

张昱泽,张德福,杨秋红,等. 黑斑蛙普通变形杆菌的分离鉴定及药物敏感性分析[J]. 华中农业大学学报, 2025, 44(2): 251-257.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2025.02.025

黑斑蛙普通变形杆菌的分离鉴定及药物敏感性分析

张昱泽^{1,2}, 张德福², 杨秋红¹, 周顺¹, 艾晓辉¹, 董靖¹

1. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 武汉 430223; 2. 渤海大学食品科学与工程学院, 锦州 121013

摘要 为探明养殖场黑斑蛙大量死亡的原因, 从患病黑斑蛙的脑、脊及肝肾中分离纯化一株致病菌 B20200824, 经过生理生化测定、16S rRNA 序列测序及进化树构建对该菌株进行鉴定, 利用纸片扩散法和肉汤微量稀释法分别测定该菌株的敏感性和最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentrations, MICs)。经鉴定, 发现该菌株为革兰氏阴性短杆菌, 生化特征与普通变形杆菌一致, 16S rRNA 序列分析和进化树研究发现该菌株与普通变形杆菌有较高亲缘性, 基因相似性达到99%以上, 因此将该病原菌鉴定为普通变形杆菌。药敏试验结果显示, 该菌株对诺氟沙星、阿莫西林和恩诺沙星等6种药物耐药, 对多西环素、红霉素2种药物中介, 对阿奇霉素、头孢噻肟和氟苯尼考等5种药物敏感; 13种药物的MICs试验结果显示, 氟苯尼考最小抑菌质量浓度为0.25 μg/mL, 亚胺培南、左氧氟沙星和阿奇霉素的最小抑菌质量浓度为0.125 μg/mL, 头孢噻肟的最小抑菌质量浓度为0.061 25 μg/mL, 该测定结果与药敏试验结果基本一致。以上结果表明, 普通变形杆菌可导致养殖黑斑蛙发病和死亡, 在生产中可使用氟苯尼考进行防控。

关键词 黑斑蛙; 普通变形杆菌; 药敏试验; 耐药性

中图分类号 S966.3⁺2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2025)02-0251-07

黑斑蛙(*Pelophylax nigromaculatus*)又名青蛙、田鸡, 属蛙科、侧褶蛙属的两栖类动物, 广泛分布于中国、日本、韩国及俄罗斯, 在我国主要分布于华北、华中及华南(除海南、云南和台湾)部分地区的平原和丘陵^[1]。黑斑蛙具有较高的药用和食用价值, 是重要的两栖经济品种, 其养殖规模不断扩大^[2]。集约化养殖模式的兴起增加了黑斑蛙的产量和经济收入, 但同时也带来了蛙类疾病, 如脑膜炎、白内障、胀肚、红腿病、腐皮病及水霉病等^[3]。生产上, 引起蛙类疾病的病原较多, 已报道的黑斑蛙病原菌有洛菲不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*)^[1]、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)^[4]、脑膜炎脓毒性黄杆菌(*Flavobacterium meningosepticum*)^[5]、米尔伊丽莎白白菌(*Elizabethkingia miricola*)^[6]、脑膜炎败血伊丽莎白白菌(*Elizabethkingia meningoseptica*)^[7]等, 一旦感染可导致20%~100%的死亡率。由此可见, 大量的病原菌威胁着黑斑蛙的健康养殖, 不仅给养殖者带来巨大的经济损失, 还对蛙类产品的质量造成潜在的影响。

普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)是一种肠杆菌

科变形杆菌属的革兰氏阴性杆菌, 是一种人畜共患病原菌^[8-9]。该菌存在于动物肠道^[10-11], 不仅可引起猪^[12]、鸡^[13]和大熊猫^[14]等陆生动物发病, 还可导致罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)^[15]、中华鳖(*Trionyx sinensis*)^[16]、对虾(*Penaeus orientalis*)^[17]等水生动物的细菌性传染病。此外, 该菌是一种食源性病原菌, 通过导致食物腐败变质, 引起人类食物中毒^[18-19]。普通变形杆菌分布极为广泛, 对于该菌的预防与治疗常常依赖抗生素, 而抗生素的不合理使用导致了耐药性菌株的出现^[20]。

