

红尾皇冠鱼(*Aequidens rivulatus*)病原无乳链球菌的分离、鉴定与特性分析*

姚学良 徐晓丽^① 李贺密 钟文慧 臧莉 李灏 杨超敬

(天津市水产技术推广站 天津 300221)

摘要 为查明天津地区养殖红尾皇冠鱼(*Aequidens rivulatus*)大量死亡的原因,取患病红尾皇冠鱼进行细菌分离,从病鱼肾脏中分离到优势菌株 071901,人工感染试验证实其对红尾皇冠鱼有较强的致病性;采用形态学观察、生理生化特性、16S rRNA 基因序列系统发育树分析及 *cfb* (GBS-specific gene *cfb*, CAMP factor)基因检测对菌株 071901 进行鉴定。结果显示,菌株 071901 为革兰氏阳性球菌,生化特性与链球菌属的无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)相近,基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析将菌株 071901 与无乳链球菌聚为一支,以 071901 为模板特异性扩增无乳链球菌的 *cfb* 基因,也得到了预期的 900 bp 的核酸片段,进一步证实菌株 071901 为无乳链球菌。对 30 种抗生素的药敏结果显示,菌株 071901 对红霉素、阿奇霉素等 19 种药物敏感,对多粘霉素、罗红霉素、呋喃唑酮等 11 种药物耐药。

关键词 红尾皇冠鱼;无乳链球菌;生物学特性;16S rRNA; *cfb*

中图分类号 S96 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)02-0106-07

近年来在国内休闲渔业中,观赏鱼养殖异军突起,给养殖者带来较大的收益。然而在快速发展的同时,病害问题也日益凸显,造成了巨大的经济损失,成为观赏鱼产业健康发展的瓶颈。观赏鱼疾病的发生呈现致病因子复杂化、病原多样化、季节性不明显等特征。红尾皇冠鱼(*Aequidens rivulatus*)是我国观赏鱼养殖的主要品种之一,2012 年天津地区养殖的红尾皇冠鱼暴发疾病,发病鱼死亡率高达 80%,病鱼体色发黑,体表多处出血,逐渐失去平衡,在水中翻滚、打转或静止于水底;肠道内无食,积有黄色粘液,与已报道的鱼类链球菌感染相似。

对分离自红尾皇冠鱼中的病原菌进行了理化特性、致病性、抗菌药物敏感性、16S rRNA 基因系统发育分析及 *cfb* 特异基因分子鉴定等病原学研究,旨在进一步了解红尾皇冠鱼链球菌病的流行分布状况,为红尾皇冠鱼链球菌病的防控奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

患病红尾皇冠鱼取自天津市西青区精武镇养殖园区,体质量为 80-100 g。人工感染实验于 2012 年 10 月进行,健康红尾皇冠鱼购自天津市里自沽农场,体质量为(90±3) g,暂养 7 d 后用于人工感染实验。饲养期间采用充气泵增氧,每日投饵两次,吸污 1 次,换水 1/2,实验期间水温保持在 30℃。脑心浸液培养基(Brian Heart Infusion, BHI)购自德国默克公司,细菌微量生化反应管及细菌药敏纸片等均购自杭州天和微生物试剂有限公司。无乳链球菌标准菌(CVCC 1887)购自中国兽医药品监察所。

1.2 病原菌分离

从病鱼肾脏中分离细菌,划线接种于 BHI 固体

* 天津市科技支撑计划项目(12ZCZDNC00900)资助。姚学良, E-mail: tjyaoxueliang@126.com

① 通讯作者:徐晓丽,工程师, E-mail: xiaolixu1983@gmail.com

收稿日期:2014-05-18,收修改稿日期:2014-06-20

培养基, 28℃培养 24 h, 挑取形态一致的优势菌落进一步纯化, 获得纯培养的菌株, 转接于 BHI 液体培养基中培养 24 h, 加 15%甘油于-80℃冰箱中保存。在 BHI 固体培养基中 28℃培养 24 h, 取菌体, 经涂片、固定、革兰氏染色, 显微镜下观察菌体形态。

