

牙鲆病原秦皇岛弧菌主要生物学性状研究

房海 陈翠珍 张晓君

(河北科技师范学院动物科学系, 秦皇岛 066600)

摘要: 从秦皇岛某海水养殖场牙鲆(*Pardichthys olivaceus* L.) 细菌性败血症感染的病例中, 分离到了相应的病原细菌。经对 12 株纯培养菌进行形态特征、培养特性、理化特性等方面较系统的表观分类学指征及代表菌株 DNA 中 G+ Cmol% 的测定, 表明为弧菌属(*Vibrio* Pacini 1854) 细菌的一个新种, 并定名为秦皇岛弧菌(*Vibrio qinhuangdaora* sp. nov.)。同时对该菌的血清型进行了检定, 表明 12 株菌具有同种的 K 抗原和同种的 O 抗原(血清同源); 另外, 经以 37 种抗菌类药物做敏感性测定, 结果显示对供试的头孢唑啉等 32 种药物敏感、对青霉素 G 等 5 种耐药, 在不同菌株间无明显的敏感与耐药差异。

关键词: 牙鲆; 秦皇岛弧菌; 生物学性状

中图分类号: S941.42

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2005)04-0366-06

近年来, 国内外在水产养殖动物弧菌病(*Vibriosis*) 及相应病原弧菌方面已多有记载和报道, 所涉及的病原弧菌主要包括鳃弧菌(*V. anguillarum*)、河流弧菌(*V. fluvialis*)、灿烂弧菌(*V. splendidus*)、鲨鱼弧菌(*V. carchariae*)、解藻朊酸弧菌(*V. alginolyticus*)、美人鱼弧菌(*V. damsela*)、哈氏弧菌(*V. harveyi*)、鱼肠道弧菌(*V. ichthyoenteri*)、奥氏弧菌(*V. ordalii*)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)、杀对虾弧菌(*V. penaeicida*)、创伤弧菌(*V. vulnificus*)、杀鲑弧菌(*V. salmonicida*)、弗氏弧菌(*V. fischeri*)、火神弧菌(*V. logei*)、非 O1 霍乱弧菌[*V. cholerae* (nonO1)]、海弧菌(*V. pelagius*)、最小弧菌(*V. mimicus*)、产气弧菌(*V. gazogenes*)、坎氏弧菌(*V. campbellii*)、日本竹荚鱼弧菌(*V. trachuri*) 等^[1-14]。

作者近几年在对牙鲆(*Pardichthys olivaceus*) 的细菌性病害研究中, 曾于 2001 年对一起以败血症感染为特征的病例进行了检验(4.5 月龄左右牙鲆)。在所检 17 尾发病濒死及新鲜病死牙鲆的病变组织中, 发现均有不同量但均较多、在形态特征上表现一致的细菌; 同时以其做细菌分离, 结果均分离到了同种细菌且在形态特征上与用病料直接镜检的相一致, 对分离菌株的鉴定结果表明为弧菌属(*Vibrio*

Pacini 1854) 细菌的一个新种, 并定名为秦皇岛弧菌(*Vibrio qinhuangdaora* sp. nov.)。择其代表菌株做对健康牙鲆的人工感染试验, 表明能引起与自然病例相一致的败血症感染病变, 并能重新检出原感染菌, 显示了强致病作用及原发病原学意义。鉴于该菌为一新种病原弧菌, 所以进行了对该菌一些主要生物学性状的研究, 现将研究结果报道如下, 以便交流。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及其来源 取上述病例中 17 尾发病濒死及新鲜病死牙鲆进行检验, 发现均有肝、脾、肾等脏器不同程度肿胀(个别有出血)的败血症感染病变。以其中 6 尾的肝、肾及腹水为材料, 无菌操作接种于普通营养琼脂、含 7% 兔血营养琼脂培养基平板, 置 28℃培养 24—48h 做细菌分离; 对所分离出的细菌, 在进行菌落的数量、分布及同一性等方面的检查后, 从每尾鱼不同被检组织材料中随机取分离菌落(择每尾鱼两种被检材料的各 1 个共 2 个)分别移接于普通营养琼脂斜面(28℃培养 24h)做成纯培养后置 4℃冰箱保存供鉴定用; 6 尾鱼共做纯培养 12 株, 各菌株依次编号为 HQ010712-1 至 HQ010712-12。

