

文章编号: 1000-5013(2012)06-0660-07

# 一株罗非鱼出血病致病菌的分离与鉴定及组织病理观察

王忠敏, 黄惠莉

(华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

**摘要:** 从患有出血病症状的罗非鱼病灶部位分离筛选出一株高致病性菌(编号为 BC-2), 结合对菌落形态观察、生理生化实验及 16S rDNA 测序, 确定该高致病菌为一种致罗非鱼死亡的蜡状芽孢杆菌。通过对健康鱼进行不同浓度致病菌的感染试验及定性数据机率的分析, 可知其半数致死量( $LD_{50}$ )的对数值为 7.534 8、感染的菌浓度为  $3.4 \times 10^7$  cfu  $\cdot$  mL $^{-1}$ 、置信限为 95%。通过对患病鱼的不同组织器官的切片病理结构观察, 可以发现鳃和肠是病变最明显的部位。

**关键词:** 罗非鱼; 蜡状芽孢杆菌; 出血病; 组织切片; 病理

**中图分类号:** Q 939.124

**文献标志码:** A

罗非鱼(Tilapia)属于热带鱼类, 在广东、海南、福建等地都有大面积养殖, 是我国一种主要经济鱼类。导致罗非鱼死亡的主要原因, 有溶氧量过低、有毒物质的侵害、温度过低及病原体的感染等。在病原体中, 细菌性疾病对罗非鱼的影响最为普遍, 如嗜水气单胞菌导致的运动性气单胞菌病、链球菌引起的链球菌病、爱德华氏菌引起的爱德华氏病, 以及柱状屈杆菌引起的烂腮鳃病<sup>[1]</sup>等。近些年, 我国科研工作者从鱼体内分离出致病的气单胞菌<sup>[2]</sup>、嗜水气单胞菌<sup>[3]</sup>和无乳链球菌<sup>[4]</sup>; 在国外, 文献[5-7]分别报道柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare*)、格氏乳球菌(*Streptococcus agalactiae*)和弗朗西斯氏菌(*Francisella sp.*)均可引起罗非鱼感染发病。蜡状芽孢杆菌是一种条件致病菌, 其致病性受宿主和环境的综合影响。随着水产养殖密度的增大, 鱼体的栖息环境越来越恶劣, 蜡状芽孢杆菌也很可能从机会致病菌中成为常见病原体。有研究表明<sup>[8]</sup>: 蜡状芽孢杆菌也能通过食物中毒引起人体产生腹泻、呕吐症状的一种食源性病原菌, 其本身通常是弱毒性, 但其分泌的毒素会引起暴发性的食物中毒。2000年, 冯斯敏等<sup>[9]</sup>报道了蜡状芽孢杆菌能引起军曹鱼大量死亡。本文针对当地养殖中暴发过的一次大批量罗非鱼死亡(以出血病为主)情况, 从病灶的肌肉与肠部位分离筛选出致鱼出血病的高致病菌之一, 并对该菌进行生理生化实验, 观察该菌感染健康鱼后不同组织器官的微观病理结构变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

罗非鱼, 由福建厦门集美台商养殖场提供。无菌脱纤维羊血(购自上海源叶生物科技有限公司), 苏木素-伊红法(HE)染色液(购自江苏南京建成生物工程研究所)。培养基, 主要成分为氯化钠、蛋白胨、酵母膏、琼脂、无菌脱纤维羊血。

### 1.2 菌种筛选、分离与纯化

用 75% 酒精对病鱼表面进行消毒处理, 从病灶部位(肌肉、肠)取少量组织进行研磨成糊, 加入 10 mL, 0.5% 的无菌生理盐水混匀, 在  $3\ 000\ r \cdot \min^{-1}$  离心机上离心 3~5 min; 然后, 取上清液 0.5 mL, 加

收稿日期: 2011-12-13

通信作者: 黄惠莉(1962-), 女, 教授, 主要从事水产免疫与防治的研究。E-mail: hlhuang@hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省科技重点项目(2007T0010)

入到 4.5 mL,0.5%的无菌生理盐水中,依次制成  $10^{-3}$ , $10^{-4}$ , $10^{-5}$ , $10^{-6}$ , $10^{-7}$ , $10^{-8}$ 等稀释度备用.

