



黑斑蛙蝌蚪出血病病原菌的分离鉴定及药物敏感性

钟为铭^{1,2}, 彭芳¹, 陈康勇³, 赵天宇⁴,
邹钧^{1,3}, 高志鹏^{1,2*}

(1. 湖南农业大学动物科学技术学院, 湖南长沙 410128;

2. 湖南省特色水产资源利用工程技术研究中心, 湖南长沙 410128;

3. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

4. 湖南农业大学园艺学院, 湖南长沙 410128)

摘要: 为确定黑斑蛙蝌蚪出血病的病原菌并筛选出防治该病的药物, 本研究从患出血病蝌蚪体内分离出菌株 KD-CXB-1, 健康蝌蚪在人工感染该菌后出现与自然感染蝌蚪相似的出血症状。同时从人工感染死亡蝌蚪体内分离到与菌株 KD-CXB-1 形态特征及生理生化特性一致的优势菌株, 以上结果表明 KD-CXB-1 为黑斑蛙蝌蚪出血病的病原菌。实验进一步对菌株 KD-CXB-1 开展形态学观察、革兰氏染色、生理生化指标测定、16S rDNA 基因序列测定、系统发育树构建、药物敏感性测定。形态学观察显示该菌为杆状的革兰氏阴性菌, 长度约 1 μm, 表面粗糙。通过 16S rDNA 基因序列比对、系统发育树构建、生理生化实验确定 KD-CXB-1 为嗜水气单胞菌。药物敏感性实验结果表明, KD-CXB-1 对氟苯尼考、丁香和苏木等 10 种药物高度敏感; 对乌梅、五倍子和黄芩等 3 种药物中度敏感; 对阿莫西林、大黄和青霉素等 8 种药物不敏感。研究表明, 嗜水气单胞菌是引起黑斑蛙蝌蚪出血病的病原菌, 筛选出的 10 种高敏感药物为有效防治蝌蚪出血病提供了理论参考和实践依据。

关键词: 黑斑蛙; 蝌蚪; 嗜水气单胞菌; 病原鉴定; 药物敏感性

中图分类号: S 947.2

文献标志码: A

黑斑蛙 (*Rana nigromaculata*) 是我国分布最广的两栖动物之一, 其生性凶猛, 跳跃能力极强, 是捕食害虫的能手, 具有巨大的生态效益和经济效益。在养殖蛙类中, 导致蝌蚪患病的原因有很多, 包括环境因素、化学因素以及微生物感染等。目前研究表明, 在环境因素方面, 水质恶化和温度骤变容易导致蝌蚪患病^[1]。养殖水体温度升高, 一方面可以促进蝌蚪呼吸、循环和代谢^[2], 另一方面也会增加有毒物质的毒性, 造成蝌蚪变态期提前、孵化率下降^[3]、生存能力变弱和存活率降

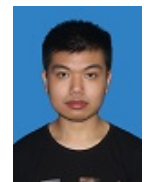
低等负面影响^[4]。当温度达到 37~38 °C 或低于 0 °C 时, 会造成蝌蚪死亡^[5]。化学因素方面, Green 等^[6]研究表明, 林蛙 (*R. chensinensis*) 蝌蚪生长阶段, 水中 Cl⁻ 浓度增加会降低林蛙蝌蚪的存活率。孙胜男等^[7]研究证明, 阿特拉津和氯吡硫磷化学药物的联合作用对林蛙蝌蚪具有很强的毒性, 并且具有协同作用。苏红巧等^[8]研究发现, 氯吡硫磷实验组中, 非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 蝌蚪的死亡率为 85%, 重铬酸钾各浓度实验组中黑斑蛙蝌蚪死亡率均高于无药物处理组。研究证明化学物质对

收稿日期: 2020-12-29 修回日期: 2021-02-06

资助项目: 国家自然科学基金 (32073020); 湖南省教育厅科学研究重点项目 (20A238); 国家级大学生创新训练计划 (s202010537005)

第一作者: 钟为铭 (照片), 从事水产动物医学研究, E-mail: 1727841172@qq.com

通信作者: 高志鹏, 从事水生动物医学研究, E-mail: gaozhipeng627@163.com



蝌蚪具有一定的毒性作用,且不同种的蝌蚪对化学物质的敏感性不同。微生物感染方面,王会聪等^[9]实验证明肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)是引起棘胸蛙(*R. spinosa*)蝌蚪腹水,腹部肿大和出血症状的病原菌。此外,Borteiro等^[10]在乌拉圭本土发现蛙壶菌(*Batrachochytrium dendrobatidis*)能感染不同种的蝌蚪,是野生蛙类生存的潜在威胁之一。Nieto等^[11]从患病红腿蛙(*R. aurora*)蝌蚪分离出多种寄生物,其中包括吸虫、水蛭和原生动物等。

