

石鲽细菌性败血感染症及其病原细菌研究

陈翠珍 房 海 张晓君 王秀云 巩元芳 葛慕湘

(河北科技师范学院动物科学系, 秦皇岛 066004)

摘要: 2001—2002年, 分别对两起养殖的石鲽(Stone flounder, *Kareius bicoloratus* L.)病害进行了检验, 均表现为败血症感染特征。经以20尾病(死)石鲽(每起病例各10尾)做病变组织中细菌检查、细菌分离与鉴定、人工感染试验等的病原学检验, 表明两起被检病例均为同种的杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)感染; 另在其中1起病例所检10尾石鲽的2尾中, 同时检出了呈继发感染的不动杆菌(*Acinetobacter*)。通过对所分离后做纯培养的60株杀鲑气单胞菌、6株不动杆菌分别进行较系统的表观分类学指征(Phenotypic information)及代表菌株16S rRNA基因序列测定与系统发育学分析, 表明其中的杀鲑气单胞菌为一个新亚种, 不动杆菌为琼氏不动杆菌(*Acinetobacter junii*)的一个新形态型; 又择代表菌株送中国典型培养物保藏中心(CCTCC)进行了表观性状、DNA中C+Cmol%的测定等的复核鉴定, 并将其中的杀鲑气单胞菌新亚种定名为杀鲑气单胞菌杀鲽亚种(*Aeromonas salmonicida* subsp. *flounderacida* subsp. nov.), 将其中的琼氏不动杆菌新形态型定名为琼氏不动杆菌形态型I (*Acinetobacter junii* morphovar I)。

关键词: 石鲽; 细菌性败血症; 病原细菌

中图分类号: S941. 42 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2006)-0515-09

杀鲑气单胞菌[*Aeromonas salmonicida* (Lehmann and Neumann 1896)Griffin Sniezko and Friddle 1953]亦被称为灭鲑气单胞菌, 是最早被描述的鱼类病原菌之一, 主要是引起鲑科鱼类的感染发生疖疮病(Furunculosis), 因此在传统上也多认为鲑科鱼类易感杀鲑气单胞菌。事实上, 除了鲑科外的其他鱼类感染杀鲑气单胞菌, 在近些年来已多有记述, 所表现出的病害类型也并非均为疖疮病, 且所造成危害也是严重的^[1-4]。对于鱼类杀鲑气单胞菌感染症的有效诊断、检疫、预防与治疗及病原学等方面的研究, 无论从提高水产养殖生产经济效益还是就鱼类病原细菌方面来讲, 都是具有较重要意义的。

近年来, 在鱼类细菌性病害的研究中, 作者曾在2001—2002年分别从野生转为人工养殖的石鲽(Stone flounder, *Kareius bicoloratus* L. Jordan and Snyder)呈败血症感染病例的病(死)鱼中有规律地检出了相应的病原杀鲑气单胞菌, 经对分离菌株的鉴定结果表明为杀鲑气单胞菌的新亚种; 同时, 还有个别病(死)鱼中同时检出了另外一种亦属于具有致病性

的细菌, 经鉴定表明为不动杆菌属(*Acinetobacter* Brisou and Prévot 1954)中琼氏不动杆菌(*A. junii* Bouvet and Grimont 1986)的一种新形态型。基于这些病原细菌在石鲽甚至有的在其他鱼类中的感染发病尚少见报道, 加之这些相应病原细菌为新的亚种或形态型, 为便于学术交流, 现将所检石鲽病例的发病情况、相应病原细菌的主要特性等的研究结果作如下报告。

1 材料与方法

1.1 病例检验 对发病石鲽鱼群在进行发病情况的调查后, 取濒死发病鱼及新鲜死亡鱼做眼观病变的检查; 再分别取其病变组织材料做抹片后以革兰氏染色镜检细菌, 并在此基础上分别进行细菌分离。

1.2 细菌分离与纯培养 分别取上述被检鱼的病变组织材料, 无菌操作接种于普通营养琼脂、含7%家兔脱纤血的血液营养琼脂培养基平板, 置28℃培养24—48h 检查结果; 对所分离出的细菌, 先检查生长菌落的数量、分布及同一性, 然后按菌落种类及从

每尾鱼的分离菌落各择一定数量菌落, 分别移接于普通营养琼脂斜面(28°C 培养24h)做成纯培养后置 4°C 冰箱保存供鉴定用。

1.3 细菌鉴定 分别取上述分离菌株的纯培养菌, 移接于普通营养琼脂斜面置 28°C 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; 取上述分离菌株的纯培养菌, 移接于普通营养琼脂斜面(涂布接种)每株各2管, 分置于 37°C 和 28°C 条件下培养48h 检查生长发育情况; 取上述分离菌株的纯培养菌, 移接(涂布接种)于疖疮病琼脂(Furunculosis agar, FA)培养基斜面, 置 28°C 条件下每天观察是否有色素产生; 取菌株的纯培养菌, 分别接种于细菌鉴定的相应培养基进行氧化酶、 H_2O_2 酶、糖(醇和苷)类代谢、吲哚、MR、V-P、有机酸盐利用、 H_2S 产生、硝酸盐还原等较系统地测定理化特性。

