

doi: 10.3969/j.issn.2095-0780.2013.03.009

鲫鱼诺卡氏菌培养条件及培养基的优化

夏立群, 王 蓓, 夏洪丽, 黄郁葱, 简纪常, 鲁义善

(广东海洋大学水产学院, 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室, 广东省高等学校水产经济动物病害控制重点实验室, 广东 湛江 524088)

摘要: 对鲫鱼诺卡氏菌(*Nocardia seriolea*)ZJ0503 的增菌培养基和生长条件进行优化。研究了温度、盐度、初始 pH 对鲫鱼诺卡氏菌生长的影响, 并通过单因素试验对培养基的碳源、氮源和无机盐成分进行了筛选, 采用正交试验法对培养基各主要成分的添加量进行了优化。结果表明, 鲫鱼诺卡氏菌最适宜生长条件为温度 25 ℃、盐度 5、pH 6.5 ± 0.2; 经筛选, 鲫鱼诺卡氏菌培养基中最佳碳源是葡萄糖, 最佳氮源是酵母粉, 促生长作用最强的 2 种无机盐是磷酸氢二钾(K_2HPO_4)和氯化钙($CaCl_2$); 确立了培养基优化配方为葡萄糖 20 g·L⁻¹, 酵母粉 15 g·L⁻¹, K_2HPO_4 0.75 g·L⁻¹, $CaCl_2$ 0.2 g·L⁻¹(单独灭菌), 氯化钠($NaCl$)5 g·L⁻¹, pH 6.5 ± 0.2。

关键词: 鲫鱼诺卡氏菌; 培养基; 培养条件; 优化

中图分类号: S 943.335.42

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2013)03-0051-06

Optimal culture conditions and medium of *Nocardia seriolea*

XIA Liqun, WANG Bei, XIA Hongli, HUANG Yucong, JIAN Jichang, LU Yishan

(Fisheries College of Guangdong Ocean University, Guangdong Provincial Key Lab. of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals, Key Lab. of Diseases Controlling for Aquatic Economic Animals of Guangdong Higher Education Institutions, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: We carried out the study to optimize the enrichment medium and culture conditions of *Nocardia seriolea* (ZJ0503). We studied the effects of temperature, salinity and initial pH on the growth of *N. seriolea*, investigated the carbon source, nitrogen source and inorganic ions of *N. seriolea* with single-factor experiment, and optimized different ingredients of medium with orthogonal experiment. The results indicate that the optimal growing condition of *N. seriolea* is temperature 25 ℃, salinity 5 and pH 6.5 ± 0.2, the optimum carbon source is glucose, and nitrogen source yeast extract; that K_2HPO_4 and $CaCl_2$ promote the growth of *N. seriolea* greatly. In addition, the optimum ingredients of medium are as follows: glucose 20 g·L⁻¹, yeast extract 15 g·L⁻¹, K_2HPO_4 0.75 g·L⁻¹, $CaCl_2$ 0.2 g·L⁻¹ (sterilized separately), and $NaCl$ 5 g·L⁻¹, pH 6.5 ± 0.2.

Key words: *Nocardia seriolea*; medium; culture conditions; optimization

广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室从海水网箱养殖的患病卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)中分离到一株鲫鱼诺卡氏菌(*Nocardia seriolea*), 命名为鲫鱼诺卡氏菌 ZJ0503 株^[1]。鲫鱼诺卡氏菌在分类学上属放线菌目, 诺卡氏菌科, 诺

卡氏菌属^[2]。该菌是水产动物诺卡氏菌病的主要致病菌, 当水产动物体质虚弱、免疫力低下时可通过饵料、鳃或伤口感染, 流行水温 22 ~ 28℃, 发病率一般为 15% ~ 30%, 严重时可达 50% ~ 60%, 平均死亡率约 20%, 人工感染的死亡率可高达

收稿日期: 2013-01-07; 修回日期: 2013-01-14

资助项目: 公益性行业(农业)科研专项(201203085); 广东省科技计划项目(2006A20301003)

