

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.18277

大菱鲂内脏结节病病原的分离与鉴定

罗璋¹, 张振国¹, 郝爽¹, 白晓慧¹, 贾文平¹, 高谦², 冯守明^{1,3}

1. 天津市水产研究所, 天津 300221;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

3. 天津市水生动物疫病预防控制中心, 天津 300221

摘要: 2017 年 8 月, 天津市滨海新区某养殖场大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)发生病害, 累计死亡率约为 25%, 患病鱼体表无明显症状。通过肉眼和病理组织切片观察发现, 患病鱼肾脏、脾脏、肝脏和肠道存在大量圆形结节, 肾脏、肝脏和脾脏组织病变明显, 肾小管坏死, 肝细胞脂肪变性, 脾脏中存在大量的坏死细胞。此外, 在脾脏和肾脏组织中发现大量的抗酸杆菌。利用传统病原菌分离方法, 从具有典型症状的濒死大菱鲂肾脏组织分离到优势菌株 myco-10, 利用该菌株注射攻毒能导致健康大菱鲂 66.7% 的死亡率, 且表现出与自然发病鱼相同的症状。采用 16S rDNA、*Hsp65*、*ropB* 基因序列分析, 构建系统发育树并结合细菌形态特征、生理生化测试对菌株 myco-10 进行鉴定, 结果显示, 菌株 myco-10 的 16S rDNA、*Hsp65*、*ropB* 基因序列与分枝杆菌属细菌(*Mycobacterium* spp.)相似度最高, 且在系统发育树中与海分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*)和溃疡分枝杆菌(*Mycobacterium ulcerans*)聚为一簇, 生理生化反应与海分枝杆菌一致。综合生理生化特征和基因序列分析结果, 将菌株 myco-10 鉴定为海分枝杆菌。这是中国首例分枝杆菌引起大菱鲂病害的报道, 可为大菱鲂内脏结节病的防治提供参考资料。

关键词: 大菱鲂; 结节; 海分枝杆菌; 鉴定

中图分类号: 941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2019)03-0559-10

大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)隶属鲽形目(Pleuronectiformes)、鲆科(Bothidae)、菱鲆属, 俗称多宝鱼, 自然分布于欧洲沿岸各主要海区, 其肉质鲜嫩、营养价值高, 在欧洲水产品市场广受欢迎^[1]。1992 年大菱鲂被引种到国内, 1998 年人工繁殖取得突破后, 大菱鲂养殖迅速兴起, 逐渐成为我国北方沿海地区海水工厂化养殖的主要品种^[2]。随着大菱鲂养殖规模的迅速扩大, 疾病发生日趋频繁, 特别是在海水工厂化高密度养殖生产中, 高温季节病害尤为严重。大菱鲂的细菌性疾病、病毒性疾病和寄生虫病均有报道^[3-11], 其中细菌性病原包括迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)^[3]、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)^[4]、副乳房链

球菌(*Streptococcus parauber*)^[5]、杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)^[6]、海弧菌(*Vibrio pelagius*)^[7]、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)^[8]、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)^[9]等。

2017 年 8 月, 天津市滨海新区某海水鱼养殖场大菱鲂发生一种新型疾病, 日死亡率约为 0.5%, 死亡持续 30 d 以上(期间养殖水温为 22~23℃)。除少数患病鱼表现为反应迟钝, 离群独游, 体色发黑外, 无其他明显发病症状, 分别用氟苯尼考、盐酸土霉素和恩诺沙星以口服投喂的方式进行治疗没有明显效果。为了分析病因, 本实验开展了病原学和组织病理学研究, 初步证明了引起此次大菱鲂疾病的病原为海分枝杆菌(*Mycobacterium*

收稿日期: 2018-08-11; 修订日期: 2018-09-27。

基金项目: 天津市自然科学基金项目(16JCYBJC30000); 天津市水产产业技术体系创新团队项目(ITTFR2017008); 天津市农业科技成果转化与推广项目(201501030); 天津市科技计划项目(18ZXBFNC00030)。

作者简介: 罗璋(1982-), 男, 博士, 高级工程师, 主要从事水产动物病害防治研究. E-mail: luozhang2010@163.com

通信作者: 高谦, 研究员, E-mail: qgao@shou.edu.cn; 冯守明, 研究员, E-mail: smfeng65@163.com

marinum), 这是分枝杆菌引起大菱鲆疾病在国内的首次报道, 可为大菱鲆疾病的防控和健康养殖提供理论依据和参考。

1 材料和方法

1.1 实验对象

患病大菱鲆采集于天津市滨海新区某海水鱼养殖场, 体长为 10~14 cm, 濒死鱼装入氧气袋后被快速送往实验室进行诊断和病原分离。体长 6~10 cm 的健康大菱鲆由天津市滨海新区立信水产养殖有限公司提供。

1.2 主要试剂

脑心浸液培养基(BHI)、Middlebrook 7H10 (+OADC)培养基(7H10), Lowenstein-Jensen 培养基(L-J)购于美国 BD 公司, DNA 提取试剂盒、2× Master PCR MIX 购于宝生物工程(大连)有限公司, 细菌微量生化管购自杭州微生物试剂有限公司。

1.3 病原菌的分离和寄生虫观察

用 MS222 对患病鱼进行麻醉后, 用 70%酒精棉球反复擦拭体表, 无菌条件下对病鱼进行解剖, 用接种环分别从患病鱼的肾脏和脾脏组织取少量样品划线接种于 BHI、7H10 和 L-J 培养基, 28℃

培育 4 周后进行观察, 选取优势菌落进行纯化后保存。取患病鱼的鳍条、鳃、黏液、内脏结节等样品在显微镜下进行寄生虫检查。

1.4 病理组织切片

将患病鱼的脾脏、肾脏、肝脏、肠道组织样品切成约 0.5 cm 小块, 用中性福尔马林固定后, 酒精梯度脱水, 石蜡包埋, 切成 5 μm 厚度, 然后进行 hematoxylin-eosin staining 染色(HE)和 Ziehl-Neelsen 染色(ZN)。

1.5 患病鱼的特定病原检测

将患病鱼脾脏和肾脏样品进行混合匀浆, 利用动物组织 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 分别用分枝杆菌属(*Mycobacterium*)通用引物 T39、T13 和 preT43、T531, 鲑肾杆菌(*Renibacterium salmoninarum*)检测引物 BKDF、BKDR 和 BKDF2、BKDR2, 立克次氏体(*Rickettsia-like organism*)检测引物 PS-F、PS-R 进行 PCR 检测(表 1)^[12-14]。对 PCR 产物进行回收、测序, 测序结果与 NCBI 数据库中已登录 GenBank 的基因片段进行比对。

