



养殖大菱鲂细菌性红体病病原菌的分离与鉴定

董 丽^{1,2}, 王印庚², 张 正², 曲江波³, 陈 霞⁴

(1.中国海洋大学 生命学院, 山东 青岛 266003; 2.中国水产科学研究院 黄海水产研究所 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室, 山东 青岛 266071; 3.天源水产有限公司, 山东 烟台 264000; 4.青岛九洋红水产科技有限公司, 山东 青岛 266071)

摘要: 从患有红体病的养殖大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*) 的肌肉中分离得到一株优势菌并记为 H1。经人工注射感染证实 H1 即为引起养殖大菱鲂红体病的病原菌, 其半致死量 LD_{50} 为 2.82×10^5 CFU/mL, 而低浓度 (1.41×10^3 CFU/mL) 没有造成死亡, 但注射部位有脓肿现象, 注射相同体积 1.5% 无菌生理盐水的对照组没有明显的症状, 注射部位也无异常。革兰氏染色显示该菌为革兰氏阴性, 菌体呈杆状, 周生鞭毛。综合该菌的形态、常规生理生化特征和 API32E 鉴定结果, 发现 H1 与迟钝爱德华氏菌的表性特征非常相似, 相似率达到 99.9%。在分子水平上对其 16S RNA 基因序列的测定、同源性分析, 结果表明 H1 与迟钝爱德华氏菌的亲缘关系最近, 相似度达到 99%。综合上述研究结果, 将该菌株初步鉴定为迟钝爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*)。

关键词: 大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*); 红体病; 细菌鉴定; 迟钝爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*)

中图分类号: S965

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096 (2009) 07-0057-07

大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*) 属于鲆科 (Bothidae)、菱鲆属 (*Scophthalmus*), 自然分布于欧洲沿岸各主要海区, 是欧洲水产品市场广受欢迎的一种名贵鱼种, 经济价值很高^[1]。于 1992 年由中国水产科学研究院黄海水产研究所从英国引进到中国, 大菱鲂养殖业在北方沿海迅速兴起, 成为第四次海水养殖浪潮的支柱产业。目前大菱鲂养殖多数采用的是“温室大棚+深进海水”的养殖模式^[2], 但随着养殖规模的快速增长, 养殖密度的增加, 水体环境的恶化, 疾病的流行也随之而来^[3]。根据国内外有关大菱鲂主要感染性疾病的报道, 可以将其分为三大类, 即: 细菌性疾病、病毒性疾病和寄生虫病。其中细菌性疾病是大菱鲂养殖中危害最为严重的一种疾病, 给养殖产业带来了巨大的经济损失^[4-10]。2007 年 8~9 月份山东省文登市某养殖场体长 10 cm 左右的大菱鲂患有“红体病”, 其症状为病鱼的皮下肌肉充血发红, 腹腔出现腹水现象, 感染后期漂浮于水面; 内部解剖发现其肝脏颜色接近正常, 肾、脾肿大, 肠壁变薄且充水; 感染率几乎近 100%, 每天鱼的死亡数量达 500~600 条。作者从患有“红体

病”鱼体的肌肉中分离出一株优势菌 H1, 并根据电镜下的形态特征、常规生理生化反应、API32E 自动鉴定系统鉴定结果以及 16SrRNA 基因序列同源性分析鉴定该菌株为迟钝爱德华氏菌, 现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

供试病大菱鲂来自文登市一养殖场, 体长约 10 cm; 人工感染用健康大菱鲂平均体长 $13 \text{ cm} \pm 1 \text{ cm}$, 体质量 $48 \text{ g} \pm 2 \text{ g}$, 购自蓬莱天源水产有限公司。

pMD18-T 载体购自宝生物 (大连) 有限公司,

收稿日期: 2008-09-23; 修回日期: 2008-12-26

基金项目: 国家 863 计划资助项目 (2003AA622070); 国家“十一五”科技支撑计划资助项目 (2006BAD09A11) 公益性行业 (农业) 科技专项项目 (nyhyzx07-46)

作者简介: 董丽 (1982-), 女, 安徽阜阳人, 硕士研究生, 主要从事海水养殖病原微生物学研究, 电话: 0532-85817991, E-mail: donglizh@163.com; 王印庚, 通信作者, 电话: 0532-85841732, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn



