

牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 秦皇岛弧菌 感染症及其病原细菌研究*

陈翠珍 张晓君 房海¹⁾ 靳晓敏 王秀云
(河北科技师范学院动物科学系 秦皇岛 066600)

提要 采用病原分离与鉴定、人工感染试验等方法,在对养殖牙鲆病例进行发病情况、病理变化特征检验的基础上,进行病原学检验。结果表明,此病例属于由弧菌属 (*Vibrio* Pacini 1854) 细菌引起的败血症。经对 12 株纯培养菌 (HQ010712-1—HQ010712-12) 进行形态特征、理化特性等表观分类学指征的检验,选择代表菌株 (HQ010712-1 株) 进行 16S rRNA 基因的测定与系统发育学分析等,判定为弧菌属的一个新种。将 HQ010712-1 株送中国典型培养物保藏中心 (CCTCC) 进行了复核鉴定与分类定名,依据分离地定名为秦皇岛弧菌 (*Vibrio qinhuangdaora* sp. nov.); 参考菌株为 HQ010712-1。

关键词 牙鲆, 细菌性败血症, 病原细菌, 系统发育学分析, 16S rRNA
中图分类号 S941

已知弧菌属 (*Vibrio* Pacini 1854) 细菌中的某些种,是危害水产养殖动物的重要病原菌,常能引起多种养殖鱼类、贝类及甲壳类等发生相应的弧菌病 (Vibriosis),且常表现出高发病率和致死率,对水产养殖生产危害严重。在弧菌病及病原弧菌种类等方面,国内外多有记载和研究报道,除了常见的鳃弧菌 (*V. anguillarum*)、副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*)、弗氏弧菌 (*V. furnissii*)、创伤弧菌 (*V. vulnificus*)、灿烂弧菌 (*V. splendidus*)、河流弧菌 (*V. fluvialis*)、解藻肌酸弧菌 (*V. alginolyticus*)、河口弧菌 (*V. aestuarianus*)、哈氏弧菌 (*V. harveyi*)、非 O1 群霍乱弧菌 (non-O1 *V. cholerae*)、奥氏弧菌 (*V. ordalii*)、鲨鱼弧菌 (*V. carchariae*) 等 (Austin et al, 1987, 1999; 室贺清邦等, 1996; 沈锦玉等, 2000; 王国良等, 2003; Anguianobltan et al, 1998; 莫照兰等, 2002, 2003; 常建波等, 2001; 吴后波等, 2001) 外,近些年也报道了一些新种,如日本竹荚鱼弧菌 (*V. trachuri*) (Iwanoto et al, 1995)、鱼肠道弧菌 (*V. ichthyenteri*) (Kim et al, 2004) 等。

几年来,作者对养殖牙鲆、大菱鲆、中华绒螯蟹等水产养殖动物的一些细菌性病害,进行了发病情况、主要病理变化及相应病原细菌方面的研究,相继检出了鳃弧菌、鱼肠道弧菌等病原弧菌。2001 年 7 月,在对一起呈败血症感染的牙鲆病例检验中,通过对病原菌的鉴定,认为是弧菌属细菌的一个新种 (sp. nov.), 现将所检牙鲆病例及相应病原弧菌主要特性等的检验结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 病例检验

对发病牙鲆鱼群在进行临床及发病情况的调查后,取濒死发病鱼及刚刚病死鱼剖检做病变检查;分别以其病变组织做抹片后经革兰氏染色镜检细菌,同时进行细菌的分离。

1.2 细菌分离与纯培养

分别取被检牙鲆病变组织,无菌操作接种于普通营养琼脂、含 7% 兔血清琼脂培养基平板,置 28℃ 培养 24—48h 做细菌分离。对所分

* 河北省科技厅科技攻关项目, 02220502D 号; 河北省自然科学基金项目, C2005000498 号。陈翠珍, 教授, E-mail: chen_cuizhen@163.com

1) 通讯作者, 房海, 教授, E-mail: fanghaib@163.com

收稿日期: 2005-01-17; 收修改稿日期: 2005-05-18

离出的细菌,在进行菌落的数量、分布及同一性等方面的检查后,从每尾鱼的分离菌落中各择一定数量分别移接于普通营养琼脂斜面(28℃培养24h)做成纯培养后置4℃冰箱保存供鉴定用。

