

患爆发性败血症斑点叉尾鲷病原的分离与鉴定

陈红莲, 王永杰, 陈宇, 潘庭双, 吴明林, 凌俊

(安徽省农业科学院水产研究所, 合肥 230031)

摘要: 从患爆发性败血症斑点叉尾鲷肝、脾和肾分离到大量形态和色泽一致的细菌。随机挑选 5 株细菌注射健康斑点叉尾鲷, 感染鱼 72 h 内全部死亡, 且患病症状与自然发病症状一致, 确认分离株为斑点叉尾鲷败血症的致病菌。依据其菌落形态、生理生化特征, 结合其 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列分析, 鉴定 5 个分离株为蜡样芽孢杆菌。用 20 种抗微生物药敏纸片对分离株进行药敏实验, 发现 5 株菌均对 7 种喹诺酮类药物、5 种氨基糖苷类药物, 麦迪霉素, 克林霉素和新生霉素敏感, 而对 2 种头孢菌素类药物和复方新诺明有耐药性。

关键词: 斑点叉尾鲷; 败血症; 蜡样芽孢杆菌; 16S rRNA; *gyrB*

中图分类号: S941.42

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2014)01-0024-06

Isolation, identification of pathogenic bacteria from *Ictalurus punctatus* with fulminate septicemia

CHEN Honglian, WANG Yongjie, CHEN Yu, PAN Tingshuang, WU Minglin, LING Jun

(Fisheries Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031)

Abstract: Large colonies with similar morphology and color were obtained from liver, spleen and kidney of channel catfish, *Ictalurus punctatus* with fulminate septicemia. The experiment was carried out with healthy juvenile channel catfish by means of injection with live 5 isolates randomly selected. All individuals of the fish injected died within 72 h. The symptom was similar to those of the naturally infected fish. Therefore, the isolates were suggested to be the pathogenic bacterium strain of *Ictalurus punctatus* with fulminate septicemia. These isolates were further identified as *Bacillus cereus* by phenotypic characters, analysis of their 16S rRNA and *gyrB* sequences. Antimicrobial sensitivity patterns of five strains were evaluated against 20 antimicrobial drugs. The result showed that they were all sensitive to seven quinolones, five aminoglycosides, midecamycin, clindamycin, novobiocin, and resistant to two cephalosporins and compound sulfamethoxazole.

Key words: channel catfish (*Ictalurus punctatus*); septicemia; *Bacillus cereus*; 16S rRNA; *gyrB*

斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 原产于美洲, 又称沟鲶、美洲鲶、河鲶, 自 20 世纪 80 年代引进我国, 经过 20 多年的研究及推广, 已经在 30 个省(区、市)进行广泛的养殖。随着斑点叉尾鲷养殖规模的日益扩大, 集约化程度逐渐提高, 养殖环境日益恶化, 斑点叉尾鲷病害日趋严重, 爆发性死亡时有发生, 给养殖户造成了重大的经济损失。在高密度、过量投饵的养殖模式中, 由于环境“胁迫”作用, 病原体传播非常容易。目前, 引发斑点叉尾鲷疾病的细菌有: 嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hy-*

drophila)、温和气单胞菌 (*A. sobria*)、爱德华氏菌 (*Ewardsiella*)、柱状嗜纤维菌 (*Cytophaga columnaris*)、鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacte baumannii*)、嗜麦芽寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*) 等^[1-5]。国内外还未见蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 感染斑点叉尾鲷致病的报道。

2012 年 7 月中旬, 安徽省合肥市长丰县某养殖场养殖的斑点叉尾鲷出现大批量死亡, 其临床症状为: 病鱼离群靠塘边独游, 反应迟钝, 头部、鳍条及其基部充血, 眼球突出, 肛门红肿, 解剖可见鳃

收稿日期: 2013-05-21

基金项目: 安徽省农业科学院院长青年创新基金项目 (12B0515), 安徽省农业成果转化项目 (12040302002) 和安徽省农业科学院引进人才科研启动资金共同资助。

