

## 西伯利亚鲟停乳链球菌的分离、鉴定与致病性

潘厚军<sup>1</sup>, 刘晓勇<sup>2</sup>, 常藕琴<sup>1</sup>, 王庆<sup>1</sup>, 孙慧武<sup>2</sup>, 刘瑞明<sup>1</sup>, 付小哲<sup>1</sup>, 刘雨果<sup>1</sup>, 吴淑勤<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东广州 510380; 2. 中国水产科学研究院, 北京 100141)

**摘要:** 从患暴发性流行病的西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*) 肝脏和心脏中各分离到 1 株细菌, 分离纯化后获得 2 个分离株, 编号分别为 AeBF070904、AbHT070912, 对分离菌进行了菌株鉴定、致病性分析及药敏实验。分别应用常规生理生化鉴定、全自动细菌测定卡 API 20 STREP 和 ID 32 STREP 进行检测, 结果表明, 2 个分离株均为停乳链球菌(*Streptococcus dysgalactiae*)。对 2 个分离株的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增和测序, 并与 GenBank 中收录的链球菌 16S rRNA 基因进行序列分析并构建系统进化树, 结果显示, 2 个分离株的 16S rRNA 基因序列相同, 与停乳链球菌同源性最高达 97.3%, 在系统进化树上与停乳链球菌聚为一簇, 进一步确认 2 个分离株均为停乳链球菌。从人工感染后发病鱼的内脏组织再分离的细菌特性与原感染菌相同, 确认停乳链球菌是西伯利亚鲟的致病菌。2 个分离株对西伯利亚鲟、杂交鲟及剑尾鱼均有致死毒性, 37℃ 培养的细菌毒力比 28℃ 培养的细菌毒力强。2 个分离株均对青霉素、诺氟沙星等 7 种药物敏感; 对头孢唑啉、庆大霉素等 2 种药物耐受; 对红霉素中等敏感; 对卡那霉素等 8 种药物菌株之间出现差异。[中国水产科学, 2009, 16(6): 891-904]

**关键词:** 西伯利亚鲟; 停乳链球菌; 致病性; 细菌鉴定; 16S rRNA 基因序列; 药物敏感

**中图分类号:** S941.42

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8737-(2009)06-0891-14

鲟鱼为软骨硬鳞鱼, 其肉厚骨软、营养丰富、味道鲜美, 具有很高的经济价值, 用鲟鱼卵加工成的鱼子酱有“黑色黄金”之称。中国鲟鱼养殖的主要种类有西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)、史氏鲟(*Acipenser schrencki*) 等。其中, 西伯利亚鲟因易驯养、生长快、体形大、肉质好, 成为目前国内鲟鱼养殖的主导品种<sup>[1]</sup>。随着中国大陆鲟鱼养殖的发展, 传染性病害日趋严重。已有较多关于嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) 感染各种鲟鱼致病的报道<sup>[2-4]</sup>, 还有关于豚鼠气单胞菌(*Aeromonas carvia*) 和类志贺邻单胞菌(*Plesimonas shigelloides*) 感染鲟鱼致病的报道<sup>[5]</sup>。以上报道的致病菌均为革兰氏阴性菌, 只有 Roy 和 Ruth 等<sup>[6]</sup> 认为革兰氏阳性菌—链球菌(*Streptococcus* spp.) 亦可能是鲟鱼细菌性疾病的病原。

本研究采用电镜观察、细菌分离、生理生化鉴定及 16S rRNA 基因序列分析等手段, 从患暴发性

流行病西伯利亚鲟中分离、确认致病性停乳链球菌(*Streptococcus dysgalactiae*), 并对分离的菌株进行了药敏实验, 旨在为鲟鱼细菌性疾病防控提供研究基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 病鲟来源

病鲟于 2007 年 6-10 月取自北京市房山区与河北唐山市迁西 2 个鲟鱼养殖基地的西伯利亚鲟, 主要症状为心脏外膜有大量的米粒大小、息肉状、紫褐色的囊状肿物, 肝脏苍白, 有时见出血块、血性腹水、脾脏肿大。此种疾病主要暴发流行于高水温(>22℃) 季节, 死亡率可高达 60% 以上。

#### 1.2 病鲟组织电镜观察

取病鲟脾脏、肾脏、心脏、肝脏等组织, 经含 2.5% 戊二醛的 0.1 mol/L PBS 液前固定, 含 1% 锇酸的 0.1 mol/L PBS 液后固定, 系列乙醇脱水, Epon812 树脂

收稿日期: 2008-12-22; 修订日期: 2009-05-21.

基金项目: 十一五国家科技支撑计划(2006BAD03B05); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2007B009).

作者简介: 潘厚军(1968-), 女, 副研究员, 从事水产动物病害研究. E-mail: phj001@126.com

包埋后,进行常规超薄切片,醋酸铀—柠檬酸铅双染色, Philips CM 10 透射电镜观察。

### 1.3 细菌分离纯化

取不同来源的患病鲟鱼,以无菌操作取肝、肾、脾、心脏等组织,以接种环在脑心浸出液琼脂(BHI,北京陆桥生物制品有限公司)、5% 绵羊血琼脂(广东环凯微生物科技有限公司)上划线接种,于 28 °C 培养 28~72 h、在平板上选择出现较多形态一致的菌落,选择单个菌落纯化,以脱脂牛奶(加 5% 的蔗糖)为保护剂,冷冻干燥保存备用。

### 1.4 细菌生化鉴定

纯化的细菌在血平板上 28 °C 培养 24 h,转接 BHI 肉汤培养基,28 °C 180 r/min 培养 20 h,用无菌吸管吸取菌液于载玻片上,按常规方法进行革兰氏染色试验。根据革兰氏染色结果再采用 2 种方法,一种是进行细菌的常规生长特性、生理生化测定,鉴定结果参照文献 [7-9] 的标准判断细菌的种类;另一种是选择链球菌测定卡 API 20 STREP(法国 bioMerieux)和 ID 32 STREP(法国 bioMerieux),按说明书程序操作,分别在 API 系统和 ATB 系统细菌自动鉴定仪上读取细菌鉴定结果。

### 1.5 细菌 16S rRNA 基因序列分析

**1.5.1 细菌 DNA 模板的制备** 取分离细菌及海豚链球菌标准株(ATCC29178) 28 °C 180 r/min BHI 中培养 48 h 的液体培养物,按 Omega 公司 DNA 提取试剂盒说明进行总 DNA 提取。

**1.5.2 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增** 选择 Messick 等<sup>[10]</sup>报道的通用引物 fD1/rD1。该引物能扩增大多数真细菌近乎全长的 16S rRNA 基因,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。引物序列如下:

fD1, Sense direction: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCT CAG-3';

rD1, Antisense direction: 5'-AAGGAGGTGATCCA GCC-3'。

反应在 50 μL 体系中进行: 10×PCR 缓冲液 5.0 μL, dNTP 1.0 μL; fD1 1.0 μL; rD1 1.0 μL; 模板 DNA 2.0 μL; Taq DNA 聚合酶 1.0 μL; ddH<sub>2</sub>O 39 μL。

