

日本对虾(*Penaeus japonicus*)虾苗杀虾微杆菌 (*Microbacterium shrimpcida* sp. nov.) 感染及病原菌检验*

房海 陈翠珍 张晓君 何振平 葛慕湘

(河北科技师范学院动物科学系 秦皇岛 066004)

提要 用平板划线分离方法,从呈群体死亡的日本对虾蚤状幼体中分离到同种细菌,经对从分离做纯培养的 6 株菌(HL010406-1 至 HL010406-6)进行形态特征、理化特性、代表菌株(HL010406-1)的 16S rRNA 基因序列测定及系统发育学等方面的鉴定,初步表明其为微杆菌属(*Microbacterium* Orla-Jensen 1919)细菌的一个新种;选择代表菌株(HL010406-1)送中国典型培养物保藏中心(CCTCC)进行了复核鉴定,将其暂定名为杀虾微杆菌(*Microbacterium shrimpcida* sp. nov.)。根据用 HL010406-1 为代表菌株对健康虾及牙鲆做感染试验,初步认为该菌可能是造成所检虾苗死亡的病原菌。经用 37 种抗菌类药物对 3 株菌所做的药敏试验,结果发现对供试的青霉素 G 等 30 种药物呈敏感或高度敏感、对诺氟沙星低度敏感、对苯唑青霉素等 6 种具有耐药性。

关键词 日本对虾, 虾苗, 杀虾微杆菌, 检验
中图分类号 S941

近年来,已报道引起对虾感染发病的细菌主要有鳃弧菌(*V. anguillarum*)(郑国兴等, 1990)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)(陶保华等, 2001)、产气弧菌(*V. gazogenes*)(战文斌等, 1997a)、非 O1 霍乱弧菌[*V. cholerae* (non-O1)](王立平等, 1997)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)(周永灿等, 2003)、嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)(刘荭等, 1999)、普罗威登斯菌(*Providencia rettgeri*)(战文斌等, 1997b)等。目前尚无微杆菌属(*Microbacterium* Orla-Jensen 1919)细菌引起鱼、虾等水产养殖动物感染发病的明确记述。2001 年,作者从一起呈群体死亡的日本对虾(*Penaeus japonicus*)蚤状幼体中检出了大量同种细菌,经鉴定初步表明为微杆菌属细菌的一个新种(sp. nov.),并经感染试验认为该菌是所检死亡虾苗的相应病原菌。现将该病例及相应病原菌主要特性的检验结果做如下报告。

1 实验

1.1 病例检验

对群体死亡虾苗的发病情况调查和检验后,随机取 2g 死亡虾苗用无菌生理盐水离心洗涤 3 次,取沉淀虾体无菌操作组织研磨器磨碎后制备成虾体组织悬液(1:5),做涂片以革兰氏染色镜检细菌。

1.2 细菌分离与纯培养

取上述虾体组织悬液直接滴加于普通营养琼脂、含 7% 家兔血液营养琼脂培养基平板做划线接种,置 28℃ 培养 24—48h 做细菌分离;选取纯一或优势生长的细菌菌落移接于普通营养琼脂斜面置 28℃ 培养 24h 做纯培养,置 4℃ 普通冰箱保存供鉴定用。

1.3 细菌鉴定

1.3.1 形态特征检查 取上述纯培养菌,分别

* 河北省科学技术研究与发展计划资助项目, 04220401D 号。房海, 教授, E-mail: fanghaihb@163.com

收稿日期: 2005-03-27; 收修改稿日期: 2005-06-19

移接于普通营养琼脂斜面每株各 2 管, 分置 28、37 培养 18h 制备涂片标本, 经革兰氏染色后镜检细菌形态; 选择代表菌株制备成磷钨酸负染色标本, 置 JEM-100CX 透射电子显微镜下检查形态与鞭毛形成情况。

