

# 石鲈病原琼氏不动杆菌形态型 I 的鉴定\*

陈翠珍 房海 张晓君

(河北科技师范学院动物科学系 秦皇岛 066600)

**摘要:** 从由杀鲈气单胞菌 (*Aeromonas salmonicida*) 所引起的石鲈 (Stone flounder, *Kareius bicoloratus* L.) 细菌性败血感染症病 (死) 鱼肝、脾、肾及肠内容物中, 同时检出了作为继发感染的病原菌。经对 6 株纯培养菌在形态特征、理化特性等方面较系统的表观分类学指征鉴定及代表菌株 DNA 中 G + C mol% 的测定, 表明为琼氏不动杆菌的一个新形态型并定名为琼氏不动杆菌形态型 I (*Acinetobacter junii* morphovar I); 同时, 对该菌进行了血清型、对抗菌类药物的敏感性及其致病作用等方面的试验, 初步表明此 6 株菌具有同种的表面 (K) 及同种的菌体 (O) 抗原。对供试 37 种抗菌类药物在不同菌株间的敏感及耐药无明显差异, 对供试石鲈及牙鲈均具有较强的致病作用。

**关键词:** 石鲈, 琼氏不动杆菌形态型 I, 鉴定

**中图分类号:** S943 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 03-0034-06

## Identification of *Acinetobacter junii* Morphovari from Diseased Stone Flounder (*Kareius bicoloratus* L.) \*

CHEN Cui-Zhen FANG Hai ZHANG Xiao-Jun

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

**Abstract:** Successive pathogenic bacteria were examined from liver, spleen, kidney and contents of intestine of diseased stone flounder (*Kareius bicoloratus* L.) occurring bacterial septicaemia infection caused by *Aeromonas salmonicida*. Identification of extensive phenotypic information to 6 pure cultures and detection of the mol% G + C ratio of the DNA to representative strains, showed that the examined bacteria belonged to a new morphovar of *Acinetobacter junii*, and was designated as *Acinetobacter junii* morphovar I. In addition, serotype, antibiotic sensitivity and pathogenicity of isolates were studied, the results showed that the 6 strains have the same K-antigen and O-antigen, there are no obvious differences in sensitivity and resistance to used 37 antimicrobial agents between strains, and have strong pathogenicity to experimental stone flounder and Bastard halibut.

**Key words:** Stone flounder (*Kareius bicoloratus* L.), *Acinetobacter junii* morphovar I, Identification

已知不动杆菌属 (*Acinetobacter* Brisou and Prévot 1954) 的某些种, 是比较常见的医院感染病原菌之一, 被称为不动杆菌感染 (acinetobacter infection)<sup>[1,2]</sup>; 对陆生动物致病的报道还较少, 已有记述其可致新生驹的败血症、牛乳腺炎及水牛流产等<sup>[3]</sup>; 作为水产养殖动物的病原不动杆菌, 已有明确记述和报道的主要有乙酸钙不动杆菌 [*A. calcoaceticus* (Beijerinck 1911) Baumann et al. 1968]、鲍氏不动杆菌 (*A. baumannii* Bouvet and Grimont 1986) 及鲁氏不动杆菌 [*A. lwoffii* (Audureau 1940) Brisou and Prévot 1954 emend. Bouvet and Grimont 1986] 等<sup>[4-9]</sup>。

\* 河北省科技厅科技攻关项目 (No. 02220502D)

通讯作者 Tel: 0335-2039084, E-mail: chencuizhen@163.com

收稿日期: 2004-08-06, 修回日期: 2004-10-26

近几年我们在对鱼类病害研究中, 于 2001 年从以败血症感染为主要特征的石鲈病例中, 除检出了作为原发病原菌的杀鲈气单胞菌 (*Aeromonas salmonicida*) 外, 还同时检出了作为继发感染的一种病原菌, 经鉴定为琼氏不动杆菌 (*A. junii* Bouvet and Grimont 1986) 的一种新形态型并定名为琼氏不动杆菌形态型 I (*Acinetobacter junii* morphovar I)。为便于学术交流, 现将对其主要性状研究结果作如下报告。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株及来源

