

斑鳢烂鳃病原菌的研究

邓国成¹ 江小燕¹ 陈昆慈¹ 刘礼辉^{1,2}

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广州 510380; 2. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘要:从池塘患烂鳃病的斑鳢 (*Mystus guttatus*) 亲鱼病灶中分离出一株毒力较强的致病菌 Mg2, 经形态学观察、生理生化特性和 16S rRNA 基因序列分析鉴定, 其主要特征为: 菌体细长, 无鞭毛和荚膜, 革兰氏阴性, 大小 $0.5 \times (6.5-11) \mu\text{m}$, 菌落黄色, 边缘不整齐呈假树根状。氧化酶、过氧化氢酶阳性, 分解酪素和明胶, 硝酸盐还原阳性; 不分解纤维素、几丁质、酪氨酸、七叶灵和淀粉, 吡唑和葡萄糖产气阴性。对恩诺沙星、诺氟沙星、萘啶酸、红霉素、洁霉素敏感, 菌株的 16S rRNA 基因序列分析结果表明: Mg2 菌株与柱状黄杆菌聚类, 基因序列的同源性在 97.5% 以上, 综合生理生化、分子生物学两方面的分类鉴定结果, Mg2 菌株应归类鉴定为柱状黄杆菌 (*Flavobacterium Columnare*)。

关键词:斑鳢; 柱状黄杆菌; 16S rRNA 基因; 系统进化

中图分类号: S941.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2009)03-0442-07

斑鳢 (*Mystus guttatus*) 属鲶形目 (Siluriformes), 鲶科 (Bagridae), 鳢属 (*Mystus Scopoli*), 是珠江流域特有的重要经济鱼类。该鱼个体大, 肉质鲜美, 与鲈鱼 (*Lateolabrax japonicus*)、鳊鱼 (*Siniperca kneri Garman*)、嘉鱼 (*Ptychidio jordani Myers*) 齐名, 被誉为珠江四大名贵鱼类。近年来, 由于江河资源日益减少, 而我国目前池塘养殖的种苗主要依赖于江河的捕捞, 为拯救和保护斑鳢这个名贵品种, 斑鳢人工繁殖与养殖技术研究曾列入“九五”国家攻关和“十五”广东省科技兴渔项目。从江河的野生斑鳢引入池塘驯化养殖, 在亲鱼培育、人工繁殖研究取得了显著成效, 但在病害防治仍未深入研究。本文作者就发生在广东省云浮市郁南县建成特种水产养殖场 100 多亩斑鳢亲鱼发生烂鳃病而造成严重死亡的病例进行研究, 分离出病原菌 10 多株, 经感染、筛选, 从中选出致病力最强的菌株 Mg2, 开展相关的病原形态学、理化特性及分子生物学方面的研究。

1 材料与方法

1.1 材料 病鱼取自广东省云浮市郁南县建成特种水产养殖场, 发病亲鱼体重 3.5—5 kg, 体长 70—80 cm。主要症状: 病鱼鳃丝末端腐烂, 严重时鳃小瓣缺损并黏有污泥和坏死组织, 鳃盖内侧因致病菌

腐蚀而发炎、溃烂 (图 1)。回归感染用的实验鱼为健康的斑鳢鱼种, 规格 8—10 cm。

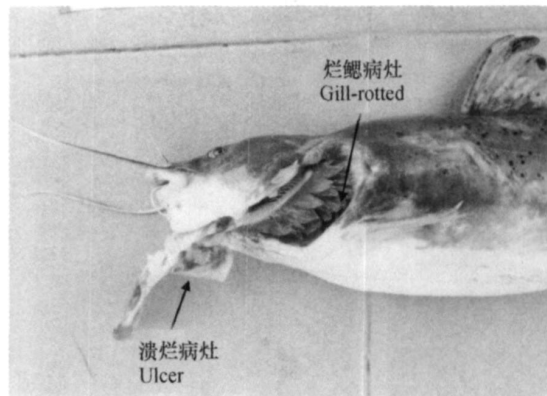


图 1 患病的斑鳢亲鱼

Fig. 1 Gill-rotted disease of brood *Mystus guttatus*

1.2 病原菌的分离培养 病原菌的分离采用两种方法进行。方法一, 直接从病灶中取样接种到 0.05% 胰蛋白胨琼脂平皿上划线分离; 方法二, 挑取病灶组织在显微镜下观察, 看有形成柱状或团聚的细菌, 直接在玻片上取样接种到 0.05% 胰蛋白胨平皿分离。