转化 *E.coli* DH5 α 及琼脂糖胶回收试剂盒购自天根生化科技有限公司, Taq DNA 聚合酶购自纽英伦生物技术有限公司, 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 病鱼检查与细菌分离

1.2.1 病鱼解剖检查

对患有红体症状的病鱼, 用 1.5% 灭菌的盐水将体表冲洗干净, 用无菌解剖刀刮取病鱼体表粘液, 剪下皮下充血肌肉(病灶处), 同时获取部分鳃丝, 内部解剖取其肝脏、肠道、肾、脾等器官组织, 分别做成水浸片在显微下观察, 以及血涂片经 Giemsa 染色观察, 观察是否有寄生虫、霉菌和细菌。再经 CsCl 密度梯度离心, 磷钨酸负染电镜观察是否有病毒感染。

1.2.2 细菌分离

取患病典型的大菱鲂, 在无菌条件下, 用 75% 的酒精棉球擦拭病鱼体表, 分别取其肌肉及肝、肾等组织少许, 用无菌盐水冲洗组织块, 研碎后分别做成水浸片在显微镜下观察, 并划线接种于 TSB (胰蛋白胨肉汤) 固体培养基平板, 于 28 $^{\circ}$ C 恒温培养 24~48 h, 观察细菌的生长情况及菌落的颜色和特征并选取优势菌挑取单菌落, 纯化培养 3 次。纯培养物保种于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

1.3 病原菌的形态的观察

将纯化培养后的细菌复活, 挑取单菌落进行革兰氏染色和负染, 分别使用光镜和电镜观察细菌的个体形态、大小和鞭毛结构。

1.4 生理生化鉴定

采用法国梅里埃公司 API32E 自动鉴定系统, 按说明书上所述方法进行鉴定。病原菌分别在不同盐度 (0%、1%、3%、5%、7%、10%), pH 值梯度 (3.0、4.0、4.5、5.0、5.5、6.5、7.5、8.5、9.5、10) 及温度 (4 $^{\circ}$ C、10 $^{\circ}$ C、15 $^{\circ}$ C、20 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C) 条件下培养 24 h 后, 并测定 600 nm 处的吸光值, 结合肉眼观察判定细菌生长情况。

1.5 16S rRNA 基因序列的测定及其系统发育树的建立

1.5.1 PCR 模板 DNA 的制备

用灭菌的牙签挑取纯化培养的单菌落即为 DNA 反应的模板。

1.5.2 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增及产物回收

16S rRNA 基因 PCR 扩增的两个引物分别为为 27 F (正向引物): 5'-AGAGTTTGATC(C/A)TGG-CTCAG-3' (对应于 *E.coli* 16S rRNA 基因的第 8~27 个碱基位置) 和 1492 R (反向引物): 5'-TACGG (C/T) TACCTTGTTACGACTT-3' (对应于 *E.coli* 16S rRNA 基因的第 1492~1510 个碱基位置)^[11]。在 25 μ L 的 PCR 反应体系中含有: 2.5 μ L 10 \times PCR 缓冲液 (含 2 mol/L MgSO₄), 0.5 μ L 10 mol/L 4 \times dNTP 混合液, 0.5 μ L 10 μ mol/L 正、反引物, 0.2 μ L TaqDNA 聚合酶 (5000 U/mL), 21 μ L 灭菌双蒸水。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 52 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 温育 10 min。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收目的片段用于连接。

1.5.3 连接与转化

16S rRNA 基因片段和 pMD18-T Vector 于连接反应体系中, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。连接产物转化 *E.coli* DH5 α 后, 涂布于含有氨苄青霉素的 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 挑单菌落接种于氨苄青霉素 LB 培养液, 37 $^{\circ}$ C 170 rpm 震荡培养 6~8 h, 经 PCR 扩增单克隆培养物检测。序列测定交由上海生工生物工程技术有限公司进行。

1.5.4 序列分析及系统发育树的构建

将所获得的 16 rRNA 基因序列在 GenBank 中进行 BLAST 搜索, 选取 20 株与菌株 H1 相似性最高的细菌 16 rRNA 基因序列, 用 BIOEDIT 软件中集成的 Clustalw 软件对 H1 菌与 GenBank 中的 20 株细菌的 16 rRNA 基因序列进行对比分析、多序列匹配排列, 用系统发生推断软件包 PHYLIP3.6a3^[12] 进行统计和聚类分析。采用邻位相连法 (Neighbor-joining) 获得系统发育树, 通过自举分析 (Bootstrapping) 进行系统进化树的评估, 自举数据集为 1000 次。