1.2 细菌形态特征检查 取上述 12 株纯培养菌, 分

别接种于普通营养琼脂培养基斜面置 28℃培养 18h 做成涂片,经革兰氏染色后镜检细菌形态。

1.3 菌落特征检查 12株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)、疖疮病琼脂(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)、麦康凯琼脂(MacConkey 琼脂)、伊红美蓝琼脂等 10 种不同培养基平板,置 28℃培养 24h 和 48h 分别检查生长情况及菌落特征。

1.4 培养温度对细菌发育的影响 取上述12株纯培养菌,分别移接于(涂布接种)普通营养琼脂斜面每株各 2 管,于 37℃和 28℃条件培养 48h 检查。

1.5 在普通营养肉汤中的生长表现 取上述12株纯培养菌,分别移接于普通营养肉汤中置 28℃培养 24h 检查生长情况。

1.6 电子显微镜观察细菌形态 择代表菌株 HQ010712-1,接种于半固体培养基平板,置 28℃培养 24h 后,取菌悬浮于无菌蒸馏水中制成细菌悬液作为供试菌液,取此菌液 1 滴于经 Formvar 膜包被的铜网上,静置 1min 左右后吸除菌液,再以 0.5% 磷钨酸水溶液同样加 1 滴于铜网上负染 1min 左右,吸附菌液并待自然干燥后,置 JEM-100CX 透射电镜下检查形态特征、菌体表面结构与鞭毛形成等。

1.7 理化特性检查与细菌归类判定 对上述12株纯培养菌,分别按常规进行理化特性测定,根据结果并主要依据 1994 年出版的第九版《伯杰氏鉴定细菌学手册》及有关资料,进行对鉴定菌的归类判定^[15-17]。同时择代表菌株送中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection, CCTCC)予以复核鉴定,并以高效液相色谱法(High performance liquid chromatography, HPLC)做细菌 DNA 中 G+ Cmol%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。

1.8 菌株的血清型检定 以其中1株作为代表菌株 HQ010712-1,分别制备经福尔马林灭活的全菌(OK)免疫原、经 121℃热处理 1h 的菌体(O)免疫原,分别强化免疫接种健康家兔制备相应抗血清,以此抗血清分别对本菌株及其他各菌株作血清型的检定。具

体方法是取上述供试 12 株菌的纯培养物,分别移接于普通营养琼脂斜面 28℃培养 18h 作为 OK 玻板凝集原,分别移接于 TS 肉汤(胰酪大豆胨肉汤)各 2 管置 28℃培养 18h 后,其中 1 管直接作为 OK 试管凝集原、另 1 管经 121℃处理 1h 作为 O 试管凝集原,分别与用上述 HQ010712-1 菌株制备的 OK 及 O 抗血清做相应及交叉的玻板凝集和试管凝集试验^[15]。OK 玻板凝集原若与相应 OK、O 抗血清均呈明显凝集(++),则判定为无 O 凝集抑制性 K 抗原的存在,若仅与 OK 抗血清明显凝集、与 O 抗血清不凝则判为存在 O 凝集抑制性 K 抗原;试管凝集试验则以凝集效价相等或仅差 1 个滴度的判为同血清型菌株。

1.9 药物敏感性测定 随机取经鉴定后的纯培养菌6株(HQ010712-1 至 HQ010712-6),采用常规琼脂扩散(K-B)法进行对常用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^[18]。

2 结果

2.1 细菌形态与菌落特征

供试的 12 株菌形态特征一致,均为革兰氏染色阴性,杆状但多为短杆状、球状,有的杆状菌体稍弯曲,两端钝圆,散在、有的成双或呈 3—8 个的不规则短链状(这种排列形式以似球状菌体为多)排列,无芽孢,大小在 0.5—1.2μm×0.5—2.2μm 的细菌。