1.4 PCR 模板 DNA 的制备 择代表菌株分别接种于 LB 肉汤中 28°C 培养16h, 取1mL菌液离心(10000r/min)弃上清后悬浮于100 μL 无菌蒸馏水中, 经 100°C 水浴加热5min后同样离心, 取上清作为PCR模板DNA^[5]。

1.5 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增与测序 16S rRNA 基因 PCR 扩增的两个引物分别为 27F(正向引物): 5'-AGA GTT TGA TC (C/A)TGG CTC AG-3'(对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的第8—27个碱基位置)和 1492R(反向引物): 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'(对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的第 1492—1510 个碱基位置)^[6]。在20 μL 反应体系中含有: 无菌蒸馏水 14.4 μL 1×PCR 缓冲液 2 μL , 1.5m mol/L MgCl_2 1.6 μL , 4×dNTP 混合物 0.4 μL , 引物各 0.2 μL 2.5U/ μL 的 Taq DNA 聚合酶 0.2 μL , 模板 DNA 1 μL 。PCR 反应条件为: 96°C 预变性6min、接 95°C 变性1min、 55°C 复性1min、 72°C 延伸2min, 30个循环然后 72°C 温育6min。PCR 扩增产物经 DNA 纯化系统(Wizard PCR Preps, Promega)纯化后, 由上海博亚生物工程技术公司使用3730测序仪进行基因序列测定。

1.6 序列分析及数据处理 将上述代表菌株的16S rRNA 基因序列分别通过NCBI的Blast检索系统(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>)进行序列同源性分析, 并使用ClustalX1.8软件与从GenBank数据库中获得的序列相似性较高的菌株的序列进行多序列匹配排列(Multiple Alignments), 采用邻接法(Neighbor joining method)获得分支系统树, 并通过自举分析(Bootstrap)进行置信度检测, 自举数据集为1000次。

1.7 菌种的归类判定 以经上述表型性状鉴定的结果, 主要参照文献[3, 7, 8]及有关资料, 并结合系统发育学的结果, 进行供试菌的种属判定。在此基础上, 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%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。

1.8 人工感染试验 择上述经鉴定后的每种细菌的代表菌株, 分别接种于普通营养肉汤 28°C 培养18h调成 $9 \times 10^8 \text{ CFU/mL}$ 作为供试菌液, 分别经腹腔、背鳍基部肌肉途径接种3月龄左右健康石鲽0.3mL/尾(感染接种前养殖观察5d且健康的供试), 同时设立用同剂量、同批无菌普通营养肉汤接种的对照。接种后隔离养殖于水簇箱中, 每天观察发病与死亡情况, 对病死鱼及时进行病变检验, 并以其病变肝组织为材料, 进行如前有述的同自然病例的制备抹片做革兰氏染色镜检细菌和进行细菌分离, 对所分离回收到的细菌再同上述方法制备纯培养后进行理化特性鉴定, 以被感染鱼出现同自然病例样的病变、从病死鱼重新回收到原感染菌作为供试菌属于相应致病菌的判定指标。

2 结果

2.1 发病情况与主要病变

2001年3月和2002年3月, 分别对河北某两个海水鱼养殖场所养殖的约2—3月龄石鲽(均为采自海区野生转为人工养殖的)病例进行了检验, 两起病例(记作: 病例1、病例2)均呈败血症感染, 缺乏特征性的症状与病变。

2.1.1 病例1 该场所养石鲽共50000尾左右, 初见有病鱼且陆续死亡, 随之死亡增多, 病鱼表现摄食减少至废绝、游动缓慢、上浮至水面等, 病程约持续60d左右, 共发病约45000尾(占约90%)、死亡约40000尾(发病致死率约88.9%)。在发病渐进高峰期时, 取15尾发病濒死及新鲜死亡石鲽进行病变检验, 发现其外观无典型特征病变, 剖检病变主要为: 肝脏(其中9尾有不同程度出血点)、脾脏、肾脏均呈不同程度肿胀及不同程度充血迹象, 肠臌气且肠内几乎无食物、均有不同量的淡黄白色黏液, 有5尾鱼的肠黏膜存在数量不等及程度不同的出血点, 有6尾鱼肠内存有黄白酪样、不规则

的小块状物。

2.1.2 病例 2 该场所养石鲽共 5000 尾左右, 其发病症状等与病例 1 的基本一致, 病程约 40d 左右, 共发病 5000 尾左右(占 100%), 死亡约 4500 尾(发病致死率约 90%)。于发病渐进高峰期时, 取 13 尾发病濒死及新鲜死亡石鲽进行病变检验, 其外观无典型特征病变, 仅见有的鳍充血或出血, 剖检病变均主要为: 肝、脾、肾不同程度的肿胀和充血, 有 4 尾的胆囊肿大, 3 尾的肾有不同程度出血点, 4 尾的肝有不同程度出血点, 肠臌气且肠内几乎无食物、有不同量的淡黄白色黏液。