作者简介: 夏立群(1976-), 女, 博士, 讲师, 从事海洋生物学研究。E-mail: xialq@gdou.edu.cn

通信作者: 鲁义善(1974-), 男, 博士, 教授, 从事水产动物病害研究。E-mail: luys@gdou.edu.cn

90% ~ 100%^[3-5]。中国地区感染鲫鱼诺卡氏菌的鱼类既有卵形鲳鲹、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)、暗纹东方鲀(*Fugu obscurus*)、鲈(*Lateolabrax japonicus*)和花身鲷(*Terapon jarbua*)等海水鱼类，又有乌鳢(*Channa maculata*)、大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)等淡水鱼类^[1,4-11]。诺卡氏菌病可导致鱼类慢性死亡，或降低成鱼的商品价值，对水产养殖业影响较大。在药物防治方面，由于鲫鱼诺卡氏菌具有较强的抗药性且存在于结节内，导致该病尚无有效的治疗措施。疫苗免疫应是有效的控制手段，但目前对于鲫鱼诺卡氏菌疫苗的研究均未取得较好效果，进展缓慢。接种鲫鱼诺卡氏菌灭活疫苗后五条鲫(*Seriola quinqueradiata*)可以产生血清凝集抗体，但对攻毒并不能提供任何免疫保护作用^[12-13]；同属近缘种 *N. soli* 和 *N. fluminea* 作为活疫苗免疫五条鲫仅能产生低微的免疫保护(相对保护率 65.4%)^[14]。因此，研发更为高效的鱼类诺卡氏菌疫苗势在必行。

鲫鱼诺卡氏菌疫苗的研制需要大规模培养菌体。细菌的增菌培养大多采用液体培养，但目前对于鲫鱼诺卡氏菌的培养多为固体培养，尚未见对于该菌的液体培养条件和培养基组成的相关研究报道。文章针对诺卡氏菌规模化培养的技术问题，研究了液体培养的温度、盐度、pH、培养基碳源、氮源和无机盐等因子对鲫鱼诺卡氏菌生长的影响，分析了鲫鱼诺卡氏菌液体培养的生长规律并优化了其培养参数，以期为鲫鱼诺卡氏菌菌体发酵参数的确定和疫苗的研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 鲫鱼诺卡氏菌 ZJ0503 菌株是 2005 年 03 月从湛江港和阳江闸坡海水网箱养殖场的患结节病卵形鲳鲹中分离所得，由广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室保藏。

1.1.2 培养基 脑心浸液肉汤液体培养基(brain heart infusion broth, BHI)为牛脑浸出汁 200 g·L⁻¹，牛心浸出汁 250 g·L⁻¹，蛋白胨 10 g·L⁻¹，葡萄糖 2 g·L⁻¹，氯化钠(NaCl)5 g·L⁻¹，用蒸馏水配制而成，pH 为 7.4 ± 0.2。胰胨大豆胨液体培养基(trryptic soy broth, TSB)为胰蛋白胨 15 g·L⁻¹，大豆蛋白胨 5 g·L⁻¹，NaCl 5 g·L⁻¹，用蒸馏水配制而成，pH 为 7.2 ± 0.2。沙氏液体培养基(sab-

ouraud's dextrose broth, SDB)为蛋白胨 10 g·L⁻¹，葡萄糖 40 g·L⁻¹，用蒸馏水配制而成，pH 为 5.6 ± 0.2，无氯霉素抗性。普通海水培养基(seawater medium, SM)为牛肉膏 3 g·L⁻¹，蛋白胨 5 g·L⁻¹，酵母浸膏 1 g·L⁻¹，用人工海水配制而成，pH 为 7.2 ± 0.2。

1.2 方法

1.2.1 鲫鱼诺卡氏菌的活化和培养 将保存于 -80 ℃ 冰箱的鲫鱼诺卡氏菌菌种划线于 BHI 固体培养基上，于 28 ℃ 恒温倒置培养 7 d，挑取单菌落接种于 BHI 液体培养基中，28 ℃、130 r·min⁻¹ 条件下培养 7 d。

