

研究报告

斑点叉尾鮰源普通变形杆菌的分离、鉴定及药敏特性

杨移斌^{1,2} 余琳雪^{1,3} 杨秋红^{1,2} 刘永涛^{1,2} 胥宁^{1,2} 杨先乐³ 艾晓辉^{1,2*}

(1. 中国水产科学研究院长江水产研究所 湖北 武汉 430223)

(2. 淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心 湖北 武汉 430223)

(3. 上海海洋大学 上海 201306)

摘要: 【目的】对患病斑点叉尾鮰进行病原菌分离、鉴定及药敏实验,为斑点叉尾鮰肠道坏死病的防控提供参考。【方法】从患病斑点叉尾鮰病灶、肝、脾和肾分离纯化病原菌,经理化特性测定及16S rRNA基因序列分析对其进行鉴定,开展人工感染试验,并利用纸片扩散法进行药敏特性分析。【结果】分离菌株k1为本次引发斑点叉尾鮰病害的致病菌,其对斑点叉尾鮰的LD₅₀为2.82×10⁵ CFU/g。菌株k1理化特性与普通变形杆菌 *Proteus vulgaris* 基本一致,16S rRNA基因序列与普通变形杆菌相似性最高,综合判定分离菌株为普通变形杆菌。分离菌株k1对环丙沙星、头孢唑林及头孢拉定等12种抗生素高度敏感,对苯唑西林、阿莫西林及痢特灵等7种抗生素耐药。【结论】分离菌株k1是斑点叉尾鮰病原菌,养殖时可选用庆大霉素及氟苯尼考等药物进行防控。

关键词: 普通变形杆菌, 斑点叉尾鮰, 鉴定, 药敏特性

Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of *Proteus vulgaris* isolated from *Ictalurus punctatus*

YANG Yi-Bin^{1,2} YU Lin-Xue^{1,3} YANG Qiu-Hong^{1,2} LIU Yong-Tao^{1,2}
XU Ning^{1,2} YANG Xian-Le³ AI Xiao-Hui^{1,2*}

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

(2. Hubei Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center, Wuhan, Hubei 430223, China)

(3. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: [Objective] We isolated, identified and tested antibiotic sensitivity of a pathogen from naturally infected *Ictalurus punctatus*. [Methods] The pathogenic bacteria were isolated and purified from lesions, liver, kidney and spleen of *Ictalurus punctatus*. Strain k1 was identified using the biochemical identification and 16S rRNA gene sequence determination. The artificial infection test was done, and antimicrobial susceptibility was tested by disc diffusion method. [Results] Strain k1 was the pathogen of *Ictalurus punctatus*, and the LD₅₀ of the isolates was 2.82×10⁵ CFU/g.

Foundation item: Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (No. 201503108-CC-1, 201203085)

*Corresponding author: E-mail: aixh@yfi.ac.cn

Received: December 26, 2016; **Accepted:** February 20, 2017; **Published online** (www.cnki.net): February 27, 2017

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项项目(No. 201503108-CC-1, 201203085)

*通讯作者: E-mail: aixh@yfi.ac.cn

收稿日期: 2016-12-26; 接受日期: 2017-02-20; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-02-27

According to morphological and biochemical characteristics as well as the result of 16S rRNA gene sequence analysis, strain k1 was identified as *Proteus vulgaris*. Strain k1 was susceptible to 12 agents including ciprofloxacin, cefazolin, cefadroxil and other antibiotics. Meanwhile, it showed resistance to oxacillin, amoxicillin, furazolidone and other 7 antibiotics. [Conclusion] Our results demonstrated that *Proteus vulgaris* was the pathogen causing high mortality in *Ictalurus punctatus*, and the disease may prevent by using drugs such as gentamicin and neomycin in fisheries.

