



大口黑鲈鲁氏耶尔森氏菌的分离鉴定、 主要毒力基因及致病性研究

王巧煌^{1*}, 林楠¹, 元丽花¹, 季静², 林丹¹

(1. 福建省水产技术推广总站, 福建 福州 350002;

2. 福建省农林大学, 福建 福州 350002)

摘要: 为探明 2021 年 3 月福建某水库养殖大口黑鲈疾病暴发的原因, 实验从患病大口黑鲈肝脏、肾脏、脾脏中分离优势菌, 通过人工感染实验确定病原菌, 并综合 16S *rDNA* 基因序列分析、生理生化 and 质谱特征等技术对该病原菌进行种属鉴定, 同时, 进行毒力基因检测、药物敏感性实验以及组织病理学观察。结果显示, 从病鱼脾脏中分离获得 1 株优势菌并鉴定为鲁氏耶尔森氏菌; 该菌株对大口黑鲈的半致死剂量为 3.8×10^5 CFU/尾; 该菌株携带 *yrP1*、*yhlA*、*yhlB* 等毒力基因, 对恩诺沙星、盐酸多西环素、氟甲喹、硫酸新霉素、氟苯尼考等 5 种药物相对敏感。组织病理学观察发现, 鲁氏耶尔森氏菌的感染造成大口黑鲈肝脏、肾脏、脾脏不同程度的损伤, 表现为明显的变性、坏死及炎症细胞的浸润等。本研究首次报道了鲁氏耶尔森氏菌对养殖大口黑鲈的致病性, 可为养殖大口黑鲈鲁氏耶尔森氏菌病的诊断和药物防治提供参考依据。

关键词: 大口黑鲈; 鲁氏耶尔森氏菌; 分离鉴定; 致病性; 药物敏感性

中图分类号: S 941.42

文献标志码: A

大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*), 俗称淡水黄鱼, 原产于北美, 20 世纪 80 年代引入中国, 是一种深受广大养殖户和消费者喜爱且具有重要经济价值的淡水鱼类^[1]。据农业农村部统计数据, 2020 年我国大口黑鲈养殖年产量约为 61 万 t^[2]。近年来, 随着我国大口黑鲈养殖业的迅速发展, 养殖规模和集约化程度不断攀升, 其病害种类逐渐增多、危害程度不断加剧, 严重影响了大口黑鲈养殖产业的健康发展。目前, 国内已报道的养殖大口黑鲈的细菌性病原主要有嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、洋葱霍尔德氏菌 (*Burkholderia cepacia*)、诺卡氏菌 (*Nocardia* sp.)、维氏气单胞菌 (*A. veronii*)、巨型球菌 (*Macrocooccus caseolyticus*) 等^[3-7]。

鲁氏耶尔森氏菌 (*Yersinia ruckeri*) 属肠杆菌科 (Enterobacteriaceae) 耶尔森菌属 (*Yersinia*), 为革兰氏阴性短杆菌。鲁氏耶尔森氏菌是冷水性鲑科 (Salmonidae) 鱼类的常见致病菌, 可导致鲑鳟鱼类发生肠炎红嘴病, 其主要症状为体表 (尤其是嘴、鳍、泄殖孔) 及内脏器官充血、出血等^[8]。鲁氏耶尔森氏菌还能感染金鱼 (*Carassius auratus*)、木叶鲮 (*Pleuronichthys cornutus*)、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)、鳗鲡 (*Anguilla japonica*)、西伯利亚鲟 (*Acipenser baerii*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙 (*Aristichthys nobilis*) 等其他鱼类^[9-12], 并导致鱼类细菌性败血症。虽然鲁氏耶尔森氏菌感染的宿主范围较广, 但迄今未见有侵染大口黑鲈的报道。

收稿日期: 2022-02-15 修回日期: 2022-03-31

资助项目: 2022 年福建省海洋服务与渔业高质量发展专项资金; 福建省 2017 年农业“五新”工程“低碳高效循环海水养殖技术创新与示范推广”

通信作者: 王巧煌 (照片), 从事水生动物病害与防治研究, E-mail: 535681286@qq.com



2021年3月,福建某水库养殖大口黑鲈出现大量死亡,累计死亡率高达30%以上。病鱼的主要外观症状表现为食欲减退、嘴巴周围及体表出血等病症。为探明此次疾病暴发的原因,本实验从患病大口黑鲈中分离致病菌并研究其致病性,旨在为大口黑鲈养殖病害防控提供理论参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

患病大口黑鲈采自福建某养殖水库,健康大口黑鲈由福建天马科技集团股份有限公司提供,经检查确认健康后用于人工感染实验。

TSA、TSB培养基购自广东环凯微生物科技有限公司,革兰氏染色试剂盒购自北京陆桥技术股份有限公司,细菌生化微量鉴定管购自梅里埃诊断产品(上海)有限公司,PCR相关试剂和细菌基因组DNA提取试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司,实验用相关引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,琼脂糖为SIGMA公司产品,药敏分析试剂板购自南京菲恩医疗科技有限公司;VITEK质谱仪(Vitek MS Plus)购自广州沪河生物科技有限公司;全自动数字切片扫描系统(Pannoramic midi)购自3dhitech公司(匈牙利);实验水槽控制系统购自上海海圣生物实验设备有限公司。

1.2 方法

流行病学调查及发病症状观察 调查养殖水库大口黑鲈发病情况及死亡率,了解发病时间、发病水温、发病鱼规格。实地观察病鱼的摄食情况和行为特点等,查看病鱼体表和腹部肿大等情况,解剖观察内脏器官是否有明显的病变,从而确定疾病的基本症状,并取病样组织进行病原菌分离与纯化。

组织病理学观察 取自然条件下发病的大口黑鲈肝脏、肾脏和脾脏组织,用4%甲醛溶液固定,样品按照经典的组织学分析法进行组织脱水、透明、透蜡和包埋处理,经切片和苏木精-伊红(H.E)染色后,使用Pannoramic midi型全自动数字切片扫描系统(3dhitech,匈牙利)采集病理图片,放大倍数为20倍,并观察分析。

病鱼的采集及优势菌的分离纯化 选取具有典型症状的大口黑鲈,于无菌条件下解剖,取其肝脏、肾脏和脾脏等组织划线接种于TSA平

板,19℃培养24~48h,并挑取平板上优势形态的单菌落继续划线3次直至获得纯化单菌落,15%甘油菌悬液保藏于-80℃超低温冰箱。

分离菌株的鉴定 将分离菌株接种于TSA平板上19℃下培养24~36h后,采用多种方法对其进行鉴定。

分离菌株形态与生理生化鉴定。按照常规方法对该分离菌株进行革兰氏染色,观察其形态和染色特性,然后参照《常规细菌系统鉴定手册》^[13-14]提供的各项生理生化指标,使用VITEK 2 Compact全自动细菌鉴定系统对该分离菌株进行生理生化鉴定。