12 株菌在供试 10 种不同培养基的同种培养基上,所表现出的生长情况及菌落特征一致(表 1)。在普通营养琼脂和血液营养琼脂上的生长情况及菌落特征均与自然病例初代分离的相一致,在血液营养琼脂上使用绵羊血的与使用家兔血的所呈现的β溶血情况差异不明显。

2.2 不同培养温度及在普通营养肉汤中的细菌生长情况

12 株供试菌均仅在 28℃条件下的生长,菌苔呈较透明状的灰白色,生长中度,在 37℃无生长。在普通营养肉汤中,12 株菌生长表现一致,均为轻度均匀混浊生长,管底形成圆点状菌体沉淀摇动后呈线状上升易消散。

表 1 12 株供试菌的菌落特征

Tab. 1 The colony characteristics of 12 strains

培养基 Medium	菌落特征 Colony characteristics
普通营养琼脂	圆形光滑、边缘整齐、稍隆起、半透明、无色或近浅灰白色, 菌落直径为培养 24h 在 0.4mm 左右、48h 在 1.0mm 左右, 生长中度
血液营养琼脂	圆形光滑、边缘整齐、稍隆起、 β -溶血、无色或近浅灰白色, 菌落直径为培养 24h 在 0.5mm 左右、48h 在 1.0mm 左右, 生长中度
TCBS	圆形光滑、边缘整齐、较扁平的黄色菌落, 培养 24h 直径在 1.8mm 左右、48h 在 2.5mm 左右, 生长较丰盛, 菌落(苔)不易刮下且呈黏块状不易涂开, 刮下菌落后留下黄色菌落痕迹
庆大霉素琼脂	培养 48h 检查未见生长
XLD	圆形光滑、边缘整齐、稍隆起、黄色的菌落(菌落周边培养基下陷), 培养 24h 直径在 1.0mm 左右、48h 在 1.5mm 左右, 生长中度, 刮下菌落(下面留下黄色菌落痕迹)呈黏块状不易涂开
麦康凯琼脂	圆形光滑、边缘整齐、稍隆起、无色的菌落, 培养 24h 直径在 0.5mm 左右、48h 在 1.0mm 左右, 生长接近中度, 刮下菌落(苔)呈稍黏态不易涂开
伊红美蓝琼脂	培养 24h 划线接种起始处长出与培养基相同的紫黑色薄菌苔及一些圆形光滑、边缘整齐、直径在 0.2mm 左右的菌落, 48h 的菌落直径在 0.4mm 左右, 生长贫瘠且不易在离开划线起始部的地方生长出单菌落
FA	培养 24h 难以见到明显生长, 48h 形成圆形光滑、边缘整齐、无色的小菌落(直径在 0.1—0.2mm), 生长贫瘠
TSA	圆形光滑、边缘整齐、稍隆起、半透明的灰白色菌落, 培养 24h 直径在 0.5mm 左右、48h 在 1.5mm 左右(不透明), 生长中度
SS 琼脂	圆形光滑、边缘整齐、无色的菌落, 培养 24h 直径在 0.8mm 左右(稍隆起)、48h 在 1.2mm 左右(较扁平), 刮下菌落(苔)呈稍黏态不易涂开, 生长中度

2.3 电镜下的菌体形态

HQ010712-1 株表现在菌体表面似呈皱褶状, 形成端生(球状菌体亦可称侧生)的单鞭毛(图 1)。

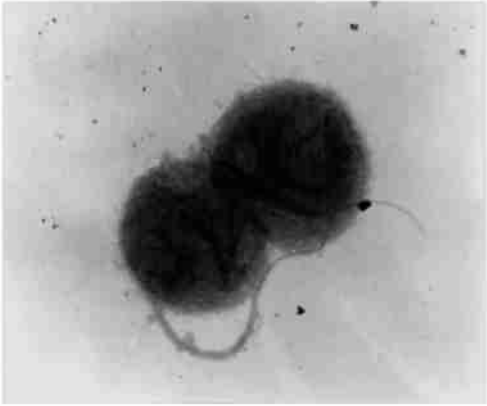


图 1 电镜照片(HQ010712-1 株, 26000 $\times$)