2001 年 3 月, 河北某水产养殖场所养殖的 2~3 月龄石鲈发病, 于发病高峰期取发病濒死及新鲜死亡鱼 15 尾进行检验, 均表现有肝脏肿胀或有不同程度出血点、脾脏及肾脏不同程度肿胀等的败血症感染病变。取其中 10 尾做病原学检验, 结果表明该病例的原发病原菌为杀鲈气单胞菌的一个新亚种 (subsp. nov.), 并经择代表菌株送中国典型培养物保藏中心 (China Center for Type Culture Collection, CCTCC) 予以复核鉴定与分类定名为杀鲈气单胞菌杀鲈亚种 (*Aeromonas salmonicida* subsp. *flounderacida* subsp. nov.)。同时还从其中 2 尾鱼中检出了作为继发感染的另一种细菌, 随机取分离菌落 (每尾鱼 3 个) 做纯培养 6 株, 其编号依次为 HQ010320B-1 至 HQ010320B-6。

### 1.2 细菌形态特征与生长表现的检查

取上述 6 株纯培养菌, 分别移接于普通营养琼脂斜面各 2 管分置 28℃、37℃ 培养 18h 做涂片, 经革兰氏染色后镜检细菌形态; 分别划线接种于普通营养琼脂等 12 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; 分别移接于普通营养琼脂斜面 (涂布接种) 每株各 2 管, 分置于 37℃ 和 28℃ 条件下培养 48h 检查生长情况及菌苔特征; 分别移接于普通营养肉汤管中, 置 28℃ 培养 24h 做液体培养的生长表现检查; 取上述供试菌代表菌株 (HQ010320B-1 株), 接种于半固体琼脂培养基, 置 28℃ 培养 24h 后, 制备磷酸钨负染色标本做透射电子显微镜下形态特征检查。

### 1.3 理化特性与归类判定

将上述 6 株纯培养菌, 分别接种于细菌理化特性鉴定用培养基后按常规进行理化特性测定<sup>[10,11]</sup>, 根据结果并主要依据第九版《Bergey's Manual of Determinative Bacteriology》(1994) 及有关资料, 进行对鉴定菌的初步归类判定<sup>[4,11,12]</sup>。在此基础上择 1 个代表菌株 (HQ010320B-1 株) 送 CCTCC 予以表观性状的复核鉴定、DNA 中 G + C mol% 测定、负染色标本的透射电子显微镜下形态特征检查等, 最后确定其相应的分类位置。

### 1.4 血清型及血清同源性测定

取上述 6 株供试菌的 1 个代表菌 (HQ010320B-1 株) 株, 接种于普通营养肉汤 2 瓶 (100mL/瓶) 置 28℃ 培养 18h 后, 分别制备经福尔马林灭活的全菌体 (OK) 免疫原、经 121℃ 热处理 1h 的菌体 (O) 免疫原; 以此免疫原 (经离心浓缩) 分别强化免疫健康家兔制备相应的 OK、O 抗血清。以此抗血清分别对本菌株 (HQ010320B-1 株) 及其他 5 株做凝集反应血清型检定, 玻片凝集原为普通营养琼脂斜面置 28℃ 的 18h 培养物, 若与 OK、O 抗血清均呈基本一致凝集强度的明显凝集 (++) 则判定为可能无明显 O 凝集抑制性 K 抗原的存在或虽然有 K 抗原但表达不良, 若仅与 OK 抗血清明显凝集、与 O 抗血清不凝或仅轻微不明显的凝集则判为存在 O 凝集抑制性 K 抗原; 试管凝集原为普通营养肉汤 28℃ 的 18h 培养物, 分为全菌 (OK) 凝集原及经 121℃ 处理 1h

的菌体 (O) 凝集原, 分别与上述 OK、O 抗血清做对应及交叉的试管凝集反应<sup>[13]</sup>, 以凝集价相等或仅差 1 个抗体滴度者判为同种血清型菌株 (血清同源)。

1.5 致病作用检验

择上述代表菌株 (HQ010320B-1 株), 移接于普通营养肉汤中 28℃ 培养 18h 后制备成  $9 \times 10^8$  CFU/mL 菌悬液, 以此菌液对健康石鲮 (3 月龄左右)、牙鲆 (5 月龄左右) 各 6 尾 0.3 mL/尾的感染 (腹腔接种) 试验, 以检验其致病作用。同时设立仅接种无菌营养肉汤的对照石鲮牙鲆各 6 尾。

1.6 对抗菌类药物的敏感性测定

对上述经鉴定后的菌株, 采用琼脂扩散法 (K-B) 进行对常用抗菌类药物的敏感性测定, 以抑菌圈直径的大小作为敏感与耐药的判定指标<sup>[14]</sup>。