1.3 细菌鉴定

1.3.1 形态及理化特性检查 取上述分离菌株的纯培养物,分别移接于普通营养琼脂斜面置28℃培养18h,制备涂片标本进行革兰氏染色做形态特征检查;分别移接于普通营养琼脂斜面,每株各2管,分置于37℃、28℃条件下培养24h检查生长发育情况;分别移接于细菌鉴定的相应培养基进行主要理化特性的鉴定(东秀珠等,2001);择代表菌株制备磷钨酸负染标本,置透射电子显微镜下观察细菌形态特征与鞭毛形成情况。

1.3.2 16S rRNA 基因序列测定与系统发育学分析

1.3.2.1 PCR 模板 DNA 的制备 择代表菌株 HQ010712-1 接种于 LB 肉汤中 28℃ 培养 16h,取 1ml 菌液离心(10000r/min)弃上清后悬浮于 100 μ l 无菌蒸馏水中,经 100℃ 水浴 5min 后同样离心,取上清作为 PCR 模板 DNA。

1.3.2.2 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增与测序 16S rRNA 基因 PCR 扩增的两个引物分别为 27F(正向引物): 5'-AGA GTT TGA TC(C/A) TGG CTC AG-3'(对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的第 8—27 个碱基位置)和 1492R(反向引物): 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'(对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的第 1492—1510 个碱基位置)(Martin *et al.* 1998)。在 20 μ l 反应体系中含有: 无菌蒸馏水 14.4 μ l 1 \times PCR 缓冲液 2 μ l 1.5mmol/L MgCl₂ 1.6 μ l 4 \times dNTP 混合物 0.4 μ l 引物各 0.2 μ l 2.5U/ μ l 的 *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μ l 模板 DNA 1 μ l PCR 反应条件为: 96℃ 预变性 6min,接 95℃ 变性 1min,55℃ 复性 1min,72℃ 延伸 2min,30 个循环后 72℃ 温育 6min,PCR 扩增产物经 DNA 纯化系统(Wizard PCR Purification System, Promega)纯化后,由上海博亚生物工程技术公司使用 3730 测序仪进行基因序列测定。

1.3.2.3 序列分析与数据处理 将上述代表菌株的 16S rRNA 基因序列通过 NCBI 的 Blast 检索系统(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>)进行序列同源性分析,并使用 ClustalK1.8 软件与从

GenBank 核酸数据库中获得的序列相似性较高的 16S rRNA 序列进行多序列匹配排列(Multiple Alignments),采用邻接法(Neighbor joining method)构建系统发育树。

1.3.3 细菌种类判定 以其表型性状,主要参照“Bergey's Manual of Determinative Bacteriology”(Holte *et al.* 1994)、“Bergey's Manual of Systematic Bacteriology”(Krieg *et al.* 1984)、“Bacterial Fish Pathogens Disease of Farmed and Wild Fish”(Austin *et al.* 1987, 1999)及有关资料,同时结合系统发育学分析结果,进行对供试菌的种属判定。在此基础上,选择其代表菌株送中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection, CCTCC)予以复核鉴定及分类定名。

1.4 人工感染试验

择上述分离鉴定的代表菌株,接种于普通营养肉汤中 28℃ 培养 18h,调制成 9×10^8 CFU/ml 作为供试菌液,分别经腹腔、背鳍基部肌肉注射感染体长 20cm 左右的健康牙鲆各 6 尾(0.3ml/尾,感染接种前养殖观察 5d 且健康供试),同时设立仅用同剂量、同批无菌营养肉汤接种的对照(每种途径各 3 尾共 6 尾),均隔离养殖于试验水族箱内,每天观察发病与死亡情况。对死亡鱼及时进行病变检查,并取其病变材料制备如上所述的同自然病例的抹片作革兰氏染色镜检细菌和进行细菌的分离,对所分离回收的细菌再制备纯培养后进行理化特性的复核鉴定,以被感染鱼出现同自然病例样的病变、从病死鱼重新分离回收到原感染菌作为供试菌为相应致病菌的判定指标。

2 结果

2.1 发病情况与主要病变

2001 年 7 月,对秦皇岛某海水鱼养殖场养殖的 4.5 月龄左右牙鲆所发生的病害进行了检验,结果表明其为败血性感染症。该场共养牙鲆 4 万尾左右,于 6 月份水温升高时陆续发病、死亡且日渐严重,到送检时(7 月 12 日)已发病 1 万余尾(占 25% 以上)、死亡 7000 余尾(病死率 70% 以上)。病鱼主要表现为食欲不振、游动缓慢、部分上浮、部分有腹胀;对当时送检的 17 尾濒死及刚刚病死牙鲆进行检验,其中 13 尾腹面及鳃盖有不同程度的出血、6 尾的头及背鳍肌肉出现腐烂现象、3 尾的肠管露出肛门外、5 尾死鱼的躯体弯曲;剖检见有 9 尾存在不同程度的腹水(不很

