

青虾“软壳综合症”病原及其特性

潘晓艺^{1*} 沈锦玉^{1*} 李建应² 贺宝祥² 尹文林¹ 郝贵杰¹ 徐洋¹ 姚嘉赞¹

(1. 中国水产科学研究院鱼类健康与免疫重点实验室 浙江省淡水水产研究所 浙江 湖州 313001)

(2. 德清县水产技术推广站 浙江 湖州 313100)

摘要: 从患软壳综合症的濒死青虾体内分离到一株细菌 QXL0711B, 经人工感染试验, 其对青虾的半数致死浓度(LC₅₀)为 1.47×10^6 CFU/mL, 具有较强毒力。API 32E 系统鉴定及 16S rRNA 序列分析, 该病原菌为维罗纳气单胞菌温和生物变种(*Aeromonas veronii biovar sobria*, 登录号: FJ808727)。其系统发育分析表明, 菌株 QXL0711B 与维罗纳气单胞菌(登录号: X71120)和维罗纳气单胞菌温和生物变种(登录号: AY987729)的亲缘关系最近, 其同源性都为 99%。药敏实验结果表明: 菌必治、复达欣、环丙沙星、恩诺沙星、氟哌酸等 5 种化学药剂对该病原菌有较强的抑菌作用。
关键词: 青虾, 软壳综合症, 维罗纳气单胞菌, 日本沼虾

Identification and Biological Characteristics of the Pathogen Causing *Macrobrachium nipponense* Soft-shell Syndrome

PAN Xiao-Yi^{1*} SHEN Jin-Yu^{1*} LI Jian-Ying² HE Bao-Xiang²
YIN Wen-Lin¹ HAO Gui-Jie¹ XU Yang¹ YAO Jia-Yun¹

(1. Key Laboratory of Fish Health and Immunology, Chinese Academy of Fishery Science, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou, Zhejiang 313001, China)

(2. Deqing Fishery Technical Extension Station, Huzhou, Zhejiang 313100, China)

Abstract: A pathogenic bacterial strain QXL0711B was isolated from freshwater shrimp (*Macrobrachium nipponense*) suffering with soft-shell syndrome. The 50% lethal concentration (LC₅₀) of strain QXL0711B was 1.47×10^6 CFU/mL, which showed that strain QXL0711B was rather strong virulent to *Macrobrachium nipponense*. Strain QXL0711B was gram negative and had β -hemolytic activity on sheep blood agar. By means of API 32E identification and 16S rRNA sequence analysis, strain QXL0711B was identified as *Aeromonas veronii biovar sobria* (locus number: FJ808727), which was the closest relative to *Aeromonas veronii* strain (locus number: X71120) and *Aeromonas veronii biovar sobria* strain (locus number: AY987729) with 99% homology. In addition, strain QXL0711B was highly sensitive to ceftriaxone ceftazidime ciprofloxacin enrofloxacin and norfloxacin.

Keywords: Freshwater shrimp, Soft-shell Syndrome, *Aeromonas veronii*, *Macrobrachium nipponense*

青虾, 学名日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*), 属甲壳纲, 十足目(Decapoda), 长臂虾科(Palaemonidae), 沼虾属(*Macrobrachium*), 在中国、日本、越南、朝鲜半岛以及缅甸等国都有分布^[1-3]。

基金项目: 浙江省科技计划项目(No. 2008C22058); 湖州市科技计划项目(No. 2007YN22); 德清县科技合作专项

* 通讯作者: Tel: 86-572-2041403; ✉ panxiaoyi@136.com, sjinyu@126.com

收稿日期: 2009-03-24; 接受日期: 2009-06-11

因其肉味鲜美、营养丰富,是我国传统的淡水水产佳品。2006年全国内陆虾类产量98.18万吨,其中青虾养殖产量20.92万吨,年产值约73亿元^[4]。我国青虾养殖面积现已超过300万亩。随着青虾人工养殖规模的扩大和养殖时间的延长,青虾的疾病日趋增多,并呈现多样化,比较严重的有嗜水气单胞菌感染引起红鳃病^[5],拟态弧菌感染引起的红体综合症^[6]和纤毛虫病等。

