

# 锦鲤中琼氏不动杆菌的分离与鉴定

陈翠珍, 张晓君, 房海, 靳晓敏, 葛慕湘, 王秀云

(河北科技师范学院动物科学系, 河北秦皇岛 066600)

**摘要:** 对从病死锦鲤 (*Cyprinus carpio* L.) 肝组织中分离的 2 株菌 (编号: HC050630D-1, HC050630D-2) 进行了形态特征、理化特性、药物敏感性以及对健康鲤鱼的致病作用等方面的检验; 测定了 HC050630D-1 株菌的 16S rRNA 基因序列, 构建了系统发育树。结果表明, 2 株被检菌为琼氏不动杆菌 (*Acinetobacter junii*), 对健康鲤鱼未呈现明显致病作用; 所测菌株的 16S rRNA 基因序列长度 1 450 bp 在 GenBank 中登录号为 EF669479, 该菌株 16S rRNA 基因序列与 GenBank 数据库中不动杆菌属细菌的 16S rRNA 基因序列同源性为 99%; 药敏试验结果显示对供试的头孢拉定等 21 种药物呈现高度敏感或敏感, 对头孢他啶等 7 种呈低度敏感, 对青霉素 G 等 9 种耐药。

**关键词:** 锦鲤; 琼氏不动杆菌; 鉴定

中图分类号: S917.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-3075(2009)01-0086-05

锦鲤 (*Cyprinus carpio* L.) 在分类学上属鲤科, 为亚热带和温带地区的淡水鱼类。因其体表漂亮的斑纹及优美的游姿很具观赏价值, 我国人民的传统民俗赋予它吉祥、幸福的象征。锦鲤受到广大养鱼爱好者的喜爱, 是我国高效益出口创汇鱼种之一。由于其养殖方式多为水族箱或水池等, 常因环境因素引起疾病, 尤其是细菌传染病时有发生, 造成较严重的经济损失。

河北秦皇岛某宾馆水池养殖的观赏用锦鲤, 于 2005 年 6 月发生病害并偶有病死鱼出现。病鱼主要表现出鳞片脱落、体表出血等症状。经病原学检验, 认为是维氏气单胞菌 (*Aeromonas veronii*) 与弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*) 的混合感染所致; 同时还检出了可能作为参与者的吉氏库特氏菌 (*Kurthia gibsonii*) 和琼氏不动杆菌 (*Acinetobacter junii*)。本文报告了对其中 2 株琼氏不动杆菌的形态特征、主要理化性状、系统发育学、病原学、药物敏感性等方面的研究结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 细菌分离与纯培养

取 3 尾病鱼和 2 尾刚刚病死的鱼进行检验, 均表现在体侧、鳍、头部有不同程度出血, 其中 3 尾的肛门处有出血, 鳞片较大面积脱落, 剖检见有肠道胀气, 肝脏肿大、质脆并有出血, 均有不等量血样腹水;

2 尾的腹内有小的血块, 腹壁内层肌肉出血。取刚刚病死的 2 尾鱼的肝组织为材料, 先做抹片经革兰氏染色镜检细菌; 再做划线接种于普通营养琼脂培养基, 28℃ 培养 24 h 做细菌分离; 待分离细菌后, 将不同菌落分别移接于普通营养琼脂培养基斜面, 28℃ 培养 24 h 做成纯培养供鉴定用。

### 1.2 细菌鉴定

取上述纯培养菌, 分别移接于普通营养琼脂斜面各 2 管, 分置于 28℃、37℃ 条件下培养 18 h 后制备成涂片标本, 经革兰氏染色镜检细菌形态; 分别划线接种于普通营养琼脂、血液琼脂 (含 7% 家兔脱纤维营养琼脂) 检查菌落特征; 分别接种于普通营养肉汤 (管) 中, 置 28℃ 培养 24 h, 检查液体培养的生长表现; 分别移接于细菌鉴定的相应培养基进行氧化酶、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 酶、糖 (醇和苷) 类代谢、吲哚、MR 试验、V-P 反应、有机酸盐利用、H<sub>2</sub>S 产生、硝酸盐还原等试验, 较系统地测定其理化特性 (东秀珠和蔡妙英, 2001)。

