

文章编号: 1004-7271(2004)01-0023-07

鳊致病性嗜水气单胞菌 GYK1 株 的鉴定、毒力及溶血性

潘厚军¹, 吴淑勤¹, 董传甫², 石存斌¹

叶美茜¹, 林天龙², 黄志斌¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380;
2. 福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福建 福州 350013)

摘要: 从患溃疡病的鳊肾脏中分离出一株病原细菌编号为 GYK1。此株病菌人工感染鳊、银鲫、剑尾鱼, 实验鱼出现出血、肌肉坏死或溃疡症状; 腹腔注射攻毒, 对鳊、银鲫、剑尾鱼、小鼠的半致死剂量(LD₅₀)分别为 8.33×10^4 、 1.06×10^5 、 1.26×10^5 、 1.05×10^6 CFU/g。菌培养液上清能溶解鳊、加洲鲈、银鲫、小鼠、兔、绵羊、人 O 型血等的红细胞, 在绵羊血平板上为 β -溶血, 不同代次和保存条件的细菌溶血性稳定。细菌在电镜下的形态、生化特性和 ID32E 系统自动鉴定的结果均符合嗜水气单胞菌的特征。PCR 扩增检测到嗜水气单胞菌特异性的毒力基因——气溶素基因(aerA)209bp 片段, 进一步说明此株病原细菌为含有毒力基因的嗜水气单胞菌。实验结果表明, GYK1 是一株毒力和溶血性均较强的嗜水气单胞菌。

关键词: 鳊 嗜水气单胞菌 鉴定 毒力 溶血性

中图分类号: S917.1 文献标识码: A

Identification, virulence, hemolytic activity of GYK1, a strain of pathogenic *Aeromonas hydrophila* isolated from mandarinfish

PAN Hou-jun¹, WU Shu-qin¹, DONG Chuan-fu², SHI Cun-bin¹

YE Mei-xi¹, LIN Tian-long², HUANG Zhi-bin¹

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, CAFS, Guangzhou 510380, China;
2. Animal Husbandry and Veterinary Medicine Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China)

Abstract: A pathogenic bacterial strain named GYK1 was isolated from the kidney of mandarinfish (*Siniperca chuatsi* Basilewsky) suffering from epizootic ulcerative syndrome. The virulent tests were carried out by using the pure culture of the bacteria artificially infected *Siniperca chuatsi*, *Carassius gibelio*, *Xiphophorus helleri* and mouse. The experimental fish died of hemorrhage, necrosis or ulcer in the muscles. The LD₅₀ of the bacteria infecting the three species of experimental fish and the mouse via intraperitoneal injection was 8.33×10^4 , 1.06×10^5 , 1.26×10^5 and 1.05×10^6 CFU/g respectively. The supernatant of the culture could lyse erythrocytes not only from mandarinfish but also from large-mouth bass, silver crucian carp, mouse, rabbit, sheep, and the O-serotype

收稿日期: 2003-09-28

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2001BA505B0301)和广东省科技计划项目(B205)

作者简介: 潘厚军(1968-),女,湖南宁乡人,副研究员,在职硕士,从事水产动物病害研究。Tel: 020-81617592, E-mail: phj001@163.net

通讯作者: 吴淑勤(1956-),女, Tel: 020-81616813, E-mail: sqwxm@163.net

human. The bacteria had β -hemolytic activity in 5% sheep blood agar. And the hemolytic activity was stabilized in different generations or conserved conditions. The isolate was defined as *A. hydrophila* based on the morphology in TEM, biochemical characteristics and the automatic ATB Expression. The specific 209bp fraction in the aerolysin gene of *A. hydrophila* was amplified by the polymerase chain reaction. It proved that the isolate was *A. hydrophila* with the aerolysin gene whose product having both hemolytic and cytolytic properties. The tests showed GYK1 was a strain of *A. hydrophila* with strong virulence and hemolytic activity.

