

方斑东风螺“急性死亡症”的病原病理研究

王江勇，王瑞旋，苏友禄，吴开畅，郭志勋，姜敬哲，刘广锋，赵 旺

(中国水产科学研究院南海水产研究所，农业部南海渔业资源开发利用重点实验室，广东 广州 510300)

摘要：对海南发生的方斑东风螺(*Babylonia areolata*)“急性死亡症”进行了病原分离纯化、人工感染试验，以及病原 16S rDNA 分析和生理生化鉴定。结果显示病原菌为哈维弧菌(*Vibrio harveyi*)；药敏试验结果显示，该病原菌对常见的抗菌药物如恩诺沙星、复合磺胺等敏感，而对青霉素表现为耐药；组织病理结果显示鳃叶、腹足、肝胰腺、消化道、肾等器官的细胞出现变性、坏死、血细胞浸润等现象。

关键词：东风螺；“急性死亡症”；哈维弧菌；组织病理

中图分类号：S 944. 4⁺9 文献标志码：A 文章编号：2095 - 0780 - (2013) 05 - 0093 - 07

Pathogen and pathology of " acute death syndrome"
of *Babylonia areolata*

WANG Jiangyong, WANG Ruixuan, SU Youlu, WU Kaichang, GUO Zhixun,
JIANG Jingzhe, LIU Guangfeng, ZHAO Wang

(Key Lab. of South China Sea Fishery Resource Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: The pathogens of *Babylonia areolata* " acute death syndrome" in Hainan were isolated and purified, artificially infected, 16S rDNA analized, and physiological and biochemical characteristics identficated. The results show that the pathogen is *Vibrio harveyi*. Drug sensitivity test results show that the pathogen is sensitive to the common antibiotics drugs such as enrofloxacin, sulfa, but resistant to penicillin. Pathological changes in the gill, hepatopaneas, gastropods, digestive tract and kidney are as follows: cell degeneration, necrosis, and blood cell infiltration.

Key words: *Babylonia areolata*; acute death syndrome; *Vibrio harveyi*; histopathology

方斑东风螺(*Babylonia areolata*)属腹足纲、新腹足目、蛾螺科、东风螺属，在中国主要分布于东南沿海的砂质海底，其肉味鲜美、经济价值高，是很有增养殖发展前景的浅海重要经济贝类。由于人工育苗及养殖技术的突破，海南、广东、福建等地工厂化养殖规模日益扩大，尤其在海南省形成了较大的养殖规模，现有养殖水池面积约 30 多万平方米，产值超过 2 亿元人民币^[1 - 2]。

然而，伴随着养殖产业的发展，养殖密度越

来越大，养殖过程中各种病害逐渐增多，且日趋严重。已经报道的有聚缩虫、纤毛虫、桡足类和单孢子虫等寄生虫病^[3 - 7]，寄生性疾病对东风螺的危害相对较小，不容易引起大规模的暴发。2006 年以来多个东风螺养殖场陆续暴发“肿吻症”，吻管出现水肿、颜色发红，吻管伸出后无法收缩回壳内，该病病程短，死亡率高，目前已分离到哈维弧菌(*Vibrio harveyi*)、鳃弧菌生物变种 I(*V. anguillarum* Biovar I)等细菌^[8 - 9]；但对于

东风螺的“肿吻症”尚无防治方法报道，而对东风螺“壳肉分离症”有防治方法报道却尚未找到确切病原^[10-11]。笔者在海南养殖场对出现急性死亡的方斑东风螺进行采样，对其病原、病理进行了分析研究。

1 材料与方法

1.1 材料

患病东风螺来自海南省万宁市山根镇某工厂化养殖场。感染用螺购自汕尾某养殖场，暂养过程显示健康状态，暂养 3 d 后进行感染试验，同时设对照组。感染试验用海水沙滤后经 0.5×10^{-6} 氧化氯 (ClO_2) 溶液消毒。细菌分离用 Zobell 2216E 培养基 (酵母膏 1 g, 蛋白胨 5 g, 磷酸铁 0.1 g, 氯化钠 30 g, 蒸馏水 1 L, pH 7.6 ~7.8, 琼脂 20 g)、脑心浸汁培养基; 海洋弧菌选择性培养基 TCBS 为北京路桥生物技术有限公司产品。

