

文章编号:1000 - 0615(2006)01 - 0103 - 05

网箱养殖大黄鱼诺卡氏菌病的初步研究

王国良, 袁思平, 金 珊

(宁波大学生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘要:首次报道了大黄鱼诺卡氏菌病的发生情况。病鱼以体表和心、脾、肾等内脏出现白色结节为主要症状, 平均死亡率 15%。对病鱼进行细菌分离培养和光镜、电镜检查, 均发现长或短的丝状分枝状杆菌。用分离菌株作回归感染, 证实为该大黄鱼结节病的病原菌。对病原菌的基本生物学特性进行了研究, 确定病原为诺卡氏菌。

关键词:大黄鱼; 诺卡氏菌病; 诺卡氏菌; 网箱养殖

中图分类号: S965.322 文献标识码: A

Preliminary study on nocardiosis in cage-reared large croaker, *Pseudosciaena crocea* (Richardson)

WANG Guo-liang, YUAN Si-ping, JIN Shan

(College of Life-science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: An epizootic in seawater cage-reared large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*, in China from September to November 2003 was caused by a *Nocardia* sp. The cumulative mortality was 15% and diseased fish were 16 months old with total length from 20 to 30 cm. Multiple, white nodules, 0.1 - 0.3 cm in diameter, were scattered on the heart, spleen and kidney. The morphology of isolated bacteria from Lowenstein-Jensen medium (LJM) and tryptic soy agar (TSA) were Gram-positive, branching, bead-like or long, slender, filamentous rods. Experimental infection indicated that the isolated bacterium was pathogen responsible for the mortalities and the bacterium colonizes the fish via skin or gill, and intragastric exposure to the pathogen was less effective as a route of infection. Based on the symptom of diseased fish and the growth characteristics, morphological, physiological, and biological properties of the bacterium, the isolated were identified as *Nocardia* sp.

Key words: *Pseudosciaena crocea*; nocardiosis; *Nocardia*; cage-rear

大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 因其暖水性、广食性、生长快、肉质鲜美、营养丰富和经济效益好等特点, 近年来一直是我国东南沿海主要的海水养殖经济鱼类之一, 遍布福建、浙江、广东、台湾和江苏等省。产业的发展创造了巨大的社会和经济效益。但由于集约化程度过高、种质退化、近海环境污染、养殖海域老化等诸多原因, 病害逐渐增多, 不时出现新的种类。近两年, 浙江台州、舟山等地网箱养殖大黄鱼出现了一种以体表和内脏出现白色结节为主要症状的疾病, 该病危害严重, 持

续时间长, 造成大批鱼死亡。目前国内外还没有大黄鱼患该病的报道。为此我们对该病进行了初步研究, 确定为诺卡氏菌病。

1 材料与方法

1.1 病鱼来源

病鱼于 2003 年 10 月采自浙江台州大陈岛海水网箱养殖鱼排, 体长 20 ~ 30 cm, 体重 150 ~ 300 g。

收稿日期: 2004-12-14

资助项目: 浙江省自然科学基金项目 (Y304078); 浙江省教育厅项目 (20051691)

作者简介: 王国良 (1955 -), 男, 浙江定海人, 教授, 主要从事水产动物病害研究。Tel: 0574 - 87600737, E-mail: wanggl@nbip.net

1.2 流行病学调查与疾病症状观察

对该病的流行情况进行调查。观察大黄鱼网箱养殖的水域环境及活动情况,并取濒死病鱼与正常鱼进行体表及内部解剖病理比较观察,确定该病各病程的典型症状。

1.3 细菌分离培养及菌丝观察

选取具有典型症状的濒死病鱼,无菌操作取少量心、脾、肾组织上的白色结节分别在 TSA、L-D 和小川平板培养基上划线分离,28℃ 恒温培养 7~10 d 后纯化细菌,分离菌株编号为 H 031016。用扞片法在 TSA 培养基上培养分离菌株,28℃ 恒温培养 7~10 d 后观察菌丝体。

1.4 回归感染

实验用鱼体长 24~26 cm,体重 150~200 g,分注射、口灌、浸泡和 3 个对照组,每组 15 尾。在养殖海区网箱中进行,试验水温 22~26℃。

分离菌株在 TSA 斜面上 28℃ 培养 7 d 后,用无菌生理盐水洗下菌苔,稀释成所需浓度的菌悬液(平板倾注法计算菌悬液浓度),进行腹腔注射(IP)、口灌感染(IG)。每尾注射 0.5 mL,口灌每尾 1 mL。两对照组分别注射和口灌等量的无菌生理盐水。

将分离菌株于 3 000 mL 的 TSA 液体培养基中扩大培养 7 d,然后在 4℃、8 000 r·min⁻¹下,离心 30 min,无菌的生理盐水清洗沉淀 3 次,再用无菌的生理盐水配制成 3 000 mL 菌悬液,平板倾注法计算菌悬液浓度。在水族箱中将菌液用养殖海水稀释 15 倍,将实验鱼浸于菌液中 20 min。对照组为自然组。