反应条件为: 95 °C 预处理 3 min; 进行 30 个循环反应,每个循环反应包括 94 °C 45 s, 50 °C 45 s,

72 °C 1.5 min; 循环完成后,72 °C 充分延伸 10 min。

**1.5.3 PCR 产物电泳及胶回收** 取全部反应液在 1% 琼脂糖凝胶(含溴化乙锭)上电泳,在 5 V·cm<sup>-1</sup> 条件下电泳 30 min。然后在紫外灯下切取目的片段,按照 Omega 胶回收试剂盒中的说明书进行胶回收。

**1.5.4 基因的克隆和序列测定** 按 Takara 公司 pMD18-T 载体说明书要求,将纯化的 PCR 产物连接到载体上。按常规方法转化 *E.coli* DH5α 感受态细胞,在含有 Amp 的 LB 固体培养基上涂板后 37 °C 倒置培养 12~16 h,挑取转化平板上长出的白色单菌落,在含有 Amp 的 LB 液体培养基中 37 °C 振荡培养过夜。按照 Omega 质粒提取试剂盒中的说明书进行质粒抽提,进行 PCR 鉴定后送菌液至上海生工生物工程技术服务有限公司进行序列测定。

**1.5.5 16S rRNA 基因序列分析与数据处理** 采用 ClustalX 1.81 和 DNASTar 软件与从 GenBank 数据库中获得的其他链球菌属细菌的 16S rRNA 序列进行相似性分析,并利用 Mega4 软件进行系统进化树的建立、统计和聚类分析。

### 1.6 细菌人工感染

**1.6.1 实验鱼** 健康西伯利亚鲟,体长 8.2~9.6 cm,体质量 7.0~9.2 g,平均 8.1 g; 杂交鲟(西伯利亚鲟♀×杂交鲟♂),体长 8.2~10.0 cm,体质量 7.5~9.5 g,平均 8.3 g; 剑尾鱼,体长 5.8~6.6 cm,体质量 3.1~3.6 g,平均 3.3 g。西伯利亚鲟和杂交鲟均来源于广东广州市嘉禾水产研究所鱼苗良种场,剑尾鱼来源于珠江水产研究所水生实验动物基地。所有实验鱼在试验前暂养 7 d,确认健康后用于人工感染实验。

**1.6.2 人工感染实验** 细菌在绵羊血琼脂平板上 28 °C 培养 42 h,用无菌生理盐水洗下菌苔,配成 3.0×10<sup>8</sup> CFU·mL<sup>-1</sup> 浓度的菌悬液。腹腔注射感染健康西伯利亚鲟和杂交鲟,每组 10 尾,每尾注射 0.2 mL; 肌肉注射剑尾鱼,每组 10 尾,每尾注射 0.1 mL。对照组注射相同剂量的 0.65% 无菌生理盐水。观察实验鱼症状,发现死鱼及时捞出,并解剖检查病变情况,连续观察 14 d。从濒死显症的实验鱼肌肉、心脏、肝脏、肾脏等部位再次分离细菌,进行鉴定。鱼感染实验水温为 26~28 °C。

**1.6.3 不同温度培养的细菌对西伯利亚鲟和剑**

**尾鱼的毒力比较** 将分离纯化的 AeBF070904 和 AbHT070912 菌株分别在 5% 绵羊血琼脂上培养 42 h, 设 28 °C 及 37 °C 2 种培养温度, 用无菌生理盐水配成  $3.0 \times 10^9$  CFU · mL<sup>-1</sup>、 $9.5 \times 10^8$  CFU · mL<sup>-1</sup>、 $3.0 \times 10^8$  CFU · mL<sup>-1</sup>、 $9.5 \times 10^7$  CFU · mL<sup>-1</sup>、 $3.0 \times 10^7$  CFU · mL<sup>-1</sup>、 $9.5 \times 10^6$  CFU · mL<sup>-1</sup> 浓度的菌悬液, 分别注射健康西伯利亚鲟和剑尾鱼, 对照组注射 0.65% 无菌生理盐水。每组实验鱼尾数、细菌注射方法、剂量及结果观察同 1.6.2。根据 Reed (1938)<sup>[11]</sup> 的方法求出半致死浓度 (LC<sub>50</sub>, 单位: CFU · mL<sup>-1</sup>)。半致死剂量 (LD<sub>50</sub>, 单位: CFU · g<sup>-1</sup>) 由下式求出。鱼感染实验水温亦为 26 ~ 28 °C。

$$\text{半致死剂量 LD}_{50} (\text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}) = \text{LC}_{50} (\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}) \times \text{注射量} (\text{mL}) \div \text{实验鱼平均体质量} (\text{g})$$

### 1.7 细菌药敏试验

以纸片法在 5% 绵羊血平板上进行, 28 °C 恒温培养 24 h 后观察抑菌圈有无并测量直径。药敏纸片购自北京天坛药物生物技术开发公司, 根据文献 [12] 的标准判定细菌对药物的敏感性。

## 2 结果与分析

### 2.1 病鲟组织的电镜观察

病鲟组织的电镜照片如图 1 所示, 肾脏、脾脏、心脏和肝脏中均发现有球形的细菌, 可见细菌排列成链状, 球形细菌直径约为 0.6 μm。

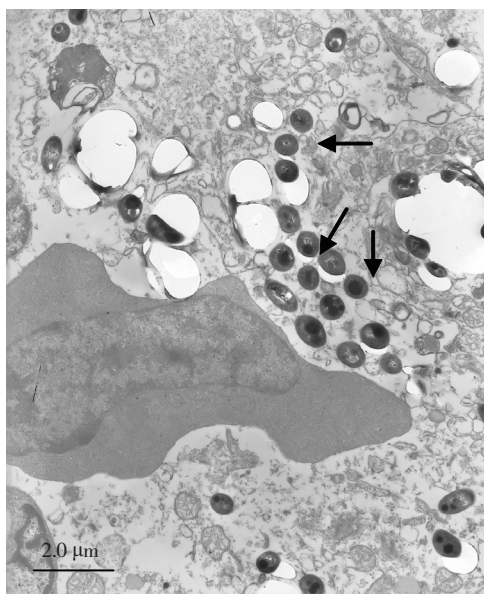


图 1 患病西伯利亚鲟肾脏电镜切片  
箭头示多个球形细菌连接成链状。

Fig. 1 Electronic microscope sections of kidney of diseased *Acipenser baerii*  
Arrows show some spherical bacteria connected as chains.

