

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49 (7):931-937; 4 July 2009
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

宁海地区香鱼弧菌病病原菌鉴定

李长红, 陈炯*, 史雨红, 李明云

宁波大学, 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 宁波 315211)

摘要: 【目的】香鱼弧菌病对中国沿海地区的香鱼养殖业造成了巨大的危害, 然而, 病原不明导致了防治上的许多问题。本文鉴定了引起宁海地区香鱼爆发性弧菌病的病原。【方法】采用 TCBS 平板分离优势菌; 采用回归感染试验确认病原菌, 采用改进的寇氏法计算 LD_{50} ; 采用形态学观察、生理生化特征测定、细菌特异性引物 PCR 扩增检测及细菌 16S rRNA 和金属蛋白酶 (MP) 基因序列分析鉴定细菌; 采用药敏实验测定它对部分抗生素的敏感性。【结果】分离并鉴定优势菌株 ayu-H080701 为宁海地区香鱼弧菌病的病原菌, 它对香鱼的半致死量为 1.2×10^4 CFU。形态学观察和生理生化特征测定表明, ayu-H080701 与鳃利斯顿氏菌最为接近。PCR 扩增检测表明, 细菌 16S rRNA 基因通用引物和鳃利斯顿氏菌 MP 基因特异引物均能扩增到预期大小的特异性条带。ayu-H080701 与鳃利斯顿氏菌 16S rRNA 基因核苷酸序列同源性最高, 为 99.4% ~ 99.5%, 与同属的海弧菌和美人鱼发光杆菌分别为 94.3% 和 91.9%; ayu-H080701 与鳃利斯顿氏菌 MP 氨基酸序列同源性高达 97.6% ~ 98.8%, 与其它弧菌科成员则低于 75.6%, 系统进化树分析也揭示 ayu-H080701 与鳃利斯顿氏菌进化相关性最高。【结论】引起宁海地区香鱼弧菌病的菌株 ayu-H080701 被鉴定为鳃利斯顿氏菌。

关键词: 香鱼弧菌病; 鳃利斯顿氏菌; 鉴定

中图分类号: Q93-331 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2009) 07-0931-07

香鱼 (*Plecoglossus altivelis*) 为胡瓜鱼目 (Osmeriformes) 香鱼科 (Plecoglossidae) 唯一成员。它肉质细腻, 体色美, 味清香, 是东亚地区中国、日本和朝鲜等国家特有的一种小型经济名贵鱼类。数十年来, 它一直都是日本最重要、产量最高的淡水养殖鱼类, 但由于长期集约化养殖、种质退化和环境污染等诸多原因, 养殖病害频繁发生。迄今为止, 已报道的养殖香鱼病原菌主要包括鳃利斯顿氏菌 (*L. anguillarum*)^[1]、鳃败血假单胞菌 (*Pseudomonas anguilliseptica*)^[2]、变形假单胞菌 (*P. plecoglossicida*)^[3-5] 和嗜冷黄杆菌 (*Flavobacterium psychrophilum*)^[6] 等。

近年来, 由于国际市场对香鱼的需求日趋增加,

香鱼养殖业在中国也迅速兴起。随着养殖规模的扩大, 由传染性疾病引起的养殖香鱼大量死亡事件时有发生, 但相关病害病原的鉴定报道很少, 仅有台湾报道的杀鲑气单胞菌 (*Aeromonas salmonicida*)^[7] 和嗜水气单胞菌 (*A. hydrophila*)^[8]。2008 年 7 ~ 8 月, 浙江省主要香鱼养殖区域 - 宁波市宁海县发生香鱼爆发性病害, 病鱼表现典型的弧菌病特征, 以体表出血、脾肾肿大为主要症状, 通常在出现症状后 2 ~ 3 d 内死亡, 累积死亡率达 40% ~ 60%, 损失严重。本文报道了对该病害病原菌的分离鉴定, 通过形态学观察、生理生化特征测定及序列分析, 病原被鉴定为鳃利斯顿氏菌。