1.2.2 鲫鱼诺卡氏菌在 4 种培养基中生长情况的测定 将活化好的鲫鱼诺卡氏菌菌液按 5% 的接种量接种到 BHI、TSB、SD、SM 液体培养基内，28 ℃、130 r·min⁻¹ 条件下培养 7 d。将菌液用微量电动组织混匀器充分混匀后各吸取 300 μL 于 96 孔酶标板中，平行样 3 个，以空白培养基为对照，用全波段自动酶标仪测定菌液的 600 nm 的光密度(OD)。比较鲫鱼诺卡氏菌在 4 种培养基中生长情况

1.2.3 培养条件优化 按 5% 的接种量将鲫鱼诺卡氏菌菌液接种到 4 种培养基中生长情况最好的培养基中，设置不同温度、盐度和酸碱度，检测鲫鱼诺卡氏菌的生长情况。温度设置为 16 ℃，22 ℃，25 ℃，28 ℃，31 ℃ 和 37 ℃。盐度为 0 ~ 40，梯度为 5。酸碱度设置为 pH 4 ~ pH 9，梯度为 0.5。

1.2.4 培养基碳源的筛选 以 4 种培养基中生长情况最好的培养基为母本，参照鲫鱼诺卡氏菌的生理生化特征^[1,6]，进行碳源筛选试验。分别用等量(2%) 的葡萄糖、甘油、麦芽糖及蔗糖进行试验，培养基其他成分不变。按 5% 接种量接入上述培养基，按照优化后的培养条件培养 7 d。参照 1.2.2 的方法测定菌液的 OD₆₀₀。比较鲫鱼诺卡氏菌在不同碳源培养基中生长情况，选出最佳碳源。

1.2.5 培养基氮源的筛选 确定最佳碳源后将培养基中的氮源用等量(1%) 的蛋白胨、酵母粉、牛肉浸膏及麦芽浸膏进行试验，培养基其他成分不变。按 5% 接种量接入上述培养基，按照优化条件培养 7 d。参照 1.2.2 的方法测定菌液的 OD₆₀₀，比较鲫鱼诺卡氏菌在不同氮源培养基中生长情况，选出最佳氮源。

1.2.6 培养基无机盐成分的筛选 在确定最佳碳源和氮源的基础上配置培养基, 对培养基的无机盐成分进行筛选。根据相关报道, 并参照其他**鮰**鱼诺卡氏菌可以生长的培养基成分, 考察添加8种无机盐磷酸氢二钾(K_2HPO_4 0.75 g·L⁻¹)、硫酸铵[$(NH_4)_2SO_4$ 0.5 g·L⁻¹]、硫酸镁($MgSO_4$ 0.5 g·L⁻¹)、氯化钙($CaCl_2$ 0.2 g·L⁻¹)、硫酸铜($CuSO_4$ 1.0 mg·L⁻¹)、硫酸铁($FeSO_4$ 0.01 g·L⁻¹)、硫酸锌($ZnSO_4$ 1.0 mg·L⁻¹)、硫酸锰($MnSO_4$ 1.5 mg·L⁻¹)对**鮰**鱼诺卡氏菌生长的影响, 以未添加无机盐的培养基为对照。

1.2.7 正交设计优化培养基主要成分 对筛选得到的最佳碳源、最佳氮源和促生长作用最强的2种无机盐共4种主要成分进行 $L_9(3^4)$ 正交设计试验。优化条件下培养7 d后参照1.2.2的方法测定菌液的OD₆₀₀, 分析4种物质对**鮰**鱼诺卡氏菌的影响度及最佳剂量组合。

1.2.8 验证试验 将**鮰**鱼诺卡氏菌按5%比例, 接种到1.2.7中得到的最佳培养基、正交试验中的菌体浓度最高的培养基和SDB液体培养基, 于优化条件下培养7 d, 参照1.2.2的方法测定菌液的OD₆₀₀, 比较**鮰**鱼诺卡氏菌在3种培养基中的生长情况, 验证正交试验结果是否准确。