Key words :*Siniperca chuatsi* ; *Aeromonas hydrophila* ; identification ; virulence ; hemolytic activity

鳊 (*Siniperca chuatsi*) 又名桂花鱼, 其肉嫩味美, 是我国特别是广东省发展较快的名优养殖品种之一。但病毒性暴发性传染病^[1 2]和细菌性疾病经常困扰着鳊的健康养殖。在细菌性疾病方面, 由柱状嗜纤维菌 (*Cytophaga columnaris*) 引起的细菌性烂鳃病^[3 4]和由嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*, 简为 *Ah*) 引起的细菌性败血症^[5]均很严重。黄志坚等^[6]从病鳊分离到温和气单胞菌 (*Aeromonas sobria*)、少动假单胞菌 (*Pseudomonas paucimobilis*) 等 6 种细菌。据我们的研究, 嗜水气单胞菌是广东省养殖鳊的主要病原细菌, 除引起鳊发生以鳍基、肌肉出血为特征的细菌性败血症外, 在一定条件下也使鳊发生溃疡病, 造成较大的死亡。针对鳊嗜水气单胞菌病的危害, 我们分析了从病鳊分离的一株嗜水气单胞菌菌株——GYK1 株的毒力和溶血性, 并利用 PCR 方法检测其是否具有嗜水气单胞菌特异性的毒力基因——气溶素基因, 下面报告其结果。

1 材料与方 法

1.1 菌 株

GYK1 株, 2001 年 3 月从惠州博罗养殖的患流行性溃疡综合症的鳊肾脏中分离, 此病鳊体重约 500 ~ 600g, 其体侧溃疡、烂成一个圆形的洞, 洞周边红肿, 且病鳊伴有头部、鳍基轻微出血症状 (图 1)。据塘主反映, 此塘死亡的大部分鳊出现此症状, 死亡率为 60% 以上。菌株经纯化培养、以脱脂牛奶 (加 5% 的蔗糖) 为保护剂, 冻干保存备用。

对照菌株共 9 株, 其来源见表 1。

1.2 培养基

营养琼脂和营养肉汤: 上海生物制品研究所出品。

5% 绵羊血琼脂平板: 广东环凯微生物科技有限公司出品。

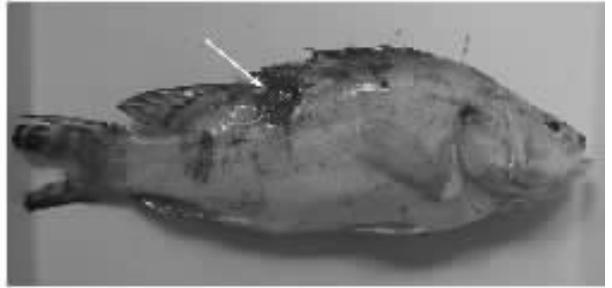


图 1 患溃疡病的鳊 (箭头示溃疡), GYK1 菌株从此病鱼的肾脏分离

Fig.1 The mandarin fish with epizootic ulcerative syndrome, (the arrow shows the ulcer), from whose kidney the GYK1 strain was isolated

表 1 实验对照菌株来源、种类及所分离的鱼品种 (或出处)

Tab.1 The origins, species and the providers of the test contrast bacteria strains

种类	菌株编号	分离鱼种或出处	来 源
嗜水气单胞菌	G010926	鳊	珠江水产研究所
	Gui7	鳊	珠江水产研究所
	SX1	银鲫	珠江水产研究所
	B7	鲮鱼	珠江水产研究所
	TPS-30	鲢	浙江省淡水水产研究所
	L316	欧鳊	福建
	Ah10501	不明	北京陆桥公司
	ATCC7966	牛奶	ATCC
	温和气单胞菌	CR-79-1-1	草鱼

