 16S rDNA 序列长度为 1414 bp (GenBank 登录号为 JN555612)。Blast 比对结果显示, 除了未鉴定到种的希瓦氏菌属菌株外, 与该菌株

表 1 分离菌株的生理生化特性

Table 1 Phenotypic characteristics of isolates from diseased *Carassius auratus gibelio*

Test	SY Y (n=7)	<i>S. putrefaciens</i> *
Gram	-	-
Motility	+	+
Gelatine liquefaction	+	+
Motility	+	+
Pigment	Red-brown	Red-brown
Oxidase	+	+
Catalase	+	+
Urease	-	-
Ornithine decarboxylase	+	+
Arginine dihydrolase	-	-
Lysine decarboxylase	-	-
Gas from glucose	-	nd
H ₂ S production	+	+
Nitrate reduction	+	+
Indole production	-	-
Gelatine liquefaction	+	d
Acid production from		
Glucose	-	-
Lactose	-	-
Melibiose	-	nd
Trehalose	-	-
Fructose	-	-
Arabinose	-	d
Sorbitol	-	-
Rhamnose	-	nd
Sucrose	-	d
Ribose	-	-
Maltose	-	d
Inositol	-	-
Raffinose	-	nd
Salicin	-	-
Adonitol	-	nd
Aesculin	-	-
Xylose	-	-
Mannose	-	-
Citrate	+	d
MR	-	nd
VP	-	-
Growth at		
4°C	+	+
28°C	+	+
37°C	+	+
40°C	-	-
Growth in		
0% NaCl	+	+
3% NaCl	+	+
6% NaCl	+	d
9% NaCl	+	-
11% NaCl	-	-
Growth in		
pH 4.0	-	nd
pH 6.0	+	nd
pH 8.0	+	nd

+, positive; -, negative; nd, no data; d, variable results; * Data from Bergey's Manual of Determinative Bacteriology^[11], Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals: a practical identification manual^[12], Biochemical and Pathogenic of *Shewanella algae* and *Shewanella putrefaciens*^[13] and Polyphasic Taxonomy of the Genus *Shewanella* and Description of *Shewanella oneidensis* sp. nov.^[14].

序列相似性高的大部分都是腐败希瓦氏菌。EzTaxon server 2.1 比对发现, 菌株 SYY-1 与 *S. putrefaciens* LMG26268^T 序列相似性为 98.7%。结

