

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)内脏白点病的 病原分离和组织病理学观察

邱杨玉¹ 郑磊² 毛芝娟^{2*} 陈孝煊¹

(1. 华中农业大学 水产学院 湖北 武汉 430070)

(2. 浙江万里学院 生物与环境学院 浙江 宁波 315100)

摘要: 【目的】确定大黄鱼“内脏白点病”的病原, 初步分析该病的致病机理, 为大黄鱼内脏白点病的防治提供部分启示。【方法】开展病原菌的分离、种类鉴定和人工感染试验等工作, 同时通过石蜡组织切片的方法, 观察病鱼的组织病理学变化。【结果】确定病原菌为恶臭假单胞菌。在病鱼的肝脏、肾脏、脾脏等组织中均能发现明显症状或病症, 各组织均发生炎性病变, 细胞变形或解体, 在脾、肾等组织中, 纤维组织增生, 围绕菌体形成肉眼见到的“白点”。【结论】恶臭假单胞菌作为病原菌, 引起大黄鱼内脏出现明显白点, 其致病机理仍需进一步探讨。

关键词: 大黄鱼, 内脏白点病, 病原菌, 分离和鉴定, 组织病理

Isolation and identification of the causative agent and histopathology observation of white-spots disease in internal organs of *Larimichthys crocea*

QIU Yang-Yu¹ ZHENG Lei² MAO Zhi-Juan^{2*} CHEN Xiao-Xuan¹

(1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

(2. Biological and Environmental College, Zhejiang Wanli University, Ningbo, Zhejiang 315100, China)

Abstract: [Objective] In order to find the pathogenic bacteria of white-spots disease in internal organs of *Larimichthys crocea*. [Methods] Using the method of isolation and identification of the

基金项目: 宁波市海洋与渔业科技项目 3-4

*通讯作者: ✉: zhijuanmao@tom.com

收稿日期: 2011-09-01; 接受日期: 2011-11-21

causative agent in combination with 16S rRNA sequencing to find the pathogenic bacteria. Besides it was determined by artificial infection. The tissue of diseased fish were pathologically analyzed by paraffin histological section techniques. **[Results]** The bacterium *Pseudomonas putida* was responsible for the disease. Affected fish showed obvious inflammation and cell deformation or disintegration of the liver, kidney and spleen. **[Conclusion]** The conducted study was necessary in order to reveal the reason for the high mortality of cultured yellow croaker in the Xiangshan bay. Furthermore, the results of this study can help to early recognize such disease outbreaks, hence preventing drastic economic losses in the future.

Keywords: *Larimichthys crocea*, White-spots disease, Causative agent, Isolation and identification, Histopathology.

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)是我国东南沿海网箱养殖的主要经济品种, 养殖过程中主要受到弧菌病和多种寄生虫病的危害, 发病季节一般集中在每年的6–10月^[1–4]。2011年1–4月, 浙江省象山港网箱养殖大黄鱼发生一种严重病害, 与以往的病情不同, 病鱼体表无明显病症, 解剖后可见脾、肾出现直径0.5 mm–1.0 mm的白色结节, 后期肝脏也出现相同白点, 故暂称该病为“内脏白点病”; 由于发病期在低温季节, 鱼不吃饲料, 无法投喂药物进行有效治疗, 发病网箱死亡严重, 累计死亡率可达50%以上, 造成惨重的经济损失。为了深入了解该病的发生原因, 寻找有效的防治方法, 本研究开展了病原的分离鉴定和药敏性测定的研究。同时进行了相关组织病理学的研究, 旨在找到该病的致病机理, 了解病原侵入鱼体后引起的机体免疫反应, 为疾病的防治提供部分依据。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

患病大黄鱼于2011年1月采自浙江省宁波市象山港大黄鱼养殖场, 体长20 cm–30 cm, 体重200–400 g, 收集具有典型内脏白点症状的大黄鱼作为病理学研究材料。健康大黄鱼采自象山港远离发病区的养殖网箱, 经检查确认健康后使用。

1.2 组织病症观察

观察临床患病鱼体的表型病症, 解剖并取出病鱼的肝脏、脾脏、肾脏等进行组织表型病症观察。

1.3 病原菌的分离与培养

选取发病大黄鱼, 用75%酒精棉球对鱼体表擦拭消毒后, 无菌操作解剖鱼体, 从肝、肾、脾等组织中取样, 在TCBS和ZoBell平板培养基中划线分离, 28 °C恒温培养18 h, 挑取形态特征一致的优势菌落进行纯化培养, 纯化后获得一株分离菌株PT01, 工作菌株于4 °C保存备用。