1.3 实验动物

鳎:体长 8.2~9.6cm,体重 9.0 ± 1.2 g,购自广东江门市蓬江区荷塘镇荷塘鱼苗场;银鲫:体长 8.0~9.8cm,体重 9.2 ± 1.4 g,购自珠江水产研究所良种基地;剑尾鱼:体长 5.8~6.6cm,体重 3.4 ± 0.3 g,购自广东广州市芳村区西朗专业户。所有试验鱼在室内饲养,适应观察 14d,经镜检无寄生虫、内脏分离无细菌等病原,食欲、活动正常,确认健康后用于实验。小鼠:体重 20 ± 1.0 g,购自广东省医学实验动物中心,实验室内适用 7d,经观察,摄食、活动正常后用于实验。

1.4 菌体形态的透射电镜观察

细菌在营养肉汤培养基中培养 16h,直接吸取菌液滴于铜网,醋酸双氧铀染色,在 JEM100CX-II 型透射电镜下观察。

1.5 细菌生化鉴定

采用二种方法。一种是进行细菌的常规生化鉴定,鉴定结果参照《伯杰氏鉴定细菌学手册》^[7] 第九版判断细菌的种类。另一种是应用细菌鉴定仪,将细菌按操作规程在 ID₃₂E 试剂条上加样、培养,ATB Expression 自动鉴定仪上读取细菌鉴定结果。

1.6 动物感染试验

1.6.1 腹腔、肌肉注射和棉签涂菌感染症状观察

细菌在营养琼脂上 28℃ 培养 24h,用无菌生理盐水配成 $3 \times 10^6 \sim 3 \times 10^8$ CFU/mL 浓度梯度的菌悬液。腹腔或肌肉注射实验鱼,注射剂量:鳎、银鲫每尾约 0.1mL,剑尾鱼每尾 0.03~0.05mL。腹腔注射小鼠,剂量每只约 0.3mL。另取实验鱼剥掉 2~3 片鳞片,棉签蘸取菌苔少许,轻涂于剥鳞处。设注射生理盐水及剥鳞不涂菌的对照组。观察实验鱼症状。从濒死显症的实验动物肝脏、肾脏等部位再次分离细菌,进行生化鉴定。鱼感染实验在 20~22℃ 和 26~28℃ 两种水温下进行。

1.6.2 腹腔注射半致死剂量(LD₅₀)测定

如 1.6.1 制备菌悬液,腹腔注射攻毒实验鱼的菌液浓度为 $3 \times 10^6 \sim 3 \times 10^7$ CFU/mL,攻毒小鼠的菌液浓度为 $3 \times 10^7 \sim 3 \times 10^8$ CFU/mL,各设立 5~7 个浓度梯度组,攻毒剂量同 1.6.1,每浓度梯度组注射实验动物 10 只。并设立平行实验组和对照组。连续观察 168h,记录感染动物的症状和死亡情况,根据 Reed 和 Müench^[8] 的方法求出半致死剂量(LD₅₀,单位:CFU),按实验动物的体重换算成 CFU/g 的剂量。实验水温为 26~28℃。

1.7 溶血性测定

1.7.1 在 5% 绵羊血琼脂平板上的溶血情况

用接种针蘸取不同方法保存、不同代次的 GYK1 菌少许,穿刺接种在绵羊血琼脂平板上,28℃ 培养 48h,4℃ 放置 24h,观察并测量溶血斑直径。

1.7.2 对鳎等溶血价的测定

参考陈怀青等^[10]的方法。测定菌液上清对鳎、鲈、银鲫、小鼠、兔、绵羊、人 O 型血等红细胞的溶血价。以 50% 红细胞溶解的最高稀释度为溶血价。

1.8 气溶素基因的 PCR 检测

参照 Pollard 等^[11]的报道进行,直接以纯培养的细菌为模板进行 PCR 扩增。引物为 5'-CCAAGGGTCTGTGGCGACA-3' 和 5'-TTTCACCGGTAACAGGATTG-3' (由上海生工生物工程技术有限公司合成)。

