

# 大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 病原 鳃利斯顿氏菌的鉴定\*

张晓君 陈翠珍 房海<sup>1)</sup> 战文斌 靳晓敏 王秀云

(河北科技师范学院动物科学系 秦皇岛 066600)

(水产病害与免疫学研究室 教育部海水养殖重点实验室 中国海洋大学 青岛 266003)

**提要** 采用表观分类学及分子生物学方法,对从大菱鲆细菌性败血感染症的病(死)鱼中分离到的相应病原菌,进行了形态特征、理化特性等较系统的鉴定及代表菌株 DNA 中 G + Cmol% 的测定;同时,择代表菌株进行了 16S rRNA 基因的分子鉴定,测定了 16S rRNA 基因序列、分析了相关细菌相应序列的同源性、构建了系统发生树。结果表明,所检 30 株菌均为利斯顿氏菌属 (*Listonella* MacDonell and Colwell 1986) 的鳃利斯顿氏菌 [*L. anguillarum* (Bergeman 1909) MacDonell and Colwell 1986], 择 S010610-1 株、S010610-3 株及 S010623-1 株作为代表菌株进行的 16S rRNA 基因序列测定,不包括引物结合区,所扩增的 16S rRNA 基因序列长度, S010610-1 株为 1466bp (GenBank 登录号: AY963630)、S010610-3 株为 1416bp (GenBank 登录号: AY963631)、S010623-1 株为 1424bp (GenBank 登录号: AY963632), 与 GenBank 数据库中弧菌属细菌的同源性在 97%—99%。

**关键词** 大菱鲆, 鳃利斯顿氏菌, 鉴定, 系统发育学分析  
**中图分类号** S941

随着大菱鲆在我国北方养殖的大面积发展,病害问题已成为当前产业持续、健康、稳定发展的重要课题而受到养殖界的特别关注。2001 年,作者对山东某海水鱼养殖场大菱鲆(2—3 月龄)所发生的呈败血症感染的病例进行了检验。病鱼表现摄食减少、反应迟钝;检验两批次送检的共 20 尾发病濒死及刚刚死亡大菱鲆,发现均表现有不同程度的口部、鳍及腹面出血,有的存在鳍条裂开并呈不同程度的腐烂状,剖检见肝肿胀并均有不同程度的出血、充血或贫血、脾及肾稍肿胀,有的在肌肉有不同程度的出血点或小斑,均呈败血症病变;有的存在不同程度的呈半透明状(个别的血样)的腹水。

经对病原检验表明为利斯顿氏菌属 (*Listonella* MacDonell and Colwell 1986) 的鳃利斯顿氏菌

[*L. anguillarum* (Bergeman 1909) MacDonell and Colwell 1986] 所引起的感染。鉴于该菌为鱼类一种常见且重要的病原菌,为丰富其生物学性状、分子生物学及致病作用等方面的内容,作者对所分离做纯培养的 30 株菌进行了形态特征、菌落特征、理化特性、不同菌株的感染试验等方面的检验,同时择代表菌株进行了 16S rRNA 基因序列测定与系统发育学分析,旨在能为对该菌的有效检验及进一步研究等提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株及其来源

取上述 15 尾大菱鲆的病变组织肝、脾、肾及腹水为材料,用普通营养琼脂及含 7% 兔血营养琼脂平板做细菌分离,置 28℃ 培养 24h 和 48h 检查。结果出现了两种情况,一是在 15 尾鱼的被

\* 河北省科技厅科技攻关项目, 02220502D 号; 河北省自然科学基金项目, C2005000498 号。张晓君, 博士, 副教授, E-mail: zxj930@163.com

1) 通讯作者: 房海, 教授, E-mail: fanghai@163.com

收稿日期: 2005-01-07 收修改稿日期: 2005-10-22

检组织材料中均分离到了数量不等但均为大量、几乎均呈纯培养状的同种细菌的菌落(记作A菌);二是在第二批次检验10尾鱼的各被检组织中除均分离到A菌外,还同时分离到在分布数量上与A菌差异不明显(在有的鱼各被检组织中明显多于A菌)、亦均呈纯培养状的另一种菌落(记作B菌)。从每尾鱼各取分离菌落2个分别移接于普通营养琼脂斜面(28℃培养24h)做成纯培养后供鉴定用,如此15尾鱼的共做纯培养30株,各菌株按顺序依次编号:第一批5尾的10株为S010610-1至S010610-10(均为A菌),第二批10尾的20株(A菌、B菌各10株)为S010623-1至S010623-20如此属于A菌的共20株、B菌的共10株。

