

青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)新发病病原类志贺邻单胞菌(*Plesiomonas shigelloides*)的分离鉴定*

叶 键² 刘晓宁³ 王 晓⁴ 徐 慧⁴ 沈文英¹ 高敏杰¹ 章晓栋¹

(1. 绍兴文理学院生命科学学院 绍兴 312000; 2. 杭州市水产技术推广总站 杭州 310001; 3. 杭州大江东产业集聚区农业局 杭州 311222; 4. 绍兴出入境检验检疫局 绍兴 312000)

摘要 为研究青鱼暴发性死亡原因,从病症典型青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)肌肉、肝脏和肾脏处进行细菌接种,分离获得一株细菌(HZ2015),对其进行了形态观察、生化特性检测和 16S rRNA 序列分析,通过动物回归实验、毒力检测和药敏试验了解其对青鱼的致病性、毒力及药物敏感性。所得菌株为类志贺邻单胞菌(*Plesiomonas shigelloides*),动物回归实验能复制出类似症状,且能从体内再次分离到该菌株;分离株对小鼠的半数致死量(LD₅₀)为 10^{6.6} CFU;对头孢呋辛、头孢哌酮、庆大霉素、卡那霉素、复达欣高度敏感。研究表明,菌株 HZ2015 为青鱼体表溃烂病病原,本研究系类志贺邻单胞菌致青鱼体表溃烂病的首次报道。

关键词 青鱼;类志贺邻单胞菌;强致病性

中图分类号 S943 doi: 10.11693/hyhz20160300049

青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)亦称黑鲢、螺蛳青,属硬骨鱼纲、鲤科鱼类。个体大,生长迅速,最大个体可达 70kg,肉味美。分布于中国各大水系,主产于长江以南平原地区,为中国主要淡水鱼类养殖对象,是我国淡水养殖的“四大家鱼”之一(Li *et al.*, 1995)。近年来由于环境、饲料、养殖管理等因素导致的青鱼病害问题不断,已经报道的可引发青鱼大规模病害的主要病原菌有嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)等(Wang *et al.*, 2009; 张波等, 2010),尤其是前者容易引起急性暴发,造成青鱼大规模死亡。由于两者均可引发其它大宗淡水鱼类死亡,因而对青鱼的感染及致病机理研究不深入。目前专门针对青鱼病害的研究涉及较少,由类志贺邻单胞菌引发的青鱼病害也未见报道。

2015 年 8 月,杭州市一养殖场青鱼暴发病情,发病鱼不分个体大小,行动缓慢,反应迟钝,常离群独

游;体表出现溃烂,位置不一;解剖可见肠道充血,肾脏肿大,呈紫红色,日死亡率达 5%以上。本实验自病症典型患病鱼体内分离到 1 株可疑菌株,经生化和分子生物学方法鉴定其为类志贺邻单胞菌,并进一步通过回归感染确定了其病原性,同时检测了其毒力和药物敏感性,为生产中正确预防及治疗该菌的感染提供了科学参考。

1 材料与方法

1.1 材料

药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司; *Premix Ex Taq*, PCR 产物纯化试剂盒购自 TaKaRa 公司(日本);细菌基因组抽提试剂盒购自 Qiagen 公司(德国);健康青鱼(1000—1200g)购自杭州市某青鱼养殖场,体表无伤,隔天喂食,养殖一周确认健康后用于致病性实验;40 日龄 SPF 级 BALB/c 雌性小鼠购自浙江中医药大学实验动物中心。

* 国家自然科学基金青年科学基金资助项目, 31201930 号;浙江省公益技术研究农业项目, 2013C32045 号;绍兴市公益技术应用研究项目 2014B70044 号。叶键,高级工程师, E-mail: yejian1015@163.com

通讯作者: 章晓栋, E-mail: 13676885816@163.com

收稿日期: 2016-03-09, 收修改稿日期: 2016-04-15

1.2 病原菌分离及保存

将患病的青鱼用 75% 的酒精进行体表消毒处理, 用手术刀刮除溃烂处腐肉后, 从肌肉处分离接种于 LB 琼脂培养基上; 解剖后从肝脏、肾脏处分离接种于 LB 琼脂培养基上。将培养基置于 37°C 培养 36 h, 挑取优势菌群进行分离纯化, 然后接种至营养琼脂上培养。同时将纯化后的菌液加入等体积的 20% (V/V) 甘油, 于 -80°C 超低温冰箱中保存备用。