1.2 病原菌分离

无菌条件下取病螺腹足、外套膜、鳃和内脏等组织，碾磨成浆，灭菌海水梯度稀释后取适量涂抹 ZoBell 2216E、脑心浸汁培养基、TCBS 培养基平板，28 ℃ 培养 96 h，选取形态特征一致的优势菌落重复划线纯化，直至获得纯培养单菌落，接种于斜面培养待用。

1.3 人工感染试验

对致病菌的初步筛选，第 1 次攻毒试验确认除 T3 外其余 4 株具不同程度的致病性; 第 2 次攻毒试验分 9 组进行，B1、B2、T1 和 T2 共 8 组试验组 (每个试验组设 2 个平行)，另外设对照组 1 个。采用肌肉注射方法，注射量为 $50 \mu\text{L} \cdot \text{个}^{-1}$ ，菌液浓度约为 $10^7 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。试验组每组注射 10 个，对照组注射生理盐水 (15 个)。注射后正常养殖 (水温 27.5 ℃，充气，过滤)。注射后 16 ~96 h 内每隔 2 ~3 h 观察 1 次并记录。

1.4 病原菌鉴定

1.4.1 菌株的 16S rDNA 基因序列测定和分析

1) PCR 模板的制备。按照 TIANGEN 公司的细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行总 DNA 制备，并取 DNA 溶液进行琼脂糖凝胶电泳检查制备的 DNA 完整性，若符合要求置于 -20 ℃ 保存备用。2) 基因扩增、克隆及测序。用于 16S rDNA 基因扩增的引物为通用引物，其正向引物 8F: 5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3' (对应于 *E. coli* 16S rDNA 的

第 8 至第 27 个碱基位置)，反向引物 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 反应条件为 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 45 s; 52 ℃ 复性 40 s; 70 ℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 70 ℃ 温育 10 min。PCR 产物交由上海英俊生物技术公司进行纯化和测序。

1.4.2 常规鉴定 生理生化特征检测是将菌株划线接种于脑心浸汁和 TCBS 平板培养基，28 ℃ 培养 24 h 观察菌落形态，并检测主要的生理生化指标 (包括革兰氏染色、鞭毛染色、氧化酶、触酶反应等)，并在初步鉴定的基础上进一步检测部分生化指标。同时进行 API(32E) 系统鉴定。

1.6 药物敏感性试验

利用杭州天和微生物试剂有限公司生产的药敏纸片，采用 K-B 扩散法进行药物敏感性试验，每种药设 2 个重复求平均值，具体步骤依据 NCCL 标准进行^[12]。

1.7 组织病理切片

剪取正常螺和病螺的肠、肾、腹足、鳃、心和肝胰腺等组织，分别切成小块大小约为 0.5 cm^3 。置于 Baker 福尔马林钙液中固定 24 h，Leica 脱水机脱水，Leica 包埋机石蜡包埋，常规切片，切片厚度 4 ~5 μm ，HE 染色，显微观察。

2 结果

2.1 病螺临床症状

正常的螺一般藏身于砂中，或爬行于砂面，触角伸出，对外界刺激敏感 (图 1 - a); 养殖池中病螺则爬出砂面，有些侧卧于砂面，对外界刺激反应迟钝，可见到吻管明显肿大 (图 1 - b)。

2.2 病原菌分离纯化

由发病东风螺分离到 5 株优势菌，按优势度强弱依次进行编号为 B1、B2、T1、T2 和 T3。

2.3 病原菌 16S rDNA 基因鉴定结果

经过测序、比对，B1、B2、T1、T2 和 T4 株均为 *V. harveyi*，T3 为 *Photobacterium jeanii* sp. nov，相似度均在 99% 以上。

2.4 人工感染试验结果

B1 菌株，注射浓度为 $10^7 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时累计死亡率为 40%，注射浓度为 $10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时累计死亡率为 50%; B2 菌株，注射浓度为 $10^7 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时累计死亡率为 30%，注射浓度为 $10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时累计死亡率为 70%; T1 菌株，注射浓度为 10^7

