

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (4) :442 - 448; 4 April 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.04.011

杂交鲟海豚链球菌的分离、鉴定及药物敏感性

王小亮, 徐立蒲*, 王静波, 王姝, 曹欢

北京市水产技术推广站, 北京 100021

摘要: 【目的】2012年7月,北京市怀柔区一家养殖场的杂交鲟爆发疾病,陆续死鱼。为确定病原,【方法】从具有典型症状的患病鱼的肝、肾和脾中分离获得3株分离菌,编号HRS12718L、HRS12718K和HRS12718S。采用形态特征、理化特性、16S rDNA和海豚链球菌特异性基因逐步鉴定病原菌的种类。取HRS12718K分离株进行人工感染实验,确认病原菌的致病性。开展药物敏感性实验筛选分离株的敏感药物。【结果】结果显示3株分离菌的形态特征和理化特性与从中国其它鱼类分离的海豚链球菌一致。采用16S rDNA序列构建的进化树与海豚链球菌聚为一支,与海豚链球菌的同源性在99.1%以上。HRS12718K分离株对杂交鲟的半致死量LD₅₀为4.42 × 10⁵ CFU/mL,试验感染鱼出现与自然发病鱼相似临床症状。分离株对诺氟沙星、噁诺沙星、硫酸新霉素、盐酸多西环素和盐酸四环素敏感,尤其对噁诺沙星敏感。【结论】最终确认引起该养殖场杂交鲟发病的病原为海豚链球菌,建议使用噁诺沙星进行治疗。

关键词: 杂交鲟, 海豚链球菌, 鉴定, 药物敏感性

中图分类号: S917.1 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2014)04-0442-07

鲟鱼肉味鲜美,营养丰富,是一种经济价值很高的大型鱼类。中国养殖的鲟鱼主要种类有西伯利亚鲟 (*Acipenser baerii*)、施氏鲟 (*Acipenser schrencki*)、杂交鲟 (*Huso dauricus* ♀ × *Acipenser schrencki* ♂)、俄罗斯鲟 (*Acipenser gueldenstaedti*) 和匙吻鲟 (*Polyodon spathula*) 等。其中,杂交鲟具有生长快、抗病力强、怀卵量大等优点,已成为仅次于西伯利亚鲟和施氏鲟的主要养殖品种^[1]。近年来,中国的鲟鱼养殖规模不断扩大,养殖产量逐年增加。随之而来的是养殖鲟鱼的疾病爆发更加频繁,严重制约鲟鱼养殖业的健康发展。目前,已报道的鲟鱼致病菌有嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)^[2-5]、豚鼠气单胞菌

(*Aeromonas carvia*) 和类志贺邻单胞菌 (*Plesiomonas shigelloides*)^[6-7]、停乳链球菌 (*Streptococcus dysgalactiae*)^[8]。

2012年7月初,北京市怀柔区梭草的养殖场养殖的杂交鲟出现陆续死亡,持续约10 d,累计死亡率达30%。发病鱼体长35 - 40 cm,发病池水温在20 - 26℃,养殖水体含大量悬浮物。本研究从发生传染性疾病的病鲟分离病原,采用生理生化特性及16S rDNA基因序列鉴定病原菌,开展感染试验确认分离株的致病性,筛选病原菌的敏感性药物。旨在为鲟鱼的细菌性疾病防控提供依据。

基金项目:北京市科委重大项目(D121100003712003);北京市农业科技项目(PXM2012_036237_000012);北京市鲟鱼、鲑鳟鱼创新团队项目(2013)

* 通信作者。Tel: +86-10-89559484; E-mail: bjbk@163.com

作者简介:王小亮(1981-),男,河南人,硕士,主要从事水产动物病害防治的研究。E-mail: wxldynasty@163.com

收稿日期:2013-08-29;修回日期:2013-10-18

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼: 病鱼取自北京市怀柔区梭草的一家养殖场。病鱼的主要特征为部分鱼眼珠浑浊发白, 口周围、腹部有出血点或出血斑, 体表、鳍条基部有果冻样突起, 肛门红肿。解剖后发现肝脏大面积出血, 脾脏肿大, 肾脏糜烂, 性腺表面有出血点, 肠道内无食物、后肠肠壁充血。制作鳃的水滴片于显微镜下观察, 未发现寄生虫和真菌。

