

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) 细菌败血感染症 及病原检验与分析*

房海 陈翠珍 张晓君 葛慕湘 何振平 靳晓敏 王秀云

(河北科技师范学院动物科学系 秦皇岛 066600)

提要 采用调查统计、剖检病变、病原分离鉴定与人工感染健康鱼致病作用试验的方法,对自然发生的养殖牙鲆细菌败血感染症病例,进行了发病情况、临床表现及病理变化等方面的检验,同时取病(死)牙鲆的肝、腹水、腐烂肌肉组织为材料进行细菌分离,对分离于10尾鱼20株纯培养菌的形态特征、理化特性等进行鉴定。结果表明,分离出来的两种细菌,一种是弧菌属(*Vibrio* Pacini 1854)细菌的一个新种(sp. nov.)并定名为牙鲆弧菌(*Vibrio olivaceus* sp. nov.);另一种是气单胞菌属(*Aeromonas* Kluver and van Niel 1936)的嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)。通过人工感染试验等表明该两种分离菌为相应感染症的致病菌。

关键词 牙鲆,败血感染症,病原细菌,检验

中图分类号 S941

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)在分类学上属于鲽形目(Pleuronectiformes)、鲽科(Bothidae)、牙鲆属(*Paralichthys*),由于其肉质鲜美、营养价值高及生长速度快等,已成为目前我国北方沿海地区海水养殖鱼类的主导优良鱼种。近年来随着其养殖规模及养殖密度的不断扩大,也伴随一些病害的发生,尤其是由某些病原微生物特别是细菌引起的传染病,常具有发病及死亡率高、在特定水环境中传播速度快等特点,给牙鲆养殖业带来较大的经济损失。在牙鲆细菌感染症中,已有对弧菌(*Vibrio*)、爱德华氏菌(*Edwardsiella*)、链球菌(*Streptococcus*)、屈挠杆菌(*Flexibacter*)、兔莫拉氏菌(*Moraxella cuniculi*)等的记载和报道(周丽等, 1997; Austin *et al*, 1987, 1999; 室贺清邦等, 1996; Mekuchi *et al*, 1995; Mamun-Rashid *et al*, 1994; 宋春华等, 2001)。2001年,作者对河北秦皇岛某海水鱼养殖场所发生的呈败血症感染的牙鲆病例进行了检验,表明为弧菌属(*Vibrio* Pacini 1854)的细菌与嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)的混合感染,基于所检弧菌有些主要生物学性状指标与目前记载和报道的均有差异,认为属于

弧菌属的新种(sp. nov.)并定名为牙鲆弧菌(*Vibrio olivaceus* sp. nov.)。鉴于此新种弧菌与嗜水气单胞菌对牙鲆的混合感染尚未见报道,现对所检牙鲆病例的发病情况及相应病原细菌的检验结果进行总结,以期对该病的有效检验与防治及对相应病原细菌的进一步研究等有所帮助。

1 材料与方法

1.1 病例检验

2001年9月,对秦皇岛某海水鱼养殖场牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)病害进行了发病情况、病理变化等检验。同时,取发病濒死及刚刚病死鱼病变组织材料分别做抹片后以革兰氏染色镜检细菌,并在此基础上进行了细菌分离。

1.2 病原细菌检验

1.2.1 细菌分离与纯培养 分别取上述被检牙鲆的病变组织为材料,划线接种于普通营养琼脂、含7%兔鲜血营养琼脂平板,置28℃培养24—48h检查结果;对所分离出的细菌,先检查生长菌落数量、分布及同一性,然后按菌落种类从每尾鱼各取分离菌落2个,分别移接于普通营养琼脂斜

* 河北省科技厅科技攻关项目,02220502D号。房海,教授, E-mail: fanghaihb@163.com

收稿日期:2004-06-07;收修修改稿日期:2004-08-27

面,并按分离地和分离日期(年、月、日)对同种细菌按顺序依次编号,28℃培养24h,做成纯培养后置4℃冰箱保存供鉴定用。

1.2.2 形态特征检查 取上述分离菌的纯培养物,分别移接于普通营养琼脂斜面各2管,分置于28℃、37℃条件下培养18h,分别制备涂片标本进行革兰氏染色做形态特征检查。

