

文章编号: 1004 - 7271 (2008) 01 - 0040 - 07

罗非鱼海豚链球菌 PCR 检测方法的建立

甘西¹, 陈明¹, 余晓丽¹, 李莉萍¹, 陈汉忠²,
徐增辉², 雷爱莹¹, 梁万文¹, 黄维义²

(1. 广西水产研究所, 广西南宁 530021;

2. 广西大学动物科学技术学院, 广西南宁 530005)

摘要:为建立准确快速的海豚链球菌鉴定方法,设计合成了海豚链球菌种特异性引物 CM1/CM2,进行了其特异基因片段的 PCR 扩增、反应条件的优化及方法的特异性和敏感性试验;同时还进行了不同检测材料的比较及 9 份临床样品检测。结果表明,引物 CM1/CM2 只能从海豚链球菌中扩增到特异性基因片段,供试的其它 9 种水产常见病原菌 PCR 扩增均呈阴性;能够检测的最低细菌数在 20 ~ 30 个细菌;方法可直接从病鱼的脑、肝脏、肾脏及脾脏组织检测到该菌;另外,临床菌株检测结果与基于菌株 16S rRNA 基因序列系统进化分析结果一致。该方法弥补了传统细菌鉴定很难将该菌鉴定到种的缺点,并显著缩短了检测时间及降低了检测成本,具有较好的应用前景。

关键词:海豚链球菌; PCR; 罗非鱼; 诊断

中图分类号: S 917 文献标识码: A

Development of a PCR assay for *Streptococcus iniae* in tilapia

GAN Xi¹, CHEN Ming¹, YU Xiao-li¹, LI Li-ping¹, CHEN Han-zhong²,
XU Zeng-hui², LEI Ai-ying¹, LIANG Wan-wen¹, HUANG Wei-yi²

(1. Guangxi Institute of Fisheries, Nanning 530021, China;

2. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: In recent years, *Streptococcus iniae* infected farmed tilapia causes economic losses in our country and the world. To set up a method detecting *S. iniae* in tilapia, this paper designed primers CM1/CM2 based on the sequences of *S. iniae*. At the same time, the tests which amplified the specific DNA fragment, optimized the PCR reaction condition, sensitiveness and special were detected. The different detected material was compared and 9 clinical samples were detected at one time. The result indicated that the CM1/CM2 primers set only amplified a specific DNA fragment from *S. iniae* but not from 9 strains common pathology bacteria of fisheries. It can detect bacterial cells in 20 - 30, and the PCR reaction also can directly detect the *S. iniae* from brain, liver, kidney, spleen of infected tilapia. On the other hand, the detection results of clinical strains were consistent with the Phylogenist Analysis based on 16S rRNA gene sequences. The method makes up for the disadvantage of traditional method that can not detect the species between the bacteria and reduce

收稿日期: 2007-04-10

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划基金项目(0639036)

作者简介: 甘西(1956 -), 男, 广西贵港人, 高级工程师, 主要从事水生生物病害方面的研究。Tel: 0771 - 5317682, E-mail:

Ganxicn@126.com

通讯作者: 梁万文, Tel: 0771 - 5300191, E-mail: nnlww@126.com

the detected time and the cost. So, the method detecting *S. iniae* will have a good future for application.

Key words: *Streptococcus iniae*; PCR; tilapia; detection

罗非鱼为全球主要经济鱼类之一,具有食性杂、生长快、抗病力与抗逆性强、肉质好、繁殖力强、适应环境广、易养殖、群体产量高等一系列优点。现已成为南方各省出口型养殖规模最大的鱼类,产量占世界 50%。然而近年来,由于高密度饲养,种群退化,加上养殖水质、环境及气候恶化,各类病害时常大面积暴发,已严重影响到罗非鱼产业的健康发展^[1-2]。根据国内外报道和本实验室研究发现,链球菌病是罗非鱼养殖病害中最常见的疾病,每年由链球菌引起的世界水产产业的经济损失高达 100 亿美元^[3]。病原分类研究表明,海豚链球菌是其中最主要的病原菌,其引起的发病率在 30%~50% 之间,而死亡率几乎为 100%^[4]。