自2005年以来,在淡水青虾主要养殖区浙江省德清县暴发了不明原因的青虾死亡。主要病症表现为掉肢、软壳、肝胰腺发黄和肌肉水肿,故此暂命名为“青虾软壳综合症”。虾感染该病后,摄食明显减少,活动迟缓,蜕壳后新壳角质化不及时造成软体状而死亡。该病主要危害对象是4 cm以上的成体青虾,发病高峰为1月、3~5月和10~12月,发病率14.6%~60%,死亡率71.14%,高的达到90%以上。该病给青虾养殖业造成严重的经济损失。为了尽快搞清此病发生的原因,找到有效的防治方法,作者以典型症状的病虾为材料,对其病原进行了研究,为进一步开展青虾“青虾软壳综合症”的防治提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 材 料

病虾均取自浙江省德清某青虾养殖场,虾重4 g~5 g,健康虾取自浙江省淡水水产研究所浙北水产苗种基地,水池暂养备用。

1.2 病原菌分离

患病青虾症状为掉肢,软壳,肌肉水肿样。取发病症状典型的濒死青虾,现场用70%的酒精棉球反复擦拭消毒青虾体表,用无菌剪刀打开头胸甲,无菌操作取病虾的肝胰脏、肌肉、血液等组织,划线接种于胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)培养基平板上,28℃培养24 h后,挑取形态特征一致的优势菌落进行纯培养,转接斜面保存备用。

1.3 病原菌的人工感染试验

在60 cm×50 cm×40 cm水体的玻璃缸中,每缸放养体重4 g~5 g的健康青虾10尾,连续充气,暂养5 d后进行肌肉注射感染试验。试验菌株在28℃下培养18 h~24 h,用灭菌过的生理盐水制成终浓度约为 2.31×10^8 CFU/mL的菌悬液,以腹部肌肉注射(0.1 mL/尾)的方法进行人工感染,对照组注射同量

无菌生理盐水。每组各注射10尾,水温为19℃~22℃。连续7 d观察并记录试验虾死亡数目,同时对人工回归感染发病濒死的试验虾进行病原菌再分离,观察再分离的菌株与原分离菌株在形态与理化特性等方面是否一致。

另采集自然发病、症状典型病虾的肝胰腺,按1 g:10 mL添加生理盐水进行冻融研磨,10000 r/min离心,上清过0.22 μm滤膜,滤液对健康青虾进行攻毒。

1.4 病原菌毒力测定

将分离的致病菌株菌悬液分别稀释成 3.43×10^5 CFU/mL、 3.43×10^6 CFU/mL、 3.43×10^7 CFU/mL、 3.43×10^8 CFU/mL,然后分别对健康青虾进行肌肉注射感染,每尾注射剂量为0.1 mL。以注射等量无菌生理盐水的健康青虾作为对照。每注射组试验青虾各10尾,水温为19℃~22℃。连续7 d观察并记录试验青虾的死亡数目,并用概率单位图解法^[7]计算半数致死浓度(LC₅₀)。

1.5 病原菌鉴定

1.5.1 菌株形态观察和API 32E系统鉴定:纯培养的细菌经28℃培养18 h~24 h后,作革兰氏染色,进行细菌形态观察,生理生化特性应用法国生物梅里埃(Biomerieux)公司的API32E细菌鉴定系统进行,依据《常见细菌系统鉴定手册》^[8]和《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology》^[9]对菌株进行生化试验和鉴定。

1.5.2 16S rRNA 鉴定:分子生物学操作参照文献[10]进行,引物采用16S rRNA基因通用引物,27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (*Escherichia coli* 对应位置为8~27)和1541R:5'-AAGGAGGTGATCCA GCCGCA-3' (*Escherichia coli* 对应位置为1541~1522)。PCR扩增产物用1.0%琼脂糖凝胶电泳并进行回收纯化,引物合成和测序由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.6 序列分析

待鉴菌株16S rRNA基因序列通过NCBI的Blastn检索系统进行序列同源性比对,使用DNASar软件的Megalign系统与GenBank数据库中获得菌株的16S rRNA基因序列进行多序列匹配排列,构建分支系统树。

1.7 药敏试验

以涂布法接种病原菌于TSA培养基平板上,贴

上药敏纸片(直径 6 mm), 28°C 培养 24 h 后测抑菌圈直径。所用药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司。

