

养殖鱼类致病诺卡氏菌研究进展*

袁思平 王国良** 金珊

(宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211)

摘要: 综述了国内外有关养殖鱼类诺卡氏菌病的发生情况及其病原生物学、分类学、致病性、组织病理学、诊断检测技术和防治等方面的研究进展, 提出了一些问题和建议, 以为相关研究提供参考。

关键词: 鱼类, 诺卡氏菌, 诺卡氏菌病

中图分类号: Q939.13 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2006) 02-0137-05

Review of Pathogenic Nocardias in Cultured Fish*

YUAN Si-Ping WANG Guo-Liang** JIN Shan

(Faculty of Life Science and Bio-technology, Ningbo University, Ningbo 315211)

Abstract: Some studies on nocardiosis in cultured fish were critically reviewed, including pathogenic bacterium, taxonomy, pathogenicity, histopathologically, diagnosis, controlling method and immunology. Some problem and advice on this disease were suggested.

Key words: Fish, Nocardia, Nocardiosis

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^[1]。在水产养殖中, 首例报道诺卡氏菌病的是虹彩脂鱼 (Valdez & Conroy 1963)^[2], 以后陆续发生在虹鳟、黄尾鲷、乌鳢、大西洋牡蛎、大口鲈和海鲈^[3-20]等水产养殖动物中(表1), 给水产养

表 1 主要养殖鱼类致病诺卡氏菌

致病菌	感染对象	流行地	文献
星状诺卡氏菌 (<i>N. asteroides</i>)	虹彩脂鱼 (<i>Hyphessobrycon innesi</i>)	阿根廷	[2]
	虹鳟 (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	美国	[3]
	乌鳢 (<i>Channa maculata</i>)	台湾	[4, 5]
	大口鲈 (<i>Micropterus salmoides</i>)	台湾	[6, 7]
	河鲈 (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	加拿大	[8]
鳊鱼诺卡氏菌 (<i>N. seriolae</i>) (原名 <i>N. kampachi</i>)	黄尾鲷 (<i>Seriola quinqueradiata</i>)	日本	[9~14]
	海鲈 (<i>Lateolabrax japonicus</i>)	台湾	[15]
	大黄鱼 (<i>Larimichthys crocea</i>)	中国大陆	[16]
粗形诺卡氏菌 (<i>N. crassostreae</i>)	大西洋牡蛎 (<i>Crassostrea gigas</i>)	美国	[17, 18]
杀鲑诺卡氏菌 (<i>N. salmonicida</i>)	红鲑鱼 (<i>Oncorhynchus nerka</i>)	美国	[19]
<i>Nocardia</i> sp.	大西洋鲑鱼 (<i>Salmo salar</i> L.)	澳大利亚	[20]

* 浙江省自然科学基金项目 (No. Y304078)
浙江省教育厅项目 (No. 20051691)
** 通讯作者 Tel: 0574-87600122, E-mail: wanggl@nbip.net
收稿日期: 2005-07-14, 修回日期: 2005-09-20

殖造成了巨大损失。诺卡氏菌曾是日本水产养殖中最主要的病原菌之一,也是大西洋牡蛎养殖的主要病原菌之一,近年来对我国台湾水产养殖业影响较大。王国良等^[16]在我国大陆也首次在网箱养殖大黄鱼发现了诺卡氏菌病。本文综述了国内外学者进行的相关研究,并讨论了存在的一些问题与展望。

1 生物学性状

诺卡氏菌革兰氏阳性,好氧,具抗酸性或弱抗酸性或在生长的某一阶段具有抗酸性^[7],菌体呈长或短杆状,或细长分枝状,常断裂成杆状至球状体,基丝发达,呈分枝状,气丝较少。直径 $0.2\mu\text{m} \sim 1.0\mu\text{m}$,长 $2.0\mu\text{m} \sim 5.0\mu\text{m}$,丝状体长 $10\mu\text{m} \sim 50\mu\text{m}$ 。可单个、成对、Y或V字状排列或排列成栅状,并具膨大或棒状末端。不运动,不产生孢子。菌体超薄切片在电镜下可观察到胞壁为3层结构,电子密度高的肽聚糖层与质膜由一层电子密度低的区域隔开,并具假分枝^[17,18]。粗形诺卡氏菌(*N. crassostreae*)的单个菌体呈较规则的球杆状,不产生气丝^[17,18]。

