

养殖鲟鱼出血症病原鲁氏耶尔森菌的 分离鉴定和致病性研究*

李绍戌¹ 王 荻¹ 冯 娟^{2,3} 卢彤岩^{1①}

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所 哈尔滨 150070; 2. 中国水产科学研究院南海水产研究所 广州 510300;
3. 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室 广州 510300)

提要 鲁氏耶尔森菌(*Yersinia ruckeri*)是鲑鳟鱼类和温水性鱼类肠炎红嘴病的主要病原,可引起病鱼体表出血、肠道肿胀发炎等临床症状。本研究从患出血症施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)中分离到一株致病性菌株(YR-H01),生理生化鉴定和 16S rRNA 基因序列分析表明 YR-H01 株为鲁氏耶尔森菌。人工感染该菌后发病鱼表现为肛门红肿、外突明显,部分鱼鳍基部和下颌处有出血现象,内脏器官不同程度出血,且从组织中再分离的细菌特性与原感染菌相同。腹腔注射后该菌株对施氏鲟的半致死浓度为 7.2×10^6 CFU,且攻毒剂量越大,临床病症出现越快。病理组织切片显示,该菌感染鲟鱼后肝细胞发生明显病变,淋巴细胞浸润,肝索结构消失,细胞肿胀,核空泡变性或核仁边缘化。

关键词 施氏鲟(*Acipenser schrenckii*); 鲁氏耶尔森菌(*Yersinia ruckeri*); 16S rRNA 基因; 致病性
中图分类号 S941 **doi:** 10.11693/hyh20130121001

鲟鱼(*Acipenseriformes*)属世界性保护物种(谢忠明等, 2002)。随着鲟鱼养殖关键技术的完善,鲟鱼养殖产业得到快速发展。我国试养的鲟多达十几种,目前形成规模养殖的种类主要有施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)、西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)、鲟鳇杂交(*Huso dauricus*♀×*Acipenser schrenckii*♂)和匙吻鲟(*Polyodon spathula*),约占鲟养殖总产量的 90%以上(孙大江等, 2011)。但受到集约化程度快速提高、养殖水体污染严重、病害防治技术落后等诸多因素影响,养殖鲟鱼爆发性疾病日趋严重,给生产及科研工作造成巨大损失和困扰(田甜等, 2012)。

水产动物耶尔森菌病(yersiniosis)是由肠杆菌科耶尔森菌属的鲁氏耶尔森菌(*Yersinia ruckeri*)引起的,该菌可导致鲑鳟鱼类发生肠炎红嘴病(enteric redmouth, ERM),其主要症状为体表(尤其是头、嘴、鳃盖等部位)充血、肠道肿胀发炎等(Furones *et al.*, 1993; Tobback *et al.*, 2007)。研究表明,鲁氏耶尔森菌

主要为冷水性鲑鳟鱼类的病原菌,但同样感染其他鱼类如鲢、鳙、鳊、金鱼、鲤鱼、鲟鱼和罗非鱼等,并导致鱼类细菌性败血症,可同其他革兰氏阴性菌如嗜水气单胞菌、温和气单胞菌、豚鼠气单胞菌等混合感染(Berc *et al.*, 1999; Danley *et al.*, 1999; Eissa *et al.*, 2008)。在国内,徐伯亥等(1991)、范芳玲等(2010)先后报道了由鲁氏耶尔森菌引起的鱼类细菌性败血症,病鱼体表多处出血,内脏伴有不同程度的发炎、充血。Vuillaume 等(1987)首次从西伯利亚鲟中分离到鲁氏耶尔森菌,病鱼表现为嘴部、下颌、胸鳍及泄殖孔附近出血,并伴有腹水。2010 年作者在河北某鲟鱼养殖场进行流行病学调查发现一例施氏鲟出血症,症状与已报道的耶尔森菌病相近,对发病鲟鱼进行了病原分离鉴定,并进一步确定了病原菌的致病性。为了明确病原菌的分类学地位,本文采用生理生化方法和 16S rRNA 基因序列分析方法鉴定致病菌,并进行系统发育学分析。另外,通过感染鲁氏菌后鲟鱼病