2020年8月湖北省某养殖场的黑斑蛙出现大量死亡, 为了确定其死亡原因, 对患病黑斑蛙进行剖解及病原学检查、鉴定, 并对其分离菌株进行常见抗生素的敏感性测定, 旨在为黑斑蛙普疾病的防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

患病蛙样本采自荆州某养殖场; 健康蛙购自市

收稿日期: 2023-09-19

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目(2019YFD0901702)

张昱泽, E-mail: zyz201912@163.com

通信作者: 董靖, E-mail: dongjing@yfi.ac.cn

场;抗生素标准品多西环素、新霉素、头孢噻肟、阿莫西林、红霉素、阿奇霉素、恩诺沙星、亚胺培南、诺氟沙星、氟苯尼考、头孢拉定、左氟氧沙星、利福平由北京索莱宝公司提供;药敏纸片由杭州微生物试剂有限公司提供;其他试剂购自武汉毫升生物技术有限公司。

1.2 细菌的分离纯化

取患病症状明显的黑斑蛙用无菌 PBS 缓冲液反复清洗蛙体表 4~5 次,于超净工作台剖取蛙的脑、脊、肝脏和肾脏,生理盐水冲洗 3 次后用无菌手术剪刀各剪取一小块组织,在无菌匀浆器中研磨均匀,取匀浆液用无菌 PBS 梯度稀释后接种于脑心浸液琼脂(BHI)培养基培养 16~18 h(28 °C)。

1.3 人工感染试验

挑取单菌落于 BHI 固体培养基培养至对数生长期(28 °C),用麦氏比浊管将菌液稀释至 5 个不同的浓度梯度($1.5 \times 10^8 \sim 1.5 \times 10^4$ CFU/mL)。挑选健康的黑斑蛙作为试验动物,每组 20 只,试验前预饲养 7 d,期间未出现疾病和死亡则用于后续感染试验。健康黑斑蛙通过腹腔注射 200 μ L 上述菌液建立感染,对照组注射相同体积的生理盐水。试验期间保持水温在 25~28 °C,溶氧保持在 5.5~7.5 mg/L。感染后每 24 h 观察各试验组蛙的发病和死亡情况,并及时做好记录。采用 Bliss 法计算其半数致死浓度(LC₅₀),取濒死蛙的脑、脊、肝脏及肾脏进行病原菌的分离及鉴定。

1.4 分离菌的生理生化鉴定

挑取单菌落革兰氏染色后于光学显微镜下观察细菌的形态。同时用无菌生理盐水将试验菌株的单菌落重悬,于 AP120E 生化鉴定试剂条中培养 24 h(37 °C),在 ATB32GN 细菌鉴定系统中进行生化鉴定。

1.5 分离菌基因序列分析

使用 DNA 提取试剂盒提取分离菌株的 DNA,以此作为模板,用通用引物扩增目的基因片段^[21-22]。上游引物序列:5'-AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG-3',下游引物序列:5'-GGTTACCTTGT-TACGACTT-3'。扩增产物经测序后,将目的基因序列通过 BLAST 软件进行同源性比对,使用 MEGA 6.0 构建系统发育树。

1.6 分离菌的药敏试验

分离菌株对常见抗菌药物的敏感性通过纸片扩

散法(K-B)来测定^[23]。挑取单菌落于 BHI 液体培养基振荡培养至对数生长期(28 °C, 180 r/min)。12 000 r/min 离心 2 min 收集菌体,用无菌 PBS 缓冲液重悬洗涤 2~3 次后将菌悬液调至 1.5×10^8 CFU/mL。取药敏纸片贴于菌液涂布均匀的培养基(28 °C)过夜培养后测定抑菌圈直径,根据纸片说明书判定结果。

1.7 分离菌最小抑菌浓度测定

在 96 孔板中加入受试药物,倍比稀释后的药物质量浓度分别为 32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.062 5 μ g/mL。菌液按本文材料与方法“1.6”的描述制备并稀释至 1×10^6 CFU/mL,然后加入 96 孔板中,使每孔菌液的终浓度为 5×10^5 CFU/mL。每种药物进行 3 次重复试验,同时设置阳性对照和阴性对照组。于 28 °C 生化培养箱中培养 16~18 h,其中以没有细菌生长的孔为最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)。

