

doi: 10.7541/2020.017

美洲黑石斑迟缓爱德华氏菌分离、鉴定及致病性研究

吴静¹ 王庚申² 柳敏海³ 李伟业^{3,4} 汪玮² 施慧²
许文军² 谢建军² 何杰²

(1. 浙江海洋大学水产学院, 舟山 316000; 2. 浙江省海洋水产研究所, 浙江省海水增养殖重点实验室, 舟山 316000;
3. 舟山市水产研究所, 舟山 316000; 4. 宁波大学, 宁波 315000)

摘要: 养殖美洲黑石斑(*Centropristis striata*)发生以“内脏白点”为主要临床症状的暴发性死亡, 为明确美洲黑石斑患病原因, 对患病鱼进行了病原分离、鉴定及致病性研究, 以期防治美洲黑石斑迟缓爱德华氏菌病提供参考依据。患病的美洲黑石斑的症状主要表现为鳃和内脏组织如脾脏及肾脏上布满白点。从患病鱼的病灶处分离纯化到一株优势致病菌株(ZS201807), 通过对该菌株形态特征、生化特性和16S rDNA基因测序等综合分析, 鉴定该菌为迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)。人工感染实验证实此菌株可引起健康美洲黑石斑发病并表现出与自然发病相似的症状。利用组织切片和电镜超薄切片技术对患病美洲黑石斑鱼的肝脏、脾脏、鳃丝等6种组织进行组织病理学分析。组织病理结果显示, 脾和肾是感染较严重的主要靶器官, 脾脏组织内大量红细胞浸润, 出现严重瘀血; 鳃丝毛细血管扩张; 肾小管管腔狭窄, 肾小球肿大, 上皮细胞肿胀, 细胞空泡化。超微病理显示, 病鱼脾脏和头肾组织有大量杆状细菌积聚。药敏试验发现该菌对环丙沙星(5 µg/片)、四环素(30 µg/片)、恩诺沙星(5 µg/片)等14种药物敏感; 对青霉素(10 U/片)、阿奇霉素(15 µg/片)、丁胺卡那(30 µg/片)等13种药物耐受。证实此次养殖美洲黑石斑发病死亡的病原菌为迟缓爱德华氏菌。

关键词: 美洲黑石斑; 迟缓爱德华氏菌; 分离鉴定; 组织病理; 电镜超薄切片

中图分类号: S947.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2020)01-0143-10

美洲黑石斑(*Centropristis striata*), 又称条纹锯鲷和黑锯鲷, 俗称黑石斑。属鲷科(Serranidae)、石斑鱼亚科(Epinephelinae)、石斑鱼属(*Epinephelus*), 原产于美国大西洋和墨西哥沿岸。因其肉质肥美、口感滑而不腻, 而且生长速度快, 病害少, 易于养殖, 深受美国 and 加拿大消费者欢迎。2002年, 我国首次引入美洲黑石斑并进行了育苗试验, 2006年实现规模化生产并逐步走向网箱、工厂化养殖, 如今美洲黑石斑已成为非常有前景和市场价值的养殖对象^[1,2]。

目前, 国外关于美洲黑石斑的研究主要集中在健康养殖与繁育、生态渔业评价和生物学等方面, Copeland等^[3]研究了野生美洲黑石斑以四种不同密

度圈养在循环池系统中的生长与饲料利用; Alam等^[4]研究了美洲黑石斑幼鱼的膳食蛋白需要量; Weirich^[5]研究了美洲黑石斑幼鱼在不同盐度下对急性氨和亚硝酸盐暴露的耐受性; 国内对美洲黑石斑的研究主要集中在营养成分^[6]、育苗及养成技术等方面, 李海燕等^[7]用解剖和光镜技术观察了美洲黑石斑消化道的形态及组织学结构; 邱金海等^[8]对美洲黑石斑进行了营养成分分析与营养价值评价, 但涉及病害方面的研究报道很少。2018年7月, 舟山市水产研究所围塘养殖的一批美洲黑石斑幼龄鱼暴发性死亡, 死亡率达30%。病鱼活动缓慢, 沉于养殖池底部。鱼体表完好未见异常, 解剖病鱼发现, 鱼鳃丝上白点明显, 脾脏和肾脏组织均布满

收稿日期: 2019-01-21; 修订日期: 2019-08-21

基金项目: 浙江省科技厅院所专项(2017F50016、2017F30039); 浙江海洋大学博士启动基金(22135010815); 浙江省重点研发项目(2018C02SAA00108); 浙江省海洋水产研究所科技计划(2019F101)资助 [Supported by Special Projects of Zhejiang Provincial Science and Technology Department (2017F50016, 2017F30039); Doctor Foundation of Zhejiang Ocean University (22135010815); Zhejiang Province Key Research and Development Project (2018C02SAA00108); Science and Technology Plan of Zhejiang Marine Fisheries Research Institute (2019F101)]

作者简介: 吴静(1995—), 女, 江苏盐城人; 硕士研究生; 主要从事海水养殖病害研究。E-mail: 616980865@qq.com

通信作者: 施慧, E-mail: huishi2002@126.com

1—2 mm左右灰白色小结节, 肝脏未见结节。本课题组从发病鱼体内脏组织分离纯化到一株致病菌, 开展了致病性、细菌形态学、生理生化、分子生物鉴定、药敏试验以及组织病理和电镜超微病理切片等研究, 以期为美洲黑石斑健康养殖和疾病防治提供理论基础和科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

发病美洲黑石斑于2018年7月采集自舟山市水产研究所, 体长10—12 cm, 体重40—50 g, 选取临床表现出特征性的鳃丝苍白的病鱼。人工感染试验材料为舟山市水产研究所健康美洲黑石斑, 体长12—14 cm。

主要试剂: 胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)购于青岛高科园海博生物技术有限公司, TCBS琼脂购于杭州滨和微生物试剂有限公司, 细菌基因组DNA提取试剂盒购自QIAGEN公司, 药敏纸片购于杭州微生物试剂有限公司, *Taq* DNA聚合酶、dNTP购自TaKaRa公司。

1.2 病原菌分离培养

取临床表现出典型病症的濒死病鱼, 取鳃丝、体表黏液及肠道内容物等制成水浸片, 显微镜下观察。用75%酒精棉球对病鱼体表消毒后, 在无菌条件下取病鱼肝脏、肾脏小块, 进行组织匀浆, 并划线接种于常规细菌培养基胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)和弧菌选择性培养基(TCBS)培养基上, 28℃培养24—48h, 观察细菌生长情况。挑选形态一致的菌株纯化培养, 将纯化后的菌株置于30%甘油溶液中-80℃保存备用。

