

文章编号:1000-0615(2009)02-0311-07

养殖大菱鲂中牙鲆肠弧菌的分离鉴定及组织病理学

吕俊超, 李轩, 韩茵, 陈吉祥, 张晓华

(中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要:2007年1月,山东省胶南某养殖场人工养殖的大菱鲂发生严重病害并大批死亡。病鱼的主要症状是体表溃疡,腹腔积液,肠道肿胀,肝脏萎缩,胆囊暗绿色等。从病鱼胆囊中分离纯化得到优势菌株,命名为da3。人工感染试验证实,该菌株对大菱鲂有较强的致病性。对体重为25g的大菱鲂的半数致死量为每尾鱼 2×10^6 CFU。通过细菌16S rDNA序列测定及形态学和生理生化特征研究确定,该病原菌为牙鲆肠弧菌(*Vibrio ichthyenteri*)。组织病理学观察表明,病鱼的肝脏、肾脏、脾脏、肠道和脑的微观结构发生了明显的病理变化,由此引起的器官功能衰竭可能是病鱼死亡的主要原因。

关键词:大菱鲂;牙鲆肠弧菌;分离鉴定;组织病理

中图分类号:S 941.3

文献标识码:A

大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)为鲽形目(Pleuronectiformes)鲽科(Bothidae)菱鲂属(*Scophthalmus*)鱼类,原产大西洋东北部区域,因生长迅速,肉质鲜美,营养丰富,性情温顺,上世纪九十年代被引进我国,现已在我国北方沿海形成大规模养殖,形成巨大的产业^[1-2]。但是随着引进时间的推移和由于养殖方式的不完善,经常有新的病害发生,其中最主要的是细菌感染引起的疾病。在我国已经报道了感染大菱鲂的多种病原菌,其中弧菌病是最集中也是危害较大的一个类群。从世界范围看,弧菌病是最常见的海水养殖鱼类病害,常见的有鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)、创伤弧菌(*V. vulnificus*)、溶藻胶弧菌(*V. alginolyticus*)、灿烂弧菌(*V. splendidus*)、大菱鲂弧菌(*V. scophthalmi*)及费氏弧菌(*V. fischeri*)等引发的疾病^[3-5]。

2007年1月,山东省胶南某大菱鲂养殖场发生严重的病害,鱼体下方表层溃疡、鳍有血丝、腹部有细的血丝,经解剖观察,发现多个内脏器官发生病变。较明显的病变有:腹腔有淡黄色腹水,肠道透明并充水肿胀,肝脏萎缩、色暗红,胆囊颜色暗绿。本研究从病鱼胆囊中分离纯化出优势菌株,对该菌株进行了分类鉴定,并进行了人工感染

试验。此外,还对病鱼进行了组织病理学研究。

1 材料与方法

1.1 分离病原菌

实验所用大菱鲂均来自山东省胶南某养殖场。2007年1月,从该养殖场取得发病大菱鲂,用无菌生理盐水冲洗后,以无菌操作方式解剖,观察其病理变化,并取肝脏、脾脏、胆囊、肾脏、脑及体表溃疡等处的内部组织分别匀浆涂布于LBN(含2% NaCl的LB)培养基平板。28℃培养24h,用划线法分离纯化其优势菌落。选取从胆囊中分离纯化的优势菌株,将其命名为da3,并以该菌株进行后续实验。将纯化的菌株置于15%的甘油-生理盐水溶液中,-80℃保存备用。

1.2 各器官组织切片检测

分别取自然发病大菱鲂的肝脏、脾脏、肾脏、肠道、脑、心脏等器官处的组织,用Bouin氏液固定12h,石蜡包埋后进行切片,切片厚度4μm,以H.E对比染色法染色,中性树胶包埋,显微镜观察和拍照。

1.3 人工感染试验

试验用健康大菱鲂(体重约25g)随机分组,每组6尾,以70cm×50cm大小的水族箱注入

收稿日期:2008-03-14 修回日期:2008-10-09

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2007AA09Z434);农业部公益性行业科研专项(nyhyzx07-046)