1.2.9 **鮰**鱼诺卡氏菌在优化条件下的生长曲线

按5%比例接种**鮰**鱼诺卡氏菌菌液于优化后的液体培养基中, 设3个重复组, 以不加细菌的培养基作对照, 于优化条件下培养7 d, 每隔12 h取样, 按1.2.2的方法检测菌体浓度。以培养时间为横坐标, 以OD₆₀₀为纵坐标作该菌的生长曲线。

2 结果

2.1 在4种培养基中生长情况

对4种不同培养基中**鮰**鱼诺卡氏菌的生长情况进行了比较(图1)。**鮰**鱼诺卡氏菌在不含氯霉素抗性的沙氏液体培养基(SDB)中生长情况最佳, 其次是脑心浸液肉汤液体培养基(BHI), 在普通海水培养基(SM)中**鮰**鱼诺卡氏菌生长最慢。故选择SDB培养基作为后续试验的培养基。

2.2 不同培养条件对生长的影响

对**鮰**鱼诺卡氏菌培养环境设置了不同温度, 结果见图2-a。该菌在温度37 °C不能生长, 16~31 °C条件下均可生长, 在22~28 °C生长良好, 菌株的最适培养温度可采用25 °C; **鮰**鱼诺卡氏菌在不

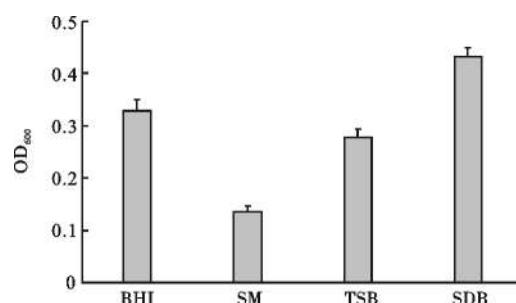


图1 不同培养基对**鮰**鱼诺卡氏菌生长的影响
BHI. 脑心浸液肉汤液体培养基; SM. 海水培养基;
TSB. 胰胨大豆胨液体培养基; SDB. 沙氏液体培养基

Fig. 1 Effects of different culture medium on the growth of *N. seriolea*

BHI. brain heart infusion broth; SM. seawater medium;
TSB. tryptic soy broth; SDB. sabouraud's dextrose broth

