

美国红鱼肾肿大症的病原及其致病性研究

张继挺, 朱文渊, 王国良*

(宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 针对浙江省温州洞头海水网箱养殖美国红鱼发生的以肾脏显著肿大为主要病症的肾肿大症疾病, 进行病原及其致病性研究. 从病鱼肾脏分离获得优势菌株 MH061205-2, 经人工感染试验证实该菌具有致病性, 会引起美国红鱼肾肿大症状. 进一步对其进行形态学和生理生化特征测定, 以及 16S rRNA 测序分析等多元鉴定表明: MH061205-2 菌株为海藻希瓦氏菌(*Shewanella algae*), 是美国红鱼肾肿大症的病原菌, 该菌体呈杆状, 革兰氏染色阴性, 极生单鞭毛, 氧化酶反应阳性; 该菌对头孢噻肟、头孢他啶、哌拉西林、卡比西林和环丙沙星等 15 种药物敏感.

关键词: 美国红鱼; 肾肿大症; 海藻希瓦氏菌

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2013) 01-0006-06

美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*), 又称红鼓鱼、斑尾鲈等, 学名为眼斑拟石首鱼, 属鲈形目, 石首鱼科, 拟石首鱼属. 原产于南大西洋和墨西哥湾沿岸水域, 1991 年引进我国, 具有生长快、产量高、食性广以及对环境适应能力强等优点, 现已在浙江、福建等省广泛养殖, 取得了可观的经济效益. 随着养殖规模的扩大, 养殖密度的加大, 养殖海区水质趋于恶化, 加上美国红鱼经多代人工繁殖造成性状退化, 导致其机体抵抗力下降. 这些年来美国红鱼病害频繁发生, 且危害加重, 并时有新的病害出现, 造成了很大的经济损失, 已成为阻碍养殖生产可持续发展的瓶颈^[1-3]. 笔者在浙江省温州洞头和宁波象山海水网箱养殖美国红鱼中发现一种新病害, 鉴于该病表现特征为肾脏肿大, 故暂定名为美国红鱼肾肿大症^[4], 在国内外属首次报道. 笔者进一步对分离菌株进行了致病性、生理生化特性、16S rRNA 基因序列相似性及系统发育分析等研究, 以期为该病的预防和控制提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 样品来源及症状观察

试验用病鱼于 2008 年 11 月和 2009 年 11 月采

自温州洞头海水养殖网箱, 平均体重 200~300 g. 感染用的健康美国红鱼取自宁波市象山县黄避岙海水网箱养殖鱼排, 平均体重 150~200 g. 取症状典型的濒死美国红鱼, 观察其体表及各个内脏器官的病变情况, 并与健康鱼进行比较, 以确定该病主要病变情况及病变部位.

1.2 病原菌的分离纯化

选取病鱼, 无菌操作取少量肾、心、脾、肝组织分别在 50%海水普通营养琼脂和 TCBS 琼脂培养基平板上划线分离, 28℃恒温培养 24 h 后, 挑取形态特征一致的优势菌进行纯化培养, 将纯化菌株转接至斜面培养基保存备用.

1.3 人工回归感染

分离菌株在 50%海水营养琼脂斜面上 28℃恒温培养 24 h 后, 用 0.85%无菌生理盐水洗下菌苔, 稀释成所需浓度菌悬液. 采用腹腔注射感染、口灌感染和浸泡感染 3 种感染方式. 试验水温 20℃, 盐度 28‰. 观察感染发病鱼症状, 及时解剖检查内脏器官病变情况, 同时作细菌分离.

1.4 病原菌形态观察及生理生化特征测定

将分离到菌株 MH061205-2 接种至 50%海水普通营养琼脂平板和斜面上, 培养 18 h 后, 对幼龄菌

收稿日期: 2012-07-01.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://nbdxlg.paperopen.com/>

基金项目: 教育部长江学者与创新团队项目 (IRT0734); 宁波市自然科学基金 (2009A610116).

