

杂色鲍幼苗“急性死亡脱落症”病原菌分析

刘广锋^{1,2}, 周世宁², 徐力文¹, 王瑞旋¹, 王江勇¹, 陈毕生¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东广州 510300; 2. 中山大学生命科学学院, 广东广州 510275)

摘要:从“急性死亡脱落症”发病期的杂色鲍幼苗体内和病苗附着的薄膜上, 共分离到4株优势菌, 即NA0301、NA0302、NA0303和NA0304。经人工浸泡感染实验证明, 从病幼苗体内和苗附着的薄膜上分离到的优势菌株NA0301和NA0302是杂色鲍幼苗的致病菌, 它们均为革兰氏阴性、短杆状、极生鞭毛、能运动。常规生理生化及Biclog细菌鉴定系统测试结果表明, 菌株NA0301与溶珊瑚弧菌(*Vibrio coralliilyticus*)的亲缘关系最近, 而菌株NA0302与溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)的亲缘关系最近。为了进一步确定它们的分类学地位, 分别测定了溶珊瑚弧菌和溶藻弧菌的16S rDNA序列, 分析相关细菌相应序列的同源性, 并构建系统进化树。结果表明, 菌株NA0301与溶珊瑚弧菌的亲缘关系最近, 菌株NA0302与溶藻弧菌的亲缘关系最近。因此, 菌株NA0301和菌株NA0302分别鉴定为: 溶珊瑚弧菌和溶藻弧菌。[中国水产科学, 2006, 13(4): 655-661]

关键词:杂色鲍; 幼苗; 病原菌; 鉴定; 溶珊瑚弧菌; 溶藻弧菌

中图分类号:S944.45 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)04-0655-07

杂色鲍(*Haliotis diversicolor* Reeve)属于腹足纲(Gastropoda)鲍科(Haliotiade), 是中国南方海水养殖的主要经济贝类之一。2001年以来, 广东、福建、海南等地沿海养殖的杂色鲍在幼苗培育过程中出现了大规模“急性死亡脱落”现象(俗称“脱板症”), 使鲍苗大幅减产。

由于鲍等贝类流行病原因复杂, 迄今为止, 人们对它的认识还不够深入, 对于病原体的类别、感染条件和药敏性等亟待进行深入研究^[1]。有关研究资料显示^[2], 鲍病害的研究长期以来多集中在养成的大鲍上。虽然近年来也有人开始研究鲍幼苗的病害^[3], 但有关杂色鲍幼苗流行暴发“急性死亡脱落症”病原的研究鲜见报道。本实验于2003~2004年对引起杂色鲍幼苗发生“急性死亡脱落症”的病原菌进行了研究, 以期对杂色鲍幼苗培育中的病害防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用菌株来源于2003年4~10月间在深圳南澳某养殖有限公司发病苗池的病幼苗和病苗附着

薄膜上。病鲍苗壳长0.1~0.3 cm; 细菌培养用Zobell 2216E海水异养菌培养基; 感染实验用的杂色鲍幼苗来源于深圳南澳某养殖有限公司的健康苗养殖池, 苗龄为幼体附着20 d左右, 壳长0.1~0.3 cm; 经显微镜观察, 该实验用苗是健康发育的、活力良好的杂色鲍幼苗。所用分子生物学试剂购于申能博采生物科技有限公司, 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 病原菌的分离

用灭菌海水将病幼苗冲洗, 然后将鲍苗压碎, 适量无菌海水稀释, 吸取冲洗液0.1 mL用玻棒涂布于2216E平板上; 参照纪伟尚等^[4]方法, 取发病池鲍苗附着薄膜, 用灭菌棉签刮取附着物藻类及细菌并加入适量无菌海水, 振荡混匀, 吸取0.1 mL涂布于2216E平板中; 所有接种工作在采样后2 h内完成。于28℃倒置培养24 h后, 挑取优势单菌落纯化培养。

1.3 病原菌的致病力测定

1.3.1 人工感染实验 取健康池的鲍苗连同附着基薄膜一起放入1 L烧杯中, 用重物固定并展开。设感染组和对照组, 每组2个平行。共使用10个烧

收稿日期: 2004-06-29; 修订日期: 2005-06-21.

