

研究报告

牛蛙致病变形菌的鉴定及其敏感药物筛选

韩艳楠¹ 余银春² 王鑫毅¹ 王丽¹ 刘晓琳¹ 金珊^{1*} 赵青松¹

(1. 宁波大学海洋学院 浙江 宁波 315211)

(2. 浙江省天台县里石门水库渔林场 浙江 天台 317205)

摘要:【目的】分离鉴定引起牛蛙(*Rana catesbeiana*)皮肤溃疡病症的致病菌,筛选抗菌药物。【方法】采用无菌解剖组织划线分离法分离致病菌,通过人工感染试验、菌体和菌落形态观察、API 20E 系统鉴定、16S rRNA 基因序列分析,确定分离菌的致病性及分类地位,并对该菌进行药物敏感性试验。【结果】从患病濒死牛蛙体内分离细菌 NWG20141026,通过形态特征观察、生理生化试验、API 20E 系统鉴定和 16S rRNA 基因序列相似性分析,认为 NWG20141026 菌株为普通变形菌(*Proteus vulgaris*)。人工感染试验显示, NWG20141026 菌株不仅可以通过皮肤伤口感染引起蛙体表溃疡溃烂病症,也可通过消化道感染引起蛙肠炎病。药敏实验结果表明,氟苯尼考、四环素、多西环素、茶啉酸、磺胺异噁唑、恩诺沙星、红霉素等 7 种药物对普通变形菌具有较好的抑杀菌作用。【结论】引起牛蛙(*R. catesbeiana*)皮肤溃疡病症的致病菌 NWG20141026 为普通变形菌(*P. vulgaris*),所患疾病命名为牛蛙变形菌病。普通变形菌对健康牛蛙具有较强致病性,氟苯尼考、四环素、多西环素、茶啉酸、磺胺异噁唑等 5 种药可作为防治牛蛙变形菌病的候选药物。

关键词: 牛蛙, 皮肤溃疡, 普通变形菌, 药敏试验

Foundation item: Marine Special Funding for Public Welfare Industry Project (No. 201105007); Ningbo University Aquaculture in Zhejiang Province Priority Level 1 Subject Open Fund (No. xkzsc1503)

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

Received: November 30, 2015; **Accepted:** February 29, 2016; **Published online** (www.cnki.net): March 10, 2016

基金项目: 海洋公益性行业专项经费资助项目(No. 201105007); 宁波大学水产浙江省重中之重一级学科开放基金(No. xkzsc1503)

***通讯作者:** E-mail: jinshan@nbu.edu.cn

收稿日期: 2015-11-30; **接受日期:** 2016-02-29; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-03-10

Identification and sensitive drug test of pathogenic *Proteus vulgaris* from *Rana catesbeiana*

HAN Yan-Nan¹ YU Yin-Chun² WANG Xin-Yi¹ WANG Li¹ LIU Xiao-Lin¹
JIN Shan^{1*} ZHAO Qing-Song¹

(1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang 315211, China)

(2. Lishimen Reservoir Fishing and Forest Farm, Tiantai, Zhejiang 317205, China)

Abstract: [Objective] Pathogen isolation, identification, and drug sensitivity test were performed on *Rana catesbeiana* that were suffering from skin ulcers in order to provide references to effectively prevent and control skin ulcers disease. [Methods] Pathogens, separated from the heart, liver and nidus of dying *Rana catesbeiana* infected by skin ulcers with the use of routine separation methods, were identified through artificial infection test, API 20E biochemical identification system, and 16S rRNA gene sequence analysis. Then, drug sensitivity test was conducted using paper diffusion method. [Results] One superior strain (NWG20141026), isolated from *Rana catesbeiana* infected by skin ulcers, exhibited strong pathogenicity to *Rana catesbeiana* by Artificial infection test. Through API 20E biochemical identification and 16S rRNA gene sequence analysis, it was found that the strain was *Proteus vulgaris*. The results from drug sensitivity test showed that phathogen of skin ulcer were highly sensitive to 7 medicines, such as florfenicol, tetracycline, doxycycline, nalidixic acid, sulfisoxazole, enrofloxacin, and erythrocine. [Conclusion] Skin ulcer disease, caused by *Proteus vulgaris*, could be treated by florfenicol, tetracycline, doxycycline, nalidixic acid, and sulfisoxazole.