基金项目: 长江学者和创新团队发展计划 (IRT0734); 宁波市科技局项目 (2007C10081)

* 通信作者。Tel: +86-574-87609571; Fax: +86-574-87600167; E-mail: jchen1975@163.com

作者简介: 李长红 (1984 -), 女, 湖北老河口人, 博士研究生, 研究方向为鱼类分子病理学。E-mail: lichanghong0716@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-12-18; 修回日期: 2009-03-06

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: T4 DNA 连接酶、pMD19-T 载体和 Ex Taq DNA 聚合酶等均购自 Takara 公司; UNIQ-10 柱式胶回收试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司; 其余药品试剂均为进口分析纯。药敏纸片购自杭州天河生物制药厂。离心机 (MICROCL 17 型) 购自 Thermo Electron 公司, PCR 仪 (Mastercycle

personal 型) 购自 Eppendorf 公司, 恒温振荡器 (HZ-9211K 型) 购自太仓市科教器材厂。

1.1.2 样品: 2008 年 7 月从浙江省宁波市宁海县香鱼养殖区, 选取症状典型的濒死病鱼。

1.1.3 引物: 采用已报道的细菌 16S rRNA 基因通用扩增引物^[9] 和部分弧菌科成员鉴定引物^[10-15] 进行 PCR 扩增验证 (表 1)。引物合成由上海英骏生物技术有限公司完成。

表 1 细菌 16S rRNA 基因通用扩增引物和部分弧菌科成员鉴定引物

Table 1 Sequences and data for primers in this study				
Numbers of primer pairs	Oligonucleotide sequence (5'→3')	Target gene	Amplicon size/bp	T _m /°C
1	16SF: AGAGTTTATCATCGGCTCAG 16SR: GGTTACCTFTTACGACTT	16S rRNA gene of bacteria ^[3]	1506	58
2	p2F: CCTTTAACCAAGTGGCGTA p2R: CGATTGTAAAGGGCGACAAT	MP gene of <i>L. anguillarum</i> ^[4]	248	58
3	toxRF1: GAAGCAGCACTCACCGAT toxRR1: GGTGAAGACTCATCAGCA	toxR gene of <i>V. harveyi</i> ^[5]	382	55
4	VM-F: CAGGTTTGYTGCACGGCGAAGA Val2-MmR: GATCGAAGTRCCRACACTMGA	dnaJ gene of <i>V. anginolyticus</i> ^[6]	144	60
5	VP-1: CGGCGTGGGTGTTTCGGTAGT VP-2r: TCCGCTTCGCGCTCATCAATA	gyrB gene of <i>V. parahaemolyticus</i> ^[7]	285	58
6	Fer-3: CGGTTTTGGCCAGTGACG Fer-4: AGGCGCTCGGGTTGGCTATCT	fstA gene of <i>A. salmonicida</i> ^[8]	422	60
7	AP1: CAAGGAGGTCTGTGGCGACA AP2: TTTCACCGGTAGCAGGATTG	β-haemolysin gene of <i>A. hydrophila</i> ^[9]	208	55

1.2 病原菌的分离

无菌条件下取病鱼体表溃疡、肝、脾、肾等部位作为材料, 用普通营养琼脂和 TCBS 平板做细菌分离, 置 28℃ 培养 24 h。结果从被检材料中分离到纯度一致的菌株, 命名为 ayu-H080701, 纯培养后 -70℃ 保存备用。

1.3 菌体形态观察及常规生理生化鉴定

用普通光镜和透射电镜结合观察分离细菌的形态、大小和鞭毛。参照《常见细菌系统鉴定手册》^[6] 和《伯杰氏细菌学鉴定手册》^[7] 方法对其进行生理生化特征测定。

1.4 病原菌的回归感染

将菌株 ayu-H080701 接种于普通营养肉汤中, 28℃ 恒温过夜培养, 用无菌生理盐水稀释至所需浓度 (平板菌落计数法计算菌悬液浓度)。选择无外伤、游动活泼, 平均体重 45 g 左右的健康香鱼作为供试鱼。驯化 7 d 后, 经腹腔注射的方式进行人工感染。实验共分 6 个组, 每组 12 尾鱼, 其中 5 个实验组, 1 个对照组。实验组每尾注射 0.1 mL 菌液, 对照组每尾注射等量的无菌生理盐水。实验期间不投喂饲料, 不间断充气, 控制水温为 (20 ± 1)℃。感

