

香港养殖海鲷弧菌致病菌药物敏感性及其耐药质粒研究^{*}

李 军^{1 2} 叶 军¹ 傅慰亭² 胡应劭² 徐怀恕¹

(¹ 青岛海洋大学海洋生物系 青岛 266003)

(² 香港中文大学生物系 香港)

摘 要 从发病海鲷 (*Sparus sarba*) 中共分离到 51 株弧菌 (*Vibrio*), 经 API20E 细菌快速鉴定系统及 Alsina 和 Blanch 关键生理生化特性分析鉴定为 7 个种, 它们分别是: 溶藻胶弧菌 (*V. alginolyticus*) 24 株, 创伤弧菌 (*V. vulnificus*) 12 株和副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*) 7 株, 火神弧菌 (*V. logei*) 4 株, 远洋弧菌 II 菌 (*V. pelagius* II) 2 株, 河弧菌 (*V. fluvialis*) 1 株和地中海弧菌 (*V. mediterranei*) 1 株。其中 3 种优势菌溶藻胶弧菌、创伤弧菌和副溶血弧菌证实对海鲷有致病性。另外采用平板稀释法检测了 51 株菌对 16 种抗菌素的敏感性。发现所有菌株对 ceftriaxone、链霉素、萘啶酮酸和利福霉素敏感, 几乎所有菌株对 ceftazidime、netilmicin、氯霉素和 sulfamethoxazole 敏感。大部分菌株对氨苄青霉素 (60.8%)、cefuroxime (66.7%)、丁胺卡那霉素 (55%)、卡那霉素 (58.8%) 和三甲氧苄氨嘧啶 (76.5%) 等具有较强的耐药性。通过对菌株中所含有的耐药质粒进行分析, 发现 15 株菌株含有 1~4 个质粒, 分子量范围为 9~123 kb 之间, 对 12 株既含有较大分子量质粒又具有耐药性的菌株进行了质粒转化试验, 结果其中 9 株菌的质粒具有转化能力, 转化率为 10^{-11} ~ 10^{-9} , 表明所分离的菌株的抗药性是由于细菌染色体相关突变造成的。

关键词 海鲷, 弧菌, 弧菌病, 药敏试验, 质粒, 转化

分类号 R378.3 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)05-0461-08

弧菌广泛分布于沿岸海水及河口水体中, 其中部分种类能导致野生及养殖海产鱼、虾及贝类等的弧菌病^[1~4]。但是, 在水产养殖中, 随着抗生素等化学药物的长期过量使用, 导致细菌抗药性的日益严重^[5,6]。另外, 很多嗜盐性弧菌还是潜在的人类致病菌^[7]。海鲷是一种经济价值较高的海水养殖鱼类。近年来由于养殖生态环境污染和高密度养殖导致海鲷弧菌病频繁爆发, 给海鲷养殖业造成巨大的经济损失^[2]。本文报道了发病海鲷体内弧菌的主要类群, 并重点就其对常用抗生素的敏感性以及抗药性菌株可能存在的耐药性质粒等进行了研究, 以期揭示香港地区海鲷养殖生态环境中致病弧菌的种类组成以及导致环境细菌产生日益严重抗药性的原因。

1 材料和方法

1.1 实验鱼

发病海鲷取自香港吐露港和白沙湾网箱养殖场, 采样时间为 1995 年 5 月~1997 年 2

^{*} 本研究由香港中文大学生物系及 UNESCO 部分资助 (No. 861.359.8)。

青岛海洋大学海洋生物系郑家声教授, 香港中文大学生物系罗家雯女士以及微生物系凌美麟博士参加部分工作, 特此致谢。

收稿日期: 1997-10-16, 修回日期: 1998-08-15

月。病鱼的主要症状为鱼体表面出血、背、尾鳍溃烂,有的出现眼珠混浊、鳞片脱落,解剖后常可观察到内脏器官肝、肾肿大、充血,有的出现腹水。健康海鲷(体重 150~200g)取自香港中文大学海洋研究所。

1.2 标准菌株

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)(AS1.1614)和溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)(AS1.1587)获自中国科学院微生物研究所菌种保藏中心。抗菌素敏感试验质控标准菌大肠杆菌(*Escherichia coli*)NCTC 10418 和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)NCTC 10662 标准质粒对照菌 *E. coli* 40R646, 48R626, RT641, A0R268, A0R448, 28R823 及质粒转化受体菌株 *E. coli* Jp995 均获自香港中文大学微生物学系。