* 十二五国家科技支撑计划项目资助, 2012BAD25B10 号; 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室开放基金项目资助, LSF2011-08 号。李绍戌, 博士, 副研究员, E-mail: swli_1982@163.com

通讯作者: 卢彤岩, 研究员, E-mail: lutongyan@hotmail.com

收稿日期: 2013-01-21, 收修改稿日期: 2013-05-29

理组织切片观察, 来了解鲁氏耶尔森菌对鲟鱼的致病机理和感染途径。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

鱼源鲁氏耶尔森菌分离株(YR-H01)于2010年分离自河北某鲟鱼养殖场患病鲟鱼体内; 实验用施氏鲟购自中国水产科学研究院北京房山鲟鱼繁殖中心, 为非免疫状态下(60±2)g实验鱼; 实验用 TSA/TSB 培养基、PCR 所用试剂及特异性引物均购自上海生工生物工程有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司; 细菌生化微量鉴定管购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 病原菌形态观察及理化特征鉴定 室温下解冻低温冷冻保存的菌种, 在无菌条件下, 将细菌接种于 TSA 平板上, 25°C 恒温培养 24h。肉眼观察菌落形态、大小、隆起度、颜色等, 并利用透射电镜(Hitachi-7650)观察细胞的形态及鞭毛数量等; 菌株各项生化指标的测定参照相关文献进行(东秀珠等, 2001)。

1.2.2 人工感染实验及 LD₅₀ 测定 将分离菌株 YR-H01 接种 TSA 于 25°C 恒温培养 24h 后, 用 10mL pH 7.2 的灭菌生理盐水洗板, 振荡摇匀, 稀释至合适浓度备用。选取适当的稀释系数, 按照攻菌浓度从高到低依次设立 A—H 共 8 个实验组, 同时设立注射等比例生理盐水的对照组 Z 进行摸索 LD₅₀ 实验。每组随机选取施氏鲟 6 尾, 按照 0.2mL/50g 体重腹腔注射不同浓度菌液, 分别于 24h、48h 及 72h 后观察记录死亡情况及病理症状, 同时按 Reed-Muench 法计算菌株半致死量(LD₅₀)(Reed *et al.*, 1938)。

将鲁氏菌稀释至 LD₅₀ 浓度并进行攻毒实验, 每组 10 尾, 设空白对照组。剖检实验组死亡施氏鲟, 观察鱼体内主要脏器的病理变化, 并对 72h 仍存活的鲟鱼取血及实质器官肝、肾进行细菌分离计数, 同时对其肝、肾组织进行组织病理学检验。

1.2.3 16S rRNA 序列测定及系统发育分析 将细菌接种于 TSB 中, 25°C 220r/min 震荡 18h 后离心收集菌体, 按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取细菌总 DNA, 作为 PCR 模板 DNA。参考文献, 利用特异性引物 Yer-F: 5'-CGAGGAGGAAGGGTT AAGT-3'和 Yer-R: 5'-AAGGCACCAAGGCATCTCT-3'对鲁氏菌 16S rRNA 基因片段进行扩增(Cunningham *et al.*, 2010)。PCR 反应条件为: 95°C 预变性 5min;

94°C 变性 30s, 55°C 退火 30s, 72°C 延伸 1min, 共 30 个循环; 最后 72°C 延伸 10min。PCR 产物经纯化后由上海生工生物工程股份有限公司进行序列测定。

利用 BLAST 在线同源性查询软件查询所测菌株 YR-H01 的 16S rRNA 序列的属性, 将其与从 GenBank 数据库中获得的耶尔森菌属细菌及其他亲缘关系相近的属种的 16S rRNA, 采用 Clustal W 软件进行多序列匹配排列(Multiple Alignments), 用系统发生推断软件包 MEGA 4.0 进行系统发育分析。在 Kimura-2-parameter 模型的基础上, 用 Neighbor-joining 法构建分子系统树, 自举分析(Bootstrap)1000 次重复检测分子系统树的置信度, 缺失和不确定的位点在计算中被省略。

