



# 牛副流感病毒 3 型的分离鉴定

刘鹏 侯喜林\* 周玉龙 朴范泽

(黑龙江八一农垦大学动物科技学院 黑龙江 大庆 163319)

**摘要:** 从黑龙江省某牛场患有呼吸道疾病的病牛鼻液中分离到 1 株病毒, 该病毒能在 MDBK 细胞上增殖并产生特征性细胞病变, 对分离毒株进行理化特性、RT-PCR 鉴定及序列测定与分析, 结果发现该病毒为 RNA 病毒, 具有血凝性, 对乙醚、氯仿极其敏感, 不耐热, 对酸的抵抗力差; 分离株与 GenBank 中已发表的病毒株 N 基因片段的同源性为 82.6%~99.1%, 结果表明分离的病毒为牛副流感病毒 3 型毒株, 命名为 BPIV3 DQ1 株。根据 GenBank 上发表的牛副流感病毒 3 型核衣壳蛋白 N 基因序列, 设计合成了一对特异性引物, 能扩增 704 bp 的目的片段, 可以检测出 10 个 TCID<sub>50</sub>/100 μL 病毒核酸。

**关键词:** 牛副流感病毒 3 型, 分离, 鉴定, RT-PCR

## Isolation and Identification of Bovine Parainfluenza Virus Type 3

LIU Peng HOU Xi-Lin\* ZHOU Yu-Long PIAO Fan-Ze

(College of Animal Science and Technology, Heilongjiang August-First Land Reclamation University, Daqing, Heilongjiang 163319, China)

**Abstract:** One virus strain was isolated from the nasal secretion of a bovine suspected to be respiratory tract disease at a beef farm in Heilongjiang province. The virus could grow well and produce typical cytopathic effect in MDBK cells. Bovine parainfluenza virus type3(BPIV3) has been identified by a series of systematic identification such as physicochemical features, RT-PCR, and sequence analysis. As a result, the virus is an RNA virus, which is of hemagglutination and is very sensitive to ether and chloroform, no resistance to heat and acid. The homology of the nucleocapsid(N) gene sequence of the isolate and of GenBank is 82.6% to 99.1%. The isolated virus was confirmed as Bovine parainfluenza virus type3 named BPIV3 DQ1 strain. Specific primers were designed and synthesized according to the reported N protein gene sequence of Bovine parainfluenza virus type3 in GenBank. The size of 704 bp fragment was amplified and 10 TCID<sub>50</sub>/100 μL of viral nucleic acid was detected.

**Keywords:** BPIV3, isolation, identification, RT-PCR

牛副流感病毒 3 型病是由牛副流感病毒 3 型 (Bovine parainfluenza virus type3, BPIV3)引起的一

种急性、热性传染病。BPIV3 属于副黏病毒科副黏病毒属, 为单链负股有囊膜的 RNA 病毒, 是引起牛

和其它反刍动物急性呼吸道疾病的主要病毒之一<sup>[1]</sup>。1959 年 Reisinger 等在美国首次从牛体分离到此种病毒<sup>[2]</sup>。随后, 法国、前苏联、日本、丹麦、加拿大、澳大利亚、巴拿马和意大利等国家也相继分离出该病毒, 而我国尚未见该病毒的分离报道。目前, 我国许多地区的牛群中的急性呼吸道疾病非常普遍, 对养牛业危害很大, 从发病情况看, 牛副流感病毒 3 型可能是引起牛呼吸道疾病的一个最重要的病原。

2008 年 6 月中旬, 黑龙江省某农场牛群爆发了疑似牛副流感病毒 3 型病例, 病牛体温高达 40°C 左右、呼吸急促、咳嗽、流鼻涕、流泪以及流涎等。采集发病牛的鼻液进行病毒分离, 经过细胞培养、病毒增殖、理化特性试验和序列分析, 分离的病毒为牛副流感病毒 3 型; 同时利用分离毒株建立了 RT-PCR 方法。这一结果在国内首次揭示了由副流感病毒 3 型病毒引起的牛副流感病存在, 为今后该病的流行病学、免疫学、致病机理和免疫预防等方面的研究奠定了基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