1.3 细菌的分离纯化和鉴定

取垂死病鱼,以无菌操作取病鱼肝脏、肾、眼、体表病灶组织,匀浆后,取上清液涂布硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖(简称 TCBS)培养基平板,28℃ 培养,待长成明显菌落后,挑取单菌落在 2216E 培养基上划线纯化。细菌纯培养物于 -80℃ 条件下保存于含 15% 甘油的 TSB 培养基(Difco 产品)。

所分离的 51 株菌以及 2 标准菌株主要采用 API20E 细菌快速鉴定系统(bioMérieux S. A, Motalieu Vercieu, France)进行鉴定,部分菌株参照 Alsina 与 Blanch 的方法^[8]鉴定。

1.4 毒力试验

选择部分优势菌株采用腹腔注射方法人工感染健康海鲷(10 条/组),注射剂量为 0.2mL/条菌液(10^9 cfu/mL)同时设注射无菌生理盐水的对照。试验鱼饲养于室内水族箱(约 500L 水体)中,水温控制在 25℃,每天投喂人工饵料^[9],连续观察 2 周,记录死亡鱼数。

1.5 抗生素敏感试验

采用平板稀释法^[7]在 Mueller Hinton 琼脂(Oxoid, UK)中加入抗生素至一定浓度,倒培养皿制成抗生素平板,其中三甲氧苄氨嘧啶(trimethoprim)和 sulfamethoxazole 两种抗生素培养基中需补加 5% 马血。挑取 2216E 平板上单菌落,制成 3×10^8 cfu/mL 菌悬液,用多点接种器(Denley, England)接种抗生素平板,28℃ 培养 24h,观察结果。同时,标准菌 *E. coli* NCTC 10418 和 *P. aeruginosa* NCTC 10662 作为阳性对照。

1.6 质粒的提取和分子量测定

51 株细菌连同 6 株含标准质粒的对照菌株,按照文献^[10,11]方法并稍加修改提取细菌质粒。挑取平板菌落,悬浮于 200 μ L 裂解液(3% SDS, 50mmol/L Tris, pH11.2.6)中,55℃ 水浴保温 1h,加酚:氯仿(1:1)抽提,离心取上清液,0.7% 琼脂糖凝胶电泳,电压 12V/cm 4.5h。然后经溴化乙锭染色,紫外灯下观察结果(Bio-Rad 的紫外成像系统)。

质粒分子量是应用 JANDEL 程序按各样品质粒 DNA 带迁移距离参照已知分子量质粒的标准曲线来确定的。

1.7 质粒转化试验

选择既具有抗药性又含质粒的菌株作为供体菌。对含利福霉素抗性的受体菌 JP995 进行质粒转化实验。分别将供体菌和受体菌接种营养肉汤培养基,适温培养 4h,各取 2mL 混合,过滤收集菌体,将细菌连同滤膜一起贴在 MacConkey 琼脂平板上培养过夜,然

后振荡洗脱膜上细菌,并作 10 倍系列稀释,分别从 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} 四个稀释度各取 0.1mL,涂布于含利福霉素和待测供体菌所耐受抗生素的双重选择性 MacConkey 培养基上,37℃ 培养 24~48h,计数生长菌落数求平均值即为含有转入抗性质粒的 Jp995 菌数。同样分别从 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 三个稀释度中取 0.1mL 涂布于只含利福霉素的 Mac-Conkey 平板,培养并计算受体菌 Jp995 的总菌数,按下列公式计算转化率:转化率=转化了弧菌质粒的 Jp995 菌数/受体菌总数

2 结果

2.1 细菌的分类和鉴定

应用 TCBS 弧菌选择性培养基共从发病海鲷中分离出 51 株细菌,其菌体均为杆状或短杆状,极生单鞭毛运动,革兰氏反应阴性,氧化酶阳性,发酵葡萄糖产酸,对弧菌抑制剂 O/129 敏感,因此均具备弧菌属的典型特性,可确定为弧菌^[12]。应用 API 20E 细菌快速鉴定系统鉴定,部分不确定菌株参照 Alksina 和 Blanch 的生理生化法进行补充鉴定。鉴定结果 51 株菌分属于 7 个种(表 1),其中溶藻胶弧菌(*V. alginolyticus*)24 株,占 47.06%;创伤弧菌(*V. vulnificus*)12 株,占 23.53%和副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)7 株,占 13.73%;为优势菌种,而火神弧菌(*V. logei*)、远洋弧菌(*V. pelagius*)II 型、地中海弧菌(*V. mediterranei*)和河弧菌(*V. fluvialis*)等为非优势菌种。