目前,国内检测海豚链球菌仍然采用传统的形态学、染色和生化试验进行鉴定,花费时间长,而且灵敏度和特异性都难以满足快速检测和生产上的需要。国际水生动物疾病诊断参考实验室认为^[5],同已有的细菌生化鉴定和免疫学检测方法相比,PCR 技术能够解决大多数有关敏感性和特异性的问题,其在水产疾病诊断领域具有广阔的应用前景。本研究采用 PCR 方法对罗非鱼海豚链球菌进行快速检测,旨在为实际生产中罗非鱼链球菌病的治疗和控制提供诊断依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌 株

罗非鱼海豚链球菌株和鲷爱德华氏菌株由广西水产研究所鱼病研究室分离鉴定保存,其他菌株均从中国科学院水生生物研究所购买。所有菌株信息如表 1。

表 1 实验菌株信息

Tab. 1 The information of experiment bacterial strains

菌株编号	菌种名称(所引起的病名)	培养基	最适温度(℃)
<i>E. i-CGX</i>	鲷爱德华氏菌(肠型败血症) <i>Edwardsiella ictaluri</i>	BHIA	25~28
W81-11	I 型荧光假单胞菌 <i>Pseudomonas fluorescens</i> biotype I	BHIA	25~28
ST78-3-3	点状产气单胞菌点状亚种(打印病) <i>Aeromonas punctata</i> sub. <i>punctata</i>	BHIA	25~28
E-3-11	鳃弧菌(鳃弧菌病) <i>Vibrio anguillarum</i>	BHIA	25~28
CR79-1-1	温和气单胞菌(败血症) <i>Aeromonas sobria</i>	BHIA	25~28
58-20-9	肠型点状产气单胞菌(肠炎病) <i>Aeromonas punctata</i> f. <i>intertinalis</i>	BHIA	25~28
YCX-01	柱状黄杆菌(烂鳃病) <i>Flavobacterium columnare</i>	AOA	25~28
XS91-4-1	嗜水气单胞菌(暴发病) <i>Aeromonas hydrophila</i>	BHIA	25~28
WY91-24-3	河弧菌(暴发病) <i>Vibrio fluvialis</i>	BHIA	25~28
CMS001	海豚链球菌(链球菌病) <i>Streptococcus iniae</i>	TSA	25~28

注:黄杆菌培养基(AOA):胰蛋白胨 0.05%,酵母浸汁 0.05%,乙酸钠 0.02%,牛肉浸汁 0.02%,琼脂 1.0%,pH 7.2~7.4。牛脑心培养基(BHIA):牛脑浸粉 0.5%,牛心浸粉 1.0%,胰蛋白胨 1.0%,葡萄糖 0.2%,NaCl 0.5%,琼脂 2.0%(固体培养基)。pH 6.8~7.2。

1.1.2 试剂

Taq DNA 聚合酶(5U/μL)、dNTPs(25μmol/L)为宝生物工程(大连)有限公司产品,DNA 抽提试剂盒为 TIANGEN 产品,其它化学试剂为国产分析纯级。PCR 采用美国 GeneAmp PCR System 9700 核酸扩增仪。

1.1.3 引物

采用 Mata^[6] 试验方法中的一对引物,预计扩增片段为 870 bp,并由上海生工生物工程技术有限公司合成,上下游引物序列分别为:CM1:5'-AAG GGG AAA TCG CAA GTG CC-3';CM2:5'-ATA TCT GAT TGG GCC GTC TAA-3'。

1.2 方法

1.2.1 细菌 DNA 的提取

将柱状黄杆菌接种于 AOA 培养基,其余细菌均接种于 BHIA 培养基,28 ℃ 培养 48 h 后,用生理盐水稀释菌落。刮取的菌液按 TIANGEN 公司细菌基因组 DNA 提取试剂盒操作说明进行抽提,DNA 样于 -20 ℃ 保存备用。

1.2.2 PCR 反应及产物测序

反应在 25 μL 体系中进行:10 × buffer(无 Mg^{2+}) 2.5 μL, $MgCl_2$ (25 mmol/L) 1.5 μL, dNTP(各 25 mmol/L) 0.5 μL,引物各(25 μmol/L) 0.5 μL,模板 1.0 μL, Taq DNA Polymerase(5U/μL) 0.25 μL, ddH₂O 18.25 μL。循环参数:94 ℃ 预变性 4 min;94 ℃ 30 sec,55 ℃ 30 sec,72 ℃ 45 sec,35 次个循环;最后 72 ℃ 延伸 5 min,于 4 ℃ 结束反应。同时用 1.0 μL ddH₂O 替代模板设为空白对照。PCR 扩增后所有产物在 1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳,溴化乙锭染色,紫外线下观察、拍照,分析 PCR 扩增产物。用胶回收试剂盒从琼脂糖凝胶中回收纯化目的 PCR 扩增产物,宝生物工程(大连)有限公司进行 DNA 序列双向测定。

