

一株溶藻弧菌 H1B6 的分离与鉴定

李卓昱¹, 鲍玉杰¹, 尚玉曼¹, 袁增智^{1,2*}

(1. 天津师范大学生命科学学院, 天津 300387; 2. 天津市动植物抗性重点实验室, 天津 300387)

摘要 从患病的半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*) 溃疡体表处筛选到一株 H1B6 优势菌株, 根据形态观察、16S rDNA 检测、生理生化鉴定结果, H1B6 菌株与溶藻弧菌最为接近, 而在以 16S rDNA 序列构建的系统发育进化树模型中, H1B6 菌株也与溶藻弧菌菌株聚为一支。Biolog 微生物鉴定结果显示, H1B6 菌株为溶藻弧菌的可能性为 98.6%, 确定 H1B6 菌株为溶藻弧菌。斑马鱼攻毒试验结果显示, H1B6 菌株 24 h 的半数致死浓度 (LD₅₀) 为 4.58×10⁶ CFU/mL。

关键词 半滑舌鲷; 溶藻弧菌; 16S rDNA; LD₅₀; Biolog

中图分类号 S917 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)05-0100-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.05.027



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Isolation and Identification of a Strain of *Vibrio alginolyticus*

LI Zhuo-yu, BAO Yu-jie, SHANG Yu-man et al (College of Life Sciences, Tianjin Normal University, Tianjin 300387)

Abstract A dominant strain of H1B6 was isolated from the ulcer surface of diseased *Cynoglossus semilaevis*. According to morphological observation, 16S rDNA sequencing, physiological and biochemical identification results, H1B6 strain was suspected as *Vibrio alginolyticus*. According to the phylogenetic tree model constructed by 16S rDNA sequence, H1B6 strain was clustered with *Vibrio alginolyticus* strains. Furthermore, H1B6 strain was finally identified as *Vibrio alginolyticus* by using Biolog microbial identification test, and the probability (PROB value) was 98.6%. H1B6 strain's acute toxicity test on zebrafish was performed and half lethal concentration (LD₅₀) after 24 hours was determined as 4.58×10⁶ CFU/mL.

Key words *Cynoglossus semilaevis*; *Vibrio alginolyticus*; 16S rDNA; LD₅₀; Biolog

半滑舌鲷是我国北方重要的海水养殖鱼类, 隶属鲷形目 (Pleuronectiformes) 舌鲷科 (Cnoglossidae) 舌鲷属 (*Cynoglossus*), 作为一种深受广大消费者欢迎的鱼种, 具有较高的经济食用价值^[1]。近年来, 各类疾病的出现使半滑舌鲷的健康状况和养殖事业受到极大威胁, 其中以细菌性疾病居多。例如, 天津地区海水养殖场中的半滑舌鲷发生了以鱼鳍基部出血、体表溃烂、拒食并最终死亡等症状为特征的体表溃疡病, 严重影响了养殖半滑舌鲷的产量。徐晓丽等^[2]已从患病的半滑舌鲷体表病灶分离到哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 和鱼肠道弧菌 (*Vibrio ichthyenteri*), 经回感试验证实这 2 株菌可使半滑舌鲷患病死亡, 确定其为半滑舌鲷体表溃疡病的致病菌。高桂生等^[3]从自然发病的半滑舌鲷肝脏和肾脏处分离到一株荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*), 人工感染试验发现该菌可以引起半滑舌鲷全身性细菌败血症。王燕^[4]认为美人鱼发光杆菌杀鱼亚种为患病舌鲷的病原菌。为进一步阐明养殖半滑舌鲷体表溃疡病病原及发病机制, 笔者开展了相关病原菌的筛选工作, 并从患溃疡病的半滑舌鲷体表筛选出一株溶藻弧菌, 编号为 H1B6, 从形态观察、生理生化鉴定、Biolog 微生物鉴定、16S rDNA 序列分析方面对分离菌株进行了鉴定, 旨在探究其致病性, 为今后半滑舌鲷溃疡病的防控与治疗提供一定的科学依据。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 培养基。TCBS: 称取该成品 30.0 g 溶于 1 L 蒸馏水