基金项目: 广东省重大招标项目(2K805301N); 中国水产科学研究院青年基金项目(2003-青-8).

作者简介: 刘广锋(1977-), 男, 助理研究员, 博士研究生, 从事海洋微生物学研究. Tel: 020-89022636; E-mail: gf_l@21cn.com

通讯作者: 周世宁. Tel: 020-84110238; E-mail: bsmi@szu.edu.cn

杯,每个烧杯14~20只幼苗,连续充气,暂养24 h。采用浸泡感染方法,将所分离菌株培养24 h后制成菌悬液,用灭菌海水将菌稀释到适当浓度(约 10^8 CFU/mL)。用制好的菌悬液按1:100适量加入1 L烧杯内制成浓度 10^6 CFU/mL的海水菌液。将幼苗放入浸浴24 h后,更换清洁海水,重复加入同样浓度的活菌液,再浸浴24 h,然后更换清洁海水饲养,实验期间利用自然昼夜光照,白天光照度在1 500~3 000 lx之间,同时设立不加菌液的对照组。每天换新鲜海水1次,进行观察记录,连续8 d,实验期间水温22~25℃。

1.3.2 回归感染实验 取感染组刚死的幼苗按1.3.1方法进行细菌重分离,观察细菌基本形态特征。并利用分离纯化后的细菌,进行重复感染实验,观察并记录结果。

1.3.3 半致死剂量 LD_{50} 的测定 挑取菌株NA0301和NA0302于2216E斜面,28℃培养24 h,用灭菌海水将菌苔洗脱下来,结合平板计数法调整菌母液浓度约为 10^9 CFU/mL,然后按10倍稀释成7个梯度的浸泡感染液,即分别为 10^3 CFU/mL、 10^4 CFU/mL、 10^5 CFU/mL、 10^6 CFU/mL、 10^7 CFU/mL、 10^8 CFU/mL和 10^9 CFU/mL。进行半致死剂量 LD_{50} 测定实验,参照改良寇氏法^[5]计算半致死剂量。

1.4 病原菌的鉴定

1.4.1 形态观察与生理生化实验 病原菌理化特性的测定和鉴定参照东秀株等^[6]和伯杰氏细菌鉴定手册^[7]的方法进行,应用Biolog公司[Biolog inc. Hayward, CA, USA]的革兰氏阴性细菌鉴定系统[GN Microplate]进行95种唯一碳源的生化反应测定,使用Biolog Micro Station System 3.50软件分析。

1.4.2 16S rDNA序列分析 参照戴欣等^[8]方法,

应用细菌16S rDNA扩增通用引物16(+)'5'-A-GAGTTTGTGATCCTGGCTCAG 3'和1 492r 5'-GGT-TACCTTGTTACGACTT 3',分别对应于*E. coli*. 16S rDNA 8~27位和1 510~1 492位;将病原菌纯培养菌液煮沸后立即冷却,作为模板,进行16S rDNA PCR扩增;扩增产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳进行分析,确认已获得病原菌16S rDNA。PCR产物由上海博亚生物技术有限公司(3730核酸测序仪)进行DNA序列测定。最后将获得的序列与GenBank数据库中的所有核酸序列进行Blast比较分析。

1.4.3 序列分析及数据处理 将菌株的16S rDNA基因序列与从GenBank数据库中获得的弧菌属的16S rDNA基因序列,采用Clustal w 1.8软件进行序列匹配排列(Multiple Alignments),用系统发生推断软件包PHYLP 95进行统计和聚类分析,用Kimura双参数模型计算各序列分化距离,采用邻接法(Neighbor-joining Method)获得分支系统树,并通过自举分析(Bootstrap)进行置信度检测,自举数据集为1 000次。

