

虹鳟细菌性疾病病原菌分离鉴定及药敏试验

冯栋梁¹, 李勤慎^{1,2}, 刘哲¹, 王静汝¹

(1. 甘肃农业大学 动物科学技术学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃省渔业技术推广总站, 甘肃 兰州 730030)

摘要: 为快速鉴定虹鳟疑似细菌性疾病的致病菌, 寻找敏感药物。对 2 尾患病鱼体内细菌进行分离纯化培养, 经生化鉴定明确病原菌, 最后利用药物敏感纸片 Kirby-bauer 琼脂扩散法进行敏感药物筛选。在鳃、心脏、脾、肝、肠组织中分离鉴定得到 2 种细菌, 分别为产气肠杆菌和付甲伤寒沙门氏菌。药物敏感试验结果表明: 氯霉素、卡那霉素和米诺环素对两种菌株均有较强的抑制作用; 头孢他定和多粘菌素对两种菌株抑制作用次之; 两种菌株对头孢曲松、氧氟沙星、环丙沙星以及克林霉素等有较强的耐药性。

关键词: 虹鳟; 细菌性疾病; 病原菌; 分离鉴定; 药敏试验

中图分类号: S917.1 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1672-4305.2021.02.015

Isolation and identification of pathogenic bacteria of rainbow trout bacterial diseases and drug susceptibility test

FENG Dongliang¹, LI Qinshen^{1,2}, LIU Zhe¹, WANG Jingru¹

(1. College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. Gansu Fishery Technology Promotion Station, Lanzhou 730030, China)

Abstract: In order to quickly identify bacterial disease of pathogens of rainbow trout and search sensitive drugs for this disease. The bacteria in the two fishes were separated and purified, and the pathogens were identified by biochemical identification. Finally, the sensitive drugs were screened by Kirby-bauer agar diffusion method. Two kinds of bacteria were isolated and identified in gill, heart, spleen, liver and intestine tissues, namely enterobacter aerogenes and salmonella typhimurium. The drug sensitivity test results showed that: chloramphenicol, kanamycin and minocycline have strong inhibitory effects on the two strains; ceftazidime and polymyxin are the second inhibitory effects on the two strains; the two strain is highly resistant to ceftriaxone, ofloxacin, ciprofloxacin and clindamycin.

Key words: rainbow trout; bacterial diseases; pathogenic bacteria; isolation and identification; drug sensitive test

虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 属鲑形目、鲑科的一种冷水性鱼类, 原产于北美洲北部和太平洋西岸, 主要生活在低温淡水中, 对养殖水域的水质要求较高^[1]。近年来, 随着养殖规模的不断扩大、集约化养殖程度的不断提高, 虹鳟养殖中细菌性疾病频发,

严重阻碍了虹鳟养殖业的健康发展, 造成了一定的经济损失。对于水产动物而言, 感染细菌性疾病的病原菌种类很多, 而不同细菌感染往往使患病鱼呈现不同的症状, 在生产中由于各种因素相互影响 (鱼体自身抵抗力、水环境、饲养管理等), 细菌性疾病往往表现出一病多症^[2-3]、一症多病等现象^[4-5]。

近年来, 对水产动物细菌性疾病, 常使用抗生素进行治疗, 但因同一细菌对不同的抗生素敏感性存在很大差异, 由于在生产实践中对于细菌性疾病未进行病原菌分离鉴定及药敏试验, 随意选择抗生素进行治疗往往导致治疗效果很不理想, 尤其近年来,

收稿日期: 2019-10-09 修改日期: 2020-06-21

作者简介: 冯栋梁 硕士研究生 研究方向为畜牧。

E-mail: 1639819443@qq.com

通讯作者: 李勤慎 学士 研究员 主要研究方向为渔业技术。

E-mail: yyjstgzz.lqsh@163.com



随着水产药物的广泛使用,细菌的耐药性不断增强,耐药菌,尤其多重耐药菌的不断增多,给水产动物细菌性疾病的治疗带来了极大困难^[3-5]。

本次研究通过细菌分离纯化培养、生化鉴定等方法对2尾疑似患细菌性疾病的虹鳟的主要患病皮肤和内脏器官进行了初步诊断及病原菌的分离、染色和生化鉴定以及药物敏感性实验。通过本次实验,旨在建立虹鳟细菌性疾病快速分离鉴定方法,为虹鳟养殖病害研究提供理论支撑。

