

doi: 10.3969/j.issn.2095-0780.2014.05.001

养殖杂交鳢迟缓爱德华菌的分离鉴定

陈言峰¹, 周爱国², 陈冠锋¹, 陈建酬¹, 张继平¹, 张辉华¹

(1. 佛山科学技术学院生命科学学院, 广东 佛山 528231; 2. 华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要: 从患病杂交鳢[斑鳢(*Channa maculata*)♀ × 乌鳢(*C. argus*)♂]体内分离到2株致病菌(ZS201364-1和ZS201364-2), 通过对其实生化特性与16S rRNA基因序列进行分析, 确定为迟缓爱德华菌(*Edwardsiella tarda*)。该致病菌兼性厌氧, 为革兰氏阴性短杆菌, 能运动, 能发酵葡萄糖、麦芽糖。吲哚试验和MR试验均为阳性。2株致病菌对杂交鳢的半致死剂量(LD_{50})分别为 $7.1 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $5.6 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 。ZS201364-1最适生长温度为25~35℃、pH为7~8、氯化钠(NaCl)质量分数为1%, 对头孢噻肟、环丙沙星、诺氟沙星等抗生素高度敏感。

关键词: 杂交鳢; 迟缓爱德华菌; 分离; 鉴定

中图分类号: S 941.42

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2014)05-0001-07

Isolation of *Edwardsiella tarda* from cultured hybrid snakehead (*Channa maculata* ♀ × *C. argus* ♂) and its identification

CHEN Yanfeng¹, ZHOU Aiguo², CHEN Guanfeng¹, CHEN Jianchou¹, ZHANG Jiping¹, ZHANG Huihua¹

(1. College of Life Science, Foshan University, Foshan 528231, China; 2. College of Animal Science,
South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Two pathogenic bacteria (ZS201364-1, ZS201364-2) isolated from diseased hybrid snakeheads (*Channa maculata* ♀ × *C. argus* ♂) were identified to be *Edwardsiella tarda* by analyses of biochemical features and 16S rDNA sequence. The anaerobic, gram negative, bacilliform and motile isolates utilized glucoses and maltose as energy. Both indole and M. R. tests proved positive. The LD_{50} s of the isolates to healthy hybrid snakeheads were $7.1 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ and $5.6 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively. The optimal growth conditions of strain ZS201364-1, which was highly susceptible to cefotaxime, ciprofloxacin and norfloxacin, were 25~35℃ pH 7~8 and 1% NaCl.

Key words: hybrid snakehead; *Edwardsiella tarda*; isolation; identification

乌鳢(*Channa argus*)和斑鳢(*C. maculata*)均属鲈形目, 攀鲈亚目, 鲢科, 鲢属^[1], 两者均为淡水养殖的名优品种。杂交鳢[(*C. maculata*)♀ × (*C. argus*)♂], 俗称杂交生鱼, 是以乌鳢为父本和斑鳢为母本杂交的子一代, 具有明显的杂种优势。杂交鳢的成功培育和养殖推广克服了其父母本养殖的地域局限性, 近年来已逐渐成为鳢科鱼类的主要养殖品种, 具有广阔的养殖前景和巨大的经济

效益^[2]。目前, 有关杂交鳢的研究主要涉及其染色体组型^[3~4]、胚胎发育^[5]、生长性能^[6]、血液指标^[7]与肌肉营养成分^[8]等方面。自然条件下鳢科鱼类抗病能力较强, 但高密度养殖条件下一旦养殖水体水质恶化, 鲢科鱼类患病也时有发生, 迄今已造成了严重的经济损失^[9~15]。然而有关杂交鳢的细菌性病害的报道鲜少, 除刘春等^[16]报道过舒氏气单胞菌(*Aeromonas schubertii*)引起杂交鳢的结

收稿日期: 2014-01-24; 修回日期: 2014-03-19

资助项目: 佛山科学技术学院校级科研项目; 广东省教育厅产学研项目(2010b090400255)