中, 搅拌使其溶解, 将 pH 调至 (7.3±0.2), 并使用高压灭菌锅 121 °C 下高压灭菌 15 min, 铺平板备用。2216E 琼脂: 称取该成品 52.3 g 溶于 1 L 蒸馏水中, 搅拌使其溶解, 将 pH 调至 (7.3±0.2), 并使用高压灭菌锅 121 °C 高压灭菌 15 min, 铺平板备用。TCBS 和 2216E 琼脂购自北京陆桥技术股份有限公司。

1.1.2 试剂与仪器。

1.1.2.1 试剂。2×Taq PCR Master Mix 购自博迈德生物有限公司; 生化鉴定管购自杭州微生物试剂有限公司; Biolog GEN III 鉴定板购自基因有限公司。

1.1.2.2 仪器。超净工作台 (SW-CJ-1FD, 江苏通净)、高压灭菌锅 (SX-500, 江阴滨江医疗有限公司)、pH 计 (METTER TOLEDO, 北京六一仪器厂)、离心机 (Centrifuge5415R Eppendorf)、PCR 仪 (BIO-RAD)、恒温培养箱 (SPX-150B-D, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂)、数显恒温水浴锅 (HH-3A 型, 金坛市金南仪器制造有限公司)、电泳仪 (DYY-6C 型, 北京六一仪器厂)、全自动微生物鉴定系统 (MicroStation Biolog)。

1.1.3 试验动物。患病的半滑舌鲷取自天津市海发珍品实业发展有限公司, 体长约 20 cm, 攻毒用斑马鱼购自天津市中环花鸟鱼虫市场, 体长 4~6 cm。

1.2 方法

1.2.1 病原菌的分离。取患溃疡病的半滑舌鲷, 病鱼表现为体表溃烂、腹部肿胀、活力减弱。在超净工作台中用无菌棉球擦拭病鱼体表溃烂处, 取接种环轻轻蘸拭溃烂处, 接种于 TCBS 及 2216E 固体培养基上。28 °C 下恒温培养 24 h, 选取优势菌种进行分离与纯化, 将连续分离、纯化 3 次得到的菌株置于甘油中保种, -80 °C 下保存备用。

基金项目 天津师范大学博士基金资助项目 (52XB1412)。

作者简介 李卓昱 (1992—), 女, 山西长治人, 硕士研究生, 研究方向: 水生生物分子生物学。* 通信作者, 讲师, 从事水产动物病害学研究。

收稿日期 2019-01-11

1.2.2 16S rDNA 检测。

1.2.2.1 16S rDNA 的 PCR 扩增。该试验从患病的半滑舌鲷体表溃烂处分离到一株优势菌株,命名为 H1B6,将纯化得到的 H1B6 菌株在 TSB 液体培养基中 37 ℃,220 r/min 过夜培养 16 h,分别取 200 μL 菌液 100 ℃ 沸水煮 10 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清即 DNA 作为 PCR 模板。PCR 反应体系如下:模板 1 μL、混合引物 1 μL、2×Taq PCR MasterMix 12.5 μL、无菌水 10.5 μL。PCR 反应条件如下:预变性 94 ℃,2 min;变性 94 ℃ 30 s、退火 58 ℃ 30 s、延伸 72 ℃,30 s;终延伸 72 ℃ 2 min。PCR 引物为细菌 16S rDNA 的通用引物,正向引物 27F 为 AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG,反向引物 1492R 为 GGTACCTTGTACGACTT,由华大基因合成。

1.2.2.2 PCR 产物的检测及序列分析。取 2 μL PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测。上述 PCR 产物由上海生工生物工程有限公司测序,测序结果通过 NCBI 网站的 BLAST 检索系统进行同源序列比对分析,从中选取高度相似序列,使用 MEGA6(Molecular evolutionary genetics analysis,MEGA)软件构建 16S rDNA 的系统进化树。

1.2.3 生理生化鉴定。将纯化得到的 H1B6 菌株划线于 TSB 培养基上,28 ℃ 培养 24 h 后,使用无菌牙签挑取单菌落接种于生化鉴定管中,置于 37 ℃ 恒温培养箱中培养 24 h,观察其颜色变化。参照《伯杰氏细菌鉴定手册》^[5],确定其生理生化特性。

1.2.4 Biolog 微生物鉴定。将 H1B6 菌株置于 TSB 平板上活化 2 次,次日使用无菌棉签挑取单菌落接种于 B 接种液中,充分混合均匀后将其浊度调至(95±1)%,每孔 100 μL 加至 GEN III 鉴定板上,33 ℃ 下培养 16~24 h。在鉴定操作软件中设置相应参数选项(鉴定板号码、鉴定板类型、参照规程和培养时间)后将鉴定板放入 OmniLog 读数仪,经与数据库比对后进行结果分析,并将所得数据进行保存。