1.3 病原菌形态及生理生化特性检测

将细菌菌株纯化培养后, 经涂片、固定和革兰氏染色后, 使用光学显微镜观察。用等渗的无菌生理盐水洗下菌苔, 在 JSM-6360LV 扫描电镜进行观察。对分离菌株用 API ID32E 系统(Biomerieux, 法国)进行生化鉴定。

1.4 16S rDNA 的 PCR 扩增、测序和分析

以细菌基因组为模板, 应用 16S rRNA 通用引物 (8F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') 进行 PCR 扩增。PCR 产物用 PCR 产物纯化试剂盒回收后, 交 Invitrogen 公司测序。将测序所得菌株 16S rRNA 序列通过 NCBI 的 Blast 检索系统进行序列同源性分析。选取同源性较高的同种菌株的 16S rRNA 序列, 设置外群, 使用 MEGA4.0 软件, 采用邻接法构建系统发育树。通过自举分析进行置信度检测, 自举数集 1000 次。

1.5 药敏实验

采用纸片扩散法(K-B 法)进行细菌药敏性试验, 培养 24h 的细菌以无菌生理盐水洗下, 制备成浓度约 1×10^7 CFU/mL, 均匀涂布于 LB 固体培养基上, 用无菌镊子将药敏纸片均匀贴在平板上, 37°C 培养 24h 后测量抑菌圈直径。

1.6 动物实验

取纯化的菌株划线接种于 LB 平板, 30°C 下培养 18h。用生理盐水将菌苔洗下, 稀释成四个浓度的细菌悬液: 1.0×10^6 、 1.0×10^7 、 1.0×10^8 、 1.0×10^9 CFU/mL, 用于感染试验。

1.6.1 细菌回归实验 实验用青鱼在实验开始前 48h 停食。将青鱼分为两组, 每组 10 条。阳性组每条青鱼注射 0.1mL 菌液; 阴性组每只注射 0.1mL 生理盐水。控制水温为 28°C, 期间充气, 不换水。感染后记录发病死亡情况。死亡鱼进行解剖, 随机选取两条进行病原菌分离鉴定。

1.6.2 毒力实验 健康小鼠 25 只平均分成 5 个组。

4 个阳性组每只小鼠腹腔注射 0.1mL 菌液, 菌液浓度分别为 1.0×10^6 、 1.0×10^7 、 1.0×10^8 、 1.0×10^9 CFU/mL。阴性对照组小鼠每只注射 0.1 mL 无菌生理盐水。观察记录发病和死亡情况, 并用改良寇氏法计算 LD_{50} 值。

2 结果

2.1 菌株形态

分离菌株培养 18h 后形成的菌落低凸, 圆形, 直径 1—2mm, 边缘光滑, 表面湿润(图 1), 有刺激性气味。光镜检测发现分离菌株革兰氏染色为阴性, 短链状杆菌, 呈单个或成对分布。透射电镜观察, HZ2015 菌株呈末端圆形直杆状, 无芽孢和荚膜, 两端有丛生鞭毛, 大小(短径×长径)为 0.7—0.9 μ m×1.5 μ m (图 2)。

