

患体表出血症的泥鳅病原菌的鉴定与生物特性分析

林 锋¹, 刘 莉¹, 包成荣², 王雨辰¹, 曹 铮¹, 徐 洋¹, 李 倩¹, 胡廷尖^{1*}

(1. 浙江省淡水水产研究所, 农业部淡水健康养殖重点实验室, 湖州 313001;

2. 杭州市萧山区瓜沥镇农业和农村局, 杭州 311241)

摘 要: 从体表具有明显出血症状的患病泥鳅内脏组织中分离到 2 株优势菌, 对这 2 种菌进行了鉴定和特性分析。利用形态学观察、生理生化特性分析和 16SrDNA 序列测定法对细菌类别进行初步判定, 并采用人工感染试验和药敏试验对细菌的致病性与耐药性进行分析。分析表明这 2 种菌分别为霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 和希瓦氏菌 (*Shewanella putrefaciens*), 人工感染试验表明它们对泥鳅具有较强的致病性; 用含有抗生素的 20 种药敏纸片进行药敏试验, 发现这 2 种分离菌同时对氯霉素、环丙沙星、复方新诺明、头孢西丁、四环素、诺氟沙星和头孢他啶等 7 种抗生素高敏, 对其他抗生素具有一定抗性。首次报道了泥鳅一种新的病原即希瓦氏菌, 试验表明希瓦氏菌作为一种潜在的病原菌, 可能与泥鳅霍乱弧菌协同作用, 对泥鳅的养殖造成危害, 同时也为泥鳅常见体表出血症病原的确定和防治提供参考依据。

关键词: 泥鳅; 出血症; 霍乱弧菌; 希瓦氏菌; 药敏试验

中图分类号: S917.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2017)03-0367-06

Biological characterization and identification of bacteria from *Misgurnus anguillicaudatus* associated with body surface hemorrhagic disease

LIN Feng¹, LIU Li¹, BAO Chengrong², WANG Yuchen¹, CAO Zheng¹, XU Yang¹, LI Qian¹, HU Tingjian¹

(1. Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture, Ministry of Agriculture, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001;

2. Agricultural and Countryside Bureau of Guali Town, Xiaoshan District, Hangzhou 311241)

Abstract: Two bacteria associated with body surface hemorrhagic disease were isolated from the blood, heart, liver, spleen, intestines of *Misgurnus anguillicaudatus*, which were further analyzed using morphological observation, physiological and biochemical characteristic analysis, 16SrDNA sequence determination, sensitivity test and artificial infection experiments. The isolated strains were identified as *Vibrio cholerae* and *Shewanella putrefaciens* which were related to the pathogenicity of *Misgurnus anguillicaudatus*. The sensitivity of the two bacteria to 20 antibiotics was evaluated. The results showed that the isolated strains were highly sensitive to seven antibiotics including chloramphenicol, ceftazidime pentahydrate, norfloxacin, tetracycline, cefoxitin, paediatric compound sulfamethoxazole and ciprofloxacin. They also showed some resistance to other antibiotics. This is the first report on a new pathogen of *Misgurnus anguillicaudatus*. It revealed that *Shewanella* sp., as a potential new pathogen, may have a synergistic effect with *Vibrio cholerae* and pose a threat to the culture of *Misgurnus anguillicaudatus*.

Key words: *Misgurnus anguillicaudatus*; hemorrhagic disease; *Vibrio cholerae*; *Shewanella putrefaciens*; antibiotic susceptibility testing

泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 是一种杂食性鱼类, 广泛分布于中国各地淡水水域中, 由于蛋白含量高, 味道鲜美, 并且具有滋补药用功能, 深受广大消费者的喜爱, 现已成为我国淡水养殖的主

要品种之一。虽然泥鳅的规模化人工育种技术研究已有多, 但是一些瓶颈一直无法突破, 导致苗种产量不高, 加上养殖病害问题严重, 使得泥鳅养殖产量不稳定, 影响了泥鳅产业的可持续性发展。由

