

石鲈(*Kareius bicoloratus* L.) 源杀鲑气单胞菌 杀鲌亚种生物学性状的研究*

张晓君 房海¹⁾ 陈翠珍 战文斌

(河北科技师范学院动物科学系 秦皇岛 066600)

¹⁾(水产病害与免疫学研究室 教育部海水养殖重点实验室 中国海洋大学 青岛 266003)

提要 采用分类方法,对从两起石鲈(*Kareius bicoloratus* L.)细菌性败血症病例的病(死)鱼中分离到的相应病原菌,进行形态特征、培养特征、自凝性、色素产生情况及生理生化特性等较系统的表观分类学指征鉴定及代表菌株 DNA 中(G+C)%的测定等研究。结果表明,分离菌为杀鲑气单胞菌的新亚种(subsp. nov.)并定名为杀鲑气单胞菌杀鲌亚种(*Aeromonas salmonicida* subsp. *flounderacida* subsp. nov.)。经血清型检定,表明 60 株菌均为同种血清型。选择代表菌株做对健康石鲈、牙鲆、鲤、鲫及泥鳅的人工感染试验,表明了相应的原发病原学意义及较强的致病作用。药敏试验结果表明,对供试 37 种抗菌药物中的青霉素 G 等 6 种耐药,对头孢噻肟等 25 种高敏,对多黏菌素 B、利福平 2 种敏感,对头孢唑啉等 4 种在株间存在一定敏感性差异。该研究结果能较全面地反映出该菌的主要生物学性状。

关键词 石鲈,杀鲑气单胞菌杀鲌亚种,生物学性状

中图分类号 S941

杀鲑气单胞菌具有广泛的世界范围的地理分布,宿主范围很广,包括我国在内的世界很多国家均有该菌分布,如奥地利、比利时、丹麦、挪威、法国、英国、爱尔兰、芬兰、瑞士、西班牙、德国、苏格兰、美国、加拿大及澳大利亚等国家均有该菌的检出,对经济价值较高的鲑科鱼类造成了毁灭性的冲击。在水产养殖中,有关杀鲑气单胞菌引起鱼类疾病的报告已屡见不鲜,传统上杀鲑气单胞菌被认为易感鲑科鱼类,然而近几年其病原宿主范围明显在扩大。已经明确的杀鲑气单胞菌感染发生在硬骨鱼纲主要包括鲑科、美人哈科、鱼旨科等,同时在无颌纲也有发生。已有记述遭受杀鲑气单胞菌感染的非鲑科鱼有:米诺鱼、金鱼、鲤鱼、河鲈、湖拟鲑、雅罗鱼、圆鳍雅罗鱼、虫鲈、六线鱼、褐鳕、狗鱼、鲟鱼、杜父鱼、狼鱼(Austin *et al*, 1987, 1999),此外,该菌还可感染伸口鱼(Treasurer *et al*, 1991),海鳗、大菱鲆(Nougayreda *et al*,

1990; Pedersen *et al*, 1996),以及大西洋鳕、裸盖鱼(Willumsen, 1990)等。

2001 年和 2002 年,河北秦皇岛两个海水鱼养殖场野生转为池养的石鲈(*Kareius bicoloratus* L.)发生了一种病害,所检两起病例(记为 No. 1 和 No. 2)均具有发病率高(分别为 90% 和 100%)、死亡率高(分别为 80% 和 90%)的特点;病鱼表现摄食减少至废绝、游动迟缓甚至不游动、有上浮趋势等;在病理变化方面,发现所检濒死及新鲜病死鱼均表现为一致的实质脏器肿胀或有出血等败血症变化。通过对病原学的研究,表明为由杀鲑气单胞菌的一个新亚种(subsp. nov.)所引起的细菌性病害;又对分离鉴定后的菌株择代表菌株送中国典型培养物保藏中心(CCTCC)进行了复核鉴定,并将其定名为杀鲑气单胞菌杀鲌亚种(*Aeromonas salmonicida* subsp. *flounderacida* subsp. nov.),本文中具体报告了对该菌在生物学性状方面的研究

* 河北省自然科学基金资助项目,302431 号;河北省科技厅资助项目,02220502D 号。张晓君,河北科技师范学院副教授,中国海洋大学博士研究生, E-mail: zxj9307@163.com