1.2.3 PCR 反应条件优化

主要从 Mg^{2+} 浓度和退火温度两方面进行调整来优化 PCR 扩增条件, Mg^{2+} 设有 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L 5 个浓度;退火温度设有 55、55.4、56.1、57.2、58.6、59.8、60.5、61 ℃ 8 个温度。按上述 PCR 体系进行扩增,取 6 μL PCR 产物于 1.0% 琼脂糖凝胶电泳、染色及图象分析。

1.2.4 PCR 反应特异性试验

阳性菌株从发病罗非鱼脑组织分离,通过形态学、生理生化特性及 16S rRNA 基因序列系统进化分析鉴定为海豚链球菌(序列在 NCBI 的登录号为 DQ985468)。选取鲷爱德华氏细菌、I 型荧光假单胞菌、点状产气单胞菌点状变种、鳃弧菌、温和气单胞菌、肠型点状产气单胞菌、柱状黄杆菌、嗜水气单胞菌、河弧菌 9 种水产常见病原菌作为对照病原。所有细菌 DNA 按上述方法抽提,按最佳 PCR 体系和反应程序进行 PCR 扩增。

1.2.5 PCR 敏感性试验

挑取单个菌落接种于 LB 液体培养基,28 ℃ 培养 24 h 后进行细菌计数,取 10 μL 菌液以 10 倍进行梯度稀释,分别取 1 μL 各稀释梯度的菌液依照得到的最佳反应条件进行 PCR 扩增,测定模板最低检出量,以能扩增出特异性片段的最高稀释度判定该 PCR 方法的敏感性。

1.2.6 检测材料选择试验

分别选取菌液 DNA、病鱼肝脏组织总 DNA、菌液、菌落 4 种为检测材料,其中菌液 DNA、病鱼肝脏组织总 DNA、菌液在进行 PCR 扩增时,PCR 反应体系不变(参照结果 2.2),但模板分别为 1 μL 的菌液 DNA、病鱼肝脏组织总 DNA、菌液;菌落在进行 PCR 时,PCR 反应体系中 ddH₂O 增加 1 μL,最后用牙签挑取单个菌落于总 PCR 体系中作为扩增模板。

1.2.7 内脏组织检测

应用所建立的 PCR 诊断方法陆续对 5 尾海豚链球菌诊断为阳性的罗非鱼脑、肝脏、肾脏、脾脏和肌肉组织分别进行细菌分离和直接特异 PCR 检测,同时设空白对照(模板用 ddH₂O 代替)。感染罗非鱼脑、肝脏、肾脏、脾脏和肌肉组织总 DNA 抽提按试剂盒说明操作。该试验旨在了解病原菌在感染罗非鱼内脏各器官的分布和检出情况。

1.2.8 临床菌株检测

应用所建立的 PCR 诊断方法分别对南宁和横县发病罗非鱼和斑点叉尾鲷分离到的 9 株链球菌进行检测,同时将诊断结果与对应分离菌株的 16S rRNA 基因序列分类分析结果及生化鉴定(委托广西出入境检验检疫局进行)结果进行比对。

表 2 临床分离菌株信息

Tab. 2 The information of clinical isolated strains

菌株编号	鉴定结果	宿主	分离部位	分离时间	来源
CMS001	<i>S. iniae</i>	罗非鱼	脑	2006-04	南宁场 1
CMS002	<i>S. agalactiae</i>	罗非鱼	肝	2006-06	南宁场 2
CMS003	<i>S. iniae</i>	罗非鱼	肝	2006-06	南宁场 2
CMS004	<i>S. iniae</i>	罗非鱼	脑	2006-07	横县场 1
CMS005	<i>S. agalactiae</i>	斑点叉尾鲷	脑	2006-08	南宁场 2
CMS006	<i>S. agalactiae</i>	斑点叉尾鲷	脑	2006-09	横县场 1
CMS007	<i>S. iniae</i>	罗非鱼	肾	2006-09	横县场 2
CMS008	<i>S. agalactiae</i>	斑点叉尾鲷	脑	2006-09	横县场 3
CMS009	<i>S. iniae</i>	罗非鱼	脑	2006-11	横县场 4

