|  |  |
| --- | --- |
| ICS  |   |
| CCS  | 点击此处添加CCS号 |

|  |
| --- |
|  21 |

辽宁省地方标准

DB 21/T XXXX—2024

海胆主要疾病诊断与防治技术规程

Technical Regulations for Diagnosis and Prevention of Major Diseases of Sea Urchins

2024 - XX - XX发布

2024 - XX - XX实施

辽宁省市场监督管理局  发布

1. 前言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由辽宁省农业农村厅提出并归口。

本文件起草单位：。

本文件主要起草人：。

本文件发布实施后，任何单位和个人如有问题和意见建议，均可以通过来电和来函等方式进行反馈，我们将及时答复并认真处理，根据实际情况依法进行评估及复审。

归口单位通讯地址：辽宁省农业农村厅（沈阳市和平区太原北街2号综合楼A座），联系电话：024-23447862。

文件起草单位通讯地址：大连海洋大学（辽宁省大连市黑石礁街52号），联系电话：0411-84763800。

海胆主要疾病诊断与防治技术规程

* 1. 范围

本文件规定了中间球海胆红斑病和黑嘴病的临床症状、病原鉴定方法与结果判定和防治技术规程。

本文件适用于由溶珊瑚弧菌（*Vibrio coralliilyticus*）、锡那罗州弧菌（*Vibrio sinaloensis*）、灿烂弧菌（*Vibrio splendidus*）、棘皮动物弧菌（*Vibrio echinoideorum*）、嗜环弧菌（*Vibrio cyclitrophicus*）感染导致的中间球海胆（*Strongylocentrotus intermedius*）红斑病和黑嘴病的诊断和防治。

* 1. 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 11607 渔业水质标准

SC/T 7103 水生动物产地检疫采样技术规范

GB/T 4789.28 食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求

GB/T 4789.4 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验

GB/T 4789.5 食品安全国家标准 食品微生物学检验 志贺氏菌检验

DB50/T 1606 水生动物细菌性病原鉴定技术规范

SC 1059 渔用含氯消毒剂

DB21/T 1859 农产品质量安全 光棘球海胆增养殖技术规范

NY 5071 无公害食品 渔用药物使用准则

SC/T 1132 鱼药使用规范

中华人民共和国农业农村部第250号公告

中华人民共和国农业农村部第2292号公告

中华人民共和国农业农村部第2583号公告

中华人民共和国农业农村部第2638号公告

* 1. 诊断

3.1 现场调查

水质情况包括水源、水色、水温、透明度、pH、亚硝酸盐、氨氮、溶解氧、硬度等；养殖情况包括养殖密度、苗种来源、饵料来源等。

3.2 临床诊断

3.2.1 海胆红斑病

患红斑病海胆表现为体表出现大小不等的暗红色粘性斑块，严重者斑块处破溃，体腔内液从破口流出。

3.2.2 海胆黑嘴病

患黑嘴病海胆表现为摄食能力下降，附着能力减弱，棘刺脱落，围口膜颜色发黑。

3.3 病原检测

3.3.1 试剂材料

检验中所需试剂、染色剂、培养基的配制按照GB/T 4789.28、GB/T 4789.4和GB/T 4789.5规定执行，双蒸水、10×PCR缓冲液、dNTP、Taq DNA聚合酶、琼脂糖、核酸染料、DNA分子量标准参照物与核酸提取试剂盒选用专业试剂公司提供的商品化试剂，上述未提及的见附录A。

3.3.2 仪器设备

超净工作台、生物安全柜、医用冰箱、高速离心机（100rpm～20000rpm）、高压灭菌锅、PCR仪、电泳仪、凝胶成像仪、生化培养箱、移液器等。

3.3.3 采样

按照严格要求进行现场采样，样品采集符合 SC/T 7103要求。

3.3.4 细菌分离与纯化

在超净工作台或生物安全柜中，用灭菌接种环蘸取海胆病灶部位（红斑病病灶多位于体表，黑嘴病病灶多位于围口膜），常规划线接种至2216E培养基。将划线好的平板倒置在培养箱中，20℃±2℃培养24h～48h。观察菌落生长情况，从中挑取优势单菌落，在超净工作台或生物安全柜中用无菌接种环挑取单菌落于2216E培养基中，放置在培养箱中培养24h～48h。观察菌液状态，若浑浊，则于4℃保存待检。