染开始后, 记录 96 h 内发病症状和死亡情况, 采用 Aliu 和 Nwude^[8] 改进的寇氏法 (Karber's method) 计算半数致死剂量 (LD₅₀)。公式为: $\lg_{50}^{LD} = X_k - d \sum P_i - 0.5$, 其中 X_k 为最大剂量对数, d 为相邻两组对数剂量之差数, P_i 为死亡率, i 为组号。对死亡鱼体进行解剖和病原菌的再分离, 对优势菌株进一步完成生化特性的测定。

1.5 药物敏感性实验

用药敏纸片法在普通营养琼脂平板上测定 ayu-H080701 对药物的敏感性。28℃ 恒温培养 16 ~ 18 h, 观测抑菌圈直径大小, 根据说明书标准判断药物敏感和抗药性。

1.6 细菌基因组序列扩增、测序和分析

1.6.1 细菌基因组 DNA 提取: 采用 Wilson^[9] 描述的方法提取 ayu-H080701 的基因组 DNA 作为模板。

1.6.2 PCR 扩增: 25 μL 的 PCR 反应体系其中包括 DNA 模板 0.5 μL, 10 × Ex PCR 缓冲液 2.5 μL, dNTP 混合物 (各 2.5 mol/L) 2 μL, 正向和反向引物 (40 pmol/L) 各 1 μL 和 Ex Taq DNA 聚合酶 1 U。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 2 min 后以下列程序进行

30个循环,每个循环包括94℃变性30s,55~60℃(见文献)复性90s,72℃延伸30s(16SF/16SR引物扩增时为90s),循环结束后72℃延伸10min。

1.6.3 扩增产物的检测和克隆: 琼脂糖凝胶检测PCR产物,预期大小的扩增条带回收后克隆至pMD19-T载体,序列测定由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.6.4 序列分析: 采用ClustalW程序(<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>)进行多重序列比对后,用MEGA 4.0软件构建系统进化树^[50]。

2 结果

2.1 病鱼症状

患病香鱼早期失去食欲,游动缓慢,体色发黑,平衡失调,体表形成溃疡,皮肤和肌肉组织出血。后期回旋狂游,腹部朝天,各鳍基部充血发红,体表肌

肉腐烂,形成出血性溃疡。肛门红肿,腹部肿胀。腹腔有大量腹水,腹脂有点状出血,肠道充血,肠内有黄色粘液。脾、肾充血肿大,或肝土黄色有出血点,有时眼球突出等。

2.2 回归感染

实验鱼在感染菌株 ayu-H080701 后,出现的症状与自然发病香鱼相似,对照组鱼无死亡,也未表现任何病症。接种 ayu-H080701 的香鱼病变组织如肝、脾、肾等组织中均分离到纯度一致的细菌,且其菌落形态、菌体形态及基本理化特性与从自然发病鱼体分离的菌株 ayu-H080701 完全一致,揭示菌株 ayu-H080701 为宁海地区香鱼弧菌病的病原。回归感染实验结果亦表明,菌株 ayu-H080701 对香鱼致病性强,病程较短。按改进的寇氏法计算,它对香鱼的 LD₅₀ 为 1.2 × 10⁴ CFU (表 2)。

表 2 回归感染实验结果

Table 2 Results of artificial infection experiments

Group	Bacterial density/ CFU/mL)	Injection dose/mL	Fish number	Death number						Mortality/%
				12h	24h	36h	48h	72h	96h	
1	3.8 × 10 ⁸	0.1	12	6	12	12	12	12	12	12/12
2	3.8 × 10 ⁷	0.1	12	0	10	12	12	12	12	12/12
3	3.8 × 10 ⁶	0.1	12	0	4	10	10	10	10	10/12
4	3.8 × 10 ⁵	0.1	12	0	0	8	8	8	8	8/12
5	3.8 × 10 ⁴	0.1	12	0	0	4	5	5	5	5/12
Control	Normal saline	0.1	12	0	0	0	0	0	0	0