1.4 菌株致病力测试

将已经纯化培养的分离菌株PT01在ZoBell斜面过夜培养后, 用0.75%的生理盐水洗下原液, 将原液稀释成 1.0×10^6 、 1.0×10^5 、 1.0×10^4 CFU/mL浓度的菌悬液备用。挑选无外伤、游动活泼、平均体重为40 g的健康大黄鱼作为供试鱼。采用腹腔注射和口服感染的方式进行人工感染。实验分为6组, 每组12尾鱼, 其中4个实验组, 2个对照组。实验组每尾注射或口灌0.2 mL的菌悬液, 对照组每尾注射或口灌相同剂量的0.75%生理盐水。人工感染后连续观察10 d, 记录发病症状及其死亡情况, 并对死亡鱼进行解剖和按照上述的分离病原菌方法进行病原菌的再分离鉴定。

1.5 细菌的鉴定

1.5.1 形态学观察: 观察28 °C恒温培养24 h的

TCBS 和 ZoBell 平板菌落的颜色、形态、透明度等菌落特征;以 24 h 纯培养的菌落进行革兰氏染色, Olympus BX51 显微镜下观察菌体形态特征。

1.5.2 理化特性试验:按照《常用细菌系统鉴定手册》^[5]的方法进行,运动性试验采用半固体琼脂穿刺法,鉴定生化管为杭州天和微生物试剂有限公司产品。实验过程中选取来源于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的恶臭假单胞菌 1.0593 菌种作为对照。

1.5.3 分离菌株 16S rRNA 基因序列的 PCR 和序列分析:采用细菌通用 16S rRNA 基因序列引物^[6],分别为上游引物 P1: 5'-AGAGTTTGATCCT GGCTCAG-3';下游引物 P2: 5'-GGTTACCTTGT TACGACTT-3'。目标片段长约 1 500 bp。以煮沸法提取的分离菌 PT01 基因组 DNA 为模板。PCR 反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 53 °C 45 s, 72 °C 90 s, 共 32 个循环; 72 °C 10 min。反应完毕取 3–5 μL PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物经纯化回收后送去直接测序(上海英俊生物技术有限公司),所得序列经 NCBI 的 BLASTn 程序在线比对后,以 MEGA 5.0 软件构建基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树。

1.6 药敏试验

以纸片法进行,挑取 PT01 单菌落于 LB 液体培养基中培养,使其菌液浓度为 0.5 麦氏单位。以无菌棉拭子将菌液均匀涂布于 LB 平板,将抗生素药敏纸片(杭州天和微试剂有限生物公司)贴于培养基表面,28 °C 恒温培养 24 h,测量抑菌圈直径。依照美国临床实验室标准研究所 CLSI^[7]规定的标准判断敏感特性。

1.7 病理组织学观察——石蜡组织切片观察

取鲜活大黄鱼,分别取患病鱼体和健康鱼体的肝脏、肾脏和脾脏组织,以预冷的 2.5% 戊二醛溶液固定,常规石蜡包埋切片,苏木精-伊红(H.E)染色,中性树脂封片,在 Olympus BX51 显

微镜下观察,记录和描述病变情况。

2 结果与分析

2.1 病鱼病症观察

如图 1 所示,病鱼表面多数无明显外部症状,少部分可见粘液分泌增加,鱼体腹鳍、臀鳍基部发红。解剖后可见内脏出现明显白色点状病灶,有的病鱼肝脏呈现“红肝”,脾脏、肾脏出现直径 0.5 mm–1.0 mm 的白点,严重的病鱼肝脏也会出现白点,病鱼肌肉失去弹性。

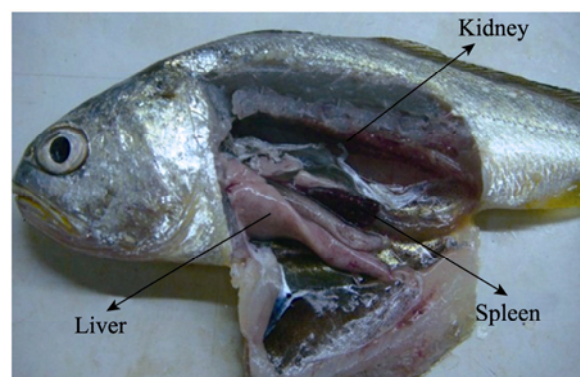


图 1 病鱼病症观察

Fig. 1 Symptoms of diseased fishes

2.2 菌株的致病性测定

用腹腔注射和口腔灌入菌悬液的人工感染方法均能使健康的大黄鱼发病,除前期(攻毒后 1–3 d)死亡的个体未出现明显内部症状外,之后(4–10 d)发病和死亡个体的脾和肾脏均出现了明显的白色结节,与自然发病情况基本相同。人工感染的具体结果见表 1,观察期为 10 d。从感染试验的结果看,分离菌对大黄鱼的毒力很强,根据修正的 Karber 法^[8]计算,分离菌经腹部注射感染后其 96 h 半数致死浓度 LD_{50} 值为 1.36×10^5 CFU/mL。同时可以看出,分离菌经口感染也显示了较强的致病力。

