

银龙鱼烂鳃病原的分离和鉴定

史谢尧^{1,2}, 贾文平², 郝爽², 张振国², 罗璋², 周文礼^{1*}, 冯守明^{3*} (1. 天津农学院水产学院, 天津市水产生态及养殖重点实验室, 天津 300384; 2. 天津市水产研究所, 天津 300221; 3. 天津市水生动物疫病预防控制中心, 天津 300221)

摘要 [目的] 对患烂鳃病银龙鱼开展病原分离和鉴定。[方法] 采用人工回归感染试验确定分离菌株的致病性, 利用生理生化试验和 16S rDNA 基因序列分析对病原菌进行鉴定。[结果] 分离菌株 YY-2017-3 对斑马鱼具有致病性, 其生理生化试验结果与柱状黄杆菌相一致; YY-2017-3 菌株的 16S rDNA 基因序列与柱状黄杆菌聚为一支, 对多种药物显示耐药。[结论] 菌株 YY-2017-3 被鉴定为柱状黄杆菌, 这是柱状黄杆菌引起银龙鱼烂鳃病在国内的首次报道。

关键词 银龙鱼; 烂鳃病; 病原菌; 柱状黄杆菌

中图分类号 S941.42⁺⁴ **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)15-0075-04

Isolation and Identification of Pathogen from *Osteoglossum bicirrhosum* with Gill Rot Disease

SHI Xie-yao^{1,2}, JIA Wen-ping², HAO Shuang² et al (1. College of Fisheries, Tianjin Agricultural University, Tianjin Key Laboratory of Aquatic Ecology and Aquaculture, Tianjin 300384; 2. Tianjin Fishery Research Institute, Tianjin 300221)

Abstract [Objective] To make the isolation and identification of pathogen from *Osteoglossum bicirrhosum* with gill rot disease. [Method] The pathogenicity of isolated strain was confirmed by artificial infection test, and the isolated strain was identified through physiological and biochemical tests, 16S rDNA gene sequencing results. [Result] The isolated strain YY-2017-3 was pathogenic to zebra fish, and its physiological and biochemical properties were consistent with those of *Flavobacterium columnare*. YY-2017-3 strain formed a single cluster with 16S rDNA gene sequences of *F. columnare*, and it showed resistant to many kinds of antibiotics. [Conclusion] YY-2017-3 strain was identified as *F. columnare*. It was the first report about this bacterium caused gill roll disease of *F. columnare* in China.

Key words *Osteoglossum bicirrhosum*; Gill rot disease; Pathogen; *Flavobacterium columnare*

龙鱼是一类古老的大型淡水鱼, 因其体形酷似我国神话中的龙, 故俗称龙鱼, 在分类上属于辐鳍鱼纲骨舌鱼目骨舌鱼科。龙鱼是地球上比较原始鱼类, 早在距今 3 亿多年前的远古石炭纪就已经存在, 素有“活化石”之称^[1]。目前, 人工养殖的龙鱼品种主要有金龙鱼、银龙鱼和红龙鱼, 其中以银龙鱼养殖数量和市场销量最大。银龙鱼鳞片较大, 受光线照射时鳞片反射出银白色光辉, 具有较高的观赏价值, 深受观赏鱼爱好者喜爱, 是一种名贵观赏鱼^[2-3]。

近年来, 随着养殖技术的不断发展, 银龙鱼的人工培育和养殖技术逐步完善, 广东、河北、天津等地养殖企业已开展银龙鱼苗的规模化培育并取得成功。2017 年 3 月中旬, 天津市宁河区某银龙鱼养殖场发生病害, 患病银龙鱼体色暗淡无光泽, 厌食, 聚集于水体表层, 对外界反应迟钝。笔者对患病银龙鱼进行了病原分离与鉴定, 并对其进行了药敏试验, 旨在为银龙鱼疾病的治疗提供理论依据。

1 材料与方

1.1 试验材料 患病银龙鱼(体长 8.2~10.3 cm)来自天津市宁河区某观赏鱼养殖场; 健康斑马鱼(体长 3.2~4.1 cm)购自天津市中环观赏鱼市场。

Shieh 培养基参照文献^[4]的方法配制; 微生物生化管和药敏片由杭州天和微生物试剂有限公司生产; LB 培养基购自北京陆桥生物技术股份有限公司; PCR 引物由生工生

