

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
54 (11):1378–1384; 4 November 2014  
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.11.016

## 鱼源溶藻弧菌生物学特性和病理组织学观察

赖迎迢, 陶家发, 孙承文, 石存斌, 吴淑勤\*

中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业部渔用药物创制重点实验室, 广东省水产动物免疫技术重点实验室,  
广东 广州 510380

**摘要:** 【目的】溃烂病是我国海水养殖及南方养殖斜带石斑鱼的常见严重病害之一。通过对患病的斜带石斑鱼病原菌的分离与鉴定, 为检测其耐药性和控制石斑鱼在海水养殖中溃烂病的爆发和流行奠定基础。本文目的是研究斜带石斑鱼相关的病原菌的特性。【方法】从患病斜带石斑鱼肾脏、肝脏病灶组织, 分离纯化得到病原菌, 进行纯化培养、人工感染和回归感染、ATB 细菌自动鉴定及药敏试验, 并进行菌体常规形态特征、培养特性和生理生化反应指标测定。【结果】确定为溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)。两株典型菌株经人工感染和回归感染均显示自然发病症状。药敏试验表明, 该菌具有较强的耐药性, 在所检测的抗菌药物中, 对青霉素等 3 类抗菌药物高度耐药, 而对氯霉素等 5 类抗菌药物敏感。器官主要组织病理学变化为: 肝细胞、肾小管细胞等变性、坏死, 病变组织有炎性细胞浸润且呈变质性炎症。溶藻弧菌对机体的主要器官造成严重病理损伤。【结论】生理生化等结果均证实分离菌株是溶藻弧菌, 而且产生多重耐药情况较为普遍, 未来应加强对养殖海水中病原耐药性和斜带石斑鱼病原感染的监测。

**关键词:** 斜带石斑鱼, 溶藻弧菌, 弧菌, 鉴定

**中图分类号:** Q939      **文章编号:** 0001-6209 (2014) 11-1378-07

近年来, 随着斜带石斑鱼 (*E. coioides*) 人工繁殖技术的突破, 养殖规模不断扩大。斜带石斑鱼俗称青斑, 属鲷科 (*Serranidae*)、石斑鱼亚科 (*Epinephelinae*)、石斑鱼属 (*Epinephelus*), 肉质鲜美, 营养丰富, 经济价值较高, 为海水名贵食用鱼类, 在广东、海南、福建等省份广泛养殖。弧菌病是危害海水养殖鱼类最严重的细菌性病原之一, 可以感染多种鱼类并引起大量死亡<sup>[1]</sup>。近几年, 人工养殖的斜带石斑鱼常发生溃疡病, 发病的鱼大量死亡, 使养殖者蒙受了极大的经济损失。病鱼体色变深, 病灶周

边鳞片松散脱落, 体表出现不同程度溃疡斑, 皮下出血, 鳍基部充血, 鳍条溃烂, 肛门红肿。内脏器官病变明显, 并有出血或淤血等症状, 有的出现腹水, 表现出典型的弧菌病症状。其中, 溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*) 对石斑鱼造成的危害日益严重。至今, 国内有关患溶藻弧菌病的石斑鱼种类有点带石斑鱼 (*E. malabaricus*)、青石斑鱼<sup>[2]</sup> (*E. awoara*)、鲑点石斑鱼<sup>[2-3]</sup> (*E. fario*) 和赤点石斑鱼<sup>[4]</sup> (*E. akaara*) 等, 作者从患病的斜带石斑鱼分离纯化到的病原菌, 经菌体常规形态特征、培养特性和生理生化反应指标

**基金项目:** 广东省科技计划项目 (2012A020601006); 国家科技支撑计划项目 (2012BAD25B02)

\* 通信作者。Tel: + 86-20-81616813; Fax: + 86-20-81616162; E-mail: wushuqin001@21.cn.com

**作者简介:** 赖迎迢 (1980–), 男, 广东人, 助理研究员, 主要研究方向为水生动物病害防治。E-mail: laiyitiao@sina.com

**收稿日期:** 2013-07-22; **修回日期:** 2013-05-20

测定, 鉴定为溶藻弧菌, 并研究该菌的致病性、药物敏感性及引起的病理变化。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和仪器