Keywords: *Rana catesbeiana*, Skin ulcer disease, *Proteus vulgaris*, Sensitive drug test

牛蛙(*Rana catesbeiana*)属于脊索动物门, 两栖纲, 蛙科, 蛙属, 原产北美, 是世界上最著名的大型食用蛙类。我国 1958–1963 年间曾多次引进养殖, 但大多未能成功, 直到 20 世纪 80 年代中期才在我国逐渐推广。由于牛蛙适应性强、食性广、繁殖生长快、易养殖, 且其营养丰富、味道鲜美、蛙皮还可制革等特点, 因此养殖利润较高, 养殖范围和规模推广很快。目前牛蛙养殖已基本覆盖全国各地, 据不完全统计, 我国牛蛙养殖年产量已超过 3 万 t^[1]。

但随着养殖规模和养殖密度的不断加大, 生物性健康饵料供不应求、种质资源退化、养殖环境恶化、养殖技术匮乏等诸多问题也不断显现, 养殖病害逐渐增多并日趋严重, 大规模暴发的疾病也时有发生。2014 年 9–10 月宁波某牛蛙养殖场出现大批牛蛙体表皮肤化脓性溃疡病症, 严重的皮肤可烂穿露出白骨; 解剖发现患病严重病蛙肝组织色泽不均匀, 发软糜化; 有的肾略肿、肠道无食红肿。此病发病率高, 死亡率 30% 以上, 给养殖户造成了严重

的经济损失。为了尽快明确疾病发生的原因及防治措施, 作者对患典型症状的病蛙进行了细菌分离, 采用 API 20E 细菌快速鉴定试剂盒初步确定引起牛蛙疾病的病原菌为变形菌属细菌, 并在此基础上进一步对该病原菌进行了 16S rRNA 基因序列分析、致病性试验及药敏试验, 具体实验结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验蛙来源

病蛙取自浙江宁波某牛蛙养殖池塘, 体重 175–225 g; 健康蛙购自宁波水产市场, 体重 150–250 g, 活力好, 无损伤, 外观镜检并经抽样解剖检验确认无病。

1.2 主要试剂和仪器

API 20E 细菌快速鉴定试剂盒, 生物梅里埃(中国)有限公司; 细菌基因组 DNA 小量制备试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒, 爱思进生物技术(杭州)有限公司; 大肠杆菌 DH5 α 、Taq DNA 聚合酶等, 北京全式金生物技术有限公司; pMD19-T Simple

Vector, 宝生物工程(大连)有限公司; 牛肉膏蛋白胨培养基^[2]、药敏纸片, 杭州滨和微生物试剂有限公司; 细菌通用引物 27F 和 1492R, 由上海华大基因科技有限公司合成。

麦氏浊度管, 生物梅里埃(中国)有限公司; SPX 型智能生化培养箱, 宁波江南仪器厂; Legend Micro 21R 高速冷冻离心机, Thermo Fisher Scientific 公司; ALS1296 PCR 仪, Bio-Rad 公司; DYY-8C 型电泳仪, 北京六一仪器厂; H-7650 透射电镜, 日本日立株式会社。

1.3 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基(g/L): 牛肉膏 5, 蛋白胨 10, NaCl 5, 琼脂 16, pH 7.0。

1.4 病原菌分离及菌悬液制备

取发病症状典型的牛蛙, 无菌解剖取病蛙肝脏、肾脏、心脏、体表溃疡处等组织分别划线接种于牛肉膏蛋白胨培养基平板上, 26 °C 恒温培养 48 h 后, 挑取形态特征一致的优势菌 NWG20141026 进行纯培养, 转接斜面保存备用。NWG20141026 菌株培养 24 h 后, 用无菌生理盐水制成浓度约 1.53×10^8 CFU/mL 的菌悬液用于感染试验, 细菌量根据麦氏浊度管结合活菌计数方法确定。

