

Nghiên cứu phân lập và một số đặc điểm bệnh học của *Flavobacterium columnare* gây bệnh trên cá rô phi (*Oreochromis* spp.) tại miền Bắc, Việt Nam

Đoàn Thị Ninh^{1,2}, Trần Thị Trinh¹, Đặng Thị Hóa¹, Nguyễn Ngọc Tuấn¹, Nguyễn Thị Hương Giang³, Kim Văn Vạn¹, Đặng Thị Lệ², Trương Đình Hoài^{1*}

¹Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, thị trấn Trâu Quỳ, huyện Gia Lâm, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 1, phường Đình Bảng, TP Từ Sơn, tỉnh Bắc Ninh, Việt Nam

³Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, thị trấn Trâu Quỳ, huyện Gia Lâm, TP Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 12/2/2022; ngày chuyển phản biện 15/2/2022; ngày nhận phản biện 7/3/2022; ngày chấp nhận đăng 11/3/2022

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập, định danh, xác định một số đặc điểm bệnh học và sinh trưởng của vi khuẩn *Flavobacterium columnare* gây bệnh trên cá rô phi nuôi ở miền Bắc. Tổng số 138 mẫu cá rô phi nghi nhiễm *F. columnare* đã được thu từ 34 đợt xuất hiện bệnh ở 21 trại nuôi của 3 tỉnh Hòa Bình, Hà Nam và Hải Dương. Kết quả cho thấy, cá rô phi nhiễm bệnh có biểu hiện đặc trưng như xơ, bạc mang, xuất hiện đốm bạc trắng trên da, xơ vây. Bệnh có thể xuất hiện quanh năm, nhưng tập trung và gây thiệt hại nhiều ở vụ đông xuân. Tỷ lệ chết ở các ao bị bệnh dao động 5-35%. Tổng số 87 chủng vi khuẩn thuần đã được phân lập thành công từ mẫu cá bệnh, 34 chủng đại diện (1 chủng/đợt xuất hiện bệnh) đã được định danh thành công bằng hình thái, đặc tính sinh hóa và kỹ thuật PCR. Các chủng vi khuẩn phân lập được trên môi trường TYES có khuẩn lạc màu vàng, dạng rễ cây, phát triển sau 36-48 giờ nuôi cấy. Vi khuẩn *F. columnare* thuộc nhóm gram âm, dạng sợi mảnh, di động trượt, dương tính với phản ứng catalase, oxidase, có khả năng hấp thụ thuốc nhuộm red congo, tạo sắc tố vàng nâu từ phản ứng flexirubin. Vi khuẩn *F. columnare* phát triển tốt khi nuôi cấy ở nhiệt độ 25-28°C, pH 7-8 và độ mặn dưới 5‰. Kết quả nghiên cứu cung cấp thông tin quan trọng hỗ trợ xây dựng biện pháp phòng và điều trị bệnh do *F. columnare* trên cá rô phi.

Từ khóa: đặc điểm dịch tễ, *Flavobacterium columnare*, miền Bắc, rô phi.

Chỉ số phân loại: 4.5

1. Đặt vấn đề

F. columnare là vi khuẩn gram âm, dạng sợi, được xác định là tác nhân gây bệnh trên nhiều đối tượng cá nước ngọt như: nheo mỳ, rô phi, chép, rô đồng, cá tra, cá hồi [1-4]. Bệnh có phân bố ở hầu hết các nước trên thế giới và gây thiệt hại rất lớn cho ngành nuôi thủy sản nước ngọt, gây chết với tỷ lệ cao, đặc biệt là trên cá da trơn [5]. Bệnh do vi khuẩn *F. columnare* có đặc trưng là xuất hiện các vùng tổn thương màu trắng đến xám vàng trên da, mang hoặc trong một số trường hợp gây nhiễm trùng huyết khi vi khuẩn xâm nhập từ các tổn thương bên ngoài vào trong cơ thể [6]. Bệnh thường bùng phát trong điều kiện môi trường nuôi kém như mật độ nuôi cao, tải lượng chất hữu cơ lớn và điều kiện nhiệt độ môi trường nuôi thay đổi [7].

Cá rô phi được xác định là đối tượng nuôi nước ngọt chủ lực ở Việt Nam với mục tiêu sản xuất phục vụ xuất khẩu [8]. Theo định hướng này, các hệ thống nuôi rô phi thâm canh mật độ cao trong lồng ở các hồ chứa, hồ thủy điện, nuôi lồng trên sông và nuôi thâm canh trong ao đất đang mở rộng nhanh chóng ở nhiều tỉnh miền Bắc. Tuy nhiên, hệ thống nuôi thâm canh mật độ cao gây stress cho đối tượng nuôi, tăng tiếp xúc cá thể trong cùng hệ thống, tích lũy nhiều thức ăn thừa và phân thải làm tăng tải lượng hữu cơ [9], là điều kiện thuận lợi để các bệnh do vi khuẩn bùng phát. Trong đó, dịch bệnh do vi khuẩn *F. columnare* gây ra đã được báo cáo ở một số nước trên thế giới như: Brazil [2, 10], Thái

Lan [11]... Tại Việt Nam, nghiên cứu về tình hình dịch bệnh do vi khuẩn này gây ra được thực hiện bởi N.N. Phuoc và cs (2020) [12] đã thu mẫu cá rô phi nhiễm bệnh và phân lập được một số chủng *F. columnare* từ một số ao nuôi ở Thừa Thiên Huế, tuy nhiên những kết quả đạt được còn khá khiêm tốn. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập, xác định tác nhân gây bệnh và đánh giá một số đặc điểm xuất hiện bệnh của bệnh do *F. columnare* trên cá rô phi nuôi ở một số tỉnh khu vực miền Bắc.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Mẫu cá rô phi nghi nhiễm *F. columnare* được thu từ các đợt bùng phát bệnh và các chủng vi khuẩn *F. columnare* sử dụng trong nghiên cứu được phân lập trực tiếp từ mẫu bệnh phẩm. Các trang thiết bị, dụng cụ, hóa chất phục vụ cho quá trình thu mẫu, nuôi cấy, phân lập, định danh vi khuẩn và đánh giá các đặc tính nuôi cấy của các chủng vi khuẩn.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp thu mẫu, đánh giá đặc điểm xuất hiện bệnh: Các mẫu cá rô phi nghi nhiễm *F. columnare* (n=138) được thu từ 21 trại/hộ nuôi thuộc 3 tỉnh miền Bắc (7 trại/tỉnh) với 3 hệ thống nuôi: nuôi lồng trên hồ chứa ở Hòa Bình, nuôi lồng trên sông và nuôi thâm canh trong ao ở Hà Nam và Hải Dương (bảng 1). Các dấu hiệu bệnh lý được xác định theo mô tả của A.M. Declercq và cs

*Tác giả liên hệ: Email: tdhoai@vnua.edu.vn

Study on isolation and some pathological characteristics of *Flavobacterium columnare* causing infection in tilapia (*Oreochromis spp.*) cultured in Northern Vietnam

Thi Ninh Doan^{1,2}, Thi Trinh Tran¹, Thi Hoa Dang¹,
Ngoc Tuan Nguyen¹, Thi Huong Giang Nguyen³,
Van Van Kim¹, Thi Lua Dang², Dinh Hoai Truong^{1*}