接种后的平皿置 28℃ 恒温培养 2—3 d 后, 挑取单个菌落接种于 0.5% 胰蛋白胨平皿, 进一步分离

收稿日期: 2007-07-11; 修订日期: 2008-10-03

基金项目: 广东省科技兴渔项目 (200301C01) 资助

通讯作者: 邓国成 (1955—), 男, 汉族, 广东顺德人; 副研究员; 主要从事鱼类病害研究。E-mail: deng_guocheng@126.com

纯化、供人工感染和鉴定用。

1.3 人工感染 实验用水为经曝气的自来水,实验容器为 0.5m ×1m 的水族箱。采用水中感染方法,将已分离纯化的菌株接种到 0.5%的胰蛋白胨培养基,28℃恒温培养 24h后,菌液直接加入试验池的水体中,使池水含菌浓度为 1×10^5 cfu/mL。放入健康试验鱼,每组 20尾,同时设不加菌液的空白对照组。

感染过程,水温控制在 25—28℃范围内,并以空气压缩机向水体压送空气,使水体含氧量保持在 8mg/L左右。当试验鱼被感染出现与自然发病鱼相似的症状时,从其病灶中重复分离细菌,纯化后再次作人工感染,方法同上。

1.4 病原菌的形态学观察 将纯化的菌种接种于 0.5%胰蛋白胨平皿,置 28℃恒温培养 24h后,观察菌落的形态、大小、颜色等。同时取液体培养 15h的菌株,经磷钨酸负染,用 JEM-100CX II透射电镜观察菌体形态及大小。

1.5 病原菌的生理生化测定 基本按科学院水生生物研究所鱼病研究室报道方法和中科院微生物研究所细菌分类组,一般细菌常用鉴定方法^[1,2]进行。

1.6 病原菌对温度、pH值和盐度的耐受试验 试验设定温度:4℃、10℃、15℃、25℃、30℃和 35℃,pH值梯度为 5.0、6.0、6.5、7.5、8.5和 9.0,盐度设定梯度为 0.2‰、0.4‰、0.5‰、0.6‰、0.7‰和 0.8‰。实验用的培养基为 0.5%的胰蛋白胨液体培养基,每试管培养液为 4.8mL,将培养 24h的实验用菌株用无菌水稀释成 9×10^8 cfu/mL (即麦氏比浊管第 3管的浓度)的细菌悬液,每管接种 0.2mL,28℃培养 48h后每一组设定浓度再用吸管吸取 0.5mL菌液,分别接种 0.5%固体胰蛋白胨平皿,置 28℃培养,分别观察细菌存活情况。

1.7 病原菌的繁殖特性 将纯化的致病菌株接种于 0.5%胰蛋白胨液体培养基,含菌量约为 1×10^6 cfu/mL,置摇床 (150r/min) 28℃震荡培养。每隔一定时间从培养液中取 2mL,用 ATB 比浊器 (生物 - 梅里埃 (Bio merieux)出品的 ATB Expression自动细菌鉴定仪所配浊度计 (DENS MAT))检测细菌的比浊度 (菌液浓度)。以培养时间为横坐标,菌液浓度为纵坐标,绘制细菌生长曲线。

1.8 16S rRNA基因序列分析

1.8.1 菌株总 DNA的提取 将菌株 Mg2接种在 0.5%胰蛋白胨液体培养基中培养过夜,离心收集菌体,按 UN Q-10柱式细菌基因组 DNA抽提试剂盒说

明书提取细菌总 DNA,同时将草鱼烂鳃病菌株 M165 (*Flexibacter columnaris*) (珠江水产研究所鱼病室提供)用相同的方法进行对照比较。

1.8.2 引物设计与 PCR 扩增 根据细菌 16S rRNA 基因保守序列设计一对引物,

上游引物: FvpF 5-GCCCAGAGAAATTTGGAT-3,

下游引物: FvpR 5-TGCCATTACTAGCGAATCC-3,

16S rRNA 基因 PCR 扩增条件为: 94℃预变性 3min;接着 94℃ 1min, 50℃ 1min, 72℃ 90s, 35个循环; 72℃延伸 10min, 35个循环。

1.8.3 16S rRNA 的序列分析 PCR 产物经纯化后,由英骏生物技术有限公司测序,序列通过 Blast 与 GenBank 中的序列进行比较,用 Vector NTI suite 9.0软件和 DNA star进行序列同源性分析及系统进化树的构建。

1.9 药敏试验 采用纸片法,即经纯化培养 24h的菌株,均匀涂布于 0.5%的胰蛋白胨平皿上,同时粘贴已含有药物的纸片。培养 16h后观察并记录抑菌结果,药敏试纸购自北京天坛药物生物技术开发有限公司。

