

牙鲆格氏乳球菌感染症及其病原

房海, 陈翠珍, 张晓君

(河北科技师范学院 动物科学系, 河北 秦皇岛 066600)

摘要:对一次养殖牙鲆(*Paralichthys olivaceus* L. Temminck et Schlegel)发生的病害进行了临床特征和病理变化等方面的检验。以5尾病(死)牙鲆做病变组织中的细菌检查及细菌分离,对分离做纯培养的10株菌(T030817-1至T030817-10)进行形态特征、理化特性等较系统的表观分类学指征鉴定;同时择代表菌株(T030817-1)进行16S rRNA基因分子鉴定,测定16S rRNA基因序列,分析相关细菌相应序列的同源性,构建了系统发生树。结果表明,10株分离菌均为乳球菌属(*Lactococcus* Schleifer et al 1986)的格氏乳球菌(*L. garvinae*)。择代表菌株(T030817-1)做对健康牙鲆的人工感染试验,表明所分离鉴定的格氏乳球菌在被检牙鲆病例中具有相应原发病原学意义及较强的致病作用。药敏试验结果显示,在供试37种抗菌药物中,对青霉素G等14种药物高度敏感,对链霉素等5种药物敏感,对苯唑青霉素等18种药物耐药。[中国水产科学, 2006, 13(3): 403-409]

关键词:牙鲆; 格氏乳球菌; 感染症

中图分类号: S941 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2006)03-0403-07

牙鲆(*Paralichthys olivaceus* Temminck et Schlegel)是中国北方沿海地区海水养殖鱼类的主导优良鱼种,近年来随着其养殖规模及养殖密度的不断扩大,病害问题日趋严重,并已成为制约其养殖发展的重大障碍。有关牙鲆细菌性病害在国内外已有记载和报道,如由鱼肠道弧菌(*Vibrio ichthyenteri*)、解藻阮酸弧菌(*V. alginolyticus*)、鳃弧菌(*V. anguillarum*)等引起的弧菌病(vibriosis)^[1-3],由迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)引起的爱德华氏菌病(edwardsielliosis)^[4-5],近海生屈挠杆菌(*Flexibacter maritimus*)引起的屈挠杆菌病(flexibacteriosis)^[6],诺卡氏菌(*Nocardia* sp.)引起的诺卡氏菌病(nocardiosis)^[7],杀鱼巴斯德氏菌(*Pasteurella piscicida*)引起的巴斯德氏菌病(pasteurellosis)^[8],链球菌(*Streptococcus* sp.)引起的链球菌病(streptococcosis)^[9],兔莫拉氏菌(*Moraxella cuniculi*)引起的莫拉氏菌病(moraxellasis)^[10]等。

2003年,对河北某海水鱼养殖场所发生的一起牙鲆病害进行了检验,表明是由格氏乳球菌(*Lactococcus garvinae*)所引起的细菌性败血症。本研究对所检病例的发病情况、临床表现及主要病理变化进行分析,并报道相应病原细菌的主要生物学性

状、16S rRNA基因序列及系统发育学等方面的研究结果,旨在对该感染症的有效检验与防治及对相应病原菌的进一步研究等提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 时间与地点

2003年8月,河北省唐海县海水养殖场。

1.2 病例检验

对发病牙鲆鱼群(3~4月龄)在进行发病情况的调查后,取濒死病鱼及刚刚病死鱼做肉眼病变的检查;再分别取其病变组织材料做抹片后,以革兰氏染色镜检细菌。

1.3 细菌分离培养与纯培养

分别取上述被检牙鲆的病变组织材料,无菌操作接种于普通营养琼脂、含7%家兔脱纤血的血液营养琼脂培养基平板,置28℃培养24~48 h检查结果;对所分离出的细菌,先检查生长菌落数量、分布及同一性,然后按菌落种类及从每尾鱼的分离菌落各择一定数量,分别移接于普通营养琼脂斜面(28℃培养24 h)做成纯培养后置4℃冰箱保存供鉴定用。

收稿日期: 2005-05-08; 修订日期: 2005-08-29.