2.3 菌体的形态及生理生化特征

菌株 ayu-H080701 为革兰氏阴性,呈短杆状或弧状,可运动,经透射电镜观察,绝大多数菌体具一根长的极生单鞭毛(图 1),菌体大小 (0.8 ~ 1.0) × (1.5 ~ 1.7) μm。在普通营养琼脂平板上 28℃ 培养 24 h 后呈圆形,边缘整齐,表面光滑湿润,中间隆起,

半透明,直径约 3 mm。在 TCBS 琼脂平板上能生长,菌落呈黄色。氧化酶阳性,对弧菌抑制剂 0/129 Q, 4-二氨基-6,7-二异丙基喋啶磷酸盐) (150 μg 或

表 3 分离菌株 ayu-H080701 的主要生理生化特征

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of the isolated strain

Properties	ayu-H080701	Properties	ayu-H080701
TCBS	yellow	Glucose	(+)
Growth on 2216E culture medium	+	Mannite	(+)
M. R.	-	Inositol	-
Oxidase	+	Sorbierite	+
Hemolysis	+	Sucrose	+
Sensitivity to 0/129 (10 μg)	+	Melibiose	-
Sensitivity to 0/129 (150 μg)	+	Amygdalin	-
H ₂ S	-	Arabinose	-
Indole	+	0% NaCl	-
Citrate utilization	-	3% NaCl	+
OPNG	+	6% NaCl	+
Gelatinase	+	8% NaCl	-
Urease	-	4℃	+
Arginine dihydrolase	+	15℃	+
Lysine decarboxylase	-	28℃	+
Ornithine decarboxylase	-	35℃	+

+ : Positive; - : Negative; (+) : Weakly Positive.

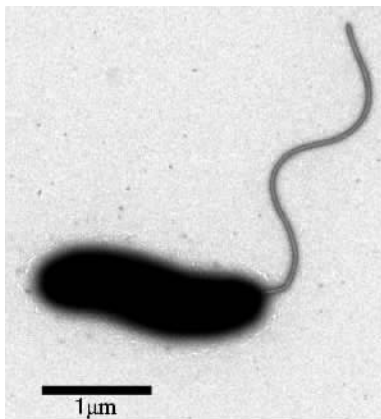


图 1 菌株 ayu-H080701 的透射电镜照片 (15000 ×)

Fig. 1 The electronic micrograph of the strain ayu-H080701 (15000 ×).

10 μg)敏感,发酵葡萄糖,产酸不产气,不产色素。根据这些特征,菌株 ayu-H080701 被初步判定为弧菌科成员。分离物的其它一些生化测定特征详见表 3,其生化特征与鳗利斯顿氏菌最为接近。

2.4 药物敏感性

用纸片法测定了具有代表性的 10 种抗菌药物对菌株 ayu-H080701 的抑制作用,结果表明该菌对氨苄青霉素、头孢唑啉和青霉素 G 有耐药性(抑菌圈直径在 0~10 mm),而对丁胺卡那霉素、羧苄青霉素、氯霉素、四环素、头孢哌酮(先锋必)、链霉素和新生霉素高度敏感(抑菌圈直径在 17 mm~34 mm)。

2.5 细菌检测引物扩增结果

以菌株 ayu-H080701 的基因组 DNA 为模板,采用 7 对引物分别进行 PCR 扩增,结果表明,细菌 16S rRNA 基因通用扩增引物和鳗利斯顿氏菌 MP 基因特异扩增引物都能扩增到预期大小的特异片段,其他引物均无特异性扩增(结果未显示)。

2.6 序列分析

菌株 ayu-H080701 的 16S rRNA 基因和 MP 基因扩增产物纯化后,分别克隆并测定序列,EMBL 登录号分别为 FM866241 和 FM866242。