2 结 果

2.1 人工感染结果

从斑鳢亲鱼患烂鳃病的病灶中分离获得 10多株菌株,经人工感染结果显示:病原菌在水中直接感染健康的斑鳢,能使其发病、显症、死亡。又从显症的发病鱼病灶中再次分离出致病菌,再次感染,同样使斑鳢出现烂鳃症状,镜检可见鳃组织有大量团聚成“柱状”摇摆的菌体,与自然发病的症状一样 (图 2、图 3)。其中病原菌 Mg2毒力较强,试验鱼死亡率达 100% (表 1)。

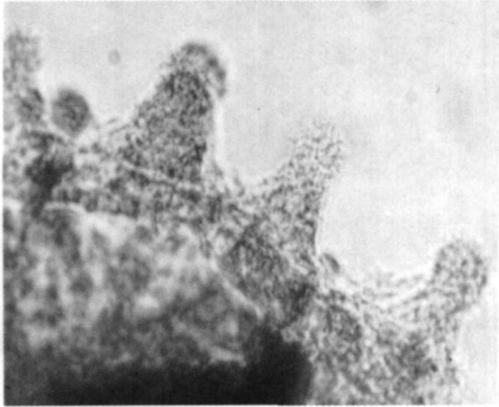


图 2 自然发病鱼的活菌 (×400)

Fig. 2 Bacteria of diseased fish in natural environment (×400)

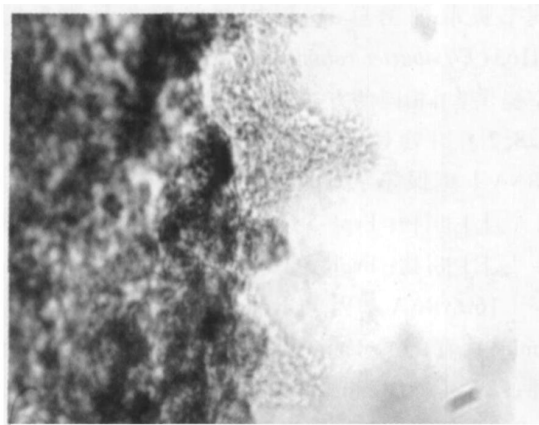


图 3 人工感染发病鱼的活菌 (×400)

Fig. 3 Bacteria of diseased fish in artificial infection (×400)

表 1 Mg2人工感染斑鳃情况

Tab. 1 The state of *Mystus guttatus* infected by Mg2

实验组别 Tested group	菌株 Strains	试验鱼数 (尾) Tested Fish (tail)	体长 Body length (cm)	水体含菌量 Concentration of bacterium in water (cfu/mL)	显症死亡数 /实验数 (尾) Infection dead fish /tested fish (tail)	感染率 Infection rate (%)	症状出现时间 Time of symptoms
实验一 Tested I	Mg2	20	8 - 10	1×10^5	20/20	100	第 2 天出现症状 Symptoms on the second day
实验二 Tested II	Mg2-1*	20	8—10	1×10^5	20/20	100	第 2 天出现症状 Symptoms on the second day
对照 Control	/	20	8—10	/	0/20	0	无 None

* 实验二的菌株为从实验一的病鱼中再次分离的菌株
* Strain of tested II was repeat isolation from tested I infected fish

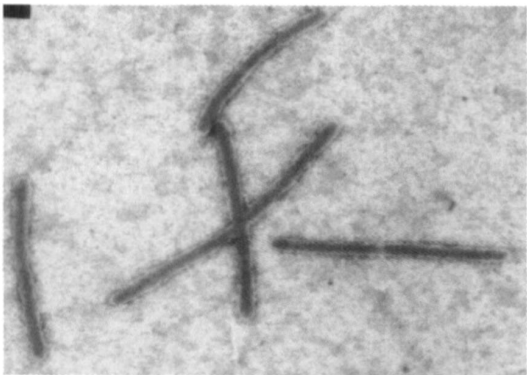


图 4 Mg2菌株的电镜照片 (×2900)

Fig. 4 Electron micrograph of Mg2 strain (×2900)