1.2.3 培养温度对细菌发育的影响 取上述分离菌的纯培养物,分别移接(涂布接种)于普通营养琼脂斜面各2管,分置于37℃和28℃条件下培养48h检查生长发育情况。

1.2.4 在普通营养肉汤中的生长表现 将上述分离菌的纯培养物,分别移接于普通营养肉汤管中,置于28℃条件下培养24h检查生长发育情况。

1.2.5 理化特性检验 对上述分离菌的纯培养物,分别按常规进行以下理化特性测定:氧化酶、H₂O₂酶、动力(半固体)、糖(醇和苷)类代谢、有机酸(盐)的利用、H₂S产生、吲哚、MR、V-P在不同含量NaCl营养肉汤中的生长、对弧菌抑制剂O/129的敏感性等。

1.2.6 菌种归类判定 根据上述试验结果,主要依据1994年出版的第九版《伯杰氏鉴定细菌学手册》(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed.) (Holt *et al.*, 1994)及有关资料(Austin B *et al.*, 1987, 1999; Krieg *et al.*, 1984),进行供试菌的种属判定,并在此基础上,选择代表菌株送中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection, CCTCC)予以表型性状的复核鉴定,同时以高效液相色谱法(high-performance liquid chromatography, HPLC)作细菌DNA中G⁺ Cmol%的测定,以磷钨酸负染色标本置透射电子显微镜下做形态特征与鞭毛形成情况的检查,最后确定其相应的分类位置。

1.3 人工感染试验

选择上述分离并经鉴定菌的代表菌株,移接于普通营养肉汤管于28℃条件下培养18h后,制备成 9×10^8 cfu/ml的菌悬液,经腹腔接种感染体长20cm左右的健康牙鲆6尾[0.3ml/尾(两种细菌混合感染的菌液为等量混匀后0.6ml/尾)],感染接种前养殖观察5天且健康供试,同时设立接种同批、同剂量无菌普通营养肉汤(6尾)的对照。接种后隔离养殖于试验水族箱内,每天观察其发病及死亡情况,并对死亡鱼及时剖检病变,同时按

上述做细菌分离,并对分离菌做相应的形态及理化特性等复核性检验。以被感染鱼发病及死亡并呈现出与自然病例样相同的败血症感染病变、能从感染病死鱼肝脏中发现感染菌并能分离回收到原感染菌为供试菌株的病原性判定指标,对照鱼应在观察期内正常存活。

2 结果

2.1 发病情况及主要病变

2001年9月,对秦皇岛某海水鱼养殖场5月龄左右牙鲆进行了检验,该场养殖规模为1200m³水体,共养殖牙鲆30000尾左右,于7月下旬始见明显发病,到送检时(9月16日)已发病10000尾左右(占33.3%左右)、死亡9000尾左右(病死率90%左右)。病鱼主要表现为摄食减少、游动缓慢、部分上浮,且日渐严重;取10尾发病濒死及刚刚死亡牙鲆进行病变检验,剖检可见其均有不同程度的腹面出血点,有5尾的背鳍肌肉不同程度腐烂,6尾腹部膨胀并有不很透明状的腹水(3尾为血样腹水),肝脏色淡或充血肿胀(4尾有不同程度出血点及3尾有不同程度坏死),肾、脾均有不同程度肿胀。

2.2 病变肝组织中的细菌

以上述经剖检病变后10尾牙鲆的肝病变组织为材料,直接做抹片经革兰氏染色后镜检细菌,结果发现均有不同量的革兰氏染色阴性、杆状及短杆状(有的为球状)、散在(个别的成双)、无芽孢、两端钝圆、大小多在(0.5—1.0)μm×(0.6—2.5)μm(有个别大的菌体长3.5μm左右)的细菌。

2.3 细菌分离

随机取2.2中所述10尾被检鱼中的5尾,分别以其肝、腹水、腐烂肌肉组织(无菌操作刮去表层后暴露深层腐烂组织)为材料,按1.2.1中所述做细菌分离培养,结果均分离到在分布数量上差异不很明显的两类细菌(分别记作A菌和B菌)的菌落,菌落特征如表1所示。

2.4 细菌纯培养

按1.2.1中所述作纯培养,A菌和B菌各10株,共20株,A菌10株的菌号为HC010916A-1—HC010916A-10,B菌10株的菌号为HC010916B-1—HC010916B-10。

