

患病黄额闭壳龟中产酸克雷伯菌的分离与鉴定

周勇¹, 曾令兵^{1 2 3}, 李瑞伟², 高正勇³, 孙建滨³, 范玉顶¹

(1. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 武汉 430223;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

3. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070)

摘要: 从患病黄额闭壳龟(*Cuora galbinifrons*) 肝脏中分离到一株致病菌 HE01, 经人工感染健康巴西龟, 可复制与自然发病相同的症状, 且从人工感染病龟体内再次分离到相同的病原菌。经 Biolog 微生物自动鉴定系统的鉴定, 以及进一步的 16 S rDNA 基因序列和系统发育分析都表明, 此致病菌为产酸克雷伯菌(*Klebsiella oxytoca*)。药物敏感性试验表明, 该菌株对头孢噻肟、头孢曲松、头孢哌酮等 10 种药物高度敏感。

关键词: 黄额闭壳龟(*Cuora galbinifrons*); 产酸克雷伯菌(*Klebsiella oxytoca*); 分离鉴定; 药敏试验

中图分类号: S943

文献标识码: A

文章编号: 1000-6907-(2012)03-0038-06

Isolation and identification of *Klebsiella oxytoca* from diseased *Cuora galbinifrons*

ZHOU Yong¹, ZENG Ling-bing^{1 2 3}, LI Rui-wei², GAO Zheng-yong³,
SUN Jian-bin³, FAN Yu-ding¹

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

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: A bacterial strain HE01 was isolated and identified from diseased *Cuora galbinifrons*. Infection with the bacterial suspension to healthy red-ear slider could reproduce the diseased symptoms as occurred naturally and the same bacterium could be recovered from these infected *C. galbinifrons*. Identification by the Biolog Microbial Identification System, and further 16 S rDNA sequence and phylogenetic analysis demonstrated that the bacterium isolated from diseased *C. galbinifrons* was *Klebsiella oxytoca*. The susceptibility test to antibiotics demonstrated that the bacterial strain HE01 was highly susceptible to cefotaxime, ceftriaxone, cefobid, and so on.

Key words: *Cuora galbinifrons*; *Klebsiella oxytoca*; isolation and identification; antibiotic susceptibility test

黄额闭壳龟(*Cuora galbinifrons*) 又叫“黄额盒龟”, 隶属于龟科(Emydidae) 闭壳属(*Cuora*), 国内主要分布于广东、广西以及海南, 国外分布在越南、老挝等地^[1-2]。中国是黄额闭壳龟主要的消费国, 大量黄额闭壳龟被食用或药用。黄额闭壳龟的人工饲养十分困难, 主要是因为该龟种适应环境能力欠佳, 在养殖过程中容易患病死亡。目前, 关于黄额闭壳龟的研究主要集中在形态分类、地理分布、人工饲养及贸易等方面^[3-4], 有关黄额闭壳龟

的病害防治技术研究鲜有报道。

2012年, 武汉某养殖户处于冬眠状态的黄额闭壳龟发病, 患病龟从冬眠状态苏醒, 体质消瘦, 舌部发白, 加温饲养发现病龟拒食、活动少、精神不振, 几天后死亡。解剖后发现体腔及肠道内大量胀气、少量腹水、消化道粘膜充血, 其他器官未发现明显的病变。于无菌条件下从病龟肝脏组织中分离培养出细菌一株, 对健康巴西龟进行人工感染试验可复制与自然发病黄额闭壳龟相同的症状, 确定

收稿日期: 2012-02-28; 修订日期: 2012-03-26

资助项目: 公益性行业(农业) 科研专项(201203086)

第一作者简介: 周勇(1984-), 男, 湖北荆州人, 硕士, 主要从事水产养殖病害研究。E-mail: zhouyong125@yahoo.com.cn

通讯作者: 曾令兵。E-mail: zenglingbing@gmail.com

其致病性。经 Biolog 微生物自动鉴定系统的鉴定和分子生物学检测确定, 该致病菌为产酸克雷伯菌 (*Klebsiella oxytoca*)。药物敏感性试验显示, 该菌对头孢类抗生素高度敏感。本项研究为龟类细菌性疾病的防控技术研究奠定了一定的基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物