随着培养日龄增加而扩大,菌层增厚,颜色变深黄,一般在 4d后就不再生长。

2.3 病原菌对温度、pH值和盐度的耐受性

病原菌 Mg2的最适生长温度为 25—28℃, 35℃可生长, 4℃不生长。培养基中 NaCl 含量超过

2.2 病原菌的鉴定

菌体形态特征 Mg2菌体细长,有柔韧、可屈挠的特性,革兰氏染色阴性,0.5%胰蛋白胨液体培养 15h后负染电镜观察,菌体长短不一致,大小约为 $0.5 \times (6.5-11) \mu\text{m}$ 左右,无鞭毛,无荚膜,两端圆钝(图 4)。当培养 48h后,菌体生长旺盛,液体混浊,表面覆盖一层淡黄色菌膜,挑选菌膜在显微镜下观察,可见团聚的细长菌体。

菌落形态特征 Mg2菌株在 0.5%胰酪琼脂平板上生长良好,25℃培养 24h后,菌落呈淡黄色,平铺在琼脂表面上呈扩散型,中央较厚,边缘不整齐,假树根状。通常菌落大小不一,在解剖镜下观察,单个菌落的轮廓像一朵菊花(图 5)。以后菌落的大小

0.6%不生长。pH范围 6.5—7.5生长良好,pH 8.5以上和 pH6.0以下则不生长。

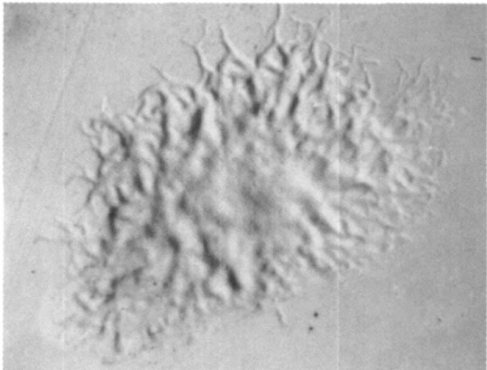


图 5 Mg2菌落形态 (×80)

Fig. 5 Single colony morphology of Mg2 (×80)

2.4 病原菌生理生化特性

病原菌不分解几丁质、纤维素、酪氨酸和淀粉,分解酪素和明胶,过氧化氢酶和氧化酶阳性(表 2),

为方便比较,同时列出 M165和文献中记载的模式菌株柱状黄杆菌 (*Flavobacterium columnare*)^[3,4]的生理生化特性与 Mg2进行比较。

表 2 供试菌株的生理生化测定结果

Tab. 2 Result of Physiological and Biochemical features of strain

鉴定项目 Identical items	菌株 Strain		模式菌株 Model strain 柱状黄杆菌 <i>Flavobacterium columnare</i>
	Mg2	M165	
氧化酶 Oxidase	+	+	+
过氧化氢酶 Catalase	+	+	+
分解酪素 Casein	+	+	+
明胶水解 Gelatin hydrolysis	+	+	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	-
硫化氢产生 H ₂ S production	-	±	+
分解纤维素 Cellulose	-	-	-
分解几丁质 Chitin	-	-	-
分解酪氨酸 Tyrosine clearing	-	-	-
分解七叶灵 Aesculin	-	-	-
淀粉水解 Starch soluble	-	-	-
利用柠檬酸盐 Citrate	-	-	-
吲哚产生 Indole production	-	-	-
葡萄糖产气 Glucose, gas	-	-	-
0.6% NaCl	-	-	-

注：“+”为阳性，“-”为阴性，“±”为不清晰的阳性或阴性
Note: “+” positive,“-”negative,“±”characteristic is not clearly positive or negative

2.5 病原菌的繁殖特性

从 Mg2菌株的生长曲线结果分析,病原菌在培养 1—7h处于迟缓期,此期中细菌体积增大,代谢活跃,但是分裂迟缓,繁殖极少。病原菌在培养 8—32h为对数生长期,此期细菌生长迅速,以恒定速度进行分裂繁殖,菌数以几何级数增长,在生长曲线图上活菌数的对数呈直线上升,达到顶峰状态。病原菌在培养 32—48h为稳定期,此期总菌数虽仍有增加,但细菌的繁殖数与死亡数大致平衡。48h后开始进入衰退期,此期细菌繁殖减慢,死亡数增多,死菌数超过活菌数(图 6)。

2.6 细菌 16S rRNA基因的分离与测序

分别从 Mg2、M165 两株培养细菌中提取总 DNA(图 7),分别以此总 DNA为模板, FvpF、FvpR 为引物, PCR扩增各获得约 1040bp的条带(图 8)。

2.7 16S rRNA基因序列分析

Blast分析表明 Mg2和 *Flavobacterium columnare* strain Ga-6-93, *Flavobacterium columnare* strain, *Flavobacterium columnare* strain LV339-01的同源性最高,分别到了 99.6%、99.8%、99.7%,Mg2和 M165的同源性为 97.5%(表 3)。所测序列与 Genbank中其他柱状黄杆菌的 16S rRNA序列用 VectorNTI9.0