作者简介: 陈言峰(1981-), 男, 博士, 助教, 从事淡水养殖鱼类病害研究。E-mail: chyfwf@126.com

通信作者: 张辉华(1971-), 教授, 从事淡水鱼类生态养殖技术研究。E-mail: hhzhang2@163.com

节病之外,国内外尚未见其他报道。笔者从广东省中山市某鱼场的患病杂交鳢分离得到2株致病菌,通过对其鉴定确定为迟缓爱德华菌(*Edwardsiella tarda*),研究了该致病菌的致病力、生长特性及对抗生素的敏感性,旨在为杂交鳢养殖过程中的病害防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

患病杂交鳢取自广东省中山市某杂交鳢养殖场,健康的杂交鳢购于广州市黄沙水产市场,体质量为 $(271 \pm 26) \text{ g}$,放于池中暂养,充气,水温维持在 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,每天投喂饲料,适应1周后开始试验。革兰氏染色液、芽孢染色液、细菌微量生化鉴定管均购于广东环凯微生物有限公司;抗生素纸片购于杭州天和微生物试剂有限公司;细菌基因组DNA提取试剂盒购于广州维宁生物科技有限公司。

1.2 细菌的分离、纯化

无菌操作从患病濒死的杂交鳢的肝、脾、肾划线接种于营养琼脂平板上,37℃培养48 h后挑取单菌落在营养琼脂平板上划线,进行纯培养。对已分离纯化的细菌按染色液说明书进行格兰染色、芽孢染色,参照文献[18]的方法进行荚膜染色,光学显微镜下观察。

1.3 细菌的生理生化鉴定

将分离菌的新鲜菌落接种于LB(Luria-Bertani)肉汤培养基中,培养18 h后取80 μL菌液加入每种微量生化鉴定管,37℃培养12~48 h后判定结果。

1.4 细菌16SrRNA基因序列的分析

用上海英骏生物技术有限公司合成的通用引物^[13]进行PCR扩增,正向引物为27F:5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3'(对应于大肠杆菌(*E. coli*)16S rRNA基因序列的第8~第27个碱基位置);反向引物1492R:5'-TACGGCTACCTTGT-TACGACTT-3'(对应于*E. coli* 16S rRNA基因序列的第1492~1510个碱基位置)。按试剂盒说明书提取细菌基因组DNA。反应体系为50 μL,0.2 μg·μL⁻¹细菌DNA模板2 μL,10 mmol·L⁻¹的正反向引物各1 μL,含Mg²⁺的10×PCR缓冲液5 μL,10 mmol·L⁻¹4×dNTP 2 μL,1 U·μL⁻¹的TaqDNA聚合酶2 μL,双蒸水37 μL。PCR采用反应条件为

94℃预变性5 min 1次;94℃30 s,58℃45 s,72℃1 min 30 s,30个循环;PCR产物送上海美吉生物医药科技有限公司纯化并测序。测序结果通过NCBI的BLAST检索系统进行同源序列比对,从中选取相似序列,并使用MEGA 4.1与从GenBank数据库中获得的序列相似性较高的菌株的序列进行多序列匹配排列(multiple alignments),采用邻接法(neighbor joining method)构建系统发育树,并通过Bootstrap法(1 000次重复)检验。

