

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (2) :229 - 235; 4 February 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.02.012

草鱼致病性类志贺邻单胞菌的分离与鉴定

胡钱东^{1,2,3}, 林强^{1,3}, 石存斌^{1,3}, 付小哲^{1,3}, 李宁求^{1,3}, 刘礼辉^{1,3}, 吴淑勤^{1,3*}

¹中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业部渔药创制重点实验室, 广东省水产动物免疫技术重点实验室, 广东 广州 510380

²大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁 大连 116023

³淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心, 湖北 武汉 430070

摘要:【目的】分离鉴定引起草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 肌肉糜烂的类志贺邻单胞菌 (*Plesiomonas shigelloide*) 菌株 JX-09。【方法】从患病草鱼分离致病菌, 经形态学观察、人工感染试验、生理生化特性测定和 16S rRNA 基因序列分析对其进行分类鉴定和致病性检验; 同时对分离到的菌株做药物敏感性试验。【结果】从回归感染后的草鱼体内再次分离到菌株 JX-09, 表明该菌株为致病菌; 菌株 JX-09 对草鱼的半致死量为 6.4×10^4 cfu/g。通过生化特征和分子系统学分析, 将菌株 JX-09 鉴定为类志贺邻单胞菌。药敏试验表明该菌株对氨曲南、头孢唑林、头孢噻吩、头孢曲松等头孢类药物敏感, 对卡那霉素、麦迪霉素、万古霉素和哌拉西林等耐药。【结论】类志贺邻单胞菌是草鱼肌肉糜烂病的致病菌, 这是首次报道了该菌对草鱼有致病性。

关键词:类志贺邻单胞菌, 草鱼, 鉴定, 药敏试验

中图分类号: S941 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2014)01-0229-07

草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 属鲤形目鲤科雅罗鱼亚科草鱼属, 是我国淡水养殖的主要养殖对象之一。养殖草鱼因具有饲料价格相对较低而经济效益明显的特点, 深受众多养殖户的喜爱。然而, 随着近年来集约化养殖程度的提高, 草鱼的各种病害频繁发生, 如草鱼“老三病”、草鱼出血病、草鱼细菌性败血症和寄生虫病等, 是困扰草鱼养殖业的主要问题之一^[1-2]。2012年8月, 我们在对江西省草鱼细菌性疾病进行流行病学调查时, 从濒死鱼体内分离到1株菌株 JX-09, 回归感染试验确定其为致病菌。病鱼主要症状为: 鱼眼球突出, 鳃丝发白; 体表浮肿、肌肉糜烂; 肝脏有出血点; 胆囊肿大; 脾脏肿大, 呈紫红色; 肠道有乌黑色内容物; 肛门红肿。经

形态观察、生化特性测定、16S rRNA 基因序列分析将该菌鉴定为类志贺邻单胞菌 (*Plesiomonas shigelloide*)。菌株 JX-09 对健康草鱼的人工感染试验, 可复制出与自然发病草鱼相同的症状, 并从濒死草鱼体内再次分离到该菌, 确定其是致病菌。并进一步研究了该菌株的药敏特性, 以期丰富草鱼细菌性病害的病原资料并为该病的防治提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料和仪器

病样采自江西省某养殖场, 具有明显的临床症状, 规格为 10 - 20 cm。健康草鱼购于广东某养殖

基金项目: 现代产业技术体系建设经费“大宗淡水鱼类产业技术体系”(CARS-46); 国家科技支撑计划(2012BAD25B02); 广州市珠江科技新星专项(2012J2200078)