2 结果

2.1 病原菌的分离与致病性试验

从自然发病的青虾肝胰腺中分离到 2 株优势菌株, 分别暂命名为 QXL0711B 和 QXL0711M(其 16S rRNA 序列 GenBank 登录号为: FJ808728, 同源性分析结果, 与 *Vogesella indigofera* 有 98% 的同源性), 经过人工回归感染试验, 仅菌株 QXL0711B 对青虾具高致病性, 人工注射感染青虾后, 7 d 内, 青虾的死亡率达 100% (表 1)。试验病虾也表现出了部分临床症状: 肌肉水肿样和掉肢, 而且从人

工回归感染濒死的病虾体内也可分离到与菌株 QXL0711B 形态特征及理化特性一致的菌株。QXL0711M 感染青虾 7 d 后, 死亡率只有 10%, 从人工回归感染濒死的病虾体内未分到细菌, 可能为其它原因死亡。组织滤液对健康青虾进行攻毒, 20 d 内未发现死亡。

根据病原菌毒力测定结果建立的试验虾死亡率 (%) 与菌液浓度对数 [$\log(\text{CFU}/\text{mL})$] 的关系曲线: $y=24.5x-101.11$ (图 1), 菌株 QXL0711B 对青虾的半数致死浓度(LC_{50})为 $1.47 \times 10^6 \text{ CFU}/\text{mL}$, 根据 Devesa 对鱼类致病菌毒力的划分标准^[11], 可判定菌株 QXL0711B 对青虾具有较强的毒力。说明菌株 QXL0711B 是此次淡水青虾的“青虾软壳综合症”的主要病原。

表 1 人工回归感染结果
Table 1 Results of artificial infection test of strain QXL0711B

菌株 Strain	注射浓度 Concentration (CFU/mL)	虾数(尾) Number	死亡数目 Death number(尾)							死亡率 Mortality (%)
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	
QXL0711B	2.31×10^8	20	3	8	15	18	20	20	20	100%
QXL0711M	2.31×10^8	20	0	1	1	2	2	2	2	10%
PBS	/	20	0	0	0	0	0	0	0	0

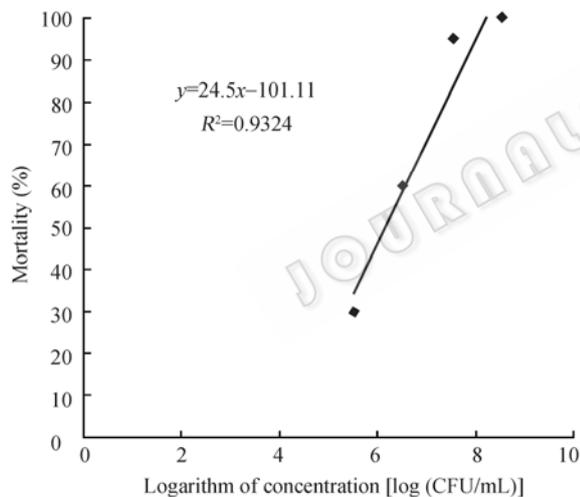


图 1 青虾死亡率 (%) 与菌液浓度对数 [$\log(\text{CFU}/\text{mL})$] 的关系曲线

Fig. 1 The relation curve of *M. nipponense* mortality with logarithm of bacterial concentration

2.2 病原菌的鉴定

2.2.1 病原菌形态特征和生化鉴定: QXL0711B 菌株在血琼脂平板菌落呈灰绿色, 表面湿润光滑, 微隆起, 边缘整齐, β 溶血性(图 2)。革兰氏染色阴性, 氧化酶阳性, 葡萄糖发酵产气型, 触酶阳性, 有动力。根据 API 32E 系统生化鉴定结果和附加的几个

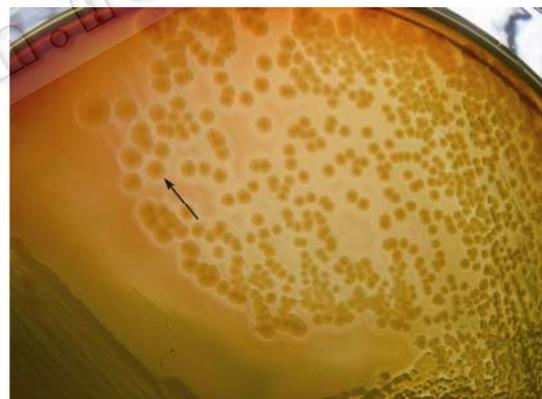


图 2 菌株 QXL0711B 在羊血琼脂平板上产生的 β -溶血圈
Fig. 2 The beta hemolysis zone of strain QXL0711B on sheep-blood agar plate