作者简介: 陈红莲, 博士, 助理研究员。E-mail: hlchen76@163.com

丝充血, 肠道内没有食物, 出现大量黄色粘液。本课题组从该养殖场患病斑点叉尾鲷的肝、脾和肾中分离到革兰氏阳性菌, 本实验结合菌落形态、生理生化特性、16S rRNA 和 *gyrB* 基因系统发育分析对分离株进行鉴定, 并测定了分离株对 20 种抗微生物药物的敏感性, 期望为斑点叉尾鲷细菌性疾病的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

5 尾患病斑点叉尾鲷取自安徽省合肥市长丰县某养殖场, 体重约 100~200 g, 用保温箱冷藏带回实验室进行病原分离。健康斑点叉尾鲷购于合肥某水产养殖场, 体重 40 g 左右。

1.2 主要试剂

胰酪大豆琼脂 (Tryptic soy agar, TSA)、胰酶大豆肉汤 (Tryptic soy broth, TSB)、脑心浸液肉汤 (Brain heart infusion broth, BHI)、MH 琼脂 (Mueller-Hinton agar)、琼脂、LB 肉汤 (Luria Bertani broth, LB) 为青岛海博生物技术有限公司产品。革兰染色液、芽孢染色液、微量生化管、蜡样芽孢杆菌 CMCC63301、20 种抗微生物药敏纸片购于杭州天和微生物试剂有限公司。伴孢晶体染色液、荚膜染色液为自配。Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒 (批号: SK8255) 购于上海生工生物工程股份有限公司, PCR 引物也由该公司合成。PCR 相关试剂、Takara MINIBEST agarose gel DNA extraction kit (D823A)、pMD18-T 购于 Takara 公司。

1.3 病原分离

无菌取样患病斑点叉尾鲷的肝、脾和肾, 剪碎, 接种环粘取一些组织液划线接种于 TSA、含 5% 绵羊血 TSA 和 BHI 琼脂平板上, 28℃ 恒温箱内培养 24 h 后, 随机挑取 5 个单菌落重复划线分离, 直至得到纯培养。将纯化菌株分别用 TSB 28℃ 过夜摇菌培养, 加终浓度 20% 甘油, -20℃ 冰箱保存, 用于进一步鉴定。

1.4 人工感染实验

1.4.1 病毒感染实验 将患病斑点叉尾鲷肝、脾和肾的组织匀浆液用装有 0.22 μm 滤膜的注射器抽滤除菌后肌肉注射 10 尾活力好、无伤的斑点叉尾鲷, 每尾注射 0.2 mL, 对照组肌肉注射等量的无菌生理盐水, 注射后, 每天观察实验鱼的发病、死亡情况, 连续观察 30 d。

1.4.2 细菌感染实验 将 28℃ 培养 18~24 h 的细菌用 0.65% 无菌生理盐水洗下, 制成菌悬液, 结合

显微计数和光电比浊计数法用无菌生理盐水将菌液最终浓度调至约 10^8 cfu·mL⁻¹。取暂养 1 周后活力好、无伤的斑点叉尾鲷随机分为 6 组, 每组 30 尾, 1~5 组每尾鱼胸鳍基部分别注射 XWH120710-1 至 XWH120710-5 菌悬液 0.2 mL; 第 6 组每尾注射等量生理盐水。各组鱼分别养于 95 cm×47 cm×50 cm 的玻璃缸中, 用增氧泵增氧。每天早、中、晚观察实验鱼的死亡情况, 连续观察 7 d。从死亡鱼的肝、脾和肾进行病原菌的再分离, 鉴定。实验用水为经曝气的自来水, 实验期间水温变化为 25~28℃。

1.5 生理生化鉴定

5 个菌株的形态及生理生化特性实验按照《常见细菌系统鉴定手册》^[6]和《Bergey's manual of systematic bacteriology》^[7]等所述方法进行。并用蜡样芽孢杆菌 CMCC63301 作参考菌, 进行同步实验。

