

大鲵腹水病病原菌的分离与鉴定研究

孟彦^{1,2},曾令兵¹,杨焱清¹,肖汉兵¹

(1 中国水产科学研究院 长江水产研究所 农业部淡水生物多样性保护与利用重点开放实验室,湖北 荆州 434000;
2 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心,江苏 无锡 214081)

【摘要】 【目的】确定导致大鲵(*Andrias davidianus*, giant salamander)腹水病的主要病原菌类型。【方法】从患病大鲵的腹水和肠道分离细菌并进行纯培养,用细菌自动鉴定系统和分子生物学方法对培养细菌进行鉴定,再对 52 尾健康的 1 龄大鲵进行感染试验,以确定病原菌,同时对病原菌进行药物敏感试验。【结果】经过细菌自动鉴定系统确定了 4 株细菌,室内感染试验确定嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)为主要致病菌;细菌 16S rDNA 基因序列分析也再次证明该菌为嗜水气单胞菌;药物敏感试验显示,该病原菌对庆大霉素、环丙沙星、阿米卡星等药物敏感,对氨卞青霉素、舒巴坦、头孢唑啉等药物具有抗性。【结论】导致大鲵腹水病的主要病原菌为嗜水气单胞菌。

【关键词】 大鲵;腹水病;嗜水气单胞菌
【中图分类号】 S941. 3 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2009)03-0077-05

Isolation and identification of the ascitesosis disease pathogen
of giant salamander, *Andrias davidianus*

MENG Yan^{1,2}, ZENG Ling-bing¹, YANG Yan-qing¹, XIAO Han-bing¹

(1 Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation and Utilization, Gertificated by Ministry of Agriculture, Jingzhou, Hubei 434000, China;
2 Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi, Jiangsu 214081, China)

Abstract: 【Objective】 The research identified the pathogenic bacterias of giant salamander (*Andrias davidianus*) that suffered from ascites disease. 【Method】 Bacteria were isolated from the intestine and ascites of two freshly died giant salamanders. Fifty two Giant salamanders were used to make experimental infection with injection bacterial suspension by intraperitoneal injection. The bacteria were identified by the Gram's staining, VITEK Bacterial Automatic Identification System and sequence analysis of 16S rDNA gene. 【Result】 Four different bacteria were isolated and finally the bacterium 2[#] FS, which was identified as *Aeromonas hydrophila*, copied the typical diseased symptoms naturally. So the *Aeromonas hydrophila* was the main pathogen of ascitesosis disease pathogen of giant salamander. Sequence analysis of 16S rDNA showed that the main pathogen was *Aeromonas hydrophila* too. The susceptibility test to antibiotics revealed the isolated pathogen was resistant to Ampicillin etc and sensitive to Ciprofloxacin, etc. 【Conclusion】 *Aeromonas hydrophila* was the pathogenic bacteria resulted in ascites disease of gaint salamander.

Key words: giant salamander(*Andrias davidianus*); Ascitesosis disease; *Aeromonas hydrophila*

大鲵(*Andrias davidianus*)俗称娃娃鱼,是国家二级保护动物,并且被列入 CITES 公约(濒危野

* [收稿日期] 2008-04-30
[基金项目] 农业科技成果转化项目(05EFN216900350);国家科技支撑计划专项(2006BAD03B08-04);国家科技基础条件平台专项(2006DKA30470-002);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目
[作者简介] 孟彦(1979—),女,陕西西安人,在读博士,研究实习员,主要从事水产病害研究。E-mail: mengyanlh@163. com
[通信作者] 肖汉兵(1963—),男,湖北天门人,研究员,主要从事大鲵遗传育种研究。E-mail: xiaohb@yfi. ac. cn