1.2.5 斑马鱼攻毒试验。将斑马鱼实验室饲养水温控制在(28±1)℃,观察 7 d 确认健康状态良好后进行细菌攻毒试验。将培养至对数生长期的 H1B6 菌株浓度分别调至 10⁸、10⁷、10⁶、10⁵ CFU/mL,并使用微量注射器通过腹腔对成年斑马鱼进行注射刺激,对照组注射等量的生理盐水,每组 5 只,24 h 内统计其死亡率并观察鱼体是否出现异常现象。试验结果参考李翠萍等^[6]的计算方法建立线性回归方程,计算 LD₅₀。

2 结果与分析

2.1 病鱼临床症状 患体表溃疡病的半滑舌鲷发病前期体表出现大量白色溃疡点,活力减弱,摄食减少。随着病情的加重,溃疡面积逐渐增大,可引发大面积溃烂现象,甚至断尾,肠道肿大,鼓出,几乎脱出肛外(图 1),严重时可致死。

2.2 病原菌分离结果及形态特征 该试验筛选到一株优势菌株,编号 H1B6,革兰氏染色结果呈阴性,呈短杆状(图 2)。该菌株在 2216E 培养基上呈 1~2 mm 圆形状,无色透明,有扩散趋势,有黏性,不易挑起。该菌株在绿色 TCBS 培养基上

为黄色圆形菌落,表面光滑,富有黏性,见图 3。

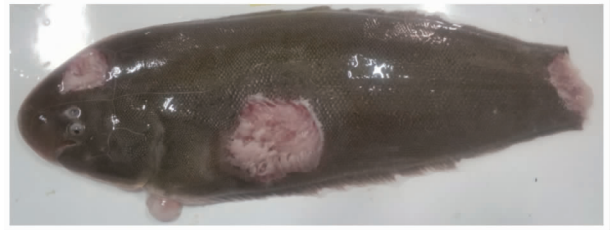


图 1 患溃疡病的半滑舌鲷

Fig. 1 *Cynoglossus semilaevis* Günther diseased with canker

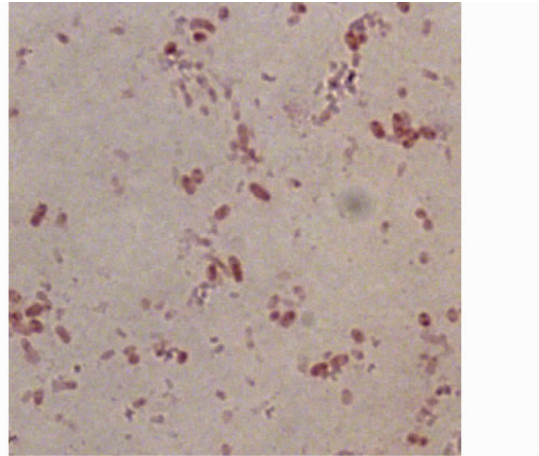


图 2 H1B6 菌株的革兰氏染色结果

Fig. 2 Gram staining result of H1B6 strain

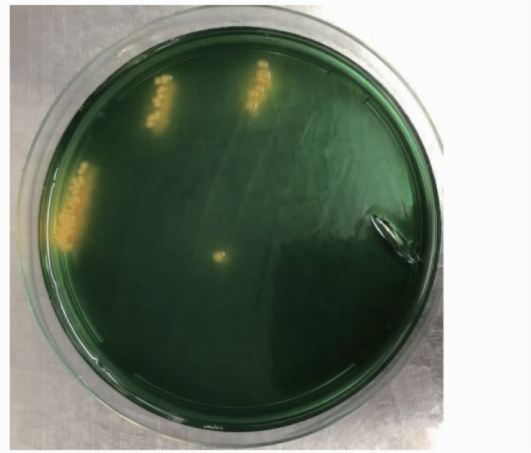
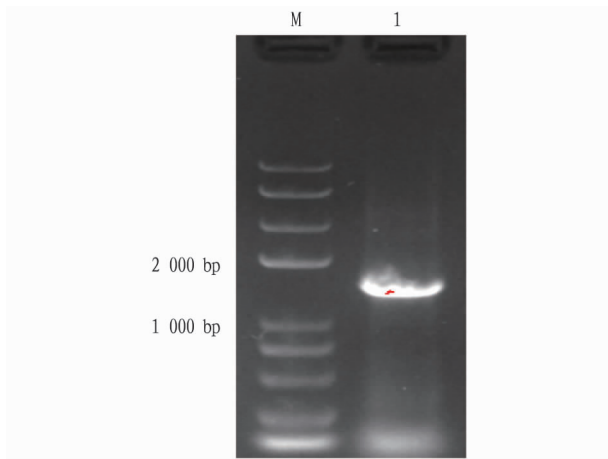


