

1 株军曹鱼病原弧菌的鉴定及其系统发育树分析

郭明元, 刘广峰, 冯娟

(中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东广州 510300)

摘要:从养殖的患病军曹鱼身上分离出1株病原菌JT2, 革兰氏阴性, 短杆状, 有极生鞭毛, 能运动, 菌落半透明。经回归感染实验, 证明该菌为军曹鱼病原菌。进行了常规生理生化实验, 并用API-ID32E系统鉴定该菌。再经Biolog-GN细菌鉴定系统鉴定, 结果JT2与鳃鱼弧菌(*Vibrio carchariae*)相似度最高。为了进一步确定该菌的分类学地位, 测定了其16S rDNA序列, 分析了相关细菌的同源性, 构建其系统发育树。结果表明, 该菌株与*V. carchariae*的亲缘关系最近。综合上述几种方法的鉴定结果, 最后鉴定该菌株为鳃鱼弧菌*V. carchariae*。[中国水产科学, 2006, 13(5): 823-828]

关键词:军曹鱼; 细菌鉴定; 鳃鱼弧菌; 16S rDNA; 系统发育

中图分类号:S941 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)05-0823-06

弧菌是海水养殖环境中正常生态菌群^[1], 其中部分种类也是鱼类的重要致病菌。现在已报道的弧菌有70多种, 病原菌主要有创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)^[2]、鳃弧菌(*V. anguillarum*)^[3]、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)^[4-5]、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)^[6]、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)^[7]、鳃鱼弧菌(*V. carchariae*)和最小弧菌(*V. mimicus*)^[8]等。国内已经报道弧菌引起军曹鱼^[9]、鲈鱼^[10]、牙鲆^[11]、大黄鱼^[12]、石斑鱼^[13]等鱼类疾病。

细菌性疾病研究工作中, 病原菌鉴定是非常重要的。传统方法是通过生理生化测试鉴定细菌, 现在的一些细菌鉴定系统(如API、Biolog等)能更简便、快速的进行细菌鉴定。近年来分子生物学方法鉴定细菌也日趋成熟, 通过对某种分子标记(如16S rDNA)^[14]进行分析, 可以快速、微量、准确、简便地对细菌进行分类鉴定。分子分类鉴定已逐步成为微生物研究的有力工具。

本实验对从患病军曹鱼分离的细菌进行了生理生化测试, 分别用API-ID32E、Biolog-GN常用细菌鉴定系统进行鉴定, 并通过测定其16S rDNA序列, 构建了系统发育树, 分析了相关细菌的同源性。研究和分析几种鉴定方法, 为今后进一步研究军曹鱼病害提供资料。鳃鱼弧菌(*V. carchariae*)是海水

中的正常菌群, 也是海水鱼的重要病原菌之一, 但从军曹鱼分离是国内首次报道。

1 材料与方法

1.1 菌种和培养基

菌种JT2分离于患病军曹鱼(*Rachycentron canadum*), 用海水保种液保种, 保存于-70℃超低温冰箱。培养基为Zobell 2216E海水培养基(酵母膏1g, 蛋白胨5g, 磷酸高铁0.1g, 琼脂粉20g, 陈海水1000mL, pH=7.6~7.8)和海洋弧菌选择性培养基TCBS培养基。

1.2 回归感染

1.2.1 人工感染 感染实验所用鱼苗为(7±1)g健康军曹鱼。感染前, 先于水池中驯养5d。养殖水温为28~30℃, 盐度为29~30, 连续充气, 每天早晚投喂人工饵料2次。细菌JT2采用腹腔注射感染方式, 每尾鱼注射0.2mL, 共设5个浓度梯度, 每个浓度组15尾鱼。对照组注射相同剂量的灭菌1% NaCl溶液。感染5天后, 计数各组死亡数。细菌浓度计算方法, 将菌液做系列稀释, 涂布平板培养后计算菌落数。

1.2.2 病原菌的再分离 感染实验中, 从濒死鱼的病灶处取样, 平板培养后选择优势菌落, 划线法纯

收稿日期: 2005-09-01; 修订日期: 2005-11-21。

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)项目(2002AA603012); 广东省农业攻关项目(2003B21502)。

