

斜带石斑鱼烂尾病病原菌的分离与鉴定

梅冰, 周永灿, 徐先栋, 王世峰, 谢珍玉

(海南大学海洋学院, 海南 海口 570228)

摘要: 2008 年 5 月从海南省三亚红沙港与陵水新村湾网箱养殖的患“烂尾病”的斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides* 中分离到 3 株优势菌株 HS08001、HS08002 和 XC08001。人工感染试验表明, 这 3 株菌株为斜带石斑鱼的致病菌。经菌株形态特征、培养特性和生理生化反应等表型测定以及 16S rDNA 测序分析, 这 3 株细菌被鉴定为哈维氏弧菌 *Vibrio harveyi*。其中, HS08001 对斜带石斑鱼的半致死剂量为 $1.05 \times 10^4 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ 鱼体重。药敏试验表明, 该菌具有较强的耐药性, 在所检测的 25 种抗菌药物中, 仅对庆大霉素、氯霉素和利福平高度敏感, 而对阿莫西林等 18 种抗菌药物不敏感。

关键词: 斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides*; 哈维氏弧菌 *Vibrio harveyi*; 烂尾病; 16S rDNA

中图分类号: S941.42 文献标识码: A 文章编号: 1009-5470(2010)06-0118-07

Isolation and identification of bacteria pathogens from *Epinephelus coioides* with tail-rotted disease

MEI Bing, ZHOU Yong-can, XU Xian-dong, WANG Shi-feng, XIE Zhen-yu

(College of Marine Science, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: A very serious tail-rotted disease broken out in the cage-cultured *Epinephelus coioides* in Sanya city and Lingshui County, Hainan province, China in May 2008. Three strains of HS08001, HS08002, and XC08001 were isolated from the diseased grouper and were shown to be the pathogens by artificial infection. All the three isolates were identified as *Vibrio harveyi* by biochemical tests and 16S rDNA sequence analysis. The LD_{50} value of strain HS08001 for *E. coioides* was $1.05 \times 10^4 \text{ CFU/g}$ body weight. Sensitivity test to 25 chemotherapeutic agents indicated that the pathogen was only highly sensitive to gentamicin, chloramphenicol, and rifampicin.

Key words: *Epinephelus coioides*; *Vibrio harveyi*; tail-rotted disease; 16s rDNA

弧菌病是危害海水养殖鱼类最严重的细菌性疾病之一, 可以感染多种鱼类并造成大量死亡^[1], 其中哈维氏弧菌 *Vibrio harveyi* 对水产养殖动物造成的危害日益严重^[2], 已引起国内外水产养殖工作者的广泛重视^[3-4]。2008 年 5 月, 在海南省三亚红沙港和陵水新村湾的网箱养殖斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides* 发生了大量死亡, 病鱼的主要症状为体色发白、体表溃疡, 其中尤以尾鳍溃烂明显, 肝脏等脏器也有许多出血斑。为了确定该病的病原等有关情

况, 本文从病鱼的多个部位进行了病原分离, 并通过人工感染实验确定了病原, 通过标准的生理生化鉴定和 16S rDNA 测序比对确定了致病菌的种类。

1 材料与方法

1.1 患病斜带石斑鱼

取自海南省三亚红沙港和陵水新村湾的网箱养鱼场, 为养殖期间发病的具有典型患病症状的濒死斜带石斑鱼。病鱼体重 20—25g, 体长为 10—15cm。

收稿日期: 2009-02-10; 修订日期: 2009-11-15。刘学东编辑

基金项目: 农业科技成果转化项目(2009GB2E200302); 国家自然科学基金项目(30660144、30760190、31060360); 海南省自然科学基金项目(80617); 海南省教育厅高等学校科研项目(Hj200729)

作者简介: 梅冰(1982—), 男, 湖北省武汉市人, 硕士研究生, 研究方向为水生生物病害及其控制。E-mail: meibing11meibing@163.com

通信作者: 谢珍玉。E-mail: xiezyscuta@163.com

病鱼现场取材后即冰低温保存, 当天运回实验室后进行病原检测。

1.2 健康斜带石斑鱼

感染实验用健康斜带石斑鱼购自海南文昌某石斑鱼苗场, 选择活力好、无患病史的个体, 体重 15—25g, 充氧运回实验室, 在水族箱中暂养 7d 后用于相关实验。

1.3 细菌分离

按照标准的无菌操作^[5], 从病鱼的体表溃疡、肝脏、肾脏和脑共 4 个部位分别取样, 划线接种于 2216E 海水培养基和 TCBS 琼脂培养基^[6], 30℃ 培养 24h 后, 记录细菌分离结果。挑取优势菌, 用 2216E 海水培养基进一步纯化后低温保存备用。同时将经纯化的菌株接种于 60% 甘油中, 于 -80℃ 冰箱中冰箱中保存备用。