混浊但有 3 尾存在血样腹水), 肝脏肿胀 (8 尾肝有出血)、鳃多为色淡、肾和脾均有不同程度肿胀。

2.2 病变组织中的细菌

取剖检后 17 尾鱼的肝组织、腹水 (9 尾), 分别做抹 (涂) 片后经革兰氏染色镜检细菌, 发现均有不同量但均较多 (尤以在腹水中更多) 的革兰氏染色阴性, 杆状 (个别菌体稍弯曲)、短杆状、球状, 两端钝圆, 散在, 有的成双排列, 无芽孢, 大小多在 (0.6—1.2) μm \times (0.7—2.5) μm 的细菌; 在

肝组织中的以杆状、短杆状菌体偏多, 在腹水中的以短杆状、球状的菌体偏多。

2.3 细菌分离与纯培养情况

随机择上述 17 尾被检牙鲆鱼中的 6 尾, 分别以其肝、肾、腹水为材料, 按 1.2 中所述划线接种于培养基平板做细菌培养, 结果从每尾被检鱼的各种被检组织中均分离到了数量不等但均较多且为同一种细菌的菌落, 其菌落特征如表 1 所示。

表 1 分离菌的菌落特征

Tab. 1 The colony characteristics of isolates

培养基	菌落特征
普通营养琼脂	圆形光滑、边缘整齐、稍隆起、半透明、无色或近浅灰白色, 菌落直径为培养 24h 多在 0.4mm 左右、48h 多在 1.0mm 左右, 生长中度
血液营养琼脂	圆形光滑、边缘整齐、稍隆起、 β -溶血、无色或近浅灰白色, 菌落直径为培养 24h 多在 0.5mm 左右、48h 多在 1.0mm 左右, 生长中度

从每尾鱼不同被检组织材料中随机取菌落 (选择每尾鱼两种被检材料的各 1 个, 共 2 个), 按“1.2”中所述移接于普通营养琼脂斜面做纯培养后供鉴定用; 如此 6 尾鱼共做纯培养菌 12 株, 各菌株按顺序依次编号为 HQ010712-1—HQ010712-12。

2.4 分离菌的理化性状及菌种分类定名

2.4.1 形态特征 12 株纯培养菌的形态特征一致, 并与在病变肝组织中的相同, 均为革兰氏染色阴性, 杆状但多为短杆状、球状, 有的杆状菌体稍弯曲, 两端钝圆, 散在, 有的成双或呈 3—8 个的不规则短链状 (这种排列形式以似球状菌体为多) 排列, 无芽孢, 大小多在 (0.5—1.2) μm \times (0.5—2.2) μm 的细菌。用代表菌株 HQ010712-1 所做的电镜标本形态检查, 发现菌体表面似呈皱褶状, 形成端生的单鞭毛。

2.4.2 理化特性 供试的 12 株纯培养菌, 均仅在 28 $^{\circ}\text{C}$ 条件下的生长, 菌苔呈较透明状的灰白色, 生长中度, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的无生长; 12 株菌对所测理化特性项目的反应一致 (表 2)。

2.4.3 16S rRNA 基因序列和系统发育学 用 HQ010712-1 株所扩增的 16S rRNA 基因序列长度为 1431bp 在 GenBank 登录号为 AY863432 该菌株与通过 NCBI 的 Blast 检索系统检索出的弧菌属细菌 16S rRNA 基因序列自然聚类, 在系统

发生树中单独聚为一个分支。在检索出的弧菌属细菌序列中, HQ010712-1 株与它们的同源性均在 95%—99%。选取了其中的 28 株弧菌属细菌的 16S rRNA 基因序列进行系统学分析, 其系统发育树如图 1 所示。

2.4.4 菌种分类定名 根据上述理化特性及系统发育分析结果, 认为属于弧菌属细菌的新种。经择代表菌株 HQ010712-1 株, 送 CCTCC 做复核鉴定与分类定名, 同样鉴定为弧菌属新种并依据《细菌命名国际法规》(ICNB), 将其定名为秦皇岛弧菌 (*Vibrio qinhuangdaora* sp. nov.), 参考菌株 (Reference strain) 为 HQ010712-1。