2 结果

2.1 GYK1 菌株的鉴定

2.1.1 菌落及菌体形态

普通营养琼脂 28℃ 培养 24h, 菌落为圆形, 直径 0.8 ~ 1.2mm, 表面光滑, 半透明, 淡黄色, 中央隆起。

透射电镜观察菌体杆状、稍弯曲, 两端钝圆, 端生鞭毛、菌毛丛生(图 2), 菌体长 2.8 μ m, 直径 1.0 μ m。

2.1.2 生化特性

GYK1 菌株在 22 ~ 35℃ 生长良好, 40℃ 能生长, 6℃ 不生长。在 0 ~ 3.0% NaCl 胨水中生长良好, 6.0% 的 NaCl 胨水中不生长。革兰氏染色阴性, 发酵葡萄糖产酸产气, 氧化酶阳性。菌株的生化特性与嗜水气单胞菌的比较详见表 2。结果符合嗜水气单胞菌的特性。

表 2 GYK1 菌株与嗜水气单胞菌的生化特性比较

Tab.2 Comparison of biochemical characteristics between GYK1 strain and the typical *Aeromonas hydrophila*

测定项目	GYK1 菌	嗜水气单胞菌	测定项目	GYK1 菌	嗜水气单胞菌
氧化酶试验	+	+	V-P 试验	+	+
葡萄糖产酸	+	+	蔗糖	+	+
葡萄糖产气	+	+	L-阿拉伯糖	+	+
运动性	+	+	D-阿拉伯糖醇	-	-
赖氨酸脱羧酶	+	d	纤维二糖	-	-
精氨酸双水解酶	+	+	肌醇	-	-
鸟氨酸脱羧酶	-	-	麦芽糖	+	+
明胶水解	+	+	山梨醇	-	-
脲酶实验	-	-	半乳糖	+	+
吲哚产生	+	+	蜜二糖	-	-
丙二酸利用	-	-	甘露醇	+	+
七叶灵水解	+	+	鼠李糖	-	-
脂肪酶	+	d	海藻糖	+	+
西蒙氏柠檬酸盐	+	d	水杨苷	+	+
ONPG	+	+	乳糖	+	d
对 O-129 敏感 (150 μ g/片)	-	-			

注: + "为阳性反应; - "为阴性反应; d "为菌株间具差异。

接种 GYK1 单菌落在 ID₃₂E 试剂条上, ATB 细菌自动鉴定仪上读取的生化谱 20275701240, 鉴定结果为嗜水气单胞菌(非常好鉴定结果, % id = 99.6/T = 0.75)。

2.2 GYK1 菌株的毒力

2.2.1 人工感染实验动物的症状

人工感染实验表明, GYK1 菌感染鳊、银鲫、剑尾鱼, 实验鱼出现出血(图 3)或溃疡(图 4)症状。通过腹腔注射途径人工感染, 均表现急性出血症状。通过棉签涂菌途径感染, 水温较低(20 ~ 22℃)时涂菌处可形成溃疡, 水温高时(26 ~ 28℃)多为急性出血性死亡。肌肉注射, 感染水温在 26 ~ 28℃ 时主要表现为出血症状, 当感染水温在 20 ~ 22℃, 且感染菌浓度

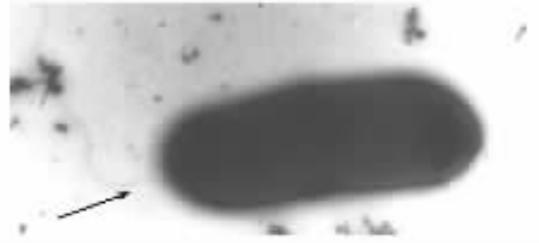


图 2 GYK1 菌株的透射电镜照片($\times 14000$) 箭头示鞭毛
Fig.2 Transmission electron micrograph of GYK1 strain ($\times 14000$) flagellum (arrow)



图 3 鳊肌肉注射感染 GYK1, 示急性出血性死亡(下), 上为对照鳊(注射生理盐水)

Fig.3 Mandarinfish infected GYK1 by intramuscular inoculation. The infected fish died with muscular hemorrhage (the lower). The upper shows the contrast fish