琼脂平板、细菌生化微量鉴定管等购自广州环凯微生物有限公司; ATB 细菌鉴定系统及生化鉴定试剂条 ID 32E 等均为法国 Biomerieux 公司产品; 药敏实验所用的抗生素药物购自浙江杭州天和微生物试剂有限公司; 切片使用 RM-2145 型 Leica 轮转式切片机, 组织切片用 OLYMPUS 显微镜观察, 显微成像装置型号为广州市明美科技有限公司产品 MD20 型。

### 1.2 病原菌分离及纯化

患病的斜带石斑鱼来源于 2012 年广东省阳江市东平镇某石斑鱼养殖网箱。无菌条件下, 用接种环分别从体表、鳃、肝、肾等部位分离细菌, 划线接种于 TCBS 平板上分离病原菌, 28℃ 恒温培养 18–24h 后, 观察菌落及细菌形态特征, 挑取形态一致的优势菌落在 TSA 平板上再次划线分离, 纯化培养并保存于斜面培养基, 同时加保护剂后冷冻干燥保存备用。纯化后的细菌用于进行生物学性状、人工感染试验和生化及药敏实验。

### 1.3 人工感染试验

将 28℃ 培养 24 h 的分离菌株用灭菌生理盐水振荡洗下, 制成菌悬液, 参照麦氏比浊管调整细菌浓度为  $3.0 \times 10^8$  CFU/mL, 对健康的斜带石斑鱼背鳍基部肌肉注射菌液 0.2 mL, 对照组注射相同剂量的无菌生理盐水, 每天观察鱼的发病死亡情况。并对死亡鱼及时剖检和致病菌的再次分离。

### 1.4 重复分离和感染试验

将从上述人工回归感染出现有明显症状的病鱼按 1.2 的方法再次分离菌株, 纯化后菌液再次注射健康的试验鱼。

### 1.5 病原菌的鉴定

将纯化的菌划线接种于琼脂平板上, 28℃ 培养 24 h 后, 观察菌落特征。取琼脂平板上的菌株, 经革兰氏染色后光学显微镜观察细菌形态, 并进行氧化酶等试验之后, 挑取菌落在无抑制营养琼脂平板

上作划线培养分纯, 制成菌悬液, 将菌液按操作规程在鉴定试剂条上加样、28℃ 恒温培养 24 h 后, 进行细菌自动鉴定仪鉴定。此外, 根据革兰氏染色结果, 应用细菌生化微量鉴定管进行细菌的常规生理生化测定。

### 1.6 病原菌的药敏试验

药敏试验以涂布法接种纯化培养 24 h 的病原菌于琼脂平板上, 贴上药敏纸片, 于 28℃ 培养 24 h 后测量抑菌圈直径, 按照纸片法说明书判断菌株对药物的敏感性。

### 1.7 组织病理切片制备

将发病鱼肝脏、肾脏和鳃等组织, 用 Bouin 氏液固定 24 h, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋。切片机连续切片, 厚度为  $3 \mu\text{m} - 5 \mu\text{m}$ , H. E 常规染色, 显微镜观察并显微摄影。

## 2 结果

### 2.1 病原菌的分离

在无菌条件下, 从患病斜带石斑鱼肾脏、肝脏病灶组织分离纯化得到优势菌株 EcGY120701 和 EcGY120702。

### 2.2 病原菌的确认

**2.2.1 人工感染试验:** 两株菌分别进行石斑鱼背鳍基部肌肉注射感染, 在 5d 之内对试验鱼的致死率达 90%–100%, 验证该菌株具有较强致病力, 带来高致死率, 结果见表 1。感染死亡及濒临死亡石斑鱼出现与自然感染相似的症状: 游泳能力减弱, 反应迟钝, 摄食能力下降, 进而鳞片脱落, 体表发红, 开始出现皮肤溃烂, 背鳍、胸鳍、尾鳍的鳍条基部充血、溃烂, 解剖后可见肝、肾等内脏器官变红。死亡石斑鱼腹腔有腹水, 肝脏肿大, 胃、肠、鳃、肾、脾也充血, 胸鳍或尾鳍有出血点, 与网箱养殖的患病石斑鱼的症状和病变相似。

**2.2.2 致病性再确认:** 从人工感染的病鱼的肝脏和肾脏等处均再次分离到与原菌株形态与生理生化性状一致的菌株。分别感染健康鱼, 结果见表 2。试验鱼在 5d 之内死亡率高达 100%, 且症状与自然感染相似, 证明所分离到的两株菌是致病菌。

