

养殖大菱鲆黑瘦症的病原菌鉴定及杀菌中草药筛选

王印庚^{1*} 任海^{1,2} 张正¹ 王岚¹ 荣小军¹ 廖梅杰¹ 陈霞³

(¹农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(²上海海洋大学, 201306)

(³青岛九洋红水产科技有限公司, 266071)

摘要 从患黑瘦症的大菱鲆幼体内分离得到一株优势菌株, 人工感染实验证实其为大菱鲆致病菌, 并经过生理生化及 16S rDNA 序列分析鉴定为灿烂弧菌 *Vibrio splendidus*。组织病理学显示, 病鱼的肝脏、肾脏、脾脏、肠道及脑均呈现不同程度的组织破坏。用煎煮法提取 11 种常用中草药成分, 测定该致病菌对中草药的杀菌效果。实验表明, 五倍子和白头翁的杀菌效果最好, 黄柏、穿心莲次之, 当归、党参、杜仲、秦皮、金银花、乳香和没药的杀菌效果最差。以五倍子、白头翁为主要成分的初步治疗试验证明, 药浴和口服给药可有效治愈大菱鲆苗期的黑瘦症。

关键词 大菱鲆 黑瘦症 病原菌 中草药 最小抑菌浓度(MIC) 最小杀菌浓度(MBC)
中图分类号 S965.335 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2012)04-0057-07

Causative pathogen of dark-thin syndrome in cultured *Scophthalmus maximus* and Chinese herbal medicine screening for the bactericidal effect

WANG Yin-geng^{1*} REN Hai^{1,2} ZHANG Zheng¹
WANG Lan¹ RONG Xiao-jun¹ LIAO Mei-jie¹ CHEN Xia³

(¹Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture,
Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology,

Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(²Shanghai Ocean University, 201306)

(³Qingdao Sunny Oceans Aquaculture Technology Ltd Co., 266071)

ABSTRACT Dark-thin syndrome often occurred at stages of larval turbot *Scophthalmus maximus*, causing lower metamorphosis and more than 80% of mortality. One bacterial strain was isolated from the diseased larvae, and it was confirmed to be the pathogen causing the disease through artificial infection tests. The pathogenic bacterium was identified as *Vibrio splendidus* by conventional physiological and biochemical tests as well as 16S rDNA sequence analysis. In addition, histopathological studies demonstrated that the bacterium could cause infectious changes in the liver, kidney, spleen, intestine and brain. The effective components of 11

国家科技支撑计划项目(2012BAD07B03)资助

* 通讯作者。

收稿日期:2010-03-30;接受日期:2012-05-03

作者简介:王印庚(1963-),男,研究员,主要从事水产健康养殖与病害防控技术研究。E-mail:wangyg@ysfri.ac.cn, Tel:(0532)85841732

Chinese herbs were extracted respectively by the method of decoction, and they were tested for the susceptibility against *V. splendidus*. The results showed that *Galla chinensis* and *Radix pulsatillae* had the best inhibitory effect on the bacterium, with minimal bactericidal concentration (MBC) of 25mg/ml. MBC for both *Phellodendron chinense* and *Herba andrographitis* was 50mg/ml. While *Chinese angelica*, *Radix codonopsis*, *Eucommia bark*, *Codex fraxini*, *Flos lnicerae*, *Boswellia carterii* and *Commiphora molmol* had the weakest inhibition effect with MBC more than 100mg/ml. The preliminary tests indicated that *G. chinensis* and *R. pulsatillae* were good treatments by oral and immersion administration.

KEY WORDS Turbot *Scophthalmus maximus* Dark-thin syndrome Pathogen
Chinese herbs Minimal inhibitory concentration(MIC)
Minimal bactericidal concentration (MBC)

大菱鲆 *Scophthalmus maximus* 属于鲽形目、鲆科、菱鲆属,原产于大西洋东北部、欧洲沿海的一种底栖海水名贵鱼类。自 1992 年引入我国,大菱鲆养殖产业迅猛发展,现已成为我国北方地区海水鱼类工厂化养殖的代表品种。但随着养殖规模的急剧扩大,病害问题已经成为制约产业发展的主要瓶颈之一(王印庚等 2004)。其中,育苗期的黑瘦症具有发病快、死亡率高等特点,成为影响育苗期成活率的主要因素之一。其典型症状为病鱼苗体色发黑,鱼体瘦弱,与正常鱼苗相比,头部大、躯干小、呈畸形,患黑瘦病的大菱鲆苗变态率很低。由于缺乏专用药物防治,养殖者往往盲目使用各种抗生素来控制病情,但收效甚微;同时也可能影响成鱼的安全问题。