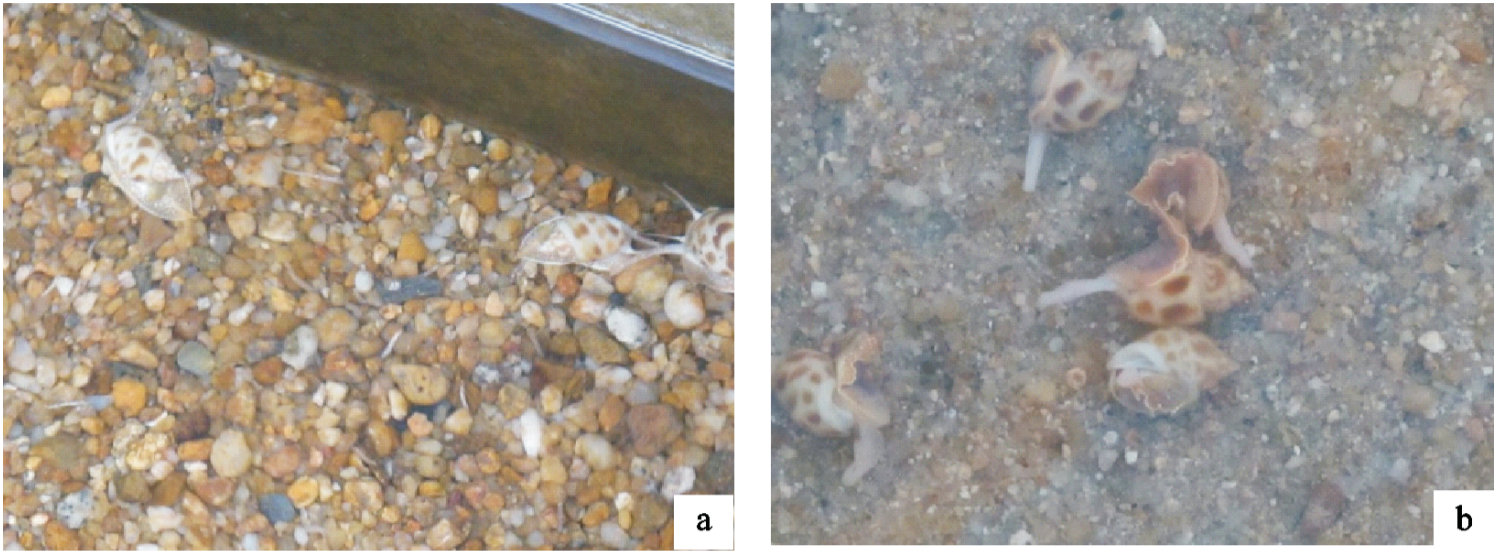


图 1 正常 (a) 和发病 (b) 的东风螺
Fig 1 Normal (a) and diseased (b) *B. areolata*

cfu·mL⁻¹时累计死亡率为 20%，注射浓度为 10⁸ cfu·mL⁻¹时累计死亡率为 80%；T2 菌株，注射浓度为 10⁷ cfu·mL⁻¹时累计死亡率为 30%，注射浓度为 10⁸ cfu·mL⁻¹时累计死亡率为 70% (表 1)。

对感染后死亡的螺进行细菌的再分离 (取内脏)，结果分离到菌落形态单一的优势菌 (图 2，图 3)，对菌株重新鉴定，结果与受试菌株种类一致。

2.5 API 鉴定结果及菌株的主要生理生化特征

由于 API 鉴定系统没有哈维弧菌的信息，故未能直接鉴定到该种，但经 API 鉴定初步排除了菌株属其他弧菌种类的可能，其主要的生理生化结果见表 2。

已有报道指出，哈维弧菌明显区别于其他弧菌的特征为在固体培养基上能形成侧生鞭毛，在 35 能生长，能利用 D- 甘露糖、纤维二糖、D-葡萄糖酸盐、D- 葡糖醛酸、庚酸、A- 酮戊二酸盐、L- 丝氨酸、L- 谷氨酸盐和 L- 酪氨酸；精氨酸双水解酶呈阴性，不产 3- 羟基-2- 丁酮，不能利用 B- 羟基丁酸、D- 山梨醇、乙醇、L- 亮氨酸、C- 氨基丁酸盐和腐铵^[12]。因此在初步鉴定的基础上将受试菌株与哈维弧菌标准株 ATCC14126 针对以上指标 (结合 API 生化鉴定结果) 进行进一步试验，结果显示受试菌株与哈维弧菌标准株一致。