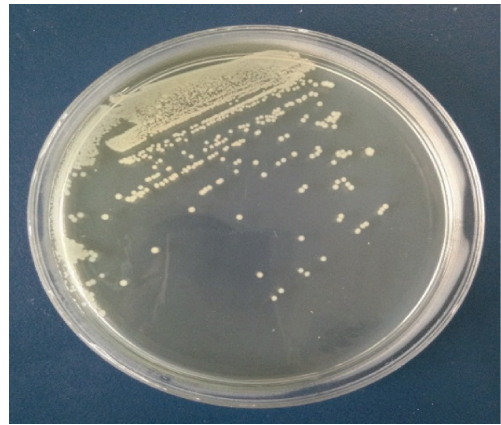


图 1 营养琼脂上菌落形态

Fig.1 Arrangement of the colonies shown on nutrient agar

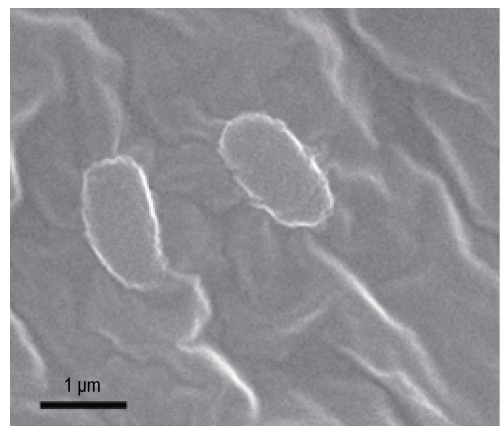


图 2 菌株透射电镜图像

Fig.2 TEM image of the strain

2.2 病原菌的生化鉴定

ATB ID 32E 生化鉴定系统表明(表 1), HZ2015 属于类志贺邻单胞菌属, 准确率为 99.9%。

表 1 病原菌的生化特征
Tab.1 Major biochemical characteristics of the pathogenic bacteria strains

Item	HZ2015	Item	HZ2015
L-鸟氨酸	+	L-色氨酸	-
L-精氨酸	+	丙二酸	+
L-赖氨酸	+	D-阿拉伯醇	-
尿素	-	D-葡萄糖	-
L-阿拉伯糖醇	-	D-蔗糖	+
半乳糖醛酸	-	L-阿拉伯糖	+
4-硝基苯基-βD-葡萄糖甙	-	4-硝基苯基-βD-半乳糖甙	-
5-溴-3-羟基吲哚-壬	-	D-海藻糖	-
L-天冬氨酸 4-硝基苯胺	-	4-硝基苯基-αD-吡喃半乳糖甙	-
5-溴-4-氯-3-吲哚-N-乙酰 1-βD-葡萄糖甙	-	4-硝基苯基-αD-吡喃葡萄糖甙	+
D-甘露醇	-	L-鼠李糖	-
D-麦芽糖	+	肌醇	-
侧金盏花醇	+	D-纤维二糖	-
帕拉金糖	-	D-山梨醇	-
4-硝基苯基-βD-葡萄糖苷酸	+	4-硝基苯基-αD-吡喃麦芽糖甙	-
5 酮基-葡萄糖酸钾	-	丙酮酸钠	-

2.3 分离菌株的 16S rRNA 基因序列测定与分析

将测序所得序列输入到 NCBI 进行 Blast 检索, 发现菌株 HZ2015 与类志贺邻单胞菌自然聚类, 同源性百分比 98.5%—99.9%。选取同源性较高的类志贺邻单胞菌的 16S rRNA 基因序列, 并以肠杆菌科的沙门氏菌属(*Salmonella*)、爱德华氏菌属(*Edwardsiella*)