1.5.5 核酸序列存取号 (Accession number)

菌株 H1 的 16S rRNA 基因序列已放在 GenBank 核苷酸系列数据库中, 存取号为 FJ493544。其他所选菌株的相关数据和存取号见表 1。



表 1 构建系统发育树的 16S rRNA 序列来源及其数据库存取号

Tab.1 The strains for phylogenetic dendrogram constructed from GenBank and their accession number

菌株名称	菌株号	存取号	菌株名称	菌株号	存取号
<i>Edwardsiella ictaluri</i>		AF310622	<i>E.tarda</i>	LTB	EU259315
<i>E.ictaluri</i>	CGX	DQ985469	<i>E.tarda</i>	WY28	EU259317
<i>E.ictaluri</i>	HSN-1	EF015475	<i>E.ictaluri</i>		EU285520
<i>E.ictaluri</i>	HSS-1	EF015476	<i>E.ictaluri</i>		EU285521
<i>E.tarda</i>	SMW7	EF091710	<i>E.ictaluri</i>		EU285522
<i>E.tarda</i>	TX1	EF467363	<i>E.tarda</i>	0304	FJ009591
<i>E.ictaluri</i>	GDH1	EF539880	<i>E.tarda</i>	K3	FJ405292
<i>E.tarda</i>	FV2	EF683604	<i>E.tarda</i>	K5	FJ405294
<i>E.tarda</i>	EH-202	EU121410	<i>E.tarda</i>	K7	FJ405296
<i>E.ictaluri</i>	TCCC11053	EU231639	<i>E.tarda</i>	K20	FJ405309

1.6 人工感染试验

将 48 h 的细菌纯培养物用 1.5% 的无菌盐水制成菌悬液，经平板菌落计数法，菌液浓度测定为 1.41×10^9 CFU/mL，10 倍系列稀释后分别制成用 1.41×10^8 CFU/mL、 1.41×10^7 CFU/mL、 1.41×10^6 CFU/mL、 1.41×10^5 CFU/mL、 1.41×10^4 CFU/mL 和 1.41×10^3 CFU/mL。取 100 cm×100 cm 的塑料桶 16 个，每桶放养健康大菱鲂 10 尾，平均体长 $13 \text{ cm} \pm 1 \text{ cm}$ ，体质量 $48 \text{ g} \pm 2 \text{ g}$ ，实验水温 17°C ，循环水养殖，每日投饵两次。肌肉注射 0.2 mL/尾，对照组注射相同体积的 1.5% 无菌盐水，每组各设两个平行。实验过程中，每日观察记录实验鱼的体色、活动力、摄食、发病症状和死亡情况。

用改进的寇氏法^[13]可计算出病原菌 H1 在水温 17°C 左右时对平均体长 $13 \text{ cm} \pm 1 \text{ cm}$ ，体质量 $48 \text{ g} \pm 2 \text{ g}$ 的大菱鲂的半致死量：

$$\text{LgLD}_{50} = X_K - d(i^2 P_i - 0.5)$$

其中 X_K 为最大对数剂量， d 为相邻两组对数剂量之差数， P_i 为死亡率， i 为组号。

2 实验结果

2.1 病鱼检查结果

通过水浸片显微镜下观察，未发现寄生虫和霉菌，而有大量的细菌存在于组织中（肝脏、肾、脾和肌肉）。经 CsCl 密度梯度离心后，亦未有沉淀物条带出现，电镜检测未见有病毒粒子存在，排除了由病毒感染的可能性。经过 48 h 培养的 TSB 培养基中长出菌落形态一致的细菌，记为 H1。

2.2 细菌的形态特征

将 H1 菌株接种于 TSB 培养基 28 ℃ 下培养 48 h

后，菌落呈圆形，中等大小（1~2 mm），中央隆起，光滑湿润；经革兰氏染色镜检为革兰氏阴性菌，长杆状。做磷钨酸负染标本后，置透射电子显微镜下观察为长杆状，具有周身鞭毛（图 1）。