收稿日期: 2016-09-13

基金项目: 浙江省重大科技专项 (2013C02009) 和国家自然科学基金青年项目 (31402328) 共同资助。

作者简介: 林 锋, 博士研究生, 助理研究员。E-mail: wwlinfeng@163.com

* 通信作者: 胡廷尖, 教授级高工。E-mail: zjsczm@163.com

于泥鳅养殖规模无法与传统的四大家鱼相比,导致我国学者对泥鳅传染性疾病的病原学研究和探索工作相对滞后,但近年来一些与泥鳅病害相关的病原也相继被分离。如杨鸢劫等从患溃疡病的泥鳅中分离出维氏气单胞^[1],房海等从患病泥鳅组织中分离到了创伤弧菌^[2],秦蕾等从泥鳅中成功分离到了气单胞菌^[3],邴旭文等从死亡的泥鳅肝脏、血液及腹水中分离出了霍乱弧菌^[4],这些均可引起泥鳅发生细菌性疾病,为泥鳅病害的防治奠定理论基础。然而,由于泥鳅在养殖中属于小品种,其产量无法与四大家鱼等相提并论,导致其生物学基础研究相对滞后;此外,环境的恶化导致水质污染严重,各种水质因子的胁迫导致病原高发且病难以判定,进而没有有效的措施来进行病害防控。本研究针对患有体表出血症的泥鳅体内分离到的病原菌进行形态观察、16SrDNA 序列鉴定、生理生化特性分析和系统进化分析及病菌药敏试验,对病原菌的生物学特性进行初步解析,确定导致泥鳅体表出血症的主要病原,为该病的防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品来源 2015年3月,来自浙江省嘉善县某泥鳅养殖场,病泥鳅平均体重为9g左右。外部症状:将死或刚死的泥鳅肛门红肿,肌肉肿胀,腹部有红斑和血点,呈均匀分布状;解剖观察:腹内肝脏、脾脏等组织几乎已不可见,有腐败溶解的迹象。从发现泥鳅发病到泥鳅大量死亡时间约5~7d,累积死亡率高达50%。

1.1.2 试剂 健康泥鳅由本实验室自行养殖。TCBS鉴别培养基购于青岛海博生物科技有限公司,琼脂干粉、大豆蛋白胨和细菌理化特性鉴定用的培养基和药敏试纸购自杭州天和微生物公司;试验动物:PCR扩增试剂购自NEB公司,革兰氏染液购自南京建成生物工程研究所,PCR引物由上海捷瑞生物工程技术有限公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 细菌分离 在超净台中,用75%酒精棉球擦拭病泥鳅体表后进行解剖,用接种针从内脏组织各部位取样,分别在TSA营养琼脂培养基和TCBS培养基固体平板上划线培养,30℃恒温培养8~12h;观察菌落形态,根据菌落特征的不同,挑取单菌落进行液体培养基摇床培养,分离到的2株单菌落被初命名为JS1501和JS1502。

1.2.2 细菌形态观察 取适量的分离菌液涂片,经

过革兰氏染色后,用显微镜观察细菌形态以及染色特征。同时,低速离心(3000 r·min⁻¹)5 min,收集JS1501和JS1502,用已高压灭菌的PBS漂洗2~3次,最后重悬浮于无菌蒸馏水中;取10 μL上述菌液到封口膜上,然后吸取2 μL钼酸(2%)轻轻混合,用专用的弯头镊镊取Formvar膜包被的铜网,将铜网覆盖在溶液上静置3~5 min;吸10 μL负染液磷钨酸(PDA)溶液(2%)到封口膜上,将已吸附菌液的铜网移到PDA溶液上静置1~2 min,再用吸水纸去除铜网上的多余染液,自然干燥后置透射电子显微镜(JEM-2100(HR))下观察。

1.2.3 致病性试验 将分离菌以3000 r·min⁻¹离心收集沉淀,用已经灭菌的生理盐水,吹打悬浮制成细菌悬液。选取大小相近的40条泥鳅,分为接种组和对照组,每10尾1组。分别给每条泥鳅注射0.1 mL细菌悬液(浓度约为1×10⁹ cfu·mL⁻¹);对照组每条仅注射0.1 mL无菌生理盐水,相同环境下分别隔离饲养。观察发病和死亡情况。

1.2.4 分离菌的生理生化测定 参照文献[5-6]中的细菌鉴定方法,采用细菌微量生化鉴定管对待测菌株各项生化指标进行测定,每项测试指标均重复2次并设置对照,部分测试项目需延长培养时间至48 h以上。