诺卡氏菌在TSA、blood agar (BA = TSA + 5% goat blood)、BHI、L-J和小川等培养基上都能生长^[9,15],生长缓慢,28℃需5~14d,形成白色或淡黄色沙粒状菌落,粗糙易碎,边缘不整齐,偶尔在表面形成皱折。

关于诺卡氏菌生理生化、化学和分子特征的研究较多,共同特征为过氧化氢酶阳性、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。细胞壁含 meso-DAP、半乳糖和阿拉伯糖(IV/A型)^[14],磷酸类脂类型为PⅡ型,含枝菌酸、大量直链不饱和脂肪酸和10-甲基结核硬脂酸。主要的甲基萘醌为MK-8(H4)^[14]和MK-9(H2)^[11]。DNA的(G+C) mol%为64~72^[11]。

2 致病性与组织病理学研究

诺卡氏菌在海水中含量其实并不高,是一种机会致病菌,当养殖鱼类体质虚弱、免疫力低下时,通过口腔^[19]、鳃或创伤^[16]而感染。该病感染率和死亡率都较高,自然发病率可达到15%~30%,严重的达到60%。人工感染的死亡率可高达90%~100%。也有的鱼类感染率较低,对池养大西洋鲑鱼的自然感染率只有3%^[20]。

感染诺卡氏菌的病鱼起初体表无明显症状,仅反应迟钝,食欲下降,上浮水面。随着病情加重,部分鱼体表变黑^[7]或出现了白色或淡黄色结节^[19],溃烂出血,尾鳍也有溃烂出血^[14],并逐渐死亡。在鳃、前肾、肝、脾、鳔、肾等内脏组织中有白或淡黄色结节出现,直径 $0.1\text{cm} \sim 0.2\text{cm}$ ^[7,15],结节作涂片会发现大量诺卡氏菌。但也有的内部症状不明显^[20]。乌鳢^[5]和虹鳟^[3]患该病腹部肿大,内有少量透明至黄色液体,而且在心、卵巢、肌肉都有结节。

在组织病理学方面相关学者也作了较多的研究,Kubota^[10]和Kumamoto^[13]对患病黄尾鲮进行了组织病理学研究。Bransden^[20]发现体表结节表现为亚急性炎症,早期肉芽形成和纤维化,并有菌体出现。Lai等^[7]对感染诺卡氏菌大口鲈病变组织切片研究发现明显的肉芽肿和炎性细胞浸润。Chen^[15]组织切片发现,病鱼结节是典型的肉芽肿,有的是多病灶有的弥散状,一个典型的肉芽肿大小不一,由坏死的组织碎片和中心聚生的菌体组成,外面由上皮细胞包围。新形成的结节中有巨噬细胞。在结节中心有抗酸的似球状的菌体。

3 分类学研究

诺卡氏菌在分类学上属于细菌域, 厚壁菌门, 放线细菌纲, 放线菌目, 诺卡氏菌科^[22]。从 1889 年 Trevisan 首次提出诺卡氏菌属^[22]以来, 诺卡氏菌的分类研究逐渐由最初的以形态描述、生理生化特征为主发展到现在的多相分类。分子分类和系统进化的研究, DNA G + C mol%、DNA-DNA 杂交、DNA-RNA 杂交、核酸序列分析和 rRNA 转录间隔序列 (ITSs) 分析等技术应用于诺卡氏菌的分类, 与形态、生理生化、化学特征结合形成了多项分类。

在养殖鱼类中, *N. asteroides* 是第一个发现的致病诺卡氏菌^[2]。随后 Kariya^[9] 在黄尾鲷分离到诺卡氏菌, 但当初只是以形态学和生理生化特征分类的, 命名为阿米巴诺卡氏菌 (*N. kampfchi*)。在 1988 年 Kudo^[14] 等用分子分类的方法 (G + C% 和 DNA-DNA 杂交) 结合其他特性真正确定了其分类地位, 并正式命名为鲷鱼诺卡氏菌 (*N. seriolea*)。在 1995 年, Chun 和 Goodfellow^[23] 对鲷鱼诺卡氏菌 (*N. seriolea*) 和其它几种诺卡氏菌的 16SrRNA 基因进行了 PCR 扩增和测序, 并对诺卡氏菌属进行了系统发育分析。至此, 诺卡氏菌的分类地位基本明确。1998 年, Friedman^[18] 用 16S rRNA 系统发育分析鉴定大西洋牡蛎诺卡氏菌病, 命名为粗形诺卡氏菌 (*N. crassostreae*)。Isik^[19] 用 16S rRNA 系统发育分析鉴定红鲑鱼诺卡氏菌病, 命名为杀鲑诺卡氏菌 (*N. salmoncidae*)。