图 3 TCBS 培养基上 H1B6 菌株的菌落特征

Fig. 3 Colony features of H1B6 strain on TCBS plate

2.3 16S rDNA 序列分析及进化树分析 以细菌 DNA 为模板,对其进行 16S rDNA 基因的 PCR 扩增,发现条带单一,有一条 1 500 bp 左右大小与预期相符的单一一条带(图 4)。将序列拼接片段在 NCBI 网站上进行 BLAST 比对,发现菌株 16S rDNA 基因为弧菌属,其中与副溶血性弧菌(序列号为 KX860115.1)同源性高达 100%,与溶藻弧菌(序列号为 KT986175.1)同源性也高达 100%,由此可初步判定 H1B6 致病菌为弧菌属。与找到的与其同源性较高的序列进行系统发育进化树分析(图 5),图 5 显示 H1B6 菌株与溶藻弧菌聚为一支。



注: M. DNA marker; 1. 16S rDNA

图4 H1B6菌株16S rDNA序列的PCR扩增结果

Fig. 4 PCR amplification results of 16S rDNA sequence of H1B6 strain

2.4 生理生化鉴定 生化鉴定结果(表1)表明,该菌株在

3%NaCl 中可正常生长,可将葡萄糖分解为丙酮酸,丙酮酸继续分解,产生甲酸、乳酸等,在 M-R 反应中呈阳性。对蔗糖、甘露醇、赖氨酸、鸟氨酸的利用呈阳性,不可利用乳糖、精氨酸和硫化氢,V-P 反应呈阴性。将鉴定结果与《伯杰氏细菌鉴定手册》中弧菌属性状进行比较^[7-8],可确定 H1B6 菌株与溶藻弧菌最为相似。

2.5 Biolog 微生物鉴定结果 利用 GEN III 鉴定板对菌株 H1B6 的碳源利用及化学敏感性进行检测,鉴定结果如图 6 所示。菌株 H1B3 呈阳性反应的有 24 个,呈阴性反应的有 42 个,呈边界值的反应的有 30 个。碳源利用检测呈阳性反应的有 11 个,呈阴性反应的有 36 个。化学敏感性检测呈阳性反应的有 13 个,呈阴性反应的有 6 个。根据 2 个重要的鉴定参数 SIM(相似性)及 DIST(距离)可知,当 SIM 越接近于 1,则相似性越高;若 DIST 小于 5,即可确定其菌株分类。Biolog 鉴定结果如表 2 所示,H1B6 菌株为溶藻弧菌的 PROB(可能性值)为 0.986,SIM 和 DIST 值均在可接受范围内,因此确定 H1B6 菌株为溶藻弧菌。

