

异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)源 醋酸钙不动杆菌表型及分子鉴定*

夏 飞^{1,2} 梁利国¹ 顾 伟^{1,2} 谢 骏¹

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室 无锡 214081;
2. 南京农业大学无锡渔业学院 无锡 214081)

摘要 采用常规的培养特征、理化特性及分子生物学的方法,对从濒死异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)血液中分离到的菌株 SY-1 进行了致病性、表型生物学、分子生物学及药敏试验的系统研究。结果表明,该菌株在盐度 5—30、pH 6—8、温度 10—42℃ 的 LB 液体培养基中均能生长,具有脲酶。该菌株 16S rRNA 基因序列(GenBank 登录存取号: JX164201, 长度 1435bp)与其它不动杆菌属菌的 16S rRNA 基因同源性相似性在 99%—100% 之间,构建系统发育树确定该菌株为醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)。人工回感可导致异育银鲫死亡。药敏试验结果显示:对恩诺沙星、强力霉素、萘啶酸、复方新诺明、氧氟沙星等 10 种抗生素敏感;对羧苄青霉素、诺氟沙星、大观霉素、卡那霉素、四环素等 14 种抗生素中度敏感;对氨苄西林、苯唑西林、林可霉素、万古霉素、氟苯尼考等 15 种抗生素耐药。

关键词 异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*); 醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*); 致病性; 药敏试验

中图分类号 S941.42

异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)肉质鲜美,是我国重要的淡水鱼类养殖品种(崔正贺等, 2007)。近年来,养殖异育银鲫的连续发病率在 70% 以上,死亡率高达 80% (陆文浩等, 2009)。对于细菌性疾病的研究报道,最早见于孙其焕等(1991)对异育银鲫溶血性腹水病病原的研究,鉴定为运动型气单胞菌属的温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)和嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)。储卫华(2001)、王春燕(2002)等也在患病异育银鲫体内分离到具有强致病性气单胞菌。江苏省盐城市射阳县是我国异育银鲫密集养殖区域之一,为高密度养殖模式,近年来由于放养模式的改良,增氧技术的提高,也滋生了一些问题,导致病害频发(张学师, 2011)。

2011 年 9 月,射阳某养殖场鲫鱼发生暴发性出血病,观察病鱼可见其胸部、腹鳍基部、尾鳍基部、下

颌、眼眶周缘、鳃盖边缘等处有不同程度的出血症状;解剖发现肠道内无食物,肝脏稍红肿,无腹水。经病原学检验,认为是嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)与维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)的混合感染所致,同时还分离到了可能作为参与者的醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*),该菌在水产动物上鲜有报道,为丰富该菌在生物学性状、分子生物学等方面的内容,对其进行了形态特征及理化特性、胞外酶及 16S rRNA 基因序列测定与系统发育学分析,并且检测了该菌对抗菌类药物的敏感性,旨在为对该菌的有效检验及进一步研究等提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 病原菌分离及纯化

取濒死异育银鲫血液,无菌操作均匀涂布于 LB

* 现代农业产业技术体系建设专项, CARS-46-10 号。夏飞, 硕士研究生, E-mail: fly0604@126.com

通讯作者: 谢骏, E-mail: xiej@ffrc.cn

收稿日期: 2012-08-23, 收修改稿日期: 2012-10-21

琼脂平板, 30℃培养 24h 后观察。挑取优势菌以 LB 琼脂平板纯化 2 次后, 保存于 LB 琼脂斜面备用。

1.2 菌落形态与培养特征检查

1.2.1 分离菌株培养条件检测 取纯培养菌移接于 LB 液体培养基 30℃培养 24h, 制备成涂片标本, 经革兰氏染色镜检细菌形态; 将制备的分离菌菌液按 1%的比例分别接种于调整成不同盐度(5、10、15、20、25、30)和 pH 值(4、5、6、7、8、9、10)的 LB 液体培养基, 30℃ 160r/min 摇床培养 24h, 测定菌液 OD_{600} 值; 将分离菌株划线接种于 LB 琼脂平板, 分别置于 5℃、10℃、15℃、20℃、25℃、28℃、30℃、35℃、37℃、40℃、42℃、45℃培养箱中培养 24h, 观察细菌生长情况。