通讯作者:张晓华,E-mail:xhzhang@ouc.edu.cn

20 cm 深的海水进行饲养,定时投食、通气和部分换水,养殖温度控制在 16~17 ℃。将从发病大菱鲆胆囊中分离出的优势菌株 da3,接种于 LBN 培养基斜面,28 ℃ 培养 24 h,灭菌生理盐水振荡洗下,用灭菌生理盐水进行梯度稀释,以涂布平板法测定菌液浓度。感染剂量为每尾鱼注射菌悬液 0.5 mL,并设立对照组。每天正常饲喂并通气换水,连续饲养并观察,随时记录发病及死亡情况。根据文献[6]提供的方法,测定该菌对大菱鲆的半数致死量。

1.4 病原菌的分类鉴定

细菌染色 将所得病原菌进行革兰氏、芽孢、鞭毛等染色并镜检。

细菌 16S rDNA 序列测定 以基因组提取试剂盒(天根生化科技有限公司生产)提取细菌的全基因组 DNA,采用细菌 16S rDNA 通用引物,

扩增保守区段的第 8 到 1510 核苷酸序列。扩增正向引物 P11: 5' - AGA GTTIGATCC TGGCTC AG - 3'(对应于 *E. coli* 8 - 27),反向引物 P12: 5' - GGTTACCTTGTTACGACTT - 3'(对应于 *E. coli* 1492 - 1510)。引物由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 反应条件: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 1 min, 55 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 1.5 min, 30 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。扩增产物经低熔点琼脂糖凝胶电泳纯化回收后与 PMD-18T 载体连接,再转入大肠杆菌 JM109 菌株,选取阳性克隆,送北京博尚生物工程公司测序。根据测序结果,在 NCBI 中用 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 进行同源性比较,取相似性最高的序列,采用 DNASTAR 软件进行进化树分析,做图。

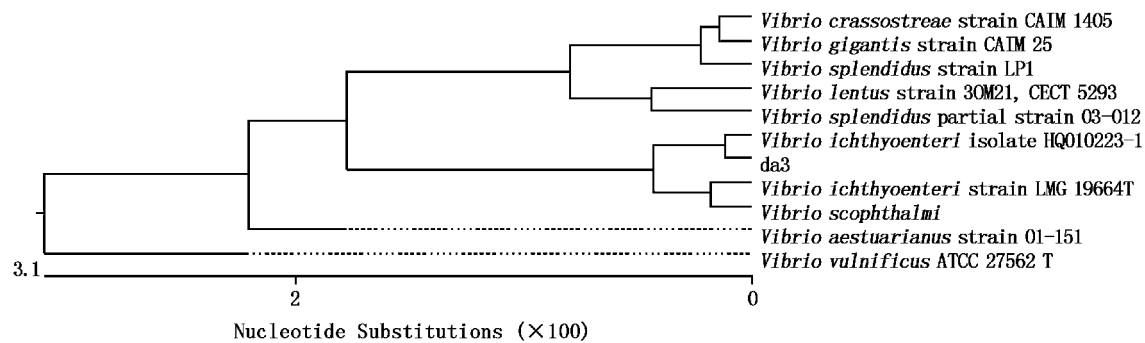


图1 根据菌株 da3 的 16S rDNA 序列构建的进化树

Fig.1 Phylogenetic tree of 16S rDNA sequence of the strain da3

生理生化特征检测 采用法国生物梅里埃公司生产的微量多项试验鉴定系统(API 20E 生理生化检测试剂盒和美国 Biolog 公司生产的 BIOLOG 微生物自动分析系统),参照产品使用说明对所得细菌进行生理生化特征检测。

2 结果

2.1 病原菌的分离及致病性

发病大菱鲆的胆汁涂布和肝组织涂布得到较多的菌落,且两者菌落表面特征相似,而其他器官组织只得到零星的菌落。从发病大菱鲆胆囊和肝脏中分离出的优势菌株,在 LBN 培养基上形成的菌落为灰褐色半透明,状湿润黏稠,可沿接种环所划的痕迹轻微扩散,培养 24 h 菌落大小为 0.5 mm 左右。在 TCBS 培养基上可生长并显示黄