1.3.2 主要理化特性检查 取上述纯培养菌, 分别划线接种于普通营养琼脂、血液营养琼脂(分别为含 7% 家兔脱纤血及含 7% 绵羊脱纤血的营养琼脂)、沙门氏菌志贺氏菌琼脂(SS 琼脂)、疔疮病琼脂(FA)、胰酪大豆胨琼脂(TSA)、木糖赖氨酸去氧胆酸盐琼脂(XLD)、庆大霉素琼脂、硫代硫酸钠柠檬酸钠胆酸钠蔗糖琼脂(TCBS)、Rimler-Shotts 培养基(RS)、2216E 海水培养基(2216E)、麦康凯琼脂(Mac Conkey 琼脂)、伊红美蓝琼脂等 12 种不同培养基平板, 置 28 培养 24h 和 48h 分别检查细菌生长情况及菌落特征; 分别移接于普通营养肉汤管中, 28 培养 24h 检查生长发育情况; 分别按常规进行氧化酶、 H_2O_2 酶、动力(半固体)、糖(醇和苷)类代谢、有机酸(盐)的利用、 H_2S 产生、吲哚、MR、V-P 等理化特性测定(东秀珠等, 2001)。

1.3.3 16S rRNA 基因序列测定与系统发育学分析
菌株 DNA 样本的制备 选取代表菌株接种于 LB 肉汤中 28 培养 16h, 取 1ml 菌液离心(10000 r/min)弃上清后悬浮于 100 μ l 无菌蒸馏水中, 经 100 水浴加热 5min 后同样离心, 取上清作为 PCR 模板 DNA。

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 $MgCl_2$ 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 3min、接 94 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 纯化系统纯化后, 由上海博亚生物工程技术公司进行基因序列测定。

系统发育树的构建 将上述代表菌株的 16S rRNA 基因序列通过美国国立卫生研究院全国生物技术中心(The National Center for Biotechnology Information, NCBI)的 Blast 检索系统(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>)进行序列同源性检索, 使用 ClustalX1.8 软件与从 GenBank 数据库获得的细菌 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。

1.3.4 菌种归类判定 以其表型性状, 主要依据“Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed.”(Holt *et al.*, 1994), “Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.2”(Sneath *et al.*, 1986)及有关资料, 并结合系统发育学的结果, 进行供试菌的种属判定。在此基础上, 选择代表菌株送中国典型培养物保藏中心(CCTCC)予以复核鉴定及分类定名。

1.4 致病作用检验

1.4.1 日本对虾 选择上述经鉴定菌的 1 个代表菌株, 移接于普通营养琼脂平板 28 培养 18h, 用无菌生理盐水洗下并调成 3×10^8 CFU/ml 的菌悬液作为供试菌液。

注射感染 取上述供试菌液经第 2 腹节肌肉注射感染健康虾(体长 6—7cm)10 尾(0.1ml/尾), 同时接种同剂量无菌生理盐水的对照虾 10 尾, 分别养殖于水族箱中, 每天换水量约 30% 左右, 观察其发病与死亡情况。

浸浴感染 分为直接浸浴和创伤浸浴两组, 方法是取上述供试菌液 20ml 混悬于 2000ml 海水中, 将此含菌海水分成两份, 每份 1000ml, 其中一份直接浸浴同上述“注射感染”中的健康虾 10 尾; 另一份将试验虾用手术刀在其背侧部划痕后浸浴, 24h 后取出放养于同批正常海水中。同时设立无菌海水放养的 20 尾虾作为对照(同样分为两组, 一组直接放养, 另一组背侧部划痕), 每天换水量约 30%, 观察其发病与死亡情况。

1.4.2 牙鲆 取 1.4.1 的“注射感染”中所述菌液, 经腹腔接种体长 20cm 左右的健康牙鲆 6 尾, 每尾 0.3ml, 同时设立接种同剂量无菌生理盐水的对照组(6 尾)。接种后隔离养殖于水族箱内, 每天观察其发病及死亡情况。

