

杀鲑气单胞菌一新亚种的生物学特性及系统发育学分析

张晓君, 房海, 陈翠珍, 靳晓敏, 王秀云

(河北科技师范学院 动物科学系, 河北 秦皇岛 066600)

摘要:从石鲮(*Kareius bicoloratus* L.)细菌性败血症的病鱼(濒死及死亡不久)中分离到相应病原菌,进行形态特征、理化特性等较系统的表观分类学指征鉴定及代表菌株 DNA 中 G + C mol% 的测定。同时,选择代表菌株进行 16S rRNA 基因的分子鉴定,测定 16S rRNA 基因序列、分析相关细菌相应序列的同源性,构建系统发生树。结果表明,分离鉴定的 60 株菌为杀鲑气单胞菌的一个新亚种(subsp. nov.),定名为杀鲑气单胞菌杀鲑亚种(*Aeromonas salmonicida* subsp. *flounderacida* subsp. nov.)。代表菌株 HQ010320-1 及 HQ010320-5 的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 数据库中的杀鲑气单胞菌的同源性在 99% 和 100%。[中国水产科学, 2006, 13(6):917-923]

关键词:石鲮;杀鲑气单胞菌杀鲑亚种;生物学特性;系统发育学分析

中图分类号:S941 文献标识码:A 文章编号:1005-8737-(2006)06-0917-07

杀鲑气单胞菌[*A. salmonicida* (Lehmann and Neumann 1896) Griffin Sniezko and Friddle 1953]为气单胞菌属(*Aeromonas* Kluver and van Niel 1936)最早报道的鱼类病原菌之一,主要引起鲑科鱼类感染发生疔疮病(*furunculosis*),对经济价值较高的鲑科鱼类危害严重^[1-2]。近年来的研究表明,该菌宿主范围在明显扩大,除了鲑科外的其他鱼类感染杀鲑气单胞菌已多有记述^[3-6]。

2001 年和 2002 年,在河北省的 2 个海水鱼养殖场野生转为池养的石鲮(*Kareius bicoloratus* L.)发生病害,均具有高发病率和死亡率,所检濒死及新鲜病死鱼均表现为一致的实质脏器肿胀或有出血等败血症变化。本研究室经病原学研究表明,这是由杀鲑气单胞菌的 1 个新亚种(subsp. nov.)所引起的细菌性病害,同时选择代表菌株送中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection, CCTCC)进行复核鉴定,同样鉴定为杀鲑气单胞菌的新亚种,并将其定名为杀鲑气单胞菌杀鲑亚种(*Aeromonas salmonicida* subsp. *flounderacida* subsp. nov.)。本研究对分离鉴定的杀鲑气单胞菌杀鲑亚种菌株的主要特性、16S rRNA 基因序列及系统发育学进行分析,旨在为对该菌的有效检验及进一步研究等提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及其来源

从两起病害中,随机取病鱼各 10 尾,均为濒死及死亡不久的石鲮,分别取其肝、脾、肾、肠内容物,用普通营养琼脂及含 7% 兔血营养琼脂平板做细菌分离,28 ℃ 各培养 24 h 和 48 h,结果均分离到同一种细菌。从每尾鱼随机取 3 个菌落,移接于普通营养琼脂斜面(28 ℃ 培养 24 h)做纯培养,用此方法从病例 No. 1 的 10 尾鱼共做纯培养 30 株,按分离地、分离日期及菌株数编号依次为:HQ010320-1 至 HQ010320-30;病例 No. 2 的 30 株为:HQ020329-1 至 HQ020329-30。

1.2 形态特征检查

将上述 60 株供试纯培养菌分别接种于普通营养琼脂斜面置 28 ℃ 培养 18 h,做涂片再经革兰氏染色后镜检细菌形态;取上述供试菌的代表菌株,制备磷酸负染色标本后置 JEM-100CX 透射电镜下观察形态特征。

1.3 理化性状测定

取上述 60 株纯培养菌,分别接种于细菌理化特性鉴定用的培养基,按《常见细菌系统鉴定手册》^[7]、《Bergey's Manual of Determinative Bacteriology》^[8]、