现在的诺卡氏菌属成为了一个均一的分类单元, 属内至少可归为 3 个 rRNA 亚群, 集中于最早描述的种, 即星状诺卡氏菌 (*N. asteroides*)、巴西诺卡氏菌 (*N. brasiliensis*) 和豚鼠耳炎诺卡氏菌 (*N. otitidiscaviarum*)^[22]。*N. salmoncidae* 与 *N. asteroides* 在同一个 rRNA 亚群, *N. crassostreae*、*N. seriolea* 和 *N. otitidiscaviarum* 在同一个 rRNA 亚群。

4 诊断与检测技术

在以前, 养殖鱼类疾病主要是通过外部、解剖症状以及细菌分离和组织病理学观察来诊断。诺卡氏菌在病情严重时, 外部和解剖症状都较明显, 而且诺卡氏菌可用选择性培养基分离培养, 根据症状和病原菌形态等特征, 基本可以诊断。由于诺卡氏菌病病情不剧烈, 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, 故给该病的早期检测诊断带来极大困难。

随着现代生物技术的发展, 免疫和分子技术也应用在养殖鱼类诺卡氏菌病的诊断和检测中。Ikeda^[24] 研究了患诺卡氏菌病黄尾鲷的血液组成变化, 并作为一种诊断指标。Kusuda^[25] 用荧光抗体法检测黄尾鲷诺卡氏菌病。Gee^[26] 用 PCR 技术检测大西洋牡蛎诺卡氏菌病。Kono^[27] 用 16S ~ 23S rRNA 转录间隔序列 PCR 快速检测黄尾鲷诺卡氏菌病 *N. seriolea*, 比选择性培养基 (L-J 培养基) 的检出率要高的多, 能检携带者和症状不明显的感染鱼, 是一种快速而灵敏的方法, 为该病防治开辟了新的道路。

5 防治研究

对养殖鱼类诺卡氏菌病在免疫方面的研究较少。Kusuda^[28] 研制疫苗防治黄尾鲷诺

卡氏菌病。Chen^[15]对病鱼进行了免疫细胞化学研究。Friedman^[17]对大西洋牡蛎诺卡氏菌病进行了间接荧光抗体分析。但均未取得较好效果,进展缓慢。

在药物防治方面,Chen^[29]研究了 *N. asteroides* 对抗生素的敏感性。测定了鱼体分离的 16 株 *N. asteroides* 对 24 种抗生素的敏感性,发现联磺甲氧苄啶 [trimethoprim-sulphamethoxazole (TMP-SMX)] 和氯霉素、红霉素、利福平、强力霉素等抗生素对 *N. asteroides* 有较好的抑制效果。并用 TMP-SMX (1:5) 以 40mg/L 拌饵治疗,取得了较好效果。Chen^[30]还研究了 *N. asteroides* 对消毒剂的敏感性。用鱼体分离的 10 株 *N. asteroides* 对 4 种常用消毒剂进行敏感性试验,发现苯扎氯铵 [benzalkonium chloride (BKC) 十二烷基二甲基苄基氯化铵] 即洁尔灭为抗 *N. asteroides* 的最好消毒剂。并以 2mg/L 对养殖水体消毒取得了较好效果。其中有些药物已是国内外禁用的药物,应从无公害的角度研制有效的防治药物。

6 问题与展望

诺卡氏菌曾影响日本、美国、澳大利亚、加拿大等地的水产养殖业,并造成很大经济损失。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^[14]。我国大陆也首次在养殖大黄鱼中发现诺卡氏菌病,应该引起相关学者的关注^[16]。

在养殖鱼类诺卡氏病的研究上,对病原的研究较多,病原的分类方法基本成熟。在病理方面,大多在组织病理上做了一定的研究,应用其他方法进行病理研究的较少,应加深对病理的研究,探明诺卡氏菌的致病机理。加强对其病原的来源和致病途径的研究,为有效防治提供理论基础。

在诊断和检测上研究较少,还没有一种快速灵敏的检测试剂盒,应该加强该病的早期诊断技术研究。在免疫学上的研究一直未能得到好的效果。应加强在免疫学上的研究。药物方面的研究也不多,建议从无公害的角度研制有效的防治药物。

