

# 广西北部湾大宗海水养殖鱼类卵形鲳鲹感染溶藻弧菌及其致病性研究\*

## Isolation, Identification and Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* from Marine Cultured *Trachinotus ovatus* in Beibu Gulf, Guangxi

余庆<sup>1</sup>,李菲<sup>1</sup>,王一兵<sup>2</sup>,覃仙玲<sup>1</sup>,陈宪云<sup>1</sup>,吴柳莹<sup>2</sup>,李鹏飞<sup>1\*\*</sup>

YU Qing<sup>1</sup>, LI Fei<sup>1</sup>, WANG Yibing<sup>2</sup>, QIN Xianling<sup>1</sup>, CHEN Xianyun<sup>1</sup>, WU Liuying<sup>2</sup>, LI Pengfei<sup>1</sup>

(1. 广西科学院广西北部湾海洋研究中心, 广西近海海洋环境科学重点实验室, 广西南宁 530007; 2. 广西民族大学海洋学院, 广西南宁 530007)

(1. Guangxi Key Laboratory of Marine Environmental Science, Guangxi Beibu Gulf Marine Research Center, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. College of Marine Sciences, Guangxi University for Nationalities, Nanning, Guangxi, 530007, China)

**摘要:**【目的】2016年广西钦州湾近海网箱养殖的卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)发生以体表皮肤溃烂、皮下出血、内脏器官病变为典型症状的细菌性疾病,通过对患病卵形鲳鲹中病原菌进行分离、鉴定与保存,为后续开展病原菌快速检测技术和防控技术等研究,以及控制相关病原菌在海水养殖中的暴发和流行奠定基础。【方法】利用LB平板和TCBS平板从患病卵形鲳鲹体表溃烂病灶、肾脏、肝脏组织中分离纯化疑似病原菌,并对其进行常规形态特征和生化反应的生物学检验,通过16S rDNA基因测序对疑似病原菌株进行分子生物学鉴定,在细胞和鱼体水平开展病原菌的致病性研究,同时进行人工感染的回接试验。【结果】分离得到4株疑似病原菌(TOQZ01, TOQZ02, TOQZ03, TOQZ04),基于其表型、分子生物学特征和进化关系,判定4株菌株均为弧菌属的溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*),且细胞毒性试验和回归试验证实,分离得到的溶藻弧菌为此次卵形鲳鲹发病的病原菌。【结论】溶藻弧菌是引起广西沿海地区海水养殖鱼类发生细菌性鱼病的主要致病菌之一,未来将基于本研究中分离得到的溶藻弧菌开展病害快速检测技术和防控技术等现代海水生态健康养殖关键技术研究,以实现广西海水养殖溶藻弧菌病的快速诊断、实时监控和有效预防。

**关键词:**卵形鲳鲹 溶藻弧菌 细胞毒性 防控建议

**中图分类号:**S941.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2018)01-0068-06

**Abstract:**【Objective】The *Trachinotus ovatus* cultured in offshore cages in Qinzhou Bay of Guangxi Province showed typical symptoms of bacterial diseases in 2016, including skin ulceration, subcutaneous bleeding and visceral lesions. By isolating, identifying and preserving the pathogenic bacteria in the diseased *T. ovatus*, it established the foundation for the follow-up research on the rapid detection technology and prevention and control technology of pathogenic bacteria, as well as controlling the outbreak and epidemic of related pathogenic bacteria in the marine culture. 【Methods】Four suspected pathogen strains were isolated from the ulcer lesions, kidney and liver of diseased *T. ovatus* by using LB and TCBS plates. Biological tests were conducted to check the conventional morphological