1 实验材料与方法

1.1 实验对象及主要耗材

实验动物为甘肃省刘家峡水库网箱养殖患病濒死虹鳟2尾,病鱼患有轻微水霉,形体消瘦、肛门红肿外突、鳃部及鳍基部充血等病症。实验鱼体长约22~26 cm,体重约500~750 g,用于临床剖检、病原菌分离鉴定及药敏实验。

自配营养琼脂培养基用于病原菌分离纯化,革兰氏染液、氧化酶试剂、肠杆菌科细菌生化编码鉴定管(J2002,15种)及抗菌药物成套纸片(S1100,30种)均购自杭州微生物试剂有限公司。

1.2 采样及初步诊断

于2019年4月28日,在甘肃省刘家峡水库网箱虹鳟养殖场进行现场采样,通过肉眼观察病鱼表征,解剖检查腹腔内出血积水情况及内脏有无明显病理变化,显微镜镜检有无寄生虫,初步诊断确定发病原因^[6]。

1.3 病原菌分离纯化

在无菌环境下,用棉球蘸取75%乙醇将病样体表擦拭消毒,用无菌剪刀解剖后取鳃、肠道、心脏、脾脏、肝脏组织,碾碎后用涂布棒涂抹于营养琼脂培养基,置于恒温培养箱28℃培养24 h,选择形态较为一致的单菌进行3~4次纯化培养,将纯化细菌用无菌接种环接种于普通肉汤培养基,置于恒温摇床28℃培养24 h,用于后期实验及传代培养,并将经纯化长出菌落的琼脂平板置于冰箱备用^[7-9]。将各个组织分离纯化后的细菌进行暂时命名,以便后期实验记录,本实验中,将2尾虹鳟鳃组织细菌分别命名为GS1、GS2,肠道组织细菌分别命名为IS1、IS2,心脏组织细菌分别命名为HS1、HS2,脾脏组织细菌分别命名为SS1、SS2,肝脏组织细菌分别命名为LS1、LS2。

1.4 病原菌鉴定

1.4.1 革兰氏染色鉴定

对菌落形态进行观察,并选取单一菌落用革兰

氏染色后在显微镜下形态进行观察,革兰氏阴性菌呈红色,革兰氏阳性菌呈紫色。以均匀分散开的细菌的革兰氏染色反应为准。(过于密集细菌,常常呈现假阳性)^[10-11]。

1.4.2 氧化酶实验

在洁净滤纸一角沾取少许被检菌落,滴加配制好的氧化酶试液(一支氧化酶干粉加1 mL无菌蒸馏水)一滴,十秒后观察结果,紫红色为阳性,无色或黄色为阴性^[12]。

1.4.3 肠杆菌科细菌生化编码鉴定管鉴定

经革兰氏染液鉴定为革兰氏阴性菌,氧化酶实验鉴定为氧化酶阴性反应后,初步断定该菌为肠杆菌科细菌,采用肠杆菌科细菌生化编码鉴定管进行生化鉴定,根据肠杆菌科细菌生化鉴定编码册及伯杰细菌鉴定手册进行判定^[6]。

1.5 回归感染实验

选取分离鉴定所得菌落,用无菌生理盐水清洗菌苔,得到菌悬液,采用活菌计数法将细菌稀释到浓度为 1.0×10^8 CFU/mL,随机选取10尾暂养一周的健康虹鳟,腹腔注射0.2 mL菌悬液为实验组,另选取10尾健康虹鳟腹腔注射0.2 mL生理盐水做空白对照组。将实验组和对照组分别置于不同孵化缸内,在同等水质条件下饲养15天,密切观察记录两组虹鳟死亡情况。将死亡鱼再进行病原菌分离鉴定,判断是否与注射菌一致,以确定致病菌。