## 2.2 致病菌分离与鉴定

**2.2.1 菌落形态** 从北京房山水泥池和河北迁西网箱自然发病的西伯利亚鲟肝脏、肾脏、脾脏、心脏均分离到菌落形状相似的优势菌。分离细菌在 5% 绵羊血琼脂平板上 28 °C 培养 48 h, 菌落直径为 0.8 ~ 1

mm, 灰色、圆形、突起、湿润, α-溶血, 在 BHI 琼脂平板上形成淡黄色针尖样大小的菌落, 普通营养琼脂平板上生长不良。分离菌株的来源、编号见表 1。选取代表分离菌株 AeBF070904、AbHT070912 进行以下细菌鉴定、回归感染、药敏实验。



表 1 自然发病的西伯利亚鲟分离的部分细菌菌株  
Tab. 1 Partial bacteria strains isolated from diseased *Acipenser baerii*

菌株编号 Strain	采样地点 Sampling location	养殖模式 Culture model	鱼体质量 /g Body weight	主要症状 Major symptoms	分离部位 Isolated organ
AeBF070904	北京房山 Fangshan, Beijing	水泥池, 流水 Cement pond, flowing water	700	心外膜囊肿, 血性腹水, 脂肪肝	肝脏 Liver
AeBF070906	北京房山 Fangshan, Beijing	水泥池, 流水 Cement pond, flowing water	700	心外膜囊肿, 血性腹水, 脂肪肝	心脏 Heart
AeBF070905	北京房山 Fangshan, Beijing	水泥池, 流水 Cement pond, flowing water	700	心外膜囊肿, 血性腹水, 脂肪肝	肾脏 Kidney
AeBF070907	北京房山 Fangshan, Beijing	水泥池, 流水 Cement pond, flowing water	700	心外膜囊肿, 血性腹水, 脂肪肝	脾脏 Spleen
AbHT070911	河北迁西 Qianxi, Hebei	水库网箱 Cages in reservoir	400	心外膜囊肿, 肝脏灰白色	肝脏 Liver
AbHT070912	河北迁西 Qianxi, Hebei	水库网箱 Cages in reservoir	400	心外膜囊肿, 肝脏灰白色	心脏 Heart
AbHT070913	河北迁西 Qianxi, Hebei	水库网箱 Cages in reservoir	300	心外膜囊肿, 肝脏灰白色	肾脏 Kidney
AbHT070914	河北迁西 Qianxi, Hebei	水库网箱 Cages in reservoir	300	心外膜囊肿, 肝脏灰白色	脾脏 Spleen

2.2.2 菌体形状及生理、生化指标 分离细菌纯培养物革兰氏染色阳性, 油镜下可见, 有的细菌 2~5 个相互连接形成短链, 有的 8 个以上连接形成长链

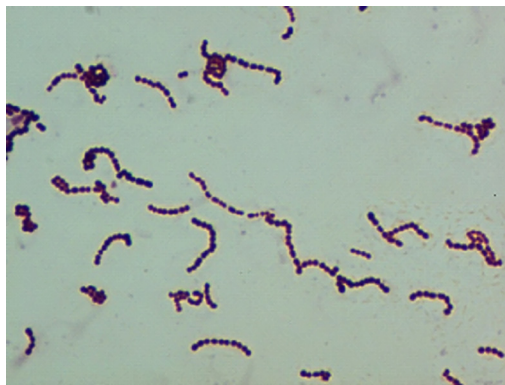


图 2 西伯利亚鲟肝脏中分离的菌株 AeBF070904 革兰氏染色形态 (×1000)

Fig. 2 Micrograph of strain AeBF070904 isolated from the liver of *Acipenser baerii* in Gram staining (×1000)

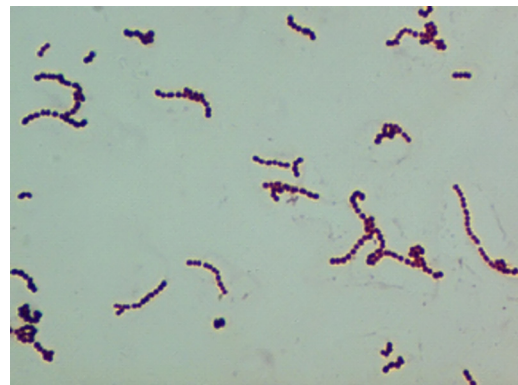


图 3 西伯利亚鲟心脏中分离的菌株 AbHT070912 革兰氏染色形态 (×1000)

Fig. 3 Micrograph of strain AbHT070912 isolated from the heart of *Acipenser baerii* in Gram staining (×1000)

分离细菌在 10 °C 和 45 °C 不生长, 20 °C、28 °C、37 °C 均生长, 37 °C 生长优于 28 °C。1%、2% 及 3% NaCl 中生长, 6.5% NaCl 中不生长, α-溶血, 海藻糖阳性, CAMP 实验阴性, 不利用乳糖和水杨苷 (表 2)。分离细菌的生理生化测定结果与日本从鲫鱼中分离

(图 2、图 3)。细菌过氧化氢酶反应阴性, 从革兰氏染色下细菌形态和过氧化氢酶试验结果, 初步鉴定为链球菌属细菌。

的停乳链球菌 (*Streptococcus dysgalactiae*)<sup>[13]</sup> 相似, 综合常规生化测定及链球菌 2 个测定卡的结果以及参考文献 [7-9, 13], 鉴定为停乳链球菌停乳亚种 (*S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*)。



表 2 从西伯利亚鲟分离的细菌与日本从鲟鱼中分离的停乳链球菌及相似菌生化特性比较  
**Tab. 2 Comparison of biochemical characteristics between isolates from *Acipenser baerii* (in this experiment) and *Streptococcus dysgalactiae* isolated from *Seriola* spp. by Japanese scientists or other similar bacteria**

测定项目 Item	从鲟鱼中分离的细菌 Isolates from <i>Acipenser baerii</i> (n=2)				已报道的链球菌 Streptococcus spp. from others	
	常规方法 Conventional	API 20 STREP	ATP ID32 STREP	日本从鲟鱼中 分离的停乳链球菌 <sup>[13]</sup> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> From <i>Seriola</i> spp.	停乳链球菌亚种代表株 <sup>[13]</sup> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> ATCC 43078	停乳链球菌类马亚种代表株 <sup>[13]</sup> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> ATCC 35666
革兰氏染色 Gram stain	+			+	+	+
溶血性 Haemolysis (5% sheep)	$\alpha$			$\alpha$	$\alpha$	$\beta$
过氧化氢酶 Catalase	-			-	-	-
10°C 生长 Growth at 10°C	-			-	-	-
20°C 生长 Growth at 20°C	+					
28°C 生长 Growth at 28°C	+					
37°C 生长 Growth at 37°C	+					
45°C 生长 Growth at 45°C	-			-	-	-
1% NaCl 生长 Growth in 1% NaCl	+					
2% NaCl 生长 Growth in 2% NaCl	+					
3% NaCl 生长 Growth in 3% NaCl	+					
6.5% NaCl 生长 Growth in 6.5% NaCl	-			-	-	-
VP 试验 Voges-Proskauer test	-			-	-	-
CAMP 实验 CAMP test	-					
尿素酶 Urease	-	-				
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolysis	-	-		d	-	-
马尿酸盐水解酶 Hippurate hydrolysis	-	-		-	-	-
糖醇类利用: Utilization of						
棉籽糖 Raffinose	-	-		-	-	-
甘露醇 Mannitol	-	-		-	-	-
阿拉伯糖 Arabinose	-	-		-	-	-
乳糖 Lactose	-	-		-	+	-
海藻糖 Trehalose	+	+		+	+	+
山梨醇 Sorbitol	-	-		-	-	-
核糖 Ribose	+	+		d	+	+
七叶灵 Esculin	-	-		-	-	-