收稿日期:2017-12-26

修回日期:2018-01-08

作者简介:余庆(1990-),女,硕士,实习研究员,主要从事水生经济动物病害防控技术研究。

\* 广西自然科学基金项目(2017GXNSFBA198176)和广西科学院基本科研业务费项目(2017YJJ23002)资助。

\*\* 通信作者:李鹏飞(1988-),男,博士,硕士生导师,主要从事水生经济动物病害防控与生态养殖技术研究, E-mail: pfl2014@126.com。

and pathogenicity of related pathogenic bacteria in the marine culture. 【Methods】Four suspected pathogen strains were isolated from the ulcer lesions, kidney and liver of diseased *T. ovatus* by using LB and TCBS plates. Biological tests were conducted to check the conventional morphological

characteristics and physiological and biochemical reactions. Molecular biology identification of the suspected pathogenic strains was performed by 16S rDNA gene sequencing. The pathogenicity of pathogenic bacteria was carried out at the level of cells and fish, and the re-inoculation of artificial infection was carried out simultaneously. **【Results】**Four strains of suspected pathogens (TOQZ01, TOQZ02, TOQZ03, TOQZ04) were isolated and these four strains were identified as *Vibrio alginolyticus* based on their phenotypes, molecular biological characteristics and evolutionary relationships. The cytotoxicity and regression tests confirmed that the isolated *V. alginolyticus* were the pathogen, which caused the bacterial diseases in *T. ovatus*. **【Conclusion】***Vibrio alginolyticus* is one of the main pathogenic bacteria that cause bacterial fish disease in marine culture fish in the coastal areas of Guangxi. In the future, *Vibrio alginolyticus* isolated from this study will be used to carry out rapid disease detection technology and prevention and control technology and other key technologies of modern seawater eco-health farming in order to realize the rapid diagnosis, real-time monitoring and effective prevention of *Vibrio alginolyticus* in marine culture of Guangxi.

**Key words:** *Trachinotus ovatus*, *Vibrio alginolyticus*, cytotoxicity, suggestion for prevention and control

## 0 引言

**【研究意义】**卵形鲳鲅和石斑鱼肉质细腻,营养丰富,作为名贵的海水养殖鱼类,在活海鲜市场中的经济价值极高。目前国内石斑鱼养殖年产量已达10万吨以上,卵形鲳鲅年产量则达到8万吨左右,产业直接产值超过200亿元<sup>[1-2]</sup>。近年来随着卵形鲳鲅和石斑鱼需求量的不断增加,广西地区的卵形鲳鲅和石斑鱼养殖进入了快速发展期,养殖效益极为显著,市场潜力巨大,有望成为继罗非鱼和对虾养殖后广西的又一大支柱性产业<sup>[3-6]</sup>。然而在高密度、集约化网箱养殖条件下,各种病害频繁暴发,造成巨大经济损失<sup>[7]</sup>。

**【前人研究进展】**作为包括广西在内的华南沿海地区海水养殖鱼类发生细菌性鱼病的主要致病菌之一,溶藻弧菌引起的鱼病具有发病迅速、死亡率高、流行面广等特点,严重威胁华南地区水产养殖业的健康可持续发展<sup>[8-9]</sup>。弧菌病的防治一直是研究的重点。目前治疗弧菌病主要是使用抗生素等化学药物,但药物抗菌效果不持久,更严重的是抗生素的滥用不仅加剧了耐药菌株的产生,还造成了水产品中有害药物残留等重大食品安全问题,以及导致近海生态环境不断恶化<sup>[10-11]</sup>。**【本研究切入点】**2016年春夏交接时期,北海、钦州、防城港等广西卵形鲳鲅主要养殖区暴雨不断,河道暴涨携带大量泥沙进入海水,浑浊的海水不仅造成网箱中卵形鲳鲅产生缺氧应激,更导致鱼病的暴发流行。其中,广西钦州湾近海网箱养殖的卵形鲳鲅发生以体表皮肤溃烂、皮下出血、内脏器官病变为典型症状的细菌性疾病。**【拟解决的关键问题】**本研究对患病卵形鲳鲅中疑似病原菌进行系统研究,包括对疑似病原菌进行常规形态特征和生理生化反应的生物学检验,通过16S rDNA基因测序对疑似病原菌