表 1. EC0601 号菌和 EC0602 号菌人工感染试验结果

Table 1. Results of infection test by strain EC0601 and EC0602

Stain No.	Concentration / (cfu/mL)	Number of tested fish	Injection dosage/mL	Number of dead fish/day					Number of dead fish	Mortality/%
				1 d	2 d	3 d	4 d	5 d		
ecGY120701	3.0 × 10 <sup>8</sup>	10	0.2	2	4	2	1	1	10	100
ecGY120702	3.0 × 10 <sup>8</sup>	10	0.2	0	2	4	2	1	9	90
Control	salt solution	10	0.2	0	0	0	0	0	0	0

表 2. EC0601 号菌和 EC0602 号菌人工感染试验结果

Table 2. Results of infection test by strain EC0601 and EC0602

Stain No.	Concentration / (cfu/mL)	Number of tested fish	Injection dosage/mL	Number of dead fish/day					Number of dead fish	Mortality/%
				1 d	2 d	3 d	4 d	5 d		
ecGY120701	3.0 × 10 <sup>8</sup>	10	0.2	1	4	2	2	1	10	100
ecGY120702	3.0 × 10 <sup>8</sup>	10	0.2	1	2	3	3	1	10	100
Control	salt solution	10	0.2	0	0	0	0	0	0	0

2.3 病原菌的鉴定

两株菌在营养琼脂上生长良好,菌落均圆形,表面光滑,有光泽,边缘整齐;在 TCBS 培养基 28℃ 培养 24 h 后菌落均为圆形,中央隆起表面光滑,有光泽,边缘整齐,形成黄色大菌落。两株菌经革兰氏染色,均为革兰氏阴性,短杆状,无芽孢、荚膜,无 NaCl 不生长,3% - 10% NaCl 均可生长,可运动,对弧菌抑制剂 O/129 (150 μg) 敏感,MR、靛基质、V-P 反应均为阳性。ATB 判定结果,这两株菌为溶藻弧菌。生理生化测定显示,分离菌株能发酵葡萄糖,蔗糖、甘露醇、麦芽糖阳性;精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、肌醇、鼠李糖、尿素、阿拉伯糖、乳糖、硫化氢、山梨醇、棉子糖、木糖、枸橼酸盐、丙二氨酸、β-半乳糖苷 (ONPG) 阴性。结合其它生化反应结果,与文献 [5] 溶藻弧菌相符,可确定为溶藻弧菌。

2.4 病原菌的药敏试验

从广东省阳江市石斑鱼养殖网箱患病石斑鱼分离得到共 30 株溶藻弧菌,它们药敏试验结果如表 3,对抗生素均存在不同的耐药性(表 4),其中 EC01 对三甲氧苄嘧啶、羧苄西林、庆大霉素、阿莫西林、头孢噻吩、头孢哌酮、丁胺卡那霉素、四环素、万古霉素、阿莫西林/舒巴坦、硫酸多粘菌素 B 和呋喃唑酮共 12 种抗生素具有较高的耐药性,并且耐药率高达 54.5%;EC26 对三甲氧苄嘧啶、利福平、羧苄西林、万古霉素具有耐药性,EC20 对三甲氧苄嘧啶、羧苄西林、阿莫西林和万古霉素具有耐药性,耐药率均为 18.2%。其他菌株对 22 种抗生素的耐药率在 22.7% - 50.0% 之间。

表 3. 22 种抗生素对溶藻弧菌分离株的抑制作用

Table 3. Inhibitory effect of 22 antibiotics to isolated *V. alginolyticus* strains

Strain No.	Drug sensitivity			Resistant rate/%
	R	I	S	
ec01	12	2	8	54.5
ec02	11	1	10	50.0
ec03	5	2	15	22.7
ec04	9	2	11	40.9
ec05	6	2	14	27.2
ec06	8	2	12	36.4
ec07	5	3	14	22.7
ec08	5	4	13	22.7
ec09	8	1	13	36.4
ec10	6	3	13	27.2
ec11	11	3	8	50.0
ec12	7	9	6	31.8
ec13	7	2	13	31.8
ec14	6	1	15	27.2
ec15	6	2	14	27.2
ec16	10	3	9	45.5
ec17	5	5	12	22.7
ec18	6	3	13	27.2
ec19	5	4	13	22.7
ec20	4	4	14	18.2
ec21	6	2	14	27.2
ec22	6	2	14	27.2
ec23	6	2	14	27.2
ec24	5	2	15	22.7
ec25	6	1	15	27.2
ec26	4	1	17	18.2
ec27	8	2	12	36.4
ec28	7	1	14	31.8
ec29	11	2	9	50.0
ec30	8	1	13	36.4

S:sensitive; I:intermediate; R:resistant.

