

嗜水气单胞菌引致的金钱鱼细菌性疾病

张庆华^{1,2*}, 马文元¹, 陈彪¹, 刘至治², 徐华东¹,
张秋月¹, 王晓冰², 贾亮²

(1. 上海海洋大学水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 为了分离鉴定实验室养殖的金钱鱼暴发性疾病的病原, 利用传统病原分离的方法, 从病鱼肝脏分离得到一株G⁻短杆菌(Ah201416), 对其进行电镜观察和生理生化鉴定, 对病鱼组织进行病理切片分析, 并根据科赫法则, 用分离株对健康金钱鱼进行人工感染。结果显示, 该菌株电镜下观察细菌大小为0.8~1.0 μm×1.0~2.0 μm(宽×长), 无芽孢和荚膜, 生理生化特性与嗜水气单胞菌基本一致; 16S rRNA序列(登录号: KR006248)与GenBank中嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, AhATCC7966)的16S rRNA基因序列的同源性高达99%, 系统进化树与Ah聚为一支。病理切片分析发现, 发病金钱鱼与正常金钱鱼相比, 鳃小片细胞不同程度地脱落, 伴有白细胞浸润; 肠绒毛结构消失, 肌肉层疏松明显; 肾脏中肾小管细胞脱落, 管腔中有坏死细胞, 并出现不同程度的颗粒变性; 肝脏细胞形态不规则, 伴有血细胞浸润等病理损伤。人工感染实验表明, 其对健康金钱鱼96 h的半数致死剂量(LD₅₀)为7.35×10⁷ CFU/mL。研究表明, 发病金钱鱼中分离的Ah201416菌株为嗜水气单胞菌, 丰富了金钱鱼细菌性病原的研究, 此结果为金钱鱼细菌性疾病的防治和养殖业的健康发展提供了重要的理论依据。

关键词: 金钱鱼; 嗜水气单胞菌; 病理损伤; 半数致死剂量

中图分类号: S 941.42

文献标志码: A

金钱鱼(*Scatophagus argus*), 又名金鼓鱼, 属鲈形目(Perciformes)、金钱鱼科(Scatophagidae)、金钱鱼属(*Scatophagus*)。国际上金钱鱼科仅金钱鱼1属3种, 为广盐性亚热带鱼类。原产于印度尼西亚、菲律宾、泰国等国家, 分布在中国东南沿海的金钱鱼是中国金钱鱼科的唯一一种。成鱼体长20~30 cm, 体扁圆形, 银白色, 体表两侧腹部有稀疏的数十黑色圆斑, 似金钱状。该鱼体表两侧背部有数条黑色横带, 形态别致, 深受水族爱好者的喜欢, 属名贵观赏鱼类。同时由于其肉质细嫩、味道鲜美, 且具有较高的营养价值, 成为兼具食用和观赏双重价值的大众新宠。

现阶段国内外对于金钱鱼的研究主要集中在生物学特征^[1-3]、性腺发育和产卵^[4-5]、肌肉成分^[6]、人工养殖^[7]和细胞系的构建^[8]等方面, 对于金钱鱼病害的研究曾有吴金英等^[9]报道了惠州长宫吸虫寄生在金钱鱼的肠道; 庞启华^[10]报道了米氏后海盘虫和粗钩后海盘虫寄生在金钱鱼鳃部; 2012年, 罗璋等^[11]从与金钱鱼隶属于同一科的患病银鼓鱼(*Selenotoca multifasciata*)的肾脏组织中分离得到一株海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)。迄今为止, 未见金钱鱼细菌性病原的报道。目前, 水产动物的病害仍以细菌性疾病为主, 各种水生的病原菌作为主要的传染性疾病的病原造成了巨大的经济损失, 因此, 对金钱鱼的细

收稿日期: 2015-07-15 修回日期: 2015-12-24

资助项目: 上海市教育委员会科研创新项目(13ZZ127); 教育部留学回国人员科研启动基金(D-8002-15-0042); 上海海洋大学博士启动基金(A-0209-13-0105344); 中美海洋研究中心(A1-0209-13-0805)

通信作者: 张庆华, E-mail: qhzhang@shou.edu.cn

菌性疾病进行深入地研究迫在眉睫。

2014年6月, 上海海洋大学某实验室购买的金钱鱼暴发严重疾病, 发病率达50%以上。患病鱼主要症状为反应迟钝、摄食量减少, 体表点状出血; 鳃部黏液增多、充血; 腹部肿胀伴有腹水, 肛门红肿; 胸鳍、背鳍、尾鳍和臀鳍不同程度发白、溃烂; 肠道内无食并充满黄色脓水状积液; 肝脏发白。本实验室立即对发病鱼进行病原分离、分类鉴定, 电镜扫描, 病鱼组织病理切片观察及健康金钱鱼人工感染等一系列工作, 最终确定导致本次金钱鱼患病的病原菌为嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, Ah), 为金钱鱼细菌性疾病的预防和健康养殖提供了重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

患病金钱鱼购自广东湛江雷州湾, 体长(5.1±0.3) cm。2014年6月饲养于上海海洋大学某实验室期间发病。健康金钱鱼购于上海市蓝天水族店, 体长(4.3±0.5) cm, 饲养于塑料水族箱(长×宽×高=80 cm×40 cm×40 cm)中, 水深30 cm, 增氧泵充氧, 水温(28±1) °C, 每天投喂2次观赏鱼浮性饲料, 暂养1周后开始实验。细菌微量生化反应管购自杭州天和微生物试剂有限公司。鲤(*Cyprinus carpio*)上皮瘤细胞(EPC)由上海海洋大学农业部国家水生动物病原库(National Pathogen Collection Center of Aquatic Animal, NPCCAA)提供, 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, Sa)为本实验室保存。