和肠杆菌属(*Enterobacter*)等菌株为外群, 进行分子系统发育分析, 结果如图 3 所示。

2.4 药敏实验

对 29 种药物的敏感性试验结果显示(表 2), 菌株 HZ2015 对头孢哌酮、头孢呋辛、庆大霉素、卡那霉素、先锋霉素 5、先锋霉素 6、复达欣、新霉素、强

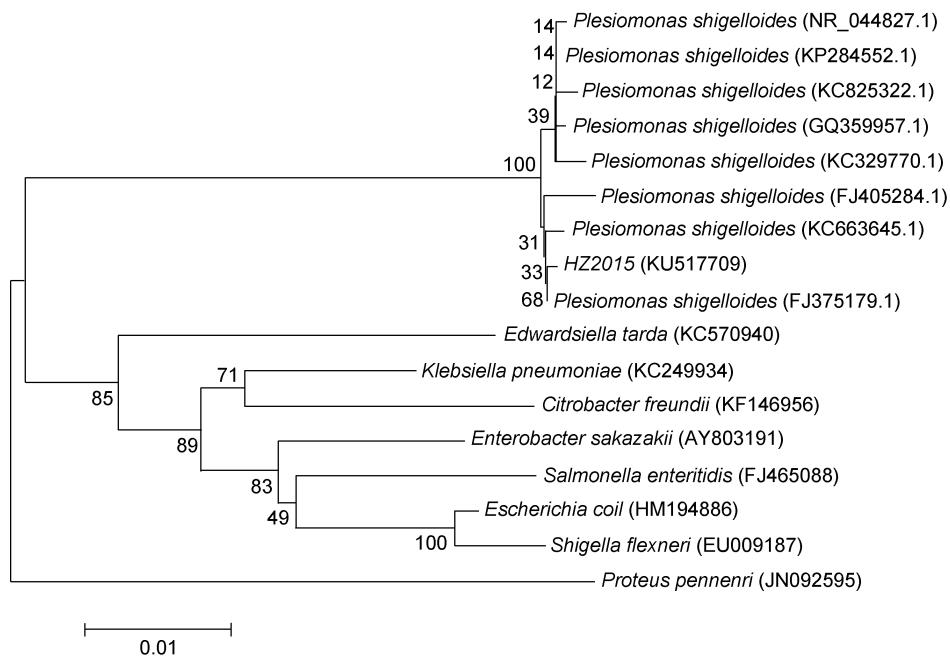


图 3 菌株 HZ2015 16S rDNA 基因序列系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of strain HZ2015 based on 16S rRNA gene sequence

表 2 药物敏感性试验
Tab.2 Results of test for antibiotic susceptibility

抗生素	抑菌圈直径判定标准(mm)			抑菌圈直径(mm)
	耐药	中度敏感	敏感	
青霉素(P)	10	11—15	16	R(10)
苯唑西林(OX)	10	11—12	13	R(7)
氨苄西林(AMP)	13	14—16	17	R(6)
哌拉西林(PRL)	17	18—20	21	I(20)
头孢曲松(CTRX)	13	14—20	21	R(0)
头孢唑啉(CXM)	14	15—17	18	S(27)
头孢哌酮(CFP)	15	16—20	21	S(24)
麦迪霉素(MID)	13	11—15	17	I(13)
红霉素(EM)	13	14—22	23	I(14)
庆大霉素(GM)	12	13—14	15	S(25)
氧氟沙星(OFLX)	12	13—15	16	I(13)
诺氟沙星(NOR)	10	11—15	16	I(12)
克林霉素(DA)	14	15—20	21	I(16)
万古霉素(VA)	14	15—16	17	R(10)
四环素(TE)	14	15—18	19	I(16)
氯霉素(CL)	12	13—17	18	I(17)
复方新诺明(SXT)	10	11—15	16	S(22)
羧苄西林(CB)	19	20—22	23	R(9)
头孢氨苄(CN)	14	15—17	18	R(10)
先锋霉素 VI(PVI)	14	15—17	18	S(22)
先锋霉素 V(PV)	14	15—17	18	S(21)
复达欣(ZOX)	14	15—17	18	S(30)
卡那霉素(KA)	14	15—16	17	S(26)
新霉素(N)	12	13—16	17	S(22)
强力霉素(DO)	12	13—15	16	S(21)
美满霉素(LR)	14	15—18	19	S(24)
环丙氟哌酸(GR)	12	13—16	17	I(14)
多粘霉素 B(PB)	8	8—11	12	S(15)
呋喃唑酮(AOZ)	14	15—16	17	S(18)

力霉素、美满霉素、多粘霉素 B 和呋喃唑酮高度敏感；对青霉素、苯唑西林、氨苄西林、头孢曲松、万古霉素、羧苄西林、和头孢氨苄耐药。

2.5 动物实验

2.5.1 细菌回归实验 结果显示，水温升高至 28°C，感染后 36h，开始出现死亡，到第 48 小时，死亡率最高达 100%，而对照组死亡率均为 0(表 3)，病死鱼呈现出与自然发病类似的症状(图 4)，表现为体表溃烂，肠道充血肿胀，肾脏肿大。从死亡青鱼的肝

脏、肌肉等组织均能分离到形态一致的菌落，对其进行生化鉴定和 16S rDNA 同源性比对，结果显示为同一菌株。

表 3 回归感染试验
Tab.3 Results of artificial infection test

菌株	致死率			
	12h	24h	36h	48h
HZ2015	0/10	0/10	7/10	10/10
Control	0/10	0/10	0/10	0/10

