

研究报告



一株牛蛙源金黄杆菌的分离鉴定及其致病特性

卜令飞 王鑫毅 金珊* 赵青松 陈寅儿

宁波大学海洋学院 浙江 宁波 315211

摘要:【背景】美国牛蛙养殖过程中病害问题非常突出,尤其是细菌性病害,其病原种类多、病原菌复杂多样、蔓延速度快、发病死亡率高,一直是牛蛙养殖过程中防控的难点。【目的】确定从患病牛蛙体内分离到的一株细菌 NW1203 的分类地位和致病性。【方法】无菌操作从牛蛙体内取样划线分离细菌,通过形态观察、生理生化试验、16S rRNA 基因序列比对进行种属鉴定,通过人工感染、溶血性试验和病理切片观察分析其致病特性。【结果】经形态和生理生化鉴定及 16S rRNA 基因序列比对,菌株 NW1203 为金黄杆菌属细菌,与 *Chryseobacterium* sp. F30 的相似性达 100%,进化树也显示该菌与金黄杆菌属细菌聚类;溶血性试验表明,菌株 NW1203 对绵羊、小鼠和牛蛙的血细胞都呈完全溶血;人工感染试验及感染病蛙的组织切片观察显示,菌株 NW1203 对牛蛙具有较强致病性,可引起牛蛙肝、肾、脾等主要组织严重病变,LD₅₀ 为 4.753×10³ CFU/g。【结论】明确了菌株 NW1203 为牛蛙新病原,为牛蛙疾病的防控提供了理论依据。

关键词: 牛蛙, 金黄杆菌, 致病性, 组织病理变化

Isolation, identification and pathogenic characteristics of *Chryseobacterium* sp. from *Rana catesbiana*

BU Ling-Fei WANG Xin-Yi JIN Shan* ZHAO Qing-Song CHEN Yin-er

School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang 315211, China

Abstract: [Background] Diseases, especially bacterial diseases have been a big challenge in American bullfrog (*Rana catesbiana*) farming. Due to a high diversity of these pathogens, rapid spread of the disease as well as high mortality rate, the bacterial disease in the bullfrog is difficult to prevention and control. [Objective] In order to study the taxonomic status and pathogenicity, one bacterial strain NW1203 was isolated and identified from diseased *R. catesbiana*. [Methods] The strain NW1203 was isolated from *R. catesbiana* by streaking plate method under aseptic conditions, followed by morphological observation, physiological, biochemical tests and 16S rRNA gene phylogenetic analyses to identify bacterial species. To investigate the pathogenicity of these bacteria, artificial infection followed by hemolytic test and histopathological examination were performed. [Results] Based on the characterization of physiological,

Foundation items: Marine Special Funding for Public Welfare Industry Project (201105007); Ningbo University Aquaculture in Zhejiang Province Priority Level 1 Subject Open Fund (xkzsc1503)

*Corresponding author: E-mail: jinshan@nbu.edu.cn

Received: 05-08-2018; **Accepted:** 08-11-2018; **Published online:** 13-11-2018

基金项目: 海洋公益性行业专项经费资助项目(201105007); 宁波大学水产浙江省重中之重一级学科开放基金(xkzsc1503)

*通信作者: E-mail: jinshan@nbu.edu.cn

收稿日期: 2018-08-05; **接受日期:** 2018-11-08; **网络首发日期:** 2018-11-13

biochemical examination and 16S rRNA gene sequence alignment, the isolated bacteria NW1203 was identified as *Chryseobacterium* sp. with 100% sequences similarities to *Chryseobacterium* sp. F30. Furthermore, phylogenetic trees showed bacteria NW1203 was grouped with *Chryseobacterium* sp. Hemolytic tests showed the strain NW1203 exhibited strongly hemolytic to the erythrocyte of sheep, mice and bullfrog. Artificial infection test and tissue section observation of infected frogs indicated the strain NW1203 had strongly pathogenic to *R. catesbiana* with LD₅₀ values of 4.753×10^3 CFU/g and could cause severe pathological changes in main tissues including liver, kidney and spleen. **[Conclusion]** This study indicates that the bacteria strain NW1203 was a new pathogen causing bacterial disease of *R. catesbiana* and provides a theoretical basis for the prevention and control of bullfrog diseases.

Keywords: *Rana catesbiana*, *Chryseobacterium* sp., Pathogenicity, Histopathologic changes

牛蛙(*Rana catesbiana*)是一种大型食用蛙类,因其鸣叫声宏亮酷似牛而得名。由于牛蛙味道鲜美,具备高蛋白、低脂肪、低胆固醇的特点,且牛蛙的皮、油、激素、腺体和胆汁等都具有应用价值,可作为工业、养殖业、医药业等多种行业重要的原材料。因此,牛蛙深受许多消费者的青睐,是我国水产养殖主要经济动物之一,年产已超过 10 万 t^[1]。然而在牛蛙的养殖过程中,病害问题非常突出,严重阻碍着这一产业的发展^[1-2]。目前已报道的牛蛙病害主要有虹彩病毒病^[3]、霉菌病^[4],由车轮虫(*Trichodina*)、舌杯虫(*Apiosoma*)、斜管虫(*Chilodonella*)、锚头蚤(*Lernaea*)等引起的寄生虫病^[4],以及由假单胞菌(*Pseudomonadaceae*)、气单胞菌(*Aeromonas*)、爱德华氏菌(*Edwardsiella*)、链球菌(*Streptococcus*)、葡萄球菌(*Staphylococcus*)、变形菌(*Proteus*)、不动杆菌(*Acinetobacter*)、伊丽莎白菌(*Elizabethkingia*)、耶尔森氏菌(*Yersinia*)等引起的细菌性疾病^[2,5-10]。而细菌性病害由于病原种类多、病因复杂多样、蔓延速度快、发病死亡率高等特点,对牛蛙养殖产业危害最大,一直是牛蛙养殖过程中防控的重点^[5]。