取 200  $\mu$ L 上述每个稀释度进行 LB 血琼脂平板<sup>[10]</sup>涂布培养,每个稀释度 3 个平行,于 35  $^{\circ}$ C 培养 24 h.对初筛的各个单菌落在 LB 琼脂平板中进行纯化培养,直至为单菌落为止,并对每个单菌落进行显微镜观察以确保无杂菌.最后,用 LB 血琼脂平板对每个菌落进行涂布以记录观察菌落形态.

1.3 供试鱼的准备

选取大小基本一致的罗非鱼,分为 13 组,每组鱼 5 条.其中:未注射任何物质的编号 BC-00,注射生理盐水的编号 BC-0,注射 11 种浓度致病菌的分别编号 BC-1 至 BC-11.水温控制为 20~25  $^{\circ}$ C,水体 pH 值为 6.8~7.0.实验进行腹腔注射<sup>[11]</sup>.对所筛选菌分别扩大培养后制成  $2.4\times10^7$  cfu $\cdot$ mL<sup>-1</sup>的菌悬液,每条鱼注射剂量 0.2 mL.

1.4 健康鱼的感染实验

制备  $6.56\times10^9$  cfu $\cdot$ mL<sup>-1</sup>的原菌液,进行不同浓度( $10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$ , $10^{-4}$ )稀释及腹腔注射 0.2 mL,并对受感染鱼成活时间和死亡率进行统计.取感染致死鱼的肌肉、鳃、肠、肝约 5 mm $\times$ 5 mm $\times$ 2 mm 大小的组织,经中性缓福尔马林固定液固定 24 h,再经脱水、透明、透蜡、包埋、切片(切片的厚度为 15  $\mu$ m)及贴片处理等;然后,根据 HE 染色试剂盒进行染色,并在油镜下进行观察.

1.5 生化实验及 16S rDNA 序列测定

供试菌的生理生化实验参考文献[12].经细菌液体培养、离心获得菌体、裂解细胞(破碎或溶菌酶)、沉淀离心、溶解、PCR 扩增,最后把扩增的序列送北京三博远志公司和生工生物工程(上海)有限公司进行 16S rDNA 测序测定.

2 结果与分析

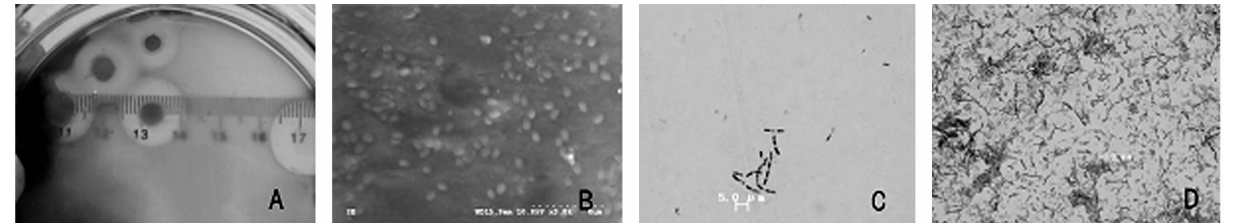
2.1 致病菌的筛选

依据实验方法,从鱼的鳃、肠、肌肉等病灶部位筛选到 11 种菌,其中 5 株优势菌的形态如表 1 所示. BC-2 菌落与菌株的电镜扫描形态,如图 1 所示.从图 1 可知:BC-2 菌落呈灰色,菌落直径大小在 4~8 mm,溶血圈较大,直径约 11 mm,为  $\beta$  溶血型;电镜下的 BC-2 菌为杆菌,从表面上无法看出有无芽孢;革兰氏染色 BC-2 菌的染色结果为蓝紫色,表明为 G<sup>+</sup>;芽孢染色观察发现菌体成蓝色而芽孢成浅红色.