1.2 病原的分离

在无菌环境下, 按照病原检查的程序, 对濒死病鱼的体表及内脏器官进行寄生虫、病毒和细菌的检查。参照曾伟伟等^[12]的方法, 取肝脏、肾脏和鳃进行病毒的分离及EPC细胞的传代培养。取肝脏、肾脏和脾脏组织, 在营养琼脂(NB)平板表面涂抹、划线接种, 28 °C培养24 h, 纯化, 获得纯培养的优势菌株, 保存, 备用。

1.3 细菌形态观察

将分离纯化的菌株无菌操作划线接种于营养琼脂培养基中, 28 °C培养20 h, 按照文献^[13]方法进行扫描电镜样品的制备, 扫描、观察细菌形态。参照国标法(GB/T18652-2002), 以不具运

动性的金黄色葡萄球菌做阴性对照, 利用嗜水气单胞菌的半固体鉴别培养基(*A. hydrophila* medium, AHM)进行细菌运动性观察实验。

1.4 生理生化鉴定

将Ah201416按照文献^[14]的方法稍作改动进行生理生化鉴定。取分离株接种于营养肉汤培养基, 28 °C摇床过夜培养, 吸取50 μL菌液加入微量生化管中, 置于28 °C培养并观察结果。参照伯杰氏细菌鉴定手册^[14]中细菌生理生化指标进行确认。

1.5 16S rRNA 序列测定与分析

16S rRNA序列的PCR扩增与测序 菌液样品由上海杰李生物公司进行测序。采用16S rRNA通用引物: 27F: 5'-AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3'。反应体系: 2×Taq MasterMix (Vazyme) 20 μL, 10 μmol/L引物各0.8 μL, 模板1.5 μL, ddH₂O补充至40 μL。PCR扩增程序为94 °C变性3 min, 然后进入35个循环: 94 °C变性30 s, 56 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 最后72 °C延伸10 min。

序列分析与系统发育树的构建 测序结果在NCBI中的Blast程序进行同源性检索, 与GenBank中已知的基因片段进行比较, 获取菌株序列号(accession number)。选取同源性较高的基因序列, 用MEGA 5.0软件进行多重比较后采用邻位相连法构建系统发育树。

1.6 病理组织学观察

取发病鱼的鳃、心脏、肝脏、肾脏、脾脏、胃和肠, 以健康金钱鱼的相同组织作为对照, 参照有关组织病理学研究方法^[15-16]进行。将各种组织在 Bouin氏固定液中固定24 h后, 酒精梯度脱水(75%、80%、90%、95%和100%酒精)各1 h, 透明采用乙醇: 二甲苯(1:1) 0.5 h、二甲苯 I 10 min、二甲苯 II 10 min, 在65 °C条件下浸蜡, 蜡 I (含少量二甲苯)1.5 h、蜡 II 1.5 h, 包埋后切片, 厚度4 μm, 40 °C水温展片后捞出, 37 °C烘片过夜, H.E染色, 封片, 利用OLYMPUS BX53显微镜观察, CellSens Entry软件(Olympus, Japan)进行拍照。

1.7 人工感染实验与LD₅₀的测定

将Ah201416菌株接种于营养肉汤液体培养基, 28 °C摇床震荡培养20 h, 用0.85%无菌生理

盐水制成菌悬液，稀释成 3.1×10^9 、 3.1×10^8 、 3.1×10^7 、 3.1×10^6 、 3.1×10^5 、 3.1×10^4 CFU/mL共6个浓度，腹腔注射健康鱼6组，8尾/组，根据预实验结果确定注射剂量为0.2 mL/尾，对照组注射等剂量0.85%的生理盐水。实验鱼分别置于各组水族箱中，实验期间连续充气， $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ 水温饲养。每隔3 h依次观察实验鱼发病和死亡情况。根据死亡情况计算 LD_{50} ，并对人工感染后有典型症状的金钱鱼肝脏进行细菌再分离，验证再分离菌株与原致病菌是否一致。

2 结果

2.1 发病鱼症状

发病鱼体表点状出血；鳃部黏液增多、充血；腹部肿胀伴有腹水，肛门红肿；胸鳍、背鳍、尾鳍和臀鳍不同程度发白、溃烂；肠道内无食并充满黄色脓水状积液；肝脏发白(图版 I)。

2.2 病原分离及细菌的形态观察

按照病原检查的程序，在发病鱼体表、鳃及内脏均未发现寄生虫。肝脏和肾脏的组织研磨样品在EPC细胞上没有出现细胞病变(cytopathic effect, CPE)，连续盲传4代后，也未分离得到病毒。肝脏样品中分离到一株优势细菌，命名为Ah201416，该菌株革兰氏染色呈阴性，菌体短杆状，电镜照片显示其大小为 $(0.8 \sim 1.0) \mu\text{m} \times (1.0 \sim 2.0) \mu\text{m}$ (宽 \times 长)，无芽孢和荚膜(图1)；在AHM半固体琼脂柱中沿穿刺线向周围扩散生长，培养基变黄，对照组Sa菌株只沿穿刺线生长，培养基仍呈紫色，说明分离株具有运动性(图2)；在营养琼脂平板上 28°C 培养24 h后，菌落呈圆形，乳白色，湿润，不透明，边缘整齐，菌落直径1.0~1.5 mm；在营养肉汤培养基中底层呈混浊生长，表层较清，稍有菌膜，摇动可使菌体均匀散开。肾脏和脾脏样品中未分离到典型优势菌株。