生化反应, 同时设维罗纳气单胞菌温和生物变种标准株 ATCC51106 为对照, 鉴定为维罗纳气单胞菌温和生物变种(*A. veronii biovar sobria*)(表 2)。

2.2.2 病原菌 16S rRNA 基因序列及系统发育分析: 通过以 16S rRNA 通用引物, QXL0711B 基因组为模板扩增获得长度约 1500 bp 左右的片段(图 3), 测序结果得到 1537 bp 的 DNA 片段, GenBank 登录号为 FJ808727。通过 NCBI 的 Blastn 检索系统进行基因序列同源性检索, 发现同源性排前 32 位的菌株都属

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

表 2 API 32E 生化鉴定
Table 2 The results of biochemical experiment with API 32E

项目 Item	菌株 Stain		项目 Item	菌株 Stain	
	QXL0711B	ATCC51106		QXL0711B	ATCC51106
氧化酶 OX	+	+	吲哚 IND	+	+
鸟氨酸脱羧酶 ODC	-	-	N-乙酰-β-葡萄糖苷酶 βNAG	-	+
精氨酸双水解酶 ADH	+	+	β-半乳糖苷酶 βGAL	+	+
赖氨酸脱羧酶 LDC	+	+	葡萄糖 GLU	+ g+	+ g+
脲酶 URE	-	-	蔗糖 SAC	+	-
L-阿拉伯糖醇 LARL	-	-	L-阿拉伯糖 LARA	-	-
半乳糖酸盐 GAT	-	-	D-阿拉伯糖醇 DARL	-	-
5-酮基-葡萄糖酸钠 5KC	-	-	α-葡萄糖 αGLU	-	+
脂肪酶 LIP	+	+	α-半乳糖苷酶 αGAL	-	+
酚红 RP	-	+	海藻糖 TRE	+	+
β-葡萄糖苷酶 βGLU	+	-	鼠李糖 RHA	-	-
甘露醇 MAN	-	+	肌醇 INO	-	-
麦芽糖 MAL	+	+	纤维二糖 CEL	-	+
侧金盏花醇 ADO	-	-	山梨醇 SOR	-	-
帕拉金糖 PLE	-	+	α-麦芽糖苷酶 αMAL	+	+
β-葡萄糖酸酶 βGUR	+	-	L-天门冬素芳胺酶 ASPA	-	-
丙二酸 MNT	-	-	七叶苷 ESC	-	-
枸橼酸盐 CIT	-	+	水杨苷 SAL	-	-

注: +: 阳性; -: 阴性; g+: 产气.

Note: +: Denotes positivity; -: Denotes negativity; g+: Gas produced.

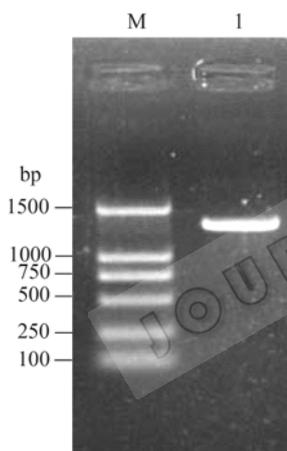


图 3 QXL0711B 菌株 16S rRNA 基因扩增产物电泳图
Fig. 3 The electrophoresis photograph of the 16S rRNA sequence from strain QXL0711B

于气单胞菌属(*Aeromonas* spp.), 同源性在 97%~100%之间。其中 30 株菌为维罗纳气单胞菌(*A. veronii*), 4 株维罗纳气单胞菌温和生物变种(*A. veronii biovar sobria*), 1 株维罗纳气单胞菌维罗纳生物变种(*A. veronii* bv. *veronii*)。根据同源性检索结果, 选取同源性高的不同种的气单胞菌构建系统发育树(图 4)。结果进一步表明菌株 QXL0711B、维罗纳气单胞菌(*A. veronii*)和维罗纳气单胞菌温和生物变种(*A. veronii biovar sobria*)聚为一簇。综合形态与生理