¹Faculty of Fisheries, Vietnam National University of Agriculture,
Trau Quy Town, Gia Lam District, Hanoi, Vietnam

²Research Institute for Aquaculture No 1,

Dinh Bang Ward, Tu Son City, Bac Ninh Province, Vietnam

³Faculty of Veterinary Medicine, Vietnam National University of Agriculture,
Lane 64, Ngo Xuan Quang Street, Trau Quy Town, Gia Lam District, Hanoi, Vietnam

Received 12 February 2022; revised 7 March 2022; accepted 11 March 2022

Abstract:

The study aims to isolate, identify, and determine the pathological characteristics of *Flavobacterium columnare* causing disease in tilapia cultured in Northern Vietnam. A total of 138 samples of tilapia suspected of being infected with *F. columnare* were collected from 34 disease outbreaks at 21 tilapia farms in Hoa Binh, Ha Nam, and Hai Duong provinces. The results showed that infected tilapia exhibited typical symptoms such as fibrous, silver gills, appearance of silvery white spots on the skin, fibrous fins. The outbreaks can occur in tilapia farms anytime, but focusing and much damage in the winter-spring crop with accumulative mortality rates from 5-35%. A total of 87 isolates were retrieved from the fish samples; 34 representative isolates (1 isolate per outbreak) were successfully identified by phenotypic, biochemical tests, and PCR assays. Using TYES medium, the *F. columnare* isolates grew in yellow and rhizoid colonies after 36-48 h of culture. The bacteria were gram-negative, long filamentous, absorbed Congo red dye, produced flexirubin pigment, gliding motility, and were positive to catalase and oxidase tests. *F. columnare* grew well at a temperature of 25-28°C, pH 7-8 and NaCl concentration below 5‰. The present results provide critical information in developing strategies for the prevention and control of *F. columnare* infection in tilapia.

Keywords: epidemiological characterisation, *Flavobacterium columnare*, Northern Vietnam, tilapia.

Classification number: 4.5

(2013) [13] và H. Dong và cs (2015) [11], bao gồm mang xơ trắng, hoặc xám vàng, cơ thể xuất hiện đốm nhạt màu, xơ vảy. Tiến hành thu 3-5 mẫu cá có dấu hiệu bệnh đặc trưng như mô tả ở trên từ mỗi đợt bệnh bùng phát để phục vụ nghiên cứu. Mẫu cá sau thu được vận chuyển về phòng thí nghiệm trong điều kiện bảo quản lạnh đối với mẫu cá mới chết hoặc vận chuyển kín trong các túi PE chứa nước có bơm oxy đối với cá còn sống để thực hiện nghiên cứu. Các thông tin liên quan đến đặc điểm xuất hiện bệnh như thời gian xuất hiện bệnh, tỷ lệ chết ước tính, cỡ cá nhiễm bệnh cũng được thu thập và tổng hợp liên tục vào tất cả các tháng trong năm (bảng 1).

Bảng 1. Thông tin thu mẫu cá rô phi nghi nhiễm *F. columnare* trong nghiên cứu.

Địa điểm thu mẫu	Mã trại	Hình thức nuôi	Thời điểm thu mẫu	Số mẫu thu (n=138)	Ký hiệu mẫu
Hòa Bình	HB1	L-HC	3/2021	3	Til-HB1-1
			6/2021	5	Til-HB1-2
	HB2	L-HC	4/2021	5	Til-HB2-1
			11/2020	4	Til-HB3-1
	HB3	L-HC	5/2021	5	Til-HB3-2
			6/2021	4	Til-HB3-3
	HB4	L-HC	11/2020	5	Til-HB4-1
			12/2020	4	Til-HB4-2
	HB5	L-HC	2/2021	3	Til-HB5-1
			8/2021	5	Til-HB6-1
	HB6	L-HC	9/2021	3	Til-HB6-2
			11/2020	4	Til-HB6-3
	HB7	L-HC	10/2021	5	Til-HB7-1
Hà Nam	HN1	A	11/2021	3	Til-HN1-1
			2/2020	4	Til-HN1-2
	HN2	L-S	10/2021	3	Til-HN2-1
	HN3	L-S	1/2021	3	Til-HN3-1
			3/2021	3	Til-HN3-2
	HN4	L-S	2/2021	4	Til-HN4-1
	HN5	A	1/2021	5	Til-HN5-1
Hải Dương	HD1	A	11/2020	3	Til-HN6-1
			2/2021	4	Til-HN6-2
	HD2	A	4/2021	4	Til-HN6-3
	HD3	A	9/2021	4	Til-HN7-1
			10/2021	5	Til-HN7-2
	HD4	L-S	4/2021	4	Til-HD1-1
			2/2021	5	Til-HD2-1
	HD5	A	9/2021	3	Til-HD3-1
			9/2021	5	Til-HD4-1
	HD6	A	3/2021	5	Til-HD4-2
			10/2021	3	Til-HD4-3
	HD7	A	2/2021	4	Til-HD5-1
			11/2020	5	Til-HD6-1
	HD8	A	8/2021	4	Til-HD7-1

Ghi chú: L-HC: nuôi lồng trên hồ chứa; L-S: nuôi lồng trên sông; A: nuôi ao đất.

Phương pháp sàng lọc mẫu và nuôi cấy, phân lập vi khuẩn: Sử dụng cồn 70% khử trùng bề mặt cơ thể cá trước khi tiến hành giải phẫu trong điều kiện vô trùng. Tất cả các mẫu cá nghi nhiễm sau thu (138 mẫu) được sàng lọc thông qua bước nhuộm gram mẫu mô ở các vùng tổn thương như: mang, da, vây, xoang miệng, lách, thận để quan sát sự có mặt của vi khuẩn ở các cơ quan này. Những mẫu có sự hiện diện của vi khuẩn gram âm, dạng sợi (n=125) nghi *F. columnare* như mô tả của H. Dong và cs (2015) [11] được đưa vào nuôi cấy.

Vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường TYES (Tryptone yeast extract salts) [14], khuẩn lạc sau nuôi cấy có màu vàng, dạng vẩy phát triển sau 36-48 giờ nuôi cấy nghi là các chủng *F. columnare* độc lực theo H. Dong và cs (2015) [11] và H. Kunttu và cs (2011) [15] được tách để nuôi cấy thuần. Các chủng vi khuẩn sau khi nuôi cấy thuần (n=87) được lưu giữ trong môi trường tăng sinh bổ sung glyceron ở điều kiện -80°C.

Phương pháp định danh vi khuẩn bằng xác định hình thái, sinh hóa: Từ bộ chủng vi khuẩn thuần thu được, lựa chọn ngẫu nhiên 1 chủng/đợt bùng phát bệnh để định danh (n=34). Đặc điểm hình thái, sinh hóa của vi khuẩn được xác định theo mô tả của J.F. Bernardet và P.A. Grimont (1989) [16] và N.B. Buller (2004) [17]. Vi khuẩn thuần được quan sát hình thái khuẩn lạc trên đĩa nuôi cấy, xác định hình dạng vi khuẩn qua nhuộm gram và soi tươi xác định đặc tính di động. Phản ứng catalase sử dụng kit thử oxidase H_2O_2 3% (Merck, Darmstadt, Đức); oxidase sử dụng thuốc thử dimethyl-*p*-phenylene diamine (Biomerieux, Pháp); khả năng hấp thụ congo đỏ sử dụng thuốc thử red congo (Merck, Darmstadt, Đức); sự có mặt của sắc tố flexirubin được thử bằng dung dịch KOH 20% (Merck, Darmstadt, Đức). Quy trình thực hiện được tiến hành theo hướng dẫn của kit thử và mô tả kết quả của J.F. Bernardet và cs (2006) [18]. Các chủng vi khuẩn được định danh sơ bộ là *F. columnare* khi có kết quả kiểm tra tương đồng với chủng chuẩn *F. columnare* ATCC 23463.