黑斑蛙蝌蚪出血病的病症为蝌蚪腹部、头部有出血点,解剖发现肠道内充满积水且局部发红。该症状与Mouriño等^[12]观察的牛蛙(*R. catesbiana*)蝌蚪出血病的病理症状相似^[12]。蝌蚪出血病发病率在养殖后期呈上升趋势,这给黑斑蛙养殖带来巨大的经济损失。目前关于黑斑蛙蝌蚪出血病的报道较少,为有效地控制黑斑蛙蝌蚪出血病,掌握其发病机理,本实验对患出血病黑斑蛙蝌蚪进行病原菌分离、鉴定及药物敏感性实验,旨在为黑斑蛙蝌蚪出血病的诊断和有效防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

患出血病的黑斑蛙蝌蚪和健康黑斑蛙蝌蚪取自湖南省某黑斑蛙养殖场。取颈部、腹部出现点状出血,腹部膨胀的发病蝌蚪进行病原菌分离。健康蝌蚪经7 d暂养观察,从中选取无病无伤的蝌蚪作为实验材料。

1.2 实验试剂

胰蛋白胨大豆肉汤(trypticase soy broth, TSB)培养基、水解酪蛋白(mueller hinton, MH)培养基、技术琼脂粉、微量生化鉴定管购于广东环凯微生物科技有限公司,抗菌药敏药片购于杭州微生物科技有限公司,75%酒精购于衡阳广盛医用科技有限公司,0.85%生理盐水购于国药集团化学试剂有限公司,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)和2.5%戊二醛购于雷根生物,叔丁醇购于天津市光复精细化工研究所。

1.3 实验方法

病原菌的分离 选取具有典型症状的黑斑蛙蝌蚪进行体外消毒,在无菌环境下将病灶明显

的脏器、充血处肌肉以及腹水划线接种于TSB固体培养基上,置于28℃恒温培养18 h,挑取单个优势菌落进行纯化,置于28℃恒温培养18 h,观察菌落特性,保存备用。

病原菌理化特性分析 接种病原菌于TSB固体培养基上,在28℃下恒温培养24 h,进行革兰氏染色,利用光学显微镜观察染色结果。生理生化实验使用广东环凯微生物科技有限公司微量生化鉴定管进行测定。

扫描电子显微镜观察 病原菌培养至对数生长期后,4 000 r/min离心后弃除培养基,用无菌PBS洗涤2次并重悬。然后将菌体在4℃下用2.5%戊二醛固定过夜。弃除固定液并用无菌PBS洗涤3次;然后依次用10%、30%、50%、70%和90%乙醇脱水,每次15 min,用100%乙醇脱水1次,每次20 min;用叔丁醇置换2次,每次20 min。最后将菌体进行真空冷冻干燥,喷金,使用扫描电子显微镜(Hitachi SU8010)观察并拍照。

16S rDNA 鉴定 使用16S rDNA BigDye Terminator v1.1试剂盒提取菌株的DNA,采用扩增细菌的PCR通用引物,正向引物F:5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAG-3',反向引物R:5'-GGTAC CTTGTTACGACTT-3',引物合成和PCR扩增产物测序均由上海生工生物工程股份有限公司完成。将细菌的16S rDNA基因序列与GenBank中已知核酸序列进行Blast比对。在NCBI上查找同源序列,使用MEGA 6软件构建系统发育树。

人工回归感染 将分离纯化的病原菌株接种于TSB液体培养基中,28℃培养24 h,以4 000 r/min离心20 min,去除上清液。无菌生理盐水重悬,参照麦氏比浊法调整菌悬液浓度为 2×10^6 CFU/mL。将健康的蝌蚪分为实验组和对照组,每组12尾,3组平行。将实验组蝌蚪在浓度为 2×10^6 CFU/mL的菌液中浸泡20 min,然后转移到无菌的水族箱中饲养。对照组用等量无菌生理盐水浸泡20 min,同样转移到无菌的水族箱中饲养。在整个人工感染养殖期间,水温保持在25~28℃。每天观察记录实验蝌蚪的发病情况、症状以及死亡情况,并对发病和死亡的蝌蚪进行解剖。观察死亡蝌蚪病症并与原始病症进行比对,并再次进行病原菌的分离与纯化。

药物敏感性实验(药敏纸片法) 用无菌生理盐水将分离菌株稀释至 2×10^6 CFU/mL,取100

μL 菌液均匀涂布于 MH 固体培养基表面, 用无菌镊子夹取药敏纸片紧贴在培养基表面, 置于 28 °C 培养 12~16 h, 用游标卡尺测量抑制圈直径, 参照杭州微生物科技有限公司的药敏试验判断标准来判定结果。

2 结果

2.1 患病蝌蚪症状

蝌蚪外表病灶较明显, 肠道内无食物, 有血丝, 无出血现象。颈部、腹部出现点状出血, 腹部膨胀。解剖内脏, 发现均有不同程度的充血现象(图 1)。

2.2 病原菌分离与 16S rDNA 测序结果

从患病蝌蚪体表充血处肌肉、病灶明显的脏器中分离纯化到一株优势菌株 KD-CXB-1, 该菌株菌落呈现淡黄色、圆形、黏稠状、半透明。

经过 16S rDNA 测序, 得到长度为 1 412 bp 的基因序列。将菌株基因序列与 NCBI 基因库中的序列进行比对, 结果显示菌株 KD-CXB-1 与嗜水气单胞菌(XYCY-1 *Aeromonas hydrophila*) 的 16S rDNA 序列(KY905657.1) 的同源性达到 99.93%。同时使用 MEGA 6 软件进行了系统发育树的构建, 结果显示 KD-CXB-1 与嗜水气单胞菌处于同一个进化分支上(图 2)。根据以上结果, 初步鉴定 KD-CXB-1 菌株为嗜水气单胞菌。