1.2.2 胞外酶活性检测 对分离菌株 SY-1 分别进行了脂酶、卵磷脂酶、蛋白酶、尿素酶、淀粉酶等胞外产物的检验, 将分离菌株分别点状接种于含有蛋黄液(10%)、吐温 80 (1.0%)、脱脂牛奶(10%)、淀粉(1%)的 LB 琼脂平板中, 于 30℃恒温培养 24h 后观察, 含蛋黄液、吐温 80 以及脱脂牛奶的平板可以直接观察水解圈, 若菌落周围出现透明环则为阳性(张晓君等, 2009); 含淀粉的平板则在观察之前滴加 I_2 -KI 溶液(革兰氏染色用卢戈氏液), 若细菌具有淀粉酶, 则淀粉被分解, 不与碘发生反应, 菌落周围培养基变透明, 如细菌不具有淀粉酶, 则培养基中的淀粉与碘发生反应出现紫色(邢旭文等, 2009); 明胶酶活性采用明胶生化反应管液化方法, 接种后 30℃恒温培养 24h, 置于 4℃冰箱中过夜后观察, 培养基液化, 不再凝固时为阳性。

1.3 人工回感试验

取分离菌株 SY-1 移接于 LB 液体培养基, 160r/min 摇床培养 24h 后, 制备成 3×10^{10} 、 3×10^9 、 3×10^8 、 3×10^7 、 3×10^6 CFU/mL 的菌悬液, 经肌肉接种感染健康异育银鲫(体重 100g 左右)10 尾(每尾 0.5mL), 同时设立接种无菌 LB 液体培养基的对照组异育银鲫 10 尾。接种后隔离充气饲养于水族箱中, 每天换水 1 次, 早、晚各投喂 1 次配合饲料。观察其发病及死亡情况, 死亡异育银鲫按照 1.1 方法进行病原菌分离。

1.4 病原菌菌种鉴定

1.4.1 生理生化特性测定 分别移接于细菌鉴定的相应生化微量反应管进行糖(醇和苷)类代谢、有机酸盐利用、 H_2S 产生、葡萄糖产气、硝酸盐还原等试验, 较系统地测定其理化特性(东秀珠等, 2001)。

1.4.2 16S rRNA 基因序列测定与系统发育学分析

将菌株 SY-1 于 30℃液体培养基中培养 24h, 12000r/min 离心 1min 收集菌体, 按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒(生工生物工程(上海)股份有限公司)提取基因组 DNA, 作为 PCR 模板, -20℃保存备用。

利用细菌 16S rRNA 通用引物, 分别为正向引物 27F: (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTCAG-3'), 反向引物 1492R: (5'-GGT TAC CTT GTTACGACT T-3')。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。20 μ L 的 PCR 反应体系为: 10 \times PCR 缓冲液 2 μ L、4 \times dNTP 混合物 0.5 μ L、1.5mmol/L $MgCl_2$ 1.6 μ L、引物各 0.2 μ L、Taq DNA 聚合酶 0.3 μ L, DNA 模板 2 μ L、无菌双蒸水 13.2 μ L。PCR 反应条件为: 95℃预变性 4min; 94℃变性 1min、56℃复性 1min、72℃延伸 2min, 30 个循环; 72℃温育 5min (祝璟琳等, 2010)。取 5 μ L 产物在含 goldview 染色剂的 1%琼脂糖凝胶上电泳, 电泳结束后将胶放入凝胶成像系统, 拍照观察结果。PCR 扩增产物交由生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定。

将菌株 SY-1 的 16S rRNA 基因序列与从 GenBank 中已知核酸序列进行 Blast 分析, 并使用 ClustalX 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, 之后使用 MEGA 4.1 软件采用邻接法构建系统进化树, 并通过 Bootstrap 法(1000 次重复)检验。

1.5 药敏试验

药敏试验采用 K-B 纸片法进行, 菌液浓度为(1×10^7)—(1×10^8) CFU/mL, 在无菌条件下进行操作, 以抑菌圈直径大小作为敏感与耐药的判定指标(叶应妩等, 1997)。药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司。

2 结果与分析

2.1 菌落形态特征

取发病鲫鱼血液, 无菌操作均匀涂布于 LB 琼脂平板, 30℃培养 24h, 平板上有大量优势生长的细菌, 主要为 3 种。其中一种即为本研究所用菌株, 经纯化, 30℃培养 24h, 呈乳白色不透明的圆形菌落, 直径 1.5mm 左右, 中央隆起, 表面及边缘均光滑, 粘而附于培养基上。革兰氏染色镜检为阴性菌, 杆状。