2 结果与分析

2.1 分离菌株的培养特性

采取濒死黑斑蛙的脑、脊、肝脏及肾脏进行细菌分离,得到 1 株优势菌,命名为 B20200824,菌落在 BHI 平板上呈乳白色,钝圆,边缘不规则;光学显微镜下观察到该菌为短杆状,排列无规则,革兰氏染色显示为阴性。

2.2 分离菌株对健康黑斑蛙的毒力

健康的试验黑斑蛙腹腔注射 B20200824 菌液后,7 d 内的发病死亡情况如表 1 所示。不同浓度菌液感染后,黑斑蛙出现不同程度的死亡现象,高浓度注射试验组的黑斑蛙在 2 d 内全部死亡,随着浓度的降低,死亡率也剂量依赖性下降。试验组黑斑蛙出现不同程度的发病症状,如精神不振,行动缓慢,采食量下降,歪头,眼睛浑浊,腹部膨胀等。对患病蛙进行剖检,发现蛙腹部有大量的腹水,肝脏和肾脏有膨大、发白等病变。同时从脑、脊、肝脏和肾脏分离出来的细菌,经鉴定后与 B20200824 菌株一致。试验期间,阴性对照组无明显的发病,未出现死亡。B20200824 菌株对黑斑蛙的 LC₅₀ 为 1.92×10^5 CFU/mL。

2.3 生化鉴定结果

分离株的生化鉴定结果如表 2 所示,将该结果输入至 ATB32GN 细菌鉴定系统后发现,分离菌株的生化特征与普通变形杆菌的生化特征相似度为 100%。

表 1 健康黑斑蛙感染分离菌株后的死亡情况

Table 1 Mortality of healthy *Pelophylax nigromaculatus* after infection with isolated strain

分组 Group	蛙数量 Number	感染浓度/(CFU/mL) Concentration	感染后不同时间死亡数 Deaths after infection							死亡率/% Mortality
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	
1	20	1.5×10 ⁸	15	5	0	0	0	0	0	100
2	20	1.5×10 ⁷	11	3	2	1	0	0	0	85
3	20	1.5×10 ⁶	9	3	2	1	0	0	1	75
4	20	1.5×10 ⁵	5	3	2	0	0	0	0	50
5	20	1.5×10 ⁴	0	2	1	0	0	0	0	15
6	20	生理盐水 Normal saline	0	0	0	0	0	0	0	0

表 2 分离菌株的生化鉴定结果

Table 2 Biochemical characterization of the isolate

测定项目 Tested parameters	B2020 0824	普通变形 杆菌 <i>Proteus vulgaris</i>	测定项目 Tested parameters	B20200824	普通变形 杆菌 <i>Proteus vulgaris</i>
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-	-	赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	-	-
色氨酸脱羧酶 Tryptophan decarboxylase	+	+	葡萄糖发酵 Glucose fermentation	+	+
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	-	-	苦杏仁苷 Amygdalin	-	-
β-半乳糖苷酶 β-Galactosidase	-	-	麦康凯 MacConkey	+	+
VP 试验 VP test	-	-	甘露醇 Mannitol	-	-
肌醇 Inositol	-	-	山梨醇 Sorbitol	-	-
尿素酶 Urease	+	+	蔗糖 Sucrose	+	+
氧化酶 Oxidase	-	-	鼠李糖 Rhamnose	-	-
柠檬酸盐 Citrate	-	-	蜜二糖 Melibiose	-	-
硫化氢 Hydrogen sulfide	+	+	葡萄糖氧化 Glucose oxidation	+	+
阿拉伯糖 Arabinose	-	-	明胶 Gelatin	+	+
NO ₃ →NO ₂	+	+	运动性 Mobility	+	+
NO ₃ →N ₂	-	-			

2.4 16S rRNA 序列分析

利用通用引物扩增得到了 B20200824 菌株 16s rRNA 的基因片段,将扩增产物纯化后进行测序,通

过序列比对发现该菌株与普通变形杆菌的同源性较高。系统发育树结果(图 1)显示,该菌株与普通变形杆菌 P3M 株(CP060211.1)聚为一支,同源性达到 99%。再结合该菌株的生理生化鉴定结果,可将该菌判定为普通变形杆菌。