基金项目: 河北省科技厅科技攻关项目(02220502D).

作者简介: 房海(1956-),男,教授,主要从事病原微生物学研究. Tel: 0335-2039321; Fax: 0335-2024487; E-mail: fanghaihb@163.com

1.4 细菌鉴定

1.4.1 形态与菌落特征检查 取上述纯培养菌,分别移接于普通营养琼脂斜面各2管分置28℃、37℃培养18h,制备涂片标本进行革兰氏染色做形态特征检查;各菌株分别划线接种于普通营养琼脂、血液营养琼脂(分别为含7%家兔脱纤血及含7%绵羊脱纤血的营养琼脂)、沙门氏菌志贺氏菌琼脂(SS琼脂)、疳疮病琼脂(FA)、胰酪大豆胨琼脂(TSA)、木糖赖氨酸去氧胆酸盐琼脂(XLD)、庆大霉素琼脂、硫代硫酸钠柠檬酸钠胆酸钠蔗糖琼脂(TCBS)、麦康凯琼脂、伊红美蓝琼脂、Rimmler-Shotts培养基(RS)及2216E海水培养基(2216E)等12种不同培养基平板,置28℃培养24h和48h,分别检查生长情况及菌落特征。

1.4.2 电子显微镜观察细菌形态 择上述纯培养菌的1个代表菌株,接种于半固体培养基,置28℃培养24h后,取菌悬浮于无菌蒸馏水中制备成细菌悬液作为供试菌液,取此菌液1滴于经Formvar膜包被的铜网上,静置1min左右后吸除菌液,再以0.5%磷钨酸水溶液同样加1滴于铜网上负染1min左右,吸除染液并待自然干燥后,置JEM-100CX透射电子显微镜下检查。

1.4.3 培养温度对细菌发育的影响 取上述纯培养菌,分别做涂布接种于普通营养琼脂斜面各2管,分置于37℃和28℃培养48h,检查细菌生长发育情况。

1.4.4 在普通营养肉汤中生长情况检查 取上述纯培养菌,分别接种于普通营养肉汤(管)中,置28℃培养24h,检查液体培养的生长表现。

1.4.5 理化特性检查 取上述纯培养菌,分别接种于细菌理化特性鉴定用培养基中,按常规进行氧化酶、接触酶、糖(醇及苷)类代谢、H₂S、吲哚、MR、V-P试验、硝酸盐还原、OF试验、有机酸盐利用等较系统的理化特性测定^[11]。

1.4.6 16S rRNA 基因序列测定与系统发育学分析

(1)PCR模板DNA的制备 择代表菌株,分别接种于LB肉汤中28℃培养16h,按小量细菌基因组DNA抽提试剂盒(上海华舜生物工程有限公司产,批号204-L)所述方法提取DNA作为PCR模板DNA。

(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1492~1510个碱基位置)^[12]。在20μL反应体系中含有:无菌蒸馏水14.4μL,1×PCR缓冲液2μL,1.5mmol/L MgCl₂ 1.6μL,4×dNTP混合物0.4μL,引物各0.2μL,2.5U/μL的Taq DNA聚合酶0.2μL,模板DNA 1μL。PCR反应条件为:95℃预变性3min,接94℃变性1min,55℃复性1min,72℃延伸2min,30个循环后72℃温育6min。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。

(3)16S rRNA 基因序列系统发育树构建 对供试代表菌株的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,并使用ClustalX1.8软件与从GenBank数据库中获得的序列相似性较高的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,并通过Bootstrap法(1000次重复)检验。

1.4.7 菌种的归类判定 以经上述表型性状鉴定结果,主要依据《Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed》^[13]、《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology》^[14]、《Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish》^[15]及有关资料,并结合细菌发育学分析的结果,进行分离菌的种属判定。