2.2 肝组织中的细菌

分别取上述两起病例经剖检后的各 10 尾石鲽(各先做 1—10 的编号)共 20 尾的病变肝组织, 做抹

片后经革兰氏染色镜检, 发现均有不同量革兰氏染色阴性、无芽孢、两端钝圆、散在或有的成双排列、大小多在 $0.5-1.0\mu\text{m} \times 1.0-2.2\mu\text{m}$ 的杆菌。

2.3 细菌分离与纯培养情况

2.3.1 细菌分离 分别取 2.2 所述各 10 尾石鲽共 20 尾的肝、脾、肾、肠内容物(黏液及黄白色酪样物)为材料, 按 1.2 中所述划线接种于培养基平板及做细菌培养, 结果从每尾被检鱼的各种被检组织中均分离出了数量不等但均为多量的(肠内容物材料相对其他材料的较少些)呈同种特征的纯一的菌落(记作: A 菌); 另外, 在病例 1 的第 5 号和第 9 号两尾鱼中还分离出了在数量上与 A 菌差异不明显的另一种特征一致的菌落(记作: B 菌)。A 菌和 B 菌的菌落特征如表 1 所示。

表 1 A 菌和 B 菌的菌落特征

Tab. 1 The colony characteristics of A and B strains

种类 Strains	普通营养琼脂 Nutrient agar	血液营养琼脂 Blood nutrient agar
A 菌 Bacteria A	圆形光滑、边缘整齐、较隆起、较不透明、灰白色, 菌落直径为 24h 多在 $0.3-0.4\text{mm}$, 48h 多在 $1.0-1.2\text{mm}$	基本与在普通营养琼脂上的相同, 呈 β -溶血的菌落
B 菌 Bacteria B	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	基本与在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 β -溶血现象

2.3.2 细菌纯培养 对上述从两起病例鱼的分离菌, 依次按鱼的编号各从肝、脾、肾或肠内容物的分离菌随机取 A 菌的菌落 3 个/尾及 B 菌的菌落 3 个/尾, 并以分离地和分离日期(年、月、日)及菌落顺序进行菌株的编号, 按 1.2 中所述制备纯培养。如此 A 菌共 20 尾鱼的 60 株, 其中病例 1 的 10 尾鱼为 30 株(菌株编号为: HQ010320-1 至 HQ010320-30)、病例 2 的 10 尾鱼为 30 株(菌株编号为: HQ020329-1 至 HQ020329-30); B 菌的仅为病例 1 中的 2 尾鱼的 6 株, 编号为 HQ010320B-1 至 HQ010320B-6。

2.4 分离菌的生物学性状

2.4.1 形态特征 A 菌 60 株的形态一致, 均为革兰氏染色阴性、无芽孢、两端钝圆、散在或有的成双排列、大小多在 $0.4-1.0\mu\text{m} \times 1.0-2.0\mu\text{m}$ 的杆状(但多为短杆状或球状)细菌, 偶可见有个别长丝状菌体; B 菌 6 株的形态一致, 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、大小多在 $0.6-1.0\mu\text{m} \times 1.0-1.6\mu\text{m}$ 的杆状(但多为短杆状或球状)细菌。另外, 将 B 菌 6 株分别移接于普通营养琼脂斜面后置 37 °C 培养 18h, 经革兰氏染色后镜检

其形态特征为多数菌体与 28 °C 培养的相一致, 但似表现稍大些(多在 $0.6-1.0\mu\text{m} \times 1.0-2.0\mu\text{m}$); 同时, 出现有如同亚葫芦状、肥大个体、蚯蚓状长丝体、粗细不匀的长丝体、肾形、不规则菌体形、不规则长丝体、一端膨大的丝状体、曲颈瓶状等的异常菌体形态。

2.4.2 在不同培养温度条件下的生长 A 菌 60 株均仅在 28 °C 条件下生长(菌苔呈不透明的灰白色且生长较丰盛), 在 37 °C 条件下不生长; B 菌 6 株的在两种温度条件下均正常生长, 菌苔呈不透明的灰白色, 生长丰盛(28 °C 的更优些)。

2.4.3 色素产生情况 A 菌 60 株均能在培养 72h 后产生水溶性棕色色素(有个别菌株可在培养 24h 或 48h 后即见色素产生), 仅在产生色素的强度上存在株间差异性。

2.4.4 理化特性 A 菌 60 株及 B 菌 6 株对所测项目的反应均分别一致。择 A 菌及 B 菌各 1 个代表菌株(HQ010320-1 株、HQ010320B-1 株), 送 CCTCC 做复核鉴定, 其结果如表 2 所示; 电镜检查结果, 两种菌均为短杆状、无鞭毛。