1.6 分离菌株的分子生物学鉴定

利用细菌 DNA 提取试剂盒提取分离菌株的基因组, 并以此为模板, 利用分枝杆菌属通用引

表 1 本实验中所用的引物
Tab.1 PCR primers used in this study

引物名称 primer	引物序列(5'-3') sequence (5'-3')	扩增片段长度/bp segment length	用途 application
T39	GCGAACGGGTGAGTAACACG	936	套氏 PCR 检测分枝杆菌属细菌 test <i>Mycobacteria</i> sp. by nested PCR
T13	TGCACACAGGCCACAAGGGA		
preT43	AATGGGCGCAAGCCTGATG		
T531	ACCGCTACACCAGGAAT		
BKDF	GACGGCAATGTCCGTTCCCGTTT	501	套氏 PCR 检测肾杆菌 test <i>Renibacterium salmoninarum</i> by nested PCR
BKDR	CAAGGTGAAGGGAATTCTTCCACT		
BKDF2	CGCATTATCGTTACACCC		
BKDR2	TTCAACAGTACAAGGCTTCA		
PS-F	CTAGGAGATGAGCCCGCGTTG	390	PCR 检测立克次氏体 test <i>Piscirickettsia</i> by PCR
PS-R	ATTCA CATCAACTTAATCT		
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1480-1494	扩增 16S rDNA 基因 16S rDNA gene clone
1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT		
Myco-F	GGCAAGGTCACCCGAAGGG	752-761	扩增 <i>rpoB</i> 基因 <i>rpoB</i> gene clone
Myco-R	AGCGGCTGCTGGGTGATCATC		
Hsp-F	ATCGCCAAGGAGATCGAGCT	644	扩增 <i>hsp65</i> 基因 <i>hsp65</i> gene clone
Hsp-R	AAGGTGCCGCGGATCTTGTT		

物进行套氏 PCR 检测。此外, 分别利用引物 27F 和 1492R^[15], Myco-F 和 Myco-R^[16], Hsp-F 和 Hsp-R^[17]扩增分离菌株的 16S rRNA、*rpoB*、*hsp65* 基因序列(表 1), PCR 扩增产物切胶回收后, 与 PMD-18T 载体连接, 转 *E. coli* TOP10 感受态细胞, 挑取阳性克隆进行测序, DNA 测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成, 利用 NCBI 数据库对测序结果进行同源性比较, 并利用 MEGA 4.1 软件采用邻位相连法(neighbor-joining)构建系统发育树。

1.7 分离菌株的形态学观察和生理生化特征

参照东秀珠等^[18]的方法对分离菌株进行生理生化测试, 包括抗酸染色、硝酸盐还原、5%NaCl 生长、脲酶活性、接触酶活性、芳香硫酸酶活性和吐温-80 水解。

分离菌株的透射电镜观察: 用 2.5%戊二醛对菌落进行固定, 经 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液清洗 3 次后, 再用 1%锇酸于 4℃下振荡固定 3 h; 然后用缓冲液清洗 3 次, 乙醇梯度脱水, 环氧丙烷置换, Spurr 树脂浸透包埋; 切成 70 nm 厚度, 经醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色, 透射电子显微镜下观察并拍照。

分离菌株的扫描电镜观察: 用 2.5%戊二醛对菌落进行固定后, 进行乙醇梯度脱水、中间液代换、临界点干燥和样品粘贴, 离子溅射仪镀膜后观察并拍照。

1.8 人工感染实验

69 尾健康大菱鲆在暂养 2 周后被用于实验。

随机选取 9 尾鱼用于特定病原检测, 分别取 9 尾鱼的内脏混合样品, 按照套氏 PCR 方法进行分枝杆菌属细菌检测, 实验结果显示 9 尾鱼均为阴性。其余 60 尾大菱鲆被随机平均分为 2 组, 实验组腹腔注射 0.1 mL 3×10^8 CFU/mL myco-10 菌悬液, 对照组注射 0.1 mL 0.85% 的无菌生理盐水。实验鱼在 22℃ 的循环水养殖系统中养殖 30 d, 每天观察鱼的发病情况并及时捞走死鱼, 统计死亡结果, 濒死鱼被用于病原的再次分离。

2 结果与分析

2.1 患病鱼主要症状和组织病理切片观察

患病鱼除少数表现为体色发黑外体表无明显症状, 利用显微镜进行寄生虫检测, 除体表黏液中有少量纤毛虫外, 其他部位未检测到寄生虫。对患病鱼进行解剖, 在脾脏、肾脏中发现大量白色结节, 直径为 0.5~2.0 mm (图 1)。

利用组织切片, 发现除脾脏(图 2A)和肾脏组织(图 2C)中存在大量的圆形或椭圆形结节以外, 在肝胰腺(图 2E)和肠道(图 2G)中也存在少量结节, 直径为 20~500 μ m。通过组织病理观察, 发现脾脏中存在大量的坏死细胞, 以及血铁黄素的沉积(图 2B)。肾脏组织中肾小管坏死, 部分肾小管被纤维细胞包被(图 2D)。肝细胞脂肪变性, 部分肝细胞细胞核消失(图 2F), 肠道中存在的结节使肠绒毛发生融合(图 2G)。此外, 利用抗酸染色, 在肾脏和脾脏组织中发现大量的杆状抗酸细菌(图 2H, 2I)。

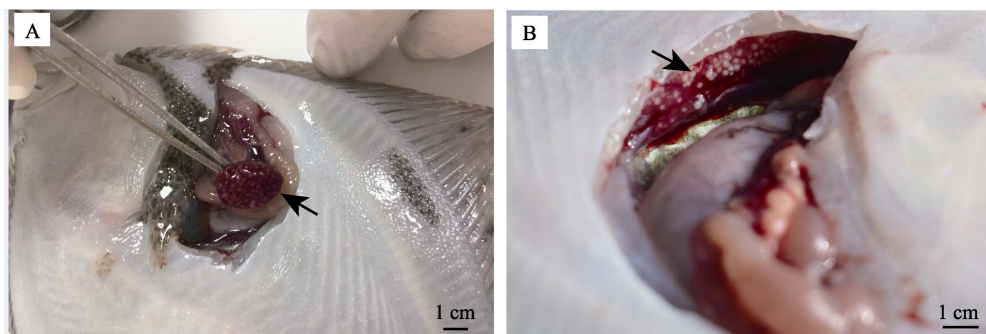


图 1 患内脏结节病大菱鲆的主要特征

脾脏(A)和肾脏(B)中发现大量的白色结节(→所示)。

Fig. 1 Typical symptom of *Scophthalmus maximus* suffering granulomas in internal organs
Abundant white granulomas were observed in the spleen (A) and kidneys (B) (arrows).