Phương pháp tách chiết DNA và giám định vi khuẩn bằng sinh học phân tử: Các chủng vi khuẩn sau định danh sơ bộ thành công bằng hình thái, sinh hóa (n=34) được tách chiết DNA để khẳng định bằng phương pháp sinh học phân tử. DNA của vi khuẩn thuần được tách bằng bộ kit InstaGen matrix (Bio-rad, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. DNA sau tách được lưu ở điều kiện -20°C để sử dụng trong quá trình định danh bằng sinh học phân tử theo mô tả của J.A. Bader và cs (2003) [5].

Tất cả các chủng sau thử sinh hóa được đưa vào giám định bằng PCR, sử dụng primer xác định sự có mặt của gen đích ISR với đoạn mồi xuôi FCISRFL: TGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAGAGACA; mồi ngược FCISRR: TAATYRCTAAAGATGTTCTTTCTACTTGTGTTG, kích cỡ vùng gen đích là 470 bp [19]. Hỗn dịch cho 1 phản ứng PCR có thể tích tổng 20 μ l bao gồm 10 μ l Gotag green Master Mix (Promega, Anh), 1,5 μ l mỗi primer xuôi và ngược, 3 μ l mẫu DNA, 4 μ l nước tách DNA. Hỗn dịch được đưa vào máy luân nhiệt để khuếch đại DNA theo chu trình nhiệt như sau: tiền biến tính ở 94°C trong 5 phút; 40 chu kỳ lặp lại với biến tính ở 94°C trong 30s, gắn mồi ở 55°C trong 45s, kéo dài ở 72°C trong 60s; giai đoạn kéo dài sau cùng ở 72°C trong 7 phút. Đối chứng dương là chủng chuẩn

quốc tế *F. columnare* ATCC 23463, đối chứng âm là mẫu không DNA.

Sản phẩm PCR được phân tích trên máy điện di sử dụng bản gel chứa 1% agarose nhuộm bằng dung dịch Redsafe (Intron, Hàn Quốc). Hình ảnh điện di bản gel được chụp bằng hệ thống Gel imager (Bio-Rad, Mỹ).

Phương pháp cảm nhiễm, khẳng định tác nhân gây bệnh: Để khẳng định vi khuẩn phân lập được có khả năng gây bệnh trên cá rô phi khỏe mạnh, lựa chọn 3 chủng vi khuẩn đại diện đã định danh thành công (FC-HB03, FC-HN04, FC-HD07) từ mỗi tỉnh thu mẫu để tiến hành cảm nhiễm trên cá rô phi. Theo kết quả nghiên cứu của H. Dong và cs (2016) [20], liều ngâm vi khuẩn *F. columnare* 2×10^6 CFU/ml gây chết 100% cá rô phi giống. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu của P. Wonmongkol và cs (2018) [21], liều gây chết 50% cá rô phi giống khi ngâm cảm nhiễm *F. columnare* ở mức $1,2 \times 10^6$ CFU/ml. Do vậy trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn nồng độ 2×10^6 CFU/ml để sử dụng trong thí nghiệm cảm nhiễm. Cá cảm nhiễm có kích cỡ 25-30 g, trước khi tiến hành thí nghiệm, cá được nuôi thuần hóa để làm quen với điều kiện bể trong thời gian 1 tuần. Tiến hành nuôi tăng sinh các chủng vi khuẩn bằng môi trường TYES trong 36 giờ. Sử dụng phương pháp cháng cây trên đĩa thạch để xác định mật độ vi khuẩn trong dịch gốc. Bổ sung thêm nước muối sinh lý để điều chỉnh mật độ vi khuẩn gốc của 3 chủng về mức đồng đều khoảng 2×10^8 CFU/ml. Đối với mỗi chủng vi khuẩn, pha loãng 50 ml dịch khuẩn gốc vào 5 l nước sạch để tạo dịch ngâm cảm nhiễm có mật độ vi khuẩn khoảng 2×10^6 CFU/ml. Sử dụng 10 con cá/lô ngâm, lặp lại 2 lần, thời gian ngâm là 2 giờ, sau đó đưa ra nuôi trong các bể 120 l và theo dõi trong 7 ngày. Lô đối chứng thực hiện tương tự với nước ngâm không chứa vi khuẩn. Trong thời gian theo dõi (7 ngày), cá chết hoặc có biểu hiện bệnh sau cảm nhiễm được thu để quan sát triệu chứng bệnh tích, nhuộm gram, soi tươi quan sát sự xuất hiện của vi khuẩn trong mô bào. Một số mẫu cá được nuôi cấy, phân lập lại vi khuẩn và được giám định nhanh bằng PCR để khẳng định tác nhân gây bệnh.

Phương pháp xác định một số đặc tính nuôi cấy của vi khuẩn: Các thử nghiệm đánh giá ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy bao gồm nhiệt độ, độ mặn và pH lên sinh trưởng của vi khuẩn được thực hiện với 3 chủng vi khuẩn đại diện FC-HB03, FC-HN04 và FC-HD07. Dựa trên các thử nghiệm ban đầu của chúng tôi và kết quả nghiên cứu của L.R. Suomalainen và cs (2006a) [22], các khoảng môi trường được thiết lập để thử nghiệm bao gồm nhiệt độ: 10, 15, 20, 25, 28, 30 và 35°C; hàm lượng NaCl: 0, 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5 và 15‰; pH: 5, 6, 7, 8, 8,5 và 9. Với các lô thử nghiệm nhiệt độ, vi khuẩn được nuôi cấy trong bể ổn nhiệt (water bath). Bổ sung NaCl để điều chỉnh độ mặn của môi trường nuôi cấy, trong khi sử dụng NaOH, HCl loãng để điều chỉnh pH môi trường nuôi. Với lô thử nghiệm ảnh hưởng của độ mặn và pH, vi khuẩn được nuôi cấy ở 28°C.

Phương pháp đánh giá kết hợp dựa trên nuôi cấy tăng sinh và đếm khuẩn lạc trên đĩa thạch, sử dụng môi trường TYES. Để tiến hành thử nghiệm, 5 khuẩn lạc vi khuẩn phát triển sau 36 giờ được lấy và đánh tan đồng nhất vào 1 ml PBS tạo vi khuẩn giống, bổ sung 50 μ l vi khuẩn giống vào các ống 5 ml có chứa môi trường tăng sinh TYES với các điều kiện nhiệt độ, NaCl và pH đã được thiết lập như

trên và chằng cấy trên thạch để xác định mật độ vi khuẩn tại thời điểm bắt đầu thí nghiệm. Sau 36 giờ, 50 µl dịch khuẩn được chằng cấy trên đĩa thạch TYES và nuôi cấy ở 28°C trong 36 giờ để đánh giá số lượng vi khuẩn mọc và phát triển.