3.3.5 细菌理化指标测定

3.3.5.1 革兰氏染色

按GB/T 4789.28的规定执行。

3.3.5.2 生理生化试验

3.3.5.2.1 赖氨酸脱羧酶试验

按GB4789.5中的规定执行。

3.3.5.2.2 鸟氨酸脱羧酶试验

按GB4789.5中的规定执行。

3.3.5.2.3 精氨酸脱羧酶实验

按GB4789.28中的规定执行。

3.3.5.2.4 蔗糖水解试验

按GB 4789.28中的规定执行。

3.3.5.2.5 蛋白胨水试验

按GB 4789.4中的规定执行。

3.3.5.2.6 甘露醇利用试验

按GB4789.28中的规定执行。

3.3.6 细菌分子生物学鉴定

3.3.6.1 细菌DNA抽提

取2mL待检菌培养液，12000r/min离心1min，收集菌体。菌体悬浮于500μL TE缓冲液（pH8.0），震荡悬浮，加入50μL 10%的SDS溶液，10μL 20mg/mL的蛋白酶K，混匀，37℃温育1h。加入100μL 5mol/L的NaCl溶液，充分混匀，再加入100μL CTAB/NaCl溶液混匀，65℃温育20min。加入等体积的酚:氯仿:异戊醇（25:24:1），混匀，12000r/min离心5min。取上清液加入等体积的氯仿:异戊醇（24:1），混匀，12000 r/min离心5min。取上清液，加入1倍体积异丙醇，颠倒混合，室温下静置10min，10000 r/min离心10min；沉淀用70%酒精洗涤2次，室温晾干。加入50mL的TE缓冲液溶解，-20℃贮存，备用。

3.3.6.2 PCR检测

3.3.6.2.1 16S rRNA引物

上游引物：27F: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 下游引物：1492R: GGTTACCTTGTTACGACTT

3.3.6.2.2 反应体系

**表1 PCR反应体系**

|  |  |
| --- | --- |
| 反应成分 | 体积（µL） |
| 10×PCR缓冲液 | 5.0 |
| dNTP | 4.0 |
| Taq DNA聚合酶 | 1.0 |
| 50mM MgSO4 | 2.5 |
| 上游引物 | 1.0 |
| 下游引物 | 1.0 |
| 模板 | 1.0 |
| 双蒸水 | 9.5 |
| 总体积 | 25.0 |

3.3.6.2.3 反应条件

95℃预变性5min，95℃ 30s；57℃ 30s；72℃ 90s；扩增30个循环；72℃ 10min，最后4℃保温。

3.3.6.3 琼脂糖凝胶电泳

用1×TAE电泳缓冲液配置1.5%的琼脂糖凝胶。将5μL样品和1μL 6×上样缓冲液混匀后加入样品孔，在电泳时设立核酸标准分子量作对照。5V/em电泳约0.5h，当溴酚蓝快到达琼脂糖凝胶底部时，停止电泳。将琼脂糖凝胶浸入核酸染料中进行泡染15min，于TAE缓冲液中脱色15min，将凝胶置于凝胶成像仪上观察。

结果判定：阳性对照16S rDNA的扩增产物在1500bp处出现特异性条带，DNA分子量标准条清楚，阴性对照和空白对照无特异性条带，待测样品出现1500bp的特异性核酸条带，则可进行基因测序，否则无效。