细菌 16S rRNA 基因 1496 个核苷酸序列比较表明,ayu-H080701 与鳗利斯顿氏菌核苷酸序列同源性最高,为 99.4%~99.5%,与弧菌属成员为 96.3%~97.6%,而与同属的海弧菌(*L. pelagius*)和美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damsela*)分别为 94.3%和 91.9%;16S rRNA 基因系统进化树分析表明,ayu-H080701 与鳗利斯顿氏菌系统进化相关性最高,与同科的弧菌属成员进化相关性次之,但与同属其他两个成员进化相关性较远(图 2)。MP 82 个氨基酸序列比较表明,ayu-H080701 与鳗利斯顿氏菌氨基酸序列同源性高达 97.6%~98.8%,而与其它弧菌科成员均低于 75.6%;MP 系统进化树分析表明,ayu-H080701 与鳗利斯顿氏菌紧密成簇(图 3)。序列分析结果揭示,菌株 ayu-H080701 为鳗利斯顿氏菌(即原弧菌属的鳗弧菌)的一个分离物。

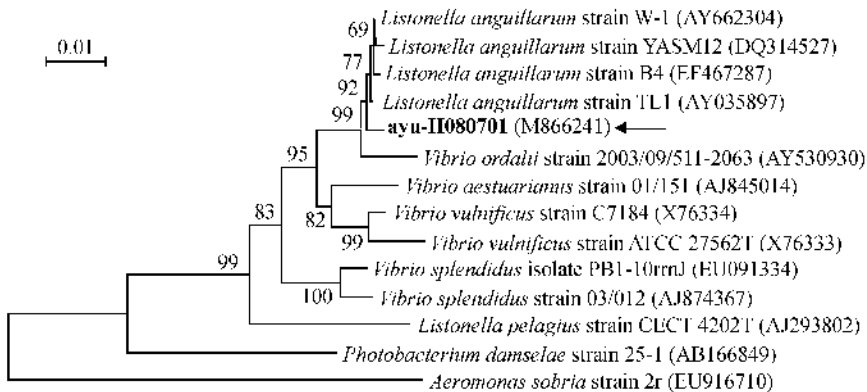


图 2 部分弧菌科成员 16S rRNA 基因核苷酸序列的系统进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of the nucleotide sequences of some bacterial 16S rRNA genes using the MEGA4.0 program. The values at the forks indicate the percentage of trees in which this grouping occurred after bootstrapping (1,000 replicates; shown only when >60%). The scale bar shows the number of substitutions per base.

3 讨论

鳗利斯顿氏菌(*L. anguillarum*),即原弧菌属的鳗弧菌(*V. anguillarum*),在世界范围内引起养殖鱼类,特别是海水养殖鱼类的流行病爆发。该细菌 1893 年首次从鳗鲡中分离,并被命名为 '*Bacterium anguillarum*'^[21];1909 年更名为 '*V. anguillarum*'^[22];1985 年,MacDonell 和 Colwell 对弧菌科代表菌株 5S rRNA 基因进行系统发育分类研究,提出建立弧菌科新属—利斯顿氏菌属 *Listonella*,并将其归到该属中^[23],但 *Listonella* 属的定义及成员分类仍存在争议^[24]。

1967 年,鳗利斯顿氏菌首次被鉴定为日本香鱼的一个病原^[25],此后的十多年里,该病原引起的病害在日本众多香鱼养殖地区都有报道危害巨大,引起了科研人员的重视,随后,鳗弧菌商品化疫苗被迅速推广使用,80 年代后该病害在日本等地已鲜有报道,目前日本香鱼养殖最重要的病害病原为变形假单胞菌^[6-5]和嗜冷黄杆菌^[6]。而在中国,由于香鱼养殖业起步较晚,因此对病害的研究报道极少。本文综合形态学、生理生化特征和序列特征,揭示引起宁海地区香鱼弧菌病的病原 ayu-H080701 为鳗利斯顿氏菌的一个分离物,这也是该菌在中国香鱼上致病的首次报道。它毒力强,致死快,对香鱼的半致死