* 通信作者。Tel: +86-20-81616813; E-mail: wushuqin001@21cn.com

作者简介: 胡钱东(1987-), 男, 四川达州人, 硕士研究生, 专业方向为水产动物疾病与免疫。E-mail: hqd19871114@163.com

收稿日期: 2013-05-17; 修回日期: 2013-07-11

场,暂养在水族箱中供人工感染试验。

脑心浸出液琼脂培养基(北京陆桥有限责任公司);血琼脂平板(广东微生物科技有限公司);药敏实验所用抗生素药物(浙江杭州天和微生物试剂有限公司);PCR反应体系(TaKaRa公司),Labcyler梯度PCR仪(德国SENSO公司);ATB细菌鉴定系统及生化鉴定试剂条ID32E(法国Biomerieux公司);细菌DNA试剂盒(OMEGA Bio-Tek公司)。

1.2 病原分离和纯化

选取具有典型发病症状的濒死草鱼,无菌水冲洗体表后,用75%酒精棉球擦拭体表,在无菌条件下,用接种环取具有典型症状的病鱼的肝、脾、肾和肌肉样品,划线接种脑心浸出液琼脂培养基(BHI)和血琼脂平板,在28℃恒温培养24h;同时取糜烂肌肉涂片、染色后于光学显微镜下观察。挑取优势菌落,经2次纯化培养后,得到菌株JX-09。

1.3 病原形态观察

将纯化后的细菌JX-09分别划线接种于脑心浸出液琼脂培养基和血琼脂平板上,28℃恒温培养24h后观察菌落形态。显微镜观察:取琼脂平板上培养24h的菌体,经涂片、固定和革兰氏染色后,显微镜下观察。

1.4 人工感染试验

1.4.1 回归感染试验:回归感染试验分1个试验组和1个对照组,用相应细菌纯化培养液并稀释,菌液浓度为 4.0×10^8 cfu/mL,对照组注射生理盐水。回归感染试验开始前,暂养草鱼停食48h,然后随机向2个组分取草鱼各15尾。菌液注射剂量为0.2 mL/尾,生理盐水0.2 mL/尾。试验期间水温28-31℃,连续7d观察并记录各组鱼的发病和死亡情况。并对濒死草鱼及时进行解剖和病原菌的再次分离。

1.4.2 半致死浓度:根据文献[3-4]中测定方法,用背鳍基部注射感染健康草鱼的方法来测定JX-09的半致死浓度(LD₅₀)。随机挑取暂养10d的草鱼105尾,规格10-15cm,平均体重50g。随机分为7个组,6个试验组,1个对照组,每组15尾。暂养期间每天投喂一次,试验开始前停食48h。

将细菌纯化培养物经0.65%的无菌生理盐水洗涤并配制成细菌悬液,稀释成所需菌液浓度进行人工背鳍基部注射感染试验。菌液浓度为: 1×10^3 cfu/mL、 1×10^4 cfu/mL、 1×10^5 cfu/mL、 1×10^6 cfu/mL、 1×10^7 cfu/mL、 1×10^8 cfu/mL,每尾注射

剂量0.2 mL;对照组草鱼注射无菌生理盐水0.2 mL/尾。试验期间水温28℃-31℃,连续7d观察并记录各组鱼的发病和死亡情况。

1.5 病原菌鉴定

1.5.1 生理生化鉴定:首先对病原菌进行革兰氏染色;根据染色结果选取相应的生化鉴定试剂条ID32E,按其说明操作,并放入湿盒内28℃下培养24h,用ATB Expression细菌鉴定系统进行生化鉴定。

1.5.2 16S rRNA序列同源性分析:将纯化后的细菌JX-09接种于BHI液体培养基,28℃摇床过夜培养,使用细菌基因组DNA提取试剂盒,按照其方法提取DNA作为PCR反应模板。用于扩增16S rRNA基因的通用引物:上游引物PSF:5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3',下游引物PSR:5'-CTACGGTTACCTGTTCACGAC-3',预期扩增长度1500 bp,由上海博尚生物科技有限公司合成。以细菌组DNA为模板,进行PCR扩增,反应条件为:95℃ 5 min;94℃ 40 s,53℃ 45 s,72℃ 90 s,30个循环;72℃ 8 min。PCR反应结束后,产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测并用胶回收试剂盒回收纯化(OMEGA公司)。回收产物连接到pMD18-T载体中(TaKaRa公司),转化大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态细胞,PCR鉴定挑选阳性克隆,送上海英骏生物技术有限公司进行测序。通过已测得的序列与GenBank中邻近种属的16S rRNA序列进行相似性比较,确定其物种。