2.3 生理生化鉴定结果

常规生理生化结果显示，分离菌株Ah201416可发酵乳糖、麦芽糖、蔗糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖和葡萄糖并产酸、产气，不发酵木糖和鼠李糖；甘露醇实验阳性，山梨醇和肌醇实验阴性；可产生红色吡啶环；氧化酶阳性；接触酶、精氨酸脱羧酶、赖氨酸脱羧酶、七叶苷和

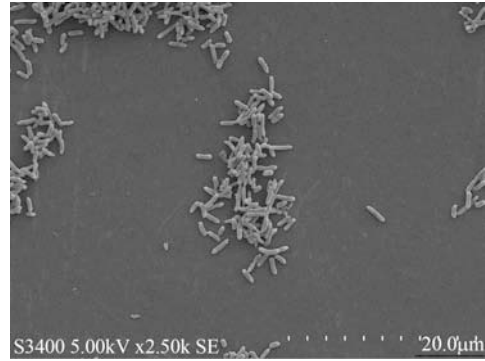


图1 菌株Ah201416的电镜图

Fig. 1 Electron micrographs of strain Ah201416



图2 菌株Ah201416的运动性

(a) 金黄色葡萄球菌；(b) 菌株Ah201416

Fig. 2 motility of strain Ah201416

(a) *S. aureus*; (b) strain Ah201416

V-P实验阳性，与嗜水气单胞菌(ATCC7966)的生理生化特性一致(表1)。

2.4 16S rRNA 序列测定结果与系统发育树分析

分离菌株Ah201416的16S rRNA序列大小为1451 bp，登陆GenBank获得的菌株登录号为KR006248，与GenBank中已知序列进行Blast比对，结果显示Ah201416株与Ah的16S rRNA基因序列的同源性最高，与Ah ATCC7966 (GenBank登录号：NC008570.1)的同源性高达99%。将Ah201416与GenBank中的其他单胞菌属细菌16S rRNA序列构建系统进化树(图3)，其与Ah聚为一支，表明Ah201416菌株为嗜水气单胞菌(Ah)。

表 1 分离株 Ah201416 的生理生化特性

项目 item	Ah201416 观察结果 observed results	嗜水气单胞菌 ATCC7966 <i>A. hydrophila</i> ATCC7966
乳糖 lactase	+	+
麦芽糖 maltose	+	+
蔗糖 sucrose	+	+
阿拉伯糖 arabinose	+	+
木糖 xylose	-	-
半乳糖 galactose	+	+
甘露糖 mannose	+	+
鼠李糖 rhamnose	-	-
甘露醇 mannitol	+	+
山梨醇 sorbitol	-	-
肌醇 inositol	-	-
吲哚 indole	+	+
氧化酶 oxidase	+	+
接触酶 catalase	+	+
精氨酸脱羧酶 arginine decarboxylase	+	+
赖氨酸脱羧酶 lysine decarboxylase	+	+
七叶苷 esculin	+	+
V-P 实验 V-P test	+	+

注: +, 阳性; -, 阴性

Notes: +, positive; -, negative

2.5 病理组织学观察结果

分析发现, 发病金钱鱼与正常金钱鱼相比, 鳃小片细胞不同程度地脱落并伴有白细胞浸润; 肠绒毛结构消失, 肌肉层疏松明显; 肾脏中肾小管细胞脱落, 管腔中有坏死细胞, 并出现不同程度的颗粒变性; 肝脏细胞形态不规则, 伴有血细胞浸润等病理损伤(图版 II)。其他组织中未发现明显的病理变化。

2.6 人工感染实验与 LD₅₀ 的测定

人工感染后实验鱼发病症状同自然发病症状基本相似, 体表可见点状出血, 腹部肿胀, 肠道无食、肿胀, 至感染后期, 有的鱼甚至出现严重的败血症症状: 如体表和肠道严重出血, 肝脏红肿充血, 腹水严重; 对照组鱼活泼健康, 无任何发病症状。从感染后的病鱼肝脏中

再次分离细菌, 经生理生化鉴定和 16S rRNA 鉴定后, 与初次分离细菌相同。据人工感染实验结果, 运用寇氏方法计算 Ah201416 菌株对健康金钱鱼 96 h 的 LD₅₀ = 7.35 × 10⁷ CFU/mL (表 2)。

表 2 菌株 Ah201416 人工感染实验结果

组别 group	病原浓度/ (CFU/mL) concentration	96 h 累计 死亡数/尾 accumulative death number	实验鱼数量 fish number	死亡率/% mortality
1	3.1 × 10 ⁴	0	8	0
2	3.1 × 10 ⁵	0	8	0
3	3.1 × 10 ⁶	0	8	0
4	3.1 × 10 ⁷	3	8	37.5
5	3.1 × 10 ⁸	6	8	75.0
6	3.1 × 10 ⁹	8	8	100
对照 control	0.85% NaCl	0	8	0