2.2.3 16S rRNA 的 PCR 扩增结果与系统发育分析

PCR 扩增 2 个分离株 AeBF070904 和 AbHT070912 的 16S rRNA 基因片段约 1 500 bp (图 4)。测序均获得长 1 541 bp 的片段, 获得的序列与 GenBank 中已收录的相关性较高的 16S rRNA 序列比对分析结

果表明, 2 株从西伯利亚鲟分离的细菌 16S rRNA 基因序列没有差异, 为 100%; 它们与停乳链球菌(*S. dysgalactiae*) 同源性最高, 为 97.3%; 与停乳链球菌类马亚种(*S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*) 同源性为 94.9% (表 3)。

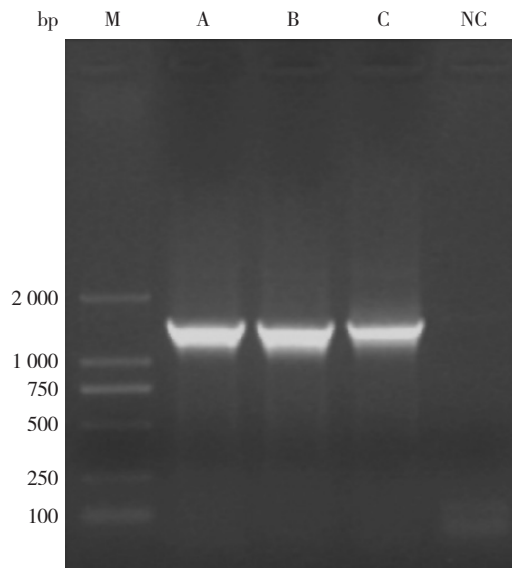


图 4 西伯利亚鲟分离菌株 16S rRNA 基因 PCR 扩增结果

M: DNA 分子标记 DL 2000; A: 分离株 AeBF070904; B: 分离株 AbHT070912; C: 海豚链球菌标准株(ATCC29178); NC: 阴性对照

Fig. 4 PCR amplification of 16S rRNA gene of isolates from *Acipenser baerii*

M: DNA Marker; A:AeBF070904; B:AbHT070912; C: *S. iniae* ATCC29178; NC:negative control

表 3 鲟鱼链球菌 2 个分离株与同属其他种链球菌代表株的同源性分析结果

Tab. 3 Homology analysis of two isolates from *Acipenser baerii* and the representative strains from other *Streptococcus* spp.

		Percent Identity														%			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
Divergence	1	■	100.0	92.6	81.9	88.2	92.9	97.3	94.9	84.0	97.1	86.8	76.5	96.9	93.8	87.8	89.2	1	AeBF070904
	2	0.0	■	92.6	81.9	88.2	92.9	97.3	94.9	84.0	97.1	86.8	76.5	96.9	93.8	87.8	89.2	2	AbHT070912
	3	4.5	4.5	■	84.3	91.4	95.7	95.4	94.4	87.1	96.2	89.1	79.6	96.3	96.6	89.1	92.6	3	<i>S. uberis</i>
	4	3.9	3.9	4.1	■	93.6	95.6	96.0	96.0	93.5	96.2	92.9	90.3	96.3	99.3	94.0	95.0	4	<i>S. agalactiae</i>
	5	7.1	7.1	6.5	6.7	■	93.3	93.0	93.5	88.9	93.8	91.8	85.0	94.0	94.0	87.7	92.1	5	<i>S. bovis</i>
	6	4.7	4.7	4.3	4.6	7.0	■	95.4	94.5	86.2	95.7	88.5	78.9	95.5	95.5	90.1	91.3	6	<i>S. canis</i>
	7	0.5	0.5	4.6	4.2	7.4	4.8	■	96.9	85.9	97.1	88.4	78.0	96.3	95.8	89.6	91.0	7	<i>S. dysgalactiae</i>
	8	1.0	1.0	4.6	4.1	6.6	4.1	1.2	■	88.1	96.8	90.9	80.4	96.3	96.4	90.1	92.4	8	<i>S. dysgalactiae</i> , subsp. <i>equisimilis</i>
	9	6.2	6.2	5.8	6.5	6.1	6.4	6.4	5.8	■	94.0	94.6	87.1	93.8	93.8	92.7	95.3	9	<i>S. equinus</i>
	10	2.6	2.6	3.9	3.9	6.5	4.5	3.0	3.3	6.2	■	87.2	77.2	97.9	94.1	87.5	90.0	10	<i>S. iniae</i>
	11	8.2	8.2	8.0	7.1	7.3	8.2	7.8	6.9	5.5	7.9	■	81.9	92.4	92.1	86.8	90.8	11	<i>S. milleri</i>
	12	6.6	6.6	5.7	6.0	1.6	6.3	6.9	6.0	4.8	6.0	5.8	■	94.4	94.8	94.9	95.0	12	<i>S. mitis</i>
	13	3.2	3.2	3.7	3.8	6.3	4.6	3.7	3.8	6.5	2.2	7.9	5.8	■	93.8	87.3	90.0	13	<i>S. parauberis</i>
	14	3.5	3.5	3.4	0.7	6.3	4.5	3.7	3.7	6.4	3.5	7.5	5.4	3.5	■	89.0	92.8	14	<i>S. porcinus</i>
	15	2.9	2.9	3.7	4.5	5.2	2.7	3.2	2.7	4.5	3.6	6.1	4.9	3.5	3.9	■	95.0	15	<i>S. pyogenes</i>
	16	5.9	5.9	4.9	5.2	5.6	6.4	6.2	5.4	4.9	5.3	6.1	5.2	5.0	4.8	4.5	■	16	<i>S. suis</i>
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		