1.5.3 序列分析与系统发育树的构建:采用GenBank数据库中Blast软件对测得序列进行相似性比较。根据比对结果,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。

1.6 药物敏感试验

药敏试验采用K-B琼脂法进行。将该菌24h纯化培养物用无菌生理盐水洗下并制成 2.0×10^8 cfu/mL的菌悬液。用灭菌棉签蘸取菌悬液均匀涂布于营养琼脂平板上,然后用无菌镊子将抗生素纸片紧贴在琼脂表面,于28℃下恒温培养24h。记录各药敏纸片抑菌圈的直径,根据药敏纸片生产厂家推荐的抑菌范围解释标准判断实验结果。

2 结果

2.1 病原菌菌落及细胞形态特征

菌株在脑心浸出液培养基中, 培养液均匀混浊, 表面无菌膜生长; 在脑心浸出液琼脂培养基上菌落呈圆形、米黄色不透明, 表面湿润、光滑、微隆起、边缘整齐, 菌落较小, 直径为 1–2 mm。在血琼脂平板上呈灰白色, 不溶血。经革兰氏染色, 镜检可见红色直杆菌, 两端钝圆, 多单个散在。

2.2 回归感染实验和半致死浓度

在草鱼背鳍基部注射 JX-09 感染后, 分离菌株对健康草鱼有较强的致病性, 人工感染草鱼的死亡率为 100%, 对照组无死亡。攻毒草鱼均表现出与

养殖场发病草鱼相同的症状, 并从被感染草鱼的肝脏、脾脏、肾脏和糜烂肌肉中再次分离到相同的病原菌。说明菌株 JX-09 即为该病的病原菌。

当菌株 JX-09 的感染浓度为 4.0×10^8 cfu/mL 时, 能引起草鱼 100% 发病死亡, 当感染浓度为 3.0×10^3 cfu/mL 时, 不会引起草鱼死亡(表 1)。根据表中鱼的死亡结果, 运用 SPSS 13.0 软件计算 JX-09 的 $LD_{50} = 2.56 \times 10^4$ cfu/g。

2.3 生化鉴定结果

分离菌株 JX-09 经革兰氏染色确定为革兰氏阴性菌 (G^-)。经 ATB Expression 生化鉴定仪和 ID32E 生化试剂条鉴定, JX-09 为类志贺邻单胞菌(鉴定率 99.9%, T 值 0.95, 鉴定结果极好)。具体结果如表 2 所示。

表 1. JX-09 对健康草鱼人工感染试验结果

Table 1. Results of artificial infection of JX-09 in grass carp

concentration / (cfu/mL)	number of tested fish	No. of death at different time							mortality
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	
4.0×10^8	15	15	0	0	0	0	0	0	15
4.0×10^7	15	0	10	1	2	1	0	0	14
4.0×10^6	15	0	5	2	2	2	0	0	11
4.0×10^5	15	0	0	3	2	2	0	0	7
4.0×10^4	15	0	0	0	2	1	1	0	4
4.0×10^3	15	0	0	0	0	0	0	0	0