患病黄额闭壳龟采集于武汉某养殖户, 腹甲长 10 cm。用于感染试验的健康巴西龟购于武汉堤角花鸟大世界, 平均体重为 (20 ± 1.0) g, 暂养在 60 cm × 40 cm × 20 cm 塑料箱内, 养殖用水为充分曝气的自来水, 一周后用于感染试验, 试验控制水温 (25 ± 1) °C。

1.1.2 主要试剂和仪器

BHI (BD, Becto™ Brain Heart Infusion), PCR 产物纯化试剂盒 (Promega, Wizard Sv Gel and PCR Clean up System), 药敏试剂盒 (杭州天和微生物试剂有限公司), 全自动微生物鉴定仪 (Biolog, Biolog GEN III, USA), 生物安全柜 (ESCO, Class II BSC, Singapore), 离心机 (SiGMA, 3K15, Germany), 化学发光成像与分析系统 (Bio-RAD, ChemiDoc™ XRS+, USA), PCR 仪 (Biometra, T-professional, Germany), 生化培养箱 (上海新苗医疗器械制造有限公司, Spx-250BS-II), 透射电子显微镜 (Hitachi, H-7650, Japan)。

1.2 致病菌分离与培养

取濒死黄额闭壳龟, 用 70% 酒精消毒体表, 在生物安全柜中无菌操作取肝脏于 BHI 琼脂平板上划线接种, 置 30 °C 培养, 24 h 后挑取形态特征一致的优势菌落在相同的条件下作纯培养, 并挑取菌株通过负染法于电镜下观察其形态^[5]。纯培养物接种 BHI 液体培养基扩大培养, 培养菌液分装到冻存管中加甘油 (终浓度 25%) 于 -80 °C 保存备用。菌株编号为 HE01。

1.3 人工感染试验

取保存的菌种接种于 BHI 培养液中, 培养 24 h 后 4 000 g 离心集菌, 所得菌体用无菌 PBS 离心洗涤 3 次, McFarland 比浊法结合平板菌落计数法测定细菌浓度, 并调整细菌浓度为 1×10^9 CFU/mL, 10 倍梯度稀释得到 1×10^8 CFU/mL、 1×10^7 CFU/mL 和 1×10^6 CFU/mL, 共 4 个浓度梯度用于健康龟的注射感染试验。巴西龟的注射感染试验: 取暂

养 1 周后的健康巴西龟随机分成 5 组, 每组 30 只, 4 个试验组以 0.2 mL/只的剂量分别腹腔注射 4 种浓度的菌悬液, 对照组以 0.2 mL/只的剂量腹腔注射 PBS。每天观察记录死亡情况。取人工感染死亡的巴西龟进行细菌的分离和鉴定, 以确定所分离的病菌的致病性。

1.4 微生物鉴定

取经过纯培养 BHI 固体培养基纯培养的 HE01 菌株采用单菌落划线接种于 BUG 鉴定平板上, 30 °C 培养 16 ~ 24 h, 待菌落大小适宜时, 取 Biolog 细菌鉴定试剂盒 IF-A 接种液, 将管外壁擦拭干净, 置于 Biolog 浊度仪中, 调整其读数为 100% T; 用无菌棉签蘸取适量的单菌落至接种液中, 使浊度仪读数在 92% ~ 98% T 之间, 用 8 孔排枪将混合液转移至 GEN III 鉴定板中, 每孔 100 μL, 将鉴定板装载于 Biolog 系统中培养, 系统自动读数并输出鉴定结果。