表 1 所筛选菌的形态及溶血情况

Tab.1 Morphology and hemolysis on the isolated bacteria

菌株编号	菌落直径/mm	颜色	溶血圈	溶血圈直径/mm	干湿	表面	边缘
BC-1	3~7	深灰色	大	24	干燥	凸	平整
BC-2	4~8	灰色	较大	11	干燥	凸	平整
BC-3	1~2	棕黄色	—	—	微湿	凸	平整
BC-7	2~3	深黄色	小	7	干燥	凸	平整
BC-11	2~6	浅灰色	较小	10	干燥	微凸	不规则



(a) 菌落形态 (b) 电镜扫描形态 (c) 革兰氏染色 (d) 芽孢染色

图 1 BC-2 菌的形态观察结果

Fig.1 Morphology of BC-2 bacterium

2.2 BC-2 菌株致病性的感染结果

依据实验方法正常充气喂养 7 d 后,对每天每组鱼的感染情况及死亡率进行统计,结果如表 2 所示.表 2 中: $N_i$  为感染鱼尾数; $N_D$  为不同时间死亡鱼的尾数; $\eta$  为死亡率.

从表 2 可知:BC-2 菌的死亡率最大达到 80%,且 BC-2 菌出现病症及死亡时间最快;空白组(BC-0

与 BC-00 两组的死亡率为 0%). 从各种菌感染后,鱼体表现出的症状所出现的时间快慢、死亡率的高低、症状的差异,表明 BC-2 菌感染罗非鱼的症状为出血病,且病变反应时间最快,死亡率也最高. 此外,BC-2 菌的菌落溶血圈明显,说明这种菌是罗非鱼的致病菌,而且是高致病出血病的病原体之一. 所以选 BC-2 菌为目标菌. BC-2 菌的感染症状,主要是鳞有血丝、脱鳞、鳞片间有血丝、腹腔肿胀、大量皮肤表面鳞和皮肤的脱落,如图 2 所示.

表 2 罗非鱼感染及死亡情况统计表

Tab. 2 Statistical table of the infection and death of the tilapia

编号	$N_1/\text{尾}$	$N_D/\text{尾}$													$\eta/\%$
		12 h	22 h	34 h	44 h	54 h	64 h	76 h	86 h	98 h	108 h	120 h	130 h	142 h	
BC-1	5	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40
BC-2	5	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	80
BC-3	5	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40
BC-4	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BC-5	5	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
BC-6	5	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
BC-7	5	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40
BC-8	5	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
BC-9	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BC-10	5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
BC-11	5	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40
BC-0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BC-00	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



(a) 空白组



(b) BC-2 菌感染

图 2 死亡罗非鱼的症状

Fig. 2 Symptom of dead tilapia

2.3 不同 BC-2 菌浓度感染及定性数据机率分析

选取不同菌浓度(C)的 BC-2 菌,对 6 组健康鱼(每组 10 条)进行感染,统计致病菌后 72 h 罗非鱼的死亡情况,结果如表 3 所示.

根据英国学者 D. J. Finney 的 Probit Analysis 机率分析理论<sup>[13]</sup>,运用 DPS 软件中的生物测定对其进行计数型数据机值分析,并确定其半数致死量(LD<sub>50</sub>). 即

$$y = 0.843\ 6 + 0.551\ 6x.$$

拟合程度的卡方值  $\chi^2 = 1.968\ 3 < 7.815$ (自由度等于 3 时,  $\chi^2_{0.05} = 7.815$ ),表明所求的毒力回归曲线是合适的,即否定所求模型的异质性的假设.

从计算结果中可以得出:LD<sub>50</sub> 的对数值为 7.534 8;感染的菌浓度为  $3.4 \times 10^7\ \text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,其置信限为 95%,菌的有效作用浓度在  $9.24 \times 10^5 \sim 3.6 \times 10^8\ \text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内.