对上述感染死亡虾、牙鲆, 取其病变组织做抹片后经革兰氏染色镜检细菌, 同时做细菌分离

与纯培养及对分离菌株做相应的形态特征、理化特性等的复核性检验;以被感染虾及牙鲆发病死亡、并能分离回收到原感染菌作为供试菌株的病原性判定指标,对照虾及牙鲆应在观察期内正常存活。

1.5 对抗菌类药物的敏感性测定

选择上述经鉴定的代表菌株,采用常规琼脂扩散法(K-B)对抗菌类药物的敏感性测定,以抑菌圈直径大小作为敏感与耐药的判定指标(叶应妩等,1997)。

2 结果

2.1 发病情况与主要病变

2001年4月,河北某水产养殖育苗场的日本对虾(*Penaeus japonicus*)蚤状幼体发生群体死亡,到检验时(4月6日)已死亡3天时间,严重的池内死亡率达80%左右;虾苗死亡前主要表现摄食减少、反应迟钝、部分上浮水面、活力低下;取死亡虾苗置低倍显微镜下观察,可见体色暗红或发白、刚毛断裂、附肢不健全、食道变细。

2.2 死亡虾苗组织中的细菌

在死亡虾苗组织悬液中,有大量形态特征一致的革兰氏阳性、杆状、有的菌体一端明显宽于另端(弹状)、散在及个别成双排列、两端钝圆、无芽孢、大小多在(0.6—1.0) $\mu\text{m} \times$ (1.5—2.5) μm (个别大的达3.5 μm 左右)的细菌。

2.3 细菌分离与纯培养

从虾体组织悬液中分离到了大量同种细菌的菌落。在普通营养琼脂上为圆形光滑、边缘整齐、稍隆起、半透明、藤黄色的菌落,培养24h检查其直径多在0.1—0.2mm的小菌落,48h多在1.0mm左右,生长中度;在血液营养琼脂上的菌落特征与在普通营养琼脂上的相同:不溶血,48h菌落直径多在1.2mm左右,生长中度。做纯培养6株,以分离地、日期及株数依次编号为:HL010406-1、HL010406-2、HL010406-3(取自普通营养琼脂),HL010406-4、HL010406-5、HL010406-6(取自血液营养琼脂)。

2.4 分离菌的理化特性及菌种分类定名

2.4.1 形态特征 上述6株纯培养菌的形态特征一致,且与在死亡虾组织中的相同(但菌体较小)。具体为革兰氏染色阳性(有的菌体呈阴性或介于阳、阴性之间)、杆状(有的为短杆状或近似球状)、散在(个别成双)、多数菌体的一端宽于另

端(弹状)、两端钝圆、无芽孢、大小多在(0.2—0.4) $\mu\text{m} \times$ (0.3—1.4) μm 。以HL010406-1为代表菌株在电子显微镜下检查,菌体为一端稍宽、呈弹状、有的菌体着生少数几根鞭毛。

2.4.2 理化特性 上述6株纯培养菌在供试12种不同培养基上,同种培养基上的生长情况及菌落特征表现一致。其中在普通培养琼脂和血液营养琼脂上的生长情况及菌落特征,与前述用此两种培养基直接从死亡虾苗组织悬液中初代分离的相一致;在TCBS、庆大霉素琼脂、RS、XLD、伊红美蓝琼脂、麦康凯琼脂及SS琼脂上,于培养48h检查均未见生长;在TSA上的菌落不透明、藤黄色,培养24h直径多在0.1—0.2mm,培养48h直径多在1.0mm左右,生长接近中度;在FA上的菌落特征与TSA上的基本一致,培养24h检查直径多在0.2mm,48h多在1.2mm左右,在菌苔处沿划线方向形成不等间距的、隆起的薄片状横向皱褶(有的皱褶可高出菌苔1.0mm左右),生长较丰盛(尤其菌苔处);在2216E培养基上培养24h检查,仅在划线起始部生长薄层菌苔(藤黄色),48h检查形成很密集的藤黄色、圆形光滑、边缘整齐、直径多在0.2mm左右的小菌落,菌苔处生长中度。在普通营养肉汤中的生长表现一致,均为呈中度的均匀混浊生长,管底形成圆点状菌体沉淀,有很轻微的菌环且摇动后易脱落消散。6株菌对所测理化性状结果一致,具体如表1所示。