1.5 人工感染试验

70尾健康的杂交鳢分为7组,每组10尾,6组为试验组,1组为对照组。取菌株ZS201364-1的新鲜菌落制成浓度为 $1.12 \times 10^9 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 菌悬液,然后分别稀释至 $1.12 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1.12 \times 10^7 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1.12 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1.12 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $1.12 \times 10^4 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。分别将以上几个浓度的菌液按照每尾0.5 mL的剂量,对健康杂交鳢腹腔注射进行感染。对照组的杂交鳢,则按照每尾0.5 mL的剂量在相同部位注射0.85%无菌生理盐水。该人工感染试验持续15 d,每日观察受试鱼的发病症状并记录死亡的尾数,并从濒死的鱼重新分离细菌,根据改进的寇氏法^[17]计算半致死剂量(LD_{50})。 $\lg \text{LD}_{50} = X_k - d(\sum P_i - 0.5)$,其中 X_k 为最大对数剂量, d 为相邻两组对数剂量之差数, P_i 为死亡率, i 为组号。同样的方法用于菌株ZS201364-2对杂交鳢的 LD_{50} 的测定。

1.6 生长特性

1.6.1 温度对致病菌生长的影响 将菌株ZS201364-1的单菌落接种到无菌LB肉汤中振荡($80 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)培养18 h,取25 μL菌液分别接种到24支盛有5 mL无菌营养肉汤的试管中,于5℃、10℃、15℃、25℃、30℃、35℃、40℃和45℃下培养,每个温度设3个重复。18 h后取样分别测定不同培养温度下菌液的光密度($\text{OD}_{460 \text{ nm}}$)。以培养温度为横坐标、 $\text{OD}_{460 \text{ nm}}$ 为纵坐标绘制曲线。

1.6.2 pH对致病菌生长的影响 将菌株ZS201364-1的单菌落接种到无菌LB肉汤中振荡($80 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)培养18 h,取25 μL菌液分别接种到21支盛有pH为4、5、6、7、8、9和10的5 mL无菌营养肉汤的试管中,每个pH设3个重复,30℃下培养18 h后取样分别测定不同pH时菌液的 OD_{460} 。以pH为横坐标、 OD_{460} 为纵坐标绘制曲线。

1.6.3 NaCl质量分数对致病菌生长的影响 将

菌株 ZS201364-1 的单菌落接种到无菌 LB 肉汤中振荡($80 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)培养 18 h, 取 25 μL 菌液分别接种到 33 支含 NaCl 质量分数分别为 0%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5% 和 5.0% 的 5 mL 无菌营养肉汤的试管中, 每个 NaCl 质量分数设 3 个重复, 30 °C 条件下培养 18 h 后取样分别测定不同 NaCl 质量分数时菌液的 OD_{460} 。以 NaCl 质量分数为横坐标、 OD_{460} 为纵坐标绘制曲线。

1.7 药敏试验

采用纸片扩散法, 无菌操作将菌株 ZS201364-1 的 24 h 培养物以无菌生理盐水洗下制成 $1.5 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌悬液, 取 80 μL 菌悬液涂布于营养琼

脂培养基平板, 用无菌镊子将抗生素纸片轻轻贴在琼脂表面, 37 °C 恒温培养 48 h 后测量抑菌圈直径的大小。

2 结果

2.1 形态特征

该致病菌为革兰氏阴性短杆菌, 能运动, 无芽孢, 无荚膜。在普通营养琼脂培养基上 37 °C 培养 24 h, 形成正圆形、凸起、灰白色、有光泽的菌落, 直径 0.5 ~ 1.0 mm。