表 3 不同 BC-2 菌浓度感染

罗非鱼的死亡情况

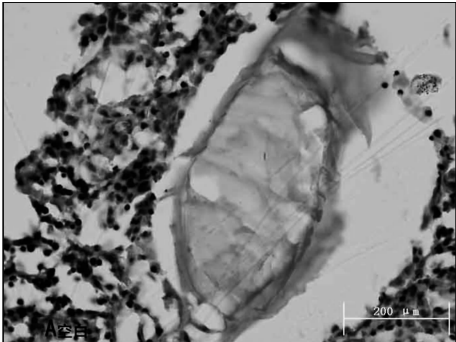
Tab. 3 Death of tilapia infected by

the different concentrations of BC-2

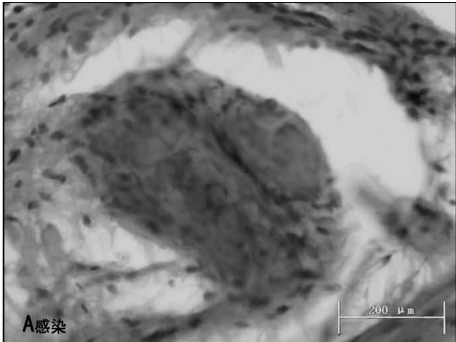
$C/\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$	$N_1/\text{尾}$	$N_D/\text{尾}$
$6.56 \times 10^9$	10	10
$6.56 \times 10^8$	10	7
$6.56 \times 10^7$	10	6
$6.56 \times 10^6$	10	5
$6.56 \times 10^5$	10	4
空白	10	2

2.4 感染致死鱼的病理组织观察

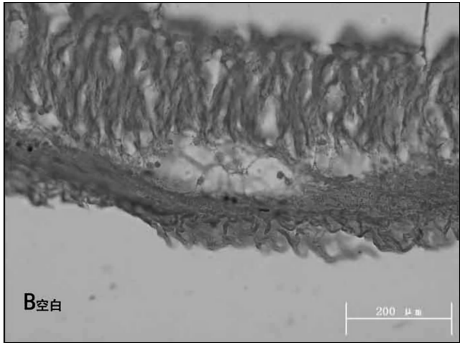
将在感染过程中感染致死的死鱼及时保存于 4 ℃ 冰箱中, 以备进行病理组织切片. 经过组织切片观察, 观察结果如图 3 所示. 图 3 中, 未感染鱼组织做空白对照.