2 结果

2.1 病原菌的分离及人工感染实验

共分离纯化出优势菌4株,编号为:NA0301、NA0302、NA0303和NA0304,作为疑似病原菌。分别对鲍幼苗做毒性感染实验。结果显示,菌株NA0301、NA0302分别对杂色鲍幼苗具有极强的致病作用,感染4~5 d后死亡率均为100%(表1),且人工感染症状与自然发病症状相似,即呈暴发性死亡,鲍苗死后仍黏附在附着基薄膜上。另外2株分离菌NA0303和NA0304的致病性不明显,没有表现出对幼苗的毒性。

表1 人工感染实验结果

Tab.1 Artificial infection experiment on larval abalone

菌株号 Strains No.	菌液浓度/ (CFU·mL ⁻¹) Bacteria concentration	n	死亡数/个 Dead number/ind								累计死亡数/ 实验个数 Total Dead/n
			第1天 Day 1	第2天 Day 2	第3天 Day 3	第4天 Day 4	第5天 Day 5	第6天 Day 6	第7天 Day 7	第8天 Day 8	
NA0301	1.0×10^6	18	0	0	13	5	-	-	-	-	18/18
NA0302	1.0×10^6	14	0	2	3	1	8	-	-	-	14/14
NA0303	1.0×10^6	14	0	2	1	0	2	0	0	0	5/14
NA0304	1.0×10^6	15	0	1	0	0	0	1	0	0	2/15
对照 Control	0	17	0	2	1	0	0	1	0	0	4/17

2.2 菌株回归感染及半致死浓度 LD_{50} 的测定结果

分别从 NA0301 和 NA0302 实验组中刚死的人工感染幼苗和薄膜上分离优势菌,它们的菌落特征、菌体显微形态以及基本理化性状与原菌株完全一致。回归感染实验结果表明,菌株 NA0301 和 NA0302 确实对杂色鲍幼苗具有很大的毒性,由此

确定菌株 NA0301 和 NA0302 为杂色鲍幼苗的病原菌。按改良寇氏法计算出菌株 NA0301 48 h 内的 $LD_{50} = 2.25 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 其平均可信限为 $[(2.25 \times 10^6) \pm (2.07 \times 10^6)] \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。菌株 NA0302 96 h 内的 $LD_{50} = 1.27 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ (表 2)。

表 2 杂色鲍幼苗 LD_{50} 实验结果
Tab.2 LD_{50} experiment on larval abalone

菌株号 Strains No.	菌液浓度/(CFU·mL ⁻¹) Bacteria concentration	n	死亡数/个 Dead number/ind		累计死亡数/实验个数 Total Dead/s
			48 h	96 h	
NA0301	6.8×10^3	19	1		1/19
	6.8×10^4	20	3		3/20
	6.8×10^5	18	3		3/18
	6.8×10^6	20	15		15/20
	6.8×10^7	21	18		18/21
	6.8×10^8	17	17		17/17
对照 Control	0	20	0		0/20
NA0302	3.0×10^4	17		1	1/17
	3.0×10^5	18		3	3/17
	3.0×10^6	16		3	3/16
	3.0×10^7	18		5	5/18
	3.0×10^8	17		6	6/17
	3.0×10^9	18		16	16/18
对照 Control	0	19		1	1/19

2.3 病原菌的鉴定

2.3.1 形态特征 菌株 NA0301 在 2216E 培养基 24 h 的菌落呈圆形、半透明,表面光滑、边缘整齐;在 TCBS 培养基的菌落呈黄色;革兰氏染色阴性,短杆状,运动,极生单鞭毛。菌株 NA0302 在 2216E 培养基 24 h 的菌落呈圆形、半透明、表面光滑、边缘不齐、泳动非常强;在 TCBS 培养基的菌落呈黄色、泳动、边缘不齐;革兰氏染色阴性,短杆状,极生单鞭毛。

2.3.2 生长条件 菌株 NA0301 兼性厌氧,生长需要 NaCl,在盐度 10~60 生长良好,最适生长 NaCl 质量分数为 3%,最适生长温度为 28℃。菌株 NA0302 兼性厌氧,在盐度 10~80 生长良好,最适生长 NaCl 质量分数为 3%,在 4℃ 不生长,最适生长温度为 28℃。