2.2 生理生化鉴定

根据分离菌株的生理生化特性结果^[18], 鉴定 2 株致病菌均为迟缓爱德华菌(表 1)。

表 1 分离菌的生理生化特征

Tab. 1 Physiological and biochemical characteristics of isolates

检测项目 test item	ZS201364-1	ZS201364-2	迟缓爱德华菌 <i>E. tarda</i>
动力 mobility	+	+	+
吲哚 indole	+	+	+
七叶苷 aesculin	+	-	-
硫化氢 H_2S	+	+	+
尿素酶 urease	-	-	-
西蒙氏柠檬酸盐 citrate	-	-	-
M. R. methyl red	+	+	+
V-P V-P reaction	-	-	-
苯丙氨酸脱氨酶 phenylalanine deaminase	-	-	-
葡萄糖酸盐 glyconate	-	-	-
三糖铁琼脂 triple sugar iron agar	+	+	+
鸟氨酸脱羧酶 ornithine decarboxylase	+	+	+
赖氨酸脱羧酶 lysine decarboxylase	+	+	+
精氨酸脱羧酶 arginine decarboxylase	-	-	-
精氨酸双水解酶 arginine hydrolase	-	-	-
葡萄糖 glucose	+	+	+
麦芽糖 D-maltose	+	+	+
乳糖 lactose	-	-	-
木糖 D-xylose	-	-	-
甘露醇 D-mannitol	-	-	-
棉子糖 raffinose	-	-	-
山梨醇 D-glucitol	-	-	-
侧金盏花醇 adonite	-	-	-
淀粉水解 amyloyisis	-	-	-
马尿酸盐 hippurate	+	+	+

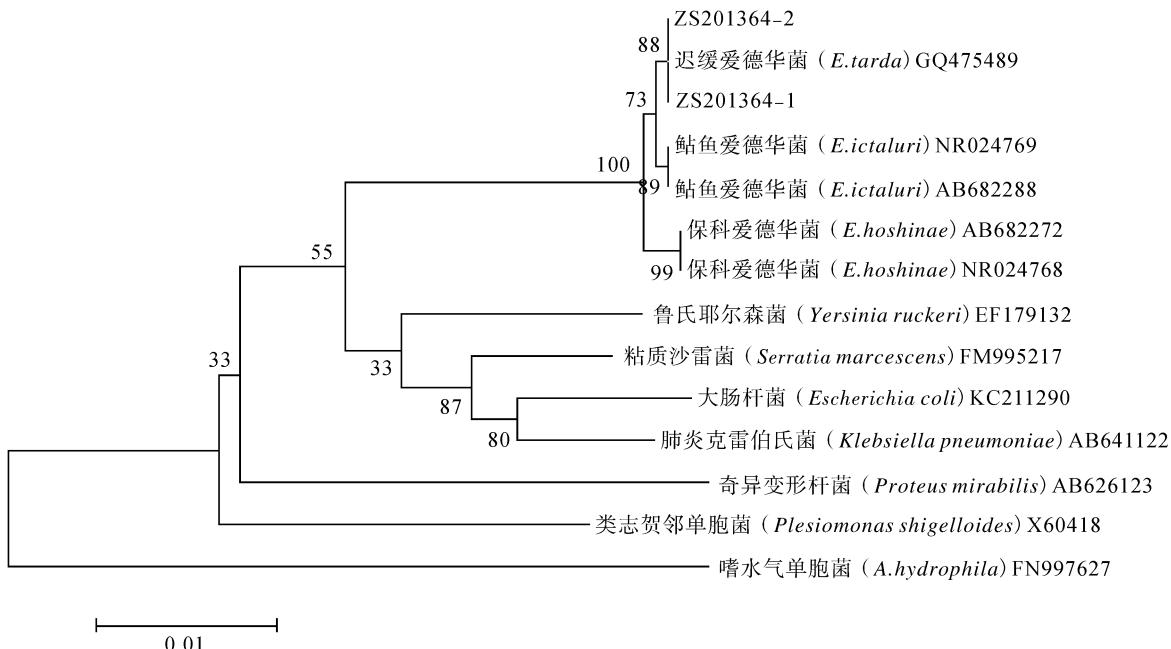


图1 基于 16S rRNA 基因序列所构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences using neighbour-joining method

2.3 16SrRNA 基因序列的分析

菌株 ZS201364-1 和 ZS201364-2 所扩增的 16SrRNA 基因序列长度分别为 1 428 bp 和 1 429 bp, 将此 2 条序列 (Accession No. KJ183027 和 KJ183028) 分别与 GenBank 中的序列进行比较, 结果与迟缓爱德华菌同源性均为 99%, 从而鉴定此 2 株菌为迟缓爱德华菌。