1.6 16S rRNA 和 *gyrB* 序列测定

取分离株接种于 TSB 中 28℃ 过夜培养, 用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取 DNA 作为 PCR 模板。16S rRNA 基因 PCR 扩增的引物为, 27 F (正向引物): 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492 R (反向引物): 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'。*gyrB* 基因 PCR 扩增的引物为 F: 5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGGNAARTTYGA-3'; R: 5'-AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCACRTCCNGTCAT-3'。PCR 反应体系: 无菌蒸馏水 37.8 μL, 10×PCR 缓冲液 5 μL (含 1.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂), 4×dNTP 混合物 4 μL (2.5 μmol·L⁻¹), 引物各 1.0 μL (40 μmol·L⁻¹), 5.0×10⁶ U·L⁻¹ 的 *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μL, 模板 DNA 1 μL。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 4 min, 接下来 35 个循环 (94℃ 变性 1 min, 55℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 2 min), 72℃ 温育 10 min。PCR 反应结束后, 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 将检测为阳性的 PCR 产物送上海生工测序。将阳性 PCR 产物经 Takara MINIBEST agarose gel DNA extraction kit 试剂盒纯化回收, 用 pMD18-T 与纯化 DNA 连接, 然后用自制感受态 DH_{5a} 转化, 接着涂布于 100 μg·mL⁻¹ 的 LB 琼脂平板上, 37℃ 培养 16 h, 挑取单个克隆。菌体经 PCR 检测为阳性后, 用 LB 液体培养基过夜摇菌, 取 1 mL 菌液送上海生工测序。

1.7 系统发育树的构建

将分离株的 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列通过 NCBI 的 Blast 检索系统 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行序列同源性分析, 使用 Clustal X2 软件与从 GenBank 数据库中获得的蜡样芽孢杆菌组的 6

个种(绝大部分为模式株)及 *Bacillusadius* (作为外群)的相应基因序列进行多序列匹配排列(Multiple alignments),使用 MEGA 5.1 软件采用邻接法(Neighbor joining method)构建系统发育树,并通过 1000 次的自举分析(Bootstrap)进行置信度检测。

1.8 药敏实验

参照美国临床实验室标准化委员会(National committee for clinical laboratory standards, NCCLS)推荐的方法进行药敏实验。将 5 个分离株在 TSA 上培养 12~18 h,各取一些细菌溶于 0.65%的生理盐水中,调节浓度至约 10^8 cfu·mL⁻¹,用棉拭子反复均匀涂布于 MH 琼脂平板上,用无菌镊子将 20 种抗微生物药敏纸片贴于培养基表面,28℃培养 24 h 后,观察记录抑菌环的直径(包括药敏片)。

2 结果与分析

2.1 病原菌的分离及致病力鉴定

28℃培养 24 h,接种物在 TSA 和 BHI 琼脂平板上均长出大量色泽和形态均一的菌落,菌落圆形、灰白色、不透明、大而扁平、表面干燥,大小约为 3~5 mm。在 5%绵羊血 TSA 平板上形成典型的 β 溶血(完全溶血)。

经抽滤除菌后的组织浆注射健康斑点叉尾鲷,30 d 内实验鱼没有发生死亡;5 株分离菌人工感染斑点叉尾鲷,5 组实验鱼在感染后 72 h 内全部发病死亡,发病症状与自然发病症状基本相同,并从发病鱼肝、脾和肾分离到大量与注射细菌形态、生理生化特征一致的细菌。对照组实验鱼全部存活。

表 1 分离株生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of the isolates

特性 Character	分离株 Isolates	蜡样芽孢杆菌 ^a <i>B. cereus</i>	特性 Character	分离株 Isolates	蜡样芽孢杆菌 ^a <i>B. cereus</i>
氧化酶 Oxidase	—	—	丙二酸盐 Malonate	—	—
接触酶 Catalase	+	+	DNA 酶 Dnase	—	—
O-F 实验 O-F test	F	F	V-P 实验 V-P test	—	—
运动性 Motility	+	+	明胶 Gelatin	+	+
吲哚 Indole	—	—	6% NaCl	—	—
棉籽糖 Raffinose	—	—	O/129	—	—
纤维二糖 Cellobiose	—	—	葡萄糖:产酸 Glucose, acid production	+	+
麦芽糖 Maltose	+	+	葡萄糖:产气 Glucose, gas production	—	—
木糖 Xylose	—	—	鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	—	—
鼠李糖 Rhamnose	—	—	赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	—	—
阿拉伯糖 Arabinose	—	—	精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	+	+
阿拉伯醇 Arabitol	—	—	西蒙氏枸橼酸盐 Simmons citrate	—	—
甘露醇 Mannitol	—	—	酪氨酸分解 Degradation of tyrosine	+	+
山梨醇 Sorbitol	—	—	硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+
肌醇 Inositol	—	—	苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase	—	—
水杨苷 Salicin	+	+ ^b	七叶草 Esculin hydrolysis	+	+ ^b
酪蛋白酶 Proteinase	+	+	H ₂ S 产生 H ₂ S production	—	—
5℃生长 Growth at 5℃	—	—	卵磷脂酶实验 Lecithinase test	+	+
40℃生长 Growth at 40℃	+	+	KCN 生长 KCN growth	—	—
尿素 Urea	—	—			