分离菌株的分子生物学鉴定。参照曹师琪等^[15]的方法,对分离菌株进行分子生物学鉴定。采用细菌基因组DNA提取试剂盒提取分离菌株的基因组DNA,通过细菌16S *rDNA*通用引物扩增得到16S *rDNA*序列。PCR产物经生工生物工程(上海)股份有限公司测序后,通过NCBI数据库中的Nucleotide blast进行序列同源性分析,并采用ClustalX 1.8软件进行序列比对,使用MEGA 4.0软件构建系统发育树。

分离菌株的VITEK质谱鉴定。挑取新鲜的单菌落,均匀点样于金属靶板的样品孔中,后加入1μL质谱样品处理基质溶液覆盖样品,室温晾干后放入VITEK MS Plus质谱仪进行鉴定。每个样品双孔检测,并以培养15~18h的ATCC25922校准菌株作为质控。

分离菌株主要毒力基因的检测 通过PCR扩增检测病原菌的主要毒力基因^[16-17],包括*yrp1*、*yhlA*、*yhlB*、*invF*、*traC*、*traL*及*traN*等7种基因,其PCR扩增引物和扩增条件见表1。将与预期片段大小一致的PCR扩增产物片段测序验证。

人工回归感染实验 将分离菌株于TSA平板19℃活化后挑取单菌落至TSB培养液中,19℃、200 r/min培养18~24h后,用0.9%的无菌生理盐水制成浓度为 1.2×10^8 、 1.2×10^7 、 1.2×10^6 、 1.2×10^5 和 1.2×10^4 CFU/mL的菌悬液。实验前随机选取5尾实验室暂养14d的健康大口黑鲈(体质量55~65g)进行解剖,并取内脏组织涂板、制片,进行病毒如虹彩病毒(Iridescent virus)、弹状病毒(Rhabdovirus)的检测,以确认其无细菌、寄生虫、病毒感染后取60尾随机分为6组,每组10尾。实验组大口黑鲈每尾腹腔注射0.5 mL菌液,对照组注射等体积0.9%的无菌生理盐水。实验期间

表 1 主要毒力基因序列和扩增条件

Tab. 1 Sequences and amplification conditions for main virulenic genes

引物 primers	引物序列 (5'-3') primer sequences (5'-3')	产物/bp product size	反应条件 reaction condition
<i>yrp1</i> -F	GGATCCATGAAAGCAAGTAGTAATAAA	1434	[16]
<i>yrp1</i> -R	AAGCTTGAATACATCCAAACAATA		
<i>yh1A</i> -A1	ATATCCGGGCCGAAGGC	938	[18]
<i>yh1A</i> -A2	ATTGTCGATCAATAAGC		
<i>yh1B</i> -B1	ATAACCGGTGGAGATCA	735	
<i>yh1B</i> -B2	CAGGTTATGAGTGCGGT		
<i>inv F</i> -TF	GTACTCACCTTCATCAGTCGG	1623	[17]
<i>inv F</i> -TR	CGAGTGCTGATTAGCTGGTTC		
<i>traC</i> -1	CCACCGGCTCACATAACC	930	[19]
<i>traC</i> -2	CCGGTTCGCTGCTGTTC		
<i>traL</i> -1	ATGCAGATCTGTTTTGGGGCGGACGC	584	[19]
<i>traL</i> -2	ATGCAGATCTCCGTGGGGTTTCAGGGA		
<i>traN</i> -1	TGACCGGCTGGCATTTC	317	[19]
<i>traN</i> -2	CCTCAAAACGAACCTGT		

用海圣实验水槽控制系统保持水温稳定在 $(19 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。观察记录实验组和对照组大口黑鲈的发病和死亡情况, 连续观察 7 d, 并对濒死的实验鱼及时剖检并进行病原菌的分离鉴定, 同时根据改进的寇氏法^[20] 计算半数致死剂量 (LD_{50})。

药物敏感性实验 药物敏感性实验采用 2018 年版美国临床和实验室标准协会 (CLSI) 推荐的肉汤稀释法操作标准, 参照厂家提供的药敏分析板使用说明书, 测定农业农村部分允许的 8 种常见抗菌药物对病原菌的最小抑菌浓度 (MIC)。

2 结果

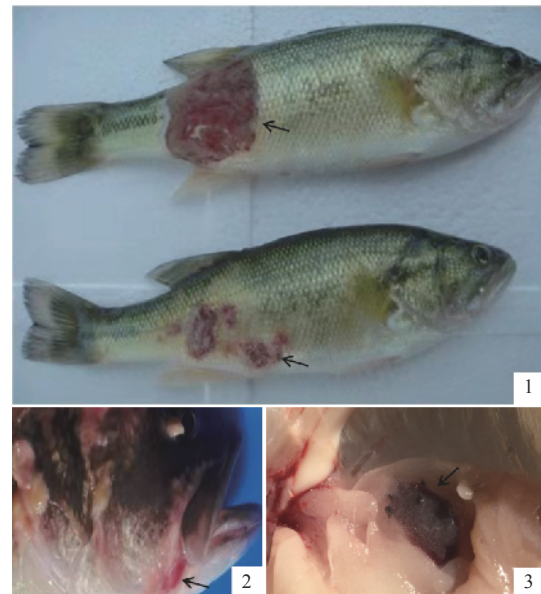
2.1 流行病学特征与症状

2021 年 3 月, 福建某养殖水库大口黑鲈持续出现死亡现象, 死亡率高达 30% 以上。发病水温约为 $15 \sim 19^\circ\text{C}$, 发病鱼体质量为 250~300 g 不等, 濒死鱼漂浮于水面、静止不动, 停止摄食, 嘴巴周围及体表两侧出现出血点 (图版 I-1~2), 严重者体色发黑、烂身、烂鳍; 内脏器官存在不同程度的损伤, 尤以肝脏轻出血及脾脏肿大 (图版 I-3), 其他组织器官无明显变化。自然条件下发病的大口黑鲈组织病理学观察可见肝脏、脾脏、肾脏出现不同程度的病变。肝细胞内有中性粒细胞浸润 (图版 II-1), 出现广泛空泡变性 (图版 II-2); 脾脏组织结构异常, 大部分区域脾小结结构紊乱, 红髓白髓界限不清, 并可见红髓嗜中性粒细胞增多,