1.3 形态学观察和生理生化特性鉴定

挑取TSA培养基上纯化培养的菌落, 进行革兰氏染色, 并在显微镜下观察其菌落形态和大小。采用API 20E试剂盒鉴定其生理生化特性, 具体操作按照试剂盒说明进行。

1.4 药敏试验

将优势菌株接种于TSA培养基上, 经28℃纯化培养48h后, 加入无菌生理盐水制成菌悬液, 采用纸片扩散法, 取100 μ L制备的菌悬液(经显微镜计数约为 10^9 CFU/mL)涂布于TSA平板, 用无菌镊子将药敏纸片轻轻贴在平板表面, 28℃恒温培养24h后测定抑菌圈直径, 根据说明书的标准确定分离菌株对不同抗生素的敏感性。

1.5 人工感染实验

将分离到的优势菌株经TSA培养基28℃培养48h后, 用0.85%的无菌生理盐水制成菌悬液。采用

分光光度法测定菌液浓度, 配置 1×10^7 、 1×10^6 和 1×10^5 CFU/mL的菌悬液。选择规格均一、有活力的健康美洲黑石斑进行回感实验(体重80 g左右, 体长12—14 cm), 每组7尾鱼, 每个感染组设一个平行对照分别对应A、B、C组, 并设1个空白对照组。采用腹腔注射法对美洲黑石斑进行人工感染实验, 每尾鱼注射1.5 mL菌悬液, 空白对照组注射等量的0.85%生理盐水。试验水温26℃, 连续充气, 不投喂, 每天换水量为30%, 连续观察7d, 记录发病症状和死亡情况。并对濒死病鱼进行重分离实验。

1.6 组织病理学观察

光镜样品制备及观察 选择鳃部白点症状明显的发病鱼, 分别取其肝、脾及肾等组织经Bouin氏液固定, 在24h后换数次75%乙醇冲洗, 最后保存于75%的乙醇中。固定样品经后续乙醇系列及丙酮脱水过程, 移入二甲苯溶液中透明, 浸蜡包埋后切片, 烤干后展片以苏木精-伊红染色法(HE染色)染色, 中性树胶封片, 显微镜下观察拍照^[9-11]。

电镜样品制备及观察 选择患病活鱼, 将病鱼肝、脾及肾等内脏组织切成2 mm×2 mm×2 mm的小块分别固定于2.5%戊二醛磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.4)中, 4℃固定4h以上。在0.1 mol/L磷酸缓冲液中4℃漂洗过夜后再用1%锇酸溶液固定, 经过一系列浓度的乙醇脱水, 样品块经环氧树脂包埋后制备超薄切片, 在透射电镜下观察拍照^[12, 13]。

1.7 分离菌16S rDNA基因序列测定及系统发育树构建

利用细菌基因组提取试剂盒提取分离菌的全基因组DNA作为PCR模板。采用细菌16S rDNA通用扩增引物, 正向引物27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', 反向引物1492R: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'。引物由上海生物工程公司合成。

PCR反应体系为50 μ L: 10×PCR缓冲液5 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 4 μ L, *Taq*聚合酶(5 U/ μ L) 0.5 μ L, 10 μ mol/L正向和反向引物各0.5 μ L, 1 μ L模板, 其余用无菌去离子水补足。

PCR反应条件: 94℃预变性5min, 94℃变性1min, 56℃退火45s, 72℃延伸1min, 30个循环, 72℃延伸10min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后, 由上海生物工程公司测序。

运用DNAMAN软件对获取的基因序列进行排序、比对, 同时应用NCBI中BLAST软件对测得的基因序列进行同源检索。从GenBank中下载同源性较高基因序列作参考, 使用MEGA3.1分析软件,

Kimura-2法计算遗传距离, 并采用bootstrap (重复次数1000)进行自举分析, 邻接法构建分子发育树。

2 结果

2.1 解剖观察与临床症状

发病池塘水温29℃左右, 发病鱼多为体长12 cm左右的幼鱼, 该病日死亡率在1%以上。病鱼体表完好、无溃疡等异常病症。解剖濒死活鱼, 主要病症表现为鳃部白点明显; 肝脏发白; 脾脏肿大, 布满白色结节; 头肾、后肾肿大, 布满白色结节; 心脏上偶见有白色结节(图 1); 将组织器官上的白色结节压片后, 革兰氏染色可见大量阴性短杆菌(图 2)。

2.2 寄生虫检测和细菌分离

对采集病鱼样本的体表黏液、鳃丝、肠道内容物等进行显微镜检, 均未发现致病性寄生虫。在无菌条件下, 使用细菌培养基TSA和TCBS对病鱼的肝、肾和脾等内脏组织进行细菌分离培养, 28℃培养24—48h后观察。在24h后, TSA和TCBS未发现有优势致病菌出现, 48h在TSA培养基上长出直径约1 mm, 表面湿润、隆起的灰白色菌落。TCBS上为绿色、直径约1 mm左右的细小菌落。

2.3 形态特征及生理生化试验结果

分离菌ZS201807经革兰氏染色后为阴性、杆状菌, 其大小约 $0.5\ \mu\text{m}\times 2\ \mu\text{m}$, 可运动。采用API 20E系统鉴定分离菌, 其主要生理特征为赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶阳性, 精氨酸双水介酶、邻硝基苯-半乳糖苷酶、脲酶、明胶酶阴性, 产生 H_2S , 不形成吡啶, 不利用柠檬酸, V-P试验阴性, 氧化酶阴性, 能发酵葡萄糖, 不能利用甘露醇、肌醇、山梨醇、鼠李糖、蔗糖、阿拉伯糖产酸。鉴定结果与文献[14]迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)生理生化特征基本一致, 初步将ZS201807鉴定为迟缓爱德华氏菌(表 1)。

2.4 药敏试验

利用27种抗生素对分离菌进行药敏试验(表 2)。用纸片法测得分离菌株对环丙沙星、头孢曲松、诺氟沙星、头孢噻肟、氧氟沙星、四环素、恩诺沙星等14种药物敏感; 对青霉素、阿奇霉素、丁胺卡那、妥布霉素、链霉素、卡那霉素、万古霉素等13种药物耐受。