收稿日期:2005-12-01; 修订日期:2006-04-24。

基金项目:河北省自然科学基金(C2005000498)。

作者简介:张晓君(1969-),女,副教授,博士,主要从事水产动物病害及病原微生物学研究。E-mail:zxj9307@163.com

通讯作者:房海。Tel:0335-2039062; Fax:0335-2024487; E-mail:fanghaihb@163.com

《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology》^[9]等进行较系统的理化特性测定;选择代表菌株送 CCTCC 进行复核鉴定、并以高效液相色谱法做细菌 DNA 中 G + C mol% 测定,根据结果做菌种判定。

1.4 16S rRNA 基因序列测定与系统发育学分析

1.4.1 PCR 模板 DNA 的制备 选择 2 个代表菌株(HQ010320-1 株及 HQ010320-5 株)分别接种在 LB 琼脂平板上,28 ℃ 培养 24 h 后取单菌落转接于 LB 肉汤中 28 ℃ 培养 16 h 左右,取 1 mL 菌液 4 ℃ 下离心 5 min(10 000 r/min)。弃上清后悬浮于 100 μL 无菌蒸馏水中,经 100 ℃ 水浴加热 5 min 后同样离心,取上清作为 PCR 模板 DNA^[10]。

1.4.2 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增与测序

16S rRNA 基因 PCR 扩增的 2 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 1 492 ~ 1 510 个碱基位置)^[11]。20 μL 反应体系包括:无菌蒸馏水 14.4 μL,1 × PCR 缓冲液 2 μL,1.5 mmol/L MgCl₂ 1.6 μL,4 × dNTP 混合物 0.4 μL,引物各 0.2 μL,2.5 U/μL 的 *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μL,模板 DNA 1 μL。PCR 反应条件为:96 ℃ 预变性 6 min、95 ℃ 变性 1 min、55 ℃ 复性 1 min、72 ℃ 延伸 2 min,30 个循环后 72 ℃ 温育 6 min。PCR 扩增产物经 DNA 纯化系统(Wizard PCR Preps, 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。

1.4.3 序列分析与系统发生树构建 将上述 2 个代表菌株的 16S rRNA 基因序列分别通过 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 Clustal X1.8 软件与从 GenBank 数据库中获得的杀鲑气单胞菌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,通过自举分析(bootstrap)进行置信度检测,自举数据集为 1 000 次。

1.5 质粒 DNA 指纹图谱分析

1.5.1 细菌培养及质粒 DNA 的提取 取在普通营养琼脂培养基保存的 60 株杀鲑气单胞菌菌株,移接于 5 mL LB 液体培养基中,28 ℃ 振荡培养 18 h 后,经 6 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,用 250 μL 细胞重悬液悬浮菌体,向其中加入 250 μL 细胞裂解

液,上下颠倒混合 4 次后,加入 10 μL 碱性蛋白酶液,上下颠倒混合 4 次,于室温静置 5 min,加入 350 μL neutralization 液,上下颠倒混合 4 次后,12 000 r/min 离心 10 min,将上清液移入 1.5 mL 离心管的 Spin column 中,12 000 r/min 离心 1 min,弃去离心管中的液体,再用 250 μL 洗涤液洗涤 Spin column,相同条件下离心 2 min,使 Spin column 柱上的乙醇彻底挥发干净,再向 Spin column 柱上加入 50 μL nuclease-free 水,同样条件离心 1 min,洗脱下 Spin column 柱上的质粒 DNA。所用试剂为美国 Promega 公司生产的小量 DNA 纯化系统试剂盒。

1.5.2 琼脂糖凝胶电泳 用 1 × TBE 缓冲液配制 0.5% 琼脂糖凝胶,凝胶中加入 EB 使其终浓度达 0.5 mg/L,60 V 条件下电泳约 3 h,电泳结束后,用 3 000 凝胶成像在紫外光下拍照记录结果并用分析系统测定质粒 DNA 分子量。

2 结果

2.1 形态特征

60 株菌的形态一致,均为革兰氏染色阴性、两端钝圆、散在或个别成双排列、无芽孢、大小多在 (0.4 ~ 1.0) μm × (1.0 ~ 2.0) μm 的杆状(多为短杆状或球状)细菌,偶可见有个别长丝状菌体;用代表菌株(HQ010320-1 株及 HQ010320-5 株)做磷钨酸负染色电镜标本观察显示,其中菌株 HQ010320-1(自凝株)的细胞壁表面虚实不匀、甚至蜂窝状(图 1),菌株 HQ010320-5(不自凝株)细胞壁表面较光滑(图 2),均无鞭毛。