色。选定来自胆囊的一株细菌(da3)进行后续实验。菌株 da3 腹腔注射感染大菱鲆的结果见表 1,统计结果表明该菌对大菱鲆的半数致死量为每尾 2×10^6 CFU。

2.2 病原菌的分类鉴定

细菌染色结果 经过染色,光学显微镜观察,所得菌株均显示为革兰氏阴性,弧形,不形成芽孢,有极生单鞭毛。

病原菌 16S rDNA 的序列比较 菌株 da3 基因组 DNA 提取后作为模板,用细菌 16S rDNA 通用引物扩增目标产物,与载体连接并在大肠杆菌中扩增后,提取质粒并测序,所得序列在 Genbank 数据库中与已登录细菌的 16S rDNA 序列比较,发现与牙鲆肠弧菌两个菌株的相似性分别达到 99.8% 和 98.1%。

表 1 分离菌株 da3 腹腔注射感染大菱鲆的结果

Tab.1 Results of the turbot challenged with isolated bacterial strain da3 by intraperitoneal injection

| 注射剂量 (CFU) dose | 试验鱼(尾) tested fish | 死亡鱼(尾) fish mortality | | | |
|--------------------|-----------------------|-----------------------|-----|-----|-----|
| | | 1 d | 2 d | 3 d | 7 d |
| 2×10^7 | 6 | 2 | 3 | 1 | 0 |
| 2×10^6 | 6 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 2×10^5 | 6 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 2×10^4 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 对照组 control | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |

表 2 分离菌株 da3 的形态和生理生化特征

Tab.2 Morphological, biophysiological and biochemical characteristics of bacterial strain da3

| 鉴定项目 items | da3 | <i>V. ichthyenteri</i> 标准菌株 ^[7] | 鉴定项目 items | da3 | <i>V. ichthyenteri</i> 标准菌株 ^[7] |
|--|-----|---|--|-----|---|
| 形态 form | 弧形 | 弧形 | N-乙酰-D-半乳糖胺 N-Acetyl-D-Galactosamine | + | |
| 运动性 motility | + | + | N-乙酰-D-葡萄糖胺 N-Acetyl-D-Glucosamine | + | |
| 革兰氏染色 Gram stain | - | - | D-果糖 D-Fructose | + | |
| 鞭毛 flagella stain | + | | α -D-葡萄糖 α -D-Glucose | + | + |
| TCBS | 黄 | 黄/绿 | D-甘露糖 D-Mannose | + | + |
| β -半乳糖苷酶 ONPG | - | - | 胸苷 Thymidine | + | |
| 精氨酸水解 ADH | - | - | D-葡萄糖酸 D-Gluconic acid | + | - |
| 赖氨酸脱羧 LDC | + | - | β -羟丁酸 β -Hydroxybutyric acid | + | |
| 鸟氨酸脱羧 ODC | - | - | D,L-乳酸 D,L-Lactic acid | + | |
| 柠檬酸利用 CIT | - | | 次黄苷/肌苷 Inosine | + | |
| 产 H ₂ S H ₂ S | - | | D-海藻糖 D-Trehalose | - | - |
| 尿素酶 URE | - | | 核糖醇 Adonitol | - | - |
| 色氨酸脱氨酶 TDA | - | | D-阿拉伯醇 D-Arabitol | - | - |
| 吲哚形成 IND | - | - | D-纤维二糖 D-Cellobiose | - | - |
| V. P. 试验 V. P. test | - | - | 赤藓糖醇 Erythritol | - | - |
| 运动性 MOB | + | + | D-半乳糖 D-Galactose | - | - |
| 明胶酶 GEL | - | - | D-半乳糖醛酸 D-Galacturonate | - | - |
| 葡萄糖产酸 GLU | + | + | 乳糖 Lactose | - | - |
| 葡萄糖产气 GLU | - | - | 麦芽糖 Maltose | - | - |
| 甘露醇 MAN | - | - | | | |