构建系统发育树(图5)的结果表明,2个分离株 AeBF070904 和 AbHT070912 在系统发育树上一起

与停乳链球菌(*S. dysgalactiae*)聚为一簇。

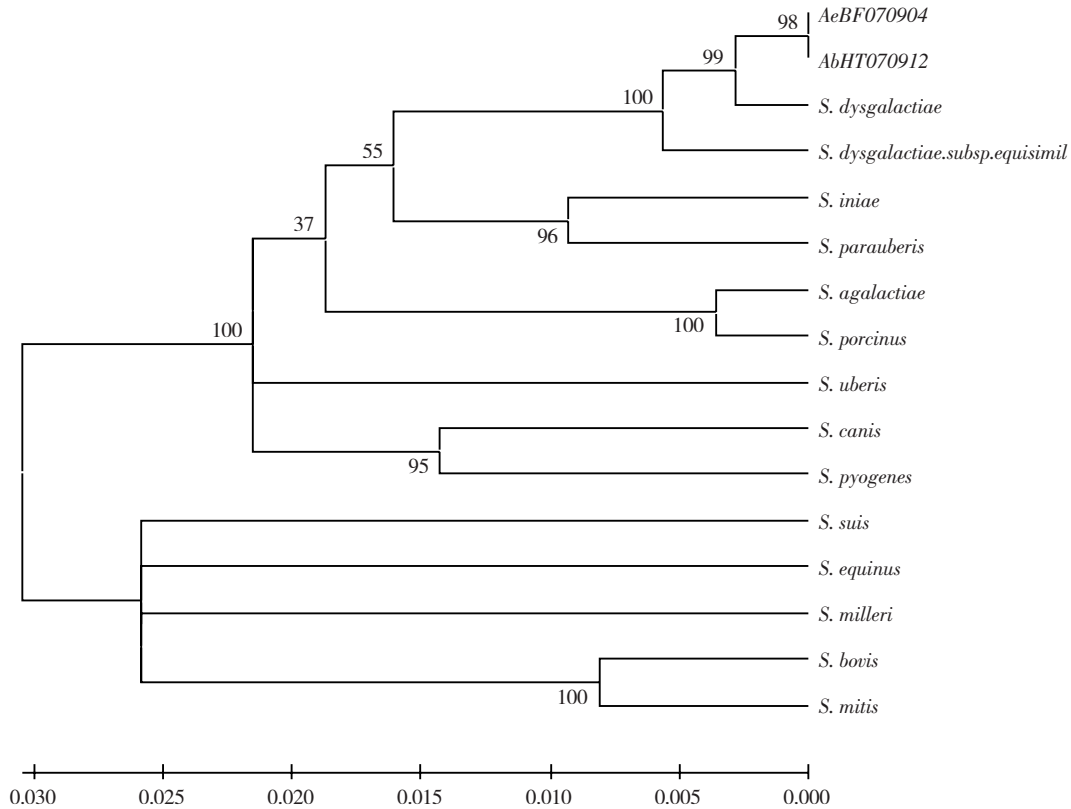


图5 鲟鱼链球菌2个分离株与其他同属不同种链球菌16S rRNA聚类分析的结果

Fig. 5 Phylogenetic relationship among the *Streptococcus* species based on analysis of 16S rRNA gene sequences

## 2.3 细菌毒力

### 2.3.1 细菌感染健康西伯利亚鲟、杂交鲟和剑尾鱼

AeBF070904 和 AbHT070912 菌株 28 °C 培养 42 h 的新鲜菌悬液对健康西伯利亚鲟、杂交鲟和剑尾鱼人工感染的结果表明(表4),菌株对3种鱼均有致死作用。3种鱼感染菌后均出现腹部出血、肌肉坏死等症状。2种鲟鱼感染菌后2天才出现死鱼,剑尾鱼发病死亡时间比2种鲟鱼提前,人工感染菌后24 h即出现死鱼。2个分离株  $3.0 \times 10^8$  CFU · mL<sup>-1</sup> 浓度的菌液人工感染试验鱼,3种鱼14 d内死亡率均在60%以上,剑尾鱼达100%。从感染菌后刚死亡的3种试验鱼肌肉、心脏等组织中分离的菌与原感染菌形态、生化特性相同。

### 2.3.2 不同温度培养的细菌对西伯利亚鲟和剑尾鱼的毒力比较

28 °C 和 37 °C 培养 42 h 的细菌感染西伯利亚鲟和剑尾鱼的结果表明:分离株 AeBF070904 感染西伯利亚鲟的半致死剂量 LD<sub>50</sub>: 28 °C 培养为  $5.43 \times 10^6$  CFU · g<sup>-1</sup>, 而 37 °C 培养为  $3.26 \times 10^6$  CFU · g<sup>-1</sup>; 感染剑尾鱼的半致死剂量 LD<sub>50</sub>: 28 °C 培养为  $2.30 \times 10^6$  CFU · g<sup>-1</sup>, 而 37 °C 培养为  $1.45 \times 10^6$  CFU · g<sup>-1</sup>。AbHT070912 株感染西伯利亚鲟的 LD<sub>50</sub>: 28 °C 培养为  $4.0 \times 10^6$  CFU · g<sup>-1</sup>, 而 37 °C 培养为  $1.75 \times 10^6$  CFU · g<sup>-1</sup>; 感染剑尾鱼的半致死剂量 LD<sub>50</sub>: 28 °C 培养为  $1.38 \times 10^6$  CFU · g<sup>-1</sup>, 而 37 °C 培养为  $6.18 \times 10^5$  CFU · g<sup>-1</sup>(表5)。结果显示,同批次、同种的实验鱼分别接种 37 °C 培养的细菌与 28 °C 培养的细菌,37 °C 培养的细菌 LD<sub>50</sub> 较

表 4 从西伯利亚鲟分离的 AeBF070904 和 AbHT070912 菌株人工感染实验结果 (28 °C 培养)

Tab. 4 Results of bacteria strains AeBF070904 and AbHT070912 isolated from *A. baerii* artificially infecting *A. baerii*, *A. baerii* ♀ × *A. schrencki* ♂ and *X. helleri* (bacteria cultured at 28 °C)

注射菌株 Bacteria strain injected	实验鱼 Test fish	n	菌液浓度 / (CFU · mL <sup>-1</sup> ) Concentration	注射液体积 / mL Injected volume	累计死亡尾数 / 尾 Accumulative death number/ind								死亡率 / % Mortality	
					1 d	2 d	3 d	4 d	6 d	8 d	11 d	14 d		
0 (对照 Control)	西伯利亚鲟 <i>A. baerii</i>	10	生理盐水 Physiological saline	0.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	杂交鲟 <i>A. baerii</i> ♀ × <i>A. schrencki</i> ♂	10	生理盐水 Physiological saline	0.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	剑尾鱼 <i>X. helleri</i>	10	生理盐水 Physiological saline	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AeBF070904	西伯利亚鲟 <i>A. baerii</i>	10	3.0 × 10 <sup>8</sup>	0.2	0	2	4	5	6	6	7	7	70	
	杂交鲟 <i>A. baerii</i> ♀ × <i>A. schrencki</i> ♂	10	3.0 × 10 <sup>8</sup>	0.2	0	1	3	4	4	5	6	6	60	
	剑尾鱼 <i>X. helleri</i>	10	3.0 × 10 <sup>8</sup>	0.1	3	6	9	10	10	10	10	10	100	
AbHT070912	西伯利亚鲟 <i>A. baerii</i>	10	3.0 × 10 <sup>8</sup>	0.2	0	3	5	7	8	9	9	9	90	
	杂交鲟 <i>A. baerii</i> ♀ × <i>A. schrencki</i> ♂	10	3.0 × 10 <sup>8</sup>	0.2	0	2	5	7	7	8	8	8	80	
	剑尾鱼 <i>X. helleri</i>	10	3.0 × 10 <sup>8</sup>	0.1	2	6	8	10	10	10	10	10	100	

小,表明 37 °C 培养的细菌毒力较强。

#### 2.4 药敏试验

分离株 AeBF070904、AbHT070912 对 18 种药物的敏感性结果(表 6)表明,2 个分离株均对青霉素、氨苄西林、阿莫西林、哌拉西林、诺氟沙星、萘诺沙星、左氧氟沙星等 7 种药物敏感,对头孢唑啉、庆大霉素等 2 种药物耐受,对红霉素中等敏感。而对另 8 种药物的敏感性出现差异,如对卡那霉素和阿米卡星: AeBF070904 敏感, AbHT070912 耐受; 而对壮观霉素: AeBF070904 耐受, AbHT070912 敏感。显示同种细菌不同地点的分离株对药物的敏感性有差异。