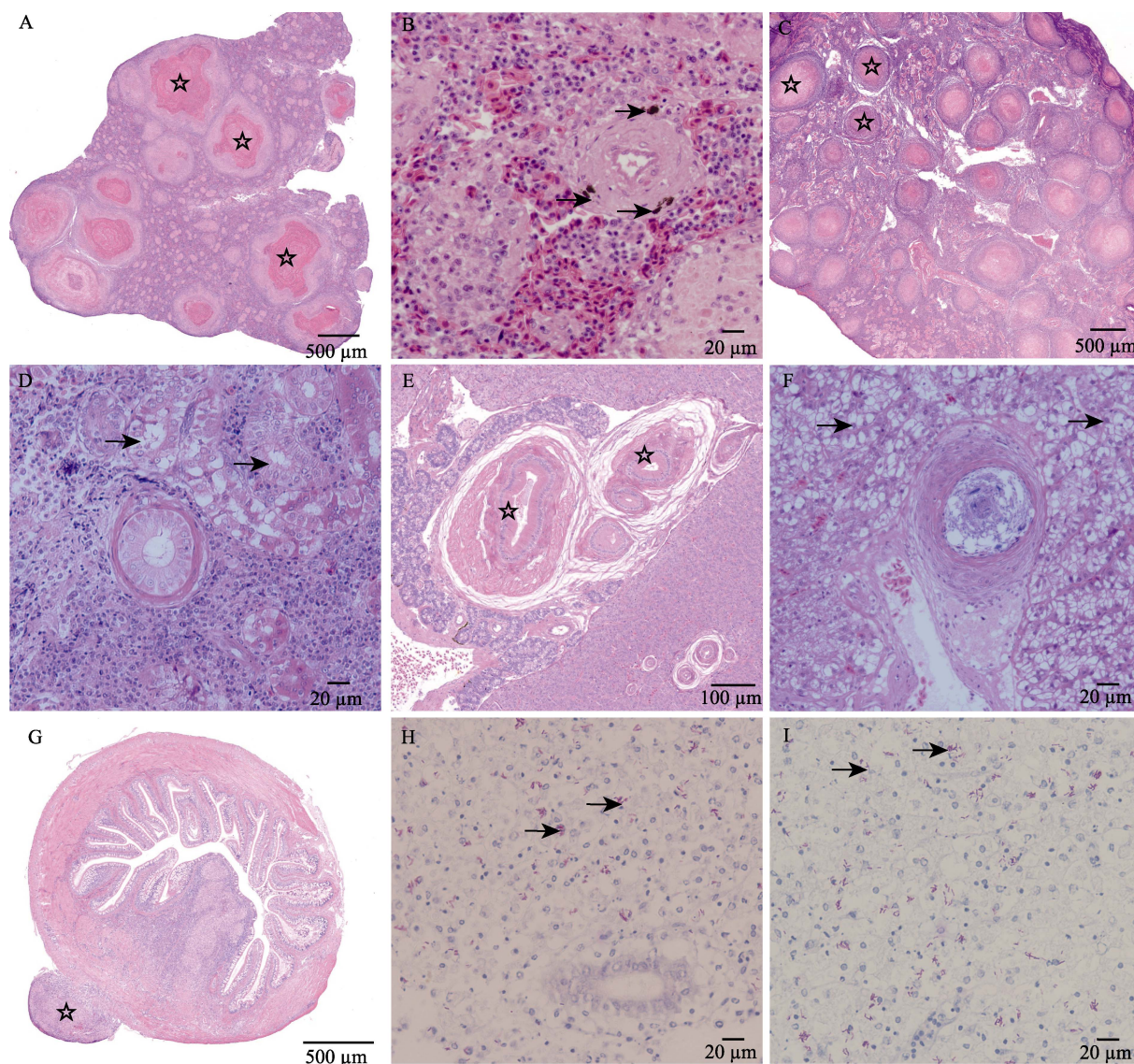


图 2 患病鱼的组织病变情况

A、C、E、G: 脾脏、肾脏、肝脏、肠道中存在大量结节(☆所示)(HE 染色); B. 脾脏中血铁黄素沉积(↑)(HE 染色); D. 肾小管上皮细胞变性, 坏死 (↑)(HE 染色); F. 肝细胞脂肪变性(↑)(HE 染色);

H、I. 肾脏和脾脏中存在大量的抗酸菌(↑)(ZN 染色).

Fig. 2 The pathological changes of the tissue of diseased fish

A, C, E, G: abundant nodules in spleen, kidney, liver and intestinal tract (stars) (HE); B. Hemosiderin deposition in spleen (arrows) (HE); D. Degeneration and necrosis in the epithelial cells of tubules (arrows) (HE);

F. Fatty degeneration of hepatocytes (arrows) (HE); H, I. lots of acid-fast bacilli in kidney and spleen (arrows) (ZN).

2.2 患病鱼的特定病原检测

利用套氏 PCR 方法, 对患病鱼内脏组织进行分枝杆菌属细菌的检测, 结果显示能扩增出 936 bp 和 308 bp 的特异性核酸片段, 对 PCR 产物进行测序、比对后发现, 核酸序列与海分枝杆菌相似性为 99%。利用鲑肾杆菌和立克次氏体 PCR 检测引物未能扩增出目的条带(图 3)。

2.3 病原菌的分离纯化

利用 7H10 培养基, 从患病鱼脾脏和肾脏可以分离到大量形态一致的圆形、干燥、不透明菌落。将优势菌株进行纯化, 将其命名为 myco-10。黑暗条件下, 菌株 myco-10 在 7H10 和 L-J 培养基中都生长为白色菌落, 光照 48 h 以后, 白色菌落变成黄色(图 4)。在 BHI 平板中, 菌株 myco-10 生