表 2. 分离菌株 JX-09 的生理生化特征

Table 2. Biochemical and physiological characteristics of the isolated strain JX-09

reaction item	result	reaction item	result
D-glucose	+	5-keto-D-gluconate	-
lipase	-	lysine decarboxylase	+
L-arabitol	-	L-arabinose	-
D-mannitol	-	inositol	+
malonate	-	D-galacturonate assimilation	-
D-arabitol	-	D-cellobiose	-
L-aspartate arylamidase	-	adonitol	-
arginine dihydrolase	+	indole	+
D-trehalose	+	β -glucuronidase	-
β -glucosidase	-	α -galactosidase	+
α -maltose	-	α -glucosidase	-
D-maltose	+	urease	-
β -N-acetyl-glucosaminidase	-	D-sorbitol	-
saccharose	-	phenolsulphonphthalein	+
L-rhamnose	-	palatinose	-
ornithine decarboxylase	+	α -galactosidase	+

“+” Positive reaction “-” Negative reaction.

2.4 基于 16S rRNA 基因序列同源性确定菌株 JX-09 的系统发育地位

用通用引物扩增 JX-09 菌株的 16S rRNA, 获得长度为 1502bp 的片段(图 1)。将测定的菌株序列递交到 GenBank 中进行 Blast 同源性分析, 结果表明, 所测基因序列(登录号: KC825332)与已登陆的类志贺邻单胞菌 16S rRNA 相应基因序列的同源性为 98% - 99%, 从中选择同源性较高的类志贺邻单胞菌以及弧菌科其它菌属细菌的 16S rRNA 基因序列, 并以柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare*)为外群, 用 MEGA 4 软件通过邻接法进行系统发育分析, 发现 JX-09 与类志贺邻单胞菌聚为一簇(图 2)。

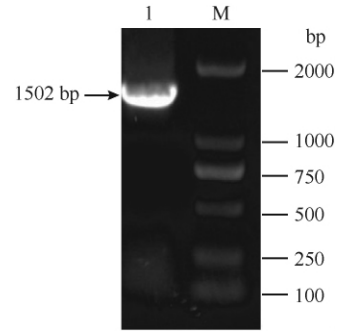


图 1. 菌株 JX-09 16S rRNA 的 PCR 结果

Figure 1. PCR amplified products of 16S rRNA. M, DL2000 DNA Marke; lane 1, JX-09.