2.3.3 基本生理生化特性鉴定 菌株 NA0301 和 NA0302 均为氧化酶反应阳性,对弧菌抑制剂 O/129 敏感,极生鞭毛,运动性、Na⁺ 促生长,利用 D-甘露醇等。根据这些特征,菌株 NA0301 和

NA0302 初步判定为弧菌科弧菌属细菌 (*Vibrio* sp.)。应用 Biolog 细菌自动鉴定系统未能分析显示出菌株 NA0301 的最相似菌株,表明菌株 NA0301 不在 Biolog 细菌自动鉴定系统的数据库中,因此应用 Biolog 系统软件未能对 NA0301 作出鉴定;而系统软件分析显示菌株 NA0302 为溶藻弧菌,可能性 99.0%,SIM 0.857,DIST 2.13。

为了明确菌株 NA0301 的分类学地位,进一步进行了生理生化特征比较(包括与近 10 年来新命名的弧菌种类),比较结果显示,菌株 NA0301 的生化特征与溶珊瑚弧菌较接近。结合 Biolog 系统反应的结果,在可比较的 100 多个测试项目特征中,只有 D-果糖、D-甘露醇、尿苷、阿洛酮糖、L-组氨酸、D,L 甘油磷酸和 m-肌醇的测试结果不同,其中菌株 NA0301 均为阴性,溶珊瑚弧菌均为阳性。而菌株 NA0302 与溶藻弧菌标准株进行比较,只有 D-甘露糖和 8% NaCl 2 个项目不同。菌株 NA0301 和 NA0302 可利用的唯一碳源测定结果与其最相似的菌株分别作比较(表 3)。

表3 菌株 NA0301、NA0302 与溶珊瑚弧菌、溶藻弧菌的部分生理生化特性标准比较

Tab.3 Comparisons of biochemical and biophysical characteristics among strains NA0301 and strain NA0302 and *V. coralliilyticus* and *V. alginolyticus*

项目 Item	Strain NA0301	<i>V. coralliilyticus</i> (Standard)	Strain NA0302	<i>V. alginolyticus</i> (standard)
4℃	-	-	-	-
0% NaCl	-	-	-	-
3% NaCl	+	+	+	+
6% NaCl	+	+	+	+
8% NaCl	-	-	+	-
10% NaCl	-	-	-	-
氧化酶 Oxidase	+	+	+	+
O/129	+	+	+	+
β -甲基-D-葡萄糖苷 β -Methyl-D-Glucoside	+	d	-	-
单甲基琥珀酸 Mono-Methyl-Succinate	-	d	+	+
溴丁二酸 Bromo Succinic Acid	d	+	+	+
L-组氨酸 L-Histidine	-	+	+	+
α -羟基丁酸 α -Hydroxy Butyric Acid	-	-	+	d
D-果糖 D-Fructose	-	+	+	+
m-肌醇 m-Inositol	-	+	-	-
D-甘露醇 D-Mannitol	-	+	+	+
D-甘露糖 D-Mannose	+	+	-	+
阿洛酮糖 D-Psicose	-	+	+	+
甲基丙酮酸 Methyl Pyruvate	-	d	+	+
尿刊酸 Urocanic Acid	-	d	-	d
甲酸 Formic Acid	-	-	-	d
丁二胺 Putrescine	-	-	+	d
尿苷 Uridine	-	+	+	+
D,L- α -磷酸甘油 D,L- α -glycerol Phosphate	-	+	+	+

注:“-”阴性;“+”阳性;“d”部分阳性部分阴性。

Note:“-”negative,“+”positive,“d”partly negative and partly positive.

