

文章编号: 1000 - 0615(2004)03 - 0297 - 06

网箱养殖青石斑鱼的溃疡病病原

覃映雪, 池信才, 苏永全, 王德祥, 陈信忠

(厦门大学海洋学系亚热带海洋研究所, 福建 厦门 361005)

摘要: 2002 年夏季厦门同安湾一带气候炎热, 降雨量少, 海水盐度偏高, 同安湾刘五店的网箱养殖石斑鱼大面积暴发溃疡病。本研究调查了石斑鱼溃疡病暴发的特征和症状, 主要表现为肌肉溃疡坏死、眼球脱落、鱼骨暴露等。从病鱼体表及内脏分离出优势菌群命名为 TS-628, 经回归感染证实 TS-628 就是引发本次石斑鱼溃疡病的病原菌。对病原菌进行鉴定发现, 该菌革兰氏染色呈阴性, 电镜下观察菌体呈短杆状, 极端单鞭毛, 综合研究该菌在形态、生理生化、16S rDNA 同源性 & 药物敏感性等方面的特性, 基本确认分离到的病原菌为哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*), 该菌对氯霉素、壮观霉素等多种抗生素敏感, 对万古霉素、青霉素 G 等抗生素不敏感。哈维氏弧菌是水产养殖病害常见病原菌, 但作为养殖石斑鱼的病原菌在国内属首次报道。

关键词: 哈维氏弧菌; 青石斑鱼; 溃疡病; 病原

中图分类号: S941.42 **文献标识码:** A

The pathogeny of ulcer disease in *Epinephelus awoara*

QIN Ying-xue, CHI Xin-cai, SU Yong-quan, WANG De-xiang, CHEN Xin-zhong

(Department of Oceanography, Institute of Subtropic Ocean, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The summer of 2002 was hot and dry in Xiamen, and the seawater salinity was higher than usual, sometimes reaching 38 in Tongan Bay. From the end of May, ulcer disease occurred on a large scale in Tongan Bay. In the middle of June, a heavy rain brought about high mortality among the cultured groupers, which caused serious loss. The characteristics of ulcer disease were observed. Infected groupers displayed sluggish swimming and refused feeding, several days later, the groupers' eyes swelled and became ulcerated, the tail turned red, the scales became detached and the back muscle gradually ulcerated, then the eyes even dropped out and the muscle became so necrotic that the spine was exposed, finally the diseased fishes died. Anatomized the dead fish and found that the livers and gills were pale and the gallbladder was distended. The time course from appearance of disease signs to death lasted about a week. Dominant bacteria, which were Gram-negative and seen short rod with single polar flagellum under electron microscope, were isolated and designated TS-628. In artificial infection test all fish of the experimental group died on the third day after injected with bacterial suspension, while all the fish in control group showed no signs till the end of another week observation. The dead grouper had pale livers and gills and small ulcerations on the caudal fin and anal fins. These were the same signs as the natural infected fishes. The re-isolate also had the same characteristics as TS-628, which proved the isolate TS-628 was the pathogenic bacteria that

收稿日期: 2003-05-14

资助项目: 福建省重大科技项目资助(2002N009)

作者简介: 覃映雪(1976-), 女, 广西柳州人, 博士研究生, 主要从事鱼类病害研究。Tel: 0592 - 2181589, E-mail: yingxue-qin@163.com

triggered this ulcer disease. Different methods were used to identify the pathogenic bacteria in this study. The identification result through VITEK-AMS system GNI card was that TS-628 was *Burkholderia mallei*, with 99% reliability. While traditional biochemical identification revealed that TS-628 exhibited relatedness to *Vibrio harveyi* through comparison with Bergey's Manual Determinative Bacteriology. In order to confirm absolutely different results above, further researches were carried out to identify TS-628 again. So 471bp sequence of TS-628 16S rRNA gene was amplified and compared with all DNA sequences (1192858 in total) in GenBank (GenBank + EMBL + DDBJ + PDB), homology analyses showed that 16 sequences were picked out to have the highest similarity, with 98% identity. These 16 sequences all originated from *Vibrio*, 8 of them didn't mention specific names, 6 of them were *V. harveyi* and 2 of them were *V. carchariae* which also belongs to *harveyi* because their similarity in physiological and biological characteristics and DNA homology. According to morphological features, physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA gene homology comparison of the bacteria, the pathogenic bacteria were *V. harveyi*. Drug sensitivity test showed that the pathogenic bacteria were highly sensitive to chloramphenicol, actinospsectcin etc. *V. harveyi* is a kind of pathogenic bacterium commonly found in marine-fishes culture, but this is the first time that *V. harveyi* is reported as the pathogenic bacteria of cage-cultured grouper in China. And *V. harveyi* should be regarded as an opportunistic pathogen which has close relation to temperature and salinity and easily causes vibriosis under conditions of high temperatures and drought. Therefore, it is necessary to guard against *V. harveyi* vibriosis in such summer days.