2015 年 12 月作者从浙江台州某养殖场一批患严重体表溃烂症的牛蛙体内分离到了一株细菌 NW1203,为了确定该菌的分类地位及其致病性,对其进行了种属鉴定、溶血性试验、人工感染试验及组织病理学分析,以期对牛蛙细菌性疾病的防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验蛙来源

病蛙取自台州某牛蛙养殖场,体重 200–300 g;健康牛蛙购自宁波水产市场,体重 250–300 g,活力良好,体表没有损伤,经检验确认无病。

1.2 主要试剂和仪器

胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)培养基、细菌微量生化反应管、Bouin 氏液、革兰氏染液、药敏纸片等,杭州微生物试剂有限公司;API 20E 细菌鉴定试剂盒, Bio Mérieux 公司;细菌基因组 DNA 小量制备试剂盒, Axygen 生物技术(杭州)有限公司;细菌通用引物 27F 和 1492R, 上海华大基因科技有限公司;2×Taq MasterMix (Dye), 康为世纪生物科技有限公司。

PCR 仪, 杭州朗基科学仪器有限公司;透射电镜, HITACHI 公司;凝胶成像仪, Bio-Rad 公司。

1.3 采样及细菌分离

取患病牛蛙,先用自来水冲洗,无菌纱布擦干,再用 75%酒精棉球擦拭体表后,解剖取牛蛙脑、肝、脾、肾、心脏、肌肉、腹水及体表溃烂处组织,划线接种于 TSA 平板上,28 °C 培养 48 h。挑选形态特征相似的黄色菌落再次划线分离,获得一株纯培养细菌 NW1203,转接 TSA 斜面保存,备用。

1.4 菌株 NW1203 的溶血活性测定

溶血活性测定采用绵羊、小鼠和牛蛙等 3 种动物的脱脂血制成血琼脂平板, pH 7.5, 方法参考刘晓琳等^[9]。

1.5 菌株 NW1203 的人工感染试验

NW1203 菌接种 TSA 斜面于 28 °C 培养 20 h, 对比麦氏浊度管, 用生理盐水制成菌悬液, 浓度分别约为 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 CFU/mL, 采用平板活菌计数法确定细菌数量。试验在 180 cm×100 cm×70 cm 的塑料桶中进行, 共设 10 组, 腹腔注射 6 组, 其中 5 个感染组和 1 个对照组; 创伤浸泡组 2 组, 感染组和对照组各 1 组; 无创伤浸泡组 2 组, 感染组和对照组各 1 组。每组健康牛蛙 20 只, 腹腔注射组每只牛蛙注射 0.3 mL, 对照组注射同量无菌生理盐水; 创伤浸泡组是用无菌小刀轻划伤皮肤, 剪去部分趾蹼, 然后把经创伤处理的蛙放入装有 50 L 约 10^4 CFU/mL 菌液的 100 cm×50 cm×50 cm 的玻璃缸中, 浸泡 30 min 后移入试验塑料桶中暂养; 无创伤浸泡组不制造创伤, 其它处理方法同创伤浸泡组; 创伤对照组和无创伤对照组均不浸泡菌液, 其它处理方法同试验组^[5]。试验过程中发现濒死蛙立即取出解剖, 观察症状, 并对组织进行细菌分离, 另取肝、脾、肾等组织, Bouin 氏液固定用于制作病理切片。致病菌 LD₅₀ 采用改良寇氏法计算^[11]。

1.6 病理组织切片制备及观察

分别取人工感染发病牛蛙和健康牛蛙的肾、肝、脾等组织, Bouin 氏液固定后, 石蜡包埋切片, HE 染色, 显微镜下观察并拍照。

1.7 菌株 NW1203 的形态观察及生理生化鉴定

NW1203 菌活化后, 转接 TSA 平板, 28 °C 恒温培养 20 h 后进行革兰氏染色及电镜样品制作, 电镜样品制作参考王鑫毅等方法^[12], 电镜观察菌体形态; TSA 平板 28 °C 培养 24 h 和 48 h 做菌落形态观察; 生理生化试验采用 API 20E 细菌鉴定试剂盒并参考赵乃昕等^[13]、Hugo 等^[14]方法进行。

1.8 菌株 NW1203 的分子鉴定

用 DNA 小量制备试剂盒制备菌株 NW1203 的基因组 DNA, 用细菌通用引物 27f (5'-AGAGTTT

GATCCTGGCTCAG-3')和 1492r (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3')对菌株 NW1203 基因组 DNA 进行 16S rRNA 基因序列的扩增。PCR 反应体系(50 μL): 2×Taq MasterMix (Dye) 24 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 2 μL, 模板 2 μL, ddH₂O 20 μL; PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 6 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后, PCR 产物送上海华大基因科技有限公司完成测序。将所获得的 16S rRNA 基因序列上传至 NCBI 数据库进行 BLAST 序列比对, 采用 Primer 5.0 对获得的序列进行整理, 利用 MEGA 6.06 软件, 采用邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 菌株 NW1203 的分离及致病性试验

对自然患病牛蛙进行细菌分离, 获得一株黄色菌落的纯培养细菌 NW1203。溶血性试验结果显示, 菌株 NW1203 对绵羊、小鼠和牛蛙的血细胞都呈完全溶血。采用 NW1203 菌对牛蛙进行人工感染, 感染初期牛蛙精神不振, 行动迟缓或不动, 食欲下降, 随后体表创伤处逐渐溃烂, 特别是关节处和趾蹼溃烂严重, 有的部位可烂穿露出白骨(图 1A、B)。解剖发现患病严重的牛蛙肝脏肿大, 组织色泽不均匀, 有花斑(图 1C); 胆囊略有肿胀, 胆汁浓稠; 有的肾、脾略肿、暗红色; 腹腔有少量淡黄色黏液。人工感染试验结果见表 1, 用改良寇氏法计算得到菌株 NW1203 对牛蛙的 LD₅₀ 为 4.753×10^3 CFU/g。对腹腔注射和创伤浸泡感染发病濒死牛蛙的肝、肾等组织进行细菌重分离, 可分离到与 NW1203 菌株形态特征完全一致的菌株, 未分离到其它病原。说明 NW1203 菌株确为牛蛙的致病菌, 对牛蛙具有较强致病性^[15], 推测 NW1203 菌主要是通过体表伤口感染导致牛蛙死亡。