第一作者: 张继挺 (1984-), 男, 浙江宁波人, 硕士研究生, 主要研究方向: 鱼病学研究. E-mail: jiting.zhang@yahoo.com.cn

*通信作者: 王国良 (1955-), 男, 浙江舟山人, 博导/教授, 主要研究方向: 鱼病学研究. E-mail: wangguoliang@nbu.edu.cn

分别进行油镜和 TECNAI 10 型透射电子显微镜观察. 生理生化特性参照 API 20E 自动鉴定卡进行.

1.5 病原菌的 16S rRNA 基因序列分析

1.5.1 PCR 模板 DNA 的制备

分离菌株在 50%海水普通培养斜面中 28℃培养 18 h 后, 无菌水洗下菌苔, 按东秀珠的方法提取基因组总 DNA^[5].

1.5.2 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增与测序

采用 16S rRNA 基因特异性扩增法进行, 通用引物序列为 F5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3' 和 R5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3'. 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成. 50 μL PCR 反应总体系中, 分别加入双蒸水 29 μL、10×PCR Buffer 5.0 μL、Mg²⁺ 3.0 μL、d NTP(2.5 μmol·L⁻¹) 4.0 μL、引物(25 μmol·L⁻¹)各 2.0 μL、Taq 酶(5 U·μL⁻¹) 1.0 μL 以及模板 DNA 4.0 μL; 反应条件为 94℃预变性 4 min, 然后 94℃ 1 min、56℃ 1 min、72℃ 2 min, 进行 30 个循环, 最后 72℃延伸 5 min 结束反应. 取扩增产物 4 μL 在 1.2%的琼脂糖凝胶上进行电泳检测.

PCR 扩增产物的回收纯化采用上海生工科技公司的 DNA 快速纯化回收试剂盒. 将 PCR 扩增产物直接由上海基康生物有限公司用 ABI 377 DNA 自动测序仪测序.

1.6 系统发育树构建

所测序列利用 GenBank 数据库中的 BLAST 进行相似性比较. 根据返回结果, 从 GenBank 数据库调用相近序列, 在 Clustalx(1.83)程序包中进行多重序列匹配排列分析, 使用 MEGA 4.0 邻接法构建系统进化树.

1.7 药敏试验

采用药敏纸片琼脂平板扩散法^[6]. 所用药敏纸片由杭州天和微生物试剂有限公司生产.

2 结果

2.1 病鱼症状

患病初期, 病鱼上浮于水面游动, 体表并无明显症状. 随着病情加重, 病鱼体表和鳍条出现溃疡. 解剖观察, 内部脏器病变明显, 尤其是肾脏显著肿大, 体积甚至达到正常肾脏的 10 倍以上, 肝脏、脾脏、胆囊等也有肿大现象, 心脏、肠及鳃等组织未

见明显的病变(图 1).



图1 患病美国红鱼肿大的肾脏

2.2 病原菌特征

从病鱼的肾脏、肝脏组织中均分离出菌落形状相同的优势菌. 分离细菌在 50%海水普通营养琼脂平板上 28℃恒温培养 24 h 后, 出现直径约为 1 mm 的乳白色菌落, 在 TCBS 琼脂平板上可生长, 呈绿色菌落. 选代表菌株 MH061205-2 进行细菌鉴定、人工回归感染、药敏等实验. 病鱼组织经超薄切片, 透射电镜观察未见病毒颗粒等其他原核生物体(有关组织病理学研究另文发表).

革兰氏染色结果显示菌体形态一致, 为革兰氏阴性, 呈杆状, 直径约 0.5 μm, 长 1.0~3.0 μm. 氧化酶反应阳性. 电镜观察显示菌体呈杆状, 极生单鞭毛(图 2). 经 API 20E 系统鉴定(表 1), 菌株 MH061205-2 和海藻希瓦氏菌(*Shewanella algae*)为同种菌.