2 结果

2.1 发病病例的流行情况及临床特征

2010 年 3 月作者在河北省某鲟鱼养殖场进行流行病学调查发现一例鲟鱼出血症, 死亡率达到 30%。养殖模式为水泥池流水养殖, 发病水温约 12—16°C, 发病个体大小约 300—500g。同时间在河南、北京周边地区主要鲟鱼养殖场也发现类似病症, 死亡率从 10%至 50%不等; 结合近几年的鲟鱼主要病害流行病学调查工作, 初步判断为细菌性出血症。病鱼临床症状表现为下颌、胸鳍、腹部及泄殖孔附近出血, 并伴有腹水。解剖观察发现病鱼内脏器官有不同程度的出血, 肝脏肿大、发暗, 有出血点或出血斑, 心脏呈花斑状, 脾脏紫黑色, 肠道不同程度出血。

2.2 细菌形态特征

鲁氏耶尔森菌 YR-H01 株在 25°C 培养 24h 后于 TSA 平板上形成表面光滑、边缘整齐、微粘、淡黄色, 直径约 1—2mm 的圆形隆起的菌落。革兰染色后镜检发现该菌株为革兰氏阴性短杆菌(图 1a)。透射电镜结

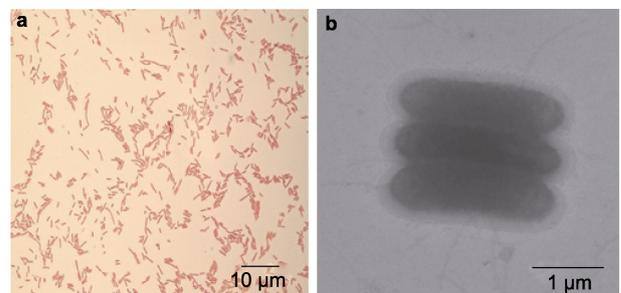


图 1 鲁氏耶尔森菌 YR-H01 株形态观察

Fig.1 Morphological images of *Y. ruckeri* YR-H01

a. 光学显微镜下鲁氏菌革兰氏染色照片; b. 透射电镜下鲁氏菌形态观察(25000×)

果显示, YR-H01 株胞外有一层明显的细胞膜, 伴有褶皱。细胞直径约 0.64 μm , 长度在 1.7—2.5 μm , 细胞膜的厚度为 0.12 μm 。每个细胞有 5—8 条周生鞭毛并锚定在细胞上(见图 1b)。

2.3 理化特征

常规理化分析表明, YR-H01 株革兰染色阴性,

氧化酶反应阴性, 氧化发酵阳性, 具有运动性; 其他理化特征见表 1。生长条件测定结果显示, YR-H01 株生长温度范围为 20—37 $^{\circ}\text{C}$, 最适生长温度为 25—30 $^{\circ}\text{C}$, 在含盐量 1%—3% 的 TSA 培养基上能生长, 生长的 pH 值范围为 5.0—9.0, 最适 pH 值为 7.0, 且在 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18h 后细菌数目达到稳定期(图 2)。

表 1 YR-H01 菌株的生理生化特征分析

Tab.1 Characteristics and biochemical reactions of the YR-H01 isolate

性状	结果		性状	结果	
	YR-H01	<i>Y. ruckeri</i>		YR-H01	<i>Y. ruckeri</i>
革兰染色	-	-	葡萄糖产气	-	D
氧化/发酵	+	+/-	木糖	-	-
氧化酶	-	-	纤维二糖	-	-
移动性	+	-	蜜二糖	-	-
脲酶	-	-	棉子糖	-	-
赖氨酸脱羧酶	+	N	蔗糖	-	-
鸟氨酸脱羧酶	+	+	鼠李糖	-	-
谷氨酰胺转移酶	+	+	阿拉伯糖	-	-
枸橼酸盐	+	-	海藻糖	-	+
明胶	+	+	水杨苷	-	-
吲哚	-	-	山梨醇	+	+
VP 反应	-	-	肌醇	-	-

+为阳性; -为阴性; N 表示未进行该项目测定; D 表示结果有变化; *Y. ruckeri* 理化特征参考有关文献(Danley et al, 1999; 范芳玲等, 2010)