2 结果

2.1 PCR 扩增及序列测定

以分离鉴定的海豚链球菌 DNA 为模板,经 PCR 扩增和凝胶成像系统观察,发现在预期 870 bp 处出现了目的片段(图 1)。PCR 产物经纯化和 DNA 双向测序,得到一条 870 bp 的核苷酸序列(序列已发表在 NCBI 数据库,登录号为 EF126045)。序列同源性分析发现,所得核苷酸序列与引物设计模板序列(*S. iniae* lctP & lctO genes, Y07622)对应片段同源率为 100%。同时在 NCBI 数据库进行 Blast 搜索,测序所得序列仅与模板序列具有很高的相似性。以上结果表明,该 PCR 可以准确扩增出海豚链球菌基因组特异性目的片段。

2.2 PCR 反应条件的优化

当 Mg^{2+} 浓度为 2.5 mmol/L 时,退火温度设有 55、55.4、56.1、57.2、58.6、59.8、60.5、61 °C,通过电泳发现当退火温度在 56.1 °C 时,其 PCR 产物条带最亮,并且没有非特异性条带,因此选择 56 °C 作为最佳退火温度;当退火温度为 56 °C, Mg^{2+} 浓度设有 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L 5 个浓度。琼脂糖凝胶电泳发现 Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L 时,目的条带最清楚,并无非特异性条带产生。所以最终确定退火温度为 56 °C, Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L。

最终确定的 PCR 体系为:10 × PCR Buffer(无 Mg^{2+}) 2.5 μL, $MgCl_2$ (25 mmol/L) 2.0 μL, dNTP(各 25 mmol/L) 0.5 μL, Taq DNA 聚合酶(5U/μL) 0.25 μL, 模板 1.0 μL, 引物(25 μmol/L) 各 0.5 μL, 加灭菌双蒸水至 25 μL。PCR 反应程序为:94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 45 s, 35 个循环, 72 °C 延伸 5 min。

2.3 特异性试验

以海豚链球菌 DNA 和 9 种其它常见鱼类致病菌株 DNA 为模板,按上述筛选到的最佳体系和循环参数进行 PCR 扩增。电泳结果(图 2)显示,该 PCR 反应只从海豚链球菌 DNA 扩增出 870 bp 特异性基因片段,其它菌株均未扩增出相应片段,表明本试验

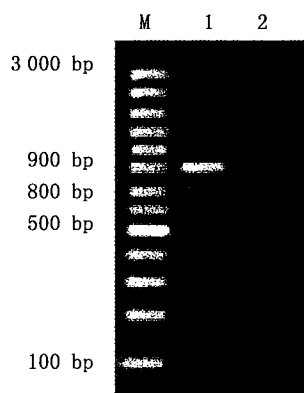


图 1 PCR 扩增结果

Fig. 1 The result of PCR amplification

M: 3000 bp DNA Marker; 1: 海豚链球菌; 2: 空白对照

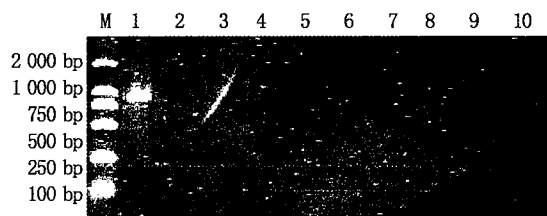


图 2 特异性试验结果

Fig. 2 The result of specific test

M: DL2000 DNA Marker; 1: 海豚链球菌; 2~10: 鲷爱德华氏菌、I 型荧光假单胞菌、点状产气单胞菌点状亚种、鳃弧菌、温和气单胞菌、肠型点状产气单胞菌、柱状黄杆菌、嗜水气单胞菌、河弧菌

所用引物具有较好的特异性。

2.4 敏感性试验

通过对细菌计数,原始菌液浓度为 2.3×10^6 个/ μL 。对各稀释梯度的菌液进行 PCR 扩增发现,当原菌液稀释到 10^{-5} 时,泳道 6 显示方法还能检测出目的条带,但当原菌液稀释到 10^{-6} 时,泳道 7 显示方法未能检测出目的条带。因此,所建立的 PCR 方法能够检测的最低细菌量为 20~30 个海豚链球菌。