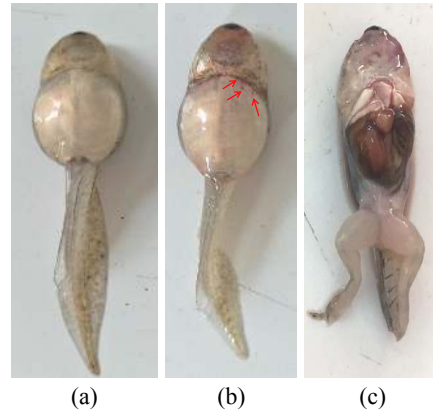


图 1 患病黑斑蛙蝌蚪病变特征

(a) 健康黑斑蛙蝌蚪, (b) 蝌蚪颈部、腹部有出血点、腹部膨大, (c) 蝌蚪腹水, 脏器组织发生病变

Fig. 1 Characteristics of diseased *R. nigromaculata* tadpole

(a) healthy tadpoles, (b) hemorrhagic spots on the neck and abdomen, enlarged abdomen, (c) ascites, organ tissue lesions

2.3 病原菌的理化特性

菌株 KD-CXB-1 是革兰氏阴性菌。扫描电镜下菌株 KD-CXB-1 呈圆杆状, 长度约 1 μm, 细菌表面粗糙(图 3)。菌株能够发酵葡萄糖产气, 发酵甘露醇、果糖和蔗糖等, 不发酵尿素、丙二醇和纤维二糖等, 与 Austin^[13] 等对嗜水气单胞菌实验的结果和《伯杰氏细菌鉴定手册》中嗜水气单胞菌的反应一致。具体生理生化特性见表 1。

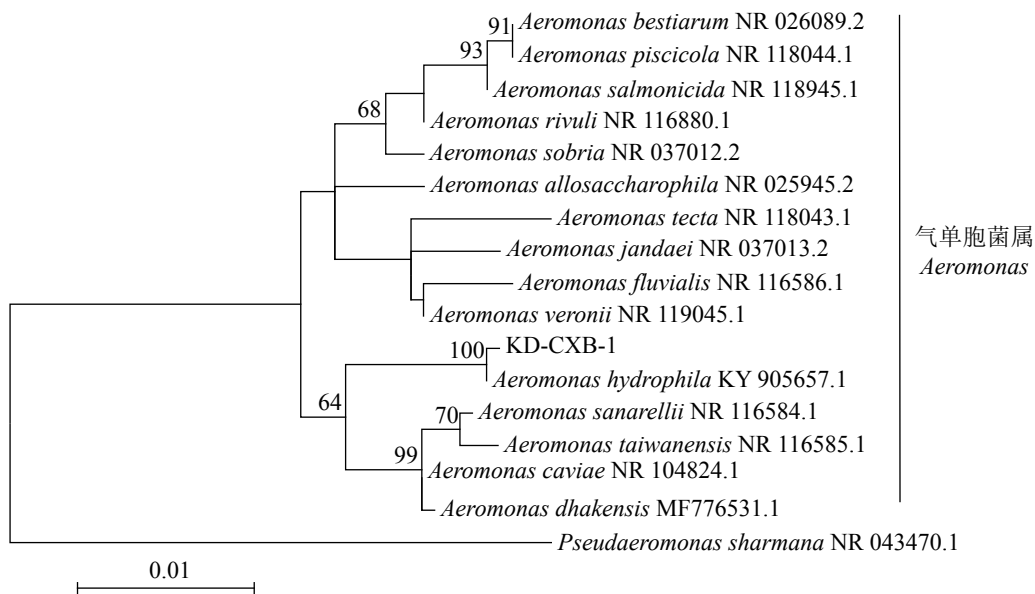


图 2 菌株 KD-CXB-1 的 16S rDNA 序列构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree constructed based on 16S rDNA sequence homology of strain KD-CXB-1

表 1 菌株 KD-CXB-1 与嗜水气单胞菌的生理生化特性的比较

Tab. 1 Comparison of the physiological and biochemical characteristics between KD-CXB-1 strain and *A. hydrophila*

