DOI号: 10.3724/SP.J.0000.2009.20277

养殖乌鳢诺卡氏菌病及其病原研究

王国良[1,2] 徐益军[1] 金 珊[1] 祝璟琳[1] 朱文渊[1]
(1. 宁波大学生命科学与生物工程学院教育部应用海洋生物技术重点实验室, 宁波 315211; 2. 宁波大学医学院, 宁波 315211)

摘要: 2006年 6月至 7月, 浙江萧山的部分乌鳢养殖池塘出现大规模死鱼现象, 发病率达 35%, 死亡率 100%。病死鱼鱼龄多在 18个月左右, 体长 30—35cm。症状主要表现为体表、鳍条充血, 肝、脾、肾等内脏器官出现直径 1—5mm的乳白色结节。从病鱼的肝脏和肾脏中分离到菌株 W060622, 经光镜、电镜观察, 在形态上均表现为长或短的分支状杆菌。回归感染试验证实 W060622即为引起此次乌鳢结节病的病原菌。通过 16S rRNA基因的全序列测定, 并与 Genbank中相关序列进行比对, 发现 W060622与 鱼诺卡氏菌 *Nocardia seriolea* JCM3360^T (Z36925)的 16S rRNA基因序列相似性达 99.9%。结合菌株回归感染、形态学和生物学特征及 16S rRNA分子鉴定, 确定 W060622为 鱼诺卡氏菌。

关键词: 乌鳢; 诺卡氏菌病; 回归感染; 16S rRNA; 鱼诺卡氏菌
中图分类号: S941 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2009)02-0277-07

乌鳢 (*Ophiocephalus argus* Cantor)俗称黑鱼、蛇头鱼, 隶属鲈形目鳢科, 是我国广泛分布的肉食性淡水经济鱼类。随着市场需求的日益扩大, 人工养殖已从少量混养发展到大规模集中饲养。近两年, 在浙江杭州及绍兴一带, 频现一种养殖乌鳢大规模死亡的暴发性疾病。患病对象以 2龄鱼为主, 流行季节在 6—8月。平均发病率 35%, 发病死亡率高达 100%, 经济损失严重。现已证实乌鳢大规模死亡系 鱼诺卡氏菌 (*Nocardia seriolae*)引起。

首例报道诺卡氏菌病的是虹彩脂鱼 (*Hyphessobrycon innesi*), 以后陆续发生在虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)[1]、五条 (*Seriola quinqueradiata*)等水产养殖动物中。鱼类诺卡氏菌病一般表现为体表和内脏出现结节状肉芽肿。本次发病鱼以肝、脾、肾等内脏器官出现大量乳白色结节为主要症状, 结节直径 1—5mm。在鳢科鱼类中, Chen[2]和 Enrico[3]曾分别报道了斑鳢 (*Channa maculata*)和纹鳢 (*Channa striata*)结节病, 病原菌分别诊断为星状诺卡氏菌 (*N. asteroides*)和多孔分支杆菌 (*Mycobacterium Porifera*), 郭琼林[4]等也报道了乌鳢结节病的类似病例, 病原菌诊断为类立克次氏体 (Rickettsia-like organism, RLO)。

本研究主要通过 16S rRNA基因序列相似性分析, 结合菌株回归感染、形态及生理生化特性等将该乌鳢病原菌鉴定为 鱼诺卡氏菌。这是国内外首次在养殖乌鳢中发现诺卡氏菌病[5], 也是养殖乌鳢感染 鱼诺卡氏菌的首次报道。该研究旨在为乌鳢诺卡氏菌病的有效防控提供理论参考, 且为乌鳢健康养殖及病害诊治增加新的内容。

1 材料与方法

1.1 病鱼来源及症状观察 由浙江萧山某乌鳢养殖场提供 2龄患病乌鳢, 体长 30—35cm, 体重 250—400g。取濒死病鱼与正常鱼进行体表及内部解剖病理比较观察, 确定该病各病程的典型症状。

1.2 病原分离 选取具有典型症状的濒死病鱼, 无菌操作从肝、脾、肾、心等部位分离细菌, 分别划线于胰蛋白胨大豆琼脂 (Tryptic soy agar, TSA)、小川 (Ogawa's medium, OM)、普通营养琼脂培养基中, 28℃恒温培养 5—7d后纯化细菌, 分离菌株编号为 W060622。