1) 通讯作者,房海,教授, E-mail: fanghaihb@163.com

收稿日期:2004-06-07,收修改稿日期:2004-08-27

结果。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及其来源

择两起病例各 10 尾共 20 尾濒死及新鲜死亡石鲈, 分别以其肝、脾、肾、肠内容物为材料, 用普通营养琼脂及含 7% 兔血琼脂平板做细菌分离, 28℃培养 24h 和 48h 检查, 结果均分离到同一种细菌。从每尾鱼不同材料所分离菌各随机取 1 个菌落(每尾鱼取 3 个), 接种于普通营养琼脂斜面(28℃培养 24h)做纯培养, 如此从病例 No. 1 的 10 尾共做纯培养 30 株, 按分离地、日期及菌株数编号依次为: HQ010320-1 至 HQ010320-30; 病例 No. 2 的 30 株为: HQ020329-1 至 HQ020329-30。

1.2 细菌的形态特征与生长表现

1.2.1 形态特征检查 将上述 60 株供试纯培养菌, 分别接种于普通营养琼脂斜面置 28℃培养 18h, 做涂片, 经革兰氏染色后, 镜检细菌形态。

1.2.2 菌落特征检查 将上述供试 60 株纯培养菌, 分别划线接种于普通营养琼脂、血液琼脂(分别为含 7% 家兔脱纤血及含 7% 绵羊脱纤血的营养琼脂)、沙门氏菌志贺氏菌琼脂(SS 琼脂)、疳疮病琼脂(FA)、胰酪大豆胨琼脂(TSA)、木糖赖氨酸去氧胆酸盐琼脂(XLD)、庆大霉素琼脂、硫代硫酸钠柠檬酸钠蔗糖琼脂(TCBS)、麦康凯琼脂、伊红美蓝琼脂、蛋白胨-牛肉浸液-糖原(PBG) 11 种不同培养基平板(同时对 PBG 进行接种后用 2% 琼脂覆盖及不覆盖的对比观察), 置 28℃培养 24h 和 48h, 分别检查菌落特征。

1.2.3 培养温度对细菌发育的影响 将上述 60 株纯培养菌, 分别做涂布接种于普通营养琼脂斜面各 2 管, 分置于 37℃和 28℃培养 48h, 检查细菌生长发育情况。

1.2.4 在生理盐水中自凝的检查 取上述 60 株供试纯培养菌, 分别接种于普通营养琼脂斜面 28℃培养 24h, 在洁净载玻片上滴加 0.9% 无菌生理盐水 1 小滴(约 0.025ml), 用接种环直接取少许供试菌在生理盐水中转动混悬后, 于 1min 内观察结果, 以呈现出凝集颗粒的判为阳性(自凝菌株), 呈乳化态的判为阴性(非自凝菌株)。

1.2.5 在普通营养肉汤中生长情况检查 将上述 60 株供试纯培养菌, 分别接种于普通营养肉汤(管)中, 置 28℃培养 24h, 检查液体培养的生长表现。

1.3 色素产生的检查

分别使用 FA、TSA 和普通营养琼脂培养基进行色素产生情况的试验, 同时进行不同培养温度对色素产生影响的试验, 方法是将上述 60 株供试纯培养菌, 分别涂布接种于这些培养基斜面各两管, 分置于 22—23℃及 28℃下培养, 每天检查色素产生情况。

1.4 电子显微镜观察

取上述供试菌的代表菌株, 制备磷钨酸负染色标本后置 JEM-100CX 透射电镜下观察形态特征、菌体表面结构与鞭毛形成情况等。

1.5 理化性状测定与归类判定

供试 60 株菌理化特性的测定和菌种鉴定按《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠等, 2001)、《伯杰氏鉴定细菌学手册》(Holt *et al.*, 1994)、《伯杰氏系统细菌学手册》(Krieg *et al.*, 1984)、“Disease of Farmed and Wild Fish”(Austin *et al.*, 1987, 1999) 进行。在此基础上, 选择代表菌株送中国典型培养物保藏中心(CCTCC) 予以表观性状、DNA 中(G + C)% 及电镜下的形态观察等鉴定, 最后确定其相应的分类位置。