1.5 致病性测定

择上述分离鉴定的代表菌株,接种于普通营养肉汤中28℃培养18h调成6×10⁸ CFU/mL作为供试菌液,分别经腹腔、背鳍基部注射感染体长20cm左右的健康牙鲆各6尾,剂量为0.3mL/尾(感染接种前养殖观察5d且健康供试);同时设立用同剂量、同批无菌营养肉汤接种的对照,均隔离养殖于试验水族箱内,每天观察发病与死亡情况。以被感染鱼出现同自然病例样的病变、从病死鱼重新分离回收得到原感染菌作为供试菌株的病原性判定指标。

1.6 药物敏感性测定

取上述纯培养菌株,采用琼脂扩散纸片法(K-B)进行对常用抗菌类药物的敏感性测定,以抑菌圈

的大小(直径)作为敏感与耐药的判定指标^[16]。

2 结果

2.1 发病情况与主要病变

发病牙鲆在3~4月龄。该场共养牙鲆2万尾左右,于6月份水温升高时陆续发病、死亡且日渐严重,到送检时(8月17日)发病率达25%左右,病死率40%以上。病鱼主要表现为摄食减少、游动迟缓或不正常等,部分有腹胀;取2尾发病濒死与3尾刚刚病死牙鲆共5尾检验,有2尾在体表有少量出血点;剖检见均有不同程度的肝、脾、肾肿胀病变,4尾的肝表面有点状或小斑块状出血,3尾有不等量、不透明的腹水(其中1尾的腹水为淡血样的),表现为败血感染的特征。

2.2 肝及腹水中的细菌

以上述剖检病变后5尾牙鲆的病变肝组织(3尾的腹水)为材料,直接做抹(涂)片后经革兰氏染色镜检细菌,结果发现均有数量不等的革兰氏染色阳性、球杆状或球状、散在、成双或3~5个的不规则短链状排列、无芽孢、两端钝圆(有的一端或两端稍尖)、大小多在 $(0.5\sim 1.0)\mu\text{m}\times(0.8\sim 1.6)\mu\text{m}$ 的细菌。

2.3 细菌分离培养与纯培养情况

2.3.1 细菌分离培养 分别取上述5尾被检牙鲆的肝、肾及腹水(3尾存在腹水的)为材料,按1.2中所述做细菌分离培养,结果从每尾被检鱼的各种被检组织材料中均分离出了数量不等但均为多量、呈同种特征的纯一菌落。在普通营养琼脂上,生长为圆形光滑、边缘整齐、稍隆起、半透明、闪光的灰白色菌落,培养24h检查直径多在0.2mm左右,48h多在0.5mm左右,生长较贫瘠;在血液营养琼脂上,生长为圆形光滑、边缘整齐、稍隆起、不透明、不溶血、闪光的灰白色菌落,培养24h检查直径多在0.3mm左右,48h多在0.5mm左右,生长较贫瘠。

2.3.2 细菌纯培养 5尾鱼共做纯培养菌10株,各菌株按顺序依次编号为T030817-1至T030817-10。

2.4 纯培养菌的鉴定

2.4.1 形态特征 10株菌的形态一致并与在病变肝组织中的相同,且在37℃与28℃培养的相一致。均为革兰氏染色阳性、球杆状或球状、散在、有的成双(两尖端或两圆端相对)、有的呈3~10个的不规则短链状排列、无芽孢、两端钝圆(有的菌体一端或

两端尖),大小多在 $(0.5\sim 1.0)\mu\text{m}\times(0.7\sim 1.6)\mu\text{m}$ 的细菌;代表菌株(T030817-1)经电镜负染色标本检查,见菌体呈球杆状或球状、有的一端或两端尖、菌体表面有一薄层类似微荚膜(图1,2个相连的菌体)。



图1 T030817-1株电镜照片($\times 33\,000$)

Fig.1 Electron micrograph of T030817-1 ($\times 33\,000$)