2.5 菌株的药敏试验结果

利用 K-B 法测定了该菌对 13 种抗生素的敏感性,结果如表 3 所示。该菌对 6 种药物耐药,分别是诺氟沙星、阿莫西林、新霉素、恩诺沙星、头孢拉定和利福平,对多西环素和红霉素中度敏感,而对阿奇霉素、头孢噻肟、氟苯尼考、亚胺培南和左氧氟沙星 5 种药物敏感。使用肉汤稀释法测定 13 种药物的 MICs,结果见表 4,其中氟苯尼考、亚胺培南、左氧氟沙星、阿奇霉素和头孢噻肟等 5 种药物的抑菌效果较好,与敏感性试验结果一致。

3 讨论

普通变形杆菌是一种条件致病性的人畜共患病原菌,近年来,该菌引起水产动物的细菌性疾病的报道逐渐增多^[15,24]。李瑾年等^[16]发现感染普通杆菌的中华鳖皮肤溃烂或有穿孔症状。杨移斌等^[25]发现感染普通变形杆菌的斑点叉尾鲴体表溃烂,肛门发炎,流出黏液,脾肾充血,肠道坏死。许兵等^[17]观察到感染普通变形杆菌的对虾腿部变红,肝肾发白。普通变形杆菌感染的石斑鱼体表有溃疡,且腹部膨胀^[26]。本试验首次在患病黑斑蛙中分离到普通变形杆菌,回归试验发现,感染普通变形杆菌的黑斑蛙采食量下降,精神萎靡,眼睛浑浊,有运动障碍,腹部胀大,解剖后可见,肝脏、脾脏肿大发白,肾脏轻微出血,肠道内容物减少,腹部有大量的腹水等主要症状。黄杰等^[15]从罗非鱼内脏组织分离出 1 株普通变形杆菌,发现其半致死浓度为 1.3×10⁶~1.3×10⁷ CFU/尾,高于本研究中病原菌的半致死浓度,提示本研究所分离的菌株致病力较强。

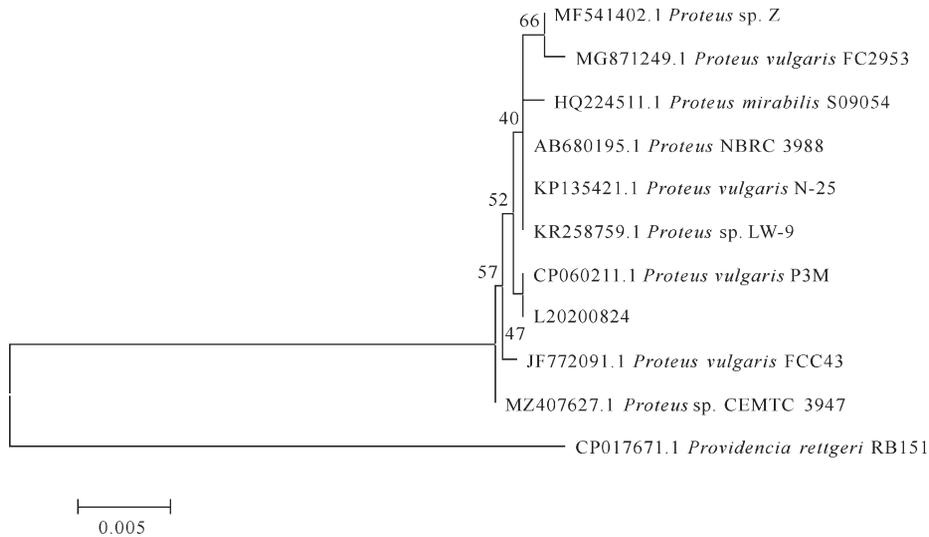


图1 系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree

表3 B20200824 分离菌株对13种抗生素药物的敏感性
Table 3 Antibiotic susceptibility of B20200824 strain to 13 kinds of antibiotics