### 1.3 16S rRNA 基因序列测定与系统发育学分析

取上述分离鉴定的 1 个菌株接种于 LB 肉汤中 37℃ 培养 16 h 按大连宝生生物工程有限公司生产的“小量细菌基因组 DNA 抽提试剂盒 (批号: DV810A)”所述方法提取 DNA 作为 PCR 模板 DNA。

16S rRNA 基因 PCR 扩增的 2 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 1 492~1 510 个碱基位置) (Martin

收稿日期: 2007-12-23

作者简介: 陈翠珍, 女, 1955 年生, 河北滦南人, 教授, 主要从事动物病原微生物学研究。

F Polz & Collen M Cavanaugh, 1998)。在 20  $\mu$ L 反应体系中含有: 无菌蒸馏水 14.4  $\mu$ L, 10 $\times$  PCR 缓冲液 2  $\mu$ L, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.6  $\mu$ L, 4 $\times$  dNTP 混合物 0.4  $\mu$ L, 引物各 0.2  $\mu$ L, 2.5U/ $\mu$ L 的 *Taq* DNA 聚合酶 0.2  $\mu$ L, 模板 DNA 1  $\mu$ L。PCR 反应条件为: 96 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 接 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 温育 6 min。PCR 扩增产物经 DNA 纯化系统 (Wizard PCR Preps, Promega 公司生产) 纯化后, 由上海博亚生物工程技术公司进行基因序列测定。

将上述菌株的 16S rRNA 基因序列通过美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 的 Blast 检索系统 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>) 进行序列同源性分析, 使用 ClustalK1.83 软件与从 GenBank 数据库中获得的细菌 16S rRNA 序列进行多序列匹配排列 (Multiple Alignments), 采用邻接法 (Neighbor joining method) 构建系统发育树。

#### 1.4 菌种归类判定

根据对细菌形态、理化特性的检验结果, 主要依据 Holt JG 等 (1994)、Austin B 等 (1999)、Krieg N R 等 (1984) 的文献资料, 并结合 16S rRNA 基因序列与系统发育学的结果, 进行供试菌的种属判定。

#### 1.5 人工感染试验

取上述分离并经鉴定的代表菌株, 移接于普通营养肉汤管 37 $^{\circ}$ C 培养 18 h 后, 制备成  $3 \times 10^8$  CFU/mL 的菌悬液, 经腹腔接种感染健康鲤鱼 6 尾 (每尾 0.3 mL), 同时设立接种无菌普通营养肉汤的对照鲤鱼 4 尾。接种后隔离饲养于水族箱中, 观察其发病及死亡情况, 对死亡鱼及时检查, 同时进行细菌分离和对分离菌做相应的形态及理化特性等复核性检验。以被感染鱼发病或死亡并能重新分离回收得到原感染菌为供试菌株的病原性判定指标, 对照鱼应在观察期内正常存活。

#### 1.6 药物敏感性测定

取经鉴定的纯培养菌株, 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 (叶应妩和王毓三, 1997)。

### 2 结果

#### 2.1 细菌分离与纯培养情况

在 2 尾鱼的肝组织中, 均见有较多量革兰氏染色阴性杆菌, 在其中 1 尾中还偶见革兰氏染色阳性

杆菌。做细菌分离, 结果分离到 4 种细菌的菌落 (分别记作 A、B、C、D)。其中 A 菌从 2 尾鱼中均分离到且呈优势态, 经鉴定为维氏气单胞菌; B 菌从 2 尾鱼均分离到且较多, 经鉴定为弗氏柠檬酸杆菌; C 菌仅从其中 1 尾分离到几个菌落, 经鉴定为吉氏库特氏菌; D 菌从 2 尾均分离到, 但仅有很少菌落, 即为本次所鉴定的琼氏不动杆菌。该菌在普通营养琼脂平板上, 菌落圆形光滑、边缘整齐、稍隆起、浅灰白色、不透明, 培养 24 h 直径多在 1.5 mm 左右。取每尾鱼分离菌落各 1 个做纯培养共 2 株, 按分离地、日期及株数编号为 HC050630D-1、HC050630D-2。