1.3 病原形态观察

1.3.1 菌落形态观察 将分离纯化后的细菌培养物分别划线接种于 TSA和小川培养基中, 28℃恒温培养 5—7d后观察菌落形态。

1.3.2 显微镜观察 对分离菌株进行革兰氏染色

收稿日期: 2007-06-14; 修订日期: 2008-11-12
基金项目: 长江学者和创新团队发展计划 (No. IRT0734); 浙江省自然科学基金 (No. Y3080244); 宁波市自然科学基金 (No. 2007A610069)资助
通讯作者: 王国良 (1955—), 男, 教授; 主要从事水产动物病害研究。Tel: 0574-87600922; E-mail: wanggl@nbip.net

和抗酸染色, 于 400倍和 1000倍显微镜下镜检。利用扦片法观察菌丝形态。取融化并冷却至大约 50℃的 TSA培养基约 20 mL倒平板, 凝固待用。挑取菌种在平板上划线接种, 将已灭菌的盖玻片以大约 45°角扦入培养基内 (扦在接种线上), 再将平板倒置, 于 28℃培养 5—7d。取出盖玻片, 于 400倍和 1000倍显微镜下镜检。

1.3.3 电镜观察 用无菌生理盐水洗下 TSA斜面上的菌苔, 稀释并制成菌悬液。吸取一滴菌悬液置于封口膜上, 然后将其覆盖于 200目的涂有聚乙烯甲醛 (Formavar-carbon)的铜网上, 放置 5min。醋酸铀 (PTA, pH 6.5)染色 3—5min, 干燥, TECNAI 10型透射电子显微镜观察。

肾脏组织用 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双固定, 4% 醋酸铀染色 30min。酒精逐级脱水后, 用 100% 丙酮脱水。无水丙酮与包埋剂渗透组织, 震荡, 包埋, 并置烘箱内于 37℃、45℃和 60℃逐级聚合。修块, 制备 100—120nm超薄切片, 醋酸铀和柠檬酸铅染色, TECNAI 10型透射电子显微镜观察。

1.4 回归感染 健康试验乌鳢 80尾, 体重 120—150 g, 体长 20—25 cm。随机分成 8个试验组, 设置为注射、口灌、浸泡组及相应的对照组, 每组 10尾。试验用水族箱盛水 35 dm^3 (容积 45cm × 30cm × 30cm), 充气, 试验水温 26—28℃。试验前正常投喂配合饲料, 后停食。暂养 48h, 以备试验。

菌株于 TSA斜面 (28℃)培养 7d, 用 0.85% 的无菌生理盐水洗下菌苔, 制备成菌悬液, 测定浓度为 1.16×10^6 CFU (Colony-forming units)用于腹腔注射和口灌试验; 菌种于胰蛋白胨大豆肉汤 (Tryptic Soy Broth, TSB)液体培养基中 (28℃, 120 r/min摇床)生长 7d, 经稀释后测定浓度为 2.71×10^6 CFU, 用于浸泡试验。

腹腔注射菌量为 0.5 mL。对照组注射等量无菌生理盐水 (0.85%)。口灌组灌胃菌量为 1.0mL。对照组灌胃等量无菌生理盐水 (0.85%)。创伤浸泡组, 镊子刮取健康鱼体表鳞片制造创伤, 然后于 2.71×10^6 CFU浓度菌液中浸泡 20min, 清洗鱼体数次, 转入普通水体暂养。非创伤浸泡组, 健康鱼于 2.71×10^6 CFU浓度菌液中浸泡 20min, 清洗鱼体数次, 转入普通水体暂养。创伤对照组, 创伤制造方式同上, 转入普通水体暂养。

试验过程中, 密切关注试验鱼的活力、水质等。发现濒死鱼, 立即取出解剖, 观察症状, 并在病灶处用 TSA培养基进行细菌分离。

1.5 生理生化试验 参照伯杰氏细菌鉴定手册 (第九版)和中科院微生物研究所放线菌分类组刘志恒[6]的相关属、种鉴定内容和方法, 对供试菌株的酶类产生、水解活性、单一碳源生长及温度和盐度耐受性等进行研究。

温度耐受性试验: TSA斜面上接种 W060622菌株, 分别置 35℃、40℃、45℃水浴培养 7—10d, 观察其生长情况; TSB试管培养 W060622菌株, 在 50℃水浴中分别处理 2、4、6、8h, 转接至 TSA平板培养, 5—7d后观察其生长情况。