人工感染试验所用杂交鲟购于北京市密云县北庄养殖场。试验鲟鱼体色正常、体表无损伤、活力较好, 平均体长 (15.4 ± 2.2) cm, 体重 (26.61 ± 3.62) g。暂养 10 d, 使其恢复体能、适应环境。

1.1.2 主要试剂: 脑心浸液琼脂培养基 (BHIA) 购于北京陆桥生物技术有限公司。革兰氏染色试剂盒和荚膜染色试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司。哥伦比亚血琼脂培养基 (BA) 和 API 20 STREP 鉴定试剂条购于北京威泰科生物技术有限公司。UNI-Q-10 柱式细菌基因组抽提试剂盒购于上海生物工程有限公司。抗菌药物购于美国 Sigma 公司。

1.2 病原菌分离、纯化

随机取具典型症状的患病鲟鱼两尾, 无菌操作从肝、脾和肾划线分离于 BHIA 平板, 于 28℃ 恒温培养箱培养 48 h, 各个平板均获得大量形态一致的小菌落。挑取单菌落于 BA 再次划线分离, 获得纯化菌株。共获得 3 株分离菌, 编号 HRS12718L (肝)、HRS12718K (肾) 和 HRS12718S (脾)。纯化菌株于脑心浸液肉汤培养基 (BHI) 28℃ 培养 24 h, 分装后加 30% 甘油于 -80℃ 保存。

1.3 分离株的形态观察和生理生化特征

单菌落划线分离于 BHIA, 28℃ 培养 48 h 观察菌落形态, 进行氧化酶和触酶实验; 划线分离于 BHIA 平板上, 28℃ 培养 5 d 观察菌落形态和溶血性。单菌落接种于含有 10% 灭活胎牛血清的 BHI 肉汤中, 36℃ 孵育 4 h, 5000 × g 离心 2 min, 去上清, 适量 1% 的生理盐水重悬, 涂片, 采用革兰氏染色试剂盒和荚膜染色试剂盒染色, 油镜下观察。单菌落接于 BHI 培养基, 分别置于 10℃ 和 45℃ 培养 5 d 观察生长情况。配制盐度为 1%、3% 和 6.5% BHI 培养基, 接种后置于 28℃ 培养 3 d, 观察生长情况。采

用 API 20 STREP 细菌鉴定试剂条鉴定生化特征。

1.4 分离株的 PCR 鉴定、16S rDNA 基因序列测定与系统发育分析

病原菌的 DNA 模板制备采用 UNI-Q-10 柱式细菌基因组抽提试剂盒提取, 置于 -20℃ 保存备用。细菌 16S rDNA 序列扩增通用引物^[9] For: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', Rev: 5'-TACGGCTACCTTGTACGCTT-3' (55℃ 退火), 海豚链球菌特异性基因 Sin1 的引物^[10] For: 5'-CTAGAGTACACATGTACTNAAG-3', Rev: 5'-GGATTTTCCACTCCATTAC-3' (52℃ 退火), 引物均由上海生物工程有限公司合成。PCR 反应体系 50 μL, 包括 10 × PCR 缓冲液 5 μL, 25 mmol/L 氯化镁 5 μL, 5 U/μL Taq 酶 0.25 μL, 10 mmol/L dNTP 1 μL, 模板 DNA 2 μL, 20 pmol/μL 上下游引物各 2 μL, DEPC 水补至 50 μL。PCR 反应条件为 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 1 min, 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 32 个循环后 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。PCR 扩增产物纯化后, 由上海生工生物工程技术公司进行基因序列测定。

将分离菌的 16S rDNA 基因序列通过 NCBI 的 Blast 检索系统进行序列同源性分析, 从中选取与所获序列同源性较高的同种菌株的 16S rDNA 基因序列, 并从 GenBank 数据库中获得同属相关种的 16S rDNA 序列, 利用 MEGA 4.0 采用邻位连接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统发育树, 通过自举分析进行置信度检测, 自举数集 1000 次。

1.5 分离株的人工感染试验

取肾脏的分离株 (编号 HRS12718K) 进行人工感染试验。将菌株接种到 BHIA 斜面, 28℃ 培养 24 h, 用 PBS (0.02 mol/L, pH 7.2) 洗脱获得菌悬液, 以 McFarland 比浊法设定细菌浓度, 分别制成浓度 5.9×10^8 、 5.9×10^7 、 5.9×10^6 、 5.9×10^5 、 5.9×10^4 CFU/mL 的菌悬液, 备用。