比较 30 株溶藻弧菌对 22 种抗生素的耐药性(图 1),可以得到如下结论:溶藻弧菌分离株对三甲氧苄氨嘧啶、青霉素类和万古霉素具有很强的耐药性;对氯霉素、头孢吡肟、环丙沙星、诺氟沙星、大环内酯类抗生素均敏感(100.00%);对头孢噻吩、头孢呋辛等抗生素中度敏感。头孢噻吩、头孢呋新、头孢哌酮、头孢吡肟这四代头孢菌素类抗生素,随着代

数的增加,从一到四代头孢菌素类抗生素抗溶藻弧菌作用呈增强趋势;

本次测得溶藻弧菌多重耐药株耐药谱表明:分离的溶藻弧菌菌株呈多重耐药,均能耐 4 种及 4 种以上抗生素,可见耐药现象相当广泛;耐 7 种和 7 种以上抗生素有 15 株(50.0%);耐 9 种及 9 种以上抗生素有 6 株(20.7%)。

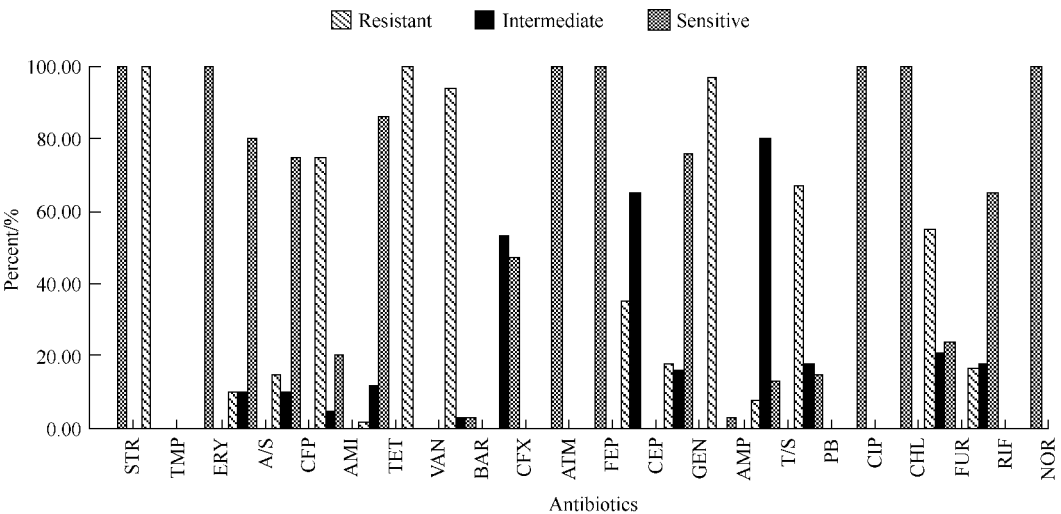


图 1. 溶藻弧菌分离株对 22 种抗生素的耐药率对比分析

Figure 1. Comparison of antibiotic-sensitivity *V. alginolyticus* strains to the 22 antibiotics.