药物名称 Antibiotics	含量/($\mu\text{g}/\text{disc}$) Content	抑菌圈直径/mm Inhibition zone	敏感度 Susceptibility
多西环素 Doxycycline	30	10.48 \pm 2.96	I
诺氟沙星 Norfloxacin	30	0	R
阿莫西林 Amoxicillin	20	0	R
红霉素 Erythromycin	15	15.28 \pm 2.71	I
阿奇霉素 Azithromycin	15	21.23 \pm 2.22	S
头孢噻肟 Cefotaxime	30	30.47 \pm 2.18	S
恩诺沙星 Enrofloxacin	10	10.18 \pm 2.74	R
氟苯尼考 Flofenicol	30	20.48 \pm 1.66	S
新霉素 Neomycin	30	0	R
利福平 Rifampin	15	15.93 \pm 1.87	R
亚胺培南 Imipenem	10	20.52 \pm 2.2	S
左氟氧沙星 Levofloxacin	30	25.98 \pm 0.12	S
头孢拉定 Cefradine	30	0	R

注:S:敏感;I:中介;R:耐药。Note: S: Susceptible; I: Intermediate; R: Resistant.

表4 抗菌药物对 B20200824 分离菌株的 MICs
Table 4 The MICs of antibiotics to B20200824

药物名称 Antibiotics	MIC/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	药物名称 Antibiotics	MIC/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
多西环素 Doxycycline	8	氟苯尼考 Flofenicol	0.25
诺氟沙星 Norfloxacin	32	新霉素 Neomycin	16
阿莫西林 Amoxicillin	>32	利福平 Rifampin	16
红霉素 Erythromycin	16	亚胺培南 Imipenem	0.125
阿奇霉素 Azithromycin	0.125	左氟氧沙星 Levofloxacin	0.125
头孢噻肟 Cefotaxime	0.061 25	头孢拉定 Cefradine	>32
恩诺沙星 Enrofloxacin	8		

注:表中数据为3次重复的平均值。Note: Data in the table are the mean of 3 replicates.

在水产养殖中滥用抗生素导致了越来越多的耐药菌株的产生,研究发现不同的水产养殖动物对普通变形杆菌具有不同的毒力耐受性,不同来源的菌株对抗生素的敏感性及耐药性也不同。Rahim^[27]在临床上分离出的普通变形杆菌对红霉素等四种药物耐药,对头孢噻肟高度敏感。牛金利等^[13]在鸡源普通变形杆菌的药敏试验中发现供试菌株对青霉素、红霉素等药物耐药,对头孢噻肟、庆大霉素等药物高度敏感。与本试验显示的红霉素为中度敏感有差异,对头孢噻肟高度敏感,头孢拉定耐药一致,这可

能与养殖场的用药方法不同相关,导致耐药性有差异。该菌株对红霉素的耐药结果与侯忠余^[28]的研究一致,对氟苯尼考敏感与柯文杰等^[29]的研究一致。

在对13种抗菌药物的耐药性测试中,本试验分离出的普通变形杆菌对6种药物耐药,说明此菌株具有多重耐药性。普通变形杆菌与奇异变形杆菌都有一定的耐药性,给人类和动物健康造成严重的威胁,促使我们寻找新型安全的抗菌剂。抗菌肽因其强大的抗菌、抗生物膜、抗炎和抗氧化特性使其成为开发新型肽类抗生素的理想药物,其中有3种抗菌肽类似物已在开展临床试验^[30-31]。同时有研究证明,在体外抗菌肽与抗生素联用具有显著的抗菌效果^[32]。因此,可以考虑联合用药来抑制细菌的感染。本研究发现,所分离的普通变形杆菌对氟苯尼考敏感,可用于该病的防控,但须按照药品说明书的剂量使用,并严格执行休药期规定。