根据菌株 ZS201364-1 和 ZS201364-2 的 16S rRNA 基因序列测定结果, 选取相似序列使用 MEGA 4.1 采用邻接法构建系统发育树, 并通过 Bootstrap 法 (1 000 次重复) 检验。所构建的系统发育树见图 1。菌株 ZS201364-1 和 ZS201364-2 的 16S rRNA 基因序列与迟缓爱德华菌的 16S rRNA 基因序列自然聚类。从而鉴定菌株 ZS201364-1 和 ZS201364-2 均为迟缓爱德华菌。

2.4 人工感染试验

人工感染后的杂交鳢第 3 天开始死亡, 从死亡鱼的肝、肾均可再次分离到原感染细菌。试验过程中, 注射了 0.85% 无菌生理盐水的对照组鱼摄食正常, 外观特征没有明显的变化。计算得到菌株 ZS201364-1 和 ZS201364-2 对杂交鳢 LD₅₀ 分别为 $7.1 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $5.6 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

2.5 生长特性

2.5.1 温度对致病菌生长的影响

菌株 ZS2013

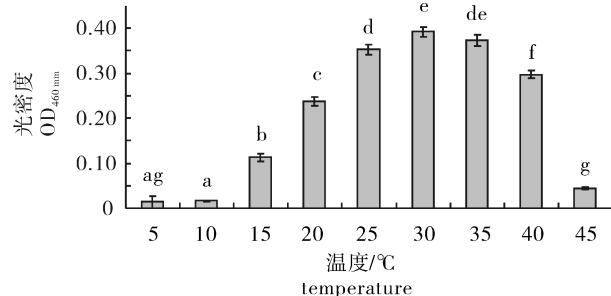


图2 温度对菌株 ZS201364-1 生长的影响

不同字母标记的表示差异显著 ($P < 0.05$),
误差线代表平均值的标准误差, 后图同此

Fig. 2 Effect of temperature on growth of strain ZS201364-1

Different letters indicate significant difference among different treatments ($P < 0.05$), and bars represent standard errors of the means. The same as in the following figures.

64-1 在温度 10~45 °C 均能生长, 最适生长温度为 25~35 °C (图 2)。

2.5.2 pH 对致病菌生长的影响 菌株 ZS201364-1 在 pH 4~10 均能够生长, 其中最适生长 pH 为 7~8 (图 3)。

2.5.3 NaCl 质量分数对致病菌生长的影响

菌株 ZS201364-1 在 NaCl 质量分数为 0~4% 均能生长, 其中最适生长的 NaCl 质量分数为 1% (图 4)。

表2 人工感染试验结果

Tab. 2 Result of artificial infection experiment

菌株 strain	菌液浓度/ $\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ concentration of bacteria solution	试验鱼数/尾 number of samples	死亡个数/尾 number of death samples	死亡率/% mortality	半致死剂量 $/\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ LD_{50}
ZS201364-1	1.12×10^4	10	2	20	7.1×10^5
	1.12×10^5	10	4	40	
	1.12×10^6	10	5	50	
	1.12×10^7	10	6	60	
	1.12×10^8	10	10	100	
	1.12×10^9	10	10	100	
ZS201364-2	1.12×10^4	10	2	20	5.6×10^5
	1.12×10^5	10	3	30	
	1.12×10^6	10	6	60	
	1.12×10^7	10	7	70	
	1.12×10^8	10	10	100	
	1.12×10^9	10	10	100	