物工程(上海)有限公司合成; *rTaq*、pMD 19T Vector, DNA Marker 和 Gel Extraction kit 均购自 TaKaRa 公司。

1.2 病原的分离和寄生虫检查 用 75% 乙醇浸过的棉球对患病银龙鱼进行反复擦拭后, 在无菌条件下对病鱼进行解剖, 用接种环从患病鱼的鳃组织取少量样品划线接种于 Shieh 平板和 LB 平板, 另外从肝、脾、肾等组织划线接种于 LB 平板和 BHI 平板; 28 °C 培育 48 h 后, 选取优势菌落进行进一步纯化, 直至获得纯培养菌株。取患病银龙鱼的鳃丝、鳍条、体表黏液、肠道黏液、血液、肝脏、脾脏和肾脏等样品在显微镜下进行寄生虫检查。

1.3 病原的鉴定

1.3.1 生理生化试验。 将分离纯化后的 YY-2017-3 菌株划线接种于 Shieh 平板, 28 °C 培养 48 h 后, 观察其菌落形态。生理生化试验按参考文献^[5-7]的方法进行。生理生化试验测定项目包括葡萄糖、木糖、蔗糖、麦芽糖、鸟氨酸脱羧、精氨酸脱羧、赖氨酸脱羧、精氨酸水解、尿素、甘露醇、硫化氢、硝酸盐还原、枸橼酸盐、靛基质、七叶苷、明胶、触酶、氧化酶。

1.3.2 分子生物学鉴定。 参照文献^[8]的方法进行分子生物学鉴定, 以提取菌株 YY-2017-3 的基因组 DNA 为模板, 采用细菌 16S rDNA 序列扩增的通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGC-TACCTTGTACGCTT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为: 模板 2 μL, 上下游引物各 0.4 μL (浓度 10 μmol/L), 2 × Mix 20 μL, 补双蒸水至 40 μL。PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。将 PCR 产物切胶回收, 连接 pMD-19T 载体后, 转 *E. coli* TOP10 感受态细胞, 挑取阳性克隆进行测序。将测序结果与已登录 GenBank 数据库的序列

基金项目 天津市水产产业技术体系创新团队项目 (ITTFR 2017008); 天津市自然科学基金项目 (16JCYBJC30000); 天津市农业科技成果转化与推广项目 (201501030)。

作者简介 史谢尧(1990—), 男, 河北宁晋人, 硕士研究生, 研究方向: 水产动物病害研究。* 通讯作者: 冯守明, 研究员, 博士, 硕士生导师, 从事水产动物病害研究; 周文礼, 研究员, 博士, 硕士生导师, 从事渔业资源开发与利用研究。

收稿日期 2018-03-27

进行同源性比对后,从 GenBank 数据库中下载相近种的 16S rDNA 序列,利用 MEGA5.0 软件进行多序列匹配排列,采用邻位相连法(Neighbor-joining)构建系统发育树。

1.4 药敏试验 参照文献[9]的方法进行药敏试验,将 YY-2017-3 菌株接种在 Shieh 培养基中,在 28 °C、150 r/min 培养 48 h 后,6 000 r/min 离心集菌 10 min,用无菌 PBS 将菌液浓度调整至 1×10^8 CFU/mL,取 200 μ L 菌悬液均匀涂布于 Shieh 平板后,贴上药敏纸片,28 °C 培养 48 h 后,观察并记录抑菌圈直径,根据药敏纸片说明书的判定标准进行判定。