参考文献References

- [1] 李成伟,王均,苏航,等.黑斑蛙腐皮病病原分离、鉴定及致病性研究[J].江苏农业科学,2020,48(17):174-178.LI C W, WANG J, SU H, et al. Isolation, identification and pathogenicity of *Pelophylax nigromaculatus* skin rot [J]. Jiangsu agricultural sciences, 2020, 48(17): 174-178 (in Chinese).
- [2] 杨尚昆,陈金辉,潘丽婷,等.黑斑蛙高效生态养殖新技术[J].安徽农业科学,2015,43(29):52-53.YANG S K, CHEN J H, PAN L T, et al. New technology of efficient ecological breeding of *Pelophylax nigromaculatus* [J]. Journal of Anhui agricultural sciences, 2015, 43(29): 52-53 (in Chinese).
- [3] 阮陈松杰.黑斑蛙“歪头病”病原菌的分离鉴定及其致病机制研究[D].荆州:长江大学,2021.RUAN C S J. Isolation, identification and pathogenic mechanism of “tilt head disease” of *Pelophylax nigromaculatus* [D]. Jingzhou: Yangtze University, 2021 (in Chinese with English abstract).
- [4] 夏理海,罗凯,李由申,等.黑斑蛙“白内障(歪头)”病原诊断及药敏试验[J].江苏农业科学,2018,46(8):174-176.XIA L H, LUO K, LI Y S, et al. Pathogen diagnosis and drug sensitivity test of “cataract” in *Pelophylax nigromaculatus* [J]. Jiangsu agricultural sciences, 2018, 46(8): 174-176 (in Chinese).
- [5] 陈晓凤,周常义,陈梦麟.牛蛙脑膜脓毒性黄杆菌病原的研究[J].集美大学学报(自然科学版),1999,4(3):30-35. CHEN X F, ZHOU C Y, CHEN M L. Study on pathogen of *Flavobacterium meningosepticum* disease of bullfrog [J]. Journal of Jimei University (natural science), 1999, 4(3): 30-35 (in Chinese with English abstract).
- [6] 秦振阳.黑斑蛙“歪头病”病原菌的分离鉴定及全基因组测序分析[D].雅安:四川农业大学,2018.QIN Z Y. Isolation, identification and genome-wide sequencing analysis of the pathogen of *Pelophylax nigromaculatus* “tilt head disease” [D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2018 (in Chinese with English abstract).
- [7] 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].重庆:西南大学,2016.WU X Z. Isolation and identification of cataract pathogen from *Pelophylax nigromaculatus* and its bacteriostasis *in vitro* [D]. Chongqing: Southwest University, 2016 (in Chinese with English abstract).
- [8] 刘泽文,袁芳艳,田永祥,等.猪变形杆菌病的研究进展[J].安徽农业科学,2014,42(12):3578-3579.LIU Z W, YUAN F Y, TIAN Y X, et al. Research progress of porcine *Proteus mirabilis* disease [J]. Journal of Anhui agricultural sciences, 2014, 42(12): 3578-3579 (in Chinese with English abstract).
- [9] WANG Y, PAN X. Bacteria: *Proteus* [M]//MOTARJEMI Y. Encyclopedia of food safety. Waltham: Academic Press, 2014: 486-489.
- [10] ZHANG Y, LEI C W, WANG H N. Identification of a novel conjugative plasmid carrying the multi-resistance gene *cf*r in *Proteus vulgaris* isolated from swine origin in China [J/OL]. Plasmid, 2019, 105: 102440 [2023-09-19]. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2019.102440>.
- [11] CAO H, LI Y W, LEI Y, et al. Isolation, identification, phylogenetic analysis and related properties of a pathogen in *Silurus meridionalis* Chen [J]. Acta microbiologica sinica, 2007, 47(1): 1-6.
- [12] 蒋增海,邓同炜,赵攀登,等.猪源奇异变形杆菌分离与鉴定及16S rRNA基因序列同源性分析[J].贵州农业科学,2017,45(12):91-94.JIANG Z H, DENG T W, ZHAO P D, et al. Isolation, identification of swine *Proteus mirabilis* and homology analysis of 16S rRNA gene sequence [J]. Guizhou agricultural sciences, 2017, 45(12): 91-94 (in Chinese with English abstract).
- [13] 牛金利,吴群,明月月,等.鸡源普通变形杆菌的分离鉴定及药物敏感性研究[J].中兽医医药杂志,2020,39(3):27-30. NIU J L, WU Q, MING Y Y, et al. Isolation, identification and drug sensitivity of *Proteus vulgaris* isolated from chicken [J]. Journal of traditional Chinese veterinary medicine, 2020, 39(3): 27-30 (in Chinese with English abstract).
- [14] 曾显成,池雪林,修云芳,等.大熊猫源普通变形杆菌分离鉴定及致病性分析[J].中国兽医学,2020,50(11):1379-1388.ZENG X C, CHI X L, XIU Y F, et al. Isolation, identification and pathogenicity analysis of a strain of *Proteus vulgaris* from giant panda [J]. Chinese veterinary science, 2020, 50(11): 1379-1388 (in Chinese with English abstract).
- [15] 黄杰,安佳星,易弋,等.罗非鱼致病性普通变形杆菌的分离鉴定[J].畜牧与兽医,2020,52(9):94-98.HUANG J, AN J X, YI Y, et al. Isolation and identification of pathogenic *Proteus*