株进行分子生物学鉴定与系统发育分析,在细胞和鱼体水平开展病原菌的细胞毒性和致病性研究,同时进行人工感染的回接试验,最终证实此次卵形鲳鲅发病的病原菌为弧菌属的溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

卵形鲳鲅头肾组织细胞系(TOHK cell line)保存于本实验室<sup>[12]</sup>;0.22 μm滤柱购自Millipore;96孔细胞培养板购自Corning;琼脂平板和细菌生化鉴定管等购自广州环凯微生物有限公司;生化培养箱购自上海博迅,超净工作台为AIRTECH,观察细胞用的倒置光学显微镜为Olympus CX41。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 病鱼样品采集与疑似病原菌的分离纯化

发病的卵形鲳鲅从广西钦州湾近海养殖网箱中采集获得,体长10~15 cm;健康卵形鲳鲅购自钦州的卵形鲳鲅养殖场,体长10~15 cm。在无菌条件下,从患病卵形鲳鲅的肝、脾、肾和体表溃烂组织处取样划线接种于琼脂平板,置于37℃培养24 h后,根据优势菌落的形态大小、颜色特征等进一步纯化培养,纯化后的菌株用30%甘油保存于-80℃超低温冰箱中。

#### 1.2.2 病原菌的分子生物学鉴定与Blast比对

利用细菌基因组DNA提取试剂盒,提取纯化后细菌的基因组DNA,作为PCR反应中的模板DNA。利用16S rDNA基因通用引物进行PCR扩增,16S rDNA基因通用引物为27F:5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R:5'-CGGTTACCTTGT-TACGACTT-3'。PCR反应程序为98℃预变性5

min, 95°C 变性 1 min, 55°C 退火 45 s, 72°C 延伸 1 min, 30 个循环后 72°C 延伸 10 min。取部分 PCR 产物进行电泳检测, 剩余部分交由上海生物工程服务有限公司测序, 并使用 NCBI 的 Blast 功能对测序结果进行比对分析。

### 1.2.3 回归试验

试验前随机取 5 尾健康卵形鲳鲂的肝、脾、肾和肌肉组织涂板确定其健康无细菌感染。试验组中, 分别将分离得到的疑似病原菌通过腹腔注射接入健康卵形鲳鲂中。对照组 1(Con1) 中健康卵形鲳鲂腹腔注射无菌 PBS, 对照组 2(Con2) 中健康卵形鲳鲂不作任何处理, 每组 10 尾鱼。将分离纯化的菌株在 LB 液体培养基中 37°C 培养 24 h, 然后将菌液用 PBS 稀释成菌悬液(浓度为  $1 \times 10^8$  CFU/mL), 试验组的每尾鱼腹腔注射 0.2 mL 稀释的菌悬液, 对照组 1 注射 0.2 mL 的 PBS, 对照组 2 不作任何处理。各组鱼在 28°C 继续培养 10 d, 记录各组鱼的死亡情况, 统计 10 d 内的累计死亡率, 同时用 LB 平板对濒临死亡的卵形鲳鲂肝脏、脾脏、肾脏和肌肉组织进行细菌分离。

### 1.2.4 细菌胞外产物(Extracellular products, ECPs)对细胞的毒性分析

将分离纯化的菌株 TOQZ01 在 LB 液体培养基中 37°C 培养 36 h, 12 000 g 4°C 离心 30 min 后收集上清, 使用 0.22  $\mu$ m 滤柱过滤上清液后, 获得细菌胞外产物(ECPs), 并用 BCA 蛋白检测试剂盒(Pierce Biotechnology, Rockford, I L) 测定上清液中细菌胞外产物(ECPs)中的蛋白含量。取卵形鲳鲂头肾组织细胞, 按照  $4 \times 10^4$  细胞/孔的细胞量接入 96 孔细胞培养板, 28°C 培养 24 h。该实验分为 3 组: 试验组 1(Test 1), 每孔细胞接入 10  $\mu$ L ECPs(300  $\mu$ g/mL); 试验组 2(Test 2), 每孔细胞接入 20  $\mu$ L ECPs(300  $\mu$ g/mL); 试验组 3(Test 3), 每孔细胞接入 30  $\mu$ L ECPs(300  $\mu$ g/mL); 对照组 1(Con 1), 每孔细胞接入