1.5 人工感染试验

试验设肌肉注射感染组、肌肉注射对照组、创伤浸泡感染组、创伤浸泡对照组、单纯浸泡感染组、单纯浸泡对照组等 6 组, 在 120 cm×80 cm×50 cm 的塑料桶中进行, 每桶放养健康牛蛙 10 只, 暂养 2 d 后进行感染试验。注射组采用大腿肌肉注射法, 每尾注射菌量为 0.2 mL, 对照组注射同量无菌生理盐水。创伤浸泡组用小刀轻轻在健康牛蛙体表制造创伤, 然后于稀释菌液中浸泡 30 min, 自来水清洗后放入塑料桶暂养, 对照组同样制造创伤后, 自来水清洗后再放入塑料桶暂养。单纯创伤浸泡组将健康牛蛙于稀释菌液中浸泡 30 min, 自来水清洗后放入塑料桶暂养, 对照组直接放入塑料桶暂养。试验水温 23–26 °C, pH 7.0±0.3, 试验期间适量投饵。

试验过程中发现濒死蛙立即取出解剖, 观察症状, 并取组织用牛肉膏蛋白胨培养基进行细菌分离。

1.6 病原菌形态观察及生理生化鉴定

NWG20141026 菌株在牛肉膏蛋白胨培养基平板上 26 °C 培养 20 h 左右, 用 0.7% 生理盐水制成菌悬液做革兰氏染色、鞭毛染色及电镜观察, 生理生化鉴定采用生物梅里埃(BioMérieux)公司的 API 20E 细菌快速鉴定试剂盒并参考房海等^[3]进行。

1.7 16S rRNA 基因扩增及其序列分析

以菌株 NWG20141026 基因组 DNA 为模板, 用细菌通用引物 27F 和 1492R 进行 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增^[4-5]。16S rRNA 基因扩增反应体系为 50 μ L, 其中 10×PCR 缓冲液 5.0 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 4.0 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 1.0 μ L, 10 μ mol/L 引物各 0.5 μ L, 2.5 μ L 模板 DNA, Taq DNA 聚合酶 (2.5 U/ μ L) 0.5 μ L, ddH₂O 36 μ L。PCR 反应条件为: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 6 min。PCR 扩增产物用琼脂糖凝胶回收, 连接到 pMD19-T 载体上, 作 T-A 克隆, 转化至大肠杆菌 DH5 α , 由上海华大基因公司完成测序。

将所测的 NWG20141026 菌株的 16S rRNA 基因序列上传至 GenBank 数据库, 并通过数据库中的 BLAST 进行序列相似性比较, 选取与所测序列同源性高的已知菌株, 采用 ClustalX 软件进行多序列比对(Multiple Alignments), 利用 MEGA 6.06 软件, 采用邻位相连(Neighbor-Joining)法构建系统发育树, 通过自举分析(Bootstrap)进行置信度检测, 自举数集 1 000 次。

1.8 药敏试验

以涂布法接种 0.1 mL 菌悬液于牛肉膏蛋白胨培养基平板上, 贴上药敏纸片, 26 °C 恒温培养 24 h 后, 测抑菌圈直径。

2 结果与分析

2.1 病蛙主要症状及病原菌的致病性

病蛙发病初期体表破损处出血、红肿, 逐渐形



图 1 患病牛蛙
Figure 1 The diseased *R. catesbeiana*

成化脓性溃疡斑,随着病情严重,溃疡斑不断扩大加深并连成一片,有的皮肤肌肉烂穿露出白骨,一般头背部和四肢溃烂相对严重(图 1)。解剖可见肝肾肿大变软,有少量腹水,肠空,有的肠变软发红并伴有肛门红肿现象。

采用光镜和电镜技术对病蛙病变组织、体表等部位检查未发现寄生虫和病毒。取病蛙肝脏、肾脏、脾脏、心脏、体表溃疡处等组织进行平板划线,获得优势生长菌 NWG20141026。

病原菌人工感染试验结果显示,NWG20141026 菌株有较强致病性,肌肉注射和创伤浸泡致死率 100% (表 1),感染蛙症状与自然发病蛙相似。肌肉注射组和创伤浸泡组发病较快,体表注射部位和创伤处溃疡溃烂严重,有的腹水较多,肝肾等组织变

软,病变明显,有的肠充血发红。非创伤浸泡组病情发展相对缓慢,病症以肠道充血发红为主,但大多病情较轻。对感染发病濒死牛蛙的肝、肾等组织进行细菌分离,又可分离到与 NWG20141026 菌株形态特征完全一致的菌株,说明 NWG20141026 菌株确为牛蛙的致病菌。