生动植物种国际贸易公约)种类目录中,是现存个体最大的两栖类动物,有很重要的科研价值及药用和营养价值。但是,由于人为捕猎和自然环境的改变,野生大鲵数量急剧下降^[1],基于保护和开发利用的目的,目前兴起了大鲵的人工养殖。人工养殖很难完全模仿自然状态下大鲵的生活环境,加之对大鲵的一些生活习性尚不清楚,所以在饲养过程中出现了诸多问题,其中疾病是影响大鲵养殖业发展的重要因素之一。大鲵规模化养殖中发生的主要疾病有腹水病、腐皮病和烂尾病等十多种^[2],但以腹水病危害最为严重。大鲵腹水病又称大鲵腹肿胀病,多发生在室温和水温均较高的 6~10 月份。各种饲养阶段和不同规格的大鲵均可感染,但以 1 龄左右的大鲵发病率最高。患病大鲵初期食量迅速下降、体重减轻、反应迟钝、离群独游或匍匐在池壁四周;随后在背部出现出血点,腹部、头部手摸有积水感;不吃不动,漂浮于水中身体失去平衡;伴随病症的发展,腹部、头部积水明显增多;病情严重者腹部上翻,眼球外凸,眼睛周围有白膜覆盖;剖检后发现腹腔大量积水,胃肠内无食物,肠壁充血有炎症,后肠充满泡沫状粘稠物质,肝肿大且有出血点。如果病鲵发现晚则很难治疗,死亡率较高。

目前,对于该病的研究还很少^[2],叶小丽^[3]和欧东升^[4]对该病有简单报道,但这些研究均缺乏有力的试验证据。本研究对大鲵腹水病的病原进行了分离与鉴定,确定了导致大鲵腹水病的主要病原菌,以期为大鲵腹水病的防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2006 年从浙江某大鲵人工养殖场,采集处于濒死状态下的大鲵于 -20 ℃ 冷冻带回实验室。病鲵最典型的症状为腹部水样肿胀,剖检后腹腔内有大量澄清或带血色样的积水,肠道充血或失血,肝脏有出血点,脾脏出血。52 尾供试 1 龄健康大鲵同样取自该大鲵养殖场,体质量约 0.2 kg,体长 12~15 cm,将其在水温 19~21 ℃ 的盆内暂养 1 周后用于试验。

1.2 主要试剂

酵母提取物、胰蛋白胨、DPBS 缓冲液、琼脂糖等试剂购自 Sigma 公司;细菌总基因组提取试剂盒 GenElute Bacterial Genomic DNA Kit 购自 Sigma 公司,PCR 扩增试剂盒 PCR Core System II 购自 Promaga 公司,PCR 产物纯化试剂盒 Gel Extrac-

tion Kit 购自 OMEGA 公司。

1.3 引物设计与合成

采用 16S rDNA 基因引物序列进行 PCR 扩增。引物序列为:5'-GAAAGGTTGATGCCTAAT-ACGTA-3' (451~473 bp);5'-CGTGCTGGCAA-CAAAGGACAG-3' (1 115~1 135 bp)^[5]。引物由上海生工生物工程公司合成。

1.4 大鲵腹水病病原菌的分离

取濒死幼鲵 2 尾(分别设为 1[#] 和 2[#]),于无菌条件下取其腹水和肠道组织,分别接种于 LB 液体和固体培养基,分别在 28 和 37 ℃ 条件下培养。对 18~24 h 后分离到的细菌进行纯培养获得 4 株细菌,分别记为 1[#] FS、1[#] CD、2[#] FS 和 2[#] CD。

1.5 细菌的初步鉴定

将纯培养的细菌在法国梅里埃公司 VITEK 细菌自动鉴定仪上进行鉴定,同时利用该仪器进行药物敏感性检测。

1.6 细菌的致病性

将分离的细菌在固体 LB 培养基中于 37 ℃ 培养过夜后,挑取单个细菌克隆在 28 ℃ 液体 LB 培养基内进行悬浮培养,在 4 ℃、4 000 r/min 条件下离心 30 min 弃上清,加 DPBS 悬浮细菌。用 A₆₀₀ 光密度比浊法结合 LB 琼脂平板计数法计算菌液浓度,分别制备 3 个浓度梯度的菌悬液(1×10⁶,1×10⁷ 和 1×10⁸ CFU/mL)备用。将 52 尾室内暂养 1 周的健康大鲵随机均分为 13 组,进行感染试验,其中一组为对照组,其余 12 组分别接种 4 株细菌不同浓度的菌悬液。感染试验于 19~20 ℃ 在盆内进行。试验组以 0.1 mL/尾的剂量进行腹腔基部注射接种菌悬液,对照组以 0.1 mL/尾的剂量腹腔注射 DPBS。感染后连续观察 10 d,期间定期饲喂剪碎的虾料,记录死亡数并剖检死亡大鲵。