构建的系统进化树显示(图 9)Mg2与 *Flavobacterium columnare* strain Ga-6-93等黄杆菌聚类,基本确认为柱状黄杆菌。

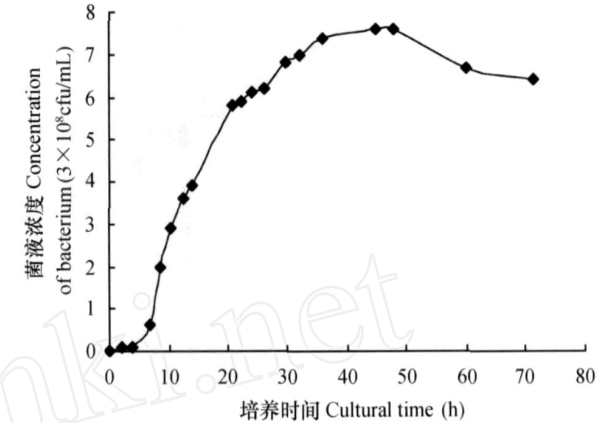


图 6 Mg2 菌株的生长曲线
Fig. 6 Growth curve of Mg2 strain

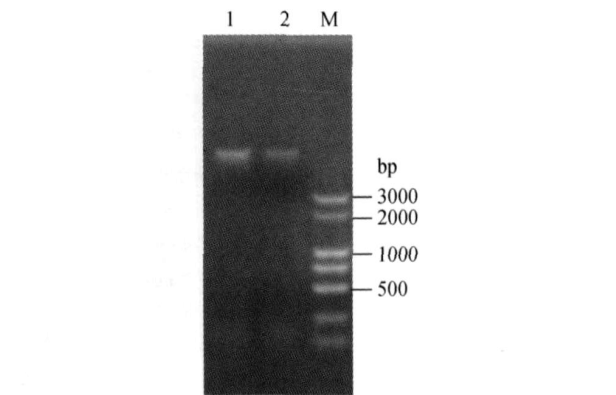


图 7 基因组总 DNA
Fig. 7 Genomic DNA
1,2 分别为 Mg2 和 M165 的基因组 DNA;M 为 DNA 标准
1,2:DNA gene of strains Mg2 and M165, respectively;M:DNA marker

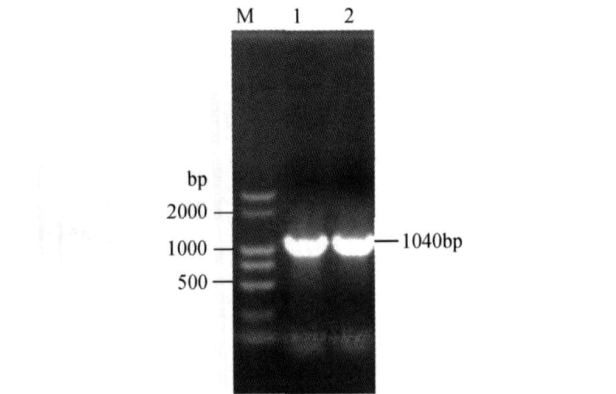


图 8 16S rRNA 基因的 PCR 扩增产物
Fig. 8 PCR amplified products of 16S rRNA genes
M 为 DNA 标准;1,2 分别为 Mg2 和 M165 的 PCR 扩增产物
M:DNA marker;1,2:16S rRNA gene PCR products of strains Mg2 and M165, respectively

表 3 所测菌株与 GenBank 中 7 种黄杆菌 16S rRNA 基因序列的同源性
Tab. 3 Similarities of the 16S rRNA of Mg2 and other Flavobacteriaceae

PercentIdentity									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1		95.7	95.5	95.7	84.3	84.4	84.3	84.2	84.2
2	16.1		98.8	98.6	85.3	85.3	85.3	84.8	85.0
3	77.7	110.6		99.0	85.3	85.3	85.4	84.5	85.0
4	74.9	77.8	124.8		85.2	85.1	85.2	84.5	85.1
5	18.4	26.7	88.0	89.3		99.8	99.9	97.7	99.6
6	18.2	26.9	88.5	88.8	0.1		99.9	97.9	99.8
7	18.4	26.8	88.2	88.5	0.0	0.1		97.8	99.7
8	19.5	26.8	89.9	91.2	2.5	2.4	2.5		97.5
9	18.2	26.9	89.1	89.5	0.3	0.2	0.3	2.6	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Divergence