### 3 讨论

鱼类链球菌病是由链球菌属细菌感染引起的传染病<sup>[6,13-15]</sup>,引起鱼类链球菌病的种类主要有海豚链球菌(*S. iniae*)<sup>[16-22]</sup>、无乳链球菌(*S. agalactiae*)<sup>[23-26]</sup>和停乳链球菌(*S. dysgalactiae*)<sup>[13,27]</sup>等,其中停乳链球菌

(*S. dysgalactiae*)引起的鱼类疾病最早见于 Nomoto 等<sup>[13]</sup>(2004 年)的报道,停乳链球菌引起杜氏鲷(*Seriola dumerili*)和五条鲷(*Seriola quinqueradiata*)死亡。从鲷中分离的停乳链球菌对鲷毒性较强,而对小白鼠毒性较低<sup>[13]</sup>。周素明等<sup>[22]</sup>2007 年从发病的卵形鲳鲆中分离到一株停乳链球菌,该菌株对罗非鱼毒力不强,但是该论文没有关于该菌株对卵形鲳鲆的毒力报道。本实验从西伯利亚鲟分离的 2 株停乳链球菌回归感染,对西伯利亚鲟的 LD<sub>50</sub> 在 10<sup>6</sup> ~ 10<sup>7</sup> CFU · g<sup>-1</sup> 之间,实验鱼表现出血症状。本研究可以确定鲟鱼中分离的停乳链球菌具致病性。

目前鱼类病原细菌的鉴定多结合传统的形态特征观察、生理生化特性测定及基因序列分析等技术,以确保鉴定结果的可靠性<sup>[3-4,13,21-22,25-27]</sup>。本研究中采用电镜观察、常规生理生化测试、全自动细菌鉴定系统 API 20 STREP 和 ID 32 STREP 2 个测定卡测试,以及 16S rRNA 基因序列分析等方法,对分离菌株进行鉴定

表 5 28 °C 与 37 °C 培养分离株 AeBF070904 和 AbHT070912 对西伯利亚鲟和剑尾鱼和剑尾鱼的毒力比较  
 Tab. 5 Comparison of virulence of isolates AeBF070904 and AbHT070912 to *A. baerit* and *X. helleri* cultured at different temperatures (28 °C and 37 °C)

实验鱼 Test fish	平均体质量/g Mean body weight	菌株 Isolated strain	培养温度/°C Temperature	菌液浓度/ (CFU · mL <sup>-1</sup> ) Concentration	注射液体积/mL Injected volume	累计死亡尾数/ind Accumulative death number	死亡率/% Mortality	LC <sub>50</sub> / (CFU · mL <sup>-1</sup> )	LD <sub>50</sub> / (CFU · g <sup>-1</sup> )
西伯利亚鲟 <i>A. baerit</i>	8.1	AeBF070904	28	3.0 × 10 <sup>9</sup>	0.2	10	100		
				9.5 × 10 <sup>8</sup>	0.2	9	90		
				3.0 × 10 <sup>8</sup>	0.2	7	70		
				9.5 × 10 <sup>7</sup>	0.2	2	20	2.2 × 10 <sup>8</sup>	5.43 × 10 <sup>6</sup>
				3.0 × 10 <sup>7</sup>	0.2	0	0		
				生理盐水 Physiological saline	0.2	0	0		
	37	AeBF070904	37	3.0 × 10 <sup>9</sup>	0.2	10	100		
				9.5 × 10 <sup>8</sup>	0.2	9	90		
				3.0 × 10 <sup>8</sup>	0.2	8	80		
				9.5 × 10 <sup>7</sup>	0.2	4	40	1.32 × 10 <sup>8</sup>	3.26 × 10 <sup>6</sup>
				3.0 × 10 <sup>7</sup>	0.2	1	10		
				生理盐水 Physiological saline	0.2	0	0		
剑尾鱼 <i>X. helleri</i>	3.3	AeBF070904	28	9.5 × 10 <sup>8</sup>	0.1	10	100		
				3.0 × 10 <sup>8</sup>	0.1	10	100		
				9.5 × 10 <sup>7</sup>	0.1	6	60		
				3.0 × 10 <sup>7</sup>	0.1	2	20	7.59 × 10 <sup>7</sup>	2.30 × 10 <sup>6</sup>
				9.5 × 10 <sup>6</sup>	0.1	0	0		
				生理盐水 Physiological saline	0.1	0	0		
	37	AeBF070904	37	9.5 × 10 <sup>8</sup>	0.1	10	100		
				3.0 × 10 <sup>8</sup>	0.1	10	100		
				9.5 × 10 <sup>7</sup>	0.1	9	90	4.78 × 10 <sup>7</sup>	1.45 × 10 <sup>6</sup>
				3.0 × 10 <sup>7</sup>	0.1	3	30		
				9.5 × 10 <sup>6</sup>	0.1	0	0		
				生理盐水 Physiological saline	0.1	0	0		



西伯利亚鲟 <i>A. baerii</i>	8.1	AbHT070912	3.0 × 10 <sup>9</sup>	0.2	10	100		
			9.5 × 10 <sup>8</sup>	0.2	9	90		
			3.0 × 10 <sup>8</sup>	0.2	9	90		
			9.5 × 10 <sup>7</sup>	0.2	3	30	1.62 × 10 <sup>8</sup>	
			3.0 × 10 <sup>7</sup>	0.2	1	10	4.0 × 10 <sup>6</sup>	
	生理盐水	0.2	0	0				
	Physiological saline							
		3.0 × 10 <sup>9</sup>	0.2	10	100			
		9.5 × 10 <sup>8</sup>	0.2	10	100			
		3.0 × 10 <sup>8</sup>	0.2	8	80			
剑尾鱼 <i>X. helleri</i>	3.3	AbHT070912	9.5 × 10 <sup>7</sup>	0.2	7	70	7.08 × 10 <sup>7</sup>	
			3.0 × 10 <sup>7</sup>	0.2	3	30	1.75 × 10 <sup>6</sup>	
			生理盐水	0.2	0	0		
			Physiological saline					
				9.5 × 10 <sup>8</sup>	0.1	10	100	
		3.0 × 10 <sup>8</sup>	0.1	10	100			
		9.5 × 10 <sup>7</sup>	0.1	7	70			
		3.0 × 10 <sup>7</sup>	0.1	4	40	4.57 × 10 <sup>7</sup>		
		9.5 × 10 <sup>6</sup>	0.1	1	10	1.38 × 10 <sup>6</sup>		
		生理盐水	0.1	0	0			
Physiological saline								
	9.5 × 10 <sup>8</sup>	0.1	10	100				
	3.0 × 10 <sup>8</sup>	0.1	10	100				
	9.5 × 10 <sup>7</sup>	0.1	9	90				
	3.0 × 10 <sup>7</sup>	0.1	6	60	2.04 × 10 <sup>7</sup>			
	9.5 × 10 <sup>6</sup>	0.1	3	30	6.18 × 10 <sup>5</sup>			
	生理盐水	0.1	0	0				
Physiological saline								

表6 细菌 AeBF070904 及 AbHT070912 对 18 种药物的敏感性  
 Tab. 6 Sensitivity of AeBF070904 and AbHT070912 isolated from *A. baerii* to 18 kinds of chemotherapeutants