较低时($3.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7$ CFU/mL)部分实验鱼出现肌肉坏死、溃疡等症状,而浓度较高时($1.0 \times 10^7 \sim 3.0 \times 10^8$ CFU/mL),主要出现出血症状。鳊比其他实验鱼敏感,死亡多呈急性,部分攻毒鳊注射处红肿,肌肉出血(图3)。

GYK1 菌以 $1.0 \times 10^8 \sim 3.0 \times 10^8$ CFU/mL 的浓度腹腔注射小鼠,小鼠活动减弱、呼吸困难,16h 后出现死亡,解剖死亡的小鼠,肠道充血、积水肿胀。

从人工感染的动物再次分离的菌为嗜水气单胞菌,生化特性与原代 GYK1 株相同。

2.2.2 对鳊、银鲫、剑尾鱼和小白鼠的 LD_{50}

GYK1 株对鳊、银鲫、剑尾鱼和小鼠的半致死剂量(LD_{50})结果见表3。表3结果说明,以鱼体重计算的半致死剂量 LD_{50} (CFU/g) 鳊 < 银鲫 < 剑尾鱼 < 小鼠,说明此菌对鳊的毒力最强,对小鼠的毒力最弱。

表3 GYK1 菌腹腔注射攻毒鳊、银鲫、剑尾鱼的半致死剂量(LD_{50}) (水温 $26 \sim 28^\circ\text{C}$)

Tab.3 The LD_{50} of GYK1 strain infecting mandarin fish, silver crucian carp, swordtail fish and mouse by intraperitoneal inoculation (water temperature: $26 \sim 28^\circ\text{C}$)

半致死剂量	鳊	银鲫	剑尾鱼	小鼠
CFU	7.5×10^5	9.8×10^5	4.3×10^5	2.1×10^7
CFU/g	8.33×10^4	1.06×10^5	1.26×10^5	1.05×10^6

2.3 GYK1 菌株的溶血性

2.3.1 在 5% 绵羊血琼脂平板上的溶血情况

不同代次、不同保存方法的 GYK1 菌在 5% 绵羊血琼脂平板上的溶血情况见图5。标号“5、6、7、8”示对照嗜水气单胞菌菌株的溶血情况。各标号的溶血斑直径见表4。

图5和表4的结果表明, GYK1 在绵羊血琼脂平板上为 β -溶血,溶血斑直径比嗜水气单胞菌 G010926、Gui7、B7 等3株大,但比嗜水气单胞菌 SX1 株略小,不同代次和保存方法保存的细菌溶血性稳定。实验结果说明 GYK1 株在绵羊血琼脂平板上有较好的溶血性。

2.3.2 对动物细胞的溶血价

GYK1 菌液上清对鳊等动物细胞的溶血价测定结果见表5。结果表明, GYK1 菌株能溶解鳊、加洲鲈、银鲫、小鼠、兔、绵羊、人 O 型血的红细胞,其对鳊的溶血价为 2^6 , 大于加洲鲈而小于银鲫,相当于对绵羊等哺乳动物细胞的溶血价。

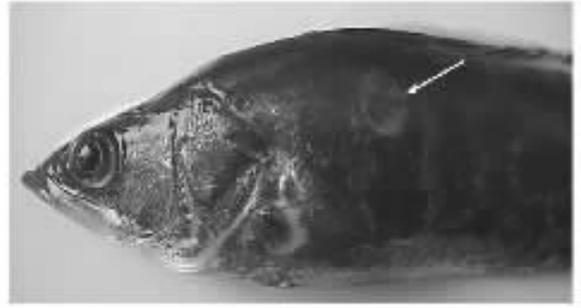


图4 GYK1 棉签涂菌感染鳊,示形成的溃疡($20 \sim 22^\circ\text{C}$)

Fig.4 Mandarinfish infected GYK1 by smearing inoculation, ulcer appeared (the arrow)