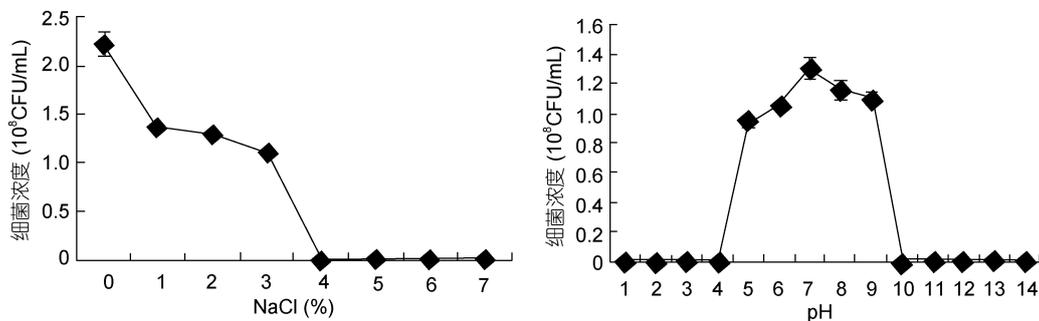


图 2 鲁氏菌 YR-H01 株最适生长条件研究

Fig.2 The optimum growth condition of *Y. ruckeri* YR-H01 strain

2.4 16S rRNA 基因序列和系统发育学分析

PCR 扩增 YR-H01 菌株的 16S rRNA 基因片段约 500bp, 测序结果表明该片段有 563bp, 在 GenBank 中的登陆序列号为 JQ657818。同源性检索结果表明 YR-H01 菌株与耶尔森菌属的鲁氏耶尔森菌、克里斯坦森耶尔森菌以及小肠结肠炎耶尔森菌核苷酸同源性达到 96.5% 以上。

从 NCBI 核酸数据库中选取 16 个水产动物致病菌株的 16S rRNA 基因序列进行系统发育学分析, 结果如图 3 所示, YR-H01 与 *Y. ruckeri* (HQ222844)、*Y.*

kristensenii (NR025159)、*Y. enterocolitica* (NR041832) 和 *Y. intermedia* (NR027545) 聚成一群, 与它们的相似性分别达到 98.5%、97.5%、96.4% 和 96.8%; 另外, 与爱德华菌属的迟缓爱德华菌、斑点叉尾鲷爱德华菌遗传距离较近, 而与黄杆菌亲缘关系较远。综合常规生理生化和 16S rRNA 基因序列分析结果表明, YR-H01 株鉴定为鲁氏耶尔森菌。

2.5 LD₅₀ 的测定及临床观察结果

当注射 0.2mL 浓度为 1.5×10^8 CFU/mL 的菌液后, 试验鱼的累积死亡率达到 100%; 因此, 确定分组区间

为 $(0-3) \times 10^7$ CFU, 所用稀释倍数为 1.5。根据 Reed-Muench 法计算 YR-H01 菌株半致死量(LD₅₀)为 7.2×10^6 CFU(表 2)。

经观察发现, 鲟鱼感染鲁氏耶尔森菌后, 肛门红肿

外突明显, 且部分鱼鳍基部和下颌处有出血现象。随着攻菌浓度的升高, 出现临床病理症状的时间逐渐缩短, 实验 A 组 6h 开始有部分鱼出现病理症状, 8h 症状普遍出现, 9h 第一尾鱼死亡, 对照组无死亡记录。