少量细胞坏死变性 (图版 II-3~5); 肾组织内可见胞浆疏松及炎症细胞浸润, 个别细胞胞核破碎, 肾小球萎缩变性, 并可见中性粒细胞 (图版 II-6~9)。

2.2 分离菌株的培养特征

从自然发病大口黑鲈脾脏中分离纯化获得 1 株优势菌, 编号为 FNZYR3。该分离菌株在 TSA

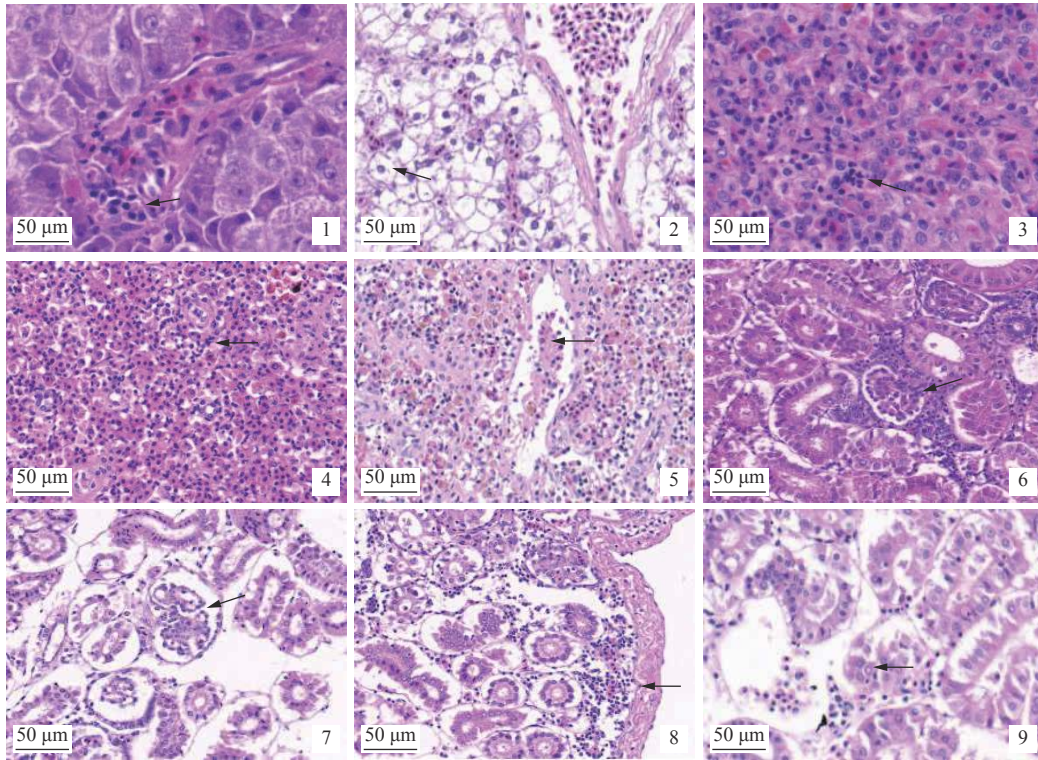


图版 I 患病大口黑鲈临床症状

1~3. 分别表示患病大口黑鲈体表出血点、嘴巴周围出血点及脾脏肿大

Plate I Clinical signs of diseased *M. salmoides*

1-3. indicates bleeding spots in the skin, bleeding spots around the mouth and splenomegaly of diseased *M. salmoides*, respectively



图版 II 患病大口黑鲈的组织病理学观察

1. 患病大口黑鲈肝细胞内有中性粒细胞浸润, 2. 肝细胞空泡变性, 3~5. 脾细胞坏死变性, 6. 肾小球上有中性粒细胞浸润, 7. 肾小球萎缩变性, 8. 肾组织内可见炎症细胞浸润, 9. 肾细胞胞核破碎

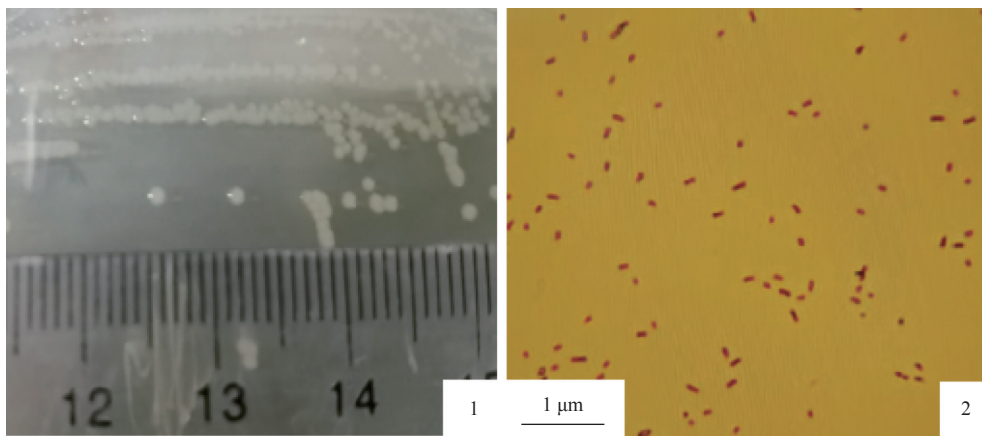
Plate II Histopathological observation of diseased *M. salmoides*

1. infiltration with neutrophils in liver cells, 2. vacuolar degeneration of hepatocytes, 3-5. splenocyte necrosis and degeneration, 6. infiltration with neutrophils in glomerulars, 7. glomerular atrophy and degeneration, 8. infiltration with inflammatory cells in kidney tissue, 9. renal cell nucleus fragmentation

平板上生长良好, 肉眼观察呈圆形、隆起、表面光滑湿润、边缘整齐的乳白色菌落 (图版 III-1)。该分离菌株革兰氏染色呈阴性, 显微镜下形态为短杆状 (图版 III-2)。

2.3 分离菌株的生理生化鉴定

使用 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定系统对该分离菌进行生理生化鉴定, 结果显示, 分离菌 FNZYR3 与鲁氏耶尔森氏菌标准菌株的符合概