注:“+”:阳性;“-”:阴性;a:蜡样芽孢杆菌 CMCC63301;b:弱阳性;F:发酵。

Note:“+”:Positive;“-”:Negative;a: *B. cereus* CMCC63301;b: Weakly positive;F: Ferment.

2.2 生理生化鉴定

5 个菌株的革兰氏染色、芽孢染色、伴孢晶体染色和荚膜染色结果显示细菌两端钝圆,短杆状,大小为 1.1~1.2 μm×2.3~4.5 μm,芽孢呈卵圆形,多数位于菌体中间,芽孢不突出于菌体,无荚膜,无伴孢晶体。5 个分离株的另 39 个理化特性鉴定结

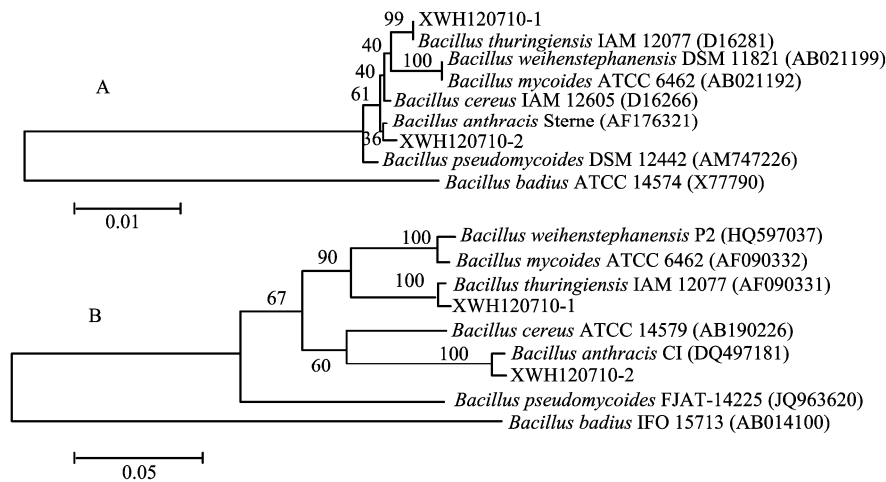
果一致,且与蜡样芽孢杆菌 CMCC63301 的相应鉴定结果一致(表 1)。这些细菌均可以利用水杨苷,水解精氨酸,还原硝酸盐,分解酪蛋白,5℃不生长,40℃生长。

2.3 16S rRNA 和 gyrB 序列分析

16S rRNA 和 gyrB 基因的 PCR 产物直接测序发

现分离株中除 XWH120710-2 外的 4 株序列一致, 为同一种细菌。选 XWH120710-1 和 XWH120710-2 为代表进一步克隆、测序这 2 个基因部分序列进行分析, 获得 16S rRNA 基因序列均为 1474 bp, 在 GenBank 中登录号分别为 KF022230 和 KF022231, 获得 *gyrB* 基因序列分别为 1171 bp 和 1189 bp, 在 GenBank 中登录号分别为 KF022229 和 KF022228。2 个基因序列分析显示: XWH120710-1 株与蜡样芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌 (*B. thuringiensis*) 的同源性最高, 16S rRNA 和 *gyrB* 基因的同源性分别达 99%~100%、92% 以上, 其中 16S rRNA 序列与苏云金芽孢杆菌模式株 IAM12077 (登录号: D16281)