表 4. 溶藻弧菌分离株多重耐药谱

Table 4. Multiple resistance to *V. alginolyticus* strains

Multi-antimicrobial resistance	Numbers of strains	Percent / %
AMP-BAR-TMP-AMI-VAN-FUR-RIF-PB	4	13. 3
AMP-BAR-TMP-CEF-AMI-VAN-FUR-PB		
AMP-BAR-TMP-CEF-AMI-VAN-FUR-T/S		
AMP-BAR-TMP-AMI-VAN-PB-CEF	5	16. 7
AMP-BAR-TMP-AMI-VAN-PB-RIF		
AMP-BAR-TMP-AMI-VAN-PB-FUR		
AMP-BAR-TMP-VAN-PB-CEF / AMP-BAR-TMP-VAN-PB-FUR	6	20. 0
AMP-BAR-TMP-VAN-FUR-AMI / AMP-BAR-TMP-VAN-PB-AMI		
AMP-BAR-TMP-VAN-PB / AMP-TMP-CEF-VAN -AMI	7	23. 3
AMP-BAR-TMP-VAN-AMI / AMP-TMP-CEF-VAN-FUR		
AMP-BAR-TMP-VAN-CEF		
AMP-BAR-TMP-AMI-VAN-PB-FUR-T/S-GEN	1	3. 3
AMP-BAR-TMP-CEF-CFP-GEN-AMI-VAN-PB-FUR-RIF	3	10. 0
AMP-BAR-TMP-CEF-CFP-GEN-AMI-VAN-PB-FUR-T/S		
AMP-BAR-TMP-CEF-CFP-A / S-GEN-AMI-VAN-PB-FUR		
AMP-BAR-TMP-CEF-CFP-A / S-AMI-VAN-PB-FUR	1	3. 3
AMP-BAR-TMP-CEF-CFP-A / S-GEN-AMI-TET-VAN-PB-FUR	1	3. 3
BAR-TMP-RIF-VAN	2	6. 7
BAR-AMP-TMP-VAN		

2.5 病理变化

通过对病鱼鳃、肝和肾组织进行切片制作,从光

学显微镜下观察到,石斑鱼受溶藻弧菌感染后,鳃、肝和肾等在病理组织学上可见以下一些病理变化

(图 2)。鳃小片上皮细胞增生、肿胀、肥大(图 2-A);部分鳃细胞空泡变性(图 2-B),细胞核溶解消失,细胞质嗜酸性增强,细胞坏死(图 2-C);肝组织细胞界限模糊不清,肝细胞索排列紊乱,细胞浆中出现多量大小不等的空泡,为脂肪变性(图 2-D),有的肝细胞明显肿大变性,被伊红深染,细胞核溶解性坏死,病变组织间质中大量的嗜酸性细胞浸润(图 2-

E),有的细胞核溶解消失,细胞嗜酸性坏死,病变组织炎性细胞浸润(图 2-F),呈变质性炎症;肾小球结构模糊不清、松散,呈空泡样,部分区域肾小球的血管球肿胀、肾小球坏死(图 2-G)。各组织器官共同的组织病理变化主要表现为细胞变性、坏死,病变组织炎性细胞浸润,呈变质性炎症。溶藻弧菌对石斑鱼机体的主要器官造成严重病理损伤。