1.4 人工感染试验

健康斜带石斑鱼在水族箱中暂养 7d 后, 分组饲养在规格为 45cm × 35cm × 40cm 的水族箱中, 每箱 10 尾。每天正常投喂石斑鱼人工配合饲料, 日换水量为水体的 1/3。将待测菌株用海水营养液体培养基^[6]于 28℃ 扩大培养 24h 后, 用无菌生理盐水 (0.85% NaCl) 稀释成浓度为 1.4×10^7 cfu·mL⁻¹ 的菌悬液, 每尾经腹腔注射 0.1mL, 对照组注射等量的无菌生理盐水, 感染组和对照组各注射 10 尾, 并都设两个平行组。观察并记录感染后 10d 内各组石斑鱼的发病及死亡情况。选择已感染患病的实验斜带石斑鱼, 记录其患病症状, 并从其体表溃疡处、肝脏、肾脏等部位再次进行细菌分离。只有当发病症状与自然发病症状相同, 且所分离菌株与人工感染菌株的菌落形态一致, 才认定实验动物是因人工感染而发病。

1.5 病原菌的菌种鉴定

1.5.1 表型鉴定

病原菌经进一步纯化后, 首先进行常规形态学检查, 再参照 Mercedes-Anicel^[7]的方法并结合《常见细菌系统鉴定手册》^[8]进行分类鉴定。鉴定指标有: 革兰氏染色, 葡萄糖发酵, 氧化酶, 精氨酸双水解酶, 赖氨酸脱羧酶, 精氨酸脱羧酶, 鸟氨酸脱羧酶, ONPG 反应, TCBS 生长, 甘露糖, 乳糖, 纤维二糖, 质量分数分别为 0%、6%、8% 和 10% 的氯化钠, 4、28、35 和 40℃ 培养, 柠檬酸盐, 吡啶, 阿拉伯糖, 甘露醇, 0/129, 蔗糖, VP, 葡萄糖产气等。生化鉴定管及相关试剂均购自杭州微生物有限公司。

1.5.2 16S rDNA 序列测定与分析

将病原菌接种于普通海水营养液体培养基中, 28℃ 以 200rpm 振荡培养 24h, 提取细菌总 DNA。细菌总 DNA 模板的提取方法参考萨姆布鲁克 J 等^[9]。对病原菌的 16S rDNA 序列的 PCR 扩增与测序:

正向引物 Pf: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' (8-27 in *E. coli*);

反向引物 Pr: 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3' (1492-1510 in *E. coli*);

扩增目的片段大小约为 1.5kb。

PCR 反应体系 (50μL): ExTaqDNA 聚合酶 (5U·μL⁻¹, 含 Mg²⁺) 0.3μL, dNTP 4μL, 10×PCR 缓冲液 5μL, 正向引物 Pf (10μmol·L⁻¹) 1μL, 反向引物 Pr (10μmol·L⁻¹) 1μL, DNA 模板 2μL, 加超纯水至总体积 50μL。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 4min; 94℃ 变性 1min、57℃ 退火 1min、72℃ 延伸 90s, 30 个循环; 最后在 72℃ 温育 10min。1% 琼脂糖电泳观察结果。采用 Takara 公司的 DNA 凝胶回收试剂盒对 PCR 产物进行回收。连接 pMD19-T Vector, 筛选阳性克隆送大连宝生物 (Takara) 有限公司进行核苷酸序列测定。采用 DNASTAR 软件将待检菌株的 16S rDNA 序列与从 GenBank 中获得的同源性最高的细菌 16S rDNA 序列进行多序列匹配排列, 构建系统进化树。