表 2 理化特性测定结果(CCTCC)
Tab. 2 Results of physiological and biochemical characteristics (CCTCC)

项目 Item	A 菌 Bacteria A	B 菌 Bacteria B	项目 Item	A 菌 Bacteria A	B 菌 Bacteria B
G+Cmol %	62.6	51.2	松二糖 Turanose	—	—
2,3-丁二醇 2,3-Butanediol	ND	—	吐温 80 Tween 80	+	+
L-天门冬氨酸 L-Aspartic acid	ND	+	阿东糖醇 A donitol	+	—
L-亮氨酸 L-Leucine	ND	+	L-阿拉伯糖 L-Arabinose	—	—
L-组氨酸 L-Histidine	ND	+	D-阿拉伯醇 D-Arabi tol	—	—
乙酸 Acetic acid	—	+	D-纤维二糖 D-Cellobiose	—	-/+
运动 Motility	—	—	i-赤藓糖醇 i-Erythritol	—	—
鞭毛 Flagella	—	—	D-半乳糖 D-Galactose	—	—
37℃生长 Growth at 37℃	—	+	龙胆二糖 Gentibiose	—	+/-
接触酶 Catalase	+	+	D-果糖 D-Fructose	—	+/-
氧化酶 Oxidase	+	—	L-墨角藻糖 L-Fucose	—	-/+
苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase	—	—	α-D-乳糖 α-D-Lactose	—	—
O-F 试验 O-F test	F	—	m-肌醇 m-Inositol	—	—
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	—	麦芽糖 Maltose	+	—
产 H ₂ S H ₂ S production	—	+	海藻糖 Trehalose	—	—
吲哚 Indole	—	—	D-甘露醇 D-Mannitol	+	—
葡萄糖: 产酸 Glucose acid production	+	—	L-鼠李糖 L-Rhamnose	—	+/-
产气 gas production	—	—	β-甲基-D-葡萄糖 β-methyl-D-gluco side	—	—
明胶液化 Gelatin hydrolysis	+	—	D-棉子糖 D-Raffinose	+	—
V-P 试验 V-P test	—	—	蜜二糖 Melibiose	—	-/+
甲基红 MR test	—	—	菊糖 Inulin	—	—
蔗糖还原 Sucrose reduction	—	-/+	D-葡萄糖酸 D-Gluconic acid	-/+	+
柠檬酸 Citrate	—	+	丙二酸 Malonate	+	-/+
脲酶 Urease	—	—	L-谷氨酸 L-Glutamic acid	—	+
α-D-葡萄糖 α-D-Glucose	—	+/-	琥珀酸 Succinic acid	—	+
D-甘露糖 D-Mannose	—	+/-	β-半乳糖苷酶 ONPG	+	—
α-环状糊精 α-Oextrin	—	—	水杨苷 Salicin	—	—
糖原 Glycogen	+/-	ND	七叶苷 Esculin	—	—
D-山梨醇 D-Sorbitol	—	—	木糖醇 Xylitol	—	+
O/129, 10 ⁴ g	ND	R	甘油 Glycerol	—	—
150 ⁴ g	ND	S			

注: 表中符号的+示阳性, -示阴性, +/-示介于+与-之间, -/+示介于-与+之间, F示发酵型, ND示未测定, R示抗性, S示敏感。

Notes: +, positive; -, negative; +/-, between positive and negative; -/+, between negative and positive; F, fermentative; ND, not determined; R, resistance; S, sensitivity.

2.5 16S rRNA 基因序列和系统发育学

2.5.1 HQ010320-1 株与 HQ010320-5 株 择 HQ010320-1 株与 HQ010320-5 株作为代表菌株进行的 16S rRNA 基因序列测定结果, 不包括引物结合区, HQ010320-1 株所扩增的 16S rRNA 基因序列长度为 1425bp (GenBank 登录号: AY786177), HQ010320-5 株为 1423bp

(GenBank 登录号: AY786178)。将 HQ010320-1 株及 HQ010320-5 株的 16S rRNA 基因序列在国际互联网上进行同源性检索, 结果其与杀鲑气单胞菌的 16S rRNA 基因序列自然聚类, 且 HQ010320-1 与 HQ010320-5 两个菌株在系统发生树中聚为一个分支。选取了其中全部的杀鲑气单胞菌菌株 16S rRNA 基因序列进行系