2.3. Phương pháp xử lý số liệu

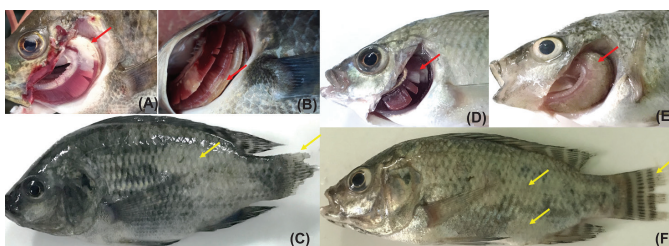
Số liệu về tỷ lệ chết của cá trong quá trình cảm nhiễm, mật độ vi khuẩn phát triển ở các điều kiện môi trường nuôi khác nhau được phân tích thống kê mô tả kết hợp với so sánh giữa các nghiệm thức bằng phân tích ANOVA, sử dụng phép so sánh Turkey Post-Hoc trên phần mềm SPSS20 và Excel 2013.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Đặc điểm xuất hiện bệnh trắng da, bạc mang do vi khuẩn *F. columnare* trên cá rô phi

Kết quả tổng hợp thông tin dịch tễ từ các đợt xuất hiện bệnh cho thấy, bệnh trắng da, bạc mang trên cá rô phi do nhiễm *F. columnare* thường gặp ở kích cỡ cá dưới 300 g, phổ biến nhất ở giai đoạn dưới 100 g ở cả 3 hệ thống nuôi (bảng 1). Các đợt bùng phát bệnh xuất hiện ở hầu hết các tháng trong năm, nhưng tập trung vào khoảng thời gian từ tháng 9 đến tháng 3 năm sau, đặc biệt vào các giai đoạn giao mùa, tháng 9-10 và tháng 3-4 đối với các hệ thống nuôi ao và nuôi lồng trên sông. Ở giai đoạn nuôi thương phẩm, cá rô phi nhiễm *F. columnare* thường chết rải rác, với tỷ lệ chết cao hơn ở giai đoạn nhỏ (dưới 100 g), khi đạt kích cỡ cao hơn, tỷ lệ chết giảm. Đặc biệt, các đợt bùng phát bệnh ở hệ thống nuôi lồng trên sông và hồ chứa thường gây ra tỷ lệ chết cao hơn (20-35%) so với khi nuôi trong ao (5-15%).

Cá nghi nhiễm bệnh xuất hiện các triệu chứng lâm sàng đặc trưng như mòn vẩy, xuất hiện các đốm bạc màu trên da, cơ thể nhợt nhạt, tia mang xơ, bạc trắng hoặc xám vàng từng phần hoặc toàn bộ lá mang, tăng tiết nhớt (hình 1). Tuy cá nhiễm bệnh thể hiện triệu chứng lâm sàng rõ ràng nhưng bệnh tích đại thể không đặc trưng. Những đặc điểm lâm sàng quan sát được trên cá nhiễm *F. columnare* trong nghiên cứu này tương tự với các công bố trước đây trên cá rô phi [2, 11].



Hình 1. Dấu hiệu lâm sàng trên cá rô phi nhiễm *F. columnare*. (A, B, C) Mẫu cá thu từ hệ thống nuôi; (D, E, F) Mẫu cá cảm nhiễm. Cá nhiễm bệnh có dấu hiệu xơ, bạc hoặc xám vàng tia mang (mũi tên đỏ) và bạc da, xơ tia vây (mũi tên vàng).

Bệnh do vi khuẩn *F. columnare* thường bắt đầu từ các lây nhiễm bên ngoài trên da, vây, mang và phát triển thành các khối loét sâu dưới cơ [23]. Vi khuẩn *F. columnare* được cho là sử dụng nhớt cá làm nguồn dinh dưỡng [24]. Trong quá trình phát triển và nhân lên sau khi nhiễm vào ký chủ, vi khuẩn tiết ra nhiều sản phẩm ngoại bào trong đó có enzyme protease ngoại bào, là yếu tố độc lực quan

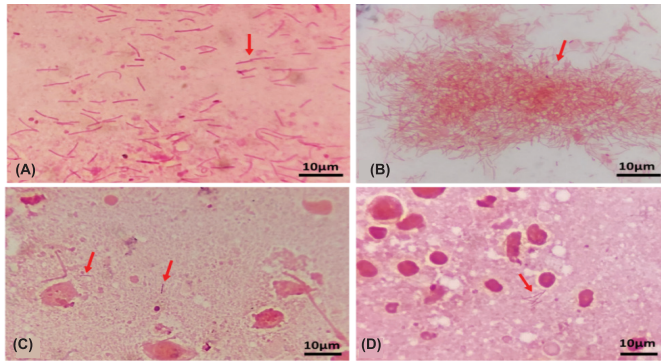
trọng gây ra các tổn thương và hoại tử trên mang và mô biểu bì của cá nhiễm bệnh [25, 26]. Ngoài ra, các vùng tổn thương, hoại tử ban đầu trên da, mang cũng thường dẫn đến các lây nhiễm thứ cấp, bội nhiễm nấm hoặc các nhóm vi khuẩn gây bệnh khác, dẫn đến các tổn thương nặng hơn, gây loét da, hoặc sâu vào các lớp cơ [18, 27, 28]. Khi mang và da bị tổn thương sâu, vi khuẩn dễ xâm nhập vào máu cá gây nhiễm trùng huyết và đi vào các hệ cơ quan nội tạng [29]. Đây cũng là nguyên nhân có sự xuất hiện của vi khuẩn từ nội quan của cá nhiễm bệnh giai đoạn nặng trong nghiên cứu.

Vi khuẩn *F. columnare* có thể gây nhiễm từ cấp tính đến mạn tính với mức độ độc lực phụ thuộc vào từng chủng vi khuẩn [13]. Ngoài ra, giai đoạn độ tuổi của cá nhiễm bệnh cũng là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến mức độ nghiêm trọng của các tổn thương và dấu hiệu bệnh. Cá giai đoạn nhỏ bệnh thường phát triển ở dạng cấp tính và gây tổn thương rất nặng ở mang, cản trở hô hấp, hạn chế khả năng thu nhận oxy trong nước, gây chết nhanh, chết cấp tính [13]. Cá giai đoạn trưởng thành có thể nhiễm ở dạng cấp tính, bán cấp tính hoặc mạn tính. Cá nhiễm bệnh ở thể mạn tính thường xuất hiện các vùng hoại tử nghiêm trọng màu vàng xám trên mang [18, 30]. Đây có thể là nguyên nhân gây ra hiện tượng cá giai đoạn nhỏ hơn thường có tỷ lệ chết cao hơn so với giai đoạn lớn ghi nhận được ở các hệ thống nuôi. Tuy nhiên, ở các đợt bùng phát bệnh xảy ra trong nghiên cứu này, cá đều chết rải rác với tỷ lệ chết tích lũy cao nhất ở mức 35%, không quan sát được hiện tượng cá chết cấp tính, chết hàng loạt trong thời gian ngắn. Điều này có thể do kích cỡ cá ở các hộ/trại nuôi đã đủ lớn (trung bình trên 38,4 g), không gây ra các lây nhiễm ở dạng cấp tính như ở giai đoạn cá bột, cá hương.