3 讨论

本实验从患病的金钱鱼肝脏中分离到一株病原菌。利用该病原菌对健康金钱鱼进行人工感染, 确有与原始发病症状相同的症状产生, 证明该菌为金钱鱼的致病菌, 符合科赫法则(Koch's law)。经生理生化特征及 16S rRNA 鉴定, 确定该病原菌为嗜水气单胞菌。对自然发病的金钱鱼进行病理切片分析, 发现其主要发病部位为鳃、肠道、肝脏和肾脏, 在其他检测组织中未见明显病理症状。究其原因可能为病鱼处于发病初期或中期, 尚未发展到败血症的地步。而实验中发现, 人工感染的金钱鱼在感染后期, 确实出现严重的败血症症状。同时, 按照病原检查的程序, 对寄生虫和病毒进行了检查, 在体表、鳃及内脏均未发现寄生虫, 也未分离到病毒。本实验首次对嗜水气单胞菌引起的金钱鱼细菌性疾病的病原进行了系统而深入的研究, 丰富了其病原学的研究内容, 对金钱鱼细菌性疾病的防治具有重要意义, 对疾病的预防和控制奠定了理论基础。

嗜水气单胞菌普遍存在于淡水、海水、污泥、淤泥以及土壤中, 是一种人兽共患病的病原^[17]。该菌能引起软体动物、鱼类、两栖类、爬行类、鸟类及哺乳类等多种动物全身性败血症或局部感染, 并

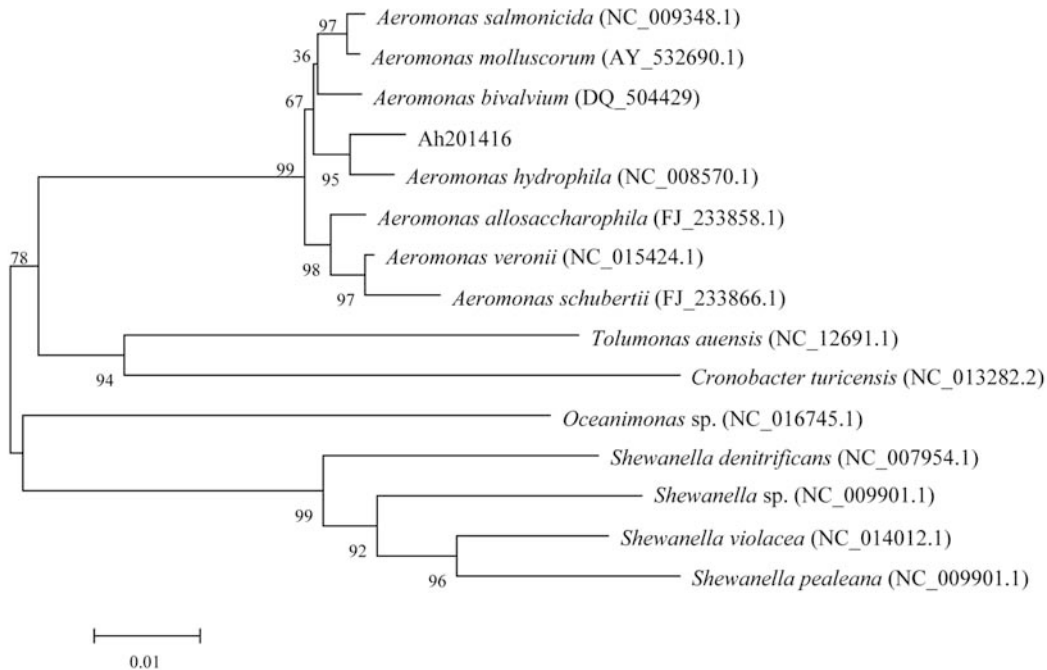


图3 Ah201416菌株基于16S rRNA基因序列的NJ系统发育树

Fig. 3 NJ phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences

常致动物死亡；引起人类急性胃肠炎、败血症及伤口感染^[18]，现已被国外列入腹泻病原菌检测范围^[19]。同时嗜水气单胞菌作为主要淡水养殖鱼类暴发性败血症的病原，引起多种水产动物感染患病，包括鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*)^[20]、青鱼 (*Mylopharyngodon piceus*)^[21]、团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)^[22]和尼罗罗非鱼 (*Oreochromis nilotica*)^[23]等。近年来，鱼源的细菌性人兽共患病的研究引起很多学者的关注，使得鱼和人类细菌感染之间的关系得到前所未有的关注，Saitanu等^[24]从患红斑病的鲤中分离得到嗜水气单胞菌；而嗜水气单胞菌也可引起金鱼 (*Carassius auratus*)^[25]、锦鲤^[26]、虎头鲨 (*Pangasius polyurandon*)^[27]的多种细菌性疾病。因此，由嗜水气单胞菌引起的广为流行的观赏鱼品种——金钱鱼的细菌性疾病应给予足够的重视。

随着人民生活水平的不断提高，人们的消费观念有所改变，对休闲娱乐的消费需求也随之提升，开始追求高品质的生活，越来越多的人喜欢养殖观赏鱼。观赏鱼作为陶冶情操的娱乐项目越来越得到大家的青睐，已成为仅次于猫和狗的七大家庭饲养宠物之一。但日益严重的观赏鱼疾病造成的巨大经济损失是限制该行业快速发展的瓶颈之一。2012—2013年，仅天津地区观赏鱼养殖疾病发生情况的调查发现，