相应序列的同源性为 100%; XWH120710-2 株与炭疽芽孢杆菌 (*B.anthraxis*)、蜡样芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌的同源性最高, 16S rRNA 和 *gyrB* 基因的同源性分别达 99% 以上及 98% 以上。2 个基因的系统发育学分析获得相似的拓扑结构 (图 1A 和 B), XWH120710-1 株与苏云金芽孢杆菌 IAM12077 株聚为 1 支, XWH120710-2 株与炭疽芽孢杆菌 (登录号: 16S rRNA AF176321; *gyrB* DQ497181) 聚为 1 支。且 *gyrB* 基因系统发育树中这 2 个节点的置信值均为 100%, 均比 16S rRNA 基因系统发育树中相应节点的数值高, 分别为 99% 和 36%。



A: 16S rRNA gene; B: *gyrB* gene

用邻接法分析 16S rRNA 基因 (图 A) 和 *gyrB* 基因 (图 B)。在分支节点处显示 1000 个重复树的置信值
Nucleotide neighbor joining method was used to analyze the sequences of 16S rRNA gene (Figure 1A) and *gyrB* gene (Figure 1 B).
Bootstrap values of 1000 tree replicas are shown at each branch node

图 1 分离株 16S rRNA 和 *gyrB* 基因系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of the isolates based on 16S rRNA and *gyrB* gene sequences

表 2 药敏实验

Table 2 The susceptibility test

药物种类 Category of antibiotics	抗菌药物 Antibiotics	敏感性 Sensitivity	药物种类 Category of antibiotics	抗菌药物 Antibiotics	敏感性 Sensitivity
香豆素类 Coumarins	新生霉素 Novobiocin	S	四环素类 Tetracyclines	四环素 Tetracycline	S 或 I
大环内酯类 Macrolides	麦迪霉素 Midecamycin	S		强力霉素 Doxycycline	S 或 I
林可酰胺类 Lincosamides	克林霉素 Clindamycin	S	头孢类 Cephalosporins	头孢氨苄 Cephalexin	R
喹诺酮类 Quinolones	依诺沙星 Cinoxacin	S		头孢他啶 Ceftazidime	R
	氧氟沙星 Ofloxacin	S	氨基糖苷类	新霉素 Neomycin	S
	氟罗沙星 Fleroxacin	S	Aminoglycosides	妥布霉素 Tobramycin	S
	恩诺沙星 Enrofloxacin	S		卡那霉素 Kanamycin	S
	萘啶酸 Nalidixic acid	S		庆大霉素 Gentamicin	S
	诺氟沙星 Norfloxacin	S		链霉素 Straptomycin	S
	洛美沙星 Lomefloxacin	S	磺胺类 Sulfonamides	复方新诺明 Compound sulfamethoxazole	R

注: S: 高度敏感; I: 中度敏感; R: 耐药。Notes: S: High sensitivity; I: Moderate sensitivity; R: Resistance.

2.4 药敏实验

药敏实验结果参照 NCCLS 标准对抑菌环做出解释。5 个分离株对 20 种抗微生物药物中的 7 种喹诺酮类药物、5 种氨基糖苷类药物、麦迪霉素、克林霉素和新生霉素敏感, 对 2 种四环素类药物高度敏感或中度敏感, 而对 2 种头孢菌素类药物和复方新诺明有耐药性(表 2)。

3 讨论

本研究通过回归感染实验证实, 经抽滤除菌后的组织浆对健康斑点叉尾鲷无致病作用, 表明疾病不是由病毒感染引起; 而从患病斑点叉尾鲷肝、脾和肾中分离到大量形态和色泽一致的细菌, 随机挑取的 5 株细菌对健康斑点叉尾鲷有强致病致死作用, 发病症状与自然发病症状相同, 且能从发病鱼的肝、脾和肾中分离到大量与注射感染细菌形态、生理生化特征相同的细菌。因此, 这些细菌被认为是引起斑点叉尾鲷败血症的病原。