1.3 人工感染实验

将纯培养菌接种于 BHI 液体培养基, 28℃培养过夜, 0.85% NaCl 洗涤 3 次, 菌悬液浓度调至 3×10^7 CFU/ml 作为供试菌液, 待用。感染实验分两组, 每组 6 尾红尾皇冠鱼。实验组腹腔接种供试菌液, 每尾 0.2 ml; 对照组注射等量 0.85% NaCl; 每天观察记录实验鱼感染后的发病及死亡情况, 期间每天正常饲养并换水, 取症状典型的实验鱼再次进行细菌分离鉴定。如果实验鱼出现典型症状或发病死亡, 在相同病灶处分离到的感染菌确定为病原菌。

1.4 病原菌鉴定

1.4.1 形态与菌落特征观察及理化特性检查 取纯培养菌接种于 BHI 固体培养基, 28℃培养 20 h, 制备涂片标本进行革兰氏染色观察细菌形态特征; 参照东秀珠等(2001)、杨正时等(2003)进行细菌糖(醇及苷)类代谢、硝酸盐还原、枸橼酸盐利用、赖氨酸脱羧酶等理化特性测定。

1.4.2 16S rRNA 和 *cfb* 基因序列测定与系统发育分析 取 1 ml 菌液 12000 r/min 离心 1 min, 弃上清液, 沉淀重悬于 100 μ l 无菌蒸馏水中, 煮沸 5 min 后迅速冰浴 10 min, 12000 r/min 离心 5 min, 取上清液作为 PCR 反应模板。

采用通用引物 B27F(5'-AGAGTTTGATCM(C)-TGGCTCAG-3')与 1492R(5'-ACGGY(C)TACCTTGT-TACGACTT-3')扩增细菌的 16S rRNA(Martin *et al.*, 1998)。反应条件: 95℃预变性 3 min, 94℃变性 1 min, 55℃退火 1 min、72℃延伸 2 min, 30 个循环后 72℃延伸 10 min。PCR 扩增产物送至上海生物工程技术公司进行基因序列测定。

参照卢迈新等(2010)的方法, 特异性扩增无乳链球菌 *cfb* 基因, 扩增引物 PcfbS(5'-CGACAGCATCA-CACGAAAATACA-3')和 PcfbA (5'-TGACGACCT-TTTGGACAAGTAGTAA-3')。PCR 反应条件: 94℃预变性 5 min, 94℃变性 1 min、54℃退火 1 min、72℃延伸 1 min, 30 个循环后 72℃延伸 7 min。PCR 产物送至上海生物工程技术公司进行基因序列测定。

将分离细菌的 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, 并从中选取相关的 16S rRNA 基因序列, 采用 ClustalX 软件进行多序列匹配排列(Multiple alignments), 分别以 16S rRNA 基因为遗传标记, 用 MEGA 5.1 采用邻接法(Neighbor-joining method)构建系统发育树, 通过自举分析检测置信度(1000 次重复)。

1.5 药物敏感性测定

所分离菌株的药敏实验采用常规琼脂扩散(K-B)法进行, 挑取划线培养的无乳链球菌单菌落于 BHI 液体培养基中 28℃摇床培养至稳定期, 调整菌液浓度为 1.5×10^8 CFU/ml, 均匀涂布于平板, 将选定的 30 种抗生素药敏纸片贴于平板上, 于 28℃培养 24 h, 观察并记录各抑菌圈直径(mm), 按照药敏纸片使用说明中的抑菌范围解释标准判断实验结果。

2 结果

2.1 病鱼症状及病原菌分离

病鱼体色发黑, 体表多处出血, 逐渐失去平衡, 在水中翻滚、打转或静止于水底; 肠道内无食, 积有黄色粘液。在患病红尾皇冠鱼的肾脏中存在大量革兰氏阳性球菌, 单个、成对或链状排列。在 BHI 固体培养基上培养 24 h 后, 形成细小的乳白色菌落(直径约 1 mm)。在 BHI 液体培养基上培养 24 h 后, 菌体沉于试管底部。取单菌落做纯培养, 编号 071901(图 1)。