210个病例中以细菌病和寄生虫病为主，占调查病例的80%以上，且多为细菌和寄生虫的混合感染，确定的27种观赏鱼疾病中，其中由细菌引起的疾病就占了10种。世界卫生组织的报告显示，人类越来越多地面临“共患性”疾病的挑战，从2001年的61%左右上升到10年后的75%^[28]。目前，我国对海淡水养殖的食用鱼疾病研究较多，而且也比较深入，但对观赏鱼疾病的研究甚少，一旦发病，养殖者只能参照食用鱼的方法进行防治，滥用药现象严重。因此，加强观赏鱼病原、病理、药理及防治技术等方面的研究，是突破瓶颈的途径之一，为观赏鱼产业的可持续发展提供技术保障^[29]。本实验为今后观赏鱼疾病的研究方法和防治策略提供了相应的依据，而且金钱鱼作为兼具食用性和观赏性的新品种，其所带病原的传播范围比其他单一价值的鱼类品种更加广泛，理应引起足够的重视。

感谢上海海洋大学水产与生命学院陆宏达教授和潘连德教授协助分析病理切片。

参考文献：

- [1] 兰国宝，阎冰，廖思明，等. 金钱鱼生物学研究及回顾[J]. 水产科学，2005，24(7): 39-41.

Lan G B, Yan B, Liao S M, et al. Biology of spotted

- scat *Scatophagus argus*: a review [J]. Science of Aquatic Products, 2005, 24(7): 39-41(in Chinese).
- [2] 吴波, 张敏智, 邓思平, 等. 金钱鱼雌雄个体的形态差异分析[J]. 上海海洋大学学报, 2014, 23(1): 64-69.
Wu B, Zhang Z M, Deng S P, et al. Analysis of morphological index and discrimination of male and female *Scatophagus argus* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2014, 23(1): 64-69(in Chinese).
- [3] 蔡泽平, 胡家玮, 王毅. 金钱鱼早期发育的观察[J]. 热带海洋学报, 2014, 33(4): 20-25.
Cai Z P, Hu J W, Wang Y. Observing early development of *Scatophagus argus* [J]. Journal of Tropical Oceanography, 2014, 33(4): 20-25(in Chinese).
- [4] 曾文刚, 刘振浩, 李红, 等. 金钱鱼抗缪勒氏管激素基因克隆及其在性腺发育不同时期mRNA表达水平的分析[J]. 水产学报, 2015, 39(11): 1604-1612.
Zeng W G, Liu Z H, Li H, et al. Gene cloning of anti-Müllerian hormone and analysis of its mRNA level in *Scatophagus argus* at the different development stages of gonad [J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(11): 1604-1612(in Chinese).
- [5] 崔丹, 刘志伟, 刘南希, 等. 金钱鱼性腺发育及其组织结构观察[J]. 水产学报, 2013, 37(5): 696-704.
Cui D, Liu Z W, Liu N X, et al. Histological study on the gonadal development of *Scatophagus argus* [J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(5): 696-704(in Chinese).
- [6] 施永海, 张根玉, 张海明, 等. 金钱鱼肌肉营养成分的分析和评价[J]. 食品工业科技, 2015, 36(6): 346-350.
Shi H Y, Zhang G Y, Zhang H M, et al. Evaluation of nutritive quality and nutrient components in muscle of *Scatophagus argus* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(6): 346-350(in Chinese).
- [7] 宋郁, 苏冒亮, 刘南希, 等. 金钱鱼幼鱼低温耐受能力和饵料营养需求的研究[J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21(5): 715-719.
Song Y, Su M L, Liu N X, et al. Studies on low temperature resistance and nutritional needs of *Scatophagus argus* juveniles [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2012, 21(5): 715-719(in Chinese).
- [8] 张莹莹, 梁雪梅, 曾文刚, 等. 金钱鱼肾细胞系的建立及生长特性研究[J]. 海洋与湖沼, 2014, 45(3): 651-656.
Zhang Y Y, Liang X M, Zeng W G, et al. Establishment and characterization of a new euryhaline fish kidney cell line of *Scatophagus argus* [J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2014, 45(3): 651-656(in Chinese).
- [9] 吴金英, 吕军仪. 金钱鱼体内惠州长宫吸虫种群动态分析[J]. 水生生物学报, 2002, 26(1): 82-88.
Wu J Y, Lü J Y. Studies on the population dynamics of *lenolopa Huizhouensis* in *Scatophagus argus* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2002, 26(1): 82-88(in Chinese).
- [10] 庞启华. 广东海水鱼类单殖吸虫后海盘虫属 *Metahaliotrema* Yamaguti, 1953两个种的记述[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 1996(4): 28-31.
Pang Q H. Two species of the genus *Metahaliotrema* Yamaguti 1953 from Guangdong [J]. Journal of South China Normal University (Natural Science Edition), 1996(4): 28-31(in Chinese).
- [11] 罗璋, 许杰, 韩进刚, 等. 银鼓鱼病原菌(海豚链球菌)的分离与鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(1): 95-99.
Luo Z, Xu J, Han J G, et al. Insolation and identification of pathogenetic *Streptococcus iniae* from *Selenotoca multifasciata* [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2012, 31(1): 95-99(in Chinese).
- [12] 曾伟伟, 王庆, 王英英, 等. 一株鳢科鱼源弹状病毒的分离及鉴定[J]. 水产学报, 2013, 37(9): 1416-1424.
Zeng W W, Wang Q, Wang Y Y, et al. Isolation and characterization of a rhabdovirus from snakehead fish (*Ophicephalus striatus*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(9): 1416-1424(in Chinese).
- [13] 谢家仪, 董光军, 刘振英. 扫描电镜的微生物样品制备方法[J]. 电子显微学报, 2005, 24(4): 440.
Xie J Y, Dong G J, Liu Z Y. Method of preparation of microbiological specimen for scanning electron microscope [J]. Journal of Chinese Electron Microscopy Society, 2005, 24(4): 440.
- [14] Garrity G. Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd edition [M]. Baltimore: Williams & Wilkins, 2005: 561.
- [15] 彭克美, 张登营. 组织学与胚胎学[M]. 北京: 中国农业

