

从患病黑鲷分离病原菌 HV0811 的鉴定及其系统发育分析

孟 鹏, 战文斌, 绳秀珍

(中国海洋大学 教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 从症状为溃疡瞎眼的养殖黑鲷(*Sebastes fuscescens*)病灶处分离到 3 株优势菌 HV0811、PT0811 和 JH0811, 以肌肉注射人工感染实验证实菌株 HV0811 为致病菌, 其对黑鲷的半致死浓度为 7.15×10^5 CFU/尾。通过对致病菌的形态学观察、生理生化分析表明: 菌株 HV0811 为革兰氏阴性菌, 极生单鞭毛, 短杆状, 直径 1~3 μm , 需 Na^+ 生长, 低于 4℃、高于 42℃ 不生长。基于 16S rRNA 和 HSP60 基因序列构建的系统发育树表明: HV0811 分别与哈维氏弧菌(AY750578 和 AY332571)相类聚, 其中 16S rRNA 基因序列与哈维氏弧菌(AY750578)聚合置信度较低, 仅有 10%, 不能有效地确定该种; HSP60 基因序列与哈维氏弧菌(AY332571) 聚合为一个分支的置信度达 100%。综合该菌的形态、生理生化及 HSP60 基因序列比对结果, 表明分离到的病原菌 HV0811 为哈维氏弧菌。药敏试验结果显示病原哈维氏弧菌(HV0811)对庆大霉素、新霉素、氟哌酸等较为敏感。

关键词: 黑鲷(*Sebastes fuscescens*); 溃疡; 瞎眼; 哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*); 16S rRNA 基因; HSP60 基因
中图分类号: S943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2010)05-0048-07

黑鲷(*Sebastes fuscescens*)学名许氏平鲷, 又称黑石鲈、黑寨, 隶属于鲷形目, 鲷科, 平鲷属, 属喜岩礁性底栖鱼种, 肉质鲜嫩, 脂肪少, 软硬适口, 具有较高的经济价值。分布于北太平洋西部, 中国黄、渤、东海都有, 北方沿海终年可见。黑鲷生长快, 适应性好, 是网箱养殖的较好种类。黑鲷在北方尤其在山东是重要的网箱养殖对象之一, 随着养殖规模的不断增大, 养殖密度的增加, 水体环境的恶化, 黑鲷病害也日益显著。

已有报道哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)能引起海水网箱养殖高体鲷^[1]、尖吻鲈^[2]和鲈鱼^[3]的溃疡病, 但尚未见哈维氏弧菌引起黑鲷患溃疡、瞎眼症的报道。2008 年 10 月, 山东威海网箱养殖黑鲷发病, 主要症状为溃疡、瞎眼, 发病黑鲷体长 15~20 cm, 死亡率约为 30%。为了深入了解该疾病从而采取有效防治措施, 作者对患病黑鲷进行了病灶处致病菌的分离, 在常规生理生化鉴定的基础上, 利用基因序列分析的方法对其进行了分类鉴定, 并进行了药物敏感试验, 以期对该疾病的预防控制提供参考资料。

1 材料与方 法

1.1 病原菌分离

患病黑鲷取自山东威海网箱养殖的自然发病鱼

群, 体长 15~20 cm, 体质量 140~160 g, 症状为体表溃烂充血, 尾部断裂出血, 眼球突出呈浊状, 游动缓慢, 基本不摄食。

取体表溃烂严重的濒死病鱼, 无菌条件下从体表、眼睛等部位分离细菌, 划线接种于 2216E、BHI、TSA 平板培养基上, 28℃ 培养 18~24 h, 挑取形态一致的优势菌落进行纯化培养后于 -80℃ 保存备用。

1.2 人工感染实验

将纯化的 3 株优势菌 28℃ 培养 18~24 h 后用 0.85% 无菌生理盐水洗脱得菌悬液, 用 McFarland 比浊法配制成 9×10^8 CFU/mL。并以 10 倍系列稀释菌悬液至浓度为 9×10^7 、 9×10^6 、 9×10^5 和 9×10^4 CFU/mL。