2 结果

2.1 形态及菌落特征

6 株供试菌在 28℃ 培养的形态一致, 均为革兰氏染色阴性、无芽孢、两端钝圆、散在或个别成双排列、大小在  $0.6 \sim 1.0 \mu\text{m} \times 1.0 \sim 1.6 \mu\text{m}$  的杆状 (球杆状) 细菌; 在 37℃ 培养的与 28℃ 培养的相一致, 但似表现稍大些 (多在  $0.6 \sim 1.0 \mu\text{m} \times 1.0 \sim 2.0 \mu\text{m}$ ), 另外出现有如同亚葫芦状、肥大个体、蚯蚓状长丝体、粗细不均的长丝体、肾形、不规则菌体形、不规则长丝体、一端膨大的长丝体、曲颈瓶状等的异常菌体形态, 且这些异常形态的菌体均表现个体明显较大。6 株菌在供试的同种培养基上, 其生长情况和菌落特征相一致 (表 1)。

表 1 供试菌的菌落特征

培养基	菌 落 特 征
普通营养琼脂	圆形光滑、边缘整齐、稍隆起、不透明、浅灰白色、质地较黏、菌落直径为 24h 多在 1.2mm 左右、48h 多在 2.0mm 左右, 生长丰盛
血液营养琼脂	基本与普通营养琼脂上的相同, 近乳白色, 具有较狭窄且不很明显的 $\beta$ -溶血现象 (绵羊血的比家兔血的更弱), 生长丰盛
TCBS 培养基	24h 和 48h 检查均未见生长
庆大霉素琼脂	24h 和 48h 检查均未见生长
XLD 培养基	24h 检查未见明显生长, 48h 检查见有少数菌落出现, 特征为圆形光滑、边缘整齐、稍隆起、无明显颜色、较黏稠、直径 0.5mm 左右, 生长贫瘠
麦康凯琼脂	圆形光滑、边缘整齐、较隆起、无色、黏稠不易刮下, 24h 直径多在 1.0mm 左右、48h 多在 1.5mm 左右, 生长较丰盛
伊红美蓝琼脂	圆形光滑、边缘整齐、较扁平、较黏稠、浅灰褐色 (较培养基本色浅)、24h 直径多在 0.5mm 左右, 48h 的菌落中心色深、直径多在 2.0mm 左右, 生长丰盛
FA 培养基	圆形光滑、边缘整齐、稍隆起、半透明、较黏稠、乳白色, 24h 直径多在 0.2mm 左右、48h 多在 0.5mm 左右, 生长接近中度
TSA 培养基	圆形光滑、边缘整齐、稍隆起、半透明、较黏稠、乳白色, 24h 直径多在 0.5mm 左右、48h 多在 1.0mm 左右, 生长中度
SS 琼脂	24h 检查见有直径多在 0.2mm 左右的无色小菌落, 48h 检查见菌落呈圆形光滑、边缘整齐、稍隆起、无色、较黏稠、直径多在 0.8~1.0mm, 生长中度
RS 培养基	圆形光滑、边缘整齐、稍隆起的菌落, 培养 24h 直径多在 1.0mm 左右 (浅绿色且中心色重)、48h 多在 1.2mm 左右 (深绿色), 生长中度
2216E 培养基	圆形光滑、边缘整齐、稍隆起、不透明、灰白色的菌落, 培养 24h 直径多在 0.2mm 左右、48h 多在 1.0mm 左右, 生长接近中度

2.2 在不同培养温度条件下及在普通营养肉汤中的细菌生长情况

6 株供试菌, 在 28℃、37℃ 两种温度条件下均能正常生长, 菌苔呈不透明的灰白色, 生长丰盛 (28℃ 的更优些); 在普通营养肉汤中 28℃ 培养 24h 呈均匀混浊生长, 管底有圆点状沉淀 (摇动后呈线状上升易散开), 有轻度菌环形成且摇动后易散开。

2.3 电子显微镜下的菌体形态

供试的代表菌株 HQ010320B-1 株, 其细胞壁表面是呈均匀态凹凸不平的、无鞭毛 (图 1)。

2.4 理化性状与归类定名

6 株供试菌对所测项目内容的结果一致, 认为属于同种细菌并依据其性状判定为不动杆菌属的琼氏不动杆菌, 又主要依据其在 28℃、37℃ 条件下培养所表现出来的不同形态特征认为其属于琼氏不动杆菌的新形态型菌株; 择代表菌株 (HQ010320B-1 株) 送 CCTCC 进行复核鉴定 (表 2) 与分类定名, 根据所测项目结果, 将其定名为琼氏不动杆菌的新形态型—琼氏不动杆菌形态型 I (*Acinetobacter junii* morphovar I)。