Ngoài ra, điều kiện môi trường nuôi cũng ảnh hưởng lớn đến bùng phát bệnh do *F. columnare*. Trong số các yếu tố này, hàm lượng chất hữu cơ và các hợp chất chứa nitơ tăng lên, làm tăng stress lên cá nuôi, tăng tiết nhớt, thúc đẩy phát triển của vi khuẩn [7]. Ngoài ra, các hệ thống nuôi thâm canh cũng có đầy đủ các điều kiện tốt để tăng sinh các loại ký sinh trùng và vi khuẩn gây bệnh khác, tăng đồng nhiễm các tác nhân gây bệnh [13]. Đây là nguyên nhân dẫn đến cá thường chết nhiều vào các thời điểm nhiệt độ mát, đặc biệt là các thời điểm giao mùa khi tăng lượng mưa, tăng chất hữu cơ trong hệ thống nuôi. Khi xảy ra dịch bệnh, đối với các hệ thống nuôi trong ao khép kín, các loại tác nhân gây bệnh cơ hội bao gồm ký sinh trùng và vi khuẩn gây bệnh dễ dàng bị tiêu diệt khi sử dụng các loại thuốc sát trùng và kháng sinh điều trị, do đó giảm thiểu tỷ lệ chết. Trong khi đó, các hệ thống nuôi lồng rất khó khử trùng, tiêu diệt tác nhân gây bệnh thứ cấp do nuôi trong hệ thống mở, do vậy khi bùng phát bệnh thường có tỷ lệ chết cao hơn.

3.2. Kết quả phân lập và định danh tác nhân gây bệnh

Quá trình sàng lọc từ 138 mẫu cá rô phi có dấu hiệu bệnh đặc trưng thu từ các đợt bùng phát bệnh đã cho kết quả 125 mẫu có xuất hiện vi khuẩn gram âm, dạng sợi mảnh nghi *F. columnare* ở các vị trí tổn thương trên da, mang và trong xoang miệng. Một số mẫu cá có biểu hiện nhiễm bệnh nặng cũng quan sát được vi khuẩn xuất hiện rải rác trong mô lách, thận trên (hình 2, bảng 2). Tổng số 87 chủng vi khuẩn thuần đã được phân lập thành công trên môi trường TYES. Các đặc tính hình thái, sinh hóa của 34 chủng



Hình 2. Kết quả nhuộm gram mẫu mô tươi từ cá rô phi nghi nhiễm *F. columnare*. Vi khuẩn gram âm, dạng sợi mảnh (mũi tên đỏ) phân bố rải rác hoặc tập trung thành từng bụi lớn ở các vị trí tổn thương trên mang và da (A, B); xuất hiện rải rác trong xoang miệng (C) và thận (D).

Bảng 2. Thông tin dịch bệnh do vi khuẩn *F. columnare* trên cá rô phi tại miền Bắc.

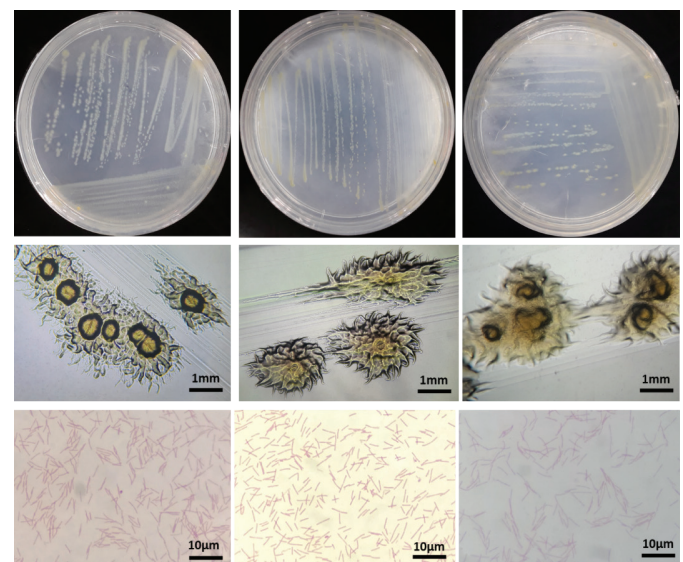
STT	Đợt bùng phát ⁽¹⁾	Hệ thống nuôi ⁽²⁾	Tháng ⁽³⁾	Cỡ cá ⁽⁴⁾	Tỷ lệ chết ⁽⁵⁾	Chủng phân lập	Vị trí phân lập	Giám định PCR
1	HB1-1	L-HC	3	245,7	20-30	FC-HB1	Mang	+
2	HB1-2	L-HC	6	125,2	25-35	FC-HB2	Da	+
3	HB2-1	L-HC	4	302,6	15-20	FC-HB3	Mang	+
4	HB3-1	L-HC	11	215,8	25-30	FC-HB4	Thận	+
5	HB3-2	L-HC	5	264,5	25-30	FC-HB5	Mang	+
6	HB3-3	L-HC	6	176,3	15-20	FC-HB6	Mang	+
7	HB4-1	L-HC	11	85,1	10-15	FC-HB7	Da	+
8	HB4-2	L-HC	12	138,2	25-30	FC-HB8	Da	+
9	HB5-1	L-HC	2	97,8	20-30	FC-HB9	Thận	+
10	HB6-1	L-HC	8	81,6	20-25	FC-HB10	Lách	+
11	HB6-2	L-HC	9	78,2	15-20	FC-HB11	Mang	+
12	HB6-3	L-HC	11	177,6	30-35	FC-HB12	Mang	+
13	HB7-1	L-HC	10	275,3	10-15	FC-HB13	Da	+
14	HN1-1	A	11	38,4	5-10	FC-HN1	Mang	+
15	HN1-2	A	2	47,1	1-5	FC-HN2	Mang	+
16	HN2-1	L-S	10	268,9	10-15	FC-HN3	Da	+
17	HN3-1	L-S	1	151,4	15-20	FC-HN4	Thận	+
18	HN3-2	L-S	3	148,7	10-15	FC-HN5	Mang	+
19	HN4-1	L-S	2	93,1	25-30	FC-HN6	Mang	+
20	HN5-1	A	1	76,3	5-10	FC-HN7	Da	+
21	HN6-1	L-S	11	115,2	15-20	FC-HN8	Mang	+
22	HN6-2	L-S	2	75,1	25-30	FC-HN9	Mang	+
23	HN6-3	L-S	4	81,7	25-20	FC-HN10	Da	+
24	HN7-1	A	9	135,7	1-5	FC-HN11	Da	+
25	HN7-2	A	10	55,7	15-20	FC-HN12	Da	+
26	HD1-1	A	4	72,8	10-15	FC-HD1	Mang	+
27	HD2-1	A	2	42,6	15-20	FC-HD2	Da	+
28	HD3-1	A	9	167,6	1-5	FC-HD3	Lách	+
29	HD4-1	L-S	9	112,4	15	FC-HD4	Mang	+
30	HD4-2	L-S	3	76,3	20-25	FC-HD5	Da	+
31	HD4-3	L-S	10	215,2	10-15	FC-HD6	Lách	+
32	HD5-1	A	2	39,5	10-15	FC-HD7	Mang	+
33	HD6-1	A	11	41,2	15-20	FC-HD8	Da	+
34	HD7-1	A	8	50,4	1-10	FC-HD9	Thận	+

(¹): đợt xuất hiện bệnh; mã trại - đợt bùng phát, HB: Hòa Bình; HN: Hà Nam; HD: Hải Dương; (²): hệ thống nuôi: L-HC: lồng trên hồ chứa; L-S: nuôi lồng trên sông; A: nuôi thâm canh trong ao đất; (³): tháng xuất hiện bệnh; (⁴): khối lượng cá trung bình của các mẫu cá thu; (⁵): tỷ lệ chết ước tính bởi chủ hộ nuôi.