感染实验菌株按上述浓度各设 4 个感染组, 每组 10 尾黑鲷, 并设一个重复。肌肉注射, 每尾共注射 0.1 mL 菌悬液, 对照组注射同体积的 0.85% 无菌生理盐水。

健康黑鲷购自青岛小港水产品市场, 体长

收稿日期: 2008-10-23; 修回日期: 2009-04-25

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2006AA100306); 国家自然科学基金项目(30771648)

作者简介: 孟鹏(1984-), 女, 硕士研究生, 水产动物免疫与疾病防治, 电话: 13405323517, E-mail: mp2007@163.com; 战文斌, 通信作者, 博士生导师, 教授, E-mail: wbzhan@ouc.edu.cn

18~21 cm, 体质量 170~190 g。水温 25℃, 充气, 定期投饵、换水, 定时观察、记录发病死亡情况。

1.3 细菌鉴定

将分离纯化的 HV0811 和人工感染后分离纯化的 HV0811-1 划线接种于 2216E 和 TCBS 平板培养基上, 28℃ 培养 18 h 后观察菌落特征, 同时进行革兰氏染色和电镜观察。

菌株 HV0811、HV0811-1 的生理生化特征实验参照《常见细菌系统鉴定手册》^[4]和《伯杰氏细菌学鉴定手册》(第九版)^[5]进行, 快速鉴定采用法国生物梅里埃公司 miniATB 鉴定系统 ID32E 鉴定条。

1.4 16S rRNA 和 HSP60 基因序列的测定和分析

DNA 模板制备: 菌株 HV0811 于 2216E 平板培养基 28℃ 培养 24 h。挑取单一菌落悬浮于无菌去离子水中, 100℃ 水浴 5 min, 冷却后 4℃ 12 000 r/min 离心 10 min, 上清液作为 PCR 扩增反应的模板。

基因序列的 PCR 扩增与测序: 用于 16S rRNA 基因 PCR 扩增的引物为正向: 27F: 5'-AGAGTTT-GATC(C/A) TGGCTCAG-3'(对应于 *E.coli* 16S rRNA 基因的第 8~27 个碱基位置), 反向: 1 492R :5'-TACGG(C/T) TACCTTGTTACTT - 3'(对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的第 1 492~1 510 个碱基位置); 用于 HSP60 基因 PCR 扩增的引物为正向: P1: 5'-ACAAC-AGCAACGGTACTAGC-3', 反向: P2: 5'-CAACTTT-CACGATGCCAC-3'^[6]。在 50 μL PCR 反应体系中含有: 5 μL 10×PCR 缓冲液, 3 μL 25 mmol/L MgCl₂, 1 μL 10 mmol/L 4 × dNTP, 引物各 1 μL, Taq DNA 聚

合酶(5 U/μL) 1 μL, 模板 DNA 5 μL。16S rRNA 和 HSP60 基因 PCR 反应条件分别为: 94℃ 预变性 4 min, 接 94℃ 变性 30 s, 55℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 100 s, 30 个循环, 最后 72℃ 温育 6 min; 94℃ 预变性 2 min, 接着 94℃ 30 s, 50℃ 45 s, 72℃ 60 s, 35 个循环, 72℃ 延伸 7 min。PCR 产物经琼脂糖电泳确定特异条带后, 由上海生物工程技术公司进行 PCR 产物的纯化和序列测定。

序列分析与系统发育树的构建: 菌株 HV0811 的 16S rRNA 和 HSP60 基因序列已经提交国际互联网 Gen-Bank 核苷酸序列数据库, 通过 Blast 与 GenBank 数据库中的序列进行比较, 从中选取与所分析的基因序列同源性高的已知菌株, 采用 ClustalX1.8 软件进行多序列匹配排列, 用 Mega2.1 采用邻位相连(Neighbor-joining method)获得系统发育树, 通过自举分析(Bootstrap)进行置信度检测, 自举数集 1 000 次。