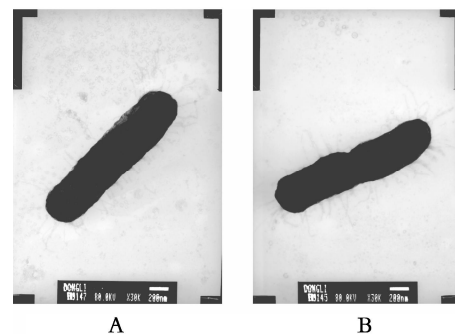


图 1 电镜下的 H1 菌株

Fig.1 Electronic micrograph of the isolated strain H1

A. 长杆状菌体和周身鞭毛; B. 示菌体裂殖

A. rod-shaped organism with flagella; B. fissionarism

2.3 生理生化特征

盐度梯度试验的结果表明，该菌能生长的盐度浓度是 0%~4%；pH 值梯度生长范围 5.5~9.5；15~40

均能生长。API32E 鉴定结果显示该菌株为迟钝爱德华氏菌，相似率达到 99.9%。其中鸟氨酸脱羧酶、赖氨酸脱羧酶、半乳糖酸盐、酚红、葡萄糖阳性。其主要的生理生化特征见表 2。

2.4 16S rRNA 基因序列及系统发育树的构建

为了进一步从分子水平上确定所分离菌的分类位置，对该菌进行了 16S rRNA 基因序列的测定，所扩增的 16S rRNA 基因序列电泳结果如图 2，其目



表 2 菌株 H1 的 API32E 生理生化实验结果

Tab.2 Bio-chemical characteristics of strain H1 by API32E test

项目	<i>E.tarda</i>	H1	项目	<i>E.tarda</i>	H1
鸟氨酸脱羧酶 ODC	+	+	吲哚产生 (+James) IND	+	+
精氨酸双水解酶 ADH	-	-	N-乙酰- α -葡萄糖苷酶 α NAG	-	-
赖氨酸脱羧酶 LDC	+	+	α -半乳糖苷酶 α GAL	-	-
脲酶 URE	-	-	葡萄糖 GLU	+	+
L-阿拉伯糖醇 LARL	-	-	蔗糖 SAC	-	-
半乳糖酸盐 GAT	+	+	L-阿拉伯糖 LARA	-	-
5-酮基-葡萄糖酸 5KG	-	-	D-阿拉伯糖醇 DARL	-	-
脂肪酶 LIP	-	-	α -葡萄糖 aGLU	-	-
酚红 RP	+	+	α -半乳糖苷酶 aGAL	-	-
α -葡萄糖苷酶 α GLU	-	-	海藻糖 TRE	-	-
甘露醇 MAN	-	-	鼠李糖 RHA	-	-
麦芽糖 MAL	+	+	肌醇 INO	-	-
侧金盏花醇 ADO	-	-	纤维二糖 CEL	-	-
PLE	-	-	山梨醇 SOR	-	-
α -葡萄糖酸酶 α GUR	-	-	α -麦芽糖苷酶 aMAL	-	-
丙二酸 MNT	-	-	L-天门冬素芳胺酶 ASPA	-	-

注：+表示阳性；-表示阴性

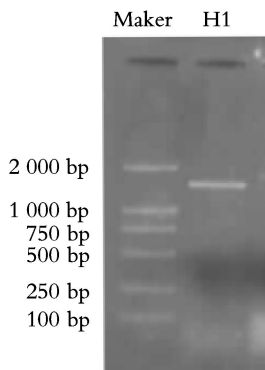


图 2 H1 菌株的 16SrRNA 基因扩增产物

Fig.2 Amplification product of 16SrRNA gene of strain H1

的片段大小约为 1 500 bp，目的片段经连接、转化至 *E.coli* DH5 α 后经 DNA 双向测序长度为 1 509 bp。通过互联网 NCBI，在 GenBank 中进行 BLAST 相似性搜索，发现除爱德华氏菌属外，其余的相似性较低。图 3 是根据菌株 H1 的 16S rRNA 基因序列与相关属种 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树。图中可见菌株 H1 与迟钝爱德华氏菌 (EU259317) 自然聚为一支，且同源性高达 99%，可将其鉴定为迟钝爱德华氏菌。