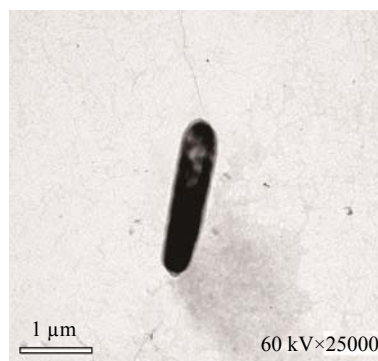


图2 病原菌形态透射电镜观察(Bar=1.0 μm)

2.3 人工回归感染实验

感染试验结果表明, 菌株 MH061205-2 对美国红鱼有很强的致病性, 与自然发病鱼症状基本一致. 从病变组织肾、肝中均分离到纯度一致的细菌, 分离菌经 16S rRNA 基因 PCR 扩增、测序, 鉴定结果与自然发病鱼体分离的 MH061205-2 菌株完全

表 1 菌株 MH061205-2 和海藻希瓦氏菌 API 20E 生化反应表

鉴定项目	美国红鱼病原菌	参照菌株	鉴定项目	美国红鱼病原菌	参照菌株
氧化酶	+	+	明胶酶	+	+
V-P 反应	—	—	葡萄糖	—	—
H ₂ S 产生	+	+	甘露醇	—	—
吲哚产生	—	—	肌醇	—	—
柠檬酸利用	—	—	山梨醇	—	—
β-半乳糖苷酶	—	—	鼠李糖	—	—
精氨酸双水解酶	—	—	蔗糖	—	—
赖氨酸脱羧酶	—	—	密二糖	—	—
鸟氨酸脱羧酶	+	+	苦杏仁苷	—	—
色氨酸脱氨酶	—	—	L-阿拉伯糖	—	—
脲酶	—	—			

注：“+”代表结果阳性，“—”代表结果阴性。

表 2 美国红鱼人工感染试验结果

组别	数量/尾	菌液当量浓度/(CFU·mL ⁻¹)	剂量/mL	累计死亡数/尾								死亡率/%
				1 d	2 d	3 d	4 d	6 d	8 d	11 d	14 d	
注射	20	4.5×10 ⁷	0.5	0	0	2	7	16	20	20	20	100
口灌	20	4.5×10 ⁷	1.0	0	0	0	0	5	17	20	20	100
创伤浸泡	20	3.4×10 ⁶	30*	0	0	0	0	4	12	17	17	85
非创伤浸泡	20	3.4×10 ⁶	30*	0	0	0	0	0	5	12	12	60
注射对照	20	saline	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
口灌对照	20	saline	1.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
创伤对照	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
健康对照	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

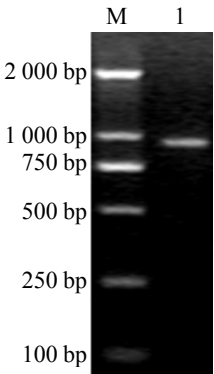
注：*为浸泡 30 min.

一致。注射组和口灌组死亡率为 100%，创伤浸泡组死亡率为 85%，非创伤浸泡组死亡率为 60%，对照组没有死亡，也无任何病症(表 2)。

2.4 病原菌 16S rRNA 序列分析及系统发育树构建

PCR 扩增病原菌 MH061205-2 的 16S rRNA 基因片段长度为 900 bp(图 3)，GenBank 登陆注册号为 FJ217206。将该序列与 GenBank 中已报道的相关性较高的 16S rRNA 基因序列进行比对，结果表明：该菌株与海藻希瓦氏菌(*S. algae*)(AF005249)的 16S rRNA 基因序列相似性达 99%以上。从系统发育树(图 4)上可以看出，该菌株与海藻希瓦氏菌位于同一个分支上。据此鉴定美国红鱼肾肿大症病原菌