2.6 药敏试验结果

药敏试验结果显示，该病原菌对水产药物如恩诺沙星、复合磺胺等敏感，而对青霉素表现为耐药 (表 3)。



图 2 人工感染后的东风螺
Fig 2 *B. areolata* after artificial infection

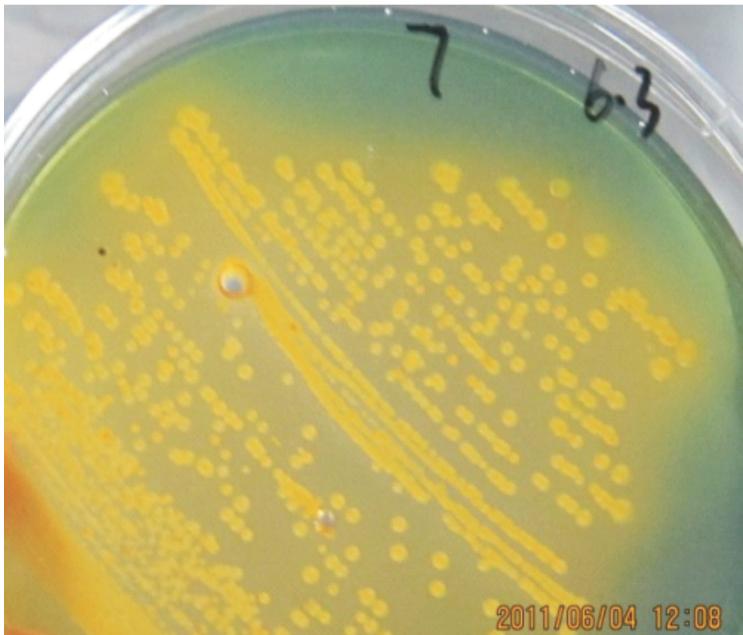


图 3 再分离的菌落形态
Fig 3 Colony morphology after re-purifying

表 1 东风螺人工感染试验结果

Tab. 1 Results of artificial infection of *B. areolata*

菌株编号 strain No.	注射浓度 / cfu·mL ⁻¹ injection concentration	累计死亡率 / % cumulative mortality	半致死浓度 / cfu·mL ⁻¹ LD ₅₀
B1	3 ×10 ⁸	50	1. 18 ×10 ⁸
	3 ×10 ⁷	40	
	3 ×10 ⁶	0	
B2	3 ×10 ⁸	70	9. 4 ×10 ⁷
	3 ×10 ⁷	30	
	3 ×10 ⁶	0	
T1	3 ×10 ⁸	80	9. 4 ×10 ⁷
	3 ×10 ⁷	20	
	3 ×10 ⁶	0	
T2	3 ×10 ⁸	70	9. 4 ×10 ⁷
	3 ×10 ⁷	30	
	3 ×10 ⁶	0	
对照组(生理盐水) control group(phosilological saline)	0. 9%	0	

表 2 4 株哈维弧菌的生理生化结果

Tab. 2 Physiological and biochemical results of 4 strains of *V. harveyi*

鉴定指标 identified index	菌株 strain			
	T1	T2	B1	B2
触酶(过氧化氢酶) catalase	+++	+++	+++	+++
鞭毛染色 flagella staining	鞭毛极生	鞭毛极生	鞭毛周生	鞭毛极生
革兰氏染色 Gram staining	-	-	-	-
氧化酶 oxidase	+	+	+	+
1% 氯化钠葡磷胨水 1% NaCl ghacose-phosphate broth	+	+	+	+
无盐胨水 not NaCl tryptone broth	-	-	-	-
1% 氯化钠蛋白胨水 1% NaCl tryptone broth	+	+	+	+
3% 氯化钠胨水 3% NaCl tryptone broth	+	+	+	+
6% 氯化钠胨水 6% NaCl tryptone broth	-	+	+	+
8% 氯化钠胨水 8% NaCl tryptone broth	-	+	+	+
10% 氯化钠胨水 10% NaCl tryptone broth	-	-	-	-
1% 氯化钠蔗糖 1% NaCl sucrose	+	-	+	+
1% 氯化钠甘露糖 1% NaCl mannose	+	+	+	+
1% 氯化钠阿拉伯糖 1% NaCl arabinose	-	-	-	-
1% 氯化钠肌醇 1% NaCl inosite	-	-	-	-
赖氨酸脱羧酶 Iysine decarboxylase	-	-	-	-
精氨酸双水解酶 Arginine hydrolase	+	+	+	+
葡萄糖产气 glucose aerosis	-	+	-	-