长速度极为缓慢, 划线接种 15 d 以后, 菌落如针尖大小。

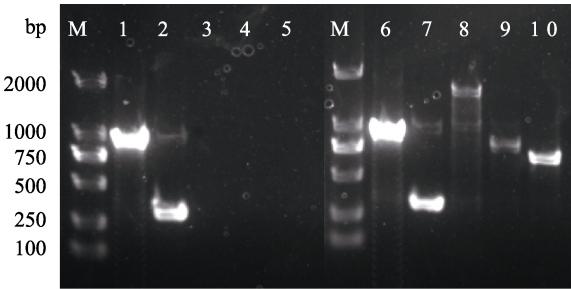


图 3 患病鱼组织的病原检测和菌株 myco-10 的 16S rDNA、*rpoB*、*Hsp65* 基因扩增
M: DL2000 DNA marker; 1, 2: 对患病鱼进行分枝杆菌检测; 3, 4: 对患病鱼进行鲑肾杆菌检测; 5: 对患病鱼进行立克次氏体检测; 6, 7: 对菌株 myco-10 进行分枝杆菌检测; 8, 9, 10: 菌株 myco-10 的 16S rDNA、*rpoB*、*Hsp65* 基因的扩增。
Fig. 3 Pathogens detection for disease fish by PCR and amplify 16S rDNA, *rpoB*, *Hsp65* genes for isolate myco-10
M: DL2000 DNA marker; 1, 2: test *Mycobacterium* sp. for disease fish; 3, 4: test *Renibacterium salmoninarum* for disease fish; 5: test Rickettsia-like organism for disease fish; 6, 7: test *Mycobacterium* sp. for isolated myco-10; 8, 9, 10: amplifying 16S rDNA, *rpoB*, *Hsp65* genes for isolate myco-10.

2.4 分离菌株的鉴定

生理生化测试结果表明, 菌株 myco-10 在脲酶、Tween-80 水解、68℃下过氧化氢酶、芳香硫酸酯酶等反应中显示阳性, 硝酸还原酶、5% NaCl 生长为阴性。

对菌株 myco-10 进行 ZN 染色, 结果呈阳性(图 5A)。通过扫描电镜发现, 菌株 myco-10 为稍微弯曲的无鞭毛杆菌, 菌体大小为 2 μm×0.4 μm~

3 μm×0.4 μm (图 5B)。通过透射电镜发现, 菌株 myco-10 的细胞壁较厚(图 5C)。

PCR 扩增获得菌株 myco-10 的 16S rDNA、*rpoB*、*Hsp65* 基因片段, 片段大小分别为 1492 bp、761 bp 和 644 bp (图 3), 利用 NCBI 数据库进行比对分析, 发现该序列与分枝杆菌属相似度最高。分别利用 GenBank 中已登录的分枝杆菌属的 16S rDNA、*rpoB* 和 *Hsp65* 基因序列进行匹配排列后构建系统发育树, 结果表明, myco-10 的 16S rDNA 的基因序列与溃疡分枝杆菌(*Mycobacterium ulcerans*)、海分枝杆菌、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)、山羊分枝杆菌(*Mycobacterium caprae*)共聚一枝(图 6)。myco-10 的 *rpoB* 和 *Hsp65* 基因序列与溃疡分枝杆菌、海分枝杆菌聚为一枝(图 7 和图 8)。

据报道, 分枝杆菌的 *ropB* 和 *Hsp65* 基因较 16S rDNA 基因在种间具有更好的区分度^[19], 利用这两个基因序列构建系统发育树, 发现 myco-10 能与其他分枝杆菌分开, 但仍然与海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌聚为一枝(图 7, 图 8)。这可能是由于海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌的基因组高度相似所造成(相似度高达 98.3%)^[20]。生理生化实验结果表明, 菌株 myco-10 的 Tween-80 水解和芳香硫酸酯酶反应为阳性, 与海分枝杆菌一致, 而与溃疡分枝杆菌不符^[21]。因此, 根据分子生物学和生理生化方法, 将菌株 myco-10 鉴定为海分枝杆菌。

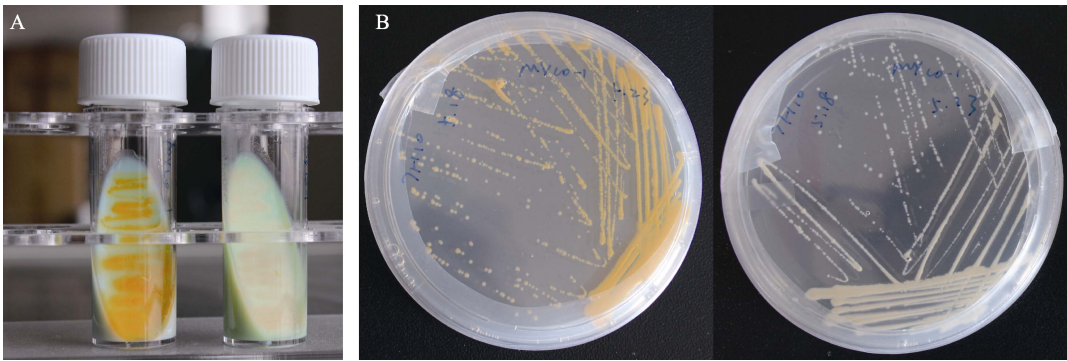


图 4 菌株 myco-10 的菌落形态特征和光照产色性
L-J 培养基(A)和 7H10 培养基(B), 菌株 myco-10 的菌株光照前(右边)和光照后(左边)。
Fig. 4 Morphology and photochromogenicity of isolated myco-10
Lowenstein-Jensen slant tubes (A) and 7H10 agar medium (B). White colonies (right) of isolated myco-10 turned yellow (left) when exposed to light directly.

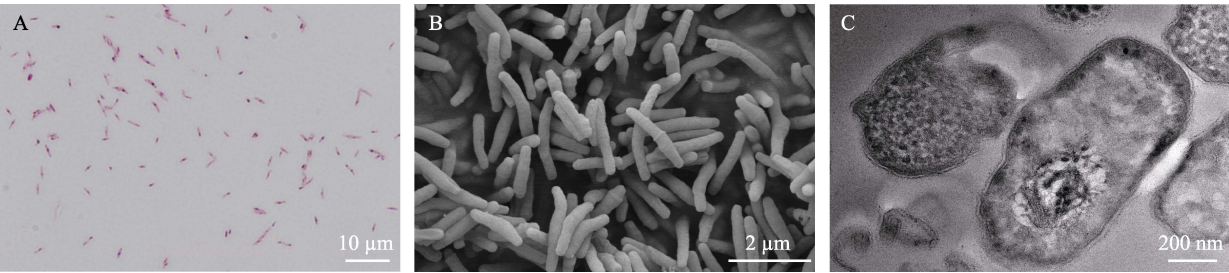


图 5 菌株 myco-10 的形态特征
A. 抗酸染色; B. 扫描电镜; C. 透射电镜.