表 1 4 株菌株的生理生化检测结果

Table 1 Physiological biochemical test results of 4 strains

生理生化检测项目 Biochemical tests	溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	TOQZ01	TOQZ02	TOQZ03	TOQZ04
1%NaCl 葡萄糖产气 1%NaCl Glucose	-	-	-	-	-
1%NaCl 葡萄糖磷酸盐胨水 1%NaCl Glucose phosphate peptone water	+	+	+	+	+
1%NaCl 蛋白胨水 1%NaCl Peptone water	d	+	-	-	+
1%NaCl 蔗糖 1%NaCl Sucrose	+	+	+	+	+
1%NaCl 甘露糖 1%NaCl Mannose	+	+	+	+	+

10  $\mu$ L 无菌 PBS; 对照组 2(Con 2), 细胞无处理。各组细胞继续培养 24 h 后在光学显微镜下观察。为了检测 ECPs 的细胞毒性, 即其对细胞活性的影响, 各孔中的细胞加入 20  $\mu$ L 的 WST-8 溶液继续在 28°C 培养 4 h, 然后用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度, 实验分别重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 疑似病原菌的分离结果

在无菌操作条件下, 从自然发病的卵形鲳鲂肝、脾、肾和体表溃烂组织中分离纯化得到 4 株优势菌株, 标记为 TOQZ01, TOQZ02, TOQZ03, TOQZ04。

### 2.2 疑似病原菌的形态观察与生理生化特征

分离纯化得到的 4 株菌株在 LB 平板上 37°C 培养 24 h, 生长状况良好, 菌落形状为圆形, 表面光滑, 边缘整齐(图 1a); 4 株菌株在 TCBS 平板上 37°C 培养 24 h 后均长成黄色圆形大菌落, 表面光滑, 边缘整齐(图 1b)。对菌株进行革兰氏染色后镜检发现, 该 4 株菌株均为革兰氏阴性菌(图 1c)。对 4 株菌株进行生理生化检测, 检测结果参照文献报道和常见细菌系统鉴定手册<sup>[13-14]</sup>发现, 该 4 株菌株与溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)极为相似(表 1)。

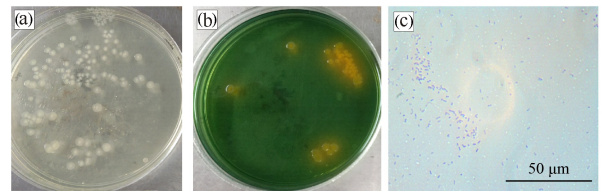


图 1 疑似病原菌在 LB 平板(a)和 TCBS 平板(b)上的菌落形态及革兰氏染色结果(c)

Fig. 1 The colony morphology and Gram staining results (c) of suspected pathogenic bacteria on LB (a) and TCBS (b) plates

Continue table 1

生理生化检测项目 Biochemical tests	溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	TOQZ01	TOQZ02	TOQZ03	TOQZ04
1%NaCl 阿拉伯糖 1%NaCl Arabia sugar	-	-	-	-	-
1%NaCl 肌醇 1%NaCl Inositol	-	-	-	-	-
1%NaCl 赖氨酸脱羧酶 1%NaCl Lysine decarboxylase	+	+	+	+	+
1%NaCl 精氨酸双水解酶 1%NaCl Arginine dihydrolase	-	-	-	-	-
无盐胨水 Salt free peptone water	-	-	-	-	-
3%NaCl 胨水 3%NaCl Peptone water	+	+	+	+	+
6% NaCl 胨水 6%NaCl Peptone water	+	+	+	+	+
8% NaCl 胨水 8%NaCl Peptone water	+	+	+	-	+
10% NaCl 胨水 10%NaCl Peptone water	+	-	+	+	-