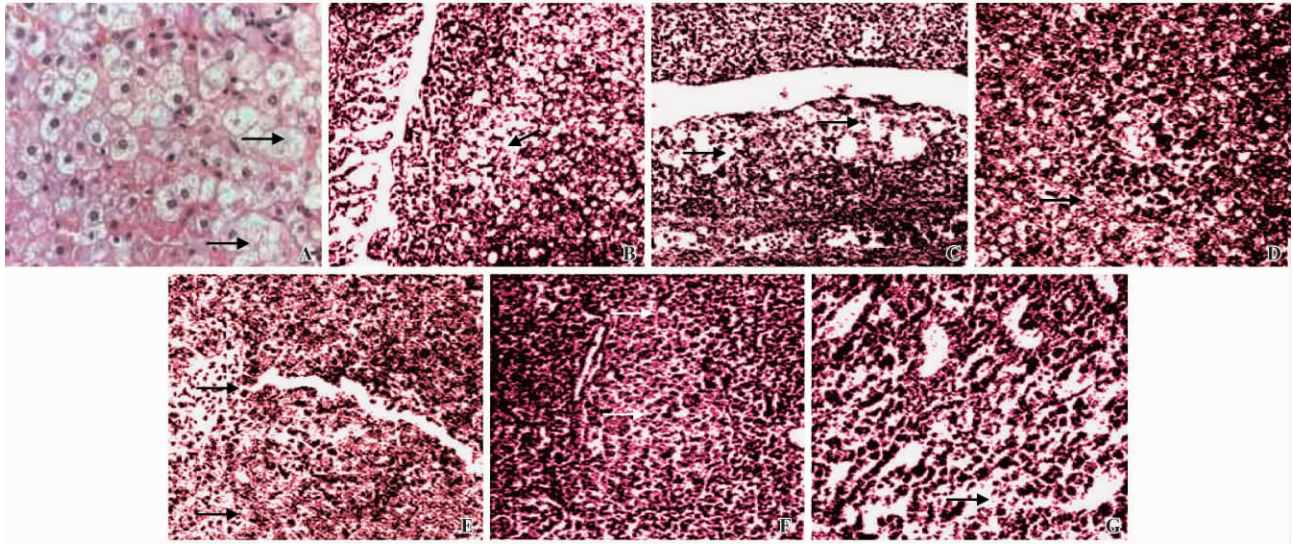


图 2. 溶藻弧菌感染后的组织器官的病理变化

Figure 2. Histopathological changes of *V. alginolyticus*. A: Proliferation and severe swelling of gill Cells (arrow); B: Cell degeneration of gill (arrow); C: Karyolysis disappear, increased cytoplasmic eosinophilia (arrow); D: hepatic steatosis and the inflammatory cell infiltration; E: Severe swelling of liver cells, karyolysis, cell necrosis; F: Karyolysis, necrotic eosinophils (arrow); G: Disappeared of structure of renal tubular (arrow).

### 3 讨论

本文从患病斜带石斑鱼体不同组织分离到菌株,经人工回归感染试验和毒力试验证实该菌株是石斑鱼溃烂病的致病菌,具有较强致病力,用 ATB 系统进行自动微生物分析鉴定,鉴定结果可信度在 90% - 99%。研究中测定菌株的形态学特征和主要生理生化指标与有关文献 [2-5] 报道非常相似。溶藻弧菌广泛分布于世界各地海水及河口处,数量居海水类弧菌之首,是世界范围内的海水养殖鱼类的主要病原菌,能引起以色列养殖的鲷科鱼类、西班牙养殖的鲈鱼、澳大利亚养殖的尖吻鲈<sup>[6]</sup>、日本人工育苗的真鲷仔稚鱼<sup>[7]</sup>、台湾地区养殖的石斑鱼<sup>[8]</sup>以及我国南方养殖的石斑鱼等发生溶藻弧菌病<sup>[2-4]</sup>,严重危害着海水养殖业的发展。溶藻弧菌是海水中的正常菌群,为条件致病菌,其致病性取决于鱼体的健康状态及水环境的理化条件<sup>[9]</sup>。由于近些年石斑鱼养殖业的迅速发展,许

多养殖区网箱布局不合理,水流不畅,养殖密度过大。此外,经常投喂冰鲜小杂鱼,对海水污染严重,夏季高温使得弧菌大量繁殖;养殖过程中如换网等引起机械损伤等人为因素,均致使鱼体免疫功能下降、抗病力降低,一旦受寄生虫的感染,容易继发感染细菌性疾病。另外,当养殖水域溶藻弧菌大量繁殖成为优势种时,容易引起养殖石斑鱼发生溶藻弧菌病,导致石斑鱼大量死亡<sup>[10]</sup>。溶藻弧菌是人工养殖的斜带石斑鱼弧菌病的重要病原菌。

本次测得溶藻弧菌多重耐药株耐药谱表明:均能耐 4 种及 4 种以上抗生素,可见耐药现象相当广泛;其中耐 7 种和 7 种以上抗生素有 15 株 (50.0%),耐 9 种及 9 种以上抗生素有 6 株 (20.7%)。揭示了溶藻弧菌对药物适应并产生多重耐药的情况较为普遍,该结果与其它地区溶藻弧菌具有严重的多重耐药性的情况相似<sup>[11]</sup>。一旦菌株之间存在耐药质粒的相互传递,将在一定养殖区域内大幅增加多重耐药菌株的数量<sup>[12]</sup>。本实验筛

选得到多重耐药菌株, 将为耐药质粒提取以及研究其耐药基因、耐药性产生的过程及耐药质粒传播情况, 提供必要的基础, 从而减少其耐药性的产生和传播。近几年由于硝基呋喃类、喹诺酮类、四环素类等药物的普遍使用, 造成养殖环境微生物自然区系平衡的破坏, 使弧菌对这些药物产生较大的耐药性<sup>[13-15]</sup>, 治疗效果均不理想, 且这些药物中多数为国家禁用药物。该结果同时为斜带石斑鱼养殖临床合理用药、防止滥用药提供了依据。采用药物治疗是暂时的应急措施, 存在抗药性和药物残留等问题, 而且盲目的用药只会使病害愈演愈烈。要从根本上防治弧菌病, 应从预防为主, 通过降低养殖密度和合理网箱布局, 减少体表损伤, 控制环境污染, 改善水质环境, 使用新鲜饲料鱼和优质饲料, 选用弧菌疫苗<sup>[16-17]</sup>或其它免疫增强剂提高免疫, 增强机体的抗病力, 才能取得较好的防治效果。