1.7 大鲵腹水病病原的分子生物学鉴定

1.7.1 细菌 DNA 的提取 将纯培养的菌悬液以 4 000 r/min 离心后收集沉淀,然后根据细菌总基因组提取试剂盒 GenElute Bacterial Genomic DNA Kit 的使用说明进行操作。对感染试验中具有致病性的病菌 2[#] FS,即嗜水气单胞菌的 16S rDNA 基因部分序列进行 PCR 扩增。

1.7.2 细菌 16S rDNA 的 PCR 扩增 PCR 反应体系为 50 μL,包括 5 μL 10×buffer,1 μL 10 μmol/L dNTPs,1 μL 25 mmol/L Mg²⁺,10 μmol/L 上、下游引物各 2 μL,1 μL 5 U/μL Taq DNA 聚合酶,2 μL 模板 DNA,36 μL 双蒸水。反应条件为:94 ℃ 预

变性 3 min;94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃复性 45 s,72 ℃延伸 10 min,共 35 个循环;最后 4 ℃保存。扩增产物用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测回收后克隆测序。

2 结果与分析

2.1 由患病大鲵分离细菌的菌落形态特征

由患病大鲵分离的细菌,在普通固体 LB 培养基上培养 16~24 h 后,出现 1[#] FS、1[#] CD、2[#] FS 和 2[#] CD 4 种不同形态的菌落。1[#] FS 菌落直径 0.5 mm,圆形,隆起,湿润,半透明,露滴状,为革兰氏阴

性;1[#] CD 菌落直径 3 mm 左右,灰白色,不透明,似融蜡状,为革兰氏阳性;2[#] FS 形成四周光滑的乳白色扁平菌落,为革兰氏阴性;2[#] CD 菌落直径约 1 mm,灰白色,圆形,边缘整齐,表面湿润,为革兰氏阴性。

2.2 由患病大鲵分离细菌的生理生化鉴定结果

4 株细菌(1[#] FS、1[#] CD、2[#] FS、2[#] CD)经过生理生化试验(表 1)及自动细菌分析系统鉴定后,分别确定为洛菲氏不动杆菌、腊样芽孢杆菌、嗜水气单胞菌和费氏枸橼酸杆菌。鉴定结果见表 1。

表 1 由患病大鲵分离的 4 株细菌的生化反应特征
Table 1 Characteristics of biochemistry reaction of 4 bacterial strains isolated from disease salamander

反应项目 Reaction item	1 [#] FS	1 [#] CD	2 [#] FS	2 [#] CD	反应项目 Reaction item	1 [#] FS	1 [#] CD	2 [#] FS	2 [#] CD
动力学 Dynamics	—		+	+	阳性生长控制 GC	+		+	+
甘露糖 MNE			+		木糖 XYL	—	—	—	+
28 ℃生长 28 ℃ Growth	+		+	+	香豆酸 COU	—		—	—
37 ℃生长 37 ℃ Growth	+		+	+	乙酰胺 ACE			—	—
阿拉伯糖 ARA	+	—	+	+	七叶树苷 ESC	—		+	—
水杨酸 Salicylic Acid		—	—		尿素 URE	—		—	+
蔗糖 SCU	—		+	+	半乳糖苷酶 ONP	—		—	+
核糖醇 ADO	—		—	—	丙二酸盐 MAL	—		—	+
肌醇 INO	—	—	+	—	多粘菌素 B PXB	—		—	+
麦芽糖 MLT	—	+	+	+	硫化氢 H2S	—		—	+
葡萄糖氧化 OFG	—		+	+	β-溶血 β-haemolytic	—	+	+	
靛基质 Indole			—	—	鸟氨酸 ORN	—		—	—
赖氨酸 LYS	—		—	—					

注:+, 阳性;—, 阴性。
Note: +, Positive; —, Negative.