1.5 人工回归感染斑马鱼试验 将 60 尾健康斑马鱼(体长 3.2~4.1 cm)随机分成 2 组,分别为感染组和对照组。将水温调节至 28 °C,24 h 不间断曝气,暂养 14 d 后开始试验。感染组采用新鲜活化的 YY-2017-3 菌液浸泡感染,菌液终浓度为 1.0×10^7 CFU/mL;浸泡 1 h 后,将斑马鱼捞出放回水族缸中饲养,对照组添加等量的 Shieh 培养基模拟浸泡感染。试验期间不喂食、不换水,观察感染后斑马鱼的活动情况,记录死亡鱼数量,及时捞走死鱼。对濒死的斑马鱼进行解剖,取鳃部组织在 Shieh 平板划线,根据科赫原则鉴定是否能再次分离到相同的细菌。

2 结果与分析

2.1 发病鱼症状 患病银龙鱼厌食、游泳异常、离群独游并常浮于水体表层,呈缺氧状态;体色暗淡、无光泽,鳃丝发白和部分腐烂。取少量鳃丝置于显微镜下观察,发现大量杆状细菌呈滑行运动。打开腹腔后,未发现内脏异常。

2.2 病原菌的分离和形态学观察 从患病银龙鱼的肝、脾、肾等组织中未分离到细菌,但从鳃部分离到 1 株细菌,暂定名为 YY-2017-3。该菌株在 Shieh 平板上形成大小不一、边缘不整齐、假根状、中央较厚、干燥、淡黄色的菌落(图 1)。

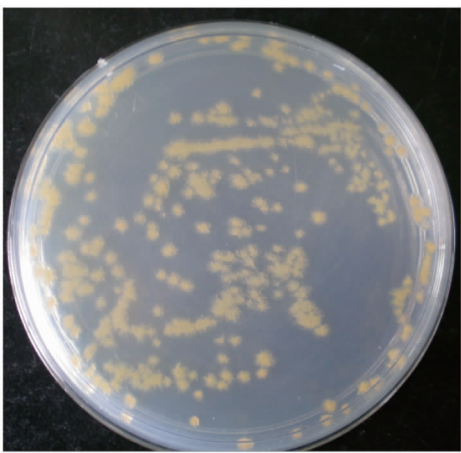


图 1 菌株 YY-2017-3 的菌落形态

Fig.1 Colonial morphology of YY-2017-3 strain

2.3 病原菌的鉴定 通过革兰氏染色,利用光学显微镜观察发现 YY-2017-3 菌株为革兰氏阴性杆菌,有时弯曲成半圆形,无芽胞(图 2)。取菌悬液在显微镜下观察,发现其运动方式为滑行。生理生化试验结果表明,菌株 YY-2017-3 在尿素、硝酸盐还原、触酶、氧化酶、分解明胶反应中表现为

阳性,其他均为阴性(表 1)。

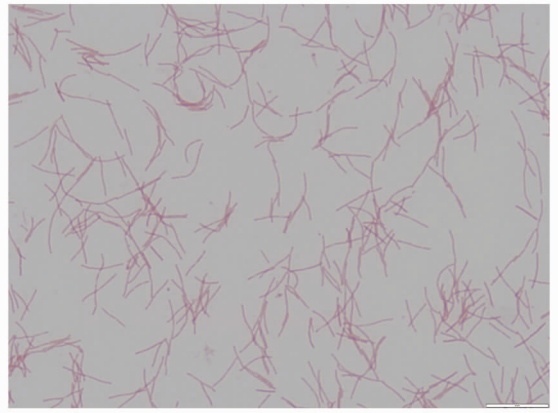


图 2 菌株 YY-2017-3 的革兰氏染色结果

Fig.2 Gram staining results of YY-2017-3 strain

以 YY-2017-3 菌株的总 DNA 为模板,对其 16S rDNA 基因进行 PCR 扩增,得到 1 477 bp 的核酸片段,完成测序后将序列在 NCBI 网站上进行同源性比对,发现其与 *Flavobacterium columnare* strain CF2 同源性最高,达 99%。选用 GenBank 中已登录的部分黄杆菌属细菌的 16S rDNA 基因序列进行匹配排列,构建系统发育树,结果发现 YY-2017-3 菌株与柱状黄杆菌聚成一支(图 3)。综合生理生化试验和分子生物学鉴定结果,可将 YY-2017-3 菌株鉴定为柱状黄杆菌。