1.6 药敏试验

采用Kirby-bauer琼脂扩散法,将细菌接种到营养琼脂平板上,28℃培养16~18 h的菌苔用生理盐水调成菌悬液后,均匀涂布于营养琼脂平板上,然后贴上药物敏感性试纸(直径6 mm),恒温28℃培养24 h,观察并记录结果,通过抑菌直径判定药物敏感性^[12]。

2 实验结果与分析

2.1 初步诊断结果

通过对患病虹鳟体表、鳃、鳍、内脏初步检查,可见病鱼体表粘液较多、鳃部及鳍部充血,剖检可见内脏有明显充血、出血现象,显微镜下观察,未发现寄生虫存在,可初步诊断为细菌性疾病致死。

2.2 病原菌鉴定结果与分析

2.2.1 革兰氏染色结果

各个组织所培养细菌均为革兰氏阴性菌,镜下观察,为杆状菌,无鞭毛。

2.2.2 氧化酶实验结果

各个组织所培养菌株在氧化酶实验中无细胞色

素氧化酶产生,所有细菌均为氧化酶阴性反应。

2.2.3 生理生化鉴定结果

通过革兰氏染色和镜检结果,以及氧化酶实验结果,确诊该细菌为肠杆菌科细菌,通过肠杆菌科细菌生化编码鉴定管进行生化鉴定。对细菌进行15项生化鉴定,结果如表1所示。依照细菌生化编码

鉴定手册,根据15项鉴定结果阴阳性进行数字编码得出单项数值,然后利用肠杆菌科细菌鉴定表对应得出总值,得出结果如表2所示。根据鉴定值,查阅肠杆菌科细菌生化鉴定编码手册,确定各株细菌分别为:产气肠杆菌、付甲伤寒沙门氏菌,如表3所示。

表1 生化鉴定结果

项目	GS ₁	GS ₂	IS ₁	IS ₂	HS ₁	HS ₂	SS ₁	SS ₂	LS ₁	LS ₂
硫化氢	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
苯丙氨酸	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
葡萄糖盐	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
靛基质	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
甲基红	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
枸橼酸盐	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
尿素	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
动力	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
产气	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
赖氨酸	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
鸟氨酸	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
棉子糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
山梨醇	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
侧金醇	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
木糖	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-

注: +为阳性, -为阴性。

表2 肠杆菌科细菌鉴定表

生化试验	硫化氢	苯丙氨酸	葡萄糖盐	靛基质	甲基红	枸橼酸盐	尿素	动力	产气	赖氨酸	鸟氨酸	棉子糖	山梨醇	侧金醇	木糖
GS ₁	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
单值	4	2	①	4	2	①	4	2	①	4	②	①	④	②	①
总值		1			1			1			6			7	

注: +为阳性, -为阴性。



表 3 肠杆菌科细菌鉴定结果

细菌	鉴定值(总值)	菌名(编码)	鉴定值(%)
GS ₁	11167	产气肠杆菌	100
GS ₂	11167	产气肠杆菌	100
IS ₁	02300	付甲伤寒沙门氏菌	76.779
IS ₂	02300	付甲伤寒沙门氏菌	76.779
HS ₁	02300	付甲伤寒沙门氏菌	76.779
HS ₂	02300	付甲伤寒沙门氏菌	76.779
SS ₁	11167	产气肠杆菌	100
SS ₂	11167	产气肠杆菌	100
LS ₁	02300	付甲伤寒沙门氏菌	76.779
LS ₂	02300	付甲伤寒沙门氏菌	76.779

2.3 回归感染实验结果

将分离鉴定所得两株细菌进行回归感染,结果显示:注射产气肠杆菌菌悬液后,10尾虹鳟6天内全部死亡,死亡率为100%,对死亡鱼进行病原菌分离鉴定,体内优势菌为产气肠杆菌;注射付甲伤寒沙

门氏菌菌悬液后,10尾虹鳟15天内死亡7尾,死亡率为70%,对死亡鱼进行病原菌分离鉴定,体内优势菌为付甲伤寒沙门氏菌。表4为注射菌悬液和生理盐水后15天内不同时间虹鳟死亡情况。