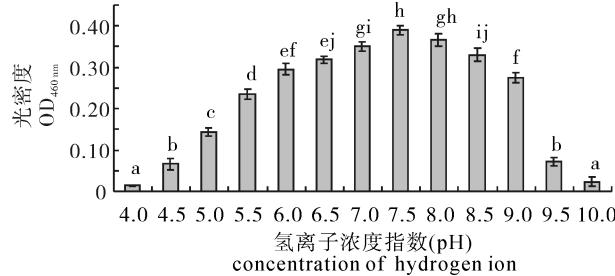


图3 pH对菌株ZS201364-1生长的影响

Fig. 3 Effect of pH on growth of strain ZS201364-1

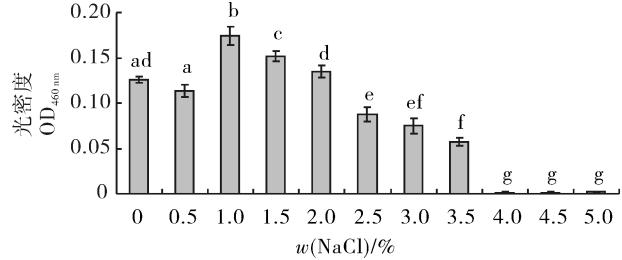


图4 氯化钠质量分数对菌株ZS201364-1生长的影响

Fig. 4 Effect of NaCl content on growth
of strain ZS201364-1

2.6 药敏试验

药敏试验结果显示, 菌株ZS201364-1对头孢噻肟、环丙沙星和诺氟沙星等抗生素高度敏感; 对链霉素、复方新诺明、林可霉素、强力霉素和利福平等低度敏感。

3 讨论

迟缓爱德华菌在分类上属于肠杆菌科、爱德华氏菌属, 是水产养殖中常见的一种致病菌。迟缓爱德华菌感染的宿主广泛, 自1962年首次报道了其对日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)的感染以来^[19], 目

前该菌已引起了多种鱼类如斑点叉尾 (*Ictalurus punctatus*)、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis nilotica*)、高体革 (*Scortum barcoo*)、黑鲷 (*Sparus macrocephalus*) 和漠斑牙鲆 (*Paralichthys lethostigma*) 等的病害^[20-25]。该菌还可感染两栖类动物如牛蛙 (*Rana catesbeiana*) 和大鲵 (*Andrias davidianus*)^[26-27]。除此之外, 还有该菌感染爬行类、鸟类、哺乳动物甚至人类的一些报道。笔者从患病杂交鳢分离到迟缓爱德华菌在国内外尚属首次, 表明对于迟缓爱德华菌, 杂交鳢是一种新发现的宿主。

表3 菌株 ZS201364-1 对 17 种抗生素药敏试验结果
Tab. 3 Sensibility of strain ZS201364-1 to 17 antibiotics

抗生素 antibiotic	每片含量/ μg content	抑菌圈直径/mm diameter of inhibition zone
阿米卡星 amikacin	30	22
卡那霉素 kanamycin	30	23
链霉素 phytomycin	10	10
复方新诺明 complex sinomin	23.75/1.25	6
庆大霉素 gentamicin	10	20
头孢唑啉 cephazoline	30	27
四环素 tetracycline	30	11
头孢拉定 cefradine	30	24
利福平 rifampicin	5	6
强力霉素 doxycycline	30	10
林可霉素 lincomycin	2	7
头孢噻肟 cefotaxime	30	41
左氟沙星 levofloxacin	5	31
诺氟沙星 norfloxacin	10	34
多粘菌素 Bpolymyxin B	300 units	12
新霉素 neomycin	30	25
环丙沙星 ciprofloxacin	5	36

该研究中根据分离菌的形态学特征、生理生化特性的检测结果,参考《常见细菌系统鉴定手册》^[18],鉴定2株致病菌均为迟缓爱德华菌。通过测定该菌株的16S rRNA基因序列并进行分析,显示该菌株与迟缓爱德华菌的同源性最高,达99%。经计算菌株ZS201364-1和ZS201364-2对杂交鳢LD₅₀依次为 $7.1 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $5.6 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 。根据鱼类致病菌划分标准^[28],2株致病菌对杂交鳢均具有很强的致病力。