通过组织病理显微观察, 斜带石斑鱼溶藻弧菌病的鳃、肝和肾等组织器官均发生不同程度病变, 主要表现为细胞变性、坏死, 病变组织炎性细胞浸润, 呈变质性炎症, 对各器官的组织功能均造成一定影响, 多器官组织的病变和坏死共同导致了鱼的死亡。溶藻弧菌主要是通过在其侵袭和增殖过程中对机体造成的细胞和组织损伤, 以及其代谢产物(毒素)干扰和破坏机体的局部或全身的正常新陈代谢或机能<sup>[18]</sup>。由于对溶藻弧菌致病性研究还处在较为初级阶段, 今后需对于溶藻弧菌的传播途径、致病机理等方面作进一步研究, 随着研究的深入, 更多的致病因子和致病机制将会被发现。

## 参考文献

- [1] Xiao H, Li J, Wang X, Ji W, Xu H. Studies on Pathogens of Rotted Gill and Rotted Caudal Fins of Seaperch (*Lateolabrax japonicus*) Fry. *Journal of Ocean University of Qindao*, 1999, 29 (1) : 87-93. (in Chinese)  
肖慧, 李军, 王祥红, 纪伟尚, 徐怀恩. 鲈鱼苗烂鳃、烂尾病病原菌的研究. 青岛海洋大学学报, 1999, 29 (1) : 87-93.
- [2] Liu X, Zou X, Mo X, Li J, Ye Z, Weng R, Wu T, Zhu S. A Study on the pathogen of vibriosis isolated from diseased *Epinephelus* sp. in cage mariculture. *Tropic Oceanology*, 1994, 13 (1) : 81-86. (in Chinese)  
刘秀珍, 邹晓理, 莫小燕, 李家炳, 叶振腾, 翁容生, 巫特坚, 朱世雄. 海水网箱养殖石斑鱼病原菌研究. 热带海洋, 1994, 13 (1) : 81-86.
- [3] Zhu Z, He J, Huang Z. Identification and pathogenicity of pathogen of *Epinephalus fario* and *E. awoara* ulceration disease. *Acta Cientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 1994, 13 (1) : 81-86. (in Chinese)  
朱传华, 何建国, 黄志坚. 网箱养殖石斑鱼暴发性溃疡病病原菌分离、鉴定及致病性研究. 中山大学学报(自然科学版). 2000, 39 (增刊) : 78-281.
- [4] 吴后波, 吴灶和, 潘金培. 海水网箱养殖赤点石斑鱼溃疡病致病菌研究. 热带海洋研究(五). 北京: 科学出版社, 1997: 91-95.
- [5] Anderson DP. 鱼类免疫学. 张寿山, 鼎可译, 等译. 北京: 中国农业出版社, 1984: 51-52.
- [6] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 83-90.
- [7] Aznar R, Ludwig W, Amarm RI, Schleifer KH. Sequence determination of rRNA genes of pathogenic *Vibrio* species and whole-cell identification of *Vibrio vulnificus* with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *SystBacteriol*, 1994, 44 (2) : 330-337.
- [8] Gauger EJ, Gomez-Chiarri M. 16S ribosomal DNA sequencing confirms the synonymy of *Vibrio* and *V. carchariae*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2002, 52 (1) : 39-46.
- [9] Yamada Y, Kaku Y, Wakabayashi H. Phylogenetic intra-relationships of atypical *Aeromonas salmonicida* isolated in Japan as determined by 16S rDNA sequencing. *Fish Pathology*, 2000, 35 (1) : 35-40.
- [10] Chen Y, Zhong S, Zhou C. Prevention and treatment of luminous disease of adult prawns. *Acta Cientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2000, 39: 218-223. (in Chinese)  
陈月忠, 钟硕良, 周宸. 成虾发光病病原体的分离鉴定及防治技术研究. 中山大学学报(自然科学版), 2000, 39 (增刊) : 218-223.
- [11] Wu X, Zhou Y, Ouyang J, Dai X, Wang S, Xie Z. Resistance to drugs and plasmid diversity in bacterium *Vibrio Alginolyticus* in Hainan Province. *Fisheries Science*, 2012, 31 (1) : 50-54. (in Chinese)  
吴学贵, 周永灿, 欧阳吉隆, 戴小连, 王世锋, 谢珍玉. 海南地区溶藻弧菌耐药性及其质粒多样性的研究. 水产科学, 2012, 31 (1) : 50-54.
- [12] Eun-Gyoungl, Kwang-Tae, Hongsik. Antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* strains isolated from farmed fish in Korea from 2005 through 2007. *Journal of Food Protection*, 2011, 74 (3) : 380-386.
- [13] Wang R, Wang J, Xu L, Feng J. Antibiotic resistance of