Flavobacteriaceae Riemerella 16s

Flavobacteriaceae bacterium WH032

Flavobacteriaceae bacterium WR053 16s

Flavobacteriaceae bacterium WR055 16s

Flavobacterium columnare gene for 16SrRNA

Flavobacterium columnare strain Ga-6-93

Flavobacterium columnare strain LV339-01

ml165f

mg2

ψ

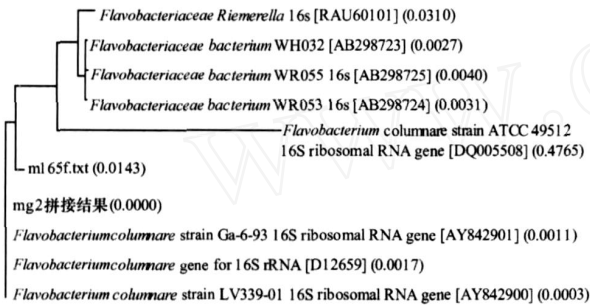


图 9 以 16S rRNA 基因构建的黄杆菌系统进化树

Fig. 9 Phylogenetic tree of *Flavobacterium* based on 16S rRNA genes
[]内代表在 GenBank 中序列存取号
[] represents accession number in GenBank

2.8 药敏试验

试验结果表明:病原菌 Mg2 对恩诺沙星、诺氟沙星、萘啶酸、罗美沙星和红霉素、洁霉素等 17 种药物高度敏感,对苯唑青霉素产生抗药(表 4)。

3 讨 论

鱼类烂鳃病的研究国外早年已有报道^[5-8],国内王德铭 1958 年也报道草、青鱼烂鳃病^[9], 1975 年湖北省水生生物研究所鱼病研究室,从草鱼烂鳃病病灶中分离出致病菌 G4,定名为鱼害粘球菌新种(*Myxococcus piscicola* Lu, Nie & ko, Sp. nov)^[2], 1987 年

表 4 Mg2 药敏试验

Tab. 4 Sensitivity of Mg2 to antibacterial agents

抗菌药物 Antibacterial agents	含量 (μg/片) Content (μg/disc)	抑菌圈 Diameter of inhibitory zone (mm)	抗菌药物 Antibacterial agents	含量 (μg/片) Content (μg/disc)	抑菌圈 Diameter of inhibitory zone (mm)
头孢噻肟 Cefotaxime	30	20	恩诺沙星 Baytril	10	25
头孢氧哌唑 Cefoperazone	15	21	诺氟沙星 Norfloxacin	10	24
头孢氨苄 Cephalixin	30	16	萘啶酸 Nalidixic acid	30	28
头孢唑啉 Cephazolin	30	32	吡哌酸 Acidum pipemidicum	30	23
头孢拉定 Cephadrine	30	14	罗美沙星 Lomefloxacin	10	26
哌拉西林 Piperacillin	100	24	氧氟沙星 Ofloxacin	5	24
新诺明 Sulfamethoxazole	300	14	利福平 Rifampicin	5	24
复方新诺明 Sulfamethoxazole timethop rim	25	25	万古霉素 Vancomycin	30	12
新霉素 Neomycin	30	18	麦迪霉素 Midecamycin	15	22
庆大霉素 Gentamicin	10	20	青霉素 Benzyl penicillinum	10	22
红霉素 Erythromycin	15	28	链霉素 Streptomycini	10	16
卡那霉素 Kanamycin	30	18	苯唑青霉素 Oxacillin	1	8
洁霉素 Lincomycinum	2	40	羧苄青霉素 Carbenicillin	100	20
壮观霉素 Spectinomycin	100	26	妥布霉素 Tobramycin	10	14
四环素 Tetracycline	30	22	强力霉素 Doxycycline	30	20