2.5 检测材料选择试验

分别以菌液 DNA、病鱼肝脏组织总 DNA、菌液、菌落 4 种为 PCR 扩增模板,在确定的最佳反应体系和反应程序进行 PCR 扩增。电泳染色发现菌液 DNA、病鱼肝脏组织总 DNA、菌液、菌落 4 种材料均扩增出对应的海豚链球菌特异性目的条带,结果如图 4。

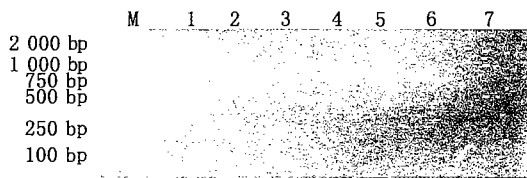


图 3 敏感性试验结果

Fig. 3 The result of sensitive test

M: DL2000 DNA Marker; 1~7: 菌液浓度分别为 2.3×10^6 个/ μL , 2.3×10^5 个/ μL , 2.3×10^4 个/ μL , 2.3×10^3 个/ μL , 2.3×10^2 个/ μL , 2.3×10 个/ μL , 2.3 个/ μL

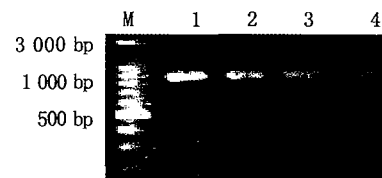


图 4 不同检测材料 PCR 结果

Fig. 4 The PCR result of different detection materials

M: DL1500 bp DNA Marker; 1~4: 菌液 DNA; 病鱼肝脏组织总 DNA; 菌液; 菌落

2.6 内脏组织检测结果

通过对 5 尾海豚链球菌分离为阳性临床病鱼的肝脏、脾脏、脑、肾脏及肌肉组织总 DNA 进行海豚链球菌特异 PCR 扩增,结果 4 份脑组织检测为阳性,1 份脑组织检测为阴性,检出率为 80%;肝脏、脾脏和肾脏组织检测均为阳性,检出率为 100%;而 5 份肌肉组织和空白对照均为阴性。图 5 为其中 1 尾内脏组织检测结果。

2.7 临床菌株检测结果

通过对临床分离的 9 株链球菌(6 株来源于罗非鱼,3 株来源于斑点叉尾鲷)进行海豚链球菌特异片段 PCR 扩增,结果如图 6。其中 5 株诊断为海豚链球菌,与其对应的 16S rRNA 基因序列分类分析结果一致(其中 CMS001 菌株 16S rRNA 基因序列已在 NCBI 公布,登录号为 DQ985468);CMS002 菌株 16S rRNA 基因序列(NCBI 登录号为 EF092913)分类分析结果显示为无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*);CMS005、CMS006 和 CMS008 菌株(均来源于斑点叉尾鲷)在 16S rRNA 基因序列测定时失败,无法进行分类分析。然而对 9 株分离菌株进行生化鉴定,均未能鉴定到种,从而未能进行比较。

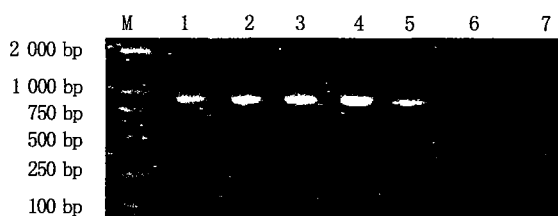


图 5 不同组织 PCR 检测结果

Fig. 5 The detection results of different tissues by PCR
M: DL2000 DNA Marker; 1: 阳性对照; 2~5: 肝脏、脾脏、脑和肾脏组织; 6: 肌肉组织; 7: 空白对照



图 6 临床菌株 PCR 检测结果

Fig. 6 The detection results of clinic isolate strains by PCR
M: DL2000 DNA Marker; 1~9: CMS001, CMS002, CMS003, CMS004, CMS005, CMS006, CMS007, CMS008, CMS009