đại diện được lựa chọn (1 chủng/đợt bùng phát bệnh) đều có đặc tính tương đồng nhau và tương đồng với chủng chuẩn *F. columnare* ATCC23463. Khuẩn lạc vi khuẩn có màu vàng, dạng rỗ, đạt kích cỡ 0,5-3,0 mm sau 36 giờ nuôi cấy; vi khuẩn gram âm, dạng sợi mảnh sợi, có chiều dài 2-10 µm. Một số đặc tính sinh hóa khác ghi nhận được bao gồm di động trượt, dương tính với các phản ứng oxidase, catalase, flexirubin, red congo và không phát triển trên môi trường TSA (bảng 3, hình 3). Các đặc điểm ghi nhận được phù hợp với mô tả của J.F. Bernardet và cs (1989) [16] và H. Dong và cs (2015) [11] về chủng *F. columnare* gây bệnh trên cá rô phi. Hầu hết các chủng đều được phân lập từ các vị trí tổn thương trên mang và da, chỉ có một số ít chủng phân lập được từ mẫu thận, lách cá nhiễm bệnh nặng (bảng 2).

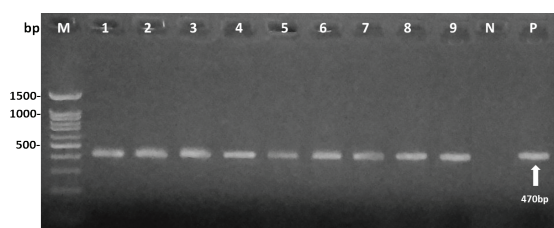
Bảng 3. Kết quả thử một số đặc tính sinh hóa của các chủng vi khuẩn đại diện phân lập được trên cá rô phi nhiễm bệnh.

Đặc tính sinh thái, sinh hóa	Chủng phân lập từ cá rô phi nhiễm bệnh (n=34)	Chủng chuẩn <i>F. columnare</i> ATCC 23463
Gram	-	-
Phát triển trên TSA	-	-
Hình thái khuẩn lạc trên TYES	rỗ	rỗ
Hình thái vi khuẩn	Sợi mảnh	Sợi mảnh
Di động trượt	+	+
Oxidase	+	+
Catalase	+	+
Flexirubin	+	+
Red congo	+	+



Hình 3. Hình thái khuẩn lạc và hình dạng vi khuẩn của 3 chủng đại diện phân lập từ 3 tỉnh nghiên cứu.

Kết quả giám định bằng kỹ thuật PCR khẳng định, 34/34 chủng được định danh là *F. columnare* khi cho kết quả dương tính với đoạn mồi đặc hiệu cho loài *F. columnare*, sản phẩm khuếch đại có kích cỡ 470 bp, trùng với vị trí xuất hiện vạch của chủng đối chứng dương *F. columnare* ATCC23463 (hình 4, bảng 2).

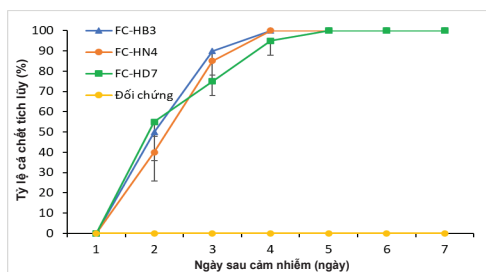


Hình 4. Hình ảnh điện di của 9 chủng đại diện (3 chủng/tinh). M: marker; giếng 1-9: 9 chủng vi khuẩn đại diện phân lập từ cá rô phi nhiễm bệnh; N: đối chứng âm (mẫu không DNA); P: đối chứng dương (chủng *F. columnare* ATCC23463).

3.3. Kết quả cảm nhiễm khẳng định tác nhân gây bệnh

Kết quả ngâm cảm nhiễm liều 2×10^6 CFU/ml vi khuẩn *F. columnare* trong 2 giờ gây chết 100% cá cảm nhiễm sau 48-72 giờ, trong khi lô đối chứng không có cá chết sau 7 ngày tiêm (hình 5). Cá nhiễm bệnh sau cảm nhiễm có các dấu hiệu như cơ thể nhợt nhạt và bạc tia mang từng gốc hoặc toàn bộ cung mang tương đồng với dấu hiệu ghi nhận được trên cá nhiễm bệnh thu từ tự nhiên (hình 1). Các vị trí tổn thương trên cá nhiễm bệnh đều quan sát được sự có mặt của vi khuẩn gram âm, dạng sợi mảnh tương tự như chủng vi khuẩn đưa vào cảm nhiễm. 3 chủng phân lập được đưa vào định danh nhanh bằng PCR đều cho kết quả dương tính với gen đặc hiệu cho loài *F. columnare*.

Kết quả cảm nhiễm khẳng định vi khuẩn *F. columnare* phân lập được là tác nhân gây ra các triệu chứng đặc trưng trên cá nhiễm bệnh thu từ tự nhiên và gây chết cho cá nhiễm bệnh theo quy trình và nguyên lý Koch's về chẩn đoán và khẳng định tác nhân gây bệnh. Hiện tượng chết cấp tính quan sát được trong nghiên cứu tương đồng với kết quả cảm nhiễm trên cá điều hồng giai đoạn nhỏ ở khoảng liều tiêm tương tự được H. Dong và cs (2015) [11] tiến hành trên chủng *F. columnare* thu từ cá rô phi nhiễm bệnh ở Thái Lan.

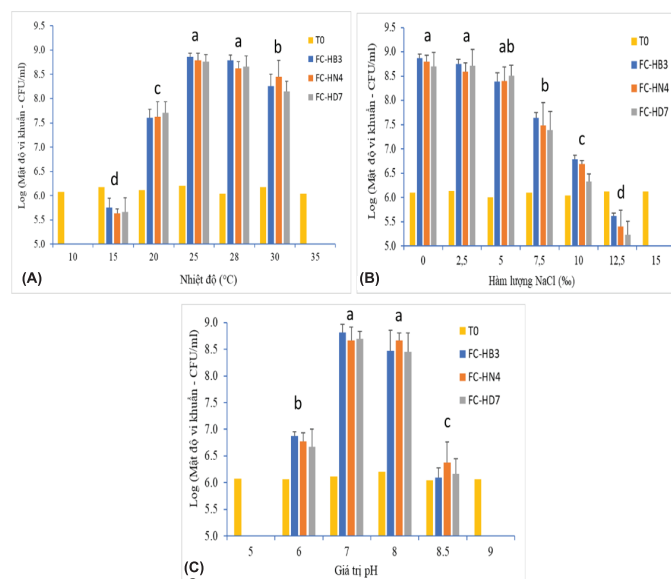


Hình 5. Tỷ lệ chết tích lũy của cá sau ngâm cảm nhiễm.