2.3 由患病大鲵分离细菌的药物敏感试验

表 2 表明,由患病大鲵分离的 4 株细菌对不同

药物的耐药性不同,但是均对环丙沙星和庆大霉素敏感。

表 2 由患病大鲵分离的 4 株细菌的药物敏感试验结果

Table 2 Experimental results of medicament susceptibility of 4 bacterial strains isolated from disease salamander

药物 Medicament	耐药性 Antibiotic resistance			
	1 [#] FS	1 [#] CD	2 [#] FS	2 [#] CD
卡那霉素 Amikacin			S	
氨卞西林 Ampicillin		R	R	S
舒巴坦 Sulbactam		R	R	
头孢唑啉 Cefazolin			R	R
头孢吡肟 Cefepime	S		S	S
头孢他啶 Ceftazidime	S		S	S
头孢三嗪 Ciftriaxone	S		S	S
环丙沙星 Ciprofloxacin	S	S	S	S
庆大霉素 Gentamicin	S	S	S	S
哌拉西林/他巴克坦 Piperacillin/Tazobactam	S		R	S

注: S, 敏感; R, 耐药。
Note: S, Susceptivity; R, Resistance.

2.4 由患病大鲵分离细菌的致病性

在注射 4 种不同细菌不同浓度菌悬液 19 h 后,注射 2[#] FS(嗜水气单胞菌)1×10⁸ CFU/ mL 剂量

组中的 2 尾大鲵出现了腹水症状,其中一尾症状非常明显并于 25 h 时死亡,注射 53 h 后该组大鲵全部死亡,死亡症状与自然情况下大鲵腹水症状一致;而

注射 2[#] FS 1×10⁷ CFU/mL 剂量组的大鲵在注射 47 h 时有 2 尾出现轻微腹水症状,但在第 5 天症状消失。而其他注射组直至观察结束也未发现任何死亡现象,而且在整个过程中对照组大鲵均健康。说明 2[#] FS,即嗜水气单胞菌应是大鲵腹水病的主要致病菌。

2.5 大鲵腹水病病原的 16S rDNA 序列分析

PCR 扩增结果(图 1)显示,获得了 2[#] FS 样本 700 bp 左右的 16S rDNA 片段。

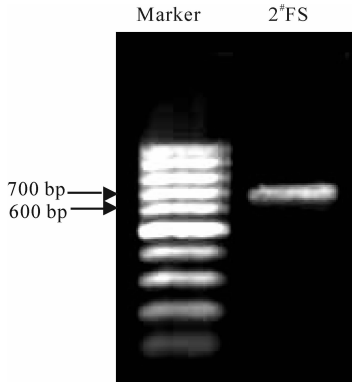


图 1 大鲵腹水病病原菌株 2[#] FS 16S rDNA 基因扩增产物的电泳结果

Fig. 1 Amplified product of 16S rDNA of strain 2[#] FS of ascitesis disease pathogen of giant salamander detected in electrophoresis

测序结果表明,2[#] 腹水菌株 16S rDNA 长度为 702 bp,通过比对发现,有 117 条与测序序列相似度在 94% 以上的序列,其中测序序列与嗜水气单胞菌标准菌株 CCM7232 (DQ207728)、ATCC7966 (CP000462) 的相似度达 98%,而且与菌株 AM184306(来自河水)等嗜水气单胞菌分离株的相似度也高达 98%,说明该菌株为嗜水气单胞菌。

3 讨论

本试验通过分离、鉴定和人工感染试验最终确定,引起大鲵腹水病的主要病原菌为嗜水气单胞菌。大鲵腹水病主要发生在温度较高的 6~10 月份,各种规格大鲵都可以感染,但以 1 龄左右的幼鲵为主要感染对象,发病率和死亡率都很高。作为一种条件致病菌,嗜水气单胞菌广泛存在于水环境中^[6],是引起水产生物病害的重要病原体^[7-10]。据报道,在许多淡水养殖品种中,都存在由嗜水气单胞菌感染引起的病害^[11-15]。夏季由于温度高,水体中容易富集养分造成水体污染,而且高温还会使鱼体抵抗力下降,所以当水体环境恶化、水温升高或者机体对外