- vulgaris* from tilapia[J]. Animal husbandry & veterinary medicine, 2020, 52(9): 94-98 (in Chinese with English abstract).
- [16] 李權年, 余为一, 祖国掌, 等. 中华鳖普通变形杆菌的分离鉴定及其致病性研究[J]. 中国兽医科技, 1999, 29(3): 28-30. LI J N, YU W Y, ZU G Z, et al. Isolation, identification and pathogenicity of *Proteus vulgaris* from *Trionyx sinensis* [J]. Chinese veterinary science, 1999, 29(3): 28-30 (in Chinese).
- [17] 许兵, 纪伟尚, 徐怀怨. 一种新的对虾病原菌(普通变形菌) [J]. 水产学报, 1992, 16(2): 130-136. XU B, JI W S, XU H S. *Proteus vulgaris*: a new pathogen in *penaeus orientalis* [J]. Journal of fisheries of China, 1992, 16(2): 130-136 (in Chinese with English abstract).
- [18] 柯文杰, 覃华斌, 陈言峰, 等. 25种中草药对普通变形杆菌的体外抑菌试验[J]. 水产科技情报, 2019, 46(6): 328-331. KE W J, QIN H B, CHEN Y F, et al. *In vitro* bacteriostatic test of 25 Chinese herbal medicines against *Proteus vulgaris* [J]. Fisheries science & technology information, 2019, 46(6): 328-331 (in Chinese).
- [19] 李培龙, 王滨, 王玉健. 普通变形杆菌严重污染引起的食物中毒[J]. 河北医学, 2000, 6(6): 574-576. LI P L, WANG B, WANG Y J. Food poisoning caused by serious pollution of *Proteus vulgaris* [J]. Hebei medicine, 2000, 6(6): 574-576 (in Chinese).
- [20] BILAL S, ANAM S, MAHMOOD T, et al. Antimicrobial profiling and molecular characterization of antibiotic resistant genes of *Proteus vulgaris* isolated from tertiary care hospital, Islamabad, Pakistan [J]. Pakistan journal of pharmaceutical sciences, 2019, 32(6): 2887-2891.
- [21] 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. HAN Y N, YU Y C, WANG X Y, et al. Identification and sensitive drug test of pathogenic *Proteus vulgaris* from *Rana catesbeiana* [J]. Microbiology China, 2016, 43(6): 1280-1287 (in Chinese with English abstract).
- [22] 董靖, 张露珊, 刘绍春, 等. 1株克氏原螯虾肺炎克雷伯菌的分离鉴定及药物敏感性分析[J]. 华中农业大学学报, 2021, 40(1): 93-98. DONG J, ZHANG L S, LIU S C, et al. Isolation, identification and susceptibility analysis of pathogenic *Klebsiella pneumonia* from diseased *Procambarus clarkii* [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2021, 40(1): 93-98 (in Chinese with English abstract).
- [23] 杜嘉楠, 吴晨薇, 叶颖萱, 等. 蛙类常见传染病介绍及病原学鉴定研究进展[J]. 今日畜牧兽医, 2019, 35(8): 63-64. DU J N, WU C W, YE Y X, et al. Research progress on introduction and pathogen identification of common infectious diseases in frogs [J]. Today animal husbandry and veterinary medicine, 2019, 35(8): 63-64 (in Chinese).
- [24] RANI M K, CHELLADURAI G, JAYANTHI G. Isolation and identification of bacteria from marine market fish *Scomberomorus guttatus* (Bloch and Schneider, 1801) from Madurai district, Tamil Nadu, India [J]. Journal of parasitic diseases, 2016, 40(3): 1062-1065.
- [25] 杨移斌, 余琳雪, 杨秋红, 等. 斑点叉尾鲷源普通变形杆菌的分离、鉴定及药敏特性[J]. 微生物学通报, 2017, 44(10): 2391-2397. YANG Y B, YU L X, YANG Q H, et al. Isolation, identification and drug sensitivity of *Proteus vulgaris* from channel catfish [J]. Microbiology China, 2017, 44(10): 2391-2397 (in Chinese with English abstract).
- [26] 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. YANG X, WU X Z. Pathogenic *Proteus vulgaris* found in redspotted grouper *Epinephelus akaara* [J]. Fisheries science, 2005, 24(9): 5-7 (in Chinese with English abstract).
- [27] RAHIM H R. Isolation and identification of some bacteria content in burn wounds in misan, Iraq [J]. Archives of razi institute, 2021, 76(6): 1665-1670.
- [28] 侯志余. 普通变形杆菌噬菌体的分离鉴定及其裂解酶的表达和纯化[D]. 成都: 西南民族大学, 2022. HOU Z Y. Isolation and identification of *Proteus vulgaris* phage and expression and purification of its lyase [D]. Chengdu: Southwest University for Nationalities, 2022 (in Chinese with English abstract).
- [29] 柯文杰, 孙斌斌, 覃华斌, 等. 加州鲈源普通变形杆菌分离、鉴定及药敏分析[J]. 水产学杂志, 2020, 33(2): 29-34. KE W J, SUN B B, QIN H B, et al. Isolation, identification and drug sensitivity of *Proteus vulgaris* from diseased largemouth bass *Micropterus salmoides* [J]. Chinese journal of fisheries, 2020, 33(2): 29-34 (in Chinese with English abstract).
- [30] WANG Y, OUYANG J H, LUO X J, et al. Identification and characterization of novel bi-functional cathelicidins from the *Pelophylax nigromaculatus* with both anti-infective and antioxidant activities [J/OL]. Developmental & comparative immunology, 2021, 116: 103928 [2023-09-19]. <http://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103928>.
- [31] WANG J J, DOU X J, SONG J, et al. Antimicrobial peptides: promising alternatives in the post feeding antibiotic era [J]. Medicinal research reviews, 2019, 39(3): 831-859.
- [32] XIONG Y Q, YEAMAN M R, BAYER A S. *In vitro* antibacterial activities of platelet microbicidal protein and neutrophil defensin against *Staphylococcus aureus* are influenced by antibiotics differing in mechanism of action [J]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1999, 43(5): 1111-1117.