3 小结与讨论

S. iniae 呈全球性分布,在水产养殖业中是一种严重的传染性病原菌。世界许多国家和地区的罗非鱼养殖均遭受其害,如中国,日本,以色列,澳大利亚,美国和许多中东国家。*S. iniae* 除了感染罗非鱼和杂交罗非鱼,还感染多种海淡水养殖鱼类如日本鲷、鳗及虹鳟等^[3,7-8]。此外,*S. iniae* 还可以在不同种鱼类之间传播,混合养殖中受 *S. iniae* 传染的可能性更大。此外,*S. iniae* 除感染鱼类外,还会因操作不慎随伤口感染人类^[9-12]。然而,目前我国罗非鱼链球菌病的诊断仍然采用传统方法对病原菌进行分离及鉴定,所需的时间比较长,准确性差,很难达到确诊,这种被动的局面导致了罗非鱼滥用抗生素现象严重,直接影响到了我国罗非鱼的出口创汇。因此,建立 *S. iniae* 特异、敏感、快速检测方法,不仅可以对水产养殖链球菌病进行监测和早期诊断,采取针对性的有效措施减少经济损失,提高我国罗非鱼的出口竞争力和信誉度;同时可以避免抗生素滥用,对人类健康和环境监测均具有重要意义。

据国外报道,能造成鱼类链球菌病的菌株主要为 *S. iniae*、*S. difficilis*、*S. agalactiae* 和 *S. shiloi* 四种^[13-15],感染罗非鱼的主要是 *S. iniae* 和 *S. agalactiae*^[16-18] 两种。本实验室 2006 年先后从广西各地的发病罗非鱼分离到 6 株链球菌,通过 16S rRNA 基因序列测定和系统进化分析,其中 5 株为 *S. iniae*,1 株为 *S. agalactiae*,并且通过攻毒试验发现,*S. iniae* 的致病性显著比 *S. agalactiae* 强。因此,*S. iniae* 是罗非鱼链球菌病中危害最为严重,并且也是其中最为常见的一种。而斑点叉尾鲷链球菌病的主要病原体是 *S. agalactiae*。本研究针对 *S. iniae* 基因序列设计引物建立种特异性 PCR 诊断方法,特异性强,与嗜水气单胞菌等水产养殖常见病原菌无交叉反应,并且还能够区分 *S. agalactiae*,在临床检测中可以一步鉴定到种,弥补了生化等常规细菌鉴定方法的不足。

传统细菌鉴定方法程序繁琐,时间长,费用高;同时对菌属中各菌种生理生化特性要有详细的认识;并且对鉴定工作者的要求也非常高。所以在研究相对薄弱的水产病害行业,利用该方法很难将许多水产病原菌鉴定到种。自动化细菌鉴定仪在人类病原菌和兽类病原菌鉴定上的应用已非常普遍,并且有效。其原因是当前对人类病原菌和兽类病原菌的研究有很长历史,建立了较完整的专业病原数据库。目前因缺乏较好的水产细菌病原专业数据库,自动化细菌鉴定仪很难将临床致病菌株鉴定到种。本文建立 *S. iniae* 的 PCR 检测方法,可直接从病鱼脑、肝脏、肾检测到 *S. iniae* 特异性基因片段,避免了细菌分离纯化等繁琐程序。整个检测过程快速、方便,最快可在 3 小时内完成。其临床菌株检测结果表明,该方法与通过 16S rRNA 基因序列系统进化分析结果一致,具有快速、准确、敏感和方便等特点。

该方法可从患病鱼体的脑、肝脏、肾脏及脾脏组织直接检出 *S. iniae* 基因组特异片段,其中肝脏、肾脏及脾脏的检出率高于脑组织,本实验室在进行 *S. iniae* 分离菌株攻毒试验时也发现,急性死亡罗非鱼的肝脏、肾脏及脾脏组织均能分离到 *S. iniae*,但脑组织有时不能分离 *S. iniae*,而亚急性和慢性病鱼均能从脑组织中分离到 *S. iniae*。因此,推断 *S. iniae* 是随着病程推移,最终在突破脑屏障到达脑组织大量繁殖,从而使病鱼中后期出现转圈和狂游症状。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 刘永进,方开吉,刘志圣,等. 网箱养殖罗非鱼暴发性鱼病及防治技术[J]. 淡水渔业,1995,25(1):25-26.
- [3] 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.
- [4] Eldar A, Bejerano Y, Livoff A, et al. Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish[J]. Vet Microbiol,1995,43:33-40.
- [5] 世界动物卫生组织鱼病专家委员会(国家质量监督检验检疫总局译). 水生动物疾病诊断手册[M]. 北京:中国农业出版社,2001:110-115.
- [6] Mata A I, M. Blanco M, Lucas Dom'inguez, et al. Development of a PCR assay for *Streptococcus iniae* based on the lactate oxidase(*lctO*) gene with potential diagnostic value[J]. Veterinary Microbiology,2004,101:109-116.
- [7] Colorni A, Diamant A, Eldar A, et al. *Streptococcus iniae* infections in red sea cage-cultured and wild fishes[J]. Dis Aquat Org,2002,49:165-170.