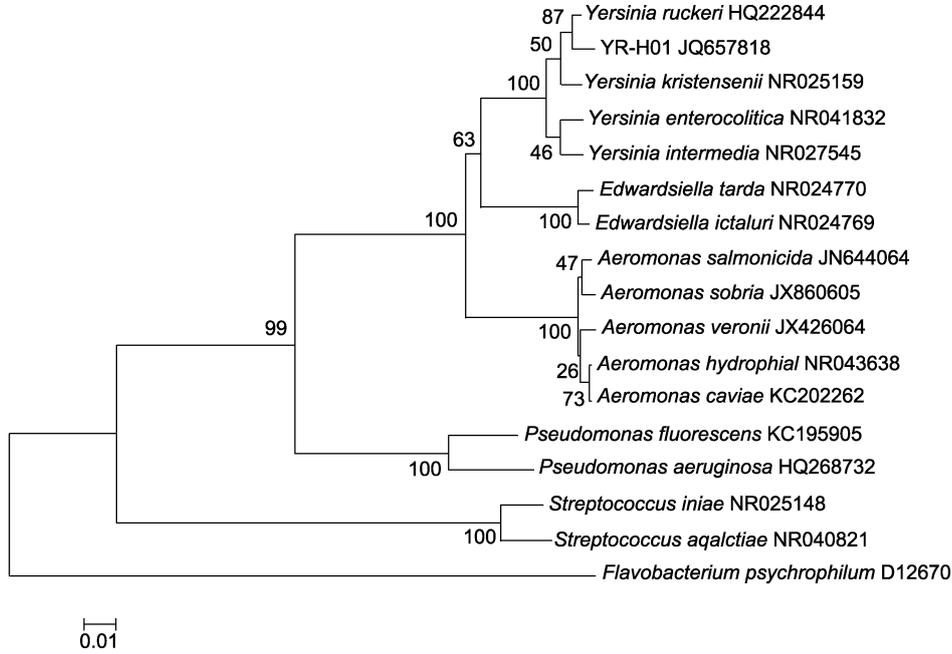


图 3 基于 16S rRNA 基因序列的系统进化树分析

Fig.3 Phylogenetic relationship among *Yersinia* species based on 16S rRNA gene sequences

表 2 人工感染不同浓度 YR-H01 株后试验鱼的死亡数量统计

Tab.2 The cumulative mortality of fish injected with different concentrations of *Y. ruckeri* H01

时间 (h)	不同攻毒剂量下试验鱼累计死亡数(尾)								
	3×10^7 CFU	2×10^7 CFU	1.33×10^7 CFU	0.89×10^7 CFU	0.59×10^7 CFU	0.39×10^7 CFU	0.26×10^7 CFU	0.17×10^7 CFU	0×10^7 CFU
24	8	4	3	2	1	0	0	0	0
48	9	7	5	4	3	1	0	0	0
72	10	9	7	6	4	3	1	0	0

试验用鱼总计 10 尾

对实验组感染后死亡鲟鱼进行剖检可见, 其肠道充血, 肿胀, 肠道内充满黄色液体, 部分鱼有粘性分泌物。取对照组及感染后存活鲟血及肝、肾涂板进行细菌分离计数, 结果表明: 对照组三种组织中均未分离到鲁氏菌, 而实验组肝、肾带菌率为 100%, 且生化鉴定和分子鉴定结果表明重新分离到的菌株与感染的鲁氏菌 YR-H01 株一致; 血液未见细菌检出。

2.6 病理组织观察

由肝肾组织切片结果可见, 感染后鲟鱼肾脏无明显病变(图 4a), 肾细胞形状及大小均正常, 肾小管管腔形状清晰可辨, 无淋巴细胞及血细胞侵染, 且管腔上皮细胞界线清晰, 排列规则。对照组鲟鱼肝脏组

织切片(图 4b)观察结果表明, 对照组肝脏组织致密、结构清晰, 具有完整的肝索、肝血窦等结构, 肝细胞排列紧密, 核呈圆形, 位于细胞中央, 细胞质饱满, 且细胞间窦状隙明显, 其中充满红血球。而感染鲁氏菌的鱼肝组织出现明显的淋巴细胞浸润(图 4c), 肝细胞的索状结构消失, 肝组织呈弥漫性坏死, 肝细胞肿胀, 肝细胞基本上失去了正常的多角形状, 核空泡变性或核仁移向边缘(图 4d)。有些肝细胞已经溶解变性, 窦状隙腔已弥散不可见。