表 1 从发病海鲷鱼体所分离 51 株细菌的组成

Table 1 Compersion of 51 isolates from diseased *Sparus sarba*

细菌种类 Species	菌株数 Number of strains	组成比例 Percentage / %	细菌种类 Species	菌株数 Number of strains	组成比例 Percentage / %
溶藻胶弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	24	47.04	远洋弧菌 (<i>V. pelagius</i>)	2	3.92
创伤弧菌 <i>V. vulnificus</i>	12	23.53	河弧菌 <i>V. fluvialis</i>	1	1.96
副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	7	13.73	地中海弧菌 <i>V. mediterranei</i>	1	1.96
火神弧菌 <i>V. logei</i>	4	7.84			

2.2 致病力

三种优势菌种的部分菌株对海鲷人工感染试验结果表明,试验菌株均可使海鲷发病,发病死亡率介于 10%~60%之间,症状与自然发病鱼相似。11d 后没有鱼再发病死亡,部分发病鱼症状开始消失。对照组没有鱼发病(表 2)。

2.3 抗生素敏感性

51 株菌株对 16 种不同浓度的抗生素的敏感性结果见表 3。所有菌株对 ceftriaxone,链霉素,萘啶酮酸和利福霉素敏感,几乎所有菌株对 ceftazidime(96%),氯霉素(98%)和 sulfamethoxazole(98%)敏感。51 株弧菌分离株中,有 31 株对氨苄青霉素具有较强的抗性。大部分菌株对头孢氨苄(66.7%),丁胺卡那霉素(55%),卡那霉素(58.8%)和三甲氧苄氨嘧啶(76.5%)等具有一定的耐药性(表 3)。

表 2 试验菌株对海鲷的致病性试验

Table 2 Pathogenicity of selected *Vibrio* strains to *Sparus sarba*

菌种 Species	菌株号 Strain No.	感染剂量 Bacterial dose ($\times 10^8$ cfu/mL)	试验鱼数 Number of fish tested	死亡鱼数 Number of dead fish	死亡率 Mortality /%
溶藻胶弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	9	1×10^8	10	6	60
	243	1×10^8	10	5	50
	270	1×10^8	10	4	40
创伤弧菌 <i>V. vulnificus</i>	42	1×10^8	10	6	60
	114	1×10^8	10	2	20
副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	193	1×10^8	10	3	30
	68	1×10^8	10	1	10
对照 Control	—	—	10	0	0

表 3 51 株弧菌分离株对 16 种抗生素的敏感性

Table 3 Susceptibilities of 51 isolates to 16 antimicrobial agents

抗生素 [*] Antibiotics [*]	菌株数 Number of strains exhibiting			抗生素 [*] Antibiotics [*]	菌株数 Number of strains exhibiting		
	R ¹	I ²	S ³		R ¹	I ²	S ³
Str	0	0	51	Net	0	7	44
NA	0	0	51	Cef	0	8	43
Rif	0	0	51	Gen	0	14	37
Cet	0	0	51	An	0	28	23
Chl	0	1	50	Kan	0	30	21
S	0	1	50	TMP	1	38	12
Cez	0	2	49	Ceu	8	26	17
Tet	0	7	44	Amp	30	1	20

* 注 (Note) Str :链霉素(Streptomycin);NA :萘啶酮酸(Nalidixic acid);Rif :利福霉素(Rifampicin);Cet :Ceftriaxone;
Chl :氯霉素(Chloramphenicol);S :Sulfamethoxazole;Cez :Ceftazidime;Tet :四环素(Tetracycline);Net :Netilmicin;Cef :Cef-
tioxur;Gen :庆大霉素(Gentamicin);An :丁胺卡那霉素(Amikacin);Kan :卡那霉素(Kanamycin);TMP :三甲氧苄氨嘧啶
(Trimethoprim);Ceu :头孢氨苄(Cefuroxime);Amp :氨苄青霉素(Ampicillin). ¹R :高度耐药(32 mg/L);²I :中等耐药
(18 mg/L);³S :敏感(1 mg/L).