1.6 病原菌对斜带石斑鱼的 LD₅₀ 值测定

经人工感染确定致病菌株后, 参考沈建忠^[10]的测定方法测定其 LD₅₀ 值。具体方法如下: 将待测致病菌株用海水营养液体培养基于 28℃ 扩大培养 24h 后, 用无菌生理盐水 (0.85% NaCl) 稀释成以下浓度的菌悬液: 1.1×10^4 、 1.1×10^5 、 1.1×10^6 、 1.1×10^7 和 1.1×10^8 cfu·mL⁻¹, 实验共分 12 组, 其中 10 组为感染组, 将上述浓度的各组菌液分别经腹腔注射接种 2 组 (即设一个重复组), 每组接种 10 尾, 每尾接种 0.1mL; 另 2 组为对照组, 共 20 尾, 腹腔注射接种等量的无菌生理盐水。接种后连续 15d 观察记录各组石斑鱼的发病和死亡情况, 测定致病菌对斜带石斑鱼的 LD₅₀ 值。

各菌株的 LD₅₀ 分别按公式计算。

先按下式计算距离比例:

$$\text{距离比例} = \frac{> 50\% \text{的百分率} - 50}{> 50\% \text{的百分率} - < 50\% \text{的百分率}};$$

半致死时菌液的稀释指数 = 大于 50% 稀释度的对数 - 距离比例 × 稀释系数的对数 (稀释系数即稀释倍数, 这里为 10 倍稀释, 故取 10 的对数);

LD₅₀ = 菌液浓度 × 半致死时菌液的稀释指数 × 注射菌液的体积 / 鱼体的质量

1.7 药敏试验

参考许兵等^[11]的纸片法,将 25 种抗菌药物的药敏纸片(直径为 0.5cm)贴在 2216E 固体培养基平板上,测定待测菌株对抗菌药物的敏感性。28 培养 24h,观测有无抑菌圈及测量抑菌圈的直径,根据抑菌圈直径判断标准^[12]确定待测菌株对药物的敏感性结果。药敏纸片购自杭州微生物有限公司。

2 结果

2.1 病鱼的主要患病特征

养殖斜带石斑鱼患病后表现的主要症状为游动迟缓、体表黏液增多、体色发白,并在体表局部区域出现溃疡,其中尤以尾鳍溃烂最为严重,有的患病个体的尾鳍已烂成只剩余尾鳍骨,尾部呈扫把状,因此渔民称之为“烂尾病”。对病鱼解剖后发现,其肝脏变白并在表面有大块的淤血斑,肾脏表面有血泡。网箱养殖斜带石斑鱼患该病后死亡严重,有的网箱死亡率达 80%以上,造成了严重经济损失。

2.2 细菌分离

从典型患病斜带石斑鱼的体表溃疡处、肝脏、肾脏和脑等部位进行细菌分离并培养 24h 后,从肝脏、肾脏和脑都分离到大量的细菌,且从这些部位所分离细菌的菌落形态相同;从体表溃疡处也分离到大量细菌,绝大多数细菌的菌落形态与从肝脏等体内部位分离的细菌相同。从肝脏、肾脏、脑分离

的细菌以及从病灶分离的优势菌在 2216E 海水培养基上 30 培养 24 h 后,所形成的菌落特征为:圆形,表面光滑,边缘不整齐,半透明,直径为 1—2mm;在 TCBS 琼脂培养基上经 30 培养 24h 后,所形成的菌落呈黄色,直径为 0.5—1mm。挑取从三亚红沙港患病鱼脑组织分离的 2 株细菌分别命名为 HS08001 和 HS08002,挑取从陵水新村患病鱼脑组织分离的 1 株细菌命名为 XC08001。

2.3 人工感染试验

取上述分离的菌株 HS08001、HS08002 和 XC08001 以 1.4×10^7 cfu·mL⁻¹ 的浓度分别对健康斜带石斑鱼进行人工感染。结果表明,所有 3 株菌株均可导致实验石斑鱼致病并发生死亡,人工感染石斑鱼所表现的患病症状与养殖场斜带石斑鱼的患病症状相同;此外,从人工感染患病斜带石斑鱼的体表溃疡处、肝脏、肾脏和脑都分离到大量细菌,并且细菌的菌落形态与感染菌株的菌落形态相同(表 1)。从感染患病石斑鱼肝脏、肾脏和脑所分离的细菌中分别挑选 1 株典型菌株,命名为 H1、H2 和 A1,对这 3 株细菌经进一步纯化后进行表型鉴定,除阿拉伯糖外,其他生理生化指标检测结果与菌株 HS08001、HS08002 和 XC08001 完全一致。说明菌株 HS08001、HS08002 和 XC08001 均为患“烂尾病”斜带石斑鱼的致病菌。

表 1 3 株细菌对斜带石斑鱼的感染结果

Tab. 1 Results of the virulence test of three isolates to healthy *Epinephelus coioides*