2.2 分离菌的致病性

试验组的红尾皇冠鱼感染测试菌 5 d 后陆续死亡, 并出现明显的体色变黑、倒悬或静止于水底、肝脏轻度贫血等症状, 9 d 后试验组鱼全部死亡。对照组红尾皇冠鱼在 14 d 观察期内没有表现出任何症状, 无一死亡; 从感染死亡鱼的肾脏分离细菌, 纯培养后进行鉴定, 结果显示再次分离的菌株与原感染菌的形态特征、理化特性及 16S rRNA 基因序列均一致, 证明所分离菌株 071901 为引起本次红尾皇冠鱼死亡的病原菌。

2.3 理化性状

菌株 071901 的生理生化结果见表 1, 与无乳链球菌的生理生化特征基本一致, 初步判定菌株 071901 为无乳链球菌。

2.4 16S rRNA 基因序列与系统发育分析

对菌株 071901 进行 16S rRNA 基因序列的扩增, 测序获得 1487 bp 基因片段, 已登录 GenBank (KJ957081)。

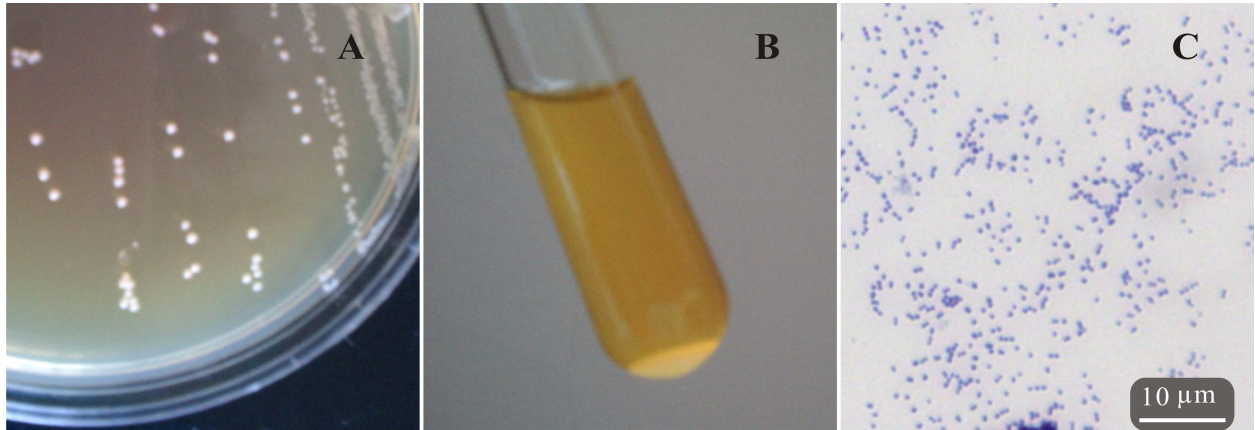


图1 菌株 071901 在 BHI 固体和液体培养基上的形态和革兰氏染色形态

Fig.1 The morphology of strain 071901 in the solid and liquid culture medium BHI and micrograph of strain 071901 shown by Gram staining

A. 菌落形态; B. 液体培养基中的形态; C. 革兰氏染色形态

A. Colony morphology; B. Liquid morphology; C. Micrograph of strain 071901 in Gram staining

表1 菌株 071901 与无乳链球菌的生理生化特征的比较

Tab.1 Comparison of physiological and chemical characteristics of strain 071901 and *S. agalactiae* standard strain

项目 Items	菌株 071901 Strain 071901	标准菌株 Standard strain	项目 Items	菌株 071901 Strain 071901	标准菌株 Standard strain
乳糖 Lactose	-	-	支链淀粉 Pullulan	-	+
棉籽糖 Raffinose	-	-	糖原 Glycogen	-	-
山梨醇 Sorbitol	-	-	阿拉伯糖 Arabinose	-	-
核糖 Ribose	+	+	半乳糖苷酶 β -Galactosidase	-	-
松三糖 Melezitose	-	-	环式糊精 Cyclodextrin	-	-
甘露醇 Mannitol	-	-	葡萄糖 Glucose	+	+
阿拉伯醇 Arabitol	-	-	果糖 Fructose	+	+
尿素酶 Urease	-	-	蕈糖 Mushroom sugar	+	+
蔗糖 Sucrose	+	+	枸橼酸盐 Citrate	-	-
蜜二糖 Melibiose	-	-	硝酸盐还原 Nitrate reduction	-	-
麦芽糖 Maltose	+	+	赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	-	-