Key words: *Vibrio harveyi*; *Epinephelus awoara*; ulcer disease; pathogeny

石斑鱼 (grouper) 是鲈形目 (Perciformes), 鲈科 (Serranidae), 石斑鱼亚科 (Epinephelinae), 石斑鱼属 (*Epinephelus*) 鱼类的通称。它是一类名贵海产鱼, 一向以其肉质鲜美营养丰富而倍受青睐, 目前石斑鱼类已经成为我国南方海水网箱养殖的主要品种, 据初步估计, 仅厦门市 2000 年海水养殖石斑鱼的网箱就已达 3 万多箱。但是, 随着养殖密度的增加, 水体环境的恶化, 石斑鱼各种养殖病害时有发生, 且有愈演愈烈之势。

2002 年夏季厦门气候炎热, 降雨量少, 海水盐度偏高, 同安湾刘五店一带海水盐度有时高达 38, 从 5 月底开始, 同安湾网箱养殖的石斑鱼病害大面积暴发, 6 月中旬在一次较大规模的降雨后石斑鱼大量死亡, 之后病害趋于平缓并恢复正常。经调查和解剖分析排除了病毒和寄生虫为病原的可能, 从鱼病灶部位分离出优势菌株并经回归感染证实该菌株是引起此次病害的病原菌, 本文从形态、生化反应及 16S rDNA 同源性等方面对其进行了研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用鱼 患病青石斑鱼 (400 ~ 500g) 于溃疡病暴发的高峰期取自厦门同安湾刘五店病害严重的 Z 养殖网箱, 非发病期从同安湾刘五店没有病

害感染的 L 养殖网箱选取无异常活力强的青石斑鱼 (300 ~ 400g) 用于回归感染。

培养基 普通营养琼脂培养基和 TCBS 培养基。

常规 PCR 试剂 Taq 酶、dNTP 等购自 Takara 生物公司, 引物由上海生工合成。

1.2 实验方法

病原菌的分离 无菌操作取患病鱼的鳃、肝脏、肠及体表溃烂部位在普通营养琼脂上划线分离病原菌, 32 培养至有明显菌落生成, 挑取优势菌落在普通营养琼脂和 TCBS 培养基平板划线分离数次, 直至获得纯培养物, 编号为 TS-628。

回归感染 8 尾健康青石斑鱼充气暂养一周无异常后用于回归感染, 其中 4 尾为实验组, 另外 4 尾为对照组。分离纯化后的细菌, 制成约 9×10^8 cfu \cdot mL⁻¹ 菌悬液, 对实验组进行腹腔注射, 每尾注射 0.2 mL, 对照组每尾注射 0.2 mL 生理盐水。

形态学观察 分离纯化的细菌按常规负染方法负染后置电镜下观察并拍照。

细菌的生化鉴定 取 TS-628 菌株的单菌落用自动微生物检测仪 (AMS) GNI 鉴定卡鉴定, 自动微生物检测仪 VITEK JR. 由法国生物梅里埃公司生产。并根据文献 [1] 的方法选取有代表性的生化反应, 用细菌微量生化鉴定管进行细菌生化鉴定。

分子生物学方法鉴定细菌 借鉴彭宣宪等^[2]设计的细菌 16S rRNA 基因保守区特异性引物 RI (5' -AACTCAAAGGAATTGACGG 3') 和 RII (5' -GACGGCGGTGTGTACAA 3'), 以分离菌株 DNA 为模板,对该菌株 16S rRNA 基因片段进行 PCR 扩增。

反应体系:10 ×Buffer 5 μL, Mg⁺⁺ 4 μL, dNTP 4μL, 模板 DNA 2 μL, RI 1 μL, RII 1 μL, Ex Taq 0.8 μL, ddH₂O 32.2 μL。

反应程序:95 5min; (95 60s; 50 45s; 72 45s) ×30 cycles; 72 7min。同样的模板和引物分别扩增 3 次并将产物交上海生工进行序列测定。应用 genetyr 和 clustalx 分析软件将 3 次测序结果进行分析,得到长为 471bp 的序列,与所有已登录基因库的 1192858 个基因片段进行同源性比较。