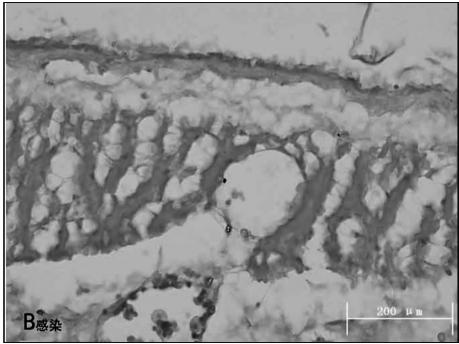
(a) 未感染鱼鳃



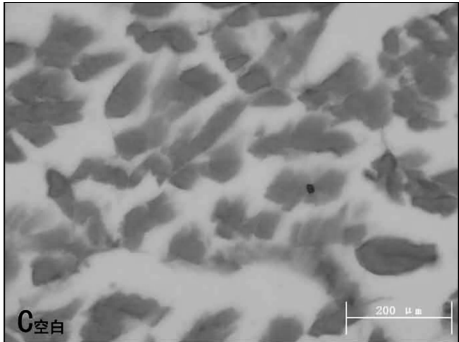
(b) 感染鱼鳃



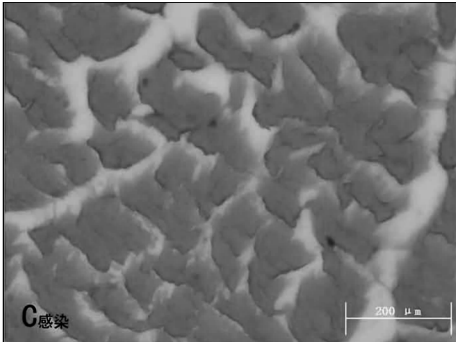
(c) 未感染鱼肠上皮



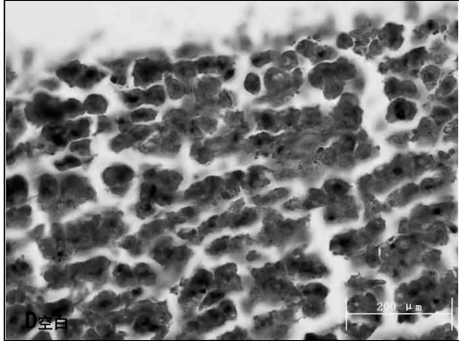
(d) 感染鱼肠上皮



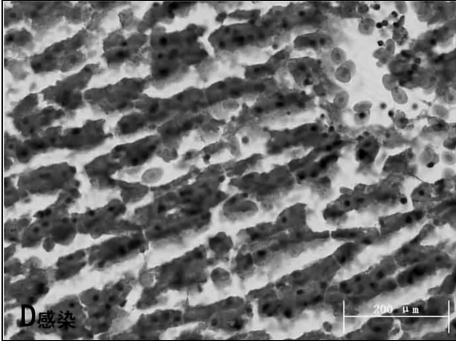
(e) 未感染鱼肌肉



(f) 感染鱼肌肉



(g) 未感染鱼肝



(h) 感染鱼肝

图 3 感染致死鱼不同组织的结构变化

Fig. 3 Structural changes of different tissues for the infected tilapia

从图 3 可知: 未感染鱼的鳃丝的横切片比较完整, 而感染组的鱼鳃丝肿大; 未感染鱼组的肠上皮细

胞排列紧密,而感染组的鱼肠上皮细胞较为疏松,并有裂痕;未感染鱼组与感染组的肌肉结构区别不是很明显,只是细胞略微变大;未感染鱼组与感染组的肝组织细胞变化不大,只是感染组的肝细胞变得修长,且有一些零散的游离细胞.从图 3 可知:未感染鱼空白组与感染组的鳃与肠的结构有明显的变化,而肌肉和肝的区别不是很明显,故从病理组织结构上进一步确定 BC-2 是罗非鱼的一种致病菌.所发现供试菌对罗非鱼的病变明显部位在于鳃与肠,对肝的症状却不是很明显,这可能与分泌的肠毒素有一定的关系,有待进一步的研究.

2.5 BC-2 菌的生理生化及 16S rDNA 序列测定

经革兰氏染色镜检发现 BC-2 菌为 G<sup>+</sup> 杆菌(图 1),其生理生化的鉴定结果如表 4 所示.

表 4 供试菌生理生化实验

Tab. 4 Examination of physiology and biochemistry for selected bacterium

鉴定项目	鉴定结果	鉴定项目	鉴定结果	鉴定项目	鉴定结果	鉴定项目	鉴定结果
革兰氏染色	G <sup>+</sup>	丙二酸盐利用	+	H <sub>2</sub> S	+	精氨酸双水解酶	—
芽孢染色	+	柠檬酸盐利用	+	M. R	+	鸟氨酸脱羧酶	—
氧化酶	+	糖、醇类发酵	—	V. P	—	赖氨酸脱羧酶	+
吡啶	+	葡萄糖氧化发酵	发酵型	接触酶	+	精氨酸脱羧酶	+
硝酸盐还原	+	苯丙氨酸脱氨酶	—	脲酶	+	色氨酸脱氨酶	—

由北京三博远志公司测定 BC-2 菌的 16S rDNA 的序列长度为 1 242 bp,GenBank 公司经 BankIt 提交申请获得国际基因库接受的序列号为 JN230702. 经 Blast 比对分析后显示与该基因序列同源性较高的全部是芽孢杆菌,其中大部分为蜡状芽孢杆菌.

图 4 为系统发育树,其中括号内编号为 GenBank 序列号,结点处数字为 Bootstrap 值.从图 4 可知:该菌与编号为 DQ420176.1 的同源性最高(达 97%),且聚为一分支.综合 BC-2 的形态、生理生化鉴定与 16S rDNA 基因序列分析结果,将 BC-2 致病菌鉴定为蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*).