+: 阳性; -: 阴性. +: Positive; -: Negative

经 Blast 同源比对, 菌株 071901 与无乳链球菌(*S. agalactiae*)、海豹链球菌(*S. phocae*)、豕链球菌(*S. porcinus*)及海豚链球菌(*S. iniae*)等的 16S rRNA 基因序列相似性均在 97%以上。选择哈维氏弧菌 16S rRNA 基因序列(登录号: NR_043165)作为外围菌, 将分离菌与检索出的部分球菌菌株的 16S rRNA 基因序列进行系统发育分析(图 2)。结果显示, 菌株 071901 与无乳链球菌聚为一支, 置信度为 100%; 使用引物 PcfbS 和 PcfbA 扩增分离菌株的 *cfb* 基因, 获得预期长度约 900 bp 的条带(图 3)。BLAST 分析显示, 所扩增的 *cfb* 序列与已登录的无乳链球菌相应序列(HF952104.1、CP000114.1、CP003810.1)高度同源(100%)。

2.5 菌种分类位置

结合形态观察、生理生化特征、16S rRNA 和 *cfb*

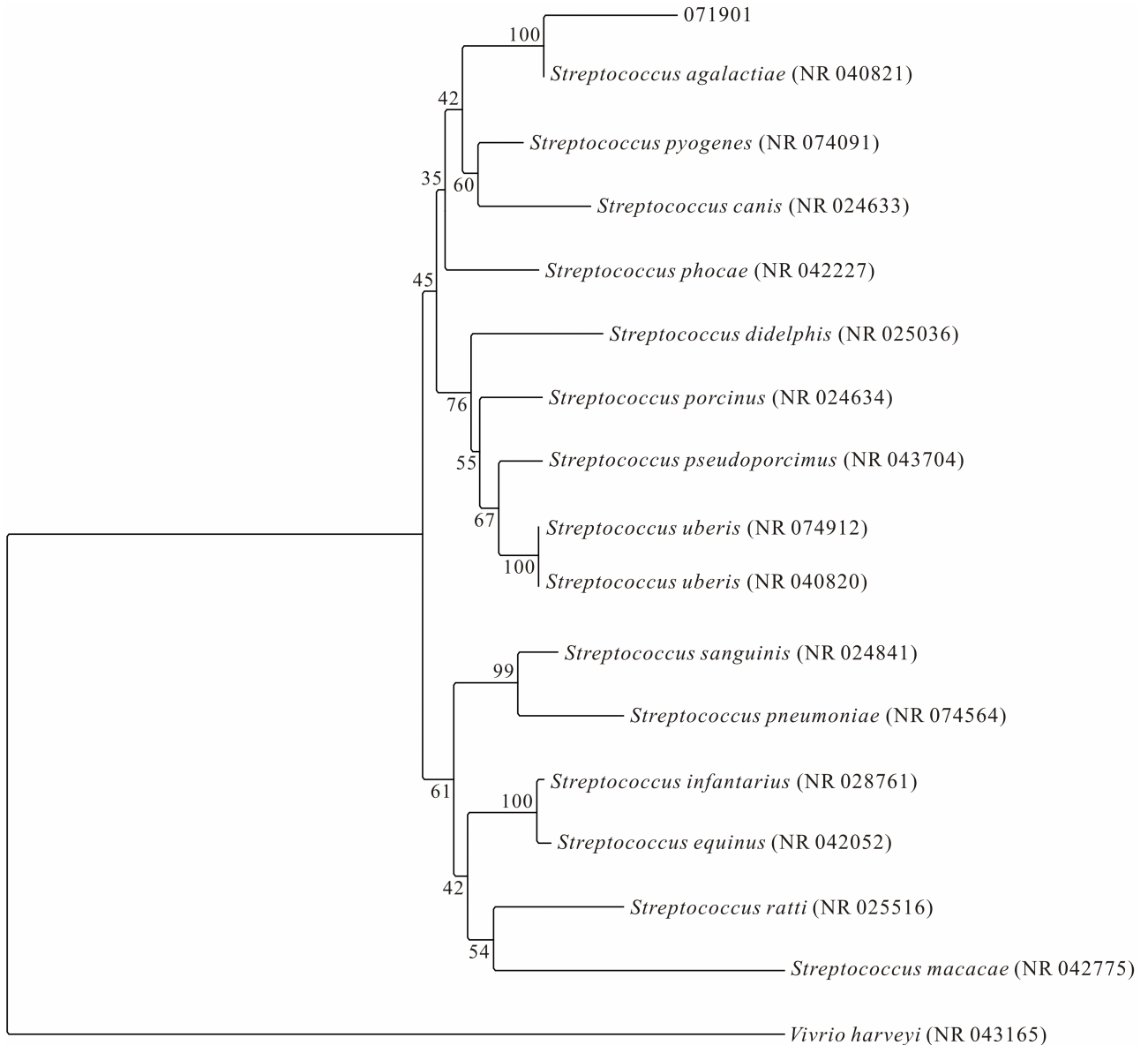
特异性基因分子鉴定结果, 判定分离菌为链球菌属(*Streptococcus*)的无乳链球菌(*S. agalactiae*)。