1.5 16 S rDNA 序列的扩增和测定

取保存的菌种接种 BHI 液体培养基, 30 °C 培养 24 h 离心集菌。参照 GenElute Bacterial Genomic DNA Kit 使用说明书提取细菌总 DNA。用于 16 S rDNA 序列扩增的引物为细菌的通用引物, 上游引物为: CACGGA TCC AGA GTT TGA T (C/T) (A/C) TGG CTC AG, 下游引物为: GTG AAG CTT AGG G (C/T) T ACC TTG TTA CGA CTT。采用 50 μL 反应体系进行 PCR 扩增: 10 × PCR Buffer 5 μL, dNTP (10 mmol/L) 1 μL, Primers (F/R, 10 μmol/L) 各 1 μL, rTaq DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.5 μL, DNA 模板为 1 μL, ddH₂O 补足至 50 μL。PCR 扩增程序为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 胶回收试剂盒回收, 送上海生工生物工程有限公司测序。

1.6 序列同源性分析及系统发育树的构建

将测得菌株的 16 S rDNA 序列通过 NCBI 的 Blast 检索系统进行序列同源性分析。检索出相似较高的序列采用 Clustal X (1.83) 进行多序列匹配排列 (Multiple Alignments)。参照文献 [6] 使用 MEGA 4.0 软件, 采用邻接法 (Neighbor-joining method) 构建系统发育树, 并通过 1 000 次的自举分析 (boos trap) 进行置信度检测。

1.2.6 药敏试验

采用纸片扩散法 (K-B 法) 进行药敏性试验。

取 100 μL 新鲜菌悬液(浓度约 1×10^7 CFU/mL) 均匀涂布于 BHI 固体培养基上, 用无菌镊子将 35 种药敏纸片均匀贴在平板上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后测量抑菌圈直径。

2 结果

2.1 致病菌分离镜检结果

从患病黄额闭壳龟的肝脏中分离到一株优势菌。该菌株在 BHI 培养基上 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后出现

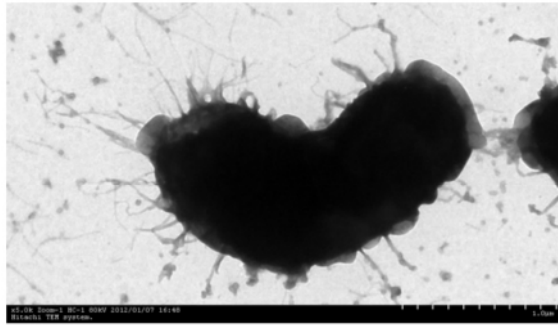


图 1 负染法观察菌株

菌落大小为 1 ~ 2 mm, 圆形, 边缘整齐, 半透明, 乳白色或淡黄色, 有光泽菌落。负染后电镜观察, 该菌株呈杆状, 周身鞭毛(图 1)。

2.2 人工感染试验结果

人工感染试验结果见表 1。由表可知, 菌液浓度为 1×10^6 CFU/mL 和 1×10^7 CFU/mL 组注射巴西龟, 在染毒后 7 d 内没有出现死亡; 1×10^8 CFU/mL 组巴西龟在 8 d 内累积死亡率达到 15%; 1×10^9 CFU/mL 组巴西龟在 8 d 累积死亡率达到 55%, 说明该菌株对巴西龟具有一定的致病性。人工感染死亡的巴西龟解剖后, 腹腔有少量腹水, 体腔及肠道内有胀气, 消化道粘膜有轻微充血。

2.3 Biolog 全自动微生物鉴定仪的鉴定结果

从患病黄额闭壳龟、人工感染死亡的巴西龟中分离的细菌经 Biolog 全自动微生物鉴定系统鉴定为同一种细菌。菌株 HE01 的鉴定结果表明, 该菌株为产酸克雷伯菌的可能性达 85%。各项参数为: PROB = 0.85; SIM = 0.525; DIST = 4.807。具体的反应项目及结果见表 2。

表 1 HE01 对巴西龟人工感染试验结果

Tab. 1 Results of artificial infection of HE01 in red-ear slider

组	浓度 / (CFU/mL)	实验龟数量 /只	注射剂量 /mL	不同时间死亡数					死亡率 /%
				4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	
1	1×10^9	20	0.2	3	6	2	0	0	55.0
2	1×10^8	20	0.2	0	2	1	0	0	15.0
3	1×10^7	20	0.2	0	0	0	0	0	0.0
4	1×10^6	20	0.2	0	0	0	0	0	0.0
对照	PBS	20	0.2	0	0	0	0	0	0.0