鉴定项目 identification items	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	菌株 KD-CXB-1
吲哚产生实验 indole production	+	+
柠檬酸盐利用实验 citrate utilization	D	-
明胶液化实验 gelatin liquefaction	+	+
尿素分解实验 urea decomposition	-	-
苯丙氨酸脱氨酶实验 phenylalanine ammonia	-	-
甘油品红实验 glycerol magenta	+	+
七叶苷水解实验 esculin hydrolysis	+	+
β -半乳糖苷酶实验 o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside	+	+
赖氨酸脱羧酶实验 lysine decarboxylase	D	-
精氨酸双水解酶实验 arginine double hydrolase	+	+
鸟氨酸脱羧酶实验 ornithine decarboxylase	-	-
硝酸盐还原实验 nitrate reduction	+	+
葡萄糖产气实验 glucose gas production	+	+
氰化钾实验 cyanide test	+	+
棉子糖发酵 raffinose fermentation	-	-
木糖发酵 xylose fermentation	-	-
蔗糖发酵 trehalose fermentation	+	+
乳糖发酵 lactose fermentation	D	-
阿拉伯糖发酵 arabinose fermentation	+	+
蜜二糖发酵 melibiose fermentation	-	-
鼠李糖发酵 rhamnose fermentation	-	-
纤维二糖发酵 cellobiose fermentation	-	-
半乳糖发酵 galactose fermentation	+	+
麦芽糖发酵 maltose fermentation	+	+
甘露糖发酵 mannose fermentation	+	+
丙二醇发酵 propanediol fermentation	-	-
侧金盏花醇发酵 adonitol fermentation	-	-
山梨醇发酵 sorbitol fermentation	-	-
木糖发酵 xylose fermentation	-	-
甘露醇发酵 mannitol fermentation	+	+
卫茅醇发酵 dulcitol fermentation	-	-
肌醇发酵 inositol fermentation	-	-

注：“+”为阳性，“-”为阴性，“D”为可疑

Notes: “+”, positive, “-”, negative, “D”, variable reactions

2.4 人工感染结果

实验组蝌蚪早期 (1~6 d) 观察到的症状为腹部膨大、食欲下降、游动缓慢。中后期 (6~20 d) 症状为腹部、尾部以及头部出现红点, 随着时间推移, 红点逐渐增加并明显。10~12 d, 实验组蝌蚪死亡数急剧增加, 死亡蝌蚪均出现出血病症状, 具体表现为体表出现明显充血现象, 腹部肿大,

解剖内脏可见腹腔内有大量腹水, 重要内脏器官出现红色出血斑; 对照组死亡率为 16.7%, 死亡蝌蚪均未出现出血病症状 (表 2)。结果说明菌株 KD-CXB-1 可引起黑斑蛙蝌蚪出血病并导致其死亡。从实验组死亡蝌蚪体内分离到与菌株 KD-CXB-1 形态特征及生理生化特性一致的菌株。

表 2 人工感染实验结果

Tab. 2 Results of artificial infection by immersion infection

菌株 strain	实验蝌蚪数/尾 no. of samples	不同感染时间的死亡数/尾 no. of deaths of different infection time								死亡总数/尾 total no. of deaths	死亡率/% mortality
		4 d	6 d	8 d	10 d	12 d	14 d	16 d	20 d		
KD-CXB-1	12	0	1	2	4	10	10	10	11	33	91.7
	12	0	1	2	5	12	12	12	12		
	12	0	0	1	3	9	10	10	10		
对照组 control group	12	0	0	1	1	2	2	2	2	6	16.7
	12	0	0	1	2	3	3	3	3		
	12	0	0	0	0	1	1	1	1		

2.5 药敏特性结果

菌株 KD-CXB-1 对 12 种抗生素和 9 种中草药药物敏感性实验结果见表 3, 结果表明分离菌株对新霉素、氟苯尼考、庆大霉素、卡那霉素、

丁胺卡那、链霉素、四环素、多西环素、丁香和苏木高度敏感; 对五倍子、乌梅和黄芩中度敏感; 对阿莫西林、苯唑西林、青霉素、氨苄西林、大黄、黄连、柯子和石榴皮不敏感。

表 3 菌株 KD-CXB-1 药敏实验结果

Tab. 3 Drug susceptibility test of KD-CXB-1 strain

抗生素药物 antibiotic drugs	抑菌圈直径/mm diameter of inhibition zone	敏感性 susceptibility	中草药药物 Chinese herbal drugs	抑菌圈直径/mm diameter of inhibition zone	敏感性 susceptibility
新霉素 neomycin	37.79	S	丁香 <i>Syzygium aromaticum</i>	23.20	S
氟苯尼考 florfenicol	37.31	S	苏木 <i>Caesalpinia sappan</i>	22.40	S
丁胺卡那 amikacin	35.67	S	五倍子 <i>Rhus chinensis</i>	13.00	I
庆大霉素 gentamicin	32.99	S	乌梅 <i>Prunus mume</i>	12.00	I
卡那霉素 kanamycin	30.83	S	黄芩 <i>Scutellaria baicalensis</i>	10.31	I
链霉素 streptomycin	28.61	S	大黄 <i>Rheum officinale</i>	9.50	R
四环素 tetracycline	28.55	S	黄连 <i>Coptis chinensis</i>	8.00	R
多西环素 doxycycline	26.62	S	柯子 <i>Frctus terminaliae</i>	8.00	R
阿莫西林 amoxicillin	6.00	R	石榴皮 <i>Punica granatum</i>	8.00	R
苯唑西林 oxacillin	6.00	R			
青霉素 penicillin	6.00	R			
氨苄西林 ampicillin	6.00	R			