2.4 回归感染试验 试验组 30 尾斑马鱼在感染第 3 天开始死亡,在感染后的 7 d 内全部死亡。对照组斑马鱼没有出现任何病症。人工感染后试验鱼表现为反应迟钝、离群独游、体色发黑。对濒死鱼进行解剖检查,发现斑马鱼鳃丝发白。从感染后的病鱼鳃部中再次分离致病细菌,进行生理生化试验,其结果与菌株 YY-2017-3 相一致。

表 1 YY-2017-3 菌株的生理生化试验结果

Table 1 Physiological and biochemical test results of YY-2017-3 strain

测定项目 Determination items	结果 Result	测定项目 Determination items	结果 Result
触酶 Catalase	+	精氨酸脱羧酶 Arginine decarboxylase	-
氧化酶 Oxidase	+	精氨酸水解 Arginine dihydrolase	-
葡萄糖 Glucose	-	鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-
木糖 Xylose	-	赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	-
蔗糖 Sucrose	-	尿素 Urea	+
麦芽糖 Maltose	-	硝酸盐还原 Nitrate reduction	+
甘露醇 Mannitol	-	吲哚 Indole	-
硫化氢 Hydrogen sulfide	-	七叶苷 Esculin	-
枸橼酸盐 Citrate	-	明胶 Gelatin	+

注: +. 阳性; -. 阴性

Note: + stands for positive; - stands for negative

2.5 药敏试验 由表 2 可知,在测定的 16 种抗生素中,菌

株 YY-2017-3 除对氨苄青霉素和罗红霉素敏感外,对其他

抗生素均显示出耐药或中度敏感。

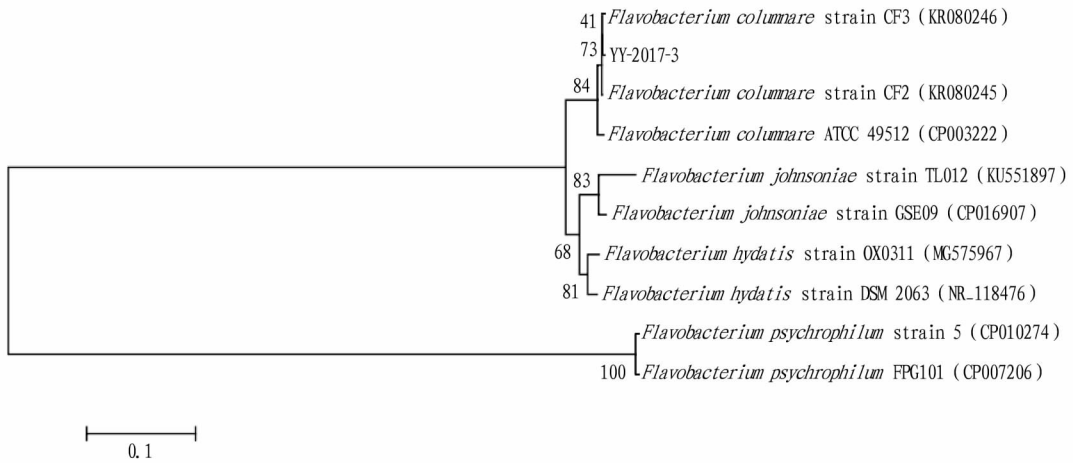


图 3 基于 16S rDNA 基因序列分析的 JY201705 菌株聚类结果

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis results of JY201705 strain based on 16S rDNA gene sequences

表 2 菌株 YY-2017-3 对 16 种抗生素的药敏试验结果

Table 2 The drug sensitivity results of YY-2017-3 strain to 16 kinds of antibiotics

抗生素 Antibiotics	结果 Result	抗生素 Antibiotics	结果 Result
四环素 Tetracycline	R	诺氟沙星 Norfloxacin	R
新霉素 Neomycin	R	环丙沙星 Ciprofloxacin	R
链霉素 Streptomycin	I	氟苯尼考 Florfenicol	I
多粘菌素 Polymyxin B	R	万古霉素 Vancomycin	R
复方新诺明 SMZ-TMP	R	罗红霉素 Roxithromycin	S
卡那霉素 Kanamycin	R	磺胺甲异恶唑 Sulfame-	R
妥布霉素 Tobramycin	R	thoxazole	
左氟沙星 Levofloxacin	R	氧氟沙星 Ofloxacin	R
氨苄青霉素 Ampicillin	S		