2.2 理化性状

供试 60 株分离菌对所测理化性状的项目结果一致(表 1),表中杀鲑气单胞菌无色亚种(*A. salmonicida* subsp. *achromogenes*)、杀日本鲑亚种(*A. salmonicida* subsp. *masoucida*)、杀鲑亚种(*A. salmonicida* subsp. *salmonicida*)、史氏亚种(*A. salmonicida* subsp. *smithia*) 4 个亚种各项结果取自第九版《Bergey's Manual of Determinative Bacteriology》(1994)^[8]。本研究分离鉴定的新亚种—杀鲑亚种(*Aeromonas salmonicida* subsp. *flounderacida* subsp. nov.)为 60 株供试菌的结果,并均对弧菌抑制剂 O/129(10 μg、150 μg)为抗性(R),溶血试验表明,60 株供试菌在含 7% 的家兔脱纤血的营养琼脂上均呈明显的 β-溶血,另外 G + C mol% 为 CCTCC 对代表菌株 HQ010320-1 株测定的结果。

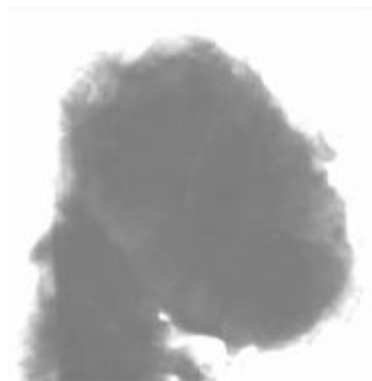


图1 菌株HQ010320-1电镜照片(×52 000)

Fig. 1 Electron micrograph of HQ010320-1(×52 000)



图2 菌株HQ010320-5电镜照片(×52 000)

Fig. 2 Electron micrograph of HQ010320-5(×52 000)

表1 分离菌的理化性状

Tab. 1 Physiological and biochemical characteristics of isolates

特性 Character	无色亚种 subsp. <i>achromogenes</i>	杀日本鲑亚种 subsp. <i>masoucida</i>	杀鲑亚种 subsp. <i>salmonicida</i>	史氏亚种 subsp. <i>smithia</i>	分离菌 Isolates
生长 Growth 28 °C	+	+	+	+	+
37 °C	-	-	-	-	-
卵磷脂酶 Lecithinase	•	•	•	•	-
吲哚 Indole	+	+	-	-	+
甲基红 Methyl red	+	+	+	-	-
V-P 试验 V-P test	-	+	-	-	+
柠檬酸盐 Citrate, Simmons	-	-	-	-	-
H ₂ S 产生 H ₂ S production	-	+	-	+	-
尿素水解 Urea hydrolysis	-	-	-	-	-
苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase	-	-	-	-	-
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	d	d	d	-	ND
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	+	+	+	[-]	ND
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-	-	-	-	ND
动力 Motility	-	-	-	-	-
明胶液化 Gelatin hydrolysis	+	+	+	+	+
KCN 生长 KCN, growth	-	-	-	•	ND
丙二酸盐利用 Malonate utilization	-	-	-	•	-
D-葡萄糖, 产酸 D-Glucose, acid	+	+	+	[+]	+
D-葡萄糖, 产气 D-Glucose, gas	-	+	+	[+]	-
侧金盏花醇 Adonitol	-	-	-	•	-
L-阿拉伯糖 L-Arabinose	-	+	+	•	-
D-阿拉伯醇 D-Arabitol	-	-	-	•	-
纤维二糖 Cellobiose	-	-	-	-	-
卫茅醇 Dulcitol	-	-	-	•	-
赤鲜醇 Erythritol	-	-	-	•	-
D-半乳糖 D-Galactose	+	+	+	-	-
甘油 Glycerol	d	d	d	[-]	-
myo-肌醇 myo-inositol	-	-	-	-	-
乳糖 Lactose	-	-	-	-	-