2.4.2 菌落特征 在供试12种培养基上,供试10株菌的生长情况和菌落特征一致。在普通营养琼脂、血液琼脂上的生长情况及菌落特征均与前述相应直接从病变组织材料中分离的一致,在血液营养琼脂上使用绵羊血与使用家兔血的相同(均不溶血);在TCBS、庆大霉素琼脂、XLD、SS琼脂、伊红美蓝琼脂、麦康凯琼脂及RS培养基上,培养48h未见生长。

(1)TSA 圆形光滑、边缘整齐、稍隆起、灰白色的菌落,培养24h直径多在0.4mm左右(半透明),48h多在1.2mm左右(不透明),生长中度。

(2)FA 圆形光滑、边缘整齐、半透明、稍隆起、浅灰白色的小菌落,培养24h直径多在0.2mm左右,48h多在0.4mm左右,生长较贫瘠。

(3)2216E 培养24h检查仅见不明显、密集的小菌落,48h检查呈密集、很小的圆形小菌落,生长贫瘠。

2.4.3 在不同培养温度及普通营养肉汤中生长发育情况 上述10株纯培养菌,37℃和28℃培养均呈一致的生长状态,菌苔呈较透明态的灰白色,生长接近中度。在普通营养肉汤(管)中生长表现一致,均为轻度均匀混浊生长,管底有小圆点状菌体沉淀(摇动后呈线状上升易消散)。

2.4.4 理化性状 10株供试菌对所测项目内容的结果一致(表1)。

表1 10株菌的理化特性测定结果

Tab.1 Results of physiological and biochemical characteristics of 10 strains

项目 Item	结果 Result	项目 Item	结果 Result
37℃生长 Growth at 37℃	+	甘油 Glycerol	-
氧化酶 Oxidase	-	纤维二糖 Cellobiose	+
接触酶 Catalase	-	α-甲基-D-葡萄糖苷 α-methyl-D-glucoside	-
H ₂ S产生 H ₂ S production	-	乳糖 Lactose	+
O-F试验 O-F test	F	赤藓醇 Erythritol	-
动力 Motility	-	甘露糖 Mannose	+
明胶液化 Gelatin hydrolysis	-	松二糖 Turanose	+
葡萄糖,产酸 Glucose, acid production	+	果糖 Fructose	+
葡萄糖,产气 gas production	-	核糖 Ribose	-
山梨醇 Sorbitol	-	甲基红 MR test	+
蔗糖 Sucrose	+	V-P试验 V-P test	+
鼠李糖 L-Rhamnose	-	吲哚 Indole	-
阿拉伯糖 Arabinose	-	硝酸盐还原 Nitrate reduction	-
肌醇 Inositol	-	醋酸盐利用 Acetate utilization	-
甘露醇 Mannitol	+	枸橼酸盐利用 Citrate utilization (Simmons)	-
七叶苷利用 Esculin	+	酒石酸盐利用 Tartrate utilization	-
麦芽糖 Maltose	+	黏液酸利用 Mucate utilization	-
木糖 Xylose	+	丙二酸盐利用 Malonate utilization	-
木糖醇 Xylitol	-	尿素酶 Urease	-
苦杏仁苷 Amygdalin	+	IPA(SIM)	-
松三糖 Melezitose	-	乙酰胺酶 Acetamidase	-
山梨糖 Sorbose	-	淀粉酶 Diastase	-
侧金盏花醇 Adonitol	-	β-半乳糖苷酶 ONPG	+
蜜二糖 Melibiose	+	卵磷脂酶 Lecithinase	+
棉子糖 Raffinose	+	蛋白酶 Proteinase	+
菊糖 Inulin	-	DNA酶 Drase	-
水杨苷 Salicin	+	苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine desaminase	-
半乳糖 Galactose	+	脂酶(吐温 80) Lipase (Tween 80)	-
海藻糖 Trehalose	+	NaCl中生长 Growth at NaCl:0%	+(微弱)
阿拉伯醇 Arabitol	-	1%	+
糖精 Oextrin	+	6%	-
卫茅醇 Dulcitol	-		

注: + 示阳性, - 示阴性, F 示发酵型。

Note: "+" positive; "-" negative; "F" fermentative.