图版 III 菌株 FNZYR3 的菌落形态和细胞形态

1-2. 分别表示菌株 FNZYR3 在 TSA 培养基上的菌落形态及其在显微镜下的细胞形态

Plate III Bacterial colony morphology and cell morphology of strain FNZYR3

1-2. indicates bacterial colony morphology on TSA medium and its cell morphology under the microscope of strain FNZYR3

率为 96%, 具体生理生化特征详见表 2。

2.4 16S rDNA 序列及系统发育树分析

PCR 扩增 FNZYR3 菌株的 16S rDNA, 获得大小约为 1 500 bp 的片段。PCR 扩增产物经测序及 Blastn 在线比对分析后, 结果显示, 菌株 FNZYR3 的 16S rDNA 与 NCBI 数据库的鲁氏耶尔森氏菌 ATCC 29473(GenBank 登录号: NR_119063.1) 的 16S rDNA 序列同源性为 98.67%。基于 16S rDNA 序列构建菌株 FNZYR3 的系统发育树, 从构建的系统发育树可知, 菌株 FNZYR3 与鲁氏耶尔森氏菌一起归属在同一分支里, 即与鲁氏耶尔森氏菌聚为一类(图 1), 表明该分离菌株可能为鲁氏耶尔森氏菌。

2.5 VITEK MS 质谱鉴定结果

FNZYR3 菌株的 VITEK MS 质谱鉴定结果为

鲁氏耶尔森氏菌, 可信度为 99.9%, 其峰值图如图 2 所示。

因此, 综合分离菌株的形态特征及生理生化特性, 并结合 16S rDNA 序列测定与系统发育分析及 VITEK MS 质谱鉴定结果, 判定该菌为鲁氏耶尔森氏菌。

2.6 菌株 FNZYR3 的主要毒力基因分析

主要毒力基因检测结果显示, 菌株 FNZYR3 的 *yrP1*、*yhlA* 和 *yhlB* 毒力基因的 PCR 扩增结果均为阳性, 目的条带大小分别为 1 434、938 和 735 bp, 将扩增产物送测序, 测序结果经 BLAST 序列比对分析, 以上 3 种基因序列与已知序列相似性均达 98% 以上, 而菌株的 *invF*、*traC*、*traL* 和 *traN* 的扩增结果则均为阴性(图 3)。表明菌株 FNZYR3 携带 *yrP1*、*yhlA*、*yhlB* 相关毒力基因, 而不携带 *invF*、*traC*、*traL*、*traN* 相关毒力基因。

表 2 菌株 FNZYR3 的生理生化指标

Tab. 2 Physiological and biochemical characteristics of strain FNZYR3

生化项目 reaction items	结果 results	生化项目 reaction items	结果 results
丙氨酸-苯丙氨酸-脯氨酸芳胺酶 APPA	-	蔗糖 SAC	-
侧金盏花醇 ADO	-	D-塔格糖 dTAG	-
L-吡咯烷酮芳胺酶 PyrA	-	D-海藻糖 dTRE	+
L-阿拉伯醇 IARL	-	柠檬酸盐(钠) CIT	-
D-纤维二糖 dCEL	-	丙二酸盐 MNT	-
β-半乳糖苷酶 BGAL	-	5-酮基-D-葡萄糖酸盐 5KG	-
H ₂ S 生成 H ₂ S	-	L-乳酸盐碱化 ILATk	+
β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶 BNAG	+	α-葡糖苷酶 AGLU	-
谷氨酰芳胺酶 pNA AGL Tp	-	琥珀酸盐碱化 SUCT	+
D-葡萄糖 dGLU	+	β-N-乙酰氨基半乳糖 NAGA	-
γ-谷氨酰转移酶 GGT	-	α-半乳糖苷酶 AGAL	-
发酵/葡萄糖 OFF	+	磷酸酶 PHOS	-
β-葡糖苷酶 BGLU	-	甘氨酸芳胺酶 GlyA	-
D-麦芽糖 dMAL	+	鸟氨酸脱羧酶 ODC	+
D-甘露醇 dMAN	+	赖氨酸脱羧酶 LDC	+
D-甘露糖 dMAE	+	L-组氨酸同化 IHISa	-
β-木糖苷酶 BXYL	-	香豆酸 CMT	+
β-丙氨酸芳胺酶 pNA BALap	-	β-葡萄糖醛酸酶 BGUR	-
L-脯氨酸芳胺酶 ProA	+	O/129 耐药 (comp.vibrio.) O129R	+
脂肪酶 LIP	-	谷氨酸-甘氨酸-精氨酸芳胺酶 GGAA	-
古老糖 PLE	-	L-苹果酸盐同化 IMLTa	-
酪氨酸芳胺酶 TyrA	+	ELLMAN ELLM	+
尿素酶 URE	-	L-乳酸盐同化 ILATa	-
D-山梨醇 dSOR	-		

注: “+”表示阳性反应, “-”表示阴性反应
Notes: “+” positive; “-” negative

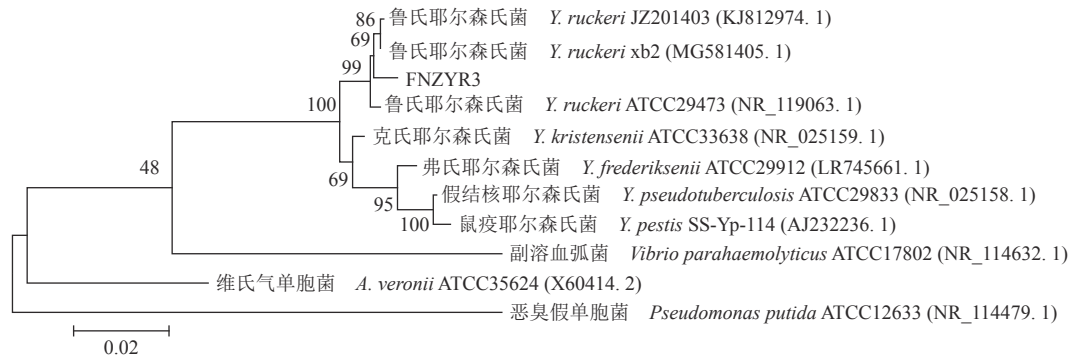


图1 菌株 FNZYR3 的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of strain FNZYR3