Keywords: *Proteus vulgaris*, *Ictalurus punctatus*, Identification, Antimicrobial susceptibility

斑点叉尾鮰(*Ictalurus punctatus*)属鲶形目(Siluriformes)鮰科(Ictaluridae)^[1],原产于美洲,是美洲重要的水生经济鱼类,肉质鲜美又无肌间刺,因此深受消费者青睐。1984年湖北水产科技工作者引进国内养殖斑点叉尾鮰,因其适应国内各种养殖环境,并具有饵料来源广、广温性及生长速度快等优势,迅速在国内掀起了养殖热潮。但随着斑点叉尾鮰养殖的大规模推广,养殖户受市场高价的诱惑,养殖规模及密度不断扩大,养殖环境不断恶化,导致病害频发,已成为斑点叉尾鮰养殖业健康发展的一大障碍。目前已报道的斑点叉尾鮰细菌性病原主要有嗜水气单胞菌^[2]、温和气单胞菌^[3]、嗜麦芽寡养单胞菌^[4]、海豚链球菌^[5]、鮰爱德华氏菌^[6]、荧光假单胞菌^[7]、鲁氏耶尔森氏菌^[8]及鲍曼不动杆菌^[9]等。

2016年六七月湖北仙桃养殖场的斑点叉尾鮰出现一种病害,发病死亡率30%,引起严重经济损失。发病斑点叉尾鮰体表轻微溃烂,肛门有淡黄色液体流出,经解剖后发现肝脂变严重、轻微坏死,脾肾轻微充血,肠道严重糜烂坏死。本研究从患病死亡斑点叉尾鮰体内分离到一株高致病菌株,开展了生理生化指标测定、16S rRNA基因序列测定、系统发育分析及回归感染,并对其药物敏感性进行了测定,旨在为斑点叉尾鮰普通变形杆菌病的有效防控提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试验鱼:5尾自然患病斑点叉尾鮰取自湖北仙桃鮰鱼养殖场;健康斑点叉尾鮰规格 50 ± 1.5 g,购自湖北嘉鱼苗种场,活力强,无明显外伤,暂养7d无异常后用于实验。

1.1.2 主要试剂和仪器:普通营养琼脂、营养肉汤、水解酪蛋白琼脂购自北京陆桥生物技术有限公司;药敏纸片及细菌生化微量鉴定管购自杭州滨和微生物试剂有限公司;细菌基因组DNA提取试剂盒及PCR试剂购自生工生物工程(上海)股份有限公司。无菌操作台、摇床及高压灭菌锅购于上海博讯实业有限公司;离心机及恒温培养箱购于上海恒一科学仪器有限公司;PCR仪购于赛飞(中国)有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 病原菌分离:在无菌条件下取患病斑点叉尾鮰体表溃烂肌肉、肝、肾、脾及坏死肠道,接种于普通营养琼脂平板上。恒温 28°C 培养24h后,挑取形状、大小及颜色基本一致的菌落进行细菌纯化培养。纯化好的菌株与25%甘油混匀后保存于 -80°C 。

1.2.2 人工感染:取健康无伤病斑点叉尾鮰用于感染试验,设置试验组及对照组,每组斑点叉尾鮰为10尾,每组均设置2个重复。将分离菌株用生理盐水制成浓度为 1.2×10^9 CFU/mL的菌液,试验组斑点叉尾鮰每尾腹腔注射菌液0.1mL,对照组每尾注射等剂量生理盐水。试验期间不投喂,保持水质良好,溶氧充足,水温控制在 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。连续观察记录斑点叉尾鮰发病死亡情况,对濒死斑点叉尾鮰进行解剖及细菌再分离。

1.2.3 细菌LD₅₀测定:配制浓度为 4.2×10^{10} 、 4.2×10^9 、 4.2×10^8 、 4.2×10^7 、 4.2×10^6 CFU/mL的分离菌株菌悬液,采取腹腔注射法进行攻毒试验,注射量为0.1mL/尾,即不同组斑点叉尾鮰菌液注射剂量分别为 4.2×10^9 、 4.2×10^8 、 4.2×10^7 、 4.2×10^6 、 4.2×10^5 CFU/尾,对照组斑点叉尾鮰相同部位注射等剂量的0.65%生理盐水,每组斑点叉尾鮰均是10尾。连续观察并及时记录斑点叉尾鮰发病死亡情况,用

概率单位图解法^[10]计算半致死剂量(LD₅₀)。

1.2.4 形态学及生理生化特性测定: 对分离菌株进行革兰氏染色,并在光学显微镜下观察其形态特征。采用细菌生化微量反应管,参照《常见细菌系统鉴定手册》^[11]对分离菌株生理生化指标进行测定。