蜡样芽孢杆菌组细菌包括: 蜡样芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、炭疽芽孢杆菌、蕈状芽孢杆菌(*B.mycoides*)、韦氏芽孢杆菌(*B.weihenstephanensis*)和假真菌样芽孢杆菌(*B.pseudomycoides*)^[7]。16S rRNA 序列分析已成为细菌种属鉴定和分类的标准方法^[8]。*gyrB* 基因编码促旋酶的 B 亚单位基因存在于大多数细菌中, 并且不会发生频繁的水平转移^[9], 常被用于近缘种和菌株基因系统发育学分析。然而, 蜡样芽孢杆菌与苏云金芽孢杆菌、炭疽芽孢杆菌在分子水平上同源性很高^[10-13]。16S rRNA, 23S rRNA 和 *gyrB* 基因的系统发育学分析将蜡样芽孢杆菌组细菌分为 7 个亚基因组, 蜡样芽孢杆菌在 6 个亚基因组中出现^[10]。因此, 区分蜡样芽孢杆菌组各种还是依据细菌的表型性状进行, 如菌落形态、运动性、荚膜、溶血性、结晶体及一些化学特性^[7]。

依据《Bergey's manual of systematic bacteriology》^[7], 本实验分离的 5 株细菌的形态、生理生化特征与蜡样芽孢杆菌的相应特性相符。因此, 尽管 16S rRNA 和 *gyrB* 基因系统发育树均显示 XWH120710-2 与炭疽芽孢杆菌聚为 1 支, 但依据其多个表型特征与炭疽芽孢杆菌的相应特征不符合, 后者没有运动性, 有荚膜, 没有溶血性, 水杨苷阴性, 精氨酸双水解阴性, 该菌株被鉴定为蜡样芽孢杆菌。2 个基因系统发育树均显示 XWH120710-1 与苏云金芽孢杆菌聚为一支, 前者与后者唯一不同的表型特征是没有产生伴孢晶体。Hernandez 等^[14-15]从同一个战争中严重感染病人身上同时分离到产生

伴孢晶体和不产生伴孢晶体的苏云金芽孢杆菌。McIntyre 等^[16]从多例食物中毒病人身上分离到细菌, 依据其表型特征鉴定为蜡样芽孢杆菌, 后来发现这些细菌携带了多个苏云金芽孢杆菌的致病基因(呕吐毒素、*cry1* 和 *cry2*), 于是建议将其鉴定为苏云金芽孢杆菌。因此, 依据表型特征将以 XWH120710-1 为代表的 4 株细菌暂时鉴定为蜡样芽孢杆菌, 是否可能为苏云金芽孢杆菌需要对其致病基因进一步测序分析。

蜡样芽孢杆菌组中有 3 种细菌对人类生产、生活的影响比较大, 炭疽芽孢杆菌一般被认为是致病菌, 可以当做生物武器使用, 在自然环境中存在量少或没有, 蜡样芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌广泛分布于土壤及许多其他环境中^[7]。苏云金芽孢杆菌休眠期能产生伴孢晶体, 对多种昆虫有很强的毒性作用^[17], 被用来制备微生物杀虫剂; 蜡样芽孢杆菌是人畜条件致病菌, 可导致人食物中毒和感染, 主要引起呕吐和腹泻^[18]。目前, 有 2 种蜡样芽孢杆菌组细菌引发水生动物疾病。蜡样芽孢杆菌已引起刺参(*Stichopus japonicus*)患“腐皮综合征”^[19], 引发鲤(*Cyprinus carpio*)鳃弓坏死^[20], 导致中华鳖(*Trionyx sinensis*)患病^[21]; 蕈状芽孢杆菌引起斑点叉尾鲷躯干肌肉“溃疡”^[22]、中华鳖“眼球溃疡”^[23]。本文首次报道蜡样芽孢杆菌引发斑点叉尾鲷败血症。该疾病的爆发被认为与水温高, 水质恶化, 病原菌得到大量繁殖有关系。

本实验分离的 5 株蜡样芽孢杆菌对 7 种喹诺酮类药物、5 种氨基糖苷类药物敏感, 而对 2 种头孢菌素类药物和复方新诺明有耐药性。谭爱萍等^[21]从中华鳖分离的蜡样芽孢杆菌与本实验分离株的耐药性结果相似, 他们也发现分离株对多种喹诺酮类、氨基糖苷类药物敏感, 对 2 种磺胺类和 4 种 β -内酰胺类(其中 2 种为头孢类)药物有耐药性。

参考文献:

- [1] 苏应兵, 邹桂伟, 袁科平, 等. 斑点叉尾鲷暴发性败血症病原的分离与鉴定[J]. 淡水渔业, 2006(5): 37-41.
- [2] 耿毅, 汪开毓, 陈德芳, 等. 斑点叉尾鲷嗜麦芽寡养单胞菌的分离鉴定及系统发育分析[J]. 中国兽医学报, 2007, 27(3): 330-335.
- [3] 刘礼辉, 李宁求, 石存斌, 等. 斑点叉尾鲷烂鳃病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.
- [4] Xia L, Xiong D M, Gu Z M, et al. Recovery of *Acinetobacte baumannii* from diseased channel catfish (*Ictalurus Punetatus*) in China[J]. Aquaculture, 2008, 284: 285-288.
- [5] 李艳和, 杨克礼, 潘庭双, 等. 安徽省斑点叉尾鲷细菌

- 性病原的分离鉴定及药物敏感性分析[J]. 安徽农业大学学报, 2010, 37(2): 278-283.
- [6] 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: 364-398.
- [7] Vos P D, Garrity G M, Jones D, et al. Bergey's manual of systematic bacteriology: volume three: the Firmicutes (2nd edition)[M]. Dordrecht Heidelberg London & New York: Springer-verlag, 2009, 3: 21-128.
- [8] Olsen G J, Pace N R, Nuell M, et al. The ribosomal RNA database project[J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19 (Suppl.): 2017-2021.
- [9] 侯晓丽, 陈智. 分类及鉴别细菌的新靶标-gyrB 基因[J]. 国外医学·流行病学传染病学分册, 2005, 32(1): 38-41.
- [10] Bavykin S G, Lysov Y P, Zakhariyev V, et al. Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and gyrB gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(8): 3711-3730.
- [11] Helgason E, Økstad O A, Caugant D A, et al. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*-one species on the basis of genetic evidence[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66: 2627-2630.
- [12] Helgason E, Tourasse N J, Meisal R, et al. Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70: 191-201.
- [13] Hill K K, Ticknor L O, Okinaka R T, et al. Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* isolates[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70: 1068-1080.
- [14] Hernandez E, Ramisse F, Cruel T, et al. *Bacillus thuringiensis* serotype H34 isolated from human and insecticidal strains serotypes 3a3b and H14 can lead to death of immunocompetent mice after pulmonary infection[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 1999, 24: 43-47.
- [15] Hernandez E, Ramisse F, Ducoureaux J P, et al. *Bacillus thuringiensis* subsp. konkukian (serotype H34) superinfection: case report and experimental evidence of pathogenicity in immunosuppressed mice[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36: 2138-2139.
- [16] McIntyre L, Bernard K, Beniac D, et al. Identification of *Bacillus cereus* group species associated with food poisoning outbreaks in British Columbia, Canada[J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(23): 7451-7453.
- [17] Lopes J, Arantes O M, Cenci M A, et al. Evaluation of a new formulation of *Bacillus thuringiensis israelensis*[J]. Braz J Biol, 2010, 70(4): 1109-1113.
- [18] Lund T, Granum P E, Sullivan K O. The sequence of the nonhaemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*[J]. FEMS Microbiol Lett, 1999, 178: 355-361.
- [19] 骆艺文, 郝志凯, 王印庚, 等. 一株引起刺参“腐皮综合征”的蜡样芽孢杆菌[J]. 水产科技情报, 2009, 36(2): 60-63.
- [20] Pychynski T, Malanowska T, Kozłowski M. Bacterial flora in branchionecrosis of carp (particularly *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*)[J]. Medycyna Weterynaryjna, 1981, 37(12): 742-743.
- [21] 谭爱萍, 赵飞, 姜兰, 等. 中华鳖致病性蜡样芽孢杆菌的分离鉴定与特性分析[J]. 广东农业科学, 2011, 20: 115-119.
- [22] Goodwin A E, Roy J S, Grizzle J M, et al. *Bacillus mycoides*: a bacterial pathogen of channel catfish[J]. Dis Aquat Org, 1994, 18:173-179.
- [23] 陈强, 杨金先, 俞伏松, 等. 鳖致病性蕈状芽孢杆菌的分离鉴定[J]. 福建畜牧兽医, 2011, 33(5): 4-7.