2.4 耐药性质粒及制裁粒转化特性

在 51 株细菌中共检测到 15 株菌(占 29.4%)中含有较大分子量(9~123 kb)的质粒,其中大部分菌株含有 1~2 个质粒,81 号菌株则含 4 个分子量不同的质粒,含有质粒的菌株对多种抗生素具有抗药性,且它们的抗药性类型相似(表 4 和 6)。

根据抗生素敏感试验和质粒电泳结果,选择 12 株菌进行氨苄青霉素抗性质粒和头孢氨苄抗性质粒的转化试验,同时对其 2 株菌进行三甲氧苄氨嘧啶抗性制裁粒的转化试验,结果 9 株菌可以将抗性质粒及相应的抗药特性转移给受体菌,转化率介于 10⁻¹¹~10⁻⁹(表 5)。

表 4 细菌的质粒分析结果*
Table 4 Results of plasmid analysis

菌种 Species	菌株号 Strain No.	质粒数 Number of plasmids	质粒大小 Plasmid size/kb	抗药性 Antibiotic resistance
溶藻胶弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	5	1	18	Amp ,Ceu ,An ,TMP
	6	1	18	Amp ,Ceu ,Gen ,TMP
	9	1	78	Amp ,Ceu ,An ,TMP
	63	1	78	Amp ,Ceu ,An ,Kan ,TMP
	64	1	74	Amp ,Ceu ,CF ,Kan ,Gen ,TMP
	276	1	72	Amp ,Ceu ,An ,KN ,Tet ,TMP
	71	2	78 ,81	Amp ,Ceu ,Kan ,TMP
	272	2	108 ,123	Amp ,Ceu ,An ,Kan ,Gen ,TMP
	243	2	108 ,123	Amp ,Ceu ,An ,Kan ,TMP
创伤弧菌 <i>V. vulnificus</i>	81	4	50 ,85 ,89 ,105	Amp ,Ceu ,TMP
	42	1	9	Amp ,Ceu ,An ,Kan ,Gen ,Net ,TMP
	110	1	30	An ,Kan
	114	1	31	Gen ,Net ,An ,Kan
	125	1	39	An ,Kan ,Tet
	278	1	68	Amp ,Ceu ,TMP
<i>V. parahaemolyticus</i>				

* 其余 36 株菌未检测到质粒。No plasmids in other 36 stains.

表 5 三种抗性粒转化率测定结果
Table 5 Results of transformation efficiency of 3 resistant plasmids

Ampicillin 抗性质粒 Anti-ampicillin plasmid		Cefuroxime 抗性质粒 Anti-cefuroxime plasmid		Trimethoprim 抗性质粒 Anti-trimethoprim plasmid	
菌株号 Strain No.	转化率 Transformation efficiency	菌株号 Strain No.	转化率 Transformation efficiency	菌株号 Strain No.	转化率 Transformation efficiency
42	0	42	0	5	4.2×10^{-10}
278	0	278	1.1×10^{-10}	6	1.0×10^{-10}
5	1.4×10^{-9}	5	3.8×10^{-10}		
6	5.3×10^{-11}	6	5.0×10^{-10}		
9	7.3×10^{-10}	9	1.0×10^{-10}		
63	1.7×10^{-10}	63	8.6×10^{-9}		
64	3.1×10^{-11}	64	1.3×10^{-9}		
71	0	71	5.0×10^{-10}		
81	0	81	4.8×10^{-9}		
243	0	243	0		
272	0	272	0		
276	2.0×10^{-10}	276	0		

表 6 质粒存在和细菌抗药性的关系

Table 6 Relationship between the presence of plasmids and resistance to antibiotics

抗药性 Antibiotic resistance	菌株数 Number of strains		抗药性 Antibiotic resistance	菌株数 Number of strains	
	无质粒 Without plasmids	存在质粒 With plasmids		无质粒 Without plasmids	存在质粒 With plasmids
Amp	19	12(38.7%)*	TMP	27	12(30.8%)
Kan	19	11(36.7%)	Net	5	2(28.6%)
Gen	9	5(35.7%)	Tet	5	2(28.6%)
An	18	10(35.7%)	CF	7	1(12.5%)
Ceu	22	12(35.3%)			

* 抗药菌株质粒检出率, percentage of strains with plasmids.