## 1.2 形态与菌落特征检查

取上述30株纯培养菌,分别移接于普通营养琼脂斜面置28℃培养18h制备涂片标本进行革兰氏染色做形态特征检查;各菌株分别划线接种于普通营养琼脂、血液营养琼脂(分别为含7%家兔脱纤血及含7%绵羊脱纤血的营养琼脂)、疔疮病琼脂(FA)、庆大霉素琼脂、硫代硫酸钠柠檬酸钠胆酸钠蔗糖琼脂(TCBS)、Rimler-Shotts培养基(RS)及2216E海水培养基(2216E)等7种不同培养基平板,置28℃培养24h和48h分别检查生长情况及菌落特征。

## 1.3 电子显微镜观察细菌形态

择上述30株纯培养菌的代表菌株(S010610-1、S010610-3、S010623-1),分别接种于半固体培养基,置28℃培养24h后,取菌悬浮于无菌蒸馏水中制成淡菌悬液作为供试菌液,取此菌液1滴于经Formvar膜包被的铜网上,静置1min左右后吸除菌液,再以0.5%磷钨酸水溶液同样加1滴于铜网上负染1min左右,吸除染液并待自然干燥后,置JEM-100CX透射电子显微镜下检查形态特征与鞭毛形成情况。

## 1.4 理化特性检查

取上述30株纯培养菌,分别接种于细菌理化特性鉴定用培养基中,按常规进行氧化酶、接触酶、糖(醇及苷)类代谢、H<sub>2</sub>S、吡啶、MR、V-P试验、硝酸盐还原、OF试验、枸橼酸盐利用(Simmons)等较系统的理化特性测定(东秀珠等,2001)。

## 1.5 16S rRNA 基因序列测定与系统发育学分析

### 1.5.1 PCR 模板 DNA 的制备 择代表菌株

S010610-1、S010610-3及S010623-1,分别接种于LB肉汤中28℃培养16h按小量细菌基因组DNA抽提试剂盒(上海华舜生物工程有限公司产,批号204-L)所述方法提取DNA作为PCR模板DNA。

### 1.5.2 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增与测序

16S rRNA基因PCR扩增的两个引物分别为27F(正向引物):5'-AGA GTT TGA TC(C/A)TGG CTC AG-3'(对应于*E. coli* 16S rRNA基因的第8—27个碱基位置)、1492R(反向引物):5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'(对应于*E. coli* 16S rRNA基因的第1492—1510个碱基位置)(Martin *et al.*, 1998)。在20μl反应体系中含有:无菌蒸馏水14.4μl 1×PCR缓冲液2μl 1.5mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.6μl 4×dNTP混合物0.4μl引物各0.2μl 2.5U/μl的*Taq* DNA聚合酶0.2μl模板DNA1μl PCR反应条件为:95℃预变性3min,接94℃变性1min,55℃复性1min,72℃延伸2min,30个循环后72℃温育6min。PCR扩增产物经DNA纯化系统(Wizard PCR Prep, Promega)纯化后,由上海博亚生物工程技术公司使用3730测序仪进行基因序列测定。

### 1.5.3 16S rRNA 基因序列系统发育树的构建

分别对供试3个菌株的16S rRNA基因序列通过NCBI的Blast检索系统(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>)进行序列同源性分析,并使用ClustalX1.8软件与从GenBank数据库中获得的序列相似性较高的菌株的序列进行多序列匹配排列(Multiple Alignments),采用邻接法(neighbor joining method)获得分支系统树,并通过Bootstrap法(1000次重复)检验。

## 1.6 菌种的归类判定

以经上述表型性状鉴定结果,主要依据“Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed.”(Holt *et al.*, 1994),“Bergey's Manual of Systematic Bacteriology”(Krieg *et al.*, 1984),“Bacterial Fish Pathogens Disease of Farmed and Wild Fish”(Austin *et al.*, 1999)及有关资料,并结合细菌发育学分析的结果,进行分离菌的种属判定。

## 1.7 致病性测定

择上述分离鉴定的代表菌株(S010610-1、S010610-3、S010623-1),分别接种于普通营养肉汤中28℃培养18h调成 $9 \times 10^8$  CFU/ml作为供试菌液,分别经腹腔接种感染体长20cm左右的健