3.4. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy lên sự phát triển của vi khuẩn

Xu hướng phát triển của 3 chủng *F. columnare* đại diện phân lập từ cá rô phi nhiễm bệnh trong điều kiện khác nhau về nhiệt độ, hàm lượng NaCl và pH diễn ra tương đối giống nhau. Nhiệt độ có ảnh hưởng rất lớn đến khả năng phát triển của vi khuẩn *F. columnare*. Sự phát triển của vi khuẩn không có khác biệt ở nhiệt độ 25-28°C ($p > 0,05$). Tuy nhiên, khi nhiệt độ tăng lên 30°C hoặc giảm xuống 20°C, khả năng nhân lên của vi khuẩn bắt đầu suy giảm ($p < 0,05$) với mức kém hơn ở 20°C so với 30°C. Vi khuẩn

F. columnare vẫn sống sót nhưng không nhân lên ở 15°C và chết hoàn toàn khi nhiệt độ tăng lên 35°C hoặc giảm xuống 10°C (hình 6A).



Hình 6. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy lên khả năng phát triển của 3 chủng vi khuẩn *F. columnare* đại diện. (A) Nhiệt độ; (B) Độ mặn; (C) Giá trị pH; T0: mật độ vi khuẩn tại thời điểm nuôi cấy.

Khả năng sinh trưởng tốt nhất của vi khuẩn này ở điều kiện mát (25-28°C) cũng một phần giải thích cho sự xuất hiện bệnh thường xuyên hơn ở điều kiện thời tiết này trong thực tế. Ngoài khả năng sống sót và nhân lên tốt hơn, ở mức nhiệt này, vi khuẩn còn có khả năng gắn bám tốt hơn vào mô bào vật chủ và mức độ hoạt động của các emzym ngoại bào, các sản phẩm tiết độc lực ở mức cao nhất, làm tăng hiệu quả xâm nhập và gây bệnh A. Decostere và cs (1998, 1999, 2002) [7, 27, 30]. Mặc dù theo J.F. Bernardet và cs (1989) [16], A. Decostere và cs (1998) [27] có những chủng vi khuẩn *F. columnare* phát triển được ở mức nhiệt trên 37°C, nhưng các chủng gây bệnh trên cá rô phi thu được trong nghiên cứu không sống sót khi nhiệt độ tăng đến 35°C.

Khả năng nhân lên của vi khuẩn không có sự khác biệt lớn khi bổ sung thêm NaCl vào môi trường nuôi cấy ở mức 2,5 và 5‰ so với khi không bổ sung thêm NaCl. Tuy nhiên, khả năng nhân lên của vi khuẩn suy giảm lớn khi tiếp tục tăng thêm lượng NaCl lên mức 7,5‰ và hầu như không nhân lên ở độ mặn 10‰. Mức độ mặn 12,5‰, một phần vi khuẩn vẫn sống sót, nhưng chết hoàn toàn ở độ mặn 15‰ (hình 6B). Đối với thử nghiệm thay đổi pH môi trường nuôi cấy, khả năng phát triển của vi khuẩn không có sự khác biệt khi nuôi cấy trong điều kiện môi trường tăng sinh có pH 7, 8 ($p > 0,05$), nhưng suy giảm rõ rệt khi pH tăng lên 8,5 hoặc giảm xuống 6 ($p < 0,05$), với mật độ đạt được ở pH 6 cao hơn ở pH 8,5. Vi khuẩn *F. columnare* không có khả năng sống sót khi pH môi trường nuôi cấy tăng lên 9 hoặc giảm xuống mức 5 (hình 6C). So với các nghiên cứu của L.R. Suomalainen và cs (2006b) [31], ảnh hưởng của độ mặn và pH lên khả năng phát triển của chủng vi

khảo thu được trong nghiên cứu khá tương đồng với chủng phân lập từ cá có vảy ở vùng Finland. Mặc dù chưa có các thí nghiệm đánh giá một cách chính xác nhưng khả năng phát triển kém của vi khuẩn trong điều kiện mặn lợ (>10‰ và pH>8) cũng là cơ sở giải thích cho thực tế không có báo cáo về sự xuất hiện của bệnh này trên cá rô phi khi nuôi trong môi trường mặn lợ ở miền Bắc.

4. Kết luận

F. columnare là tác nhân gây chết cá rô phi nuôi ở 21 trại nuôi tại Hòa Bình, Hà Nam và Hải Dương với các triệu chứng trắng da, bạc mang trên cá nhiễm bệnh. Nghiên cứu đã phân lập và định danh thành công tác nhân gây bệnh bằng phương pháp sinh hóa và giám định bằng sinh học phân tử. Trong điều kiện nuôi cấy, vi khuẩn *F. columnare* phân lập được từ cá rô phi nhiễm bệnh phát triển tốt ở nhiệt độ mát (25-28°C), pH trung tính đến kiềm nhẹ (7-8) và độ mặn dưới 5‰. Kết quả nghiên cứu cung cấp thông tin ban đầu về bệnh *F. columnare* trên cá rô phi và là cơ sở trong việc xây dựng chiến lược phòng và điều trị bệnh, giảm thiểu thiệt hại do bệnh gây ra trong thời gian tới.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.05-2020.18. Các tác giả xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ của các nhóm sinh viên Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam và các chủ trang trại nuôi cá rô phi ở Hòa Bình, Hà Nam, Hải Dương đã giúp đỡ, tạo điều kiện trong quá trình điều tra, thu mẫu để hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A. Decostere, F. Haesebrouck, G. Charlier, et al. (1999a), "The association of *Flavobacterium columnare* strains of high and low virulence with gill tissue of black mollies (*Poecilia sphenops*)", *Veterinary Microbiology*, **67**(4), pp.287-298, DOI: 10.1016/S0378-1135(99)00050-4.
- [2] H. Figueiredo, P.H. Klesius, C.R. Arias, et al. (2005), "Isolation and characterisation of strains of *Flavobacterium columnare* from Brazil", *Journal of Fish Diseases*, **28**(4), pp.199-204, DOI: 10.1111/j.1365-2761.2005.00616.x.
- [3] C.A. Shoemaker, O.O. Fuster, C.R. Arias, et al. (2008), "*Flavobacterium columnare* genomovar influences mortality in channel catfish (*Ictalurus punctatus*)", *Veterinary Microbiology*, **127**(3-4), pp.353-359, DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.09.003.
- [4] B.R. LaFrentz, S.E. LaPatra, C.A. Shoemaker, et al. (2012), "Reproducible challenge model to investigate the virulence of *Flavobacterium columnare* genomovars in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*", *Diseases of Aquatic Organisms*, **101**(2), pp.115-122, DOI: 10.3354/dao02522.
- [5] J.A. Bader, C.A. Shoemaker, P.H. Klesius (2003), "Rapid detection of columnaris disease in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) with a new species-specific 16-S rRNA gene-based PCR primer for *Flavobacterium columnare*", *Journal of Microbiological Methods*, **52**(2), pp.209-220, DOI: 10.1016/S0167-7012(02)00208-7.
- [6] K.S. Roth, W. Yunghans, L.F. Caslake (2002), "Differences in chondroitin AC lyase activity of *Flavobacterium columnare* isolates", *Journal of Fish Diseases*, **25**(11), pp.687-691, DOI: 10.1046/j.1365-2761.2002.00421.x.
- [7] A. Decostere, F. Haesebrouck, J.F. Turnbull, et al. (1999b), "Influence of water quality and temperature on adhesion of high and low virulence *Flavobacterium columnare* strains to isolated gill arches", *Journal of Fish Diseases*, **22**(1), pp.1-11, DOI: 10.1046/j.1365-2761.1999.00132.x.
- [8] Ministry of Agriculture and Rural Development (2016), *Decision Approving The Development Plan for Tilapia Farming to 2020, with a Vision to 2030* (in Vietnamese).
- [9] A.B. Dauda, A. Ajadi, A.S.T. Fabunmi et al. (2019), "Waste production in aquaculture: Sources, components and managements in different culture systems", *Aquaculture and Fisheries*, **4**(3), pp.81-88, DOI: 10.1016/j.aaf.2018.10.002.