量 (LD_{50}) 为 1.2×10^4 CFU, 对宁海县的香鱼养殖业造成了严重威胁。它对丁胺卡那霉素等 7 种药物高度

敏感, 防治该香鱼病害时可供参考。

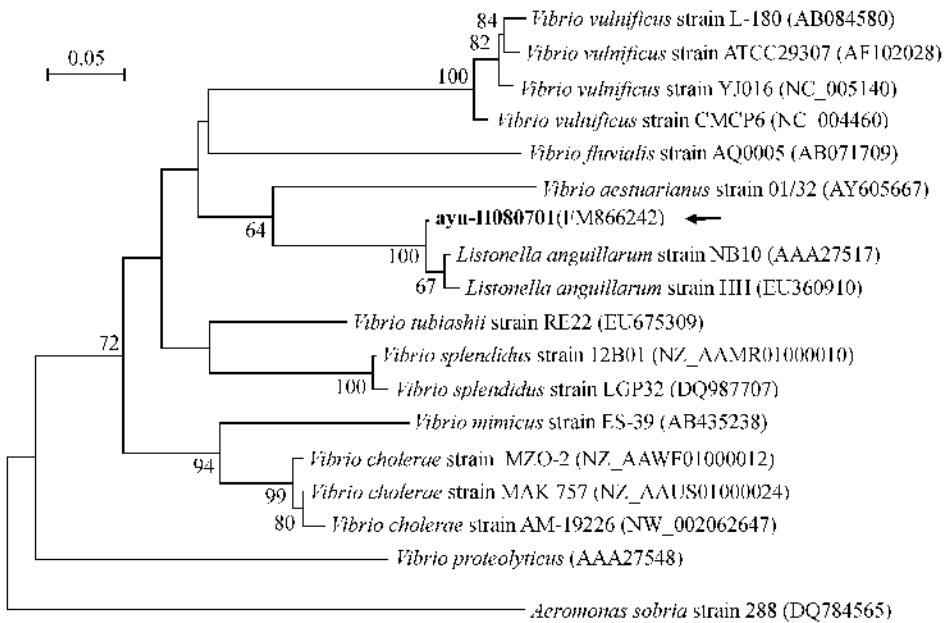


图 3 部分弧菌科成员编码的金属蛋白酶氨基酸序列系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of the metalloprotease amino acid sequences of some bacteria using the MEGA4.0 program. The values at the forks indicate the percentage of trees in which this grouping occurred after bootstrapping (1,000 replicates; shown only when > 60%). The scale bar shows the number of substitutions per base.

一般认为, 鳃利斯顿氏菌是海洋和洄游性鱼类如鲑鱼和鳟等的病原菌, 不能在淡水中存活^[6]。然而, 该菌引起的弧菌病害在宁海县梅林镇的香鱼淡水养殖塘中频繁发生。据调查, 发生病害的养殖场基本都是抽取地下水进行香鱼养殖, 而这些水源进行富集后, 用鳃利斯顿氏菌 MP 引物进行 PCR 扩增能检测到鳃利斯顿氏菌 (结果未显示)。因此我们推测, 淡水香鱼养殖塘中的鳃利斯顿氏菌病害可能源于水源。由于近年来宁海县梅林镇等地过度开采地下水用于灌溉和日常生活, 加之皂溪入海口挖沙现象严重, 导致海水入侵, 鳃利斯顿氏菌随之污染了地下水。这也是中国首次鉴定鳃利斯顿氏菌为香鱼弧菌病的病原。该病害病程短, 发病率和死亡率高, 对沿海地区的香鱼养殖业有较大危害, 应当引起重视。

参考文献

[1] Muroga K, Egusa S. *Vibrio anguillarum* isolated from ayu in freshwater farm-ponds. *Fish pathology*, 1970, 5: 16 - 20.
 [2] Nakai T, Hanada H, Muroga K. First records of *Pseudomonas anguilliseptica* infection in cultured ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathology*, 1985, 20: 481 - 484.