注: S. 高度敏感 ($d > 18$ mm), I. 中度敏感 ($10 \text{ mm} \leq d \leq 18$ mm), R. 耐药 ($0 \text{ mm} \leq d < 10$ mm)

Notes: "S" denoted highly sensitive ($d > 18$ mm); "I" denoted moderately sensitive ($10 \text{ mm} \leq d \leq 18$ mm); "R" denoted low or no sensitivity ($0 \text{ mm} \leq d < 10$ mm)

3 讨论

人工饲养条件下, 因养殖水体环境恶化, 温度改变等原因可促使水体中的条件病原菌引起蛙类疾病。如米尔伊丽莎白菌 (*Elizabethkingia miricola*) 能引起黑斑蛙歪头病; 奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis*) 能引起棘胸蛙烂皮病; 腐败希瓦菌 (*Shewanella putrefaciens*) 能造成棘腹蛙的食欲缺乏从而导致饥饿死亡; 脑膜炎败血伊丽莎白菌 (*E. meningoseptica*) 能引起棘胸蛙白内障, 皮肤溃疡

等病理症状^[14-17]。本实验中, 病原菌嗜水气单胞菌属于弧菌科 (*Vibrionaceae*) 气单胞菌属, 广泛存在于淡水、污水以及土壤等自然环境中, 是一种人-畜-鱼共患病原菌^[18]。该菌是鱼类重要病原菌之一, 据报道, 感染嗜水气单胞菌患病或死亡的水生动物包括草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)^[19-20]、黄鳊 (*Monopterus albus*)^[21]、胡子鲇 (*Clarias fuscus*)^[22]、金鱼 (*Carassius auratus*)^[23]、翘嘴鲌 (*Siniperca chuatsi*)^[24] 等。目前报道关于嗜水气单胞菌感染蛙类造成的疾病有红腿病、腐皮病和腹水病等^[25]。

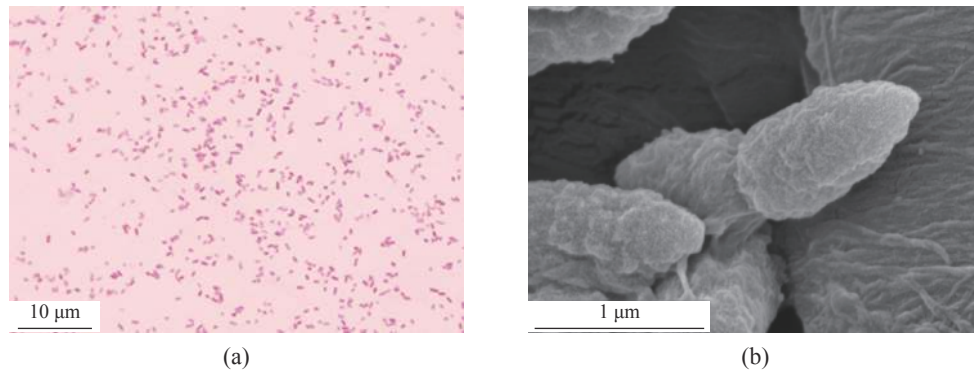


图3 菌株 KD-CXB-1 的形态学特征

(a) 革兰氏染色图片 ($\times 1\ 000$), (b) 扫描电镜图片 ($\times 50\ 000$)

Fig. 3 Morphological characteristics of strain KD-CXB-1

(a) Gram stained image observed by optical microscope ($\times 1\ 000$), (b) image observed by scanning electron microscope ($\times 50\ 000$)

但嗜水气单胞菌感染黑斑蛙蝌蚪时期的细菌性疾病报道较少, 黑斑蛙蝌蚪出血病早期症状为腹部膨大、食欲下降、游动缓慢。中后期蝌蚪死亡数急剧增加且体表出现红色出血点。病原菌人工感染实验中感染出血病的蝌蚪, 死亡高峰期集中在 10~12 d。因此在实际生产活, 可以通过早期有效药物的治疗对黑斑蛙蝌蚪进行防治。