· 续上表 ·

| 鉴定项目 items | da3 | <i>V. ichthyenteri</i> 标准菌株 ^[7] | 鉴定项目 items | da3 | <i>V. ichthyenteri</i> 标准菌株 ^[7] |
|-----------------|-----|---|-----------------------------|-----|---|
| 肌醇 | - | | 甘露醇 | - | - |
| INO | | | Mannitol | | |
| 山梨醇 | - | | 甘露糖 | - | - |
| SOR | | | Mannose | | |
| 鼠李糖 | - | - | 蜜二糖 | - | - |
| RHA | | | Melibiose | | |
| 蔗糖 | + | +/- | 甲基-D-葡萄糖苷 | - | - |
| SAC | | | Methyl-D-Glucoside | | |
| 蜜二糖 | - | - | 棉子糖 | - | - |
| MEL | | | Raffinose | | |
| 苦杏仁苷 | - | - | D-山梨醇 | - | - |
| AMY | | | D-Sorbitol | | |
| 阿拉伯糖 | - | - | D-海藻糖 | - | + |
| ARA | | | D-Trehalose | | |
| 硝酸盐还原 | + | + | γ -氨基丁酸 | - | - |
| NO ₂ | | | γ -Aminobutyric acid | | |
| 腐胺 | - | - | L-亮氨酸 | - | - |
| Putrescine | | | L-Leucine | | |

注: BIOLOG 细菌鉴定系统结果为阴性并且《伯杰氏系统细菌学手册》第二版未收录的生理生化特征本表未列出

Notes: The negative results identified by BIOLOG system which are not included in Bergeys Manual of Determinative Bacteriology (2nd edition) were omitted from this table

生理生化特征鉴定结果 对所得菌株 da3, 采用 API 20E 和 BIOLOG 细菌鉴定系统鉴定, 其主要生理生化特征列于表 2, 该表中所用牙鲈肠弧菌 (*V. ichthyenteri*) 标准菌株特征引自《伯杰氏系统细菌学手册》第二版^[7]。菌株 da3 与牙鲈肠弧菌标准菌株的生理生化特征基本一致, 仅在赖氨酸脱羧和利用碳源 D-葡萄糖酸的能力方面有差异。综合菌株 da3 的 16S rDNA 测序结果及生理生化特征结果, 可以确定该菌株为牙鲈肠弧菌。