1.2.5 16S rRNA 基因序列测定及系统发育分析: 将分离菌株接种于营养肉汤中,取处于对数生长期的菌液离心(4 °C, 12 000 r/min) 1 min 后收集菌体,经试剂盒提取 DNA 后作为 PCR 扩增模板。上游引物 27F: 5'-AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3'; 下游引物 1492R: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3',由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。参照曹海军等^[12]方法进行 PCR 扩增,50 μL PCR 反应体系: 10×PCR buffer 5 μL, dNTPs (10 mmol/L) 1 μL, 上、下游引物(10 mmol/L)各 1 μL, rTaq DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.5 μL, DNA 模板 2 μL, ddH₂O 补足至 50 μL。PCR 反应条件: 95 °C 4 min; 94 °C 45 s, 56 °C 45 s, 72 °C 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 8 min。将 PCR 扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司纯化及测序。将测序结果与 NCBI 中已有序列进行 BLAST 比对,并利用 MEGA 5.1 软件中 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。

1.2.6 药敏特性分析: 参照 NCCLS 实验标准^[13],采用纸片扩散法开展药敏实验。将分离菌株接种于营养肉汤培养基中,用生理盐水调整菌液浓度为 1.5×10⁷ CFU/mL。取 200 μL 菌液均匀涂布于水解酪蛋白琼脂平板上,贴上不同的药敏纸片,置于 28 °C 恒温培养 24 h 后测量抑菌圈大小。

2 结果与分析

2.1 细菌分离

从自然患病斑点叉尾鮰肝、肾、脾及坏死肠道分离到同一株高致病菌株 k1。经人工感染研究,实验组斑点叉尾鮰出现死亡,而对照组没有出现异常情况。感染发病死亡斑点叉尾鮰出现体表轻微出血,肛门有大量黄色液体流出;解剖发现肝、肾及脾严重充血,肠道糜烂及轻微坏死。从感染致

死斑点叉尾鮰的肝、肾、脾及坏死肠道分离到与菌株 k1 生理生化特性一致的菌落,因此证实 k1 株为斑点叉尾鮰致病菌。根据建立的实验鱼死亡率(%)与分离菌株注射剂量对数[lg(CFU)]的关系曲线: $y=21x-106.02$ (表 1、图 1), k1 株对斑点叉尾鮰的半数致死剂量 LD₅₀=1.41×10⁷ CFU/50 g,即 LD₅₀=2.82×10⁵ CFU/g。

2.2 细菌鉴定

k1 株为革兰氏阴性菌,详细理化特性如表 2 所示, k1 菌株理化特性与普通变形杆菌 *Proteus vulgaris* 基本一致。k1 的 16S rRNA 基因序列片段大小为 1 395 bp, GenBank 登录号为 KY118917,将测序结果与 NCBI 中已有序列 BLAST 比对,比对结果表明分离株 k1 与变形杆菌种类同源性最高,选取同源性高的变形杆菌属及水产重要病原菌的 16S rRNA 基因序列,构建系统发育树进行分析(图 2),菌株 k1 在发育树上与普通变形杆菌 *Proteus*

表 1 分离株对斑点叉尾鮰 LD₅₀ 试验结果
Table 1 Results of LD₅₀ of isolation strain in *Ictalurus punctatus*

组别 Group	注射剂量 Injected dose (CFU/unit tail)	实验鱼数量 Fish number (unit tail)	死亡数量 Amount of death (unit tail)	死亡率 Mortality (%)
A	4.2×10 ⁹	10	10	100
B	4.2×10 ⁸	10	8	80
C	4.2×10 ⁷	10	4	40
D	4.2×10 ⁶	10	3	30
E	4.2×10 ⁵	10	2	20
F	0.65% 生理盐水	10	0	0

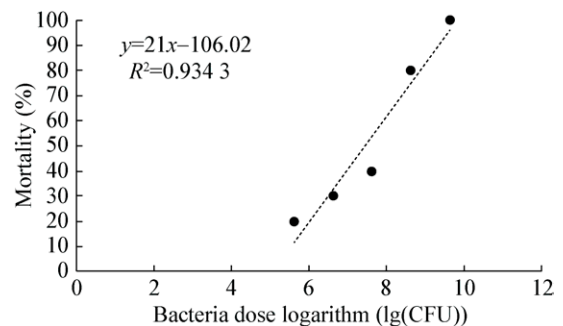


图 1 斑点叉尾鮰死亡率与细菌剂量对数的关系曲线
Figure 1 The relation curve of *Ictalurus punctatus* mortality with logarithm of bacteria dose