在常见疾病的药物治疗中,中草药不仅具有毒副作用小、无药物残留以及性能多样化等优点,还具有提高水产动物生产性能、饲料利用率、促进生长和提高非特异性免疫力等功效(童圣英等 1998)。在水产养殖过程中,特别是在淡水养殖中,中草药使用广泛,对细菌性、病毒性、寄生性疾病都有相应的配方并具有良好的效果(曹俊辉等 2008)。因此,应用中草药防治鱼病越来越受到人们的关注。

本研究从患黑瘦症大菱鲆鱼苗分离到一株优势菌,对其进行综合鉴定,经过回接感染实验,证实为该病症的致病菌;对患病大菱鲆苗进行了病原学及组织病理学研究;运用二倍稀释法测定了包括五倍子在外的 11 种中草药对该致病菌的体外抑菌作用,旨在为该病的中草药防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

2008 年 5 月 12 日,患病大菱鲆苗取自山东荣成某大菱鲆育苗场,为孵化 16d 的鱼苗。感染实验用的健康鱼苗由青岛某良种鱼繁育中心提供,为孵化 17d 的鱼苗。五倍子、白头翁、黄柏、穿心莲、当归、党参、杜仲、秦皮、金银花、乳香和没药 11 种中草药购自青岛同仁堂药店。

1.1.2 主要试剂和仪器

TSA(胰蛋白胨大豆肉汤固体培养基)购自北京陆桥生物技术有限公司,法国生物梅里埃 ATB expression 细菌鉴定仪,日本 Nikon E800 显微镜。

1.2 病原菌的分离培养和生理生化鉴定

1.2.1 病原菌的分离培养

取典型自然发病的濒死大菱鲆,用 70%酒精棉球对病苗体表消毒,再用无菌生理盐水冲洗,将鱼体剪碎后划线接种于 TSA 培养基平板上,28℃下恒温培养 24h 后挑取形态特征一致的优势单菌落于 TBA 固体培养基

上重复培养3次,置于4℃冰箱斜面保存。

1.2.2 形态观察及生理生化特性测定

分别将优势菌接种于 TSA 平板培养基上,28℃恒温培养 20h 后取单菌落进行革兰氏染色;用 API 32E 生化反应试剂条测定其主要生理生化特征,初步确定细菌种类。

1.3 人工感染实验

将分离得到的优势菌株 28℃ TSB 平板划线培养 24h,挑取单个菌落于 1.5% 的灭菌盐水中,振荡混匀制成菌悬液,采用平板计数法计算菌液浓度。

实验养殖用水为过滤自然海水,用加热棒加热使水温保持在 18 ± 1 ℃。实验期间连续充气,每天换水 1 次,每次换水量为整个水体的 1/3。实验用鱼为孵化 17d 的健康鱼苗。暂养 7d 后,采用浸浴感染,实验分为对照组和实验组,共用鱼 40 尾,在 46 cm×36 cm×31 cm 大小的塑料整理箱中进行,每个整理箱水体为 18L,浸浴菌液浓度为 2×10^3 CFU/ml,连续菌浴 2 h 后换水,对照组鱼苗正常饲养,每天投饵 1 次。人工感染后连续观察 7d,记录分析。

1.4 组织病理分析

取典型自然发病的鱼苗在 Davidson's 固定液中固定 24 h 后,于 70% 的酒精中保存。组织经酒精梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后切片,切片厚度约 6 μm,苏木精-伊红染色后,用中性树胶封片,在 Nikon E800 显微镜下观察、照相。

1.5 病原菌的分子鉴定

1.5.1 细菌 DNA 的提取

将细菌接种于 TSB 平板培养基上,28℃培养过夜。取单一菌落悬浮于 50 μl 的无菌去离子水中,于 100℃水浴 10 min,冷却后 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液作为 PCR 反应模板。

1.5.2 16S rDNA 基因的 PCR 扩增

引物为 16S rDNA 序列扩增的通用引物,正向引物为 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物为 1429R: 5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3'。设置 50 μl 反应体系,PCR 扩增的反应程序为:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,55℃复性 30 s,72℃延伸 90 s,30 个循环,4℃保存。将扩增的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,并在紫外灯下观察、拍照。