2.5 致病性

择上述经鉴定后的秦皇岛弧菌代表菌株 — HQ010712-1 株, 按 1.4 中所述感染的健康牙鲆 6 尾 (每种途径), 结果腹腔接种的 6 尾于感染后 3d 4d 5d 各死亡 1 尾、3 尾、2 尾, 发病及死亡率 100% (6/6), 均表现有肝脏不同程度肿胀, 5 尾有腹水 (其中 3 尾为血样腹水); 肌肉注射的 6 尾于感染后 5d 6d 各死亡 2 尾、4 尾, 发病及死亡率 100% (6/6), 均表现肝脏不同程度肿胀及充血 (其中 4 尾有不同程度坏死病变), 5 尾存在肾脏肿胀, 3 尾有腹水。对照 6 尾鱼, 于 10d 观察期内均正常存活。

表 2 理化特性鉴定结果

Tab 2 Results of physiological and biochemical characteristics

项目	结果	项目	结果	项目	结果
37℃ 生长试验	-	甘露醇	+	脂酶 (吐温 80)	+
氧化酶	+	吲哚产生	-	糊精	+
接触酶	+	七叶苷利用	-	松二糖	-
克氏双糖铁琼脂: 斜面	-	苯丙氨酸脱氨酶	-	硝酸盐还原	+
柱层	+	尿素酶	-	水杨苷	-
H ₂ S	-	IPA (SM)	-	卫茅醇	-
OF 试验 (葡萄糖)	F	麦芽糖	+	甘露糖	+
H ₂ S 产生: 纸条法	-	丙二酸盐利用	+	半乳糖	+
琼脂法	-	醋酸盐利用	-	甘油	-
动力 (半固体)	+	木糖	-	赤藓醇	-
明胶液化	-	木糖醇	-	海藻糖	+
枸橼酸盐利用 (Simmons)	-	苦杏仁苷	-	纤维二糖	+
葡萄糖: 产酸	+	侧金盏花醇	-	菊糖	-
产气	-	松三糖	-	棉子糖	-
山梨醇	-	酒石酸盐利用	-	乙酰胺酶	-
蜜二糖	-	黏液酸利用	-	阿拉伯醇	-
蔗糖	+	卵磷脂酶 (蛋黄法)	+	乳糖	-
鼠李糖	-	蛋白酶 (7% 牛奶营养琼脂)	-	ONPG	+
肌醇	-	淀粉酶 (碘液显示法)	+	α-甲基-D-葡糖苷	-
MR 试验	-	DNA 酶 (盐酸覆盖法)	+	精氨酸双水解	-
V-P 反应	-	NaCl 肉汤中生长: 0%	-	O/129: 10 ⁴ g	S
阿拉伯糖	-	1%	+	150 ⁴ g	S
山梨糖	-	6%	+	C+ Gm o% (HPLC)	64.1
果糖	+				

注: 表中符号的 + 示阳性, - 示阴性, S 示敏感, F 示发酵型, G+ Gm o% 为由 CCTCC 对 HQ010712-1 株的测定结果

取不同途径感染死亡牙鲆各 3 尾的肝脏, 直接做抹片经革兰氏染色镜检, 发现均有大量在形态特征上表现同前述自然感染病例中的革兰氏染色阴性细菌。同时, 用其以普通营养琼脂、含

7% 兔血营养琼脂做细菌分离 (28℃ 培养 48h), 结果均分离到大量纯一的同前面所述的原感染菌的菌落, 取每尾鱼分离菌各 1 个菌落做纯培养 (共 6 株) 进行复核鉴定, 结果与原感染菌完全一致。