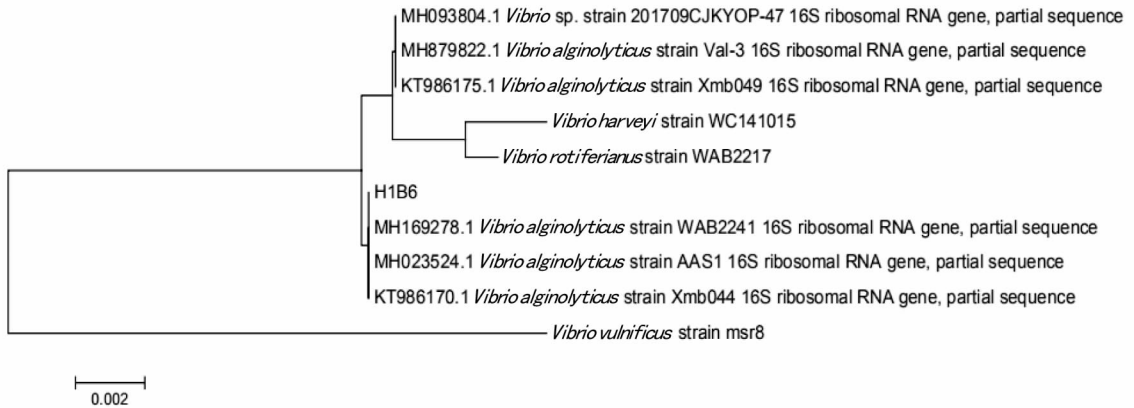


图5 H1B6菌株16S rDNA序列系统进化树分析

Fig. 5 The phylogenetic tree analysis of 16S rDNA sequence of H1B6 strain

表1 分离菌株的生化鉴定结果

Table 1 Biochemical identification results of isolated bacteria strain

鉴定项目 Identification item	检测结果 Detection results	阳性对照 Positive control	鉴定项目 Identification item	检测结果 Detection results	阳性对照 Positive control
葡萄糖 Glucose(3%NaCl)	+	+	M-R	+	+
蔗糖 Sucrose(3%NaCl)	+	+	V-P	-	-
乳糖 Lactose(3%NaCl)	-	-	蛋白胨水 Peptone water(3%NaCl)	+	+
甘露醇 Mannitol(3%NaCl)	+	+	赖氨酸 Lysine(3%NaCl)	+	V
硫化氢 Hydrogen sulfide(3%NaCl)	-	-	鸟氨酸 Ornithine(3%NaCl)	+	+
精氨酸 Arginine(3%NaCl)	-	-			

注:+为阳性,-为阴性,V为可变

Note: +, - and V stand for positive, negative and variable results, respectively

2.6 斑马鱼毒力试验结果 毒力试验结果如表 3 所示,腹腔注射 6 h 开始,Ⅲ、Ⅳ组斑马鱼表现出明显的食欲不振、活力下降、失去方向感,并开始死亡。观察死鱼发现其体表充血,鱼体泛白,黏液增多,腹部肿胀,尾部呈上翘状,具有典型的急性细菌感染败血症病理变化特征,如图 7 所示。Ⅳ组 12 h 死亡率达 100%,Ⅲ组 24 h 内全部死亡,Ⅱ组累计死亡率仅为 20%,此后再无死亡现象,Ⅰ组和空白对照(CK)组无死亡现象。使用 SPSS 16.0 统计软件建立线性回归方程 $y = 10^{7x} - 414 286 (R^2 = 0.988 4)$,由该公式计算出 H1B6 菌株的

24 h LD₅₀ 值为 4.58×10^6 CFU/mL。

3 讨论

该研究从患病的半滑舌鲷体表溃烂处分离得到一株菌株 H1B6,根据 16S rDNA 序列测定和生理生化鉴定结果判定该菌株为溶藻弧菌。16S rDNA 被称为“细菌化石”,是细菌系统分类研究中最常用的分子标尺^[9]。16S rDNA 序列测序结果显示,H1B6 菌株与溶藻弧菌、副溶血弧菌都具有高达 100%的同源性,但由于缺少生理生化水平的证据,因此将其确定到种还缺乏强有力证据。由于不同细菌的代谢酶系统

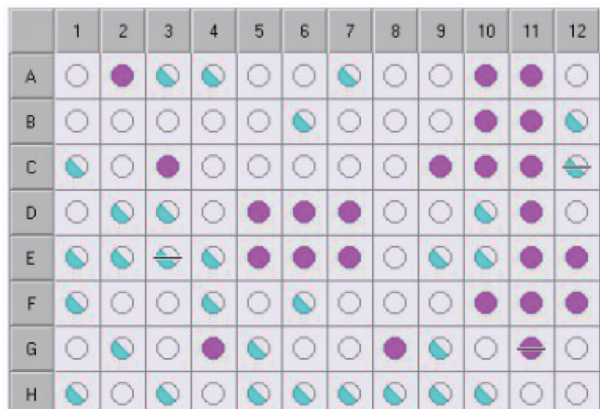


图 6 菌株 H1B6 在 GEN III 鉴定板上的鉴定结果

Fig. 6 Reactions of strain H1B6 on GEN III identification plate

表 2 Biolog 微生物鉴定结果

Table 2 The results of Biolog microbial identification test

编号 No.	PROB	SIM	DIST	物种 Species
1	0.986	0.776	2.964	<i>Vibrio alginolyticus</i>
2	0.006	0.004	6.204	<i>Vibrio harveyi</i>
3	0.006	0.003	6.255	<i>Vibrio aestuarianus</i>
4	0.002	0.001	6.970	<i>Vibrio splendidus</i>