菌株	菌浓度/(cfu·mL ⁻¹)	试验鱼数量/尾	总死亡数/尾	死亡率/%
HS08001	1.4×10^7	2×10	15	75
HS08002	1.4×10^7	2×10	16	80
XC08001	1.4×10^7	2×10	14	70
对照	0	2×10	0	0

2.4 病原菌的鉴定

2.4.1 表型鉴定

菌株 HS08001、HS08002、XC08001 的形态和生理生化特征鉴定结果见表 2,具体为:菌体呈短杆状,极生单鞭毛,有侧毛,不泳动,革兰氏阴性,对弧菌抑制剂 0/129 敏感($150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),对弧菌抑制剂 0/129 不敏感($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),葡萄糖发酵阳性,氧化酶阳性,4 不生长,28 和 35 生长,40 和 0 % NaCl 不生长,2 % NaCl、6 % NaCl 和 8 % NaCl 生长,10 % NaCl 不生长,V-P 反应阴性,吡嗪产生阳性,精氨酸双水解酶阴性,赖氨酸脱羧酶阳性,甘露糖

阳性,葡萄糖产气阴性,鸟氨酸脱羧酶阳性,精氨酸脱羧酶阴性,甘露醇阳性,乳糖阴性,纤维二糖阳性,ONPG 阴性。

2.4.2 16S rDNA 序列测定与分析

分别以菌株 HS08001、HS08002 和 XC08001 的基因组总 DNA 为模板,经标准 PCR 扩增和测序后,3 个菌株都产生了 1513bp 的 16S rDNA 产物,这些序列已提交至 Genbank 中,登录号分别为 FJ605240、FJ605241 和 FJ605242。将这 3 株菌株的 16S rDNA 基因序列与 Genbank 中同源性最高的 52 株其他菌株的 16S rDNA 基因序列进行同源性比对和多序列匹

表 2 菌株 HS08001、HS08002、XC08001、H1、H2、A1 和哈维氏弧菌 *Vibrio harveyi* 的形态特性及生理生化特征
Tab. 2 Physiological and biochemical characteristics of strain HS08001、HS08002、XC08001、H1、H2、A1 and *Vibrio harveyi*

项 目	不同菌株的特征						
	HS08001	HS08002	XC08001	H1	H2	A1	<i>Vibrio harveyi</i>
ONPG 反应	—	—	—	—	—	—	—
柠檬酸盐利用	+	+	+	+	+	+	+
0/ 129 敏感(150μg)	+	+	+	+	+	+	+
0/ 129 敏感(10μg)	—	—	—	—	—	—	—
TCBS 生长	黄	黄	黄	黄	黄	黄	黄
4 生长	—	—	—	—	—	—	—
28 生长	+	+	+	+	+	+	+
35 生长	+	+	+	+	+	+	+
40 生长	—	—	—	—	—	—	—
0% NaCl 生长	—	—	—	—	—	—	—
2% NaCl 生长	+	+	+	+	+	+	+
6% NaCl 生长	+	+	+	+	+	+	+
8% NaCl 生长	+	+	+	+	+	+	+
10% NaCl 生长	—	—	—	—	—	—	—
V-P 反应	—	—	—	—	—	—	—
吡哌产生	(+)	+	+	+	(+)	+	+
精氨酸双水解酶	—	—	—	—	—	—	—
赖氨酸脱羧酶	+	+	+	+	+	+	+
鸟氨酸脱羧酶	+	+	+	+	+	+	+
精氨酸脱羧酶	—	—	—	—	—	—	—
葡萄糖产气	—	—	—	—	—	—	—
阿拉伯糖	+	—	—	+	—	—	—
甘露糖	+	+	+	+	+	+	+
氧化酶	+	+	+	+	+	+	+
葡萄糖	+	(+)	+	+	+	(+)	+
蔗糖	+	—	+	—	+	+	+
甘露醇	(+)	+	(+)	—	+	+	+
乳 糖	—	—	—	—	—	—	—
纤维二糖	+	+	+	+	+	+	+
革兰氏染色	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻

注: “+”表示阳性, “—”表示阴性, “(+)”表示产生较慢。

配排列, 构建了系统进化树(图 1)。从进化树可以看出, 菌株 XC08001 与 AY750577、AY750578、EU031646 这 3 株哈维氏弧菌菌株的同源性达 99.9%—100%, 聚为独立一支; HS08001、HS08002 与哈维氏弧菌 AY750575、AY750577、AY750578、DQ304557、DQ995520、EU031646、EU090704 等的同源性高达 99.3%—99.7%。因此, 结合菌株的表型特征, HS08001、HS08002 和 XC08001 被鉴定为哈维氏弧菌。