关于迟缓爱德华菌的生长特性,WAKABAYASHI和EGUSA^[29]研究表明,该菌在培养基中NaCl质量分数为0~4%内能生长,pH 5.5~9能生长,LB肉汤中培养时15~42℃能生长。该研究中的菌株ZS201364-1的生长特性与上述报道的相比,耐盐性基本一致,但pH和温度的范围有所不同。同时,菌株ZS201364-1与ISHIHARA和KUSUDA^[30]报道的最适生长温度为30℃的结论一致,但与XIAO等^[31]报道的最适生长的NaCl质量分数为2%结论不同。这可能与菌株差异有关,也可能与不同菌株所处的咸淡水环境有关。

菌株ZS201364-1对17种抗生素的敏感性的结

果,可为在对由迟缓爱德华菌引起的杂交鳢感染症防治用药时提供参考。该研究的结果与薄清如等^[32]报道的鳗鲡源迟缓爱德华菌菌株、叶旭红等^[24]报道的高体革源迟缓爱德华菌菌株对链霉素的敏感性,以及邓显文等^[20]报道的罗非鱼源迟缓爱德华菌菌株对四环素的敏感性,均有很大的差异。这种差异可能是由菌株自身引起,也可能是养殖过程中药物的使用导致了某些菌株对某些药物产生抗性的结果。

参考文献:

- [1] 中国水产科学研究院珠江水产研究所,上海水产大学,华南师范大学,等.广东淡水鱼类志[M].广州:广东科技出版社,1990: 511~514.
- [2] 马建波,茅沈丽,卓孝磊,等.杂交鳢池塘高效养殖技术[J].水产养殖,2010(10): 33~35.
- [3] 杨小强.闽香鳢遗传生物学研究 I -子代和亲本形态比较[J].福建水产,2004, 10(2): 41~44.
- [4] 张诚,刘年峰,杨小强,等.闽香鳢及其亲本染色体组型的比较[J].上海海洋大学学报,2005, 14(2): 103~107.
- [5] 姚桂桂,刘新铁,谢楠,等.杂交鳢杭鳢1号胚胎发育过程的观察[J].江西农业学报,2010, 22(11): 133~135.