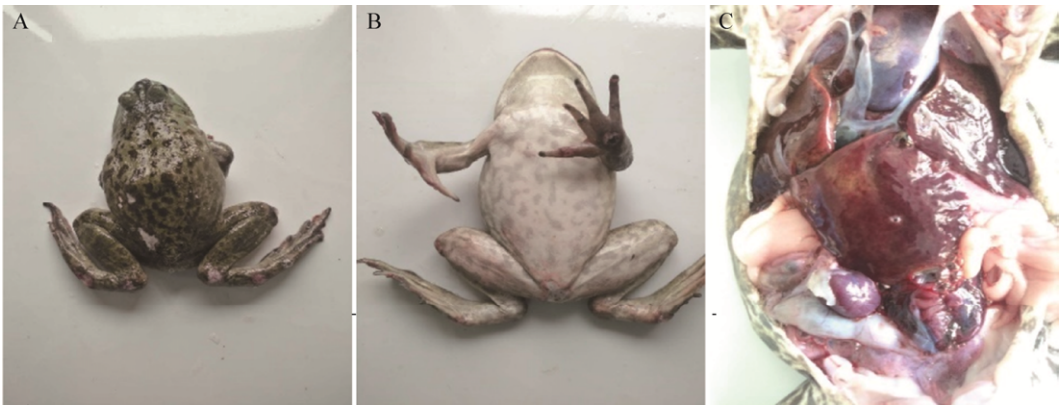


图 1 牛蛙人工感染菌株 NW1203 后的主要病症
Figure 1 Main symptom of *R. catesbiana* after artificial infection of bacteria strain NW1203

注：A：牛蛙背部和后肢皮肤脱落、溃烂；B：牛蛙手、腹部和后肢关节溃烂严重；C：肝肿大，有色斑。
Note: A: The skin of the back and hind limbs of the *R. catesbiana* falls off and fester; B: Forelimb, abdomen and hind limb joints of *R. catesbiana* are severely ulcerated; C: Hepatomegaly, with spots.

表 1 牛蛙人工感染试验结果
Table 1 Artificial infection test of *R. catesbiana*

感染方式 Infection mode	菌液浓度 Number of bacteria (CFU/mL)	剂量 Dose (mL)	试验数(尾) Number of test	死亡数(尾) Death number								死亡率 Mortality rate (%)
				1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	
腹腔注射	4.36×10^8	0.3	20	1	2	4	3	1	5	3	1	100
Intraperitoneal injection	4.36×10^7	0.3	20	0	2	1	4	1	3	2	3	80
	4.36×10^6	0.3	20	0	0	1	2	1	1	2	3	50
	4.36×10^5	0.3	20	0	1	0	0	0	2	0	1	20
	4.36×10^4	0.3	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Saline solution	0.3	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
创伤浸泡	4.36×10^4	5.0×10^4	20	1	0	1	2	3	1	4	2	70
Wound soak	Water		20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
无创伤浸泡	4.36×10^4	5.0×10^4	20	0	0	1	0	0	0	1	0	10
Non-wound soak	Water		20	0	0	0	0	0	0	0	0	0

2.2 病蛙主要组织病理变化

感染 NW1203 菌后，病蛙肝、肾、脾等主要组织病变明显，主要病理变化见图 2，其它组织没有明显变化。

肝：正常蛙肝细胞排列紧密，呈不规则型，细胞界限和细胞核清晰(图 2A)；病蛙肝肿大，细胞排列疏松、结构模糊，细胞大量坏死，出现空泡化(图 2B)，部分组织充血严重(图 2C)。

肾：正常蛙肾小管管腔规则，肾小管上皮细胞排列整齐、界限清晰，管腔中刷状缘明显，肾小球

层次清晰，细胞排列紧密，细胞核完整，血窦色泽鲜红(图 2D)；病蛙肾小管上皮细胞肿胀，颗粒变性明显，管腔呈现不规则或闭合，刷状缘紊乱，纤毛减少或消失(图 2E)，肾小球坏死，血窦褪色(图 2F)。

脾：正常蛙脾组织由结缔组织网、毛细血管网及间于其中的细胞群所组成，红细胞群和白细胞群镶嵌存在，细胞核完整，淋巴细胞分布其中，巨噬细胞明显(图 2G)；病蛙脾组织充血严重(图 2H)，部分脾组织细胞坏死、空泡化，红细胞崩解形成血铁症，淋巴细胞坏死、数量减少，巨噬细胞增多(图 2I)。