2.2 分离菌主要生物学形状

2.2.1 培养条件 在 LB 液体培养基中, 30℃培养 24h 检查呈均匀混浊生长, 管底有点状菌体沉淀(摇动呈线状上升易消散)。在盐度 5—30 的 LB 液体培养基中均能生长, 在盐度为 0.5%的液体培养基中生长

旺盛; 能生长的 pH 范围为 6—8; 低于 10℃ 以及高于 45℃ 时该菌不生长, 最适生长温度为 30—37℃。

2.2.2 胞外酶活性 菌株 SY-1 不具有酪蛋白酶、淀粉酶、脂酶活性, 也不具明胶酶以及卵磷脂酶活性, 但具有脲酶活性。

2.3 回归感染试验结果

取上述鉴定的醋酸钙不动杆菌 SY-1, 对健康异育银鲫进行回归感染试验, 结果显示, 浓度为 3×10^{10} 、 3×10^9 、 3×10^8 CFU/mL 试验组有鲫死亡, 体表有轻微出血症状, 剖检未见明显病变, 从死亡鱼中分离到少量同种菌落, 经复核鉴定与所用的感染菌相一致。浓度为 3×10^7 CFU/mL、 3×10^6 CFU/mL 的试验组观察 14d 未见发病, 对照 10 尾观察 14d 均正常存活。

2.4 生理生化特性

生化特性结果显示, 分离菌株 SY-1 能利用葡萄糖、麦芽糖、甘露糖、半乳糖、纤维二糖、甘露醇, 其它糖醇类不能利用; 不利用苯丙氨酸、鸟氨酸、赖氨酸以及精氨酸; 硝酸盐还原不产气, 葡萄糖产酸不产气; 能在醋酸盐、丙二酸盐中生长。属于氧化型细菌。具体结果见表 1。

2.5 16S rRNA 基因序列测定及分析

用 SY-1 菌株所扩增的 16S rRNA 基因序列长度 1435bp, 在 GenBank 中登录号为 JX164201。将 SY-1 菌株的 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

表 1 分离菌株的生理生化特性
Tab.1 Physiological and biochemical characteristics of the isolate

特性	菌株		特性	菌株	
	SY-1	A.c*		SY-1	A.c*
葡萄糖	+	+	纤维二糖	+	+
乳糖	-	-	蛋白胨水	-	.
麦芽糖	+	-	葡萄糖铵	+	+
甘露醇	+	+	鸟氨酸脱羧酶	-	-
甘露糖	+	-	赖氨酸生化管	-	-
蔗糖	+	-	葡萄糖产气	-	-
阿拉伯糖	-	+	精氨酸双水解酶	-	-
阿拉伯醇	-	-	硝酸盐(产气)	-	-
木糖	-	-	β -半乳糖苷	-	.
木糖醇	-	-	枸橼酸盐	-	.
半乳糖	+	-	醋酸盐	+	+
松三糖	-	-	酒石酸盐	-	.
山梨醇	-	-	DNA	-	.
山梨糖	-	-	丙二酸盐	+	+
卫茅醇	-	-	蕈糖	-	-
赤藓醇	-	-	棉子糖	-	-
苦杏仁苷	-	.	果糖	-	-
鼠李糖	-	-	蜜二糖	-	-
糊精	+	.	乙酰胺酶	+	.
淀粉	-	-	硝酸盐(还原)	+	-
肌醇	-	.	OF 管	O	O
侧金盏花醇	-	-	精氨酸脱羧酶	-	-
水杨苷	-	.	氰化钾生长试验管	-	.
尿素	+	+	葡萄糖酸盐	-	.
硫化氢	-	.	α -甲基-D 葡萄糖苷	-	.