2.4.3 16S rRNA 基因序列和系统发育学 代表菌株(HL010406-1株)在GenBank中登录号为DQ377339,所扩增的16S rRNA基因序列长度为1381bp,将该16S rRNA基因序列通过NCBI的Blast进行同源性检索,结果其与微杆菌属细菌的16S rRNA基因序列自然聚类。在检索出的微杆菌属细菌序列中,该菌株与它们的同源性在95%—98%,选取了其中的25株微杆菌属细菌的16S rRNA基因序列进行系统发育学分析,其系统发育树如图1所示。

2.4.4 菌种分类定名 根据上述形态特征、理化特性、系统发育学的结果作综合判定,认为该菌可列为微杆菌属细菌的一个新种。送CCTCC做复核检验的HL010406-1株,同样鉴定为微杆菌属细菌的新种,并根据菌株分离的来源、结合对虾具有致病作用的特性,将其暂定名为杀虾微

表1 分离菌的理化特性

Tab.1 Physiological and biochemical characteristics of the isolates

项目	结果	项目	结果	项目	结果
37 生长	+	蔗糖	-	麦芽糖	-
氧化酶	-	鼠李糖	-	丙二酸盐利用	+
接触酶	+	肌醇	-	醋酸盐利用	+
产 H ₂ S	-	甲基红试验	-	木糖	-
OF 试验	F	V-P 试验	-	木糖醇	-
动力	+	阿拉伯糖	-	苦杏仁苷	-
明胶液化	-	甘露醇	-	松三糖	-
枸橼酸盐利用	-	吡啶产生	-	山梨糖	-
葡萄糖: 产酸	+	七叶苷利用	-	侧金盏花醇	-
产气	-	苯丙氨酸脱氨酶	-	酒石酸盐利用	+
山梨醇	-	尿素酶	-	黏液酸利用	-
蜜二糖	-	IPA	-	β-半乳糖苷酶	+
棉子糖	-	阿拉伯醇	-	-甲基-D-葡糖苷	-
菊糖	-	乙酰胺酶	-	乳糖	-
水杨苷	-	淀粉酶	+	海藻糖	-
吐温 80	-	糊精	-	赤藓醇	-
硝酸盐还原	-	卫茅醇	-	甘露糖	-
半乳糖	+	甘油	+	果糖	+
蛋白酶	-	NaCl 中生长: 0%	+	松二糖	-
纤维二糖	-	1%	+	O/129: 10 μg	S
DNA 酶	+	6%	-	150 μg	S
卵磷脂酶	-	G+Cmol% (HPLC)	64.5		

注: + 示阳性, - 示阴性, F 示发酵型, S 示敏感; G + Cmol% 为 CCTCC 对 HL010406-1 株的测定结果

杆菌(*Microbacterium shrimpida* sp. nov.), 参考菌株(reference strain)为 HL010406-1。

2.5 致病作用

2.5.1 对虾的致病作用 经注射感染的 10 尾试验虾, 于接种感染后 5 天内全部死亡, 对照 10 尾虾观察 14 天正常存活。直接浸浴的 10 尾虾于感染后的 8 天内死亡 3 尾, 余 7 尾观察 14 天未见发病; 创伤浸浴的 10 尾于感染后 6 天内死亡 5 尾, 余 5 尾观察 14 天未见发病; 对照虾观察 14 天均正常存活。死亡虾外观见体色发暗, 虾体较混浊。