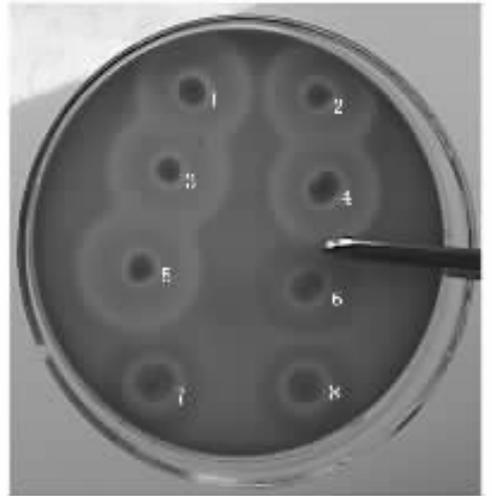


图5 不同代次及保存方法的 GYK1 菌株在 5% 绵羊血琼脂平板上的溶血图谱

Fig.1 The hemolytic activity of different generations or conserved methods of GYK1 on 5% sheep blood agar
1. GYK1 株 F3 (无菌水斜面保种); 2. GYK1 株 F3 (石蜡油斜面保种); 3. GYK1 株 F3 (无菌水斜面保种); 4. GYK1 株 F1 (冻干保种); 5. SX1 株 F1 (冻干保种); 6. B7 株 F1 (冻干保种); 7. G010926 株 F1 (冻干保种); 8. Gui7 株 F1 (冻干保种)

表 4 不同保存方法及代次的 GYK1 菌株及对照 Ah 菌株的溶血斑直径 (mm)

Tab.4 The hemolytic diameter of GYK1 of different generations or conserved methods and the contrast *Aeromonas hydrophila* strains on 5% sheep blood agar

菌 株 标号	GYK1 菌				对照嗜水气单胞菌菌株			
	1	2	3	4	5	6	7	8
溶血圈直径 (mm)	27.0	27.5	28.0	26.8	30.0	20.0	21.2	19.2

注 标号“1~8”所示同图 5。

表 5 GYK1 株对鳊等动物细胞的溶血价

Tab.5 The hemolytic titer of GYK1 to erythrocytes from animals such as mandarinfish

红细胞来源	鳊	加洲鲈	银鲫	小鼠	兔	绵羊	人 O 型
溶血价	2 ⁶	2 ⁵	2 ⁷	2 ⁷	2 ⁶	2 ⁶	2 ⁶

2.4 气溶素基因(aerA)的 PCR 检测

以特异引物进行 PCR 扩增 GYK1 株及 4 株嗜水气单胞菌阳性对照株 (TPS-30, L316, Ah10501, ATCC7966) 和 1 株阴性对照株 (温和气单胞菌 CR-79-1-1) 的结果见图 6。图 6 结果表明, GYK1 及 4 株阳性对照的嗜水气单胞菌扩增出特异的 209bp 的片段, 而阴性对照的温和气单胞菌 CR-79-1-1 株无此片段。说明 GYK1 株具有气溶素基因。

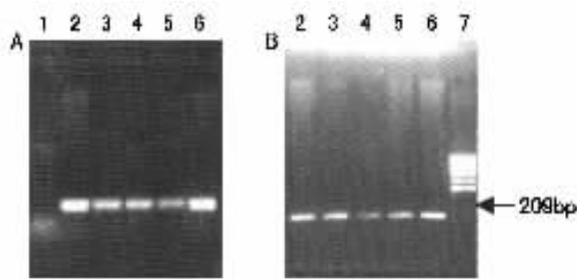


图 6 PCR 检测嗜水气单胞菌气溶素基因

Fig.6 Detection of the aerolysin gene of *A. hydrophila* using PCR

1. CR-79-1-1 ; 2. TPS-30 ; 3. L316 ; 4. GYK1 ;
5. Ah10501 ; 6. ATCC7966 ; 7. marker

3 讨论

3.1 GYK1 菌株的鉴定

从患流行性溃疡综合症的鳊肾脏中分离的 GYK1 菌株, 电子显微镜下的形态、生长和生化特性均符合《伯杰氏鉴定细菌学手册》(第九版) 中嗜水气单胞菌 (*Ah*) 的特征; 利用 ID₃₂E 系统在 ATB Expression 自动鉴定仪读取 GYK1 菌株的鉴定结果为 *Ah*; PCR 扩增检测证实, GYK1 菌株具有 *Ah* 特异性的毒力基因—气溶素基因 (*aerA*) 片段。鉴定结果表明 GYK1 菌株是具有气溶素基因的嗜水气单胞菌。