Fig 1 Electron micrograph of bacteria(HQ010712-1, 26000 $\times$)

2.4 理化性状与分类定名

供试 12 株菌对所测项目结果一致, 根据其相应性状认为属于弧菌属细菌的新种。择其中的 HQ010712-1 株作为代表菌株送 CCTCC 进行复核鉴定, 所测相应项目的结果(表 2)与本课题组所测的

基本一致, 同时根据相应理化性状, 依据细菌命名国际法规, 将其归为弧菌属细菌的新种并定名为: 秦皇岛弧菌(*Vibrio qinhuangdaora* sp. nov.)。

表 2 理化特性鉴定结果表

Tab. 2 Results of physiological and biochemical characteristics

项目 Item	结果 Result	项目 Item	结果 Result
革兰氏染色	-	松二糖	-
Gram stain		Turanose	
菌落表面颜色	乳白色	吐温 80	+
Colony colour	Milky White	Tween 80	
基质色素	-	阿东糖醇	-
Soluble pigments		Adonitol	
细胞形状	杆状	L-阿拉伯糖	-
Cell shape	Rod	L- Arabinose	
细胞大小(μ m)	0.5~0.7 $\times$ 1.6~2.4	D-阿拉伯醇	-
Cell size(μ m)		D- Arabitol	
形成内生孢子	-	D-纤维二糖	-
Endospores produced		D- Cellobiose	
运动	+	α -赤藓糖醇	-
Motility		α - Erythritol	

续表			
项目 Item	结果 Result	项目 Item	结果 Result
鞭毛	侧生	D-半乳糖	-
Flagella	Lateral	D-Galactose	
37℃生长	-	龙胆二糖	-
Growth at 37℃		Gentiobiose	
接触酶	+	D-果糖	-
Catalase		D-Fructose	
氧化酶	+	L-墨角藻糖	-
Oxidase		L-Fucose	
苯丙氨酸脱氨酶	-	α-D-乳糖	-
Phenylalanine deaminase		α-D-Lactose	
O-F 试验	F	m-肌醇	-
O-F test		m-Inositol	
硝酸盐还原	+	麦芽糖	+
Nitrate reduction		Maltose	
产 H ₂ S	-	海藻糖	-
H ₂ S production		Trehalose	
吲哚	-	D-甘露醇	+
Indole		D-Mannitol	
葡萄糖: 产酸	+	L-鼠李糖	-
Glucose, acid production		L-Rhamnose	
产气	-	β-甲基-D-葡萄糖苷	-
gas production		β-methyl-D-glucoside	
明胶液化	-	D-棉子糖	-
Gelatin hydrolysis		D-Raffinose	
V-P 试验	-	乙酸	-
V-P test		Acetic acid	
甲基红	-	菊糖	-
MR test		Inulin	
蔗糖还原	-	D-葡糖酸	-
Sucrose reduction		D-Gluconic acid	
柠檬酸	-	丙二酸	-
Citrate		Malonate	
脲酶	-	L-谷氨酸	-
Urease		L-Glutamic acid	
α-D-葡萄糖	-	琥珀酸	-
α-D-Glucose		Succinic acid	

续表			
项目 Item	结果 Result	项目 Item	结果 Result
D-甘露糖	-	β-半乳糖苷酶	+
D-Mannose		ONPG	
α-环状糊精	-	水杨苷	-
α-Oextrin		Salicin	
D-山梨醇	-	七叶苷	-
D-Sorbitol		Esculin	
木糖醇	-	甘油	-
Xylitol		Glycerol	
蜜二糖	-	NaCl(%): 0	-
Melibiose		3	+
O/ 129: 10μg	S	6	+
150μg	S	G+ Cmcl%(HPLC)	64. 1

注: 表中符号的+ 示阳性, - 示阴性, S 示敏感, F 示发酵型。
Notes: + , positive; - , negative; S, sensitivity, F, fermentation.