作者简介: 郭明元(1982-), 男, 学士, 主要从事海水生物病害研究工作。

通讯作者: 冯娟, E-mail: juanf@21cn.com

化,将二次分离菌株 JT22 与原菌株 JT2 一起做细菌鉴定。JT22 做第二次腹腔注射感染实验。

1.3 形态观察和生理生化实验

将 JT2 划线接种于 2216E 平板和 TCBS 平板, 29℃ 培养 24 h, 观察单个菌落的形态。对培养 18 h 细菌常规方法进行革兰氏染色和鞭毛染色, 光镜 (1000×) 下观察细菌和鞭毛形状。另取细菌 18 h 培养物, 用无菌 1% NaCl 悬浮细菌至浓度 10^5 cfu/mL, 上载铜网膜, 负染后透射电镜下观察菌体形态和鞭毛。常规方法做 JT2 氧化酶试验, 甲基红试验, 发酵葡萄糖试验。

1.4 API 细菌鉴定系统

API-32E 是鉴定肠杆菌科和其他营养不苛求的革兰氏阴性杆菌的系统, API 系统的 ID32E 实验条是由 32 个干燥的培养基测定小管所组成。首先进行氧化酶测定, 为阳性则可进行鉴定。将菌株 JT22 和 JT2 培养 24 h, 挑取几个菌落用无菌生理盐水制备菌悬液, 相当于 0.5 McFarland 的浊度, 振荡均匀, 用 ATB 比浊器测量。用 ATB 微量吸管定量接入 55 μ L/管。按说明书操作, 37℃ 下好氧培养 24 h。用 ATB 分析仪阅读器自动记录每个小管的颜色反应, 并将数据输入电脑, 由相应的软件进行解释。

1.5 Biolog 细菌鉴定系统

Biolog 系统利用微生物新陈代谢过程中对 95 种碳源利用率的差异, 配合氧化还原反应显色剂, 形成各自特有的“代谢指纹图谱”, 与数据库中标标准菌株图谱进行比较鉴定。

先测定 JT2 和 JT22 的氧化酶反应, 然后选择相应的 GN2 细菌鉴定板。将细菌接种于含 5% 脱纤羊血的 BUG 琼脂培养基, 有氧 30℃ 培养 16~24 h。用无菌棉签取一定量细菌至无菌 GN/GP-IF 接种液中, 调整至浊度计读数为 $(28 \pm 3)\%$ T。按 150 μ L/管加满所有 96 个小管。按说明书方法, 于 30℃ 培养。分别于 4~6 h 和 16~24 h 用 Biolog 读数仪读数, 用 Biolog Microlog3 4.20 软件进行分析。

1.6 16S rDNA 序列测定和分析

1.6.1 PCR 模板 DNA 的制备 将细菌接种平板培养, 28℃ 过夜。取单一菌落悬浮于 50 μ L 无菌蒸馏水中, 100℃ 水浴加热 5 min, 离心取上清作为

PCR 模板 DNA。

1.6.2 16S rDNA 序列的 PCR 扩增与测序 扩增 16S rDNA 的正向引物为 8F: 5'-AGAGTTTGATC-CTGGCTCAG-3' (对应于 *E. coli* 16S rDNA 的第 8~27 个碱基位置), 反向引物 1492R: 5'-GGT-TACCTTATTACGACTT-3' (对应于 *E. coli* 16S rDNA 的第 1492~1510 个碱基位置)^[15]。在 100 μ L 的 PCR 反应体系中含有: $1 \times$ PCR 缓冲液, 1.5 mmol/L $MgCl_2$, $4 \times$ dNTP 混合物各 200 μ mol/L, 引物各 0.5 μ mol/L, Taq DNA 聚合酶 1 μ L (2.5 U/ μ L), 2 μ L DNA 原液。PCR 反应条件为: 96℃ 预变性 6 min; 94℃ 变性 1 min, 50℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 30 个循环; 最后 72℃ 温育 6 min。产物交由上海博亚生物技术公司进行测序。