2.5 16S rDNA基因序列分析结果

通过PCR反应扩增, 经1%琼脂糖凝胶电泳检测获得1400 bp的特异性条带。经测序获得16S rDNA基因序列, 与GenBank中已登陆的核酸序列进行BLAST分析, 采用MEGA软件构建系统发育树, 结果显示分离菌与爱德华氏菌属自然聚为一分支, 分离菌的16S rDNA基因序列与迟缓爱德华氏菌最为相似, 同源性高达99% (图 3)。结合生理生化鉴定结果, 进一步确定ZS201807为迟缓爱德华氏菌。

2.6 人工感染实验

用分离到的优势菌对健康美洲黑石斑进行腹腔注射感染实验, 接种后第2天开始出现死亡。A组在感染4d后全部死亡, B组在7d内死亡率为28.6%, C组在7d内死亡率为0, 对照组在实验期间无发病症状、无死亡(表 3)。人工感染试验发病鱼表现的临床症状与自然发病鱼的相似, 活力下降, 解剖病死鱼, 脾脏肿大并有大量白色结节, 但鳃部和其他内脏组织未见白色结节(图 4); 从感染鱼分离得到的优势菌与ZS201807菌落形态、生理生化特征基本一致, 经16S rDNA基因序列测定与回感菌株一致, 证实分离菌株ZS201807是导致此次美洲黑石斑暴发性死亡的病原菌。

2.7 组织病理切片观察结果

在普通光学显微镜下观察病鱼的组织病理切片, 发现病鱼的肝脏、肾脏等组织有严重的病理变化。病鱼肝脏中可见明显的细胞肿胀, 血管内出现



图 1 患病美洲黑石斑鱼及其解剖图

Fig. 1 Sick black seabass and its anatomy

a. 鳃丝有白点; b. 肝脏发白; c. 脾脏肿大、白点结节

a.: Gill filaments with white dots; b. Liver whitened; c. Spleen was enlarged and had white dot nodules

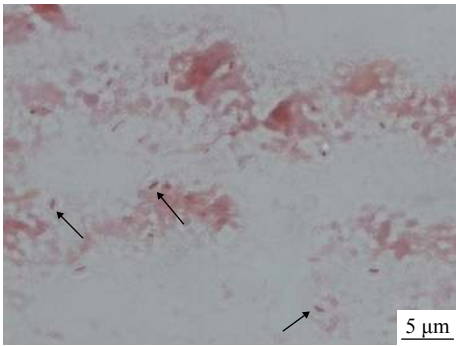


图2 白色结节压片革兰氏染色
Fig. 2 White nodule tablet with gram-stained

表1 分离菌生理生化鉴定结果

Tab. 1 Physiological and biochemical identification results of isolated bacteria

鉴定项目 Appraisal item	菌株 Bacterial strain	迟缓爱德华氏菌 <i>E. tarda</i>
β-半乳糖苷酶β-galactosidase	—	—
精氨酸双水介酶Arginine digydrolase	—	—
赖氨酸脱羧酶Lysine decarboxylase	+	+
鸟氨酸脱羧酶Ornithine decarboxylase	+	+
柠檬酸利用Citrate utilization	—	—
H ₂ S产生H ₂ S production	+	+
脲酶Urease	—	—
色氨酸脱羧酶Tryptophan deaminase	±	N
吲哚产生Indole production	—	+
V-P试验V-P test	—	—
明胶酶Gelatinase	—	N
葡萄糖Glucose	+	+
甘露醇Mannitol	—	—
肌醇Inositol	—	—
山梨醇Sorbitol	—	—
鼠李唐Rhamnose	—	—
蔗糖Sucrose	—	—
密二糖Melibiose	—	—
苦杏仁苷Amygdalin	—	N
阿拉伯糖Arabinose	—	—

注：“+”表示阳性反应，“-”表示阴性反应，“N”表示没有数据
Note: “+” positive, “-” negative, “N” no data

轻微溶血, 肝细胞界限模糊, 细胞间质增宽, 细胞核浓缩或崩解消失(图版 I -1); 脾脏组织细胞坏死, 大量红细胞浸润, 出现严重瘀血, 在红髓和白髓区均可见散在的坏死灶, 坏死灶内实质细胞界限模糊不清, 有淋巴细胞浸润(图版 I -2); 鳃丝末端膨大, 鳃丝毛细血管扩张, 鳃小片肿胀、排列不规则呈波状扭曲, 严重的鳃小片上皮细胞与毛细血管分离, 淋巴细胞浸润(图版 I -3); 病鱼肾组织坏死、大量淋

巴细胞浸润, 肾小管管腔狭窄, 部分肾小管闭塞, 失去原有结构, 上皮细胞肿胀界限模糊不清晰、细胞核空泡化; 肾小球肿大, 严重的崩解, 囊腔变窄, 细胞空泡化(图版 I -4); 头肾出现大面积组织坏死和崩解并形成坏死灶, 部分坏死组织淀粉样变性, 血窦扩张, 瘀血(图版 I -5); 病鱼心肌纤维结构松散、紊乱, 心肌退化变性, 胞质液化呈均质玻璃样病变, 部分心肌细胞坏死(图版 I -6)。

表2 药敏试验结果

Tab. 2 Results of drug sensitivity test

抗菌药物Antibiotic	剂量Dosage	抑菌圈直径 Diameter of inhibition (mm)	敏感性 Sensitivity
青霉素Gpenicillin G	10U	15	R
氨苄西林Ampicillin	10 (μg/disc)	21	S
苯唑西林Oxacillin	1 (μg/disc)	0	R
头孢曲松 Ceftriaxone	30 (μg/disc)	40	S
头孢噻肟 Cefotaxime	30 (μg/disc)	36	S
头孢呋辛Cefuroxim	30 (μg/disc)	23	S
头孢拉定 Cephadrine,	30 (μg/disc)	31	S
卡那霉素 Kanamycinum	30 (μg/disc)	10	R
链霉素Streptomycin	10 (μg/disc)	10	R
妥布霉素 Tobramycin	10 (μg/disc)	10	R
四环素Tetracycline	30 (μg/disc)	33	S
多西环素 Doxycycline	30 (μg/disc)	30	S
阿奇霉素 Azithromycin	15 (μg/disc)	11	R
诺氟沙星 Norfloxacin	10 (μg/disc)	38	S
氧氟沙星Ofloxacin	5 (μg/disc)	34	S
环丙沙星 Ciprofloxacin	5 (μg/disc)	44	S
恩诺沙星 Enrofloxacin	10 (μg/disc)	32	S
万古霉素 Vancomycin	30 (μg/disc)	0	R
多黏菌素 Polymyxin B	300 IU	0	R
新生霉素 Novobiocin	30 (μg/disc)	22	S
磺胺异恶唑 Sulfisoxazole	300 (μg/disc)	32	S
复方新诺 Sulfamethoxazolum	23.75/1.25	20 (μg/disc)	R
阿莫西林 Amoxicillin	20 (μg/disc)	30	S
制霉菌素Nystatin	100 (μg/disc)	0	R
氟苯尼考Florfenicol	30 (μg/disc)	30	S
丁胺卡那Amikacin	30 (μg/disc)	11	R
庆大霉素 Gentamicin	10 (μg/disc)	9	R