- 出版社, 2002: 149-155.
- Peng K M, Zhang D Y. Histology and embryology [M]. Beijing:China Agriculture Press, 2002: 149-155(in Chinese).
- [16] 卡林. 组织病理学与组织化学技术手册[M]. 北京:科学出版社, 1987: 18-20.
- Culling C F A. Handbook of histopathological and histochemical techniques [M]. Beijing:Science Press, 1987: 18-20(in Chinese).
- [17] Suarez G, Khajanchi B K, Sierra J C, *et al.* Actin cross-linking domain of *Aeromonas hydrophila* repeat in toxin A (RtxA) induces host cell rounding and apoptosis [J]. *Gene*, 2012, 506(2): 369-376.
- [18] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述[J]. 水产学报, 1992, 16(3): 282-288.
- Lu C P. Pathogenic *Aeromonas hydrophila* and the fish diseases cause by it [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1992, 16(3): 282-288(in Chinese).
- [19] 姜艳丽, 李丽丽. 嗜水气单胞菌的研究进展[J]. 黑龙江农业科学, 2015 (2): 142-146.
- Jiang Y L, Li L L. Research progress on *Aeromonas hydrophila* [J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2015 (2): 142-146(in Chinese).
- [20] 梁利国, 谢骏, 叶诗尧. 鲢病原嗜水气单胞菌分离鉴定及检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(5): 374-378.
- Liang L G, Xie S X. Identification and detection of the pathogenic *Aeromonas hydrophila* isolated from *Hypophthalmichthys molitrix* [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2013, 35(5): 374-378(in Chinese).
- [21] 梁利国, 谢骏. 青鱼病原嗜水气单胞菌分离鉴定, 毒力因子检测及药敏试验[J]. 生态学杂志, 2013, 32(12): 3236-3242.
- Liang L G, Xie J. Isolation and identification, virulence factor detection, and susceptibility test of pathogen *Aeromonas hydrophila* isolated from *Mylopharyngodon piceus* [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2013, 32(12): 3236-3242(in Chinese).
- [22] 夏飞, 梁利国, 谢骏. 团头鲂病原嗜水气单胞菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 水产科学, 2012, 31(10): 606-610.
- Xia F, Liang L G, Xie J. Isolation, identification and drug susceptibility of a pathogenic bacterial strain from bluntnose black bream *Megalobrama amblycephala* [J]. *Fisheries Science*, 2012, 31(10): 606-610(in Chinese).
- [23] 杨宁, 黄海, 张希, 等. 尼罗罗非鱼嗜水气单胞菌病的病原分离鉴定和药敏试验[J]. 水产科学, 2014, 33(5): 306-310.
- Yang N, Huang H, Zhang X, *et al.* Isolation, identification and drug sensitive test of pathogen *Aeromonas hydrophila* from Nile tilapia *Oreochromis nilotica* [J]. *Science of Aquatic Products*, 2014, 33(5): 306-310(in Chinese).
- [24] Saitanu K, Wongsawang S. Red-score disease in carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1982, 5(3): 79-86.
- [25] 周毅, 张培培, 徐晔, 等. 金鱼嗜水气单胞菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 水产科学, 2014, 33(6): 379-384.
- Zhou Y, Zhang P P, Xu H, *et al.* Identification and drug sensitivity test of pathogenic *Aeromonas hydrophila* from goldfish *Carassius auratus* [J]. *Science of Aquatic Products*, 2014, 33(6): 379-384(in Chinese).
- [26] 刘荭, 史秀杰, 高隆英, 等. 进口锦鲤暴发病原的 nested-PCR鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2002, 21(5): 414-418.
- Liu H, Shi X J, Gao L Y, *et al.* Study on the aetiology of Koi epizootic disease using the method of nested-polymerase chain reaction assay (nested-PCR) [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2002, 21(5): 414-418(in Chinese).
- [27] 赵铭武. 热带观赏鱼虎头鲨细菌性败血病的诊断与治疗[J]. 山西科技, 2015, 21(1): 80-81.
- Zhao M W. The diagnosis and treatment of bacterial septicemia of tropical ornamental fish of *Pansasius polyurandon* [J]. *Shanxi Science and Technology*, 2015, 21(1): 80-81(in Chinese).
- [28] Souza M J. One health: zoonoses in the exotic animal practice [J]. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 2011, 14(3): 421-426.
- [29] 骆小年, 刘刚, 闫有利. 我国观赏鱼种类概述与发展[J]. 水产科学, 2015 (9): 580-588.
- Luo X N, Liu G, Yan Y L. A review: Development and species of ornamental fish in China [J]. *Science of Aquatic Products*, 2015 (9): 580-588(in Chinese).