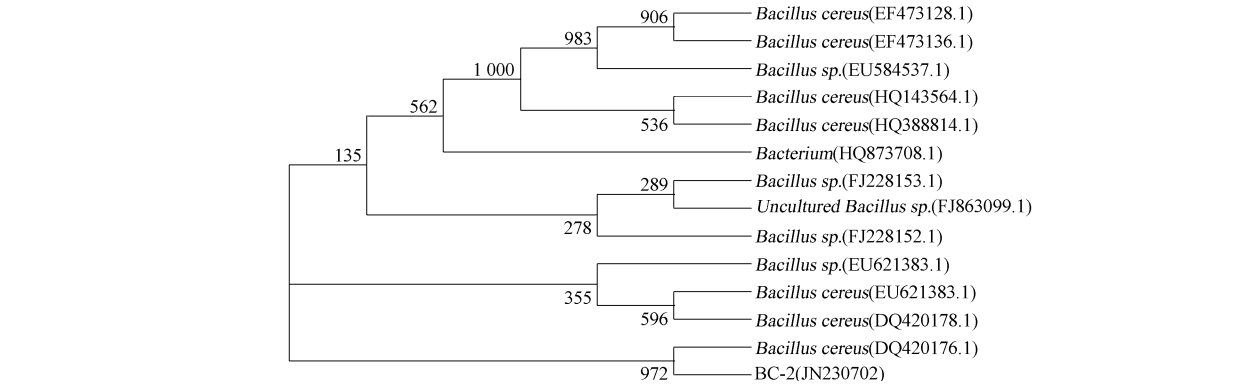


图 4 根据 BC-2 16S rDNA 序列构建的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on sequences of BC-2 16S rDNA

3 讨论

蜡状芽孢杆菌群包括蜡状芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、蕈状芽孢杆菌、炭疽芽孢杆菌、韦氏芽孢杆菌、假蕈状芽孢杆菌<sup>[14]</sup>.蜡状芽孢杆菌是一种革兰氏阳性,需氧,特定条件下厌氧,运动型的,能产生内生孢子并产生有毒物质的棒状杆菌.其内生孢子是一种高度物化的处于休眠状态的一类细胞,能抵抗极端环境,如热、脱水及其他物理刺激.蜡状芽孢杆菌能在苛刻环境中幸存是由于其孢子,一旦生存环境有利,则孢子会生长并大量繁殖<sup>[15]</sup>.但也有人发现孢子形成的环境对孢子的特性有影响,如耐热性与孢子形成的温度有关<sup>[3,16]</sup>.

近年来,对蜡状芽孢杆菌的致病性的研究表明,蜡状芽孢杆菌能引起人体产生腹泻和呕吐<sup>[17]</sup>、出血病<sup>[18]</sup>、角膜炎<sup>[19]</sup>、急性眼内炎<sup>[20-21]</sup>.Lee 等<sup>[22]</sup>报导了有关革兰氏阳性芽孢杆菌引起的皮肤类白侯感染症状.Xing 等<sup>[23]</sup>发现在免疫缺陷病人中蜡状芽孢杆菌能引起肝脓肿和出血病.Chatterjee 等<sup>[24]</sup>通过统计发现 4 407 只疟蚊幼体中有 2.8%被蜡状芽孢杆菌所感染.Andrea 等<sup>[25]</sup>发现在肝病晚期病人中蜡状

芽孢杆菌引起的噬肉病,并且认为蜡状芽孢杆菌应该被视为一种病原菌而不仅仅是污染.研究表明蜡状芽孢杆菌是一种能引起人类产生食物中毒的病原菌<sup>[8]</sup>. 本研究表明:蜡状芽孢杆菌也能致罗非鱼感染,表现出出血病状并引起高致死率.其不仅对人类健康食品生产是一种威胁,而且对罗非鱼也具潜在危害.因此,进行水产养殖中罗非鱼的致病菌之一——蜡状芽孢杆菌的研究,对于食品安全及水产养殖两方面都具有积极的意义,就像 Andrea 所呼吁的一样,蜡状芽孢杆菌应该被视为一种致病菌而非仅是一种对食品的污染.