观察感染发病的病鱼症状,发现死鱼及时捞出,解剖检查其内脏器官病变情况,同时作细菌分离。

1.5 病原菌鉴定

电镜观察 将分离菌株制成菌悬液,吸取一滴置于铜网膜上,醋酸铀染色,日立 H-300 型透射电子显微镜观察。

在斜面上取一小块长有分离菌株的培养基,2.5%戊二醛固定 2 h,梯度乙醇脱水,临界点干燥,真空喷金,日立 S-450 型扫描电子显微镜扫描观察。

将病鱼肾脏组织用 2.5%戊二醛固定 2 h, Epon 包埋, LKB 超薄切片机切片,醋酸铀染色,日立 H-300 型透射电子显微镜观察。

生理生化实验 按文献[1-3]的方法相应属、种鉴定有关内容和方法,对病原菌的酶类产生、水解活性、单一碳源生长及温度耐受性进行了研究。

2 结果

2.1 流行情况

诺卡氏病主要发生在浙江沿海网箱养殖大黄鱼,患病对象主要为 2 龄鱼,发病季节在 9-11 月。病情发展缓慢,但发病和死亡率较高。据调查,2003 年 9-11 月在浙江台州大陈岛网箱养殖的 30 万尾大黄鱼中,因该病而死亡 4 万余尾,平均发病率达 20%,平均死亡率达 15%,病情重的网箱,死亡率可达 60%。发病持续时间较长,给养殖生产带来很大损失。

2.2 病鱼的症状

患病初期,病鱼体表有擦伤或损伤症状,反应迟钝,食欲下降,上浮水面离群独游。随着病情加重,部分病鱼体表开始充血、发炎,逐渐溃烂,各鳍也有溃烂出血,随后逐渐死亡。解剖观察,内脏有明显的病变,心、脾、肾等内脏稍有肿大,而且有大量白色结节(图 1),直径 1~3 mm。将结节内物质作涂片,镜检发现大量短或细长杆状或分枝状革兰氏阳性菌体。

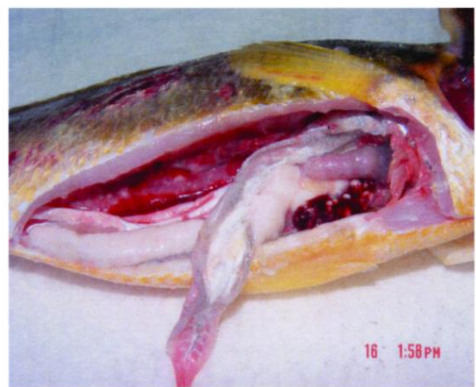


图 1 病鱼脾、肾白色结节

Fig. 1 White nodules in spleen and kidney of diseased fish

2.3 细菌分离

心、脾、肾组织上的白色结节在 L-J 和小川培养基上长出淡黄色沙粒状菌落,在 TSA 培养基上长出白色沙粒状菌落。将菌落作涂片,观察到与直接用病鱼组织涂片相同的菌体。在这些培养基上未见其它细菌生长。

2.4 回归感染

感染试验结果表明,该菌即为大黄鱼结节病的病原菌,对大黄鱼有较强的致病性,病程较长,死亡率 100% (表 1)。

试验鱼在感染后 10 d 左右,注射和浸泡组有鱼开始游动迟缓,上浮水面,体表和各鳍基部有发红或出血症状,随后几天连续有鱼死亡,到 20 d 时这两组全部死亡。而口灌感染组没有死亡,也无

任何症状。3 组对照无任何症状。

发病鱼解剖发现心、脾都有大量白色结节,肾脏充血,肿大,肝脏稍肿大,变白灰色。与自然发病鱼症状基本相似。从病变组织心、脾、肾、肝、肌肉中均分离到纯度一致的细菌,菌落形态、菌体形态及基本理化特性与从自然发病鱼体分离的原菌株完全一致。

表 1 回归感染实验结果

Tab. 1 Results of artificial infection experiments

组别 group	试验尾数 number	菌液浓度 (CFU mL ⁻¹) bacteria density	剂量 (mL) dose	感染后死亡数及死亡时间 (d) no. and time of fish death																死亡尾数 no. of dead fish	死亡率 (%) mortality
				10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20							
注射 IP	15	1.05 × 10 ⁸	0.5	0	0	1	1	2	4	3	2	1	1	0	15	100					
口灌 IG	15	1.05 × 10 ⁸	1.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
浸泡 immersion	15	1.47 × 10 ⁷	20 *	0	0	0	1	2	3	4	2	2	0	1	15	100					
注射对照 IP control	15	生理盐水 saline	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
口灌对照 IG control	15	生理盐水 saline	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
自然组 nature	15	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					