#### 2.2 分离菌的主要生物学性状及细菌种类

2.2.1 形态特征 28 $^{\circ}$ C 培养 18 h 均为革兰氏染色阴性、无芽孢、两端钝圆、散在 (个别成双), 大小多为 (0.5~1.0)  $\mu$ m  $\times$  (0.8~1.4)  $\mu$ m 的杆状, 但多为短杆状及球状细菌; 37 $^{\circ}$ C 培养 18 h 的多数菌体的形态特征与 28 $^{\circ}$ C 培养的基本一致, 但表现稍大些, 多在 (0.6~1.0)  $\mu$ m  $\times$  (1.0~1.8)  $\mu$ m, 同时出现有较肥大个体、长丝状、蚯蚓状或粗细不均的长丝体、一端较膨大的长丝体等异常形态的菌体。

2.2.2 菌落特征 2 株纯培养菌在普通营养琼脂上的菌落特征和生长情况, 与从病料中直接分离的相一致, 培养 48 h 的菌落直径多在 1.8 mm 左右; 在血液营养琼脂上的与在普通营养琼脂上的相同, 不溶血。

2.2.3 普通营养肉汤中的生长情况 在普通营养肉汤中, 2 株菌生长表现一致, 呈均匀混浊生长, 有点状菌体沉淀 (摇动呈线状上升易消散), 形成轻度菌膜 (摇动易消散)。

2.2.4 理化特性 2 株纯培养菌所测项目结果是一致的, 各项目结果如表 1 所示。

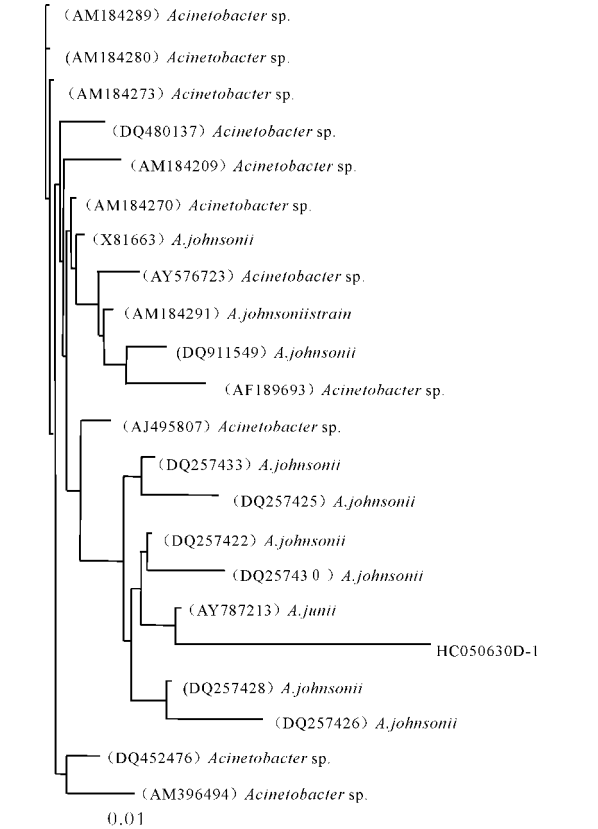
2.2.5 16S rRNA 基因序列和系统发育学 用 HC050630D-1 菌株所扩增的 16S rRNA 基因序列长度 1450 bp 在 GenBank 中登录号为 EF669479, 将 HC050630D-1 株的 16S rRNA 基因序列通过 NCBI 的 Blast 检索系统进行序列同源性检索, 结果其与不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 细菌的 16S rRNA 基因序列自然聚类, 在检索出的不动杆菌属细菌序列中, 该菌株与它们的同源性在 99%。选取了其中 21 株细菌的 16S rRNA 基因序列进行系统发育学分析, 结果其与琼氏不动杆菌聚为一分支, 系统发育树如图 1 所示。