2.4.5 16S rRNA 基因序列与系统发育学 以 T030817-1 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 基因序列长度为 1 427 bp (GenBank 登录号: DQ010113)。将 T030817-1 株的 16S rRNA 基因序列在国际互联网上进行同源性检索, 结果其与乳球

菌属细菌的 16S rRNA 基因序列自然聚类, 且与格氏乳球菌聚为同一个分支。在检索出的乳球菌属细菌序列中, T030817-1 株与它们的同源性分别在 97% 和 99%。选取了其中部分乳球菌属菌株的 16S rRNA 基因序列进行了系统发育学分析, 其系统发育树如图 2 所示。

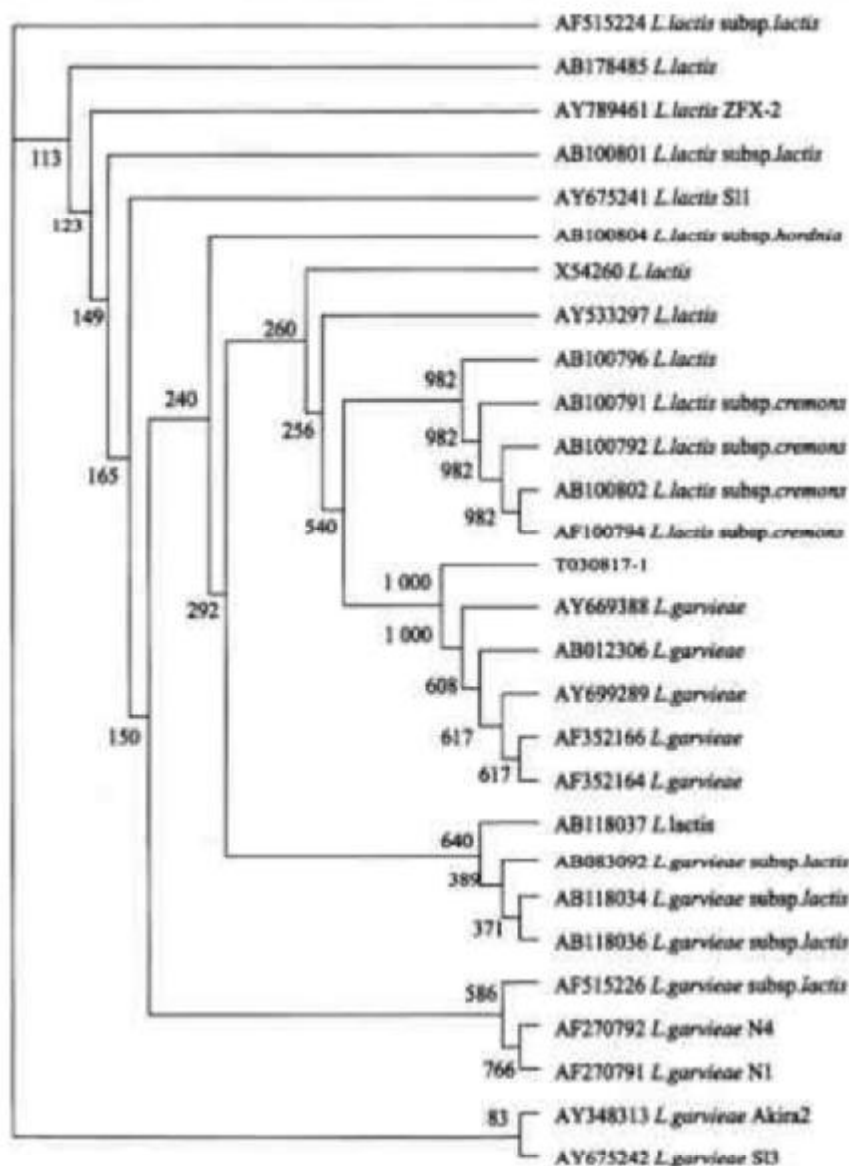


图2 16S rRNA 基因序列分析聚类图

(图中 AF515224~AY675242 为菌株在 NCBI 的登录号,数字为自举次数)