此外,自感染发病鱼体内重新分离到的菌株,其形态特性和主要理化特性(表 2)与原感染菌株完全相同。

表 1 分离菌株的人工感染试验

Table 1 Artificial challenge of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) against the isolated strain PT01

组号 Groups	菌液浓度 Concentration of bacteria (CFU/mL)	感染方式 Methods of injection	剂量 Dose (mL)	试验鱼数(尾) Numbers of samples	攻毒后天数和累计死亡数量(尾) Days post i.p. injection and cumulative death of the fish										死亡率 Mortality (%)
					1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	
1	1.0×10 ⁶	腹注	0.2	12	0	0	3	6	8	11	12	12	12	12	100
2	1.0×10 ⁵	腹注	0.2	12	0	0	0	2	3	5	6	8	8	8	67
3	1.0×10 ⁴	腹注	0.2	12	0	0	0	0	1	3	4	5	5	5	42
4	1.0×10 ⁵	口服	0.2	12	0	0	2	4	7	9	10	10	10	10	83
5	0.75% NaCl	腹注	0.2	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0.75% NaCl	口服	0.2	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表 2 分离菌的生理生化特性

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of the isolated strain

检测项目 Items	分离菌 PT01	恶臭假单胞菌 1.0593
	PT01	<i>Pseudomonas putida</i> 1.0593
O-F 测验 O-F test	O	O
氧化酶 Oxidase	+	+
西盟氏枸橼酸盐 Simmons citrate	+	+
葡萄糖产气 Gas production	—	—
麦芽糖 Maltose	+	+
蔗糖 Sucrose	+	+
鼠李糖 Rhamnos	—	—
木糖 Xylose	+	+
果糖 Fructose	+	+
甘露醇 Mannitol	—	—
肌醇 Inositol	—	—
乳酸 Lactic acid	—	+
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	+	+
赖氨酸脱羧酶肉汤 Lysine decarboxylase	—	—
氰化钾 Potassiumcyanide	—	+
尿素 Urea	+	—
硫化氢 Production of H ₂ S	—	—
DNA	—	—
乙酰胺 Acetamide	—	—
硝酸盐还原 Nitrate deduction	+	—
明胶 Gelatinase production	—	—
4 °C 生长 Growth	+	+
42 °C 生长 Growth	—	—
运动性 Mobility	+	+
磷脂酶 Phospholipase	—	—
TCBS 平板上菌落颜色 Color of colony on TCBS agar	绿色	绿色

注: +: 阳性; -: 阴性; O: 非发酵性细菌. 恶臭假单胞菌 1.0593 菌种来源于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心.

Note: +: Positive; -: Negative; O: Non-fermentative bacteria. *Pseudomonas putida* 1.0593 comes from China general microbiological culture collection center.

2.3 病原菌的分离与鉴定

2.3.1 形态观察: 自病鱼组织中分离到平板上的菌落, 生长特性和形态非常一致, 在 Zobell 平板上生长良好, 呈乳白色菌落; 能在 TCBS 平板上生长, 但长速缓慢, 生长 48 h 左右可见绿色菌落。分离菌株为革兰氏阴性, 杆状菌。

2.3.2 生理生化鉴定: 分离菌为非发酵性细菌, 有运动性, 氧化酶阳性, 利用枸橼酸盐、木糖和蔗糖; 精氨酸双水解酶阳性, 甘露醇利用阴性, DNA 酶、乙酰胺结果阴性, 不产生明胶酶, 主要生理生化特性与恶臭假单胞菌^[5,9]1.0593 的生理生化特性相近。

2.3.3 16S rRNA 基因序列比对和系统发育分析: 分离菌 PT01 基因组 DNA 经 PCR 扩增获得了预期约 1 500 bp 的特异性条带(图 2), 纯化回收的 PCR 产物经直接测序后获得 1 404 bp 片段的序列, 将测定的序列递交 NCBI 进行 BLASTn 在线比对, 结果表明, 该序列同假单胞菌属多种细菌的同源性高达 99% 以上, 其中与恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* strain NBAII CK-24E 菌株的 16S rRNA 基因(登录号 HQ162489.1)完全同源。实验所得序列递交到 GenBank, 登录号为 JF261631.1。