[3] Wakabayashi H, Sawada K, Ninomiya K, et al. Bacterial hemorrhagic ascites of ayu caused by *Pseudomonas* sp.. *Fish Pathology*, 1996, 31: 239 - 240.
 [4] Nishimori E, Tsukamoto KK, Wakabayashi H. *Pseudomonas plecoglossicida* sp. nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50: 83 - 89.
 [5] Park SC, Shimamura I, Fukunaga M, et al. Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66: 1416 - 1422.
 [6] Kondo M, Kawai K, Kurohara K, et al. Adherence of *Flavobacterium psychrophilum* on the body surface of the ayu *Plecoglossus altivelis*. *Microbes Infection*, 2002, 4: 279 - 283.
 [7] Wang WS, Wang DH, Lee JS. An outbreak of *Aeromonas salmonicida* infection of ayu (*Plecoglossus altivelis*) in Taiwan. *Asian Fisheries Science*, 1996, 9: 235 - 238.
 [8] Chang PH, Wu TP, Chung HY, et al. *Aeromonas hydrophila* and *Saprolegnia australis* isolated from Ayu, *Plecoglossus altivelis* with ulcerative skin disease in Taiwan. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*,

- 2002, 22: 394 – 400.
- [9] Acinas SG, Rodríguez-Valera F, Pedrós-Alió C. Spatial and temporal variation as shown by RFLP fingerprinting of PCR amplified 16S rDNA. *FEMS Microbiology Ecology*, 1997, 24: 27 – 40.
- [10] 余俊红, 陈吉祥, 厉云等. 聚合酶链反应 (PCR)检测花鲈鳗弧菌感染. 黄渤海海洋 *Journal of Oceanography of Huanghai & Bohai Seas*, 2002, 20 (2): 60 – 64.
- [11] Pang L, Zhang XH, Zhong Y, et al. Identification of *Vibrio harveyi* using PCR amplification of the *toxR* gene. *Letters in Applied Microbiology*, 2006, 43 (3): 249 – 255.
- [12] Pham HN, Kiyofumi O, Jiro M, et al. Rapid and specific identification of 5 human pathogenic *Vibrio* species by multiplex polymerase chain reaction targeted to *dnaJ* gene. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2007, 59: 271 – 275.
- [13] Kasthuri V, Nobuhiko D, Shigeaki H. Cloning and nucleotide sequence of the *gyrB* Gene of *Vibrio parahaemolyticus* and its application in detection of this pathogen in shrimp. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64 (2): 681 – 687.
- [14] Roxana Beaz-Hidalgo, Gian EM, Sabela B, et al. Development of a PCR protocol for the detection of *Aeromonas salmonicida* in fish by amplification of the *fstA* (ferric siderophore receptor) gene. *Veterinary Microbiology*, 2008, 128: 386 – 394.
- [15] Xia C, Ma ZH, Habibur RM, et al. PCR cloning and identification of the ? haemolysin gene of *Aeromonas hydrophila* from freshwater fishes in China. *Aquaculture*, 2004, 229: 45 – 53.
- [16] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 第一版. 北京: 科学出版社, 2001.
- [17] Baumann P, Schubert RHW. Facultatively anaerobic gram-negative rods, Family II. Vibrionaceae. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Section 5. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984.
- [18] Aliu YO, Nwude N. Determination of the median lethal dose (LD₅₀) // Aliu YO, Nwude N. *Veterinary Pharmacology and Toxicology Experiments*. Section 1. Zaria: Ahmadu Bello University Press, 1982.
- [19] Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria // Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. *Current protocols in molecular biology*. Section 2.4. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1994.
- [20] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24 (8): 1596 – 1599.
- [21] Canestrini. La malattia dominante delle anguille. *Atti Istituto Veneto Scienze*, 1893, 7: 809 – 814.
- [22] Bergman AM. Die rote Beulenkrankheit des Aals. *Bericht aus der Koniglichen Bayerischen Versuchsstation*, 1909, 2: 10 – 54.
- [23] Macdonell MT, Colwell RR. Phylogeny of the Vibrionaceae, and recommendation for two new genera, *Listonella* & *Shewanella*. *Systematic and Applied Microbiology*, 1985, 6: 171 – 182.
- [24] ICSB. Subcommittee on the taxonomy of *Vibrionaceae*: Minutes of the meetings (Minute 8), 4 and 7 July 1994, Prague, Czech republic. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1998, 48: 1467 – 1469.
- [25] Muroga K, Egusa S. *Vibrio anguillarum* from an endemic disease of ayu in Lake Hamana. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1967, 33: 636 – 640.
- [26] Anderson JIW, Conroy DA. *Vibrio* disease in marine fishes // Snieszko SF. *A Symposium on Diseases of Fishes and Shellfishes*. No. 5. Washington DC: American Fisheries Society Special Publication, 1970.