1.1.1 病料来源: 无菌采集处于发热期疑似 BPIV3 感染病牛鼻腔深部的鼻液作为病毒分离的病料。

1.1.2 细胞和培养基: 牛肾细胞(MDBK)均购自中国科学院上海细胞库, DMEM 培养基为 Gibco 公司产品; 犊牛血清为 PAA 公司产品。

1.1.3 主要试剂: Trizol reagent 购自 Invitrogen 公司, M-MuLV 反转录酶(200 U/ $\mu$ L)、HPR I RNA 酶抑制剂(40 U/ $\mu$ L)、dNTP(10 mmol/L)、LA Taq DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L)、dNTPs (2.5 mmol/L)、DNA marker DL2000 均购自 TaKaRa 公司; DEPC 水、琼脂糖均购自 Sigma 公司; 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.1.4 参考毒株: 牛副流感病毒 3 型(BPIV3)BN-1 株、牛呼吸道合胞体病毒(BRSV)NMK-7 株和牛腺病毒 7 型(BAdV-7) Fukuroi 株由日本动物卫生研究所惠赠; 牛鼻气管炎病毒(IBRV)DQ 分离株和牛冠状病毒(BCV)DQ 分离株由黑龙江八一农垦大学传染病实验室分离鉴定保存。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养: MDBK 细胞用含 10% 犊牛血清的 DMEM 培养液培养, 用含 EDTA 的胰酶消化细胞, 传代, 待细胞长成单层后, 用于病毒接种。

1.2.2 病料的处理: 将无菌采集病牛鼻液的棉拭子装入灭菌试管内, 加入适量(以充分浸泡棉拭子为宜)含青、链霉素各 100 U/mL 的 Hanks 液, 将浸泡液吸出, 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液过滤除菌后, 立即接种 MDBK 细胞。

1.2.3 病毒分离与传代: 取上述处理的滤液 0.5 mL 立即接种于已长成单层处于对数生长期的 MDBK 细胞, 37°C 吸附 2 h, 间隔 30 min 轻摇 1 次, 使滤液与细胞充分接触。吸附后用 PBS 轻洗 2 遍, 然后加入不含有犊牛血清的 DMEM 维持液, 于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 每天观察细胞病变(CPE)。盲传 3 代未出现 CPE 且鉴定为阴性者废弃, 阳性者继续传代, 直至出现 CPE。当 CPE 出现 80% 时收毒, -80°C 反复冻融 3 次后, 4000 r/min 离心 15 min, 取上清-80°C 保存备用。

1.2.4 病毒的滴定(TCID<sub>50</sub> 的测定): 将参考毒株 BN-1 株的第 6 代细胞毒和分离毒株的第 8 代细胞毒分别进行滴定, 测定毒价。方法如下: 将收获的病毒上清液用不含血清的 DMEM 培养基按 10<sup>-1</sup>~10<sup>-10</sup> 稀释, 每个稀释度做 8 个重复(接种 8 孔), 每孔接种 100  $\mu$ L, 37 °C 孵育 2 h。吸去病毒液, 用 PBS 洗 1 遍, 每孔加 200  $\mu$ L 细胞维持液持续在 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。每天观察记录 CPE, 5 d 后判定结果, 同时设阳性对照(BPIV3 参考毒株)和阴性对照(维持液)。

1.2.5 病毒理化特性试验: 对分离病毒的第 10 代 MDBK 细胞培养物进行理化特性鉴定, 用终浓度为 50 mg/L 的 5-碘脱氧尿核苷(5-IUDR)处理分离毒, 鉴定病毒核酸型; 用乙醚、氯仿处理分离毒, 进行脂溶性敏感试验; 用 pH 3.0 的盐酸处理分离毒, 进行耐酸性试验; 56°C 水浴 30 min, 对分离毒进行耐热性试验, 同时分别设立对照组。

1.2.6 RT-PCR 鉴定: 1) 引物设计。根据 GenBank 上发表的 BPIV3 N 蛋白基因序列, DNASTar 比对所有 BPIV3 N 蛋白基因序列, 利用 Oligo 6.0 在保守区设计 2 条引物。N 基因的上游引物为: 5'-GAGAAAGACCCAGGAAGACAGA-3', 下游引

物为:

5'-ACACCCATCGCATAACTCCAGA-3', 预计扩增产物为 704 bp。

2) BPIV3 的 RNA 提取。按照 Trizol reagent 试剂说明提取总 RNA。

3) 反转录(RT)。20  $\mu$ L 反转录体系中, 反转录引物(上游) 1  $\mu$ L, 模板 11  $\mu$ L, 70 $^{\circ}$ C 作用 5 min, 冰浴 2 min; 再加入 5 $\times$ M-MuLV Buffer 4.0  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 2.0  $\mu$ L, HPR I RNA 酶抑制剂 1.0  $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C 作用 5 min; 离心后加入 M-MuLV 反转录酶 1.0  $\mu$ L, 充分混匀后离心, 42 $^{\circ}$ C 温浴 90 min, 70 $^{\circ}$ C 10 min 灭活反转录酶, 冰浴 2 min, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

4) PCR 反应。PCR 反应于 25  $\mu$ L 体系中进行: rTaq buffer 2.5  $\mu$ L, dNTPs(2.5 mmol/L) 1  $\mu$ L, 上、下游引物(20  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, 模板 DNA 2.0  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 17.3  $\mu$ L, 后加 rTaq(5 U/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 50 s, 50 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物于 4 $^{\circ}$ C 保存。取反应产物 5  $\mu$ L, 加入适量的上样缓冲液, 混匀后于 1% 琼脂糖凝胶 (EB 浓度为 5  $\mu$ g/mL)中 200 V 电压下电泳 10 min, Gel Doc 2000 成像系统(美国, BioRad 公司)观察并照相。

5) 序列测定与分析。将 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体上, 再转化到 DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态细胞中得到重组菌, 提取质粒, 进行酶切鉴定。将酶切鉴定阳性的重组菌送往上海生工生物技术有限公司进行测序。应用 DNASTar 软件分析测定的序列。

1.2.7 血凝和血凝抑制试验: 将上述出现 CPE 变化的细胞培养液进行血凝和血凝抑制试验, 方法参照殷震等编著的《动物病毒学》<sup>[3]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 病毒的分离

在牛场采集的病料中, 经细胞培养后, 有 1 份出现典型的 CPE。该分离株在 MDBK 细胞上盲传 3 代后, 少数细胞开始出现融合病变, 连传 7 代后能够产生稳定且典型的规律性细胞病变。病变早期可见典型的细胞变大、变圆现象, 然后局部细胞开始融合; 晚期细胞开始表现为大面积融合呈网状, 最

后融合细胞坏死、脱落(见图 1)。对照组细胞培养 72 h 后生长良好, 铺满培养瓶底, 未见细胞发生病变(见图 2)。

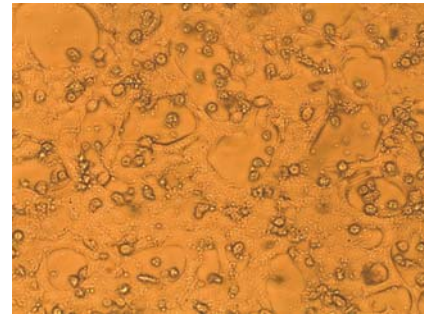


图 1 接毒后 72 h CPE(1: 100)

Fig. 1 CPE after infected 72 h (1:100)



图 2 72 h 后正常 MDBK 细胞(1: 100)

Fig. 2 Normal MDBK cell after 72 h (1:100)

### 2.2 病毒的滴定(TCID<sub>50</sub>/100 $\mu$ L 的测定)

按 Reed-Muench 算法<sup>[3]</sup>进行计算, 结果参考毒株 BN-1 株的第 6 代细胞毒和分离毒 DQ 株的第 8 代细胞毒的 TCID<sub>50</sub>/100  $\mu$ L 分别为 10<sup>9.9</sup> 和 10<sup>8.9</sup>。

### 2.3 病毒的理化特性

分离毒的核酸型测定、脂溶性敏感试验、耐酸性试验和耐热性试验结果见表 1。试验结果表明, 所分离的病毒是有囊膜的 RNA 病毒, 对乙醚、氯仿极其敏感, 不耐热, 对酸的抵抗力较弱。

### 2.4 病毒的 RT-PCR 鉴定

按照参考文献方法<sup>[4]</sup>进行扩增, 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 所得产物为 704 bp, 与预期结果相一致(见图 3)。

### 2.5 序列测定与分析

用 DNASTar 软件对测序结果进行分析, DQ 株 N 基因序列与 BN-1 参考毒株 N 基因序列比较结果(见图 4)。DQ 株 N 基因序列与 GenBank 中已发表的副流感病毒 3 型 N 基因序列的同源性为 82.6%~99.1%(见图 5)。