2.5 分离菌的鉴定

2.5.1 形态特征 10株A菌的形态特征一致,10株B菌的形态特征一致,具体如表2所示。

表 1 A 菌和 B 菌的菌落特征
Tab. 1 Colony characteristics of A and B strains

菌类	普通营养琼脂	血液 营养琼脂
A	圆形光滑、边缘整齐、稍隆起、半透明至不透明、浅灰白色的菌落, 24h 检查直径多在 0.8mm 左右、48h 多在 1.2mm 左右, 生长中度	乳白色闪光的菌落, 24h 检查直径多在 1.0mm 左右、48h 多在 1.2mm 左右, 不溶血, 余特征同普通营养琼脂的, 生长中度
B	圆形光滑、边缘整齐、较隆起、不透明、灰白色的菌落, 24h 检查直径多在 1.2mm 左右、48h 多在 2.0mm 左右(稍隆起), 生长丰盛	24h 检查多在 1.2mm 左右、48h 多在 2.0mm 左右, β -溶血的菌落, 余特征同普通营养琼脂的, 生长丰盛

表 2 纯培养菌的形态特征
Tab. 2 Strains morphology

菌类	株数	形 态 特 征
A	10	28℃培养的呈革兰氏染色阴性, 杆状但多为短杆状或球状, 散在(个别的成双), 无芽孢, 两端钝圆, 大小多在(0.6—1.0) μm \times (0.9—2.0) μm ; 37℃培养的与 28℃培养的基本形态特征一致, 有的球状或接近球状的菌体排列成 3—8 个的不规则短链, 另表现似比 28℃的菌体稍宽些, 大小多在(0.6—1.1) μm \times (0.9—2.0) μm
B	10	28℃与 37℃培养的特征一致, 均呈革兰氏染色阴性, 杆状及短杆状, 散在(个别的成双), 无芽孢, 两端钝圆, 大小多在(0.4—0.6) μm \times (1.0—2.2) μm , 有极个别的长丝状菌体

2.5.2 在不同培养温度条件下的生长发育情况 均能在两种温度条件下生长, 其中 A 菌的菌苔呈半透明状、浅灰白色, 28℃的生长较丰盛、37℃的生长中度; B 菌的菌苔不透明、灰白色, 生长丰盛, 两种温度下的基本一致。

2.5.3 在普通营养肉汤中的生长表现 供试 A 菌 10 株的表现一致, 呈轻度均匀混浊生长、管底有圆点状菌体沉淀(摇动后呈线状上升易消散)、有轻度菌环但摇动后即散开; B 菌 10 株的表现一致, 呈均匀混浊生长、管底形成较大的圆点状菌体沉淀(摇动后即散开)、有明显菌环(用力摇动后可脱下散开)、形成轻度菌膜(摇动后呈小颗粒状不易均匀消散)。

2.5.4 理化特性与菌种判定 A 菌 10 株对所测项目内容的结果一致, 属于同种细菌, 并结合上述试验内容的结果将其归为弧菌属的细菌, 又基于其有些主要性状指标与目前记载和报道的弧菌属细菌均有差异(陈师勇等, 2004), 认为其属于弧菌属的新种(sp. nov.); 选择其中 1 个代表菌株(HC010916A-1 株), 送 CCTCC 进行的复核鉴定与分类定名(表 3), 同样判定为弧菌属细菌的新种, 并根据《细菌命名国际法规》(International Code of

Nomenclature of Bacteria, ICNB) 将其定名为牙鲆弧菌(*Vibrio olivaceus* sp. nov.), 其中“牙鲆(*olivaceus*)”一词的意为首次从发病(死)牙鲆中分离到的(即根据来源予以定名)。

B 菌 10 株对所测项目内容的结果一致(表 4), 认为属于同种细菌并判定为气单胞菌属(*Aeromonas* Kluyver and van Niel 1936)的嗜水气单胞菌[*A. hydrophila* (Chester 1901) Stanier 1943]。