1.5.3 测序与序列分析

PCR 产物由上海生工生物工程技术有限公司测序。将所测得的序列与 GenBank 中细菌的 16S rDNA 序列进行比较,选取相似度较高的 18 个序列与病原菌一起进行系统发育树分析。用 BioEdit 软件中的 ClustalW 软件进行多序列比对,用系统发生推断软件包 Phylip 3.6 进行统计和聚类分析,通过自举分析进行置信度检测,自举次数为 1 000 次,用 Kitch 法获得系统发育树,最后确定该菌种类。

1.6 中草药的体外抑制实验

1.6.1 药液的制备

五倍子、白头翁、黄柏、穿心莲、当归、党参、杜仲、秦皮、金银花、乳香和没药 11 种中草药分别粉碎,100 目过筛,各称取 10 g 置于 500 ml 烧杯内,加 100 ml 蒸馏水,置于室温下浸泡 2 h 后,然后置于 90℃水浴锅连续煎煮 3 次,每次 1 h。冷却、过滤,合并煎煮液浓缩至 50 ml,使药液含生药为 200 mg/ml。装瓶高压灭菌(106℃,30 min)放凉后,置于 4℃冰箱保存,备用。

1.6.2 体外抑菌实验

采用牛津杯打孔法进行体外抑菌实验(刘冬梅等 2006)。在无菌条件下制作带孔培养基平板,然后将稀释至 6×10^8 CFU/ml 的菌悬液用灭菌棉签均匀涂布于打孔的培养基上,而将获得的中草药提取液分别置于孔

中,28℃培养,待出现明显抑菌圈后测定抑菌圈直径,每组设两个平行。

1.6.3 MIC 和 MBC 的测定

利用 96 孔酶标板采用改良微量二倍稀释法进行。具体方法参照张传亮等(2008)。取 96 孔酶标板,以 70%酒精浸泡过夜,在烘干箱内烘干并小心取出后置于超净工作台内进行如下操作。在各实验孔中加入液体 TSB 150 μl ,然后将 150 μl 中草药提取液加入第 1 孔,混合均匀后取其总量的 1/2 加入第 2 孔,以此得到药液浓度为原始浓度的 1/2、1/4、1/8……1/128,第 8 孔作为阴性对照组,不加菌悬液,用于检测整个实验过程是否受到污染,阳性对照组不加中草药提取液。然后在每孔中加入 1% 的红氮唑 5 μl ,用于指示细菌生长情况。最后在除第 8 孔以外的各孔中加入 10 μl 的待测定菌株(灿烂弧菌)菌悬液,混合均匀后于 28℃ 保温盒中摇床培养过夜,颜色变红说明有细菌生长,记录结果即可得到最小抑菌浓度(MIC)。另外取灭菌棉签在无菌条件下蘸取该酶标板内的液体涂布于 TSB 平板上过夜,观察是否有灿烂弧菌生长,以此确定中草药的最小杀菌浓度(MBC)。

2 结果

2.1 流行情况和发病症状

大菱鲆黑瘦症发病率高,死亡快,主要感染孵化后的早期鱼苗,一般孵化后 7~18d 的鱼苗较易感染,感染率近 100%,死亡率在 80%~90%以上,严重者在几天内可导致鱼苗全部死亡。具体症状为病鱼体色变黑,身体消瘦,头部大、躯干小,呈蝌蚪状,摄食不佳或停止摄食,与同期正常鱼苗相比个体较小,发育迟缓,变态率低,活力差,最后沉于池底死亡(图 1)。



图 1 患黑瘦症的大菱鲆鱼苗
Fig. 1 Diseased turbot larvae with dark-thin syndrome

2.2 病原菌形态及生理生化特性

分离的优势菌株记为 SDRC-HS-1, API 32E 细菌自动鉴定仪自动读取和人工读取反应结果,菌株 SDRC-HS-1 两次读取结果均为不可接受生化谱。根据其形态和生理生化特征(表 1),菌株 SDRC-HS-1 为革兰氏阴性菌,杆状(图 2),菌落呈土黄色、不透明,有运动性,氧化酶、过氧化氢酶反应阳性,对 O/129 敏感, H_2S 产生、精氨酸双水解、鸟氨酸脱羧酶、V-P 实验均为阴性等,另外该菌株的生长温度范围较广,在 4~40℃ 均能生长。将该致病菌的表型特征与伯杰氏细菌学手册(第九版)以及其他相关文献中报道的生理生化特征进行比较,发现该菌株与灿烂弧菌 *Vibrio splendidus* 最相近。