表 1 分离菌的理化特性

Tab 1 Physiological and biochemical characteristics of isolates

| 项目                 | 结果     | 项目       | 结果     | 项目           | 结果     | 项目                | 结果     |
|--------------------|--------|----------|--------|--------------|--------|-------------------|--------|
| Item               | result | Item     | result | Item         | result | Item              | result |
| 37℃ 生长             | +      | 吐温 80    | +      | 尿素酶          | -      | 苦杏仁苷              | -      |
| 氧化酶                | -      | 硝酸盐还原    | -      | IPA          | -      | 半乳糖               | -      |
| 接触酶                | +      | 甘油       | -      | DNA 酶        | -      | 山梨糖               | -      |
| 产 H <sub>2</sub> S | -      | 蛋白酶      | -      | 乙酰胺酶         | -      | 侧金盏花醇             | -      |
| O - F 试验           | -      | 蔗糖       | -      | 淀粉酶          | -      | 海藻糖               | -      |
| 动力 (半固体)           | -      | 鼠李糖      | -      | 糊精           | -      | 甘露糖               | -      |
| 明胶液化               | -      | 肌醇       | -      | NaCl 中生长: 0% | +      | β - 半乳糖苷酶         | -      |
| 枸橼酸盐利用 (Simmons)   | +      | 甲基红      | -      | 1%           | +      | α - 甲基 - D - 葡萄糖苷 | -      |
| 葡萄糖: 产酸            | -      | V - P 试验 | -      | 6%           | -      | 乳糖                | -      |
| 产气                 | -      | 阿拉伯糖     | -      | 麦芽糖          | -      | 卵磷脂酶              | +      |
| 山梨糖                | -      | 甘露醇      | -      | 丙二酸盐利用       | +      | 果糖                | -      |
| 蜜二糖                | -      | 吡哌       | -      | 醋酸盐利用        | +      | 卫茅醇               | -      |
| 棉子糖                | -      | 七叶苷利用    | -      | 木糖           | -      | O /129 10 μg      | R      |
| 菊糖                 | -      | 苯丙氨酸脱氨酶  | -      | 纤维二糖         | -      | 150 μg            | R      |
| 水杨苷                | -      |          |        |              |        |                   |        |

注: + 示阳性, - 示阴性, R 示抗性。



注: 图中 AM 184289 ~ AM 396494 为菌株在 NCBI 的 16S rRNA 基因登录号。

Notes AM 184289 ~ AM 396494 were database accession numbers of 16S rRNA gene in NCBI

图 1 16S rRNA 基因序列分析聚类

Fig 1 Dendrogram of 16S rRNA gene sequences analysis  
2.2.6 细菌种类 上述检验结果表明, 所分离鉴定的 2 株菌为同种细菌。依据其形态与培养特性、理

化特性及系统发育学的结果, 判定为不动杆菌属的 琼氏不动杆菌。

2.3 人工感染的致病作用

取上述鉴定的 琼氏不动杆菌 HC050630D - 1 株, 对健康鲤鱼进行感染试验, 结果供试 6 尾鱼感染后 72 h 死亡 1 尾, 剖检未见明显病变, 从死亡鱼中分离到少量同种菌落, 经复核鉴定与所用感染菌相一致。其余 5 尾观察 14 d 未见发病, 对照 4 尾观察 14 d 均正常存活。