2.6 人工感染的致病作用

2.6.1 牙鲆弧菌 选择经上述鉴定的牙鲆弧菌代表菌株 HC010916A-1, 按 1.3 中所述方法做对牙鲆的感染试验, 结果 6 尾牙鲆于感染后 3、4、5、6 天各发病死亡 1 尾、2 尾、1 尾、2 尾, 发病及死亡率 100% (6/6), 均表现有肝脏肿胀及充血, 4 尾存在不同程度的肝脏坏死斑点, 肾脏肿胀, 5 尾存在较多的腹水。对照 6 尾鱼, 于 10 天观察期内均正常存活。

以上述感染病死牙鲆 3 尾的肝组织为材料做细菌检验, 在其肝组织抹片中均发现有大量在形态特征上表现同感染菌的革兰氏染色阴性细菌; 同时均分离到大量纯一的同前面所述的原感染菌的菌落, 对从每尾鱼的分离菌落中各取 2 个做纯

培养, 共 6 株进行的主要理化特性指标复核鉴定, 与原感染菌完全一致。

表 3 CCTCC 对 A 菌代表株 HC010916A-1 的复核鉴定结果
Tab. 3 Results of identification to HC010916A-1 by CCTCC

项目	结果	项目	结果	项目	结果
革兰氏染色	-	柠檬酸	+	肌醇	-
菌落表面颜色	乳白色	脲酶	-	麦芽糖	+ / -
基质色素	-	α-D-葡萄糖	+	海藻糖	+
细胞形状	短杆状	D-甘露糖	+ / -	D-甘露醇	-
细胞大小(μm)	(0.5—0.7) × (1.4—2.2)	α-环状糊精	+	L-鼠李糖	-
形成内生孢子	-	D-山梨醇	-	β-甲基-D-葡萄糖苷	-
运动	-	木糖醇	-	D-棉子糖	-
鞭毛	-	蜜二糖	-	乙酸	-
37℃生长	+	O/129: 10μg	R	菊糖	?
接触酶	+	150μg	S	D-葡糖酸	-
氧化酶	+	松二糖	- / +	NaCl(%) : 0	-
苯丙氨酸脱氨酶	-	吐温 80	+	3	+
O-F 试验	-	阿东糖醇(侧金盏糖醇)	-	6	+
硝酸盐还原	+	L-阿拉伯糖	+	丙二酸	+ / -
产 H ₂ S	-	D-阿拉伯醇	-	L-谷氨酸	+
吲哚产生	-	D-纤维二糖	-	琥珀酸	+
葡萄糖: 产酸	-	α-赤藓糖醇	-	β-半乳糖苷酶	-
产气	-	D-半乳糖	-	水杨苷	-
明胶液化	-	龙胆二糖	-	七叶苷	-
V-P 试验	-	D-果糖	-	甘油	-
甲基红试验	-	L-墨角藻糖	-	G+ Cmol%(HPLC)	50.1
蔗糖还原	-	α-D-乳糖	-		

注: 表中符号, + 示阳性, - 示阴性, + / - 示介于+ 与- 之间, - / + 示介于- 与+ 之间, R 示抗性, S 示敏感, ? 示难判定

2.6.2 嗜水气单胞菌 选择经上述鉴定的嗜水气单胞菌代表菌株HC010916B-1, 以 1.3 中所述的方法对牙鲆的感染试验, 结果供试 6 尾牙鲆于感染后 4、5、6、7 天各发病死亡 1、2、2、1 尾, 发病

及死亡率 100%(6/6), 均表现有肝脏肿胀及充血(3 尾存在出血斑点), 3 尾存在不同程度的坏死斑点, 肾脏有不同程度的肿胀。对照 6 尾鱼, 于 10 天观察期内均正常存活。

