

草鱼肠道约氏不动杆菌的分离鉴定及药敏特性研究

胡秀彩¹, 吕爱军¹, 孙敬锋¹, YEONG Yiksung¹, 石洪玥¹, 宋亚娇^{1,2}

(1.天津农学院水产学院,天津市水生生态及养殖重点实验室,天津 300384;

2.河南师范大学水产学院,河南 新乡 453007)

摘要:研究草鱼肠道不动杆菌,为鱼类肠道细菌的分离鉴定与微生态机制研究积累资料。从草鱼肠道中分离纯化获得1株细菌,编号为SW-2,采用细菌形态观察、生理生化特性分析、16S rDNA克隆测序及系统发育树构建等进行研究。结果表明SW-2菌株为革兰氏阴性短杆菌,对葡萄糖、甘露糖、木糖、枸橼酸盐利用等均为阴性;PCR方法扩增SW-2菌株16S rDNA并亚克隆至pMD18-T载体,测序获得序列长度为1503 bp,与约氏不动杆菌(*Acinetobacter johnsonii*)序列相似性最高为99.7%;进一步构建系统发育树显示与*A. johnsonii*亲缘关系最近,自然聚类为一支,从而确定为约氏不动杆菌(*A. johnsonii*);药敏试验结果显示SW-2菌株对庆大霉素、羧苄青霉素、阿莫西林、氨苄西林、卡那霉素等药物敏感。人工回归感染草鱼7 d后未出现发病死亡现象,但是是否为条件致病菌有待进一步研究。

关键词:约氏不动杆菌;16S rDNA;分离鉴定;药敏试验;草鱼

中图分类号:S941.42 文献标志码:A 文章编号:1674-3075(2019)05-0099-05

不动杆菌属(*Acinetobacter*)细菌广泛分布于水、土壤环境中,主要包括醋酸钙不动杆菌(*A. calcoaceticus*)、洛菲不动杆菌(*A. lwoffii*)、鲍曼不动杆菌(*A. baumanii*)、琼氏不动杆菌(*A. junii*)和约氏不动杆菌(*A. johnsonii*)等(Malik et al, 2003; Feng et al, 2016; 刘金辉等, 2016)。研究表明,不动杆菌(*Acinetobacter*)为条件致病菌,可引起人、兽、鱼类感染发病(Tian et al, 2016; 吴彩艳等, 2013)。近几年,从鲤、鲫、草鱼等体内分离获得琼氏不动杆菌(*A. junnii*)、鲍曼不动杆菌(*A. baumanii*)、厦门不动杆菌(*A. xiamenensis*)(毛芝娟等, 2013; 顾泽茂等, 2010; 胡秀彩等, 2016)。目前未见鱼源约氏不动杆菌的报道。本研究对从草鱼肠道中分离获得的1株不动杆菌进行细菌形态学、生理生化以及16S rDNA测序,鉴定种类,为鱼类肠道不动杆菌的分离鉴定与微生态机制研究积累资料。

收稿日期:2017-07-31

基金项目:天津市自然科学基金重点项目(18JCYBJC29900);天津市水生生态及养殖重点实验室开放基金(TJAE201803);天津市水产产业技术创新团队(ITTFRS2017009);河南省高等学校重点科研项目(17A240001);河南省自然科学基金项目(182300410021)。

作者简介:胡秀彩,1976年生,实验师,主要从事水产动物与微生物学研究。E-mail: huxiucai@126.com

通信作者:吕爱军,教授,博士,主要从事水产动物微生物与免疫学研究。E-mail: lajand@126.com

1 材料与方法

1.1 材料

草鱼(平均体重约50 g)购自江苏省徐州市某水产市场,随机挑选健康活泼、无临床症状的草鱼。LB培养基、肠杆菌科细菌生化编码鉴定管和药敏纸片购自杭州滨和微生物试剂有限公司。PCR反应试剂、细菌基因组提取试剂盒、DNA凝胶回收试剂盒均购自大连宝生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌的分离、纯化与生理生化鉴定 参照胡秀彩等(2016)方法。无菌操作剪取草鱼肠道中后段,刮取肠道内容物加适量无菌生理盐水后,低速离心5 min,吸取少量上清液涂布LB平板,28℃培养过夜,挑取单菌落经传代纯化2~3次后,4℃冰箱保存、备用。草鱼肠道细菌的生理生化试验,采用肠杆菌科细菌生化编码鉴定管,包括糖、盐类、MR、VP、吲哚试验等11项生理生化指标测定。