2.3.4 病原菌 16S rDNA 序列分析和系统发育

为了进一步确定菌株 NA0301 和 NA0302 的分类学地位,测定 16S rDNA 序列,并与其他细菌的 16S rDNA 序列进行比较分析。对获得的菌株 NA0301 和 NA0302 的 16S rDNA 基因序列图谱分别进行了分析处理。菌株 NA0301 得到了长度为 1 407 bp 的序列,菌株 NA0302 得到了长度为 1 398 bp 的序列。GenBank 登录号分别为 DQ079633 和 DQ079634。

将菌株 NA0301 的 16S rDNA 序列和 GenBank 上的全部 16S rDNA 基因序列比对分析结果显示,在最相近的 100 个序列中,82 个为弧菌属细菌,菌株 NA0301 与它们的同源性为 96%~98%;未培养菌和 *Mucus bacterium*,分别占 7%和 6%。相似度最高(98.6%)的菌株为 *Vibrio* sp. R-14968,但该菌

未定种,且为深海中分离的菌,一些理化特性与菌株 NA0301 有较大的差异;其次是溶珊瑚弧菌,相似度也为 98.3%。而 NA0302 株菌的 16S rDNA 序列比较结果显示,在最相近的 100 个序列中,弧菌属细菌占 83%,NA0302 与它们的相似性为 98%~99%;与溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)的 16S rDNA 序列同源性达 99%。从 200 个序列中选取 26 个已有公开发表文章引用的菌株 16S rDNA 序列进行系统学分析,结果如图 1 所示。菌株 NA0301 与溶珊瑚弧菌分类地位上最为接近,其次与塔氏弧菌(*V. tubiashi*)的遗传距离较近。从图 1 还可看出,菌株 NA0302 与溶藻弧菌聚为一群,二者相似性最高,亲缘关系最近。这与生理生化特征和 Biolog 系统比较结果相同(图 1)。

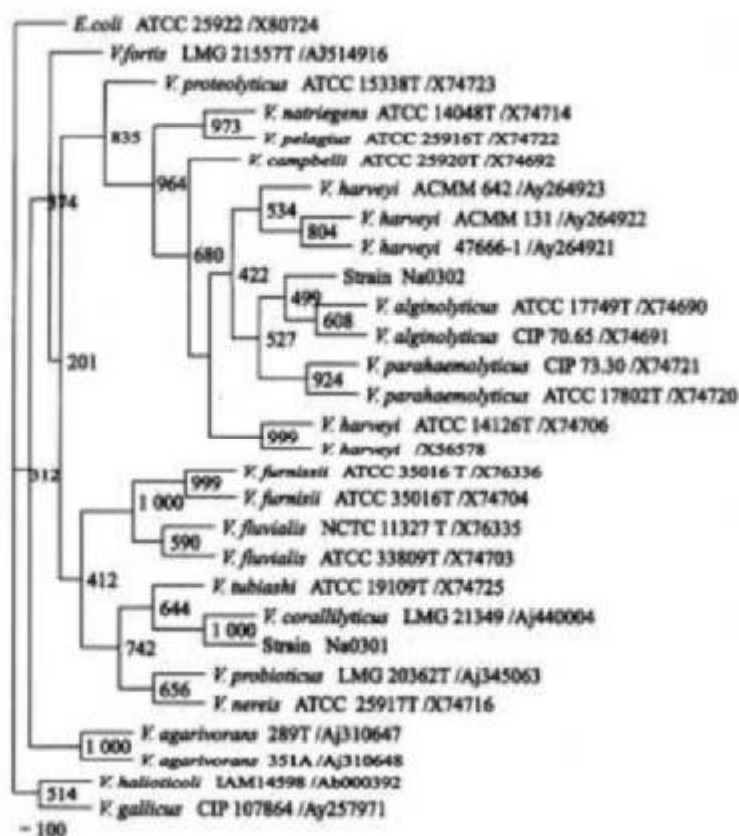


图1 16S rDNA 序列分析聚类结果

注:“/”前面的是菌名和菌株号,“/”后面的是 GenBank 登录号,分支上的数字是 1 000 次重复抽样检测的 bootstrap 值。

Fig.1 Dendrogram of 16S rDNA sequence analysis

Note: Name of bacterial and the strain number location in front of “/”. The GenBank logging number is at the back of “/”. The number above the offshoot is bootstrap value.