抗菌药物 Chemotherapeutants	含药量 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{disc}^{-1}$ ) Dose	敏感性 Sensitivity	
		AeBF070904	AbHT070912
青霉素 G Penicillin G	10	S	S
氨苄西林 Ampicillin	10	S	S
阿莫西林 Amoxicillin	10	S	S
哌拉西林 Piperacillin	10	S	S
头孢唑啉 Cefazolin	30	R	R
诺氟沙星 Norfloxacin	10	S	S
环丙沙星 Ciprofloxacin	5	I	R
萘诺沙星 Enrofloxacin	5	S	S
左氧氟沙星 Levofloxacin	5	S	S
四环素 Tetracycline	30	I	R
利福平 Rifampicin	5	I	R
红霉素 Erythromycin	15	I	I
磺胺甲基异噁唑 Sulfamethoxazole	15	R	I
呋喃妥因 Nitrofurantoin	300	R	I
庆大霉素 Gentamicin	10	R	R
阿米卡星 Amikacin	30	S	R
卡那霉素 Kanamycin	30	S	R
壮观霉素 Spectinomycine	100	R	S

注: S—敏感; I—中等敏感; R—抗性。

Note: S—sensitive; I—intermediate; R—resistant.

的结果均符合为停乳链球菌(*S. dysgalactiae*)。停乳链球菌又分为停乳链球菌停乳亚种(*S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*)和停乳链球菌类马亚种(*S. dysgalactiae* subsp. *equisimili*), 2个亚种生化特性的主要区别在于: 停乳亚种水杨苷利用为阴性, 而类马亚种水杨苷利用为阳性<sup>[9]</sup>; 停乳亚种一般为 $\alpha$ -溶血, 而类马亚种为 $\beta$ 溶血<sup>[13,28]</sup>。本研究的分离株为 $\alpha$ -溶血、不利用水杨苷, 16S rRNA 序列分析的结果与停乳链球菌停乳亚种同源性最高, 与停乳链球菌类马亚种同源性稍低, 因而综合鉴定的结果为停乳亚种(subsp. *dysgalactiae*)。2个测定卡给出的结果归为停乳链球菌, 但在亚种的水平上有所差异, API 20 STREP 的结果倾向于停乳亚种, 而 ATP ID32 STREP 的结果倾向于类马亚种, 表明在细菌的鉴定中不能单纯依靠细菌鉴定卡, 而要结合常规生化测定及基因序列分析等技术。

以往中国从鲟鱼中分离的细菌为革兰氏阴性菌<sup>[2-5]</sup>, 本研究表明革兰氏阳性菌(停乳链球菌)是西伯利亚鲟传染病的新病原。水生动物链球菌病多发

于水质差、养殖密度大的区域, 可能在水体和底泥中保存较长时间, 在一个养殖系统环境中存在的某些链球菌, 可能会成为这个鱼场特有的、在一定时期内引起疾病的病原菌, 链球菌感染能快速通过被污染水体传播到饲养于同一水体中的鱼类<sup>[26,29-31]</sup>。因此, 针对链球菌病的防御, 应该注重养殖鱼种类的轮养, 并且在鱼池休养时彻底清塘消毒, 采用科学的水体环境修复技术, 保持适当的鱼种放养密度。停乳链球菌是牛、猪、羊等家养动物乳房炎、多关节炎、败血症的常见病原菌<sup>[9,27,32-33]</sup>, 也可感染人类<sup>[27,34]</sup>, 属人、兽、鱼共患病原。目前, 人、兽共患病原的危害已成为公共卫生防御的国际研究热点, 该方面的研究值得进一步深入。

#### 参考文献:

- [1] 崔禾, 何建湘, 郑维中. 我国鲟鱼产业现状分析及发展建议 [J]. 中国水产, 2006 (6): 8-9; 2006 (7): 14-15.
- [2] 杨治国. 鲟鱼嗜水气单胞菌的分离及鉴定 [J]. 淡水渔业, 2001, 31

- (5): 40-41.
- [3] 孟彦, 肖汉兵, 张林, 等. 施氏鲟出血性败血症病原菌的分离和鉴定 [J]. 华中农业大学学报, 2007, 26 (6): 822-826.
- [4] 李圆圆, 曹海鹏, 何珊, 等. 鲟源致病性嗜水气单胞菌 X1 的分离鉴定与药敏特性研究 [J]. 微生物学通报, 2008, 35 (8): 1 186-1 191.
- [5] 曹海鹏, 杨先乐, 高鹏, 等. 鲟细菌性败血症综合征致病菌的初步研究 [J]. 淡水渔业, 2007, 37 (2): 53-56.
- [6] Roy P E, Yanong , Ruth. Francis-Floyd. Streptococcal infections of fish [J]. Circular, 2006, 57: 1-6.
- [7] Holt J G, Krige N R, Senath P H A, et al. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (ninth edition) [M]. London: Williams & Wilkins Press, 1994: 527-558.
- [8] 东秀英, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 259-266.
- [9] 陆承平. 兽医微生物: 第4版 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2007: 87-96.
- [10] Messick J B, Berent L M, Cooper S K. Development and evaluation of a PCR-based assay for detection of *Haemobartonella felis* in cat and differentiation of *H. felis* from related bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis [J]. J Clin Microbiol, 1998, 36 (2): 462-466.
- [11] Reed L G, Müench H. A simple method of estimating fifty percent end points [J]. Am J Hyg, 1938, 27: 493-497.
- [12] 中华人民共和国. WS/T 125-1999 中华人民共和国卫生行业标准, 纸片法抗菌药物敏感试验标准 [S]. 1999-12-09 发布, 2000-05-01 实施.
- [13] Nomoto R, Munasinghe L I, Jin D H, et al. Lancefield group C *Streptococcus dysgalactiae* infection responsible for fish mortalities in Japan [J]. J Fish Dis, 2004, 27 (12): 679-686.
- [14] 夏春. 水生动物疾病学 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2004: 154-156.
- [15] Richard Facklam. What happened to the Streptococci: Overview of taxonomic and nomenclature changes [J]. Clin Microbiol Rev, 2002, 15 (4): 613-630.
- [16] Eldar A, Ghitfano C. *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases [J]. Dis Aquat Org, 1999, 36 (3): 227-231.
- [17] Nguyen H T, Kanai K. Selective agars for the isolation of *Streptococcus iniae* from the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, and its cultural environment [J]. J Appl Microbiol, 1999, 86: 769-776.
- [18] Shoemaker C A, Klesius P H, Evans J J, et al. Prevalence of *Streptococcus iniae* in tilapia, hybrid striped bass, and channel catfish on commercial fish farms in the united states [J]. AJVR, 2001, 62: 174-177.
- [19] Mitchell R W, Einstein M D, Margare T L, et al. Invasive infections due to a fish pathogen, *Streptococcus iniae* [J]. N Engl J Med, 2004, 337 (9): 589-594.
- [20] 柴家前, 丁巧玲, 王振龙. 罗非鱼链球菌的分离鉴定 [J]. 中国预防兽医学报, 2002, 24 (1): 18-20.
- [21] 甘西, 陈明, 余晓丽, 等. 罗非鱼海豚链球菌 16S rRNA 基因的序列测定和系统进化分析 [J]. 水产学报, 2007, 31 (5): 618-623.
- [22] 周素明, 李安兴, 马跃, 等. 养殖鱼类链球菌病原的分离鉴定及其 16S rDNA 分析 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2007, 46 (2): 68-71.
- [23] Glibert P M, Landsberg J H, Evans J J, et al. A fish kill of massive proportion in Kuwait Bay, Arabian Gulf, 2001: the roles of bacterial disease, harmful algae, and eutrophication [J]. Harmful Algae, 2002, 1: 215-231.
- [24] Evans J J, Klesius P H, Gilbert P M, et al. Characterization of beta-haemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait [J]. J Fish Dis, 2002, 25: 505-513.
- [25] Evans J J, Pasnik D J, Klesius P H, et al. Identification and epidemiology of *Streptococcus iniae* and *S agalactiae* in tilapia [C]. Proceedings of the International Symposium of Tilapia Aquaculture ISTA7. Veracruz, Mexico, September 2006: 25-42.
- [26] 张新艳, 樊海平, 钟全福, 等. 罗非鱼无乳链球菌的分离、鉴定及致病性研究 [J]. 水产学报, 2008, 32 (5): 772-779.
- [27] Nomoto R, Unose N, Shimahara Y, et al. Characterization of Lancefield group C *Streptococcus dysgalactiae* isolated from farmed fish [J]. J Fish Dis, 2006 29 (11): 673-682.
- [28] Vieira V V, Teixeira L M, Zahner V, et al. Genetic relationships among the different phenotypes of *Streptococcus dysgalactiae* strains [J]. Intern J System Bacteriol, 1998, 48: 1 231-1 243.
- [29] Kusuda R, Kawai K. Characteristics of *Streptococcus* sp pathogenic to yellowtail [J]. Fish Pathol, 1982, 17: 11-16.
- [30] Kitao T, Aoki T, Iwata K. Epidemiological study on streptococcosis of cultured yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) -- I. Distribution of *Streptococcus* sp. in seawater and muds around yellowtail farms [J]. Bull Jpne Soc Sci Fish, 1979, 45: 567-572.
- [31] Rasheed V, Plumb J A. Pathogenicity of a non-hemolytic Group B *Streptococcus* sp in gulf killifish, *Fundulus grandis* Baid and Girard [J]. Aquaculture, 1984, 37: 97-105.
- [32] Blanchard P C. 停乳链球菌引起的奶山羊多关节炎 [J]. 国外兽医学—畜禽传染病. 1995, 15 (4): 16-17.
- [33] 李宏胜, 郁杰, 罗金印, 等. 我国部分地区个体奶牛场乳房炎细菌学调查 [J]. 中兽医医药杂志, 2002, 21 (6): 14-17.
- [34] 吴芦英, 包小红. 停乳链球菌引起剖腹产后感染 1 例 [J]. 江西医学实验科学, 2007, 25 (4): 294.