为海藻希瓦氏菌。



M: 分子量标准; 1: MH061205-2 菌株的 PCR 产物

图 3 16S rRNA 基因序列 PCR 扩增电泳

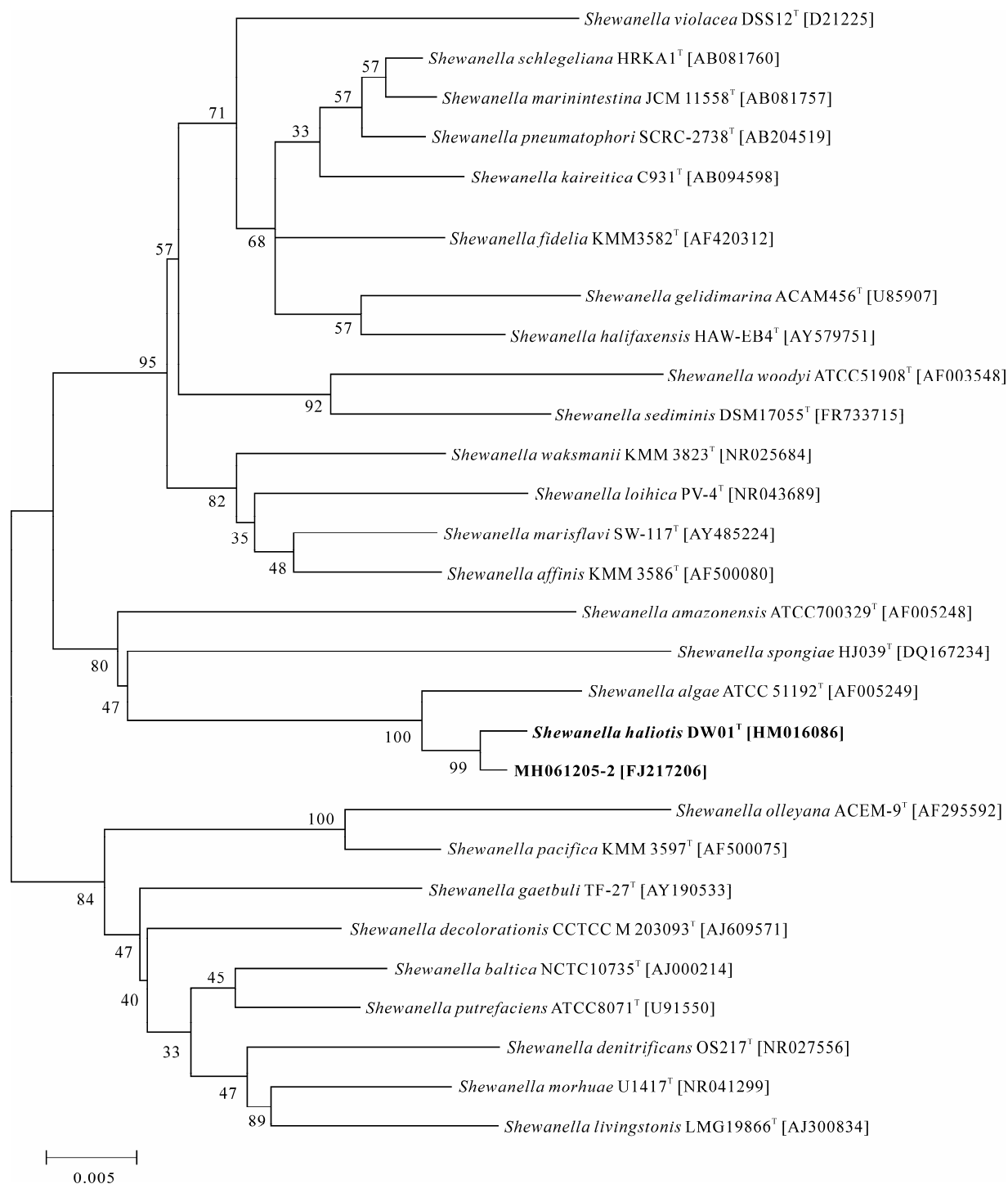


图 4 根据 16S rRNA 基因序列同源性构建的 MH061205-2 与相关菌株的系统进化树

2.5 药物敏感性试验

从表 3 可以看出, 病原菌对头孢噻肟、头孢他啶、哌拉西林、卡比西林和环丙沙星等 15 种药物敏感, 对链霉素、卡那霉素和阿米卡星 3 种药物中等敏感, 对头孢噻吩和四环素有抗性。