注: “-”: 0%—10%阳性; “+”: 90%—100% 阳性; “.”: 未记录; “O”: 氧化型。*指表中数据取自文献《Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed.》(Krieg *et al*, 1994)

的同源性在 99%—100%。从中选取 18 株细菌的 16S rRNA 基因序列进行系统发育学分析, 结果其与醋酸钙不动杆菌(登录号: JN700142)聚为一分支, 系统发育树如图 1。综合细菌形态学、生理生化特性以及 16S rRNA 的分子鉴定, 判定分离菌为不动杆菌属的醋酸钙不动杆菌。

2.6 药敏试验结果

菌株 SY-1 对 39 中抗生素的敏感性如下: 对恩诺沙星、强力霉素、萘啶酸、复方新诺明、氧氟沙星、环丙沙星、米诺沙星、氟罗沙星、左氟沙星、红霉素敏感; 对青霉素 G、氨苄西林、多粘菌素 B、磷霉素、甲哌利福霉素、乙酰螺旋霉素等 15 种抗生素耐药, 其中氨苄西林、苯唑西林、林可霉素、万古霉素、氟苯尼考、替考拉丁等 6 种无抑菌圈。具体结果见表 2。

3 讨论

醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoacet*)属于不动杆菌属, 广泛分布于自然界中, 主要在水体和土壤中, 易在潮湿环境中生存。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(李梦东, 1998), 存在于健康人的皮肤、咽部等; 对陆生动物已有记述可致新生犊的败血症、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鲍氏不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)(顾天钊等, 1997)、鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*)(李桂峰等, 2001)。国外曾发现该菌能引起虹鳟鱼和溪鱈鱼病害(Marina *et al.*, 2009), 醋酸钙不动杆菌国内仅报道一例, 与嗜水气单胞菌共同作用引起牛蛙红腿病(胡成钰等, 2001)。

本研究所检的异育银鲫病例, 属于混合感染, 从病鱼血液中分离所得细菌的数量和人工感染试验结果分析可知, 其中主要是维氏气单胞菌与嗜水气单胞菌, 分离所得的醋酸钙不动杆菌较少, 是一种参与菌。人工回感试验结果显示, 死亡鲫出血症状轻微, 分离菌株具有一定毒力, 但是致病力低。

对醋酸钙不动杆菌的鉴定, 主要根据其革兰染色阴性杆菌以及生化试验结果。常见细菌系统鉴定手册记载该菌种有 10%—20% 菌株液化明胶, 一般的菌株具有脲酶, 不能使苯丙氨酸脱氢, 也不能使鸟氨酸、赖氨酸和精氨酸脱羧, 所有的菌株都能在铵盐和