3 讨论

鲁氏耶尔森菌是冷水性鲑鳟鱼类、温水性鲤科鱼

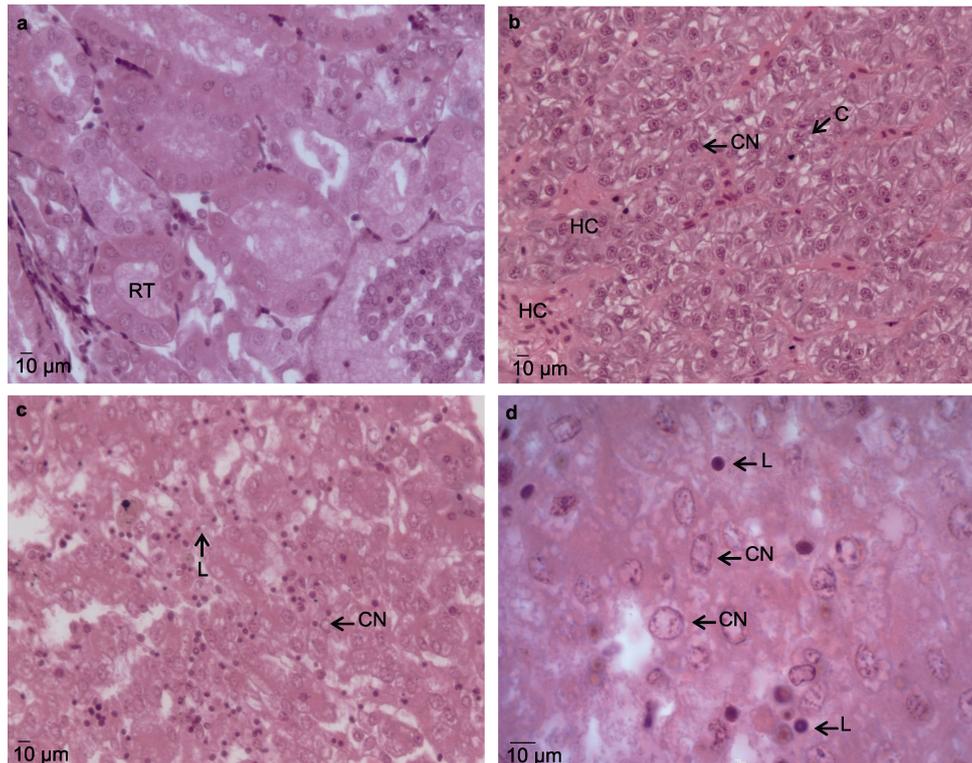


图4 鲁氏耶尔森菌感染施氏鲟肝肾病理变化

Fig.4 Pathological changes of livers and kidneys in Amur sturgeon after infection by YR-H01 strain

a. 肾脏组织切片(40×): 肾小管(RT)正常, 无淋巴细胞及血细胞侵染; b. 对照组肝脏(40×): 肝细胞(C), 肝细胞核(CN), 肝索(HC), 肝血窦(HS); c. 病变肝脏(40×): 淋巴细胞(L); d. 病变肝脏(100×): 核空泡变性或核仁移向边缘, 有淋巴细胞浸润

类等的常见病原菌之一。自上世纪 50 年代首次在美国养殖虹鳟体内分离到该菌以来(Ross *et al*, 1966), 其宿主范围和地理分布均有明显地扩大趋势, 其感染鱼类主要包括鲑鳟科鱼类、金鱼、鳊鱼、鳙鱼、鲟鱼、鲢鱼、鳙鱼、斑点叉尾鲟等, 且在德国、法国、英国等欧洲各国及澳大利亚、中国均有所发现(Austin *et al*, 2007), 已成为对养殖鱼类具有广泛致病性的重要病原菌之一。本实验首次从我国鲟鱼主养区患出血症的鲟鱼体内分离、保存了鲁氏耶尔森菌一株, 命名为 YR-H01 株, 结合目前对鱼类病原菌的鉴定方法, 从形态观察、理化特征分析及基因序列比对分析等方面对其进行研究(Nomoto *et al*, 2004; 孟彦等, 2007; 甘西等, 2007), 结果显示 YR-H01 株的理化特征与已报道的斑点叉尾鲟(*Ictalurus punctatus*)源菌株基本一致(范芳玲等, 2010)。攻毒后, 实验鱼有明显出血症状, 且可从发病鱼的内脏组织再次分离到与原感染菌特性相同的致病菌株, 确定该菌对施氏鲟具有致病性。而电镜观察菌株形态与 Austin 等(1999)报道的鲁氏耶尔森菌基本一致。