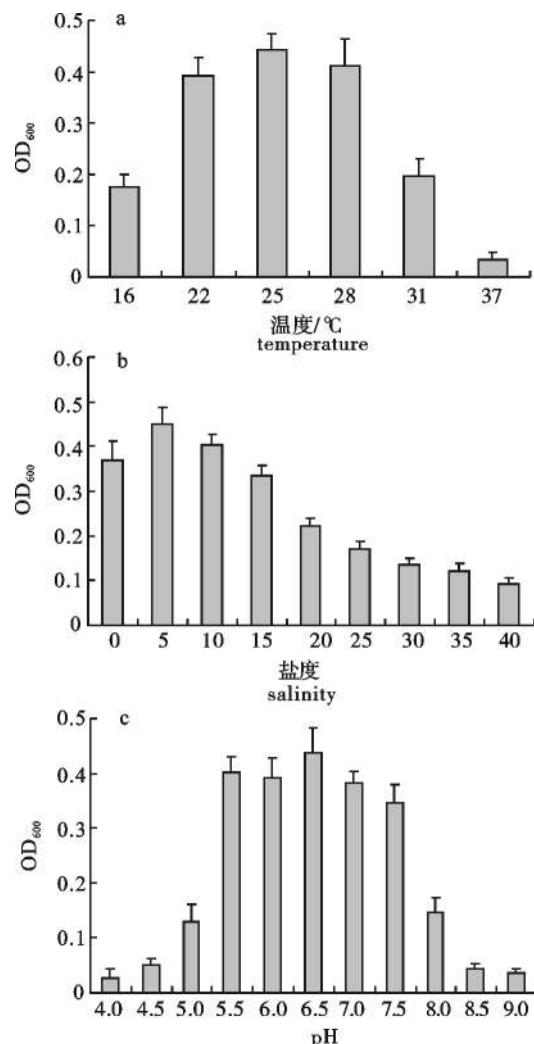
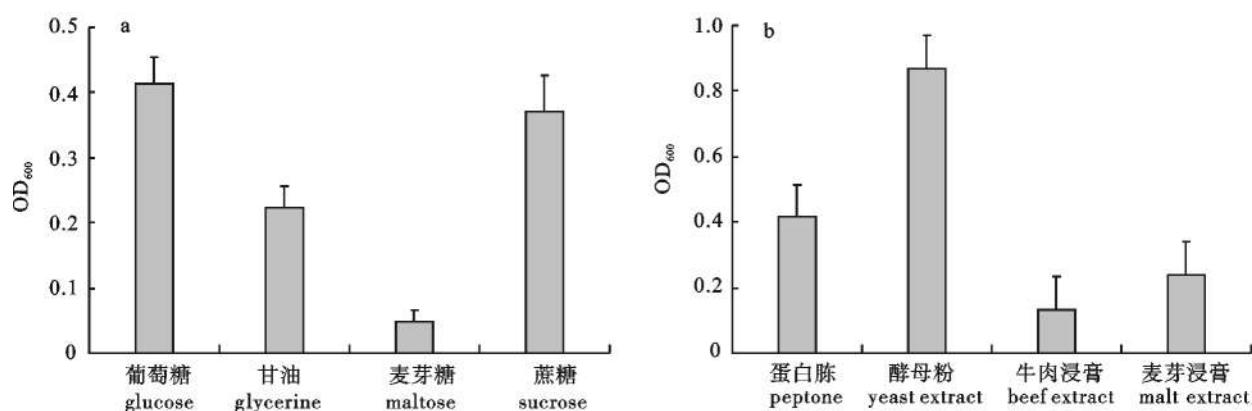
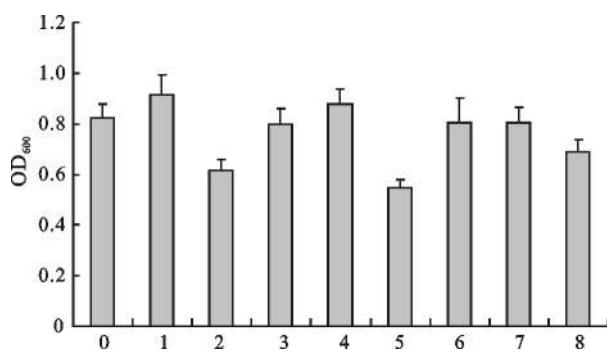


图2 温度(a)、盐度(b)和pH(c)对

鮰鱼诺卡氏菌生长的影响

Fig. 2 Effects of temperntane (a), salinity (b) and pH(c) on the growth of *N. seriolea*

图3 不同碳源(a)和氮源(b)对**鮰鱼诺卡氏菌**生长的影响Fig. 3 Effects of different carbon sources (a) and nitrogen sources (b) on the growth of *N. seriolea*图4 无机盐离子对**鮰鱼诺卡氏菌**生长的影响

0. 对照；1. 磷酸氢二钾；2. 硫酸铵；3. 硫酸镁；4. 氯化钙；
5. 硫酸铜；6. 硫酸铁；7. 硫酸锌；8. 硫酸锰

Fig. 4 Effect of inorganic ions on the growth of *N. seriolea*
0. control; 1. K₂HPO₄; 2. (NH₄)₂SO₄; 3. MgSO₄; 4. CaCl₂; 5. CuSO₄; 6. FeSO₄; 7. ZnSO₄; 8. MnSO₄

同盐度条件下的生长情况见图2-b, 可以看出该菌在盐度0~40时均可生长, 在盐度0~10时生长良好, 菌株的最适培养盐度可采用5; 初始pH对**鮰鱼诺卡氏菌**生长的影响见图2-c, 发现菌体密度随初始pH的增加整体呈现先增加后减小的趋势, 初始pH在5.5~7.5时菌体生长良好, 在pH小于5和大于8时菌体生长缓慢。因此, **鮰鱼诺卡氏菌**最适初始pH可选定为6.5±0.2。