关于鱼的病理组织结构已经有不少科学工作者有过相关的研究.蔡完其等<sup>[26]</sup>研究罗非鱼溃烂病的病理结构时发现其患病骨骼肿大、肝细胞和肾上皮细胞颗粒变性,并且乳酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶等同工酶活性减弱或消失.秦蕾等<sup>[27]</sup>对养殖中的大菱鲆的爱德华氏病进行了菌种分离,并经 16S rDNA 鉴定为迟钝爱德华氏菌;而对患病的大菱鲆的组织切片发现的肾脏病变最为明显,用光镜与电镜发现该病的主要特征是巨噬细胞增生以及肉芽肿的形成.汪开毓等<sup>[28]</sup>从斑点叉尾急性流行病分离到一株嗜麦芽寡养单胞菌,并对其进行组织病理观察,发现病变主要表现为全身组织器官广泛性水肿,其骨骼肌、肝等部位损伤较为严重,超微结构发现其线粒体与细胞核明显损伤.隗黎丽<sup>[29]</sup>研究了微囊藻毒素对鱼类的组织结构的变化,发现肝和肾脏等组织有一定程度的受损.

这些相关文献的报道,发现病原菌对鱼的病变的主要部位在肝.文中从患出血病的罗非鱼病灶部位筛选出致罗非鱼产生较大死亡率的病源菌,从病理组织切片发现其病变组织最明显的是鳃和肠,其中鳃明显肿胀,而小肠则表现为上皮细胞松散、组织结构明显遭受破坏.这与之前相关研究人员报道的爱德华氏菌导致的肝是主要的病变部位有区别<sup>[26-28,30-31]</sup>.

以该蜡状芽孢杆菌为出发菌株,开发对罗非鱼及水产养殖中对抗此种病的各种疫苗的研制,通过免疫来增强鱼体自身免疫力、减少抗生素的使用营造一个健康、生态的食物链关系,具有一定的研究意义和广泛的应用前景.

参考文献:

[1] 曹维国. 常见尼罗罗非鱼病的诊治[J]. 中国水产, 1984(2): 24-25.

[2] 李槿年, 沈守琼, 余为一, 等. 正常鱼体内条件致病菌种类的调查研究[J]. 淡水渔业, 1999(2): 21-24.

[3] 邓国成, 江小燕, 叶星, 等. 草鱼出血病混合感染的嗜水气单胞菌的分离、鉴定与理化特性[J]. 微生物学通报, 2009, 36(8): 1170-1173.

[4] 卢迈新, 黎炯, 叶星, 等. 广东与海南养殖罗非鱼无乳链球菌的分离、鉴定与特性分析[J]. 微生物学通报, 2010, 37(5): 766-774.

[5] FIGUEIREDO H C P, KLESIUS P H, ARIAS C R, et al. Isolation and characterization of strains of *Flavobacterium columnare* from Brazil[J]. Journal of Fish Diseases, 2005, 28(4): 199-204.

[6] EVANS J J, KLESIUS P H, PASNIK D J, et al. Human streptococcus agalactiae Isolate in nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Emerging Infectious Diseases, 2009, 15(5): 774-776.

[7] SOTO E, HAWKE J P, FERNANDEZ D, et al. *Francisella* sp., an emerging pathogen of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in Costa Rica[J]. Journal of Fish Diseases, 2009, 32(8): 713-722.

[8] NA J S, KIM T H, KIM H S, et al. Liver abscess and sepsis with *Bacillus pantothenicus* in an immunocompetent patient: A first case report[J]. World Journal of Gastroenterology, 2009, 15(42): 5360-5363.

[9] 冯斯敏, 云金蕊. 蜡状芽孢杆菌引起军曹鱼大批死亡的报告[J]. 中国水产, 2000(8): 39-40.

[10] 彭喜春, 张宁, 冉艳红, 等. 海产品中溶藻弧菌的筛选及其致病因子的研究[J]. 现代食品科技, 2008, 24(4): 312-315.

[11] 刘云, 刘允坤, 杨栋, 等. 牙鲆迟缓爱德华氏菌急性感染实验: 4 种不同方法的比较[J]. 海洋科学, 2001, 25(2): 8-11.

[12] 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.

[13] FINNEY D J. Probit analysis[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1977.

[14] ABEE T, GROOT M N, TEMPELAARS M, et al. Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: Diversity and role of germinant receptors[J]. Food Microbiology, 2011, 28(2): 199-208.

[15] BEDNARCZYK A, DACZKOWSKA-KOZON E G. Pathogenic features of bacteria from the *Bacillus cereus* group

[J]. Postepy Mikrobiologii,2008,47(1):51-63.