Fig. 5 Morphological characteristics of isolated myco-10
A. Acid-Fast stain; B. Scanning electron micrograph; C. Transmission electron microscopy.

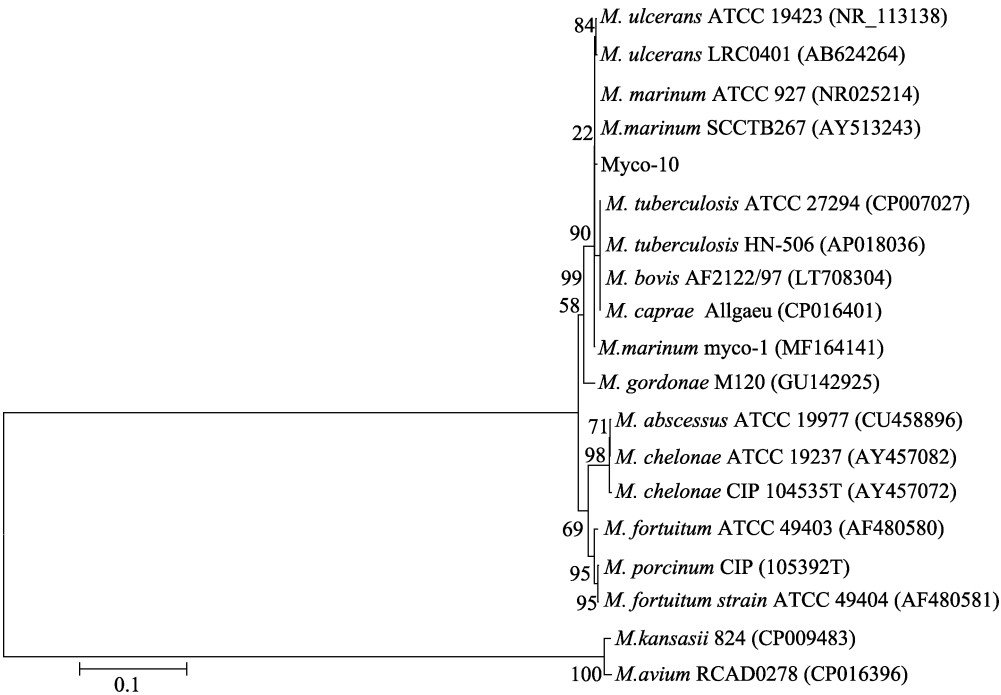


图 6 基于 16S rDNA 基因利用邻接法构建进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree based on neighbor-joining analyses of the 16S rDNA gene sequences

2.5 人工感染实验

从人工感染后的第 20 天开始, 实验组大菱鲆开始出现死亡, 至第 30 天累计死亡率为 66.7%, 对照组没有死亡。死亡鱼的主要症状为腹部膨胀, 脾脏和肾脏出现大量白色结节, 与自然发病鱼的症状类似, 从结节处分离的菌株与 myco-10 具有相同的生理生化特性和 16S rDNA 基因序列。

3 讨论

结节病是一种严重危害养殖鱼类的疾病, 该病以形成局部性肉芽肿为主要病理特征。据报道, 能引起鱼类结节病的病原主要有分枝杆菌^[22]、诺

卡氏菌(*Nocardia* sp)^[23]、立克次氏体^[24]、美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damsela*)^[25]、鲑肾杆菌^[26]和杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)^[27]。在这些病原中, 分枝杆菌、立克次氏体和鲑肾杆菌的分离和培养相对较为困难。因此, 本研究在进行病原分离之前, 利用 PCR 的方法对患病鱼进行这 3 种病原的检测, 以便快速确定疑似病原后, 选择合适的方法对病原进行分离和培养, 提高成功率。经 PCR 检测发现, 从患病鱼内脏组织中检测到分枝杆菌阳性, 鲑肾杆菌和立克次氏体阴性。这暗示患病鱼可能被分枝杆菌感染。

鱼类分枝杆菌病是一类由分枝杆菌属的非结

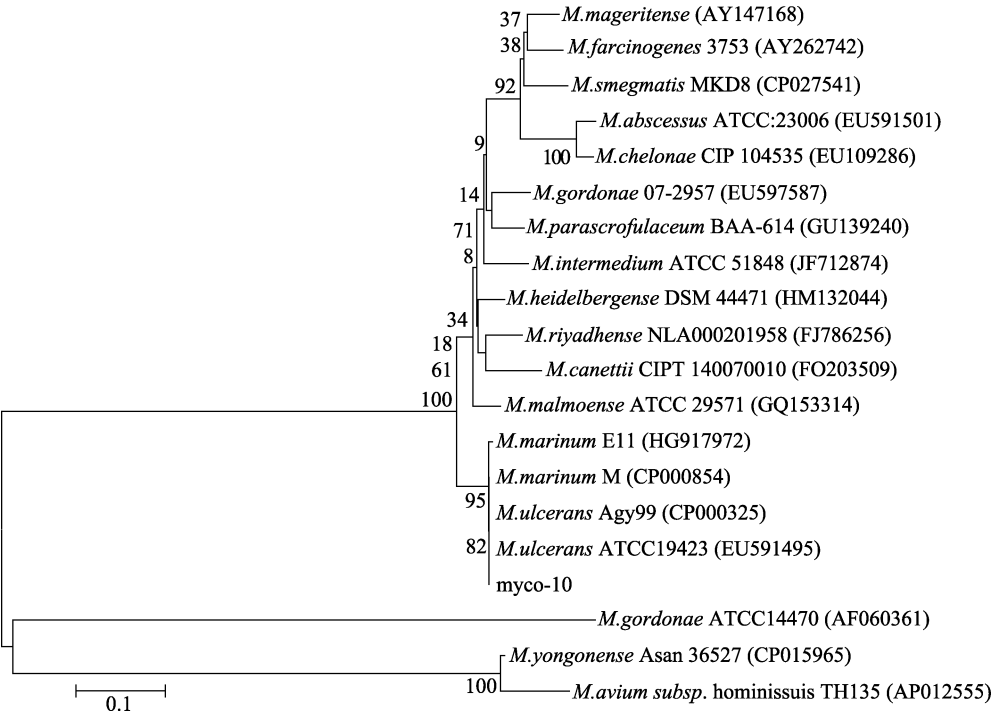


图 7 基于 *rpoB* 基因利用邻接法构建进化树

Fig. 7 Phylogenetic tree based on neighbor-joining analyses of the *rpoB* gene sequences