1.6.3 序列分析及数据处理 使用 Phylip 软件进行分子系统树的构建。将菌株 16S rDNA 序列与从 GenBank 数据库中获得的其他同属细菌的 16S rDNA 序列一起, 运用 Clustalx 软件进行序列排比, 生成 Phylip 格式文件。用 Seqboot 程序优化系统树, 通过自举分析 (bootstrap) 进行置信度检测, 自举数据集为 1000 次。用 Dnadist 程序计算序列间的距离, 用 Neighbor 程序 (邻位相接法) 构建细菌的系统树。

1.6.4 核酸序列存取号 (Accession number) 用于构建系统树的相关菌株及其在 GenBank 核苷酸序列数据库中的序列存取号 (表 1)。

2 结果

2.1 人工感染实验结果

不同浓度的 JT2 和 JT22 腹腔注射感染军曹鱼苗的结果见表 2 和表 3。第一次和第二次感染实验中, 军曹鱼发病症状均为游动缓慢, 身体变黑, 眼睛充血, 眼球变乳白, 死亡后解剖发现, 肛门处有白色黏稠液体流出。通过表 2, 用寇氏法计算出 JT2 的半致死浓度 LD_{50} 为 6.76×10^5 个/mL·g。

2.2 细菌形态特征及基础生化特征

细菌 JT2 和 JT22 形态特征和生化特征相同, 在 2216E 培养基培养 20 h, 菌落为圆形, 半透明, 表面光滑略凸起, 边缘整齐, 直径约 2 mm。TCBS 培养基上生长呈黄色。菌体革兰氏染色阴性, 短杆状, 可运动, 电镜下观察有单极生长鞭毛 (图 1)。

表1 16S rDNA序列来源和数据库存取号
Tab.1 16S rDNA sources and accession number

菌株号 Strain No.	名称 Species	存取号 Access No.
ATCC 14035T	霍乱弧菌 <i>Vibrio cholerae</i>	X74695
CECT 514 T	<i>V. cholerae</i>	X76337
ATCC 14126T	哈氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	X74706
ATCC 35084T	鲨鱼弧菌 <i>V. carchariae</i>	X74693
ATCC 25920T	坎氏弧菌 <i>V. campbelli</i>	X74692
ATCC 12964T	鳗弧菌 <i>V. anguillarum</i>	X16895
ATCC 33466T	双氮弧菌 <i>V. diazotrophicus</i>	X74701
ATCC 33466	<i>V. diazotrophicus</i>	X56577
ATCC 33809T	河流弧菌 <i>V. fluvialis</i>	X76335
NCTC 11327T	<i>V. fluvialis</i>	X76335
ATCC 33125T	灿烂弧菌 <i>V. splendidus</i>	X74724
ATCC 27562T	创伤弧菌 <i>V. vulnificus</i>	X74726
ATCC 29307	<i>V. vulnificus</i>	X74727
ATCC 15338T	解蛋白弧菌 <i>V. proteolyticus</i>	X74723
ATCC 15338	<i>V. proteolyticus</i>	X56579
ATCC 17802T	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	X74720
ATCC 17749T	溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	X74690
ATCC 11040T	明亮发光杆菌 <i>Photobacterium phosphoreum</i>	X74687
ATCC 25521T	发光杆菌 <i>P. leiognathi</i>	X74686

表2 JT2/JT22 腹腔注射感染结果
Tab.2 Results of *Rachycentron canadum* challenged with bacterium JT2

菌液浓度/cfu·mL ⁻¹ concentration of strain JT2/JT22	实验鱼/尾 tested nos n	JT2		JT22	
		累积死亡数/尾 dead nos/ind	死亡率/% mortality	累积死亡数/尾 dead nos/ind	死亡率/% mortality
3.5×10 ⁹	15	14	93.3	13	86.7
3.5×10 ⁸	15	12	80.0	11	73.3
3.5×10 ⁷	15	7	46.7	8	53.3
3.5×10 ⁶	15	6	40.0	7	46.7
3.5×10 ⁵	15	1	6.6	2	13.3
对照 control	15	0	0.0	0	0.0