vulgaris 聚为一支。综合判定分离菌株 k1 为普通变形杆菌 *Proteus vulgaris*。

2.3 药敏特性

研究了分离菌株 k1 对 19 种抗生素的敏感特性, 结果见表 3。分离菌株 k1 对环丙沙星、头孢唑

林、头孢拉定、氯霉素、氟苯尼考、诺氟沙星、阿奇霉素、新霉素、卡那霉素、左氧氟沙星、庆大霉素及丁胺卡那霉素高度敏感, 对苯唑西林、阿莫西林、痢特灵、克林霉素、利福平、红霉素及多西环素不敏感。

表 2 菌株 k1 的生理生化试验结果
Table 2 Results of biochemical characteristics of strain k1

试验项目 Test items	k1	普通变形杆菌 <i>Proteus vulgaris</i>	试验项目 Test items	k1	普通变形杆菌 <i>Proteus vulgaris</i>
吲哚产生 Indole produce	+	+	D-葡萄糖产气 D-glucose gas	+	(+)
甲基红 Methyl red test	+	+	乳糖 Lactose	-	-
V-P 试验 V-P experiment	-	-	蔗糖 Sucrose	+	+
柠檬酸盐 Citrate	-	(-)	D-甘露醇 D-mannitol	-	-
H ₂ S	+	+	卫矛醇 Galactitol	-	-
脲酶 Urease	+	+	水杨苷 Salicin	+	(+)
苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase	+	+	D-阿东醇 D-adonitol	-	-
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	-	-	肌醇 Inositol	-	-
精氨酸水解酶 Arginine hydrolase	-	-	阿拉伯糖 Arabinose	-	-
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-	-	氧化酶 Oxidase	-	-
运动性 Motility	+	+	七叶灵水解 Esculin hydrolysis	+	(+)
明胶液化 Gelatin liquefaction	+	+	木糖 Xylose	+	+
KCN 生长 KCN growth	+	+	纤维二糖 Cellobiose	-	-
丙二酸盐 Malonate	-	-	脂酶 Lipase	+	(+)
D-葡萄糖产酸 D-glucose produce acid	+	+	ONPG	-	-

注: +: 阳性; -: 阴性; (+): 阳性反应超过 24 h; (-): 阴性反应超过 24 h.

Note: +: Positive; -: Negative; (+): The time of positive reaction exceed 24 h; (-): The time of negative reaction exceed 24 h.

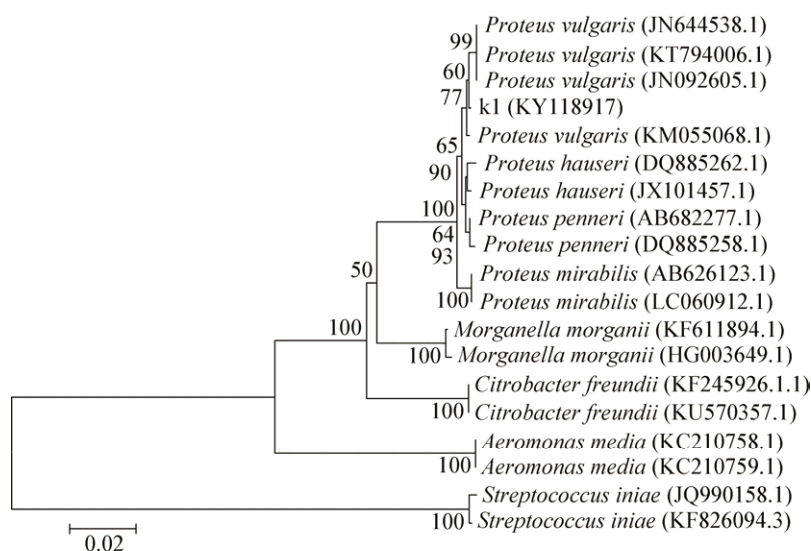


图 2 k1 株 16S rRNA 基因序列与相关菌株的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of k1 16S rRNA gene sequence and its relatives

注: 括号内的数字为 GenBank 序列号; 节点处的数字为 Bootstrap 值。

Note: Numbers in parenthesis represented GenBank accession number; Numbers at the branch points indicated the bootstrap values.