差异,对糖类、脂质、蛋白质等的利用也不同^[10],利用此特征,使用生化鉴定管建立生化反应,结果参照《伯杰氏细菌鉴定手册》和已有研究中的溶藻弧菌特性^[8,10-11]比较,确定 H1B6 菌株与溶藻弧菌最为相似。使用 Biolog 鉴定法,利用细菌对不同碳源代谢率差异,进一步确定了 H1B6 菌株为溶藻弧菌。

表 3 斑马鱼人工感染试验结果

Table 3 The results of zebrafish's artificial infection test

浓度 Concentration CFU/mL	死亡数 Dead number//尾							总计 Total	累计死亡率 Accumulative mortality rate//%
	6 h	9 h	12 h	15 h	18 h	21 h	24 h		
10 ⁵ (I)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁶ (II)	0	0	0	1	0	0	0	1	20
10 ⁷ (III)	1	1	0	0	0	0	3	5	100
10 ⁸ (IV)	0	2	3	0	0	0	0	5	100
75%NaCl(CK)	0	0	0	0	0	0	0	0	0



注:A. 感染斑马鱼;B. 健康的斑马鱼

Note: A. Infected zebrafish; B. Healthy zebrafish

图 7 感染溶藻弧菌斑马鱼的临床症状

Fig. 7 Clinical symptoms of zebrafish infected with *V. alginolyticus*

溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)是一种普遍存在于海水及淡水中的条件性致病菌,可感染水环境中的各类宿主^[12]。目前已从凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[11]、法老乌贼(*Sepia pharaonis*)^[13]、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)^[14]、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[15]等生物体内分离出该菌,并发现其可引发病害。Lv 等^[13]从患病的法老乌贼(*Sepia pharaonis*)体内分离得到溶藻弧菌 Wz11 菌株,并证实该菌株在皮肤粘液以及组织液中有较高存活力,是法老乌贼的潜在致病菌。Xie 等^[16]通过对引起中国南海西沙群岛的珊瑚感染珊瑚病 PAWS 的成因分析,筛选到 2 株优势菌种(XSBZ03 和 XSBZ14),经过 Biolog 鉴定、16S rRNA 序列分析、生化反应,均证实这 2 株菌为溶藻弧菌。因此,笔者认为其是 PAWS 病的致病因子,并随水的转移导致长期感染。

斑马鱼作为模式生物,具有遗传背景清楚、易于获得、饲养及操作简便等优点,因此被越来越多地运用于病原毒力分

析研究中。李亚军等^[17]分析了裂腹鱼源无乳链球菌血清型 Ia(S07)和Ⅲ型(S03)毒力的差异性,分别腹腔接种不同浓度的 S07 和 S03 菌株于斑马鱼体内,结果显示 S07 株对斑马鱼的 LD₅₀ 值为 1.88×10³ CFU/mL, S03 株对斑马鱼的 LD₅₀ 值为 7.09×10⁷ CFU/mL,表明 Ia 毒力显著高于Ⅲ型。高艳侠等^[18]从健康的尼罗罗非鱼体内筛选出一株益生菌 LF01,并对其进行了生物安全性检测,表明 LF01 株对罗非鱼、斑马鱼、乌鳢 3 种鱼均具有良好的安全性,即使在高浓度制剂感染下也无任何临床症状。该研究中也斑马鱼作为检验分离菌株毒力的模型。通过人工感染试验发现, H1B6 菌株对斑马鱼具有急性感染能力,毒力较强,提示该菌可能是导致半滑舌鲷体表溃疡病的病因之一。在此基础上,今后还需要开展进一步的研究工作,以探索该菌株的致病机制以及对半滑舌鲷的致病力,为半滑舌鲷体表溃疡病的防治提供理论基础。

(下转第 146 页)