合比对结果选取相关菌株所构建的系统发育树如图 2, 可见与菌株 SYY-1 聚类的也多是腐败希瓦氏菌, 且具有较高的 bootstrap 值。

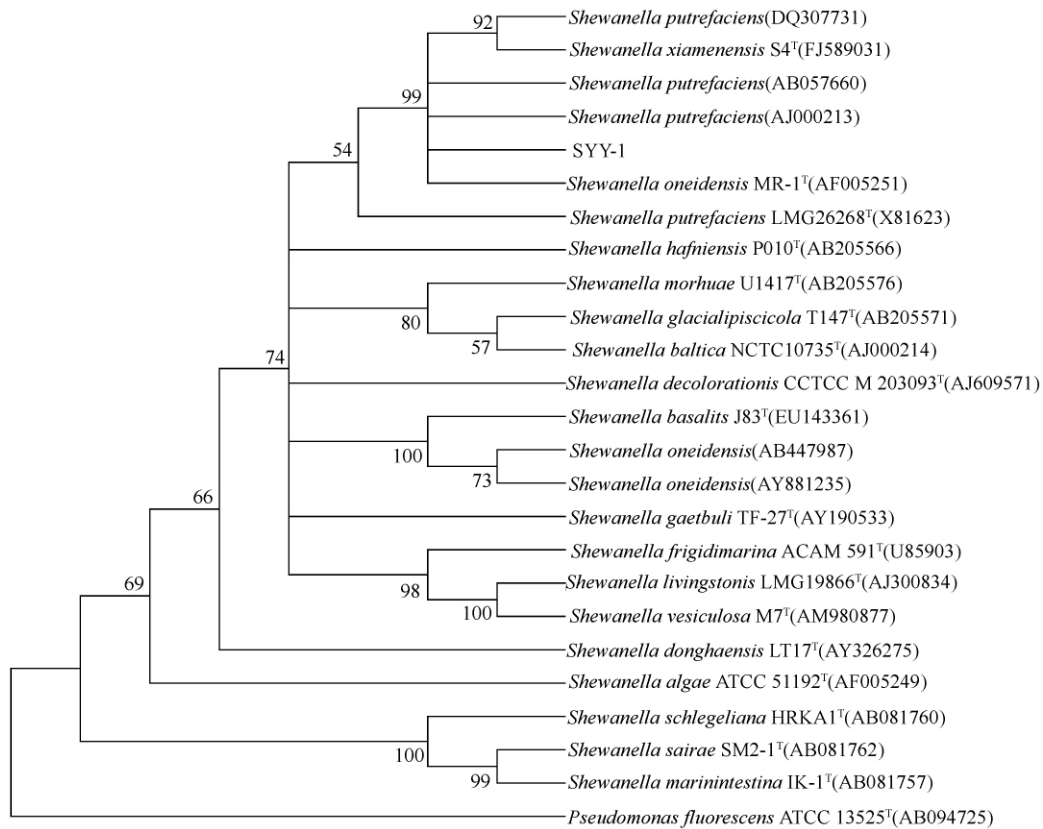


图 2 基于 16S rDNA 序列构建的菌株 SYY-1 的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain SYY-1 based on the result of 16S rDNA sequence analysis. Numbers at branching points indicate bootstrap values (1000 replicates); Numbers in brackets indicate GenBank accession number; The sequence of *Pseudomonas fluorescens* ATCC13525^T (AF094725) was used as outgroup.

2.5 分离菌株的人工感染试验结果

以 SYY-1 为代表菌株进行的回接感染试验结果见图 3。可见 9×10^8 cfu/mL 组的鱼在感染后 5 天内死亡率达到 100%, 而 9×10^2 cfu/mL 组的鱼在实验进行的 28 d 内没有表现发病症状和死亡, 同时对对照组的鱼在实验期间也无病状和死亡出现。该菌株在感染的 28 d 内的 LD₅₀ 为 2.1×10^3 cfu/g。感染发病的鱼躯干部和鳍基部充血发红, 肛门红肿; 解剖发现有腹水, 花斑肝, 脾脏肿大呈红黑色; 高浓度感染组的发病鱼腹腔膜可见有点状出血。从每条刚死亡的病鱼中均分离到大量与接种菌株 SYY-1 菌落形态一致的优势菌株。

2.6 病原菌株的药物敏感性测试

药物敏感性测试结果见表 2, 可见菌株 SYY-1 对吡啶酸、萘啶酸、氟哌酸、氟啶酸、氟苯尼考、利福

平、美满霉素、氟罗沙星、恩诺沙星、复达欣、菌必治、先锋 IV、罗红霉素和左氟沙星等抗生素敏感。

3 讨论

根据对菌株 SYY-1 进行的形态和生理生化等多项测试的结果, 并参照相关鉴定手册和文献^[11-14], 发现该菌株的表型特性和腐败希瓦氏菌相一致。16S rDNA 序列比对分析显示该菌株与腐败希瓦氏菌相似性较高, 从系统发育树中也可见其与腐败希瓦氏菌群发生聚类, 这说明两者之间确实存在较近的亲缘关系。所构建的系统发育树同时显示在腐败希瓦氏菌的聚类分支中出现 *Shewanella xiamenensis* 和其中一株 *Shewanella oneidensis*, 这表明两者的 16S rDNA 序列也与菌株 SYY-1 有着较高

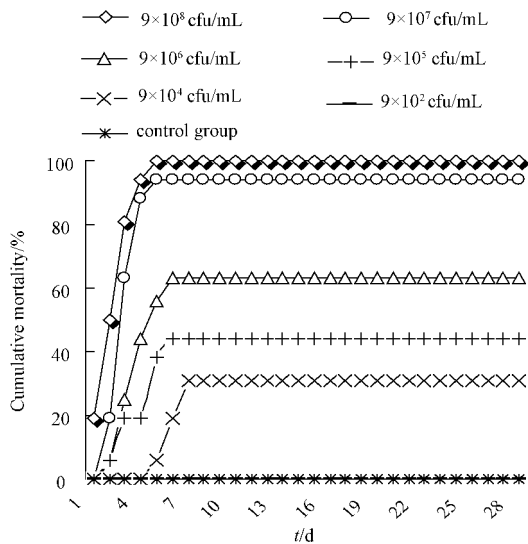


图3 菌株SY-1人工感染异育银鲫的结果

Fig.3 Mortality of *Carassius auratus gibelio* after experimental infection with strain SY-1 at selected doses.