盐度耐受性试验: 配制盐度梯度为 30‰、40‰、60‰的 TSA培养基, 滴加菌液 0.1 mL于空培养皿中, 用预热冷却后的液状 TSA倾倒入含菌培养皿, 摇匀。培养 5—7d后, 观察其生长情况。

1.6 16S rRNA基因的PCR扩增 基因组 DNA提取和 PCR扩增参照东秀珠[7]的方法进行。16S rRNA基因 PCR扩增引物分别为: P1: 5′-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3′; P2: 5′-TACGGCTACCTTGT-TACGACTT-3′。分别对应于 *E. coli* 16S rRNA基因的第 8—27和第 1492—1514个碱基位置。25μL反应体系包括: 1×PCR Buffer 2.5μL, 2.5mmol/L $MgCl_2$ 2μL, dNTP (各 25μmol/L) 0.2μL, 引物 P1、P2 (25μmol/L)各 1μL, *Taq* DNA聚合酶 (5U/μL) 0.2μL, DNA模板 2μL。ddH_2O 16.1μL。PCR反应条件为: 94℃预变性 4min, 94℃变性 1min, 47℃复性 1min, 72℃延伸 2min, 30个循环, 最后 72℃延伸 5min。PCR产物的回收纯化采用上海基康生物有限公司的 DNA快速纯化回收试剂盒。PCR产物直接测序, 测序工作由上海基康生物有限公司 ABI 377 DNA自动测序仪完成。测序引物为: P1: 5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′; P2: 5′-TACGGCTAG-CTTGTTACGACTT-3′; P3: 5′-GTAGGGTGCGAGCGT-TG-3′。所测序列利用 GenBank数据库中的 BLAST与邻近种属的 16S rRNA序列进行相似性比较。

2 结 果

2.1 病鱼症状

自然发病乌鳢开始仅反应迟钝, 食欲下降, 上浮水面。随着病情加重, 部分鱼体表出现创伤, 溃烂出血, 鳍条有充血现象。大多伴有肛门红肿, 腹部膨大, 少数病鱼眼球突出。解剖观察发现, 膨大的腹腔内有少量透明或淡黄色液体, 在肝、脾、肾等内脏组织中出现乳白色或淡黄色结节, 直径 1—5mm(图 1)。60d内累计死亡率达 35% (50万尾中死亡 18万

尾)。取结节内物质涂片, 镜检发现大量长或短的革兰氏阳性分枝状菌体。

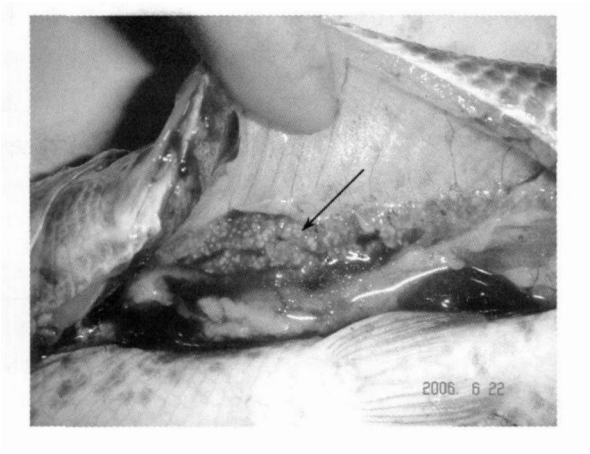


图 1　布满乳白色结节的病鱼肾脏

Fig. 1　White nodules in kidney of diseased snakehead

2.2　病原形态

2.2.1　菌落形态

对病鱼的病灶部位(肝、脾、肾)进行病原分离, 得到纯度一致的单菌落。病原菌在 TSA、小川及普通营养琼脂培养基上均能生长。但生长缓慢, 需5—7d才能长出, 菌落呈淡黄色沙粒状, 粗糙易碎, 边缘不整齐, 偶尔在表面形成皱褶(图 2)。