药敏实验 将分离到的病原菌接种于液体培养基,32 培养 18h 后均匀涂布在营养琼脂平板,后在平板上贴上含不同药物的药敏片(购自杭州天和微生物试剂有限公司,批号 20011123),32 培养 24h,测量抑菌圈直径。

2 结果

2.1 溃疡病症状

2002 年 6 月同安湾网箱养殖青石斑鱼暴发病害的主要症状:发病初期患病鱼缓慢浮游于网箱边缘,不再摄食;中期,患病鱼眼球变为黄绿色并且明显向外突出,体表病变的部位变红,鳞片溃烂并逐渐脱落,主要出现在背部和尾部;后期患病鱼的眼球溃烂脱落,病灶部位肌肉腐烂,以至骨骼外露,最后死亡。解剖检查,病鱼肝脏和鳃的颜色泛白,胆囊肿大。从出现病症到最后死亡整个过程为 1 周左右。

2.2 病原菌的形态特征

经分离在 TCBS 平板上的可视菌落有 3 种,95% 以上的优势菌落为黄色,另外在大量优势菌落中还夹杂有少数几个绿色和浅黄色菌落,挑取优势菌落在普通营养琼脂和 TCBS 培养基纯化培养,结果均生长良好,回归感染后再分离的菌株特征与原菌株相同。在 TCBS 平板上的菌落为黄色,圆形,隆起,边缘整齐,不透明;而在普通琼脂平板上菌落为灰白色圆形隆起,边缘光滑。细菌革兰氏染色阴性,负染后电镜观察,菌体短杆状,极端单鞭毛(图 1)。

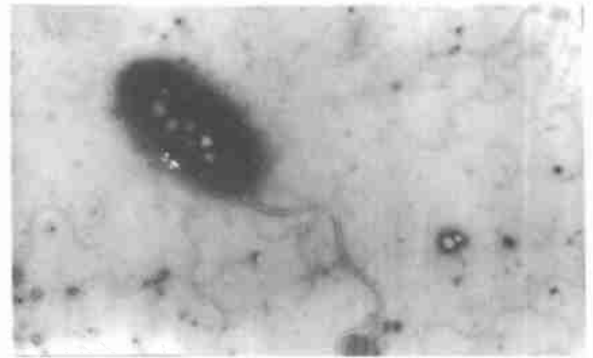


图 1 病原菌的电镜照片(×10 000)

Fig. 1 Electron micrograph of the pathogenic bacteria

2.3 回归感染结果

实验组 4 尾青石斑鱼于感染第 3 天全部死亡,对照组继续观察 1 周没有出现任何病症。死亡的实验组石斑鱼肝脏和鳃发白,有的尾鳍和臀鳍边缘开始出现轻微溃疡,症状与自然感染的患病鱼相似,再分离菌株经鉴定与感染菌株相同,证实分离得到的菌株是引发此次溃疡病的病原菌。

2.4 生化特征

自动微生物检测仪 GNI 鉴定卡的鉴定结果为鼻疽伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia mallei*) (表 1),鉴定结果的可信度达 99%。

鼻疽伯克霍尔德氏菌是人与兽类的共同病原菌,作为水生鱼类的致病菌尚未见报道,另外鼻疽伯克霍尔德氏菌不具有鞭毛,这与图 1 中的菌体形态特征不符,因此根据 TS-628 可在弧菌的选择性培养基 TCBS 上生长良好等特征选取针对弧菌类细菌的代表性生化反应,用微量生化管进行再鉴定(表 2)。由表 2 结果查知,分离菌株的上述生化特征与《伯杰氏细菌系统鉴定手册》^[3]中所描述的哈维氏弧菌(*V. harveyi*)相应生化特征相近。由于两次鉴定结果大相径庭,因而再利用分子生物学的鉴定方法进行确认。

2.5 分子生物学方法鉴定结果

分离菌株 16S rDNA 序列与基因库(GenBank + EMBL + DDBJ + PDB)中所有已登录的 1192858 个 DNA 序列进行同源性比较,结果显示和分离菌株 16S rDNA 同源性最高达 98%,共有 16 个序列,这 16 个序列均来源于弧菌属的种类,其中 8 个序列未能鉴定到种,6 个序列来自不同地区的哈维氏弧菌(*V. harveyi*),2 个序列源于鲨鱼弧菌(*V. carchariae*) (表 3)。