大量研究表明, 在蛙类病害防控中, 抗生素具有较好效果。吴兴镇^[26]研究不同抗生素对黑斑蛙白内障病原菌的敏感性, 其中丁胺卡那、先锋霉素 VI 和复达欣对病原菌脑膜炎败血伊丽莎白菌敏感。王湘等^[27]研究证明氟苯尼考、多西环素和诺氟沙星等抗生素对黑斑蛙“白内障”病原菌高度敏感。然而, 抗生素药物的不规范使用、过度使用和滥用可导致病原菌耐药性增加, 且不同的菌种之间的抗药现象也存在差异^[28-29]。因此在发现蝌蚪出现疾病时, 杜绝盲目、滥用药物, 以防引起病原菌的耐药性。本研究通过药物敏感实验筛选有效的抗菌药物, 在 8 种高敏感药物中, 氟苯尼考和新霉素常被用于水产养殖领域。但范晶晶等^[30]研究发现氟苯尼考对嗜水气单胞菌有明显的抗菌后效应, 这说明在实际用药过程中应考虑增加单次给药量、联合用药等方法来延长药物的抗菌后效应, 以此减少给药次数提高药效, 增加经济效应。近年来, 多种中草药被用于水生动物的疾病防控^[31-32]。中草药具有无毒、调节生物机体的免疫功能 and 不易导致细菌耐药等优点, 本实验分离的嗜水气单胞菌对丁香和苏木高度敏感, 对五倍子和乌梅等中度敏感。因此, 在黑斑蛙蝌蚪实际养殖过程中, 建议可选择中草药与抗生素联合使用的策略对黑斑蛙蝌蚪出血病进行防治。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Julian J T, Gould V A, Glenney G W, *et al.* Seasonal infection rates of *Batrachochytrium dendrobatidis* in populations of northern green frog *Lithobates clamitans melanota* tadpoles[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2016, 121(2): 97-104.
- [2] Aguirre-Becerra H, García-Trejo J F, Peña-Herrejón G A, *et al.* Effect of two levels of temperature and natural and artificial photoperiod on growth and metamorphosis of bullfrog tadpoles in an intensive rearing system[J]. *North American Journal of Aquaculture*, 2018, 80(4): 388-396.
- [3] 陈雯, 俞宝根, 郑荣泉, 等. 温度对棘胸蛙胚胎发育及蝌蚪表型特征的影响[J]. *贵州农业科学*, 2010, 38(1): 108-110.
Chen W, Yu B G, Zheng R Q, *et al.* Effect of temperature on development of embryo and phenotypic characteristics of tadpoles of *Paa spinosa*[J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2010, 38(1): 108-110 (in Chinese).
- [4] 崔明勋, 刘学龙, 崔香梅, 等. 温度、食物、饲养密度对中国林蛙蝌蚪期生长发育及变态的影响[J]. *延边大学农学学报*, 1999, 21(2): 90-94.
Cui M X, Liu X L, Cui X M, *et al.* Effect of temperature, food, feeding density on *Rana chensinensis* development and metamorphosis at tadpole[J]. *Journal of Agricultural Science Yanbian University*, 1999, 21(2): 90-94 (in Chinese).
- [5] 王立志, 李晓晨, 孙涛. 中国林蛙蝌蚪和大蟾蜍蝌蚪的

- 最适温度、逃避温度及致死温度[J]. *动物学杂志*, 2005, 40(2): 23-27.
- Wang L Z, Li X C, Sun T. Preferred temperature, avoidance temperature and lethal temperature of tadpoles of the common giant toad (*Bufo gargarizans*) and the Chinese forest frog (*Rana chensinensis*)[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2005, 40(2): 23-27 (in Chinese).
- [6] Green F B, Salice C J. Increased temperature and lower resource quality exacerbate chloride toxicity to larval *Lithobates sylvaticus* (wood frog)[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 266(1): 115188.
- [7] 孙胜男, 张治斌, 王倩, 等. 阿特拉津和毒死蜱对东北林蛙的急性毒性研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2017(5): 205-208.
- Sun S N, Zhang Z B, Wang Q, *et al.* The study of acute toxicity of atrazine and chlorpyrifos to *Rana dybowskii*[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2017(5): 205-208 (in Chinese).
- [8] 苏红巧, 张银凤, 秦占芬, 等. 黑斑蛙与非洲爪蟾蝌蚪急性毒性试验方法敏感性的比较[J]. *生态毒理学报*, 2013, 8(5): 785-790.
- Su H Q, Zhang Y F, Qi Z F, *et al.* Comparison of the sensitivity of *Rana nigromaculata* with *Xenopus laevis* in tadpole acute toxicity test[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2013, 8(5): 785-790 (in Chinese).
- [9] 王会聪, 袁九龙, 王煜恒, 等. 棘胸蛙蝌蚪“腹水病”病原菌分离与鉴定[J]. *水产科学*, 2019, 38(2): 271-275.
- Wang H C, Yuan J L, Wang Y H, *et al.* Isolation and identification of pathogen in tadpoles with ascites in frog *Rana spinosa*[J]. *Fisheries Science*, 2019, 38(2): 271-275 (in Chinese).
- [10] Borteiro C, Cruz J C, Kolenc F, *et al.* Chytridiomycosis in frogs from Uruguay[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2009, 84(2): 159-162.
- [11] Nieto N C, Camann M A, Foley J E, *et al.* Disease associated with integumentary and cloacal parasites in tadpoles of northern red-legged frog *Rana aurora aurora*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2007, 78(1): 61-71.
- [12] Mourião J L P, Martins M L, Yamashita M M, *et al.* Isolation of *Aeromonas hydrophila* in bullfrog tadpoles in the transformation stage[J]. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 2006, 41(8): 1325-1327.
- [13] Austin B, Austin D A. Methods for the microbiological examination of fish and shellfish[M]. Chichester, UK: Ellis Horwood Ltd, 1989.
- [14] 胡瑞雪. 蛙源伊丽莎白菌的鉴定、分子流行病学及其碳青霉烯酶多样性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.
- Hu R X. Identification, molecular epidemiology and diversity of carbapenemases in *Elizabethkingia* sp. from frog[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [15] 雷雪平, 耿毅, 余泽辉, 等. 棘胸蛙脑膜炎败血伊丽莎白菌的分离鉴定及其感染的病理损伤[J]. *浙江农业学报*, 2018, 30(3): 371-377.
- Lei X P, Geng Y, Yu Z H, *et al.* Isolation and identification of *Elizabethkingia meningoseptica* from Chinese spiny frog (*Quasipaa spinosa*) and pathological lesions of its infection[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2018, 30(3): 371-377 (in Chinese).
- [16] 樊汶樵, 周莉, 廖冰洁, 等. 感染棘腹蛙的腐败希瓦菌的分离与鉴定[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2015(8): 166-168.
- Fan W Q, Zhou L, Liao B J, *et al.* Isolation and identification of *Shewanella putrefaciens* infecting *Quasipaa spinosa*[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2015(8): 166-168 (in Chinese).
- [17] 王瑞君, 熊筱娟. 棘胸蛙烂皮病奇异变形杆菌的分离、鉴定及对药物敏感性研究[J]. *淡水渔业*, 2012, 42(4): 31-34.
- Wang R J, Xiong X J. Isolation, identification and drug sensitivity tests of *Proteus mirabilis* from rotten-skin disease of *Rana spinosa*[J]. *Freshwater Fisheries*, 2012, 42(4): 31-34 (in Chinese).
- [18] Gold W L, Salit I E. *Aeromonas hydrophila* infections of skin and soft tissue: report of 11 cases and review[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 1993, 16(1): 69-74.
- [19] 王艺, 刘文珍, 傅松哲, 等. 一株从草鱼中分离的嗜水气单胞菌的病原学及基因组特征[J]. *水产学报*, 2019, 43(4): 1181-1191.
- Wang Y, Liu W Z, Fu S Z, *et al.* Etiology and genomic characteristics of an *Aeromonas hydrophila* strain isolated from *Ctenopharyngodon idella*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(4): 1181-1191 (in Chinese).
- [20] 李楠, 郭慧芝, 焦冉, 等. 草鱼的一种急性细菌性传染病病原的分离鉴定及致病性研究[J]. *水生生物学报*, 2011, 35(6): 980-987.
- Li N, Guo H Z, Jiao R, *et al.* Identification and patho-