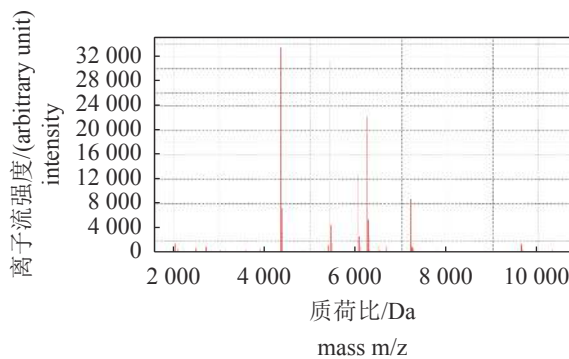


图2 菌株 FNZYR3 的峰值图

Fig. 2 Peak graph of strain FNZYR3

2.7 菌株 FNZYR3 的致病性

菌株 FNZYR3 腹腔注射感染健康大口黑鲈，攻毒 16 h 后，实验鱼反应变得迟钝； 1.2×10^8 CFU/mL 浓度组在 20 h 后开始出现死亡， 1.2×10^7 和 $1.2 \times$

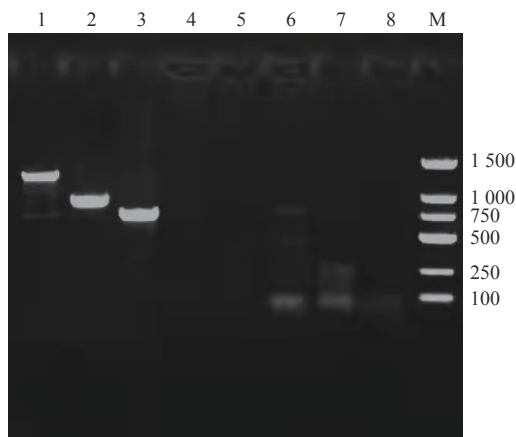


图3 FNZYR3 菌株的毒力基因 PCR 扩增结果

Fig. 3 PCR amplification results of the virulence-related genes from the strain FNZYR3

1. *yrP1*; 2. *yhlA*; 3. *yhlB*; 4. blank; 5. *invF*; 6. *traC*; 7. *traL*; 8. *traN*; M. DNA Marker

10^6 CFU/mL 浓度组相继在 39 h 后开始出现死亡。感染 7 d 时， 1.2×10^8 和 1.2×10^7 CFU/mL 浓度组死亡率均为 100%； 1.2×10^6 和 1.2×10^5 CFU/mL 浓度组死亡率分别为 60% 和 10%。发病鱼的临床表现和病理变化与自然发病鱼大致相同，具体表现为濒死的鱼游动缓慢，单独离群，停止摄食，体表发黑脱鳞，胸鳍下出血，生殖孔红肿(图版 IV-1)，部分病鱼解剖可见大量的淡黄色或含血腹水(图版 IV-2~3)，肠腔内没有食物，充满大量淡黄色黏液(图版 IV-4)，内脏器官存在不同程度的损伤，尤以肝脏出血及脾脏肿大最为明显，但可能由于受试鱼在人工感染后短时间内死亡，所以未出现烂身、烂鳍等症状；而在实验期间内 1.2×10^4 组和对照组鱼无死亡和发病现象，各组的死亡情况见图 4。采用寇氏法得出菌株 FNZYR3 对大口黑鲈的半数致死剂量 (LD_{50}) 为 3.8×10^5 CFU/尾。从人工感染发病死亡的鱼体组织器官上再次分离到与菌株 FNZYR3 形态、生理生化特性、16S *rDNA* 序列及质谱鉴定结果一致的细菌，表明菌株 FNZYR3 为此次患病大口黑鲈的病原菌。

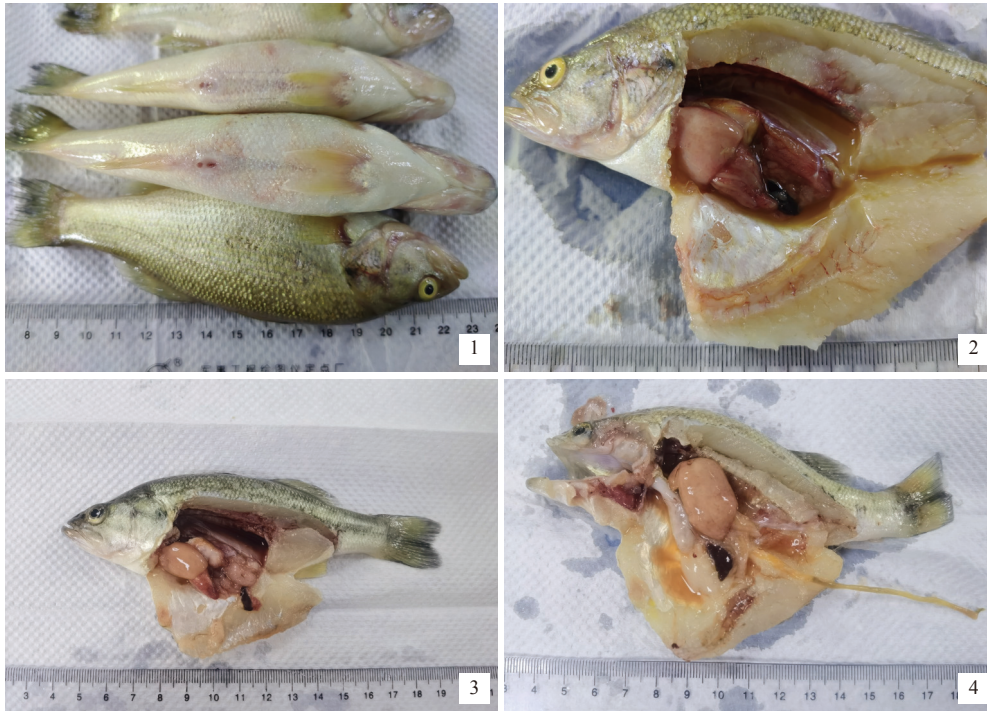
2.8 药敏实验

药敏实验结果显示，菌株 FNZYR3 对恩诺沙星、盐酸多西环素、氟甲喹、硫酸新霉素、氟苯尼考相对敏感，MIC 值分别为 0.1、0.1、0.1、0.7 和 6.2 $\mu\text{g/mL}$ ；对磺胺间甲氧嘧啶钠、磺胺甲噁唑/甲氧苄啶、甲砒霉素的 MIC 值分别为 12.5、19.0/1.0、25.0 $\mu\text{g/mL}$ (表 3)。