[16] CARLIN F,BRILLARD J,BROUSSOLLE V,et al. Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment[J]. Food Research International,2010,43(7):1885-1894.

[17] ARAGON-ALEGRO L C,PALCICH G,LOPES G V,et al. Enterotoxigenic and genetic profiles of *Bacillus cereus* strains of food origin in Brazil[J]. Journal of Food Protection,2008,71(10):2115-2118.

[18] 施彪,戚爱军. 蜡样芽孢杆菌引起败血症 1 例[J]. 淮海医药,1999,17(增刊 1):2.

[19] 张国富,姚远. 蜡样芽孢杆菌引起角膜炎结膜炎的诊断与分析[J]. 实用医技杂志,2001,8(4):252.

[20] 陈滨,胡勇平,项燕,等. 蜡样芽孢杆菌致暴发性眼内炎 2 例[J]. 中国眼耳鼻喉科杂志,2009,9(4):255,274.

[21] 刘春林,徐红云,李红,等. 蜡样芽孢杆菌致急性眼内炎 1 例[J]. 中国实用医药,2010,5(6):154.

[22] LEE P L,LEMO S B,O'BRIEN S H,et al. Cutaneous diphtheroid infection and review of other cutaneous gram-positive *Bacillus* infections[J]. Cutis,2007,79(5):371-377.

[23] XING Jian-ming,ZHANG Su,DU Ying,et al. Rapid detection of intestinal pathogens in fecal samples by an improved reverse dot blot method[J]. World Journal of Gastroenterology,2009,15(20):2537-2542.

[24] CHATTERJEE S,GHOSH T S,DAS S. Virulence of *Bacillus cereus* as natural facultative pathogen of *Anopheles subpictus* Grassi (Diptera: Culicidae) larvae in submerged rice-fields and shallow ponds[J]. African Journal of Biotechnology,2010,9(41):6983-6986.

[25] ANDREA H,GUPTE A,MCAULIFFE P F,et al. *Bacillus cereus* necrotizing fasciitis in a patient with end-stage liver disease[J]. Surgical Infections,2010,11(5):469-474.

[26] 蔡完其,黄琪琰. 尼罗罗非鱼溃烂病的病理研究[J]. 水产学报,1986,10(3):261-271.

[27] 秦蕾. 养殖大菱鲆爱德华氏菌病及其几种重要疾病的病理学研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2006.

[28] 汪开毓,耿毅,陈德芳,等. 斑点叉尾鲷急性流行性传染病的病原分离与病理学观察[J]. 中国水产科学,2007,14(3):457-465.

[29] 隗黎丽. 微囊藻毒素对鱼类的毒性效应[J]. 生态学报,2010,30(12):3304-3310.

[30] 郭琼林,卢全章. 鳗鲡爱德华氏菌病的组织病理学研究[J]. 水生生物学报,1995,19(1):56-60.

[31] 韩先朴,李伟,潘金培. 爱德华氏菌人工经口感染及病理观察[J]. 水生生物学报,1995,19(3):245-249.

Isolation, Identification and Histopathologic Observation of  
a Pathogen from Hemorrhage Tilapia

WANG Zhong-min, HUANG Hui-li

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** A highly pathogenic bacterium (No. BC-2) was isolated from the infected hemorrhage tilapia. Combination of the colonial morphology observation, the biochemistry test and 16S rDNA sequencing, the highly pathogenic bacterium was determined as *Bacillus cereus*, which could cause tilapia dead. Then infective test was carried out to normal tilapias with different concentrations of the pathogen, and the qualitative probability data analysis results showed that the logarithmic concentration of LD<sub>50</sub> was 7. 534 8 with the confidence interval 95% when the infective concentration was 3. 4 × 10<sup>7</sup> cfu · mL<sup>-1</sup>. After observing the pathological structure of different tissue and organ sections from infected tilapia, we found gill and intestine were the most evident lesion parts.

**Keywords:** tilapia; *Bacillus cereus*; hemorrhage; tissue section; pathology

(责任编辑: 钱筠      英文审校: 刘源岗)