表2 菌株SY-1的药敏实验结果

Table 2 Drug sensitivity of strain SY-1

Antibiotics	Sensitivity	Antibiotics	Sensitivity
Pipemidic Acid (30 μg)	S	Vancomycin (30 μg)	R
Nalidixic acid (30 μg)	S	Fleroxacin (5 μg)	S
Albamylin (30 μg)	R	Enrofloxacin (5 μg)	S
Fluperacid (10 μg)	S	Jiemylin (2 μg)	R
Enoxacin (10 μg)	S	Ceftriaxone (30 μg)	S
Penicillin (10 U)	I	Cefalexin (30 μg)	S
Streptomycin (10 μg)	I	Cephazolin (30 μg)	I
Neomycin (30 μg)	I	Ceftazidime (30 μg)	S
Florfenicol (30 μg)	S	Roxithromycin (15 μg)	S
Rifampicin (5 μg)	S	Sulfamethoxazole (300 μg)	R
Acetylspiramycin (30 μg)	I	Levofloxacin (5 μg)	S
Minocycline (30 μg)	S	Midecamycin (30 μg)	I
Azithromycin (15 μg)	I	Kitasamycin (15 μg)	I

S: susceptible; I: intermediate susceptible; R: resistant.

的相似性。然而,16S rDNA序列相似性的高低并不能作为物种分类的决定因素,因为具有较高序列相似性的两株菌(相似性甚至可高达99.9%)也可能归属于完全不同的两个种,而此时表型特征对于菌株归属的判断就显得尤为重要,所以必须将表型特征与16S rDNA序列分析相结合才能对菌株分类地位作出准确判断^[14-15]。从表型特征来看,*S. xiamenensis*能发酵蔗糖、麦芽糖、阿拉伯糖和葡萄糖等多种糖类,不能在6% NaCl条件下生长^[16]。而

菌株SY-1却表现出对多种糖醇类都不能利用且在6% NaCl条件下能生长这些特性,这显然与*S. xiamenensis*不相一致。将菌株SY-1与*S. oneidensis*^[12,14]进行比较,发现两者在鸟氨酸脱羧酶、柠檬酸盐和葡萄糖利用以及生长的温度和盐度范围等多项生理生化项目中也均表现不一致。因此从表型特征来看,菌株SY-1归属为*S. xiamenensis*或*S. oneidensis*的可能性较小。Venkateswaran等^[14]研究发现,希瓦氏菌属部分种之间存在较高16S rDNA序列的相似性,而种内不同菌株间的序列差异又相对较大;*S. oneidensis*原来归属*S. putrefaciens*,部分菌株表现出与后者16S rDNA序列较高的相似性,但*S. oneidensis*部分菌株间的序列相似性却相对较低。这可能就是在系统发育树中*S. oneidensis*(AF005251)没有和其他两株同类聚在一起而是与*S. xiamenensis*一起出现在腐败希瓦氏菌聚类分支中的原因所在。鉴于腐败希瓦氏菌各菌株之间16S rDNA序列差异性相对较大,Venkateswaran等^[14]认为与模式株*S. putrefaciens*(ATCC 8071)16S rDNA序列相似性高于或等于97%的菌株作为腐败希瓦氏菌来考虑都是合理的。比对结果表明菌株SY-1符合此项判定。因此综合考虑表型特征和16S rDNA序列分析的结果,将菌株SY-1最终鉴定为腐败希瓦氏菌(*S. putrefaciens*)。

通过对异育银鲫进行的人工回接感染试验表明,所分离到的腐败希瓦氏菌能使健康鱼致病死亡,病鱼表现出与自然状态下感染相似的临床特征,同时从发病死亡的鱼体内又重新分离到了接种菌株,根据Koch法则可以确定腐败希瓦氏菌是导致此次异育银鲫发病的真正致病原。

腐败希瓦氏菌(*S. putrefaciens*)最早由Derby和Hammer首次分离到并将其归属为无色杆菌属(*Achromobacter* spp.)^[17],后来又经历过多次种属划分被分别归至假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.)^[18]和交替单胞菌属(*Alteromonas* spp.)^[19]等多个属。在1985年MacDonell和Colwell最终根据5S rRNA序列进行系统发育分析,将其归为新属——希瓦氏菌属(*Shewanella* spp.)^[20]。Gilardi^[21]依据是否发酵麦芽糖和蔗糖、能否在SS培养基以及在6% NaCl条件下生长这3个指标,将腐败希瓦氏菌分为3个生物型,发现临床上有致病性的分离株大都属于生