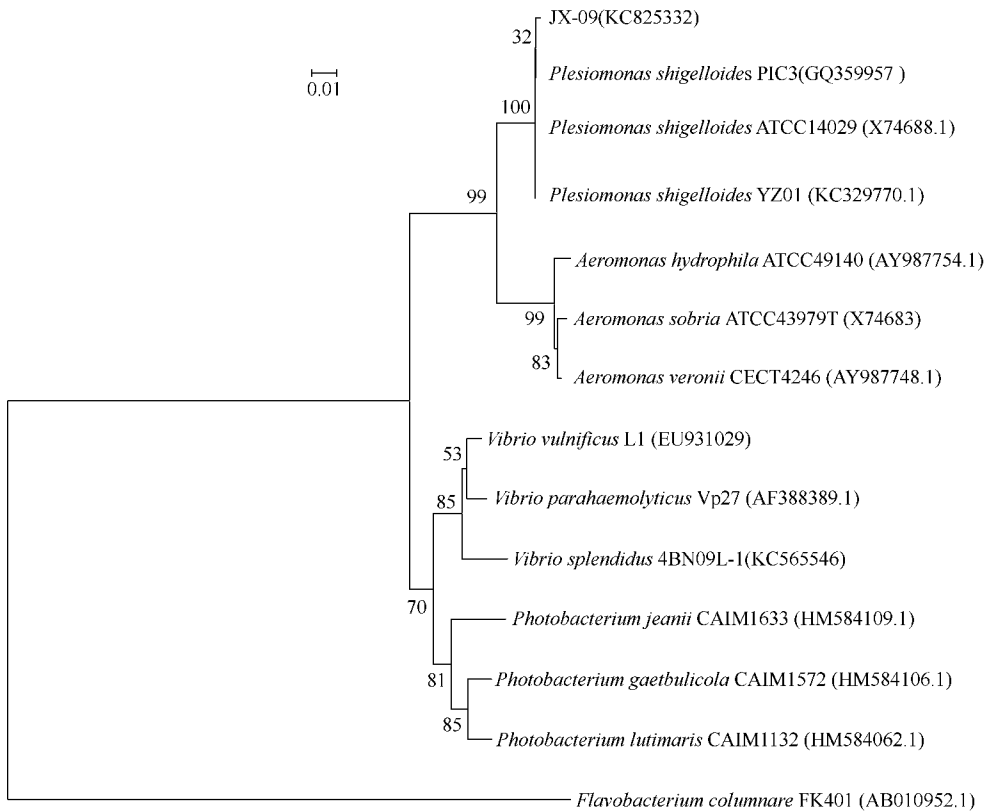


图 2. 菌株 JX-09 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 2. Phylogenetic tree of *Plesiomonas shigelloides* based on 16S rRNA gene sequence of strain JX-09. JX-09 refers to the strain isolated. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 1% sequence divergence.

2.5 药敏试验结果

用 35 种常用药物对菌株 JX-09 做药物敏感性试验, 结果显示: 该菌株对氨曲南等 26 种药物敏感,

对氨苄西林等 5 种药物中介, 对麦迪霉素等 4 种药物耐药(表 3)。

表 3. 药物敏感性试验

Table 3. Antibiotic susceptibility test

antibiotics	sensitivity	antibiotics	sensitivity	antibiotics	sensitivity
aztreonam	S	tobramycin	S	sulfamethoxazole	S
cefazolin	S	gentamicin	S	nitrofurantoin	S
cefalotin	S	oxacillin	S	ampicillin	I
cefuroxim	S	spectinomycin	S	kanamycin	I
cefoperazone	S	chloramphenicol	S	erythromycin	I
cefotaxime	S	amikacin	S	clarithromycin	I
ceftriaxone	S	tetracycline	S	piperacillin	I
cefepime	S	minocycline	S	midecamycine	R
ceftazidime	S	norfloxacin	S	penicillin G	R
cefepime	S	ciprofloxacin	S	vancomycin	R
cefoxitin	S	levofloxacin	S	clindamycin	R
ofloxacin	S	polymyxin	S		
streptomycin	S				

S: Sensitive; I: Intermediate; R: Resistant.

3 讨论

类志贺邻单胞菌 (*Plesiomonas shigelloides*) 是一种革兰氏阴性、能运动、兼性厌氧、氧化酶阳性的细菌,曾与对人类致病的弧菌属和气单胞菌属一起归属于弧菌科,后研究发现其在分子水平跟邻单胞菌和变形杆菌属更为接近,在第二版《系统细菌学伯杰氏手册》中,类志贺邻单胞菌划归到肠杆菌科,邻单胞菌属^[5]。类志贺邻单胞菌广泛分布于自然界中,尤其在水生态环境和动物体内更为常见,是一种世界性分布的细菌,可引起多种疾病的发生^[6-7]。

类志贺邻单胞菌是人类肠胃炎的主要病因之一,也可引起人类菌血症、蜂窝组织炎、脑膜炎等肠外感染^[8-9]。该菌也可感染赤麻鸭、犬,引起肠道疾病,导致死亡^[10-11]。鱼类是类志贺邻单胞菌常见的宿主^[12],该菌对许多种类水生动物有致病性,例如,亚洲龙鱼、革胡子鲶、鳊、斑点叉尾鲷和虹鳟等^[13-17]。国内的报道仅见于黄颡鱼、罗氏沼虾、斑点叉尾鲷、淡红墨头鱼、达氏鳊、异育银鲫和牛蛙等动物感染死亡的研究报道^[18-24]。本研究首次在患病草鱼体内分离到致病性菌株 JX-09。根据 API 生化鉴定结果和 16S rRNA 基因序列分析,可以确定该菌株为类志贺邻单胞菌。由类志贺邻单胞菌引起的草鱼病害尚属首次报道。这些研究表明,类志贺邻单胞菌是一种人-兽-鱼共患病原菌。因此,在草鱼的集约化养殖中,不仅要注重草鱼的健康养殖,还要注意水体中微生物对人类健康的影响。