注:R. 耐药;I. 中度敏感;S. 敏感

Note:R. Resistant;I. Intermediate;S. Susceptible

3 结论与讨论

柱状黄杆菌是较早被发现和研究的鱼类病原之一,早在 1922 年 Davis^[10] 就从患病细口鲈鱼 (*Micropterus dolomieu*) 和河鲈 (*Perca fluviatilis*) 中首次分离到该菌,并将其名为柱状芽孢杆菌 (*Bacillus columnaris*)。1944 年,该菌被 Ordal 等^[11] 从患病红鲑鱼 (*Oncorhynchus nerka*) 体内分离,并被命名为柱形粒球黏细菌 (*Chondrococcus columnaris*)。1945 年, Gar-njobst^[12] 从牛头鱼 (*Ameiurus nebulosus*) 体表病灶分离到该菌,发现其形态特征与柱形粒球黏细菌相似,但在产子实体方面存在差异,将其命名为柱状噬纤维菌 (*Cytophaga columnaris*)。卢全章等^[13] 于 1975 年从患烂鳃病的草鱼体内分离到柱状黄杆菌 G4 株,并将其命名为鱼害黏球菌 (*Myxococcus piscicola*)。随着细菌分类学研究的深入,对该菌的命名几经更改。1996 年, Bernardet 等^[14] 利用 16S rDNA 基因序列构建系统发育树,并结合生理生化特性进行综合判断,将其定名为柱状黄杆菌。曾用名有柱状粒球黏细菌、鱼害黏球菌、柱状噬纤维菌和柱状屈挠杆菌 (*Flexibacter columnaris*),都是柱状黄杆菌的同物异名^[7,14]。综上可知,对柱状黄杆菌的鉴定和命名,一直存在较大的争议。随着分子生物学的发展,细菌分类鉴定从传统的表型分类进入基因型分类水平。一般认为,

16S rDNA 同源性大于 97.5% 的菌株可视为同种^[15]。为了对从银龙鱼体内分离的细菌进行鉴定,该研究采用分子生物学鉴定和生理生化试验相结合的方法。结果表明,分离菌株 YY-2017-3 的 16S rDNA 基因序列与柱状黄杆菌的同源性达到 99%,并聚为一支,且生理生化特性与其他研究结果^[6-7] 相一致。综合考虑,可将分离菌株 YY-2017-3 鉴定为柱状黄杆菌。

柱状黄杆菌是一种常见的水产动物病原菌,其引发的柱形病又称之为细菌性烂鳃,病给我国水产养殖业造成巨大的经济损失^[16-17]。柱状黄杆菌宿主极为广泛,草鱼、鳊、鲤、鲫等淡水鱼类都为易感品种,此外,也有从淡水观赏鱼中分离到该菌的报道^[18]。笔者首次从银龙鱼中分离到柱状黄杆菌,药敏试验结果表明分离菌株对测定的 16 种药物中只有 2 种显示为敏感,这与其他研究结果^[6,18] 差别较大。尽管在不同的水域环境中同种细菌的药物敏感性可能存在差异,但该研究结果表明从银龙鱼中分离的柱状黄杆菌菌株对 12 种药物显示为耐药,且这些药物中部分药物为人用药物。由于银龙鱼价格昂贵,养殖户为了提高其存活率,可能存在频繁使用药物或滥用药物的情况,从而导致了菌株耐药性的提高。

为了有效防治柱状黄杆菌引发的疾病,国内外学者开展了广泛研究。陈昌福等^[19] 制备了柱状黄杆菌注射疫苗,该疫苗表现出较好的免疫效果,但由于注射免疫操作烦琐,限制了其广泛应用。2011 年,美国农业部研制出柱状黄杆菌的减毒疫苗,通过浸泡免疫可获得较好的免疫保护效果^[20],但减毒疫苗的安全性问题一直存在较大的争议。王良发等^[7] 研究表明柱状黄杆菌至少存在 3 种基因型,不同基因型的柱状黄杆菌疫苗之间是否存在交叉免疫保护尚未确定。我国不同地区柱状黄杆菌的血清型可能存在地域差异。因此,对于高档鱼类,使用本地区分离的病原菌制备成“自家疫苗”进行注射免疫接种应成为今后发展的趋势。