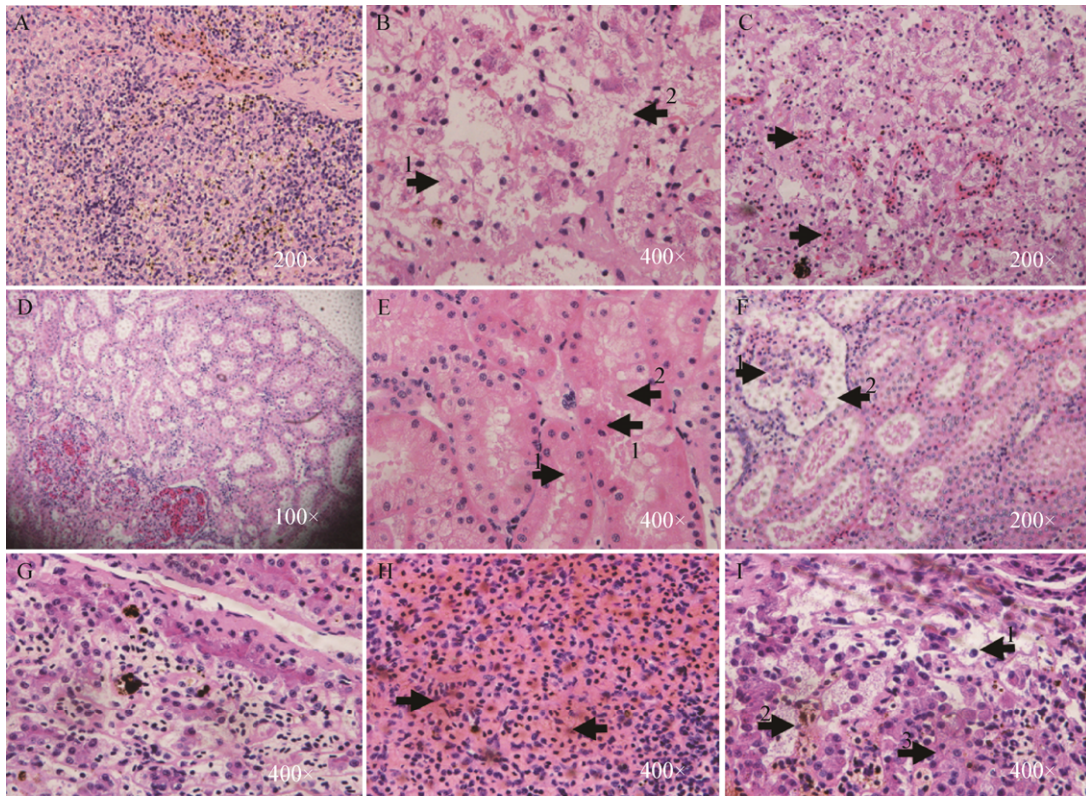


图2 患病牛蛙肝、肾、脾组织的病理变化

Figure 2 Histopathological changes of liver, kidney, and spleen of diseased *R. catesbiana*

注: A: 正常肝组织; B: 肝细胞坏死、核溶解(箭头 1), 组织空泡化(箭头 2); C: 肝组织充血(箭头); D: 正常肾组织; E: 肾小管上皮细胞增大变形, 红色颗粒增多(箭头 1), 肾小管管腔变窄(箭头 2); F: 肾小球萎缩(箭头 1), 肾小囊腔扩大(箭头 2); G: 正常脾组织; H: 脾组织严重充血(箭头); I: 脾组织细胞坏死、空泡化(箭头 1), 含铁血黄素沉积(箭头 2), 巨噬细胞增多(箭头 3).

Notes: A: Normal liver tissue; B: Hepatocyte necrosis, nuclear lysis (arrow 1), obvious empty bubble (arrow 2); C: Congestion of liver tissue (arrow); D: Normal kidney tissue; E: Swelling, deformation, red particles increase in epithelial cell of renal tubular (arrow 1), renal tubular cavity narrow (arrow 2); F: Glomerular atrophy (arrow 1), enlargement of renal capsule (arrow 2); G: Normal spleen tissue; H: Severe congestion of spleen tissue (arrow); I: Spleen cell necrosis and empty bubble (arrow 1), deposition of hemosiderin (arrow 2), macrophage increase (arrow 3).

2.3 菌株 NW1203 的鉴定

2.3.1 形态特征

菌株 NW1203 在 TSA 平板上 28 °C 培养 20 h 做革兰氏染色及电镜观察(图 3)。结果显示: NW1203 菌为革兰氏阴性杆菌, 菌体的大小约为 $(0.5-0.8) \mu\text{m} \times (1.5-2.2) \mu\text{m}$, 两侧边平行, 两端呈钝圆状, 大多单独存在, 无鞭毛, 不能运动, 无荚膜和芽孢。在 TSA 平板上培养 48 h, 菌落圆形, 直径约 2 mm-3 mm, 呈黄色、半透明, 表面光滑, 中间隆起, 边缘整齐。

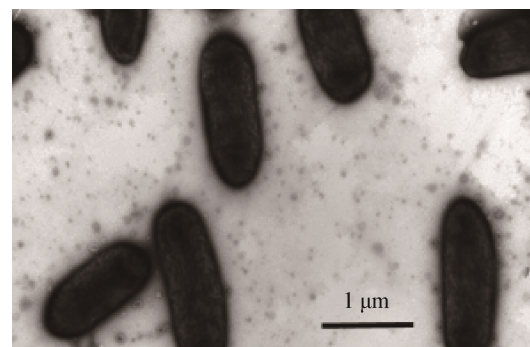


图3 NW1203 菌的电镜照片

Figure 3 Scanning electron micrographs of bacteria strain NW1203

2.3.2 生理生化特性

对菌株 NW1203 进行生理生化试验,具体结果见表 2^[14,16-19]。该菌分泌黄色素,可在麦康凯琼脂上生长,氧化酶、接触酶、明胶酶、DNA 酶阳性,能水

解七叶苷,可利用葡萄糖、麦芽糖等产酸,不发酵蔗糖、乳糖等。以上试验结果与赵乃昕等^[13]对金黄杆菌属细菌的主要特征描述完全符合,因此,推测菌株 NW1203 为金黄杆菌属细菌(*Chryseobacterium* sp.)。

表 2 菌株 NW1203 及其近似种的表型特征比较

Table 2 Comparison of phenotypic characteristics of bacteria strain NW1203 and its close species