2.3 组织病理切片的观察结果

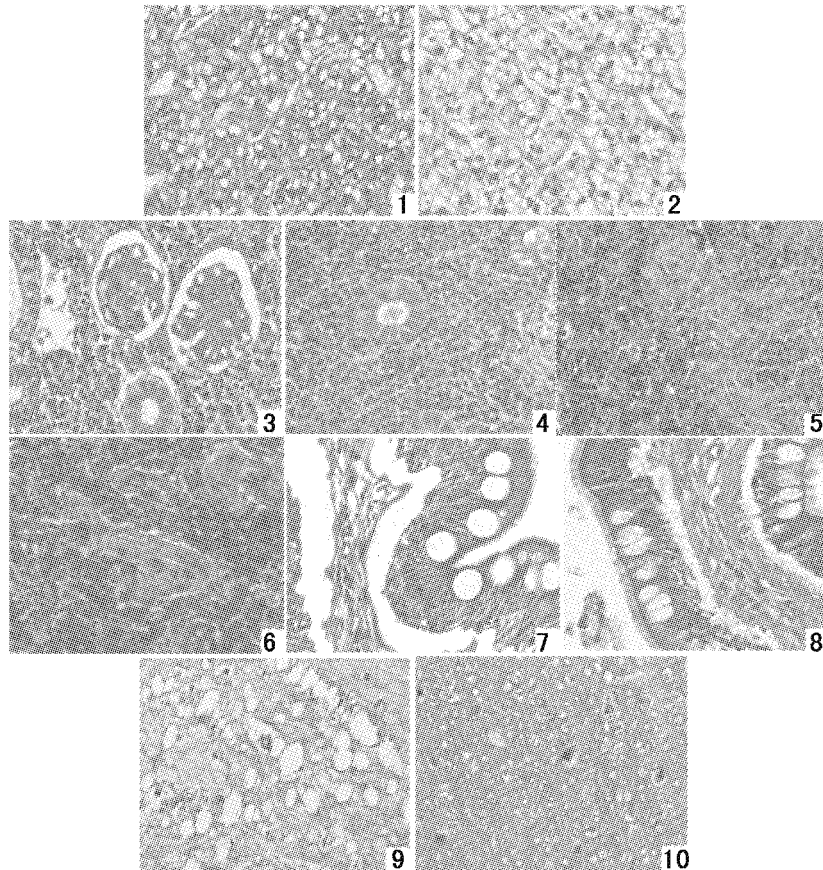
将自然发病大菱鲆和正常鱼的组织切片干燥后于光学显微镜下观察, 可见病鱼肝脏、脾脏、肾脏和肠道有较明显的变化, 另外脑部也发生变化。病鱼肝脏中可见肝细胞萎缩变形, 排列杂乱, 细胞间的界限不明显, 胞内物质凝缩形成沉淀状, 染色变深, 嗜碱性; 红细胞数目减少(图版-1)。病鱼脾脏中红细胞数目明显减少, 说明脾脏的造血功能受损(图版-3)。病鱼肾脏中可见肾组织细胞的细胞膜受损, 细胞核极度膨胀, 核内容物沉积, 强烈嗜碱性; 肾小管萎缩; 红细胞数目较少(图版-5)。小肠绒毛杯形细胞膨胀变圆; 固有层极度萎缩(图版-7)。脑组织中出現大型病理性空泡(图版-9)。正常鱼的肝脏(图版-2)、脾脏(图版-4)、肾

脏(图版-6)、肠道(图版-8)和脑组织(图版-10)未发现任何组织病理变化。

3 讨论

霍乱弧菌是被发现的第一种弧菌, 由意大利医生 Filippo Pacini 首次报道。霍乱弧菌曾给人类带来巨大灾难, 而随后发现的多种弧菌都是人或动物的致病菌。人类致病菌中危害较大的有霍乱弧菌、副溶血弧菌、创伤弧菌等, 水产养殖病原弧菌中较重要的有鳃弧菌、杀鲑弧菌、创伤弧菌和哈维氏弧菌等, 这些弧菌直接或间接给人类带来相当大的损失^[8]。

牙鲈肠弧菌最初由日本人于 1996 年从日本牙鲈的消化道中分离得到, 模式菌株为 LMG 19664^T。迄今为止, 有关牙鲈肠弧菌的资料还很少, 正式报道作为鱼类病原菌的只有日本、韩国和中国等少数几例^[9-12]。从地域上看, 已报道的发现地集中在东亚地区一个很小的范围内, 其中中国报道的菌株由陈翠珍等^[11]于渤海沿岸的养殖牙鲈中分离到。美国的 Gauger 等^[13]在发病牙鲈的肾脏中分离到该种细菌, 可是腹腔注射却未引起有效感染, 而且发现该种细菌有多个生理生化类型; 他们认为该菌的致病力可能与感染条件有关,



图版

1. 病鱼的肝脏组织;2:正常鱼的肝脏组织;3:病鱼的肾脏组织;4:正常鱼的肾脏组织;5:病鱼的脾脏组织;6:正常鱼的脾脏组织;7:病鱼的肠道组织;8:正常鱼的肠道组织;9:病鱼的脑组织;10:正常鱼的脑组织

Plate

1. the tissue of the liver from an infected fish; 2: the tissue of the kidney from a normal fish; 3: the tissue of the kidney from an infected fish; 4: the tissue of the kidney from a normal fish; 5: the tissue of the spleen from an infected fish; 6: the tissue of the spleen from a normal fish; 7: the tissue of the intestine from an infected fish; 8: the tissue of the intestine from a normal fish; 9: the tissue of the brain from an infected fish; 10: the tissue of the brain from a normal fish