1.5 药物敏感实验

药敏纸片购自青岛爱普科生物有限公司, 共 30 种抗菌药物, 药敏试验参照纸片扩散法抗菌药物敏感试验操作标准进行。

2 结果

2.1 病原菌的分离和人工感染实验

分离到的优势菌株分别编号为 HV0811、PT0811、JH0811, 人工感染 3~5 d 后, 菌株 HV0811 较高浓度感染组的鱼活动减弱, 从注射部位到尾鳍逐渐溃疡, 体表溃烂出血, 眼睛浑浊不透明, 尾鳍溃



图 1 人工感染黑鲷的实验照片(箭头示病灶处)

Fig. 1 *Sebastodes fuscescens* in the artificial infection experiment(arrows point to the lesions)

烂, 露出尾椎骨, 尾柄表皮充血, 肛门红肿, 伴有血样物流出(图 1), 与自然发病症状相同。菌株 PT0811、JH0811 组与对照组未出现任何症状。HV0811 高浓度组死亡率较高, 死亡速度较快; 低浓度组陆续发病死亡。用感染发病鱼的溃烂处、眼球及断尾分离到的细菌再次感染黑鲷, 得到相同的结果, 证明 HV0811 是黑鲷溃疡、瞎眼症的致病菌。按改进的寇氏法^[7]计算菌株 HV0811 的半致死量为 $LD_{50} = 7.15 \times 10^5$ CFU/尾, 表明该菌株具有高致病力, 对黑鲷的感染力较强, 结果见表 1。

表 1 人工感染一周实验结果

Tab. 1 Results of artificial infection experiment for a week

分组	菌浓度 (CFU/mL)	剂量 (mL)	实验鱼数 (尾)	死亡鱼数 (尾)	死亡率 (%)
1	9×10^7	0.1	10	10	100
2	9×10^6	0.1	10	9	90
3	9×10^5	0.1	10	6	60
4	9×10^4	0.1	10	1	10
对照	0.85%NaCl	0.1	10	0	0

2.2 细菌鉴定

在 2216E 平板培养基上 28℃ 培养 24 h, 菌株 HV0811、HV0811-1 呈光滑、圆形、湿润、隆起、灰白色的菌落, 直径 1~3 mm; 革兰氏染色为阴性, 短杆菌, 多呈单个排列; 无芽孢, 无荚膜, 有运动性, 不发光; 电镜观察发现菌体呈短杆状, 具有 1 根端生鞭毛(图 2)。在 TCBS 平板培养基上菌落绿色, 菌株需 Na^+ 生长, 低于 4℃ 和高于 42℃ 不生长。氧化酶、接触酶、硝酸还原反应均为阳性, 具有赖氨酸脱羧酶, 不具有鸟氨酸脱羧酶、精氨酸双水解酶、脲酶, 发酵葡萄糖产酸不产气, 利用麦芽糖、甘露糖、海藻糖, 不利用半乳糖、鼠李糖、阿拉伯糖。菌株 HV0811、HV0811-1 生理生化特性见表 2。

2.3 16S rRNA 和 HSP60 基因序列分析及系统发育树的构建

以总 DNA 为模板, 经通用引物 27F 和 1492R 扩增到 HV0811 的 16S rRNA 基因序列条带约为 1 500 bp, 经引物 P1 和 P2 扩增到 HSP60 基因序列条带约为 100 bp 和 500 bp (图 3), 分别选取 1 500 bp 和 500 bp 的条带测序。不包括引物结合区, 所扩增的 16S

rRNA、HSP60 基因序列长度分别为 1 033 bp、521 bp。基于 16S rRNA 和 HSP60 基因序列, 采用 ClustalX1.8 以及 Mega2.1 软件构建的系统发育树表明: 菌株 HV0811 分别与哈维氏弧菌(AY750578)和(AY332571)相类聚, 其中 16S rRNA 基因序列与哈维氏弧菌(AY750578)聚合置信度较低, 仅有 10%(图 4), 不能有效地确定该种; HSP60 基因序列与哈维氏弧菌(AY332571)聚为一个分支的置信度达 100%(图 5)。综合该菌的形态、生理生化及 HSP60 基因序列比对结果, 将病原菌 HV0811 鉴定为哈维氏弧菌。