表 2 HE01 菌株的 Biolog 鉴定结果

Tab. 2 Results of Biolog identification of HE01

反应项目	结果	反应项目	结果
A1 阴性对照	N	E1 白明胶	N
A2 糊精	P	E2 甘氨酸基-L-脯氨酸	P
A3 D-麦芽糖	P	E3 L-丙氨酸	P
A4 D-海藻糖	P	E4 L-精氨酸	N
A5 D-纤维二糖	P	E5 L-天冬氨酸	P
A6 龙胆二糖	P	E6 L-谷氨酸	P
A7 蔗糖	P	E7 L-组氨酸	P
A8 D-松二糖	N	E8 L-焦谷胺酸	N
A9 水苏糖	P	E9 L-丝氨酸	P
A10 阳性对照	P	E10 洁霉素	P
A11 PH6	P	E11 盐酸胍	P
A12 PH5	P	E12 硫酸四癸钠	P
B1 D-棉子糖	P	F1 果胶	P
B2 α -D-乳糖	P	F2 D-半乳糖醛酸	P
B3 D-蜜二糖	P	F3 L-半乳糖酸内酯	P
B4 β -甲基-D-葡萄糖苷	P	F4 D-葡萄糖酸	P

续表 2

反应项目	结果	反应项目	结果
B5 D - 水杨苷	P	F5 D - 葡萄糖醛酸	P
B6 N - 乙酰 - D - 葡萄糖胺	P	F6 葡罗酰胺	P
B7 N - 乙酰 - β - D - 甘露糖胺	P	F7 粘酸	P
B8 N - 乙酰 - D - 半乳糖胺	N	F8 奎宁酸	P
B9 N - 乙酰神经氨酸	P	F9 D - 葡萄糖二酸	P
B10 1% 氯化钠	P	F10 万古霉素	P
B11 4% 氯化钠	B	F11 四氮唑紫	P
B12 8% 氯化钠	N	F12 四氮唑蓝	P
C1 α - D - 葡萄糖	P	G1 P - 羟基苯乙酸	P
C2 D - 甘露糖	P	G2 丙酮酸甲酯	N
C3 D - 果糖	P	G3 D - 乳酸甲酯	B
C4 D - 半乳糖	P	G4 L - 乳酸	P
C53 - 甲基葡萄糖	N	G5 柠檬酸	P
C6 海藻糖	N	G6α - 酮戊二酸	N
C7 L - 海藻糖	P	G7 D - 苹果酸	P
C8 L - 鼠李糖	P	G8 L - 苹果酸	P
C9 肌苷	P	G9 溴代琥珀酸	MP
C10 1% 乳酸钠	P	G10 萘啶酮酸	N
C11 梭链孢酸	P	G11 氯化锂	B
C12 D - 丝氨酸	N	G12 亚碲酸钾	N
D1 D - 山梨醇	P	H1 吐温 40	N
D2 D - 甘露醇	P	H2 γ - 氨基丁酸	N
D3 D - 阿糖醇	P	H3 α - 羟基丁酸	B
D4 肌醇	P	H4 β - 羟基 - D, L - 丁酸	N
D5 甘油	P	H5 α - 丁酮酸	N
D6 D - 葡萄糖 - 6 - 磷酸	P	H6 乙酰乙酸	N
D7 D - 果糖 - 6 - 磷酸	P	H7 丙酸	N
D8 D - 冬氨酸	N	H8 醋酸	P
D9 D - 丝氨酸	P	H9 甲酸	P
D10 醋竹桃霉素	P	H10 氨基南	N
D11 利福平	P	H11 丁酸钠	P
D12 二甲胺四环素	MP	H12 溴酸钠	N