比如运输过程中造成的胁迫可能使鱼易染此病。还有报道口服该菌能引起牙鲆感染^[14],可见消化道也可能易被该病菌突破;但该菌并不只在肠道中生长,也曾有人在肾脏和腹膜中分离到^[13],而我们从发病大菱鲆的胆囊和肝脏中均分离到该种菌。Pujalte 等^[15]研究发现,在西班牙地中海沿岸海水养殖的金头鲷(*Sparus aurata*)中,全年各时期都能在鱼肠道中检测到有类似该菌的菌体,但并不引起鱼类产生明显的临床症状。而同是西班牙的 Montes 等^[16]却于夏秋季节在大菱鲆的养殖环境中分离到该种菌。迄今为止,正式报道自然感染该菌而致病的只有牙鲆^[9-12],腹腔注射感染试验可见斑马鱼能耐受较高浓度的菌液。可能该种菌对牙鲆和大菱鲆等部分鱼类有特异的致病

力,而在另一些鱼中属于正常的肠道菌。

据陈翠珍等^[11]的试验结果,人工感染的牙鲆症状为鳍基、口部、下颌、鳃裂后部及腹面有不同程度出血;剖检有不很透明的腹水,肠道内无食物且充有淡黄色黏液并有程度不同、数量不一的白线状团块物,这与我们所观察的自然发病大菱鲆的症状基本一致;而肝脏肿胀、胆囊稍肿、肾及脾均肿胀等症状与我们所观察的略有出入。出现这种结果的原因可能和菌株不同以及继发感染有关,也可能和宿主不同有关。陈翠珍等^[11]分离到的菌株不能在 TCBS 培养基上生长, β -半乳糖苷酶阳性,精氨酸双水解酶阴性,蔗糖发酵阴性,而菌株 da3 的以上特征相反,其中在 TCBS 培养基上生长时菌落及其周围培养基均为黄色;菌株

da3 与《伯杰氏系统细菌学手册》中的牙鲆肠弧菌标准菌株在赖氨酸脱羧和利用碳源 D-葡萄糖酸的能力方面有差异。我们认为病原菌可能会发生变异,生理特性改变的同时,病原菌的侵染特性和宿主范围也可能发生相应的改变。

感染牙鲆肠弧菌而发病的大菱鲆,解剖可见体内脏器有明显异常表现,组织学检查发现肝和肾细胞大片坏死,这些病变可能引起器官功能衰竭而成为死亡的主要原因之一;在肝、肾和脾的组织切片中都发现红细胞数目减少,这说明该细菌可以引起大菱鲆的败血症,这可能也是死亡的原因之一。

参考文献:

- [1] 雷霖霖. 海水养殖新品种介绍——大菱鲆[J]. 中国水产, 2004, 4: 38-39.
- [2] 雷霖霖. 大菱鲆养殖技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003.
- [3] 张正, 王印庚, 杨官品, 等. 大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 细菌性疾病的研究现状[J]. 海洋湖沼通报, 2004, 3: 83-89.
- [4] 王印庚, 张正, 秦蕾, 等. 养殖大菱鲆主要疾病及防治技术[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(6): 61-68.
- [5] 张晓华. 海洋微生物学[M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2007.
- [6] Wardlaw A C. Practical statistics for experimental biologists[M]. Chichester: John Wiley and Sons, 1985.
- [7] Garrity G M. Bergey's manual of systematic bacteriology (2nd edn) [M]// The Proteobacteria. New York: Springer-Verlag, 2005.
- [8] Thompson F L, Iida T, Swings J. Biodiversity of *Vibrios* [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2004, 68(3): 403-431.
- [9] Ishimaru K, Akagawa-Matsushita M, Muroga K. *Vibrio ichthyenteri* sp. nov., a pathogen of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) larvae [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1996, 46(1): 155-159.
- [10] Kim D H, Han H J, Kim S M, et al. Bacterial enteritis and the development of the larval digestive tract in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel) [J]. Journal of Fish Diseases, 2004, 27(9): 497-505.
- [11] 陈翠珍, 房海, 张晓君, 等. 牙鲆鱼肠道弧菌感染症及病原特性研究[J]. 热带海洋学报, 2006, 25(5): 80-86.
- [12] Moon Y G, Heo M S. Use of 16S-23S rRNA intergenic spacer region for species-specific primer developed of *Vibrio ichthyenteri* [J]. The Korean Journal of Microbiology, 2005, 41(2): 117-124.
- [13] Gauger E, Smolowitz R, Uhlinger K, et al. *Vibrio harveyi* and other bacterial pathogens in cultured summer flounder, *Paralichthys dentatus* [J]. Aquaculture, 2006, 260: 10-20.
- [14] Muroga K, Yasunobu H, Okada N, et al. Bacterial enteritis of cultured flounder *Paralichthys olivaceus* larvae [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1990, 9: 121-125.
- [15] Pujalte M J, Bobadilla A S, Pellitero P A, et al. Carriage of potentially fish-pathogenic bacteria in *Sparus aurata* cultured in Mediterranean fish farms [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2003, 54: 119-126.
- [16] Montes M, Farto R, Perez M J, et al. Genotypic diversity of *Vibrio* isolates associated with turbot (*Scophthalmus maximus*) culture [J]. Research in Microbiology, 2006, 157: 487-495.