表 4 回归感染实验结果

注射液	不同时间死亡情况							死亡率(%)
	第1d	第2d	第3d	第4d	第5d	第6d	第7d	
产气肠杆菌	0	1	2	2	4	3	0	100
付甲伤寒沙门氏菌	0	0	1	1	2	2	1	70
生理盐水(对照组)	0	0	0	0	0	0	0	0

2.4 药敏试验结果

对分离纯化鉴定的两株细菌进行药物敏感试验(将产气肠杆菌命名为菌A,将付甲伤寒沙门氏菌命名为菌B),通过抑菌圈直径断定该细菌对药物敏感程度,结果显示(如表5所示):氯霉素、卡那霉

素、米诺环素对两种菌株均有较强的抑制作用;头孢他定、多粘菌素对两种菌株抑制作用次之;两种菌株均对头孢曲松、氧氟沙星、环丙沙星、克林霉素等有较强的耐药性。

表 5 药敏试验结果

药敏纸片	菌 A		菌 B	
	抑菌直径(mm)	抑菌程度	抑菌直径(mm)	抑菌程度
氯霉素	28	S	30	S
卡那霉素	24	S	25	S
米诺环素	22	S	26	S

接上表				
丁胺卡那	20	S	21	S
羟苄西林	19	I	12	I
头孢他啶	12	I	14	I
多粘菌素	11	I	18	I
头孢曲松	0	R	3	R
氧氟沙星	0	R	0	R
环丙沙星	0	R	4	R
克林霉素	0	R	0	R
痢特灵	0	R	0	R

注: R $r < 5$ 表示耐药; I $5 < r < 20$ 表示中介; S $r > 20$ 表示敏感。

3 讨论

3.1 病原菌分离鉴定结果

现有报道中,虹鳟常见细菌性疾病病原菌主要有鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*)、杀鲑气单胞菌 (*Aeromonas salraonocida*)、嗜鳃黄杆菌 (*Flavobacterium branchiophila*)、柱状黄杆菌 (*Flavobacterium columnaris*)、点状产气单胞菌和嗜水气单胞菌等^[13]。本次实验以病原微生物学为理论依据,对疑似患有细菌性疾病的虹鳟进行细菌提取、分离、纯化培养、鉴定,得到2种优势菌落,分别为产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*) 和付甲伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 均为条件致病菌,通过回归感染实验可知,两种菌均能使虹鳟患病致死,均为本次鱼病致病菌。产气肠杆菌是一种有着高效产氢潜力的兼性厌氧菌,可用于发酵法生产氢气,正常情况下存在于人和动物肠道,无害,但在外界条件恶化、机体虚弱等情况下导致机体抵抗力下降而致病,可引起呼吸道感染等疾病,对于水产动物而言,当水质恶化、鱼体受伤等造成的体虚、抵抗力下降时,该菌将会在鳃、脾脏等部位迅速繁殖而造成呼吸受阻,严重时导致死亡,有研究表明,产气肠杆菌对罗氏沼虾有严重致病性,导致其大量死亡^[14]。付甲伤寒沙门氏菌为肠杆菌科、沙门氏菌属、付甲伤寒沙门氏菌种,据报道,人类是伤寒沙门氏菌的唯一宿主,但有研究发现付甲伤寒沙门氏菌在禽类中有所感染,导致禽类肠炎等肠道疾病,此菌在体内繁殖,导致食物中毒现象及肠炎等出血性症状^[15],暂未发现该菌在水产动物中的感染报道。综上可知,此次鱼病是由于鱼