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

生化特性鉴定以及 16S rRNA 序列分析结果, 菌株 QXL0711 可鉴定为维罗纳气单胞菌温和生物变种(*A. veronii biovar sobria*)。

2.3 药敏结果

通过菌株 QXL0711B 对 14 种药物的敏感性试验, 结果表明菌株 QXL0711B 对环丙沙星、氟哌酸、氯霉素、复达欣、恩诺沙星、氧氟沙星、舒普深和菌必治敏感, 对青霉素、新生霉素和万古霉素完全耐药, 其它药物中度敏感。具体结果见表 3。

3 讨论

维罗纳气单胞菌(*Aeromonas veronii*)也被译作维氏气单胞菌、凡隆气单胞菌和维隆气单胞菌。最早于 1987 年由 Hickman-Brenner 等^[13]描述为气单胞菌属的一个新种, 先前被描述为肠道 77 群。遗传学研究发现该种包括两个生物型: 七叶苷和鸟氨酸脱羧酶都为阴性的维罗纳气单胞菌温和生物变种, 两者都为阳性的维罗纳气单胞菌维罗纳生物型^[12,14]。维罗纳气单胞菌温和生物变种最初被归为温和气单胞菌, 但实际在遗传学上分类属于维罗纳气单胞菌^[15]。维罗纳气单胞菌造成的水产病害在国内报道较少, 还未见在虾类上的报道, 仅见崔树玉、林启存、房

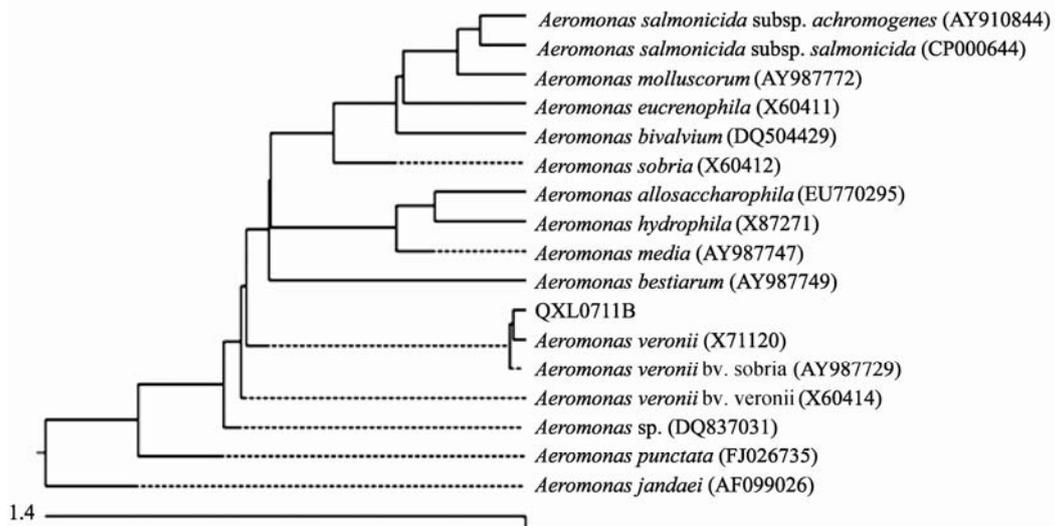


图 4 基于 16S rRNA 序列的系统发育树
Fig. 4 The phylogenetic tree based on 16S rRNA sequence

表 3 菌株 QXL0711B 的药物敏感性
Table 3 The antibiotic sensitivity of strain QXL0711B

药物 Antibiotics	抑菌圈 Diameter of inhibiting ring (mm)	药物 Antibiotics	抑菌圈 Diameter of inhibiting ring (mm)	药物 Antibiotics	抑菌圈 Diameter of inhibiting ring (mm)
卡那霉素 Kanamycin	18	痢特灵 Furazolidone	15	复达欣 Ceftazidime	29
复方新诺明 Compound sulfamethoxazole	15	氟哌酸 Norfloxacin	25	强力霉素 Doxycycline	18
庆大霉素 Gentamycin	18	新霉素 Neomycin	19	恩诺沙星 Enrofloxacin	26
先锋 V Cefalin V	17	四环素 Tetracycline	18	多粘菌素 B Aerosporin B	14
青霉素 Penicillin	0	红霉素 Erythromycin	13	氧氟沙星 Ofloxacin	22
丁胺卡那 Vancomycine	18	氯霉素 Chloramphenicolum	26	壮观霉素 Spectinomycine	12
环丙沙星 Ciprofloxacin	26	链霉素 Streptomycin	19	菌必治 Ceftriaxone	38
磷霉素 Fosfomycin	11	新生霉素 Novobiocin	0	万古霉素 Vancomycin	0
呋喃妥因 Nitrofurantoin	15	利福平 Rifampicin	17	舒普深 Sulperazon	22