1.6 血清型检定

取代表菌株制备全菌(OK)、菌体(O)免疫原(121℃热处理 1h), 经强化免疫接种家兔制备抗血清后, 对供试 60 株菌分别按《现代免疫学实验技术》(沈关心等, 1998) 方法做血清型检定。

1.7 人工感染试验

选择上述经鉴定后的代表菌株, 分别接种于普通营养肉汤中 28℃培养 18h, 制备成 9×10^8 CFU/ml 的供试菌液, 采用腹腔和肌肉注射两种方法, 剂量为 0.3ml/尾, 分别对健康石鲈(3 月龄)和牙鲈(5 月龄)及淡水养殖的鲤鱼(体长 15cm 左右)、鲫鱼(体长 20cm 左右)、泥鳅(体长 15cm 左右) 做人工感染试验, 以复制出同自然病例样的感染症并能重新分离回收到感染菌作为相应病原菌的判定指标。同时, 设立用同批、同剂量无菌营养肉汤的对照。

1.8 药物敏感性测定

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(叶应妩等, 1997), 药敏纸片为杭州天和微生物试剂有限公司生产, 以抑菌圈的直径大小作为高敏、敏感、低敏及耐药的判定指标。

生长菌苔及培养基斜面均明显呈深棕色;产色素能力弱的菌株共 26 株(占 43.3%),所生长菌苔及培养基斜面均为轻度棕色。在不同温度下培养,产色素情况的差异均不显著。另外,使用普通营养琼脂培养基,在不同温度下培养,均未见有明显的色素产生。

2.6 电子显微镜下的菌体形态

选择供试的两个菌株,其中菌株 HQ010320-1 (自凝菌株)的细胞壁表面虚实不匀、甚至蜂窝状,菌株 HQ010320-5(不自凝菌株)细胞壁表面较光滑,均无鞭毛。

2.7 分离菌的理化性状与分类定名

对 60 株供试菌所测的理化特性结果一致,并

根据主要性状的结果判定为杀鲑气单胞菌 [*Aeromonas salmonicida* (Lehmann and Neumann 1896) Griffin and Friddle 1953], 但该分离菌与杀鲑气单胞菌现已记述的 4 个亚种在一些主要性状上有明显差异,认为应归为杀鲑气单胞菌的新亚种;经选择 HQ010320-1 株作为代表菌株,由 CCTCC 在进行了相应的复检鉴定与分类定名,结果亦同样判定为杀鲑气单胞菌新亚种(表 2),并依据《细菌命名国际法规》(ICNB),将其定名为杀鲑气单胞菌杀鲑亚种(*Aeromonas salmonicida* subsp. *flounderacida* subsp. nov.),其中“杀鲑(*flounderacida*)”一词的意为首次从发病(死)石鲢中检出且为致病性的,其参考菌株为:HQ 010320-1。

表 2 CCTCC 对代表菌株 HQ010320-1 的复核鉴定内容与结果

Tab. 2 Results of rechecking and identification of representative strain HQ010320-1 by 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	-	阿东糖醇	+
细胞形状	杆状	L-阿拉伯糖	-
细胞大小(μm)	(0.4—1.0) × (1.0—2.4)	D-阿拉伯醇	-
形成内生孢子	-	D-纤维二糖	-
运动	-	± 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	F	m-肌醇	-
硝酸盐还原	+	麦芽糖	+
产 H ₂ S	-	海藻糖	-
吲哚	-	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-葡糖酸	- / +
柠檬酸	-	丙二酸	+
脲酶	-	L-谷氨酸	-
α-D-葡萄糖	-	琥珀酸	-
D-甘露糖	-	β-半乳糖苷酶	+