1.2.5 16S rDNA 序列测定和系统发育学分析 采用细菌通用引物进行16S rDNA基因序列的扩增,正向引物为27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物1492R:5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'。扩增片段大小约1470 bp。50 μL扩增反应体系:10×buffer 5.0 μL,2.5 mmol·L⁻¹ dNTPs 4.0 μL,10 μmol·L⁻¹引物各1 μL,5 U·μL⁻¹ Taq 酶 0.5 μL,模板菌液 3 μL,ddH₂O补足至50 μL。PCR扩增条件:95℃预变性4 min;94℃变性45 s,55℃退火45 s,72℃延伸1 min,35个循环后72℃延伸10 min。PCR产物进行凝胶电泳检测。将扩增条带送去测序。根据分离菌的核苷酸测序结果,利用NCBI的Blast检索系统(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>)进行序列同源性比较,采用MEGA4软件构建系统发生树,采用邻接法(Neighbor joining method)建树方法,并通过Boot-strap法检验。

1.2.6 药敏试验 按纸片扩散法进行药物敏感性试验,待培养12 h后测定抑菌圈直径,根据NCCLS判断标准进行细菌敏感性判定^[7]。检测的抗生素包括头孢唑啉、青霉素G、复达欣、头孢西丁、庆大霉素、万古霉素、卡那霉素、链霉素、新霉素、妥布霉素、强力霉素、阿米卡星、四环素、红霉素、

氯霉素、呋喃妥因、复方新诺明、诺氟沙星、呋喃唑酮和环丙沙星等 20 种。

2 结果与分析

2.1 细菌的形态特征

从采集的泥鳅病样组织中分离到 2 种菌, 分别标记为 JS1501 和 JS1502。JS1501 菌落具有菌落微小、湿润、圆形、边缘整齐、表面光滑且中级稍隆起, 呈半透明状; JS1502 菌落则具有菌落呈圆形、不透明、中心微隆起和淡黄色的特征。将细菌进行革兰氏染色后利用显微镜观察, 可以发现细菌 JS1501 染色后呈红色, 直形或略弯, 两端钝圆, 初步判定为 G⁻球菌; 细菌 JS1502 染色后呈红色, 两端不钝圆, 短杆状, 初步判定为 G⁻短杆菌。细菌 JS1501 和 JS1502 经电镜负染色标本观察, 发现 JS1501 菌体着生单菌毛 (图 1A), 而 JS1502 菌体无明显菌毛 (图 1B)。

2.2 细菌致病性试验

泥鳅分别接种细菌 JS1501、JS1502 以及 JS1501 与 JS1502 的混合悬液。1 d 后观察发现, 注射菌液的 3 组均出现活力下降症状, 且注射 JS1501 和 JS1501-JS1502 菌液组泥鳅腹部有肿胀现象, JS1502 与对照组无异常变化; 第 3 天后, 注射 JS1501-JS1502 混合菌液组泥鳅开始出现死亡, 直至第 5 天全部死亡; 而注射 JS1501 的死亡率约为 50%; JS1502 组和对照组一直没有出现死亡, 如表 1 所示。

表 1 分离菌的回归感染试验

Table 1 Pathogenic test of the isolated bacteria from *Misgurnus anguillicaudatus*

菌株 Isolate	浓度/cfu·mL ⁻¹ Concentration	试验泥鳅数/尾 Number of <i>Misgurnus anguillicaudatus</i> (individual)	感染后死亡数量/尾 Quantity of the death after post-infection(individual)
JS1501	1×10 ⁹	10	5
JS1502	1×10 ⁹	10	0
JS1501- JS1502	1×10 ⁹	10	10
对照/Control group	0	10	0



图 2 泥鳅感染分离菌株 JS1501 和 JS1502 的病理特征
Figure 2 Pathological features of *Misgurnus anguillicaudatus* infected by JS1501 and JS1502

死亡泥鳅腹部和肛门处出现明显红点和红斑, 解剖可以看到发病泥鳅内脏组织有溶解现象 (图 2)。结果表明分离菌 JS1501 具有明显致死率, 在和 JS1502 的协同作用下毒力更强。