2.6 药物敏感性

分离菌对供试的 30 种抗菌药物中的红霉素、阿奇霉素等 19 种药物敏感; 对多粘霉素、罗红霉素、呋喃唑酮等 11 种药物耐药, 具体结果见表 2。

3 讨论

链球菌病是一种广泛危害养殖鱼类的致死性细菌病, 给水产养殖业造成巨大的经济损失。Hoshina 等(1958)首次报道鱼源致病链球菌以来, 已报道受链球菌感染的海淡水鱼类包括大菱鲆(*Scophthalmus maximus*) (Domeénech *et al.*, 1996)、牙鲆(*Paralichthys*



0.02

图 2 以 16S rRNA 基因构建的无乳链球菌系统发育树
Fig.2 Phylogenetic tree of *S. agalactiae* based on 16S rRNA genes

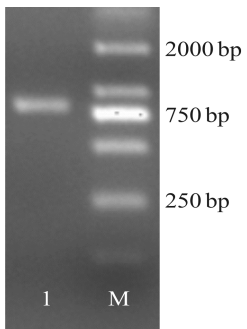


图 3 红尾皇冠鱼无乳链球菌 *cfb* 基因的 PCR 扩增结果
Fig.3 The PCR amplification of the *cfb* gene in *S. Agalactiae*
1. *cfb* 基因扩增产物; M. DL2000 Marker
1. The *cfb* gene of amplification of PCR; M. DL2000 Marker

olivaceus) (杜佳垠等, 1999)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) (郭建坤等, 1999)、鲷鱼(*Seriola quinqueradiata*) (Nomoto *et al*, 2004)等数十种。其中受无乳链球菌感染的有金头鲷(*Sparus auratus*) (Evans *et al*, 2002)、野生鲮鱼(*Liza klunzingeri*) (Evans *et al*, 2002)、罗非鱼(*Oreochromis spp.*) (李波等, 2008; 张新艳等, 2008)等。国内鱼源无乳链球菌对水产行业威胁多集中在罗非鱼产业(柴家前等, 2002; 甘西等, 2007; 张新艳等, 2008; 王蓓等, 2014), 对该产业的影响已引起有关部门的重视, 而对引起观赏鱼病害的无乳链球菌病鲜有报道。

表2 菌株 071901 对抗菌药物的敏感性
Tab.2 Sensitivity of strain 071901 to antimicrobial agents