笔者首次从银龙鱼中分离到柱状黄杆菌,扩大了柱状黄杆菌的宿主范围,也为柱状黄杆菌的进化分析、疫苗制备奠定了基础。该研究发现分离株 YY-2017-3 对多种药物显

示耐药,但其耐药机制尚有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 庄树文,吕冬云. 银龙鱼的生物学特性和饲养过程中常见病及其防治[J]. 黑龙江水产,2006(4):33-36.
- [2] 庄树文,吕冬云. 银龙鱼的养殖技术及其鉴赏[J]. 河北渔业,2006(9):54-56.
- [3] 高宏伟,贾秋红,武金星. 西北地区小型温室引进养殖银龙鱼苗的技术要点[J]. 科学养鱼,2018(1):82-83.
- [4] DECOSTERE A, HAESBROUCK F, DEVRIESE L A. Shieh medium supplemented with tobramycin for selective isolation of *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter columnaris*) from diseased fish[J]. J Clin Microbiol, 1997,35(1):322-324.
- [5] 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.
- [6] 张玉蕾,赵丽娟,周伟东,等. 黄颡鱼源柱状黄杆菌的分离鉴定及其对翘嘴鲌的致病性[J]. 华中农业大学学报,2016,35(2):83-89.
- [7] 王良发,谢海侠,张金,等. 我国淡水鱼类柱形病原菌柱状黄杆菌的遗传多样性[J]. 水生生物学报,2010,34(2):367-377.
- [8] 罗璋,许杰,韩进刚,等. 银鼓鱼病原菌(海豚链球菌)的分离与鉴定[J]. 华中农业大学学报,2012,31(1):95-99.
- [9] LUO Z, BAI X H, XU Y X, et al. Recovery of *Pseudomonas aeruginosa* from diseased grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) in China [J]. The Israeli journal of aquaculture, 2017, 67:1206-1212.
- [10] DAVIS H S. A new bacterial disease of fresh-water fishes[J]. Bulletin of the U S bureau of fisheries, 1922, 38:261-280.
- [11] ORDAL E J, RUCKER R R. Pathogenic myxobacteria[J]. Experimental biology and medicine, 1944, 56:15-18.

- [12] GARNJOBST L. *Cytophaga columnaris* (Davis) in pure culture: A myxobacterium pathogenic to fish[J]. Journal of bacteriology, 1945, 49(2):113-128.
- [13] 卢全章,倪达书,葛蕊芳. 草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)烂鳃病的研究I. 细菌性病原的研究[J]. 水生生物学集刊, 1975, 5(3):315-334.
- [14] BERNARDET J F, SEGERS P, VANCANNEYT M, et al. Cutting a Gordian knot: Emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family Flavobacteriaceae, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978) [J]. International journal of systematic bacteriology, 1996, 46(1):128-148.
- [15] 刘礼辉,李宁求,石存斌,等. 斑点叉尾鲷烂鳃病原柱状黄杆菌的分离及鉴定[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(17):7124-7126.
- [16] OLIVARES-FUSTER O, BAKER J L, TERHUNE J S, et al. Host-specific association between *Flavobacterium columnare* genomovars and fish species [J]. Systematic and applied microbiology, 2007, 30(8):624-633.
- [17] 黄锦炉,汪开毓,黄艺丹,等. 水生动物致病病菌——柱状黄杆菌研究进展[J]. 中国水产, 2009(10):59-61.
- [18] 徐晓丽,邵蓬,崔宽宽,等. 剑尾鱼烂鳃、烂尾病病原菌的分离鉴定[J]. 淡水渔业, 2014, 44(1):66-72.
- [19] 陈昌福,曾妍雄,楠田理一. 培养时间对柱状嗜纤维菌脂多糖蛋白质成分和免疫原性的影响[J]. 华中农业大学学报, 2000, 19(2):159-162.
- [20] SHOEMAKER C A, KLESIUS P H, DRENNAN J D, et al. Efficacy of a modified live *Flavobacterium columnare* vaccine in fish[J]. Fish & shellfish immunology, 2011, 30(1):304-308.