1.2.2 16S rDNA分子鉴定 采用细菌基因组试剂盒提取总DNA,通用引物正向27F:5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3',反向1492R:5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3',PCR扩增16S rDNA基因。PCR反应条件为:95℃预变性2 min、95℃变性40 s、53℃复性40 s、72℃延伸1 min 30 s,循环30次,72℃延伸10 min。用DNA胶回收试剂盒纯化PCR产物,PCR产物与pMD18-

T载体连接,转化至大肠杆菌DH5 α ,筛选阳性克隆,送至上海生工生物公司测序。

1.2.3 人工回归感染与药物敏感性测定 人工感染试验参照胡秀彩等(2018)方法进行。随机选取健康草鱼12尾,在实验室饲养1周确认无病后用于感染试验,通过平板菌落计数法测定菌悬液浓度为 1.0×10^9 、 1.0×10^{10} 、 1.0×10^{11} CFU/mL。每个浓度感染3尾鱼,腹腔注射,0.2 mL/尾;对照组3尾鱼注射等量无菌生理盐水。连续观察7 d,观察草鱼发病死亡情况。药敏试验参照曹恒源等(2016)方法进行,选用21种抗生素采用K-B法进行药敏试验,28℃培养36 h后,测量药物的抑菌圈直径。

1.2.4 数据分析处理 用Clustalx1.83和BLAST软件进行序列比对、同源性分析,采用MEGA4.1软件Neighbor-joining法构建系统发育树(胡秀彩等,2016;曹恒源等,2016)。

2 结果与分析

2.1 细菌形态及理化特征

从草鱼肠道中分离纯化得到1株细菌,编号为SW-2。该分离菌在LB培养基上长势良好,菌落形态特征为乳白色不透明、表面光滑、湿润、边缘整齐(图1a),革兰氏染色显示为革兰氏阴性短杆菌(图1b)。采用肠杆菌科细菌生化编码鉴定管试验结果表明菌株SW-2不发酵葡萄糖,葡萄糖酸盐、枸橼酸盐、丙二酸盐,甘露糖、木糖、山梨糖、蜜二糖等利用均为阴性,靛基质、MR、VP试验阴性。

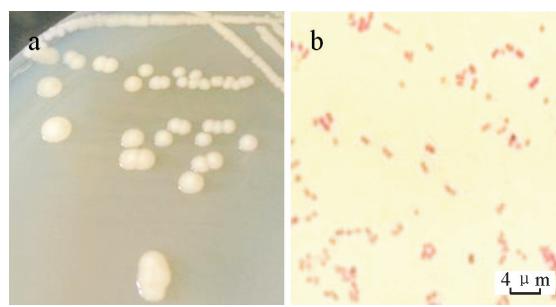


图1 SW-2 菌的形态及菌落特征
a. Colonial morphology b. Gram-staining

Fig.1 Morphological and colony characteristics of SW-2 strain

2.2 16S rDNA序列及系统发育树分析

以SW-2菌株基因组DNA为模板,采用PCR法将16S rDNA序列扩增,进行琼脂糖凝胶电泳显示目的条带出现在1 500 bp处左右(图2)。将其亚克隆于pMD18-T载体中,进行阳性克隆16S rDNA

基因测序显示大小为1 503 bp。进一步采用BLAST程序对16S rDNA测序结果进行同源性检索,SW-2菌株与约氏不动杆菌(*Acinetobacter johnsonii*)参考菌株(登录号:AB099655.1)序列相似性最高达到99.7%,最终确定SW-2菌为约氏不动杆菌(*A. johnsonii*)。选择11个遗传距离较近的不动杆菌(*Acinetobacter*)为参照菌株,构建SW-2的系统发育树,结果显示SW-2与*A. johnsonii*的亲缘关系最近,自然聚类为一支(图3)。