Characterization of *Listonella anguillarum* as the aetiological agent of vibriosis occurred in cultured ayu (*Plecoglossus altivelis*) in Ninghai country, China

Changhong Li, Jiong Chen*, Yuhong Shi, Mingyun Li

(Ministry of Education Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: [Objective] Ayu (*Plecoglossus altivelis*) vibriosis threatens ayu aquaculture seriously caused by mass mortality due to severe infections. We characterized the vibriosis pathogen of ayu in Ninghai country. [Methods] A dominant strain was isolated and identified by a series of biochemical and physiological tests. The lethal dose 50% (LD_{50}) was calculated by the modified Karber's method. PCR amplification and sequence analysis were used to further identify the pathogen. [Results] LD_{50} of ayu-H080701 was 1.2×10^4 CFU to ayu. PCR amplification showed that the bacterial universal primers for 16S rRNA gene and the specific primers for the metalloprotease (MP) gene of *Listonella anguillarum* worked. 16S rRNA gene analysis showed that ayu-H080701 shared 99.4% - 99.5% nucleotide identical to *L. anguillarum* isolates, while 94.3% and 91.9% nucleotide identical to *L. pelagius* and *Photobacterium damsela* respectively. Metalloprotease analysis showed that ayu-H080701 shared 97.6% ~ 98.8% amino acid sequence identical to *L. anguillarum* isolates, while lower than 75.6% to other bacteria. Phylogenetic analysis showed that ayu-H080701 grouped constantly with *L. anguillarum* isolates. [Conclusion] The biochemical, physiological tests and sequence analysis all strongly supported the identification of the pathogen causing ayu vibriosis in Ninghai country, China, as an isolate of *L. anguillarum*.

Keywords: ayu vibriosis; *Listonella anguillarum*; characterization

(本文责编: 王晋芳)

Supported by the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (IRT0734) and the S&T Programme of Ningbo Sci-Tech Bureau (2007C10081)

* Corresponding author. Tel: +86-574-87609571; Fax: +86-574-87600167; E-mail: jchen1975@163.com

Received: 18 December 2008/ Revised: 6 March 2009

科学出版社新书推介 2009 - 05)

可再生能源的微生物转化技术

宋安东 等 编著 978-7-03-024586-1 ¥ 55.00 2009年5月出版

内容简介: 本书在分析当前全球面临的能源和环境危机的基础上, 阐述了利用生物质转化为主要的生物炼制的内涵, 将微生物技术与可再生能源转化有机结合起来, 全面论述了利用微生物技术转化可再生能源的基础理论、基本工艺、基本装备、应用情况和发展前景。内容主要包括生物炼制、生物沼气、生物氢气、生物乙醇、生物丁醇、生物柴油、生物采油、生物燃料电池、煤炭的生物转化、能源的净化等方面, 为读者展示了能源微生物技术的全貌。本书是一部全面反映可再生能源生物转化的新技术、新材料、新方法、新进展的集理论性和实践性为一体的专著。

本书可以作为生物、环境、能源、生物化工等领域有关科研人员、生产技术人员参考书, 也可作为高等院校的生物技术、生物科学、生物工程、生物化工、能源工程、资源利用等专业的研究生、本科生的教学用书。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费)

邮购地址 北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人 周文宇 联系电话 010-64031535

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn> 欢迎致电索要书目