3 讨论

关于由细菌性病原引起鱼类肾脏疾病的报道较少, Wiens 等^[7]报道鲑鱼肾杆菌(*Renibacterium salmoninarum*)能引发鱼类慢性系统疾病, 其症状

表3 病原菌对药物敏感性试验结果

药品	纸片含量/ μg	抑菌圈直径/mm	敏感性	药品	纸片含量/ μg	抑菌圈直径/mm	敏感性
青霉素 G	10	25	S	链霉素	10	16	M
氨苄西林	10	26	S	卡那霉素	30	14	M
卡比西林	100	29	S	阿米卡星	30	15	M
哌拉西林	100	30	S	庆大霉素	10	20	S
头孢呋肟	30	28	S	四环素	30	11	R
头孢唑肟	30	24	S	氯霉素	30	27	S
头孢噻肟	30	33	S	利福平	5	18	S
头孢他啶	30	30	S	呋喃唑酮	300	20	S
头孢噻吩	30	0	R	诺氟沙星	10	22	S
复方新诺明	23.75	20	S	环丙沙星	5	27	S

注: S 为敏感; M 为中等敏感; R 为抗性。

特点为肾脏呈淡灰色且肿胀坏死,可垂直传播,一旦发病几乎无法治疗。本文报道由海藻希瓦氏菌感染引起的美国红鱼肾肿大症,表现为特征性的肾脏严重充血和显著肿大,目前尚未见有相关文献报道。陈尝等^[8]从美国红鱼溃疡病中分离鉴定的病原菌也为海藻希瓦氏菌,主要症状为体表溃疡、腹腔和肠道积水,肝脾肿大,肾毛细血管充血,但未显现肾脏肿大特征。同样的病原菌却呈现不同的病症特点和组织病理差别,笔者认为美国红鱼溃疡病的发病时间在 5~6 月份,水温为 25~28℃,与本研究的肾肿大症在 11~12 月份发病,水温 18~20℃有较大差异,这可能与不同水温引起的急性感染和慢性感染造成组织病变差异有关。

希瓦氏菌属(*Shewanella*)的分类地位从 20 世纪 30 年代至 80 年代经历了多次变更^[9-11]。直到 1985 年,MacDonell 等^[12]根据其 5S rDNA 序列数据,最终确定 *Shewanella* 为弧菌科的一个新属。该属中有腐败希瓦氏菌(*S. putrefaciens*)、海藻希瓦氏菌(*S. algae*)和波罗希瓦氏菌(*S. baltica*) 3 个种,*S. putrefaciens*和 *S. baltica* 对其研究主要集中在食品、工业和环境保护等方面,而 *S. algae* 则与人类及动物感染有关,已被证明是人畜共患的病原菌^[13-14]。Richards 等报道在多种海水养殖贝类中分离出海藻希瓦氏菌,但未进行更深入的研究^[15]。本研究鉴定美国红鱼肾肿大症的病原菌为海藻希瓦氏菌,明确了其分类地位。尽管海藻希瓦氏菌作为养殖鱼类病害的病原菌的报道尚少,但其能感染人体,

因此应该引起重视,特别注意不能摄食发病鱼和死亡鱼,避免人和动物的间接感染。研究发现,人工创伤感染和非创伤感染均能使试验鱼体因感染病原而发病,除阐明鱼体感染的可能途径外,也提示人们在海滨浴场要注意可能遭受感染。Holt 等^[16]的研究已报道夏季有较高比例人群感染海藻希瓦氏菌。

从药物敏感试验结果可知,头孢噻肟、头孢他啶、哌拉西林、卡比西林和环丙沙星等 15 种药物对病原菌有较强的抑菌作用,在生产上可酌情使用其中部分低残留无公害的药物,作为防控由海藻希瓦氏菌引起的美国红鱼肾肿大症。

参考文献:

- [1] 沈智华,钱冬,许文军,等.红拟石首鱼海豚链球菌分离、鉴定及致病性研究[J].水生生物学报,2005,29: 678-683.
- [2] Myung J O, Sung J J, Suk R K, et al. A fish nodavirus associated with mass mortality in hatchery-reared red drum[J]. *Sciaenops Ocellatus Aquaculture*, 2002, 211:1-7.
- [3] 马爱敏,闫茂仓,胡利华,等.患溃烂症的眼斑拟石首鱼分离的灿烂弧菌的鉴定[J].微生物学报,2010,50(4): 542-547.
- [4] 周旻曦,王国良,朱文渊.美国红鱼的一种新疾病[J].科学养鱼,2010,6:53.
- [5] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001:115-120.
- [6] Andrews J M. For the BSAC working party on susceptibility testing BSAC standardized disc sus-

- ceptibility testing method[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2001, 48(Suppl):43-57.
- [7] Wiens G D, Kaattary S L. Bacterial kidney disease (*Renibacterium salmoninarum*) [C]//Woo P T K, Bruno D W. Fish Diseases and Disorders. United Kindom: CAB Intern Publ, 1999:269-302.
- [8] 陈偿, 胡超群, 陈晓燕, 等. 新发现的红拟石首鱼溃疡病病原海藻施万氏菌的分离和分子鉴定[J]. 海洋与湖沼, 2003, 34(1):1-8.
- [9] Derby H A, Hammer B W. Bacteriology of butter IV: Bacteriological studies of surface taint butter[J]. Iowa Agric Exp Stn Res Bull, 1931, 145:387-416.
- [10] Shewan J M, Hobbs G, Hodgkiss W, et al. A determinative scheme for the identification of certain genera of gram-negative bacteria with special reference to pseudomonadaceae[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1960, 23:379-390.
- [11] Lee J V, Gibson D M, Shewan J M. A numerical taxonomic study of some *Pseudomonas*-like marine bacteria[J]. Journal of General Microbiology, 1977, 98: 439-451.
- [12] MacDonell M T, Colwell R R. Phylogeny of the vibronaceae and recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*[J]. Systematic and Applied Microbiology, 1985, 6:171-182.
- [13] Beleneva I A, Magarlamov T Y, Eliseikina M G, et al. Biochemical and pathogenic properties of the natural isolate of *Shewanella algae* from Peter the Great Bay, Sea of Japan[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2009, 102(3):250-255.
- [14] Gressier M, Mbayo D, Deramond H, et al. First case of human spondylodiscitis due to *Shewanella algae*[J]. International Journal of Infectious Diseases, 2010, 14: 261-264.
- [15] Oh H S, Kim K A, Kim E C, et al. Outbreak of *Shewanella algae* and *Shewanella putrefaciens* infections caused by a shared measuring cup in a general surgery unit in Korea[J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2008, 29(8):742-748.
- [16] Holt H M, Gahrn-Hansen B, Bruun B. *Shewanella algae* and *Shewanella putrefaciens*: Clinical and microbiological characteristics[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2005, 11(5):347-351.

Pathogeny and Pathogenicity of Kidney Intumesce of *Sciaenops ocellatus*

ZHANG Ji-ting, ZHU Wen-yuan, WANG Guo-liang*

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: We isolated a bacterial strain identified for MH061205-2 from kidney in diseased *Sciaenops ocellatus* with kidney intumesce, and further studied pathogeny and pathogenicity of kidney intumesce of *Sciaenops ocellatus*. Through experimental infection, we confirm that the isolated bacterial is the pathogen responsible for the mortality. We also characterize the strain on the basis of its morphology, physiology, and sequence comparison of 16S rRNA. The results of those experiments show that the strain MH061205-2 is identified as *Shewanella algae*. The bacterial are gram-negative rod, and occur singly, being negative in oxidase and sensitive to 15 chemotherapeutants such as Cefotaxime, Ceftazidime, Piperacillin, Carbenicillin and Ciprofloxacinum. As the pathogen of the *Sciaenops ocellatus* with kidney intumesce, *Shewanella algae* are reported in this article. The study is expected to render some academic value on the prevention and control of fish diseases and enriching pathogen library data of marine fish.

Key words: *Sciaenops ocellatus*; kidney intumesce; *Shewanella algae*

(责任编辑 史小丽)