2.3 人工感染实验

在感染实验第 3 天实验组开始出现死亡,至感染后第 7 天,累计死亡率为 80%,对照组自第 5 天起也出现死亡,至第 7 天死亡率为 30%,明显低于实验组。感染后的仔鱼体色发黑,身体消瘦,活力差,停止摄食,逐渐死亡,与自然发病症状相同。从感染死亡的实验组鱼苗中又分离得到相同的优势菌株,而对照组未分离到相同菌株。结果表明,该菌株可以感染大菱鲆鱼苗产生黑瘦症,并导致死亡。

2.4 组织病理分析

对病鱼进行组织病理显微观察,结果显示,病鱼的肝脏、肾脏、脾脏、肠道及脑均呈现一定程度的组织破坏。从整体上看,肝细胞核着色深,细胞界限模糊不清,肝小管减少,组织萎缩变性(图 3);脑组织神经元细胞肿胀,细胞核固缩,甚至有的神经元细胞的细胞核发生融解(图 4)。肠道内壁黏膜上皮组织模糊,细胞脱落,肠内无食物。内脏组织器官溃疡、萎缩,整体上躯干部呈消瘦状,故头部占整个身体的比例相对较大(图 5)。

表 1 分离菌株 SDRC-HS-1 生理生化特性
Table 1 Biochemical characteristics of the isolated bacterium SDRC-HS-1

检测项目	Test items	结果	Result	检测项目	Test items	结果	Result
革兰氏染色	Gram stain	-		苦杏仁甙	Amygdalin	+	
运动性	Motility	+		乳糖	Lactose	-	
4 °C		+		精氨酸双水解酶	Arginine dihydrolase	-	
20 °C		+		葡萄糖	Glucose	+	
30 °C		+		甘露糖	Mannose	-	
35 °C		+		鼠李糖	Rhamnose	-	
40 °C		+		蔗糖	Sucrose	+	
O/129 敏感	Sensitivity of O/129 (10 µg/ml)	+		蜜二糖	Melibiose	-	
氧化酶	Oxidative enzyme	+		麦芽糖	Maltose	-	
过氧化氢酶	Catalase	+		鸟氨酸脱羧酶	Ornithine decarboxylase	-	
H ₂ S 产生	Production of H ₂ S	-		色氨酸脱氨酶	Tryptophan decarboxylase	-	
硝酸盐还原	Nitrate reduction	+		赖氨酸脱羧酶	Lysine decarboxylase	-	
明胶液化	Gelatin liquefaction	+		甘露醇	Mannitol	+	
V-P 反应	V-P reaction	-		阿拉伯糖	Arabinose	-	
固体培养基上有色素产生	Pigment produced on medium plate	-		山梨醇	Sorbitol	-	
TCBS 上生长	Growth on TCBS plate	Y		肌醇	Inositol	-	
吲哚产生	Production of indole	+		N-乙酰葡萄糖胺	N-acetylglucosamine	-	
己二酸	Adipic acid	-		脲酶	Urease	-	
苹果酸	Malic acid	-		柠檬酸	Citric acid	-	
苯乙酸	Phenylacetic acid	-		奎宁酸	Quininic acid	-	
β-半乳糖苷酶	β-galactosidase	+		β-葡萄糖苷酶	β-glucosidase	+	