2.3 人工回归感染与药敏试验结果

人工感染试验结果表明,约氏不动杆菌SW-2菌株对草鱼无致病性,临床观察显示感染组与对照组草鱼之间无明显差异,并且所有草鱼7 d后均无出现发病死亡现象。药敏试验结果显示,SW-2细菌对庆大霉素、阿莫西林、氨苄西林、阿奇霉素、卡那霉素和氯霉素等药物敏感;对哌拉西林、头孢哌酮、头孢噻肟、头孢孟多、先锋霉素IV、克林霉素、万古霉素、替考拉宁、四环素、头孢噻吩和羧苄青霉素等耐药(表1)。其中庆大霉素等6种抗生素药敏试验结果见图4。

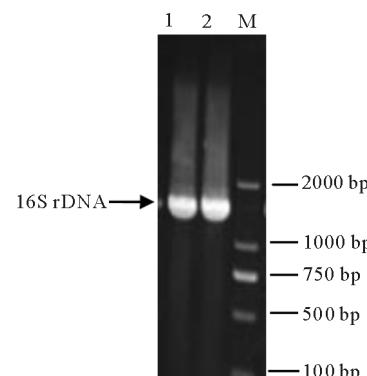


图2 SW-2 菌株电泳
Fig.2 PCR production of 16S rDNA from the SW-2 strain

3 讨论

近几年,研究报道的鱼源不动杆菌主要有鲍曼不动杆菌(*A. baumannii*)、琼氏不动杆菌(*A. junii*)和洛菲不动杆菌(*A. lwoffii*)(刘年峰等,2013;陈翠珍等,2009;张涵等,2013;王恒安等,2004)。Huber等(2004)研究发现虹鳟肠道中有不动杆菌(*Acinetobacter*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)等。张涵等(2013)研究表明三角帆蚌、银鲫、青鱼、鳙等肠道优势菌群均有不动杆菌属,推测不动杆菌为淡水鱼类肠道优势菌。本研究通过对草鱼肠道细菌SW-2菌株形态观察、生理生化特征的研究,结合

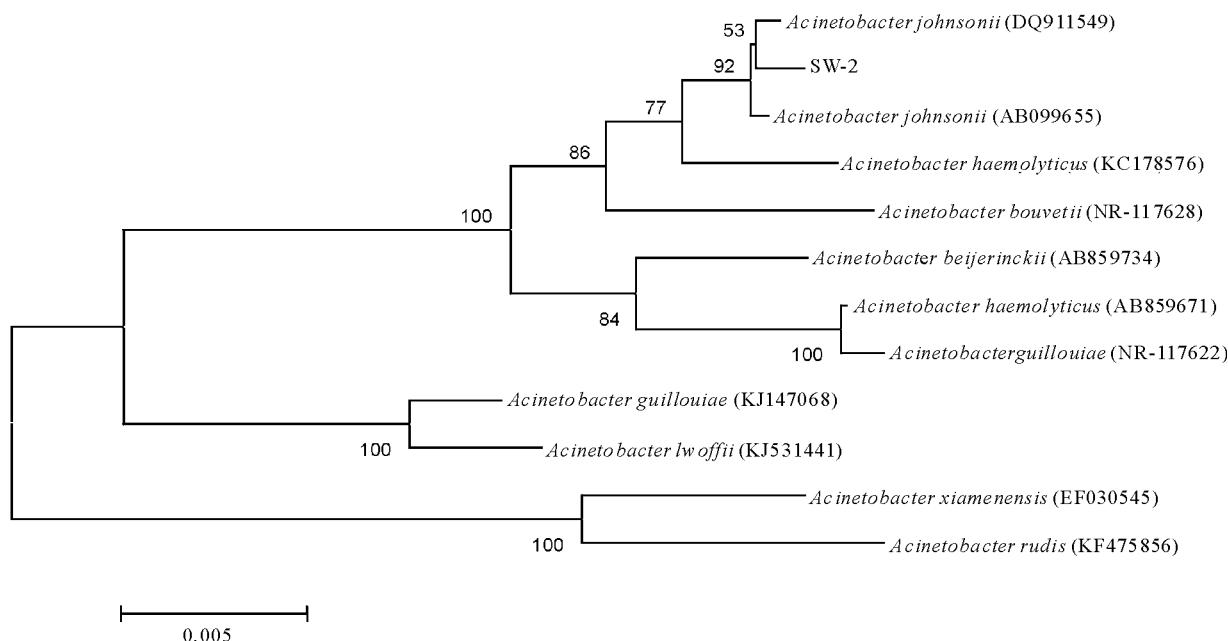


图 3 SW-2 菌株 16S rDNA 系统发育树分析

Fig.3 Phylogenetic tree of *Acinetobacter* strains, including the SW-2 strain, based on 16S rDNA sequences