2.3 培养基中碳源对生长的影响

葡萄糖、甘油、麦芽糖和蔗糖4种碳源对**鮰鱼诺卡氏菌**生长的影响见图3-a。4种不同碳源对**鮰鱼诺卡氏菌**的菌体浓度有明显影响, 以葡萄糖为碳源时菌体浓度最高; 其次为蔗糖, 在以麦芽糖为碳源时生长最缓慢。因此, 选择葡萄糖作为培养基的最佳碳源。

2.4 培养基中氮源对生长的影响

蛋白胨、酵母粉、牛肉浸膏及麦芽浸膏4种氮源对**鮰鱼诺卡氏菌**生长的影响见图3-b。4种不同氮源对**鮰鱼诺卡氏菌**的菌体浓度有明显的影响。以酵母粉为氮源时菌体浓度最高, 其次为蛋白胨, 而且酵母粉为氮源比以蛋白胨为氮源时菌体浓度提高了1倍左右; 在以牛肉浸膏和麦芽浸膏为氮源时菌体都生长缓慢。因此, 选择酵母粉作为培养基最佳氮源。

2.5 培养基中无机盐对生长的影响

8种无机盐K₂HPO₄、(NH₄)₂SO₄、MgSO₄、CaCl₂、CuSO₄、FeSO₄、ZnSO₄、MnSO₄对**鮰鱼诺卡氏菌**生长的影响见图4。对**鮰鱼诺卡氏菌**生长有明显促进作用的无机盐是K₂HPO₄和CaCl₂, (NH₄)₂SO₄、CuSO₄和MnSO₄表现为抑制作用。

2.6 培养基优化的正交实验

对葡萄糖、酵母粉、K₂HPO₄和CaCl₂进行4因素3水平正交试验, 以确定最佳组合剂量。正交设计方案及结果见表1。**鮰鱼诺卡氏菌**在9号培养基中生长最好, 其次为6号培养基, 在1号培养基中生长最差。经极差分析, 4种培养基成分对菌株生长结果的影响顺序为酵母粉>葡萄糖>K₂HPO₄>CaCl₂, 培养基最佳剂量组合为A2B3C3D2, 即葡萄糖20 g·L⁻¹, 酵母粉15 g·L⁻¹, K₂HPO₄0.75 g·L⁻¹, CaCl₂0.2 g·L⁻¹。

2.7 验证试验

以正交设计得到的A2B3C3D2配方做培养基, 与正交试验中生长最好的9号培养基以及初始SDB培养基做对比试验。为了避免钙离子(Ca²⁺)与磷酸盐形成沉淀, CaCl₂需配制成母液后单独灭菌,

表1 培养基不同成分对鲫鱼诺卡氏菌生长影响的正交试验设计及结果

Tab. 1 Experimental design and results of different ingredients of medium for the growth of *N. seriolea*

处理 treatment $L_9(3^4)$	因素/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ factors				组合的效果/菌浓度 OD ₆₀₀ the effect of combination/bacterial concentration
	葡萄糖 glucose (A)	酵母粉 yeast extract (B)	磷酸氢二钾 K_2HPO_4 (C)	氯化钙 CaCl_2 (D)	
1	10	5	0.25	0.1	0.547
2	10	10	0.50	0.2	0.801
3	10	15	0.75	0.3	0.953
4	20	5	0.50	0.3	0.658
5	20	10	0.75	0.1	0.891
6	20	15	0.25	0.2	1.030
7	30	5	0.75	0.2	0.674
8	30	10	0.25	0.3	0.858
9	30	15	0.50	0.1	1.038
K1	0.767	0.626	0.812	0.825	
K2	0.860	0.850	0.832	0.835	
K3	0.857	1.007	0.839	0.823	
R	0.093	0.381	0.027	0.012	
最优水平 optimal level	A2	B3	C3	D2	
因素主次顺序 the principal-secondary sequence of factors			B > A > C > D		