项目 Items	菌株 Strains					
	1	2	3	4	5	6
黄色素 Yellow pigment	+	+	+	+	+	+
5 °C 生长 Grow at 5 °C	+	+	+	+	—	V
30 °C 生长 Grow at 30 °C	+	+	+	+	+	+
37 °C 生长 Grow at 37 °C	—	+	—	—	+	+
42 °C 生长 Grow at 42 °C	—	—	—	—	—	—
麦康凯琼脂 McConkay agar	+	+	+	+	—	+
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	—	—	—	NA	—	—
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	—	+	—	NA	—	—
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	—	—	—	NA	—	—
接触酶 Catalase	+	+	+	+	+	+
氧化酶 Oxidase	+	+	+	+	+	+
DNA 酶 Dnase	+	+	+	—	+	+
卵磷脂酶 Lecithinase	+	+	+	NA	+	+
脲酶 Urease	—	—	V	—	—	—
明胶酶 Gelatinase	+	+	+	+	+	+
β-半乳糖苷酶 ONPG	—	+	NA	NA	—	—
淀粉酶 Amylase	+	+	+	+	+	—
硝酸盐还原 Nitrate reduction	—	+	—	—	—	—
柠檬酸盐 Citrate	+	+	+	—	V	—
吐温 80 Tween-80	+	NA	+	+	V	+
酪氨酸 Tyrosine	+	+	+	+	+	+
七叶苷 Aesculin	+	+	+	+	V	+
水杨苷 Salicin	—	NA	—	—	—	—
吲哚 Indole	+	+	+	—	NA	NA
H ₂ S 产生 H ₂ S production	—	—	—	+	—	—
葡萄糖 Glucose	+	+	+	—	+	+
山梨醇 Sorbitol	—	NA	—	NA	—	—
鼠李糖 Rhamnose	—	NA	—	—	—	—
麦芽糖 Maltose	+	+	+	+	+	+
肌醇 Inositol	—	NA	—	NA	—	—
蔗糖 Saccharose	—	—	—	—	—	—
阿拉伯糖 Arabinose	—	+	—	—	—	—
木糖 Xylose	—	—	—	NA	—	—
甘露醇 Mannitol	—	—	+	—	—	—
甘油 Glycerin	+	NA	+	+	V	+
乳糖 Lactose	—	—	—	NA	—	—
海藻糖 Trehalose	—	—	+	+	+	+
果糖 Fructose	—	—	+	+	—	+
纤维二糖 Cellobiose	—	NA	—	—	NA	—
乙醇 Ethanol	—	NA	—	NA	—	—

Note: +: Positive; —: Negative; V: Variable; NA: No data available. 1: NW1203; 2: *Chryseobacterium oranimense* DSM 19055^T; 3: *Chryseobacterium joostei* LMG 18212^T; 4: *Chryseobacterium jejuense* DSM 19299^T; 5: *Chryseobacterium nakagawai* JX 100822^T; 6: *Chryseobacterium lactis* JX 100821^T.

2.3.3 16S rRNA 基因序列分析

菌株 NW1203 的 16S rRNA 基因 PCR 扩增产物凝胶电泳图见图 4。测序结果显示, 菌株 NW1203 的 16S rRNA 基因长 1 433 bp (GenBank 登录号为 MH557216)。采用 BLAST 对菌株 NW1203 的 16S rRNA 基因序列进行相似性比对, 结果表明, 菌株 NW1203 与 *Chryseobacterium* sp. F30 相似性为 100%, 与 *Chryseobacterium oranimense* DSM 19055^T 和 *Chryseobacterium joostei* LMG 18212^T 的相似性为 98%; 而在 EZTaxon 网站与标准菌株比对的结果显示, 菌株 NW1203 与 *Chryseobacterium jejuense* DSM 19299^T 和 *Chryseobacterium nakagawai* JX 100822^T 的相似性最高, 均为 98.87%, 其次为 *Chryseobacterium lactis* JX 100821^T (98.58%)。通过生物学聚类软件 MEGA 6.06 构建系统发育树(图 5), 可以看出菌株 NW1203 属于金黄杆菌 (*Chryseobacterium*) 家族。但由于菌株 NW1203 的表型特征与以上相似菌种有一定差异(表 2), 因此, 综合形态观察、生理生化试验及 16S rRNA 基因序列比对结果, 鉴定菌株 NW1203 为金黄杆菌未定种 (*Chryseobacterium* sp.)。

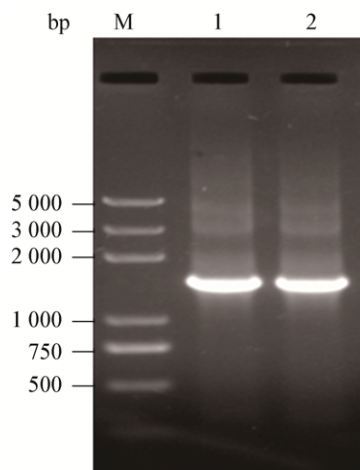


图 4 NW1203 菌的 16S rRNA 基因 PCR 扩增产物
Figure 4 PCR amplification products of bacteria strain NW1203 based on 16S rRNA gene

Note: M: 2 kb DNA marker; 1 and 2: PCR products of NW1203.

3 讨论与结论

本实验从患病牛蛙体内分离到一株细菌 NW1203, 经溶血性试验、人工感染试验和组织病理观察, 并参考 Santos 等对细菌毒性强弱的判断标准^[15], 确定 NW1203 菌对牛蛙具有较强致病性, 可引起牛蛙体表创伤部位及肝、肾、脾等主要组织器官较为明显的病症。对 NW1203 菌的形态观察和生理生化试验结果表明, 该菌属于金黄杆菌属细菌, 16S rRNA 基因序列分析显示其与 *Chryseobacterium* sp. F30 的相似性为 100%。由于菌株 NW1203 的 16S rRNA 基因序列与已发表的金黄杆菌相似性均低于 99%, 且该菌株某些主要的生理生化特征与其 16S rRNA 基因序列相近的发表菌种有一定差异(表 2), 因此, 鉴定菌株 NW1203 为金黄杆菌未定种 (*Chryseobacterium* sp.), 而种的确定还有待于进一步的鉴定。