注: P: 阳性; N: 阴性; MP: 正失配; MN: 负失配; B: 临界值; L: 少于对照组 A1。

2.4 16 S rDNA 序列分析及系统发育树的构建

用细菌 16 S rDNA 通用引物 PCR 扩增获得该菌株的 16 S rDNA 基因片段(图 2), 对此片段进行回收、测序, 得到 1449 bp 的序列。将测序所得序列输入到 NCBI 进行 Blast 检索, 发现 HE01 菌株与克雷伯菌属(*Klebsiella*) 细菌的 16 S rDNA 序列自然聚类。在最相近的 100 个序列中, 克雷伯菌属细菌占 60%, 肠杆菌属细菌占 40%, HE01 与它们的同源率为 99% ~ 100%, 从中选择同源率较高的克雷伯菌属以及其他属细菌的 16 S rDNA 基因序列, 并以假单胞菌属细菌(*Pseudomonas* sp) 为外群, 进行分子系统发育分析。结果如图 3 所示, 菌株 HE01 与 *Klebsiella oxytoca*(HE650838. 1) 和 *Klebsiella pneumoniae*(AB 680619. 1) 聚合, 且置信度高达 100%。

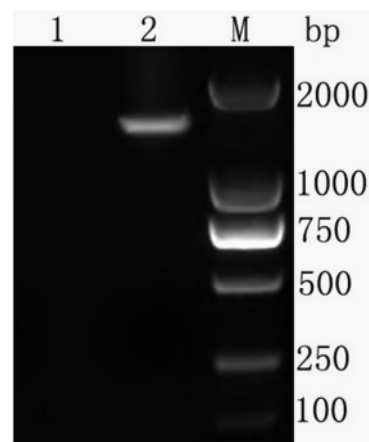


图 2 菌株 16 S rDNA 基因 PCR 扩增
 Fig. 2 PCR product of 16 S rDNA gene of strain HE01
 M: DNA Marker DL2000; 1: 阴性对照;
 2: 菌株 16 S rDNA 基因 PCR 扩增产物

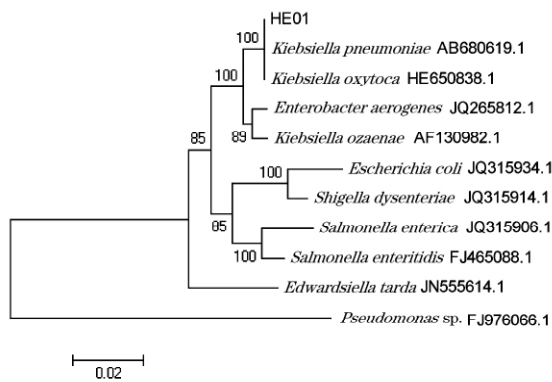


图3 以菌株 HE01 的 16 S rDNA 基因序列构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *K. oxytoca* based on 16 S r DNA gene sequence of strain HE01.

2.5 药敏试验结果

药敏试验结果见表3。药物敏感试验表明,该菌株对头孢噻肟、头孢曲松、头孢哌酮等10种药物敏感;对头孢唑肟、哌拉西林、阿米卡星、氯霉素等8种药物中度敏感;对四环素、克林霉素、红霉素、克拉霉素等17种药物不敏感。与已报道的其它动物分离出的产酸克雷伯菌的药敏试验进行了对比,发现虽然同为产酸克雷伯菌,但不同生物来源的菌株对药物的敏感性不尽相同,但是不同来源的菌株均对庆大霉素敏感(表4)。