表 3 药敏试验结果

Tab. 3 Results of drug sensitivity test

菌株编号 strain No.	高敏 hypersensitive	中敏 medium sensitivity	耐药 resistance
B1	利福平、诺氟沙星、氧氟沙星、恩诺沙星、四环素、复合磺胺	卡那霉素、新霉素、庆大霉素	青霉素
B2	诺氟沙星、氧氟沙星、恩诺沙星、四环素、复合磺胺	利福平、卡那霉素、新霉素、庆大霉素	青霉素
T1	诺氟沙星、氧氟沙星、恩诺沙星、四环素、复合磺胺	卡那霉素、新霉素、庆大霉素	青霉素
T2	诺氟沙星、氧氟沙星、恩诺沙星、四环素、复合磺胺	利福平、卡那霉素、新霉素、庆大霉素	青霉素

2.7 组织病理结果

2.7.1 鳃 正常东风螺的鳃叶呈羽状，上皮细胞排列有序，表面具有纤毛(图 4 - a)。病变的鳃叶上皮细胞肿胀，细菌侵染上皮细胞，并由此进入细胞间隙及血淋巴中，细胞间界限变得模糊不清，微绒毛脱落，血细胞大量浸润其中(图 4 - b)。

2.7.2 腹足 正常东风螺的腹足上皮组织排列紧密，结构非常规则；肌纤维结构致密，具有不同的走向，与结缔组织交织成均质的网状结构(图 4 - c)。病螺腹足肌纤维结构紊乱，排列疏松，肌纤维变细，部分肌纤维变性、坏死，呈溶解状态，肌纤维断裂，形成空洞，病原菌可在肌纤维中生长繁殖，造成肌间结缔组织的溶解，只剩下细胞核散布其中(图 4 - d)。

2.7.3 肝胰腺 消化腺主要由许多球形或形状不规则的肝小叶及小叶间的胰腺组织构成，正常的肝细胞排列紧密(图 4 - e)。病螺管腔中可见脱落的细胞，细菌侵入肝小叶及组织间隙，造成肝小叶的部分溶解，血细胞数量减少，部分病肝小管周围组织有轻微结缔组织增厚现象(图 4 - f)。

2.7.4 消化道 消化道由粘膜层、粘膜下层、肌层和外膜构成。粘膜上皮由单层柱状上皮细胞组成，细胞紧贴于基底膜，粘膜下层由疏松结缔组织构成，粘膜上皮向肠腔内形成肠绒毛；外膜由结缔组织构成(图 4 - g)。病螺的肠道主要病变表现为肠绒毛数量减少，细菌主要侵染上皮细胞，使得上皮与其下的结缔组织剥离，结缔组织疏松，纤毛层萎缩，粘液细胞增多(图 4 - h)。

2.7.5 肾 肾脏由肾小管和集合管组成。肾小管由单层柱状上皮肾细胞组成，上皮细胞呈立方形或接近立方形，细胞界限不清晰，核呈圆形(图 4 - i)。病螺肾细胞崩解，组织溶失、坏死，细菌随

着血淋巴的流动进入肾小管，肾小管完全融合，血细胞浸润其间(图 4 - j)。

3 讨论

3.1 东风螺“急性死亡症”的病原

目前养殖过程中对东风螺危害严重的病害主要有 2 种：1) 壳肉分离症。螺肉从螺壳中分离出来，首先有几个或十几个出现壳肉分离，螺肉在体外还可爬行，几天内不会死亡，而且池内其他螺摄食正常，但池内出现壳肉的分离的螺越来越多，螺肉分离后一般在几天或十几天后死亡；2) 细菌性疾病。这种病来势凶猛，染病的螺摄食量突然减少，2 ~3 d 后大量爬出沙面，吻管突出，行动缓慢，吻管外伸，对外界刺激不敏感，严重时全部死亡。