取健康鲟鱼分为 6 组, 每箱盛 80 L 消毒、暴气 3 天的地下水, 放鱼 8 尾。其中 5 箱注射相应浓度的菌悬液进行感染, 1 箱为试验对照, 注射 PBS。采取腹腔注射, 注射剂量均为每尾 0.2 mL。试验周期为两周, 水温控制在 25℃, 期间充氧、不投食、不换水, 自注射后第 2 天记录各组的死亡数量。死亡鱼解剖, 记录症状和每箱随机选取 2 尾进行病原菌分离、鉴定。采用改良寇氏法计算半致死剂量^[11]。

1.6 分离株的药物敏感性

试验方法采用 CLSI 抗微生物药物敏感性试验执行标准中的浓度梯度稀释法, 培养温度设置为 28℃。试验设立空白对照。结果记录最小抑菌浓度 (MIC), 依据 CLSI 标准判断敏感和耐药, 标准内没有的药物依同类药物判断。

2 结果

2.1 分离株的形态特征与生化特征

分离菌在 BHIA 平板上 28℃ 培养 72 h 的菌落特征为: 白色、圆形、边缘齐整、扁平、直径约 0.5 - 1.0 mm。在 BA 平板上 28℃ 培养 48 h, 菌落为圆形, 中心白色, 周边半透明, 形成 β 溶血环。氧化酶阴性, 触酶阴性, 革兰氏染色阳性, 卵圆形, 呈链状或双排链状 (图 1)。荚膜染色显示有荚膜 (图 2)。可以在 1%、3% 盐度的培养基中生长。10℃ 生长, 45℃ 不生长。

采用 API 20 STREP 系统鉴定编号 HRS12718L 和 HRS12718K 分离株的生化特征编码值为 4563117, 编号为 HRS12718S 分离株的编码值为 4562117, 均在鉴定编码手册无法查询。编号 HRS12718L 和 HRS12718K 分离株与编号 HRS12718S 分离株仅精氨酸双水解酶生化特征不一致。3 株分离菌与 Buller 等^[12] 报道的国外分离株的生化特征在 β -葡萄糖醛酸酶、核糖和甘露醇项目不同, 而与 Zhou 等^[13] 报道的中国分离株的生化特征完全一致。具体见表 1。



图 1. 杂交鲟肾脏分离株 HRS12718K 的革兰氏染色形态 (1000 ×)

Figure 1. Micrograph of strain HRS12718K isolated from the kidney of hybrid sturgeon (1000 ×).

表 1. 3 株分离菌的生理生化试验结果

Table 1. Results of biochemical characteristics of strain HRS12718K, HRS12718L and HRS12718S.

items	HRS	HRS	HRS	S.	S.
	12718L	12718K	12718S	<i>iniae</i> ^[12]	<i>iniae</i> ^[13]
10℃	+	+	+	+	+
45℃	-	-	-	-	-
1% NaCl	+	+	+	-	ND
3% NaCl	+	+	+	+	ND
6.5% NaCl	-	-	-	-	-
oxidase	-	-	-	-	-
catalase	-	-	-	-	-
hemolysis	β	β	β	β	β
V-P	-	-	-	-	-
hippurate	-	-	-	-	-
esculin	+	+	+	+	+
pyrrolidonyl arylamidase	+	+	+	+	+
α -galactosidase	-	-	-	-	-
β -glucuronidase	+	+	+	-	+
β -galactosidase	-	-	-	-	-
alkaline phosphatase	+	+	+	+	+
leucine aminopeptidase	+	+	+	+	+
arginine	+	+	+	+	+
ribose	+	+	+	-	+
arabinose	-	-	-	-	-
mannitol	+	+	+	-	+
sorbitol	-	-	-	-	-
lactose	-	-	-	-	-
trehalose	+	+	+	+	+
inulin	-	-	-	-	-
raffinose	-	-	-	-	-
amidon	+	+	+	+	+
glycogen	+	+	+	+	+

“+” positive “-” negative “ND” No done.



图 2. 杂交鲟肾脏分离株 HRS12718K 的荚膜染色形态 (1000 ×)

Figure 2. Capsule strain HRS12718K isolated from the kidney of hybrid sturgeon (1000 ×). Note: The bacteria were blue, capsule marked red, as a baby blue background.