3.3.6.4 基因测序

将PCR扩增产物进行序列测定，并与参考序列（附录B）进行比对分析。

3.3.7 结果判定

3.3.7.1 菌落形态

溶珊瑚弧菌在20℃培养24h～48h，形成表面光滑、隆起、边缘规则、不透明、圆形的乳白色菌落。

锡那罗州弧菌在20℃培养24h～48h，形成表面光滑、微隆起、边缘不整齐、不透明、圆形的乳白色菌落。

灿烂弧菌在20℃培养24h～48h，形成表面光滑、微隆起、半透明、杆状的乳白色菌落。

棘皮动物弧菌在20℃培养24h～48h，形成表面光滑、微隆起、不透明、短杆形的乳白色菌落。

嗜环弧菌在20℃培养24h～48h，形成表面光滑、隆起、边缘不整齐、不透明、短杆形的乳白色菌落。

3.3.7.2 细菌染色

溶珊瑚弧菌菌株经革兰氏染色为阴性，呈球形。

锡那罗州弧菌菌株经革兰氏染色为阴性，呈球形。

灿烂弧菌菌株经革兰氏染色为阴性，呈杆形。

棘皮动物弧菌菌株经革兰氏染色为阴性，呈短杆形。

嗜环弧菌菌株经革兰氏染色为阴性，呈短杆形。

3.3.7.3 生理生化特性

生理生化反应试验结果见表2。

**表2 中间球海胆主要致病菌的生理生化反应结果**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 反应项目 | 溶珊瑚弧菌 | 锡那罗州弧菌 | 灿烂弧菌 | 棘皮动物弧菌 | 嗜环弧菌 |
| 赖氨酸 | + | + | **-** | - | + |
| 精氨酸 | + | + | - | - | - |
| 鸟氨酸 | + | + | - | - | - |
| 水杨素 | - | + | **-** | - | - |
| 蔗糖 | + | + | **-** | + | + |
| 甘露醇 | + | - | - | - | - |
| 注：“+”为阳性，“-”为阴性。 |

3.3.7.4 16S rRNA 序列测定与同源性分析

测定的溶珊瑚弧菌、锡那罗州弧菌、灿烂弧菌、棘皮动物弧菌和嗜环弧菌DNA序列与附录所列的基因序列分别进行对比，同源性均达99%以上。

3.8 综合判定

3.8.1 符合以下所有特征者判定为海胆红斑病

临床症状与3.2.1相符；

菌落形态和染色观察与3.3.7.1和3.3.7.2相符；

生理生化反应结果与3.3.7.3（表2）相符；

16S rRNA 基因序列同源性分析结果与 3.3.7.4相符。

3.8.2 符合以下所有特征者判定为海胆黑嘴病

临床症状与3.2.2相符；

菌落形态和染色观察与3.3.7.1和3.3.7.2相符；

生理生化反应结果与3.3.7.3（表2）相符；

16S rRNA 基因序列同源性分析结果与 3.3.7.4相符。

4. 综合防治

4.1 预防

4.1.1 消毒

使用含氯消毒剂彻底清洁养殖场地、养殖设施及养殖器具，含氯消毒剂使用应符合SC 1059要求。

4.1.2 苗种选择

苗种应来自无疫区，生产单位为具有苗种生产资质，经水产苗种产地检疫合格，每批具有第三方检测单位出具的检测报告，苗种质量应符合DB21/T 1859要求。

4.1.3 养殖管理

4.1.3.1 水质

水源应符合GB 11607渔业水质标准。海域无污染，无大量淡水注入，水流通畅，透明度3 m以上，冬季不结冰；且应满足其他条件：

——大潮期低潮时水深≥8 m；

——盐度26～34；

——pH 7.5～8.5 ；

——溶解氧 ≥5 mg/L。

——海水流速10 cm/s～45 cm/s。

——水温2 ℃～26 ℃。

1. 每隔 10 d～15 d，使用生物型底质改良剂和水质改良剂各1次。

4.1.3.2 养殖水层

春秋季养殖笼（箱）最上层离水面2m～4m，高温季节及冬季应降低水层，养殖笼（箱）最上层离水面≥6米。随着海胆的生长，应及时增补浮漂，根据个体的大小及时调整养殖箱笼网衣的网目。大风浪来临前，及时采取避浪措施，宜将筏架进行整体适度下沉。

4.1.3.3养殖密度

养殖密度应根据海胆壳径大小决定，10mm～15mm海胆600个/m2～800个/m2、15mm～20mm海胆400个/m2～600个/m2、30mm～40mm海胆250个/m2～300个/m2。