注: +: 阳性; -: 阴性; Y: Yellow
+: Positive; -: Negative; Y: Yellow

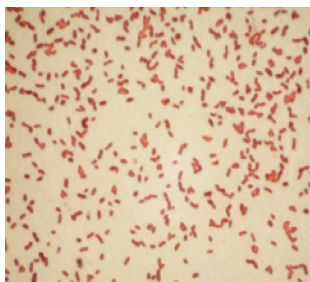


图 2 菌株 SDRC-HS-1 革兰氏染色(×1 000)
Fig. 2 Gram-stain of bacterium SDRC-HS-1

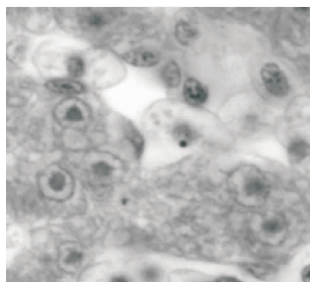
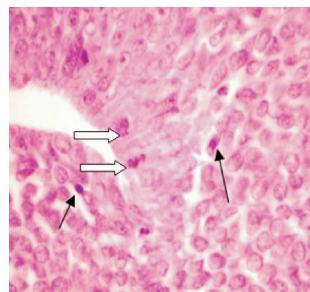
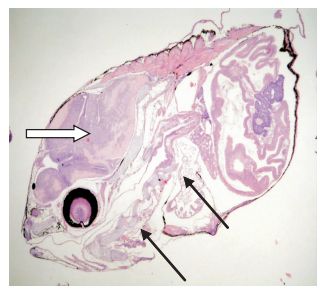


图 3 肝小管减少, 组织萎缩(×400)
Fig. 3 Histopathological changes in the affected liver



神经元胞核固缩(细箭头); 胞核融解(粗箭头)
Karyopyknosis of neurons(Narrow arrow)
Lysis of the neurons(Hollow arrow)
图 4 脑组织的病理变化(×400)
Fig. 4 Histopathological changes in the affected brain



头部呈较大比例(粗箭头); 内脏组织器官溃疡、萎缩(细箭头)
The head of affected larva is out of the normal proportion to body size(Hollow arrow)
Ulceration and atrophy of the internal organs and tissues(Narrow arrow)
图 5 鱼苗幼体整体切片(×40)
Fig. 5 A section of the affected larvae

2.5 分子鉴定

2.5.1 16S rDNA 基因扩增

通过引物 27F 和 1492R 扩增细菌 SDRC-HS-1 的 16S rDNA 基因序列,将扩增的片段进行 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测,得到1 450 bp左右的片段(图 6)。

2.5.2 16S rDNA 系统发育树构建

将细菌的 16S rDNA 基因在 GenBank 中进行同源性检索,将所得的序列进行系统发育分析。结果发现,SDRC-HS-1 与弧菌属细菌组成一群,SDRC-HS-1 与灿烂弧菌构成独立的分支,相似性达到 99%。

2.6 药物敏感试验

在所选用的 11 种中草药中,五倍子和白头翁的杀菌效果最好,其 MBC 均为 25mg/ml。黄柏、穿心莲次之,MBC 为 50mg/ml,当归、党参、杜仲、秦皮、金银花、乳香和没药抑菌、杀菌效果较差,MBC 值大于 100mg/ml(表 2)。

3 讨论

通过对细菌的形态、生理生化特征和 16S rDNA 基因序列的综合分析,从黑瘦症病鱼分离得到的优势菌株 SDRC-HS-1 被鉴定为灿烂弧菌。该菌株在人工感染条件下可使正常鱼苗发生与自然发病相同的症状,并从感染死亡的实验组鱼苗中又分离得到相同的优势菌株,表明该菌株可以感染大菱鲆鱼苗产生黑瘦症并导致死亡。因此,确定灿烂弧菌是黑瘦症的致病原。