统学分析, 其系统发育树如图 1 所示。

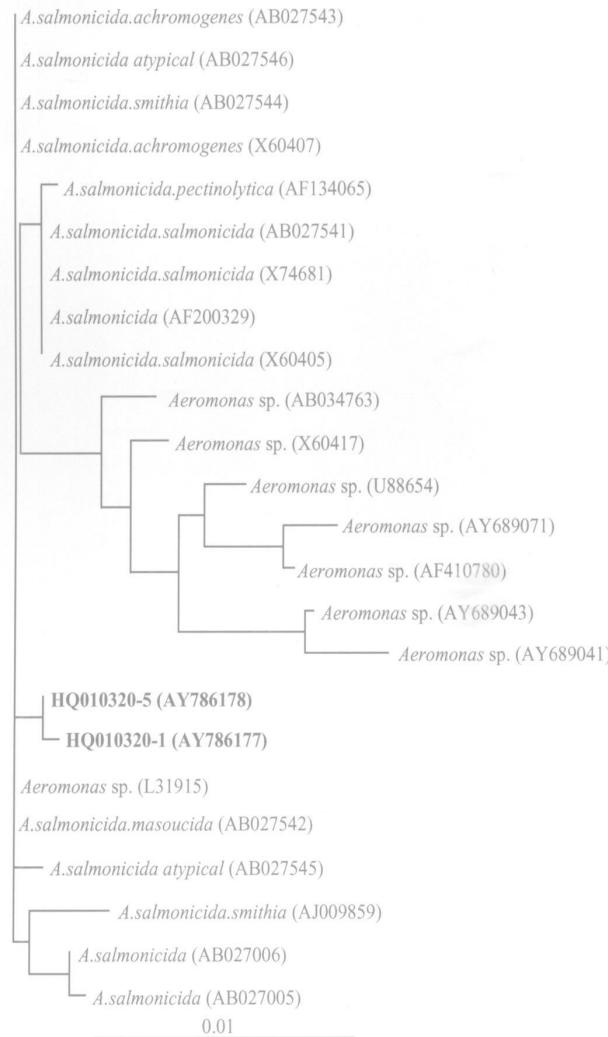


图 1 HQ010320-1 株及 HQ010320-5 株 16S rRNA 基因序列系统发育树(图中 AB027543—AB027005 为菌株在 NCBI 的登录号)

Fig. 1 Phylogenetic tree of *A. salmonicida* 16S rRNA gene sequences (AB027543—AB027005 were database accession numbers in NCBI).

2.5.2 HQ010320B-1 株 择 HQ010320B-1 株进行的 16S rRNA 基因序列测定结果, 不包括引物结合区, 所扩增的 16S rRNA 基因序列长度为 1427bp (GenBank 登录号: AY787213)。将 HQ010320B-1 株的 16S rRNA 基因序列在国际互联网上进行同源性检索, 结果其与不动杆菌属细菌的 16S rRNA 基因序列自然聚类, 且 HQ010320B-1 菌株在系统发生树中与不动杆菌属中的一个未定种菌聚为一个分支, 选取其中 28 株不动杆菌属细菌的 16S rRNA 基因序列进行系统学分析, 其系统发育树如图 2 所示。

2.6 菌种分类定名

根据上述表型性状及系统发育学的结果, 按 1.7 中所述进行供试菌的种类判定。其中 A 菌 60 株为同种的细菌, 判定为杀鲑气单胞菌, 但其有些主要生化性状指标与目前记载和报道的杀鲑气单胞菌

亚种及非典型菌株均是存有差异的^[1,3,7], 且在系统发育树中独立分支, 认为其属于杀鲑气单胞菌的新亚种; B 菌 6 株为同种细菌, 判定为琼氏不动杆菌^[7], 又主要依据其在 28 °C 和 37 °C 条件下培养所表现的不同形态特征, 且在系统发育树中与一未定种不动杆菌聚为一个分支, 认为其属于琼氏不动杆菌的新形态型菌株。

经择 A 菌中的 1 个代表菌株 (HQ010320-1 株) 及 B 菌的 1 个代表菌株 (HQ010320B-1 株), 送 CCTCC 做复核鉴定与分类定名, 依据细菌命名国际法规 (International Code of Nomenclature of Bacteria, ICNB), A 菌定名为杀鲑气单胞菌的新亚种—杀鲑气单胞菌杀鲽亚种 (*Aeromonas salmonicida* subsp. *flounderica* subsp. nov.), 参考菌株 (Reference strain): HQ010320-1; B 菌定名为琼氏不动杆菌新形态型—