抗菌药物 Drug	剂量 Dosage (μg/disc)	敏感性 Sensitivity	抗菌药物 Drug	剂量 Dosage (μg/disc)	敏感性 Sensitivity
红霉素 Erythromycin	15	S	多黏菌素 B Polymyxin B	300U	R
阿奇霉素 Azithromycin	15	S	罗红霉素 Roxithromycin	15	R
链霉素 Streptomycin	10	S	呋喃唑酮 Furazolidone	30	R
恩诺沙星 Enrofloxacin	5	S	左氟沙星 Levofloxacin	5	S
四环素 Tetracycline	30	S	制霉菌素 Nystatin	100	R
奥复星 Ofloxacin	5	R	苯唑青霉素 Oxacillin	1	R
丁胺卡那霉素 Amikacin	30	R	新生霉素 Novobiocin	30	R
阿洛西林 Azlocillin	75	S	麦迪霉素 Midecamycin	30	S
吉他霉素 Kitasamycin	15	R	克拉霉素 Clarithromycin	15	S
庆大霉素 Gentamicinum	10	R	庆大霉素 Gentamicinum	120	R
阿莫西林 Amoxicillin	10	S	洁霉素 Jiemycin	2	S
O/129	10	S	O/129	150	S
克林霉素 Clindamycin	2	S	甲氧苄啶 Trimethoprim	5	S
环丙沙星 Ciprofloxacin	5	S	头孢克洛 Cefaclor	30	S
头孢氨苄 Cephalexin	30	S	哌拉西林 Piperacillin	100	S

S. 敏感 Sensitive ; R. 抗性 Resistant

红尾皇冠鱼无乳链球菌病多发于5-9月, 30℃水温时发病最为严重, 发病率为20%-30%, 发病鱼死亡率高达80%, 病程持续时间长, 在高密度养殖环境中常反复发作。从感染濒死的病鱼分离出的菌株进行回归感染实验, 获得与自然感染相似的症状。因此, 可认为引发此次红尾皇冠鱼疾病的病原为细菌性病原。经理化特性鉴定分离菌, 初步判定病原菌为无乳链球菌。

16S rRNA 基因序列分析是目前最常用的细菌鉴定和系统发育分子遗传标记, 但16S rRNA 基因的水平转移及同一基因在不同进化分支中进化速度有差异, 适合属以上分类阶元的亲缘关系研究, 对属以下的分类单位分辨率不足(陈翠珍等, 2006)。本研究采用16S rRNA 基因对071901进行分子鉴定, 结果显示所克隆无乳链球菌的16S rRNA 基因序列与GenBank 上登录的无乳链球菌的16S rRNA 序列高度同源性(100%)。与停乳链球菌、海豚链球菌的同源性则相对较低(95.1%-97.6%), 16S rRNA 基因序列进行系统发育分析显示菌株071901与无乳链球菌聚为一支, 置信度为100%。

无乳链球菌也称B群链球菌, *cfb* 基因为其特有基因(GBS-specific gene *cfb*, CAMP factor-specific gene), 编码CAMP因子或溶血促进因子(Cohemolysin)的膜外蛋白, 它与金黄色葡萄球菌分泌的B溶血毒素神经磷脂酶(Sphingomyelinase)作用呈CAMP反应(Jurgens *et al*, 1987; Hensler *et al*, 2008), 即促进绵羊

红细胞的溶血及胞膜成分的溶解。CAMP因子是一种强毒力因子, 在抗吞噬作用与细菌入侵宿主细胞等方面起重要作用, 其类似因子在A、C和G群链球菌中也存在, 但它们编码的基因间同源性较低。因此, CAMP因子编码基因*cfb*已成为鉴定无乳链球菌的重要指标之一, 比16S rRNA 基因具有更强的分辨能力。本研究采用卢迈新等(2010)建立的基于*cfb* 基因的无乳链球菌检测技术, 扩增得到分离株的*cfb* 基因序列, BLAST分析显示它们与GenBank 上登录的无乳链球菌的*cfb* 序列高度同源(100%), 据此可进一步确定071901为无乳链球菌。综合生理生化和分子鉴定结果以及分离菌株回归感染实验结果, 可确定引发红尾皇冠鱼此次发病的病原菌为无乳链球菌。