续表			
项 目		结 果	
α-环状糊精		-	
糖原		+ / -	
D-山梨醇		-	
木糖醇		-	
G+ Cmol%		62.6	

注:表中符号的+ 示阳性,- 示阴性,+ / - 示介于+ 与- 之间,- / + 示介于- 与+ 之间。

2.8 血清型

经用HQ010320-1株作为代表菌株所制备的OK、O 抗血清,对60株供试菌的OK、O 凝集原分别做对应及交叉的凝集试验,结果对应菌株(HQ010320-1)的OK、O 凝集原与OK 抗血清的凝集效价均为11 log₂(1:2048X),其余59株的OK、O 凝集原与HQ010320-1株OK 血清的凝集价多数亦均在11 log₂、少数在10 log₂(1:1024X)或12 log₂(1:4096X);对应菌株(HQ010320-1)的OK、O 凝集原与O 抗血清的凝集效价亦均为11 log₂(1:2048X),其余59株的OK、O 凝集原与HQ010320-1株O 血清的凝集价多数亦为11 log₂(1:2048X),少数在12 log₂(1:4096X)。这一结果表明该菌不存在O 凝集抑制性的(热处理的)K 抗原,同时说明60株该菌为同种血清型(O 群)菌株(血清同源)。

基于该菌为杀鲑气单胞菌的一个新亚种,以往并无对该亚种的抗原研究,所以本次对该菌的O 抗原予以首次定名,具体为O_{asf}(其中asf为杀鲑气单胞菌杀鲮亚种菌名的缩写词);如此,则该菌的抗原式为O_{asf}:K⁻:H⁻,其中分别表示该菌的O 抗原为asf、K⁻表示该菌无K 抗原、H⁻表示该菌无H 抗原(无鞭毛)。

2.9 感染试验结果

供试菌株HQ010320-1(自凝和强产色素株)、HQ010320-5(不自凝和强产色素株)及HQ020329-4(不自凝和弱产色素株)对石鲮、牙鲆、鲤、鲫及泥鳅的人工感染试验结果(表3、表4、表5)表明,对这些供试鱼均有较强的致病作用。被感染石鲮呈现了同自然患病石鲮相同的败血症病变,牙鲆、鲤、鲫及泥鳅亦呈现败血症病变。

表3 分离菌对石鲮的感染试验结果									
Tab.3 Results of experimental infection to stone flounder of isolates									
供试菌株	途径	尾数	菌液浓度 (CFU/ml)	注射剂 量(ml)	死亡时间(h)			病 变 情 况	死亡率 (%)
					48	60	合计		
HQ010320-1	腹腔	6	9.0×10 ⁸	0.3	1	5	6	48h死亡1尾有腹水,余均表现肝稍肿,有1尾体表出血	100
	肌肉	6	9.0×10 ⁸	0.3	2	4	6	48h死亡的1尾在注射部位轻度溃烂,均有肝稍肿	100
HQ010320-5	腹腔	6	9.0×10 ⁸	0.3	2	4	6	48h死亡的2尾有轻度腹水及肝肿和质脆,余均肝稍肿	100
	肌肉	6	9.0×10 ⁸	0.3	0	6	6	仅为肝脏稍肿等一般表现,有1尾体表出血	100
HQ020329-4	腹腔	6	9.0×10 ⁸	0.3	1	5	6	48h死亡1尾有轻度腹水,均有肝稍肿等一般表现	100
	肌肉	6	9.0×10 ⁸	0.3	3	3	6	均有肝脏不同程度肿胀等一般表现	100
对照	腹腔	6	营养肉汤	0.3	0	0	0	无	0
	肌肉	6	营养肉汤	0.3	0	0	0	无	0
合计		48			9	27	36		

表 4 分离菌对牙鲆的感染试验结果
Tab. 4 Results of experimental infection to flounder of isolates

供试菌株	途径	尾数	菌液浓度 (CFU/ml)	注射剂 量(ml)	死亡时间(h)				病 变 情 况	死亡率 (%)
					48	72	96	合计		
HQ010320-1	腹腔	6	9. 0× 10 ⁸	0. 3	0	2	4	6	均表现肝脏稍肿等一般病变, 其中 4 尾有不同程度腹水	100
HQ010320-5	腹腔	6	9. 0× 10 ⁸	0. 3	1	1	4	6	均表现肝脏稍肿等一般病变, 其中 2 尾有不同程度腹水	100
HQ020329-4	腹腔	6	9. 0× 10 ⁸	0. 3	0	1	5	6	均表现肝脏稍肿, 其中 4 尾有不同程度腹水、2 尾有肾出血	100
对 照	腹腔	6	营养肉汤	0. 3	0	0	0	0	无	0
合 计		24			1	4	13	18		

表 5 HQ010320-1 对淡水鱼的感染试验结果
Tab. 5 Results of experimental infection to fresh fishes by HQ010320-1