2. 5 血清型

12 株供试菌玻片凝集试验结果为仅与 1. 8 中所述 OK 抗血清呈明显凝集(+ +), 与 O 抗血清及对照的生理盐水均不凝集(-), 初步表明该菌存在 O 凝集抑制 K 抗原且表达充分。12 株供试菌的 OK 及 O 试管凝集原与 1. 8 中所述 OK 抗血清分别做对应及交叉的试管凝集试验, 结果凝集效价在 OK 凝集原的完全一致, 均为 5Log₂(1: 32); O 凝集原的完全一致, 均在 12Log₂(1: 4096), 进一步表明这些菌株存在 O 凝集抑制性 K 抗原且同源。上述 OK、O 凝集原分别与其 O 抗血清凝集效价结果为在 O 凝集原的完全一致, 均为 10Log₂(1: 1024), 表明 12 株菌 O 抗原为同源的; OK 凝集原的完全一致, 均于第 1 管(1: 2 倍) 即无凝集(0Log₂), 比相应 O 凝集原的低 10 个抗体滴度, 更进一步表明了 K 抗原的存在及强 O 凝集阻断作用。

2. 6 对抗菌类药物的敏感性

供试的 6 株菌对 37 种抗菌类药物的敏感性, 结果未见株间的明显差异, 均表现对头孢唑啉、头孢拉啶、头孢噻肟、头孢曲松、头孢他啶、头孢哌酮、头孢吡肟、氨曲南、红霉素、阿奇霉素、链霉素、卡那霉素、庆大霉素、妥布霉素、丁胺卡那霉素、新霉素、大观霉素、诺氟沙星、氧氟沙星、环丙沙星、四环素、多西霉素、氯霉素、利福平、复方新诺明、甲氧苄啶、呋喃妥因、呋喃唑酮、恩诺沙星、新生霉素、万古霉素、多黏菌素等 32 种敏感, 对杆菌肽、克林霉素、青霉素 G、苯唑青霉素及氨苄青霉素等 5 种耐药。

3 讨论

3.1 在1994年出版的《伯杰氏鉴定细菌学手册》第九版中,共记载了弧菌属细菌 37 个种及生物型,另外则是杀对虾弧菌 (*V. penaeicida* Ishimaru *et al* 1995)、日本竹荚鱼弧菌 (*V. trachuri* Iwamoto *et al* 1996)、鱼肠道弧菌 (*V. ichthyenteri* Ishimuru *et al* 1996) 等一些新致病种的报道。本次所检出的牙鲆病原细菌,经较系统的鉴定表明为弧菌属细菌的新种,依据细菌命名国际法规,以其分离地(秦皇岛)进行了相应种的命名即:秦皇岛弧菌,参考菌株(Reference strain)为 HQ010712-1 株。该菌区别于前述已明确记载的种及所报道的新种,在所对应的相应项目中主要特征为:精氨酸双水解酶阴性、氧化酶阳性、硝酸盐还原试验阳性、分解葡萄糖产酸不产气、V-P 试验阴性、需 Na⁺、37℃ 不生长、淀粉酶阳性、不液化明胶、脂酶阳性、不利用乙酸盐、纤维二糖阳性、不利用柠檬酸盐 (Simmons)、半乳糖阳性、D-葡萄糖酸盐阴性、肌醇阴性、乳糖阴性、甘露醇阳性、甘露糖阳性、蜜二糖阴性、L-鼠李糖阴性、水杨苷阴性、山梨醇阴性、蔗糖阳性、海藻糖阳性、木糖阴性、阿拉伯糖阴性、L-谷氨酸阴性。对该病原菌的检出与研究尚属首次,不仅增添了弧菌属细菌的新内容,在细菌分类学、相应的毒力因子及致病作用研究等方面也均具有一定的学术价值和实践意义,同时也能为鱼类其他病原菌的检验与研究、鱼类新病原菌的检出与研究等提供借鉴。