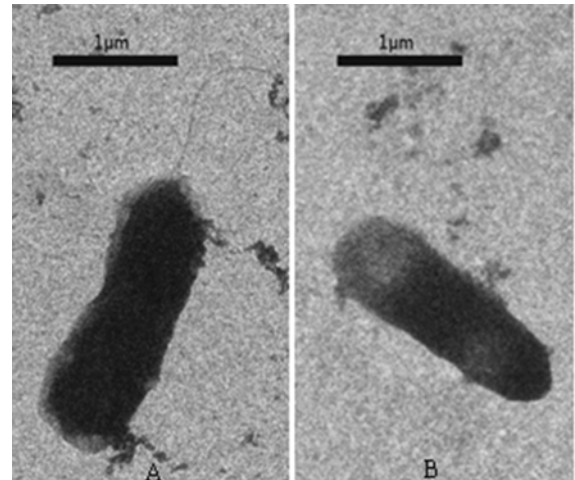
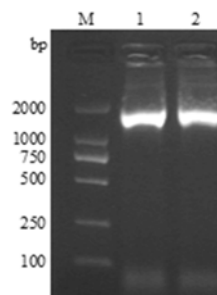


图 1 JS1501(A)和 JS1502 (B) 菌株电镜照片
Figure 1 Electron micrograph of JS1501(A) and JS1502(B)

2.3 细菌的生理生化鉴定

分离菌 JS1501 对赖氨酸、甘露醇、鸟氨酸、葡萄糖产气、氨基酸对照、蔗糖、葡萄糖酸盐和枸橼酸盐等呈阳性; JS1502 对赖氨酸、鸟氨酸、氨基酸对照、葡萄糖产气、硫化氢和尿素等呈阳性反应 (表 2)。通过细菌生化鉴定编码查对, 初步判定 JS1501 为霍乱弧菌, JS1502 为假单胞菌。



M: DL2000 DNA Marker; 1: JS1501; 2: JS1502
图 3 JS1501 与 JS1502 菌 16SrDNA PCR 电泳结果
Figure 3 PCR amplification of the 16SrDNA gene of JS1501 and JS1502

表 2 分离菌的理化特性

Table 2 The physiological and biochemical characteristics of the isolated bacteria

项目 Item	JS1501	JS1502
赖氨酸 LYS	+	+
精氨酸 ARG	-	+
鸟氨酸 ORN	+	+
氨基酸对照 AAC	+	+
蔗糖 SUC	+	-
甘露醇 MAN	+	-
水杨苷 SAL	-	-
氯化钠胰胨水 SCPPW	-	-
枸橼酸盐 CIT	+	-
葡萄糖产气 GLUG	g+	g+
硫化氢 H ₂ S	-	+
苯丙氨酸 PHE	-	-
葡萄糖酸盐 GLUC	+	-
蛋白胨水 PW	-	-
葡磷胨水 VP-MR	-	-
尿素 URE	-	+
半固体琼脂 SSA	-	-
棉子糖 RAF	-	-
山梨醇 SBT	-	-
侧金盏花醇 ADO	-	-
木胶糖 XYL	-	-

注：“+”为阳性；“-”为阴性；“g+”为产气。

Note: “+” denotes positive; “-” denotes negative; “g+” means gas produced.

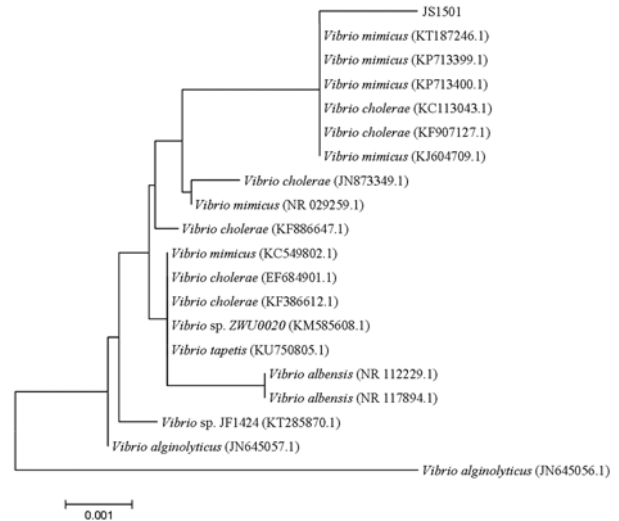
2.4 细菌 16SrDNA 序列鉴定与系统发育分析

利用细菌通用引物扩增，2 种分离菌 PCR 产物电泳结果如图 3 所示，大小约 1 500 bp，经过测序后，将 2 种分离菌株的核酸序列在 NCBI 库上进行比对，发现菌株 JS1501 与 GenBank 上已收录的霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae* strain) 和拟态弧菌 (*Vibrio mimicus* strain) 不同菌株的同源性最高达到 98%，菌株 JS1502 与希瓦氏菌 (*Shewanella sp.*) 同源性高达 99%；选择同源性较高的 16SrDNA 序列构建系统发育学树(图 4 和图 5)，再根据 JS1501 和 JS1502 的表型、生理生化特征及致病性试验结果，可以判定 JS1501 为霍乱弧菌，而 JS1502 与希瓦氏菌为同一属的细菌。