2.2 菌株形态及 API 20E 系统鉴定结果

革兰氏染色和鞭毛染色显示,NWG20141026 菌株革兰氏染色阴性,直杆状,大小约为 $(0.4-0.7) \mu\text{m} \times (1.0-3.0) \mu\text{m}$,大多单个,无荚膜和芽孢,以周生鞭毛运动(图 2),能在普通营养琼脂的平板上作周期的环形运动形成同心环,或扩展为均一的薄膜,菌落无色。NWG20141026 菌株 API 20E 系统鉴定结果

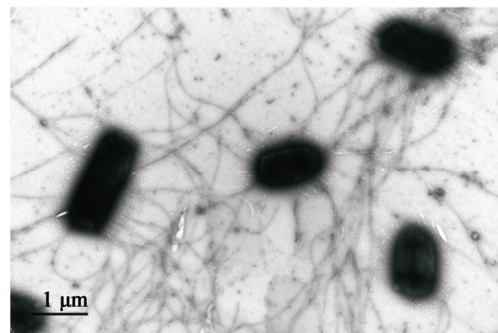


图 2 NWG20141026 菌的电镜照片
Figure 2 Electronmicrograph of strain NWG20141026

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

组别 Groups	试验数 Number of tested frog	菌液浓度 Concentration of bacterium (CFU/mL)	剂量 Injection dose (mL)	不同时间的死亡尾数 Number of death at different time															死亡数 Total dead number	死亡率 Mortality rate (%)
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
Intramuscular injection	10	1.53×10^8	0.2	0	0	2	1	2	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0	10	100
Wound soaking	10	1.53×10^5	30*	0	0	0	0	2	1	1	0	2	1	1	1	1	0	0	10	100
Soaking	10	1.53×10^5	30*	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	7	70
Injection control	10	Saline	0.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	10
Wound control	10	淡水	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	2	20
Health control	10	淡水	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

注: *: 浸泡 30 min.

Note: *: Soak 30 min.

表 2 NWG20141026 菌的生理生化特性
Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain NWG20141026

试验项目 Test item	牛蛙病原菌 NWG20141026	参照变形菌 <i>Proteus vulgaris</i>	试验项目 Test item	牛蛙病原菌 NWG20141026	参照变形菌 <i>Proteus vulgaris</i>
Growth at 37 °C	+	+	α-Methyl-D-glucose glycoside	+	+
Growth at 28 °C	+	+	Glucose	+	+
Motility	+	+	Maltose	+	+
ONPG	—	—	Inositol	—	—
Arginine dihydrolase	—	—	Ornithine decarboxyla	—	—
Lysin decarboxylase	—	—	Tryptophan deaminase	+	+
Rhamnose	—	—	Sorbitol	—	—
Saccharose	+	+	Arabinose	—	—
Citrate	—	—	Melibiose	—	—
Tyrosine	+	+	Mannitol	—	—
Urease	+	+	Amygdalin	—	—
Esterase	+	+	Cellobiose	—	—
H ₂ S produce	+	+	Xylose	+	+
Indole produce	+	+	Oxidase	—	—
V-P test	—	+	Catalase	+	+
Gelatin	+	+	0/129 sensibility	—	—
Malonate	—	—	Hemolysis test	+	+

Note: +: Positive; —: Negative.

及其它生化指标见表 2，API 20E 鉴定代码为 0476020，经查阅 API 20E 系统菌株鉴定编码手册及相关资料^[2]，可知 NWG20141026 菌株为普通变形菌(*Proteus vulgaris*)。

2.3 16S rRNA 基因序列及系统发育分析

利用引物27F和1492R扩增NWG20141026菌株的16S rRNA基因，共包括1 501个碱基，PCR产物凝胶电泳图谱(图3)，在 GenBank 中的登录号为 KT794006。将测定的16S rRNA基因序列与GenBank 中的参考序列进行比对，找出相关序列，利用生物学聚类软件MEGA 6.06进行系统发育树的构建(图4)。从N-J法构建的系统发育树上可以看出菌株 NWG20141026属于变形菌(*Proteus*)家族，与该菌序列最接近的菌株为普通变形菌(*Proteus vulgaris*)，其相似度为 99%。综合 2.2 和 2.3 结果，菌株 NWG20141026确定为普通变形菌(*P. vulgaris*)。