4.1.3.4 饵料投喂

种类以海带、裙带菜、石莼、马尾藻等大型海藻为主；每次投喂量为4000g/m2～6000g/m2，4d～6d投喂一次，根据季节不同做适当调整。

4.2 治疗

药物选择和治疗应符合NY 5071、SC/T 1132和中华人民共和国农业农村部第250号公告、第2292号公告、第2583号公告、第2638号公告。

a）外用药物治疗：使用1g/m3～2g/m3次氯酸钠溶液（有效氯10%）溶于水后，滤去残渣后全池泼洒1次～2次，每天一次，连续泼洒2d～3d。或使用0.45mL/m3～0.75mL/m3的聚维酮碘溶液（10%）全池泼洒，每天一次，连续泼洒2d～3d。

b）抗生素治疗：使用氯霉素类、四环素类等敏感性高的广谱抗生素进行治疗。治疗时需进行药敏试验，选择对病原菌敏感的抗生素，并注意轮换用药以防止耐药性的产生。

附 录 A

（规范性附录）

试剂配方

A.1 2216E 液体培养基

蛋白胨 5.0g

酵母粉 1.0g

柠檬酸铁 0.1g

氨化钠 19.45g

氨化镁 5.98g

硫酸钠 3.24g

氨化钙 1.8g

氯化钾 0.55g

碳酸钠 0.16g

溴化钾 0.08g

氨化锶 0.034g

硼酸 0.022g

硅酸钠 0.004g

氟化钠 0.0024g

硝酸铵 0.0016g

磷酸氢二钠 0.008g

琼脂 15.0g

pH 7.6±0.2 25℃

A.2 TE缓冲液（pH8.0）

将0.121g Tris碱（分子量121.1），0.0372g乙二胺四乙酸二钠（分子量372.24）加入80mL双蒸水中，加浓盐酸调节pH至8.0，加双蒸水定容至100mL，室温保存。

A.3 10%SDS溶液

将10g十二烷基硫酸钠加入80mL双蒸水中，加热至68℃助溶，再加入双蒸水定容至100mL，室温保存。

A.4 蛋白酶K（20mg/mL）

将蛋白酶K溶解于双蒸水中，至终浓度20mg/mL，分装入小管，置-20℃保存。

A.5 75mol/L的NaCl溶液

将29.22g NaCl溶解于80mL双蒸水中，再加双蒸水定容至100mL，室温保存。

A.6 CTAB/NaCI溶液

4.1g NaCl溶解于80mL双蒸水中，缓慢加入10g CTAB，再加双蒸水定容至100mL，室温保存。

A.7 酚:氯仿:异戊醇（25:24:1）

将25体积的酚、24体积的氯仿和1体积的异戊醇混合即可，室温贮存于不透光的瓶中，上面加上TE缓冲液，4℃保存。

A.8 氯仿:异戊醇（24:1）

将24体积的氯仿和1体积的异戊醇混合即可，室温贮存于不透光的瓶中。

A.9 50×TAE电泳缓冲液

在400mL双蒸水中溶解121g Tris碱，加入28.55mL冰乙酸和50mL 0.5/L EDTA。再加双蒸水定容至500mL，室温保存。使用时，配成1xTAE电泳缓冲液。

A.10 1×TAE电泳缓冲液

加入50×TAE电泳缓冲液20mL并加水定容至1000mL，配置成工作液，室温保存。

A.10 溴酚蓝指示剂溶液6×上样缓冲液

将溴酚蓝100mg，加双蒸水5mL，在室温下过夜。待溶解后再称取蔗糖25g，加双蒸水溶解后移入溴酚蓝溶液中，摇匀后定容至50mL，加入NaOH溶液1滴，调至蓝色。

 **附录B**

**（资料性附录）**

**溶珊瑚弧菌16S rRNA基因参考性序列（1471bp）**

1 attgaacgct ggcggcaggc ctaacacatg caagtcgagc ggaaacgagt tatctgaacc

61 ttcggggaac gataacggcg tcgagcggcg gacgggtgag taatgcctgg gaaattgccc

121 tgatgtgggg gataaccatt ggaaacgatg gctaataccg cataatagct tcggctcaaa

181 gagggggacc ttcgggcctc tcgcgtcagg atatgcccag gtgggattag ctagttggtg

241 aggtaatggc tcaccaaggc gacgatccct agctggtctg agaggatgat cagccacact

301 ggaactgaga cacggtccag actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tgcacaatgg