注: R=耐受, S=敏感
Note: R= tolerant, S= sensitive

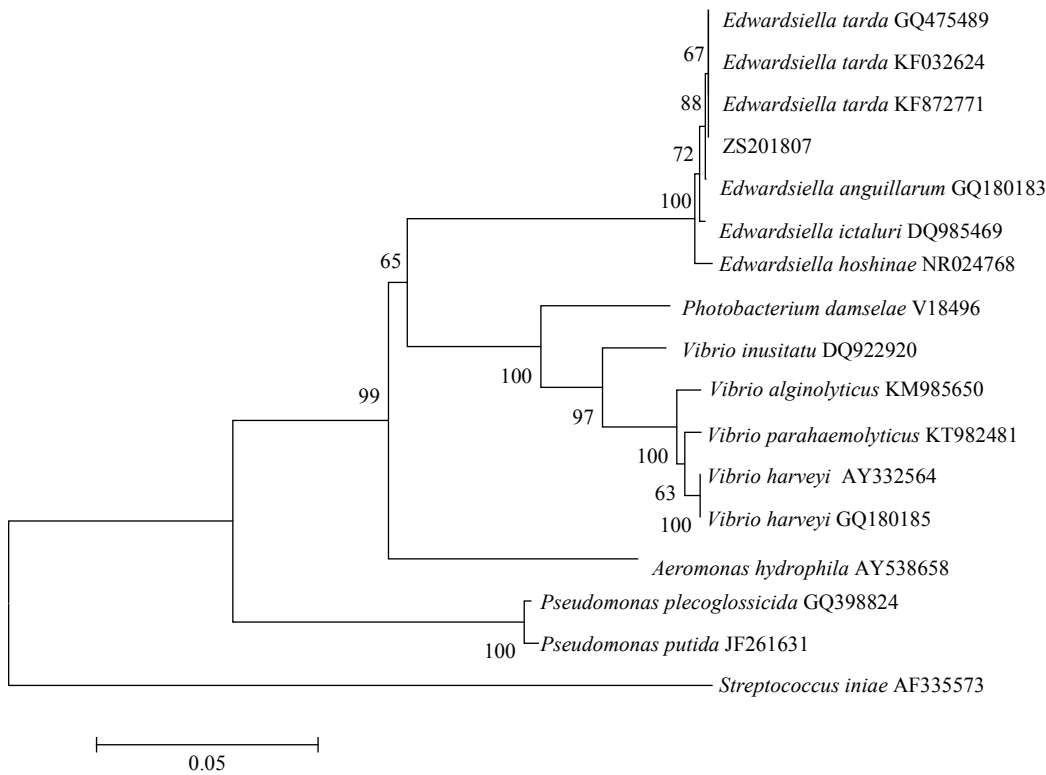


图 3 根据分离菌 16S rDNA 基因序列构建的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S rDNA gene sequence of isolated bacteria

表 3 美洲黑石斑腹腔注射感染试验结果

Tab. 3 Mortality of black seabass infected by intraperitoneal injection

实验分组 Group	细菌浓度Bacteria concentration (CFU/nL)	实验尾数No. of fish	注射剂量Injection volume (mL)	死亡时间Time to death (d)	死亡数Number of death	死亡率Mortality rate (%)
A	1×10^7	7	1.5	2—4	7	100
B	1×10^6	7	1.5	4	2	28.6
C	1×10^5	7	1.5	7	0	0
对照组 Control	生理盐水 0.85% saline	7	1.5	7	0	0



图 4 人工感染实验鱼解剖图

Fig. 4 Anatomical map of artificial infection experimental fish

2.8 超微病理

内脏组织超薄切片电镜观察结果显示, 心、肝、肾等组织在电镜下未观察到细菌, 但病鱼脾脏

和头肾组织有大量细菌侵染, 细胞结构破坏严重。病鱼脾脏和头肾组织中有大量杆状细菌积聚, 与坏死细胞形成结节, 细胞结构遭到严重破坏(图版 II -1、2); 细胞间有大量不同切面的细菌菌体, 菌体的细胞壁电子密度较高(图版 II -3), 细菌正在以出芽的方式生长发育, 并有大量的芽孢出现(图版 II -4)。

3 讨论

3.1 内脏白点病病原

细菌病是影响海水鱼类养殖的主要病害之一, 内脏白点病是近年海水鱼类养殖中比较常见的疾病。目前, 引起海水鱼类内脏白点病的病原种类很多, 邱杨玉^[15]在患内脏白点病大黄鱼(*Larimichthys crocea*)内脏中分离鉴定到一株病原菌, 经生理生化

monas putida); 罗霞等^[16]从患内脏白点病的斑鳢(*Channa maculata*)的肝、脾、肾组织中分离一株致病菌GC1, 得到1502 bp的16S rRNA基因序列, 与舒氏气单胞菌(*Aeromonas schubertii*)同源性达到99%; 张静等^[17]对导致网箱养殖鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)内脏白点病的致病菌进行了16S rRNA和HSP60基因序列分析, 结果鉴定致病菌株为哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)。在本实验中患病美洲黑石斑脾、肾内脏组织有明显白色结节, 从发病鱼中分离到一株优势菌株ZS201807, 人工感染试验结果显示, 菌株ZS201807在健康美洲黑石斑上复制出相同的临床症状, 说明本实验分离到的菌株ZS201807是引起此次美洲黑石斑发病死亡的病原菌。该菌株革兰氏染色后为阴性、短杆状菌, 采用通用引物扩增了该菌的16S rDNA序列, 并对扩增片段进行了序列测定与系统发育分析, 结果表明该菌株16S rDNA基因与迟缓爱德华氏菌的同源性最高, 达99%, 从而在分子生物学水平上将菌株ZS201807鉴定为迟缓爱德华氏菌。