鱼种	途径	尾数	菌液浓度 (CFU/ml)	注射剂量 (ml)	主 要 病 变	死亡率 (%)
鲤鱼	腹腔	6	9. 0× 10 ⁸	0. 3	下颌部出血, 肝胰脏肿胀, 2 尾有血样腹水	83. 3
	肌肉	6	9. 0× 10 ⁸	0. 3	下颌出血, 肝胰脏肿胀	50
鲫鱼	腹腔	6	9. 0× 10 ⁸	0. 3	体表出血, 肝脏肿胀且质脆	50
	肌肉	6	9. 0× 10 ⁸	0. 3	体表出血, 肝脏肿胀且质脆	33. 3
泥鳅	腹腔	6	9. 0× 10 ⁸	0. 3	肝脏肿胀, 4 尾有血样腹水	100
	肌肉	6	9. 0× 10 ⁸	0. 3	肝脏肿胀, 注射部肌肉红肿溃烂, 2 尾有血样腹水	100
对照						
鲤鱼	腹腔	6	营养肉汤	0. 3		0
	肌肉	6	营养肉汤	0. 3		0
鲫鱼	腹腔	6	营养肉汤	0. 3		0
	肌肉	6	营养肉汤	0. 3		0
泥鳅	腹腔	6	营养肉汤	0. 3		0
	肌肉	6	营养肉汤	0. 3		0
合计		72				

2. 10 对抗菌类药物的敏感性

随机选择从病例 No. 1 分离鉴定的 9 株、从病例 No. 2 分离鉴定的 9 株共 18 株, 测定对 37 种抗菌类药物的敏感性。供试菌均对供试的青霉素 G (10μg/片)、氨苄青霉素 (10μg/片)、苯唑青霉素 (1μg/片)、克林霉素 (2μg/片)、万古霉素 (30μg/片)、杆菌肽 (0. 04IU/片) 等 6 种耐药, 对供试的头孢噻肟 (30μg/片)、头孢曲松 (30μg/片)、头孢他啶

(30μg/片)、头孢哌酮 (75μg/片)、头孢吡肟 (30μg/片)、氨曲南 (30μg/片)、红霉素 (15μg/片)、阿奇霉素 (15μg/片)、链霉素 (10μg/片)、卡那霉素 (30μg/片)、庆大霉素 (10μg/片)、妥布霉素 (10μg/片)、丁胺卡那霉素 (30μg/片)、新霉素 (30μg/片)、大观霉素 (30μg/片)、诺氟沙星 (10μg/片)、氧氟沙星 (5μg/片)、环丙沙星 (5μg/片)、四环素 (30μg/片)、多西霉素 (30μg/片)、氯霉素 (30μg/片)、复方新诺

明(1.25/23.75μg/片)、呋喃妥因(300μg/片)、恩诺沙星(10μg/片)、新生霉素(30μg/片)等25种高敏,对多黏菌素B(30μg/片)、利福平(5μg/片)2种敏感,对头孢唑啉(30μg/片)、头孢拉啶(30μg/片)、呋喃唑酮(300μg/片)、甲氧苄啶(5μg/片)4种在株间存在一定敏感性差异。

3 讨论

本次从呈败血症的石鲮中检出的杀鲑气单胞菌杀鲮亚种这一新亚种,经人工感染试验表明,该菌除了能引起石鲮的发病与死亡外,还对供试牙鲆、鲤、鲫、泥鳅等具有不同程度的致病作用,这些更进一步显示了该菌在鱼类中较为广泛的致病作用。同时,从自然病例的病(死)鱼的所检各实质器官均能分离到大量感染菌,进一步表明该菌在石鲮的感染主要是败血性的。