表3 API-ID32E 系统 JT2 生化反应结果
Tab.3 The biochemical reaction results of JT2 by API-ID32E system

反应 test	结果 result	反应 test	结果 result
鸟氨酸脱羧酶	ODC +	吡啶产生(+james)	IND +
精氨酸双水解酶	ADH -	N-乙酰-β-葡萄糖苷酶	b-NAG -
赖氨酸脱羧酶	LDC +	β-半乳糖苷酶	b-GAL -
脲酶	URE +	葡萄糖	GLU +
L-阿拉伯糖醇	LARL -	蔗糖	SAC +
半乳糖酸盐	GAT -	L-阿拉伯糖	LARA -
5-酮基-葡萄糖酸钠	SKG -	D-阿拉伯糖醇	DARL -
脂肪酶	LIP -	α-葡萄糖	α-GLU -
酚红	RP +	α-半乳糖苷酶	α-GAL +
β-葡萄糖苷酶	β-GLU +	海藻糖	TRE +
甘露醇	MAN +	鼠李糖	THA -
麦芽糖	MAL +	肌醇	INO -
侧金盏花醇	ADO -	纤维二糖	CEL +
PLE	PLE -	山梨醇	SOR +
β-葡萄糖酸酶	β-GUR +	α-麦芽糖苷酶	α-mAL +
丙二酸	MNT -	L-天门冬素芳胺酶	ASPA -

注: "+"表示反应结果阳性; "-"表示反应结果阴性。

Note: "+" represents positive reaction results; "-" represents negative reaction results.

图1 菌株JT2的电镜照片($\times 15\,000$)Fig.1 The electron micrograph of bacterium JT2 ($\times 15\,000$)

常规生化测试表明,2株菌氧化酶反应都为阳性,甲基红试验阴性,发酵葡萄糖不产酸,不产色素。可初步断定这2株菌为弧菌科细菌。

2.3 API-ID 32E 反应结果

2株菌的生化谱均显示为不可接受,JT2反应结果见表3。

2.4 JT2的Biolog-GN鉴定

系统反应结果,JT2对95种碳源的利用情况见

表4。计算机软件分析结果表明,JT2为鲨鱼弧菌(*V. carchariae*)的可能性高达99%,同时具有最高的相似率为0.731(最大相似度为1.000)。在该鉴定系统中,相似率大于0.5,则结果较为可信,可初步鉴定JT2为*V. carchariae*。JT22同样鉴定为鲨鱼弧菌(*V. carchariae*)。因2株菌鉴定结果相同,故只列出JT2的反应结果。

2.5 16S rDNA序列和系统发育学分析

为了确定JT2的分类学地位,测定了其16S rDNA序列,并在GenBank中进行同源性检索。结果发现JT2与弧菌的16S rDNA序列自然聚类,在所得的100个检索结果中,弧菌种数占80%,其余为发光杆菌属细菌和未鉴定细菌。且和JT2相似度最高的10多个结果均为弧菌属细菌。从检索结果中选择18个相关弧菌的标准菌株,另选取同为弧菌科的发光杆菌作为外来菌株,从GenBank下载其16S rDNA序列。用Phylip软件构建系统树,进行系统发育学分析,系统发育树(图2)。从图2中可以看出,同一个种的2个标准菌株亲缘关系最近并聚为1个分支,JT2与*V. carchariae*聚为1个分支,其中JT2与*V. carchariae*聚为1个分支,与其他细菌均相距较远,表明JT2与鲨鱼弧菌(*V. carchariae*)亲缘关系最近。最后综合Biolog系统和16S rDNA序列分析结果,确定JT2为鲨鱼弧菌(*V. carchariae*)。再次分离的细菌JT22经同样方法鉴定,鉴定结果同为鲨鱼弧菌(*V. carchariae*)。因此可以确定JT2为病原菌。