康大菱鲂及牙鲆,每株菌各感染6尾,剂量为0.3ml/尾(感染接种前养殖观察5天且健康供试),同时设立仅用同剂量、同批无菌营养肉汤接种的对照,均隔离养殖于试验水簇箱内,每天观察发病与死亡情况。以被感染鱼出现同自然病例样的病变、从病死鱼重新分离回收原感染菌作为供试菌株的病原性判定指标。

## 2 结果

### 2.1 形态特征

30株菌的形态一致,均为革兰氏染色阴性、杆状(多数稍弯曲)、两端钝圆或稍尖、散在(个别成双)、无芽孢、大小多在(0.3—0.7)  $\mu\text{m}$   $\times$  (1.0—2.2)  $\mu\text{m}$ 的细菌;代表菌株(S010610-1、S010610-3及S010623-1)经EM负染色标本检查,菌体均为着生极端单鞭毛。

### 2.2 菌落特征

在供试12种培养基上,供试30株菌中A菌(20株)、B菌的生长情况和菌落特征存在一定的差异,A菌20株的表现一致、B菌10株的表现一致。且A菌(20株)和B菌(10株)在普通营养琼脂、血液琼脂上的菌落特征均与前述相应直接从病变组织材料中分离的一致,仅是使用绵羊血液的 $\beta$ -溶血均不如使用家兔血液的效果明显。

**2.2.1 普通营养琼脂** A菌20株培养24h检查菌落呈圆形光滑、边缘整齐、较隆起、浅橘黄色、不透明、直径多在1.0mm左右,48h直径多在1.8mm左右、橘黄色更明显,生长丰盛。B菌10株培养24h检查菌落较扁平、较透明闪光、直径多在0.8mm左右,48h多在1.5mm左右,余特征同A菌的但比A菌的湿润度高,生长丰盛。

**2.2.2 血液营养琼脂** A菌20株基本同在普通营养琼脂上的菌落特征, $\beta$ -溶血、24h直径多在1.2mm左右、48h多在2.0mm左右,生长丰盛。B菌10株的 $\beta$ -溶血环较A菌的狭窄且不如A菌的透明度高,余特征同A菌的但比A菌的湿润度高,生长丰盛。

**2.2.3 庆大霉素琼脂** A菌20株24h检查形成圆形光滑、稍隆起、边缘整齐、灰褐色(中心色重)的菌落,直径多在1.2mm左右,48h直径多在2.0mm左右,仔细观察可见有浅灰褐色色素呈水溶性渗于培养基中;生长丰盛但均于划线接种的起始点涂布处形成菌苔及邻近处形成单菌落,连续划线的远距离处不易生长出菌落。B菌10株与A菌的基本相同,仅是表现的更显湿润。

**2.2.4 TCBS** A菌20株24h检查形成圆形光滑、边缘整齐、较隆起、黄色、直径多在0.3mm左右的小菌落,48h多在1.2—1.5mm;生长较丰盛但均易于划线起始的涂布处生长且于邻近处形成单菌落,远离划线起始部处不易生长出菌落,菌落黏稠不易乳化,菌落周围培养基轻微下陷(菌落长入培养基中),刮下菌落后可见长入培养基中留下黄色菌落痕迹。B菌10株基本同A菌的。

**2.2.5 FA** A菌20株24h检查形成圆形光滑、边缘整齐、较隆起、浅橘黄色、不透明的菌落,直径多在0.6mm左右,48h多在1.8mm左右,生长较丰盛。B菌10株24h检查形成较透明、直径多在0.3mm左右的小菌落,48h多在1.2mm左右,其他特征基本同A菌的。

**2.2.6 RS** A菌20株的菌落圆形光滑、边缘整齐、隆起、孤立菌落黄色(菌落密集处及菌苔处多呈黄绿色),培养24h直径多在0.8mm左右、48h多在1.2—1.5mm,刮下菌落呈稍黏些、块状不易涂开、留下黄色菌落痕迹,生长中度。B菌10株为稍隆起、黄色的菌落(菌苔处亦黄色),其他特征基本同A菌的。

**2.2.7 2216E** A菌20株的菌落圆形光滑、边缘整齐、稍隆起、半透明状、浅橘黄色,24h检查直径多在0.5mm左右、48h多在1.8mm左右,生长中度。B菌10株培养24h检查直径多在0.4mm、48h多在1.5mm左右,其他特征基本同A菌的。