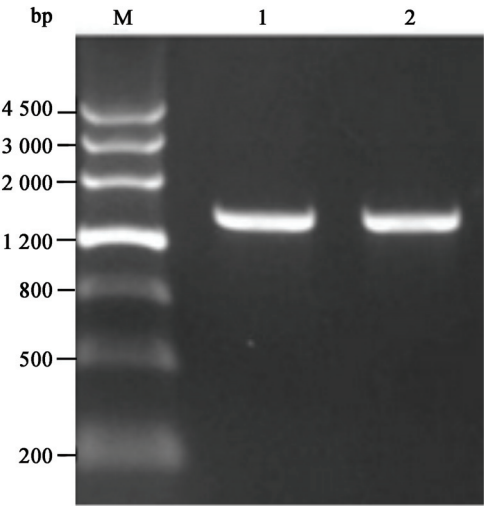


图 3 菌株 NWG20141026 的 16S rRNA 基因 PCR 扩增产物

Figure 3 PCR products of 16S rRNA gene from pathogenic strain NWG20141026

Note: M: Marker; 1–2: PCR products of NWG20141026.

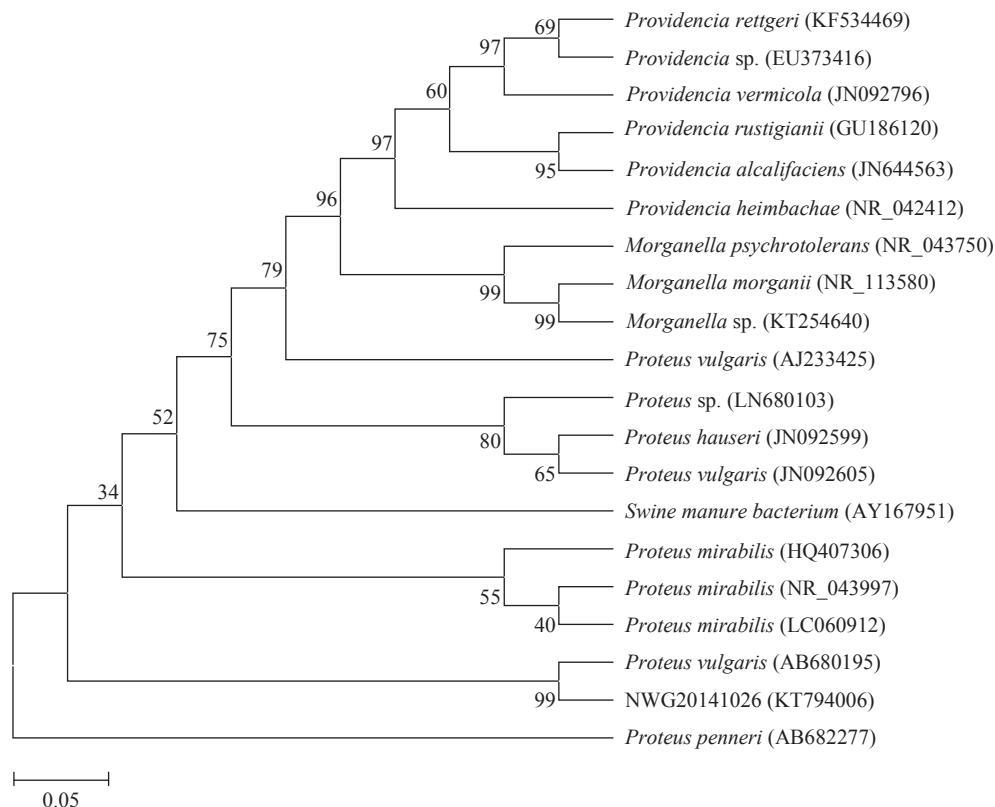


图4 基于16S rRNA基因序列的系统发育进化树

Figure 4 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence homology

注: 括号中的序列号代表菌株的 GenBank 登录号; 分支点上的数字代表计算 1 000 次聚类至同一分支概率; 标尺刻度代表 5% 的序列差异。

Note: Numbers in parenthesis represent the sequence's accession number in GenBank; The numbers at each branch point in the percentage supported by bootstrap; Bar: 5% sequence divergence.