Fig.2 Dendrogram of 16S rRNA gene sequences analysis

(AF515224~AY675242 were database accession numbers in NCBI, numbers were bootstrap values)

2.4.6 菌种判定 10 株菌对所测形态及理化特性等的表型性状的结果一致,属于同种细菌。根据表型特征及系统发育学分析的结果,判定为乳球菌属的格氏乳球菌。

2.5 致病作用

用 T030817-1 株按 1.4 中所述感染健康牙鲆,结果腹腔接种的 6 尾于感染后的 5 d、6 d、7 d 各发病死亡 2 尾、3 尾、1 尾(发病及死亡率为 100%),剖检见均呈不同程度的肝脏肿胀且有点状或小斑块状出血、肾脏肿胀(2 尾有出血)、4 尾存在腹水(2 尾为血

样的);肌肉感染接种的 6 尾于感染接种后 4 d、5 d、6 d、7 d 各发病死亡 1 尾、1 尾、2 尾、2 尾(发病及死亡率为 100%),剖检见均呈不同程度的肝脏肿胀及出血现象、肾脏肿胀及不同程度出血、2 尾存在腹水(其中 1 尾为血样的)。对照的 6 尾牙鲆(腹腔、肌注各 3 尾),在 10 d 观察期内均正常存活。

2.6 对抗菌类药物的敏感性

择其中 3 株(T030817-1、T030817-3、T030817-5)测定对 37 种抗菌类药物的敏感性,结果均对供试的青霉素 G(10 μg/片)、氨苄青霉素(10 μg/片)、头孢唑

啉(30 μg /片)、头孢拉定(30 μg /片)、头孢噻肟(30 μg /片)、头孢他啶(30 μg /片)、头孢吡肟(30 μg /片)、卡那霉素(30 μg /片)、庆大霉素(10 μg /片)、妥布霉素(10 μg /片)、新霉素(30 μg /片)、万古霉素(30 μg /片)、恩诺沙星(10 μg /片)、新生霉素(30 μg /片)等14种高敏(抑菌圈直径20~40 mm);对链霉素(10 μg /片)、丁胺卡那霉素(30 μg /片)、氧氟沙星(5 μg /片)、环丙沙星(5 μg /片)、多黏菌素B(30 μg /片)等5种敏感(抑菌圈直径16~18 mm);对苯唑青霉素(1 μg /片)、头孢曲松(30 μg /片)、头孢哌酮(75 μg /片)、氨曲南(30 μg /片)、红霉素(15 μg /片)、阿奇霉素(15 μg /片)、大观霉素(30 μg /片)、诺氟沙星(10 μg /片)、四环素(30 μg /片)、多西霉素(30 μg /片)、氯霉素(30 μg /片)、克林霉素(2 μg /片)、利福平(5 μg /片)、复方新诺明(1.25/23.75 μg /片)、甲氧苄啶(5 μg /片)、呋喃妥因(300 μg /片)、呋喃唑酮(300 μg /片)、杆菌肽(0.04 IU/片)等18种耐药(无抑菌圈形成)。

3 讨论

乳球菌属(*Lactococcus* Schleifer et al 1986)细菌包括格氏乳球菌(*L. garvieae*)、乳酸乳球菌(*L. lactis*)、鱼乳球菌(*L. piscium*)、植物乳球菌(*L. plantarum*)、棉子糖乳球菌(*L. raffinolactis*)5个种,乳酸乳球菌又分为叶蜂亚种(*L. lactis* subsp. *hordniae*)、乳脂亚种(*L. lactis* subsp. *cremoris*)、乳亚种(*L. lactis* subsp. *lactis*)^[13]。其中的格氏乳球菌^[20]和鱼乳球菌(Williams et al, 1990),已被明确可引起鱼类感染发病。