不同环境条件对细菌感染力有一定影响, 而鲁

氏菌感染受温度影响较大。15—18°C 水温对细菌感染有明显影响(Roberts, 1983); 斑点叉尾鲟腹腔注射鲁氏菌时, 18°C 感染及发病率远高于 22°C(Danley *et al*, 1999), 表明较低水温可增加鲁氏菌致病性, 加重感染程度(Fernandez *et al*, 2007)。华北、东北地区是我国鲟鱼人工繁育、苗种孵化的主要场所, 这些地区多为温冷水性养殖区, 水温 18—24°C 期间较长, 需加强鲁氏菌低温易感菌的监控和监测工作。

随着鲟鱼养殖的产业化发展, 因管理手段、养殖环境及水产品贸易等, 导致病原传播几率大大增加, 为鲁氏耶尔森菌在鲟鱼养殖地区的迅速传播创造了条件, 使该菌对鲟鱼的潜在危害性增大。上世纪九十年代我国黑龙江、山东、北京等鲟鱼主养区多次暴发病急、发病率和死亡率高的不明疾病。1997 至 2000 年间累计死亡鱼苗约 30 万尾, 死亡率高达 80%。病鱼体侧、腹部、鳃等部位出血, 个别严重者可见吻部及口腔周围出血; 剖检可见, 肝、脾、肠道等有出血现象。组织病理研究表明患病鱼肝组织病变严重, 局部肝细胞坏死(曾朝辉, 2003)。患病鱼体表及内脏组织大面积出血、肝损伤及神经症状与鲁氏菌病症有许

多相似之处。目前, 鲟鱼感染鲁氏菌的报道较少, 但危害极大, 可导致 60% 以上的死亡率(Vuillaume *et al.*, 1987)。

近几年, 我国养殖鲟鱼流行病学调查研究发现, 每年 4—8 月是耶尔森菌病的发病高峰期, 其发病率及程度受温度、水质等环境因子及鱼体自身免疫力等因素的影响。因此, 在鲟鱼养殖过程中应加强对该细菌病的监控工作, 从水质控制、养殖密度等方面预防疾病, 以便及时采取有效的防治措施, 避免该菌成为养殖鲟鱼未来重要新病原的可能, 并可适当选用喹诺酮类药物进行早期防治, 建立控制鲟鱼耶尔森菌病的有效方法。