3 讨论

3.1 鲁氏耶尔森氏菌的研究进展

鲁氏耶尔森氏菌是冷水性鲑鳟鱼类和温水性



图版 IV 菌株 FNZYR3 感染大口黑鲈的症状

1. 生殖孔红肿, 2. 腹腔充满淡黄色腹水, 3. 腹腔充满含血腹水, 4. 肠腔内充满淡黄色黏液

Plate IV Symptoms of *M. salmoides* infected with strain FNZYR3

1. genital foramen is red and swollen, 2. abdominal cavity is filled with light yellow ascites, 3. abdominal cavity is filled with bloody ascites, 4. intestinal cavity is filled with light yellow mucus

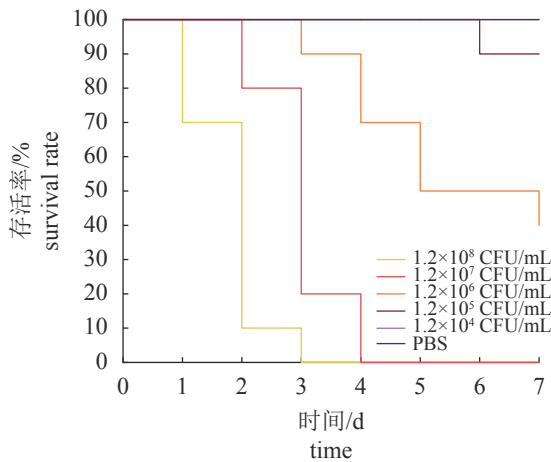


图 4 菌株 FNZYR3 感染后的存活率

Fig. 4 Survival rate of *M. salmoides* infected by strain FNZYR3

鲤科 (Cyprinidae) 鱼类的常见病原菌之一。自 1952 年在美国首次从患病的虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 中分离获得该菌以来^[21], 其地理分布逐渐扩大, 相继在德国、法国、英国等欧洲各国, 以及澳大利亚、中国均有所发现^[22], 且危害的鱼类

表 3 菌株 FNZYR3 的药敏实验结果

Tab. 3 Antibiotic sensitivity of strain FNZYR3

抗菌药物 antibiotics	MIC/ ($\mu\text{g/mL}$)	抗菌药物 antibiotics	MIC/ ($\mu\text{g/mL}$)
恩诺沙星 enrofloxacin	0.1	盐酸多西环素 doxycycline hydrochloride	0.1
氟甲喹 fluoromequine	0.1	硫酸新霉素 neomycin sulfate	0.7
氟苯尼考 florfenicol	6.2	磺胺间甲氧嘧啶钠 sulfamethoxam sodium	12.5
磺胺甲噁唑/甲氧苄啶 sulfamethoxazole/ trimethoprim	19.0/1.0	甲砒霉素 thiamphenicol	25.0

种类也不断增多, 包括金鱼、木叶鲮、斑点叉尾鲷、鳊、西伯利亚鲟、草鱼、鲢、鳙等鱼类^[9-12], 并可同其他革兰氏阴性菌如嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌 (*A. caviae*)、温和气单胞菌 (*A. sobria*) 等混合感染^[23]。在国内, 徐伯亥等^[24]和范方玲等^[25]先后发表了鲁氏耶尔森氏菌感染鲢、鳊和斑点叉尾鲷的报道, 发病时间均为 3—4 月, 发病水温为 13~20 °C, 发病症状为病鱼体表多处出血, 内脏伴有不同程度的发炎、充血。李绍戊等^[26]从我

国患病鲟中分离到鲁氏耶尔森氏菌,病鱼下颌、胸鳍、腹部及泄殖孔附近出血,并伴有腹水,发病时间为3月,发病水温约为12~16℃,组织病理观察发现,感染鲁氏耶尔森氏菌的肝组织呈弥漫性坏死,核空泡变性,有些肝细胞已经溶解变性等。最近张超^[12]从患病草鱼中分离获得鲁氏耶尔森氏菌,病鱼口腔点状出血、肌肉出血、肠外壁点状出血、鳃出血,发病日平均气温为22℃,略高于此前报道的发病水温。此次耶尔森氏菌引起福建养殖大口黑鲟发病的水温为15~19℃,与此前的报道一致。所引发的症状也与此前报道的症状相似。组织病理学观察与李绍戌等^[26]的组织观察结果也基本相似。本研究进一步扩大了耶尔森氏菌的天然宿主范围。

3.2 鲁氏耶尔森氏菌的致病条件

本实验分离的菌株FNZYR3对大口黑鲟具有较强的致病性,其LD₅₀为3.8×10⁵CFU/尾。据报道,陶莎等^[9]从患病的斑点叉尾鲟上分离获得致病性鲁氏耶尔森氏菌Q1,其LD₅₀为5.3×10⁶CFU/尾;杨昆明等^[10]从患病的西伯利亚鲟上分离获得致病性鲁氏耶尔森氏菌XB2,其LD₅₀为2.37×10³CFU/尾;可见不同菌株鲁氏耶尔森氏菌的致病力强弱存在差异。鲁氏耶尔森氏菌是一种危害世界水产养殖业的条件致病菌,温度、渗透压等因素都能影响其致病力的强弱,据报道,当环境温度高于该菌的致病温度时,某些毒性蛋白的表达量会显著降低,如胞外蛋白酶Yrp1^[27]、溶血素YhlA^[18]的表达量均在18℃显著高于28℃;当培养基渗透压上升时,yrp1操纵子的表达量会显著降低^[27]。Yrp1蛋白和YhlA溶血素作为鲁氏耶尔森氏菌的2种重要毒力因子,对其致病性十分重要^[18],而YhlA溶血素由yhlA基因编码,其分泌和激活与yhlB有关。此外,据报道,invF、traC、traL、traN也是鲁氏耶尔森氏菌的主要毒力基因^[18, 20]。本实验分离的菌株FNZYR3携带yrp1、yhlA、yhlB等3种毒力基因,而不携带invF、traC、traL、traN,这说明本实验分离的鲁氏耶尔森氏菌与此前分离的致病菌株有所不同,也说明目前可能存在有多个致病菌株能引起养殖鱼类的疾病,这在病害防控中需要引起重视。