表4 Biolog系统JT2生化反应结果

Tab.4 Biochemical reaction results of JT2 by biolog system

项目 Item	碳源种类 Carbon resource
JT2可利用的唯一碳源,共27种 27 carbon resources can be utilized by strain JT2	环糊精、糊精、淀粉、N-乙酰基-D-半乳糖胺、N-乙酰基-D-葡萄糖胺、D-纤维二糖、D-甘露糖、D-甘露醇、麦芽糖、 α -D-葡萄糖、D-葡萄糖酸、D-果糖、D-山梨醇、蔗糖、D-海藻糖、甲基丙酮酸、D-乳酸、L-丙氨酸甘氨酸、L-谷氨酸、D-葡萄糖酸、甘氨酸-L-谷氨酸、L-苏氨酸、L-丝氨酸、D-丝氨酸、肌苷、1-磷酸葡萄糖、6-磷酸葡萄糖
不能利用的唯一碳源,共52种 52 carbon resources can not be utilized by strain JT2	侧金盏花醇、L-阿拉伯糖、D-阿拉伯糖、乳糖、 α -D-乳糖、m-肌醇、龙胆二糖(β 16葡萄糖)、D-半乳糖、L-果糖、赤藓糖醇、D-蜜二糖、 β -甲基-D-葡萄糖苷、D-棉子糖、L-棉子糖、松二糖、木糖醇、 α -羟基丁酸、 β -羟基丁酸、 γ -羟基丁酸、D-葡萄糖胺酸、D-半乳糖胺酸、D-乳糖胺内酯、甲酸、顺-乌头酸(丙烯三羧酸)、乙酸、p-羟基苯乙酸、衣康酸、 α -酮丁酸、 α -酮戊二酸、 α -酮戊酸、丙二酸、丙酸、奎尼酸、D-葡萄糖二酸、癸二酸、D-丙氨酸、葡萄糖胺酸、琥珀酸胺酸、L-组氨酸、 β -基-L-脯氨酸、L-亮氨酸、L-鸟氨酸、L-苯丙氨酸、L-焦谷氨酸、D,L-肉碱、 γ -氨基丁酸、2,3-丁二醇、2-氨基乙醇、丁二胺、苯乙胺、胸腺嘧啶核苷、尿苷酸
利用率较差的碳源,共15种 15 carbon resources can be weakly utilized by strain JT2	吐温40、吐温80、阿洛酮糖、柠檬酸、琥珀酸、甘氨酸-L-天门冬氨酸、L-天门冬氨酸、L-天冬氨酸、L-丙氨酸、L-丙氨酸胺、没丁二酸、L-脯氨酸、D,L- α -磷酸甘油、丙三醇、尿苷