### 2.3 理化性状

30株供试菌中,28株对O/129(10 $\mu\text{g}$ 及150 $\mu\text{g}$ )敏感,2株(A菌中来自同一尾鱼的S010610-3和S010610-4)具有抗性;海藻糖试验表现为A菌20株阳性,B菌10株阴性;余所测项目30株均表现一致(表1)。

表1 30株分离菌的理化特性

Tab 1 Physiological and biochemical characteristics of 30 strains

项目	结果	项目	结果
37℃生长	+	明胶液化	+
氧化酶	+	枸橼酸盐利用	+
接触酶	+	葡萄糖:产酸	+
产H <sub>2</sub> S	-	葡萄糖:产气	-
O-F试验	F	山梨醇	+
动力	+	蜜二糖	-

续表

项目	结果	项目	结果
棉子糖	-	卫茅醇	-
菊糖	-	甘油	+
水扬苷	-	N aC 中生长: 0%	-
吐温 80	+	N aC 中生长: 1%	+
硝酸盐还原	+	N aC 中生长: 6%	-
半乳糖	+	麦芽糖	+
蛋白酶	+	丙二酸盐利用	-
DNA 酶	+	醋酸盐利用	+
蔗糖	+	木糖	-
鼠李糖	-	木糖醇	-
肌醇	-	苦杏仁苷	-
甲基红	+	松三糖	-
V-P 试验	+	山梨糖	-
阿拉伯糖	+	侧金盏花醇	-
甘露醇	+	酒石酸盐利用	-
吡啶	+	黏液酸利用	-
七叶苷利用	-	$\beta$ -半乳糖苷酶	+
苯丙氨酸脱氨酶	-	$\alpha$ -甲基-D-葡萄糖苷	-
卵磷脂酶	-	乳糖	-
尿素酶	-	精氨酸双水解酶	+
IPA (SM)	-	赤藓醇	-
阿拉伯醇	-	甘露糖	+
乙酰胺酶	-	果糖	+
淀粉酶	+	松二糖	-
糊精	+	G + Cmo%	50.3

注: + 示阳性, - 示阴性, F 示发酵型。G + Cmo% 为中国典型培养物保藏中心对 S010610-1 株的测定结果

## 2.4 16S rRNA 基因序列与系统发育学

S010610-1 株、S010610-3 株、S010623-1 株作为代表菌株进行的 16S rRNA 基因序列测定, 不包括引物结合区, 所扩增的 16S rRNA 基因序列长度, S010610-1 株为 1466bp (GenBank 登录号: AY963630)、S010610-3 株为 1416bp (GenBank 登录号: AY963631)、S010623-1 株为 1424bp (GenBank 登录号: AY963632)。将 S010610-1 株、S010610-3 株及 S010623-1 株的 16S rRNA 基因序列在国际互联网上进行同源性检索, 结果其与弧

菌属细菌的 16S rRNA 基因序列自然聚类, 且与鳗弧菌聚为一个分支。在检索出的弧菌属细菌序列中, S010610-1 株、S010610-3 株及 S010623-1 株与它们的同源性分别在 97% 和 99%。选取了其中部分弧菌属菌株的 16S rRNA 基因序列进行了系统发育学分析, 其系统发育树如图 1 所示。