金黄杆菌归属于黄杆菌科(*Flavobacteriaceae*)金黄杆菌属(*Chryseobacterium*), 目前该属已记载有 60 多种菌, 而且近几年也不断有新种被报道^[13,18-21]。据资料显示, 金黄杆菌属中的部分种是条件致病菌, 可引起人类和动物多种疾病^[22], 而能引起水产动物疾病的金黄杆菌主要有大菱鲆金黄杆菌 (*Chryseobacterium scophthalmum*)、产吡啶金黄杆菌 (*Chryseobacterium indologenes*)、脑膜炎败血金黄杆菌 (*Chryseobacterium meningosepticum*) (现已归于伊丽莎白菌属 *Elizabethkingia*) 等^[10,22]。近年来由于高密度养殖及养殖环境的恶化, 由金黄杆菌引起的各种养殖水产动物疾病的病例呈上升态势, 新的病原也不断涌现, 如董丽^[23]、Shahi 等^[24]报道大菱鲆金黄杆菌(*C. scophthalmum*)可引起大菱鲆、印度鲃等鱼体表及体内出血、鳃组织增生、肝肾组织损害等症状; 王鑫毅等^[12]、杨移斌等^[25]、Boran 等^[26]发现产吡啶金黄杆菌(*C. indologenes*)可引起乌鳢、中华鳖溃烂病、地中海鲷鱼腹水及腹部点状出血症, 且致病性较强; Bernardet 等^[27]曾从芬兰养殖的患病大西洋鲑鱼中分离到宙斯特氏金黄杆菌(*C. joostei*);

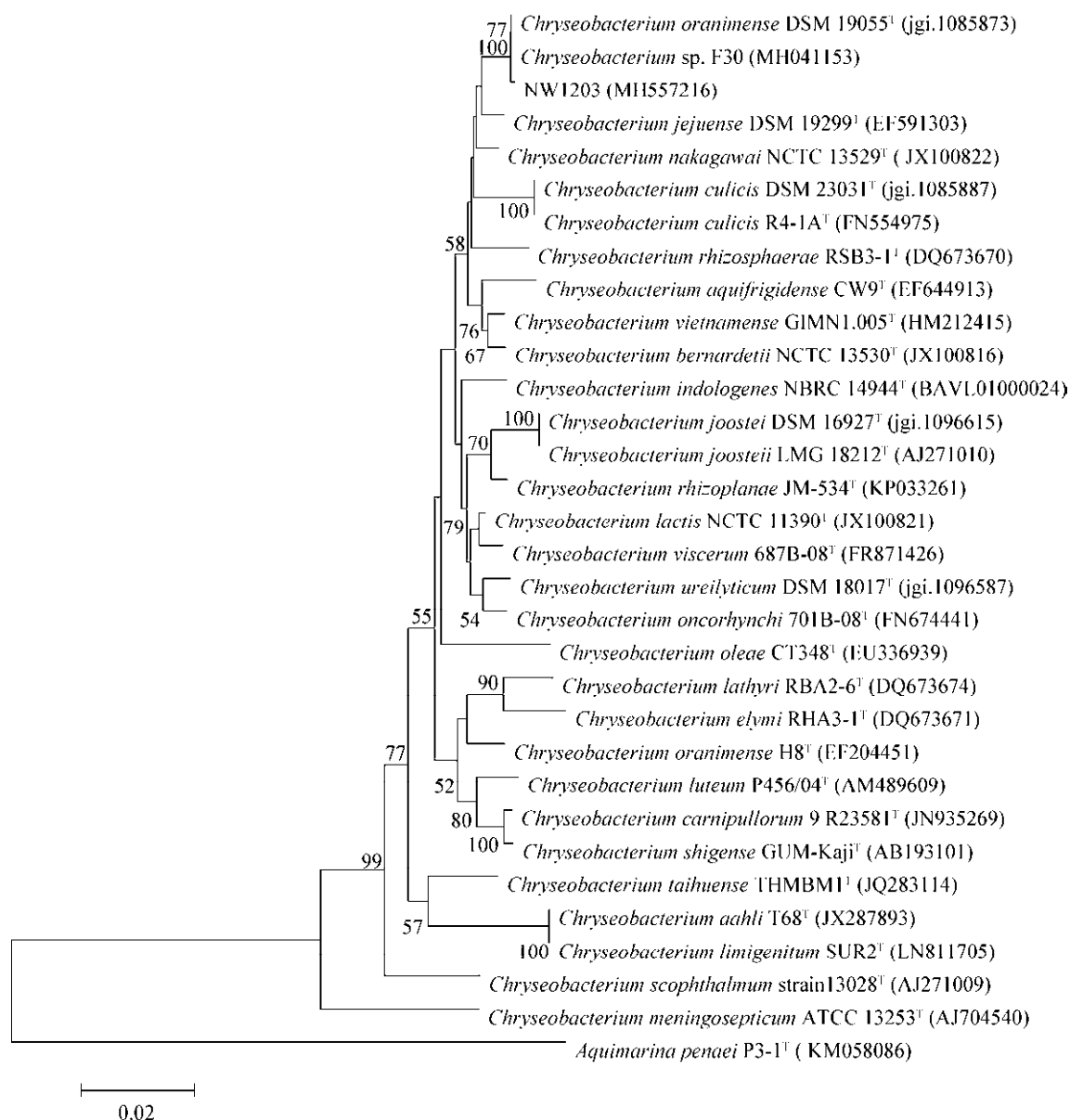


图5 菌株NW1203及其相关菌株的16S rRNA基因邻位连接法系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree (Neighbor-Joining) based on 16S rRNA sequences of NW1203

注:分支点上的数字表示构建系统树时1 000次计算时形成该节点的百分比,隐藏小于50的数字;括号中的序号代表菌株的GenBank登录号,(T)代表模式菌株;标尺长度代表2%的16S rRNA基因序列的进化差异。

Note: The bootstrap values (%) presented at the branch points were calculated from 1 000 replications; The sequence number in the parentheses means the GenBank accession number of the strain, and T means type strains; The ruler length means a 2% nucleotide sequence difference.