参 考 文 献

- 谢忠明, 孙大江, 王京树等. 2002. 鲟鱼养殖技术. 北京: 中国农业出版社, 252
- 孙大江, 曲秋芝, 张颖等. 2011. 中国的鲟鱼养殖. 水产学杂志, 24(4): 67—70
- 田甜, 杨元金, 王京树等. 2012. 鲟鱼病害研究进展. 湖北农业科学, 51(3): 559—563
- 徐伯亥, 殷战, 陈燕等. 1991. 鲢、鳙鱼一种新的传染病——*Yersinia ruckeri*, 一种新的鲢、鳙鱼病原菌. 科学通报, 82(8): 620—622
- 范方玲, 汪开毓, 耿毅等. 2010. 斑点叉尾鲟(*Ictalurus punctatus*)源鲁氏耶尔森氏菌的分离鉴定及系统发育分析. 海洋与湖沼, 41(6): 862—868
- 东秀珠, 蔡妙英. 2001. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 364—398
- 曾朝辉. 2003. 鲟鱼苗早期暴发性疾病的病因分析. 哈尔滨: 东北林业大学硕士论文
- 孟彦, 肖汉兵, 张林等. 2007. 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, 26(6): 822—826
- 甘西, 陈明, 余晓丽等. 2007. 罗非鱼海豚链球菌 16S rRNA 基因的序列测定和系统进化分析. 水产学报, 31(5): 618—623
- Austin B, Austin D A, 1999. Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish. 3rd edn. Springer-Praxis, London, England: 24—25, 89—91, 136—137, 232—233, 269—270
- Austin B, Austin D A, 2007. Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish. 4th edn. Springer-Praxis, London, England: 32—33
- Berc A, Petrinc Z, Matasin Z *et al.*, 1999. *Yersinia ruckeri* septicaemia in experimentally infected carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings. Acta Vet Hung, 47(2): 161—172
- Cunningham S A, Sloan L M, Nyre L M *et al.*, 2010. Three-hour molecular detection of *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Shigella* species in feces with accuracy as high as that of culture. J Clin Microbiol, 48(8): 2929—2933
- Danley M L, Goodwin A E, Killian H S, 1999. Epizootics in farm-raised channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), caused by the enteric redmouth bacterium *Yersinia ruckeri*. J Fish Dis, 22(6): 451—456
- Eissa A E, Moustafa M, Abdelaziz M *et al.*, 2008. *Yersinia ruckeri* infection in cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, at a semi-intensive fish farm in lower Egypt. Afr J Aquat Sci, 33(3): 283—286
- Fernandez L, Mendez J, Guijarro J A, 2007. Molecular virulence mechanisms of the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. Vet Microbiol, 125(1—2): 1—10
- Furones M D, Rodgers C J, Munn C B, 1993. *Yersinia ruckeri*, the causal agent of enteric redmouth disease (ERM) in fish. Ann Rev Fish Dis, 3: 105—125
- Nomoto R, Munasinghe L I, Jin D H *et al.*, 2004. Lancefield group C *Streptococcus dysgalactiae* infection responsible for fish mortalities in Japan. J Fish Dis, 27(12): 679—686
- Reed L J, Muench H, 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. Amer J Hyg, 27(3): 493—497
- Roberts M S, 1983. A report of an epizootic in hatchery reared rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, at an English trout farm, caused by *Yersinia ruckeri*. J Fish Dis, 6(6): 551—552
- Ross A J, Rucker R R, Ewing W H, 1966. Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Can J Microbiol, 12(4): 763—770
- Toback E, Decostere A, Hermans K *et al.*, 2007. *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. J Fish Dis, 30(5): 257—268
- Vuillaume A, Brun R, Chene P *et al.*, 1987. First isolation of *Yersinia ruckeri* from sturgeon, *Acipenser baeri* Brandt, in south west of France. Bull Eur Assoc Fish Pathol, 7(1): 18—19

ISOLATION, IDENTIFICATION AND PATHOGENICITY OF A PATHOGENIC BACTERIUM *YERSINIA RUCKERI* ASSOCIATED WITH HEMORRHAGE OF CULTURED AMUR STURGEON (*ACIPENSER SCHRENCKII*)

LI Shao-Wu¹, WANG Di¹, FENG Juan^{2,3}, LU Tong-Yan¹

(1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China; 2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 3. Key Laboratory for Exploitation & Utilization of Marine Fisheries Resources in South China Sea, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510300, China)

Abstract *Yersinia ruckeri* is a causative agent of enteric red-mouth disease or yersiniosis; it infects salmonids and several other fish species with hemorrhagic signs on body surface and in intestine. In this study, a bacterial strain YR-H01 was isolated from Amur sturgeon (*Acipenserschrenckii*) with hemorrhage disease and was identified as *Yersinia ruckeri* by analyzing biochemical reactions and 16S rRNA gene sequence. The intraperitoneally YR-H01-injected fish showed obvious haemorrhaging in anus, fin base, lower jaw, and internal organs. The bacterial strains isolated from artificially-infected fish showed similar morphological and biochemical characteristics to those from naturally infected fish. Therefore, *Y. ruckeri* was pathogenic to Amur sturgeon with similar clinical signs as naturally diseased fish in LD₅₀ 7.2×10⁶CFU according to the Reed-Muench method. The stronger the challenge dosage of YR-H01 strain applied, the quicker the clinical signs appeared. Pathologic observation showed that the liver cells of fish were damaged after challenged by *Yersinia ruckeri*, showing obvious lesions, including lymphocytes infiltration, hepatic cord disappearance, cells plumping, vacuolar degeneration, and nucleolus marginalization.

Key words *Acipenserschrenckii*; *Yersiniaruckeri*; 16S rRNA gene; pathogenicity