2.2 16S rDNA 基因序列分析及系统发育树构建

PCR 扩增分离株 HRS12718K 的 16S rDNA 基因片段约 1500 bp, 海豚链球菌特异性基因阳性, 大小为 300 bp (图 3)。16S rDNA 克隆测序获得 1513 bp 的片段, 提交 GenBank 后获取的检索号为 KF264475。经 Blast 同源性检索, 发现其与海豚链球菌的同源性最高, 在 99.1% 以上; 与副乳房链球菌的同源性为 97.6%, 与停乳链球菌的同源性为 97.2%, 与无乳链球菌的同源性为 97.0%。构建系统发育树, 显示其与海豚链球菌聚为一支, 与日本从锦鲤上获得的分离株亲缘关系最近 (图 4)。

2.3 人工感染实验结果

人工感染实验表明: 各实验组杂交鲟在注射菌悬液 2 天后开始死亡, 第 3 天出现死亡高峰, 每组 3-4 尾, 第 4-5 天死亡 1-2 尾, 后期至实验结束不再死亡。死亡鱼的主要症状为口周围和颊部有出血斑, 肛门红肿, 腹腔有少量腹水, 肝脏肿大, 有出血点, 脾肾肿大。感染死亡鱼未出现眼球突出、发白、浑浊症状。对照组实验期间未出现死亡, 也未出现病理症状。随机从人工感染的濒死鱼肾脏进行病原菌分离, 得到大量形态高度一致的菌落, 其菌落形

态、大小与首次分离到的菌落相同, API 系统鉴定的生化特征与 HRS12718K 分离株一致。结果表明海豚链球菌是杂交鲟的致病菌。依据人工感染实验结果 (见表 2), 计算出分离株 HRS12718K 对杂交鲟的 LD_{50} 为 4.42×10^5 CFU/mL。

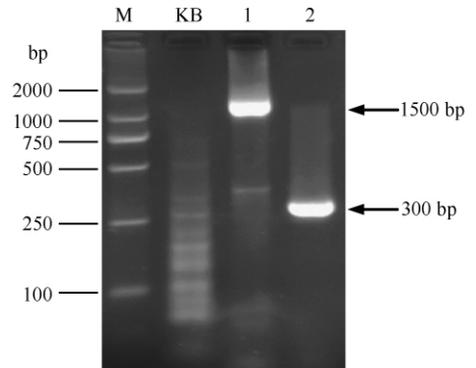


图 3. 杂交鲟分离株 HRS12718K 的 16S rDNA 基因和海豚链球菌特异性基因 PCR 扩增结果

Figure 3. PCR amplification of 16S rDNA gene and SinI gene of strain HRS12718K isolated from hybrid sturgeon. M: DNA marker DL2000; KB: blank control; lane 1: 16S rDNA of strain HRS12718K; lane 2: SinI gene of strain HRS12718K.

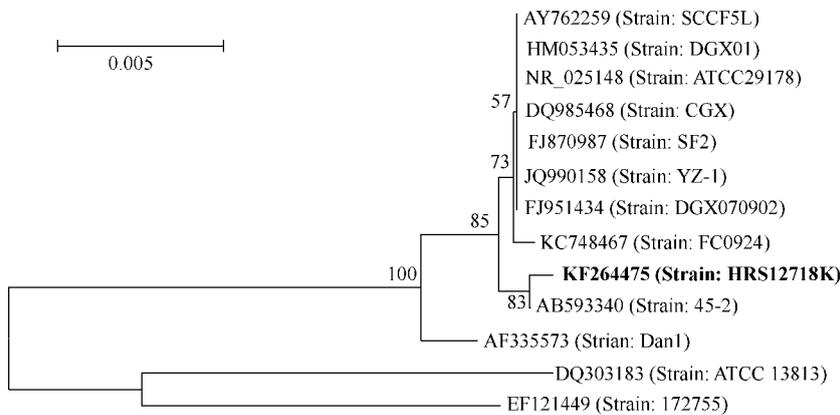


图 4. 菌株 HRS12718K 的 16s DNA 系统发育树

Figure 4. Phylogenetic tree based on 16S rDNA gene partial sequence of stain HRS12718K. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. The scale bar represents 0.005 nucleotide changes per position.