2.4 药敏试验

用药敏纸片法测定了病原菌对 25 种抗菌药物的敏感性, 结果见表 3。由表 3 可知, 依照美国临床实验室标准研究所 CLSI^[7]规定的标准, 病原菌对氧氟沙星、链霉素、庆大霉素、卡那霉素等 9 种药物敏感; 对头孢噻肟、头孢哌酮、头孢他啶等 6 种药物中度敏感; 对哌拉西林、氨曲南、红霉素等 12 种药物不敏感。

选取上述比对中同源性最高的序列, 经 MEGA 5.0 构建系统发育树(图 3)。从图 3 可以看出, PT01 菌株与恶臭假单胞菌自然聚为一支, 结合形态和理化特性结果, PT01 可鉴定为恶臭假单胞菌。

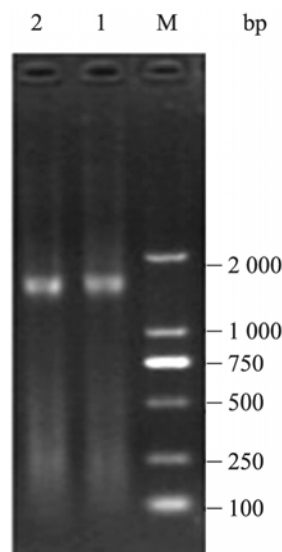


图 2 16S rRNA PCR 扩增电泳结果

Fig. 2 16S rRNA PCR electrophoresis of amplification

注: M: DL2000 marker; 1、2 均为 PT01 进行 16S rRNA PCR 扩增后的 1% 琼脂糖凝胶电泳结果。

Note: M: DL2000 marker; 1, 2: 16S rRNA PCR amplification of PTO1, which is showed by 1% agarose gel electrophoresis.

2.5 石蜡组织切片观察

2.5.1 肝组织: 正常大黄鱼的肝组织结构清晰, 细胞呈多角状, 排列均匀规则, 成放射状围绕中央静脉排列; 细胞质内含有丰富的细胞器及内含物, 核位于细胞中央, 圆形(图 4A)。患病鱼肝细胞坏死严重, 肝细胞界限模糊不清, 肝细胞崩解, 肝细胞索消失; 肝胰腺分离, 白细胞吞噬了大量菌体后破裂, 窦状隙中大量炎症细胞浸润, 肝管脱离周边组织, 呈游离状态, 上皮细胞异常, 细胞萎缩, 排列疏松, 空隙较明显(图 4B-C)。

2.5.2 脾组织: 正常大黄鱼的脾脏内有脾髓, 除淋巴细胞外含有大量红细胞及结缔组织的原纤维, 其中淋巴细胞可聚集成淋巴岛(图 5A)。病鱼脾脏组织坏死严重, 纤维组织包围菌体, 此即为肉眼见到的“白点”, 脾脏内组织恶化、充血, 脾组织中吞噬了大量菌体后, 白细胞破裂, 有大量的炎症细胞浸润, 并有明显的色素沉着现象。髓窦内含铁血黄素大量沉积, 周围出现空泡(图 5B-D)。

表 3 致病菌的药物敏感试验结果
Table 3 The sensitivity of the pathogen to antibiotics

药品 Antibiotics	纸片含量(μg/片) Concentration (μg/slice)	抑菌圈直径 Diameter of inhibitory zone (mm)	敏感性 Sensitivity
氧氟沙星 Ofloxacin	5	21	敏感 S
链霉素 Streptomycin	10	19	敏感 S
庆大霉素 Gentamicin	10	28	敏感 S
卡那霉素 Kanamycin	30	20	敏感 S
妥布霉素 Tobramycin	10	19	敏感 S
四环素 Tetracycline	30	20	敏感 S
头孢吡肟 Cefepime	30	20	敏感 S
头孢曲松(菌必治) Ceftriaxone	30	23	敏感 S
头孢噻肟 Cefotaxime	30	18	中敏 I
头孢哌酮 Cefoperazone	75	18	中敏 I
头孢他啶 Ceftazidime	30	19	中敏 I
诺氟沙星 Norfloxacin	10	18	中敏 I
洛美沙星 Lomefloxacin	10	20	中敏 I
强力霉素 Doxycycline	30	20	中敏 I
哌拉西啉 Piperacillin	100	17	耐药 R
氨曲南 Aztreonam	30	13	耐药 R
红霉素 Erythromycin	15	9	耐药 R
氨苄西林 Ampicillin	10	0	耐药 R
头孢呋辛 Cefuroxime	30	0	耐药 R
头孢唑啉 Cefazolin	30	0	耐药 R
头孢西丁 Cefoxitin	30	0	耐药 R
头孢噻吩 Cefalotin	30	0	耐药 R
麦迪霉素 Medemycin	30	0	耐药 R
呋喃唑酮 Furazolidone	30	0	耐药 R
复方新诺明 SMZ+TMP	30	0	耐药 R