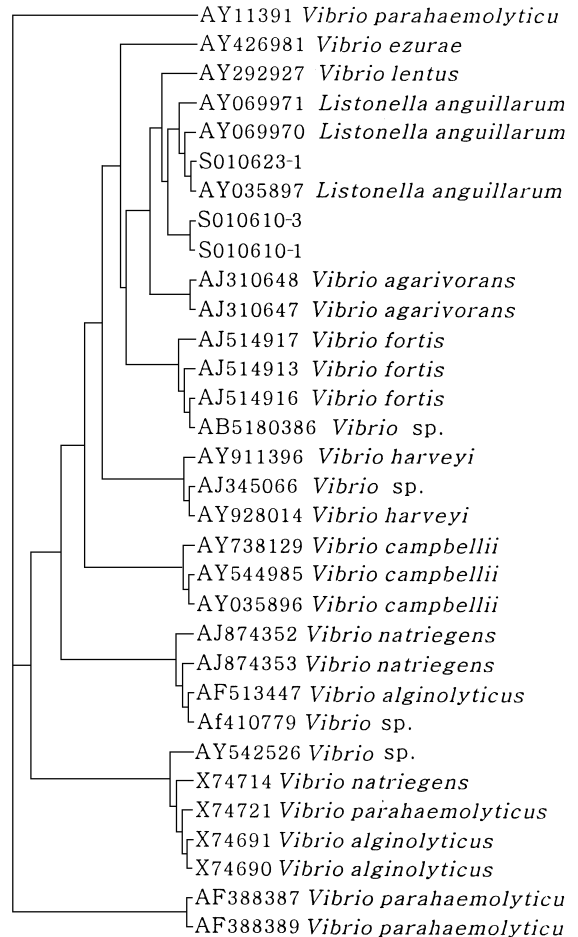


图 1 16S rRNA 基因序列分析聚类图

Fig 1 Dendrogram of 16S rRNA gene sequences

图中 AY911391—AF388389 为菌株在 NCBI 的登录号

## 2.5 菌种分类定名

30 株菌对所测项目内容的结果基本一致, 属于同种细菌。根据表型特征及系统发育学分析的结果, 判定为利斯顿氏菌属 (*Listonella* MacDonell and Colwell 1986) 的鳗利斯顿氏菌 [*L. anguillarum* (Bergeman 1909) MacDonell and Colwell 1986]。

## 2.6 致病作用

用 S010610-1 株、S010610-3 株及 S010623-1

株按 1.7 中所述感染健康大菱鲆及牙鲆, 均能导致发病与死亡并出现同自然病例的败血症病变, 具体如表 2 所示。对照的大菱鲆、牙鲆各 6 尾, 在

12 天观察期内均健壮; 感染发病但未死亡的大菱鲆共 5 尾、牙鲆共 1 尾有逐渐耐过趋势, 并于 12 天观察期内未死亡。

表 2 分离菌对大菱鲆及牙鲆的感染试验结果

Tab. 2 Results of artificial infection of the isolates to turbot and flounder

供试菌株	鱼种类	尾数	注射剂量	死亡数	病变情况
S010610-1	大菱鲆	6	0.3	4	均有肝、脾肿胀等病变, 2 尾存在血样腹水且肝脏贫血
	牙鲆	6	0.3	6	均有肝、脾肿胀, 2 尾肝出血, 3 尾肾肿胀 (1 尾有出血), 2 尾有腹水
S010610-3	大菱鲆	6	0.3	3	均有肝、脾肿胀等病变, 1 尾存在腹水
	牙鲆	6	0.3	5	均有肝、脾肿胀, 1 尾肝出血, 2 尾肾肿胀并出血, 3 尾有腹水
S010623-1	大菱鲆	6	0.3	6	均有肝、脾肿胀等病变, 4 尾存在腹水 (2 尾为血样)、肝脏质脆
	牙鲆	6	0.3	6	均有肝、脾肿胀, 3 尾肝出血, 3 尾肾肿胀并出血, 4 尾有腹水

取上述每个菌株感染死亡大菱鲆及牙鲆各 3 尾的肝脏, 直接做抹片经革兰氏染色镜检, 结果均发现有大量在形态特征上表现同自然感染病例中的革兰氏染色阴性细菌。同时, 用其以普通营养琼脂、含 7% 兔血营养琼脂做细菌分离 (28℃ 培养 48h), 结果均分离到大量统一的前面所述的原感染菌的菌落, 取每个菌株感染不同种鱼各 2 尾的分离菌各 1 个菌落做纯培养 (移接于普通营养琼脂斜面 28℃ 培养 24h) 共 12 株进行形态及理化特性的复核鉴定, 结果与原感染菌完全一致。

### 3 讨论

鳃弧菌是弧菌属细菌中较早的成员, 现该菌已归入利斯顿氏菌属, 为鳃利斯顿氏菌。目前已经揭示的大菱鲆细菌性病原主要有弧菌属 (*Vibrio* Pacini 1954) 的解藻朊酸弧菌 (*V. alginolyticus*)、鳃弧菌 (*V. anguillarum*)、海弧菌 (*V. pelagius*)、灿烂弧菌 (*V. splendidus*) 等 (Angulo et al, 1992; Austin et al, 1993; Grisez et al, 1996; Olsson et al, 1996, 1998; Lupiani et al, 1996); 此外, 有记述副乳房链球菌 (*Streptococcus parauberis*) (Damenech et al, 1996)、肠球菌 (*Enterococcus* sp.) (Toranzo et al, 1995)、杀鲑气单胞菌 (*Aeromonas salmonicida*) (Bergh et al, 1997)、病鳃假单胞菌 (*Pseudomonas anguilliseptica*) (Berthe et al, 1995)、液化沙雷氏菌 (*Serratia liquefaciensia*) (Vigneulle et al, 1995)、大菱鲆金黄杆菌 (*Chryseobacterium scophthalmum*) (Mudarris et al, 1994) 等均可引起大菱鲆的感染发病。已知该菌作为水产养殖动物的病原菌早已被确认, 现已知其能引起世界范围内的硬头