物型 2(不能发酵麦芽糖和蔗糖、能够在 SS 培养基和 6% NaCl 条件下生长)。从表型测试结果来看,作者所分离到的这株腐败希瓦氏菌应属于生物型 2(CDC 生物型 2)。而 Khashe 等^[13]认为原属于生物型 2 的腐败希瓦氏菌应重新归为海藻希瓦氏菌,并根据对多株菌表型特征的统计学数据,建议将在 42℃ 条件下能否生长,是否出现 β 溶血以及发酵核糖等作为关键指标来区分这两种希瓦氏菌。与腐败希瓦氏菌相比,海藻希瓦氏菌能在 42℃ 条件下生长,发生 β 溶血和发酵核糖。综合 16S rDNA 序列分析结果,可见作者所分离到这株希瓦氏菌并不属于海藻希瓦氏菌。因此腐败希瓦氏菌生物型 2 是否都应归为海藻希瓦氏菌还有待进一步考虑与鉴别。本研究结果丰富了菌种表型方面的统计学数据,为菌种间的区分鉴定提供了参考。

从印染工业处理废水中分离到的腐败希瓦氏菌显示出较强的染料脱色能力^[22-23],但腐败希瓦氏菌被人们所熟知却是它是有名的鱼类腐败菌,已经被确认为冷藏海水鱼的主要腐败菌^[24-27]。相比之下,作为病原菌该菌株却少为人知。腐败希瓦氏菌是人类的病原菌之一,能够感染人引起创伤性溃疡症^[28]、软组织感染^[29]以及心内膜炎^[30]等多种疾病。不仅如此,它还是一种导致人兽共患病的病原菌,能够引起水产动物发病造成养殖业者的经济损失。近几年来国内外相继发现有腐败希瓦氏菌感染金带篮子鱼(*Siganus rivulatus*)^[31]、欧洲海鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[32]、大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)^[33]以及大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[34]等海水养殖动物的报道。作为水产动物的病原菌,却较少见到腐败希瓦氏菌感染淡水养殖动物的报告。国外目前仅见 Kozińska 等^[35]所发现的鲤鱼(*Cyprinus carpio* L.)和鱒鱼(*Oncorhynchus mykiss*)的感染病例。而国内只在养殖的河蟹(*Eriocheir scinensis*)中发现了该菌感染所致的疾病^[36]。本文是首次关于腐败希瓦氏菌感染异育银鲫的报道,扩大了该菌感染宿主的范围,说明腐败希瓦氏菌作为一种潜在的新病原也可能对异育银鲫的养殖造成威胁。

毒性试验发现,与其他毒性强的菌株相比,所分离到腐败希瓦氏菌的毒性较弱,这表明作为一种机会致病菌,腐败希瓦氏菌的感染很可能与养殖密度过高以及水环境恶化等对鱼类造成的胁迫相关。在养殖环境中受到胁迫的鱼类免疫力下降,很容易会

遭受到毒性较弱的病原菌的入侵导致感染发生。尽管毒性较弱,但值得注意的是,从发病的鱼体内所分离到的腐败希瓦氏菌量大,而且此次感染导致了养殖场 30% 的月累积死亡率。因此对水产养殖中腐败希瓦氏菌的感染也需要引起人们的重视,要注意在养殖过程中确保合适的养殖密度,做好水质的调控以及切断腐败变质饲料投喂所造成的疾病传播,从而避免腐败希瓦氏菌感染的发生,减少养殖业者的经济损失。

Saeed 等^[31]发现从海水养殖的患病金带篮子鱼中所分离到的腐败希瓦氏菌不能够在无盐条件下生长,而此次我们所分离到的菌株却能够在此条件下生长,这与 Kozińska 等^[35]从淡水鱼中得到的菌株的研究结论是一致的。这说明腐败希瓦氏菌能够适应生存环境的需要而对其嗜盐能力做出调整。对所分离到的这株腐败希瓦氏菌目前只是初步研究,今后还有很多问题有待进一步探讨,比如其遗传、分子特性以及抗原性等。