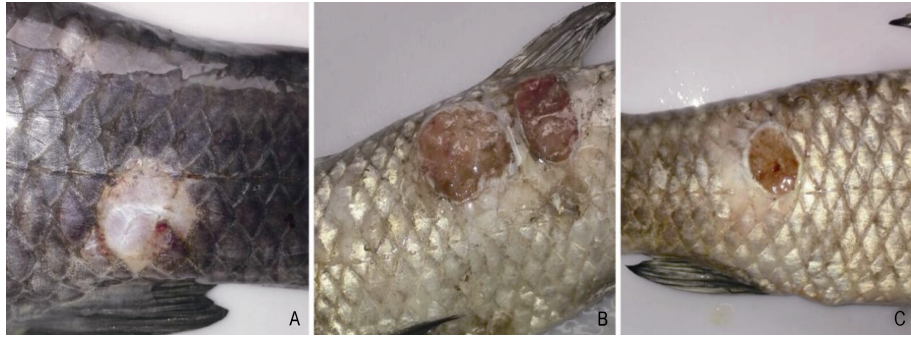


图 4 病鱼体表溃烂

Fig.4 Ulcerated body surface of diseased fish

A: 自然感染; B, C: 人工感染

2.5.2 毒力实验 小鼠于接种菌液后 12h 开始出现临床症状, 高剂量组小鼠在接种后 24h 大量死亡, 其它组死亡高峰出现在接种后 48h (表 4)。根据改良寇氏法计算, 菌株 HZ2015 LD₅₀ 值为 10^{6.6} CFU/mL。

表 4 HZ2015 细菌毒力实验
Tab.4 Pathogenic test of strain HZ2015 in mice

组别	浓度 (CFU/mL)	数目	剂量 (mL)	死亡时间				致死率 (%)
				1d	2d	3d	4d	
1	1×10 ⁹	5	0.1	4	1	0	0	100
2	1×10 ⁸	5	0.1	1	4	0	0	100
3	1×10 ⁷	5	0.1	0	5	0	0	100
4	1×10 ⁶	5	0.1	0	0	1	0	20
对照组	PBS	5	0.1	0	0	0	0	0

3 讨论

青鱼属大宗淡水性鱼类, 肉厚且嫩, 味鲜美, 富含脂肪, 刺大而少, 是淡水鱼中的上品。目前青鱼的研究结果主要集中于养殖及繁育技术、营养需求等, 而疾病学研究方面涉及较少, 已经明确的病害, 很多也是作为与其它大宗淡水鱼类共有的疾病来研究, 此次青鱼的病害事件表明, 类志贺邻单胞菌对青鱼的危害极大, 无论幼鱼、成鱼都无法幸免, 一定程度上威胁着青鱼养殖业的发展。本研究从具有典型临床症状的发病青鱼肾脏分离到菌株 HZ2015, 经过形态学和生理生化鉴定显示该菌株为类志贺邻单胞菌, 同时通过 16S rDNA 序列同源性分析, 构建了系统发育树, 发现与类志贺邻单胞菌的同源性为 98.5%—99.9%。人工感染实验表明其对青鱼具有较强的致病性, 感染鱼体表溃烂, 体内各器官不同程度损伤, 症状与自然发病鱼类似, 并能从肌肉和肾脏中分离到与注射菌形态及生化特性完全相同的细菌, 生化鉴

定及 16S rDNA 同源性匹配表明为同一菌株, 从而确定该菌株 HZ2015 为青鱼体表溃烂的致病菌。本文系类志贺邻单胞菌致青鱼发病的首次报道。

类志贺邻单胞菌是一种广泛分布在淡水环境中的细菌, 隶属肠杆菌科, 邻单胞菌属, 能引起人的腹泻, 是一种重要的肠道致病菌(Brenner *et al*, 2005), 对 3536 例急性腹泻患者的研究表明(Chen *et al*, 2013), 7.3%的细菌性病例与类志贺邻单胞菌有关。类志贺邻单胞菌对鸬鹚的感染率较高(Matsuyama *et al*, 2015), 对水生动物亦具有一定的致病力, 能引发暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、中华鳖(*Trionyx sinensis*)、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)、杂交鲟(*Huso huso*♀ × *Acipenser baeri*♂)、尼罗罗非鱼(*Tilapia nilotica*)、异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*♀ × *Cyprinus carpio*♂)、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*deman)、斑点叉尾鮰(*Ictalurus punctatus*)、亚洲龙鱼(*Scleropages macrocephalus*)、革胡子鲶(*Clarias leather*)、鳗鲡(*Anguilla japonica*)及虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的发病及死亡(Miller *et al*, 1986; 吴惠仙等, 2004; 杨鸾劫等, 2005; 潘璠等, 2007; 陆文浩等, 2009; 陈林等, 2009; Salgado-Miranda *et al*, 2010; Jun *et al*, 2011; Parvez *et al*, 2011; Joh *et al*, 2012; Lingham *et al*, 2012; 王小亮等, 2013; 左跃等, 2013; 胡钱东等, 2014; 刘志刚等, 2015)。尤其是对草鱼, 在夏秋季能引发类似症状即体表溃烂(胡钱东等, 2014), 由于两者同属鲤形目鲤科雅罗鱼亚科, 分布与赤眼鲟一起同属东亚的单元群, 亲缘关系较近, 具有较强的借鉴意义。该菌是否容易引发雅罗鱼亚科鱼类的体表溃烂, 还需进一步研究。