Research on *Aeromonas hydrophila* caused bacteria disease in spotted scat (*Scatophagus argus*)

ZHANG Qinghua^{1,2*}, MA Wenyuan¹, CHEN Biao¹, LIU Zhizhi², XU Huadong¹,
ZHANG Qiuyue¹, WANG Xiaobing², JIA Liang²

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

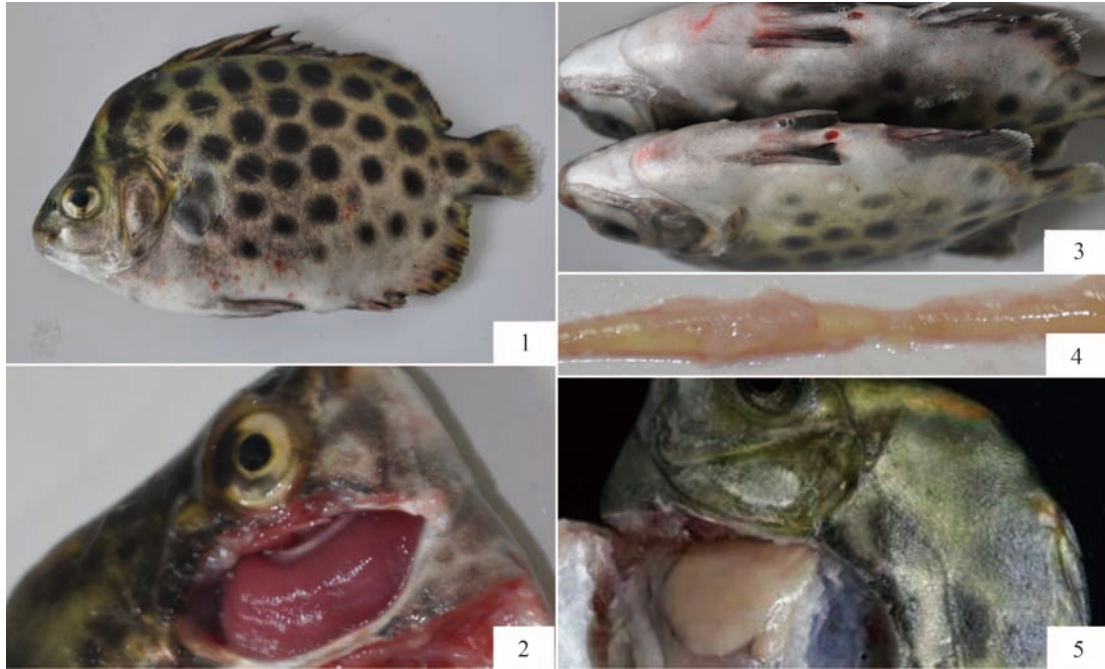
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Spotted scat *Scatophagus argus* is popularized in South China as a new resource of marine aquaculture and ornamental fish in recent years. The research of *S. argus* was focused on biological characteristics, gonad development and reproduction, composition of muscle, artificial culture and the construction of a cell line, and so on. Until now, only three parasites, including *Lenolopa huizhouensis*, *Metahaliotrema mizellei* and *M. gemiratohamula* have been recorded to exist in the gut and gill of *S. argus*. In aquaculture, priority is given only to bacterial diseases caused by various aquatic pathogenic bacteria, which led to enormous economic loss in the aquatic animals, but the bacteria diseases were not reported in the *S. argus*. Therefore, the tasks of comprehensive study on the bacterial disease in *S. argus* become more urgent and important. In order to separate and identify the pathogen of fulminant disease in *S. argus* cultured in a laboratory in Shanghai Ocean University, we used the traditional method of pathogen isolation, virus and parasite were not detected, but we obtained a bacterial strain isolated from the diseased fish liver. And then, we observed the isolate strain by the electron microscope and tested the physiological and biochemical identification, and histopathological analysis was made in the natural incidence of fish, in addition, artificial infection was also implemented according to Koch's postulates. The results show that the isolate is a Gram-negative staining, cells straight with rounded ends, 0.8–1.0 μm \times 1.0–2.0 μm , while observed by electron microscope, and consistent with *A. hydrophila* through physiological and biochemical characteristics. 16S rRNA gene sequence analysis by Blast in GenBank indicates that the isolate (accession number: KR006248) showed high levels of similarity to Ah ATCC7966 (99%). A phylogenetic tree of the isolate and other Ah strains formed a tight cluster. Histopathological analysis of diseased fish shows the pathological damages, including gill lamellae cells denudation and leukocytes infiltration in gills, abscission of intestinal villus, muscles loosening in intestine and a marked increase of pyknosis of glomerulus in kidney, infiltrating of hemocytes and inflammatory cells in liver. The healthy *S. argus* could be infected through artificial infection using the isolated bacteria. The half of lethal dose (LD_{50}) to *S. argus* in 96 h is 7.35×10^7 CFU/mL. To conclude, the Ah201416 strain was identified as *A. hydrophila* which is the pathogen for *S. argus*. This study provides a theoretical basis for disease control and prevention and calls on people to pay more attention to the potential dangers caused by *A. hydrophila* against *S. argus*.