我们调查中发现,该菌引起的疾病主要发生在

夏秋高温季节和水质较差的池塘,并且如果养殖水体受到该类病原的污染,通过水流的传播,容易造成该类疾病的流行。因此,在草鱼的集约化养殖过程中要加强管理,选择优质饲料、注意池塘底质的生态养护,做好水体消毒工作。一旦发现病情,就应该立即治疗,发病池塘的水也不能乱排放,以免传染。这些措施不仅能减少因鱼类死亡给渔民所造成的损失,还能从一定程度上阻断人类感染类志贺邻单胞菌的途径。

日益严重的药物残留、环境污染和细菌耐药现象已经成为一个世界关注的兽医公共卫生问题。对分离到的该致病菌株耐药性分析发现, JX-09 对氨基曲南、头孢唑啉等药物敏感,对氨基西林、红霉素等中介,对克林霉素、万古霉素耐药。这些结果与陆文浩等^[23]和陈林等^[20]的试验结果不同:陆文浩等分离的菌株对头孢唑林、头孢呋辛和四环素均中介;陈林等分离的菌株对复方新诺明耐药,对四环素、阿米卡星和庆大霉素等中介。这些菌株间的耐药性差异可能由于分离自不同地方、不同环境或者不同宿主,菌株因接触不同的药物环境影响而产生的耐药性变异,这可能是抗生素滥用的结果,也为治疗带来很大的困难。

参考文献

- [1] Li Y, Xiao T. Advances in research of disease-resistant transgenic grass carp. *Biotechnology Bulletin*, 2011, (1): 26-28. (in Chinese)
李耀国, 肖调义. 转基因抗病草鱼研究进展. *生物技术通报*, 2011, (1): 26-28.
- [2] Liu F, Li J. The research progress of immune factors in