类志贺邻单胞菌在 35—38°C 温度范围内生长最

佳(Lingham *et al*, 2012)。该菌对盐度和酸碱度的适应范围较广,能在多种水体中存活,往往在水温较高时流行。回归实验表明,水温在 25°C 时,该菌不具备对青鱼的致病性,但水温升高到 28°C 时,对青鱼具有极强的毒力。我们在调查中发现,该菌引起的疾病主要发生在夏季高温季节,这一点与回归实验的结论相一致。因此,应该尤其注重在高温季节加强预防和控制,合理控制饲料投喂,改良底质和水质,做好水体的消毒工作。

本研究分离得到的类志贺邻单胞菌对头孢哌酮、头孢呋辛、庆大霉素、先锋霉素、强力霉素等高度敏感;对青霉素、氨苄西林、万古霉素、羧苄西林和头孢氨苄等耐药。这与以往从不同物种中得到的分离株不一致(吴惠仙等, 2004; 陆文浩等, 2009; Matsuyama *et al*, 2015)。尤其是从人身上分离的菌株对除氨苄青霉素外的大多数抗菌药物敏感(Chen *et al*, 2013)。这可能由于地区、环境不同及接触的药物不同,导致菌株的耐药谱存在差异。因此,正确治疗因该菌引发的青鱼疾病,还应在遵守《渔用药物使用准则》的同时根据药敏试验得出的结果进行施药,避免根据经验盲目用药。