续表

特性 Character	无色亚种 subsp. <i>achromogenes</i>	杀日本鲑亚种 subsp. <i>masoucida</i>	杀鲑亚种 subsp. <i>salmonicida</i>	史氏亚种 subsp. <i>smithia</i>	分离菌 Isolates
麦芽糖 Maltose	+	+	+	-	+
D-甘露醇 D-Mannitol	-	+	+	-	+
D-甘露糖 D-Mannose	+	+	+	•	+
山梨糖 Sorbose	•	•	•	•	-
松三糖 Melezitose	•	•	•	•	-
木糖醇 Xylitol	•	•	•	•	-
苦杏仁苷 Amygdalin	•	•	•	•	-
蜜二糖 Melibiose	•	•	•	•	-
α -甲基-D-葡萄糖苷 α -CH ₂ -D-glucoside	•	•	•	•	-
棉子糖 Raffinose	-	-	-	-	-
L-鼠李糖 L-Rhamnose	-	-	-	•	-
水杨苷 Salicin	d	d	d	•	-
D-山梨醇 D-Sorbitol	-	-	-	[-]	-
蔗糖 Sucrose	+	+	-	d	+
海藻糖 Trehalose	+	+	+	-	+
D-木糖 D-Xylose	-	-	-	-	-
黏液酸盐 Mucate	-	-	-	•	-
糊精 Oextrin	•	•	•	•	-
松二糖 Turanose	•	•	•	•	-
果糖 Fructose	•	•	•	•	+
纤维二糖 Cellobiose	•	•	•	•	-
菊糖 Inulin	•	•	•	•	-
核糖 Ribose	•	•	•	•	+
七叶苷水解 Esculin hydrolysis	-	+	+	-	+
酒石酸盐 Tartrate Jordan	-	-	-	•	-
乙酸盐利用 Acetate utilization	•	•	•	•	-
脂酶(玉米油) Lipase (corn oil)	+	+	+	-	+
DNA 酶 DNase	+	+	+	+	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	+	•	+
氧化酶 Oxidase	+	+	+	+	+
β -半乳糖苷酶 ONPG	d	d	d	+	+
氯化钠 NaCl:0%	+	+	+	+	+
1%	+	+	+	+	+
6%	•	•	•	-	-
褐色水溶性色素 Brown soluble pigment	-	-	+	-	+
过氧化氢酶 Catalase	•	•	•	•	+
O-F 试验 O-F test	•	•	•	•	F
IPA (SIM)	•	•	•	•	-
蛋白酶 Proteinase	•	•	•	•	+
淀粉酶 Diastase	•	•	•	•	+
乙酰氨酶 Acetamidase	•	•	•	•	-
G + C mol% (HPLC)	57 - 59 (Tm, Bd)	57 - 59 (Tm, Bd)	57 - 59 (Tm, Bd)	57 - 59 (Tm, Bd)	62.6

注：“+”示阳性；“-”示阴性；[+]示76%~89%阳性；[-]示11%~25%阳性；“d”示26%~75%阳性；“F”示发酵型；“•”示在原文表中无记载；ND示未测定。

Note: “+”, positive; “-”, negative; [+], 76% - 89% positive; [-], 11% - 25% positive; “d”, 26% - 75% positive; “F”, fermentative; “•”, not described in primary article; ND, not detected.

2.3 16S rRNA 基因序列与系统发生树构建

HQ010320 - 1 株及 HQ010320 - 5 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, HQ010320 - 1 株为

1 425 bp (GenBank 登录号: AY786177)、HQ010320-5 株为 1 423 bp (GenBank 登录号: AY786178)。将 HQ010320-1 株及 HQ010320-5 株的 16S rRNA 基因序列在国际互联网上进行同源性检索, 结果其与杀鲑气单胞菌的 16S rRNA 基因序列自然聚类, 且供试 HQ010320-1 与 HQ010320-5 菌株在系统发生树中聚为 1 个分支, 但独立于其他菌株。在检索出的杀鲑气单胞菌序列中, HQ010320-1 株及 HQ010320-5 株与它们的同源性分别在 99% 和 100%。选取其中全部的杀鲑气单胞菌菌株及部分气单胞菌的未定种的 16S rRNA 基因序列进行系统发育学分析, 其系统发生树如图 3 所示。