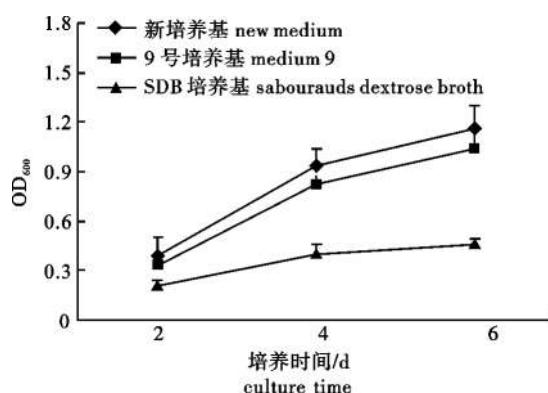


图5 3种鲫鱼诺卡氏菌培养基的比较

Fig. 5 Comparison between three culture medium of *N. seriolea*

再加入灭菌后的培养基中混匀。在 25 °C、盐度 5、pH 为 6.5 ± 0.2、130 r·min⁻¹ 条件下振荡培养 7 d，结果见图 5。经过正交试验得到的培养基在 2 d、4 d 和 6 d 的 OD₆₀₀ 均高于其他 2 种培养基，可以初步判断，正交试验结果准确，得到的新培养基比初始培养基好。

2.8 在优化条件下的生长曲线

根据 2.1 ~ 2.6 的优化结果，于含有葡萄糖 20 g·L⁻¹、酵母粉 15 g·L⁻¹、K₂HPO₄ 0.75 g·L⁻¹、

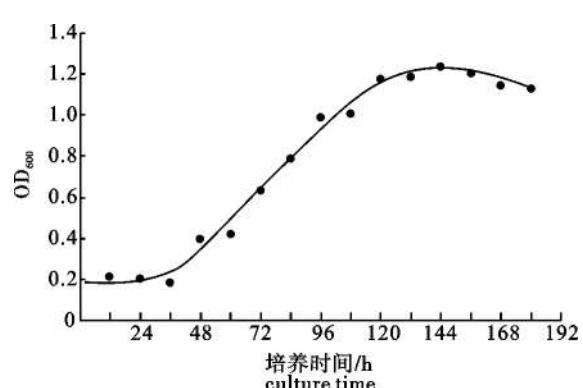


图6 鲫鱼诺卡氏菌的生长曲线

Fig. 6 Growth curve of *N. seriolea*

CaCl₂ 0.2 g·L⁻¹、NaCl 5 g·L⁻¹、pH 为 6.5 ± 0.2 的培养基中，在 25 °C、130 r·min⁻¹ 条件下振荡培养 8 d，鲫鱼诺卡氏菌的生长情况见图 6。结果显示，0 ~ 36 h 为鲫鱼诺卡氏菌生长延迟期，36 ~ 120 h 为对数生长期，而 120 ~ 156 h 为稳定期，156 h 往后则进入衰亡期。

3 讨论与结论

近年来，鲫鱼诺卡氏菌引发的诺卡氏菌病在

中国地区水产养殖中的发病率呈上升趋势。目前国内对鲫鱼诺卡氏菌的研究多集中于病原分离鉴定、快速检测和组织病理等方面^[4-11,15-17]，对鲫鱼诺卡氏菌疫苗的研究未见报道。国外有关鲫鱼诺卡氏菌疫苗的研究进展缓慢^[12-14]，尚无成功的商品化疫苗。鲫鱼诺卡氏菌菌体生长缓慢，之前对于该菌多采用固体培养基培养，如采用胰胨大豆胨琼脂培养基(TSA)、脑心浸液肉汤琼脂培养基(BHI)、沙氏琼脂培养基、罗氏培养基(L-J)、血琼脂培养基、小川培养基和普通营养琼脂培养基等^[3-4,14]，需5~14 d，才能形成1~3 mm白色或淡黄色沙粒状菌落。固体培养不利于扩大培养和疫苗大量生产。该研究对鲫鱼诺卡氏菌的液体培养参数和培养基进行了优化。单一变量控制试验确定了鲫鱼诺卡氏菌的最适生长条件为温度25 °C、盐度5、pH 6.5 ± 0.2。在此基础上着重研究了不同碳源、氮源和无机盐成分对鲫鱼诺卡氏菌生长的影响，发现最佳碳源是葡萄糖，最佳氮源是酵母粉，促生长作用最强的2种无机盐是K₂HPO₄和CaCl₂。正交试验得出培养基优化配方为葡萄糖20 g·L⁻¹，酵母粉15 g·L⁻¹，K₂HPO₄0.75 g·L⁻¹，CaCl₂0.2 g·L⁻¹(单独灭菌)，NaCl5 g·L⁻¹，pH为6.5 ± 0.2。该研究对鲫鱼诺卡氏菌菌体的大规模培养具有参考价值。