- [8] Zlotkin A, Hershko H, Eldar A. Possible transmission of *Streptococcus iniae* from wild fish to cultured marine fish [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64: 4065 - 4067.
- [9] Durborow R M. Health and safety concerns in fisheries and aquaculture [J]. Occup Med, 1999, 14(2): 373 - 406.
- [10] Lau S K P, Woo P C Y, Tse H, et al. Invasive *Streptococcus iniae* infections outside North America [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41: 1004 - 1009.
- [11] Lehane L, Rawlin G T. Topically acquired bacterial zoonoses from fish; a review [J]. Med J Aust, 2000, 173(5): 256 - 259.
- [12] Weinstein M R, Litt M, Kertesz D A, et al. Invasive infections due to a fish pathogen, *Streptococcus iniae*. *S. iniae* study group [J]. N Engl J Med, 1997, 337: 589 - 594.
- [13] Yin Z, Xu B H. Studies on the bacteriosis of fishes [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1995, 19(1): 76 - 83.
- [14] Weinstein M R, Litt M, Kertesz D A, et al. Invasive infections due to a fish pathogen, *Streptococcus iniae* [J]. N Engl J Med, 1997, 337: 589 - 594.
- [15] Eldar A, Bejerano Y, Bercovier H. *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficilis*; two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish [J]. Curr Microbiol, 1994, 28: 139 - 143.
- [16] Perera R, Johnson S, Collins M, et al. *Streptococcus iniae* associated with mortality of *Tilapia nilotica* and *T. ancea* hybrids [J]. J Aquatic Animal Health, 1994, 6: 335 - 340.
- [17] Pier G, Marlin S. *Streptococcus iniae* sp. nov, a beta-hemolytic streptococcus isolated from an Amazon fresh water dolphin, *Inia geoffrensis* [J]. Int J Syst Bacteriol, 1976, 26: 545 - 553.
- [18] Eldar A, Perl S, Frelier P E, et al. Red drum *Sciaenops ocellatus* mortalities associated with *Streptococcus iniae* infection [J]. Dis Aquat Org, 1999, 36: 121 - 127.

书籍征订:《长江口鱼类》

中国水产科学研究院东海水产研究所副所长、博士生导师、庄平研究员等 13 位专家撰写的《长江口鱼类》专著,由上海科学技术出版社于 2006 年 10 月出版。该书是我国第一部全面科学系统地论述长江口鱼类资源的著作。

本书共分六章。第一章:长江口的地理特征及其生态环境,阐述了长江的气候、水资源和水文条件,长江口黄金水道,滩涂围垦对鱼类的影响,长江干流水利工程与社会发展对河口生态环境的影响;第二章:长江口的鱼类资源,阐述了鱼类生物与栖息地多样性,鱼类饵料资源,以及长江口鱼类资源保护和资源研究简史;第三章:主要淡水鱼类,介绍了 46 种鱼类;第四章:主要洄游鱼类和河口定居性鱼类,介绍了 53 种鱼类;第五章:主要海洋鱼类,介绍了 48 种鱼类;第六章:长江口鱼类检索,包括长江口鱼类检索表和形态图检索。书末附有鱼类彩色原图。

该书为读者提供一个全面了解长江口鱼类资源及其与之相关生态环境的窗口,是一本内容丰富、全面翔实,图文并茂、通俗易懂、阅读性强的书籍。该书可供渔业资源管理部门、科研机构和大专院校师生的参考书籍,也可以作为民众的读物。

该书 80 多万字,彩色鱼类插图 12 页,定价 100 元。

数量有限,如要订购,请速与东海水产研究所《现代渔业信息》杂志编辑部联系。订书款可直接邮寄到编辑部或通过银行汇入东海水产研究所帐号,另加邮寄费 15 元。

联系人:徐吟梅

电话:021 - 55530500

Email: xuyym_8@ hotmail. com

银行帐号:中国水产科学研究院东海水产研究所 03 - 368100040018022 农业银行上海市杨浦控江路支行