表 1 菌株 TS-628AMS 生化试验结果

Tab. 1 Result of biochemical test of strain TS-628 by AMS

项 目 characteristic	反 应 reaction	项 目 characteristic	反 应 reaction	项 目 characteristic	反 应 reaction
DP3	-	DP-300	-	葡萄糖氧化 glucose (oxidative)	-
生长控制 growth control	+	乙酰胺 acetamide	-	七叶苷 esculin	-
尿兰母 plant indican	-	尿素 urea	-	枸橼酸盐利用 citrate	-
丙二酸盐 malonate	+	苯丙氨酸 TDA	-	10%乳糖 lactose	+
棉子糖 raffinose	-	山梨醇 sorbitol	-	蔗糖 sucrose	+
肌醇 inositol	+	侧金盏花醇 adonitol	-	香豆醇 p-coumaric	-
硫化氢 H ₂ S	-	ONPG	-	鼠李糖 rhamnose	-
阿拉伯糖 arabinose	-	多粘霉素 B polymyxin B	-	葡萄糖发酵 glucose (fermentative)	-
乳糖 lactose	+	精氨酸 arginine	-	麦芽糖 maltose	-
赖氨酸 lysine	-	甘露醇 mannitol	-	鸟胺酸 ornithine	-
木糖 xylose	-	氧化酶 oxidase	-		

表 2 微量生化管的生化鉴定结果

Tab. 2 Results of biochemical tube test of strain TS-628

项 目 characteristic	反 应 reaction	项 目 characteristic	反 应 reaction	项 目 characteristic	反 应 reaction
氧化酶 oxidase	+	粘丝实验 sting test	+	葡萄糖产酸 glucose (fermentative)	+
乳糖 lactose	-	甘露醇 mannitol	-	尿素 urea	-
水杨素 salicin	-	蔗糖 sucrose	+	阿拉伯糖 arabinose	-
精氨酸脱羧酶 arginine decarboxylase	+	鸟氨酸脱羧酶 ornithine decarboxylase	-	赖氨酸脱羧酶 lysine decarboxylase	+
麦芽糖 maltose	+	硝酸盐还原 nitrate reduction	+	V - P	-
0%NaCl 胨水 growth on 0%NaCl	-	3%NaCl 胨水 growth on 3%NaCl	+	6%NaCl 胨水 growth on 6%NaCl	+
8%NaCl 胨水 growth on 8%NaCl	-	10%NaCl 胨水 growth on 10%NaCl	-	葡萄糖产气 glucose (oxidative)	-

2.6 药敏实验结果

TS-628 菌株对 42 种药物的药敏实验结果可知该菌株对氯霉素、壮观霉素、磷霉素、利福平、环丙沙星等 16 种抗生素敏感,对万古霉素、青霉素 G、林可霉素、苯唑青霉素、氨苄青霉素等 16 种抗生素不敏感(表 4)。

3 讨论

由分离菌株 TS-628 的形态、生理生化及 16S rDNA 同源性特征可知,该菌短杆状,单极生鞭毛,革兰氏阴性,生化特征与哈维氏弧菌相似,16S rDNA 片段也与哈维氏弧菌相应片段同源性高达 98%。TS-628 的 16S rDNA 片段与鲨鱼弧菌相应片段的同源性也是 98%,在第九版《伯杰氏细菌鉴定手册》^[3]中根据鲨鱼弧菌和与哈维氏弧菌生理生化特征的相似性和 DNA 的高度同源性,已将鲨鱼弧菌归属于哈维氏弧菌。因此综合上述分析认为本实验分离到的 TS-628 菌株是哈维氏弧菌,并经回

归感染证实它是引发 2002 年同安湾网箱养殖斑鱼溃疡病的病原菌。

哈维氏弧菌是海水鱼类养殖业中比较常见的一种病原菌,能引起海水网箱养殖尖吻鲈 (*Lates calcarifer*)^[4]、鲈鱼 (*Lateolabrax japonicus*)^[5] 等鱼类的弧菌病,病鱼症状与 2002 年厦门同安湾网箱养殖石斑鱼暴发的溃疡病类似。根据发病的过程来看,溃疡病的高峰期发生在气温高,降水量小,海水盐度高的季节,而大量降雨之后病害逐渐消失,因此哈维氏弧菌为石斑鱼的条件致病菌,且其致病条件与温度和盐度这两个环境因子的关系甚为密切,因而在高温炎热少雨的季节有必要对哈维氏弧菌病进行预防。关于哈维氏弧菌的致病性研究目前报道不多,Saeed^[6]对哈维氏弧菌的胞外产物进行过初步研究,认为培养 36h 的哈维氏弧菌胞外产物的蛋白酶活性和溶血活性最强,对网纹石斑鱼 (*E. tauvina*) 和顾氏棘鲷 (*Acanthopagrus cuvieri*) 分别进行肌肉注射和腹腔注射,只有肌肉注射的网纹石斑