表3 k1株药敏试验结果
Table 3 Antibiotic sensitivity test of strain k1

药物 Drug	抑菌圈直径判断标准 The judgment standard of inhibition zone diameter (mm)			药物含量 Dose ($\mu\text{g}/\text{piece}$)	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (mm)	敏感性 Sensitivity
	不敏感	中度敏感	高度敏感			
	Resistant	Medium sensitivity	Highly sensitive			
环丙沙星 Ciflox	≤ 15	16-20	≥ 21	5	32	S
苯唑西林 Oxacillin	≤ 10	11-12	≥ 13	1	0	R
头孢唑啉 Cefazolin	≤ 14	15-17	≥ 18	30	23	S
头孢拉定 Cefadroxil	≤ 14	15-17	≥ 18	30	19	S
阿莫西林 Amoxicillin	≤ 13	14-17	≥ 18	20	0	R
痢特灵 Furazolidone	≤ 14	15-16	≥ 17	300	14	R
氯霉素 Chloramphenicol	≤ 12	13-17	≥ 18	300	21	S
氟苯尼考 Florfenicol	≤ 12	13-17	≥ 18	75	36	S
克林霉素 Clindamycin	≤ 14	15-20	≥ 21	2	0	R
利福平 Rifampicin	≤ 16	17-19	≥ 20	5	11	R
诺氟沙星 Norfloxacin	≤ 12	13-16	≥ 17	10	32	S
阿奇霉素 Azithromycin	≤ 13	14-17	≥ 18	15	23	S
红霉素 Erythrocin	≤ 13	14-22	≥ 23	15	0	R
新霉素 Neomycin	≤ 12	13-16	≥ 17	30	24	S
卡那霉素 Kanamycin	≤ 13	14-17	≥ 18	30	23	S
多西环素 Doxycycline	≤ 12	13-15	≥ 16	30	0	R
左氧氟沙星 Levofloxacin	≤ 13	14-16	≥ 17	5	31	S
庆大霉素 Gentamicin	≤ 12	13-14	≥ 15	10	23	S
丁胺卡那霉素 Amikacin	≤ 14	15-16	≥ 17	30	22	S

注: S: 高度敏感; R: 不敏感。

Note: S: Highly sensitive; R: Resistant.

3 结论与讨论

普通变形杆菌隶属于肠杆菌科(Enterobacteriaceae)变形杆菌属(*Proteus*), 是革兰氏阴性杆菌, 两端钝圆, 无荚膜, 不形成芽孢, 有周身鞭毛, 运动活泼, 有菌毛, 可黏附于真菌等细胞表面^[14]。

普通变形杆菌在养殖水体、底泥及腐败物以及人和动物肠道中普遍存在, 是机会致病菌, 因继发感染引起人类疾病的报道较多, 主要有食物中毒、膀胱炎及伤口感染等, 危害较大^[15]。感染鱼类致病的报道日趋增多, 目前已经有普通变形杆菌感染虾^[16]、大口鲶^[12]、中华鳖^[17-18]、赤点石斑鱼^[19]及鳄鱼^[20]等发病致死的报道。由此可见普通变形杆菌宿主从无脊椎动物到脊椎动物直至人类, 宿主广泛而

且致病力强, 是人畜鱼共患重要病原之一。变形杆菌致病机理一般是通过菌毛黏附到宿主细胞上, 并在宿主细胞快速滋生鞭毛及多糖荚膜, 然后进入到宿主细胞内部并大量释放尿素酶、溶血素、溶蛋白酶等毒力因子, 从而导致宿主出现异常及病变, 引发疾病^[21]。

本研究从患病斑点叉尾鮰肝、肾、脾及坏死肠道分离到菌株 k1, 经腹腔注射分离菌株 k1 菌悬液, 实验组斑点叉尾鮰出现与自然发病类似症状, 并且对斑点叉尾鮰的半致死剂量为 2.82×10^5 CFU/g, 表现出了较强的致病力。本次普通变形杆菌感染斑点叉尾鮰致病在国内尚属首次报道。变形杆菌在自然界广泛存在^[22], 因此在水产动物肠道中同样存在, 由于水产动物肠道中各种微生物构成了一个相对