361 gcgcaagcct gatgcagcca tgccgcgtgt atgaagaagg ccttcgggtt gtaaagtact

421 ttcagcagtg aggaaggtgg atgtgttaat agcgcattca tttgacgtta gctgcagaag

481 aagcaccggc taactccgtg ccagcagccg cggtaatacg gagggtgcga gcgttaatcg

541 gaattactgg gcgtaaagcg catgcaggtg gtttgttaag tcagatgtga aagcccgggg

601 ctcaacctcg gaattgcatt tggaactggc agactagagt actgtagagg ggggtagaat

661 ttcaggtgta gcggtgaaat gcgtagagat ctgaaggaat accggtggcg aaggcggccc

721 cctggacaga tactgacact cagatgcgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc

781 tggtagtcca cgccgtaaac gatgtctact tggaggtagt ggccgtgagc cgtggctttc

841 ggagctaacg cgttaagtag accgcctggg gagtacggtc gcaagattaa aactcaaatg

901 aattgacggg ggcccgcaca agcggtggag catgtggttt aattcgatgc aacgcgaaga

961 accttaccta ctcttgacat cctcagaaga gactggagac agtcttgtgc cttcgggaac

1021 tgagagacag gtgctgcatg gctgtcgtca gctcgtgttg tgaaatgttg ggttaagtcc

1081 cgcaacgagc gcaaccctta tccttgtttg ccagcgagtc atgtcgggaa ctccagggag

1141 actgccggtg ataaaccgga ggaaggtggg gacgacgtca agtcatcatg gcccttacga

1201 gtagggctac acacgtgcta caatggcgca tacagagggc ggccaacttg cgaaagtgag

1261 cgaatcccaa aaagtgcgtc gtagtccgga ttggagtctg caactcgact ccatgaagtc

1321 ggaatcgcta gtaatcgtag atcagaatgc tacggtgaat acgttcccgg gccttgtaca

1381 caccgcccgt cacaccatgg gagtgggctg caaaagaagt gggtagttta accttcgggg

1441 ggacgctcac cactttgtgg ttcatgactg g

**锡那罗州弧菌16S rRNA基因参考性序列（1206bp）**

1 ctacacatgc aagtcgagcg gaaacgagtt aactgaacct tcgggggacg ttaacggcgt

61 cgagcggcgg acgggtgagt aatgcctggg aaattgccct gatgtggggg ataaccattg

121 gaaacgatgg ctaataccgc ataatagctt cggctcaaag agggggacct tcgggcctct

181 cgcgtcagga tatgcccagg tgggattagc tagttggtga ggtaatggct caccaaggcg

241 acgatcccta gctggtctga gaggatgatc agccacactg gaactgagac acggtccaga

301 ctcctacggg aggcagcagt ggggaatatt gcacaatggg cgcaagcctg atgcagccat

361 gccgcgtgta tgaagaaggc cttcgggttg taaagtactt tcagcagtga ggaaggtgga

421 gtcgttaata gcggcctcat ttgacgttag ctgcagaaga agcaccggct aactccgtgc

481 cagcagccgc ggtaatacgg agggtgcgag cgttaatcgg aattactggg cgtaaagcgc

541 atgcaggtgg tttgttaagt cagatgtgaa agcccggggc tcaacctcgg aattgcattt