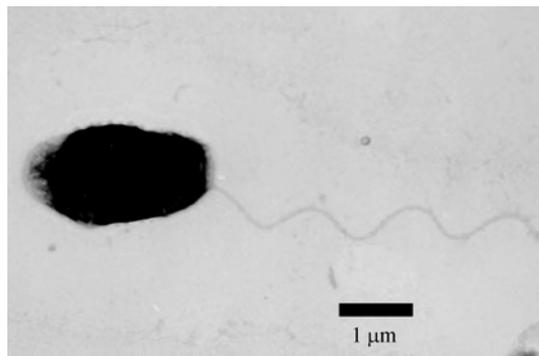


图 2 菌株 HV0811 的负染电镜照片

Fig. 2 The electron micrograph of strain HV0811 with negative staining

2.4 药物敏感试验

作者对分离的病原菌 *Vibrio harveyi* 进行了 30 种常见抗菌药物的敏感性测定, 结果显示病原菌对庆大霉素、新霉素、红霉素、美满霉素、氯霉素、先锋必素、氟哌酸、丙氟哌酸、菌必治、复达欣、奥复星、头孢呋肟及复方新诺明高度敏感, 对卡那霉素、丁胺卡那霉素、麦迪霉素、四环素、万古霉素、先锋霉素 V 及呋喃唑酮中度敏感, 对氨苄青霉素、苯唑青霉素、羧苄青霉素、氧哌嗪青霉素、青霉素、强力霉素、多黏菌素 B、氯洁霉素、先锋霉素 IV 及先锋霉素 VI 耐药。实验结果见表 3。

3 讨论

哈维氏弧菌是海水鱼的常见致病菌, 能引起花鲈^[8]、斜带石斑鱼^[9-11]、大黄鱼^[12]等鱼类不同程度的体表溃疡, 充血症状。本文中患病黑鲷不仅具有溃疡的症状同时具有瞎眼症, 角膜不透明、眼球突出, 与 Saed 等^[13]曾报道的患病的养殖遮目鱼症状相同。作者认为哈维氏弧菌在导致黑鲷出现以溃疡为主的

表 2 菌株 HV0811、HV0811-1、哈维氏弧菌《伯杰氏手册》第九版的生理生化特征比较

Tab. 2 Comparisons of physiological and biochemical characteristics of HV0811、HV0811-1 and *Vibrio harveyi*

鉴定项目	HV0811	HV0811-1	哈维氏弧菌
4℃生长 4℃	-	-	-
30℃生长 30℃	+	+	+
35℃生长 35℃	+	+	+
42℃生长 42℃	-	-	ND
0%NaCl	-	-	-
1%NaCl	+	+	+
6% NaCl	+	+	+
8% NaCl	-	-	-
10% NaCl	-	-	ND
O/ 129 (150μg)敏感 O/ 129 (150μg)	+	+	+
TCBS 琼脂培养基	G	G	ND
黄色色素(25℃)(25℃)	-	-	-
运动	+	+	+
氧化酶反应	+	+	+
接触酶	+	+	ND
硝酸盐还原	+	+	+
V. P 反应(Voges-Proskauer)	-	-	-
甲基红	+	+	+
丙二酸	-	-	-
吲哚产生	+	+	+
尿素酶	-	-	-
鸟氨酸脱羧酶	-	-	-
赖氨酸脱羧酶	+	+	+
精氨酸双水解酶	-	-	-
脂肪酶	-	-	-
淀粉酶	+	+	+
利用:肌醇	-	-	-
葡萄糖产酸	+	+	d
葡萄糖产气	-	-	-
麦芽糖	+	+	+
蔗糖	-	-	d
山梨醇	-	-	-
半乳糖	-	-	d
甘露糖	+	+	+
甘露醇	+	+	+
鼠李糖	-	-	-
海藻糖	+	+	+
阿拉伯胶糖	-	-	-
水杨苷	-	-	d