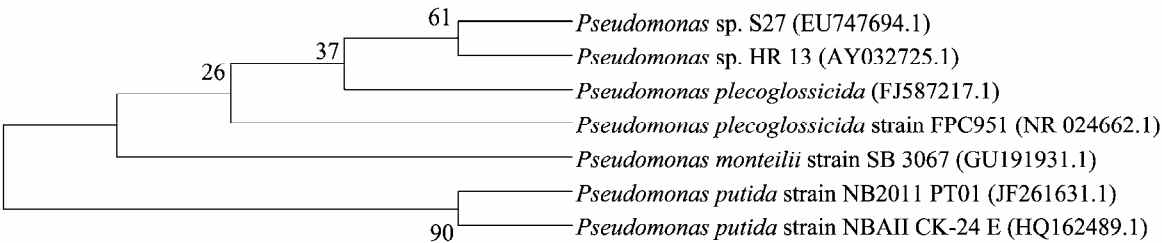


图 3 基于 16S rRNA 序列的系统发育树
Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequence of homology

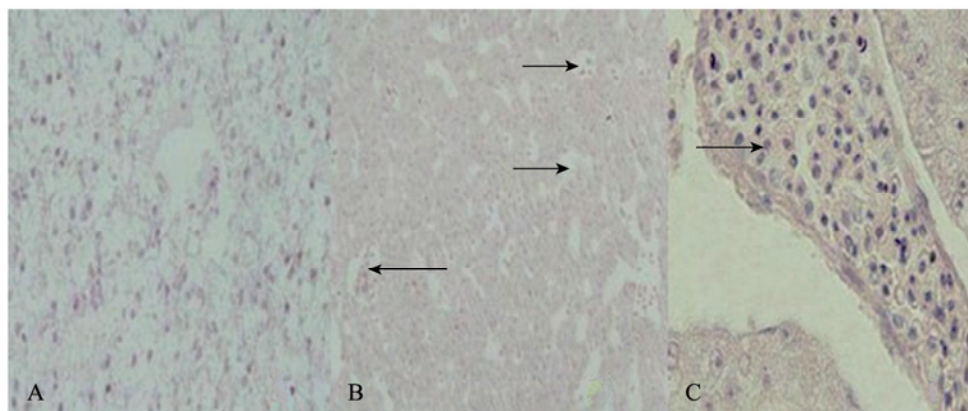


图 4 患病大黄鱼肝脏组织病变

Fig. 4 Pathological changes of liver tissues of diseased fishes

注: A: 正常的肝脏(HE×400); B: 病变的肝脏 (HE×400)示肝组织病变, 肝细胞崩解, 肝细胞索消失; 细胞萎缩, 排列疏松, 空隙较明显; C: 病变的肝脏(HE×1 000)示白细胞吞噬了大量菌体后破裂。

Note: A: Normal liver (HE×400); B: Liver with pathological changes (HE×400) indicates that the liver cells apart, liver cell cable disappeared; cell atrophy, the gap is obvious; C: Liver with pathological changes (HE×1 000) indicates that white blood cells break after consuming a lot of bacteria.

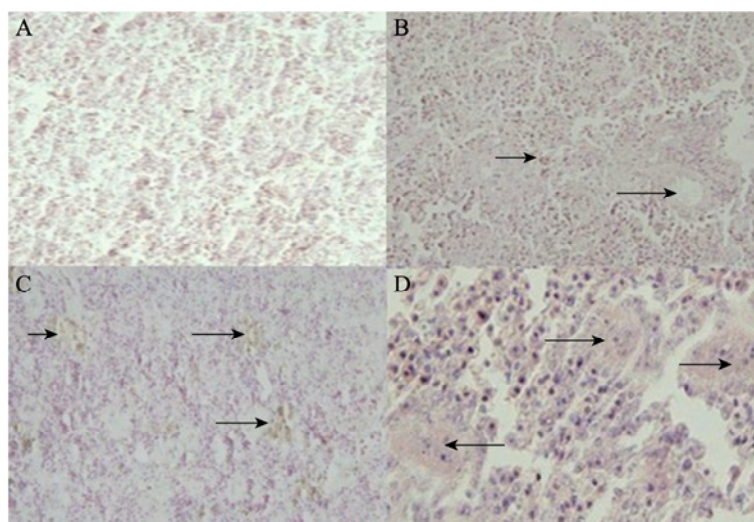


图 5 患病大黄鱼脾脏组织病变

Fig. 5 Pathological changes of spleen tissues of diseased fishes

注: A: 正常的脾脏 (HE×400); B: 病变的脾脏(HE×400)示脾组织吞噬了大量菌体后破裂的白细胞, 且脾细胞萎缩, 空隙较明显, 出现空泡化; C: 病变的脾脏(HE×400)示髓窦内含铁血黄素大量沉积; D: 病变的脾脏(HE×1 000)示脾组织中纤维组织包围菌体, 即为肉眼见到的“白点”。