- grass carp. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2009, 18(4): 502-507. (in Chinese)
- 刘峰, 李家乐. 草鱼免疫因子研究进展. 上海海洋大学学报, 2009, 18(4): 502-507.
- [3] 沈建忠. 动物毒理学. 北京: 中国农业出版社, 2002: 12.
- [4] Li N, Guo H, Jiao R, Zhang S, Liu Z, Yao W, Nie P. Identification and pathogenicity of bacterial pathogens isolated in an outbreak on bacterial disease of *Ctenopharyngodon idellus*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(6): 980-987. (in Chinese)
- 李楠, 郭慧芝, 焦冉, 张书环, 刘志新, 姚卫建, 聂品. 草鱼的一种急性细菌性传染病病原的分离鉴定及致病性研究. 水生生物学报, 2011, 35(6): 980-987.
- [5] Ruimy R, Breittmayer V, Elbaze P, Lafay B, Boussemart O, Gauthier M, Christen R. Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences. *International journal of systematic bacteriology*, 1994, 44(3): 416-426.
- [6] Ma J, Yang G, Shi X. Disease surveillance based information technology platform in China. *Disease Surveillance*, 2006, 21(1): 1-3. (in Chinese)
- 马家奇, 杨功焕, 施晓明. 基于 IT 技术平台的中国疾病监测. 疾病监测, 2006, 21(1): 1-3.
- [7] Gonz ález-Rey C. Studies on *Plesiomonas shigelloides* isolated from different environments. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae*, 2003, 6:1-45.
- [8] Khan AM, Faruque ASG, Hossain MS, Sattar S, Fuchs GJ, Salam MA. *Plesiomonas shigelloides*-associated diarrhoea in Bangladeshi children: a hospital-based surveillance study. *Journal of tropical pediatrics*, 2004, 50(6): 354-356.
- [9] Ozdemir O, Sari S, Terzioglu S, Zenciroglu A. *Plesiomonas shigelloides* Sepsis and Meningoencephalitis in a Surviving Neonate. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2010, 43(4): 344-346.
- [10] Chen W, Wang Q, Niu L, Zhao B, Yu X, Deng J. Diagnosis and treatment of a pathogenic strain of *Plesiomonas shigelloides* from *Tadorna ferruginea*. *Sichuan Animal & Veterinary Sciences*, 2006, 12:47. (in Chinese)
- 陈维刚, 王强, 牛李丽, 赵波, 余星明, 邓家波. 赤麻鸭类志贺邻单胞菌感染的诊治. 四川畜牧兽医, 2006, 12: 47.
- [11] Li F, Wang C, Yang S, Song J, Li C. Isolation identification and sequence analysis of a *Plesiomonas shigelloides* isolate from dog. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2012, 32(12): 1824-1827. (in Chinese)
- 李富祥, 王传禹, 杨仕标, 宋建领, 李春华. 1 株犬类志贺邻单胞菌的分离鉴定及序列分析. 中国兽医学报, 2012, 32(012): 1824-1827.
- [12] Miller WA, Miller MA, Gardner IA, Atwill ER, Byrne BA, Jang S, Harris M, Ames J, Jessup D, Paradies D, Worcester K, Melli A, Conrad PA. *Salmonella* spp., *Vibrio* spp., *Clostridium perfringens* and *Plesiomonas shigelloides* in marine and freshwater invertebrates from coastal California ecosystems. *Microbial ecology*, 2006, 52(2): 198-206.
- [13] Jun JW, Kim JH, Choresca Jr CH, Shin SP, Han JE, Jeong DS, Park SC. Isolation and molecular detection of *Plesiomonas shigelloides* containing *tetA* gene from Asian arowana (*Scleropages formosus*) in a Korean aquarium. *African Journal of Microbiology Research*, 2011, 5(28): 5019-5021.
- [14] Parvez N, Rathore G, Swaminathan TR, Qureshi TA. Isolation and characterization of bacteria associated with ulcerative disease of the fish, *Clarias gariepinus*. *Bulletin of Pure & Applied Sciences-Zoology*, 2011, 30(2): 85-92.
- [15] Joh SJ, Ahn EH, Lee HJ, Shin GW, Kwon JH, Park CG. Bacterial pathogens and flora isolated from farm-cultured eels (*Anguilla japonica*) and their environmental waters in Korean eel farms. *Veterinary Microbiology*, 2012, 163(2): 190-195.
- [16] Lingham T, Besong S, Ozbay G, Lee JL. Antimicrobial activity of vinegar on bacterial species isolated from retail and local channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Food Process Technol*, 2012, 2: 25-28.
- [17] Salgado-Miranda C, Palomares E, Jurado M. Isolation and distribution of bacterial flora in farmed rainbow trout from Mexico. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2010, 22(4): 244-247.
- [18] Wu S, Tian J, Wang G, Li W, Zou H. Characterization of bacterial community in the stomach of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28(5): 2165-2174.
- [19] Pan F, Fang P, Chen H. Researches on the effective drugs for the pathogenic bacterium in diseased *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Aquaculture*, 2007, 28(6): 39-41. (in Chinese)
- 潘瑶, 方苹, 陈辉. 罗氏沼虾几种病原菌防治药物的筛选. 水产养殖, 2007, 28(6): 39-41.
- [20] Chen L, Tan A, Zou W. Identification and characteristics of a pathogenic bacterial strain from channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2009, 24(3): 200-205. (in Chinese)
- 陈林, 谭爱萍, 邹为民. 斑点叉尾鮰致病菌株的鉴定及特性. 大连水产学院学报, 2009, 24(3): 200-205.
- [21] Yu H, He Z, Yan Y, Yang G, Hu J, Zhou M. Identification of *Plesiomonas shigelloides* and *Aeromonas schuberti* from doctor fish (*Garra rufa*) and antibiotics sensitivity. *Chinese Journal of Animal Health Inspection*,

2009, 26 (7) : 37-39. (in Chinese)

余华, 何智, 严玉宝, 杨光友, 胡娟, 周岷江. 温泉鱼致病性类志贺邻单胞菌和舒氏气单胞菌的分离鉴定和药敏试验. 中国动物检疫, 2009, 26 (7) : 37-39.