表 4 10 株 B 菌的理化特性

Tab. 4 Physiological and biochemical characteristics of B strains

项目	结果	项目	结果	项目	结果
生长试验: 28 ℃	+	甘露醇	+	脂酶(吐温 80)	+
37℃	+	吡哌产生	+	糊精	+
动力(半固体)	+	七叶苷利用	+	松二糖	-
氧化酶	+	苯丙氨酸脱氨酶	+	果糖	+
接触酶	+	尿素酶	-	硝酸盐还原	+
克氏双糖铁琼脂: 斜面	+	IPA(SIM)	-	水杨苷	-
柱层	+	麦芽糖	+	卫茅醇	-
H ₂ S	-	丙二酸盐利用	+	甘露糖	+
O-F 试验(葡萄糖)	F	醋酸盐利用	-	半乳糖	+
H ₂ S: 纸条法	+	蛋白酶(7% 牛奶营养琼脂)	+	甘油	+
琼脂柱	-	淀粉酶(碘液显示法)	+	赤藓醇	-
明胶液化	+	松三糖	-	海藻糖	+
枸橼酸盐利用(Simmons)	+	木糖	-	纤维二糖	+
葡萄糖: 产酸	+	木糖醇	-	山梨糖	-
产气	+	苦杏仁苷	-	菊糖	-
山梨醇	-	侧金盏花醇	-	棉子糖	-
蔗糖	+	酒石酸盐利用	-	乙酰胺酶	-
鼠李糖	-	黏液酸利用	-	阿拉伯醇	-
肌醇	-	ONPG	+	乳糖	+
MR 试验	+	NaCl 肉汤中生长: 0%	+	α-甲基-D-葡萄糖苷	-
V-P 反应	-	1%	+	O/129: 10μg	R
蜜二糖	-	6%	-	150μg	R
阿拉伯糖	+				

注: + 示阳性, - 示阴性, R 示抗性, F 示发酵

采用 2.6.1 中所述方法取感染病死牙鲆 3 尾的肝组织为材料进行感染菌的检验, 结果均检出了大量纯一的原感染菌。

2.6.3 两种菌的混合 选择上述经鉴定的牙鲆弧菌 HC010916A-1 株、嗜水气单胞菌 HC010916B-1 株, 按 1.3 中所述方法对牙鲆的感染试验, 结果于感染后 3、4、5、6 天各发病死亡 2、2、1、1 尾, 发病及死亡率 100% (6/6), 均表现为肝脏肿胀、充血及瘀血, 肾脏肿胀, 5 尾存在腹水、其中 4 尾为血样腹水。对照 6 尾鱼, 于 10 天观察期内均正常存活。

同 2.6.1 中所述方法取感染病死牙鲆 3 尾的

肝组织为材料做感染菌的检验, 结果均检出了大量两种原感染菌。

3 讨论与结论

3.1 对牙鲆鱼类的牙鲆弧菌与嗜水气单胞菌混合感染病例进行了检验, 所检病例缺乏具有诊断意义的特征临床表现, 该感染症的发病率高(至检验时发病率在 33.3% 左右且日渐严重)、致死率高(至检验时占 90% 左右且日渐严重), 显然其可构成对牙鲆的养殖具有严重危害的一种细菌性病害。在外观及剖检病变方面均呈现为败血症感染的病变。这些检验结果提示, 在该感染症的检验时, 最有效的方法是对病原细菌的分离与鉴定,

仅通过发病情况、病变等是难于作出准确诊断的。

3.2 通过对分离鉴定的牙鲆弧菌、嗜水气单胞菌的代表菌株, 单独及混合对供试牙鲆做人工感染试验, 结果不仅能复制出同自然病例的败血症感染发病与死亡情况, 且能重新分离回收到原感染菌, 表明所分离鉴定的细菌即为被检牙鲆自然病例的相应致病菌。

3.3 在《伯杰氏鉴定细菌学手册》第九版(1994)中共记载了弧菌属细菌 37 个种(species)及生物型(biovar), 另外则是一些新种的报道。已知弧菌属细菌的某些种对牙鲆鱼类的感染发病在国内外已有较多的记述, 其中主要包括鳃弧菌(*V. anguillarum*)、鲨鱼弧菌(*V. carchariae*)、灿烂弧菌(*V. splendidus*)、河流弧菌(*V. fluvialis*)、解藻朊酸弧菌(*V. alginolyticus*)等(莫照兰等, 2002, 2003; 常建波等, 2001; Austin, 1987, 1999; 室贺清邦等, 1996)。本次所检牙鲆病例为两种细菌的混合感染, 经较系统的鉴定, 表明其中一种为弧菌属细菌的新种, 依据《细菌命名国际法规(ICNB)》, 以其分离来源(牙鲆)进行了相应种的命名: 牙鲆弧菌, 参考菌株(reference strain)为 HC010916A-1, 对这一新种病原弧菌的检出与研究, 增添了鱼类病原弧菌的新内容。至于该菌的主要毒力因子及致病作用范围等, 尚需进一步研究明确。