海、秦国民和秦蕾等分别在黑鱼、丁鱼、中华绒螯蟹、锦鲤和泥鳅中分离到, 并都具致病性^[16-20]。

作为淡水青虾主要养殖区域之一的浙江省湖州地区, 在 2005~2008 年连续 4 年出现了临床症状为掉肢、蜕壳后软体、肝胰腺发黄和肌肉肿胀的病, 造成大量养殖青虾死亡。本研究从发病的亲虾肝胰腺中分离到 2 种优势菌, 通过回归感染试验, 发现分离到的 QXL0711B 株对青虾具有较强毒力, 并在攻毒后表现出部分临床症状, 如肌肉水肿和掉肢。通过生化鉴定结果, 发现最符合维罗纳气单胞菌温和生物变种的生化特征, 与标准菌株维罗纳气单胞菌温和生物变种 ATCC51106 的生化指标基本一致, 个别糖和醇有所差异, 这些差异可能是由于菌株的宿主和环境的不同而造成。为了更精确和科学地得到

鉴定结果, 我们进行了 16S rRNA 分子鉴定。以 16S rRNA 通用引物 27F 和 1541R 扩增 QXL0711B 株的 16S rRNA, 并测定了其序列, 通过 NCBI 的 Blastn 系统进行序列同源性比对, 比对结果 QXL0711B 与维罗纳气单胞菌温和生物变种聚在一簇, 综合生化和 16S rRNA 的鉴定结果可以确定 QXL0711B 为维罗纳气单胞菌温和生物变种。据报道, 格氏乳球菌也能造成罗氏沼虾肌肉发白水肿的临床症状^[21], 本研究中青虾的临床症状虽有肌肉水肿样, 但不发白。维罗纳气单胞菌对淡水虾也具有较强毒力, 3.7×10^5 CFU/g 的注射剂量就能造成淡水虾的 100%致死率, LD₅₀ 达到 2.0×10^3 CFU/g^[22]。本研究分离的 QXL0711B 对青虾的半数致死浓度(LC₅₀)为 1.47×10^6 CFU/mL, 在羊血琼脂平

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

板上 28°C 培养 36 h 表现为 β 溶血性, 也表现出了很强的致病力。QXL0711B 株的生化特性非常接近霍乱弧菌, 在最初的 API 32E 鉴定结果, 仪器的判断结果为霍乱弧菌。国内杨秦等根据霍乱弧菌的维管束状纤毛基因设计引物, 克隆了维罗纳气单胞菌温和生物变种菌株的维管束状纤毛基因^[23], 说明维罗纳气单胞菌温和生物变种的某些毒力基因和霍乱弧菌具有较高同源性, 这可能和两者具有相似的生化特性有关。