目前杀鲑气单胞菌包括4个亚种(Holt *et al*, 1994),即杀鲑亚种(*A. salmonicida* subsp. *salmoni-*

cida)、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. *smithi*),另外则是有记述的一些非典型分离物(Cornick *et al*, 1984; Wiklund *et al*, 1995; Larsen *et al*, 1996; Hellberg *et al*, 1996)。杀鲑气单胞菌各亚种间的有效鉴别,主要依赖于水溶性棕色色素的产生、葡萄糖代谢的产气、吲哚产生、MR 试验及V-P 反应、H₂S 产生、七叶苷利用、脂酶产生,以及对蕈糖、蔗糖、麦芽糖、D-甘露醇、半乳糖等碳水化合物的分解能力等性状指标(Holt *et al*, 1994)。本次所检出的杀鲑气单胞菌,在所测项目中均不能与已有记述的各亚种在这些主要指标上相吻合(表6),作为新的亚种并予以命名,主要是考虑到该菌首次由石鲮中检出且为相应被检败血感染症的原发病原菌,所以定名为杀鲑气单胞菌杀鲮亚种。

表 6 分离菌与其他亚种的表现性状鉴别特征
Tab. 6 Differentiate characteristics of isolates with other subspecies in phenotypic informations

项 目	杀鲑气单胞菌 无色亚种	杀鲑气单胞菌 杀日本鲑亚种	杀鲑气单胞菌 杀鲑亚种	杀鲑气单胞菌 史氏亚种	分离菌
吲哚产生	+	+	-	-	+
MR 试验	+	+	+	-	-
V-P 反应	-	+	-	-	+
H ₂ S 产生	-	+	-	+	-
精氨酸双水解酶	+	+	+	[-]	-
葡萄糖: 产酸	+	+	+	[+]	+
产气	-	+	+	[+]	-
阿拉伯糖	-	+	+	•	-
半乳糖	+	+	+	-	-
甘油	d	d	d	[-]	-
麦芽糖	+	+	+	-	+
甘露醇	-	+	+	-	+
水杨苷	-	-	-	•	-
山梨醇	-	-	-	[-]	-
蔗糖	+	+	-	d	+
海藻糖	+	+	+	-	+
七叶苷利用	-	+	+	-	+
脂酶(玉米油)	+	+	+	-	+
ONPG	d	d	d	+	+
棕色水溶性色素	-	-	+	-	+

注:表中符号:- 为0%—10% 阳性,[-] 为11%—25% 阳性,d 为26%—75% 阳性,[+] 为76%—89% 阳性,+ 为90%—100% 阳性,• 为在原文表中无记载;分离菌的+ 为阳性,- 为阴性;分离菌的脂酶试验是指分解吐温 80。

通过用普通营养琼脂等 11 种培养基划线接种,在 28℃培养观察,发现该菌在普通营养琼脂、血液(家兔或绵羊脱纤血)琼脂、FA、TSA 培养基上生长旺盛,菌落特征易观察描述,且 FA、TSA 的还能做水溶性棕色色素的有效观察与判定,在 β 溶血特征方面,对家兔血液的表现优于绵羊血液的;在不覆盖的 PBG 培养基上生长较旺盛,菌落呈金黄色;在麦康凯琼脂、伊红美蓝琼脂、SS 琼脂培养基上生长较差;在 TCBS、庆大霉素琼脂、XLD 培养基上,培养 48h 仍无生长。基于此结果,认为在对该菌进行分离和鉴定时,可根据该菌在普通营养琼脂、血液琼脂、FA、TSA 生长旺盛及菌落特征易观察等予以选择使用。另一方面,在普通营养肉汤中凡自凝菌株均表现菌体呈颗粒性凝集态沉于管底、不自凝菌株则表现为均匀混浊生长(管底仅有小圆点状沉淀菌体),这一点亦可列为对自凝与非自凝菌株在生长表现方面的一项鉴别指标。

所分离鉴定的各菌株,存在自凝与非自凝的差异。有报道(Udey *et al.*, 1978)认为杀鲑气单胞菌的自凝与毒力因子 A 层(A-layer)的表达及致病力相关,但本文的自凝与非自凝菌株在水溶性棕色色素产生、11 种供试培养基生长特性、生化特性、在鱼中的分布情况、对供试鱼的致病作用等方面,均是不存在明显差异。另外,经透射电镜观察,显示供试自凝菌株与非自凝菌株在菌细胞壁结构存在差异,自凝菌株与不自凝菌株相比显示细胞壁明显虚实不匀(不平整),提示这种差异性也许就是导致自凝与不自凝的直接原因。