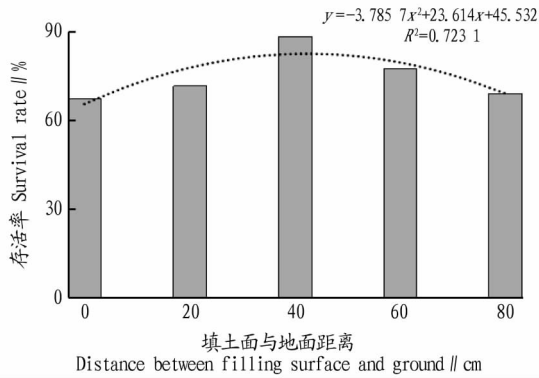


图3 不同深度栽培大樱桃存活率

Fig. 3 Survival rate of large cherry cultivated at different depths

群随之出现衰退^[13]。一般情况下,造林后,耕作强度降低,林地状态相对稳定,鼯鼠种群密度较原来会有所提高^[14]。该试验中,由于欧美大樱桃植株个体偏小,且在试验期内,在保证深坑完整的情况下,每年对试验区的空地翻整,每月进行人工除草,破坏了林地土壤的稳定性。栽培深度改变的情况下,土壤养分含量、透气性、含水量、土壤密度等理化性质发生改变^[15-19]。温度和湿度对甘肃鼯鼠体重有显著的影响,鼯鼠对植物的取食及生存环境有一定的选择性^[20]。各种原因综合导致了部分大樱桃不明原因死亡及鼯鼠活动量的变化,可能对试验结果产生一定的影响。

参考文献

- [1] 许彦平,姚晓红,乔艳君. 甘肃小陇山林区甘肃鼯鼠危害面积的气象预测预报技术研究[J]. 地球科学进展, 2011, 26(8): 881-886.
- [2] NOLTE D L. Developing approaches to reduce wildlife damage to forest resources[J]. Western forester, 2003(8): 234-256.

(上接第 103 页)

参考文献

- [1] 周红霞. 半滑舌鳎溃疡相关气单胞菌的鉴定及其致病性研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2017.
- [2] 徐晓丽, 邵蓬, 李贺密, 等. 半滑舌鳎体表溃疡病原的分离鉴定[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2015, 45(11): 29-35.
- [3] 高桂生, 张艳英, 吉志新, 等. 半滑舌鳎致病性荧光假单胞菌的分离鉴定及其感染的病理损伤[J]. 中国兽医学报, 2016, 36(7): 1145-1150.
- [4] 王燕. 两株海洋病原菌的分离鉴定、致病机理研究及三株海洋新菌的分类鉴定[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
- [5] HOLT J G, KRIEG N R, SNEATH P H A, et al. Bergey's manual of determinative bacteriology [M]. 9th ed. Maryland: Williams & Wilkins, 1994.
- [6] 李翠萍, 吴民耀, 王宏元. 3种半数致死浓度计算方法之比较[J]. 动物医学进展, 2012, 33(9): 89-92.
- [7] 聂忠学, 张谷岩, 聂晶, 等. 溶藻弧菌的生化特征与中毒表现[J]. 贵州医药, 1995(4): 252-253.
- [8] 祝玲, 吴忠业, 林阿乞, 等. 引发杂色鲍苗掉板死亡的溶藻弧菌分离鉴定及毒力分析[J]. 水利渔业, 2008, 28(3): 97-99.
- [9] 丁云娟, 彭勇, 林洪, 等. 一株副溶血弧菌 qdFsVp001 的分离与鉴定[J]. 海洋湖沼通报, 2012(3): 44-49.
- [10] 苗鹏飞, 杨映, 谭淑雯, 等. 罗氏沼虾致病性溶藻弧菌的鉴定及药敏分析[J]. 水产科学, 2018, 37(3): 384-388.
- [11] 付汉清, 林茂, 翟少伟, 等. 一株宽谱裂解性溶藻弧菌噬菌体 ΦV170 的