链球菌病目前没有有效的治疗药物, Creeper 等(2006)报道澳洲肺鱼(*Neoceratodus forsteri*)海豚链球菌对土霉素、呋喃唑酮、红霉素和阿莫西林敏感, 其中红霉素被认为是最有效的; 卢迈新等(2010)报道罗非鱼无乳链球菌对红霉素敏感, 对阿莫西林敏感或中度敏感; 祝璟琳等(2010)研究表明, 罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)无乳链球菌对红霉素较敏感。本研究显示无乳链球菌对红霉素、阿莫西林敏感, 对呋喃唑酮耐药。上述研究结果显示不同地区或不同时间分离的病原菌药物敏感性存在差异, 这与无乳链球菌存在不同的血清型以及耐药因子的变化有关(柯剑等, 2010)。链球菌的荚膜能避开巨噬细胞的吞噬(Locke *et al*, 2007), 口服药物治疗效果不佳, 且因观赏鱼经济价

值较高,养殖户往往通过延长给药时间或增加用药量来提高疗效,导致该病原菌产生更强的耐药性。有报道显示,罗非鱼无乳链球菌对喹诺酮类药物(如诺氟沙星)的耐药性有增加的趋势(卢迈新等, 2010; 柯剑等, 2010; 谭晶晶等, 2010)。红尾皇冠鱼无乳链球菌对供试的 30 种抗菌药物中的红霉素、阿奇霉素等 19 种药物敏感; 对多粘霉素、罗红霉素、呋喃唑酮等 11 种药物耐药,表明此次分离的无乳链球菌对很多药物产生耐药性,提示科学有效地选择观赏鱼疾病防治药物,以减少药物使用的盲目性及盲目用药对环境造成的压力。为避免出现多重耐药菌株,降低红尾皇冠鱼养殖风险,应加强无乳链球菌病诊断与防治技术研究。

参 考 文 献

- 王蓓, 李桂欢, 王培, 等. 罗非鱼源无乳链球菌溶血素基因体外表达及其免疫原性. 渔业科学进展, 2014, 35(6): 60-67
- 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. 水产学报, 2007, 31(5): 618-623
- 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, 106-120
- 卢迈新, 黎炯, 叶星, 等. 广东与海南养殖罗非鱼无乳链球菌的分离、鉴定与特性分析. 微生物学通报, 2010, 37(5): 766-774
- 杜佳垠, 吴晓慧. 牙鲆链球菌病的防治. 中国水产, 1999(7): 29-30
- 李波, 陈明, 李莉萍, 等. 广西罗非鱼链球菌病原的生化鉴定及药敏试验. 中国畜牧兽医, 2008, 35(10): 93-95
- 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. 水产学报, 2008, 32(5): 772-779
- 陈翠珍, 房海, 张晓君, 等. 中华绒螯蟹病原鳗利斯顿氏菌生物学特性. 湖泊科学, 2006, 18(3): 293-298
- 杨正时, 房海. 人及动物病原细菌学. 石家庄: 河北科学技术出版社, 2003, 1550-1610
- 柯剑, 赵飞, 罗理, 等. 广东省罗非鱼主养区无乳链球菌的分离、鉴定与致病性. 广东海洋大学学报, 2010, 30(3): 22-27
- 祝璟琳, 杨弘, 邹芝英, 等. 海南养殖罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)致病链球菌的分离、鉴定及其药敏试验. 海洋与湖沼, 2010, 41(4): 590-596
- 柴家前, 丁巧玲, 王振龙, 等. 罗非鱼链球菌的分离鉴定. 中国预防兽医学报, 2002, 24(1): 18-20
- 郭建坤, 杨雪珍, 景建江, 等. 中药治疗虹鳟鱼链球菌病报告. 淡水渔业, 1999, 29(12): 27-27
- 谭晶晶, 陈昌福, 高宇, 等. 奥尼罗非鱼无乳链球菌的鉴定、致病性及药物敏感性研究. 华中农业大学学报, 2010, 29(6): 745-751
- Creeper JH, Buller NB. An outbreak of *Streptococcus iniae* in barramundi(*Lates calcarifera*) in freshwater cage culture. Aust Vet J, 2006, 84(11): 408-411
- Domeénech A, Derenaández-Garayzábal JF, Pascual C, et al. Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis*. J Fish Dis, 1996, 19: 33-38
- Evans JJ, Klesius PH, Gilbert PM, et al. Characterization of β -haemolytic Group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. J Fish Dis, 2002, 25: 505-513
- Hoshina T, Sano T, Morimoto Y. A Streptococcus pathogenic to fish. J Tokyo Univ Fisheries, 1958, 44: 57-68
- Jurgens D, Sterzik B, Fehrenbeeh FJ. Unspecific binding of group B streptococcal cocytodysin (CAMP factor) to immunoglobulins and its possible role in pathogenicity. J Exp Med, 1987, 165(3): 720-732
- Locke JB, Colvin KM, Datta AK, et al. *Streptococcus iniae* capsule impairs phagocytic clearance and contributes to virulence in fish. J Bacteriol, 2007, 189(4): 1279-1287
- Hensler ME, Quach D, Hsieh CJ, et al. CAMP factor is not essential for systemic virulence of Group B *Streptococcus*. Microb Pathog, 2008, 44(1): 84-88
- Martin FP, Colleen MC. Bias in template-to-product ratios in multi-template PCR. Appl Microbiol, 1998, 64(10): 3724-3730
- Nomoto R, Munasinghe LI, Jin DH, et al. Lance field group C *Streptococcus dysgalactiae* infection responsible for fish mortalities in Japan. J Fish Dis, 2004, 27(12): 679-686