表 2. 菌株 HRS12718K 的人工感染杂交鲟试验结果

Table 2. Results of experimental infection of hybrid sturgeon with stain HRS12718K.

group	<i>c</i> (bacteria) / (CFU/mL)	injected volume / mL	number of trials	number of deaths	mortality / %
1	5.9×10^8	0.2	8	8	100
2	5.9×10^7	0.2	8	7	87.5
3	5.9×10^6	0.2	8	7	87.5
4	5.9×10^5	0.2	8	4	50.0
5	5.9×10^4	0.2	8	3	37.5
control	PBS	0.2	8	0	0

2.4 药物敏感性试验

药敏结果显示:分离株对诺氟沙星、恩诺沙星、硫酸新霉素、盐酸多西环素和盐酸四环素敏

感。而对土霉素、氟苯尼考和甲砒霉素不敏感。其中,分离株对恩诺沙星最为敏感,敏感浓度小于 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,见表 3。

表 3. 病鲟鱼不同器官来源分离株的药敏试验 (MIC) 结果

Table 3. The drug sensitivity test (MIC) of strains sourced from different organs of ill sturgeon

category	c (drugs) / ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	HRS12718L	HRS12718K	HRS12718S
fluoroquinolones	norfloxacin	1 (S)	2 (S)	1 (S)
	enrofloxacin	0.25 (S)	≤ 0.25 (S)	≤ 0.25 (S)
aminoglycosides	neomycin sulfate	1 (S)	2 (S)	0.5 (S)
tetracyclines	doxycycline hyclate	2 (S)	2 (S)	0.5 (S)
	oxytetracycline	16 (R)	32 (R)	8 (S)
	tetracycline hydrochloride	1 (S)	1 (S)	1 (S)
chloramphenicol	florfenicol	8 (R)	8 (R)	8 (R)
	thiamphenicol	16 (R)	16 (R)	8 (S)

R. resistance; S. sensitive.

3 讨论

通过对具有典型临床症状的发病杂交鲟进行病原菌初次分离,获得大量形态一致的菌落。纯化菌株的生化特征与从中国其它鱼类分离的海豚链球菌一致,具有海豚链球菌的特异性基因 *Sin1* (300 bp),其 16S rDNA 基因序列与海豚链球菌的同源性在 99.1% 以上,综合确定分离株为海豚链球菌。人工感染杂交鲟,出现与自然发病基本一致的临床症状,并可再次分离到此菌,显示该菌为引起杂交鲟的致病菌,属首次报道。

海豚链球菌自 1976 年从亚马逊河豚 (*Inia geoffrensis*) 皮肤脓肿处分离^[14],目前在全世界范围内流行,可感染海水、半咸水和淡水的二十多种养殖或野生鱼类^[15]。曾经认为链球菌在自然条件下不感染鲟鱼。1993 年,Kitao 等暗示鲟鱼也是链球菌感染的敏感对象^[16]。2006 年,Roy 和 Ruth 发现链球菌感染鲟鱼病例^[17],证实了 Kitao 等的预测。2009 年,潘厚军等^[8]和杨五名等^[18]证实感染鲟鱼的链球菌种类为停乳链球菌。本文确认海豚链球菌亦可感染鲟鱼发病。

链球菌在水中普遍存在^[19],当养殖密度大,水质环境差,水温 25 $^{\circ}\text{C}$ 时可引起养殖对象发生慢性疾病,水温 28–32 $^{\circ}\text{C}$ 时多会导致急性感染^[20]。北京地区每年 7–8 月份养殖池塘水温可在 25 $^{\circ}\text{C}$ 以上,刚好是链球菌病的适宜发病水温。暗示我们降温可能是预防链球菌病的一个措施。同时,本文的分离

株 HRS12718K 与 Yuya 等^[21]从日本锦鲤的肠道中分离到海豚链球菌(编号 45-2)的 16S rDNA 序列亲缘关系最近,可能暗示链球菌可随养殖品种传播,并在适宜条件下导致鱼类发病。