鳃、大马哈鱼、大菱鲆、香鱼、鳗鱼、太平洋鲑、鱼、竹荚鱼、真鲷、鲈鱼、鳊鱼、鳙鱼、各种热带淡水鱼以及虾、蟹、牡蛎、文蛤、鲍等 50 多种淡水、海水鱼类及其他水产养殖动物发生相应的“弧菌病”, 是水产养殖动物中较为常见且重要的病原菌, 同时也是相对研究较早、较多和较深入的水产养殖动物病原细菌 (陈师勇等, 2004)。本次从大菱鲆呈败血感染病例中的检出, 进一步表明了该菌在水生境的广泛分布和在水产养殖动物的强致病作用。

本实验中经对 30 株纯培养菌的表型性状及系统发育学的鉴定, 表明其均为鳃利斯顿氏菌。但其中来自于第一批次检验同一尾鱼的 2 株表现了对 O/129 的抗性, 来自于第二批次检验 10 尾鱼中均存在海藻糖阴性菌株 (即 B 菌 10 株), 此 10 株对纤维二糖反应虽阳性但迟缓。这一结果提示, 尽管记载鳃利斯顿氏菌对 O/129 是敏感的、海藻糖反应是阳性的, 但在实践中应对分离的野生菌株在这些性状上予以注意。

通过有规律地在自然病 (死) 大菱鲆病变组织中发现细菌、分离到几乎呈纯培养状态且大量的同一种细菌、并表现在形态特征上与自然病 (死) 大菱鲆病变组织中的相一致、人工感染试验能复制同自然感染病例的发病死亡及病变并能回收原感染菌等, 表明本次所检大菱鲆病例为由鳃利斯顿氏菌所引起的感染。病鱼仅表现为前述的一般性症状及败血症感染病变, 未见其存在相应的特征性具有诊断价值的眼观症状与病变。因此认为, 对于该感染症的有效诊断, 是对

细菌的准确分离与鉴定。在对分离菌鉴定时,除了常规的形态、理化性状等表观性状(phenotypic informations)外,最好进行16S rRNA基因序列测定与系统发育学分析等的分子分类学测定,以准确判定其分类位置,本次对O/129抗性、海藻糖阴性鳃裂斯氏菌的检出更能表明分子分类方法的意义。