3.2 嗜水气单胞菌 GYK1 株的毒力和溶血性

流行性溃疡综合症以表皮和肌肉出现严重的坏死病灶为特征, 在亚洲和太平洋地区淡水鱼中的发病率和死亡率都较高^[11]。许多研究者认为, 嗜水气单胞菌是坏死病灶的主要病原。一方面, 研究者从患溃疡病病鱼中分离到此类细菌, 如 Llobrera 和 Gacutar^[12] 和 Anonymous^[11] 发现能经常从患溃疡病的病鱼的病灶和内脏中分离到 *Ah*; 邓国成等^[13] 从患溃疡病的加洲鲈中分离到嗜水气单胞菌和温和气单胞菌。另一方面, *Ah* 具有菌毛等附着因子和某些外膜蛋白黏附因子, 能产生溶血素、细胞毒性毒素、溶蛋白酶等多种毒力因子^[14, 15]。在一定环境条件下, *Ah* 破坏宿主的表皮、真皮细胞, 形成坏死病灶, 引发溃疡病^[11, 12]。GYK1 菌株是春季从患溃疡病的鳊肾脏中分离, 人工感染实验鱼表现出出血和溃疡两种症状。说明 GYK1 菌株在鱼体内具有溶血性和细胞毒性, 在一定条件下引起鱼类出血或发生溃疡病死亡。

GYK1 菌株在体外培养也表现出较好的溶血性, 在绵羊血琼脂上为 β -溶血, 溶血性比较稳定。其培养液上清除能溶解鳊、加洲鲈、银鲫等鱼类的红细胞外, 对小鼠、兔、人 O 型血等多种哺乳动物的红细胞有较高的溶血价, 对哺乳动物的溶血价与鳊较接近, 因而在进行溶血性测定时, 可以用绵羊、兔等哺乳动物的红细胞代替。

细菌气溶素是由某些嗜水气单胞菌产生的、具有 β -溶血性和细胞毒性双重活性的胞外产物^[10]。Pollard 等根据 *Ah* 气溶素基因的开放阅读框序列设计了一对引物, 对具有气溶素的 *Ah* 可扩增出 209bp

核苷酸的特异片段,而即使具有溶血性和细胞毒性的温和气单胞菌或不产生 β -溶血素的 *Ah* 均无此条带,该方法特异性强^[10]。夏春等^[16]、林天龙等^[17]都进行过类似研究。本实验应用 Pollard 等设计的引物,PCR 扩增检测到 GYK1 菌株具有气溶素基因,在分子水平上证明此菌是能产生气溶素的嗜水气单胞菌,具有产生溶血性和细胞毒性的遗传基础。

Ah 是自然界特别是水体中广泛存在的细菌,主要感染多种淡水鱼类,不同的菌株毒力有强有弱。Mittal 等^[18]对 *Ah* 进行了毒力程度的划定:LD₅₀ 在 10⁴ ~ 10⁵ CFU 为强毒力、10⁶ ~ 10⁷ CFU 为弱毒力、大于 10⁸ CFU 为无毒力。Ysabel 等^[19]测定了从鱼和水体中分离的 39 株 *Ah* 菌株对虹鳟的 LD₅₀,根据 Mittal 等^[18]的划定,19 株为强毒力,9 株为弱毒力,11 株无毒力。本实验 GYK1 菌株对鳃等鱼类的 LD₅₀ 结果表明,GYK1 属于强毒力的 *Ah* 菌株。而且,对照凌红丽等^[20]用嗜水气单胞菌攻毒小鼠的实验结果,GYK1 菌株对小鼠的毒力也较强。