3.3 鲁氏耶尔森氏菌病的防控措施

目前,在实际生产中使用抗菌药物来预防和治疗细菌性疾病是最为直接和简便的手段,而药

物的敏感实验对临床用药具有重要的指导作用。本研究中药物敏感性实验结果显示,在所测试的8种农业农村部允许使用的抗菌药物中,病原菌FNZYR3对恩诺沙星、盐酸多西环素、氟甲喹、硫酸新霉素、氟苯尼考相对敏感,这与斑点叉尾鲟鲁氏耶尔森氏菌对恩诺沙星、多西环素、新霉素敏感及鲟源鲁氏耶尔森氏菌对氟苯尼考敏感的研究报道一致^[9-10],但与曹师琪等^[15]得出杂交鲟鲁氏耶尔森氏菌对恩诺沙星不敏感及陶莎等^[9]得出斑点叉尾鲟鲁氏耶尔森氏菌对氟苯尼考不敏感的结论存在很大的差异。由此可见,来源于不同动物种类或各地区不同用药习惯的同种细菌,其耐药谱可能有所不同。因此,当大口黑鲟养殖场发生鲁氏耶尔森氏菌病时,建议可在执业兽医的指导下优先选择以上敏感药物,并结合药物敏感性实验结果,指导养殖户科学合理使用药物,但切忌一旦发现病鱼就投放大量抗菌药物,避免造成大量病原菌耐药,同时也可能导致大口黑鲟药物残留引起食品安全问题。

4 结论

本实验从患病大口黑鲟脾脏中分离获得1株具有致病性的鲁氏耶尔森氏菌(FNZYR3),其对大口黑鲟的半致死剂量为3.8×10⁵CFU/尾。菌株FNZYR3感染大口黑鲟能导致其肝脏、肾脏、脾脏不同程度的变性、坏死及炎症细胞的浸润。菌株FNZYR3携带yrp1、yhlA、yhlB毒力基因,对恩诺沙星、盐酸多西环素、氟甲喹、硫酸新霉素、氟苯尼考等5种药物相对敏感。本实验首次报道了大口黑鲟鲁氏耶尔森氏菌的致病性,不仅扩大了鲁氏耶尔森氏菌的天然宿主范围,也为养殖大口黑鲟病害防治提供新的参考依据。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 高令梅,姜建湖,郭建林,等.浙江省加州鲟产业发展现状及对策建议[J].浙江农业科学,2021,62(11):2498-2500,2505.
Gao L M, Jiang J H, Guo J L, et al. Current situation and strategies of *Micropterus salmoides* product in Zhejiang Province[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2021, 62(11): 2498-2500,2505 (in Chinese).

- [2] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴-2021[M]. 北京: 中国农业出版社, 2021.
Fishery Administration of Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries, China Fishery Statistical Yearbook 2021[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2021 (in Chinese).
- [3] 刘春, 李凯彬, 王庆, 等. 大口黑鲈烂身病原菌的分离、鉴定与特性分析[J]. 广东农业科学, 2011, 38(6): 126-128.
Liu C, Li K B, Wang Q, et al. Identification and characterization of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Micropterus salmoides*[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2011, 38(6): 126-128 (in Chinese).
- [4] 金珊, 王国良, 赵青松, 等. 加州鲈白云病的病原及血液病理的初步研究[J]. 水生生物学报, 2005, 29(2): 184-188.
Jin S, Wang G L, Zhao Q S, et al. Preliminary studies on pathogen and hemopathology of the white cloud disease in *Micropterus salmoides*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, 29(2): 184-188 (in Chinese).
- [5] 蒋依依, 李言伟, 周素明, 等. 加州鲈诺卡菌病原的分离与鉴定[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2012, 51(1): 76-81.
Jiang Y Y, Li Y W, Zhou S M, et al. Isolation and identification of *Nocardia*, a pathogen of nocardiosis in large-mouth bass, *Micropterus salmoides*[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2012, 51(1): 76-81 (in Chinese).
- [6] 龙波, 王均, 贺扬, 等. 加州鲈源维氏气单胞菌的分离、鉴定及致病性[J]. 中国兽医学报, 2016, 36(1): 48-55.
Long B, Wang J, He Y, et al. Isolation, identification and pathogenicity of *Aeromonas veronii* isolated from *Micropterus salmoides*[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2016, 36(1): 48-55 (in Chinese).
- [7] 杨秀荣, 曾燕玲, 魏志琴. 乌江网箱养殖患病加州鲈鱼的细菌分离鉴定与回复感染[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(11): 252-254.
Yang X R, Zeng Y L, Wei Z Q. Isolation, identification and recurrent infection in cage cultured *Micropterus salmoides* in Wujiang[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2013, 41(11): 252-254 (in Chinese).
- [8] Tობბაქ E, Decostere A, Hermans K, et al. *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2007, 30(5): 257-268.
- [9] 陶莎, 姚俊杰, 商宝娣, 等. 斑点叉尾鲷致病菌株的分离鉴定与药敏特性[J]. 贵州农业科学, 2019, 47(12): 76-81.
Tao S, Yao J J, Shang B D, et al. Solation and identification of a *Yersinia ruckeri* strain infecting *Ictalurus punctatus* and its antibiotic sensitivity[J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2019, 47(12): 76-81 (in Chinese).
- [10] 杨昆明, 张文润, 马江霞, 等. 鲟源致病性鲁氏耶尔森菌的分离、鉴定及药敏研究[J]. 水产科学, 2019, 38(1): 48-54.
Yang K M, Zhang W R, Ma J X, et al. Isolation, identification and antibiotic sensitivity of pathogenic bacterium *Yersinia ruckeri* from siberian sturgeon *Acipenser baerii*[J]. *Fisheries Science*, 2019, 38(1): 48-54 (in Chinese).
- [11] 杨移斌, 夏永涛, 郑卫东, 等. 鲟源鲁氏耶尔森氏菌的分离鉴定及药敏特性研究[J]. 水生生物学报, 2013, 37(2): 393-398.
Yang Y B, Xia Y T, Zheng W D, et al. Isolation and identification of *Yersinia ruckeri* from *Acipenser baerii* and its antibiotic sensitivity[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(2): 393-398 (in Chinese).
- [12] 张超. 一例草鱼肌肉出血病的病原学分析[J]. 西南农业学报, 2021, 34(1): 208-213.
Zhang Z. Grass carp(*Ctenopharyngodon idellus*) muscle hemorrhagic disease etiology analysis[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2021, 34(1): 208-213 (in Chinese).
- [13] 李双双, 贺志沛, 罗俊娜, 等. 兔源大肠杆菌的分离鉴定及药物敏感性检测研究[J]. 江西农业学报, 2013, 25(8): 70-72.
Li S S, He Z P, Luo J N, et al. Study on isolation, identification and drug sensitivity of rabbit -derived *Escherichia coli*[J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2013, 25(8): 70-72 (in Chinese).
- [14] 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: 84-85.
Dong X Z, Cai M Y. Handbook of systematic identification of common bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001: 84-85 (in Chinese).
- [15] 曹师琪, 耿毅, 余泽辉, 等. 杂交鲟鲁氏耶尔森氏菌的