2.5 病原菌对斜带石斑鱼的 LD₅₀ 值测定

由于 HS08001、HS08002 和 XC08001 经鉴定均为哈维氏弧菌, 根据表 1 的结果, 选择相同感染浓度下死亡率中等的 HS08001 菌株测定其对健康斜带

石斑鱼的 LD₅₀ 值。先制备浓度为 1.1×10⁸cfu·mL⁻¹ 的菌悬液, 经依次 10 倍稀释后, 分别以 1.1×10⁸、1.1×10⁷、1.1×10⁶、1.1×10⁵ 和 1.1×10⁴cfu·mL⁻¹ 对健康石斑鱼进行感染, 感染后 15d 内的死亡率和累积死亡率见表 3, 经计算, 该菌株对 8—15cm 斜带石斑鱼的 LD₅₀ 值为 1.05×10⁴cfu·g⁻¹。

2.6 药敏试验

25 种抗菌药物分别对致病菌株 HS08001 的药敏检测结果表明(表 4), 该菌株具有很强的耐药性, 只有庆大霉素、氯霉素和利福平对其高度敏感, 新生霉素、先锋必素、呋喃妥因、强力霉素对其中度敏感, 而其他 18 种抗菌药物对该病原菌均不敏感。

表 4 病原菌 HS08001 对 25 种抗菌药物的敏感性
Tab. 4 Sensitivity of strain HS08001 to 25 chemotherapeutic agents

药物种类	纸片含量 /(μg·片 ⁻¹)	抑菌圈直径 /mm	敏感性	药物种类	纸片含量 /(μg·片 ⁻¹)	抑菌圈直径 /mm	敏感性
庆大霉素	10	16	S	新霉素	30	11	R
呋喃妥因	300	16	I	链霉素	10	8	R
氯霉素	30	23	S	丁胺卡那霉素	30	10	R
新生霉素	30	16	I	氧哌嗪青霉素	100	11	R
先锋必素	30	19	I	氨苄青霉素	10	11	R
利福平	5	23	S	先锋霉素 IV	30	7	R
奥复星	5	14	I	先锋霉素 V	30	7	R
阿莫西林	10	10	R	麦迪霉素	30	8	R
阿洛西林	75	13	R	美满霉素	30	10	R
洁霉素	2	8	R	青霉素	10 IU·片 ⁻¹	9	R
万古霉素	30	11	R	苯唑青霉素	30	12	R
罗红霉素	15	/	R	强力霉素	30	13	R
氯洁霉素	2	/	R				

注: “/” 表示无抑菌圈, “R” 表示耐药, “I” 表示中度敏感, “S” 表示高度敏感。

3 讨论

由于鲨鱼弧菌 *V.carchariae* 与哈维氏弧菌的生理、生化特征和基因组的高度相似性,《伯杰氏细菌系统鉴定手册》(第九版)已将鲨鱼弧菌归属于哈维氏弧菌。目前, 16S rDNA 已被国际上公认为细菌“种(species)”鉴定的最可信的基因序列^[13]。本实验分离的 HS08001、HS08002 和 XC08001 的 16S rDNA 与哈维氏弧菌不同菌株的同源性高达 99.3%—100%, 它们的生理、生化表型特征也与哈维氏弧菌相同, 因此, 这 3 株细菌被鉴定为哈维氏弧菌。不过, 从上述的进化树可以看出(图 1), 仅菌株 XC08001 明显与 3 株哈维氏弧菌菌株聚为独立一支, 菌株 HS08001 和 HS08002 没有与其他哈维氏弧菌明显聚为一支, 同时, DQ304557 和 DQ304558 2 株哈维氏弧菌也没有和 AY750575、AY750577、AY750578、DQ304557、DQ995520、EU031646、EU090704 等 7 株哈维氏弧菌和 1 株鲨鱼弧菌标准株(ATCC35084T)聚在一起, 这主要是因为 Genbank 中存在大量的没有准确鉴定或无法培养的细菌 16S rDNA 序列, 而这些细菌中也可能大量存在哈维氏弧菌所致。