表 3 与所测序列同源性最高的 16S rDNA 序列来源和基因编号

Tab. 3 16S rDNA sources and sequence version

序列号 sequence version	物种来源 organism	地理来源 origin	序列号 sequence version	物种来源 organism	地理来源 origin
AF426823.1	<i>Vibrio</i> sp. VIB 411	South Africa (南非)	AF426822.1	<i>Vibrio</i> sp. VIB 570	Spain (西班牙)
AF426817.1	<i>Vibrio</i> sp. VIB 573	Spain (西班牙)	AF426806.1	<i>Vibrio</i> <i>harveyi</i>	Taiwan (台湾)
X74693.1	<i>V. carchariae</i>	unmentioned (未注明)	AF426825.1	<i>Vibrio</i> <i>harveyi</i> ATCC 14126	unmentioned (未注明)
AF426819.1	<i>Vibrio</i> sp. VIB 654	Denmark (丹麦)	AF426815.1	<i>Vibrio</i> sp. VIB 651	Denmark (丹麦)
AF426814.1	<i>Vibrio</i> <i>harveyi</i> VIB 286	unmentioned (未注明)	AF426812.1	<i>Vibrio</i> sp. VIB 645	Tunisia (突尼斯)
AF426811.1	<i>Vibrio</i> <i>harveyi</i> VIB 295	unmentioned (未注明)	AF426808.1	<i>Vibrio</i> sp. VIB 660	Greece (希腊)
A Y046956.1	<i>Vibrio</i> <i>harveyi</i> M4	unmentioned (未注明)	AF319768.1	<i>Vibrio</i> sp. BB4	unmentioned (未注明)
AF426805.1	<i>Vibrio</i> <i>harveyi</i>	U. S. A (美国)	AF134581.1	<i>Vibrio</i> <i>carchariae</i>	unmentioned (未注明)

表 4 TS-628 菌株药敏实验结果

Tab. 4 Result of drug sensitivity test to strain TS-628

药物 drug	药片浓度 concentration ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	抑菌圈直径 diameters of micro-biostatic circles (mm)	敏感性 sensitivity	药物 drug	药片浓度 concentration ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	抑菌圈直径 diameters of micro-biostatic circles (mm)	敏感性 sensitivity
先锋 VI cephalosporinon	30	17	M	氟喹酸 ofloxacin	5	21	S
磷霉素 fosfomycin	200	22	S	氯霉素 chloramphenicol	30	30	S
二甲胺四环素 minocycline	30	11	R	痢特灵 furazolidone	300	13	R
卡那霉素 kanamycin	30	13	R	链霉素 streptomycin	10	15	S
先锋必 cefoperazone	75	19	S	乙酰螺旋霉素 acetylspiramycin	30	13	R
氧哌嗪青霉素 piperacillin	100	18	S	利福平 rifampin	5	22	S
先锋 V cefazolin	30	10	R	万古霉素 vancomycin	30	0	R
妥布霉素 tobramycin	10	16	S	新生霉素 novobiocin	30	16	M
头孢噻吩 cefoxitin	30	13	R	先锋噻肟 cefotaxime	30	22	S
青霉素 G penicillin	10	0	R	头孢克肟 cefixime	5	16	M
复达欣 ceftazidime	30	17	M	强力霉素 doxycycline	30	12	R
环丙沙星 ciprofloxacin	5	23	S	氟哌酸 norfloxacin	10	21	S
红霉素 erythromycin	15	20	M	苯咪唑青霉素 mezlacillin	75	19	S
庆大霉素 gentamicin	10	14	M	四环素 tetracycline	30	11	R
麦迪霉素 midecamycin	30	16	M	林可霉素 lincomycin	2	0	R
丁胺卡那 amikacin	30	12	R	头孢西丁 cefoxitin	30	13	R
新霉素 neomycin	30	18	M	菌必治 ceftriaxone	30	21	S
苯唑青霉素 oxacillin	75	0	R	优立新 unasyn	10	16	M
先锋孟多 cefamandole	30	18	S	壮观霉素 spectinomycin	100	27	S
头孢呋喃 cefuroxime	30	16	M	SMZ/ TMP	23.75/ 1.25	18	S
氨苄青霉素 ampicillin	10	0	R	萘啶酸 nalidixic acid	30	13	R