界环境的抵抗力下降时,嗜水气单胞菌就会“趁虚而入”造成机体感染^[16]。尤其在人工规模化养殖条件下,因养殖密度大、养殖水体循环缓慢,这些都为嗜水气单胞菌的增殖和感染提供了有利条件。该菌有许多毒力很强的因子,如气溶素、溶血素、胞外蛋白酶、S 层蛋白等^[8,17-19],可以引起鱼类不同的症状。2006 年,Zheng 等^[20]在 NCBI 的核苷酸上提交了从大鲵上分离到的嗜水气单胞菌序列(GI: 118162048);叶小丽^[3]根据患腹水病大鲵体表症状和解剖情况,并参考其他鱼类的患病资料,初步判断大鲵腹水病可能是由嗜水气单胞菌感染引起的;而欧东升^[4]从因腹水症导致死亡的大鲵体内分离到嗜水性单胞菌、粪肠球菌、异型枸橼杆菌和大肠杆菌,因此认为该病可能是多种细菌混合作用所致。本次试验还分离到洛菲氏不动杆菌、蜡样芽孢杆菌和费氏枸橼酸杆菌 3 种菌。有研究表明,洛菲氏不动杆菌可引起美国青蛙“抽搐症”,表现症状有腹胀,剖检腹腔内有透明或淡红色腹水等^[19];费氏枸橼酸杆菌曾经引起乌鳢的腹水症^[21];蜡样芽孢杆菌可以导致人的食物中毒,但本试验用这 3 种菌制备的菌悬液对大鲵进行人工感染试验,结果并未发现其具有致病性。

目前细菌的鉴定方法,除了采用传统的形态学鉴定外,还常辅助以细菌自动鉴定系统和细菌 16S rDNA 序列为主的分子生物学鉴定。本试验利用细菌自动鉴定系统和细菌 16S rDNA 序列分析均表明,导致大鲵腹水病的菌株为嗜水气单胞菌。药物敏感试验结果表明,大鲵腹水病的病原菌嗜水气单胞菌对庆大霉素、环丙沙星等药物敏感,对氨基青霉素、舒巴坦等药物具有耐药性,该结果可以初步为大鲵养殖中腹水症的预防和治疗提供一定依据。

[参考文献]

[1] Wang X M, Zhang K J, Wang Z H, et al. The decline of the Chinese giant salamander *Andrias davidianus* and implications for its conservation [J]. Cambridge Journal, 2004, 38: 197-202.
[2] 陈祥云, 陈新民. 大鲵病害研究综述 [J]. 渔业现代化, 2006 (5): 25-27.
Chen X Y, Chen X M. Review of giant salamander disease [J]. Fishery Modernization, 2006(5): 25-27. (in Chinese)
[3] 叶小丽. 大鲵腹水病的诊断与治疗 [J]. 水产养殖, 2001(6): 19.
Ye X L. The diagnosis and treatment of giant salamander suffered from ascites [J]. Journal of Aquaculture, 2001(6): 19. (in Chinese)
[4] 欧东升. 人工养殖条件下大鲵病害防治初探 [J]. 内陆水产,