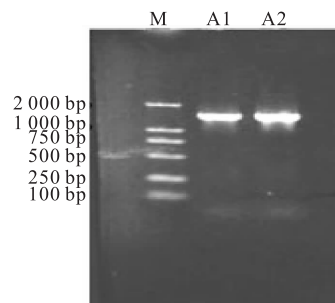


图 6 菌株 SDRC-HS-1 16S rDNA 基因扩增产物电泳图谱

Fig. 6 Electrophoresis of 16S rDNA gene amplification of strain SDRC-HS-1

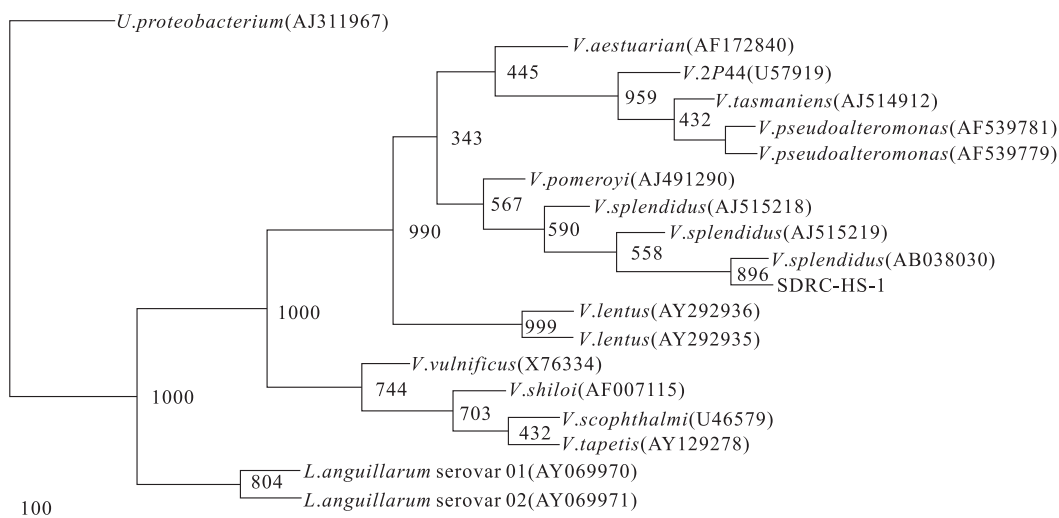


图 7 根据 16S rDNA 序列构建 SDRC-HS-1 的系统发育树

Fig. 7 Phylogenesis of bacterium SDRC-HS-1 based on 16S rDNA sequences

表 2 中草药提取液对灿烂弧菌的作用

Table 2 The effect of extract from Chinese herbal medicines against *V. splendidus*

中草药 Herbal medicine	抑菌圈直径(mm) Diameter of microbiostatic circle	最小抑菌浓度(mg/ml) Minimal inhibitory concentration	最小杀菌浓度(mg/ml) Minimal bactericidal concentration
五倍子 <i>Galla chinensis</i>	26	12.5	25
白头翁 <i>Radix pulsatillae</i>	22	25	25
黄柏 <i>Phellodendron chinense</i>	18	25	50
穿心莲 <i>Herba andrographitis</i>	16	50	50
当归 <i>Chinese angelica</i>	14	100	100
党参 <i>Radix codonopsisand</i>	—	—	—
杜仲 <i>Eucommia bark</i>	13	50	100
秦皮 <i>Codex fraxini</i>	18	50	100
金银花 <i>Flos loniceræ</i>	14	100	100
乳香 <i>Boswellia carterii</i>	15	100	200
没药 <i>Commiphora molmol</i>	12	200	200

“—”,表示无抑菌和杀菌作用

“—”;non-bacteriostatic and bactericidal action

组织病理学分析证实了黑瘦症病鱼的肝脏、肾脏、脾脏、肠道及脑组织发生病变。脑组织神经元细胞肿胀,细胞核固缩,乃至胞核融解。肝细胞核着色深,细胞界限模糊不清,肝小管减少,组织萎缩变性。肠道内壁黏膜上皮组织模糊,细胞脱落,肠内无食物。肠道组织的破坏,必然造成厌食、机体营养不良以及身体消瘦,加之内脏组织器官的萎缩,躯干部呈现消瘦状。从整体上看,黑瘦症病鱼头部大、身子小,成为该病症的主要特征之一。

灿烂弧菌可以导致多种水产动物发病,这在国内外相关文献中都有报道。在国外,Gatesoupe等(1999)报道从大菱鲆幼体中分离出8株灿烂弧菌进行感染实验,有6株可以引起大菱鲆苗高死亡率,说明大多数灿烂弧菌具有致病性。莫照兰等(2003)从孵化14d患腹水症的牙鲆苗体内分离得到灿烂弧菌,人工感染实验证实它对牙鲆苗具有很强的致病性。另有研究证实,灿烂弧菌可以感染大西洋鲑、鳟鱼和鲑鱼,病鱼明显的特征是腹部、消化道肿胀以及肠壁充血(Lupiani *et al.* 1989; Myhr *et al.* 1991)。但是关于灿烂弧菌引起它们相应的组织病理变化资料不详。

在海参养殖过程中,王印庚等(2006)从患烂胃病的仿刺参耳状幼体中也分离得到灿烂弧菌,在人工回接感染实验中同样证实灿烂弧菌对仿刺参 *Apostichopus japonicus* 具有很强的致病性。在国内,养殖大菱鲆感染灿烂弧菌尚属首次报道。