注: * 为浸泡 20 分钟

Notes: * means immersed 20 min

2.5 病原菌生物学特性

形态特征 病原菌革兰氏阳性,好氧,具有弱抗酸性,菌体呈长或短杆状,或细长分枝状,常断裂成杆状至球状体,直径 0.2 ~ 1.0 μm,长 2.0 ~ 5.0 μm,丝状体长 10 ~ 50 μm。可单个、成对、Y 或 V 字状排列或排列成栅状,有假分枝,并具膨大或棒状末端。不运动,不生孢子。

生长特性及菌丝体 病原菌生长缓慢,在 TSA、L-D 和小川培养基上 28 ℃, 7 ~ 10 d 才能长出,菌落呈白色或淡黄色沙粒状,粗糙易碎,边缘不整齐,偶尔在表面形成皱折。用扞片法观察到该菌基丝发达、繁茂,呈分枝状 (图 2)。

生理生化特性 病原菌过氧化氢酶阳性、氧化酶阴性,还原硝酸盐,不水解酪素、黄嘌呤、酪氨酸、淀粉和明胶,能以柠檬酸盐为唯一碳源生长,具有诺卡氏菌属特有的生理生化特征^[2] (表 2),而且与其中的 *Nocardia seriolae* 完全相同。

根据形态、生长和生理生化特征,确定病原菌属于诺卡氏菌属 (*Nocardia* sp.)。

电镜观察 滴片透射观察到单个菌体为长短不一或分枝状菌体,有膨大或棒状末端,在菌体

中部或两端可见内部圆形的类核体 (图 3)。菌落扫描观察到菌体呈棒状,丛生,排列不规则 (图 4)。病鱼组织切片透射观察未见病毒颗粒,发现有大量菌体,与分离菌株的形态相同。而且菌体结构特殊,中央或两端有丝状的类核体,胞壁是三层结构,外面高电子密度层与质膜之间被一低电子密度层隔开 (图 5)。



图 2 病原菌的菌丝体 (1 000 ×)

Fig. 2 Filaments of the pathogenic bacteria

表 2 病原菌及参照菌株的生理生化特征

Tab. 2 Physiological and biological characteristics of isolate and reference strains of *Nocardia*

	<i>N. asteroides</i> N317 ^T	<i>N. seriolae</i> ATCC43993	<i>N. salmonicida</i> JCM4826 ^T	<i>N. farcinica</i> ATCC3318	fish isolate H031016
过氧化氢酶 catalase	+	+	+	+	+
氧化酶 oxidase	-	-	-	-	-
脲酶 urea	+	-	+	+	-
硝酸盐还原 nitrate	+	+	+	+	+
水解 decomposition					
七叶灵 aesculin	+	+	+	+	+
明胶 gelatin	-	-	-	-	-
淀粉 starch	-	-	-	-	-
酪素 casein	-	-	-	-	-
黄嘌呤 xanthine	-	-	-	-	-
酪氨酸 tyrosine	-	-	-	-	-
唯一碳原利用 growth on sole carbon sources					
甘露醇 mannitol	+	-	+	-	-
阿拉伯糖 arabinose	-	-	-	+	-
山梨醇 sorbitol	+	-	+	-	-
柠檬酸盐 citrate	+	+	+	-	+
在 45 °C 下生长 growth at 45 °C	-	-	-	+	-



图 3 病原菌的个体形态 (12 000 ×)

Fig. 3 Pathogenic bacteria



图 5 病鱼组织切片透射观察 (30 000 ×)

Fig. 5 Transmission electron micrograph of tissue of diseased fish

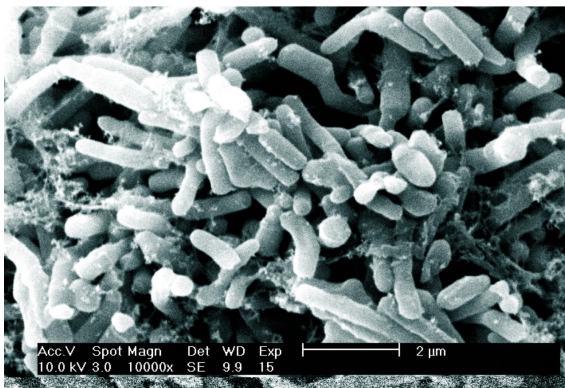


图 4 病原菌菌体形态扫描观察 (10 000 ×)