参考文献:

- [1] 吴淑勤,李新辉,潘厚军,等. 鳃暴发性传染病病原研究 [J]. 水产学报, 1997, 21(增刊) 56 - 60.
- [2] He J G, Wang S P, Zeng K, et al. Systemic disease caused by an iridovirus-like agent in cultured mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky), in China [J]. J Fish Dis, 2000, 23 : 219 - 222.
- [3] 陈昌福,史维舟,赵桂珍,等. 翘嘴鳊烂鳃病原菌的分离及初步鉴定 [J]. 华中农业大学学报, 1995, 14(3) 263 - 266.
- [4] 黄文方,李海燕,张剑英. 翘嘴鳊烂鳃病原菌的研究 [J]. 微生物通报, 1999, 26(4) 246 - 250.
- [5] 陈昌福,李 静. 翘嘴鳊细菌性败血症病原菌的分离及其致病力的研究 [J]. 华中农业大学学报, 1996, 15(4) 370 - 373.
- [6] 黄志坚,何建国,翁少萍,等. 鳊鱼细菌性病原的分离鉴定及致病性初步研究 [J]. 微生物通报, 1999, 26(4) 241 - 246.
- [7] John G H, Noel R K, Peter H A, et al. Bergy 's manual of determinative bacteriology (9th ed.) [M]. London : Williams & Wilkins Press, 1994. 190 - 191, 253 - 259.
- [8] Reed L J, Muench H. A simple method of estimating fifty percent end points [J]. Am J Hyg, 1938, 27 : 493 - 497.
- [9] 陈怀青,陆承平,赵 肖. 培养条件对嗜水气单胞菌 HEC 毒素产量的影响 [J]. 南京农业大学学报, 1993, 16(增刊) 85 - 87.
- [10] Pollard D R, Johnson W M, Lior H, et al. Detection of the aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* by the polymerase chain reactor [J]. J Clin Microbiol, 1990, 28(11) 2477 - 2481.
- [11] Anonymous. Report of the expert consultation on ulcerative fish diseases in the Asia-Pacific Region [C]. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1986, TCP/RAS/4508. Bangkok.
- [12] Llobera A T, Gacutan R Q. *Aeromonas hydrophila* associated with ulcerative disease epizootic in Laguna de Bay, Philippines [J]. Aquaculture, 1987, 67 : 273 - 278.
- [13] 邓国成,姜 兰,许淑英,等. 加洲鲈鱼溃疡病致病菌的研究 [A]. 淡水名特优水产品养殖技术研讨会论文集 [C], 1995, 19 - 25.
- [14] Cahill M M. Virulence factors in mobile *Aeromonas species* [J]. Journal of Applied Bacteriology, 1990, 69 : 1 - 16.
- [15] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述 [J]. 水产学报, 1992, 16(3) 282 - 288.
- [16] 夏 春,马志宏,陈慧英,等. 聚合酶链反应(PCR)法检测产 β -溶血素嗜水气单胞菌 [J]. 水生生物学报, 1999, 23(3) 288 - 289.
- [17] 林天龙,陈日升,董传甫,等. 欧鳊嗜水气单胞菌的分离鉴定和特性分析 [J]. 福建农业学报, 1994, 10(4) 35 - 40.
- [18] Mittal K R, Lalonde G, Leblanc D, et al. *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout : relation between virulence and surface characteristics [J]. Can J Microbiol, 1980, 26 : 1501 - 1503.
- [19] Ysabel S, Alicia E T, Juan L B, et al. Virulence properties and enterotoxin production of *Aeromonas strains* isolated from fish [J]. Infect Immun, 1988, 56(12) 3285 - 3293.
- [20] 凌红丽,陆承平,陈怀青,等. 6 株嗜水气单胞菌的毒力因子及其对小鼠的致死性 [J]. 中国兽医学报, 1999, 19(3) 255 - 257.