据各学者的研究分析,造成养殖鱼类诺卡氏菌病的主要原因可能是养殖环境、养殖密度或饵料问题。应探索建立健康的养殖模式,保持良好的养殖水体,采用合理的养殖密度,使用新鲜的饵料,科学投饲,建立全方位的疾病防治和病鱼隔离等措施,加强养殖生态的调控,从根本上控制疾病的发生,促进生产发展。

诺卡氏菌是一类重要的自然资源,某些种能产生抗生素、重要的代谢产物或酶类,有此种可用于废水(物)的生物处理。在养殖鱼类中诺卡氏菌的发现,也丰富了微生物资源。应该开发利用,转害为利。

参考文献

- [1] 刘志恒,姜成林.放线菌现代生物学与生物技术.北京:科学出版社,2004.78~79.
- [2] Valdez I E, Conroy D A. Microbiologia Espanola, 1963, 16: 249~253.
- [3] Snieszko S F, Bulloch G L, Dunbar C E, et al. Journal of Bacteriology, 1964, 88: 1809~1810.
- [4] Hsu F S, Chu H M, Weng C N. JCRF Fish Ser, 1977, 29: 22~27.
- [5] Chen S C, Tung M C, Tsai W C. COA Fish Ser, 1989, 15: 42~48.
- [6] Chen S C, Tung M C. Journal of Chinese Society of Veterinary Science, 1991, 17: 15~22.
- [7] Lai K C, Chen S N, Kou G H. COA Fish Ser, 1991, 29: 1~15.

- [8] Campbell G, Mackelvie R M. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 1968, **25**: 423 ~ 425.
- [9] Kariya T, Kubota S, Nakamura Y, *et al.* *Fish Pathology*, 1968, **3**: 16 ~ 23.
- [10] Kubota S, Kariya T, Nakamura Y, *et al.* *Fish Pathology*, 1968, **3**: 24 ~ 33.
- [11] Kusuda R, Taki H. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1973, **9**: 937 ~ 943.
- [12] Kusuda R, Taki H, Takeuchi T. *Bull. Jap Soc Sci Fish*, 1974, **10**: 369 ~ 373.
- [13] Kumamoto H, Horita Y, Hatai K, *et al.* *Bulletin of the Nippon Veterinary Zootechnical College*, 1985, **34**: 100 ~ 118.
- [14] Kudo T, Hatal K, Seino A. *Int J Syst Bacteriol*, 1988, **38**: 173 ~ 178.
- [15] Chen S C, Lee J L, Lai C C. *et al.* *J. Fish Dis*, 2000, **23** (5): 299 ~ 307.
- [16] Wang G L, Yuan S P, Jin S. *J Fish Dis*, 2005, **28** (6): 339 ~ 345.
- [17] Friedman C S, Hedrick R P. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1991, **57**: 109 ~ 120.
- [18] Friedman C S, Beaman B L, Chun J, *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, 1998, **1**: 237 ~ 246.
- [19] Isik K, Chun J, Hah Y C, *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, 1999, **49**: 833 ~ 837.
- [20] Bransden M P, Carson J, Munday B L, *et al.* *J Fish Dis*, 2000, **23** (1): 83 ~ 85.
- [21] Chen S C. *J Fish Dis*, 1992, **5** (1): 47 ~ 53.
- [22] 张建丽, 刘志恒. *微生物学报*, 2001, **41** (4): 513 ~ 517.
- [23] Chun J, Goodfellow M. *Int J Syst Bacteriol*, 1995, **45**: 240 ~ 245.
- [24] Ikeda Y, Ozaki H, Hayama K, *et al.* *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1976, **42** (9): 1055 ~ 1064.
- [25] Kusuda R, Kawahara E. *Bull Soc Sci Fish*, 1987, **53** (3): 389 ~ 394.
- [26] Gee A, Elston R A. *Journal of Shellfish Research*, 1997, **16** (1): 264.
- [27] Kono T, Ooyama T, Chen S C, *et al.* *Aquacult Res*, 2002, **33** (14): 1195 ~ 1197.
- [28] Kusuda R. Bacterial diseases of marine cultured fishes and treatment by vaccine. In: *Proceedings of the fifth Japan-Soviet joint symposium on Aquaculture*, Motoda, S. (ed.), Tokai University, Tokyo, 1976, 229 ~ 243.
- [29] Chen S C, Wang P C. *J Fish Dis*, 1993, **16** (3): 269 ~ 272.
- [30] Chen S C. *J Fish Dis*, 1992, **5** (4): 345 ~ 348.