2.5 人工感染试验结果及半致死浓度的确定

人工感染试验共进行了 19 d。试验初期，对照

组和试验组摄食正常。其中 1.41×10^9 CFU/mL 试验组在注射菌液的第二天就出现了白色粪便，第 4 天开始死亡，16 d 全部死亡。 1.41×10^8 CFU/mL 的死亡率达到 80%，而低浓度 1.41×10^3 CFU/mL 未见死亡现象。证明高浓度的迟钝爱德华氏菌对牙鲆的致病力是相当强的且能致死。人工感染后的大菱鲆，腹面肌肉充血发红，内部解剖发现其肝脏萎缩充血，肠壁变薄，充水且有白色粪便，这与作者在流行病学调查过程中所收集到的红体病病鱼样品症状基本一致 (图 4)。从感染的病鱼肌肉中再次分离得到病原菌，经过 API32E 鉴定也证实为迟钝爱德华氏菌。

经计算：

$$\lg LD_{50} = \lg(1.41 \times 10^9) - 1 \times (1 + 9/10 + 8/10 + 7/10 + 5/10 + 3/10 - 0.5) = 5.45$$

$$\text{所以 } LD_{50} = 2.82 \times 10^5 \text{ CFU/mL。}$$

3 讨论

患红体病的大菱鲆主要特征是病鱼的皮下肌肉充血发红，伴腹腔出现腹水现象有；感染后期病鱼漂浮于水面，解剖发现其肾、脾肿大，肠壁变薄、充水，但肝脏基本正常。从该患病鱼肌肉中分离得到的 H1 菌株，经人工感染试验发现 90% 以上的死

亡鱼和濒死鱼出现了明显的红体症状，从被感染的鱼体中分离得到的细菌与 H1 菌株生理生化特征一致，证实该菌为大菱鲆红体病的致病菌。通过形态

学、API32E 生理生化及 16S RNA 基因序列分析和系统发育树构建，该菌株初步被鉴定为迟钝爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*)。

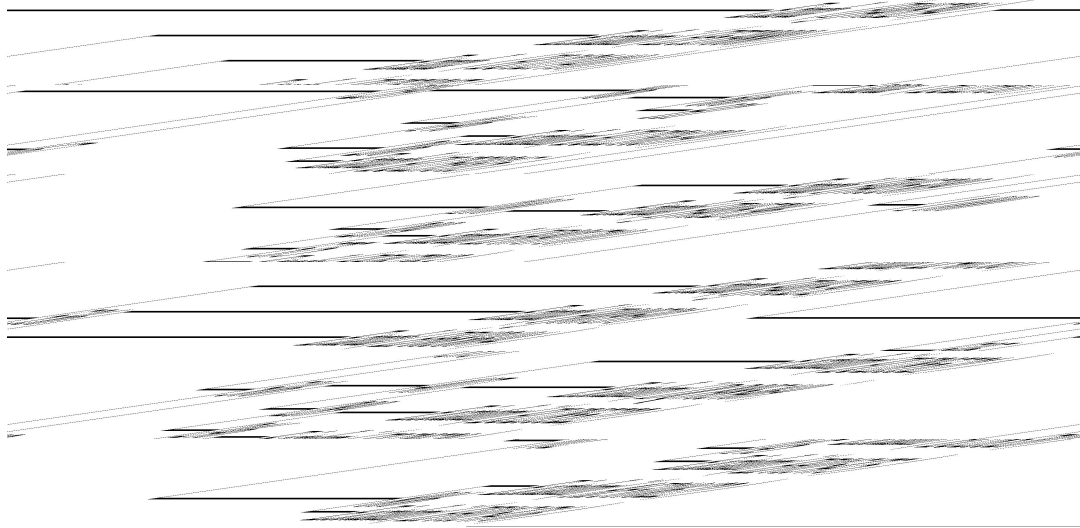


图 3 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Fig 3 Phylogenetic tree based on 16S ribosomal gene sequences



图 4 人工感染的大菱鲆

Fig.4 Artificially infected turbot by strain H1

表 3 人工感染实验结果

Tab.3 Result of challenge test of turbot infected by H1

浓度 (CFU/mL)	实验鱼数 (尾)	剂量 (mL)	死亡数量 (尾)	死亡率 (%)
1.41×10^9	10	0.2	10	100
1.41×10^8	10	0.2	9	90
1.41×10^7	10	0.2	8	80
1.41×10^6	10	0.2	7	70
1.41×10^5	10	0.2	5	50
1.41×10^4	10	0.2	3	30
1.41×10^3	10	0.2	0	0
生理盐水	10	0.2	0	0