- genicity of bacterial pathogens isolated in an outbreak on bacterial disease of *Ctenopharyngodon idellus*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(6): 980-987 (in Chinese).
- [21] 彭彬, 杨光友, 陈晓利, 等. 黄鳝出血病病原菌的分离与鉴定[J]. *淡水渔业*, 2011, 41(3): 72-76.
Peng B, Yang G Y, Chen X L, *et al.* Isolation and identification on pathogenic bacteria of hemorrhagic septicemia disease in rice field eels (*Monopterus albus*)[J]. *Freshwater Fisheries*, 2011, 41(3): 72-76 (in Chinese).
- [22] 龙苏, 韩书煜, 牛志伟, 等. 胡子鲶致病性气单胞菌的分离鉴定及其致病力与毒力基因型相关性[J]. *水产学报*, 2016, 40(3): 308-317.
Long S, Han S Y, Niu Z W, *et al.* Isolation and identification of pathogenic *Aeromonas* in *Clarias fuscus* and analysis of the correlation between its pathogenicity and virulence genotypes[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(3): 308-317 (in Chinese).
- [23] Rahman M H, Suzuki S, Kawai K. The effect of temperature on *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish, *Carassius auratus*[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2001, 17(6): 282-285.
- [24] 张悦, 高晓建, 叶金明, 等. 翘嘴鳊病原嗜水气单胞菌分子特征及LAMP检测方法的建立[J]. *水生生物学报*, 2017, 41(6): 1225-1231.
Zhang Y, Gao X J, Ye J M, *et al.* Molecular characterization and establishment of LAMP detection method of pathogenic *Aeromonas hydrophila* isolated from *Siniperca chuatsi*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(6): 1225-1231 (in Chinese).
- [25] 钟为铭, 陈康勇, 彭芳, 等. 中国蛙类疾病病原学研究进展[J]. *水产学杂志*, 2018, 31(3): 55-60.
Zhong W M, Chen K Y, Peng F, *et al.* Research advances on etiology in frog diseases in China[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2018, 31(3): 55-60 (in Chinese).
- [26] 吴兴镇. 黑斑蛙白内障病原菌的分离鉴定及体外抑菌作用研究 [D]. 西南大学, 2016.
Wu X Z. Isolation and identification of the pathogeny from cataract diseased *Rana nigromaculata* and the research of prophylaxis and treatment[D]. Southwest University, 2016 (in Chinese).
- [27] 王湘, 侯强红, 舒鸣, 等. 黑斑蛙“白内障”病原菌分离及药敏试验[J]. *畜禽业*, 2019, 30(12): 13,16.
Wang X, Hou Q H, Shu M, *et al.* Isolation and drug sensitivity testing of the "cataract" pathogenic bacterium in the *Rana nigromaculata*[J]. *Livestock and Poultry Industry*, 2019, 30(12): 13,16 (in Chinese).
- [28] 蔡丽娟, 许宝青, 林启存. 水产致病性嗜水气单胞菌耐药性比较与分析[J]. *水产科学*, 2011, 30(1): 42-45.
Cai L J, Xu B Q, Lin Q C. Comparison and analysis of drug resistance to moribund bacterium *Aeromonas hydrophila* isolated from aquatic animals[J]. *Fisheries Science*, 2011, 30(1): 42-45 (in Chinese).
- [29] 丁诗华, 王一丁, 彭远义, 等. 鱼用嗜水气单胞菌口服疫苗的免疫保护效应[J]. *西南农业大学学报(自然科学版)*, 2005, 27(6): 888-891,917.
Ding S H, Wang Y D, Peng Y Y, *et al.* Immunogenicity and protective effects of an oral vaccine microparticle against *Aeromonas hydrophila* in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Journal of Southwest Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2005, 27(6): 888-891,917 (in Chinese).
- [30] 范晶晶, 单奇, 杨元昊, 等. 5种抗菌药物对嗜水气单胞菌的体外抗菌后效应研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2018, 40(1): 14-18.
Fan J J, Shan Q, Yang Y H, *et al.* Postantibiotic effects of 5 kinds of antibiotics on *Aeromonas hydrophila*[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2018, 40(1): 14-18 (in Chinese).
- [31] 陈霞, 张其中, 李春涛. 47种中草药体外抑杀嗜水气单胞菌的药效研究[J]. *水产科学*, 2012, 31(7): 387-391.
Chen X, Zhang Q Z, Li C T. Antibacterial effect of 47 Chinese herbal medicines on bacterium *Aeromonas hydrophila in vitro*[J]. *Fisheries Science*, 2012, 31(7): 387-391 (in Chinese).
- [32] 肖辉, 苏振霞, 单娟娟, 等. 16种中草药提取物对嗜水气单胞菌的体外抑菌实验[J]. *水生态学杂志*, 2009, 2(3): 53-56.
Xiao H, Su Z X, Shan J J, *et al.* Experimental research on anti-bacterial effect of 16 kinds of Chinese herbal medicine on *Aeromonas hydrophila in vitro*[J]. *Journal of Hydroecology*, 2009, 2(3): 53-56 (in Chinese).