2.5.2 对牙鲆的致病作用 被感染的 6 尾牙鲆均于感染后的 5d 内发病死亡(3 天、4 天、5 天各死亡 1 尾、3 尾、2 尾), 剖检见均呈现了肝脏、脾脏、肾脏不同程度的肿胀并有个别存在出血点等败血症病变; 对照 6 尾牙鲆在 14 天观察期内均正常存活。

取上述不同途径感染死亡虾各 2 尾(共 6 尾)的肝胰腺、2 尾牙鲆的肝脏, 分别做抹片经革兰氏染色镜检细菌, 结果发现均有大量在形态特征上同原感染菌的细菌; 同时均分离到了原感染菌的菌落, 从每尾虾及牙鲆的分离菌落各取 1 个做纯培养共 8 株, 分别进行形态特征及主要理化特

性指标的复核鉴定, 结果均与原感染菌一致。

2.6 对抗菌类药物的敏感性

选择经鉴定的 3 株菌(HL010406-1、HL010406-3、HL010406-5)对 37 种抗菌类药物的敏感性测定, 结果未见株间的明显差异; 均表现对青霉素 G、氨苄青霉素、头孢唑啉、头孢拉定、头孢噻肟、头孢曲松、头孢哌酮、红霉素、阿奇霉素、链霉素、庆大霉素、妥布霉素、丁胺卡那霉素、新霉素、大观霉素、氧氟沙星、环丙沙星、四环素、多西霉素、氯霉素、万古霉素、利福平、复方新诺明、甲氧苄啶、恩诺沙星、新生霉素、头孢吡肟、多黏菌素 B、卡那霉素和克林霉素等 30 种药物呈高度敏感或敏感(抑菌圈直径为 16—40mm); 对诺氟沙星低度敏感(抑菌圈直径为 10mm); 对苯唑青霉素、头孢他啶、氨曲南、呋喃妥因、呋喃唑酮、杆菌肽等 6 种耐药(无抑菌圈形成)。

3 讨论

在《Bergey's Manual of Determinative Bacteriology》第九版(1994)中, 微杆菌属内记载了树状微杆菌(*M. arborescens*)、蛾微杆菌(*M. imperiale*)、乳微杆菌(*M. lacticum*)及产左聚糖微杆菌(*M. laevaniformans*)4 个已明确的种。本次从

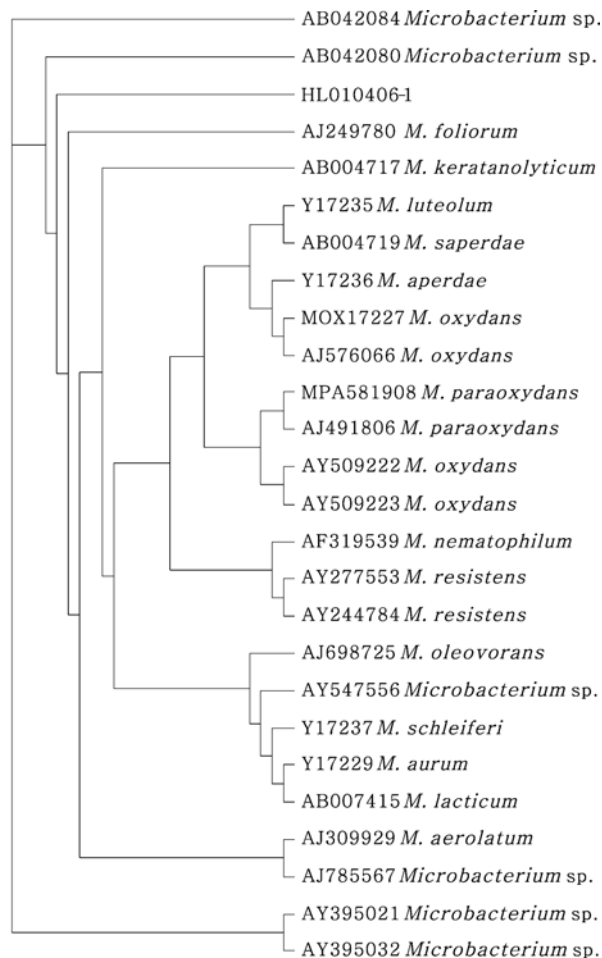


图 1 16S rRNA 基因序列分析聚类图

Fig. 1 Dendrogram of 16S rRNA gene sequences analysis
注: 图中 AB042084—AY395032 为菌株在 NCBI 的登录号