图 2　病原菌菌落形态

Fig. 2　Growing on OM of fish isolate

2.2.2　菌体显微与亚显微形态

病原菌革兰氏阳性, 具有弱抗酸性。基丝发达、繁茂, 呈分枝状, 丝状体长 10—50 μm(图 3)。菌体呈长或短杆状, 或细长分枝状, 常断裂成杆状至球状体, 两端膨大成椭球形, 直径 0.2—0.6μm, 长 1.0—3.0μm, 大多成群紧密排列(图 4)。病鱼组织透射电镜观察未见病毒颗粒、类立克次体等其他原核生物体, 发现大量菌体, 与分离菌株形态相同, 且菌体结构特殊, 中央或两端有丝状的类核体, 胞壁为三层结构, 外围高电子密度层与质膜之间被一低电子密度层隔开(图 5)。

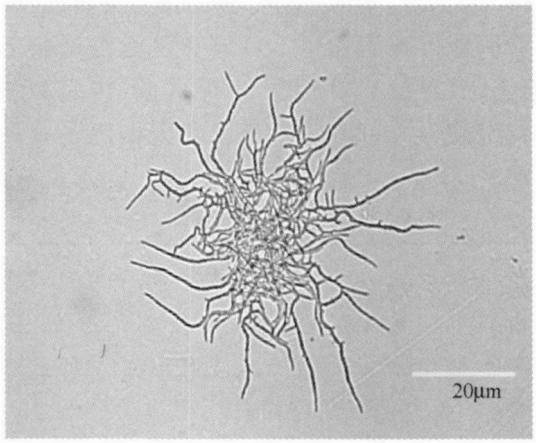


图 3　菌丝体观察

Fig. 3　Micrograph of mycelium

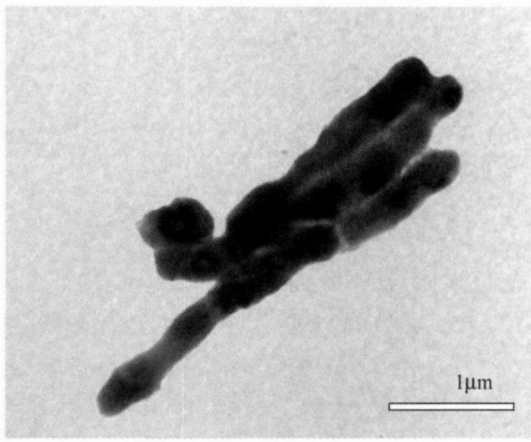


图 4　菌体透射电镜观察

Fig. 4　Transmission electron micrograph of bacteria

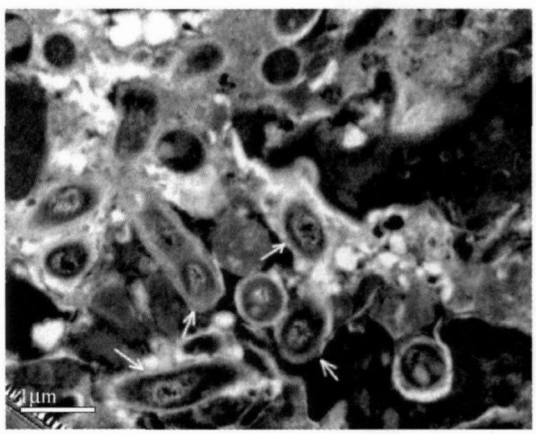


图 5　病鱼肾脏组织中菌体的透射电镜观察

Fig. 5　Transmission electron micrograph of bacteria in kidney lesions, Bar = 1 μm

2.3 回归感染试验

感染试验结果表明, 分离菌株即为该病的病原菌, 对乌鳢有较强的致病性, 病程较长, 死亡率100% (表 1)。其中, 注射组试验鱼发病最快, 感染 3d后即出现病死鱼。口灌和浸泡组试验鱼在感染 7d后开始游动迟缓, 上浮水面, 体表和各鳍条均有发红或出血症状, 随后几天出现连续死亡现象。到第 18天时, 感染组试验鱼全部死亡, 而对照组无任何症状。发病鱼解剖观察, 发现肝、脾、肾部位出现大量乳白色结节, 肾脏充血, 肿大, 与自然发病鱼症状基本相似。从病变组织肝、脾、肾部位均分离到纯度一致的菌株, 菌落形态、菌体形态及基本生理生化特性与从自然发病鱼体分离的菌株完全一致。