Isolation, identification and drug sensitivity of the pathogen causing hemorrhagic disease of *Rana nigromaculata* tadpole

ZHONG Weiming^{1,2}, PENG Fang¹, CHEN Kangyong³, ZHAO Tianyu⁴,
ZOU Jun^{1,3}, GAO Zhipeng^{1,2*}

(1. College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2. Hunan Engineering Technology Research Center of Featured Aquatic Resources Utilization, Changsha 410128;

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

4. College of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: To identify the pathogen causing hemorrhagic disease of *Rana nigromaculata* tadpoles and screen out sensitive drugs to control the disease, in this study, a strain KD-CXB-1 was isolated from diseased tadpoles, and healthy tadpoles showed hemorrhagic symptoms similar to those of naturally infected ones after being artificially infected with strain KD-CXB-1. Meanwhile, a dominant strain consistent with the morphological, physiological and biochemical characteristics of strain KD-CXB-1 was isolated from the dead tadpoles artificially infected. These results indicated that strain KD-CXB-1 was the pathogen causing hemorrhagic disease of *R. nigromaculata* tadpoles. Moreover, based on strain KD-CXB-1, several experiments were performed including morphological observation, gram staining, physiological and biochemical tests, 16S rDNA gene sequencing, construction of phylogenetic trees, and drug susceptibility. The morphological observation showed that the KD-CXB-1 was a rod-shaped Gram-negative bacterium with the length of about 1 μm and rough surface. Strain KD-CXB-1 was identified as *Aeromonas hydrophila* by 16S rDNA sequencing and physiological and biochemical tests. Drug susceptibility tests indicated that strain KD-CXB-1 was highly sensitive to 10 drugs such as florfenicol, *Syzygium aromaticum* and *Caesalpinia sappan*; moderately sensitive to *Prunus mume*, *Rhus chinensis* and *Scutellaria baicalensis*, and insensitive to 8 drugs such as amoxicillin, *Rheum palmatum* and penicillin. In conclusion, our study proved that *A. hydrophila* was the pathogen causing hemorrhagic disease of *R. nigromaculata* tadpoles, and the highly sensitive drugs screened out by drug susceptibility tests may provide theoretical reference and practical basis for the effective control of hemorrhagic disease of *R. nigromaculata* tadpoles.

Key words: *Rana nigromaculata*; tadpole; *Aeromonas hydrophila*; pathogen identification; drug sensitivity

Corresponding author: GAO Zhipeng. E-mail: gaozhipeng627@163.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (32073020); Key Projects of Hunan Education Department (20A238); National Innovation Program for College Students (s202010537005)