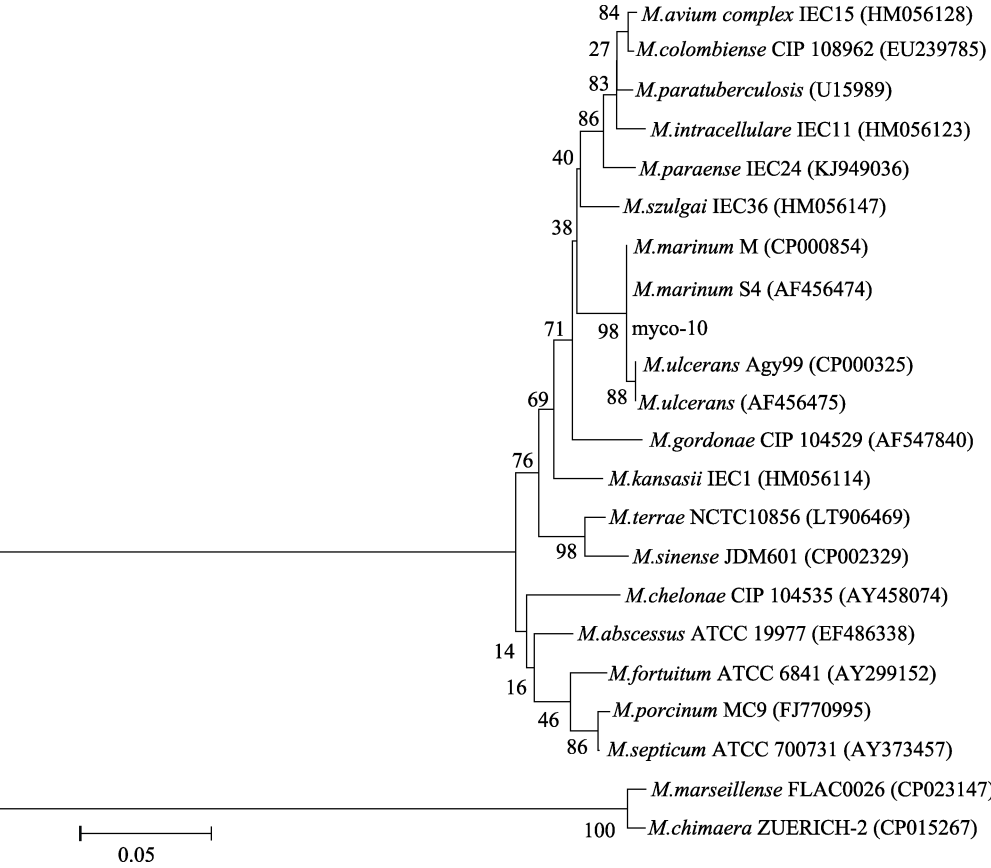


图 8 基于 *Hsp65* 基因利用邻接法构建进化树

Fig. 8 Phylogenetic tree based on neighbor-joining analyses of the *Hsp65* gene sequences

核分枝杆菌引起的长期性感染疾病,是鱼类常见的细菌性疾病。分枝杆菌宿主广泛,条纹鲈(*Morone saxatilis*)^[28]、红腹锯脂鲤(*Pygocentrus nattereri* Kner)^[29]、纹鳃(*Channa striatus*)^[30]、中华鲟(*Acipenser sinensis*)^[19]、大西洋鲑(*Salmo salar* L.)^[31]等都能被其感染。最近,我们发现了由海分枝杆菌引起的半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Günther)分枝杆菌病^[22]。本实验又从患病大菱鲆中检测到海分枝杆菌,这说明海分枝杆菌可能已成为感染中国鲆鲽鱼类的常见病原,需要引起重视。

尽管葡萄牙学者 dos Santos 等^[32]于2002年首次从患结节病的大菱鲆体内分离到海分枝杆菌。但根据科赫法则,对病原菌的确诊需要利用从患病宿主中分离到的病原对同种生物进行感染,且被人工感染的动物应出现与自然发病动物类似的症状。在 dos Santos 等^[32]的研究中,虽然分离了疑似病原,但未开展人工感染实验,本研究通过回感实验验证了 myco-10 菌株对大菱鲆的致病性,且实验动物出现与自然发病大菱鲆类似的症状,从而确定了大菱鲆是海分枝杆菌的易感宿主。

研究表明,斑马鱼(*Brachydanio rerio*)的巨噬细胞能吞噬海分枝杆菌,这种机制可能限制海分枝杆菌在斑马鱼体内的生长^[33]。但进一步研究发现,海分枝杆菌能在斑马鱼巨噬细胞内生长繁殖,并随着巨噬细胞的运动而转移传播^[34]。巨噬细胞与病原菌在吞噬与抗吞噬的斗争过程中,当细菌的增殖速度和抗吞噬作用超过吞噬细胞的吞噬能力时,吞噬细胞开始发生变性、坏死,细菌大量繁殖,这又导致了巨噬细胞和免疫细胞的聚集。最初变性坏死的吞噬细胞,以及大量繁殖的细菌与随后重新聚集的巨噬细胞和免疫细胞共同形成结节^[25]。随着结节内细菌的不断繁殖,细菌向外扩散,巨噬细胞重新开始聚集形成新的结节,随着几个结节相互融合,逐渐形成较大的结节。本实验中,这种结节融合的现象在患病大菱鲆肝脏中被观察到(图 2E)。脾脏、肾脏和肠道与鱼类的免疫器官,这些部位存在较多的巨噬细胞,因此易形成结节,但本实验中在患病大菱鲆的肝脏中也发现了结节的存在,这是否与巨噬细胞的转移有关还有待于进一步研究。