迟钝爱德华氏菌是目前水产养殖中危害较大的病原菌。1962 年 Hoshina 首次报道迟钝爱德华氏菌导致日本鳎红病 (red disease)^[14]。迄今为止,该菌已经在多种养殖鱼类中引发了病害,包括淡水鱼类和海水鱼类,如鲫、金鱼、大鳞大马哈鱼、虹鳟、罗非鱼、鳎、牙鲆、真鲷、川鲷等。除此之外,该菌还可感染两栖类动物牛蛙^[15]和爬行类动物中华鳖等^[16,17]。Regalla^[18]报道了由该菌引起的海豹发病,并且迟钝爱德华氏菌也是一种重要的人畜共患病原菌。

在国外关于迟钝爱德华氏菌感染大菱鲆的病例只有很少的研究^[19],国内张晓君等^[20]曾报道了迟钝爱德华氏菌野生型(*E. tarda* wild type)菌所引起的大菱鲆爱德华氏菌病,其病理变化为败血症感染类型,缺乏特征性具有眼观诊断价值的病变。王印庚等^[21]也报道了大菱鲆的爱德华氏菌病,且有急性和慢性两种感染形式。其急性感染时,病鱼出现的临床症状和作者描述的相似:体表皮下充血发红、局部有脓样发炎,肾脏肿大、坏死。慢性感染病鱼的典型特征是身体后半部体色发黑,而前半部体色基本正常,出现明显的‘黑-白’界线而呈‘两截’现象。根据王印庚等^[21]描述,几年前大部分养殖场的病鱼表现为慢性感染,疾病传播蔓延速度较慢,其死亡



率在 10% 以下。近期本实验室由不同时期分别从不同的养殖场患病的大菱鲂体中常分离到迟钝爱德华氏菌，且病鱼外观多呈皮下充血发红症状，养殖者称其为‘红体病’。这些现象说明迟钝爱德华氏菌成为养殖大菱鲂的重要病原菌之一，并且从疾病流行特点上使其原来的慢性感染（两截症状）逐步转化到急性感染形成明显的皮下充血发红症状。

随着大菱鲂养殖规模的不断扩大，养殖生态环境的恶化和微生物群落结构的变化，大菱鲂迟钝爱德华氏菌病的流行病学特征也随之变化。由迟钝爱德华氏菌导致的红体病的发生率不断上升，死亡率可达 30%~40% 以上，给养殖生产带来了较大的损失。综合其研究与报道，红体病可能有较复杂的致病病原，应给予足够的重视。引起红体症状的迟钝爱德华氏菌株与引起两截症状的迟钝爱德华氏菌株是否为同一血清型或其它方面存在差异还有待进一步研究。另外，养殖大菱鲂红体病也能由大菱鲂红体病虹彩病毒（TRBIV）引起^[22]，其症状是鱼体腹面充血发红，与作者报道的症状极为相似，所不同的是大菱鲂病毒性红体病鳃丝严重贫血呈暗灰色。但在本研究中，从患红体病的大菱鲂组织中，并未发现病毒粒子、霉菌和寄生虫的存在，另外经人工感染试验证实大菱鲂红体病由细菌感染所致，其致病菌为迟钝爱德华氏菌。

参考文献：

[1] 雷霖霖,刘新富.大菱鲂 *Scophthalmus maximus* 引进养殖的初步研究[J]. 现代渔业信息,1995,10(11):1-3.

[2] 雷霖霖, 门强, 王印庚, 等.大菱鲂“温室大棚+深井海水”工厂化养殖模式[J].海洋水产研究,2002,23(4):1-7.

[3] 程开敏,俞开康,战文斌, 等. 大菱鲂疾病的研究进展[J]. 鱼类病害研究, 2001,23(2):33-38.

[4] 王印庚, 张正, 秦蕾, 等.养殖大菱鲂主要疾病及防治技术[J].海洋水产研究, 2004,25(6):61-68.

[5] 张正, 王印庚, 韩文君, 等.养殖大菱鲂烂鳍病病原菌的鉴定及系统发育学研究[J].海洋科学进展,2004,22(2):192-197.

[6] 史成银, 王印庚, 秦蕾, 等.我国养殖大菱鲂病毒性红体病及其流行情况调查[J].海洋水产研究,2005,26(1):1-6.

[7] 陶秉春,郭立,王海波,阎富珍,杨永海,田凤鸣.患肠炎病大菱鲂的组织病理学研究.王清印主编:《海水健康养殖的理论与实践》.北京:海洋出版社,2003a.392~399.