vibrio strains isolated from cobia (*Rachycentron canadum*) farming water and their digestion guts. *South China Fisheries Science*, 2007, 3 (5) :1-6. (in Chinese)

王瑞旋, 王江勇, 徐力文, 冯娟. 军曹鱼养殖水体及其肠道弧菌的耐药性研究. *南方水产*, 2007, 3 (5) :1-6.

- [14] Zhang X, Cai J. Determination of the Antibiotic Susceptibilities of Four Marine Pathogenic Vibrios. *Journal of South China University of Technology (Natural Science)*, 2003, 31 (9) :66-69. (in Chinese)

张昕, 蔡俊鹏. 四种海洋致病弧菌对抗生素敏感性的测定. *华南理工大学学报*, 2003, 31 (9) :66-69.

- [15] Han S, Yu J, Jiang T, Wang D. An analysis of antimicrobial susceptibility and isolation of pathogenic *Vibrio* in brine. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2008, 34 (16) :195-199. (in Chinese)

韩善桥, 虞积耀, 姜涛. 海水中致病性弧菌分离及抗菌药物敏感性分析, *中国抗生素杂志*, 2008, 34 (16) :195-199.

- [16] Liu H, Wang Q, Liu Q. Roles of Hfq in the stress adaptation and virulence in fish pathogen *Vibrio alginolyticus* and its potential application as a target for live attenuated vaccine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 91 (2) :353-364.
- [17] Zhou Z, Pan H, Ding Y, Cai J, Huang Y, Jian J, Wu Z. VscO, a putative T3SS chaperone escort of *Vibrio alginolyticus*, contributes to virulence in fish and is a target for vaccine development. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35 (5) :1523-1531.
- [18] 徐建国. 分子医学细菌学. 北京: 科学出版社, 2000: 131-152.

## Biological characteristics and histopathological observation of *Vibrio alginolyticus* from diseased fish

Yingtiao Lai, Jiafa Tao, Chengwen Sun, Cunbin Shi, Shuqin Wu \*

Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture; Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology, Guangzhou 510380, Guangdong Province, China

**Abstract:** [Objective] Ulcer disease is one of the most serious diseases and a common problem in various stages marine culture including *Epinephelus coioides* culture of southern China. The isolation and identification of pathogenic bacteria from *E. coioides* will be useful for monitoring of drug resistance and controlling the outbreak and spread of ulcer disease in *E. coioides*. The purpose of this study was to characterize the pathogen of *E. coioides*. [Methods] The pathogenic bacteria separated from the liver and kidney of diseased fish were identified through pure culture, artificial infection, automatic tests in bacteriology automatic identification, drug sensitive tests, morphometry, and physiological and biochemical determination. [Results] The strains were characterized and identified as *Vibrio alginolyticus*. Two strain were selected for virulence tests and all the moribund/dead fish exhibited ulcer disease as that observed in natural outbreak. Drug sensitive tests show that *V. alginolyticus* was highly resistant to 3 agents including penicillin, whereas sensitive to 5 agents including chloromycetin. Histopathological changes were mainly shown as cell degeneration and necrosis of gill, liver and kidney, and alterative inflammation as a result of inflammatory cell infiltration in the diseased tissue. [Conclusion] The biochemical, physiological tests confirm that *V. alginolyticus* is the pathogen causing *E. coioides* vibriosis. The multi-drug resistance among *V. alginolyticus* suggests strengthened monitoring of outbreaks of *V. alginolyticus* caused disease in *E. coioides* culture.

**Keywords:** *Epinephelus coioides*, *Vibrio alginolyticus*, vibrio, bacterial identification

(本文责编:王晋芳)