由于药物难以渗透到结节内部,从而导致利用药物对鱼类分枝杆菌疾病进行治疗效果不明显,这也解释了为何此次疾病发生后利用抗菌类药物进行治疗没有明显效果。鱼类在被分枝杆菌感染后,除及时清除和焚烧死鱼外,目前尚无有效的处理措施^[35]。尽管有学者提出在尚未形成结节以前,杀菌抑菌是减少鱼类因感染分枝杆菌而死亡的最有效措施^[36],但在养殖生产过程中,由于鱼类分枝杆菌病发病速度慢,症状不明显,在发病早期不易被发现,所以该方法在生产中很难被应用。尽管具体的传播途径还不十分清楚,但众多研究表明分枝杆菌能通过养殖水体进行传播^[37]。因此,对养殖水产进行严格消毒,对苗种进行病原检疫可能是目前预防鱼类分枝杆菌疾病最有效的措施。此外,由于海分枝感染能感染人类^[38]。因此,深入开展鱼类分枝杆菌疾病的防控研究,对于水产养殖动物和养殖者的健康都具有重要的意义。

参考文献:

- [1] Lei J L, Liu X F. An primary study on culture of turbot *Scophthalmus maximus* L.[J]. Modern Fisheries Information, 1995, 10(11): 1-3. [雷霖霖, 刘新富. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)引进养殖的初步研究[J]. 现代渔业信息, 1995, 10(11): 1-3.]
- [2] Qin L, Xu J, Wang Y G. Edwardsielliosis in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with an unusual variant of *Edwardsiella tarda*: a clinical, aetiological and histopathological study[J]. Journal of Fish Diseases, 2014, 37(2): 103-111.
- [3] Padrós F, Zarza C, Dopazo L, et al. Pathology of *Edwardsiella tarda* infection in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) [J]. Journal of Fish Diseases, 2006, 29(2): 87-94.
- [4] Guo Y L, Wu L, Fang H, et al. Examination and analysis on pathogenic *Vibrio anguillarum* from turbot *Scophthalmus maximus* [J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(11): 222-227. [郭杨柳, 吴楠, 房海, 等. 大菱鲆病原鳃弧菌的检验与分析[J]. 生物技术通报, 2015, 31(11): 222-227.]
- [5] Domeénech A, Derenaández-Garayzábal J F, Pascual C, et al. Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberi* [J]. Journal of Fish Diseases, 1996, 19(1): 33-38.
- [6] Coscelli G A, Bermudez R, Silva A R S, et al. Granulomatous dermatitis in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) associated with natural *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* infection [J]. Aquaculture, 2014, 428-429: 111-116.
- [7] Villamil L, Figueras A, Toranzo A E, et al. Isolation of a highly pathogenic *Vibriopelagius* strain associated with

- mass mortalities of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), larvae[J]. Journal of Fish Diseases, 2003, 26(5): 293-303.
- [8] Fang W H, Huang J, Wang X H, et al. Identification and phylogenetic study of pathogenic bacteria causing ulcer disease of cultured Turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2005, 45(5): 665-670. [范文辉, 黄健, 王秀华, 等. 养殖大菱鲆溃疡症病原菌的分离鉴定及系统发育分析[J]. 微生物学报, 2005, 45(5): 665-670.]
- [9] Zhang W N, Zhou L, Xing J, et al. Isolation and identification of pathogen SR1 associated with swollen abdomen of cultured turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(4): 603-609. [张伟妮, 周丽, 邢婧, 等. 养殖大菱鲆腹水症病原菌 SR1 的分离及鉴定[J]. 中国水产科学, 2006, 13(4): 603-609.]
- [10] Souto S, Oliveira J G, Dopazo C P, et al. Reassortant betanodavirus infection in turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Journal of Fish Diseases, 2016, 39(11): 1347-1356.
- [11] Branson E, Riaza A, Alvarez-Pellitero P. Myxosporean infection causing intestinal disease in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), (Teleostei: Scophthalmidae)[J]. Journal of Fish Diseases, 1999, 22(5): 395-399.
- [12] Talaat A M, Reimschuessel R, Trucksis M. Identification of mycobacteria infecting fish to the species level using polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis[J]. Veterinary Microbiology, 1997, 58(2-4): 229-237.
- [13] Liu H, Gao L Y, Shi X J, et al. Detection of *Renibacterium salmoninarum* by nested PCR[J]. Journal of Fisheries of China, 2002, 26(5): 453-458. [刘荭, 高隆英, 史秀杰, 等. 用 nested PCR 方法快速检测鲑鱼肾杆菌[J]. 水产学报, 2002, 26(5): 453-458.]
- [14] Lei Y, Zhang H J, Wang J, et al. Development and primary application of a PCR assay for detection of piscirickettsia-like organisms[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2015, 35(6): 30-34. [雷燕, 张会军, 王娟, 等. 鱼类类立克次氏体 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 广东海洋大学学报, 2015, 35(6): 30-34.]
- [15] Lane D J. 16S/23S rRNA sequencing[M]//Stackebrandt E, Goodfellow M. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. New York: Wiley, 1991.
- [16] Adékambi T, Colson P, Drancourt M. *rpoB*-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(12): 5699-5708.
- [17] Kim H, Kim S H, Shim T S, et al. Differentiation of *Mycobacterium* species by analysis of the heat-shock protein 65 gene (*hsp65*)[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55: 1649-1656.
- [18] Dong X Z, Cai M Y. Manual of Familiar Bacterium Identification[M]. Beijing: Science Press, 2001. [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.]
- [19] Zhang D F, Ji C, Zhang X J, et al. Mixed mycobacterial infections in farmed sturgeons[J]. Aquaculture. Research, 2015, 46(8): 1914-1923.
- [20] Pidot S J, Asiedu K, Kaser M, et al. *Mycobacterium ulcerans* and other mycolactone-producing mycobacteria should be considered a single species[J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2010, 4(7): e663.
- [21] Buchanan R E, Gibbons N E. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. 8th edition. Beijing: Science Press, 1984. [布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 第8版. 北京: 科学出版社, 1984.]
- [22] Luo Z, Li J, Zhang Z G, et al. *Mycobacterium marinum* is the causative agent of splenic and renal granulomas in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther) in China[J]. Aquaculture, 2018, 490: 203-207.
- [23] Jiang Y Y, Li Y W, Zhou S M, et al. Isolation and identification of *Nocardia*, a pathogen of nocardiosis in largemouth bass, *Micropterus salmoides*[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2012, 51(1): 76-81. [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.]
- [24] Qi R R, Tang S L, Cui L B, et al. Histopathological observation of disease of rickettsia-like organism in tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2016, 29(3): 21-24. [戚瑞荣, 唐绍林, 崔龙波, 等. 罗非鱼类立克次氏体病的组织病理学观察[J]. 水产学杂志, 2016, 29(3): 21-24.]
- [25] Chang O Q, Shi C B, Ren Y, et al. Histopathological observations on pseudotuberculosis of *Seriola dumerili*[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(6): 936-943. [常藕琴, 石存斌, 任燕, 等. 高体鲷类结节病的病理组织学观察[J]. 水产学报, 2013, 37(6): 936-943.]
- [26] Xu L P, Wang J B, Zhang W, et al. Detection and identification of a strain of *Renibacterium salmoninarum* sourced from cultured Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*)[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2015, 42(6): 592-596. [徐立蒲, 王静波, 张文, 等. 一株大鳞大麻哈鱼源鲑肾杆菌的检测与鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(6): 592-596.]
- [27] Magnadóttir B, Bambir S H, Gudmundsdóttir B K, et al. Atypical *Aeromonas salmonicida* infection in naturally and experimentally infected cod, *Gadus morhua* L.[J]. Journal of Fish Diseases 2002, 25(10): 583-597.
- [28] Jeon S J, Gonsalves L C, Jacobs J M, et al. Short-term infection of striped bass *Morone saxatilis* with *Mycobacterium marinum*[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2011, 94(2): 117-124.
- [29] Evelyn M M, Donahue J M, Sells S F, et al. Ocular mycobacteriosis in a red-bellied piranha, *Pygocentrus nattereri* Kner[J]. Journal of Fish Diseases, 2011, 34(4): 323-326.
- [30] Tortoli E, Bartonloni A, Bozzetta E, et al. Identification of the newly described *Mycobacterium poriferae* from tuberculous lesions of the snakehead fish (*Channa striatus*)[J]. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 1996, 19(1): 22-29.
- [31] Brocklebank J, Raverty S, Robinson J. Mycobacteriosis in Atlantic salmon farmed in British Columbia[J]. The Canadian Veterinary Journal, 2003, 44: 486-489.
- [32] dos Santos N M S, do Vale A, Sousa M J, et al. Mycobacterial infection in farmed turbot *Scophthalmus maximus*[J].