表 1 分离毒 DQ 株理化特性检测结果			
Table 1 The results of physical and chemical characteristics of bovine isolated DQ			
检测项目 Detection	分组 Group	TCID <sub>50</sub> /100 μL	结果 Results
Type of nucleic acid	IUDR treatment	10 <sup>6.9</sup>	RNA
	Control	10 <sup>8.0</sup>	病毒
Ether sensitive test	Ether treatment	0	敏感
	Control	10 <sup>4.6</sup>	
Chloroform sensitive test	Chloroform treatment	0	敏感
	Control	10 <sup>5.0</sup>	
Acid sensitive test	pH 3.0	10 <sup>2.7</sup>	对酸
	pH 7.2	10 <sup>4.3</sup>	敏感
Temperature sensitive test	56°C 30 min	0	对热
	37°C 30 min	10 <sup>3.5</sup>	敏感

注: 与对照组相比, TCID<sub>50</sub> 降低 2 个滴度以上判为敏感.

Note: In comparison with control, it is judged as sensitive when TCID<sub>50</sub> decrease over 2 titers.

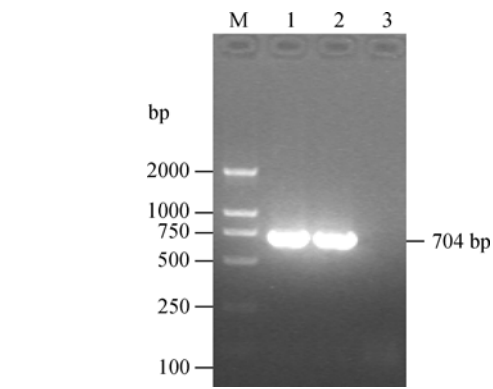


图 3 N 基因片段 RT-PCR 扩增结果

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of the RT-PCR product

注: M: DNA marker DL2000; 1: DQ 株; 2: BN-1 株, 阳性对照; 3: 阴性对照.

Note: M: DNA marker DL2000; 1: DQ strain; 2: BN-1 strain, positive control; 3: Negative control.

```

1 ATGGTGGGCTCGTAGTTAAGACCAGAGAGATGTTTATGAAAAGACAACTGACTGGATGT BN-1
1 .GAAG . . . . . - . . . . . DQ
61 TCGGGAGTGATCTTGAGTATGATCAAGACAATATGTTGCAAAATGGCAGAA GTACTTCTA BN-1
60 . . . . . DQ
121 CAATCGAGGATCTTGTTTCATACTTTGGATATCCATCATGCTTGGAGCCCTTATAATCC BN-1
120 . . . . . DQ
181 AGGTTTGATTATACTTGTCAAAGGCTATAACTAGTATATCAGGATTGAGGAAGGGATTCT BN-1
180 . . . . . DQ
241 TTA CTC GATTA GAAG CATTTA GA CAA GATGGGACAGTTAAATC CAGCTTG TGTTAAGCG BN-1
240 . . . . . DQ
301 GTGATGCAGTAGAACAAATTGGATCAATTATGAGGTCTCAACAGAGCTTAGTAACTCA BN-1
300 . . . . . DQ
361 TGGTTGAAACA CTGATAACAATGAA CACAGGTA GGAA CGA CTTGACAA CGATAGA GAAGA BN-1
360 . . . . . DQ
421 ATATACA GATTGTAGGAAA CTATATAAGGGATGCAGGTCTTGCCCTCATTTTTCAACACAA BN-1
420 . . . . . DQ
481 TCAGATACGGCATTGAGACTAGAATGGCAGCTCTAACTCTGTCTACCCTCAGACCGGACA BN-1
480 . . . . . DQ
541 TCAATAGGCTCAAAGGCACTGATAGAGCTATATCTATCAAAAAGGGCCACGTGCTCCTTTTA BN-1
540 . . . . . DQ
601 TATGCATTTTAAGAGATCCTGTGCATGGTGAGTTGCGACCAGGCAACTATCCCGCTCTCT BN-1
600 . . . . . DQ
661 GGAGTTATGCGA-TGGGTGTA BN-1
660 . . . . . A . . . . . DQ
    
```