类越冬损耗,加之前期水霉影响,机体抵抗力下降,进而引发的产气肠杆菌、付甲伤寒沙门氏菌感染,引起的细菌性出血症,造成虹鳟大量死亡。

3.2 药敏试验结果及鱼病预防措施

因水产动物细菌性疾病病原菌较为复杂,加之近年来在生产中对抗生素的滥用,导致病原菌耐药性增加,故在鱼病治疗中,选择合理的抗生素是鱼病防治的关键^[2]。对于此次虹鳟鱼病问题,应根据药敏试验结果,选取合适药物进行药浴或药饲料投喂治疗以控制细菌性疾病,并利用消毒类药物进行水体消毒。本次药敏试验只是筛选细菌最敏感类药物,未确定最低药物浓度和最适药物浓度,欠缺全面性和一定的科学性,但在生产实践中,此方法可对爆发性细菌性疾病进行快速有效应对,最大可能挽回经济损失,对虹鳟病害研究及预防治疗提供一定理论支撑。

水产动物疾病预防治疗应遵循“以防为主、防重于治”的方针,在养殖中应科学引用预防类药物,加强中草药和有益菌在水产中的应用,而保持一个良好的水体环境是鱼病防治的关键,据刘淑兰等研究表明,芽孢杆菌能分泌一种具有抑菌活性的抑菌物质,将其作为益生菌添加剂添加到饲料中用于动物生产,不仅有较好防病效果还可提高动物生产性能^[16]。据报道,中草药在水产动物病害防治中的应用主要有:预防病毒性疾病,在预防控制病毒性出血症中有显著成效;预防治疗细菌性疾病,长期使用中草药对于细菌性肠炎及细菌性败血症有着独特疗效;定期使用中草药可有效控制寄生虫的滋生^[17]。故在生产中使用中



草药进行鱼病防治,并配合有益菌的合理应用调节养殖水域营养结构显得尤为重要。

4 结语

针对虹鳟爆发性疾病,本次研究通过对患病鱼病原菌分离鉴定、回归感染,可得出本次疾病是由于鱼类越冬损耗,加之前期水霉影响,机体抵抗力下降,进而引发的产气肠杆菌、付甲伤寒沙门氏菌感染引起的细菌性出血症,造成虹鳟大量死亡,由药敏试验结果可知,利用氯霉素、卡那霉素和米诺环素等抗生素,可有效抑制该致病菌繁殖,快速有效地治疗本次虹鳟细菌性疾病。

参考文献(References):

- [1] 卢国,王炳谦.国际虹鳟育种产业简介及其对我国的借鉴意义[J].水产学杂志,2017,30(3):1-6.
- [2] 冯永杰,孙振丽,宣引明,等.苏州市患病水生动物体内细菌的分离鉴定及药敏试验[J].淡水渔业,2019,49(1):75-80.
- [3] Levy S B,Active efflux: a common mechanism for biocide and antibiotic resistance [J]. Symp Ser Soc Appl Microbiol, 2010, 92 (sl): 65-71.
- [4] Terzi H A ,Kulah C ,Ciftci I H.The effects of active efflux pumps on antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. World J Microb Biot, 2014, 30(10): 2681-2687.
- [5] Walther C ,Rossano A ,Thomann A , et al. Antibiotic resistance in *Lactococcus* species from bovine milk: Presence of a mutated multi-drug transporter *mdt(A)* gene in susceptible *Lactococcus garvieae*

strains [J]. Vet Microbio, 2008, 131(3-4): 348-357.