- Diseases of Aquatic Organisms, 2002, 52: 87-91.
- [33] Hilary C, Davis J M, Dana B, et al. Dichotomous role of the macrophage in early *Mycobacterium marinum* infection of the zebrafish[J]. Cell Host & Microbe, 2007, 2(1): 29-39.
- [34] Robin L, Lalita R. Insight into early mycobacterial pathogenesis from the zebrafish[J]. Current Opinion in Microbiology, 2008, 11(3): 277-283.
- [35] Hatai K, Ogawa K. New Atlas of Fish Disease[M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2007. [畑井喜司雄, 小川和夫. 新鱼病图谱[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2007.]
- [36] Zhang Y J. Histopathological studies on the tuberculosis of black bream, *Sparus latus* Houttuyn[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1991, 22(6): 561-567. [张永嘉. 黄鳍鲷结节病病理组织学研究[J]. 海洋与湖沼, 1991, 22(6): 561-567.]
- [37] Jacobs J M, Stine C B, Baya A M, et al. A review of mycobacteriosis in marine fish[J]. Journal of Fish Diseases, 2009, 32(2): 119-130.
- [38] Slany M, Jezek P, Fiserova V, et al. *Mycobacterium marinum* infections in humans and tracing of its possible environmental sources[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2012, 58(1): 39-44.

Isolation and identification of the pathogen causing granulomas in internal organs of turbot *Scophthalmus maximus*

LUO Zhang¹, ZHANG Zhenguo¹, HAO Shuang¹, BAI Xiaohui¹, JIA Wenping¹, GAO Qian², FENG Shouming^{1,3}

1. Tianjin Fishery Research Institute, Tianjin 300221, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Tianjin Aquatic Animal Disease Prevention and Control Center, Tianjin 300221, China

Abstract: Turbot (*Scophthalmus maximus*) is an economically important marine fish species cultured in China. However, disease is a major problem in the turbot aquaculture fishery, causing high mortality. In August 2017, a disease outbreak among turbot in a marine farm in Tianjin led to a cumulative mortality rate of 25%. The main symptom of the disease was abundant white granulomas in the internal organs of the turbot. To define the causative pathogens, bacteria were isolated from the spleen and kidneys of diseased fish using conventional methods. An artificial infection experiment was conducted to determine the pathogenicity of the isolated strain. The 16S rDNA, *Hsp65*, and *ropB* gene sequences, as well as morphological and biochemical characteristics of the strain, were examined. In addition, histopathological analysis was performed on the diseased turbot. Abundant white granulomas were observed in the spleen, kidneys, livers, and intestinal tracts of diseased fish. The hepatocytes in the livers of the diseased fish were damaged, and several irregular vacuolations were observed. Some of the spleen cells were enlarged and necrotic, and epithelial cells from the renal tubule showed vacuolar degeneration and necrosis. Furthermore, in the center of the pregranulomas, as well as kidney and spleen macrophages contained several phagocytized red, rod-shaped acid-fast bacteria. Strain myco-10 was isolated from spleens of diseased fish. Healthy turbot were subjected to bacterial challenge tests by intraperitoneal injection of 3×10^8 cfu/fish of the isolated myco-10. The accumulative mortality rate was 66.7% within 30 days post-infection. Diseased turbot displayed symptoms similar to those observed in naturally infected individuals. Strain myco-10 showed positive pigmentation production after exposure to visible light, Tween-80 hydrolysis, urease, catalase at 68°C, and aryl-sulfatase, and negative results in terms of nitrate reductase and growth on 5% NaCl. Phylogenetic trees were constructed by matching 16S rDNA, *Hsp65*, and *ropB* genes of *Mycobacterium* spp. registered in GenBank. The results showed that strain myco-10 clustered with *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium ulcerans*. Strain myco-10 was determined to be *M. marinum* based on bacterial morphology, analytical profile index identification, and 16S rDNA, *Hsp65*, and *ropB* genes sequences. The results of this study suggest that *M. marinum* is the causal agent of granulomas in the internal organs of turbot. To the best of our knowledge, this is the first report on *Mycobacterium* spp. causing disease in turbot in China. Our findings will be useful as a reference for the prevention and control of mycobacteriosis in cultured turbot.

Key words: *Scophthalmus maximus*; granulomas; *Mycobacterium marinum*; identification

Corresponding author: GAO Qian, E-mail: qgao@shou.edu.cn; FENG Shouming, E-mail: smfeng65@163.com