表3 药物敏感性试验结果
Tab.3 Antibiotic susceptibility test

药物	抑菌圈直径/mm	敏感性	药物	抑菌圈直径/mm	敏感性
氧氟沙星	10	I	头孢吡肟	16	S
克拉霉素	≤6	R	左氟沙星	14	I
头孢他啶	18	S	克林霉素	≤6	R
头孢唑肟	10	I	米诺环素	≤6	R
哌拉西林	12	I	红霉素	≤6	R
万古霉素	≤6	R	苯唑青霉素	≤6	R
氟哌酸	≤6	R	壮观霉素	≤6	R
复方新诺明	16	S	环丙沙星	16	S
阿米卡星	8	I	妥布霉素	≤6	R
头孢哌酮	24	S	青霉素 G	≤6	R
庆大霉素	18	S	氨苄青霉素	≤6	R
头孢噻肟	30	S	卡那霉素	10	I
头孢曲松	28	S	链霉素	≤6	R
头孢西丁	10	I	麦迪霉素	≤6	R
呋喃妥因	≤6	R	先锋 V	≤6	R
氨曲南	16	S	多粘霉素 B	16	S
氯霉素	8	I	四环素	≤6	R
头孢噻吩	≤6	R			

注: 敏感性判定: 6 mm 以下用 R 表示, 表明耐药; 6 ~ 15 mm 用 I 表示, 表明中度敏感; 15 mm 以上, 用 S 表示, 表明敏感。

表4 本研究与其他药敏试验结果比较
Tab.4 Comparison of antibiotic sensitivity test results of this study and others

来源	产酸克雷伯菌	孔雀 ^[7]	鸡 ^[8]	人 ^[9]
阿米卡星	I	-	-	S
卡那霉素	I	S	S	S
氟哌酸	R	I	-	-
环丙沙星	S	I	-	S
庆大霉素	S	S	I	S
氯霉素	I	R	S	S
四环素	R	R	R	-
先锋 V	R	-	-	S
链霉素	R	R	-	-
氨苄青霉素	R	-	-	R
青霉素 G	R	R	R	-
红霉素	R	-	R	-

注: S 为敏感; I 为中度敏感; R 为耐药 “-” 本试验使用的抗生素他人未使用。

3 讨论

产酸克雷伯菌是革兰氏阴性短杆菌, 需氧或兼性厌氧, 属于肠杆菌科, 电镜下观察两端钝圆、无芽孢、外有荚膜包围。克雷伯菌属包括5个种, 即肺炎克雷伯菌(含3个亚种: 肺炎亚种、鼻臭亚种、鼻硬结亚种)、产酸克雷伯菌、土生克雷伯菌、植生克雷伯菌及变形克雷伯菌。后3个种是新近发现的, 致病力低^[10]。据报道, 在多种动物体内分离到该菌属的细菌, 如肺炎克雷伯菌引起鸭^[11]、仔猪^[12]、竹鼠^[13]、鸡^[14]以及大熊猫^[15]等发病, 产酸克雷伯菌可引起抗生素相关性出血性结肠炎(antibiotics-associated hemorrhagic colitis, AHC)^[16], 引发乌骨鸡和孔雀患病, 但该菌引发龟发病还属首例报道。本次试验中分离到产酸克雷伯菌可导致腹腔有少量腹水, 体腔及肠道内有胀气, 消化道粘膜有轻微充血等症状, 人工感染试验证明其对巴西龟有一定的致病性。

借助 Biolog 全自动微生物鉴定系统进行生化检测, 进一步确定分离得到的菌株就是产酸克雷伯菌。Biolog 全自动微生物鉴定系统(Omilog GEN III)鉴定结果具有准确、迅速、不依赖手工操作等特点, 显著优于常规的生理生化鉴定方法^[17]。在 Biolog 鉴定结果中, DIST 和 SIM 是最重要的两个值。DIST 值表示鉴定结果与数据库相应的数据条的匹配程度, DIST ≤ 5.0 时匹配良好。在获得良好鉴定结果时, SIM 值在培养 4-6 h 时应 ≥ 0.75, 培养 16-24 h 时 SIM 值应 ≥ 0.50。在本项研究的细菌鉴定中, DIST 值为 4.807, SIM 值为 0.525, 表明鉴定结果准确。而与产酸克雷伯菌同属的肺炎克雷伯菌在鉴定结果中的数值分别是, DIST 值为 8.830, SIM 值为 0.017。系统计算出该菌为产酸克雷伯菌的可能性是 85%, 而肺炎克雷伯菌的可能性为 3.7%。结合 16 S rDNA 基因序列比对结果和 Biolog 全自动微生物鉴定系统结果确定该菌为产酸克雷伯菌。