此次引起东风螺“急性死亡症”的病原主要是细菌，由发病东风螺分离到的 5 株优势菌，其中 2 株分离自脑心浸汁琼脂培养基，3 株分离自 TCBS 培养基。经 16S rDNA 鉴定，4 株为哈维弧菌，1 株为 *Photobacterium jeanii*，相似度均在 99% 以上。通过多次人工感染试验显示其中 4 株哈维弧菌均具致病性，感染前后从发病螺体分离到相同的哈维弧菌，且受感染的东风螺出现相同的症状：吻管明显红肿发炎，最后死亡；半致死浓度为 ($10^7 \sim 10^8$) cfu·mL⁻¹。

笔者的试验结果与黄郁葱等^[8]的结果基本一致，后者从广东湛江地区患吻管水肿病的方斑东风螺中分离了具有较强毒性的哈维弧菌，而张新中等^[9]从海南养殖患“肿吻症”的方斑东风螺中分离的病原菌为鳃弧菌生物变种 (*V. anguillarum* Biovar)。因此通过病原分离纯化、人工感染等试验、16S rDNA 分析和生理生化鉴定，可以判断此次东风螺“急性死亡症”主要是由哈维弧菌引起的。哈

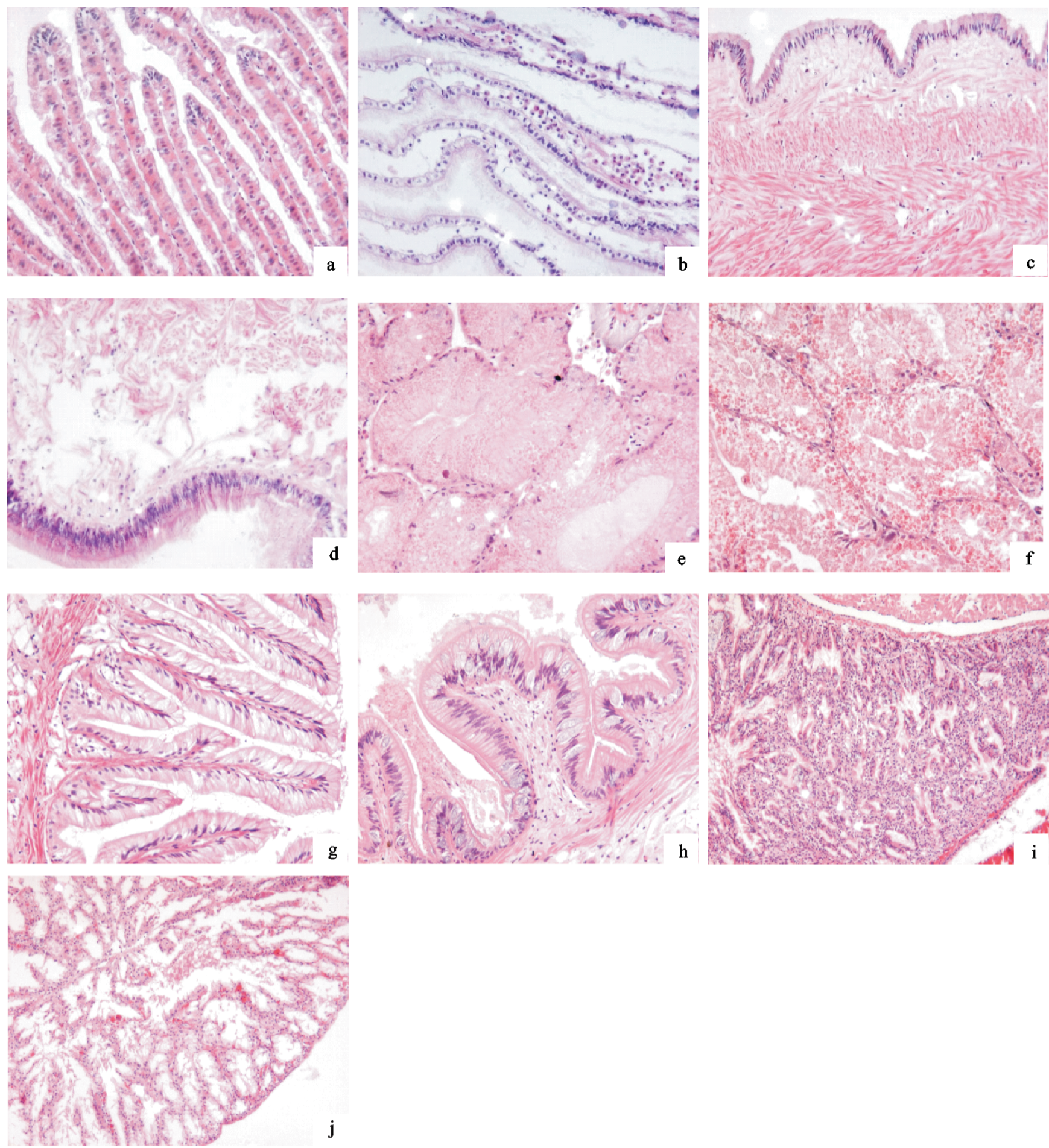


图 4 正常和发病方斑东风螺的组织学变化

a 正常的鳃 (H. E. 200 ×) ; b. 鳃丝里充满免疫相关细胞 (H. E. 200 ×) ; c. 正常的腹足 (H. E. 200 ×) ; d. 腹足的肌纤维大面积的溃烂、溶解 (H. E. 200 ×) ; e. 正常的肝胰腺 (H. E. 200 ×) ; f. 肝胰腺细胞变性, 部分腺细胞脱落 (H. E. 200 ×) ; g. 正常的消化道 (H. E. 200 ×) ; h. 消化道轻微病变, 粘液细胞增多 (H. E. 200 ×) ; i. 正常的肾 (H. E. 200 ×) ; j. 肾细胞脱落、溶解、坏死 (H. E. 200 ×)

Fig 4 Histological changes of tissues of normal and diseased *B. areolata*

a normal gill (H. E. 200 ×) ; b. the gill filaments with immune cells (H. E. 200 ×) ; c. nomal gastropod (H. E. 200 ×) ; d. muscle fiber area gastropod fester, dissolved (H. E. 200 ×) ; e. normal liver pancreas (H. E 200 ×) ; f. liver and pancreas cell degeneration, part of gland cell shedding (H. E. 200 ×) ; g. normal