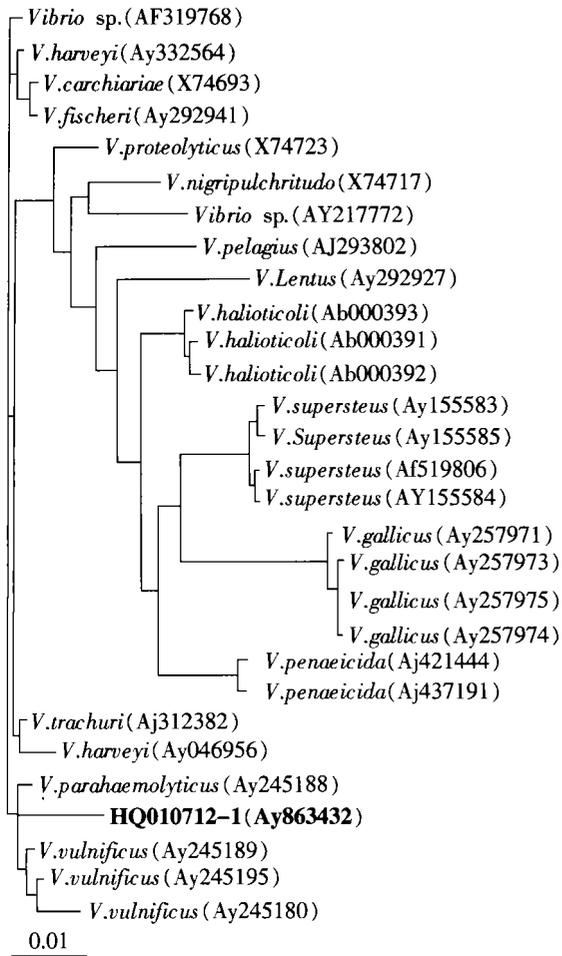


图 1 16S rRNA 基因序列系统发育树

Fig 1 Phylogenetic tree of the 16S rRNA gene sequences
图中 AF319768—AY245180 为菌株在 NCBI 的 16S rRNA 基因登录号

3 讨论与结论

3.1 从对本起牙鲆自然病例的检验结果分析, 认为所检出的新种弧菌——秦皇岛弧菌是相应的病原菌。感染病(死)鱼仅表现为败血症特征, 未见具有诊断意义的临床特征与病理变化。至于该菌对不同生长阶段、不同营养环境条件的牙鲆, 是否能引起不同的感染类型, 对其他鱼类是否具有病原学意义等, 尚有待于对自然病例广泛的检验及人工感染试验的研究予以明确。

3.2 在“Bergey's Manual of Determinative Bacteriology”第九版(1994)中, 弧菌属内记载了 37 个种 (species) 及生物型 (biovar)。近些年来, 又有一些新种病原弧菌的报道, 如日本竹荚鱼弧菌、鱼肠道弧菌等。本次从发病(死)牙鲆中检出的病原弧菌, 根据所测理化特性及系统发育学分析的

结果暂定为新种弧菌, 依据《细菌命名国际法规 (ICNB)》, 以其分离地(秦皇岛)进行了相应种的定名即: 秦皇岛弧菌, 参考菌株为 HQ010712-1。至于该菌更全面的生物学性状、生态分布等, 还有待进一步的研究阐明, 以便最准确地确定该菌与其他弧菌的同源相关性。

3.3 弧菌属细菌的某些种对牙鲆鱼类的感染发病在国内外已多有报道, 其中主要包括鳗弧菌、鲨鱼弧菌、灿烂弧菌、河流弧菌、解藻朊酸弧菌(莫照兰等, 2002, 2003; 常建波等, 2001; Austin et al, 1987, 1999; 室贺清邦等, 1996; Anguianoblrán et al, 1998)、鱼肠道弧菌(Kim et al, 2004)等病原弧菌。本次报道的从病(死)牙鲆所检出的弧菌属中的一个新种——秦皇岛弧菌, 在鱼类病原弧菌中尚属首次检出, 从某种意义上讲, 增添了弧菌属细菌的新内容, 在细菌分类、相应的毒力因子及致病作用研究、有效的检验与防治等方面也具有一定的意义; 同时, 也提示在对牙鲆弧菌病的检验中, 需对该新种弧菌予以关注。

参 考 文 献

王国良, 郑天论, 金 珊等, 2003 黑雕幼鱼腹水病原菌. 中国兽医学报, 23(1): 33—35

东秀珠, 蔡妙英编著, 2001. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 106—119, 353—398

吴后波, 潘金培, 2001. 弧菌属细菌及其所致海水养殖动物疾病. 中国水产科学, 8(1): 89—93

沈锦玉, 尹文林, 钱 冬等, 2000 中华绒螯蟹“腹水病”及“抖抖病”并发病病原的研究. 中国水产科学, 7(3): 89—92

莫照兰, 茅云翔, 陈师勇等, 2002. 一株牙鲆皮肤溃烂症病原菌的鉴定. 微生物学报, 42(3): 263—269

莫照兰, 茅云翔, 陈师勇等, 2003. 养殖牙鲆鱼苗腹水症病原菌的鉴定及系统发育学分析. 海洋与湖沼, 34(2): 131—141

常建波, 宫向红, 孙逢贤等, 2001. 养殖牙鲆弧菌病病原菌初步研究. 海洋水产研究, 22(1): 37—41

室贺清邦, 江草周三, 1996. 鱼病学概论. 东京: 恒星社厚生阁, 47—64

Anguianoblrán R, Searcybe mal M L, Lizarragapartida et al, 1998. Pathogenic effects of *Vibrio alginolyticus* on Larvae and postlarvae of the red adabne Diseases of Aquatic Organisms 33(2): 119—112