- 2005(8):17-18.
- Ou D S. Disease control of giant salamander under artificial breeding conditions [J]. Journal of Inland Fisheries, 2005(8): 17-18. (in Chinese)
- [5] 储卫华,陆承平. PCR 扩增特异性 16S rDNA 和溶血素基因检测致病性嗜水气单胞菌 [J]. 水产学报, 2005, 29(1): 79-82.
- Chu W H, Lu C P. PCR detection of pathogenic *Aeromonas hydrophila* by specific 16S rDNA and aerolysin gene [J]. Journal of Fisheries of China, 2005, 29(1): 79-82. (in Chinese)
- [6] Hristo D. The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety [J]. Food Control, 2006, 17: 474-483.
- [7] Elwitigala J P, Higgs D S, Namnyak S, et al. Septic arthritis due to *Aeromonas hydrophila*: case report and review of the literature [J]. Int J Clin Pract, 2005, 59 (Suppl): 121-124.
- [8] 朱大玲,李爱华,汪建国,等. 嗜水气单胞菌毒力与毒力基因分布的相关性 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2006, 45(1): 80-84.
- Zhu D L, Li A H, Wang J G, et al. The correlation between the distribution pattern of virulence genes and the virulence of *Aeromonas hydrophila* strains [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni: Natureal Science Edition, 2006, 45(1): 80-84. (in Chinese)
- [9] Vivas J, Carracedo B, Riano J, et al. Behavior of an *Aeromonas hydrophila* *araA* live vaccine in water microcosms [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70: 2702-2708.
- [10] Li A H, Yang W M, Hu J, et al. Optimization by orthogonal array design and humoral immunity of the bivalent vaccine against *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio fluvialis* infection in crucian carp (*Carassius auratus* L) [J]. Aqua Res, 2006, 37: 813-820.
- [11] 刘堂水,汪成竹,陈昌福. 斑点叉尾鮰细菌性病原的分离与鉴定 [J]. 华中农业大学学报, 2006, 25(2): 550-554.
- Liu T S, Wang C Z, Chen C F. Isolation and identification of pathogenic bacteria from Channel Catfish, *Ictalurus punctatus* [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2006, 25(2): 550-554. (in Chinese)
- [12] 曾纪锋,王君. 鳖嗜水气单胞菌败血症的病理学观察 [J]. 海南大学学报: 自然科学版, 2000, 18(3): 270-272.
- Zeng J F, Wang J. Pathological observation on the *Aeromonas Hydrophila* septicemia of *Trionyx Sinensis* [J]. Natural Science Journal of Hainan University: Natureal Science Edition, 2000, 18(3): 270-272. (in Chinese)
- [13] 文祝友,刘晓燕,金燮理,等. 三角帆蚌嗜水气单胞菌病的病理研究 [J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2001, 27(1): 56-59.
- Wen Z Y, Liu X Y, Jin X L, et al. Study on pathology of hyriopsis cumingii lea disease caused by *Aeromonas hydrophila* [J]. Journal of Hunan Agricultural University: Natureal Science Edition, 2001, 27(1): 56-59. (in Chinese)
- [14] 饶静静,李寿松,黄克和,等. 致病性嗜水气单胞菌多重 PCR 检测方法的建立 [J]. 中国水产科学, 2007, 14(5): 749-755.
- Rao J J, Li S S, Huang K H, et al. Development of multiplex polymerase chain reaction for detection of pathogenic *aeromonas hydrophila* and its preliminary application [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(5): 749-755. (in Chinese)
- [15] 杜雄伟,于博,李叶,等. 剑尾鱼感染嗜水气单胞菌的动态病理变化观察 [J]. 中国兽医科技, 2004, 34(10): 22-25.
- Du X W, Yu B, Li Y, et al. Observation on dynamic pathological of *Xiphophorus helleri* infected with *Aeromonas hydrophila* [J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 2004, 34(10): 22-25. (in Chinese)
- [16] Maji S, Mali P, Joardar S N. Immunoreactive antigens of the outer membrane protein of *Aeromonas hydrophila*, isolated from goldfish, *Carassius auratus* (Linn.) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2006, 20: 462-473.
- [17] Ma G A A, Cesar H R, Gerardo Z, et al. *Aeromonas hydrophila* clinical and environmental ecotypes as revealed by genetic diversity and virulence genes [J]. FEMS Microbiol Lett, 2005, 242: 231-240.
- [18] Tanmay M, Shubhamo Y G, Joydeb P, et al. Possible role of a plasmid in the pathogenesis of a fish disease caused by *Aeromonas hydrophila* [J]. Aquaculture, 2006, 256: 95-104.
- [19] 叶雪平,罗毅志,施伟达,等. 美国青蛙“抽搐症”病原及防治研究 [J]. 淡水渔业, 2005, 35(5): 48-50.
- Ye X P, Luo Y Z, Shi W D, et al. Pathogens and control of America frog “convulsion disease” [J]. Freshwater Fisheries, 2005, 35(5): 48-50. (in Chinese)
- [20] Zheng Z, Tan Z, Sun L. Isolation and identification of *Aeromonas hydrophila* from *Andrias davidianus* [EB/OL]. (2006-10-23). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=118162048>.
- [21] 舒新华,金燮理,肖克宇,等. 乌鳢腹水病病原的分离和鉴定 [J]. 湖南农业大学学报, 1998, 24(4): 286-290.
- Shu X H, Jin X L, Xiao K Y, et al. Identification and isolation of pathogenic bacteria of Snake-head's Scitesosis [J]. Journal of Hunan Agricultural University, 1998, 24(4): 286-290. (in Chinese)