参考文献

- [1] 孙其焕,孙佩芳,金丽华,吴建农. 异育银鲫溶血性腹水病原的研究. 水产学报(*Journal of Fisheries of China*), 1991, 15(2): 130-139.
- [2] 张晓君,阎斌伦,邢旭文,秦蕾,秦国民. 异育银鲫病原温和气单胞菌表型及分子鉴定与溶血素基因检测. 水生态学杂志(*Journal of Hydroecology*), 2010, 3(4): 102-107.
- [3] 陆文浩,杨家新,陈辉,顾伟,杨鸢劫. 异育银鲫类志贺单胞菌的鉴定. 淡水渔业(*Freshwater Fisheries*), 2009, 39(2): 48-53.
- [4] 陆文浩,陈辉,王习达,邹勇,黄春贵. 异育银鲫致病性鲍曼不动杆菌的鉴定和系统发育分析. 中国兽医科学(*Chinese Veterinary Science*), 2009, 39(4): 303-309.
- [5] 李林思,黄丽萍,邵汝强. 异育银鲫粘孢子虫病调查. 水产养殖(*Aquaculture*), 2008, 5: 40-42.
- [6] Lu HD, Zhu GZ, Fan LP, Zhang LY. Etiology and pathology of epidermal papillomas in allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio* ♀ x *Cyprinus carpio* var. *singonensis* ♂). *Diseases of Aquatic Organisms*, 2009, 83(1): 77-84.
- [7] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.

- [8] Lane D. 16S/23S rRNA sequencing//Stackebrandt E , Goodfellow M. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd. , 1991: 115-147.
- [9] Chun J , Lee JH , Jung Y , Kim M , Kim S , Kim BK , Lim YW. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology* , 2007 , 57: 2259-2261.
- [10] 荆永志,李在连,吕炳俊. 实验细菌学. 济南:山东医学科学院出版社,1982: 587.
- [11] Holt JG , Krieg NR , Sneath PHA , Staley JT , Williams ST. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th eds. Baltimore: Williams & Wilkins Press , 1994.
- [12] Nicky BB. *Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals: a practical identification manual*. Cambridge: CABI Publishing , 2004.
- [13] Khashe S , Janda JM. Biochemical and Pathogenic of *Shewanella algae* and *Shewanella putrefaciens*. *Journal of Clinical Microbiology* , 1998 , 36(3) : 783-787.
- [14] Venkateswaran K , Moser DP , Dollhopf ME , Lies DP , Saffarini DA , MacGregor BJ , Ringelberg DB , White DC , Nishijima M , Sano H , Burghardt J , Stackebrandt E , Nealson KH. Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. . *International Journal of Systematic Bacteriology* , 1999 , 49: 705-724.
- [15] Wayne LG , Brenner DJ , Colwell RR , Grimont PAD , Kandler O , Krichevsky MI , Moore LH , Moore WEC , Murray RGE , Stackebrandt E , Starr MP , Truper HG. International Committee on Systematic Bacteriology: Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* , 1987 , 37: 463-464.
- [16] Huang JX , Sun BL , Zhang XB. *Shewanella xiamenensis* sp. nov. , isolated from coastal sea sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 2010 , 60: 1585-1589.
- [17] Derby HA , Hammer BW. Bacteriology of butter. IV. Bacteriological studies on surface taint butter. *Iowa Agricultural Experiment Station Research Bulletin* , 1931 , 145: 385-416.
- [18] Long HF , Hammer BW. Classification of organisms important in dairy products: III. *Pseudomonas putrefaciens*. *Iowa Agricultural Experimental Station Research Bulletin* , 1941 , 285:176-195.
- [19] Baumann L , Baumann P , Mandel M , Allen RD. Taxonomy of aerobic marine eubacteria. *Journal of Bacteriology* , 1972 , 110: 402-429.
- [20] MacDonell MT , Colwell RR. Phylogeny of the Vibrionaceae and recommendation for 2 new genera , *Listonella* and *Shewanella*. *Systematic and Applied Microbiology* , 1985 , 6: 171-182.
- [21] Gilardi GL. Cultural and biochemical aspects for identification of glucose-nonfermenting gram-negative rods//Gilardi GL. *Nonfermentative gram-negative rods*. New York: Marcel Dekker Inc , 1985: 17-84.
- [22] 鲜海军. 对两株具有多种染料脱色能力的腐败交替单胞菌(*Alteromonas putrefaciens*)的研究. 应用与环境生物学报(*Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*) 2002 8(3):294-297.
- [23] 乐毅全,王士芬,朱核光. 脱色菌腐败希瓦氏菌的分离及其脱色性能研究. 环境科学与技术(*Environmental Science & Technology*) , 2004 , 27(3) : 14-15.
- [24] Jørgensen BR , Huss HH. Growth and activity of *Shewanella putrefaciens* isolated from spoiling fish. *International Journal of Food Microbiology* , 1989 , 9: 51-62.
- [25] Gram L , Huss HH. Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* , 1996 , 33: 121-137.
- [26] 郭全友,杨宪时,许钟,吴建军,周彩华. 冷藏养殖大黄鱼细菌相组成和优势腐败菌鉴定. 水产学报(*Journal of Fisheries of China*) 2006 30(6):824-830.
- [27] 崔正翠,许钟,杨宪时,郭全友,李学英. 冷藏大菱鲆细菌组成变化和优势腐败菌. 食品科学(*Food Science*) 2011 , 32(13) : 184-187.
- [28] Bulut C , Ertem GT , Gökcek C , Tulek N , Bayar MA , Karakoc E. A rare cause of wound infection: *Shewanella putrefaciens*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* , 2004 , 36 , 692-694.
- [29] Leonardo P , Adolf L , Claudio V , Oswald M , Giovanni R , Raffaele P , Peter M. Soft tissue infection and bacteremia caused by *Shewanella putrefaciens*. *Journal of Clinical Microbiology* , 2003 , 41: 2240-2241.
- [30] Benu D , Rama C , Baijayanti MM. Isolation of *Shewanella putrefaciens* from a rheumatic heart disease patient with infective endocarditis. *Journal of Clinical Microbiology* , 1998 , 36: 2394.
- [31] Saeed MO , Alamoudi MM , Al-Harbi AH. A *Pseudomonas* associated with disease in cultured rabbitfish *Siganus rivulatus* in the Red Sea. *Diseases of*