2.4 药敏试验结果

NWG20141026 菌对 26 种药物敏感性试验结果见表 3。从表 3 中可见, NWG20141026 菌对恩诺沙星、氟苯尼考、萘啶酸、四环素、多西环素、红霉素、磺胺异噁唑等 7 种药物高度敏感, 对庆大霉素等 6 种药物中度敏感, 对链霉素等 7 种药物低度敏感, 对青霉素等 6 种药物耐药。

3 讨论

实验从患病牛蛙(*R. catesbeiana*)体表溃疡处和体内分离到菌株 NWG20141026, 经人工感染试验证实其可使牛蛙体表和肝肾等主要组织器官出现明显的病症, 致死率 100%, 且在人工感染患病蛙体内

又可分离到与 NWG20141026 完全一致的菌株, 说明 NWG20141026 具有强致病性。形态学观察及 API 20E 鉴定认为 NWG20141026 菌株为普通变形菌 (*P. vulgaris*)。通过对 NWG20141026 的 16S rRNA 基因的分析, 也发现它与普通变形菌的亲缘性最接近, 且相似度为 99%, 因此, 确定引起本次牛蛙皮肤溃疡的致病菌 NWG20141026 为普通变形菌 (*P. vulgaris*)。

皮肤溃烂是人工养殖牛蛙过程中最常见的疾病之一, 在部分养蛙地区, 此病对人工养殖牛蛙的危害程度已经成为决定牛蛙养殖成败的一个重要因子^[6]。据资料显示^[7], 引起养殖牛蛙皮肤溃烂的原因主要有两个方面, 一是长期摄食缺乏维生素,

表 3 菌株 NWG20141026 的药敏实验结果
Table 3 Drug sensitive test of strain NWG20141026

药物名称 Drug name	含药量 Drug content ($\mu\text{g}/\text{per}$)	抑菌圈 Inhibition zone diameter (mm)	敏感度 Sensitivity	药物名称 Drug name	含药量 Drug content ($\mu\text{g}/\text{per}$)	抑菌圈 Inhibition zone diameter (mm)	敏感度 Sensitivity
Tetracycline	30	38	+++	Vancomycin	30	11	+
Enrofloxacin	5	39	+++	Nalidixic acid	30	42	+++
Florfenicol	30	35	+++	Penicillin	10 IU	0	—
Ciprofloxacin	5	10	+	Ampicillin	10	0	—
Amikacin	30	20	++	Amoxicillin	10	0	—
Streptomycin	10	11	+	Doxycycline	30	29	+++
Gentamicin	10	19	++	Erythromycin	15	39	+++
Nitrofurantoin	300	9	+	Chloramphenicol	30	0	—
Neomycin	30	16	++	Sulfisoxazole	300	37	+++
Enoxacin	10	17	++	Penbritin	10	0	—
Spectinomycin	100	14	+	Cefalexin	30	0	—
Minocycline	30	16	++	Norfloxacin	10	15	++
Sulfamethoxazole	23.75/1.25	9	+	Rifampin	5	13	+

特别是维生素A的饲料；二是牛蛙相互撕咬或碰伤导致皮肤破损后致病菌侵入引起，主要的致病菌为奇异变形菌(*Proteus mirabilis*)、克氏耶尔森氏菌(*Yersinia kristensenii*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)等^[8-9]。尽管以上的致病因素不同，但引起的主要病症基本相同，牛蛙发病初期头背部皮肤失去光泽，出现白花纹，接着表皮脱落并开始腐烂，逐渐蔓延到躯干和背部，直至死亡^[7]。这与本研究中病蛙皮肤以化脓性溃疡为主要病症明显不同，为了区别其他牛蛙烂皮病，作者把本次由普通变形菌(*P. vulgaris*)引起的牛蛙皮肤溃疡病命名为牛蛙变形菌病。

变形菌广泛存在于自然界，是人和动物的条件致病菌^[3]。由赵乃昕等 2013 年编著出版的《医学细菌名称及分类鉴定》一书中的变形菌属包括普通变形菌(*P. vulgaris*)、奇异变形菌(*P. mirabilis*)、产黏变形菌(*P. myrabilis*)、豪氏变形菌(*P. hauseri*)、不稳定(无恒)变形菌(*P. inconstans*)等 5 个种，其中普通变形菌和奇异变形菌已被证实是水产动物的致病