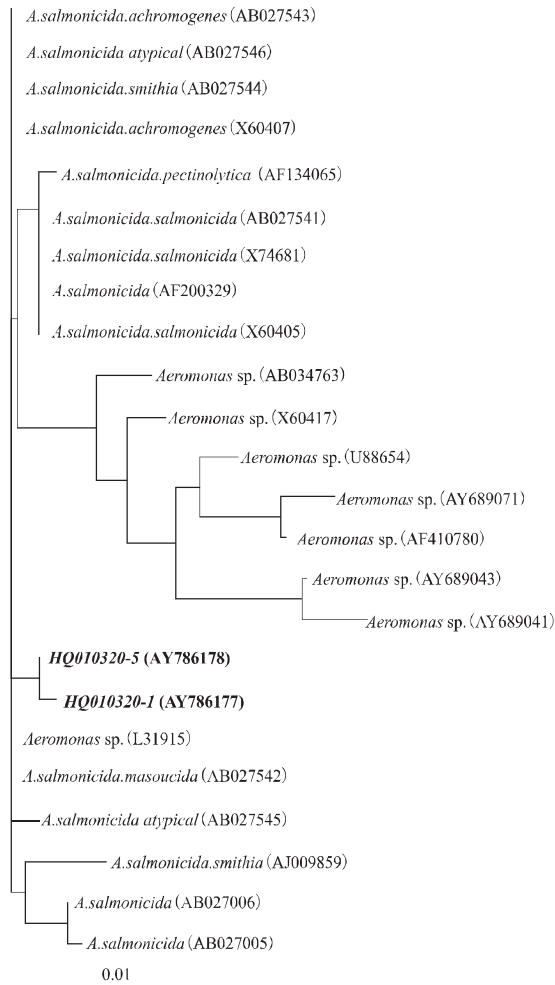


图 3 杀鲑气单胞菌 16S rRNA 基因序列系统发生树(图中 AB027543 至 AB027005 为菌株在 NCBI 的登录号)

Fig. 3 Phylogenetic tree of *A. salmonicida* 16S rRNA gene sequences (AB027543 - AB027005 were database accession numbers in NCBI)

2.4 质粒指纹图谱

对从石鲮细菌性败血症自然病例中分离获得的杀鲑气单胞杀鲑亚种菌株, 提取质粒后进行琼脂糖凝胶平板电泳图谱测定, 以确定相应的质粒条带, 并用 DL2000 作为对照测定其分子量。结果表明, 被检 60 株杀鲑气单胞杀鲑亚种具有 3 种类型的质粒条带。其中 37 株菌具有 5 条质粒带, 分子量分别为 4.61 kb、14.61 kb、17.81 kb、20.23 kb 和 24.33 kb; 15 株菌具有 3 条质粒带, 分子量分别为 17.81 kb、20.23 kb 和 24.33 kb; 另外 8 株菌具有 2 条质粒带, 分子量分别为 4.61 kb 和 17.81 kb, 且分子量为 20.23 kb 的质粒带相对较模糊(图 4)。

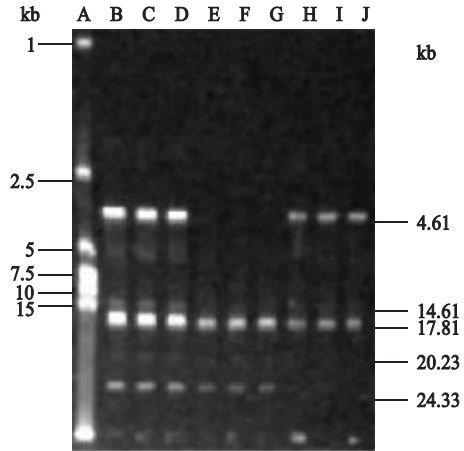


图 4 杀鲑气单胞菌杀鲑亚种质粒条带(图中数字为质粒分子量)

Fig. 4 Plasmids of *A. salmonicida* subsp. *flounderacida* subsp. nov. (Numbers indicate the molecular mass)

A, marker DL15 000; B, HQ010320-1; C, HQ010320-7; D, HQ020329-4; E, HQ010320-20; F, HQ010320-13; G, HQ010320-17; H, HQ020329-12; I, HQ020329-18; J, HQ010320-23.