- [6] 杨昆明,郭爱民,马江霞,等. 鲈细菌性肠炎致病菌的分离、鉴定及药敏实验[J]. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 42-51.
- [7] 吴红萍,王陈仪,宋晶霞,等. 微生物学实验教学—细菌的革兰氏染色经典法和三步法的比较与分析[J]. 高校实验室工作研究, 2017, 9(3): 56-59.
- [8] 周爱灵,王晓琴,谢宗平.影响革兰氏染色的因素及常见错误结果分析[J].甘肃高师学报, 2000, 5(5): 36-37.
- [9] 欧内玉,赵加修,王艳君,等. 细菌氧化酶和靛酚氧化酶检测差异性的研究[J].现代检验医学杂志, 2003, 18(3): 56.
- [10] 布坎南 R.E,吉本斯 N.E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [11] 张浩,郭虹彩,马文奎,等. 兽用药敏纸片的制备及其抑菌效果分析[J]. 畜牧与饲料科学, 2018, 39(9): 110-112.
- [12] 李伟,徐伯亥,葛蕊芳,等. 山西省虹鳟鱼弧菌病原菌的分离与鉴定[J].水产学杂志, 1990, 3(2): 23-30.
- [13] 王亚军,魏文娟,潘厚军,等. 斑点叉尾“腹水症”病原的分离鉴定及体外芽孢杆菌拮抗试验[J]. 淡水渔业, 2018, 48(3): 72-77.
- [14] 童树旗,高晓建,张双明,等. 罗氏沼虾源产气肠杆菌分离鉴定及耐药性分析[J]. 畜牧与兽医, 2019, 51(2): 83-88.
- [15] 杨维成,杨光,姚鹏杰.鸡沙门氏菌病的预防和控制[J]. 新农业, 2019, 1(1): 50-51.
- [16] 刘淑兰,陈娟,李杰,等. 复合益生菌制剂对大西洋鲑(*Salmosalar*) 生长、消化酶和非特异性免疫指标的影响[J]. 渔业科学进展, 2017, 38(5): 100-106.
- [17] 贾文涛. 中草药在水产病害防治中的应用方法[N]. 中国渔业报, 2015-03-16(B02).

(上接第58页)

均具有增殖抑制的作用,且具有时间和浓度依赖性。提示红参多糖可作为功能保健食品和抗癌药物,为红参多糖不同分级醇沉组分的活性研究和开发利用奠定了一定基础。

参考文献(References):

- [1] Torre LA ,Bray F ,Siegel RL , et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA: a Cancer Journal for Clinicians, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] Luo H ,Yang A ,Schulte BA , et al. Resveratrol induces premature senescence in lung cancer cells via ROS-Mediated DNA damage [J]. PLo S One, 2013, 8(3): e60065s.
- [3] 陈群,刘天骄.银杏叶多糖的抗肿瘤和免疫调节作用[J]. 中药药理与临床, 2003, 19(5): 18-19.
- [4] 张华芳,金京顺,俞朝阳.羊栖菜多糖诱导肿瘤细胞凋亡的实验研究[J].时珍国医国药, 2006, 17(7): 1124-1125.
- [5] 韩澄,聂少平,黄丹菲,等.青钱柳多糖对人胃癌 MGC-803 细胞生长的影响[J].天然产物研究与开发, 2009, 21(6): 952-955.
- [6] 李佩佩,杨子君,陈荫,等.薄荷多糖的提取工艺及其抗氧化、抗病毒活性的研究[J].食品科技, 2014, 39(12): 196-201.
- [7] 衡银雪,刘丹丹,边凤霞,等.黄精多糖抗衰老作用及其食品应

用研究进展[J].重庆工商大学学报(自然科学版), 2017, 34(6): 111-117.

- [8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社, 2015: 153-154.
- [9] 李慧文,韩春姬,洪喜道,等.红参多糖对免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J].延边大学农学学报, 2012, 12(4): 330-333.
- [10] 于雷,刘洋,越皓,等.红参多糖的提取及其对 STZ 糖尿病小鼠血糖血脂的作用[J].食品科技, 2012, 37(11): 181-185.
- [11] 高馨,郭义美,周君,等.苯酚-硫酸法测定红参多糖含量研究[J].实验室科学, 2018, 21(1): 28-30.
- [12] Silva D A ,de Paula R C M ,Feitosa J P A , et al. Carboxymethylation of cashew tree exudate polysaccharide [J]. Carbohydrate Polymers, 2004, 58(2): 163-171.
- [13] Zhang Z ,Zhang Q ,Wang J , et al. Chemical modification and influence of function groups on the in vitro-antioxidant activities of porphyrin from porphyra haitanensis [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 79(2): 290-295.
- [14] 池玉杰.6种白腐菌腐朽后的山杨木材和木质素官能团变化的红外光谱分析[J].林业科学, 2005, 41(2): 136-140.
- [15] 郭志明.利用近红外光谱分析技术检测绿茶有效成分的研究[D].镇江:江苏大学, 2009.