- [6] 王宇希, 冯晓宇, 李行先, 等. 杂交鳢和乌鳢池塘养殖对比试验[J]. 水产科学, 2009, 28(11): 683-686.
- [7] 卓孝磊, 梁日深, 陈言峰, 等. 杂交鳢(乌鳢♂×斑鳢♀)及其亲本血液指标的比较分析[J]. 淡水渔业, 2010, 40(3): 72-75.
- [8] 刘新铁, 王宇希, 谢楠, 等. 杂交鳢及其亲本肌肉营养成分分析[J]. 齐鲁渔业, 2010, 27(5): 24-26.
- [9] 陈昌福, 刘毅. 斑鳢细菌性败血症病原菌的分离与鉴定[J]. 中国兽医学报, 1998, 18(2): 144-146.
- [10] 曹铮, 沈锦玉, 谢荣林, 等. 乌鳢结节病病原——诺卡氏菌的分离与鉴定[J]. 水生生物学报, 2009, 33(2): 338-341.
- [11] TUNG M C, TASAI S S, HO L F, et al. An acute septicemic infection of *Pasteurella* organism in pond-cultured Formosa snakehead fish (*Channa maculata* Lacepède) in Taiwan [J]. Fish Pathol, 1985, 20(2/3): 143-148.
- [12] CHEN S C. Study on the pathogenicity of *Nocardia asteroides* to the Formosa snakehead, *Channa maculata*, and largemouth bass, *Micropterus salmoides* [J]. J Fish Dis, 1992, 15(1): 47-53.
- [13] CHEN Y F, LIANG R S, ZHUO X L, et al. Isolation and characterization of *Aeromonas schubertii* from diseased snakehead, *Channa maculata* (Lacepède) [J]. J Fish Dis, 2012, 35(6): 421-430.
- [14] LIU J Y, LI A H. First case of *Aeromonas schubertii* infection in the freshwater cultured snakehead fish, *Ophiocephalus argus* (Cantor), in China [J]. J Fish Dis, 2012, 35(5): 335-342.
- [15] CAO H, HOU S, HE S, et al. Identification of a *Bacteriovorax* sp. isolate as a potential biocontrol bacterium against snakehead fish-pathogenic *Aeromonas veronii* [J]. J Fish Dis, 2014, 37(3): 283-289.
- [16] 刘春, 李凯彬, 王庆, 等. 杂交鳢(斑鳢♀×乌鳢♂)内脏类结节病病原菌的分离、鉴定与特性分析[J]. 水产学报, 2012, 36(7): 1119-1125.
- [17] 李杰. 致病性迟缓爱德华菌的鉴定、PCR 检测及 *esaC* 基因的功能鉴定[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.
- [18] 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: 76-77.
- [19] HOSHINA T. On a new bacterium *Paracolobactrum anguillimortiferum* n. sp [J]. Bull Jpn Soc Sci Fish, 1962, 28: 162-164.
- [20] 邓显文, 谢芝勋, 刘加波, 等. 罗非鱼迟缓爱德华菌的分离与鉴定[J]. 水生态学杂志, 2009, 2(1): 114-117.
- [21] 邓显文, 谢芝勋, 刘加波, 等. 广西班牙点叉尾 爱德华菌的分离鉴定[J]. 广西农业科学, 2008, 39(2): 231-235.
- [22] 闫茂仓, 王雪鹏, 丁雷. 养殖黑鲷迟缓爱德华菌的分离鉴定[J]. 山东畜牧兽医, 2010, 31(4): 19-22.
- [23] 贺宝玲, 张玉芬, 何生美, 等. 漠斑牙鲆迟缓爱德华菌的分离与鉴定[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(12): 5529-5530.
- [24] 叶旭红, 林先贵, 王一明. 养殖澳洲宝石鱼迟缓爱德华菌的分离鉴定及致病基因的检测[J]. 淡水渔业, 2010, 40(1): 50-54.
- [25] 秦蕾, 王印庚, 张晓君. 迟钝爱德华菌感染大菱鲆的病理学研究[J]. 中国水产科学, 2009, 16(3): 411-419.
- [26] MAUEL M J, MILLER D L, FRAZIER K S, et al. Bacterial pathogens isolated from cultured bullfrogs (*Rana catesbeiana*) [J]. J Vet Diagn Invest, 2002, 14(5): 431-433.
- [27] 吴中明, 王欢, 敖弟书, 等. 大鲵的迟钝爱德华菌感染[J]. 遵义医学院学报, 2007, 30(4): 464-466.
- [28] SANTOS Y, TORANZO A E, BARJA J L, et al. Virulence properties and enterotoxin production of *Aeromonas* strains isolated from fish [J]. Infect Immun, 1989, 56(12): 3285-3293.
- [29] WAKABAYASHI H, EGUSA S. *Edwardsiella tarda* (*Paracolobactrum anguillimortiferum*) associated with pond-cultured eel disease [J]. Bull Jpn Soc Sci Fish, 1973, 39(9): 931-936.
- [30] ISHIHAZA S, KUSUDA R. Experimental infection of elvers and anguilletta with *Edwardsiella tarda* bacteria [J]. Bull Jpn Soc Sci Fish, 1981, 47(8): 999-1002.
- [31] XIAO J F, WANG Q Y, LIU Q, et al. Isolation and identification of fish pathogen *Edwardsiella tarda* from mariculture in China [J]. Aquac Res, 2009, 40(1): 13-17.
- [32] 薄清如, 黄新民, 郑帆, 等. 鳗鲡爱德华菌病的诊断和病原学研究[J]. 中国兽医学报, 1999, 19(3): 258-260.