表 **1** 健康乌鳢回归感染试验结果

Tab. 1 Results of experimental infections of snakehead with isolate

试验组 Group	试验尾数 Number	菌悬液浓度 Bacteria density (cfu / mL)	剂量 Dose (mL)	感染后死亡数及死亡时间 No. and time of fish death (d)															死亡尾数 No. of fish dead	死亡率 Mortality (%)
				3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
1注射	10	1.16×10^6	0.5	1	1	0	1	3	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	100
2口灌	10	1.16×10^6	1.0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	2	3	0	0	1	1	10	100
3创伤浸泡	10	2.71×10^6	20*	0	0	0	0	0	1	0	1	1	2	0	2	2	1	0	0	10	100
4非创伤浸泡	10	2.71×10^6	20*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	3	1	1	0	10	100
5注射对照	10	生理盐水	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6口灌对照	10	生理盐水	1.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7创伤对照	10	灭菌淡水	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8正常	10	灭菌淡水	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* 浸泡 20min Immersed 20min

2.4 生理生化特性

病原菌生理生化试验结果 (表 2)。病原菌过氧化氢酶阳性、氧化酶阴性, 产生脲酶, 还原硝酸盐, 不水解酪素、腺嘌呤、黄嘌呤、次黄嘌呤、酪氨酸、弹性蛋白、淀粉和明胶, 水解七叶灵, 能以柠檬酸盐为唯一碳源生长, 45℃下培养、40‰盐度下培养及 50℃处理 8 h后培养均不生长。生理生化特性与诺卡氏菌属基本一致, 且与其中的 鱼诺卡氏菌 (*N. seriolae*) 完全相同。

表 **2** 患病乌鳢病原菌及参照菌株的生理生化特性

Tab. 2 Physiological and biological characteristics of isolate W060622 from snakehead and reference strains of *Nocardia*

	星状诺卡氏菌 *N. asteroides*	鼻疽诺卡氏菌 *N. farcinica*	杀鲑诺卡氏菌 *N. salmonicida*	鱼诺卡氏菌 *N. seriolae*	乌鳢病原菌 Fish isolate
	ATCC 19247^T	ATCC3318	JCM 4826^T	JCM 3360^T	W 060622
过氧化氢酶 Catalase	+	+	+	+	+
氧化酶 Oxidase	−	−	−	−	−
脲酶 Urea	+	+	+	−	−
硝酸盐还原 Nitrate	+	+	+	+	+
水解 Decomposition of					
七叶灵 Aesculin	+	+	+	+	+
明胶 Gelatin	−	−	−	−	−
弹性蛋白 Elastin	−	−	−	−	−
淀粉 Starch	−	−	−	−	−
酪素 Casein	−	−	−	−	−
腺嘌呤 Adenine	−	−	−	−	−

续表

	星状诺卡氏菌 *N. asteroides*	鼻疽诺卡氏菌 *N. farcinica*	杀鲑诺卡氏菌 *N. salmonicida*	鱼诺卡氏菌 *N. seriolae*	乌鳢病原菌 Fish isolate
	ATCC 19247^T	ATCC3318	JCM 4826^T	JCM 3360^T	W 060622
黄嘌呤 Xanthine	-	-	-	-	-
次黄嘌呤 Hypoxanthine	-	-	-	-	-
酪氨酸 Tyrosine	-	-	+	-	-
唯一碳原利用 Growth on sole carbon sources					
甘露醇 Mannitol	-	-	+	-	-
阿拉伯糖 Arabinose	-	+	-	-	-
山梨醇 Sorbitol	-	-	+	-	-
柠檬酸盐 Citrate	+	-	+	+	+
在 45℃下生长 Growth at 45℃	-	+	-	-	-
50℃ 培养 8h Culture 8h at 50℃	+	+	+	-	-
40‰ NaCl中培养 Culture in 40‰ NaCl	+	+	+	-	-

注: "+"阳性; "-"阴性 Note "+" positive, "-" negative

2.5 16S rRNA序列分析

用引物 P1和 P2扩增菌株的 16S rRNA 基因, 共 1430个碱基, 其序列在 GenBank中的注册号为: EF192033。将该序列与 GenBank中相关序列进行相似性分析。结果表明, 菌株与诺卡氏菌属的菌株亲缘关系最近, 与 鱼诺卡氏菌 *Nocardia seriolea* JCM 3360^T (Z36925)的 16S rRNA 基因序列相似性达 99.9%, 只有两个碱基的差别。据此鉴定该菌株为 鱼诺卡氏菌 (*Nocardia seriolea*)。