中草药药效分析发现,11种中草药对灿烂弧菌的抑制和杀灭效果有所不同。其中五倍子、白头翁对灿烂弧菌的抑制作用最强;黄柏、穿心莲次之;当归、党参、杜仲、秦皮、金银花、乳香和没药对灿烂弧菌抑菌、杀菌作用最弱。王玉娥等(2008)测定5种海洋致病菌对34种中草药敏感性的实验中,得到五倍子、白头翁、马齿苋、乌梅、黄连、木瓜、五味子、地榆、公丁香、大黄对溶藻弧菌、哈氏弧菌、副溶血弧菌、河流弧菌和麦氏弧菌具有较高的抑制性。在众多的水产养殖细菌性疾病的中草药防治配方中也常有五倍子、白头翁成分(农业部《新编渔药手册》2005)。与前人相比,本研究中五倍子和白头翁抑菌的良好效果与之相似。

雷霖霖(2003)研究指出,在工厂化育苗条件下,孵化16~18d的大菱鲆鱼苗处于变态期,这个时期是育苗的危险期之一。通常情况下,黑瘦症时有发生,并导致鱼苗成活率低下。为此,在实际育苗生产过程中,养殖技术人员多采取紫外线消毒育苗期用水、饵料营养强化和抗生素药物预防等措施防止细菌性疾病的发生。然而,在社会各界关注水产品质量安全的背景之下,实施无公害养殖生产是实现绿色水产养殖的必经之路。长期使用抗生素会导致致病菌耐药性和水产品药物残留等问题,专用中草药替代抗生素的趋势便呼之欲出。本研究初步的治疗试验证明,以五倍子、白头翁为主要成分,100~200目粉碎,进行药浴和口服给药可有效治愈大菱鲆苗期的黑瘦症(另文报道)。针对上述筛选的中草药,今后将进一步深入进行药理学、毒理学研究以及临床防治试验,为其育苗生产中实际应用提供理论依据。

参 考 文 献

- 王印庚,张正,秦蕾,史成银,陈洁君,杨少丽,马爱军. 2004. 养殖大菱鲆主要疾病及防治技术. 海洋水产研究, 25(6): 61~68
- 王印庚,孙素凤,荣小军. 2006. 仿刺参幼体烂胃病及其病原菌鉴定. 中国水产科学, 13(6): 908~915
- 王玉娥,邢晨光,王国良. 2008. 5种海洋致病弧菌对34种中草药敏感性的测定. 水产科学, 27(5): 222~225
- 刘冬梅,李理,杨晓泉,梁世中. 2006. 用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力. 食品研究与开发, 27(3): 110~111
- 农业部《新编渔药手册》编撰委员会. 2005. 新编渔药手册. 北京: 中国农业出版社
- 张传亮,李權年,祖国掌. 2008. 中草药复方对拟态弧菌的体外抗菌和拮抗外毒素的作用. 中国微生物学杂志, 20(4): 346~351
- 莫照兰,茅云翔,陈师勇,张振冬,徐永立,张培军. 2003. 养殖牙鲆鱼苗腹水症病原菌的鉴定及系统发育学分析. 海洋与湖沼, 34(2): 131~139
- 曹俊辉,谢丽玲,杨素霞,胡建国. 2008. 中草药提取物体外抑菌活性研究. 安徽农业科学, 36(23): 9 982~9 989
- 童圣英,赵艳,李宏,王子臣. 1998. 几种常用中草药对皱纹盘鲍摄食行为的影响. 大连水产学院学报, 13(4): 71~74
- 雷霖霖. 2003. 大菱鲆养殖技术. 上海科学技术出版社. 62~65
- Gatesoupe, F. J., Lambert, C., and Nicolas, J. L. 1999. Pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. Journal of Applied Microbiology, 87(5): 757~763
- Lupiani, B., Dopazo, C. P., Ledo, A. *et al.* 1989. New syndrome of mixed bacterial and viral etiology in cultured turbot (*Scophthalmus maximus*). J. of Aquatic Animal Health, 1(3): 197~204
- Myhr, E., Larsen, J. L., and Lillehaug, A. 1991. Characterization of *Vibrio anguillarum* and closely related species isolated from farmed fish in Norway. Applied and Environmental Microbiology, 57(9): 2 750~2 757