注: +表示阳性; -表示阴性; d 表示部分菌株阳性(11%~89%); ND 表示未进行测定; G 表示生长

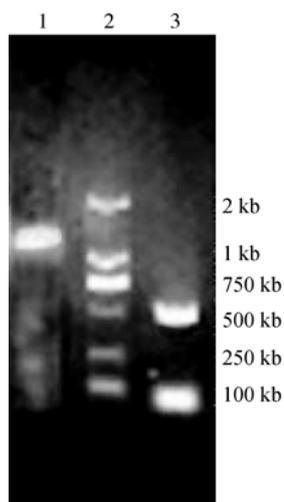


图3 菌株 HV0811 的 16S rRNA 和 HSP60 基因的 PCR 扩增未纯化产物

Fig. 3 PCR amplification products of 16S rRNA and HSP60 genes of strain HV0811

1. 菌株 HV0811 的 16S rRNA 基因的 PCR 扩增产物;
 2. Marker;
 3. 菌株 HV0811 的 HSP60 基因的 PCR 扩增产物
1. 16S rRNA gene PCR product of strain HV0811; 2. Marker; 3. HSP60 gene PCR product of strain HV0811

病症之外，还可引发患溃疡的黑鲷出现其他症状，其致病机理与患病鱼种类、身体状况及环境条件

等密切相关，但尚待进一步研究。

本研究对溃烂严重的黑鲷病灶进行了病原菌的分离，经过多次筛选获得了 3 株优势菌 HV0811、PT0811、JH0811，通过验证表明菌株 HV0811 为致病菌，而其他 2 株属于腐生菌。由于腐生菌的出现，干扰了病原菌的分离，加大了研究工作量，所以病原菌的分离工作应该在疾病的原发期进行，原因在于原发期的病原菌数量占主体地位，疾病后期众多腐生菌相继繁殖，与病原菌产生竞争，导致病原数量减少，从而增加了分离、筛选工作的困难。

本实验分离的哈维氏弧菌 HV0811 在 TCBS 上生长呈绿色与相关文献[9~10]报道的黄色结果不一致，原因在于 TCBS 的成分中包含蔗糖，相关文献中报道的哈维氏弧菌发酵蔗糖产酸，而本实验分离的哈维氏弧菌不发酵蔗糖，若在 TCBS 培养基中加入葡萄糖，生长结果则变为黄色，此差异的主要原因可能是种类个体之间存在差异性。

网箱养殖黑鲷患溃疡瞎眼症后死亡率很高，本实验分离到的哈维氏弧菌半数致死浓度低，仅有 7.15×10^5 CFU/尾，说明分离菌株对黑鲷的致死力较强。该病的发生与水体污染、养殖密度、投饵量以及药