3.2 通过普通营养琼脂等10种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、XLD、SS、麦康凯琼脂培养基上生长中度或接近中度,在供试的 TCBS 培养基上生长较丰盛,菌落特征易观察描述;在供试的伊红美蓝琼脂、FA 培养基上生长贫瘠;在庆大霉素琼脂培养基上培养 48h 检查,仍无生长。基于此种情况,认为在对该菌进行分离培养时,可根据该菌在这些供试培养基上的生长情况及菌落特征等予以选择使用。

3.3 通过以血清学凝集反应测定,表明所分离鉴定的 12 株秦皇岛弧菌均存在同种的 K 抗原和同种 O 抗原(血清同源),其中 O 抗原具有强免疫原性,K 抗原的免疫原性弱但具有强 O 凝集抑制作用,通过热处理(121℃作用 1h)试验表明该 K 抗原为不耐热性的。

3.4 经以37种抗菌类药物对其中6株秦皇岛弧菌的

药敏测定,尚未发现在不同菌株间对某种抗菌药物敏感或耐药的明显差异性,这一结果初步显示所测菌株在对供试抗菌类药物中所表现出的一致性,有益于对选择用药防治由该菌引起的感染症的参考。

参考文献:

- [1] Wang G L, Xue L Y, Jin S, *et al*. Epidemiological studies on the skin ulcer disease of *Lateolabrax japonicus* in marine cage culture[J]. *Acta Hydrobiologica sinica*, 2000, **24**(4): 392—395[王国良,薛良义,金珊,等.海水网箱养殖鲈鱼皮肤溃疡病的流行病学研究,水生生物学报,2000, **24**(4): 392—395]
- [2] Austin B, Austin D A. Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish[M]. Third (Revised) Edition. Praxis Publishing Ltd, Chichester, UK. 1999, 29—32, 106—140
- [3] Zhang X J, Zhan W B, Chen C Z, *et al*. Studies on the infection and pathogen of *Edwardsia tarda* in flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Acta Hydrobiol. sin.*, 2005, **29**(1): 31—37[张晓君,战文斌,陈翠珍,等.牙鲆迟钝爱德华氏菌感染症及其病原的研究,水生生物学报,2005, **29**(1): 31—37]
- [4] Shen J Y, Yin W L, Qian D, *et al*. Studies on pathogens of bacterial diseases of *Eriocheir sinensis* [J]. *Journal of fishery sciences of China*. 2000, **7**(3): 89—92[沈锦玉,尹文林,钱冬,等.中华绒螯蟹“腹水病”及“抖抖病”并发病病原的研究,中国水产科学,2000, **7**(3): 89—92]
- [5] Ma J M, Wang Q, Ma F H, *et al*. A Pathogen of septicopyaemia in the abalone *Haliotis discus hannai* ino. Dalian, China [J]. *Journal of Fisheries of China* 1996, **20**(4): 332—336[马建民,王琦,马福恒,等.皱纹盘鲍脓毒败血症病原菌的发现及初步研究,水产学报,1996, **20**(4): 332—336]
- [6] Wang G L, Zheng T L, Jin S, *et al*. Preliminary studies on pathogen of ascites disease of cultured *Sparus macrocephalus* [J]. *Chin J Vet Sci*, 2003, **23**(1): 33—35[王国良,郑天伦,金珊,等.黑雕幼鱼腹水病病原菌,中国兽医学报,2003, **23**(1): 33—35]
- [7] Xu B F, Lin N F, Yang J X, *et al*. Isolation identification and pathogenicity analysis of *Vibrio parahaemolyticus* from *pseudosciaena crocea* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2002, **17**(3): 174—177[许斌福,林能锋,杨金先,等.大黄鱼副溶血弧菌的分离、鉴定及致病力分析,福建农业学报,2002, **17**(3): 174—177]
- [8] Anguianobltran R, Searcybernal M L, Lizaragapapitla, *et al*. Pathogenic effects of *Vibrio alginolyticus* on Larvae and postlarvae of the red adalone [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1998, **33**(2): 112—119
- [9] Zhang X H, Austin B. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids [J]. *Journal Fish Disease*, 2000, **23**: 93—102
- [10] Mo Z L, Mao Y X, Chen S Y, *et al*. Classification for one pathogenic *Vibrio anguillarum* strain isolated from skin ulcer flounder [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2002, **42**(3): 263—269[莫照兰,茅云翔,陈师勇,等.一株牙鲆皮肤溃烂症病原菌的鉴定,微生物学报,2002, **42**(3): 263—269]
- [11] Mo Z L, Mao Y X, Chen S Y, *et al*. Classification and molecular biological analysis of one pathogenic bacterium associated with hemorrhages of cultured flounder [J]. *High technology letters*, 2001, **12**:

- 12—17[莫照兰, 茅云翔, 陈师勇, 等. 一株牙鲆出血症病原菌的分子生物学鉴定, 高技术通讯, 2001, 12: 12—17]
- [12] Mo Z L, Mao Y X, Chen S Y, *et al.* Identification and phylogenetic analysis of one pathogenic bacterium associated with swollen abdomen of cultured flounder (*Paralichthys olivaceus*) larvae[J]. *Oceanologiae limnologia sinica*, 2003, 34(2): 131—141[莫照兰, 茅云翔, 陈师勇, 等. 养殖牙鲆鱼苗腹水症病原菌的鉴定及系统发育学分析, 海洋与湖沼, 2003, 34(2): 131—141]
- [13] Chang J B, Gong X H, Sun F X, *et al.* Preliminary studies on a pathogen of vibriosis of cultured *Paralichthys olivaceus* [J]. *Marine fisheries research*, 2001, 22(1): 37—41[常建波, 宫向红, 孙逢贤, 等. 养殖牙鲆弧菌病病原菌初步研究, 海洋水产科学, 2001, 22(1): 37—41]
- [14] Wu H B, Pan J P. Progress in studies of vibriosis in aquaculture[J]. *Journal of fishery sciences of China*. 2001, 8(1): 89—93[吴后波, 潘金培. 弧菌属细菌及其所致海水养殖动物疾病, 中国水产科学, 2001, 8(1): 89—93]
- [15] Yang Z S, Fang H. Human and animal pathogenic bacteriology[M]. Shijiazhuang: Hebei Science and Technology Press, 2003, 1403—1421, 1523—1643[杨正时, 房海. 人及动物病原细菌学. 石家庄: 河北科技出版社, 2003, 1403—1421, 1523—1643]
- [16] Krieg N R, Holt J G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[M]. Volume 1. London: Williams and Wilkins, Baltimore, 1984, 518—538
- [17] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, *et al.* Bergey's Manual of Determinative Bacteriology [M]. Ninth Edition. Baltimore, Williams and Wilkins, 1994, 190—194, 253—274
- [18] Ye Y W, Wang Y S. Operating specification for clinical examination of national(2th ed) [M]. Nanjing: Southeast university press, 1997, 553—562[叶应妩, 王毓三. 全国临床检验操作规程(第二版), 南京: 东南大学出版社, 1997, 553—562]

STUDIES ON BIOLOGICAL PROPERTIES OF *VIBRIO QINHUANGDAORA* SP. NOV. ISOLATED FROM DISEASED FLOUNDER *PARALICHTHYS OLIVACEUS*

FANG Hai, CHEN Cui-Zhen and ZHANG Xiao-Jun

(Department of Animal Science, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao, 066600)

Abstract: Pathological bacteria were isolated from diseased flounder suffered bacterial septicemic infection in Qinhuangdao. Identification of morphological, culturing, physiological and biochemical characteristics to 12 pure cultures and detection of the mol%G+C ratio of the DNA to representative strain, showed that the pathogenic bacteria belonged to a new species of *Vibrio* (paci 1854) and were designated as *Vibrio qinhuangdaora* sp. nov. Simultaneously, we conducted examinations on the homology of serum, the results showed that the tested 12 strains have the same O-antigen and the same K-antigen. In addition, the susceptibilities of isolates to 37 antimicrobial agents were detected, the results showed that all the strains were sensitive to cefazolin *et al.*, were resistant to penicillin G *et al.*, and there isn't obvious discrepancy of sensitivity and resistance between strains.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; *Vibrio qinhuangdaora* sp. nov; Biological properties