图 1 HQ010320B-1 株的电镜照片 (×33,000)

表 2 理化特性鉴定 (CCTCC)

项目	结果	项目	结果
革兰氏染色	-	松二糖	-
菌落表面颜色	乳白色	吐温 80	+
基质色素	-	阿拉伯糖醇	-
细胞形状	杆状, 近似球状	L-阿拉伯糖	-
细胞大小 (μm)	0.9~1.6×1.5~3.2	D-阿拉伯醇	-
形成内生孢子	-	D-纤维二糖	-/+
运动	-	i-赤藓糖醇	-
鞭毛	-	D-半乳糖	-
37℃ 生长	+	龙胆二糖	+/-
接触酶	+	D-果糖	+/-
氧化酶	-	L-墨角藻糖	-/+
苯丙氨酸脱氨酶	-	α-D-乳糖	-
O-F 试验	-	m-肌醇	-
硝酸盐还原	-	麦芽糖	-
产 H <sub>2</sub> S	+	海藻糖	-
吡啶	-	D-甘露醇	-
葡萄糖: 产酸	-	L-鼠李糖	+/-
产气	-	β-甲基-D-葡萄糖苷	-
明胶液化	-	D-棉子糖	-
V-P 试验	-	乙酸	+
甲基红	-	菊糖	-
蔗糖还原	-/+	D-葡萄糖酸	+
柠檬酸	+	丙二酸	-/+
脲酶	-	L-谷氨酸	+

续表 2

α-D-葡萄糖	+/-	琥珀酸	+
D-甘露糖	+/-	β-半乳糖苷酶	-
α-环状糊精	-	甘油	-
D-山梨醇	-	L-组氨酸	+
木糖醇	+	L-亮氨酸	+
蜜二糖	-/+	L-天门冬氨酸	+
水杨苷	-	2, 3-丁二醇	-
O/129: 10 μg	R	七叶苷	-
150 μg	S	G + Cmol% (HPLC)	51.2

注: + 阳性, - 阴性, +/- 介于+与-之间, -/+ 介于-与+之间, R 抗性, S 敏感

2.5 血清型与血清同源性

6 株供试菌的玻板凝集试验结果为各菌株均与 OK、O 抗血清呈现明显凝集 ( + ), 无血清的生理盐水对照均不凝集 ( - )。用各菌株的 OK 及 O 试管凝集原与 OK 抗血清分别做试管凝集试验, 结果凝集效价在 OK 凝集原的均为 14 log<sub>2</sub> ( 1: 16384 倍)、O 凝集原的均为 9 log<sub>2</sub> ( 1: 512 倍), 比相应 OK 凝集原的低 5 个抗体滴度; 以 OK、O 试管凝集原与 O 抗血清分别做凝集效价测定, 结果在 O 凝集原的均为 11 log<sub>2</sub> ( 1: 2048 倍)、OK 凝集原的均为 5 log<sub>2</sub> ( 1: 32 倍), 比相应 O 凝集原的低 6 个抗体滴度。表明该菌存在 K 抗原且对 O 凝集呈现抑制作用, 6 株菌具有同种的 K 和同种的 O 抗原 ( 血清同源)。基于该菌为琼氏不动杆菌的一个新形态型, 所以本次对该菌抗原予以了定名, 将其 O 抗原定名为 Oajm ( 其中的 ajm 为琼氏不动杆菌形态型 I 菌名缩写词), K 抗原定名为 Kajm, 该菌无鞭毛抗原 ( H<sup>-</sup> ), 如此则该菌的抗原式为 Oajm: Kajm: H<sup>-</sup>。

2.6 人工感染的致病作用

2.6.1 石鲮: 经腹腔接种感染的 6 尾石鲮, 于感染后的 72h、96h、120h 各发病死亡 1 尾、1 尾、4 尾 ( 死亡率 100% ), 剖检见均不同程度呈现出了同自然病例样的败血症感染病变。取其中 3 尾的肝组织为材料做抹片革兰氏染色镜检细菌与细菌分离, 结果均在肝脏中见有大量同原感染菌的革兰氏染色阴性细菌; 同时分离到大量纯一的同原感染菌的菌落, 从每尾鱼的分离菌各取 1 个菌落做纯培养 1 株共 3 株, 经分别进行形态及一些主要理化特性指标的复核鉴定, 结果与原感染菌的完全一致。对照组 6 尾鱼, 于 10d 观察期内均健活。