2.5 菌种归类判定

综合上述对 60 株菌在形态和理化特性、代表菌株 DNA 中 G + C mol% 和 16S rRNA 基因序列测定与系统发育学分析的结果, 将其判定为气单胞菌属的杀鲑气单胞菌, 但其有些主要生化性状指标与目前记载和报道的杀鲑气单胞菌亚种及非典型菌株均有差异^[1-2,8-9], 在系统发育树中 HQ010320-1 与 HQ010320-5 菌株与杀鲑气单胞菌的 16S rRNA 基因序列自然聚类, 且单独聚为 1 个分支, 独立于其他菌株, 认为其属于杀鲑气单胞菌的新亚种; 经择代表菌株(HQ010320-1 株), 送中国典型培养物保藏中

心(CCTCC)做复核鉴定与分类定名,依据《细菌命名国际法规》(International Code of Nomenclature of Bacteria, ICNB),将供试菌定名为杀鲑气单胞菌的新亚种—杀鲑气单胞菌杀鲑亚种(*Aeromonas salmonicida* subsp. *flounderacida* subsp. nov.)。

3 讨论

目前杀鲑气单胞菌包括已明确的4个亚种^[8]即杀鲑亚种、无色亚种、杀日本鲑亚种、史氏亚种,另外还有已记述的一些非典型分离物^[12-15]。本次实验检出的杀鲑气单胞菌,在所测项目中有些指标均不能与已有记述的各亚种相吻合(表1),且在系统发育学分析中区别于其他杀鲑气单胞菌的菌株。因此,作为新的亚种并予以命名,主要考虑到该菌首次由石鲮中检出且为相应被检败血症的原发病原菌,所以定名为杀鲑气单胞菌杀鲑亚种。在对该菌鉴定时,除了常规的形态、理化性状等表现性状外,最好进行分子分类学的DNA中G+C mol%测定、16S rRNA基因序列测定与系统发育学分析等,以准确判定其分类位置及有利于对某些变异菌株的发现。

杀鲑气单胞菌对鱼类的感染在国外已多有报告,在中国亦已有从观赏金鱼肾脏标本中分离出杀鲑气单胞菌杀鲑亚种的报道^[16]。本次从呈败血症的石鲮中检出的杀鲑气单胞菌杀鲑亚种这一新亚种,除了能引起石鲮的发病与死亡外,还经人工感染试验表明对供试牙鲆、鲤、鲫、泥鳅等具有不同程度的致病作用,这些更进一步显示了该菌在鱼类中较为广泛的致病作用,但其确切的致病宿主范围,尚需对自然病例更广泛的检验予以明确。

参考文献:

- [1] Austin B, Austin D A. Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish[M]. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1987. 111-177.
- [2] Austin B, Austin D A. Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish. Third(Revised) Edition[M]. Chichester: Praxis Publishing Ltd, 1999. 20. 66-69.
- [3] Nougayreda P, Sochon E, Vuillaume A. Isolation of *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* in farmed turbot (*Psetta maxima*) in France[J]. Bull Eur Ass Fish Pathol, 1990, 10: 139-140.
- [4] Willumsen B. *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* isolated from Atlantic cod and coalfish[J]. Bull Eur Ass Fish Pathol, 1990, 10: 62-63.
- [5] Treasurer J W, Cox D. The occurrence of *A. salmonicida* in wrasse (Labridae) and implications for Atlantic salmon farming[J]. Bull Eur Ass Fish Pathol, 1991, 11: 155-161.
- [6] Pedersen K, Larsen J L. First report of an outbreak of furunculosis in turbot, *Scophthalmus maximus* caused by *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* in Denmark[J]. Bull Eur Ass Fish Pathol, 1996, 16: 129-133.
- [7] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 106-119, 353-398.
- [8] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, et al. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition[M]. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994. 73, 129, 190-191, 253.
- [9] Krieg N R, Holt J G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 1[M]. London: Williams and Wilkins, Baltimore, 1984. 545-548.
- [10] 莫照兰, 茅云翔, 陈师勇, 等. 养殖牙鲆鱼苗腹水症病原菌的鉴定及系统发育学分析[J]. 海洋与湖沼, 2003, 34(2): 131-141.
- [11] Martin F Polz, Collen M Cavanaugh. Bias in template to product ratios in multitemplate PCR[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(10): 3724-3730.
- [12] Cornick J W, Morrison C M, Zwicker B, et al. Atypical *Aeromonas salmonicida* infection in Atlantic cod, *Gadus morhua* L.[J]. Fish Dis, 1984, 7: 495-499.
- [13] Wiklund T, Dalsgaard I. Atypical *Aeromonas salmonicida* associated with ulcerated flat fish species in the North Sea[J]. Aquat Anim Health, 1995, 7: 218-224.
- [14] Larsen J L, Pedersen K. Atypical *Aeromonas salmonicida* isolated from diseased turbot (*Scophthalmus maximus* L.)[J]. Acta Vet Scand, 1996, 37: 139-146.
- [15] Hellberg H, Moksness E, Høie S. Infection with Atypical *Aeromonas salmonicida* in farmed common wolf fish, *Anarhichas lupus* L.[J]. Fish Dis, 1996, 19: 329-332.
- [16] 李健, 陈沁, 王巧全, 等. 出口渔场杀鲑气单胞菌杀鲑亚种的分离鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2003, (4): 38-39.