参考文献：

- [1] 黄郁葱, 简纪常, 吴灶和, 等. 卵形鲳鲹结节病病原的分离与鉴定[J]. 广东海洋大学学报, 2008, 28(4): 49~53.
- [2] 张建丽, 刘志恒. 诺卡氏菌型放线菌的分类[J]. 微生物学报, 2001, 41(4): 513~517.
- [3] 袁思平, 王国良, 金珊. 养殖鱼类致病诺卡氏菌研究进展[J]. 微生物学通报, 2006, 33(2): 137~141.
- [4] 王瑞旋, 刘广峰, 王江勇, 等. 养殖卵形鲳鲹(*Trachinotus ova-*
tus)诺卡氏菌病的研究[J]. 海洋湖沼通报, 2010, 33(1): 52~58.
- [5] 王国良, 徐益军, 金珊, 等. 养殖乌鳢诺卡氏菌病及其病原研究[J]. 水生生物学报, 2009, 33(2): 277~283.
- [6] 石存斌, 潘厚军, 常藕琴, 等. 养殖乌鳢结节病的病原分析[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(16): 7384~7386, 7397.
- [7] WANG G L, YUAN S P, JIN S. Nocardiosis in large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson) [J]. J Fish Dis, 2005, 28(6): 339~345.
- [8] 彭开松, 余锐萍, 祁克宗, 等. 暗纹东方鲀脂肪肝并发诺卡氏菌病[J]. 水产科学, 2008, 27(12): 629~632.
- [9] CHEN S C, LEE J L, LAI C C, et al. Nocardiosis in sea bass, *Lateolabrax japonicus*, in Taiwan [J]. J Fish Dis, 2000, 23(5): 299~307.
- [10] WANG P C, CHEN S D, TSA M AI, et al. *Nocardia seriolae* infection in the three striped tigerfish, *Terapon jarbua* (Forsskål) [J]. J Fish Dis, 2009, 32(4): 301~310.
- [11] 蒋依依, 李安兴. 鲫诺卡菌特异性PCR快速检测方法的建立[J]. 南方水产科学, 2011, 7(6): 47~51.
- [12] KUSUDA R, NAKAGAWA A. Nocardia infection of cultured yellowtail [J]. Fish Pathol, 1978, 13(1): 25~31.
- [13] SHIMAHARA Y, YASUDA H, NAKAMURA, et al. A detection of antibody responses against *Nocardia seriolae* by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and a preliminary vaccine trial in yellowtail *Seriola quinqueradiata* [J]. Eur Assoc Fish Pathologists, 2005, 25(6): 270~275.
- [14] ITANO T, KAWAKAMI H, KONO T, et al. Live vaccine trials against nocardiosis in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* [J]. Aquaculture, 2006, 261(4): 1175~1180.
- [15] 常藕琴, 石存斌, 潘厚军, 等. 乌鳢诺卡氏菌病的组织病理学[J]. 水产学报, 2008, 32(2): 209~216.
- [16] 王国良, 刘璐, 李思源, 等. 鲫鱼诺卡氏菌SYBR Green I实时荧光定量PCR检测方法的建立与应用[J]. 水产学报, 2012, 36(4): 509~513.
- [17] 王国良, 刘璐, 徐益军. 鱼类致病鲫鱼诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*)的LAMP检测技术建立与应用[J]. 海洋与湖沼, 2011, 42(1): 27~31.