近年来,格氏乳球菌对鱼类的感染在国外已多有报道,如 Robinson 和 Meyer^[17]报道该菌可引起金体美鲷感染发病,病鱼表现为体表损伤;Plumb 等^[18]报道在 Alabama 和 Florida 西海岸该菌可引起海水鱼发生肠炎、肝脏贫血及腹腔出血等病变;Kusuda 等^[19-20]和 Ugajin^[21]报道该菌可引起美洲黄盖鲷感染发病,病鱼表现为肝、肾、脾和肠病变,同时伴发腹腔积水;Barham 等^[22]报道该菌可引起虹鳟鱼类突眼、腹部膨胀,眼、鳃盖、鳍基及体表出血。在国内,目前尚未见有明确的记载和报道。

本研究对呈腹水、败血感染为特征的牙鲆病例的检验,在病(死)牙鲆组织材料中发现且又有规律地分离检出格氏乳球菌;同时,以分离菌株作对健康牙鲆的感染试验,证明其能引起被感染牙鲆的发病死亡且呈现同自然病例一样的病变;并能从感染死亡牙鲆重新分离回收得到原感染菌。这一结果,初步

表明了格氏乳球菌在水环境的广泛存在且对牙鲆也同样具有强致病作用,提示应对该菌予以重视。

通过用12种不同培养基对格氏乳球菌的培养观察,发现该菌在供试的FA培养基上生长中度或接近中度,在普通营养琼脂、血液(家兔或绵羊血)营养琼脂、TSA、2216E培养基上生长较贫瘠,在TCBS、庆大霉素琼脂、XLD、SS琼脂、伊红美蓝琼脂、麦康凯琼脂及RS培养基上48 h均未见生长。基于此种情况认为,在对该菌进行分离和鉴定时,可根据该菌在这些供试培养基上的生长情况及菌落特征等予以选择使用。

经以37种抗菌类药物对该菌的药敏测定,尚未发现在它们各自于不同菌株间对某种抗菌药物敏感或耐药的明显差异性,这一结果初步显示所测菌株在对供试抗菌类药物中所表现出的一致性,有益于对选择用药防治由该菌引起的感染症的参考;但考虑到细菌对抗菌类药物抗性变异的频繁特征,也加之本次所检菌株在区域分布、菌株数量等方面的局限性,认为比较明确地认定该菌的耐药规律等还需对不同区域、不同发病鱼类等大量分离株的检验。同时,在有效指导用药时最好是对相应病例分离株做药敏测定后选择高敏药物使用,以保证切实的防治效果。

参考文献:

- [1] Ishimaru K, Akagawa-Matsushita M, Munaga K. *Vibrio ichthyenterii* sp. nov., a pathogen of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Int J Syst Bacteriol, 1996, 46: 155-159.
- [2] Tanasakrueang V, Munaga K. Intestinal microflora of larval and juvenile stages in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Fish Pathology, 1988, 23(2): 77-83.
- [3] Levine M A, Wolke R E, Cabelli V J. *Vibrio anguillarum* as a cause of disease in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) [J]. Can J Microbiol, 1972, 18: 1585-1592.
- [4] Nakatsugawa T. *Edwardsiella tarda* isolated from cultured young flounder [J]. Fish Pathology, 1983, 18: 99-101.
- [5] Mekuchi T, Kiyokawa T, Honda K, et al. Infection experiments with *Edwardsiella tarda* in the Japanese flounder [J]. Fish Pathology, 1995a, 30: 247-250.
- [6] Dolores V B, Kawai K. An characteristics of gilding bacteria isolated from diseased cultured flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Fish Pathology, 1986, 21(4): 251-258.
- [7] Kudo T. *Nocardia asteroides* sp. nov. causing nocardiosis of cultured fish [J]. Int J Syst Bacteriol, 1988, 38: 173-178.
- [8] Fukuda Y. *Pasteurella piscicida* infection in cultured juvenile