Key words: *Scatophagus argus*; *Aeromonas hydrophila*; pathological damage; LD_{50}

Corresponding author: ZHANG Qinghua. E-mail: qhzhang@shou.edu.cn

Funding projects: Innovation Program of Shanghai Municipal Education Commission (13ZZ127); Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry (D-8002-15-0042); Doctoral Scientific Research Foundation of Shanghai Ocean University (A-0209-13-0105344); Marine Research Center between China and USA(A1-0209-13-0805)

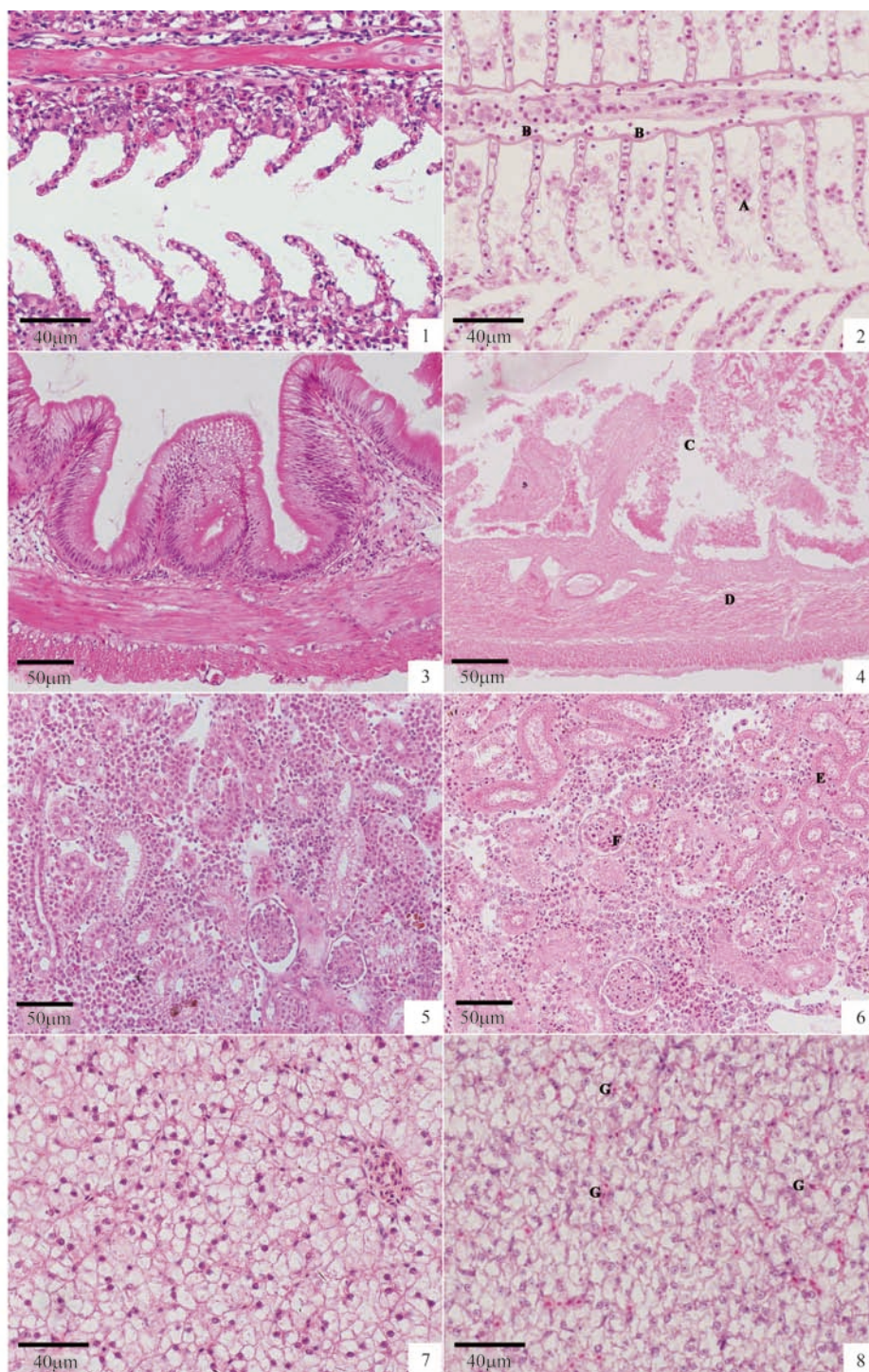


图版 I 发病金钱鱼的临床症状

1. 体表点状出血；2. 鳃部充血、黏液增多；3. 肛门红肿,腹腔肿胀,鳍条溃烂；4. 肠道充满黄色积液；5. 肝脏发白

Plate I Clinical signs of moribund *S. argus*

1. petechial hemorrhage in body surface; 2. mucus increase and congestion in gills; 3. red and swollen in anal, bloating in abdomen; fester in pterygiophore; 4. full of yellow mucus in intestine; 5. the liver whitish



图版 II 金钱鱼组织病理损伤变化

1.健康金钱鱼的鳃(600×); 2.鳃小片细胞大量脱落(A)并伴有白细胞浸润(B) (600×); 3.健康金钱鱼的肠(400×); 4.肠绒毛脱落(C), 肌肉疏松(D) (400×); 5.健康金钱鱼的肾脏(400×); 6.肾小管管腔内有脱落的细胞(E), 并出现不同程度的颗粒变性(F) (400×); 7.健康金钱鱼的肝脏(400×); 8.肝细胞形态不规则, 伴有血细胞(G) (400×)。标尺如图中所示

Plate II Pathological damages of *S. argus* tissues

1.gill of healthy *S. argus* (600×); 2.gill lamellae cells denudation (A) and leukocytes infiltration in gills (B) (600×); 3.intestine of healthy *S. argus* (400×); 4.abscission of intestinal villus (C) and muscle loosen in intestine (D) (400×); 5.kidney of healthy *S. argus* (400×); 6.cells denudation(E) and granular degeneration of kidney tubules in kidney (F) (400×); 7.liver of healthy *S. argus* (600×); 8.infiltrating of hemocytes and inflammatory cells in liver (G) (600×). Scar bar was shown in plate