Didinen 等^[28]研究证实2011年11月至2012年2月期间土耳其锦鲤大规模死亡的主要致病菌为*Chryseobacterium aahli*和*Chryseobacterium limigenitum*两种金黄杆菌。此外,还有金黄杆菌引起河蟹、蛙类及大西洋鲑鱼、大马哈鱼、淡水白鲳

等多种鱼类感染的报道^[22,27]。然而关于金黄杆菌致病机理方面的报道目前较少,大多数研究主要是通过人工感染试验和溶血性试验确定其致病性,仅王鑫毅等研究了产吡啶金黄杆菌(*C. indologenes*)胞外产物对乌鳢的致病作用,认为金黄杆菌的致病性与

其胞外蛋白有关^[12,29]; Shahi 等研究发现大菱鲂金黄杆菌(*C. scophthalmum*)感染印度鲃可引起印度鲃严重鳃病, 鳃、肝、肾、脾等组织充血出血, 鳃组织增生肥大、鳃片融合, 肝、肾、脾细胞变性坏死, 胆囊细胞肥大水肿^[24]。本实验通过人工感染试验和组织病理学观察研究了金黄杆菌对牛蛙的致病作用, 结果显示, 金黄杆菌主要是通过体表伤口感染牛蛙, 可造成牛蛙伤口发炎溃烂, 肝、肾、脾等主要组织充血肿大, 组织细胞颗粒变性、坏死、空泡化。

关于蛙类金黄杆菌病的病原, 迄今报道的仅有一种, 为脑膜炎败血金黄杆菌(*C. meningosepticum*), 它可引起蛙歪脖子病、白内障病、旋游症等多种疾病^[22,30]。该菌现已归属于黄杆菌纲(*Flavobacteria*)黄杆菌目(*Flavobacteriales*)黄杆菌科(*Flavobacteriaceae*)伊丽莎白菌属(*Elizabethkingia*), 为脑膜炎败血伊丽莎白菌(*Elizabethkingia meningosepticum*)^[9-10]。本实验所分离的菌株 NW1203, 经形态观察、生理生化试验及 16S rRNA 基因序列分析, 确定归属于金黄杆菌属(*Chryseobacterium*), 而且认为菌株 NW1203 是牛蛙的新病原, 由该菌引起的疾病暂命名为牛蛙金黄杆菌病。由于金黄杆菌在水域和土壤环境中自然存在且具有广泛的耐药性, 一旦感染水产动物, 治疗难度较大, 因此建议密切关注和深入研究水产动物的金黄杆菌病。

REFERENCES

- [1] Gao B. The status and analysis of prospects of bullfrog industry in our country[D]. Xiamen: Master's Thesis of Jimei University, 2017 (in Chinese)
高博. 我国牛蛙产业现状及前景分析[D]. 厦门: 集美大学硕士学位论文, 2017
- [2] Yang CH. Wry head disease of bullfrog pathogen, pathology and sensitive drug research[D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan Agricultural University, 2010 (in Chinese)
杨春浩. 牛蛙歪头病病原、病理及敏感药物研究[D]. 长沙: 湖南农业大学硕士学位论文, 2010
- [3] Liu XD, Yang JX, Gong H, et al. Characterization of an iridovirus isolate from *Rana catesbeiana*[J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2012, 20(1): 16-21 (in Chinese)
刘晓东, 杨金先, 龚晖, 等. 一株牛蛙源虹彩病毒的分离及鉴定[J]. 中国动物传染病学报, 2012, 20(1): 16-21
- [4] Yang DW, Lv JY, Wu JY, et al. Preliminary study on common diseases and control of *Rana catesbeiana*[J]. Fisheries Science and Technology, 2000(3): 27-30 (in Chinese)
杨大伟, 吕军仪, 吴金英, 等. 牛蛙(*Rana catesbeiana*)常见病害及防治的初步研究[J]. 水产科技, 2000(3): 27-30
- [5] Yu Z, Xiao KY, Zhong L, et al. Pathogen identification and drug sensitivity of ascites disease in *Rana catesbeiana*[J]. Freshwater Fisheries, 2013, 43(1): 50-54 (in Chinese)
于喆, 肖克宇, 钟蕾, 等. 牛蛙腹水病病原鉴定和药敏试验[J]. 淡水渔业, 2013, 43(1): 50-54
- [6] Han YN, Yu YC, Wang XY, et al. Identification and sensitive drug test of pathogenic *Proteus vulgaris* from *Rana catesbeiana*[J]. Microbiology China, 2016, 43(6): 1280-1287 (in Chinese)
韩艳楠, 余银春, 王鑫毅, 等. 牛蛙致病变形菌的鉴定及其敏感药物筛选[J]. 微生物学通报, 2016, 43(6): 1280-1287
- [7] Hang XY, Zhou DR, Ye XP, et al. Isolation and identification on the pathogen of bullfrog *Streptococcus* disease[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2012, 36(2): 361-364 (in Chinese)
杭小英, 周冬仁, 叶雪平, 等. 牛蛙无乳链球菌病原的分离鉴定[J]. 水生生物学报, 2012, 36(2): 361-364
- [8] Yin LF, Chen GL. Diagnosis and prevention of common diseases of *R. catesbeiana*[J]. Scientific Fish Farming, 2010(10): 80 (in Chinese)
尹伦甫, 陈公立. 牛蛙常见疾病的诊断与防治[J]. 科学养鱼, 2010(10): 80
- [9] Liu XL, Mei H, Bu LF, et al. Isolation and pathogenicity study of *Elizabethkingia* sp. from *Channa argus*[J]. Journal of Ningbo University (Natural Science & Engineering Edition), 2018, 31(2): 1-7 (in Chinese)
刘晓琳, 梅寒, 卜令飞, 等. 乌鳢伊丽莎白菌的分离鉴定及致病性研究[J]. 宁波大学学报: 理工版, 2018, 31(2): 1-7
- [10] Kim KK, Kim MK, Lim JH, et al. Transfer of *Chryseobacterium meningosepticum* and *Chryseobacterium miricola* to *Elizabethkingia* gen. nov. as *Elizabethkingia meningoseptica* comb. nov. and *Elizabethkingia miricola* comb. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(3): 1287-1293
- [11] Zhang Q, Liu G, Ma XL, et al. Acute toxicity test of Gamithromycin injection in mice[J]. Modern Animal Husbandry Science & Technology, 2017(3): 4-5 (in Chinese)
张倩, 刘刚, 马晓玲, 等. 加米霉素注射液对小鼠的急性毒性试验[J]. 现代畜牧科技, 2017(3): 4-5
- [12] Wang XY, Han YN, Jin S, et al. Identification and analysis on extracellular products characteristics of *Chryseobacterium indologenes* isolation from *Channa*