Austin B, Austin D A, 1987. Bacterial Fish Pathogens Disease in Farmed and Wild Fish. Chichester: Ellis Horwood Limited 263—265

- Anstın B, Austin D A, 1999. Bacterial Fish Pathogens Disease of Farmed and Wild Fish. Third (Revised) Edition. Praxis Publishing Ltd, Chichester, U K, 29—32, 106—140
- Holt J C, Krieg N R, Sneath P H A *et al*, 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition. Baltimore, Williams and Wilkins, 190—194, 253—274
- Iwamoto Y, Suzuki Y, Kurita A *et al*, 1995. *Vibrio trachuri* sp. nov., a new species isolated from diseased Japanese horse mackerel. Microbiology and Immunology 39: 831—837
- Krieg N R, Holt J C, 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 1. London: Williams and Wilkins, Baltimore, 518—538
- Kin D H, Han H J, Kim S M *et al*, 2004. Bacterial enteritis and the development of the larval digestive tract in olive flounder *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel). Journal of Fish Diseases 27(9): 497
- Iwamoto Y, Suzuki Y, Kurita A *et al*, 1995. *Vibrio trachuri* sp. nov., a new species isolated from diseased Japanese horse mackerel. Microbiology and Immunology 39: 831—837
- Martin F, Polz C, Colwell C A, 1998. Bias in template to product ratios in multitemplate PCR. Appl Environ Microbiol 64(10): 3724—3730

INFECTION AND CHARACTERIZATION OF *VIBRIO QINHUANGDAORA* SP. NOV ISOLATED FROM FLOUNDER *PARALICHTHYS OLIVACEUS* L.

CHEN Cui-Zhen, ZHANG Xiao-Jun, FANG Hai, JIN Xiao-Min, WANG Xi-Yun

(Department of Animal Science, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao, 066600)

Abstract Continuous high-level mortalities occurred in cultured flounder of a farm in Qinhuangdao, Hebei Province. Examination of naturally diseased fish had indicated a range of symptoms including poor or no appetite, slowly swimming, and often floating onto the water surface. Pathological examinations of 17 moribund and dead fish displayed haemorrhages on the opercula, mouth and fins; rot of muscles from head to dorsal fin, and anus extrusion. Internally, there were swelling of the liver, gallbladder, kidney and spleen, haemorrhaging in the liver, kidney and intestinal walls, ascitic fluid in the peritoneum. The main objective of this study was to examine infection, isolate and identify the pathogenic bacteria, and clarify the pathogenicity, so as to provide further information for examination and control infectious diseases of flounder.

Preliminary identification based on morphological, physiological and biochemical characteristics, and the mol% G+C ratio of the DNA for representative strains, showed that the isolates belonged to species of *Vibrio*. In addition, molecular identification and analysis of the nucleotide sequence of the 16S rRNA gene was conducted. Molecular phylogenetic trees were constructed. The morphological characteristics of 12 strains (numbered as HQ010712-1 to HQ010712-12) were consistent: Gram-negative, rod-shaped with rounded ends to coccoid, slightly curved (0.5—1.2) μm × (0.5—2.2) μm in size, occur singly, in pairs or irregularly short chains, non-endospores; electron micrographs revealed a single polar flagellum. The 16S rRNA of representative strain (HQ010712-1) were sequenced; the length of the 16S rRNA gene sequence is 1431 bp, accession numbers in NCBI is AY863432.

Infection trials of healthy flounder using selected representative strains, revealed that all infected groups experienced morbidities and mortalities regardless of the site of injection, and infected flounder manifested a septicæmia and clinical disease as in the naturally infected fish. In addition, the representative strain (HQ010712-1) was confirmed by China Center for Type Culture Collection (CCTCC), which the results consistent with ours, and were regarded as new species of *Vibrio*, which were designated as *Vibrio qinhuangdaora* sp. nov. based on its biological properties following "Rules of International Code of Nomenclature of Bacteria".

Key words Flounder *Paralichthys olivaceus* L., Bacterial septicæmia, Pathogenic bacteria, Phylogenetic analysis, 16S rRNA