表 1 从草鱼肠道分离的 SW-2 菌对药物敏感性

Tab.1 Antibiotic sensitivity of the SW-2 strain isolated from the intestinal tract of grass carp



1. 复方新诺明, 2. 阿奇霉素, 3. 庆大霉素, 4. 替考拉宁, 5. 头孢噻吩, 6. 先锋霉素 IV

图 4 SW-2 菌株药敏试验

1. SMZ/TMP, 2. Azithromycin, 3. Gentamicin, 4. Teicoplanin, 5. Cephalothin, 6. Cephalothins IV

Fig.4 Antibiotic sensitivity test of the SW-2 strain

16S rDNA 测序和 Blast 比对法进行鉴定分析及系统发育树分析, 鉴定为约氏不动杆菌 (*Acinetobacter johnsonii*), 其菌落形态特征与王恒安等(2004)描述约氏不动杆菌 STRB 菌株特征基本一致。李明堂等(2013)研究报道约氏不动杆菌对葡萄糖、蔗糖等利用程度非常低。本试验结果表明草鱼约氏不动杆菌 SW-2 菌株对葡萄糖、甘露糖、木糖、枸橼酸盐、葡萄糖酸盐、丙二酸盐利用等显示为阴性, 说明约氏不动杆菌对糖类成分分解利用能力极低, 但该菌在鱼类肠道微生态及其生理功能仍不清楚。

研究表明, 不动杆菌 (*Acinetobacter*) 为条件致病菌, 可引起多种鱼感染发病(毛芝娟等, 2013; 顾泽茂等, 2010; 陈翠珍等, 2009)。毛芝娟等(2013)分离

抗生素	含药量/ $\mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$	抑菌圈直径/mm	敏感性
庆大霉素	10	19	S
阿莫西林	10	18	S
氨苄西林	10	15	S
哌拉西林	100	13	R
头孢哌酮	75	10	R
头孢噻肟	30	12	R
复方新诺明	30	13	I
头孢孟多	30	9	R
先锋霉素 IV	30	10	R
红霉素	15	15	I
阿奇霉素	15	23	S
诺氟沙星	10	14	I
克林霉素	2	0	R
卡那霉素	30	19	S
磺胺异恶唑	300	13	I
万古霉素	30	0	R
替考拉宁	30	0	R
四环素	30	13	R
头孢噻吩	30	0	R
羧苄青霉素	100	12	S
氯霉素	30	20	S

注: I - 中等敏感; R - 抗性; S - 敏感

Note: I - moderately sensitive; R - resistant; S - sensitive

获得琼氏不动杆菌, 患病史氏鰕的症状为体表褪色、肛门红肿、腹腔肿大伴有大量血性腹水。陈翠珍等(2009)从病死锦鲤肝组织中分离鉴定 2 株琼氏不动

杆菌(*A. junii*)。陆文浩等(2009)从异育银鲫分离鉴定出鲍曼不动杆菌,患病症状为腹腔积水、咽腔组织充血和鳃组织发炎等。本研究从健康草鱼肠道中分离到约氏不动杆菌(*A. johnsonii*)SW-2菌株,人工回归感染试验结果表明感染7d后草鱼未出现发病死亡现象,但是是否为条件致病菌有待进一步研究。