- Aquatic Organisms*, 1987, 3: 177-180.
- [32] Korun J, Akgün-dar K, Yazici M. Isolation of *Shewanella putrefaciens* from cultured european sea bass, (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 2009, 160: 532-536.
- [33] 林克冰, 周宸, 刘家富, 周胜利, 曾志南, 陈木. 海水网箱养殖大黄鱼病原菌研究. *海洋科学 (Marine Science)*, 1999, 4: 58-62.
- [34] 吕俊超. 养殖大菱鲆病原菌的分离鉴定、组织病理学及免疫组织化学. 中国海洋大学硕士论文, 2008.
- [35] Kozińska A, Pekala A. First isolation of *Shewanella putrefaciens* from freshwater fish—a potential new pathogen of fish. *Bulletin European Association of Fish Pathologists*, 2004, 24: 189-193.
- [36] 徐欣, 陈军昌. 五种中草药对河蟹腐败假单胞菌的抑菌作用. *水产科学 (Fisheries Science)* 2002, 2: 24-27.

A new pathogen of gibel carp *Carassius auratus gibelio*—*Shewanella putrefaciens*

Lei Qin^{*}, Xiaojun Zhang, Keran Bi

College of Marine Science, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China

Abstract: [Objective] We studied a novel disease occurred among cultured *Carassius auratus gibelio* at a farm located in Yancheng City, Jiangsu Province. [Methods] The dominant bacteria were isolated from diseased fish. The pure culture of the isolated strain was analyzed using conventional physiological and biochemical tests, together with 16S rDNA gene sequencing. An experimental infection of *Carassius auratus gibelio* with the isolated strain was performed to fulfill the Koch postulates. K-B method was used for antibiotic susceptibility testing. [Results] The causal agent of the disease was finally proved to be one species of bacteria that was identified as *Shewanella putrefaciens*. Experimental infection with *S. putrefaciens* resulted in the same gross signs as naturally infected fish and the same bacteria were recovered in a pure culture from freshly dead fish. The LD₅₀ of *S. putrefaciens* was calculated as 2.1×10^3 cfu/g. The result of drug sensitivity test showed that *S. putrefaciens* was sensitive to Pipemidic acid, Nalidixic acid, Fluperacid, Enoxacin, Florfenicol, Rifampicin, Minocycline, Fleroxacin, Enrofloxacin, Ceftriaxone, Cefalexin, Ceftazidime, Roxithromycin and Levofloxacin. [Conclusion] This is the first report on a new pathogen of *Carassius auratus gibelio*, revealing that *S. putrefaciens* as a potential new pathogen may pose a threat to the culture of *Carassius auratus gibelio*.

Keywords: gibel carp *Carassius auratus gibelio*, *Shewanella putrefaciens*, 16S rDNA, antibiotic susceptibility testing

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Open Fund of Key Laboratory of Oceanic Biotechnology of Jiangsu (2008HS018) and by the Doctoral Fund of Huaihai Institute of Technology (KQ07051)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-518-85895427; E-mail: qinlei1978@163.com

Received: 23 October 2011 / Revised: 2 February 2012