3 讨论

弧菌广泛分布于海洋沿岸的水环境中,其中部分种类是沿岸海水以及许多海洋动物体表或消化道内的正常菌群(normal flora)^[1],弧菌也是引起海水鱼、虾和贝类等爆发性细菌病最常见的病原菌之一,其致病性受宿主的生理状态及水质环境条件等综合因素的影响较大,往往被认为是条件致病菌^[1,13,14]。本文报道了从发病海鲷中分离的 51 株弧菌,它们分属于 7 个不同的种,其中优势菌种为溶藻弧菌,创伤弧菌和副溶血弧菌,这和以前的研究结果一致^[2]。毒力试验表明,所选择的部分优势菌株在试验条件下都可以使海鲷发生弧菌病死亡,但是不同菌株对鱼体的致病力存在很大的差异。尤其是用较低浓度的细菌攻击试验鱼,鱼的发病死亡率很低,甚至没有死亡。这可能是由于试验鱼体抵抗力较强或试验条件下不合适的结果。

51 株菌对各种不同浓度的抗生素的敏感性大致相同。所有菌株对 ceftriaxone、链霉素、萘啶酮酸和利福霉素敏感,几乎所有菌株对 ceftazidime(96%)、氯霉素(98%)和 sulfamethozazole(98%)敏感。说明这些抗生素对防治本研究所分离的 51 株弧菌是有效的。大部分分离株对氨苄青霉素、头孢氨苄、丁胺卡那霉素、卡那霉素和三甲氧苄氨嘧啶等具有耐药性。其中,当氨苄青霉素的浓度在 128mg/L 下仍有 51% 菌株显示抗药性,表明在分离病原的养殖海鲷中氨苄青霉素的耐药株比例高且耐药性较强,这跟养殖过程中长期过量使用上述抗生素有关。该结果与 French 等对从香港沿岸水环境以及临床样品中所分离的相应弧菌的药物敏感性结果相似,大多数菌株同样对氨苄青霉素、三甲氧苄氨嘧啶以及头孢氨苄等抗生素具有较强的耐药性,对氯霉素和四环素敏感^[7]。但是,在他们的研究中,发现大多数菌株对 sulfamethozazole 具耐药性^[7],这和研究结果恰恰相反。两者的差异可能与采样的时间和空间上的不同有关。

细菌抗药性的产生主要有两方面的原因:一方面由于存在耐药质粒,另一方面由于环境污染所造成细菌抗药突变^[12]。本文对所分离菌株的质粒分析结果表明,有 29.4% 的菌株含有 1~4 个质粒,分子量为 9~123kb。细菌抗药性的产生通常跟存在的耐药质粒及其转化能力有关。可以转化的质粒通常具有较大分子量。在本研究中,尽管含有质粒的菌株其耐药性一般较不含质粒的菌株强(表 3 和 4);具有较强耐药性的菌株中,质粒检

出率也相应较高(表 6),但是,大多数对氨苄青霉素,头孢氨苄,卡那霉素和三甲氧苄嘧啶等具有较强耐药性的菌株都未检测到质粒存在(表 6)。说明在香港地区,养殖生态环境中致病菌抗药性的产生主要是由于环境污染所诱导的细菌染色体基因抗性突变造成的。这就从一个侧面反映出加强环保意识,限制过量使用抗菌素的重要性和迫切性。