- Japanese flounder [J]. *Fish Pathol.* 1996, 31(1): 127-133.
- [9] 周丽, 官庆礼, 俞开康. 牙鲆的疾病[J]. 青岛海洋大学学报, 1997, 27(2): 173-180.
- [10] 宋春华, 周丽, 战文斌, 等. 一种新的牙鲆病原菌—兔莫拉氏菌[J]. 海洋学报, 2001, 23(4): 135-140.
- [11] 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.
- [12] Pels F, Cavazaugh C M. Bias in template to product ratios in multitemplate PCR [J]. *Appl Environ Microbiol.* 1998, 64(10): 3724-3730.
- [13] Holt J G, Krieg N R, Smith P H A, et al. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition [M]. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994. 528-529, 540.
- [14] Krieg N R, Holt J G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 1 [M]. London: Williams and Wilkins, Baltimore, 1984. 518-538.
- [15] Austin B, Austin D A. *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish*. Third Edition [M]. Chichester: Praxis Publishing, 1999. 14, 44-45.
- [16] 叶应秋, 王毓三. 全国临床检验操作规程(第2版) [M]. 南京: 东南大学出版社, 1997. 556-562.
- [17] Robinson J A, Meyer F P. Streptococcal fish pathogen [J]. *J Bacteriol.* 1966, 92: 512.
- [18] Plumb J A, Schuchte J H, Guines J L, et al. *Streptococcus* sp. from marine fishes along the Alabama and northwest Florida coast of the Gulf of Mexico [J]. *Trans Am Fish Soc.* 1974, 103: 358-361.
- [19] Kusuda R, Kawai T, Toyoshima T, et al. A new pathogenic bacterium belonging to the genus *Streptococcus*, isolated from an epizootic of cultured yellowtail [J]. *Bull Jap Soc Sci Fish.* 1976a, 42: 1345-1352.
- [20] Kusuda R, Kawai K, Saito F, et al. *Enterococcus seriolide* sp. nov., a fish pathogen [J]. *Int J Syst Bacteriol.* 1991, 41: 406-409.
- [21] Ugajin M. Studies on *Streptococcus* sp. as a causal agent of an epizootic among the cultured ayu (*Plecoglossus altivelis*) in Tochi Prefecture, Japan, 1980 [J]. *Fish Pathol.* 1981, 16: 119-127.
- [22] Barham W T, Schoorbee H, Smit G L. The occurrence of *Aeromonas* and *Streptococcus* in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. *J Fish Biol.* 1979, 15: 457-460.

Lactococcus garvieae as a pathogen in flounder (*Paralichthys olivaceus* Temminck et Schlegel)

FANG Hai, CHEN Cui-zhen, ZHANG Xiao-jun

(Department of Animal Science, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao, 066004)

Abstract: In August 2003, a disease happened in cultured flounder (*Paralichthys olivaceus* Temminck et Schlegel) in a farm in Hebei Province. The diseased flounder were almost 3 to 4 months old. In fact, early in June of this year when water temperature began to increase, disease and death in the fish became more and more obvious. In the middle of August when the examination was conducted, the diseased rate was about 25% and mortality was over 40%. The pathogenic bacteria from tissues of five diseased (or dead) flounders were examined and isolated. Ten strains of bacteria (T030817-1-T030817-10) were identified and their phenotypic information were analyzed extensively, including morphological characteristics, physiological and biochemical characteristics. In addition, the molecular identification of representative strains was conducted, and the 16S rRNA gene was sequenced and compared with that of related strains. Molecular phylogenetic dendrogram was constructed. The results showed that the examined bacteria were identified as *Lactococcus garvieae*. The artificial infection experiments of representative strain (T030817-1) to healthy flounder were conducted, and the results showed corresponding pathogenicity of *L. garvieae* to flounder. The tests of antibiotic sensitivity showed that all the ten strains were highly sensitive to 14 agents including penicillin G et al. in thirty-seven antimicrobial agents used, were sensitive to 5 agents including streptomycin et al., and were resistant to 18 agents including oxacillin et al. The purpose of this study is to provide basic evidence for the disease control and test. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(3): 403-409]

Key words: *Paralichthys olivaceus* L.; *Lactococcus garvieae*; infection