所分离鉴定的各菌株均能产生水溶性棕色色素,但在菌株间存在产色素强度的差异,色素的产生强度与菌株是否自凝无相关性。测定时宜使用 FA 或 TSA 培养基,置 22—23℃或 28℃培养均可,以培养 72h 以上观察为宜。

药敏测定结果表明,在不同菌株间不存在对某种抗菌药物敏感或耐药的显著差异,所测菌株在对供试抗菌类药物中表现出了一致性,该结果有益于选择用药防治由该菌引起的感染症。

经用 60 株供试菌制备的 OK、O 凝集原与用其中代表菌株 HQ010320-1 株所制备的 OK、O 抗血清做对应及交叉的凝集抗体效价测定,表明 60 株供试菌均为同种血清型(血清同源),且不存在不耐热的 K 抗原,这一结果在对该菌进行血清型检定及血清流行病学调查方面具有一定的指导意义。

参 考 文 献

- 东秀珠,蔡妙英编著,2001. 常见细菌系统鉴定手册. 北京:科学出版社,106—119,353—398
- 叶应妩,王毓三,1997. 全国临床检验操作规程(第二版). 南京:东南大学出版社,553—562
- 沈关心,周汝麟,1998. 现代免疫学实验技术. 武汉:湖北科学技术出版社,68—69
- Austin B, Austin D A, 1987. Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish. Chichester: Ellis Horwood Limited, 111—177
- Austin B, Austin D A, 1999. Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish. Third (Revised) Edition. Praxis Publishing Ltd, Chichester, U K, 20, 66—69
- Cornick J W, Morrison C M, Zwicker B *et al.*, 1984. Atypical *Aeromonas salmonicida* infection in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. Fish Dis, 7: 495—499
- Hellberg H, Moksness E, Høie S, 1996. Infection with Atypical *Aeromonas salmonicida* in farmed common wolf fish, *Anarhichas lupus* L. Fish Dis, 19: 329—332
- Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A *et al.*, 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition. Baltimore, Williams and Wilkins, 73, 129, 190—191, 253
- Krieg N R, Holt J G, 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. London: Williams and Wilkins, Baltimore, 545—548
- Larsen J L, Pedersen K, 1996. Atypical *Aeromonas salmonicida* isolated from diseased turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Acta Vet Scand, 37: 139—146
- Nougayrède P, Sochon E, Vuillaume A, 1990. Isolation of *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* in farmed turbot (*Psetta maxima*) in France. Bull Eur Ass Fish Pathol, 10: 139—140
- Pedersen K, Larsen J L, 1996. First report of an outbreak of furunculosis in turbot, *Scophthalmus maximus* caused by *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* in Denmark. Bull Eur Ass Fish Pathol, 16: 129—133
- Treasurer J W, Cox D, 1991. The occurrence of *A. salmonicida* in wrasse (Labridae) and implications for Atlantic salmon farming. Bull Eur Ass Fish Pathol, 11: 155—161
- Treasurer J W, Laidler L A, 1994. *Aeromonas salmonicida* infection in wrasse (Labridae), used as cleaner fish on an Atlantic salmon, *Salmo salar* L. fam. Fish Dis, 17: 155—161
- Udey L, Rand Fryer J L, 1978. Immunization of fish with bacterins of *Aeromonas salmonicida*. Marine Fisheries Review, 40: 12—17
- Wiklund T, Dalsgaard I, 1995. Atypical *Aeromonas salmonicida*

associated with ulcerated flat fish species in the North Sea.

Aquat Anim Health, 7: 218—224

Willumsen B, 1990. *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonici-*

cida isolated from Atlantic cod and coalfish. Bull Eur Ass

Fish Pathol, 10: 62—63

STUDIES ON CHARACTERIZATION OF *AEROMONAS SALMONICIDA* SUBSP. *FLOUNDERACIDA* SUBSP. NOV. FROM DISEASED STONE FLOUNDER (*KAREIUS BICOLORATUS* L.)

ZHANG Xiao-Jun, FANG Hai, CHEN Cui-Zhen, ZHAN Wen-Bin

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

(Laboratory of Pathology and Immunology of Aquatic Animals, The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao, 266003)

Abstract *Aeromonas salmonicida* is one of the most important fish pathogens because of its widespread distribution, diverse host range and economically devastating impact on cultivated fish, particularly the valuable salmonids. In March 2001 and in April 2002, outbreaks of disease in captive populations of stone flounder (*Kareius bicoloratus* L.) caused by *A. salmonicida* in Qinhuangdao, Hebei Province, this has become a serious concern to prevent the culture of the stone flounder there. In the present paper the isolation and characterization of this new subspecies of *A. salmonicida* obtained from infected stone flounder is described.