死亡虾苗中分离的细菌, 经主要生物学性状鉴定, 符合微杆菌属的定义, 但其所表现的一些理化特性与现已明确记述的微杆菌种存在较明显的差异, 系统发育分析亦表现在微杆菌属细菌发育树中独立分支, 因此, 初步判定为微杆菌属细菌的一个新种; 又经 CCTCC 予以复核鉴定, 并结合对虾感染试验所表现出的致病作用, 将其暂定名为杀虾微杆菌, 参考菌株为 HL010406-1。

我国曾有报道从变质的消毒奶中分离到乳微杆菌, 并证明其可引起牛奶变质(李海滨等, 1998); 王亚南等(2004)报道, 从福建、山东某海水养虾场底泥样品中检出微杆菌属细菌, 表明该类群细菌能在养虾池底泥中分布。本文作者从死亡虾苗中分离鉴定并暂定名的杀虾微杆菌, 通过在死亡虾苗组织中发现及分离到的纯一性、经人工感染试验表现出对虾的致病性等方面分析, 认为该菌对虾是具有病原学意义的; 尽管引起虾苗死亡的原因较多(如由病原微生物引起的传染性

病害或由某些理化因素引起的非传染性死亡等), 但该菌也可能是构成本次所检虾苗死亡的主要原因之一。另一方面, 经以牙鲆为海水养殖的代表鱼类做感染试验, 结果对供试牙鲆亦能引起发病死亡, 这一结果提示对牙鲆亦可能具有致病作用, 认为应在海水养殖鱼、虾中对该菌予以注意。至于其确切的病原学意义, 尚待对本次分离菌株及更多分离菌株的进一步研究阐明。

该菌纯培养物的革兰氏染色反应常呈不均一性, 常表现为有的菌体阳性、有的阴性、有的介于之间, 经几次核对的结果一致, 看来与菌龄、染色方法等无关, 可能是该菌所表现的特性; 又经用碱溶液(3% NaOH 或 KOH)区分法予以核对, 表现为革兰氏染色阳性菌(不形成黏丝)。据此, 初步认为在对该菌进行革兰氏染色检查时, 需对此现象予以注意。在死亡虾苗、人工感染试验死亡虾及牙鲆组织中, 均呈革兰氏染色阳性反应。

通过用普通营养琼脂等 12 种不同培养基做划线接种后 28 培养观察, 发现该菌在供试的普通营养琼脂、血液(家兔血或绵羊血)营养琼脂、TSA、FA、2216E 培养基上生长较好, 菌落特征易观察描述; 在 TCBS、庆大霉素琼脂、XLD、RS、伊红美蓝琼脂、麦康凯琼脂、SS 琼脂等 7 种培养基上, 培养 48h 检查仍无生长。因此认为对该菌进行分离鉴定时, 可根据其在这些培养基上的生长情况予以选择使用。