3.2 感染迟缓爱德华氏菌症状及致病性

迟缓爱德华氏菌(*E. tarda*)属肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*), 爱德华氏菌属(*Edwardsiella*), 最早在蛇中被发现, 1962年日本学者Hoshina首次报道在患病鳗鲡(*Anguilla japonica*)中发现迟缓爱德华氏菌。该菌分布范围广泛, 易感物种包括两栖类、哺乳类、爬行类、鱼类等多种动物以及人类, 可引起人类的肠胃炎、流行性腹泻和败血症等疾病。目前该菌在20多种鱼类中引起病害, 迟缓爱德华氏菌作为病原菌的研究在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)等鱼种中均有报道^[20-22]。不同的鱼类感染迟缓爱德华氏菌后所表现出的症状也不同, 患病鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)症状为腹部发红、肛门红肿, 肝脏、肠壁充血, 腹腔有血样腹水^[23]; 自然发病罗非鱼(*Tilapia nilotica*)同样出现腹部发红、肛门红肿突出, 不同的是腹腔内充满气体, 有臭味, 胆囊高度充盈^[24]; 本研究发病美洲黑石斑临床症状未出现体表异常, 但鳃丝有明显白点且黏液较多, 同时解剖病鱼脾和头肾等内脏组织有大量的白点结节, 但没有出现文献报道的眼球突出和浑浊、皮肤坏死和肌肉溃烂、肛门突出等临床症状。刘春等^[25]对斑马鱼(*Danio rerio*)进行了迟缓爱德华氏菌的致病性试验, 当菌浓度达到 1×10^7 CFU/mL, 可以使试验感染鱼全部发病死亡, 与本文的人工感染实验中实验组美洲黑石斑全部发病死亡时菌液浓度一致。许晓芸等^[13]研究迟缓爱德华氏菌

人工感染美洲鳗鲡(*Anguilla rostrata*)后, 组织病理类型表现为肝肾混合型, 而超微病理表现为肾脏型。本研究中美洲黑石斑组织病理主要集中在脾脏和肾脏组织, 但超微电镜切片只在脾脏和头肾组织中观察到迟缓爱德华氏菌, 可能与不同鱼种机体免疫机制差异有关。迟缓爱德华氏菌病在水产养殖中属于常见的传染病, 对水产养殖业带来的经济损失非常大。目前关于迟缓爱德华氏菌病的传播途径还没有研究清楚, 有学者提出许多动物肠道携带迟缓爱德华氏菌以及水体里存在大量该菌, 可能会造成迟缓爱德华氏菌病的传播^[19]。

3.3 不同源迟缓爱德华氏菌抗药性

目前治疗迟缓爱德华氏菌病的主要手段是使用抗生素, 但不同源的分离菌株对抗生素的敏感程度也不一样, 鳊分离到的迟缓爱德华氏菌对诺氟沙星、氧氟沙星、环丙沙星等抗生素高度敏感^[23]; 患病澳洲宝石鱼(*Scortum barcoo*)分离的迟缓爱德华氏菌对环丙沙星、红霉素、氯霉素、万古霉素等抗生素较为敏感, 对其他药物中度或不敏感^[26]; 大菱鲆分离到的迟缓爱德华氏菌株对先锋霉素V、庆大霉素、氟哌酸、痢特灵等抗生素敏感^[27]。在本研究中, 分离获得的美洲黑石斑源迟缓爱德华氏菌对环丙沙星、四环素、恩诺沙星等14种药物敏感; 对青霉素、阿奇霉素、丁胺卡那等13种药物耐受。所以在抗生素的使用上, 应该根据实际情况合理选择, 其中一些禁药应该严格排除。

参考文献:

- [1] Lei J L, Lu J W. The breed predominance and culture prospects of *Centropristis striata* Linnaeus [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2007, 28(5): 110-115. [雷霖霖, 卢继武. 美洲黑石斑鱼的品种优势和养殖前景 [J]. *渔业科学进展*, 2007, 28(5): 110-115.]
- [2] Wang B, Zhu M Y, Mao X H. The breeding new fishes-*Centropristis striata* [J]. *Hebei Fisheries*, 2003(5): 26-27. [王波, 朱明远, 毛兴华. 养殖新品种——美洲黑石斑鱼 [J]. *河北渔业*, 2003(5): 26-27.]
- [3] Copeland K A, Watanabe W O, Carroll P M, et al. Growth and feed utilization of captive wild black sea bass *Centropristis striata* at four different densities in a recirculating tank system [J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2010, 34(3): 300-307.
- [4] Alam M S, Watanabe W O, Carroll P M. Dietary protein requirements of juvenile black sea bass, *Centropristis striata* [J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2010, 39(5): 656-663.
- [5] Weirich C. Tolerance of juvenile black sea bass *Centropristis striata* to acute ammonia and nitrite exposure at various salinities [J]. *Fisheries Science*, 2010, 72(5): 915-