2.5 药敏试验

霍乱弧菌 (JS1501) 和希瓦氏菌 (JS1502) 的药敏试验结果表明 (表 3)：JS1501 对呋喃妥因、四环素、诺氟沙星、头孢唑啉、头孢西丁、复方新诺明、羧苄青霉素、头孢他啶、环丙沙星和氯霉素等高敏，对卡那霉素、多粘菌素和红霉素中敏，对其

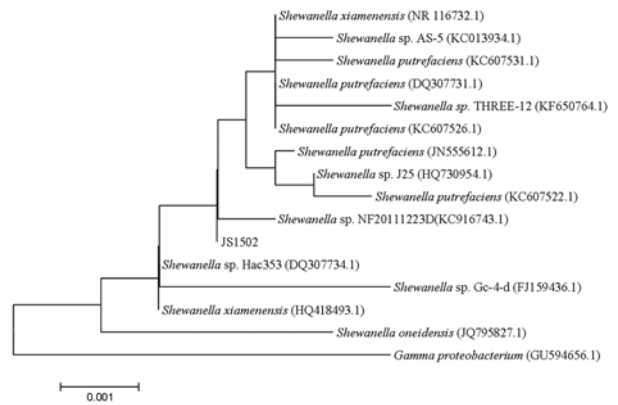
他 7 种抗生素耐药；而希瓦氏菌 (JS1502) 对四环素、头孢西丁、诺氟沙星、头孢他啶、复方新诺明、环丙沙星和氯霉素等敏感，对卡那霉素、呋喃妥因、阿米卡星、多粘菌素、庆大霉素、头孢唑啉、红霉素、链霉素和妥布霉素等中敏，对其他 4 种抗生素有耐药性。



Vibrio mimicus 拟态弧菌；*Vibrio cholerae* 霍乱弧菌；*Vibrio sp.* 弧菌；*Vibrio tapetis* 蛤弧菌；*Vibrio albensis* 易北河弧菌；*Vibrio alginolyticus* 溶藻弧菌

图 4 JS1501 株 16SrDNA 基因序列系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree based on JS1501 16SrDNA sequences



Shewanella xiamenensis 厦门希瓦氏菌；*Shewanella sp.* 希瓦氏菌；*Shewanella putrefaciens* 腐败斯瓦尼菌；*Shewanella oneidensis* 奥奈达希瓦氏菌；*Gamma proteobacterium* γ-变形菌

图 5 JS1502 株 16SrDNA 基因序列系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree based on JS1502 16SrDNA sequences

3 结论

16SrDNA 通用引物 PCR 扩增法^[8-9]目前被广泛

用于养殖水环境微生物群落的分析和病原菌鉴定, 通过与经典的革兰氏染色法相结合, 能够较快速的对细菌形态观察和核酸进行鉴定。因而本研究采用该常规步骤对从患有出血病症泥鳅中分到的 2 株菌类: 霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae* strain) 和希瓦氏菌 (*Shewanella putrefaciens*), 并进行了较快速、准确的判定。通过细菌回感试验发现这 2 种菌对泥鳅均

有致病性; 当两者协同作用时, 致病力有显著增强; 而药敏试验结果表明这 2 种菌耐药性似乎不强, 对多种抗生素均敏感。然而, 在现实用药中发现一旦病症出现, 抗生素无法起到快速治疗的目的, 而对于病原菌较为基础、详实的研究, 有利于病害的早期防治。