维罗纳气单胞菌温和生物变种能产生黏附素、细胞毒素、肠毒素、血凝素和溶血素等毒力因子^[24], 其致病机理研究报道较少。Janda 等对气单胞菌胞外酶的研究发现 98% 的嗜水气单胞菌、91% 维罗纳气单胞菌温和生物变种和 76% 的豚鼠气单胞菌能够分泌几丁质酶^[25], 这可能与“青虾软壳综合症”的病因相关。本研究中“青虾软壳综合症”的暂命名由来: 青虾最终死亡是由于蜕壳后的新壳长时间不能角质化, 使得青虾处于软壳状态, 造成青虾的各种防御能力下降而死亡; 青虾死亡时虾体呈软壳状, 故此命名。维罗纳气单胞菌温和生物变种 QXL0711B 株造成“青虾软壳综合症”的致病机理有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 刘瑞玉, 梁象秋, 严生良. 甲壳动物学论文集(第二辑). 北京: 科学出版社, 1990, pp.111-112.
- [2] Cai Y, Dai AY. Freshwater shrimps (Crustacea: Decapoda: Caridea) from the Xishuangbanna region of Yunnan Province, southern China. *Hydrobiologia*, 1999, **400**: 211-241.
- [3] Cai Y, Ng PKL. The freshwater palaemonid prawns (Crustacea: Decapoda: Caridea) of Myanmar. *Hydrobiologia*, 2002, **487**: 59-83.
- [4] 傅玉祥, 柳 正. 中国渔业年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2007, p.204.
- [5] 沈锦玉, 钱 冬, 刘 问, 等. 养殖青虾“红鳃病”病原的研究. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2000, **19**(3): 222-223.
- [6] 叶雪平, 罗毅志, 杨广智, 等. 青虾红体综合症病原研究. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2002, **21**(2): 106-108.
- [7] 徐叔云, 卞如濂, 陈 修. 药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 2002, pp.1651-1654.
- [8] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, pp.188-189.
- [9] George M, Julia A, Timothy G, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nded Vol.2. New York: Springer, 2005, pp.425-437.
- [10] 萨姆布鲁克, 拉赛尔. 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 2002, pp.387-392.
- [11] Devesa S. First report of vibriosis in turbot (*Scophthalmus maximus*) cultured in Northwestern Spain. In: Fish and Shellfish Pathology, Ellis AE (ed). New York: Academic Press, 1985, pp.131-140.
- [12] Altwegg M, Steigerwalt AG, Altwegg-Bissig R, et al. Biochemical identification of *Aeromonas* genospecies isolated from humans. *J Clin Microbiol*, 1990, **28**(2): 258-264.
- [13] Hickman-Brenner FW, MacDonald KL, Steigerwalt AG, et al. *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea. *J Clin Microbiol*, 1987, **25**(5): 900-906.
- [14] Carnahan A, Altwegg M. Taxonomy. In: The Genus *Aeromonas*//Austin B, Altwegg M, Gosling PJ, et al. (ed). Chichester, Wiley, 1996, pp.1-38.
- [15] Nair GB, Holmes B. Subcommittee on the taxonomy of *Vibrionaceae*. *Int J Syst Bacteriol*, 1999, **49**: 1945-1947.
- [16] 崔树玉, 李景学, 孙启华. 自淡水鱼中分离出一株维隆氏气单胞菌. 中国卫生检验杂志, 1994, **4**(3): 133.
- [17] 林启存, 蔡丽娟, 杨仲景. 丁鱼岁溃疡病的病原菌分离、鉴定与人工感染试验. 水产科学, 2005, **24**(11): 21-22.
- [18] 房 海, 陈翠珍, 张晓君. 中华绒螯蟹病原维氏气单胞菌的检验. 中国人兽共患病学报, 2008, **24**(1): 45-49.
- [19] 秦国民, 张晓君, 陈翠珍. 锦鲤维氏气单胞菌感染症及其病原生物学特性研究. 安徽农业科学, 2008, **36**(19): 8115-8117.
- [20] 秦 蕾, 徐 静, 张晓君. 泥鳅的凡隆气单胞菌感染. 中国人兽共患病学报, 2008, **24**(12): 1100-1102.
- [21] Chen SC, Lin YD, Liaw LL, et al. *Lactococcus garvieae* infection in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rRNA sequencing. *Dis Aquat Organ*, 2001, **45**(1): 45-52.
- [22] Sung HH, Hwang SF, Tasi FM. Response of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) to challenge by 2 strains of *Aeromonas* spp.. *J Invertebr Pathol*, 2000, **76**(4): 278-284.
- [23] 杨 秦, 黄泽智. 维罗纳气单胞菌维管束状纤毛 *mshB* 基因突变体的构建. 亚太传统医学, 2008, **4**(10): 14-16.
- [24] Rahman MH, Colque-Navarro P, Klihn I, et al. Identification and characterization of pathogenic *Aeromonas veronii* biovar *sobria* associated with epizootic ulcerative syndrome in fish in Bangladesh. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(2): 650-655.
- [25] Janda JM. Biochemical and exoenzymatic properties of *Aeromonas* species. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1985, **3**(3): 223-232.