Fig. 4 Scanning electron micrograph of the pathogenic bacteria

3 分析与讨论

诺卡氏菌是一种革兰氏阳性丝状杆菌,广泛分布在土壤、活性污泥、水、动植物和人的组织中,以腐生为主。一些菌株是人和动物的机会致病菌^[2]。在水产动物中,首例报道诺卡氏菌病的是虹彩脂鱼^[4],此后该病在虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、黄尾鲷 (*Seriola quinqueradiata*)、斑鳢 (*Channa maculata*)、大西洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*)、大口鲈 (*Micropterus salmoides*) 和海鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 等水产养殖动物中有报道^[3-9]。

患病大黄鱼从体表和内部症状看,与以往其他鱼类诺卡氏菌病的症状十分相似,病原菌在形态、生长和生理生化等基本特征上都具备了诺卡氏菌属特有的生物学特征。其 3 层的胞壁结构,与 Friedman^[6] 所描述的 *N. crassostreae* 和 *N. asteroides* 的结构极为相似。根据这些特征,本次网箱养殖大黄鱼疾病应为诺卡氏菌病,确定病原菌为诺卡氏菌 (*Nocardia* sp.)。由于诺卡氏菌各种间在生理生化特征上还没有完全一致的分类标准,近几年分子生物技术的发展,建立了新的分类标准(如 16S rRNA 基因序列同源性)^[2]。故对该病原菌具体种的确定还在进一步研究。

诺卡氏菌在海水中的含量实际并不高,曾被认为是一种机会致病菌,当养殖鱼类体质虚弱、免疫力低下时,通过呼吸或饵料而感染^[7,8]。从回归感染试验结果分析,注射和浸泡感染都能使实验鱼致病,而口灌感染不致病,这说明在自然情况下该菌从鱼体损伤部位或通过鳃部进入体内的机会较大,而通过饵料进入体内的机会较小。从发病器官来看,发病最严重的器官都是与血液循环有密切关系的器管,说明该菌是通过进入血液循

环而达到各器官,然后在各器官组织中固着,逐渐生成菌丝体而形成结节。由此推断,在自然情况下由于网箱养殖的集约化程度高,养殖密度大,鱼体容易损伤,体质下降。由此,给病原菌提供了致病机会。

由于诺卡氏菌生长较慢,造成病情不剧烈,在发病前期无症状或症状不明显,但病情持续时间长,发病率和死亡率都较高,故给该病的早期诊断和防治带来极大困难。诺卡氏菌曾危害日本鳧养殖多年,被认为是日本水产养殖中最主要的病原菌之一^[9]。也是大西洋牡蛎养殖的主要病原菌之一^[6]。近年来对我国台湾水产养殖业影响较大,先后在乌鳢、大口鲈和海鲈等养殖鱼类中感染诺卡氏菌,造成巨大的经济损失^[3]。

大黄鱼诺卡氏菌病是在我国大陆水产动物养殖中首次发现,也是国内外养殖大黄鱼首次发现感染诺卡氏菌,应该引起相关学者的关注。在水产动物养殖中,对致病诺卡氏菌的相关研究并不多,故有必要对大黄鱼诺卡氏菌病在病原菌的分类鉴定、快速检测、致病机理和预防治疗等方面作进一步研究。

参考文献:

- [1] Williams S T, Sharpe M E, Holt J G. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 4[M]. Baltimore: The Williams and Wilkins Co., 1989. 2348 - 2404.
- [2] 刘志恒, 姜成林. 放线菌现代生物学与生物技术[M]. 北京: 科学出版社, 2004. 77 - 80.
- [3] Chen S C, Lee J L, Lai C C, et al. Nocardiosis in sea bass, *Lateolabrax japonicus*, in Taiwan[J]. J Fish Dis, 2000, 23 (5): 299 - 307.
- [4] Valdez I E, Conroy D A. The study of a tuberculosis-like condition in neon tetras (*Hyphessobrycon innesi*). Characteristics of the bacterium isolated[J]. Microbiologia Espanola, 1963, 16: 249 - 253.
- [5] Chen S C, Tung M C, Tsai W C. An epizootic in Formosa snakehead fish (*Channa maculata* Lacepede), caused by *Nocardia asteroides* in fresh water pond in southern Taiwan[J]. Coa Fish Ser, 1989, 15: 42 - 48.
- [6] Friedman C S. *Nocardia crassostreae* sp. nov., the causal agent of nocardiosis in Pacific oysters[J]. Int J Syst Bacteriol, 1998, 1: 237 - 246.
- [7] Lai K C, Chen S N, Kou G H. Studies on the infection of *Nocardia* sp. in cultured largemouth bass (*Micropterus salmoides*, Lacepede)[J]. Coa Fish Ser, 1991, 29: 1 - 15.
- [8] Bransden M P, Carson J, Munday B L, et al. Nocardiosis in tank-reared Atlantic salmon, *Salmo salar* L [J]. J Fish Dis, 2000, 23 (1): 83 - 85.
- [9] Kusuda R, Salati F. Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan[J]. Annu Rev Fish Dis, 1993, 3: 69 - 85.