需要在此说明的是, 随着现代科学技术的发展, 对细菌的数值分类(numerical classification)、化学分类(chemotaxonomy)以及分子遗传学的分类(分子分类)等这些现代分类学理论的发展与技术的应用, 已构成了对细菌多相分类(polyphasic taxonomy), 这种利用细菌多种信息来研究其分类和系统进化的方法, 已被认为是目前研究各级分类单位的最有效手段, 可用于在所有水平上的分类单位的描述和定义。自 1984 年连续出版的《伯杰氏系统细菌学手册》(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)各卷已开始引入这些分类内容对细菌予以描述, 1994 年出版的《伯杰氏鉴定细菌学手册》第九版中对细菌的分类也主要是依据了多相分类的结果。目前, 这些对细菌的多相分类方法在我国有的刚刚被引用, 更多的是尚在研究探索中, 从已有发表的一些报道资料看, 基本上对细菌的分类鉴定仍是在表观分类学指征的层面上, 但其发展正在从表观分类进入系统发育体系的分类。基于这些, 则是对上述细菌在已通过表型信息、DNA 中 G+Cmol% 的分子指标等分类鉴定研

究基础上, 尚有待于进一步通过在化学分类的细胞壁成分(氨基酸及糖类等)分析与菌体蛋白指纹图谱分析及菌体脂肪酸组分分析、分子分类的 16S rRNA 基因序列分析等方面的多相分类指征研究, 以对这些菌种进行综合性的分类和定义, 更科学、准确地反映出该新种弧菌的分类位置。

3.4 本次所检出作为混合感染的嗜水气单胞菌, 主要可引起罗非、异育银鲫、鳊、草鱼、鲢、鳙、鲤鱼、月鳢、翘嘴鳊、长薄鳅等一些淡水鱼类的发病(孙其焕等, 1991; 陈翠珍等, 2001; 雷爱黄等, 1999; 郑署明等, 1999), 和海水养殖的中国对虾、斑节对虾的嗜水气单胞菌感染(樊海平等, 1994; 刘荭等, 1999), 这进一步表明了该菌在水环境的广泛分布及对水产养殖动物的广泛致病作用。

参 考 文 献

- 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—9 [Liu H, Wang K, Peng J X *et al*, 1999. Study on bacterial pathogen of “Red Body Disease” in *Penaeus monodon*. Fisheries Science Technology Informations, 26(1): 7—9]
- 孙其焕, 孙佩芳, 金丽华等, 1991. 异育银鲫溶血性腹泻病病原的研究. 水产学报, 15(2): 130—139 [Sun Q H, Sun P F, Jin L H *et al*, 1991. On the pathogenic bacteria of the hemolytic ascites of allogynogenetic crucian carp. Journal of Fisheries of China, 15(2): 130—139]
- 宋春华, 周 丽, 战文斌等, 2001. 一种新的牙鲆病原菌——兔莫拉氏菌. 海洋学报, 23(4): 135—140 [Song C H, Zhou L, Zhan W B *et al*, 2001. *Moraxella cuniculi*: a new pathogen in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Acta Oceanologica Sinica, 23(4): 135—140]
- 陈师勇, 张培军, 莫照兰等, 2004. 鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*) M3 菌株生长条件及其对蛋白酶产量的影响. 海洋与湖沼, 35(2): 159—166 [Chen S Y, Zhang P J, Mo Z L *et al*, 2004. The impact of culture conditions on *Vibrio anguillarum* strain M3 growth and protease production. Oceanologia et Limnologia Sinica, 35(2): 159—166]
- 陈翠珍, 张晓君, 房 海等, 2001. 鱼源气单胞菌的主要生物学特性研究. 中国兽医学报, 23(2): 108—114 [Chen C Z, Zhang X J, Fang H *et al*, 2001. Study on the main biological characteristics of *Aeromonas* from fish. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 23(2): 108—114]
- 周 丽, 宫庆礼, 俞开康, 1997. 牙鲆的疾病. 青岛海洋大学学报, 27(2): 173—180 [Zhou L, Gong Q L, Yu K K, 1997. Disease of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Journal of Ocean University of Qingdao, 27(2):

173—180]