- 921.
- [6] Dang R, Zhu J Q, Qiu X Z. Analysis of flesh content and nutrient components in the muscle of *Centropristis striata* [J]. *Journal of Marine Sciences*, 2010, **28**(2): 60-66. [党冉, 竺俊全, 邱新志. 美洲黑石斑鱼含肉率及肌肉营养成分分析 [J]. *海洋学研究*, 2010, **28**(2): 60-66.]
- [7] Li H Y, Zhu J Q, Chen F, *et al.* The morphology of the digestive tract of *Centropristis striata* [J]. *Journal of Biology*, 2011, **28**(4): 31-34. [李海燕, 竺俊全, 陈飞, 等. 美洲黑石斑鱼消化道的形态结构 [J]. *生物学杂志*, 2011, **28**(4): 31-34.]
- [8] Qiu J H, Lin X. Analysis of nutrient and evaluation of nutritional value for *Centropristis striata* [J]. *Journal of Hydroecology*, 2009, **2**(6): 107-112. [邱金海, 林星. 美洲黑石斑鱼营养成分分析与营养价值评价 [J]. *水生态学杂志*, 2009, **2**(6): 107-112.]
- [9] Lü J C. Isolation and identification of the pathogenic bacteria from diseased turbot, and the histopathology and immunohistochemistry of the turbot [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2008: 55-57. [吕俊超. 养殖大菱鲆病原菌的分离鉴定、组织病理学及免疫组织化学 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008: 55-57.]
- [10] Li W K, Yu X, Wen X R, *et al.* Studies on the gill histopathology and its prevention and treatment of silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix*, infected by *Dactylogyrus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1994, **18**(4): 305-311. [李文宽, 于翔, 闻秀荣, 等. 水库鲢鱼小鞘指环虫病鳃组织病理及其防治 [J]. *水产学报*, 1994, **18**(4): 305-311.]
- [11] Xu X, Li H, Ye S G, *et al.* Pathological observation of hybrid sturgeon infected with *Aeromonas hydrophila* [J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2014, **29**(3): 227-231. [徐祥, 李华, 叶仕根, 等. 杂交鲟嗜水气单胞菌病的组织病理学研究 [J]. *大连海洋大学学报*, 2014, **29**(3): 227-231.]
- [12] Zhang D F, An S W, Zhou S M, *et al.* Histopathology and ultrastructure of visceral white-spots in *Pseudosciaena crocea* [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, **38**(4): 11-16. [张丹枫, 安树伟, 周素明, 等. 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)内脏白点病的组织病理和超微病理分析 [J]. *渔业科学进展*, 2017, **38**(4): 11-16.]
- [13] Xu X Y, Chen J M, Feng J J, *et al.* Pathological and ultrastructural changes of American eel (*Anguilla rostrata*) infected by *Edwardsiella tarda* [J]. *Journal of Jimei University (Natural Science)*, 2017, **22**(6): 17-23. [许晓芸, 陈锦民, 冯建军, 等. 迟缓爱德华氏菌感染美洲鳗鲡后的组织与超微病理观察 [J]. *集美大学学报(自然科学版)*, 2017, **22**(6): 17-23.]
- [14] Dong X Z, Cai M Y. Common Bacterial System Identification Manual [M]. Beijing: Science Press, 2001: 76-77. [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: 76-77.]
- [15] Qiu Y Y. The study on visceral white spot of *Pseudosciaena crocea* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2012: 10-12. [邱杨玉. 大黄鱼内脏白点病的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2012: 10-12.]
- [16] Luo X, Deng G C, Liao G L, *et al.* Isolation and identification of causative pathogen for visceral white spot in Taiwan snakehead *Channa maculate* [J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2012, **27**(2): 95-100. [罗霞, 邓国成, 廖国礼, 等. 斑鳢内脏白点病病原的分离鉴定 [J]. *大连海洋大学学报*, 2012, **27**(2): 95-100.]
- [17] Zhang J, Shi H, Xie J J, *et al.* Isolation and identification of causative pathogen for visceral white spot in *Lateolabrax japonicus* stocked in sea-cage [J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2009, **28**(2): 176-182. [张静, 施慧, 谢建军, 等. 网箱养殖鲈鱼内脏白点病病原的分离与鉴定 [J]. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2009, **28**(2): 176-182.]
- [18] Chen A P, Jiang Y L, Qian D, *et al.* *Edwardsiellasis* [J]. *Journal of Fishery of China*, 2011(7): 49-50. [陈爱平, 江育林, 钱冬, 等. 迟缓爱德华氏菌病 [J]. *中国水产*, 2011(7): 49-50.]
- [19] Wang B, Mo Z L. *Edwardsiella tarda* and its pathogenesis [J]. *Studia Marina Sinica*, 2007, **9**(48): 138-144. [王波, 莫照兰. 迟缓爱德华氏菌及其致病机理 [J]. *海洋科学集刊*, 2007, **9**(48): 138-144.]
- [20] Zhang X J, Zhan W B, Chen C Z, *et al.* Studies on the infection and pathogen of *Edwardsiella tarda* in flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, **29**(1): 31-37. [张晓君, 战文斌, 陈翠珍, 等. 牙鲆迟钝爱德华氏菌感染症及其病原的研究 [J]. *水生生物学报*, 2005, **29**(1): 31-37.]
- [21] Deng X Y, Luo W, Tan S H, *et al.* Isolation and identification of bacteriosis pathogen—*Edwardsiella tarda* from yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) with red head disease [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2008, **39**(5): 511-516. [邓先余, 罗文, 谭树华, 等. 黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)“红头病”病原菌迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)的分离及鉴定 [J]. *海洋与湖沼*, 2008, **39**(5): 511-516.]
- [22] Wang Y G, Qin L, Zhang Z, *et al.* *Edwardsiellosis* on cultured *Scophthalmus maximus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2007, **31**(4): 487-495. [王印庚, 秦蕾, 张正, 等. 养殖大菱鲆的爱德华氏菌病 [J]. *水产学报*, 2007, **31**(4): 487-495.]
- [23] Wu Y L, Miao P F, Yu H, *et al.* Isolation, identification and drug susceptibility test of pathogenic *Edwardsiella tarda* in *Siniperca chuatsi* [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2018, **49**(4): 794-799. [吴勇亮, 苗鹏飞, 于辉, 等. 鳊鱼致病性迟缓爱德华氏菌的分离鉴定及药敏试验 [J]. *南方农业学报*, 2018, **49**(4): 794-799.]
- [24] Deng X W, Xie Z X, Liu J B, *et al.* Isolation and identification of *Edwardsiella tarda* in *Tilapia nilotica* [J]. *Journal of Hydroecology*, 2009, **2**(1): 114-117. [邓显文, 谢芝勋, 刘加波, 等. 罗非鱼迟缓爱德华氏菌的分离与

- 鉴定 [J]. 水生态学杂志, 2009, 2(1): 114-117.]
- [25] Liu C, Li K B, Wang Q, *et al.* Identification, pathogenicity and drug sensitivity of *Edwardsiella tarda* from *Danio rerio* [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2013, 32(3): 105-111. [刘春, 李凯彬, 王庆, 等. 斑马鱼迟缓爱德华氏菌的鉴定、致病性及药物敏感性 [J]. *华中农业大学学报*, 2013, 32(3): 105-111.]
- [26] Ye X H, Lin X G, Wang Y M. Identification and detection of virulence gene of the pathogenic bacteria *Edwardsiella tarda* in cultured *Scortum barcoo* [J]. *Freshwater Fisheries*, 2010, 40(1): 50-54. [叶旭红, 林先贵, 王一鸣. 养殖澳洲宝石鱼迟缓爱德华氏菌的分离鉴定及致病基因的检测 [J]. *淡水渔业*, 2010, 40(1): 50-54.]
- [27] Wang Y, Zhang X H, Lü J C, *et al.* Isolation of *Edwardsiella tarda* from diseased turbot (*Scophthalmus maximus*) and vaccination against *Edwardsiella tarda* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, 16(3): 394-403. [王燕, 张晓华, 吕俊超, 等. 养殖大菱鲆病原菌迟缓爱德华氏菌的分离鉴定及其疫苗研制 [J]. *中国水产科学*, 2009, 16(3): 394-403.]