本文对既有耐药性又含质粒的菌株进行了质粒转化能力的试验结果显示,12 株抗氨苄青霉素菌株中有 6 株具有质粒转化能力,转化率为 $10^{-11} \sim 10^{-9}$;12 株抗 Cefuroxime 菌株中,有 8 株具转化能力,转化率也同样在 $10^{-11} \sim 10^{-9}$ 之间。2 株抗 Trimethoprim 菌株的质粒转化率为 10^{-10} 。可见三种抗生质粒的转化能力普遍较低。所分离菌株普遍对多种抗生素有耐药性,有的菌株不含质粒,有的菌株含有不止一个质粒,前者细菌抗药性是染色体基因抗生突变的结果,而对后者可能是染色体基因和质粒所共同介导的,但针对细菌某一种抗药性,主要是由质粒还是由染色体基因抗性突变造成的,多质粒菌株具体由那一个质粒控制等问题,尚需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Austin B, Austin D A. Bacterial fish pathogens: Disease in farmed and wild fish. 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons Press, 1993
- [2] Woo N Y S, Ling J L M, Lo K M. *Journal of SunYatsen University, Supplement*, 1995, 3: 192~193.
- [3] 吴后波, 潘金培. 水产学报, 1997, 21(2): 171~174.
- [4] 刘秀珍, 邹晓理, 莫小燕等. 热带海洋, 1994, 13(1): 81~86.
- [5] Saitanu K, Chongthaleong A, Endo M et al. *Asian Fisheries Sciences*, 1994, 7: 41~46.
- [6] Son R, Rusul G, Sahilah A M et al. *Letters in Applied Microbiology*, 1997, 24: 479~482.
- [7] French G L, Woo M L, Hui Y W et al. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1989, 24: 183~194.
- [8] Alsina M, Blanch A R. *Journal of Applied Bacteriology*, 1994, 76: 79~85.
- [9] Woo N Y S, Kelly S P. *Aquaculture*, 1995, 135: 229~238.
- [10] Kado C I, Lin S T. *Journal of Bacteriology*, 1981, 145: 1365~1373.
- [11] Borrego J J, Morinigo M A, Martinez-Manzanares et al. *Journal of Medical Microbiology*, 1991, 35: 264~269.
- [12] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A et al. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins Press, 1994.
- [13] Valerie I, Roberts R J, Bromage N R. *Bacterial Diseases of Fish*. Cambridge: The University Press, 1993, 109~121.
- [14] Egidius E. *Aquaculture*, 1987, 67: 15~28.

ANTIBIOTIC RESISTANCE AND PLASMID PROFILES OF VIBRIO ISOLATES FROM CULTURED SPARUS SARBIA

Li Jun^{1,2} Yie Jun¹ Fu Weiting(Rita W. T. Foo)²
Hu Yingsha(Norman Y. S. Woo)² Xu Huaishu

(¹ Department of Marine Biology, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003)

(² Department of Biology, The Chinese University of Hong Kong, Shatin N T, Hong Kong)

Abstract A total of 51 potential pathogenic vibrios were isolated from moribund silver seabream.

Sparus sarba, which were collected from local fish farms of Hong Kong. All the isolates were classified and identified as 7 species by the API 20 E system and the scheme of Alsina & Blanch. These species were *Vibrio alginolyticus* (24 strains), *Vibrio vulnificus* (12 strains), *Vibrio parahaemolyticus* (7 strains), *Vibrio logei* (4 strains), *Vibrio pelagius* II (2 strains), *Vibrio fluvialis* (1 strains) and *Vibrio mediterranei* (1 strains). Among these isolates, the three predominant species (*V. alginolyticus*, *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus*) were confirmed to be virulent to sea bream by experimental challenge. All isolates were also screened for plasmid DNA by agarose gel electrophoresis and tested for susceptibility to 16 antimicrobial agents by the agar dilution method. Of the 51 isolates examined, all strains were sensitive to ceftriaxone, streptomycin, nalidixic acid and rifampicin, and almost all were sensitive to ceftazidime, netilmicin, chloramphenicol and sulfamethoxazole except one or two strains. Most isolates were resistant to ampicillin (60.8%), cefuroxime (66.7%), amikacin (55%), kanamycin (58.8%) and trimethoprim (76.5%). Fifteen of the 51 isolates harboured 1~4 plasmids, with sizes ranging from 9 to 123 kb. Both the plasmids and the associated antimicrobial resistance (ampicillin, cefuroxime and trimethoprim) of 9 isolates could be transferred to recipient by single-step conjugation, however, the frequencies were very low, ranging from 10^{-11} to 10^{-9} . The present results indicate that resistance to these antibiotics is chromosomal.

Key words *Sparus sarba*, *Vibrio*, Vibriosis, Antimicrobial susceptibility test, Plasmid, Transformation.

This work was partly supported by the Department of Biology, The Chinese University of Hong Kong and UNESCO (Contract No. 861.359.8)