(上接第59页)

经统计比对,经自治区人民政府批准的大陆自然岸线以下的海域部分和第二次全国土地调查成果陆域部范围存在重叠和空隙的情况。其中,重叠区域面积60 479 km²,空隙面积354 km²,重叠区域和空隙区域导致海洋和国土管理部门的管理界线不明确,不利于用海、用地统筹保障工作,给实际管理工作带来一定问题。经分析,一是由于调查岸线的技术定义不统一造成。海岸线修测依据《海岸线调查技术规程》以多年平均大潮高潮线为准,土地调查以0 m等深线为准。二是因为历史遗留用海等问题,部分重叠区域已发放土地使用权证书或养殖证。建议由自治区级政府部门牵头,在尊重历史、保障群众权益、加强海域资源保护与利用基础上,组织对海岸线和土地调查界线进行重新勘测划定,结合海域自然属性和社会属性进行管理界线的划定。

6 结论与讨论

通过广西海洋主体功能区遥感核查,查清了广西海洋主体功能区的海域利用现状。在调查过程中发现,广西海洋的用海项目用海方式相对单一,项目多为港口码头运输类项目,用海方式多为交通运输类,旅游娱乐用海、工业用海、渔

业用海等项目较少,未能实现海洋资源多功能使用,实现海洋经济价值;同时一些项目还发现批而不填、围而不建、圈占浪费海域资源等现象。为实现海域资源的节约集约利用和优化配置、挖掘海洋使用资源潜力,建议对闲置海域区分不同情形,分别采取协商、责令限期开发利用、收回海域使用权等方式进行处置。

参考文献

- [1] 王桥,王文杰,郑丙耀,等. 中国西部地区生态环境现状遥感调查[J]. 遥感学报, 2003, 7(6):490-497.
- [2] 黄家柱,赵锐,戴锦芳. 遥感与GIS在长江三角洲地区资源与环境动态监测中的应用[J]. 长江流域资源与环境, 2000, 9(1):34-39.
- [3] 王秀萍,蒋廷臣,殷飞,等. 基于遥感影像的江苏省海域使用现状与分析[J]. 淮海工学院学报(自然科学版), 2017, 26(1):82-87.
- [4] 王文龙,黄中和,乔伟,等. 低空航摄系统开展地理国情外业调查研究[J]. 地理空间信息, 2017, 15(10):24-26.
- [5] 王长耀,布和傲斯尔,狄小春. 遥感技术在全球环境变化研究中的作用[J]. 地球科学进展, 1998, 13(3):278-284.
- [6] 李四海,刘振民,何广顺,等. 天津海域遥感图像解译应用系统[J]. 海洋测绘, 2005, 25(4):13-15.
- [7] 滕志坤,刘继永,李兴隆. 黑龙江省生态环境现状遥感野外核查[J]. 环境科学与管理, 2005, 30(5):57-58.
- [8] 陈超,宋卓人,张为民,等. 杭州地区生态环境遥感解译及野外核查[J]. 数字城市, 2009, 4(2):35-37.

本刊提示 参考文献只列主要的、公开发表的文献,序号按文中出现先后编排。著录格式(含标点)如下:(1)期刊——作者(不超过3人者全部写出,超过者只写前3位,后加“等”)。文章题名[J]。期刊名,年份,卷(期):起止页码。(2)图书——编著者.书名[M]。版次(第一版不写)。出版地:出版者,出版年:起止页码。(3)论文集——析出文献作者.题名[C]//.主编.论文集名.出版地:出版者,出版年:起止页码。

文稿题名下写清作者及其工作单位名称、邮政编码;第一页地脚注明第一作者简介,格式如下:“作者简介:姓名(出生年—),性别,籍贯,学历,职称或职务,研究方向”。