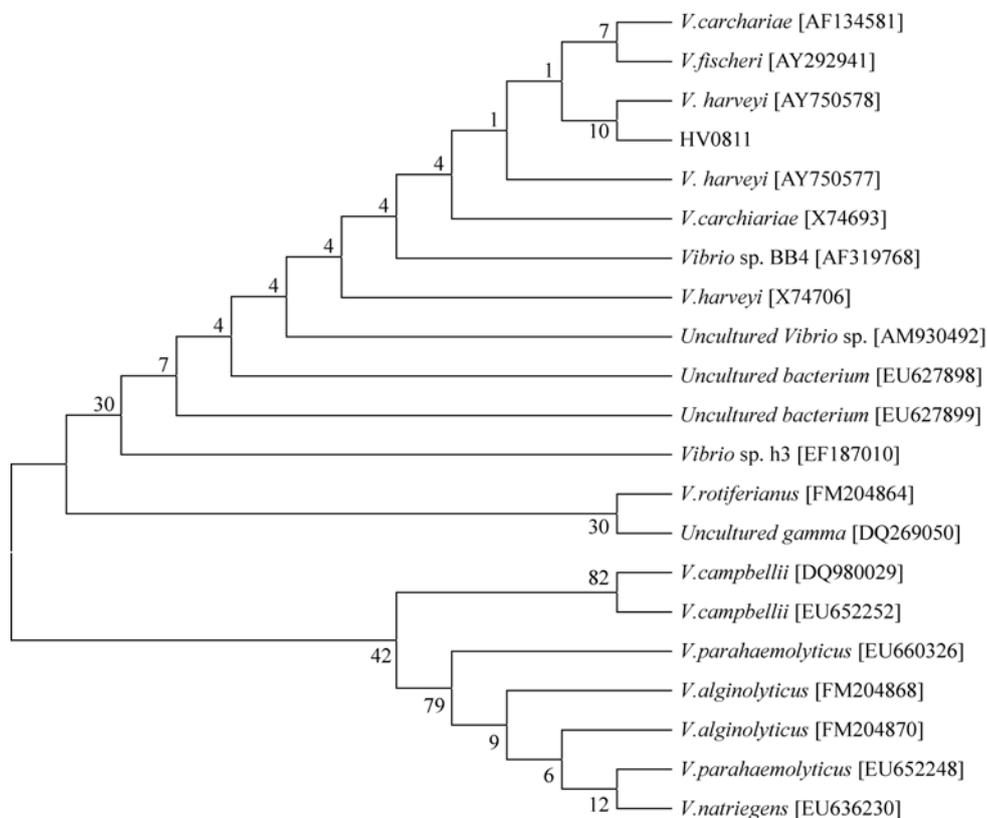


图4 以 16S rRNA 基因构建的弧菌系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of *Vibrio* based on 16S rRNA gene

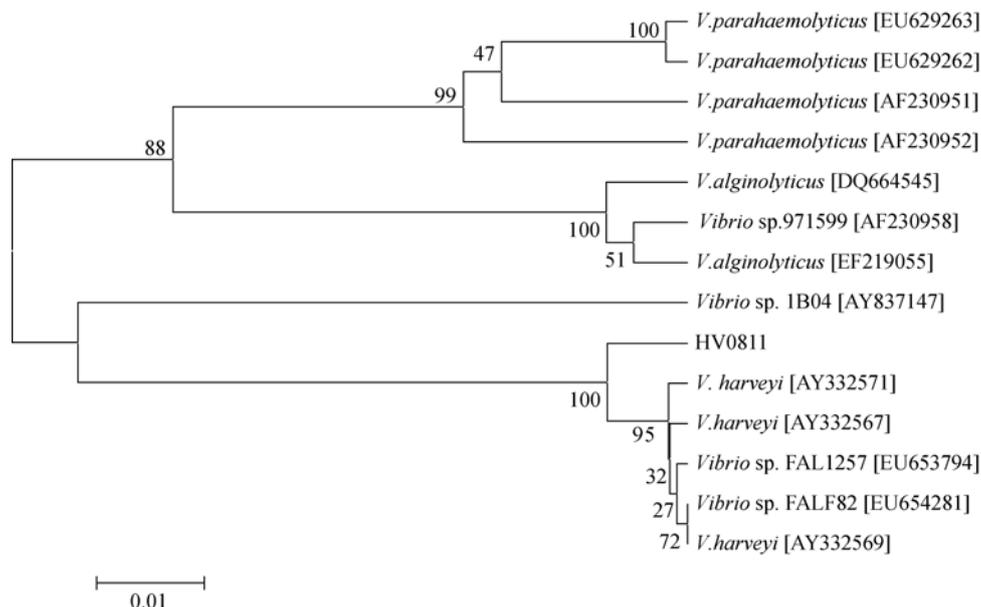


图 5 以 HSP60 基因构建的弧菌系统发育树
Fig. 5 Phylogenetic tree of *Vibrio* based on HSP60 gene