表 3 药敏试验结果
Table 3 Results of antibiotic sensitivity test

抗生素 Antibiotic	剂量/ μg Dosage	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone	
		JS1501	JS1502
庆大霉素 Gentamicin	10	0 (R)	14 (I)
青霉素 G Peillin G	10	27 (S)	16 (R)
万古霉素 Vancomycin	30	0 (R)	9 (R)
卡那霉素 Kanamycin	30	16 (I)	14 (I)
氯霉素 Chloramphenicol	30	28 (S)	22 (S)
头孢他啶 Ceftazidime Pentahydrate	30	30 (S)	23 (S)
诺氟沙星 Norfloxacin	10	30 (S)	24 (S)
强力霉素 Doxycycline	30	12 (R)	0 (R)
四环素 Tetracycline	30	30 (S)	25 (S)
头孢西丁 Cefoxitin	30	28 (S)	26 (S)
链霉素 Streptomycin	10	9 (R)	14 (I)
新霉素 Neomycin	30	0 (R)	13 (R)
呋喃唑酮 Furazolidone	300	11 (I)	10 (I)
头孢唑啉 Cefamedin	30	26 (S)	15 (I)
多粘菌素 B Polymyxin B Sulfate	15	20 (I)	20 (I)
拉氧头孢 Latamoxef	300	22 (S)	16 (I)
阿米卡星 Amikacin	30	11 (R)	15 (I)
复方新诺明 Paediatric Compound Sulfamethoxazole	1.25	26 (S)	25 (S)
妥布霉素 Tobramycin	10	0 (R)	13 (I)
环丙沙星 Ciprofloxacin	5	31 (S)	30 (S)

注: S 为敏感; I 为中度敏感; R 为耐药。Note: S. Susceptivity; I. Moderately sensitivity; R. Resistance.

霍乱弧菌 (*vibrio cholerae*) 分类于弧菌科, 是引起人霍乱 (*cholera*) 的病原菌。其中的非 O1 群霍乱弧菌广泛分布于水环境, 通常可以引起人的胃肠炎症, 有时也可引起脑膜炎、败血症和伤口感染等肠道外感染, 被认为是人畜共患的病原菌。已知该菌有不少血清型株能引起水产动物感染发病, 如 Kiiyukia 等^[10]和 Muroga 等^[11]报道该菌在日本 Amano 河的野生香鱼中引发的一种流行病; Reddacliff 等报道该菌在澳大利亚引发的一种金鱼病^[12]; 郑国兴等报道的该菌曾引起养殖对虾发生被称为“瞎眼病”的流行病^[13]; 1997 年王立平等报道该菌引起山东崂山对虾育苗场中国对虾糠虾幼体大量死亡^[14]; 2009 年该菌引起养殖泥鳅疾病首次被报道, 研究表明霍乱弧菌对于泥鳅具有非常强的致病

性, 可引起养殖泥鳅发生以体表出血为特征性疾病, 并导致病鱼大量死亡^[14]。

希瓦氏菌是通常导致鱼类快速腐败, 被确认是导致冷藏海水鱼腐败的主要致病菌^[15-16], 但作为病原菌, 希瓦氏菌的致病性的研究相对较少, 而由该菌引起泥鳅疾病应属首次报道。通过 5S RNA 序列比较分析, 1985 年 MacDonell 等将腐败假单胞菌归为一种新属——腐败希瓦氏菌属, 至今该属已有 5 个种^[5]。腐败希瓦氏菌和海藻希瓦氏菌被证实是可以感染人类的病原菌, 能够感染人体, 引起软组织感染^[17]、脾脓肿^[18]以及椎间盘炎^[19]等多种疾病, 同时这 2 种菌也可以感染多种水生动物发病。这几年希瓦氏菌属细菌感染大黄鱼^[20]、大菱鲆^[21]和异育银鲫^[22]等水生动物的研究报道多次出现, 表明该菌的

危害性逐步引起了人们的重视。

泥鳅作为一种重要的养殖品种,其体表出血症是其常见病症之一,但对其病原一直尚未确定。本次研究表明,所分离到霍乱弧菌和希瓦氏菌能够引起泥鳅体表出现出血症状,而且解剖发现2种菌的协同作用会导致泥鳅内脏组织腐化溶解,致使泥鳅出现大量死亡现象。因此,可以为泥鳅体表出血症病因判定提供参考依据。鉴于霍乱弧菌和希瓦氏菌的血清型株较多,下一步需要对2种菌展开进一步细化研究,为其诊断和防治提供更多的理论基础,有利于水产食品的安全监测。