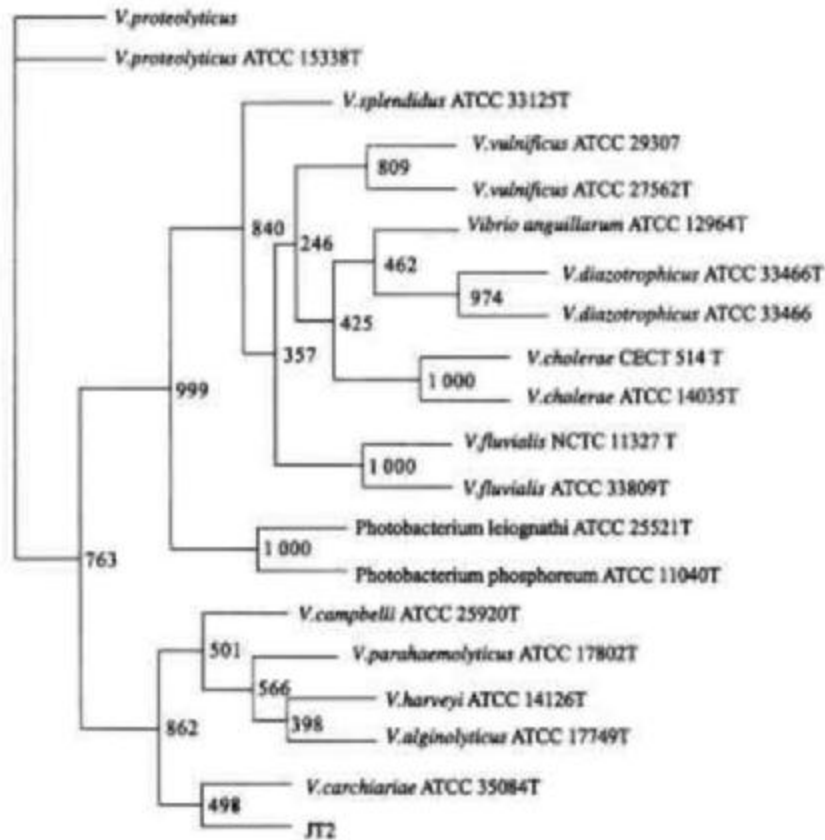


图2 16S rDNA序列分析聚类结果

Fig.2 Dendrogram of 16S rDNA sequence analysis

3 讨论

细菌鉴定主要方法有3种:传统的测定细菌生理生化特征方法;通过细菌自动鉴定系统鉴定;运用分子生物学手段进行鉴定。每种方法都有各自的优缺点,现在鉴定的通常需要3种方法结合使用。

不同的鉴定系统所利用的生化反应和数据库都各不相同,因此鉴定细菌的准确性也有差异。有人测试了六种鉴定系统的准确性^[16],发现对霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*),API20E系统对其鉴定成功率为50%,而Crystal E/NF系统为96.7%;另外API20E对河流弧菌(*V. fluvialis*)的鉴定成功率只有10%。可见,不同系统对同一细菌鉴定成功率不同,同一系统对不同细菌的鉴定成功率也不同。在实际鉴定过程中,各系统的实验条件适合不同细菌的生长,而且各系统数据库细菌特征资料也有不同,所以细菌的鉴定结果有差异不可避免。有时还可能因为某个种的血清型不同,而导致系统鉴定不出来或者鉴定错误^[17]。

在本实验中,菌株JT2经常规细菌学生化测定后,用API-ID32E系统鉴定,结果产生不可接受生化谱,这可能是因为该鉴定系统数据库中没有该菌株的资料。用Biolog系统鉴定,结果可以接受,可鉴定JT2为鲛鱼弧菌(*V. carchariae*)。再通过基于16S DNA序列构建的系统发育树来看,同样JT2与鲛鱼弧菌(*V. carchariae*)亲缘关系最近。最终可以确认JT2为鲛鱼弧菌(*Vibrio carchariae*)。

分子生物学方法已作为工具用于细菌鉴定,作者分析了弧菌属内细菌的同源性,将细菌按亲缘关系远近顺序进行排列,从系统发育树方面确定细菌的分类地位。对于亲缘关系较近的细菌,通过表型分析很难区分开,鉴定时容易产生错误,用分子方法鉴定能很好的解决这个问题^[18]。将生化特征、系统鉴定、分子指标结合起来综合分析,从而更准确的鉴定细菌。

参考文献:

- [1] 郑天伦,王国良,金 璇.海水养殖动物弧菌病防治的研究进

- 展[J]. 台湾海峡, 2002, 21(3): 372-378.
- [2] Biosca E G, C Amaro, C Esteve, et al. First record of *Vibrio vulnificus* biotype 2 from diseased European eel, *Anguilla anguilla* [J]. Fish Dis, 1991, 14: 103-109.
- [3] Egidius E. Vibriosis: pathogenicity and pathology, A review[J]. Aquaculture, 1987, 67: 15-28.
- [4] Saeed M O. Association of *Vibrio harveyi* with mortalities in cultured marine fish in Kuwait [J]. Aquaculture, 1995, 136: 21-29.
- [5] 覃映雪, 施信才, 苏永全, 等. 网箱养殖青石斑鱼的溃瘍病病原[J]. 水产学报, 2004, 28(3): 297-302.
- [6] Wong S T, T Y Lee, S T Leong. Cross protection of *Vibrio* vaccines against various pathogenic *Vibrio* obtained from diseased grouper (*Epinephelus subnoides*) [A]. The second Asia Forum [C]. Manila: Asian Fisheries Society, 1990. 683-687.
- [7] Lee K K. Pathogenesis studies on *Vibrio alginolyticus* in the grouper, *Epinephelus malabaricus* Bloch et Schneider [J]. Microb Pathog, 1995, 19: 39-48.
- [8] 吴后波, 潘金培. 海水网箱养殖真鲷细菌病原生物学研究 [A]. 中国水产学会 2000 年度学术交流会论文集 (武汉: 2000.3) [C]. 北京: 海洋出版社, 2000. 672-677.
- [9] 简纪常, 吴灶和, 陈 刚. 海水网箱养殖军曹鱼细菌病原的分离及其特性 [J]. 中国兽医学报, 2003, 23(4): 329-330.
- [10] 王国良, 金 珊, 薛良义, 等. 海水网箱养殖鲈鱼皮肤溃瘍病及其病原菌的研究 [J]. 黄渤海海洋, 2000, 18(3): 85-89.
- [11] 莫照兰, 茅云翔, 陈师勇, 等. 一株牙鲆出血症病原菌的分子生物学鉴定 [J]. 高技术通讯, 2001, 12: 12-17.
- [12] 廖庆松, 王 军, 苏永全, 等. 网箱养殖大黄鱼细菌病的研究 [J]. 集美大学学报, 2001, 6(3): 191-196.
- [13] 朱传华, 何建国, 黄志坚. 网箱养殖石斑鱼爆发性溃瘍病原菌分离、鉴定及致病性研究 [J]. 中山大学学报, 2000, 39(3): 278-282.
- [14] Delong E F, Wickham G S, Paerz. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells [J]. Science, 243: 1360-1363.
- [15] Polz M F, Cavanaugh C M. Bias in Template-to-product Ratios in Multitemplate PCR [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(10): 3724-3730.
- [16] O'Hara C M, Sowers E G, Bopp C A, et al. Accuracy of Six Commercially Available Systems for Identification of Members of the Family Vibrionaceae [J]. Clin Microbiol, 2003, 41(12): 5654-5659.
- [17] Raul Colodner, Raul Raz, Irit Meir, et al. Identification of the emerging pathogen *Vibrio vulnificus* Biotype 3 by Commercially Available Phenotypic Methods [J]. Clin Microbiol, 2004, 42(9): 4137-4140.
- [18] Bruno Gomez-Gil, Sonia Soto-Rodriguez, Alejandra Garcia-Garcia, et al. Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms [J]. Microbiology, 2004, 150(6): 1769-1777.

Identification and phylogenetic analysis of a pathogenic *Vibrio* sp. isolated from *Rachycentron canadum*

GUO Ming-yuan, LIU Guang-feng, FENG Juan

(South China Sea Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: A pathogenic bacterial strain JT2 was isolated from cobia (*Rachycentron canadum*). Morphological observation showed that it was a mobile short-rod gram negative bacterium with polar flagella and translucent. It was proved to be the pathogen of the cobia (*Rachycentron canadum*) by the challenge test. The traditional physiological and biochemical experiments were done, and API-ID32E system were applied in the bacterial classification. Identified with Biolog-GN (gram negative) system again, results showed that strain JT2 was similar to that of *Vibrio carchariae* in most of the phenotypes. To investigate the phylogenetic position of this pathogen, 16S rDNA of JT2 was sequenced and compared with that of other related strains. Molecular phylogenetic dendrogram was constructed based on the genetic distance analysis. The results showed that strain JT2 exhibited the highest levels of similarity to the *V. carchariae*. Analysing all the results of several methods, strain JT2 was identified as *Vibrio carchariae*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(5): 823-828]

Key words: cobia; bacterium identification; *Vibrio carchariae*; 16S rDNA; phylogenetic analysis

Corresponding author: FENG Juan. Tel: 86-20-84195177. E-mail: juanf@21cn.com