注:S 为敏感;M 为中度敏感;R 为不敏感

Notes: S means sensitive; M means medium sensitive; R means resistant

鱼死亡 60%,其它实验组则没有死亡记录,因此 Saeed 认为哈维氏弧菌胞外产物的致病性尚需要进一步研究证实。

本实验采用传统的生理生化、全自动微生物鉴定仪和最新的分子生物学等三种方法对分离细菌进行鉴定比较。结果发现,不管是传统的生化鉴定还是全自动微生物鉴定仪鉴定或是借助分子生物学的鉴定方法都存在不容忽视的缺陷。传统的生化实验不仅操作繁琐耗时长而且受人为主观因素影响较大,特别是在反应现象不明显时读取的结果往往会因人而异。全自动微生物鉴定仪在进行细菌鉴定时由于鉴定卡种类有限,每种卡上的生化反应只有三十种左右,对种类繁多的细菌家族而言缺乏良好的针对性,因而对研究相对较少的水生微生物不易得到准确的鉴定结果。而最新的分子生物学方法主要还是通过比较细菌核糖体 RNA 基因片段的同源性进行细菌鉴定。核糖体是细菌唯一的细胞器,其 16S rRNA 在进化中高度保守,被称为细菌的“分子化石”,但是它的保守性又是相对的,在保守区之间又存在着若干个变异区^[7],因此通过比较 16S rRNA 特定基因片段的同源性来鉴定细菌成为可能。但是截止到 1996 年只有 3500 种细菌的完整 16S rRNA 基因序列被测定^[8],这将给分子鉴定的准确性和可靠性带来很大影响。另外,应用 16S rRNA 基因序列鉴定细菌所得到的结果是待定菌株与 16 个相应 16S rRNA 基因片段的同源性都是 98%,这种情况下如果没有生化鉴定结果作为佐证,同样无法得出最后结论。因此,在进行微生物种类鉴定的时候应采用各种方法取长补短互相

补充,才能保证鉴定结果的客观性和科学性。

参考文献:

- [1] The Microbiology Taxonomists of the Institute of Microbiology Chinese Academy of Science. General identification method to ordinary bacteria[M]. Beijing: Science Press, 1978. [中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法[M]. 北京: 科学出版社, 1978.]
- [2] Peng X X, Zhou Y, Wang S Y, et al. Quick identification for pathogenic vibrio of aquacultivated creatures by UPPCR-SSCP [J]. Ocean Twaian Strait, 2000, 19(4): 460 - 464. [彭宣宪, 周樱, 王三英, 等. 采用 UPPCR - SSCP 技术快速鉴定水产养殖病原性弧菌的研究[J]. 台湾海峡, 2000, 19(4): 460 - 464.]
- [3] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, et al. Bergey's manual of determinative bacteriology (9th ed.) [M]. London: Williams & Wilkins Press, 1994. 190 - 194, 259 - 271.
- [4] Copland J W, Grey D L. Management of wild and cultured sea bass/berramundi (*Lates calcarifer Bloch*) [A]. Proceeding of an international Workshop Held at N T, Australia [C]. Aciar Proceedings, 1987. 20
- [5] Wang G L, Jin S, Xue L Y, et al. Studied on the skin ulcer disease and the pathogenic bacteria of *Lateolabrax japonicus* in marine cage culture [J]. J Oceanogr HuangHai & BoHai Seas, 2000, 18(3): 85 - 89. [王国良, 金珊, 薛良义, 等. 海水网箱养殖鲈鱼皮肤溃疡病及其病原菌的研究[J]. 黄渤海海洋, 2000, 18(3): 85 - 89.]
- [6] Saeed M O. Association of *Vibrio harveyi* with mortalities in cultured marine fish in Kuwait [J]. Aquac, 1995, 136: 21 - 29.
- [7] Otsen G J, Larsen N, Woec C R. The rebosomal RNA database project [J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19(Suppl): 2017.
- [8] Sallen B, Rajoharison A, Desvarenne S. Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of listeria species [J]. Jut J Sys Bacteriolo, 1996, 46(3): 669 - 674.