参 考 文 献

- 王小亮, 徐立蒲, 曹 欢等, 2013. 鲟致病性类志贺邻单胞菌的鉴定及药物敏感性. 微生物学报, 53(7): 723—729
- 左 跃, 易 弋, 夏 杰等, 2013. 2 株黄颡鱼源类志贺邻单胞菌的分离与鉴定. 江苏农业科学, 41(9): 199—201
- 刘志刚, 可小丽, 卢迈新等, 2015. 尼罗罗非鱼致病性类志贺邻单胞菌(*Plesiomonas shigelloides*)的分离鉴定及其病理学观察. 微生物学报, 55(1): 96—106
- 杨鸢劫, 陈 辉, 方 苹等, 2005. 工厂化养殖暗纹东方鲀致病菌的分离和鉴定. 湛江海洋大学学报, 25(4): 18—21
- 吴惠仙, 薛俊增, 2004. 中华鳖出血性肠道坏死症病原及其药敏性. 中国兽医学报, 24(4): 343—345
- 张 波, 曾令兵, 罗晓松等, 2010. 青鱼肠道出血症病原菌的分离与鉴定. 华中农业大学学报, 29(5): 607—612
- 陆文浩, 杨家新, 陈 辉等, 2009. 异育银鲫类志贺邻单胞菌的鉴定. 淡水渔业, 39(2): 48—53
- 陈 林, 谭爱萍, 邹为民, 2009. 斑点叉尾鮰致病菌株的鉴定及特性. 大连水产学院院报, 24(3): 200—205
- 胡钱东, 林 强, 石存斌等, 2014. 草鱼致病性类志贺邻单胞菌的分离与鉴定. 微生物学报, 54(2): 229—235
- 潘 璠, 方 苹, 陈 辉, 2007. 罗氏沼虾几种病原菌防治药物的筛选. 水产养殖, 28(6): 39—41
- Brenner D J, Krieg N R, Staley J T, 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. 2): The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. New York, US: Springer, 740—744
- Chen X, Chen Y, Yang Q *et al*, 2013. *Plesiomonas shigelloides* infection in Southeast China. PLoS One, 8(11): e77877
- Joh S J, Ahn E H, Lee H J *et al*, 2012. Bacterial pathogens and flora isolated from farm-cultured eels (*Anguilla japonica*) and their environmental waters in Korean eel farms. *Veterinary Microbiology*, 163(1—2): 190—195
- Jun J W, Kim J H, Choresca Jr C H *et al*, 2011. Isolation and molecular detection of *Plesiomonas shigelloides* containing *tetA* gene from Asian arowana (*Scleropages formosus*) in a Korean aquarium. *African Journal of Microbiology Research*, 5(28): 5019—5021
- Li S F, Lu G Q, Zhou B Y, 1995. Evaluation on the potential capacity of the swan oxbow for the conservation of the major Chinese carps. *Aquaculture*, 137(1—4): 46—47
- Lingham T, Besong S, Ozbay G *et al*, 2012. Antimicrobial activity of vinegar on bacterial species isolated from retail and local channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Journal of Food Processing & Technology*, 4(S11): S11-001
- Matsuyama R, Kuninaga N, Morimoto T *et al*, 2015. Isolation and antimicrobial susceptibility of *Plesiomonas shigelloides* from great cormorants (*Phalacrocorax carbo hanedae*) in Gifu and Shiga Prefectures, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 77(9): 1179—1181
- Miller M L, Koburger J A, 1986. Tolerance of *Plesiomonas shigelloides* to pH, Sodium chloride and temperature. *Journal of Food Protection*, 49(11): 877—879
- Parvez N, Rathore G, Swaminathan T R *et al*, 2011. Isolation and characterization of bacteria associated with ulcerative disease of the fish, *Clarias gariepinus*. *Bulletin of Pure & Applied Sciences-Zoology*, 30(2): 85—92
- Salgado-Miranda C, Palomares E, Jurado M *et al*, 2010. Isolation and distribution of bacterial flora in farmed rainbow trout from Mexico. *Journal of Aquatic Animal Health*, 22(4): 244—247
- Wang H R, Hu Y H, Zhang W W *et al*, 2009. Construction of an attenuated *Pseudomonas fluorescens* strain and evaluation of its potential as a cross-protective vaccine. *Vaccine*, 27(30): 4047—4055

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PATHOGENIC *PLESIOMONAS*
SHIGELLOIDES FEOM DISEASED BLACK CARP
*MYLOPHARYNGODON PICEUS***

YE Jian², LIU Xiao-Ning³, WAN Xiao⁴, XU Hui⁴, SHEN Wen-Ying¹,
GAO Min-Jie¹, ZHANG Xiao-Dong¹

(1. College of Life Sciences, Shaoxing University, Shaoxing 312000, China; 2. Hangzhou Aquacultural Technica Extending Centre, Hangzhou 310001, China; 3. Hangzhou Dajiangdong Industrial District Agricultural Bureau, Hangzhou 311222, China; 4. Shaoxing Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Shaoxing 312000, China)

Abstract In a recent outbreak of massive death of black carp *Mylopharyngodon piceus* in a breeding farm in Hangzhou, showing ulcerated body surface, we isolated a bacterium from liver, kidney, and muscle of diseased fish. In morphology, Gram's staining, ATB ID32E bacterial biochemical identification, and sequence analysis on the 16S rRNA gene, the isolate was identified as *Plesiomonas shigelloides*, named HZ2015. In our regress experiment, similar symptoms replayed. The same bacterium could be identified biochemically in 16S rDNA homology analysis. Isolate HZ2015 was demonstrated with virulence potential in mouse model, and the median lethal dose (LD₅₀) in mice was 10^{6.6} CFU/mL. Therefore, we deduce that *P. shigelloides* was the pathogenic bacteria responsible for the disease. In addition, in our susceptibility test on antibiotics, the bacterial strain HZ2015 was susceptible to cefoperazone, cefuroxime, gentamicin, kanamycin, and ceftazidime. This study presents the first case report on *P. shigelloides*-induced massive death of black carp *M. piceus* in China.

Key words *Mylopharyngodon piceus*; *Plesiomonas shigelloides*; strong pathogenicity