琼氏不动杆菌形态型 I (*Acinetobacter junii* morphovar

I), 参考菌株: HQ010320B-1。

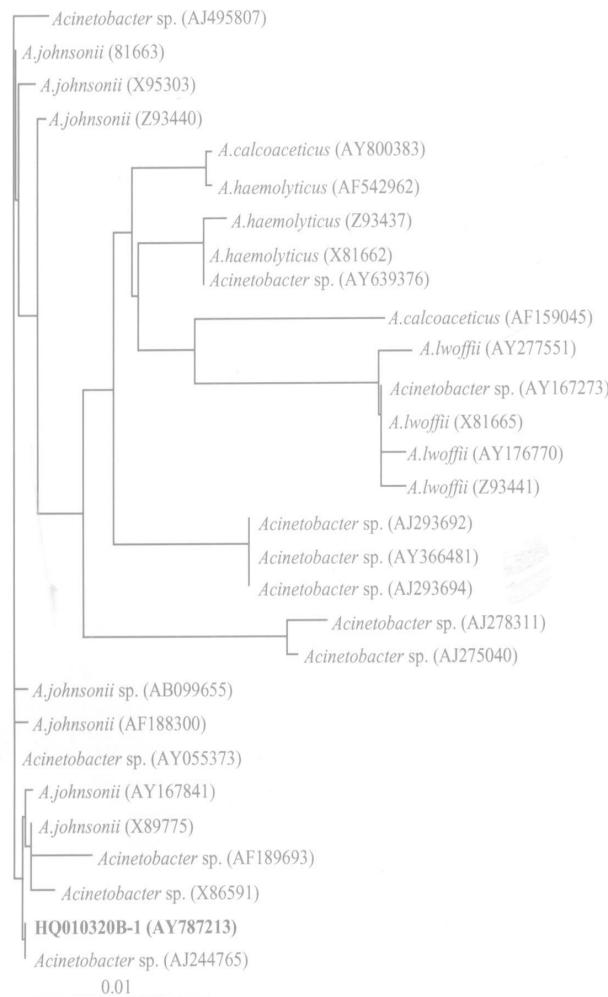


图 2 HQ010320B-1 株 16S rRNA 基因序列系统发育树(图中 AJ495807—AJ244765 为菌株在 NCBI 的登录号)

Fig. 2 Phylogenetic tree of *Acinetobacter* 16S rRNA gene sequences (AJ495807—AJ244765 were database accession numbers in NCBI).

2.7 人工感染的致病作用

2.7.1 杀鲑气单胞菌杀鲽亚种 择经鉴定后的杀鲑气单胞菌杀鲽亚种的 HQ010320-1、HQ010320-5、HQ020329-4 菌株共 3 株, 按 1.8 中所述感染健康石鲽 6 尾/途径/株, 结果被感染鱼均于感染后 60h 内发病死亡, 剖检死亡鱼均见有不同程度的同自然病例样的败血症病变; 以每个菌株不同途径感染死亡

鱼各 4 尾的肝脏为材料, 直接做抹片经革兰氏染色后镜检发现均有大量同自然感染病例样的阴性杆菌, 同 1.2 中所述方法做细菌分离均分离到了大量纯一的同原感染菌样的菌落, 又以每个菌株不同途径感染的各 2 尾鱼的分离菌各做纯培养 1 株(共 12 株)进行复核鉴定, 结果与原感染菌相吻合。感染鱼的发病死亡情况等, 如表 3 所示。

表 3 杀鲑气单胞菌杀鲽亚种感染试验

Tab. 3 Results of artificial infection of *A. salmonicida* subsp. *flounderacida* subsp. nov.

菌株 Strain	接种 Inoculation		发病死亡时间(h) Time of death			病変 Pathological Changes	菌检 Bacteriological Examination
	途径 Way	尾数 Number	48	60	合计		
					Total		
HQ010320-1	腹腔 Intraperitoneally	6	1	5	6	+	+

续表

菌株 Strain	接种 Inoculation		发病死亡时间(h) Time of death			病变 Pathological Changes	菌检 Bacteriological Examination
	途径 Way	尾数 Number	48	60	合计		
					Total		
	肌肉	6	2	4	6	+	+
	Intramuscularly						
HQ010320-5	腹腔	6	2	4	6	+	+
	Intraperitoneally						
	肌肉	6	0	6	6	+	+
	Intramuscularly						
HQ020329-4	腹腔	6	1	5	6	+	+
	Intraperitoneally						
	肌肉	6	3	3	6	+	+
	Intramuscularly						
合计		36	9	27	36		
Total							

2.7.2 琼氏不动杆菌形态型 I 择经鉴定后的琼氏不动杆菌形态型 I 的 HQ010320B-1 菌株, 按 1.8 中所述感染健康石鲽 6 尾(均为腹腔接种), 结果被感染鱼于感染后 72h 和 96h 各发病死亡 1 尾、120h 发病死亡 4 尾, 剖检见其中 3 尾存在不同程度的腹水、全部均有不同程度的肝肿胀现象; 取其中 3 尾的肝组织为材料, 直接做抹片经革兰氏染色后镜检发现均有大量同自然感染病例样的阴性杆菌, 同 1.2 中所述方法做细菌分离均分离到了大量纯的同原感染菌样的菌落, 又以每尾鱼的分离菌各做纯培养 1 株(共 3 株)进行复核鉴定, 结果与原感染菌相吻合。