平衡的微生态系统^[23],在正常情况下微生物与宿主相互影响^[24-25],不产生危害。但随着养殖业的发展,人们干预养殖进程,破坏了微生态平衡,变形杆菌可能获得快速繁殖的机会,引起致病。此次斑点叉尾鮰因感染普通变形杆菌而发生以肠道坏死为主要症状的病害,符合变形杆菌致病特点。

本研究对菌株 k1 生理生化特性进行了测定,其大部分指标均与普通变形杆菌一致,而柠檬酸盐、D-葡萄糖产气、水杨苷、七叶灵水解及脂酶等指标稍微有差异,其原因可能是人工读取结果导致的误差,但结果表明菌株 k1 很可能是普通变形杆菌。经 16S rRNA 基因序列比对及系统发育分析,菌株 k1 在系统进化树上与普通变形杆菌聚为一支,因此综合判定分离菌株 k1 为普通变形杆菌 *Proteus vulgaris*。细菌鉴定方法目前一般是结合 16S rRNA 基因序列分析及生理生化特性测定结果综合判定,鉴定结果较传统鉴定法更省时、高效及准确。

目前对于细菌性病害防控,抗生素仍是主要利器之一。本实验研究了普通变形杆菌对 19 种抗生素的敏感特性,分离菌株 k1 对氟苯尼考新霉素及庆大霉素等 12 种抗生素高度敏感,对阿莫西林、克林霉素及多西环素等 7 种抗生素耐药。药敏实验结果显示菌株 k1 对丁胺卡那霉素高度敏感,与李瑾年等^[18]研究结果一致,对新霉素、庆大霉素等高度敏感与李瑾年等^[18]有差异,但对庆大霉素高度敏感与曹海军等^[12]研究一致。同时分离菌株对阿莫西林等耐药,与曹海军等^[12]研究一致,提示需严防抗生素滥用,避免耐药菌株的产生。药敏实验结果存在差异的可能原因在于菌株的来源不同,本次药敏实验结果可作为防控斑点叉尾鮰普通变形杆菌病的科学参考依据。

参 考 文 献

- [1] Duan CL, Liu XM, Wang XD, et al. Separation of *Edwardsiella hoshinae* and histopathological changes of channel catfish, *Ictalurus punctatus*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2013, 33(3): 89-92 (in Chinese)
段翠兰, 刘训猛, 王习达, 等. 斑点叉尾鮰保科爱德华氏菌的分离鉴定和组织病理学观察[J]. 广东海洋大学学报, 2013, 33(3): 89-92
- [2] Tong GX, Li XZ, Wei XX, et al. Identification and antibiotic sensitivity of pathogen of intussusception disease found in channel catfish *Ictalurus punctatus*[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2009, 24(6): 475-481 (in Chinese)
童桂香, 黎小正, 韦信贤, 等. 斑点叉尾鮰套肠症的病原鉴定及其药敏特性[J]. 大连海洋大学学报, 2009, 24(6): 475-481
- [3] Su YB, Zou GW, Yuan KP, et al. Isolation and identification of the pathogen fulminate septicaemia from *Ictalurus punctatus*[J]. Freshwater Fisheries, 2006, 36(5): 37-41 (in Chinese)
苏应兵, 邹桂伟, 袁科平, 等. 斑点叉尾鮰暴发性败血症病原的分离与鉴定[J]. 淡水渔业, 2006, 36(5): 37-41
- [4] Geng Y, Wang KY, Chen DF, et al. Isolation, identification and phylogenetic analysis of a pathogenic bacterium in channel catfish[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2006, 46(4): 649-652 (in Chinese)
耿毅, 汪开毓, 陈德芳, 等. 斑点叉尾鮰一株致病菌的分离鉴定及系统发育分析[J]. 微生物学报, 2006, 46(4): 649-652
- [5] Yu XL, Chen M, Li C, et al. Channel catfish *Ictalurus punctatus* outbreak infected by bacterium *Streptococcus iniae*[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2008, 23(3): 185-191 (in Chinese)
余晓丽, 陈明, 李超, 等. 斑点叉尾鮰暴发性海豚链球菌病的研究[J]. 大连水产学院学报, 2008, 23(3): 185-191
- [6] Deng XW, Xie ZX, Liu JB, et al. Isolation and identification of *Edwardsiella* in channel catfish from Guangxi[J]. Guangxi Agricultural Sciences, 2008, 39(2): 231-235 (in Chinese)
邓显文, 谢芝勋, 刘加波, 等. 广西斑点叉尾鮰爱德华氏菌的分离鉴定[J]. 广西农业科学, 2008, 39(2): 231-235
- [7] Liu JY, Yang WM, Li AH, et al. Preliminary study on the etiology of channel catfish intussusception disease[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2008, 32(6): 824-831 (in Chinese)
刘金玉, 杨五名, 李爱华, 等. 斑点叉尾鮰套肠症的病原学初步研究[J]. 水生生物学报, 2008, 32(6): 824-831
- [8] Fan FL, Wang KY, Geng Y, et al. Isolation, identification and phylogenetic analysis of *Yersinia ruckeri* in channel catfish *Ictalurus punctatus*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2010, 41(6): 862-868 (in Chinese)
范方玲, 汪开毓, 耿毅, 等. 斑点叉尾鮰(*Ictalurus punctatus*)源鲁氏耶尔森氏菌的分离鉴定及系统发育分析[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(6): 862-868
- [9] Gu ZM, Liu Y, Chen CF, et al. Isolation and identification of *Acinetobacter baumannii* from the diseased channel catfish[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2010, 29(4): 489-493 (in Chinese)
顾泽茂, 柳阳, 陈昌福, 等. 鲍曼不动杆菌斑点叉尾鮰株的分离与鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(4): 489-493
- [10] Xu SY, Bian RL, Chen X. Methodology of Pharmacology[M]. 3rd Edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002: 192 (in Chinese)
徐叔云, 卞如谦, 陈修. 药理实验方法学[M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 192
- [11] Dong XZ, Cai MY. Handbook of Common Bacterial System