Isolation, identification and susceptibility of a pathogenic *Proteus vulgaris* isolated from diseased *Pelophylax nigromaculatus*

ZHANG Yuze^{1,2}, ZHANG Defu², YANG QiuHong¹, ZHOU Shun¹, AI Xiaohui¹, DONG Jing¹

1. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;

2. College of Food Science and Engineering, Bohai University, Jinzhou 121013, China

Abstract To clarify the cause of mortality in *Pelophylax nigromaculatus*, a pathogenic bacterial strain designated B20200824 was isolated from the brain, spine, liver, and kidney of diseased *P. nigromaculatus*. The strain was identified through physiological and biochemical assays, 16S rRNA sequencing, and phylogenetic analysis. Subsequently, the susceptibility and minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined using the Kirby-Bauer (K-B) and broth micro-dilution methods, respectively. After identification, the strain was characterized as a Gram-negative short bacillus with biochemical properties consistent with those of *Proteus vulgaris*. Moreover, 16S rRNA sequencing and phylogenetic analysis revealed that the strain exhibited a close genetic relationship with *P. vulgaris*, which shared over 99% genetic homology. Consequently, strain B20200824 was identified as *P. vulgaris*. The results of the drug susceptibility test showed that the strain was resistant to norfloxacin, amoxicillin, enrofloxacin, and 3 other drugs; it showed intermediate resistance to doxycycline and erythromycin, and susceptible to azithromycin, cefotaxime, florfenicol, and 2 other drugs. The MIC of florfenicol was 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, while the MICs for imipenem, levofloxacin, and azithromycin were 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and for cefotaxime it was 0.061 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. These results were consistent with those obtained from the susceptibility assay. Taken together, these findings demonstrate that *P. vulgaris* can cause disease in *P. nigromaculatus*, and florfenicol is recommended for controlling infections caused by *P. vulgaris* in clinical practice.

Keywords *Pelophylax nigromaculatus*; *Proteus vulgaris*; susceptibility test; antibiotic resistance

(责任编辑:边书京)