注：“-”表示阴性，“+”表示阳性；“d”表示结果不定

Notes：“-”indicates negative，“+”indicates positive；“d”indicates indeterminate results

### 2.3 疑似病原菌的分子生物学鉴定

将 4 株菌株(TOQZ01, TOQZ02, TOQZ03, TOQZ04)的 16S rDNA 经 PCR 扩增后的产物进行电泳检测,得到预期大小的条带(图 2a)。PCR 产物的测序结果显示,条带大小均为 1 466 bp。对测序结果进行 Blast 比对分析,结果显示 4 株菌株的 16S rDNA 基因均与溶藻弧菌相似性最高,达到 99%。系统进化树结果显示 TOQZ01 与 TOQZ02 聚为一族(图 2b)。综合 4 株菌株的菌落形态特征、菌株生理生化特征和分子生物学鉴定结果,证实这 4 株菌株均为溶

藻弧菌 *V. alginolyticus*。

### 2.4 回归试验与病原菌的确认

健康卵形鲳鲅在分别注射 4 株菌株的菌液后的 5~8 d 内全部死亡(图 3),并出现与自然发病的卵形鲳鲅相似的皮肤肌肉溃烂、腹鳍出血、内脏器官肿大充血等症状,而两组对照组中,对照组 2 中的卵形鲳鲅没有死亡或异常,对照组 1 中的卵形鲳鲅在第 1 天死亡 1 尾(可能是由于注射不当致使卵形鲳鲅受伤而死亡)。对病变死亡的卵形鲳鲅的肝、脾、肾和体表溃烂组织处取样,进行细菌学的分离检测和分子生物学鉴定,检出的菌株与 4 株菌株(TOQZ01, TOQZ02, TOQZ03, TOQZ04)均具有相似的形态和生理生化特征,且分子生物学鉴定也证明检出的菌株为溶藻弧菌。由此证明,溶藻弧菌是此次广西钦州湾近海网箱中卵形鲳鲅发病的病原菌。

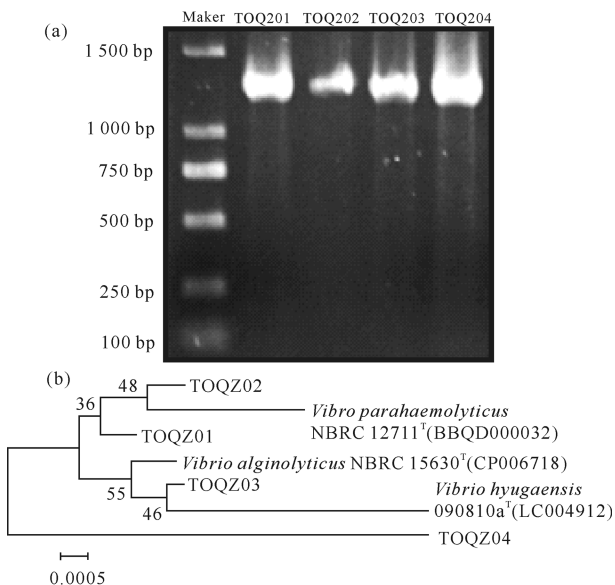


图 2 4 株病原菌 16S rDNA PCR 扩增后的电泳图像(a)和系统进化树(b)

Fig. 2 Electrophoretic images (a) and phylogenetic tree (b) of four pathogenic bacteria 16S rDNA after PCR amplification