## Isolation, Identification and pathogenicity of *Streptococcus dysgalactiae* from Siberian Sturgeon, *Acipenser baerii*

PAN Hou-jun<sup>1</sup>, LIU Xiao-yong<sup>2</sup>, CHANG Ou-qin<sup>1</sup>, WANG Qing<sup>1</sup>, SUN Hui-wu<sup>2</sup>, LIU Rui-ming<sup>1</sup>, FU Xiao-zhe<sup>1</sup>, LIU Yu-guo<sup>1</sup>, WU Shu-qin<sup>1</sup>

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China; 2. Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China )

**Abstract:** Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* is one of the major cultured sturgeons in China in recent years. In this study, ultra-thin section and transmission electron microscope observation, bacteria isolation and identification, artificial infection tests were used for analysis the cause of the severe disease. Bacterial cocci were found in kidney, spleen, liver and heart tissue sections under electron microscope. And bacteria were isolated from the four tissues using 5% sheep blood agar and BHI agar. Two isolates, one named AeBF070904 isolated from the liver of sturgeon cultured in flowing water pond in Beijing and the other named AbHT070912 isolated from the heart of sturgeon cultured in cage of reservoir in Hebei Province were obtained. The biochemical and physiological characteristics of the two isolates were learned by using conventional method, API System (20 STREP) and ATP Expression System (ID32 STREP). The tests showed that the isolates were Gram-positive cocci arranging in chains and  $\alpha$ -haemolytic on 5% sheep blood agar. They grew at 20 °C, 28 °C and 37 °C, but not at 10 °C and 45 °C. They grew in 1% NaCl, 2% NaCl and 3% NaCl, but not in 6.5% NaCl. CAMP test and Voges-Proskauer test were negative. They produced  $\beta$ -glucuronidase, leucine arylamidase and alanine-phenylalanine-proline arylamidase but not urease, arginine dihydrolysis, hippurate hydrolysis,  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -galactosidase, pyroglutamic acid arylamidase, glycyl-tryptophane arylamidase and acetyl- $\beta$ -glucosaminidase. They utilized trehalose, ribose, amygdaline, sucrose, pullulan and Maltose. They didn't utilize 12 kinds of tested sugar such as lactose, salicin, raffinose. Both the isolates were identified by conventional method, API System (20 STREP) and ATP Expression System (ID32 STREP) as *Streptococcus dysgalactiae*, 59.1% *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* and 97.9% *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, respectively. The 16S rRNA gene sequence of the two isolates were amplified and compared with those of other *Streptococcus* retrieved from GenBank. The 16S rRNA gene sequence analysis showed that the two isolates were 100% identity, both most homology with that of *S. dysgalactiae* in GenBank. The phylogenetic tree of *Streptococcus* showed that the isolates were clustered together with *S. dysgalactiae*. 16S rRNA gene sequence analysis further proved that the isolates belonged to *S. dysgalactiae*. The virulent tests were carried out by using the pure culture of the bacteria artificially infected *Acipenser baerii*, Hybrid sturgeon (*Acipenser baerii* ♀ × *Acipenser schrencki* ♂) and aquatic laboratory model animal, *Xiphophorus helleri*. The morphological and biochemical characteristics of the re-isolated bacteria from the artificially infected diseased fish were the same as those of the original infected bacteria. Both AeBF070904 and AbHT070912 were pathogenic to the three species of experimental fish. The virulence of the bacteria cultured at 37 °C was stronger than that of the bacteria cultured at 28 °C. The test of sensitivity of two strains to 18 kinds of chemotherapeutant showed that both strains were sensitive to penicillin, ampicillin, amoxicillin, piperacillin, norfloxacin, enrofloxacin, levofloxacin and mid-sensitive to erythromycin but resistant to cefazolin and gentamicin. There were some differences in sensitivity to other 8 kinds of medicaments between two isolates. For example, the susceptibility to kanamycin and amikacin, strain AeBF070904 was sensitive but AbHT070912 was resistant. While to spectinomycine, strain AeBF070904 was resistant but AbHT070912 was sensitive. It showed that there could be some differences in chemotherapeutant sensitivity among strains of bacteria belonging to the same species from different place. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16 (6): 891-904]

**Key words:** *Acipenser baerii*; *Streptococcus dysgalactiae*; pathogenicity; bacterial identification; 16S rRNA gene sequence; chemotherapeutant sensitivity