菌^[10]。目前关于奇异变形菌可引起鱼类^[11-12]、中华鳖^[13]、蛙^[14-15]等多种水产动物严重疾病的报道相对较多，而普通变形菌感染的病例较少，仅许兵等^[16]曾报道其可引起对虾红腿病，孙佩芳等^[17]研究表明鳖穿孔病和白板病的致病菌为普通变形菌，杨霞等^[18]报道 2002 年 7-9 月引起广东省阳西县河北渔港赤点石斑鱼大规模死亡的致病菌为普通变形菌，余银春等^[19]实验显示普通变形菌可引起鲫鱼皮肤溃烂病，而以上学者的研究结果均认为致病菌是由体表损伤部位入侵的。本实验结果显示，从病蛙分离的普通变形菌 NWG20141026 菌株具有强毒性，它不仅可以通过皮肤伤口感染引起蛙体表溃疡溃烂病症，也可以通过消化道感染引起蛙肠炎病。因此，牛蛙养殖中不仅要定期对养殖水质和环境进行消毒，而且要特别注意饲料卫生，定期适量拌饲药饵，一旦发病一定要采取外消内服、内外兼治的方法。药物敏感性试验表明，氟苯尼考、萘啶酸、四环素、多西环素、磺胺异噁唑、红霉素、恩诺沙星等 7 种药物对 NWG20141026 菌株具有显著的抑杀菌作

用, 但恩诺沙星和红霉素已被列入我国《无公害食品渔用药物使用准则》禁用范围, 因此, 防治牛蛙普通变形菌病可考虑选用其它 5 种药。由于化学药物的不当使用易污染环境和危害人类食品安全, 因此, 在使用时一定要以防为主、控制用药量, 产品在上市前要严格执行休药期。