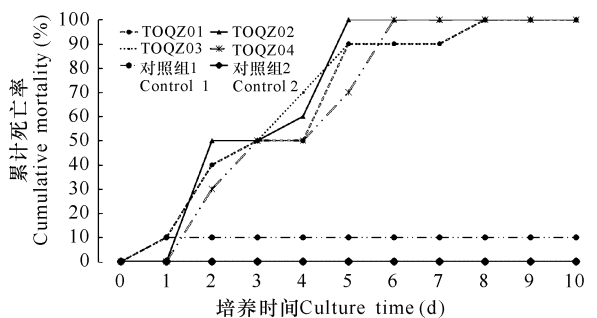


图 3 4 株菌株感染健康卵形鲳鲅的试验结果

Fig. 3 Experiment results of four strains infected with healthy *Trachinotus ovatus*

### 2.5 病原菌的胞外产物(ECPs)对卵形鲳鲅细胞系的毒性分析

菌株 TOQZ01 在 LB 液体培养基中 37℃ 培养 36

h后,菌液浓度达到  $9 \times 10^8$  CFU/mL。将获得细菌胞外产物(ECPs)按浓度梯度分别加入各组的卵形鲳鲆 TOHK 细胞中,与对照组相比,实验组的细胞形态发生变化,正常状态下长梭形的 TOHK 细胞变圆、发生皱缩,并且从细胞培养板上脱落(图 4)。细胞活性检测结果显示,实验组中的细胞活性明显降低(图 5),即菌株 TOQZ01 的细菌胞外产物(ECPs)对卵形鲳鲆 TOHK 细胞具有明显毒性。

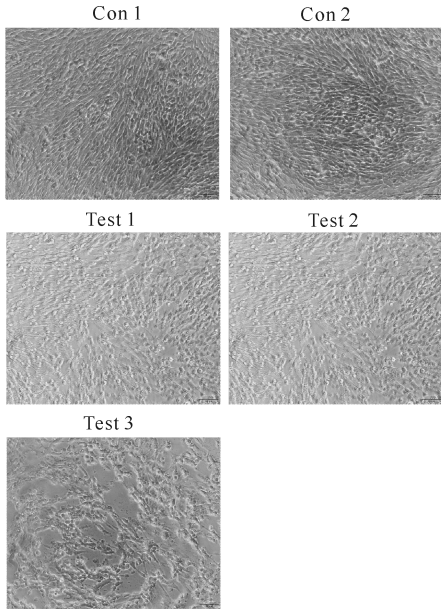
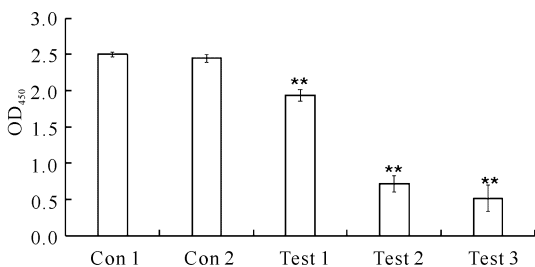


图 4 光学显微镜观察 TOQZ01 菌株的细菌胞外产物(ECPs)对卵形鲳鲆 TOHK 细胞的毒性作用

Fig. 4 Light microscope observed the cytotoxicity of bacterial extracellular products of TOQZ01 strain to TOHK cells in *Trachinotus ovatus*



\*  $P < 0.05$ , 差异显著; \*\*  $P < 0.01$ , 差异极显著

A  $P$  value  $< 0.05$  was considered statistically significant (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ )

图 5 细胞活性检测 TOQZ01 菌株的细菌胞外产物(ECPs)对卵形鲳鲆 TOHK 细胞的毒性作用

Fig. 5 Cell activity detected the cytotoxicity of bacterial extracellular products of TOQZ01 strain to TOHK cells in *Trachinotus ovatus*