珠江水产研究所何君慈等又从草鱼烂鳃病病灶中分离出致病菌 M165,通过与鱼害粒球粘菌的形态特

征、生长条件和生理、生化特性以及测定 DNA 中碱基比 (G-C%) 比较,分别为 35.3% 和 34.1%,认为

两种菌相似,根据伯杰氏 (Berge's) 细菌鉴定手册 (第 8 版) 建议草鱼烂鳃病原采用柱状屈挠杆菌 (*Flexibacter columnaris* (Davis) Leadbitter) 学名^[10]。1989 年伯杰氏 (Berge's) 细菌鉴定手册 (第 9 版) 又修改为柱状噬纤维菌 (*Cytophaga columnaris*)^[3], 而 2004 年伯杰氏 (Berge's) 系统细菌学手册 (第 2 版) 又修改为柱状黄杆菌 (*Flavobacterium columnare*)^[4]。本次从斑鳢烂鳃病病灶中分离的病原菌, 与文献中记载的柱状黄杆菌 (*Flavobacterium columnare*)^[3,4] 以及珠江水产研究所何君慈等分离的柱状黄杆菌 M165 在菌落形态、生长条件、生理生化特性等方面均相近, 均为革兰氏阴性杆菌, 无鞭毛, 无荚膜, 菌落黄色, 假树根状, 在培养基 NaCl 含量超过 0.6% 和 4℃ 时不生长。氧化酶、过氧化氢酶阳性, 分解酪素和明胶, 不分解纤维素、几丁质、酪氨酸、七叶灵和淀粉、吡啶和葡萄糖产气阴性。对抗菌素如恩诺沙星、诺氟沙星、萘啶酸、红霉素、洁霉素等敏感。又从分子生物学方面分析, Mg2 和柱状黄杆菌 M165 的 16S rRNA 基因序列与柱状黄杆菌 *Flavobacterium columnare* strain Ga-6-93, *Flavobacterium columnare* strain, *Flavobacterium columnare* strain LV339-01 的 16S rRNA 基因序列的同源性比较, 同源性在 97.5% 以上, 根据以上的鉴定结果, 引起斑鳢亲鱼烂鳃病的病原 Mg2 应归类为柱状黄杆菌 (*Flavobacterium columnare*)。

柱状黄杆菌 (*Flavobacterium columnare*) 是一种危害淡水养殖鱼类较严重的致病菌, 可致鳗鲡科 (Anguillidae)、鲤科 (Cyprinidae)、鲴科 (Ictaluridae)、鲮科 (Bagridae)、鲈科 (Serranidae) 等科中的一些鱼类感染发病, 如鳗、草鱼、青鱼、鲤、斑点叉尾鲴、加州鲈、翘嘴鲮等^[9-14], 可表现为不同的感染类型, 但症状以烂鳃病为主, 当水温达 24—28℃ 左右发病流行, 尤其下雨水温回升阶段容易发病。该菌通常是危害鱼种和当年养殖的成鱼, 而斑鳢不仅在鱼种, 体重 3.5—5kg 的亲鱼也会发生烂鳃病, 导致严重死亡。因此, 斑鳢在养殖期和亲鱼培育期间, 应注意放养密度和科学的投喂。池塘定期使用有益的微生物制剂改善水质环境, 在天气变化时及时使用二氧化氯消毒水体预防此病的发生。

参考文献:

[1] Group of bacterial Classification in Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences Common Methods for Identifying General Bacteriophyta [M]. Beijing: Academic Press 1978 [中国科

学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社. 1978]

- [2] Laboratory of Fish Disease, Institute of Hydrobiology, Hubei Studies on the gill diseases of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) I isolation of a myxobacterial pathogen [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1975, 5 (3): 315—329 [湖北省水生生物研究所鱼病研究室. 草鱼烂鳃病的研究 I 细菌性病原的研究. 水生生物学集刊, 1975, 5 (3): 315—329]
- [3] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, et al Bergey's Manual of Determinative Bacteriology [M]. Ninth Edition. Baltimore, Williams and Wilkins 1994, 485—506
- [4] George M. Garrity, Julia A. Bell, et al Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [M], Second Edition New York Berlin Heidelberg 2004, 311—318
- [5] Davis H S A new bacterial disease of freshwater fish [J]. *Bull Bur Fish Wash*, 1922, 38: 261—280
- [6] Ordal E J, Rucker R R. Pathogenic Myxobacteria [J]. *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1944, 56 (1): 15—18
- [7] Wakabayashi H, Egusa S Characteristics of a myxobacterium, *Chondrococcus Columnaris*, isolated from diseased Loaches [J]. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1966, 32: 1015—1021
- [8] Wakabayashi H, Kira K, Egusa S Studies on columnaris disease of Pondcultured Eels—I characteristics and pathogenicity of *chondrococcus columnaris* isolated from pond cultured Eels [J]. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1970, 36 (2): 147—155
- [9] Wang D M. Studies on the pathogenic bacteria of the “Gill-rot” and “Red-skin” diseases of *Ctenopharyngodon idellus* and *Mylopharyngodon piceus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1958, 3: 9—25 [王德铭. 鲢、青鱼烂鳃及赤皮病致病细菌的研究. 水生生物学集刊, 1958, 3: 9—25]
- [10] He J C, Deng G C. A Study on pathogenic bacteria of gill rote disease of grass carp [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1987, 11 (1): 1—9 [何君慈, 邓国成. 草鱼细菌性烂鳃病原的研究. 水产学报, 1987, 11 (1): 1—9]
- [11] Ye Y T, Ao Q H. A Study on the isolation of a pathogen for gill diseases of common carp (*Cyprinus carpio*) and on its virulence [J]. *Journal of Southwest Agricultural University*, 1994, 16 (5): 497—499 [叶元土, 敖奇惠. 鲤鱼烂鳃病原菌的分离及其毒力研究. 西南农业大学学报, 1994, 16 (5): 497—499]
- [12] Chen C F, Shi W Z, Zhao G Z. Isolation and identification of pathogenic bacteria causing rote gill disease in mandarin fish (*Siniperca chuatsi basilewsky*) [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 1995, 14 (3): 263—266 [陈昌福, 史维舟, 赵桂珍, 等. 翘嘴鲮烂鳃病原菌的分离及初步鉴定. 华中农业大学学报, 1995, 14 (3): 263—266]
- [13] Deng G C, Jiang L. A study on pathogenic bacteria of gill rote and mouth rote disease of *Micropterus salmoides* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1996, 3 (4): 75—84 [邓国成, 姜兰. 加州鲈细菌性烂鳃、烂嘴病病原菌的研究. 中国水产科学, 1996, 3 (4): 75—84]
- [14] Zhang L, Meng Y, Lou X S, et al Channel catfish diseases and