表 3 菌株 HV0811 对不同抗菌药物的敏感性

Tab. 3 Sensitivity of strain HV0811 to antibacterial agents

抗菌药物	纸片含量 ($\mu\text{g}/\text{片}$)	抑菌圈直径 (mm)	敏感性	抗菌药物	纸片含量 ($\mu\text{g}/\text{片}$)	抑菌圈直径 (mm)	敏感性
氨苄青霉素	10	-	R	奥复星	5	31	S
苯咪唑青霉素	1	-	R	氟哌酸	10	32	S
羧苄青霉素	100	-	R	丙氟哌酸	5	32	S
青霉素	10IU/片	-	R	痢特灵	300	18	I
氧哌嗪青霉素	100	-	R	头孢呋肟	30	22	S
庆大霉素	10	22	S	多黏菌素 B	300IU/片	-	R
卡那霉素	30	17	I	菌必治	30	34	S
丁胺卡那霉素	30	19	I	美满霉素	30	20	S
复方新诺明	23.75	34	S	强力霉素	30	-	R
复达欣	30	30	S	氯洁霉素	2	-	R
万古霉素	30	13	I	氯霉素	30	29	S
新霉素	30	20	S	先锋霉素	75	26	S
麦迪霉素	30	17	I	先锋霉素IV	30	-	R
四环素	30	15	I	先锋霉素V	30	18	I
红霉素	15	24	S	先锋霉素VI	30	-	R

注: - 表示无抑菌圈; S 表示敏感; I 表示中介; R 表示耐药

物的使用密切相关。通过对 30 种常见药物的敏感试验表明哈维氏弧菌 HV0811 对庆大霉素、新霉素、红霉素、氟哌酸及头孢呋肟等抗生素高度敏感, 可以为黑鲟的临床用药提供参考。本实验采用肌肉注射成功感染黑鲟又进一步表明哈维氏弧菌作为一种条件致病菌^[14], 极易感染鱼体受伤部位, 在养殖过程中应将防止鱼体创伤作为减少疾病发生的关键措施。

从 16S rRNA 基因序列系统发育树上看, 节点的置信度普遍很低, 其中菌株 HV0811 与哈维氏弧菌 (AY750578) 聚合的置信度仅有 10%, 由于弧菌属 16S rRNA 基因序列的种间差异不显著, 导致弧菌不具有唯一的聚类特征^[15]。以 HSP60 基因构建的系统树, 置信度普遍明显高于 16S rRNA 基因, 作者认为 16S rRNA 基因序列同源性分析不适宜用于亲缘关系较

近的弧菌种之间的鉴别, 而 HSP60 基因比 16S rRNA 基因携带更多的多态信息, 因此 HSP60 基因比 16S rRNA 基因更适合于海水养殖动物中弧菌的分类研究, 这与吴淑勤等^[10]观点相同。作者采用的 HSP60 基因序列分析和生理生化鉴定方法都证明分离的病原菌 HV0811 属于弧菌属的哈维氏弧菌。

参考文献:

- [1] 吴后波, 潘金培. 海水网箱养殖高体鳊弧菌病致病菌研究[J]. 水产学报, 1997, 21(2): 171-174.
- [2] Cop land J W, Grey D L. Management of wild and cultured sea bass barramundi (*Lates calcarifer Bloch*) [A]. Proceeding of an international work shop help at Draw in N T, Australia[C], AC: IAR Proceedings, 1987. 20.
- [3] 王国良, 金珊, 薛良义, 等. 海水网箱养殖鲈鱼皮肤溃疡病及其病原菌的研究[J]. 渤海海洋, 2000, 18(3): 01-06.
- [4] 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.
- [5] Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition [M]. Maryland: Williams & Wilkins, 1994.
- [6] 张伟妮, 周丽, 邢婧, 等. 养殖大菱鲆腹水症病原菌 SR1 的分离及鉴定[J]. 中国水产科学, 2006, 13(4): 603-609.
- [7] 邹玉霞, 张培军, 莫照兰, 等. 大菱鲆出血症病原菌的分离和鉴定[J]. 高技术通讯, 2004, 4(4): 89-93.
- [8] 王保坤, 余俊红, 李筠, 等. 花鲈弧菌病原菌(哈维氏弧菌)的分离与鉴定[J]. 中国水产科学, 2002, 9(1): 52-55.
- [9] 陈献稿, 吴淑勤, 石存斌, 等. 斜带石斑鱼病原菌(哈维氏弧菌)的分离与鉴定[J]. 中国水产科学, 2004, 11: 313-317.
- [10] 李宁求, 白俊杰, 吴淑勤, 等. 斜带石斑鱼 3 种致病弧菌的分子生物学鉴定[J]. 水产学报, 2005, 29(3): 356-361.
- [11] 覃映雪, 池信才, 苏永全, 等. 网箱养殖青石斑鱼的溃疡病病原[J]. 水产学报, 2004, 28(3): 297-302.
- [12] 毛芝娟, 刘国勇, 陈昌福. 大黄鱼溃疡病致病菌的初步分离与鉴定. 安徽农业大学学报[J], 2002, 29(2): 178-181.
- [13] Saeed M O. Association of *Vibrio harveyi* with mortalities in cultured marine fish in Kuwait [J]. **Aqua-culture**, 1995, 136: 21-29.
- [14] 郝贵杰, 沈锦玉, 潘晓义, 等. 32 种常用渔药对大黄鱼致病菌哈维氏弧菌的体外抗菌试验. 中国兽药杂志[J], 2008, 42(5): 36-39.
- [15] Kim Y B, Okuda J, Matsumoto C, *et al.* Identification of *Vibrio Parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene[J]. **J Clin Microbiol**, 1999, 37(1): 173-177.

Identification and phylogenetic analysis of pathogen HV0811 isolated from the diseased *Sebastes fuscescens*

MENG Peng, ZHAN Wen-bin, SHENG Xiu-zhen

(The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Oct., 23, 2008

Key words: *Sebastes fuscescens*; skin ulceration; blind; *Vibrio harveyi*; 16S rRNA gene; HSP60 gene

Abstract: Bacterial strains HV0811, PT0811 and JH0811 were isolated from the *Sebastes fuscescens* with skin ulceration and blind. Strain HV0811 was proved to be a pathogen by muscle injection, with the LD50 being 7.15×10^5 CFU per fish. By morphological observation and physiological-biochemical analysis, HV0811 was identified as gram-negative with single polar flagellum, in a shape of short rod and a diameter of 1-3mm; it could grow between 4°C and 42°C, but it could not grow without Na⁺. Phylogenetic tree of *Vibrio* based on 16S rRNA and HSP60 gene indicated that strain HV0811 clustered together with *V.harveyi* (AY750578) and (AY332571) respectively. The boot strap of strain HV0811 clustered together with *V.harveyi* (AY750578) based on 16S rRNA gene was only 10%, which was too low to give identification of the strain effectively; But strain HV0811 clustered together with *V.harveyi* (AY332571) based on HSP60 gene had a high boot strap of 100%. So, all above results confirmed that strain HV0811 was *V.harveyi*, Additionally, drug sensitivity screen using 30 antibacterial agents showed that strain HV0811 was sensitive to several antibacterial agents including Gentamicin, neomycin and Norfloxacin.

(本文编辑: 梁德海)