经以 37 种抗菌类药物对 3 株杀虾微杆菌的药敏测定, 尚未发现不同菌株间对某种抗菌药物敏感或耐药的明显差异, 这一结果有益于在选择用药防治时的参考。

参 考 文 献

- 王立平, 张晓华, 刘 镁等, 1997. 中国对虾糠虾幼体病原菌(非 O1 群霍乱弧菌)的研究. 中国水产科学, 4(1): 45—50
- 王亚南, 彭志英, 2004. 海水养虾场底泥中产 H₂S 的细菌的特性. 华南理工大学学报(自然科学版), 32(8): 89—92
- 东秀珠, 蔡妙英, 2001. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 353—398
- 叶应妩, 王毓三, 1997. 全国临床检验操作规程(第二版). 南京: 东南大学出版社, 556—562
- 刘 荭, 王 侃, 彭锦新等, 1999. 斑节对虾“红体病”细菌性病原的初步研究. 水产科技情报, 26(1): 7—15
- 李海滨, 李一经, 梁永冰等, 1998. 消毒奶中耐热菌——乳微杆菌的分离与鉴定. 中国乳品工业, 26(2): 21—

- 22
周永灿, 张 本, 陈雪芳等, 2003. 养殖对虾细菌性红体病的初步研究. 海洋科学, 27(5): 61—65
- 郑国兴, 沈亚林, 李 何等, 1990. 中国对虾病原菌(鳃弧菌)的研究. 水产学报, 14(1): 1—6
- 战文斌, 周 丽, 俞开康等, 1997a. 一株新的中国对虾弧菌病原菌——产气弧菌. 海洋与湖沼, 28(1): 21—26
- 战文斌, 周 丽, 陈章群等, 1997b. 一株新的对虾弧菌病原菌——雷氏普罗威登斯菌. 中国水产科学, 28(1): 21—26
- 陶保华, 胡超群, 吴 蔚, 2001. 斑节对虾弧菌病的病原生物学研究. 热带海洋学报, 20(2): 80—87
- Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A *et al*, 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition. Baltimore, Williams and Wilkins, 579, 595
- Martin F Polz, Collen M Cavanaugh, 1998. Bias in template to product ratios in multitemplate PCR. Appl Environ Microbiol, 64(10): 3724—3730
- Sneath P H A, Mair N S, Sharpe M E *et al*, 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 2. London: Williams and Wilkins, Baltimore, 1320—1322

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *MICROBACTERIUM SHRIMPCIDA* SP. NOV.

FANG Hai, CHEN Cui-Zhen, ZHANG Xiao-Jun, HE Zhen-Ping, GE Mu-Xiang

(Department of Animal Science, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao, 066004)

Abstract Acute high-level mortalities of zoea of *Penaeus japonicus* occurred in one aquaculture hatchery of Hebei of China in April 2001. The suffered shrimp showed loss of feeding, listless behaviour, impaired swimming, floating up to the water surface, with sudden death boost.

For understanding the death-causative disease, bacteria were isolated and characterized from dead larvae. Representative strains (HL010406-1 to HL010406-6) were selected for molecular identification by partial 16S rRNA gene sequencing and a molecular phylogenetic tree was constructed.

Six strains (HL010406-1 to HL010406-6) were identified in morphology, physiology and biochemistry. The strains were examined and found quite similar in morphology, being Gram-positive (some strains were between Gram-positive and Gram-negative), rod-shaped (some were short rod-shaped or spherical), single or paired with round ends, no endospores, and $(0.2—0.4) \mu\text{m} \times (0.3—1.4) \mu\text{m}$ in size. Some flagella were revealed on electronic micrographs for negatively stained strains. The mol% G+C of the DNA was 64.5. The sequenced 16S rRNA gene of strain HL010406-1 (GenBank accession No. DQ377339) is 1381bp in length. They shared high similarity at 95%—98% to that of *Microbacterium*. The results showed that the isolates is a new species of *Microbacterium*; the selected representative strain (HL010406-1) has been re-checked by China Center for Type Culture Collection (CCTCC), and designated it as *Microbacterium shrimpcida* sp. nov. The isolates were probably the pathogenic bacteria of acute larvae death shown in pathogenicity of representative strain (HL010406-1) by artificial infection experiment to healthy shrimp and flounder.

Key words *Penaeus japonicus*, Shrimp larvae, *Microbacterium shrimpcida* sp. nov., Examination