Note: A: Normal spleen (HE×400); B: Spleen with pathological changes (HE×400) indicates that white blood cells of spleen tissues break after consuming a lot of bacteria, and spleen cells atrophy, the gap is more apparent, appear empty bubble phenomenon; C: Spleen with pathological changes (HE×400) indicates that splenic sinusoids contains hemosiderin deposit; D: Spleen with pathological changes (HE×1 000) indicates that the bacteria were surrounded by fibrous tissue of spleen tissues, which is the “white spot” we can see.

2.5.3 肾组织: 正常大黄鱼的肾脏质地均匀, 结构完整, 肾小管由单层上皮细胞构成, 横切面上皮细胞间排列紧凑, 界限清晰(图 6A)。而病鱼肾小管周边组织有大量的炎性白细胞浸润, 肾小管规则形状消失, 内容物释放; 肾小管上皮细胞肿胀, 排列紊乱, 管腔变窄与闭塞; 严重区域肾小管失去原有的组织结构, 崩溃解体, 形成大面积坏死灶, 坏死灶中心区充满解体后的细胞碎片; 部分区域出现纤维组织包围菌体, 此即为肉眼见到的“白点”; 肾小球结构模糊不清、破裂(图 6B-D)。

3 讨论

3.1 假单胞菌引起的海水鱼病

在我国, 已报道的引起养殖鱼类内脏产生白点或白色结节的病原有多种, 主要有粘孢子

虫^[10-11]、诺卡氏菌^[12-15]、类立克次体^[16-18]等。粘孢子虫对网箱养殖大黄鱼的寄生偶见报道, 一年四季皆可发生, 虫体寄生在鱼体皮肤、鳃、鳍和各内脏器官, 可出现针头至米粒大小的白色包囊^[11]; 诺卡氏菌对东海海区养殖大黄鱼的感染一般发生在 9-11 月, 表现为体表充血发红和内脏出现 1 mm-3 mm 白色结节的症状, 镜检观察到分枝状革兰氏阳性菌^[14-15]; 类立克次体感染乌鳢则可引起眼球突出、腹部膨胀, 脑、眼、鳃、内脏各器官等出现白色结节^[17-18]; 本研究中大黄鱼内脏白点病主要发病季节在冬春季的 1-4 月, 病鱼体表、鳃基本完好, 内脏中脾、肾出现 0.5 mm-1.0 mm 的白点或小结节, 对症灶部位涂片镜检和分离观察到了短杆状的革兰氏阴性菌, 感染该病的大黄鱼累计死亡率高达 50%以上。可以看出, 本次感染的流行季节、疾病症状等与粘孢子虫病

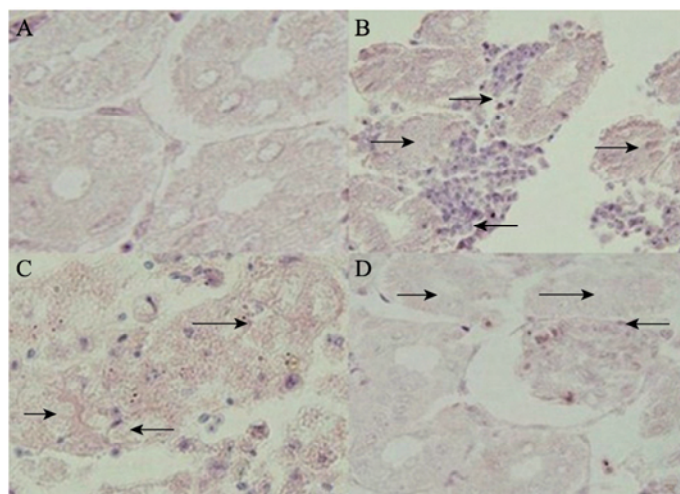


图 6 患病大黄鱼肾脏组织病变

Fig. 6 Pathological changes of kidney tissues of diseased fishes

注: A: 正常的肾脏(HE×1 000); B: 病变的肾脏(HE×1 000)示肾小管上皮肿胀, 官腔闭塞; 周边组织大量白细胞浸润; C: 病变的肾脏(HE×1 000)示肾小管溶解, 坏死, 胞浆流失于管腔; 结缔组织增生, 巨噬细胞破裂; 部分区域出现纤维组织包围菌体, 此即为肉眼见到的“白点”; D: 病变的肾脏(HE×1 000)示肾小管上皮细胞溶解, 肾小球破裂。