郑署明, 贺 蓉, 饶家荣等, 1999. 长薄鳅腐皮病致病菌的研究. 四川畜牧兽医学院学报, 13(4): 23—27 [Zheng S M, He R, Rao J R *et al*, 1999. Studies on the pathogens of the rotten skin diseases of *Lptobetia elongata*. Journal of Sichuan Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 13(4): 23—27]

莫照兰, 茅云翔, 陈师勇等, 2002. 一株牙鲆皮肤溃烂症病原菌的鉴定. 微生物学报, 42(3): 263—269 [Mo Z L, Mao Y X, Chen S Y *et al*, 2002. Classification for one pathogenic *Vibrio anguillarum* strain isolated from skin ulcer flounder. Acta Microbiologica Sinica, 42(3): 263—269]

莫照兰, 茅云翔, 陈师勇等, 2003. 养殖牙鲆鱼苗腹水症病原菌的鉴定及系统发育学分析. 海洋与湖泊, 34(2): 131—141 [Mo Z L, Mao Y X, Chen S Y *et al*, 2003. Identification and phylogenetic analysis of one pathogenic bacterium associated with swollen abdomen of cultured flounder (*Paralichthys olivaceus*) larvae. Oceanologia et Limnologia Sinica, 34(2): 131—141]

常建波, 宫向红, 孙逢贤等, 2001. 养殖牙鲆弧菌病病原菌初步研究. 海洋水产研究, 22(1): 37—41 [Chang J B, Gong X H, Sun F X *et al*, 2001. Preliminary studies on a pathogen of vibriosis of cultured *Paralichthys olivaceus*. Marine Fisheries Research, 22(1): 37—41]

雷爱黄, 黄伟坚, 秦爱珍等, 1999. 月鳃败血病病原菌的研究. 淡水渔业, 29(4): 16—19 [Lei A H, Huang W J, Qin A Z *et al*, 1999. Studies of pathogenic bacteria from septicemia. Freshwater Fisheries, 29(4): 16—19]

樊海平, 孟庆显, 俞开康等, 1994. 中国对虾败血病病原菌(气单胞菌)的致病性与生物学性状. 水产学报, 18(1): 32—38 [Fan H P, Meng Q X, Yu K K, 1994. The pathogenicities and biologic characteristics of the pathogens (*Aeromonas* spp.) caused the septicemia of *Penaeus chinensis*. Journal of Fisheries of China, 18(1): 32—38]

室贺清邦, 江草周三, 1996. 鱼病学概论. 东京: 恒星社厚生阁, 47—64

Austin B, Austin D A, 1987. Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish. Chichester: Ellis Horwood Limited, 263—265

Austin B, Austin D A, 1999. Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish. Third (Revised) Edition. Praxis Publishing Ltd, Chichester, UK, 29—32, 106—140

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, 190—194, 253—274

Krieg N R, Holt J G, 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 1. London: Williams and Wilkins, Baltimore, 518—538

Mamur Rashid M, Hond K, 1994. An Ecological Study on *Edwardsiella tarda* in Flounder Farms. Fish Pathology, 29(4): 221—227

Mekuchi T, Kiyokawa T, 1995. Infection experiments with *Edwardsiella tarda* in the Japanese flounder. Fish Pathology, 30(4): 247—250

EXAMINATION AND ANALYSIS OF BACTERIAL SEPTICAEMIA AND PATHOGEN IN BASTARD HALIBUT (*PARALICHTHYS OLIVACEUS* L.)

FANG Hai, CHEN Cui-Zhen, ZHANG Xiao-Jun, GE Mei-Xiang, HE Zhen-Ping, JING Xiao-Min, WANG Xiu-Yun
(Department of Animal Science, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao, 066600)

Abstract Bastard halibut (*Paralichthys olivaceus* Temminck et Schlegel) is a marine fish with high economic value in northern China. Diseases, their numbers and types of bacterial pathogens have been well documented, such as vibriosis, edwardsiellosis, flexibacteriosis, nocardiosis, pasteurellosis. In September 2001, we conducted examination of bacterial septicemia in bastard halibut. The results showed that the diseases were infected by two species of bacteria, one new species of *Vibrio* was identified based on its extensive phenotypic characters, and another was regarded as *Aeromonas hydrophila*. In this paper, isolation and biology of these bacteria were reported.