3 讨 论

引起鱼类患结节病的病原有棒状杆菌 (*Corynebacterium* sp.)、分枝杆菌[3] (*Mycobacterium* sp.)、诺卡氏菌[1] (*Nocardia* sp.)、巴斯德氏菌[8] (*Pasteurella* sp.)、嗜水气单胞菌[9] (*Aeromonas* sp.)以及类立克次氏体 (Rickettsia-like organism)[4]等, 而引起鳢科鱼类结节病的病原有诺卡氏菌[2]、分枝杆菌[3]及类立克次氏体[4]。本研究中病鱼肾脏组织的电镜观察显示, 肉芽肿组织中含有大量形态、大小一致的菌体, 而未见病毒颗粒、类立克次体[10,11]等其他原核生物体。我们从病鱼组织中分离获得菌株 W 060622, 其人工培养菌落特征、个体形态及染色特征等符合诺卡氏菌的一般特征, 可初步确定为诺卡氏菌引起。

鱼类诺卡氏菌病一般表现为体表和内脏出现结节状肉芽肿。通过对浙江萧山乌鳢养殖场的病鱼取样观察以及分离菌株的回归感染试验, 我们发现感染鱼的肝、脾、肾等内脏器官均出现结节状肉芽肿。本研究中, 病原菌在形态、生长和生理生化等基本特征与诺卡氏菌属的生物学特征基本一致。16S rRNA 序列同源性分析结果表明, 分离菌株与 鱼诺卡氏菌 *Nocardia seriolea* JCM 3360^T (Z36925)的 16S rRNA 基因序列相似性达 99.9%, 仅有两个碱基的差别, 据此确定该病为乌鳢诺卡氏菌病, 鉴定病原菌为 鱼诺卡氏菌。

诺卡氏菌 (*Nocardia* sp.)属于放线菌目, 诺卡氏菌科 (Nocardiaceae), 是一类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。在水产动物中, 首例报道诺卡氏菌病的是虹彩脂鱼[1], 以后陆续发生在虹鳟[1]、五条 、斑鳢[2]、红鲑鱼、太平洋牡蛎、大口鲈和海鲈[12]等水产养殖动物中。诺卡氏菌曾是日本 鱼养殖中最主要的病原菌之一, 也是太平洋牡蛎养殖的主要病原菌, 近年来对我国台湾及大陆水产养殖业影响较大。

鱼诺卡氏菌曾被报道发生在五条 、海鲈[12]及大黄鱼[13]养殖中, 三者均为海水养殖鱼类, 而在淡水鱼类病害中 鱼诺卡氏菌的发现尚属首次。诺卡氏菌在海水中的含量不高, 曾被认为是一种机会致病菌, 当养殖鱼类体质虚弱、免疫力低下时, 通过呼吸或饵料而感染[14-16]; 诺卡氏菌在淡水中的含量尚无报道。回归感染试验结果表明, 注射、口灌和浸泡感染都能使试验鱼致病, 这说明在自然情况下该菌从鱼体损伤部位、消化道或通过鳃进入体内的可

能性均存在。从发病器官来看,发病最严重的器官都是与血液循环关系最为密切的器官,说明该菌很可能通过血液循环而到达各靶器官,然后在各组织器官中固着,逐渐繁殖而形成结节。结合该病的流行病学资料可以推断,在自然情况下由于养殖密度过高、养殖区域水质恶化等环境胁迫导致机体抵抗力下降,以及乌鳢经过多代人工繁育造成种质退化,加上流行季节水温适宜病原菌繁殖,致使诺卡氏菌可通过水体或者饵料侵入机体引起致病。

在药物防治方面,目前尚无针对诺卡氏菌的特效抗菌药物。复方新诺明(TMP-SMX)和利福平(Rifampicin)曾被用于斑鳢星状诺卡氏菌病的治疗[14],并取得了较好的效果。苯扎氯铵(BKC,即洁尔灭)应用于水体消毒,对星状诺卡氏菌的抑菌效果明显[15]。免疫防治方面,Itano[16]用*N. soli*、*N. flum inea*和*N. uniform is*作为活疫苗免疫健康五条 ,发现低毒*N. soli*免疫五条 后,鱼体对*N. seriolea*的抗感染能力明显增强。