- Identification[M]. Beijing: Science Press, 2001: 97 (in Chinese)
东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 97
- [12] Cao HJ, Li YW, 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 (in Chinese)
曹海军, 李永文, 雷雨, 等. 大口鲶致病菌的分离鉴定、系统发育分析及相关特性的研究[J]. 微生物学报, 2007, 47(1): 1-6
- [13] Wikler MA. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing[M]. 9th Edition. Washington D.C.: Clinical Laboratory Standards Institute, 2009: 9-11
- [14] Chen JN, Zhu YD, Li XY, et al. Electron microscopic observation of *Proteus vulgaris*[J]. Acta Academiae Medicinae Hebei, 1987, 3(3): 136-139 (in Chinese)
陈嘉乃, 朱永德, 李向印, 等. 普通变形杆菌的电镜观察[J]. 河北医学院学报, 1987, 3(3): 136-139
- [15] Zhou ZR. Medical Microbiology[M]. 6th Edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003: 181 (in Chinese)
周正任. 医学微生物学[M]. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 181
- [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 covered 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] Li JN, Yu WY, Zu GZ, et al. Isolation and identification *Proteus vulgaris* isolated from *Trionyx sinensis* and its pathogenicity[J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 1999, 29(3): 28-30 (in Chinese)
李瑾年, 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
- [19] He CW, Chen WH, Zhou YH, et al. The isolation and identification of the bacteria leading to eye conjunctivitis in *Siamese crocodile*[J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 2003, 33(2): 75-76 (in Chinese)
何成伟, 陈武恒, 周煜华, 等. 暹罗鳄鱼结膜炎致病菌的分离与鉴定[J]. 中国兽医科技, 2003, 33(2): 75-76
- [20] Yang X, Wu XZ. Pathogenic *Proteus vulgaris* found in red spotted 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
- [21] Li WJ, Wang ZQ. Virulent fact or of *Proteus mirabilis*[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2001, 17(2): 80-86 (in Chinese)
李文建, 汪正清. 奇异变形杆菌的毒力因子[J]. 中国人兽共患病学报, 2001, 17(2): 80-86
- [22] Qian XY. Rapid detection of proteus by Loop-mediated isothermal amplification[D]. Baoding: Master's Thesis of Hebei Agricultural University, 2009 (in Chinese)
钱翔宇. 环介导等温扩增技术快速检测普通变形杆菌的研究[D]. 保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2009
- [23] Björkstén B. The gut microbiota: a complex ecosystem[J]. Clinical & Experimental Allergy, 2006, 36(10): 1215-1217
- [24] Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, et al. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota[J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6(10): 776-788
- [25] Wu SG, Gao TH, Zheng YZ, et al. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. Aquaculture, 2010, 303(1/4): 1-7