### 3 讨论

2016 年广西钦州湾近海网箱养殖的卵形鲳鲆发

生以体表皮肤溃烂、皮下出血、内脏器官病变为典型症状的细菌性疾病,通过对患病卵形鲳鲆中病原菌进行分离、形态学观察、生理生化分析,分子生物学鉴定,证实分离得到的 4 株菌株(TOQZ01, TOQZ02, TOQZ03, TOQZ04)均为溶藻弧菌。进一步的回归实验证实,这 4 株溶藻弧菌是此次卵形鲳鲆发病的病原菌。在细胞水平上的检测结果证实,分离获得的溶藻弧菌的细菌胞外产物(ECPs)对卵形鲳鲆 TOHK 细胞具有明显的细胞毒性,这与卵形鲳鲆和石斑鱼等世界主要海水养殖鱼类受到溶藻弧菌感染后出现出血性溃疡、内脏器官肿大病变的组织病理学结果相一致,即溶藻弧菌在感染和增殖过程中向胞外释放的代谢产物(细菌毒素),不仅干扰并破坏鱼体正常新陈代谢,而且对鱼体造成严重的细胞和组织损伤<sup>[15-16]</sup>。

目前对养殖鱼类细菌性疾病的诊断方法主要包括基于细菌学和组织病理学的传统观察法,基于抗体的免疫学检测方法,以及分子生物学技术等<sup>[17]</sup>。这些方法各有优点,但同时也存在操作繁琐、耗时长、仪器试剂昂贵或精确度不高等不足,无法达到现场快速准确检测诊断的要求。因此应着力发展操作便捷、成本低、耗时短、准确度高的水产致病菌快速检测技术,同时研发新型高效、绿色环保的抗菌药物,这对于及早发现、确定病原,进而有的放矢地制定治疗方案来控制溶藻弧菌的扩散、降低损失至关重要<sup>[18]</sup>。未来我们将基于本研究中分离得到的溶藻弧菌开展病害快速检测技术和防控技术等现代海水生态健康养殖关键技术研究,以实现广西海水养殖溶藻弧菌病的快速诊断、实时监控和有效预防。

### 4 结论

从广西钦州湾网箱养殖的发病卵形鲳鲆中分离得到的 4 株溶藻弧菌(TOQZ01, TOQZ02, TOQZ03, TOQZ04),回归实验证实溶藻弧菌是此次卵形鲳鲆发病的病原菌,溶藻弧菌 TOQZ01 的细菌胞外产物(ECPs)对卵形鲳鲆头肾组织细胞系具有明显细胞毒性。未来将针对广西卵形鲳鲆中分离得到的溶藻弧菌开展病害快速检测技术和防控技术的研究,以实现广西海水养殖溶藻弧菌病的快速诊断、实时监控和有效预防。

#### 参考文献:

[1] 刘锡强,马学坤,刘康,等. 华南地区金鲳鱼养殖报告[J]. 当代水产,2014(2):26-29.

LIU X Q, MA X K, LIU K, et al. Reports on the cultured *Trachinotus ovatus* in South China [J]. Current