### 参 考 文 献

- 东秀珠,蔡妙英编著,2001 常见细菌系统鉴定手册.北京:科学出版社,106—119,353—398
- 陈师勇,张培军,莫照兰等,2004 鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)M3菌株生长条件及其对蛋白酶产量的影响.海洋与湖沼,35(1):55—63
- Angulo L, Lopez J E, Lema C *et al*, 1992 *Vibrio pelagius* associated with mortalities in farmed turbot *Scophthalmus maximus* Thalassas 10: 129—133
- Austin B, Austin D A, 1999. Bacterial Fish Pathogens Disease of Farmed and Wild Fish. Third (Revised) Edition. Praxis Publishing Ltd, Chichester, U K, 29—32, 106—140
- Austin B, Stobie M, Robertson P A W *et al*, 1993. *Vibrio alginolyticus* the cause of gill disease leading to progressive low-level mortalities among juvenile turbot *Scophthalmus maximus* L., in a Scottish aquarium. Journal of Fish Diseases 16: 277—280
- Beigh , Hjeltnes B, Skiftesvik A B, 1997. Experimental infection of turbot *Scophthalmus maximus* and halibut *Hippoglossus hippoglossus* yolk sac larvae with *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. Diseases of Aquatic Organisms 29: 13—20
- Berthe F C J Michel C, Bernardet J F, 1995. Identification of *Pseudomonas anguilliseptica* isolated from several fish species in France. Diseases of Aquatic Organisms 21: 151—155
- Domenech A, Fernandez-Garayzabal J F, Pascual C *et al*, 1996. Streptococcosis in cultured turbot *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis* Journal of Fish Diseases 19: 33—38
- Grisez L, Chair M, Sorgebos P *et al*, 1996. Mode of infection and spread of *Vibrio anguillarum* in turbot *Scophthalmus maximus* larvae after oral challenge through live feed. Diseases of Aquatic Organisms 26: 181—187
- Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A *et al*, 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition. Baltimore: Williams and Wilkins, 190—194, 253—274
- Krieg N R, Holt J G, 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 1. London: Williams and Wilkins, Baltimore, 518—538
- Lupiani B, Dopazo C P, Ledo A *et al*, 1996. New syndrome of mixed bacterial and viral etiology in cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Journal of Aquatic Animal Health, 197—204
- Martin F, Polz Collen M, Cavanaugh, 1998. Bias in template to product ratios in multitemplate PCR. Appl Environ Microbiol 64(10): 3724—3730
- Mudarris M, Austin B, Segers P *et al*, 1994. *Flavobacterium scophthalmum* sp. nov., a pathogen of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). International Journal of Systematic Bacteriology, 44: 447—453
- Olsson J C, Jobom A, Westerlund A *et al*, 1996. Is the turbot *Scophthalmus maximus* (L.), intestine a portal of entry for the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. Journal of Fish Diseases, 19: 225—234
- Olsson J C, Jobom A, Westerlund A *et al*, 1998. Survival persistence and proliferation of *Vibrio anguillarum* in juvenile turbot *Scophthalmus maximus* (L.), intestine and faeces. Journal of Fish Diseases 21: 1—9
- Toranzo A E, Devesa S, Romalde J L *et al*, 1995. Efficacy of intraperitoneal vaccination and immersion vaccination against *Enterococcus* sp. infections in turbot. Aquaculture, 134: 17—27
- Vigneulle M, Baudin-Laurencin F, 1995. *Serratia liquefaciens* case report in turbot (*Scophthalmus maximus*) cultured in floating cages in France. Aquaculture, 132: 121—124

## IDENTIFICATION OF PATHOGEN *LISTONELLA ANGUILLARUM* ISOLATED FROM TURBOT *SCOPHTHALMUS MAXIMUS*

ZHANG Xiao-Jun, CHEN Cui-Zhen, FANG Hai, ZHAN Wen-Bin,  
JIN Xiao-Min, WANG Xiu-Yun

(Department of Animal Science, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao, 066600)

(Laboratory of Pathology and Immunology of Aquatic Animals, the Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education,  
Ocean University of China, Qingdao 266003)

**Abstract** Turbot (*Scophthalmus maximus* L.) is a fish species in high economic value aquacultured widely in northern China. However, cases of epizootic diseases of turbot were reported in growing number due to pathogenic bacteria infections often causing frequent mass mortality resulted from high density stocking. For alleviating the problem in search for the solution, some infected moribund turbot were collected from a farm in Laizhou, Shandong Province, July 2001, from which pathogenic bacteria were isolated. In this paper, the isolation and characterization of the bacteria are described and identified in morphology, physiology, biochemistry and bioinformatics. Representative strains (S010610-1, S010610-3 and S010623-1) were selected for molecular identification by partial 16S rRNA gene sequencing and a molecular phylogenetic tree was constructed.

30 strains were examined and found to be quite consistent in morphology, being Gram-negative and rod-shaped, single or paired with round ends, no endospores, and sized  $(0.3-0.7) \mu\text{m} \times (1.0-2.2) \mu\text{m}$ . A single polar flagellum was revealed on the electronic micrographs of negatively stained strains, and the mol% G+C of the DNA was 50.3. The molecular identification of the 16S rRNA gene identified the strains as genus *Listonella*. The sequenced 16S rRNA gene of strain S010610-1 (GenBank accession No. AY963630) is 1466bp in length, that of strain S010610-3 (No. AY963631) is 1416bp, and that of strain S010623-1 (No. AY963632) is 1424bp. They shared high similarity at 97%—99% to that of *Listonella*.

Artificially infected flounder and turbot showed apparently identical syndrome to that of natural ones. Smears of the liver from artificially infected dead fish were Gram-stained, showing many Gram-negative rods.

The isolates are *L. anguillarum* of *Listonella*, indicated in morphology, physiology and bioinformatics, and partial 16S rRNA gene sequencing.

**Key words** Turbot *Scophthalmus maximus*, *Listonella anguillarum*, Identification, Phylogenetic analysis