- [22] Cao H, Yang X, Gao P, Li Y, Zhang S, Deng L. Preliminary study of the pathogens isolated from bacterial septicaemia syndrome of sturgeons. *Freshwater Fisheries*, 2007, 37 (2) : 53-56. (in Chinese)

曹海鹏, 杨先乐, 高鹏, 李怡, 张书俊, 邓璐. 鲟细菌性败血综合征致病菌的初步研究. 淡水渔业, 2007, 37 (2) : 53-56.

- [23] Lu W, Yang J, Chen H, Gu W, Yang Y. Identification

of *Plesiomonas shigelloides* from hybridized prussian carp (*Carassius auratus gibelio* ♀ × *Cyprinus carpio* ♂). *Freshwater Fisheries*, 2009, 39 (2) : 48-53. (in Chinese)

陆文浩, 杨家新, 陈辉, 顾伟, 杨鸾劫. 异育银鲫类志贺邻单胞菌的鉴定. 淡水渔业, 2009, 39 (2) : 48-53.

- [24] Liu X, Huang C, Zou Y, Fang P. Diseased American bullfrog *Rana Catesbeiana*: Pathogen identification and medicine screening. *HeBei Fisheries*, 2011 (002) : 41-43. (in Chinese)

刘训猛, 黄春贵, 邹勇, 方苹. 发病牛蛙病原鉴定及防治药物筛选. 河北渔业, 2011 (002) : 41-43.

Isolation and identification of a pathogenic *Plesiomonas shigelloides* from diseased grass carp

Qiandong Hu^{1,2,3}, Qiang Lin^{1,3}, Cunbin Shi^{1,3}, Xiaozhe Fu^{1,3}, Ningqiu Li^{1,3}, Lihui Liu^{1,3}, Shuqin Wu^{1,3*}

¹Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology, Guangdong Province, Guangzhou 510380, Guangdong Province, China

²College of Fisheries and Life Science, DaLian Ocean University, Dalian 116023, Liaoning Province, China

³Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, Hubei Province, China

Abstract: [Objective] The aim of this study is to identify strain JX-09 and confirmed that the strain is the pathogen of diseased grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). [Methods] A pathogenic strain JX-09 was isolated from the diseased grass carp. The strain was identified based on physiological and biochemical characteristics, and the sequence analysis of 16S rRNA. Virulence of strain JX-09 to healthy grass carp was also tested. Furthermore, drug sensitivity was detected with Kirby-Bauer's agar diffusion method. [Results] Strain JX-09 was identified as *Plesiomonas shigelloides* by biochemical analysis and molecular biology. The *P. shigelloides* strain was re-isolated from the artificial infected grass carp, and the LD₅₀ was about 6.4 × 10⁴ cfu/g. Drug sensitive tests showed that strain JX-09 was susceptible to aztreonam, cefazolin, cephalothin and ceftriaxone, and resistant to kanamycin, medicamycin, vancomycin and piperacillin. [Conclusion] Strain JX-09 was the pathogen of grass carp with muscle erosive disease. To the best of our knowledge, this is the first report that *P. shigelloides* as the pathogenic strain of grass carp.

Keywords: *Plesiomonas shigelloides*, *Ctenopharyngodon idellus*, appraise, antibiotic sensitivity analysis

(本文责编:王晋芳)