参考文献:

- [1] 杨鸢劫,陈辉,金日奉,等.泥鳅溃疡病的病原菌分离和组织病理学观察[J].集美大学学报(自然科学版),2004,9(1):22-25.
- [2] 房海,陈翠珍,张晓君,等.泥鳅气单胞菌感染的检验与分析[J].中国人兽共患病学报,2006,22(11):1065-1069.
- [3] 秦蕾,徐静,张晓君.泥鳅的凡隆气单胞菌感染[J].中国人兽共患病学报,2008,24(12):1100-1102.
- [4] 邴旭文,阎斌伦,张晓君,等.泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)病原霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)的表型与分子鉴定[J].海洋与湖沼,2009,40(6):692-698.
- [5] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001:188-189.
- [6] GARRITY M G. Bergey's manual of systematic bacteriology: Vol.2[M]. 2nd ed. New York: Springer, 2005: 425-437.
- [7] 中华人民共和国卫生部医政司.全国临床检验操作规程[M].2版.南京:东南大学出版社,1997:553-562.
- [8] KIM M S, DO JEONG H. Development of 16S rRNA targeted PCR methods for the detection and differentiation of *Vibrio vulnificus* in marine environments[J]. Aquaculture, 2001, 193(3): 199-211.
- [9] PAUNGFUO C, PRASERTSAN P, BURRELL P C, et al. Nitrifying bacterial communities in an aquaculture wastewater treatment system using fluorescence in situ hybridization (FISH), 16S rRNA gene cloning, and phylogenetic analysis[J]. Biotechnol Bioeng, 2007, 97(4): 985-990.
- [10] KIIYUKIA C, NAKAJIMA A, NAKAI T, et al. *Vibrio cholerae* non-O1 isolated from ayu fish (*Plecoglossus altivelis*) in Japan[J]. Appl Environ Microbiol, 1992, 58(9): 3078-3082.
- [11] MUROGA K, TAKAHASHI S, YAMANOI H, et al. Non-*cholera* *Vibrio* isolated from diseased ayu[J]. Bull Jpn Soc Sci Fish, 1979, 45: 829-834.
- [12] REDDA CLIFF G L, HORNITZKY M, CARSON J, et al. Mortalities of goldfish, *Carassius auratus* (L.), associated with *Vibrio cholerae* (non-O1) infection[J]. J Fish Dis, 1993, 16(5): 517-520.
- [13] 郑国兴. 养殖对虾弧菌病致病菌—非 O1 群霍乱弧菌的生物学性状与致病性[J]. 水产学报, 1986, 10(2): 195-203.
- [14] 王立平, 张晓华, 刘镁, 等. 中国对虾糠虾幼体病原菌(非 O1 群霍乱弧菌)的研究[J]. 中国水产科学, 1997, 4(1): 45-51.
- [15] 崔正翠, 许钟, 杨宪时, 等. 冷藏大菱鲆细菌组成变化和优势腐败菌[J]. 食品科学, 2011, 32(13): 184-187.
- [16] 郭全友, 杨宪时, 许钟, 等. 冷藏养殖大黄鱼细菌相组成和优势腐败菌鉴定[J]. 水产学报, 2006, 30(6): 824-830.
- [17] ROUZIC N, HÉRY-ARNAUD G, JAFFUEL S, et al. Soft tissue infection associated with bacteremia caused by *Shewanella putrefaciens*[J]. Pathol Biol, 2012, 60(3): e27-e29.
- [18] BASIR N, YONG A M L, CHONG V H. *Shewanella putrefaciens*, a rare cause of splenic abscess[J]. J Microbiol Immunol, 2012, 45(2): 151-153.
- [19] GRESSIER M, MBAYO D, DERAMOND H, et al. First case of human spondylodiscitis due to *Shewanella algae*[J]. Int J Infect Dis, 2010, 14(S3): e261-e264.
- [20] 林克冰, 刘家富. 海水网箱养殖大黄鱼病原菌研究[J]. 海洋科学, 1999 (4): 58-62.
- [21] 吕俊超. 养殖大菱鲆病原菌的分离鉴定、组织病理学及免疫组织化学[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.
- [22] 秦蕾, 张晓君, 毕可然. 一种新的异育银鲫病原—腐败希瓦氏菌[J]. 微生物学报, 2012, 52(5): 558-565.