诺卡氏菌病主要发生在人类和畜牧业中,近几年在水产动物中也有较多报道,对水产养殖业造成较大损失。有关水产动物致病诺卡氏菌(包括 鱼诺卡氏菌)对食品安全和人类健康的危害尚不清楚,人鱼共患可能性的研究值得引起人们的重视。由于鱼类诺卡氏菌病病程较长,发病前期无症状或症状不明显,后期治愈率低,发病率和死亡率都较高,故给该病的早期诊断和防治带来极大困难。随着分子生物学技术的发展,病原菌分子检测技术的突破,将为乌鳢诺卡氏菌病的防治带来新的转机。

参考文献:

[1] Valdez I E, Conroy D A. The study of a tuberculosis-like condition in Neon tetras (*Hyphessobrycon innessi*) Ⅱ. Characteristics of the bacterium isolated [J]. *Microbiologia Espanola*, 1963, **16**: 249—253

[2] Chen S C. Study on the pathogenicity of*Nocardia asteroides* to Formosa snakehead, *Channna maculata* (Lacepede), and large-mouth bass, *Micropterus salmoides* (Lacepede) [J]. *J Fish Dis*, 1992, **15**: 47—53

[3] Enrico T, Alessandro B, Elena B, *et al*. Identification of the newly described *Mycobacterium Poriferae* form tuberculous lesions of snakehead fish (*Channa striatus*) [J]. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis*, 1996, **19**: 25—29

[4] Guo Q L, Jia W Z, Han X P. Rickettsia-like organism infected freshwater reared snakehead (*Ophiocephalus argus* Cantor) in China [J]. *Progress in Natural Science*, 2004, **14**(1): 59—64 [郭琼林, 贾伟章, 韩先朴. 我国淡水养殖乌鳢的类立克次体感染. 自然科学进展, 2004, **14**(1): 59—64]

[5] Xu Y J, Wang G L, Jin S. New disease on snakehead (*Ophiocephalus argus* Cantor), Nocardiosis [J]. *China Fisheries*, 2007, **3**: 62—63 [徐益军, 王国良, 金 珊. 养殖乌鳢新病害—诺卡氏菌病. 中国水产, 2007, **3**: 62—63]

[6] Liu Z H, Jiang C L. Modern biology and biotechnology of Actinomyces [M]. Beijing: Publishing Company of Science, 2004, 77—80 [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, 77—80]

[7] Dong X Z, Cai M Y. Systemic identification manual of familiar bacteria [M]. Beijing: Publishing Company of Science, 2001, 409—412 [东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社. 2001, 409—412]

[8] Qian Y X, Shao J Z, Wang G L. A review of principal bacterial diseases of mariculture fish [J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2001, **2**: 78—87 [钱云霞, 邵健忠, 王国良. 海水养殖鱼类细菌性疾病研究概况. 海洋湖沼通报, 2001, **2**: 78—87]

[9] Jin S, Wang G L, Zhao Q S, *et al*. Pathogenic and hemopathological studies on the bacterial pseudotuberculosis of *Lateolabrax japonicus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2004, **28**(6): 703—708 [金 珊, 王国良, 赵青松, 等. 鲈细菌性类结节病的病原及血液病理研究. 水产学报, 2004, **28**(6): 703—708]

[10] Jia W Z, Sun X F, Guo Q L. Primary isolation and purification of Rickettsia-like organism (RLO) from the tissues of*Ophiocephalus argus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(4): 48—49 [贾伟章, 孙晓凤, 郭琼林. 养殖乌鳢类立克次体分离纯化的初步研究. 水生生物学报, 2004, **28**(4): 48—49]

[11] Guo Q L, Sun X F, Jia W Z, *et al*. Urtrastructural pathological studies on Rickettsia-like organism infection in a cultured fish, *Ophiocephalus argus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(2): 265—271 [郭琼林, 孙晓凤, 贾伟章, 等. 养殖乌鳢类立克次体感染的超微病理学研究. 水生生物学报, 2007, **31**(2): 265—271]

[12] Chen S C, Lee J L, Lai C C, *et al*. Nocardiosis in sea bass, *Lateolabrax japonicus*, in Taiwan [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2000, **23**: 299—307

[13] Wang G L, Yuan S P, Jin S. Nocardiosis in large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson) [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2005, **28**: 339—345

[14] Chen S C, Wang P C. *In vitro* activity of antimicrobial agents to *Nocardia* [J]. *Journal of Fish Diseases*, 1993, **16**: 269—272