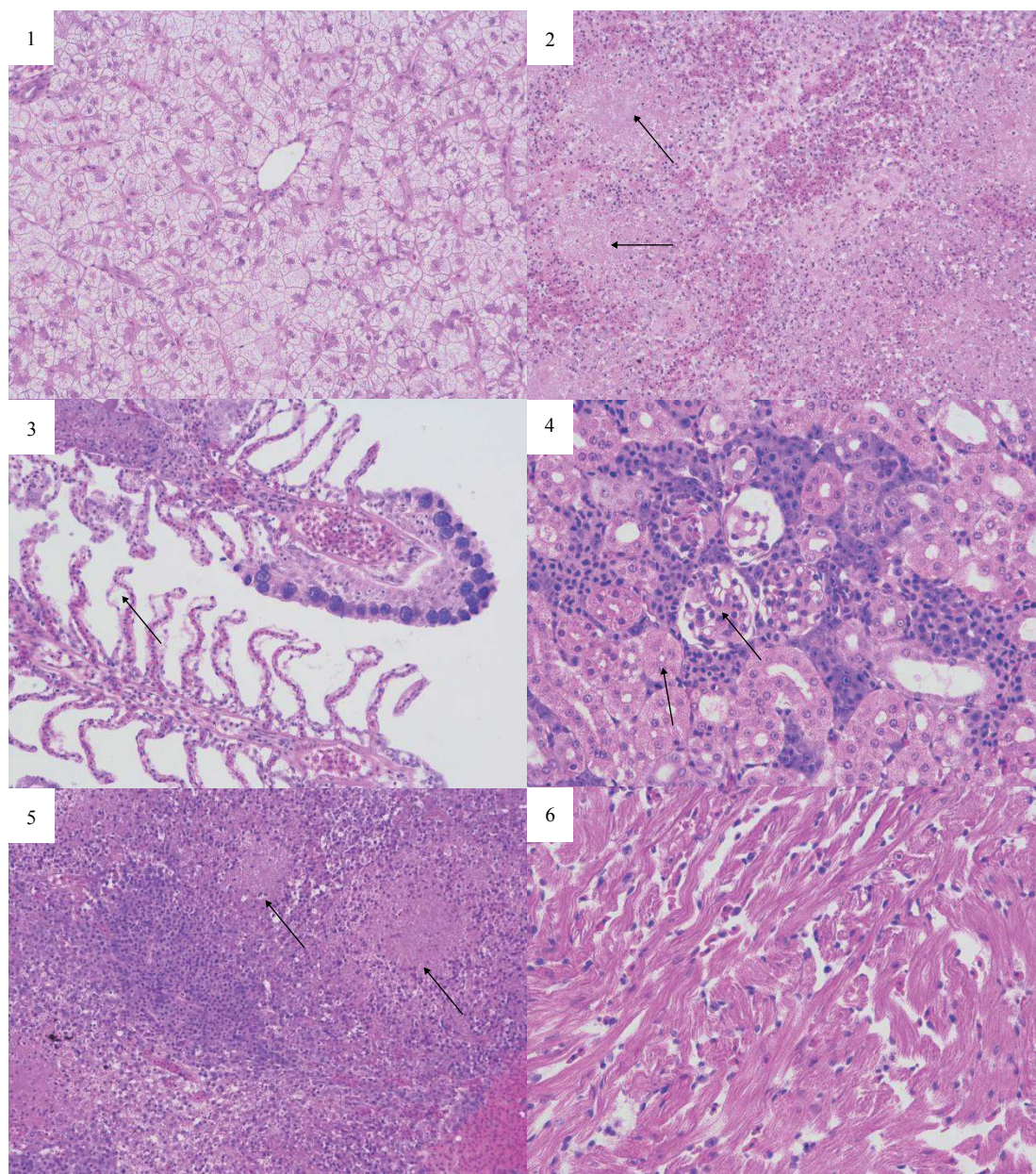
ISOLATION, IDENTIFICATION AND PATHOGENICITY OF THE PATHOGENIC BACTERIUM FROM *CENTROPRISTIS STRIATA*

WU Jing¹, WANG Geng-Shen², LIU Min-Hai³, LI Wei-Ye^{3,4}, WANG Wei², SHI Hui², XU Wen-Jun²,
XIE Jian-Jun² and HE Jie²

(1. School of Fishery, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, China; 2. Key Laboratory of Seawater Aquaculture in Zhejiang Province, Zhejiang Marine Aquatic Research Institute, Zhoushan 316000, China; 3. Zhoushan Aquatic Research Institute, Zhoushan 316000, China; 4. Ningbo University, Ningbo 315000, China)

Abstract: To discover the causes of sick black seabass, bacterial strain ZS201807 was isolated from the cultured *Centropristis striata* with the symptoms of white spots in gill and visceral organs. The biochemical and physiological characteristics of the isolated strain were studied by using conventional method, such as API 20 and 16S rDNA gene sequence. The bacteria were identified as *Edwardsiella tarda*. The artificial infection experiment indicated that the strain was the causative agent of sick *Centropristis striata*. Histopathological analysis revealed that the spleen and kidney were the main target organs with serious infection, such as a large number of erythrocyte infiltration in the spleen tissue, serious blood stasis, gill filaments capillary dilation, renal tubular cavity stenosis, glomerular enlargement, epithelial cell swelling and cell cavitation. Ultrastructural pathology showed that there was a large accumulation of rod bacteria in the spleen and head kidney tissue of the sick fish. The drug susceptibility test showed that the bacterium was sensitive to 14 kinds of drugs such as ciprofloxacin (per 5 µg), tetracycline (per 30 µg) and enrofloxacin (per 5 µg), and resistant to 13 kinds of drugs such as penicillin (per 10 U), azithromycin (per 15 µg) and amikacin (per 30 µg). It was confirmed that the pathogen of the disease and death of the black seabass was slow *Edwardsiella tarda*.