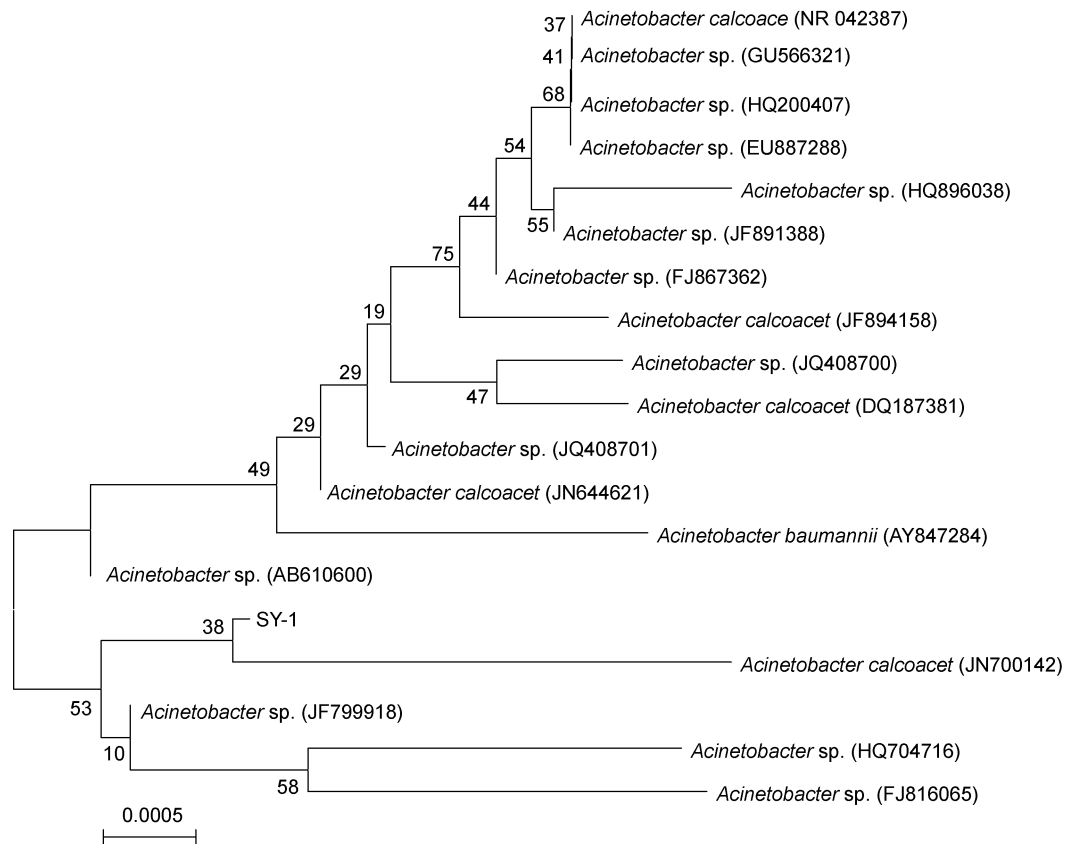


图 1 分离菌 SY-1 16S rRNA 基因序列发育进化树

Fig.1 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequence of the isolate SY-1

表 2 分离菌株 SY-1 的药敏试验结果

Tab.2 Results of drug sensitive test on the isolate SY-1

药物名称	药物含量 ($\mu\text{g}/\text{片}$)	抑菌圈(mm)	敏感性	药物名称	药物含量 ($\mu\text{g}/\text{片}$)	抑菌圈(mm)	敏感性
青霉素 G	10	14	R	强力霉素	30	20	S
氨苄西林	10	7	R	诺氟沙星	10	16	I
羧苄青霉素	100	17	I	萘啶酸	30	21	S
苯唑西林	1	7	R	乙酰螺旋霉素	30	8	R
林可霉素	2	7	R	大观霉素	100	16	I
多粘菌素 B	300	13	R	复方新诺明	23.7/1.25	20	S
万古霉素	30	7	R	氧氟沙星	5	21	S
磷霉素	200	8	R	环丙沙星	5	22	S
恩诺沙星	5	22	S	米诺沙星	30	26	S
甲哌利福霉素	5	9	R	洛美沙星	10	19	I
链霉素	10	12	R	氨基南	30	17	I
卡那霉素	30	17	I	氟罗沙星	30	21	S
阿米卡星	30	16	I	氟苯尼考	30	7	R
庆大霉素	10	14	R	克拉霉素	15	16	I
妥布霉素	10	18	I	左氟沙星	5	21	S
新霉素	30	19	I	麦迪霉素	30	9	R
新生霉素	30	10	R	依诺沙星	10	15	I
四环素	30	16	I	罗红霉素	15	15	I
哌拉西林	100	19	I	替考拉丁	30	7	R
红霉素	15	20	S				

注: 抑菌圈直径包括药敏纸片直径 7mm; R(耐药): 7mm 抑菌圈直径 14mm; S(敏感): 抑菌圈直径 20mm; I(中介): 15mm 抑菌圈直径 19mm

乙酸盐、丁酸盐或丙酮酸盐作为碳源和能源的简单无机培养基中生长; 除极少数例外, 不能利用六碳糖、双糖和糖醇类(东秀珠等, 2001)。本研究生化试验结果显示, 分离菌株 SY-1 具有醋酸钙不动杆菌的理化特性, 有些特性是少数菌株所有的。再结合 16S rRNA 基因序列测定与系统发育学分析, 进一步增加了对该菌鉴定的准确性。

使用抗生素来降低死亡率和经济损失是目前通行的做法(祝璟琳等, 2010), 但是过多使用抗菌药物会产生耐药菌株。经 39 种抗菌类药物对分离菌的药敏测定, 结果显示该菌对多种抗生素普遍耐药。胡成钰等(2001)研究表明自牛蛙体内分离所得的醋酸钙不动杆菌对四环素、红霉素和妥布霉素敏感。何林等(2001)研究表明, 醋酸钙不动杆菌对环丙沙星以及阿米卡星等敏感, 但是对氨基南、氨苄西林等表现出了强耐药性, 与本文的结果有差异。本供试菌株分离自异育银鲫, 说明分离自鱼体内的菌株其耐药性与人体上的菌株有一定的差异性。药敏试验结果可为该菌耐药谱的研究等提供一定的参考。