digestive tract (H. E. 200 ×) ; h. gastrointestinal ailments, mucous cells increased (H. E. 200 ×) ; i. normal kidney (H. E. 200 ×) ; j. renal cell shedding, lysis, necrosis (H. E. 200 ×)

维弧菌是海水养殖的主要病原菌, 可引起杂色鲍 (*Haliotis diversicolor*)、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)、大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*)、鲢鱼 (*Mi-*

ichthys miiuy)、凡纳滨对虾 (*Penaeus vannamei*) 等多种海水养殖动物致病, 并具有较高的死亡率, 给养殖业者带来巨大的经济损失^[13-19]。

3.2 东风螺“急性死亡症”的组织病理分析

从组织病理结果来看，病原菌可以侵染东风螺的几乎各个器官组织(图 4 未显示有细菌感染，病变组织不一定都会有细菌)，引起鳃、腹足等与外界直接接触器官的细胞、纤维等的变性、坏死，血细胞浸润等病理变化，同时引起内部器官如肝胰腺、消化道、肾等器官的粘液细胞增多、间质细胞脱落、溶解、坏死等变化。从病理变化可以看出，哈维弧菌具有较强的致病性，对东风螺的感染为系统感染，靶器官为鳃、腹足、肝胰腺、消化道、肾等，可造成主要器官明显的组织细胞病理变化，细菌感染后造成组织结构紊乱，细胞破坏严重，正常机能丧失，各主要器官的机能衰竭，如吻管水肿、鳃、消化道、肾等重要器官分泌异常等而导致东风螺死亡。

3.3 东风螺“急性死亡症”的防治措施

东风螺“急性死亡症”发作时几乎没有任何征兆，一般白天发现有螺不钻入砂中，2~3 d 后砂面有大量的螺行动缓慢，吻管外伸，对外界刺激不敏感，甚至有部分螺出现死亡。对病原菌进行的药物敏感性测试结果显示该病原除对青霉素耐药外，对其余受试的多种药物均敏感，对诺酮类高度敏感，而中草药的黄芩 (*Scutellariae radix*)、槟榔 (*Arecae semen*)、女贞子 (*Ligustri lucidi fructus*) 对其也有强抑制效果。但目前生产中尚没有切实有效的方法来防治该疾病。化学药物及中草药均难以彻底防治该病，推测原因应与东风螺的生长环境有关，平常生活于砂层中，摄食后的残饵及排除的粪便都沉积于砂层中，为细菌的大量繁殖提供了温床，有些细菌为条件致病菌，当细菌量及水温达到一定阈值时，就可能暴发该病；由于东风螺有坚固的螺壳作为保护，一般药物很难作用于体内，因而难以达到杀菌的目的，同时由于砂层的存在，药物也不容易作用于砂层中的细菌。