their control [J]. *Fishwater Fisheries*, 2007, 37 (1): 76—79
[张林, 孟彦, 罗晓松, 等. 斑点叉尾鲴主要疾病及其防治概

述. 淡水渔业, 2007, 37 (1): 76—79]

STUDIES ON THE PATHOGENIC BACTERIA OF GILL-ROTTED DISEASE IN SPOTTED LONGBARBEL CATFISH *MYSTUS GUTTATUS*

DENG Guo-Cheng¹, JIANG Xiao-Yan¹, CHEN Kun-Ci¹ and LIU Li-Hui^{1,2}

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380;

2. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai 200090)

Abstract: Spotted longbarbel catfish *Mystus guttatus* is a precious species of fish in Pearl River. However, gill-rotted disease caused very high mortality in cultured spotted longbarbel catfish in recent years and brought huge economic losses. To protect the fish, many researches have been carried out on pathogenic bacteria of the gill-rotted disease. In this study, a virulent strain of bacteria Mg2 was isolated from the rotted gill of diseased spotted longbarbel catfish. Artificial infection test showed that Mg2 could lead to 100% mortality of fish in the experimental group with the same signs as the natural infected fish and was the causative pathogen associated with the disease. The bacterium grew very well in 0.5% peptone liquid medium at 25—28°C under pH 6.5—7.5, and then there was no growth at 4°C or more than 0.6% of NaCl content. The bacterial colony has yellow, irregular shape with undulated margin in 0.5% peptone solid medium. Electron microscope observation revealed that Mg2 was in the absence of flagella and capsule, gram negative, and exhibits rod-shaped morphology with a size of 0.5 × 6.5—11 μm. Physiological and biochemical analysis showed that it had the characteristics of the oxidase, catalase and nitrate reduction positive; hydrolyzation of casein and gelatin; non-hydrolyzation of cellulose, chitin, tyrosine, aesculin and starch; non-fermentation of indole and glucose. Drugs sensitivity tests showed that it was highly sensitive to baytril, norfloxacin, nalidixic acid, erythromycin, lincomycin. Polymerase chain reaction (PCR) of 16S rRNA gene was carried out by using the primers specific for the Mg2 strain and sequences alignments displayed that Mg2 had the highest homology in the 16S rRNA nucleotide level with *Flavobacterium columnare* strain Ga-6-93, *Flavobacterium columnare* strain and *Flavobacterium columnare* strain LV339-01 with the values 99.6%, 99.8% and 99.7%, respectively, while had 97.5% homology with M165. Phylogenetic analysis was constructed based on the 16S rRNA gene of *Flavobacterium columnare* in the GenBank database using Vector NTI 9.0 software and revealed that the strain Mg2 clustered with *Flavobacterium columnare* strain Ga-6-93. Therefore, it indicated that the Mg2 strain should belong to the members of *Flavobacterium columnare* according to the morphological features, physiological and biochemical analysis and 16S rRNA gene homology comparison of the bacteria. To avoid gill-rotted disease, moderate density and regular disinfection in fish farm is the practical method of controlling the disease.

Key words: *Mystus guttatus*; *Flavobacterium columnare*; 16S rRNA gene; Phylogeny