[8] 陶秉春,杨永海,郭世宜,等.感染疱疹病毒大菱鲂的细胞病理学研究.中国水产(专刊).2003b.229-232.

[9] 杜佳垠.大菱鲂盾纤毛虫病研究简报[J].齐鲁渔业,2002,19:6-7.

[10] 雷霖霖, 马爱军, 王印庚, 等.一种吻蛭类大鱼蛭在大菱鲂鱼体上的感染[J].海洋水产研究,2003,24(3):72-74.

[11] Regalla J. Isolation of *Edwardsiella tarda* from a seal[J]. *Pepos Trab Inst Nac Vet*,1998,14:93-96.

[12] 陆承平.兽医微生物学[M].北京:中国农业出版社.2001.

[13] 杨茂成主编. 兽医统计学[M]. 北京:中国展望出版社,1990. 232.

[14] Hoshina T. On a new bacterium *Paracolobactrum anguillimortiferum* n.sp. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1962a, 28:162-164.

[15] 肖克宇, 黄志坚, 金燮理, 等.牛蛙爱德华氏菌病原的鉴定和致病因素的研究[J].水产学报, 1997, 21(3):316-321.

[16] 蔡完其, 孙佩芳, 刘至治.中华鳖爱德华氏菌病原和组织病理研究[J].水产学报, 1997, 21(4):428-433.

[17] 朱芸.中华鳖“浮肿病”病原菌的鉴定及迟钝爱德华氏菌溶血活化基因的克隆[D]. 请补何地何学校的硕士论文, 2007.

[18] 马勋, 欧阳志明, 陈怀清, 等.迟钝爱德华氏菌对 Hep-2 细胞的侵袭性[J].微生物学报. 1998, 38(5):336-340.

[19] Nougayrede P H, Vuillaume A, Vigneulle M, et al. First isolation of *Edwardsiella tarda* from diseased turbot (*Scophthalmus maximus*) reared in a sea farm in the bay of Biscay[J]. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*,1994, 14:128-129.

[20] 张晓君, 房海, 陈翠珍, 等.大菱鲂爱德华氏菌病:病例报告.中国兽医学报, 2007, 27(40):516-520.

[21] 王印庚, 秦蕾, 张正, 等.养殖大菱鲂的爱德华氏菌病[J]. 水产学报, 2007,31(4):487-495.

[22] 史成银, 王印庚, 秦蕾, 等.我国养殖大菱鲂病毒性红体病及其流行情况调查[J].海洋水产研究, 2005, 1:1-6.



Isolation and identification of the pathogenic bacterium causing red body from cultured Turbot *Scophthalmus maximus*

DONG Li^{1,2}, WANG Yin-geng², ZHANG Zheng, QU jiang-bo³, CHEN Xia⁴

(1. College of Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Qingdao 266071, China; 3. Tianyuan Aquaculture Limited Company, Yantai 264000, China; 4. Sunny Oceans Aquaculture Technology Co., LTD, Qingdao 266071, China)

Received: Sep., 23, 2008

Key words: *Scophthalmus maximus*; red body; identification of bacterium; *Edwardsiella tarda*

Abstract: A dominant strain of the bacteria causing red body of turbot was isolated from the diseased turbot and designated as H1. In an artificial infection test, all fish of the experimental group died in 15 days after intramuscularly being injected with a high bacterial suspension (1.41×10^9 CFU/mL), and the low bacterial suspension (1.41×10^3 CFU/mL) did not cause any death, while the control group showed no signs all through the experimentation. The LD_{50} was calculated as 2.82×10^5 CFU/mL. The moribund experimental fish had gross signs similar to the natural infected fish. The bacterium re-isolated from the challenged fish also had the same characteristics as H1, which proved that the isolated H1 was the pathogenic bacterium that triggered this red body disease. Different methods were used to identify the pathogenic bacterium. The bacterium is negative, rod in shape, peritrichous flagella under electronic microscope. Traditional biochemical identification revealed that H1 exhibited relatedness to *Edwardsiella tarda*, while the identification result by API 32E system indicated that H1 was *E. tarda* with 99.9% reliability. Its 16S ribosomal RNA gene sequences were analyzed, and it is shown from the analysis results that this strain of bacterium has a close phylogenetic relation (99%) to *E. tarda*. In summary, the pathogenic bacterium was identified as *E. tarda*.

(本文编辑：梁德海)