3 讨论

杂色鲍幼苗大规模“急性死亡脱落症”的发病特征为:在杂色鲍幼苗培育期间,鲍苗附着后的第 10~20 天(即幼苗壳长为 0.1~0.3 cm),肉眼观察鲍苗附着的薄膜板上,可见大量鲍苗在附着基上死亡并脱落。经显微镜观察,可发现许多鲍苗虽然附着在附着基薄膜上,但其活力很差或甚至已经死亡。一般暴发期不超过 3 d,死亡率 99% 以上。本感染实验结果显示,菌株 NA0301 和 NA0302 均能在浸浴感染后的第 3~5 天表现出致死高峰,这与养殖池中杂色鲍幼苗暴发急性脱落死亡的现象一致。由此确定本实验所分离的菌株溶珊瑚弧菌(NA0301)和溶藻弧菌(NA0302)是引起此次杂色鲍幼苗“急性脱落死亡”的主要病原菌。宋振荣等^[9] 2003 年报道在

28 d 鲍龄的幼苗体内观察到了有病毒颗粒,并认为该病毒为九孔鲍“脱板症”的病原体。但此次暴发“急性死亡脱落症”的大部分养殖场中,发病期都在鲍龄 10~20 d 内。多次病苗的电镜切片中没有观察到苗体内带病毒。

感染实验还表明,溶珊瑚弧菌(NA0301)的致死高峰期比溶藻弧菌(NA0302)早,说明溶珊瑚弧菌具有更强的毒力。据 Yael Ben-Haim 等^[10] 2003 年报道溶珊瑚弧菌主要是从印度洋的病鹿角珊瑚(*Pocillopora damicornis*)上分离出来的致病菌,并确立了其在分类学上的地位;也有从红海的发病鹿角珊瑚和大西洋的牡蛎幼体上分离到该弧菌的报道,Yael Ben-Haim 认为溶珊瑚弧菌只有在水温 25℃ 以上才会珊瑚中流行并引起珊瑚发病,并推测在水温低于 25℃ 时该菌可能会存在于不同的宿

主中。例如双壳贝类等。Lee K K 等^[12]2001 年报道了杂色鲍暴发了与环境温度相关的弧菌病。这与杂色鲍幼苗大规模流行暴发“急性死亡脱落症”与水温有一定相关性相似,进一步说明了溶珊瑚弧菌为主要的“急性死亡脱落症”的病原菌。而有关溶藻弧菌等的致病性研究,李国浩等^[13]2000 年报道了致病溶藻弧菌的一种蛋白质分解酶引起了九孔鲍死亡,Anguiano^[14]研究确定了溶藻弧菌对红鲍幼苗的致病性。而庞启华等^[15]2002 年报道了从正常杂色鲍(无病症,腹足吸附力强)的消化腺分离到了溶藻弧菌和恶臭假单胞菌。因此,溶藻弧菌很可能为条件致病菌。

本研究首次从养殖杂色鲍幼苗中分离到致病性溶珊瑚弧菌。弧菌是海水养殖贝类中常见的致病菌^[16,17],而对绝大多数致病菌而言,其致病是一个多因素综合作用的过程。本次分离鉴定的 2 株病原菌对杂色鲍幼苗均具有很强的毒性,但其发病条件、机制及侵染途径等目前尚不清楚,究竟是何种因素诱发弧菌对鲍幼苗的致病性,有待于进一步地深入研究。

参考文献:

- [1] 邓 欢,陈 伟,刘权超,等. 养殖海湾扇贝弧菌病的研究[J]. 应用与环境生物学报, 2003, 9(5): 517-521.
- [2] 陈信志,黄艳清. 我国鲍类养殖病害研究进展[J]. 福建水产, 2002, (2): 8-13.
- [3] 叶 琳,俞开康,王如才,等. 皱纹盘鲍幼体腹烂病病原菌的研究[J]. 中国水产科学, 1997, 4(4): 45-48.
- [4] 纪伟尚,许 兵,徐怀旭. 海洋细菌在生物表面和非生物表面附着的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1991, 21(2): 61-68.
- [5] 楼宜嘉,刘 伟,周立国,等. 药物毒理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003. 150-157.
- [6] 东秀株,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [7] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- [8] 戴 欣,周 磊,陈月琴,等. 中国南海南沙海区沉积物中弧菌 16S rDNA 多样性初步研究[J]. 自然科学进展, 2002, 12(5): 479-484.
- [9] 宋振强, 蔡振华, 倪子皓. 九孔鲍“脱板症”病原的初步研究[J]. 福建水产, 2003, (4): 1-3.
- [10] Yael Ben-Haim, Thompson F L, Thompson C C, et al. *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis* [J]. J Syst Evol Microbiol, 2003, 53(Pt 1): 309-315.
- [11] Yael Ben-Haim, Maya Zicherman-Keren, Eugene Rosenberg. Temperature-regulated bleaching and lysis of coral *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(7): 4 236-4 242.
- [12] Lee K K, Liu P C, Chen Y C, et al. The implication of ambient temperature with the outbreak of vibriosis in cultured small abalone *Haliotis diversicolor supertexta* Linchou [J]. Journal of Thermal Biology, 2001, 26: 585-587.
- [13] 李国浩, 黄之阳, 吴书敏, 等. 九孔种苗培育过程之细菌学相关研究[J]. 水产种苗月刊(台), 2000, 72.
- [14] Anguiano beltran C. Pathogenic effects of *Vibrio alginolyticus* on larvae and postlarvae of the red abalone [J]. Dis Aquatic Organisms, 1998, 33(2): 119-122.
- [15] 庞启华, 黄文芳. 杂色鲍(*Haliotis diversicolor Reeve*)消化腺细菌的初步研究[J]. 华南师范大学学报, 2002, (1): 113-116.
- [16] 吴后波, 潘金培. 弧菌属细菌及其所致海水养殖动物疾病[J]. 中国水产科学, 2001, 8(1): 89-92.
- [17] Riquelme C, Hayashida G, Vergara N, et al. Bacteriology of the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) culture in Chile [J]. Aquaculture, 1995, 138(1): 49-60.

Studies on the pathogenic bacteria of acute death and striping off disease in cultured postlarvae small abalone *Haliotis diversicolor* Reeve

LIU Guang-feng^{1,2}, ZHOU Shi-ning², XU Li-wen¹, WANG Rui-xuan¹, WANG Jiang-yong¹, CHEN Bi-sheng¹
(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Guangzhou 510300, China; 2. School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Four dominant bacterial strains, designated as NA0301, NA0302, NA0303 and NA0304, were isolated from diseased small abalone post-larvae *Haliotis diversicolor* Reeve and the plate where the larvae attached. Two of these, NA0301 and NA0302, were identified as pathogens by artificial marinated infection experiments. The strain NA0301 was isolated from the diseased post-larvae and the strain NA0302 was isolated from the plate. Biolog GN (gram negative) identification system was used to classify the strain NA0301 and NA0302. The results indicated the strain NA0302 was 99.0% similar with reference strain of *Vibrio alginolyticus*, SIM is 0.857, Dist is 2.13. The strain NA0301 could not be identified by BIOLOG ID SYSTEM. However, the carbon compound utilization of the strain NA0301 was similar to *Vibrio coralliilyticus*, which does not exist in Biolog database. In order to investigate the phylogenetic position of these pathogens, their 16S rDNA were sequenced and compared with those of related strains respectively. Molecular phylogenetic dendrogram was constructed based on the genetic distance analysis. According to their morphological and biochemical characteristics and 16S rDNA gene sequence, The strains NA0301 and NA0302 were most close to *V. coralliilyticus* and *V. alginolyticus* respectively. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(4): 655 - 661]

Key words: *Haliotis diversicolor* Reeve; postlarvae; pathogenic bacteria; identification; *Vibrio coralliilyticus*; *Vibrio alginolyticus*

Corresponding author: ZHOU Shi-ning. E-mail: lszsl@msu.edu.cn