药物敏感性试验结果对黄额闭壳龟的产酸克雷伯菌感染症的防治提供了一些科学依据。而黄额闭壳龟产酸克雷伯菌与其它水产生物来源的产酸克雷伯菌的药敏结果不尽相同, 在本实验中我们还发现, 所选 35 种药物中有 17 种对该菌株不敏感, 这可能与生物体不同有关系, 也可能与滥用药物导致菌株抗药性改变有关, 这无疑给该菌的药物防治带

来了困难。针对不同生物来源的菌株进行针对性的药物筛选试验, 选择最有效的药物进行治疗或预防, 可防止细菌抗药性的产生。

黄额闭壳龟养殖业的规模在不断地发展, 然而对其病害的研究很少, 而采用先进仪器设备以及分子鉴定的方法对黄额闭壳龟细菌性病原进行系统研究的结果更是缺乏。本试验首次从黄额闭壳龟中分离到了产酸克雷伯菌, 并确定了其致病性, 为黄额闭壳龟病害防治提供了科学依据。

参考文献:

- [1] 张孟闻, 宗 愉, 马积藩. 中国动物志(爬行纲) [M]. 北京: 科学出版社, 1998. 110-113.
- [2] Lau M, Shi H T. Asian Turtle Trade: Proceedings of a Workshop on Conservation and Trade of Freshwater Turtles and Tortoises in Asia [M]. NO. 2 USA: Chelon Res Founda, 2000. 30-38.
- [3] 汪继超. 黄额闭壳龟的活动家域和微生物利用[D]. 海南: 海南师范大学, 2007, 3-11.
- [4] 王 雷. 黄额闭壳龟的活动节律和微生物利用[D]. 海南: 海南师范大学, 2008, 1-5.
- [5] 宋敬东, 屈建国, 鲁茁壮, 等. 提高负染法透射电镜检测病毒灵敏度的制样方法及应用[J]. 病毒学报, 2010, 26(5): 410-413.
- [6] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Molec Biol Evol, 1987, 4(4): 406-425.
- [7] 高 旭. 一起孔雀产酸克雷伯氏菌病的治疗[J]. 畜牧与兽医, 2006, 38(1): 36-37.
- [8] 邹志雄, 谢拥军. 鸡产酸克雷伯菌的生物学特性研究[J]. 2008, 23(4): 86-88.
- [9] 于 兰, 董 捷, 赵 郁, 等. 产酸克雷伯氏菌引起食物中毒 15 例报告[J]. 武警医学, 2003, 14(2): 108-109.
- [10] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [11] 朱煜兰. 鸭肺炎克雷伯氏菌病的诊治[J]. 中国兽医科技, 1989, (12): 27-28.
- [12] 杨留战. 哺乳仔猪克雷伯氏菌病的调查[J]. 中国兽医科技, 1989, (1): 17-18.
- [13] 马 磊, 颜其贵, 万 莉, 等. 竹鼠肺炎克雷伯氏菌的分离鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(9): 825-827.
- [14] 彭远毅, 刘华英, 吕寿英, 等. 鸡肺炎克雷伯氏菌的分离鉴定[J]. 西南农业大学学报, 1995, (4): 165-166.
- [15] 王 强, 江 华, 中尾建子, 等. 大熊猫肺炎克雷伯氏杆菌出血性肠炎病例报告[J]. 四川动物, 1998, 17(1): 29.
- [16] Hogenauer C, Langner C, Beubler E, et al. *Klebsiella oxytoca* as a causative organism of antibiotic-associated hemorrhagic colitis [J]. Nat Eng J Med, 2006, 355(23): 2418-2426.
- [17] 高正勇, 曾令兵, 孟 彦, 等. 患病大鲵中弗氏柠檬酸杆菌的分离与鉴定[J]. 微生物学报, 2012, 52(2): 169-176.