用无菌营养肉汤经腹腔、肌肉途径接种作为对照的各 6 尾石鲽, 养殖观察 10d 均健活。

3 小结与讨论

3.1 本次所检两起石鲽病例, 均为表现一般性的败血症感染病变, 缺乏具有临床诊断意义上的特征性的临床症状与病理变化。通过对自然发病(死)鱼肝病变组织做直接染色标本发现细菌、有规律地分离到细菌并经鉴定表明为同种细菌、对健康石鲽做人工感染试验复制出同自然病例的发病与死亡并回收到原感染菌等方面的研究, 表明所检出的细菌为被检石鲽病例的相应病原菌。从所检出的细菌在每尾被检鱼及各病变组织中的分布情况、菌量等方面看, 认为其中分离鉴定的杀鲑气单胞菌杀鲽亚种为本次所检石鲽病例的相应原发病原菌、琼氏不动杆菌形

态型 I 为继发感染菌并非混合感染。

3.2 按 Bergey's 细菌分类系统, 在第九版中^[7] 分别记述了杀鲑气单胞菌和不动杆菌的分类位置。其中杀鲑气单胞菌被分类于气单胞菌属 (*Aeromonas* Kluyver and van Niel 1936), 含杀鲑气单胞菌杀鲑亚种 (*A. salmonicida* subsp. *salmonicida*)、无色亚种 (*A. salmonicida* subsp. *achromogenes*)、杀日本鲑亚种 (*A. salmonicida* subsp. *masoucida*)、史氏亚种 (*A. salmonicida* subsp. *smithia*) 共 4 个亚种, 另外则是在有的资料中还记载了杀鲑气单胞菌的一些非典型分离物 (A typical isolates); 不动杆菌为不动杆菌属, 属内记载了琼氏不动杆菌等 6 个已命名的种及 5 个尚未命名的种 (Unnamed species)。本次从发病(死)石鲽中所检出的杀鲑气单胞菌和不动杆菌, 从所表现的一些主要生物学性状来讲, 均有其相应的一些特征, 并在系统发育树中独立分支, 因此依据细菌命名国际法规, 并考虑到是从病(死)石鲽中首次检出, 将其中的杀鲑气单胞菌定名为了杀鲑气单胞菌杀鲽亚种(新亚种); 至于其中的琼氏不动杆菌, 主要是考虑到了该菌在 28 °C、37 °C 条件下培养所表现出的菌体形态差异, 将其定名为了琼氏不动杆菌形态型 I (新形态型)。

3.3 引起鱼类感染发病的细菌报道较多, 如由迟钝爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 引起的鳗鲡肝肾病、欧洲鳗鲡红头病, 弧菌属细菌的某些种所引起的鱼类弧菌病等^[9-11]。杀鲑气单胞菌对鱼类

的感染在国外已多有报告^[2-3], 在国内亦已有从观赏金鱼肾脏标本中分离出杀鲑气单胞菌杀鲑亚种的报道^[12]; 在不动杆菌属的细菌中, 作为水产养殖动物的病原不动杆菌, 已较明确的主要有乙酸钙不动杆菌(*A. calcoaceticus*)、鲍氏不动杆菌(*A. baumannii*)及鲁氏不动杆菌(*A. lwoffii*)^[13-17]。本次报告的从发病(死)石鲽中所检出的病原杀鲑气单胞菌新亚种、琼氏不动杆菌新形态型, 在鱼类病原细菌中尚属于首次检出; 另方面, 尽管通过所检细菌在被检的病(死)石鲽的分布情况等分析, 认为其中的琼氏不动杆菌形态型 I 属于此次所检石鲽病例的继发感染菌, 但经对健康石鲽的感染试验也初步表明了它的相应致病能力。这些, 提示在对于鱼类的细菌感染症研究中, 均需对此两种病原细菌予以关注。

参考文献:

- [1] Austin B, Austin D A. Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish [M]. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1987, 111-177
- [2] 室清邦, 江草周三. 病学概论 [M]. 京: 恒星社厚生, 1996, 48-53, 59
- [3] Austin B, Austin D A. Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish [M]. Third(Revised) Edition. Chichester, Praxis Publishing Ltd, 1999, 20-22, 66-79
- [4] Yu dahai, Cui yanlin. Guideline for Entry and Exit Animal Quarantine of China [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1997, 757-759[于大海, 崔砚林. 中国进出境动物检疫规范. 北京: 中国农业出版社, 1997, 757-759]
- [5] 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]. *Oceanologia et 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分析. 海洋与湖沼, 2003, 34(2): 131-141]
- [6] Martin F Polz, Collen M Cavanaugh. Bias in template to product ratios in multitemplate PCR [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(10): 3724-3730
- [7] 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, 73, 129, 190-191, 253
- [8] Krieg N R, Holt J G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [M]. Volume 1. London: Williams and Wilkins, Baltimore, 1984, 518-538
- [9] Lu Q Z, Zhu X L. Studies on the pathogenic bacteria of the liver-kidney disease of eels (*Anguilla Japonica*) [J]. *Acta Hydrobiol Sin*, 1994, 18(4): 360-368[卢全章, 朱心玲. 鳗鲡肝肾病病原的研究. 水生生物学报, 1994, 18(4): 360-368]
- [10] Zhou K, Zheng G X, Sun Q H. The pathogen of red-head disease in European eel (*Anguilla Anguilla*) [J]. *Acta Hydrobiol Sin*, 1999, 23(4): 304-310[周凯, 郑国兴, 孙其焕. 欧洲鳗鲡红头病病原的研究. 水生生物学报, 1999, 23(4): 304-310]
- [11] Wu H B, Pan J P. The characteristics of the exotoxin Vm-Pm produced by *Vibrio mimicus* [J]. *Acta Hydrobiol Sin*, 2004, 28(4): 409-412[吴后波, 潘金培. 海水养殖真鲷弧菌病病原菌外毒素的理化特性 [J]. 水生生物学报, 2004, 28(4): 409-412]
- [12] Li J, Chen Q, Wang Q Q. Isolation and identification of *A. salmonicida* subs p. *salmonicida* from goldfish [J]. *Heilongjiang Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2003, (4): 38-39[李健, 陈心, 王巧全, 等. 出口渔场灭鲑气单胞菌灭鲑亚种的分离鉴定. 黑龙江畜牧兽医, 2003, (4): 38-39]
- [13] Yang X L. Diagnosis and Prevention of Special Aquaculture Animal [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2001, 270[杨先乐. 特种水产动物疾病的诊断与防治. 北京: 中国农业出版社, 2001, 270]
- [14] Gu T Z, Lu C P, Chen H Q. Acinetobacter baumannii a novel pathogen of acute epidemic in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) [J]. *Microbiology*, 1997, 24(2): 104-106[顾天钊, 陆承平, 陈怀青. 鲍氏不动杆菌——鳜鱼暴发性死亡的新病原. 微生物学通报, 1997, 24(2): 104-106]
- [15] Huang Z J, He J G, Weng S P, et al. The isolation and preliminary identification of pathogenic bacteria from the diseased mandarin fish [J]. *Microbiology*, 1999, 26(4): 241-246[黄志坚, 何建国, 翁少萍, 等. 鳜鱼细菌性病原的分离鉴定及致病性初步研究. 微生物学通报, 1999, 26(4): 241-246]
- [16] Li G F, Li H Y, Bi Y Z. The pathogenic bacteria of the 'erecting body' disease in catfish, *Catla sinensis* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2001, 8(2): 72-75[李桂峰, 李海燕, 毕英佐. 胡子鲶“吊头病”病原的研究. 中国水产科学, 2001, 8(2): 72-75]
- [17] Song X H, Li M Y, Cai C F, et al. Pathogenic and histopathological studies on the red-head disease in *Anguilla anguilla* [J]. *Journal of Suzhou University (Natural Science)*, 2001, 17(3): 85-91[宋学宏, 李蒙英, 蔡春芳, 等. 欧洲鳗鲡红头病病原及组织病理研究. 苏州大学学报(自然科学), 2001, 17(3): 85-91]

**STUDIES ON BACTERIAL SEPTICAEMIC INFECTION AND CHARACTERIZATION
OF PATHOGENIC BACTERIA ISOLATED FROM STONE FLOUNDER
(*KAREIUS BICOLORATUS* L.)**

CHEN Gui-Zhen, FANG Hai, ZHANG Xiao-Jun, WANG Xiu-Yun, GONG Yuan-Fang and GE Mu-Xiang

(Dept. of Animal Science, Hebei Teachers College of Science and Technology, Qinhuangdao 066004)

Abstract: We conducted examinations to two cases occurring fanned Stone flounder (*Kareius bicoloratus* L.) in 2001 and 2002 respectively, all diseased fishes exhibited traits of septicaemia infection. Preliminary pathogen identification studies based on bacteriological examination of damaged tissues, isolation and identification of pathogenic bacteria and experimental infection, showed that two examined cases were infected by the same *Aeromonas salmonicida*, in addition, *Acinetobacter* which was thought successive infection was examined from two in examined ten fishes. Identification of extensive phenotypic informations for 60 pure cultures of *A. salmonicida* and 6 pure cultures of *Acinetobacter* were conducted, the 16S rRNA gene were sequenced to representative strains, molecular phylogenetic dendrogram was constructed. The results showed that the examined *A. salmonicida* was identified a new subspecies, the examined *Acinetobacter* was identified a new morphotype of *Acinetobacter junii*; the phenotypic informations of this bacteria have been re-checked and identified by China Center for Type Culture Collection (CCTCC), and the mol %G+C ratio of the DNA for representative strains were detected, and named *Aeromonas salmonicida* as *Aeromonas salmonicida* subsp. *flounderacida* subsp. nov.; and named *A. junii* as *A. junii* morphovar I.

Key words: Stone flounder (*Kareius bicoloratus* L.); Bacterial septicaemia; Pathogenic bacteria