Note: A: Normal kidney (HE×1 000); B: Kidney with pathological changes (HE×1 000) indicates that the tubular epithelial swelling, cavity block; leukocyte begin to infiltrate peripheral organizations; C: Kidney with pathological changes (HE×1 000) indicates that the tubular dissolve, necrosis; connective tissue hyperplasia, macrophages burst; the bacteria were surrounded by fibrous tissue, which is the “white spot” we can see; D: Kidney with pathological changes (HE×1 000) indicates that the tubular epithelial cells dissolve, glomerular burst.

很不相同,可以排除;而与诺卡氏菌引起的内脏结节确有相似的地方,但其体表基本无症状,这与诺卡氏菌引起明显充血和烂鳍可以明显区分,症灶部位涂片及革兰氏染色镜检结果也完全相反;与类立克次氏体引起的症状也不同;进一步的人工感染和理化特性及分子生物学鉴定确证了此次感染的致病菌为恶臭假单胞菌,与之前报道的几种病原确实不同。

已有报道表明,假单胞菌属的部分种类如荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)、恶臭假单胞菌等是重要的鱼类病原^[19-21],其危害对象包括欧洲鳗、虹鳟、大黄鱼和黑鲷等^[22-24]。本研究自2011年初发病大黄鱼体内分离和鉴定了一株恶臭假单胞菌 PT01,这与近年来不同的研究者屡次在我国东海海域患内脏白点/结节病的养殖大黄鱼中分离到了假单胞菌^[23,25-26]的结果是一致的,可见,该病菌已在局部地域内呈流行态势,有必要引起极大的重视。

3.2 大黄鱼内脏白点病的病因

本研究经腹腔注射法和口灌法人工感染大黄鱼验证了分离菌 PT01 的致病性,在感染鱼体内重新分离到了与原株相同的细菌,且人工感染症状与自然发病症状相同,即脾和肾内都出现明显的白点或白色结节。可以确定死亡是由 PT01 人工感染引起的,恶臭假单胞菌 PT01 是此次大黄鱼内脏白点病的病原菌。

本研究通过对患病大黄鱼的肝、脾、肾等3种内脏组织进行病理学分析,认为引起大黄鱼内脏白点病的原因可能为:(1)主要病原菌假单胞菌的致病因子作用导致机体组织细胞结构发生明显的病理变化,发生物质代谢障碍。肾脏调节内环境稳定的功能,脾脏的造血功能,肝脏的消化、合成和解毒等功能都受到了不同程度的影响,这些变化造成鱼体自身生理代谢紊乱,免疫力和抗病力下降,鱼体病变逐步严重。很明显重要脏

腑受损、内脏器官功能衰竭是造成感染假单胞菌鱼体出现死亡的主要原因之一。(2)本研究中观察到了恶臭假单胞菌经口感染也能很快致死,提示了养殖过程中可能经由腐败变质的饵料带入该菌引起致病。目前象山港区域网箱养殖中仍大量使用未经加工的冰鲜小杂鱼,假单胞菌由于在低温条件下也能快速生长,有可能大量存在于这类饵料中。(3)研究中观察到,发病网箱的鱼体基本上全部带菌,但症状轻微的鱼体可能捱过发病期,待水温升高,开口摄食后存活下来,提示了该菌可能诱导了鱼体的免疫耐受而在鱼体内长期存在,只在一定条件下引起发病,详细的机制有必要进一步研究。

3.3 大黄鱼内脏白点病的防治

本研究分离的致病菌 PT01 对多种喹诺酮类药物敏感,生产中可以选用恩诺沙星、洛美沙星等允许使用的药物拌饵投喂,会起到一定的治疗作用。但从本研究结果可以看出,致病性恶臭假单胞菌对常用的多种抗生素类药物已产生耐药性,单纯依赖药物控制的效果必定是不理想的,极可能在较短时间内导致耐药性的产生和传播,同时也可能导致产品中的药物残留进而引起水产品质量安全问题。本研究的结果表明该菌可经口感染,提示了不新鲜、腐败变质的饵料可能是重要的传染源,该病的预防需要从养殖模式上进行根本性的变革,杜绝直接投喂小杂鱼饵料,改用科学配方的全价饲料,才是解决问题的根本之道。同时,要深入进行恶臭假单胞菌致病机理及鱼类对该菌的免疫机制的研究,为控制该病提供完整的思路。

参 考 文 献

- [1] 毛芝娟,刘国勇,陈昌福. 大黄鱼溃疡病致病菌的初步分离与鉴定[J]. 安徽农业大学学报, 2002, 29(2): 178-181.