参考文献

- [1] Cui H, He J, Zheng W. Analysis on the industry and development of sturgeon in China. *China Fisheries*, 2006, (6):8-9. (in Chinese)
崔禾,何建湘,郑维中. 我国鲟鱼产业现状分析及发展建议. 中国水产, 2006, (6):8-9.
- [2] Yang Z. Isolation and identification of *Aeromonas hydrophila* from sturgeons. *Freshwater Fisheries*, 2001, 31(5):40-41. (in Chinese)
杨治国. 鲟鱼嗜水气单胞菌的分离及鉴定. 淡水渔业, 2001, 31(5):40-41.
- [3] Meng Y, Xiao H, Zhang L, Li L, Zeng L. Isolation and identification of hemorrhagic septicemia pathogen of amur sturgeon, *Acipenser schrenckii* Brandt. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2007, 26(6):822-826. (in Chinese)
孟彦,肖汉兵,张林,李罗新,曾令兵. 施氏鲟出血性败血症病原菌的分离和鉴定. 华中农业大学学报, 2007, 26(6):822-826.
- [4] Li Y, Cao H, He S, Yang X. Isolation and identification of *Aeromonas hydrophila* Strain X1 from *Acipenser baerii* and its antibiotic sensitivity. *Microbiololgy China*, 2008, 35(8):1186-1191. (in Chinese)
李圆圆,曹海鹏,何姗,杨先乐. 鲟源致病性嗜水气单胞菌 X1 的分离鉴定与药敏特性研究. 微生物学通报,

- 2008, 35 (8) :1186-1191.
- [5] Zhao F, Cao J, Liu Q. Study on pathology and etiology of hemorrhagic septicemia in *Acipenser baerii*. *Acta Hydrobiologia Sinica*, 2009, 33 (2) : 316-323. (In Chinese)
赵凤岐, 曹谨玲, 刘青. 西伯利亚鲟败血症病理学观察与病原学研究. *水生生物学报*, 2009, 33 (2) : 316-323.
- [6] Cao H, Yang X, Gao P, Li Y, Zhang S, Deng L. Preliminary study of the pathogens isolated from bacterial septicaemia syndrome of sturgeon. *Freshwater Fisheries*, 2007, 37 (2) :53-56. (in Chinese)
曹海鹏, 杨先乐, 高鹏, 李怡, 张书俊, 邓璐. 鲟细菌性败血症综合征致病菌的初步研究. *淡水渔业*, 2007, 37 (2) : 53-56.
- [7] Wang X, Xu L, Cao H, Wang J, Wang S. Identification and drug sensitivity of a *Plesiomonas shigelloides* from diseased sturgeons. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53 (7) :723-729. (in Chinese)
王小亮, 徐立蒲, 曹欢, 王静波, 王姝. 鲟致病性类志贺邻单胞菌的鉴定、致病性及药敏特性. *微生物学报*, 2013, 53 (7) :723-729.
- [8] Pan H, Liu X, Chang O, Wang Q, Sun H, Liu R, Fu X, Liu Y, Wu S. Isolation, Identification and pathogenicity of *Streptococcus dysgalactiae* from siberian sturgeon, *Acipenser baerii*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, 16 (6) :891-904. (in Chinese)
潘厚军, 刘晓勇, 常藕琴, 王庆, 孙慧武, 刘瑞明, 付小哲, 刘雨果, 吴淑勤. 西伯利亚鲟停乳链球菌的分离、鉴定与致病性. *中国水产科学*, 2009, 16 (6) :891-904.
- [9] Polz MF, Cavanaugh CM. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Applied Environmental Microbiology*, 1998, 64 (10) :3724-3730.
- [10] Zlotkin A, Hershko H, Eldar A. Possible transmission of *Streptococcus iniae* from wild fish to cultured marine fish. *Applied Environmental Microbiology*, 1998, 64 (10) : 4065-4067.
- [11] Zou Y, Zhang P, Mo Z, Liu T, Xu Y. Isolation and identification of hemorrhagic septicemia pathogen of turbot, *Scophthalmus maximus*. *High Technology Letters*, 2004, (4) :89-93. (in Chinese)
邹玉霞, 张培军, 莫照兰, 刘婷, 徐永立. 大菱鲆出血症病原菌的分离和鉴定. *高技术通讯*, 2004, (4) :89-93.
- [12] Buller NB. Bacteria from fish and other aquatic animal: a practical identification manual. London: CABI publishing, 2004.
- [13] Zhou SM, Xie MQ, Zhu XQ, Ma Y, Tan ZL, and Li AX. Identification and genetic characterization of *Streptococcus iniae* strains isolated from diseased fish in China. *Journal of Fish Diseases*, 2008, (31) :869-875.
- [14] Pier G., Madin S. *Streptococcus iniae* sp. Nov., a beta-hemolytic streptococcus isolated from an Amazon fresh water dolphin, *Inia geoffrensis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1976, 26 (4) :545-553.
- [15] Patrick TKW, David WB. Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections. 2nd eds. Preston: MPG Books Group, 2005.
- [16] Kitao T. Streptococcal infections//Inglis V, Roberts RJ, Bromage NR. Bacterial Diseases of fish. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1993.
- [17] Roy PEY, Ruth FF. Streptococcal infections of fish. *Circular*, 2006, 57:1-5.
- [18] Yang WM, Li AH. Isolation and characterization of *Streptococcus dysgalactiae* from diseased *Acipenser schrenckii*. *Aquaculture*, 2009, (294) :14-17.
- [19] Sako H. A comparative study on the properties and pathogenicities of beta-hemolytic *Streptococcus* sp. isolated from marine and freshwater fishes. *Suisanzoshoku*, 1993, 41:387-395.
- [20] Yuasa K, Kitancharoen N, Kataoka Y, Al-Murbaty FA. *Streptococcus iniae*, the causative agent of mass mortality in Rabbitfish *Siganus canaliculatus* in Bahrain. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1999, (11) : 87-93.
- [21] Yuya S, Tatsuro H, Takayuki H. Correlation between in vitro mucus adhesion and the in vivo colonization ability of lactic acid bacteria: Screening of new candidate carp probiotics. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2011, 75 (3) :511-515.