601 gaaactggca aactagagta ctgtagaggg gggtagaatt tcaggtgtag cggtgaaatg

661 cgtagagatc tgaaggaata ccggtggcga aggcggcccc ctggacagat actgacactc

721 agatgcgaaa gcgtggggag caaacaggat tagataccct ggtagtccac gccgtaaacg

781 atgtctactt ggaggttgtg gccttgagcc gtggctttcg gagctaacgc gttaagtaga

841 ccgcctgggg agtacggtcg caagattaaa actcaaatga attgacgggg gcccgcacaa

901 gcggtggagc atgtggttta attcgatgca acgcgaagaa ccttacctac tcttgacatc

961 cagagaatcc tacggagacg tgggagtgcc ttcgggaact ctgaaacagg tgctgcatgg

1021 ctgtcgtcag ctcgtgttgt gaaatggtgg gttaagtccc gcaacgagcg caacccttat

1081 ccttgtttgc cacncttcgg gtgggactcc agggagactg ccggtganaa ccggaagaaa

1141 gtggggacga cttcagtcat catggccctt acaaataggg ctaccncggg ctacatgggc

1201 caacaa

**灿烂弧菌16S rRNA基因参考性序列（1437bp）**

1 ggctaccatg caagtcgagc ggaaacgaca ctaacaatcc ttcgggtgcg ttaatgggcg

61 tcgagcggcg gacgggtgag taatgcctag gaaattgcct tgatgtgggg gataaccatt

121 ggaaacgatg gctaataccg cataatgcct acgggccaaa gagggggatc ttcggacctc

181 tcgcgtcaag atatgcctag gtgggattag ctagttggtg aggtaatggc tcaccaaggc

241 gacgatccct agctggtctg agaggatgat cagccacact ggaactgaga cacggtccag

301 actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tgcacaatgg gcgaaagcct gatgcagcca

361 tgccgcgtgt atgaagaagg ccttcgggtt gtaaagtact ttcagttgtg aggaaggggg

421 taacgttaat agcgttatct cttgacgtta gcaacagaag aagcaccggc taactccgtg

481 ccagcagccg cggtaatacg gagggtgcga gcgttaatcg gaattactgg gcgtaaagcg

541 catgcaggtg gttcattaag tcagatgtga aagcccgggg ctcaacctcg gaactgcatt

601 tgaaactggt gaactagagt gctgtagagg ggggtagaat ttcaggtgta gcggtgaaat

661 gcgtagagat ctgaaggaat accagtggcg aaggcggccc cctggacaga cactgacact

721 cagatgcgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc tggtagtcca cgccgtaaac

781 gatgtctact tggaggttgt ggccttgagc cgtggctttc ggagctaacg cgttaagtag

841 accgcctggg gagtacggtc gcaagattaa aactcaaatg aattgacggg ggcccgcaca

901 agcggtggag catgtggttt aattcgatgc aacgcgaaga accttaccta ctcttgacat

961 ccagagaagc cagcggagac gcaggtgtgc cttcgggagc tctgagacag gtgctgcatg

1021 gctgtcgtca gctcgtgttg tgaaatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaaccctta

1081 tccttgtttg ccagcgagtc atgtcgggaa ctccagggag actgccggtg ataaaccgga

1141 ggaaggtggg gacgacgtca agtcatcatg gcccttacga gtagggctac acacgtgcta

1201 caatggcgca tacagagggc agcaagctag cgatagtgag cgaatcccaa aaagtgcgtc

1261 gtagtccgga ttggagtctg caactcgact ccatgaagtc ggaatcgcta gtaatcgtga

1321 atcagaatgt cacggtgaat acgttcccgg gccttgtaca caccgcccgt cacaccatgg

1381 gagtgggctg caaaagaagt gggtagttta acctttcggg gaggacgctc accactt

**棘皮动物弧菌16S rRNA基因参考性序列（1337bp）**

1 gttgggcgtc gagcggcgga cgggtgagta atgcctagga aattgccttg atgtggggga

61 taaccattgg aaacgatggc taataccgca taatgcctac gggccaaaga gggggatctt

121 cggacctctc gcgtcaagat atgcctaggt gggattagct agttggtgag gtaatggctc

181 accaaggcga cgatccctag ctggtctgag aggatgatca gccacactgg aactgagaca

241 cggtccagac tcctacggga ggcagcagtg gggaatattg cacaatgggc gaaagcctga

301 tgcagccatg ccgcgtgtat gaagaaggcc ttcgggttgt aaagtacttt cagttgtgag

361 gaagggggtg tagttaatag ctgtatctct tgacgttagc aacagaagaa gcaccggcta

421 actccgtgcc agcagccgcg gtaatacgga gggtgcgagc gttaatcgga attactgggc

481 gtaaagcgca tgcaggtggt tcattaagtc agatgtgaaa gcccggggct caacctcgga

541 actgcatttg aaactggtga actagagtgc tgtagagggg ggtagaattt caggtgtagc

601 ggtgaaatgc gtagagatct gaaggaatac cagtggcgaa ggcggccccc tggacagaca

661 ctgacactca gatgcgaaag cgtggggagc aaacaggatt agataccctg gtagtccacg

721 ccgtaaacga tgtctacttg gaggttgtgg ccttgagccg tggctttcgg agctaacgcg

781 ttaagtagac cgcctgggga gtacggtcgc aagattaaaa ctcaaatgaa ttgacggggg

841 cccgcacaag cggtggagca tgtggtttaa ttcgatgcaa cgcgaagaac cttacctact

901 cttgacatcc agagaagcca gcggagacgc aggtgtgcct tcgggaactc tgagacaggt

961 gctgcatggc tgtcgtcagc tcgtgttgtg aaatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc

1021 aacccttatc cttgtttgcc agcgagtaat gtcgggaact ccagggagac tgccggtgat

1081 aaaccggagg aaggtgggga cgacgtcaag tcatcatggc ccttacgagt agggctacac

1141 acgtgctaca atggcgcata cagagggcag caagctagcg atagtgagcg aatcccaaaa

1201 agtgcgtcgt agtccggatt ggagtctgca actcgactcc atgaagtcgg aatcgctagt

1261 aatcgtgaat cagaatgtca cggtgaatac gttcccgggc cttgtacaca ccgcccgtca

1321 caccatggga gtgggct

**嗜环弧菌16S rRNA基因参考性序列（1206bp）**

1 gtcgagcgga aacgacacta acaatccttc gggtgcgtta atgggcgtcg agcggcggac

61 gggtgagtaa tgcctaggaa attgccttga tgtgggggat aaccattgga aacgatggct

121 aataccgcat gatgcctacg ggccaaagag ggggaccttc gggcctctcg cgtcaagata

181 tgcctaggtg ggattagcta gttggtgagg taatggctca ccaaggcgac gatccctagc

241 tggtctgaga ggatgatcag ccacactgga actgagacac ggtccagact cctacgggag

301 gcagcagtgg ggaatattgc acaatgggcg aaagcctgat gcagccatgc cgcgtgtatg

361 aagaaggcct tcgggttgta aagtactttc agttgtgagg aagggtgtgt agttaatagc

421 tgcgcatctt gacgttagca acagaagaag caccggctaa ctccgtgcca gcagccgcgg

481 taatacggag ggtgcgagcg ttaatcggaa ttactgggcg taaagcgcat gcaggtggtt

541 cattaagtca gatgtgaaag cccggggctc aacctcggaa ctgcatttga aactggtgaa

601 ctagagtgct gtagaggggg gtagaatttc aggtgtagcg gtgaaatgcg tagagatctg

661 aaggaatacc agtggcgaag gcggccccct ggacagacac tgacactcag atgcgaaagc

721 gtggggagca aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gtctacttgg

781 aggttgtggc cttgagccgt ggctttcgga gctaacgcgt taagtagacc gcctggggag

841 tacggtcgca agattaaaac tcaaatgaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat

901 gtggtttaat tcgatgcaac gcgaagaacc ttacctactc ttgacatcca gagaagccag

961 cggagacgca ggtgtgcctt cgggagctct gagacaggtg ctgcatggct gtcgtcagct

1021 cgtgttgtga aatgttgggt taagtcccgc aacgagcgca acccttatcc ttgtttgcca

1081 gcgagtcatg tcgggaactc cagggagact gccggtgata aaccggagga aggtggggac

1141 gacgtcaagt catcatggcc cttacgagta gggctacaca cgtgctacaa tggcgcatac

1201 agagggcagc aagctagcga tagtgagcga atcccaaaaa gtgcgtcgta gtccggattg

1261 gagtctgcaa ctcgactcca tgaagtcgga atcgctagta atcgtgaatc agaatgtcac

1321 ggtgaatacg ttcccgggcc ttgtacacac cgcccgtcac accatgggag tgggctgcaa

1381 aagaagtggg tagtttacct ttcggggagg acgctcac