推测水体传播是病原菌侵入的主要途径，一旦出现该病，就要倒池，将未出现病症的螺放入一个新池中，使用抗菌药物或消毒剂进行防治处理，同时对原池用漂白粉等消毒剂进行彻底消毒；如果病情非常严重，应立即将全池的螺移出掩埋，进行全池消毒。不发病时可在饵料中适当拌入光合细菌，水池中泼洒芽孢杆菌等，同时 2~3 个月应倒池 1 次，彻底破坏细菌滋生的温床。

参考文献:

[1] 董杨海, 符书源, 王国福. 海南省方斑东风螺养殖业的发展及其前景展望[J]. 科学养鱼, 2011(12): 39 - 40.

[2] 陈利雄, 吴进锋. 东风螺的增养殖技术及产业化前景[J]. 齐鲁渔业, 2004, 21(10): 9 - 11.

[3] 郑养福. 方斑东风螺浮游期聚缩虫病的防治[J]. 福建水产, 2007(2): 48 - 51.

[4] 黄海立, 余德光. 方斑东风螺幼虫纤毛虫病的防治方法[J]. 科学养鱼, 2007(7): 56.

[5] 王建钢, 乔振国. 方斑东风螺肉壳分离病病因的初步研究[J]. 现代渔业信息, 2011(10): 16 - 18.

[6] 王建钢, 乔振国. 方斑东风螺脱壳病防治方法探讨[J]. 现代渔业信息, 2011(11): 27 - 29.

[7] 彭景书, 戈贤平, 李明, 等. 方斑东风螺单孢子虫病的研究[J]. 水生生物学报, 2011, 35(5): 803 - 807.

[8] 黄郁葱, 简纪常, 吴灶和, 等. 方斑东风螺吻管水肿病病原菌的初步研究[J]. 渔业现代化, 2009(4): 37 - 41.

[9] 张新中, 文万饶, 冯永勤, 等. 方斑东风螺肿吻症病原菌的分离鉴定及药敏分析[J]. 海洋科学, 2010, 34(5): 7 - 12.

[10] 王国福, 张瑞姿, 曾令明, 等. 方斑东风螺肉壳分离病的防治方法[J]. 河北渔业, 2008(8): 37 - 40.

[11] 杨章武, 张扬波. 东风螺脱壳病活体接触感染试验[J]. 水产养殖, 2010, 31(9): 1 - 3.

[12] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Sixteenth informational supplement[S]. CLSI document M100-S16(ISBN 1-56238-588-7). Wayne, Pa, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.

[13] 张晓华, 钟英斌, 陈吉祥. 哈维氏弧菌的生物学特性、流行病学及检测技术[J]. 中国海洋大学学报, 2007, 37(5): 740 - 748.

[14] 王江勇, 孙秀秀, 王瑞旋, 等. 杂色鲍肌肉萎缩症病原菌的分离鉴定及系统发育分析[J]. 南方水产, 2010, 6(5): 21 - 26.

[15] 梅冰, 周永灿, 徐先栋, 等. 斜带石斑鱼烂尾病病原菌的分离与鉴定[J]. 热带海洋学报, 2010, 29(6): 118 - 124.

[16] JIANG Q, SHI L, KE C, et al. Identification and characterization of *Vibrio harveyi* associated with diseased abalone *Haliotis diversicolor*[J]. Dis Aquat Org, 2013, 103(2): 133 - 139.

[17] 王国良, 祝璟琳, 金珊, 等. 养殖大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 3 种致病弧菌的分子鉴定及其系统发育学分析研究[J]. 海洋与湖沼, 2008, 39(2): 162 - 167.

[18] 张凤萍, 彭志兰, 张健, 等. 鳊鱼弧菌病病原菌(哈维氏弧菌)的分离与鉴定[J]. 微生物学报, 2010, 50(3): 304 - 309.

[19] 刘问, 钱冬, 杨国梁, 等. 南美白对虾虾苗淡化期间发光病病原研究[J]. 集美大学学报: 自然科学版, 2004, 9(4): 300 - 304.