2.6.2 牙鲆: 经腹腔接种感染的 6 尾牙鲆, 于感染后 96h、120h、144h 各发病死亡 2 尾、3 尾、1 尾 ( 死亡率 100% ), 剖检见同样呈现有不同程度的肝肿胀等的败血症感染病变; 取其中 3 尾的肝组织为材料, 同 2.6.1 中所述做菌检, 结果与感染石鲮的一致。对照组 6 尾鱼, 于 10d 观察期内均健活。

2.7 对抗菌类药物的敏感性

随机取 6 株供试菌中的 4 株 ( HQ010320B-1、HQ010320B-3、HQ010320B-5、HQ010320B-6 ), 所做对 37 种抗菌类药物敏感性的结果未在株间出现明显差异, 均表现对供试的头孢拉啶、头孢噻肟、头孢曲松、头孢他啶、头孢哌酮、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、多西霉素、复方新诺明、恩诺沙星等 20 种高敏, 对青霉

素 G、氨苄青霉素、头孢唑啉、头孢吡肟、氨基曲南、四环素、氯霉素、多黏菌素 B、利福平、甲氧苄啶、新生霉素等 11 种敏感, 对苯唑青霉素、万古霉素、呋喃妥因、呋喃唑酮、杆菌肽、克林霉素等 6 种耐药。

### 3 讨论

(1) 如前有述, 不动杆菌属细菌的某些种已被明确为鱼类的病原菌<sup>[4-9]</sup>。本次从石鲮中检出琼氏不动杆菌并经鉴定表明为新形态型菌株, 在对鱼类致病作用方面尚无明确记载和报道, 尽管本次是作为继发感染菌检出的, 但经人工感染试验表明该菌不但能单独引起石鲮(本种鱼类)感染发病, 且对海水养殖的牙鲆亦有较强的致病作用, 初步认为该菌同样可以作为这些鱼类的原发感染菌, 也提示可将该菌列为鱼类的一种新病原菌, 至于该菌对其他水产养殖动物的致病作用及生态特征等尚有待于更广泛的检验与研究明确。

(2) 通过用普通营养琼脂等 12 种培养基做划线接种后 28℃ 培养观察, 显示了该菌在供试不同培养基上的生长情况及菌落特征等, 可供在对该菌分离与鉴定时予以选择使用。

(3) 通过以代表菌株制备抗血清后做对应及交叉血清学凝集反应测定, 表明被检菌株均存在同种的不耐热 K 抗原和同种的 O 抗原(血清同源)。是否存在血清异源菌株, 尚有待更广泛的检验予以明确。

(4) 经以 37 种抗菌类药物对 4 株琼氏不动杆菌形态型 I 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, 这一结果有益于对选择用药防治由该菌引起的感染症及进一步从事耐药规律研究的参考。

### 参考文献

- [1] 李梦东. 实用传染病学(第二版). 北京: 人民卫生出版社, 1998. 478~480.
- [2] 尹有宽, 翁新华. 中国实用内科杂志, 1999, 19(2): 71~72.
- [3] 陆承平. 兽医微生物学(第三版). 北京: 中国农业出版社, 2001. 282~283.
- [4] Austin B, Austin D A. Bacterial Fish Pathogens; Disease of Farmed and Wild Fish. Third (Revised) Edition. Praxis Publishing Ltd, Chichester, UK. 1999. 32, 119.
- [5] 顾天钊, 陆承平, 陈怀育. 微生物学通报, 1997, 24(2): 104~106.
- [6] 胡成钰, 洪一江. 水利渔业, 2001, 21(2): 49.
- [7] 李桂峰, 李海燕, 毕英佐. 中国水产科学, 2001, 8(2): 72~75.
- [8] 黄志坚, 何建国, 翁少萍, 等. 微生物学通报, 1999, 26(4): 241~246.
- [9] 宋学宏, 李蒙英, 蔡春芳, 等. 苏州大学学报(自然科学), 2001, 17(3): 85~91.
- [10] 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.
- [11] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001. 353~398.
- [12] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, et al. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition. Baltimore, Williams and Wilkins, 1994. 73, 129.
- [13] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998. 68~73.
- [14] 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. 556~562.