2.4 药物敏感性

取上述经鉴定的 琼氏不动杆菌 HC050630D - 1 菌株, 做对 37 种抗菌类药物的敏感性测定。结果表现对供试的头孢拉啶、头孢噻肟、头孢曲松、头孢哌酮、头孢吡肟、氨基糖苷、阿奇霉素、链霉素、卡那霉素、庆大霉素、妥布霉素、多西霉素、红霉素、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、恩诺沙星、复方新诺明等 21 种药物呈现高度敏感或敏感 (抑菌圈直径大于 15 mm), 对头孢他啶、四环素、氯霉素、多黏菌素 B、新生霉素、利福平、呋喃唑酮等 7 种呈低度敏感 (抑菌圈直径在 8 ~ 15 mm); 对青霉素 G、氨基青霉素、苯唑青霉素、头孢唑啉、克林霉素、万古霉素、甲氧苄啶、呋喃妥因、杆菌肽等 9 种耐药 (无抑菌圈形成)。

3 讨论

在锦鲤的细菌性感染方面, 李焕荣等 (2002) 报道由嗜水气单胞菌引起的锦鲤发病, 病鱼主要表现鳞片脱落、肛门红肿, 内脏色黄质脆、肠粘膜充血等

症状; 莫介化等 (2002) 报道由温和气单胞菌引起的锦鲤出血症; 陆小菡等 (2005) 从患病锦鲤分离到摩氏摩根氏菌; Asutin B 等 (1993) 报道曾从发病锦鲤分离到米氏链球菌。不动杆菌属的某些种, 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) (李梦东, 1998); 对陆生动物已有记述可致新生驹的败血症、牛乳腺炎及水牛流产等 (陆承平, 2001); 作为水产养殖动物的病原不动杆菌, 已明确记述和报道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.woffii*) 等 (顾天钊等, 1997; 胡成钰和洪一江, 2001; 李桂峰等, 2001; 黄志坚等, 1999), 陈翠珍等 (2005) 报道从石鲮 (*Kareius bicoloratus* L.) 中检出作为继发感染的琼氏不动杆菌新形态型菌株。

本次所检锦鲤病例, 属于混合感染, 从细菌分离的种类优势和人工感染试验结果分析, 其中主要是维氏气单胞菌, 其次是弗氏柠檬酸杆菌; 吉氏库特氏菌和琼氏不动杆菌很可能是不很重要的参与菌, 其单独的病原学意义尚难于明确, 很大可能是随其他病原菌进入鱼体或在病鱼濒死或死后进入体内的, 其确切的病原学意义还有待进一步研究明确。另外, 尽管人工感染鲤鱼也有 1 尾死亡, 但其死亡原因很可能是感染应激所造成; 通过人工感染试验来作为分离菌病原学意义指标之一, 锦鲤与鲤鱼在对该菌的易感性上也可能存在差异。

经 37 种抗菌类药物对分离菌的药敏测定, 其结果为琼氏不动杆菌耐药谱等研究提供参考。

本文作者陈翠珍等 (2005) 曾报道了分离于石鲮的 1 种病原不动杆菌, 由于其在 37℃ 的培养物出现同前述的特征性异常形态, 又经中国典型培养物保藏中心 (CCTCC) 复核鉴定, 暂定名为琼氏不动杆菌新形态型 I (*A. cinetobacter junii* morphovar I), 该菌对石鲮具有病原学意义。本次从锦鲤分离鉴定的琼氏不动杆菌, 其形态特征和主要理化特性与从石鲮分离的菌株表现一致, 且在系统发育学分析中与从石鲮分离的菌株 (登录号为 AY787213) 聚为一个分支, 因此认为本次从锦鲤分离的菌株与从石鲮分离的菌株在遗传学上是同源的, 且该菌在水环境具有较广泛的分布特征。至于该菌在各种鱼类及其他水产养殖动物的病原学意义, 尚有待进一步的研究。