Continuous and high mortalities occurred in cultured bastard halibut in September 2001. Symptoms of naturally suffered fish include loss of appetite or stopped eating, slow moving, and floating up. Pathological examinations on 10 moribund and newly dead fish exhibited petechial haemorrhages on the abdomen, rotten muscles in the base of dorsal fin, abdomen swelling with whitish ascitic fluid, and anal pop-out, swollen and congested liver, kidney and

spleen.

Two colonies were obtained for kidney, liver, spleen and ascitic fluid of 10 examined moribund fishes after being inoculated with nutrient agar and blood nutrient agar at 28 °C for 24h. In nutrient agar, colony A were round, smooth, with clear outline, slightly convex, semi-transparent to obscured, pale grayish-white colonies. The size was about 0.8mm in diameter after 24h; 1.2mm in diameter after 48h, in moderate growth rate. Colony B were round, smooth, with clear outline, slightly convex, whitish to grayish-white colonies, with the size about 1.2mm in diameter after 24h, 2.0mm in diameter after 48h, in high growth rate. In blood nutrient agar, group A were cream-coloured shiny colonies, around 1.0mm in diameter after 24h, 1.2mm in diameter after 48h, in moderate growth rate, no-haemolysis. Other traits corresponded to that of in the nutrient agar. Group B approximately 1.2mm in diameter after 24h, 2.0mm in diameter after 48h, with β -haemolysis, in high growth rate.

Traditional classification was used to identify the above isolated bacteria, and get extensive phenotypic information of A and B pure cultures including morphological, physiological and biochemical characteristics, and mol% G+ C ratio of the DNA for representative strain. Results show that morphological characteristics of 10 strains (A) were consistent, Gram-negative, rod-shaped or spherical, no-endospores, singly or in pairs, $(0.6-1.0) \mu\text{m} \times (0.9-2.0) \mu\text{m}$ in size. Morphological traits were identical at 37 °C or in 28 °C, in array of spherical cells or in irregularly short chains of three to eight cells. In addition, negatively stained electron micrograph revealed that the examined strain was rod-shaped, no flagella, few slightly curved. The characteristics of 10 strains (B) were identical at 37 °C or in 28 °C, Gram-negative, rod-shaped, singly or in pairs, no-endospores, rounded ends, $(0.4-0.6) \mu\text{m} \times (1.0-2.2) \mu\text{m}$ in size.

The results of physiological and biochemical traits show that Group A have positive reaction to oxidase, catalase, β -galactosidase, nitrate reduction, acid but no gas released from glucose, and negative reaction to citrate utilization, gelatin hydrolysis, methyl red, Voges-Proskauer reaction, sucrose reduction, inositol, sorbitol, rhamnose and arabinose, sensitive to vibriostatic agent O/129. The Group B have positive reaction to oxidase, catalase, gelatin hydrolysis, indole, methyl red, esculin, sucrose, trehalose, maltose, D-mannitol, arabinose, acid and gas released from glucose, nitrate reduced, H_2S generated, and negative reaction to urease, Voges-Proskauer reaction, D-sorbitol, adonitol, D-arabitol, L-erythritol, m-inositol, L-rhamnose, salicin, with motility, and resistant to vibriostatic agent O/129. The test was conducted on two isolates of pathogenicity by experimental infection. Occurrence of disease and death of fish were observed after the infection, and the pathogenicity of the isolates was determined by duplicating the same infections as natural outbreaks and reisolated the bacteria which were used in experimental infection. The livers from the infected dead exhibited syndromes of swollen and congested internal organs, with petri-rial necrosis, and swollen abdomen filled with ascitic fluid. The smears of liver from the dead were examined by Gram-stained Results show that a lot of Gram-negative rods occurred, which is consistent with that of the natural infected cases. In addition, the representative strains were reisolated when the sample of liver from the infected dead were inoculated on nutrient agar and blood nutrient agar (contain 7% rabbit blood) at 28 °C. The phenotypic characteristics of the reisolated ones were comparable to the description above.

The representative strains were re-checked by CCTCC, and a consistent result was presented. One was regarded as a new species of *Vibrio* and was designated as *V. olivaceus* sp. nov. from isolated fish (*P. olivaceus*) following International Code of Nomenclature of Bacteria (ICNS). Another was identified as *A. hydrophila*.

Key words Bastard halibut (*Paralichthys olivaceus* L.), Septicaemic infection, Pathogenic bacteria, Examination