参 考 文 献

- 王春燕, 2002. 异育银鲫败血病病原体的诊断及毒力和药敏实验. 生物学杂志, 19(6): 30—31
- 东秀珠, 蔡妙英, 2001. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 364—398
- 叶应妩, 王毓三, 申子瑜, 1997. 全国临床检验操作程(第 2 版). 南京: 东南大学出版社, 553—560
- 孙其焕, 孙佩芳, 垒雨华等, 1991. 异育银鲫溶血性腹水病病原的研究. 水产学报, 15(2): 130—139
- 李桂峰, 李海燕, 毕英佐, 2001. 胡子鲇“吊头病”病原的研究. 中国水产科学, 8(2): 72—75
- 李梦东, 1998. 实用传染病学(第 2 版). 北京: 人民卫生出版社, 478—480
- 邴旭文, 阎斌伦, 张晓君等, 2009. 泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)病原霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)的表型与分子鉴定. 海洋与湖沼, 40(6): 692—698
- 何林, 张立军, 吴劲松等, 2001. 醋酸钙不动杆菌对 22 种抗生素的耐药性研究. 中国微生态学杂志, 13(5): 287—288
- 张学师, 2011. 射阳县异育银鲫池塘养殖病害发生原因及防治对策. 渔业致富指南, (9): 56—58
- 张晓君, 陈翠珍, 阎斌伦等, 2009. 凡纳滨对虾(*Litopenaeus*

- vannamei*)病原副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)的表型及分子特征. 海洋与湖沼, 40(5): 654—662
- 陆文浩, 陈辉, 黄春贵, 2009. 异育银鲫气单胞菌病原菌鉴定和药敏试验. 广东海洋大学学报, 29(1): 26—30
- 陆承平, 2001. 兽医微生物学(第3版). 北京: 中国农业出版社, 282—283
- 胡成钰, 洪一江, 2001. 牛蛙红腿病病原菌敏感药物的筛选. 水利渔业, 21(2): 49
- 祝璟琳, 杨弘, 邹芝英等, 2010. 海南养殖罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)致病链球菌的分离、鉴定及其药敏试验. 海洋与湖沼, 41(4): 590—596
- 顾天钊, 陆承平, 陈怀青, 1997. 鲍氏不动杆菌——鳜鱼暴发性死亡的新病原. 微生物学通报, 24(2): 104—106
- 崔正贺, 王岩, 2007. 不同体重异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)的补偿生长. 海洋与湖沼, 38(1): 8—14
- 储卫华, 2001. 异育银鲫细菌性败血症病原与防治研究. 水利渔业, 21(1): 40
- Krieg N R, Hoit J G, 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed. Baltimore: Willians and Wilkins Company, 516—548
- Marina SPÎNU, Carmen Dana SANDRU, Gheorghe F, 2009. Bacterial Load of Trout Farm Waters in Connection with the Carrier Estate of the Fish for Zoonotic Microbes. Bulletin UASVM, Veterinary Medicine, 66(2): 1843—5270

PHENOTYPES AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF PATHOGENIC *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* FROM *CARASSIUS AURATUS GIBELIO*

XIA Fei^{1,2}, LIANG Li-Guo¹, GU Wei^{1,2}, XIE Jun¹

(1. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi, 214081;
2. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi, 214081)

Abstract A purely cultured strain (SY-1) isolated from blood of sick *Carassius auratus gibelio*, and its culture characteristics, main morphological physiological and biochemical characteristics were examined. It is found that its salinity range is 5—30, pH range is 6—8 and its growth temperature range is from 10°C to 42°C. Detection of the activity of extracellularase shows that the isolate could just produce urease. For further confirmation on molecular level, 16S rRNA gene was sequenced; and the accession number in GenBank is JX164201 in length of 1435bp. Sequences analysis on the 16S rRNA gene shows that it is very similar to other *Acinetobacter*, and their nucleotide homology was between 99% and 100%. Its phylogenetic tree show that the pathogen isolated from the diseased *C. auratus gibelio* was identified as *Acinetobacter calcoaceticus*. The challenge test using SY-1 to the fish displayed that the prevalence of symptoms and spontaneous onset symptoms were the same. The antibiotic sensitivity using 39 antimicrobial agents showed that isolates were sensitive to 10 agents, including enrofloxacin, doxycycline, nalidixic acid, cotrimoxazole, and ofloxacin, etc; sensitive slightly to 14 agents, including penicillin, norfloxacin, spectinomycin, kanamycin, and tetracycline, etc; and resistant to 15 agents, including ampicillin, lincomycin, oxacillin, vancomycin, and florfenicol, etc.

Key words *Carassius auratus gibelio*; *Acinetobacter calcoaceticus*; pathogenicity; drug sensitivity test