- [3] 郭永旺. 2017年全国农区鼠害发生趋势分析[J]. 中国植保导刊, 2017, 37(2): 50-52.
- [4] 呼生荣. 延安地区甘肃鼯鼠发生特点与防治对策[J]. 陕西林业科技, 2005(3): 24-25.
- [5] 韩崇选, 李金钢, 杨学军, 等. 中国农林啮齿动物与科学管理[M]. 杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2005: 197-234.
- [6] 李学军. 谈甘肃鼯鼠对林业的危害及防治[J]. 农业开发与装备, 2017(11): 187.
- [7] 陈生海. 湟源县高原鼯鼠危险性分析[J]. 现代农业科技, 2017(19): 125-126.
- [8] 韩崇选, 杨学军, 王明春, 等. 林区鼯鼠的综合管理研究[J]. 西北林学院学报, 2002, 17(3): 53-57.
- [9] 韩崇选, 杨林. 鼠类的危害与可持续控制技术[J]. 西北林学院学报, 2003, 18(1): 49-52.
- [10] 李建康, 王春燕, 王培新, 等. 不同整地方式对鼯鼠危害油松抑制作用研究[J]. 西北林学院学报, 2015, 30(4): 153-164.
- [11] 张惠, 申世永, 张耀. 榆林市大樱桃引种栽培适应性研究[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(04): 45-46.
- [12] 文沛. 大樱桃设施栽培技术初步研究[J]. 现代农业, 2016(4): 6-7.
- [13] 辛晓辉, 董晓波, 杨泽春, 等. 黄土高原次改林地林下植被与鼯鼠种群结构的关系[J]. 西北林学院学报, 2009, 24(3): 118-125.
- [14] 韩崇选, 张放, 李惠萍, 等. 退耕还林不同整地方式油松林地鼯鼠种群动态研究[J]. 西北林学院学报, 2010, 25(4): 120-126.
- [15] 刘志鹏. 黄土高原地区土壤养分的空间分布及其影响因素[D]. 西安: 中国科学院研究生院(教育部水土保持与生态环境研究中心), 2013.
- [16] GUAN F Y, XIA M P, TANG X L, et al. Spatial variability of soil nitrogen, phosphorus and potassium contents in Moso bamboo forests in Yong'an City, China[J]. CATENA, 2017, 150: 161-172.
- [17] 刘吉平, 吕宪国, 杨青, 等. 三江平原环型湿地土壤养分的空间分布规律[J]. 土壤学报, 2006, 43(2): 247-255.
- [18] 王军, 傅伯杰, 邱扬, 等. 黄土高原小流域土壤养分空间异质性[J]. 生态学报, 2002, 22(8): 1173-1178.
- [19] SHAO H B, LU H Y, XU G, et al. Integration into plant biology and soil science has provided insights into the total environment[J]. Science of the total environment, 2017, 579: 928-929.
- [20] 徐世才, 王丽娟, 王欢, 等. 不同环境因子对甘肃鼯鼠体重的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(13): 243-246.

分离鉴定及生物学特性[J/OL]. 微生物学通报, 2018-06-25 [2018-12-16]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1996.Q.20180622.1513.004.html>. DOI: 10.13344/j.microbiol.china.180244.

- [12] 焦彦凯, 严小军, 李小兵. 溶藻细菌及溶藻化合物研究进展[J]. 工业微生物, 2018, 48(4): 56-62.
- [13] LV T T, SONG T X, LIU H J, et al. Isolation and characterization of a virulence related *Vibrio alginolyticus* strain Wz11 pathogenic to cuttlefish, *Sepia pharaonis* [J]. Microbial pathogenesis, 2019, 126: 165-171.
- [14] 傅超英, 王建平, 孙琛, 等. 大黄鱼主要致病细菌拮抗菌株的分离鉴定、抑菌谱及安全性分析[J/OL]. 生物技术通报, 2018-09-25 [2018-12-16]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2396.Q.20180921.1144.004.html>. DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2018-0565.
- [15] 姜燕, 崔晓翠, 张正, 等. 养殖大菱鲆肠炎病的流行病学和病原学研究[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(17): 123-126.
- [16] XIE Z Y, KE S W, HU C Q, et al. First characterization of bacterial pathogen, *Vibrio alginolyticus*, for *Porites andrewsi* White syndrome in the South China Sea [J]. PLoS One, 2013, 8(9): 1-8.
- [17] 李亚军, 耿毅, 余泽辉, 等. 两株不同血清型鱼源无乳链球菌生物学特性的比较研究[J]. 中国预防兽医学报, 2018, 40(12): 1122-1127.
- [18] 高艳侠, 张德锋, 可小丽, 等. 罗非鱼源无乳链球菌肠道拮抗芽孢杆菌的筛选及其生物学特性[J/OL]. 微生物学报, 2018-11-29 [2019-01-05]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1995.Q.20181127.1603.014.html>. DOI: 10.13343/j.cnki.wxsb.20180368.