Isolation, identification and drug sensitivity of *Streptococcus iniae* from hybrid sturgeons (*Huso dauricus* female × *Acipenser schrencki* male)

Xiaoliang Wang, Lipu Xu^{*}, Jingbo Wang, Shu Wang, Huan Cao

Beijing Aquatic Product Technology Promotion Department, Beijing 100021, China

Abstract: [Objective] Sturgeons were the important economic species in Beijing. In July 2012, continuous mortality of cultured hybrid sturgeons was occurred on a farm in Huairou. [Methods] We isolated three pathogens from liver, kidney and spleen of the dying sturgeons with clinical symptoms, marked HRS12718L, HRS12718K and HRS12718S respectively. Then we analyzed their morphological, physiological and biochemical characteristics, and drug sensitivity. We also cloned and partially sequenced the 16S rDNA of strain HRS12718K. Moreover, we identified the pathogenic characteristic of strain HRS12718K by artificial infection. [Results] The morphological, physiological and biochemical characteristics of three strains were consistent with that of *Streptococcus iniae* isolated from other fishes in China, and 16S rDNA sequence of the strain HRS12718K was more than 99.1% homology with that of *Streptococcus iniae*. The LD₅₀ of the pathogen to hybrid sturgeon was 4.42×10^5 CFU/mL, and challenged sturgeons presented the similar signs as the natural infected sturgeons. In addition, the bacterium was sensitive to norfloxacin, enrofloxacin, neomycin sulfate, doxycycline hyclate and tetracycline hydrochloride, and was highly sensitive to enrofloxacin. [Conclusion] *Streptococcus iniae* was the pathogen to cultured hybrid sturgeons in Beijing area, and enrofloxacin can be used against the disease.

Keywords: hybrid sturgeon, *Streptococcus iniae*, bacterial identification, drug sensitivity

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Major Progame of Beijing Municipal Science and Technology Commission (D121100003712003)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-40-89559484; E-mail: bjbk@163.com

Received: 29 August 2013 / Revised: 18 October 2013

《微生物学报》审稿程序

本刊严格遵守“三审制”,即:编辑部内审,专家外审,主编总审。从投稿日期开始,争取在2个月之内给出审稿结果,3-6个月之内发表。

- (1) 收到来稿后,首先要由编辑初审,通过后再送外审。将请2位专家进行审阅,再送主编进行最后的总审,这个过程一般不会超过2个月。如果初审2位专家的意见分歧较大,编辑部将再请第3位专家进行初审,之后再送主编总审,那么此稿的审理时间可能会超过2个月。
- (2) 完成审稿后(即主编给出总审意见),编辑会给作者发出E-mail告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的)。作者在返回修改稿后,经本刊审核合格后方可被录用。

在此提醒作者,在没有完成全部审稿之前,不要在远程系统中看到初审意见时就急于返回修改稿件。