- 分离鉴定及感染的病理损伤[J]. *华南农业大学学报*, 2018, 39(4): 13-19.
- Cao S Q, Geng Y, Yu Z H, *et al.* Isolation and identification of *Yersinia ruckeri* from hybrid sturgeon and pathological lesions of its infection[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2018, 39(4): 13-19 (in Chinese).
- [16] 连海. 鲁氏耶尔森氏菌 *p1* 基因的克隆、分子特性分析及原核表达 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2012.
- Lian H. Cloning, Molecular characteristics analysis and prokaryotic expression of the *p1* gene of *Yersinia ruckeri*[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2012 (in Chinese).
- [17] 闵洁, 汪开毓, 刘韬, 等. 鲁氏耶尔森菌 *invF* 基因无痕缺失突变株的构建及生物学特性[J]. *水产学报*, 2017, 41(12): 1858-1866.
- Min J, Wang K Y, Liu T, *et al.* Construction and identification of *invF* gene deleted *Yersinia ruckeri* and its biological characteristics[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(12): 1858-1866 (in Chinese).
- [18] Fernández L, Prieto M, Guijarro J A. The iron- and temperature-regulated haemolysin YhIA is a virulence factor of *Yersinia ruckeri*[J]. *Microbiology*, 2007, 153(Pt 2): 483-489.
- [19] Méndez J, Fernández L, Menéndez A, *et al.* A chromosomally located *traHIJKLMN* operon encoding a putative type IV secretion system is involved in the virulence of *Yersinia ruckeri*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(4): 937-945.
- [20] 杨茂成. 兽医统计学 [M]. 北京: 中国展望出版社, 1990.
- Yang M C. Statistics for veterinary science[M]. Beijing: China Prospect Publishing House, 1990 (in Chinese).
- [21] Ross A J, Rucker R R, Ewing W H. Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*)[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1966, 12(4): 763-770.
- [22] 张晓君. 鲁氏耶尔森氏菌及鱼类相应感染症(综述)[J]. *河北科技师范学院学报*, 2004, 18(3): 77-80.
- Zhang X J. *Yersinia ruckeri* and relative infection of fish (summary)[J]. *Journal of Hebei Normal University of Science & Technology*, 2004, 18(3): 77-80 (in Chinese).
- [23] Berc A, Petrinc Z, Matasin Z, *et al.* *Yersinia ruckeri* septicaemia in experimentally infected carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings[J]. *Acta Veterinaria Hungarica*, 1999, 47(2): 161-172.
- [24] 徐伯亥, 殷战, 陈燕桑, 等. 鲢、鳙鱼一种新的传染病——*Yersinia ruckeri*, 一种新的鲢、鳙鱼病原菌[J]. *科学通报*, 1991, 36(8): 620-622.
- Xu B H, Yan Z, Chen Y S, *et al.* A new infection of silver carp and bighead carp[J]. *Chinese Science Bulletin*, 1991, 36(8): 620-622 (in Chinese).
- [25] 范方玲, 汪开毓, 耿毅, 等. 斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 源鲁氏耶尔森氏菌的分离鉴定及系统发育分析[J]. *海洋与湖沼*, 2010, 41(6): 862-868.
- Fan F L, Wang K Y, Geng Y, *et al.* Isolation, identification and phylogenetic analysis of *Yersinia ruckeri* in channel catfish *Ictalurus punctatus*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2010, 41(6): 862-868 (in Chinese).
- [26] 李绍戊, 王荻, 冯娟, 等. 养殖鲟鱼出血症病原鲁氏耶尔森菌的分离鉴定和致病性研究[J]. *海洋与湖沼*, 2014, 45(3): 561-567.
- Li S W, Wang D, Feng J, *et al.* Isolation, identification and pathogenicity of a pathogenic bacterium *Yersinia ruckeri* associated with hemorrhage of cultured Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*)[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(3): 561-567 (in Chinese).
- [27] Fernandez L, Lopez J R, Secades P, *et al.* *In vitro* and *in vivo* studies of the Yrp1 protease from *Yersinia ruckeri* and its role in protective immunity against enteric red mouth disease of salmonids[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(12): 7328-7335.

Isolation, identification, major virulence genes and pathogenicity of *Yersinia ruckeri* from *Micropterus salmoides*

WANG Qiaohuang^{1*}, LIN Nan¹, YUAN Lihua¹, JI Jing², LIN Dan¹

(1. Fujian Provincial Fisheries Technology Extension Center, Fuzhou 350002, China;

2. Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: To investigate the cause of an outbreak of unknown disease occurred in cultured largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in a reservoir in Fujian Province, with a cumulative mortality of over 30% in March 2021, the dominant bacterial colonies were isolated from the liver, spleen and kidney tissues of affected fish, the pathogenic bacteria was identified by artificial infection experiments, and its species was identified by physicochemical characteristics, 16S *rDNA* sequences, and mass spectrometry analyses. Further, virulence gene detection, drug sensitivity research and histopathological observation were carried out. A predominant bacteria strain *Yersinia ruckeri* was isolated from the spleen of the infected *M. salmoides*. A set of virulence genes including *YrP1*⁺ - *YhIA*⁺ - *YhIB*⁺ - *invF* - *traC* - *traL* - *traN* were detected by PCR from in the isolated strain, with a LD₅₀ of 3.8×10⁵ CFU per fish by intraperitoneal injection. The antibiotic sensitivity test showed that the pathogen was sensitive to enrofloxacin, doxycycline hydrochloride, flumequine, neomycin sulfate and florfenicol. Histopathological observation found that *Y. ruckeri* infection caused significant damages to liver, spleen, kidney and other organs of *M. salmoides*. The main pathologic lesions showed obvious degeneration, necrosis and infiltration of the inflammation cells. It could be included that the current research is the first report of cultured *M. salmoides* infected by *Y. ruckeri*, which will be helpful for the early diagnosis and better prevention of the disease in cultured *M. psalmodies*.

Key words: *Micropterus salmoides*; *Yersinia ruckeri*; isolation and identification; pathogenicity; antibiotic sensitivity

Corresponding author: WANG Qiaohuang. E-mail: 535681286@qq.com

Funding projects: A Dedicated Fund for High-Quality Development of Marine Services and Fisheries in Fujian Province in 2022; “Innovation, Demonstration and Promotion of Low-Carbon and High-Efficiency Circulating Aquaculture Technology”, One of the Agricultural “Five New” Project of Fujian Province in 2017