图 4 DQ 株 N 基因序列与 BN-1 株 N 基因序列比较

Fig. 4 The sequence comparison of the nucleotide for N gene of DQ strain and BN-1 strain

		Percent Identity							
		1	2	3	4	5	6	7	
Divergence	1	100.0	98.1	92.1	85.4	92.1	92.4	1	NC_002161
	2	0.0	100.0	98.1	92.1	85.4	92.1	2	AF178654 Kansas
	3	1.9	1.9	100.0	92.6	84.8	92.6	3	AF178655 Shipping Fever
	4	8.5	8.5	8.0	100.0	84.0	100.0	4	D84095 PAFP
	5	16.8	16.8	17.6	18.7	100.0	84.0	5	EU277658
	6	8.5	8.5	8.0	0.0	18.7	100.0	6	Y00114(BN-1)
	7	8.1	8.1	7.0	0.7	19.3	0.7	7	DQ
		1	2	3	4	5	6	7	

图 5 DQ 株 N 基因核苷酸同源性(%)比较

Fig. 5 The homology comparison of the nucleotide sequence for N gene of DQ strain

## 2.6 血凝和血凝抑制试验

血凝试验结果为, 待检样本的血凝素效价为 1 : 256, 应用参考毒株的阳性血清, 进行血凝抑制试验, 结果为阳性。

## 3 讨论

1) 经细胞培养、病毒增殖和理化特性试验初步鉴定所分离的病毒为 BPIV3, 该病毒对 5-IUDR 不敏感, 表明分离毒为 RNA 病毒, 并且该病毒不耐热, 对酸、乙醚和氯仿均敏感, 并且该病毒可以凝集或吸附动物的红细胞, 这进一步证明所分离的病毒是 BPIV3。但这些试验方法存在操作复杂、鉴定时间长及准确性受多种因素影响等方面的不足。RT-PCR 是近年来发展起来的生物高新技术, 具有很好的特异性和敏感性, 作为实验室确诊 BPIV3 的依据可信度较高<sup>[4]</sup>。BPIV3 N 蛋白基因具有高度保守性<sup>[5]</sup>, 并且在 BPIV3 感染细胞中 N 蛋白含量最高。因此, 本研究以核衣壳蛋白(N)基因序列为基础设计合成了一对特异性引物<sup>[6]</sup>, 对 N 基因进行克隆、扩增。序列分析结果表明, 分离株 N 基因片段序列与 GenBank 中已发表的毒株序列同源性为 82.6%~99.1%, 从分子水平上证明该毒株为 BPIV3。PCR 的结果表明, 引物浓度对 PCR 反应影响不大, 引物浓度在 0.25  $\mu$ M 到 2  $\mu$ M 之间时, 所扩增出来的目的片段都很清晰, 所以我们本着既节约成本又不影响鉴定结果的原则, 建议反应体系中引物浓度最少在 0.5  $\mu$ mol/L~1.5  $\mu$ mol/L 之间。而 dNTP 对该 PCR 反应影响要大的多, 当 dNTP 浓度为 0.025 mmol/L 或以下时就无法扩增出目的片段。

2) 目前, 实验室诊断 BPIV3 的方法主要有病毒分离法、血凝试验和血凝抑制试验。这些方法各有其优缺点, 病毒分离鉴定, 虽然繁琐且耗时, 但是要获得研究材料又必不可少; 血凝试验和血凝抑制试验无法对采集病料直接检测, 首先需要进行细胞培养, 然后对细胞培养液进行检测, 因此无法用于快速诊断; RT-PCR 诊断方法快速、敏感、特异性强, 对模板要求低, 可以从病料中直接扩增 DNA, 比传统的诊断方法更具有实际应用价值, 为 BPIV3 的鉴别和诊断提供了有效的手段。