Biological characterization and phylogenetic analysis of pathogenic new subspecies of *Aeromonas salmonicida* isolated from stone flounder (*Kareius bicoloratus* L.)

ZHANG Xiao-jun, FANG Hai, CHEN Cui-zhen, JIN Xiao-min, WANG Xiu-yun

(Department of Animal Science, Hebei Normal University of Science and Technology, Qin huang dao, Hebei 066600, China)

Abstract: Stone flounder (*Kareius bicoloratus* L.) is a marine fish with high economic value in the aquaculture industry of northern China. Continuous high-level mortalities occurred in stone flounder. The diseased samples were collected from wild stocks and cultured in farms during March 2001 and April 2002 in Qinhuangdao, Hebei Province. Examination of diseased stone flounder showed that the fish belonged to septicemia infection. The biological characteristics of pathogenic bacteria were studied, including morphological characteristics, physiological and biochemical characteristics, G + C mol% of DNA, and plasmid content of isolates. In addition, the molecular identification of representative strains was conducted, and the 16S rRNA gene were partially sequenced and compared with sequences deposited in databases; molecular phylogenetic trees were constructed. The results showed that the isolates were Gram-negative, were arranged singly or in pairs, round-ends, medium-sized short rods, $0.4 - 1.0 \mu\text{m} \times 1.0 - 2.0 \mu\text{m}$ in size, no-endospores, electron micrograph by negatively stained revealed that the cultures have no flagella; the physiological and biochemical traits showed that the isolates were positive reaction for oxidase, catalase, gelatin hydrolysis, maltose, D-mannitol, produce acid but no gas from glucose, reduce nitrate, tween 80, adonitol, D-raffinose, malonate utilization, and negative reaction for indole, methyl red, esculin, glycerol, urease, trehalose, sucrose reduction, arabinose, Voges-Proskauer reaction, produce H_2S , D-sorbitol, D-arabitol, i-erythritol, m-inositol, L-rhamnose, salicin, have no motility, can not growth at 37°C , G + C mol% of DNA were 62.6%; the sequenced 16S rRNA gene of strain HQ010320-1 (GenBank accession no. AY786177) is 1 425 bp in length, and the sequenced 16S rRNA gene of strain HQ010320-5 (GenBank accession no. AY786178) is 1 423 bp in length. The 16S rRNA gene sequence of representative strains (HQ010320-1 and HQ010320-5) exhibited high similarity (99% and 100%) with the 16S rRNA gene of *A. salmonicida* from GenBank database. The results showed that the identified 60 strains belonged to new subspecies of *Aeromonas salmonicida*, and named as *Aeromonas salmonicida* subsp. *flounderacida* subsp. nov. by their morphological characteristics, physiological and biochemical characteristics, and molecular identification by 16S rRNA partial sequence. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(6):917 - 923]

Key words: *Kareius bicoloratus* L.; *A. salmonicida* subsp. *flounderacida* subsp. nov.; biological characterization; phylogenetic analysis

Corresponding author: FANG Hai. Tel:0335 - 2039062; Fax:0335 - 2024487; E-mail:fanghaihb@163.com