(编辑 冯小花)

Biological Characteristics of Pathogenic *Streptococcus agalactiae* Isolated From *Aequidens rivulatus*

YAO Xueliang, XU Xiaoli^①, LI Hemi, ZHONG Wenhui, ZANG Li, LI Hao, YANG Chaojing
(Tianjin Fishery Technical Extension Station, Tianjin 300221)

Abstract The cultivation of ornamental fish has been gaining more and more popularity and commercial importance. Consequently ornamental fish diseases have also caught attentions. *Aequidens rivulatus* is one of the most important ornamental fish in commercial fisheries in Tianjin of China. In recent years mass death of *A. rivulatus* has caused heavy economic losses. In this study we aimed to identify the biological characteristics of the pathogens which caused diseases in *A. rivulatus*. A dominant bacterium 071901 was isolated from the kidney of diseased *A. rivulatus* and was confirmed to be pathogenic to *A. rivulatus* in artificial challenge test. We examined the morphological, physiological and biochemical characteristics of this bacterium, and analyzed 16S rRNA and *cfb* gene (GBS-specific gene *cfb*, CAMP factor) for further identification. The 16S rRNA gene and *cfb* gene were partially sequenced and compared with data from the GenBank database. BLAST showed that 16S rRNA gene and *cfb* gene of strain 071901 were highly similar to their counterparts registered in GenBank. Based on the morphological observation and physiological and biochemical characterization, strain 071901 was identified as *Streptococcus agalactiae*. Phylogenetic trees of *S. agalactiae* based on 16S rRNA gene indicated that strain 071901 was branched into the same cluster as *S. agalactiae* and showed the highest similarity to *S. agalactiae*. The results of molecular analysis of *cfb* gene were consistent with the previous results from the biochemical assays. We then performed antimicrobial susceptibility assay for 30 antimicrobial agents and found that strain 071901 was susceptible to 19 agents including erythromycin, azithromycin and florfenicol, and was highly resistant to 11 agents including enrofloxacin, bacitracin and furazolidone. In conclusion our results demonstrated that *S. agalactiae* was the pathogen that caused high mortality in *A. rivulatus*.

Key words *Aequidens rivulatus*; *Streptococcus agalactiae*; Biological characteristics; 16S rRNA gene; *cfb* gene

^① Corresponding author: XU Xiaoli, E-mail: xiaolixu1983@gmail.com