3) BPIV3 分离的影响因素。BPIV3 是 RNA 病毒, 该病毒不稳定<sup>[7]</sup>, 对环境抵抗力极弱。在无蛋白质的溶液中, 室温放置 2 h~4 h, 其感染力可降至 10%或几乎无感染力, 所以 BPIV3 的分离比较困难。病料采集的部位、时间、样品处理、病程类型、发病牛的抗病毒抗体水平等因素对病毒的分离成功与否都有一定的影响<sup>[8]</sup>, 其主要影响因素有以下 2 个方面: (1) 临床采集的样本从农场运送到实验室的过程中严重降低了病毒的分离率; (2) 分离病毒所采用的细胞系是否有适合病毒吸附的受体。病毒能在多种细胞培养上增殖并产生 CPE 变化, 分离病毒或传代时采用牛肾和牛睾丸细胞最好。本实验采用 MDBK 细胞分离培养病毒, 出现的 CPE 清晰可见, 易于辨认。因此, 本研究采集临床表现呼吸道症状的病牛鼻液, 用含双抗的 Hank's 液稀释过滤后, 立即接种 MDBK 细胞, 成功分离出 1 株 BPIV3。

4) 以上试验结果显示, 某牛场发生的一种以呼吸器官肺或胸腔形成出血性败血症为特征, 以发热, 体温高达 41 $^{\circ}$ C 以上, 流粘液性鼻汁, 呼吸困难为主要症状的传染病确诊为牛副流感病毒 3 型。我国养

牛业,特别是黑龙江省,规模化和集约化程度不断提高,牛病防治得到重视,但是 BPIV3 的研究明显不足,文献报道几乎为零。鉴于目前我国尚没有针对此病毒的疫苗,如何有效免疫预防该病有待于进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Alexander Bukreyev, Mario HS, Brian RM, *et al.* Non-segmented negative-strand viruses as vaccine vectors. *Journal of Virology*, 2006, **80**(21): 10293-10306.
- [2] Reisinger, Heddleston, Manthei, Isolation of bovine parainfluenza-3 virus in chick embryos. *J am vet med assoc*, 1959, **135**: 147.
- [3] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学. 第二版. 北京: 科学出版社, 1999, pp.343-354.
- [4] Melanie WS, David MW, Marion T, *et al.* A sensitive, specific, and cost-effective multiplex reverse transcriptase-PCR assay for the detection of seven common respiratory viruses in respiratory samples. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2004, **6**(5): 1-3.
- [5] Jane EB, Josephine MM, Mario HS, *et al.* Sequence determination and molecular analysis of two strains of bovine parainfluenza virus type3 that are attenuated for primates. *Virus Genes*, 2000, **20**(2): 173-182.
- [6] Yuko Sakai, Shinya Suzu, Tatsuo Shioda, *et al.* Nucleotide sequence of the bovine parainfluenza 3 virus genome: its 3' end and the genes of NP, P, C and M proteins. *Nucleic Acids Research*, 1987, **15**(7): 2927-2943.
- [7] David PG, Robert EW, Lee MS, *et al.* A bovine parainfluenza virus type3 vaccine is safe and immunogenic in early infancy. *The Journal of Infectious Diseases*, 2005, **191**: 1116-1122.
- [8] Horwood PF, Gravel JL, Mahony TJ, *et al.* Identification of two distinct bovine parainfluenza virus type 3 genotypes. *The Journal of Gen Virol*, 2008, **89**: 1643-1648.

2009 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(2-2)

序号	会议名称	主办单位	时间	人数	地点	联系人
10	全国酶工程会议	中国微生物学会酶工程专业委员会	待定	待定	待定	金城 010-64807425
11	2009 年生物过程模型化与控制学术会议	中国微生物学会生化过程模型化与控制专业委员会	9 月	100	上海	袁景淇 021-34204055
12	重要人兽共患病研究新进展学术研讨会	中国微生物学会人兽共患病病原学专业委员会	10 月 14-18 日	200	湖南 衡阳	万康林 010-61739466
13	第七届全国微生物毒素学术会议	中国微生物学会微生物毒素专业委员会	10 月	180	重庆	梁华平 023-68757404
14	第三届全国资源生物技术与糖工程学术研讨会	中国微生物学会基础微生物学专业委员会	10 月	150	山东 济南	李越中 0531-88564288
15	首届全国生物固氮学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	10 月	100	湖北 武汉	李友国, 张志明 027 - 87281685, 027 - 87281687
16	2009 年中国微生物学会学术年会	中国微生物学会	11 月	400	待定	王旭 010-64807200
17	第十二次全国环境微生物学学术研讨会	中国微生物学会环境微生物学专业委员会	11 月	250	湖北 武汉	蒋建东 025-84396348
18	植物线虫的微生物防治研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	12 月	60	昆明	张克勤 0871-5033790