- [10] G. Barony, G.C. Tavares, G.B.N. Assis, et al. (2015), "New hosts and genetic diversity of *Flavobacterium columnare* isolated from Brazilian native species and Nile tilapia", *Diseases of Aquatic Organisms*, **117**(1), pp.1-11, DOI: 10.3354/dao02931.
- [11] H. Dong, B. LaFrentz, N. Pirarat, et al. (2015), "Phenotypic characterization and genetic diversity of *Flavobacterium columnare* isolated from red tilapia, *Oreochromis* sp., in Thailand", *Journal of Fish Diseases*, **38**(10), pp.901-913, DOI: 10.1111/jfd.12304.
- [12] N.N. Phuoc, N.T.H. Linh, N.T.X. Hong (2020), "Initial research on disease caused by *Flavobacterium columnare* bacteria on tilapia (*Oreochromis* sp.) raised in Thua Thien Hue", *Journal of Agriculture and Rural Development*, **7**, pp. 109-116 (in Vietnamese).
- [13] A.M. Declercq, F. Haesebrouck, W.V. Broeck, et al. (2013), "Columnaris disease in fish: A review with emphasis on bacterium-host interactions", *Veterinary Research*, **44**(1), pp.1-17, DOI: 10.1186/1297-9716-44-27.
- [14] K.D. Cain, B.R. LaFrentz (2007), "Laboratory maintenance of *Flavobacterium psychrophilum* and *Flavobacterium columnare*", *Current Protocols in Microbiology*, **6**(1), DOI: 10.1002/9780471729259.mc13b01s6.
- [15] H. Kunttu, E.I. Jokinen, E.T. Valtonen, et al. (2011), "Virulent and nonvirulent *Flavobacterium columnare* colony morphologies: Characterisation of chondroitin AC lyase activity and adhesion to polystyrene", *Journal of Applied Microbiology*, **111**(6), pp.1319-1326, DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05149.x.
- [16] J.F. Bernardet, P.A. Grimont (1989), "Deoxyribonucleic acid relatedness and phenotypic characterization of *Flexibacter columnaris* sp. nov., nom. rev., *Flexibacter psychrophilus* sp. nov., nom. rev., and *Flexibacter maritimus* Wakabayashi, Hikida, and Masumura 1986", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **39**(3), pp.346-354, DOI: 10.1099/00207713-39-3-346.
- [17] N.B. Buller (2004), *Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals: A Practical Identification Manual*, CABI.
- [18] J.F. Bernardet, J.P. Bowman (2006), "The genus *flavobacterium*", *Prokaryotes*, **7**, pp.481-531, DOI: 10.1007/0-387-30747-8_17.
- [19] T.L. Welker, C.A. Shoemaker, C.R. Arias, et al. (2005), "Transmission and detection of *Flavobacterium columnare* in channel catfish *Ictalurus punctatus*", *Diseases of Aquatic Organisms*, **63**(2-3), pp.129-138, DOI: 10.3354/dao063129.
- [20] H. Dong, S. Senapin, B. LaFrentz, et al. (2016), "Virulence assay of rhizoid and non-rhizoid morphotypes of *Flavobacterium columnare* in red tilapia, *Oreochromis* sp., fry", *Journal of Fish Diseases*, **39**(6), pp.649-655, DOI: 10.1111/jfd.12385.
- [21] P. Womongkol, S. Sukhavachana, K. Ampolsak, et al. (2018), "Genetic parameters for resistance against *Flavobacterium columnare* in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)", *Journal of Fish Diseases*, **41**(2), pp.321-328, DOI: 10.1111/jfd.12728.
- [22] L.R. Suomalainen, H. Kunttu, E.T. Valtonen et al. (2006a), "Molecular diversity and growth features of *Flavobacterium columnare* strains isolated in Finland", *Diseases of Aquatic Organisms*, **70**(1-2), pp.55-61, DOI: 10.3354/dao070055.
- [23] B. Austin, D.A. Austin (2016), *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish*, Springer, DOI: 10.1007/978-3-319-32674-0.
- [24] C.A. Shoemaker, B.R. LaFrentz, E. Peatman et al. (2018), "Influence of native catfish mucus on *Flavobacterium columnare* growth and proteolytic activity", *Journal of Fish Diseases*, **41**(9), pp.1395-1402, DOI: 10.1111/jfd.12833.
- [25] B. Griffin (1991), "Characteristics of a chondroitin AC lyase produced by *Cytophaga columnaris*", *Transactions of the American Fisheries Society*, **120**(3), pp.391-395, DOI: 10.1577/1548-8659(1991)120<0391:COACAL>2.3.CO;2.
- [26] J.C. Newton, T.M. Wood, M.M. Hartley (1997), "Isolation and partial characterization of extracellular proteases produced by isolates of *Flavobacterium columnare* derived from channel catfish", *Journal of Aquatic Animal Health*, **9**(2), pp.75-85, DOI: 10.1577/1548-8667(1997)009<0075:IAPCOE>2.3.CO;2.
- [27] A. Decostere, F. Haesebrouck, L.A. Devriese (1998), "Characterisation of four *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter columnaris*) strains isolated from tropical fish", *Veterinary Microbiology*, **62**(1), pp.35-45, DOI: 10.1016/S0378-1135(98)00196-5.
- [28] C. Michel, S. Messiaen, J.F. Bernardet (2002), "Muscle infections in imported neon tetra, *Paracheirodon innesi* Myers: Limited occurrence of microsporidia and predominance of severe forms of columnaris disease caused by an Asian genomovar of *Flavobacterium columnare*", *Journal of Fish Diseases*, **25**(5), pp.253-263, DOI: 10.1046/j.1365-2761.2002.00364.x.
- [29] I. Dalsgaard (1993), "Virulence mechanisms in *Cytophaga psychrophila* and other Cytophaga-like bacteria pathogenic for fish", *Annual Review of Fish Diseases*, **3**, pp.127-144, DOI: 10.1016/0959-8030(93)90032-7.
- [30] A. Decostere (2002), "*Flavobacterium columnare* infections in fish: The agent and its adhesion to the gill tissue", *Verhandelingen-Koninklijke Academie Voor Geneeskunde Van België*, **64**(6), pp.421-430.
- [31] L.R. Suomalainen, H. Reunanen, R. Ijäs, et al. (2006b), "Freezing induces biased results in the molecular detection of *Flavobacterium columnare*", *Applied and Environmental Microbiology*, **72**(2), pp.1702-1704, DOI: 10.1128/AEM.72.2.1702-1704.2006.