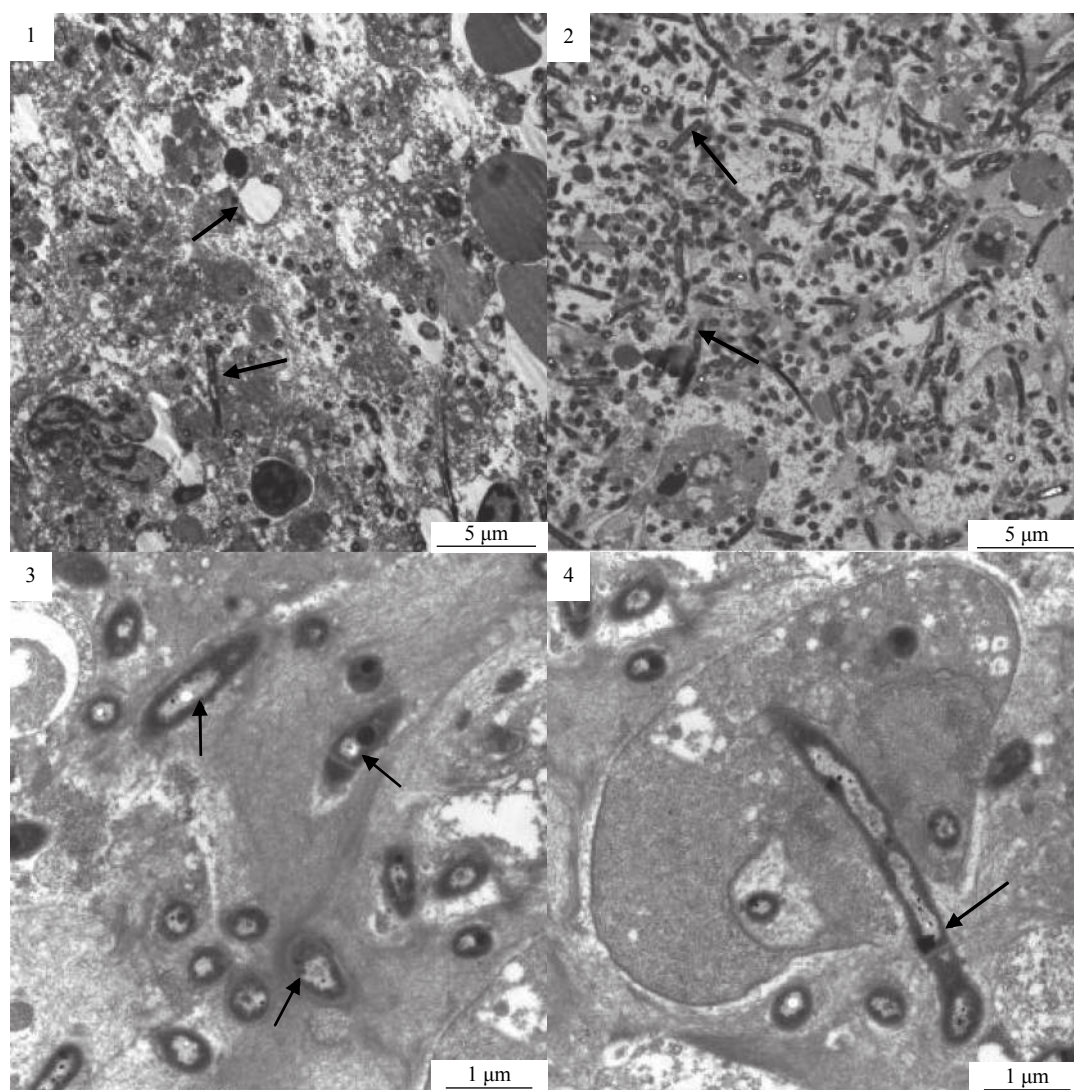
Key words: *Centropristis striata*; *Edwardsiella tarda*; Isolation and identification; Histopathology; Ultrathin section



图版 I 病鱼肝脏、脾脏、鳃丝、肾脏、头肾、心脏组织病理切片

Plate I Pathological slices of liver, spleen, gill wire, kidney, head kidney and heart of diseased fish

1. 肝细胞明显肿胀, 细胞核溶解消失($\times 200$); 2. 脾脏组织细胞坏死, 形成坏死灶(箭头), 有淋巴细胞浸润($\times 200$); 3. 鳃小片排列不规则, 上皮细胞与毛细血管分离(箭头)($\times 200$); 4. 肾小管上皮细胞间界限模糊、管腔变窄, 肾小球肿大(箭头)($\times 200$); 5. 头肾实质细胞间界限模糊、大面积组织坏死和崩解并形成坏死灶(箭头)($\times 200$); 6. 心肌纤维排列无序($\times 200$)
1. Liver cells were significantly swollen, nuclear dissolved and disappeared ($\times 200$); 2. Spleen tissue cells were necrotic, necrosis developed (arrows), lymphocyte infiltrated ($\times 200$); 3. Irregular arrangement of gill patches, epithelial cells were separated from capillaries (arrow) ($\times 200$); 4. Renal tubular epithelial cells had blurred boundaries, the lumen was narrower, the glomerular was enlarged (arrows) ($\times 200$); 5. Renal parenchymal cells were blurred, the large area was necrotic and disintegrated and necrosis were formed (arrows) ($\times 200$); 6. Myocardial fibers arrangement disordered ($\times 200$)



图版 II 病鱼脾、头肾超微病理切片

Plate II Ultrastructural pathological section of spleen and head kidney of diseased fish

1. 脾脏组织中杆状细菌散在; 2. 头肾组织里有大量杆状细菌; 3. 大量不同切面的细菌; 4. 细菌以出芽的方式生长发育(箭头) (图 2. 头肾; 图 1、3、4. 脾脏)

1. The rod bacteria dispersed in the spleen tissue; 2. A large number of rod-shaped bacteria in the head kidney tissue; 3. A large number of different tangent bacteria; 4. Bacteria grew and developed in a budding way (Fig. 2. head kidney; Fig. 1, 3, 4. Spleen)