- argus*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, 40(3): 641-646 (in Chinese)
王鑫毅, 韩艳楠, 金珊, 等. 乌鳢产吡啶金黄杆菌的鉴定及其胞外产物特性分析[J]. *水生生物学报*, 2016, 40(3): 641-646
- [13] Zhao NX, Yuan GY. *Medical Bacteria Name and Classification Identification*[M]. 3rd ed. Jinan: Shandong University Press, 2013: 115-120 (in Chinese)
赵乃听, 苑广盈. 医学细菌名称及分类鉴定[M]. 3版. 济南: 山东大学出版社, 2013: 115-120
- [14] Hugo CJ, Segers P, Hoste B, et al. *Chryseobacterium joostei* sp. nov., isolated from the dairy environment[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53(3): 771-777
- [15] Santos Y, Toranzo AE, Barja JL, et al. Virulence properties and enterotoxin production of *Aeromonas* strains isolated from fish[J]. *Infection and Immunity*, 1988, 56(12): 3285-3293
- [16] Hantsis-Zacharov E, Shakéd T, Senderovich Y, et al. *Chryseobacterium oranimense* sp. nov., a psychrotolerant, proteolytic and lipolytic bacterium isolated from raw cow's milk[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(11): 2635-2639
- [17] Weon HY, Kim BY, Yoo SH, et al. *Chryseobacterium soli* sp. nov. and *Chryseobacterium jejuense* sp. nov., isolated from soil samples from Jeju, Korea[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(2): 470-473
- [18] Cho SH, Lee KS, Shin DS, et al. Four new species of *Chryseobacterium* from the rhizosphere of coastal sand dune plants, *Chryseobacterium elymi* sp. nov., *Chryseobacterium hagamense* sp. nov., *Chryseobacterium lathyri* sp. nov. and *Chryseobacterium rhizosphaerae* sp. nov.[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2010, 33(3): 122-127
- [19] Holmes B, Steigerwalt AG, Nicholson AC. DNA-DNA hybridization study of strains of *Chryseobacterium*, *Elizabethkingia* and *Empedobacter* and of other usually indole-producing non-fermenters of CDC groups IIc, IIf, IIh and IIf, mostly from human clinical sources, and proposals of *Chryseobacterium bernardetii* sp. nov., *Chryseobacterium carnis* sp. nov., *Chryseobacterium lactis* sp. nov., *Chryseobacterium nakagawai* sp. nov. and *Chryseobacterium taklimakanense* comb. nov.[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63(12): 4639-4662
- [20] Lo CI, Sankar SA, Mediannikov O, et al. High-quality genome sequence and description of *Chryseobacterium senegalense* sp. nov.[J]. *New Microbes & New Infections*, 2016, 10: 93-100
- [21] Loch TP, Faisal M. *Chryseobacterium aahli* sp. nov., isolated from lake trout (*Salvelinus namaycush*) and brown trout (*Salmo trutta*), and emended descriptions of *Chryseobacterium ginsenosidimutans* and *Chryseobacterium gregarium*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(5): 1573-1579
- [22] Fang H, Chen CZ, Zhang XJ. *Aquacultural Animal Pathogenic Bacteriology*[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2010: 499-512 (in Chinese)
房海, 陈翠真, 张晓君. 水产养殖动物病原细菌学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010: 499-512
- [23] Dong L. Identification and aethionological of pathogenic bacteria of cultured Turbot (*Scophthalmus maximus*)[D]. Qingdao: Master's Thesis of Ocean University of China, 2009 (in Chinese)
董丽. 养殖大菱鲆几种重要细菌性疾病病原菌的鉴定及其病原学初步研究[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2009
- [24] Shahi N, Sharma P, Pandey J, et al. Characterization and pathogenicity study of *Chryseobacterium scopthalmum* recovered from gill lesions of diseased golden mahseer, *Tor putitora* (Hamilton, 1822) in India[J]. *Aquaculture*, 2018, 485: 81-92
- [25] Yang YB, Ai XH, Song Y, et al. Isolation, identification and antibiotic sensitivity of *Chryseobacterium indologenes* from *Trionyx sinensis*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, 42(4): 786-793 (in Chinese)
杨移斌, 艾晓辉, 宋怿, 等. 中华鳖源致病性产吡啶金黄杆菌分离、鉴定及药敏特性分析[J]. *水生生物学报*, 2018, 42(4): 786-793
- [26] Boran H, Terzi E, Altinok I, et al. Bacterial diseases of cultured Mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*) in sea cages[J]. *Aquaculture*, 2013, 396-399: 8-13
- [27] Bernardet JF, Vancanneyt M, Matte-Tailliez O, et al. Polyphasic study of *Chryseobacterium* strains isolated from diseased aquatic animals[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2005, 28(7): 640-660
- [28] Didinen BI, Onuk EE, Öztürk T, et al. First report of *Chryseobacterium* sp. from Koi (*Cyprinus carpio*) in Turkey[J]. *The Israeli Journal of Aquaculture*, 2016, 68: 1341-1348
- [29] Vandamme P, Bernardet JF, Segers P, et al. NOTES: New perspectives in the classification of the *Flavobacteria*: Description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* nom. rev.[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1994, 44(4): 827-831
- [30] Li M, Song TT, Zheng RQ, et al. Isolation, identification and drug sensitivity test of the pathogen of *Quasipaa spinosa*[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2016, 44(3): 64-66, 98 (in Chinese)
李明, 宋婷婷, 郑荣泉, 等. 棘胸蛙歪头病病原分离·鉴定与药敏试验[J]. *安徽农业科学*, 2016, 44(3): 64-66, 98