- [2] 金珊, 蔡完其, 王国良, 等. 养殖大黄鱼细菌性疾病的病原研究[J]. 浙江海洋学院学报: 自然科学版, 2002, 21(3): 225-230.
- [3] 鄢庆枇, 王军, 苏永全, 等. 网箱养殖大黄鱼弧菌病研究[J]. 集美大学学报: 自然科学版, 2001, 6(3): 191-196.
- [4] 纪荣兴, 邹文政, 李印龙. 大黄鱼皮肤溃烂病原的研究[J]. 海洋科学, 2004, 28(11): 57-60.
- [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: 364-398.
- [6] 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.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. 17th informational supplement M100-S17. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007.
- [8] 沈建忠. 动物毒理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 92-93.
- [9] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 第8版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [10] 王桂堂. 我国淡水鱼类粘孢子虫病的流行与控制(要点)[J]. 鱼类病害研究, 2001, 23(2): 43-45.
- [11] 林永添. 网箱养殖海水鱼粘孢子虫病的防治[J]. 齐鲁渔业, 2002(12): 41.
- [12] 彭开松, 余锐萍, 祁克宗, 等. 暗纹东方鲀脂肪肝并发诺卡氏菌病[J]. 水产科学, 2008, 27(12): 629-632.
- [13] 袁思平, 王国良, 金珊. 养殖鱼类致病诺卡氏菌研究进展[J]. 微生物学通报, 2006, 33(2): 137-141.
- [14] 王国良, 袁思平, 金珊. 网箱养殖大黄鱼诺卡氏菌病的初步研究[J]. 水产学报, 2006, 30(1): 103-107.
- [15] 王国良, 袁思平, 金珊. 大黄鱼结节病病原菌—诺卡氏菌的鉴定及其系统发育分析[J]. 中国水产科学, 2006, 13(3): 410-414.
- [16] 汪开毓, 陈德芳, 赵敏, 等. 罗非鱼主要疾病介绍与防治技术(一)[J]. 科学养鱼, 2010(7): 12-14.
- [17] 郭琼林, 贾伟章, 韩先朴, 等. 我国淡水养殖乌鳢的类立克次体感染[J]. 自然科学进展, 2004, 14(1): 59-63.
- [18] 郭琼林, 贾伟章, 孙晓凤, 等. 养殖乌鳢类立克次体感染的组织病理学研究[J]. 水生生物学报, 2007, 31(1): 45-52.
- [19] Balboa S, Ferguson HW, Romalde JL. Phenotypic, serological and genetic characterization of *Pseudomonas anguilliseptica* strains isolated from cod, *Gadus morhua* L., in northern Europe[J]. Journal of Fish Diseases, 2007, 30(11): 657-664.
- [20] Blanco MM, Gibello A, Vela AI, et al. PCR detection and PFGE DNA macrorestriction analyses of clinical isolates of *Pseudomonas anguilliseptica* from winter disease outbreaks in sea bream *Sparus aurata*[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2002, 50: 19-27.
- [21] López-Romalde S, Magariños B, Ravelo C, et al. Existence of two O-serotypes in the fish pathogen *Pseudomonas anguilliseptica*[J]. Veterinary Microbiology, 2003, 94(4): 325-333.
- [22] 樊海平, 恶臭假单胞菌引起的欧洲鳗鲡烂鳃病[J]. 水产学报, 2001, 25(2): 147-150.
- [23] 刘家富, 余祚溅, 林永添, 等. 大黄鱼假单胞菌病的初步研究[J]. 海洋科学, 2004, 28(2): 5-7.
- [24] 毛芝娟, 王美珍, 陈吉刚, 等. 黑鲷肠炎病原恶臭假单胞菌的分离和鉴定[J]. 渔业科学进展, 2010, 31(3): 23-28.
- [25] 刘振勇, 王兴春, 杨毓环. 网箱养殖大黄鱼门多萨假单胞菌病的研究[J]. 水产学报, 2002(增刊): 77-81.
- [26] 沈锦玉, 余旭平, 潘晓艺, 等. 网箱养殖大黄鱼假单胞菌病病原的分离与鉴定[J]. 海洋水产研究, 2008, 29(1): 1-6.