人工感染试验表明, 本实验所分离的哈维氏弧菌是引起海南省三亚红沙港和陵水新村湾的斜带石斑鱼暴发大规模“烂尾病”的致病菌。药敏试验表

明, 本实验分离的哈维氏弧菌对庆大霉素、呋喃妥因、氯霉素、新生霉素、先锋必素、利福平、强力霉素等药物较为敏感, 其中, 呋喃妥因和氯霉素是水产禁药, 不能用于该病的防治, 可以选用其他 5 种较为敏感且尚未列入水产禁用药物名册的药物来防治该疾病。近年来研究表明, 哈维氏弧菌日益成为海水养殖鱼类的重要细菌性病原之一, 主要感染对象有高体 *Seriola dumerili* 鲷、花鲈 *Lateolabrax japonicus* 和斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides* 等^[14-17]。虽然哈维氏弧菌都可引起病鱼发生程度不同的溃疡, 但是宿主的症状还是存在明显差异, 有时不同地区的同种鱼类的发病症状也可能不同。例如, 高体鲷的发病症状主要是鱼体发黄、变瘦弯曲成弓形并在水中不停旋转, 肠壁充血发炎, 有黏液样物从肛门流出, 表现为“肠炎病”, 与本文报道的症状明显不同; 厦门同安湾和广东阳江斜带石斑鱼的溃疡的程度明显较轻, 没有出现烂尾症状; 山东青岛花鲈幼鱼的患病症状主要表现为“烂尾病”, 与本研究实验鱼的发病症状基本一致。关于哈维氏弧菌致病性研究多数只在一个发病点取样, 分离 1 株优势菌进行相关实验, 本文是同时在海南省三亚红沙港和陵水新村湾两异地取样, 分离获得 3 株优势菌进行相关实验, 结果表明, 所分离的菌株虽然其 16S rDNA 序列存在一定差异, 但其均对斜带石斑鱼表现出较强的致病性。

参考文献

- [1] 肖慧, 李军, 徐怀恕, 等. 花鲈苗烂鳃、烂尾病病原菌的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1999, 29 (1): 87-93.
- [2] 王国良, 金珊, 薛良义, 等. 海水网箱鲈鱼皮肤溃烂病及其病原菌的研[J]. 黄渤海海洋, 2000, 18 (3): 85-89.
- [3] 钟硕良, 陈月忠, 周宸. 环境因子对发光细菌的生长及日本对虾仔虾感染死亡率的影响[J]. 中国水产科学, 2001, 8(1): 41-45.
- [4] ZHANG X H, AUSTIN B. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids[J]. J Fish Dis, 2000, 23: 93-102.
- [5] 沈萍, 范秀容, 李广武, 等. 微生物学实验 [M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 1999: 69-74.
- [6] 徐怀恕, 杨学宋, 李筠. 对虾苗期细菌病害的诊断与控制 [M]. 北京: 海洋出版社, 1999: 166-190.
- [7] MERCEDES ALSINA, ANICENT R B. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species[J]. Journal of applied bacteriology, 1994, (76): 78-85.
- [8] 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: 353-381.
- [9] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2003: 87-99.
- [10] 沈建忠. 动物毒理学[M]. 中国农业出版社, 2002: 84-95.
- [11] 许兵, 纪伟尚, 徐怀恕, 等. 对虾病原菌抑菌药物的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1993, 23 (2): 43-51.
- [12] 樊景凤, 宋立超, 王斌, 等. 1 株引起凡纳滨对虾红体病的病原菌—副溶血弧菌的初步研究[J]. 海洋科学, 2006, 30(4): 40-44.
- [13] AZNAR R, LUDWIG W, AMARM R I, et al. Sequence determination of rRNA genes of pathogenic *Vibrio* species and whole-cell identification of *vibrio vulnificus* with rRNA-targeted oligonucleotide probes[J]. Syst Bacteriol, 1994, 44(2): 330-337.
- [14] 吴后波, 潘金培. 海水网箱养殖高体鲈弧菌病致病菌研究[J]. 水产学报, 1997, 21(2): 171-174.
- [15] 王保坤, 余俊红, 李筠, 等. 花鲈弧菌病病原菌(哈维氏弧菌)的分离与鉴定[J]. 中国水产科学, 2002, 9(1): 52-55.
- [16] 覃映雪, 池信才, 苏永全, 等. 网箱养殖青石斑鱼的溃疡病病原[J]. 水产学报, 2004, 28: 297-302.
- [17] 陈献稿, 吴淑勤, 石存斌, 等. 斜带石斑鱼病原菌(哈维氏弧菌)的分离与鉴定[J]. 中国水产科学, 2004, 11: 313-317.