#### 参考文献:

- 陈翠珍, 房海, 张晓君, 等. 2005. 琼氏不动杆菌形态型 I 的主要性状及系统发育学分析 [J]. 海洋水产研究, 26 (4): 32–37.
- 东秀珠, 蔡妙英. 2001. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社: 353–398.
- 顾天钊, 陆承平, 陈怀青. 1997. 鲍氏不动杆菌——鳊鱼暴发性死亡的新病原 [J]. 微生物学通报, 24 (2): 104–106.
- 胡成钰, 洪一江. 2001. 牛蛙红腿病病原菌敏感药物的筛选 [J]. 水利渔业, 21 (2): 49.
- 黄志坚, 何建国, 翁少萍, 等. 1999. 鳊鱼细菌性病原的分离鉴定及致病性初步研究 [J]. 微生物学通报, 26 (4): 241–246.
- 李桂峰, 李海燕, 毕英佐. 2001. 胡子鲇“吊头病”病原的研究 [J]. 中国水产科学, 8 (2): 72–75.
- 李焕荣, 崔德凤, 张耳, 等. 2002. 锦鲤致病性嗜水气单胞菌分离和药敏试验 [J]. 中国预防兽医学报, 24 (3): 205–208.
- 李梦东. 1998. 实用传染病学 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社: 478–480.
- 陆承平. 2001. 兽医微生物学 [M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社: 282–283.
- 陆小菡, 邹伟民, 谭爱萍, 等. 2005. 锦鲤摩氏摩根氏菌的鉴定及致病性研究 [J]. 淡水渔业, 35 (2): 3–5.
- 莫介化, 李春枝, 张邦杰, 等. 2002. 锦鲤爆发性出血症病原的研究 [J]. 水产科技情报, 29 (6): 280–283.
- 叶应妩, 王毓三. 1997. 全国临床检验操作规程 [M]. 2 版. 南京: 东南大学出版社: 553–56.
- Austin B, Austin D A. 1999. Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish [M]. 3rd rev. Ed. UK, Chichester: Praxis Publishing Ltd. 32, 119.
- Austin B, Robertson P A W. 1993. Recovery of *Streptococcus milleri* from ulcerated koi carp (*Cyprinus carpio* L.) in the U. K. [J]. Bulletin of the European Association of Fish pathologists, 13: 207–209.
- Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, et al. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology [M]. 9th Ed. Baltimore: Williams and Wilkins. 73–129.
- Krieg N R, Holt J G. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1 [M]. London: Williams and Wilkins. 303–307.
- Martin F Polz, Collier M Cavanaugh. 1998. Bias in template to product ratios in multitemplate PCR [J]. Appl Environ Microbiol, 64 (10): 3724–3730.

(责任编辑 杨春艳)

## Isolation and Identification of *Acinetobacter junii* from Ornamental carp (*Cyprinus carpio* L.)

CHEN Cui-zhen, ZHANG Xiao-jun, FANG Hai, JIN Xiao-min, GE Mu-xiang, WANG Xi-yun

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

**Abstract** Two strains (HC050630D-1 and HC050630D-2) isolated from the liver of diseased (or dead) ornamental carp were examined including morphological characteristics, physiological and biochemical characteristics, pathogenicity to healthy carp and antibiotic sensitivity; in addition, the 16S rRNA gene of HC050630D-1 were sequenced, molecular phylogenetic tree was constructed. The results showed that the two examined strains were identified as *Acinetobacter junii* and have no pathogenicity to healthy carp; the length of the 16S rRNA gene sequence of examined strain is 1 450 bp, database accession numbers in NCBI is EF669479, and the similarity of the 16S rRNA gene sequence of examined strain with the 16S rRNA gene of *Acinetobacter* from GenBank database is 99%; the antibiotic sensitivity using 37 antimicrobial agents showed that isolates were sensitive highly or sensitive to 21 agents including cephradine, sensitive slightly to 7 agents including ceftazidime, resistant to 9 agents including penicillin G.

**Key words** Ornamental carp (*Cyprinus carpio* L.); *Acinetobacter junii*; identification