Guangxi Sciences, Vol. 25 No. 1, February 2018

- Fisheries, 2014(2):26-29.
- [2] 黄和,王娜,陈良,等.金鲳鱼鱼糜制品加工工艺优化[J].食品与机械,2015,31(6):193-198.  
HUANG H, WANG N, CHEN L, et al. Optimization on processing of *Trachinotus ovatus surimi* gel by response surface methodology[J]. Food & Machinery, 2015, 31(6):193-198.
- [3] 张少峰,张春华,邢素坤.广西海洋经济发展现状与对策分析[J].海洋开发与管理,2015(4):103-106.  
ZHANG S F, ZHANG C H, XING S K. Analysis on the current situation and countermeasures of marine economic development in Guangxi[J]. Ocean Development and Management, 2015(4):103-106.
- [4] 李坚明.“十三五”广西水产养殖业发展战略研究[J].中国渔业经济,2016,34(4):25-31.  
LI J M. Research on the development strategy of Guangxi aquaculture in 13th Five-Year[J]. Chinese Fisheries Economics, 2016, 34(4):25-31.
- [5] 马振国,洪泉.广西推动石斑鱼产业快速发展[N].中国食品安全报,2013-11-30(B1).  
MA Z G, HONG Q. Guangxi promotes the rapid development of grouper fish industry[N]. China Food Safety News, 2013-11-30(B1).
- [6] 罗春业,廖愚.广西大力发展“九化渔业”[J].中国水产,2015(1):20-22.  
LUO C Y, LIAO Y. Guangxi vigorously develops “nine oriented fishery”[J]. China Fisheries, 2015(1):20-22.
- [7] 夏立群,黄郁葱,鲁义善.卵形鲳鲹主要病害及其研究进展[J].安徽农学通报,2012,18(23):140-143,150.  
XIA L Q, HUANG Y C, LU Y S. The diseases in *Trachinotus ovatus* culture and their research progress[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2012, 18(23):140-143,150.
- [8] LIU C H, CHEN J C. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2004, 16(3):321-334.
- [9] 张彬,黄婷,熊建华,等.文蛤主要弧菌性病害研究进展[J].广东农业科学,2012(17):128-130,134.  
ZHANG B, HUANG T, XIONG J H, et al. Research progress of *Vibriosis* in hard clam, *Meretrix meretrix* Linnaeus[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2012(17):128-130,134.
- [10] 陈雨生,房瑞景,乔娟.中国海水养殖业发展研究[J].农业经济问题,2012(6):72-77.  
CHEN Y S, FANG R J, QIAO J. Study on the development of mariculture in China[J]. Issues in Agricultural Economy, 2012(6):72-77.
- [11] PARVATHI A, MENDEZ D, ANTO C. Distribution of putative virulence genes and antimicrobial drug resistance in *Vibrio harveyi* [J]. Indian J Microbiol, 2011, 51(3):332-337.
- [12] LI P, ZHOU L, WEI S, et al. Establishment and characterization of a cell line from the head kidney of Golden pompano *Trachinotus ovatus* and its application in toxicology and virus susceptibility[J]. J Fish Biol, 2017, 90(5):1944-1959.
- [13] HÖRMANSDORFER S, WENTGES H, NEUGEBAUR - BÜCHLER K, et al. Isolation of *Vibrio alginolyticus* from seawater aquaria[J]. Int J Hyg Environ Health, 2000, 203(2):169-175.
- [14] 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.  
DONG X Z, CAI M Y. Handbook of systematic identification of common bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [15] 赖迎迢,陶家发,孙承文,等.鱼源溶藻弧菌生物学特性和病理组织学观察[J].微生物学报,2014,54(11):1378-1384.  
LAI Y T, TAO J F, SUN C W, et al. Biological characteristics and histopathological observation of *Vibrio alginolyticus* from diseased fish[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(11):1378-1384.
- [16] 崔婧,范雪亭,刘文竹,等.华南地区海水养殖鱼类主要弧菌病原的分离与鉴定[J].海南大学学报:自然科学版,2014,32(3):244-251.  
CUI J, FAN X T, LIU W Z, et al. Isolation and identification of *Vibriosis pathogens* of marine cultured fishes in Southern China[J]. Natural Science Journal of Hainan University, 2014, 32(3):244-251.
- [17] ABUBAKAR I, IRVINE L, ALDUS C F, et al. A systematic review of the clinical, public health and cost-effectiveness of rapid diagnostic tests for the detection and identification of bacterial intestinal pathogens in faeces and food[J]. Health Technol Assess, 2007, 11(36):1-216.
- [18] 王一娴,叶尊忠,斯城燕,等.适配体生物传感器在病原微生物检测中的应用[J].分析化学评述与进展,2012,40(4):634-642.  
WANG Y X, YE Z Z, SI C Y, et al. Application of aptamer based biosensor for detection of pathogenic microorganism[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2012, 40(4):634-642.

(责任编辑:陆雁)