[15] Chen S C. *In vitro* susceptibility of*Nocardia* to several commonly used disinfectants [J]. *Journal of Fish Diseases*, 1992, **16**: 345—348

[16] Itano T, Kawakami H, Kono T, *et al*. Live vaccine trials against nocardiosis in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* [J]. *Aquaculture*, 2006, **261**: 1175—1180

RESEARCH ON THE NOCARDIOSIS AND PATHOGEN IN REARED SNAKEHEAD, *OPHIOCEPHALUS ARGUS* CANTOR

WANG Guo-Liang[1,2], XU Yi-Jun[1], JIN Shan[1], ZHU Jing-Lin[1] and ZHU Wen-Yuan[1]

(1. *The Key Laboratory of Applied technology of Marine Biology, Ministry of Education, Faculty of Life-Science and Bio-Technology, Ningbo University, Ningbo* 315211; 2. *The Medical School, Ningbo University, Ningbo* 315211)

Abstract Epizootics of nocardiosis in reared snakehead, *Ophiocephalus argus* Cantor, occurred in the north part of Zhejiang Province, China, in recent years. It is a chronic systematic disease which bring significant loss in aquiculture. And an epizootic disease of snakehead, cultured in brackish ponds was investigated by our workgroup in Xiaoshan, in Zhejiang Province, China, from June to July 2006. The cumulative mortality within 30d was 35% (180000 out of 500000) and the mortality was as high as 100%. The clinical signs, pathogenic morphology, virulence, biochemical characterization, ultrapathology and 16S rRNA gene were observed and analyzed. This is the first study on *Nocardia* sp.-infected snakehead in aquaculture. We try to make it the reference of prevention and cure on nocardiosis in snakehead and also provide new contents about diseases in snakehead.

The diseased fish were 18 months old with individual length from 30 to 35 cm, body weight from 250 to 400 g. Multiple, ivory-white nodules, 1—5 mm in diameter, were scattered on several internal organs, especially the liver, spleen and kidney. Gram-positive rods, often seen as branched fragmented filaments, were detected in Gram-stained smears of scrapings of the organ lesions. Bacteria were isolated from the liver and kidney of diseased fish and numbered W060622. Experimentally induced nocardiosis in snakeheads challenged with the bacterium isolated from a natural outbreak produced the same pathological changes as observed in naturally infected fish. In addition, the bacterium was re-isolated in pure culture from challenged animals only. These observations confirm the bacterium as the aetiological agent of this disease in cultured snakeheads.

The morphology of isolated bacteria from Tryptic soy agar (TSA) and Ogawa's medium (OM) were bead-like or long, slender, filamentous rods both under microscope and electron microscope. Batches of bacteria were found in kidney tissue and cells, whereas, no virus and other prokaryotes were found under electron microscope. Biochemical characterization contains enzyme production, decomposition, growth on sole carbon sources were tested and draw similarities to *Nocardia*. Almost complete sequence of the 16S rRNA gene of the organism was sequenced to be 1430 bp (GenBank Accession No. EF192033) and compared with the correlative sequences in Genbank database. It was found to be highly similar with that of the type strain of *Nocardia seriolae* JCM 3360^{T} (Z36925) and the similarity reached 99.9%. Based on the results of the experimental, morphologgical feature, physiologgical, biological properties and 16S rRNA sequence, the pathogenic organism W060622 was identified as *Nocardia seriolae*.

In the experimental infection, we found that healthy snakehead could be infected by intraperitoneal (IP) injection, intragastric (IG) infection and also by immersion challenge. This indicated that the bacterium colonizes in the fish via manifold routes, such as injured skin, gill or digestive tract. Lots of nodules were found on the liver, spleen and especially kidney of challenged fish which probably reflected that the pathogen multiplying related to blood circulation.

Epidemiology and environmental conditions showed the outbreak might associate with depressed germplasm resource by inbreeding, water contaminated and unpasteurized diets. The high density at which fish were reared and eutrophication water acted as external stressors might decrease the fish's resistance to bacterial infection. These observations suggested an opportunistic role of *Nocardia* in infected snakeheads.

Because of the great harm of this disease, no effectual approaches were found in early diagnosis and prevention and cure. So the pathology, immunology, detection and medication of nocardiosis in snakehead warrants further investigation.

Key words Snakehead; Nocardiosis; Experimental infection; 16S rRNA; *Nocardia seriolae*