参考文献

- [1] Zhou YX, Yu K. Focus on bullfrog farming the status, to promote healthy breeding[J]. Scientific Fish Farming, 2014(10): 13-17 (in Chinese)
周燕侠, 余开. 关注牛蛙养殖现状, 大力推进健康养殖[J]. 科学养鱼, 2014(10): 13-17
- [2] Shen P, Chen XD. Microbiology Laboratory[M]. 4th Edition. Beijing: Higher Education Press, 2008: 241
沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 第4版. 北京: 高等教育出版社, 2008: 241
- [3] Fang H, Chen CZ, Zhang XJ. Aquaculture Animal Pathogenic Bacterium[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2010: 237-245 (in Chinese)
房海, 陈翠珍, 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: 237-245
- [4] Huang ZJ, He JG, Weng SP, et al. The isolation and preliminary identification of pathogenic bacteria from the diseased *Mandarin fish*[J]. Microbiology China, 1999, 26(4): 241-246 (in Chinese)
黄志坚, 何建国, 翁少萍, 等. 鳊鱼细菌性病原的分离鉴定及致病性初步研究[J]. 微生物学通报, 1999, 26(4): 241-246
- [5] Yang X, Chen L, Wang CQ. Advance in application of 16S rRNA gene in bacteriology[J]. Journal of Northwest A&F University, 2008, 36(2): 55-60 (in Chinese)
杨霞, 陈陆, 王川庆. 16S rRNA 基因序列分析技术在细菌分类中应用的研究进展[J]. 西北农林科技大学学报, 2008, 36(2): 55-60
- [6] Meng SY, Meng CM, Chen CF, et al. "Bacteria drug elimination" and oxytetracycline hydrochloride combined treatment effect of bullfrog rotten skin disease(on)[J]. Fishery Guide to be Rich, 2012(5): 70-71 (in Chinese)
孟思好, 孟长明, 陈昌福, 等. "菌毒消"与盐酸土霉素结合使用对牛蛙烂皮病的治疗效果(上)[J]. 渔业致富指南, 2012(5): 70-71
- [7] Lu ZC. Bullfrog identification of two kinds of skin disease and the prevention and control[J]. Anhui Agriculture, 1998(1): 31 (in Chinese)
卢仲春. 牛蛙两种腐皮病的鉴别与防治[J]. 安徽农业, 1998(1): 31
- [8] Shu XH, Xiao KY, Jin XL, et al. Studies on the pathogenic bacteria of the rotten-skin disease of Bullfrog[J]. Journal of Fisheries of China, 1997, 21(S1): 71-76 (in Chinese)
舒新华, 肖克宇, 金燮理, 等. 牛蛙腐皮病致病细菌的初步研究[J]. 水产学报, 1997, 21(增刊): 71-76
- [9] Ye XP, Luo YZ, Zhou DR, et al. Bullfrog skin disease prevention and treatment[J]. Scientific Fish Farming, 2013(8): 56-57 (in Chinese)
叶雪平, 罗毅志, 周冬仁, 等. 牛蛙腐皮病的防治[J]. 科学养鱼, 2013(8): 56-57
- [10] Zhao NX, Yuan GY. Name and Classification of Medical Bacteria Identification[M]. 3rd Edition. Ji'nan: Shandong University Press, 2013: 321-322 (in Chinese)
赵乃昕, 苑广盈. 医学细菌名称及分类鉴定[M]. 第3版. 济南: 山东大学出版社, 2013: 321-322
- [11] Zhang QH, Xiong QM, Xiao LL, et al. A pathogen isolated from skin-ulcer *Pseudosciaena crocea*—*Proteus mirabilis* ZXS02 strain[J]. Journal of Fisheries of China, 2005, 29(6): 824-830 (in Chinese)
张庆华, 熊清明, 肖琳琳, 等. 大黄鱼溃烂症的一种致病菌——奇异变形杆菌 ZXS02 菌株[J]. 水产学报, 2005, 29(6): 824-830
- [12] Yang YZ, Xu RS, Zhou ZY, et al. Co-infection of *E. coli* and proteus in a dolphin for performance[J]. Journal of Zhanjiang Ocean University, 2000, 20(1): 24-27 (in Chinese)
杨燕忠, 许如苏, 周铮宇, 等. 演艺海豚混合感染大肠埃希氏菌和变形杆菌的检验分析[J]. 湛江海洋大学学报, 2000, 20(1): 24-27
- [13] Lin YG, Ye J, Shi TT, et al. Isolation and identification of pathogen *Proteus mirabilis* from diseased Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*[J]. Fisheries Science, 2014, 33(12): 800-803 (in Chinese)
林亚歌, 叶键, 石婷婷, 等. 中华鳖源奇异变形杆菌的分离鉴定与致病性研究[J]. 水产科学, 2014, 33(12): 800-803
- [14] Wang RJ, Xiong XJ. 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)
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
- [15] Eskew EA, Joy Worth S, Foley JE, et al. American bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*) resist infection by multiple isolates of *Batrachochytrium dendrobatidis*, including one implicated in wild mass mortality[J]. International Association for Ecology and Health, 2015, 12(3): 513-518
- [16] Xu B, Ji WS, Xu HS. *Proteus vulgaris*: a new pathogen in *Penaeus orientalis*[J]. Journal of Fisheries of China, 1992, 16(2): 130-136 (in Chinese)
许兵, 纪伟尚, 徐怀恕. 一种新的对虾病原菌(普通变形菌)[J]. 水产学报, 1992, 16(2): 130-136
- [17] Sun PF, Cai WQ, Wu JN, et al. Pathology of the caverned disease of soft-shelled turtle[J]. Journal of Fisheries of China, 1996, 20(2): 120-124 (in Chinese)
孙佩芳, 蔡完其, 吴建农, 等. 鳖穿孔病的病原研究[J]. 水产学报, 1996, 20(2): 120-124
- [18] Yang X, Wu XZ. Pathogenic *Proteus vulgaris* found in redspotted grouper *Epinephelus akaara*[J]. Fisheries Science, 2005, 24(9): 5-7 (in Chinese)
杨霞, 吴信忠. 赤点石斑鱼的普通变形菌病原学研究[J]. 水产科学, 2005, 24(9): 5-7
- [19] Yu YC, Han YN, Wang XY, et al. Identification of pathogenic from *Carassius auratus* Triploid with skin bleeding and ulcers and its prevention of drug screening[J]. Journal of Agricultural Catastrophology, 2015, 5(3): 28-30, 62 (in Chinese)
余银春, 韩艳楠, 王鑫毅, 等. 湘云鲫体表出血溃烂病原的鉴定及防治药物筛选[J]. 农业灾害研究, 2015, 5(3): 28-30, 62