**Isolation and identification of *Vibrio ichthyenteri* in farmed
turbot (*Scophthalmus maximus*)
and histopathology study of the diseased fish**

LV Jun-chao, LI Xuan, HAN Yin, CHEN Ji-xiang, ZHANG Xiao-hua
(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: In January 2007, an epizootic occurred among cultured turbot (*Scophthalmus maximus*) in a fish farm in Jiaonan, China. The diseased turbot exhibited hemorrhagic ulcer on the body, abundant yellowish ascetic fluid filled in the body cavity, swollen intestine, necrosis of liver and darkened cholecyst. Samples were taken aseptically from the hepatopancreas, spleen, gall bladder, kidney and brain, and inoculated immediately onto LBN (LB medium supplement with 2% NaCl) plates, which were incubated at 28 °C for 24 h. A predominant strain, which was designated as da3, was isolated from the gall bladder of the infected fish. Pathogenicity assays revealed that da3 was virulent to turbot by intraperitoneal injection challenge. The LD₅₀ of da3 to turbot was calculated as 2×10^6 CFU/fish to the 25 g weight turbot. Strain da3 was a Gram-negative, curved bacterium with single polar flagellum, and could grow on TCBS medium and produce yellow colonies. Strain da3 was similar to *Vibrio ichthyenteri* in morphological, most of the physiological, biochemical characteristics and 16S rDNA sequence except in lysinedecarboxylase (LDC) and the ability of using D-Gluconic acid. Strain da3 was identified to be *V. ichthyenteri*. Portions of liver, spleen, kidney, intestine, brain and heart from the naturally diseased turbot were sampled, fixed in Davidson's fixative for 12 h, and then were processed for paraffin embedding. Paraffin blocks of the tissues were cut at 4 μm thickness, and the sections were stained by the procedure of H. E. The slides were examined using an Olympus microscope, and images were captured with digital camera. There were distinctive histopathological changes in liver, kidney, spleen and intestine of the diseased turbot, and to a less extent in the brain. In the liver, necrosis of the hepatocytes were observed, and erythrocytopenia in the vein of the liver illustrated a septicemia. In the kidney, lesions of histocytes membrane, necrosis of some renal tubules, and decreased number of erythrocytes was observed. In the spleen, the number of erythrocytes decreased sharply, indicating the damage to the hematopoiesis. In the intestine, the intestinal villus goblet cells expanded to round, and the lumina propria necrosed severely. Examination of fixed tissues from healthy turbot showed structure integrity in liver, kidney, spleen and intestine. The histopathological changes in the diseased turbot may lead to the dysfunction of the organs. The results of this study may be important for controlling the bacterial disease of turbot.

Key words: *Scophthalmus maximus*; *Vibrio ichthyenteri*; identification; histopathology