The method of traditional classification were used in identifying appropriate pathological bacteria which were isolated from diseased (or dead) stone flounder of two cases which expressed bacterial septicaemia, identification of extensive phenotypic information to 60 pure cultures including morphological and colonial characterization, physiological and biochemical traits, autoagglutination, pigment production and detection of the mol% G+ C ratio of the DNA to representative strains, the results showed that the isolates were Gram-negative, occurring singly or in pairs, round ends, medium-sized but slightly short rods of $(0.4-1.0) \times (1.0-2.0) \mu\text{m}$ in size, in addition, electron micrograph by the negatively stained revealed that the cultures have no flagella. The isolates were inoculated in different medium plates, respectively, examined after 24h and 48h of incubation at 28 °C. The results showed that the characteristics of colony were identical in the same medium, on nutrient agar, the isolates were smooth, circular, 0.3—0.4mm in diameter after 24h, and 1.0—1.2mm after 48h at 28 °C, slightly convex, entire, opaque, greyish-white colonies; on blood nutrient agar, the characteristics of colonies correspond with that of nutrient agar, and with β haemolysis; on peptone beef extract glycogen agar (PBG), colonies were circular, smooth, entire, slightly convex, yellow in colour, around 0.2mm in diameter after 24h; circular, around 0.5mm in diameter and light yellow in colour after 48h; on furunculosis agar (FA), colonies were circular, smooth, entire, slightly convex, opaque, pale grayish-white, creamy, around 0.8mm in diameter after 24h and 1.5—2.0mm after 48h, the growth were rich and some strains could produce water-soluble brown pigment, on tryptone soytone agar (TSA), colonies were circular, smooth, entire, slightly convex, opaque, pale grayish-white, creamy, around 0.5—0.8mm after 24h and 1.5—2.0mm after 48h in diameter, the growth were rich and some strains could produce water-soluble brown pigment. The results of physiological and biochemical traits showed that the isolates gave positive reaction for oxidase, catalase, gelatin hydrolysis, maltose, D-mannitol, produce acid but no gas from glucose, reduce nitrate, tween 80, adonitol, D-raffinose, malonate utilization, and negative reaction for indole, methyl red, esculin, glycerol, urease, trehalose, sucrose reduction, arabinose, Voges-Proskauer reaction, produce H₂S, D-sorbitol, D-arabitol, + erythritol, - inositol, L-rhamnose, salicin, have no motility, can not growth at 37 °C, mol% G+ C of DNA were 62.6%.

Simultaneously, we conducted studies on the serum homology of isolates, pathogenicity of isolates by experimen-

tal infection, the results showed that all the isolates were serologically similar and the isolates have strong pathogenicity. The resistance of selected 18 strains from the isolates which had been identified to 37 antimicrobial agents was determined, the results showed that all strains were susceptible to cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime, cefoperazone, cefepime, aztreonam, erythromycin, azithromycin, streptomycin, kanamycin, gentamycin, tobramycin, amikacin, neomycin, spectinomycin, norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin, tetracycline, doxycycline, chloramphenicol, sulfamethoxazole and trimethoprim, nitrofurantoin, novobiocin, and enrofloxacinum; resistant to penicillin G, oxacillin, ampicillin, clindamycin, vancomycin, bacitracin; and displayed difference between strains to cefazolin, cefradine, trimethoprim, and furazolidone.

In addition, the representative strain HQ010320-1 were re checked by CCTCC, which the results consistent with ours, and were regarded as new subspecies of *A. salmonicida*, which were designated as *Aeromonas salmonicida* subsp. *flounderacida* subsp. nov. based on its biological properties following the *Rules of International Code of Nomenclature of Bacteria*. The studies could extensively reflect the main biological properties of this new subspecies.

Key words Stone flounder (*Kareius bicoloratus* L.), *Aeromonas salmonicida* subsp. *flounderacida* subsp. nov., Biological properties