水产细菌耐药菌株尤其是多重耐药菌株逐渐增多,因此不动杆菌抗生素敏感特性备受关注(毛芝娟等,2013;胡秀彩等,2016)。研究表明,锦鲤琼氏不动杆菌(*A. junnii*)对青霉素类和第一、二代头孢类抗生素耐药,而对第三代头孢菌素和碳青霉烯等敏感(毛芝娟等,2013)。锦鲤琼氏不动杆菌(*A. junnii*)对头孢拉定、头孢噻肟、头孢哌酮、庆大霉素、卡那霉素、诺氟沙星、氧氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星、复方新诺明等药物敏感,对青霉素G、氨苄青霉素、克林霉素、万古霉素等耐药(刘年峰等,2013)。胡秀彩等(2016)从草鱼肠道中分离获得厦门不动杆菌(*A. xiamenensis*)CAX1菌株,药敏试验结果对庆大霉素、阿莫西林、氨苄西林、头孢哌酮等药物敏感。本研究药敏试验结果显示约氏不动杆菌(*A. johnsonii*)SW-2菌株对庆大霉素、羧苄青霉素、阿莫西林、氨苄西林、阿奇霉素、卡那霉素等药物敏感。由此可见,水生动物源不动杆菌对头孢类、喹诺酮类等药物敏感,对青霉素类等药物耐药(毛芝娟等,2013;刘年峰等,2013;胡秀彩等,2016)。本研究可为了解鱼类不动杆菌的药敏特性以及肠道微生物研究提供科学参考。

参考文献

- 曹恒源,乔晔,陈小娟,等,2016.圆口铜鱼维氏气单胞菌的分离鉴定及药敏试验[J].水生态学杂志,37(4):95-100.
- 陈翠珍,张晓君,房海,等,2009.锦鲤中琼氏不动杆菌的分离与鉴定[J].水生态学杂志,2(1):86-90.
- 顾泽茂,柳阳,陈昌福,等,2010.鲍曼不动杆菌斑点叉尾鮰的分离与鉴定[J].华中农业大学学报,29(4):489-493.
- 胡秀彩,李旭,吕爱军,等,2016.草鱼肠道不动杆菌的分离鉴定及药敏试验[J].江苏农业科学,44(11):256-258.

- 刘金辉,张杰,姜岩,等,2016.约氏不动杆菌LP28低温碱性脂肪酶分离纯化及洗涤性能分析[J].应用化工,45(9):1691-1695.
- 刘年峰,2013.金鱼源多重耐药不动杆菌的分离与鉴定[J].水产养殖, (5):161-163.
- 李明堂,王玉军,赵淑杰,等,2013.一株约氏不动杆菌对氨氮的低温去除特性研究[J].农业环境科学学报,32(10):2055-2060.
- 陆文浩,陈辉,王习达,等,2009.异育银鲫致病性鲍曼不动杆菌的鉴定和系统发育分析[J].中国兽医学报,39(4):303-309.
- 毛芝娟,毛甬州,汪建萍,2013.两株鱼源琼氏不动杆菌的分离、鉴定和耐药特性分析[J].水产学报,37(10):1572-1578.
- 胡秀彩,孙金辉,吕爱军,等,2018.鱼源维氏气单胞菌温和生物变种的分离鉴定及药敏特性[J].水生态学杂志,39(1):105-110.
- 王恒安,秦磊,成志恒,等,2004.一株约翰逊不动杆菌的分离和鉴定[J].南京农业大学学报,27(2):139-142.
- 吴彩艳,戚南山,廖申全,等,2013.鸭源沃氏不动杆菌的分离鉴定及序列分析[J].畜牧与兽医,45(7):77-79.
- 张涵,周涛,王岩,2013.综合养殖池塘中三角帆蚌和鱼类肠道细菌的组成[J].水生生物学报,37(5):824-835.
- Feng Y, Yang P, Wang X, et al, 2016. Characterization of *Acinetobacter johnsonii* isolate XBB1 carrying nine plasmids and encoding NDM-1, OXA-58 and PER-1 by genome sequencing[J]. J Antimicrob Chemother, 71(1):71-5.
- Huber I, Spanggaard B, Appel KF, et al, 2004. Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum)[J]. J Appl Microbiol., 96(1):117-32.
- Malik A, Sakamoto M, Hanazaki S, et al, 2003. Coaggregation among nonflocculating bacteria isolated from activated sludge[J]. Appl Environ Microbiol, 69(10):6056-6063.
- Tian S, Ali M, Xie L, et al, 2016. Genome-sequence analysis of *Acinetobacter johnsonii* MB44 reveals potential nematode-virulent factors[J]. Springerplus, 5(1):986.

(责任编辑 张俊友)

Isolation, Identification and Antibiotic Susceptibility of *Acinetobacter johnsonii* from the Intestine of Grass Carp

HU Xiu-cai¹, LV Ai-jun¹, SUN Jing-feng¹, YEONG Yiksung¹, SHI Hong-yue¹, SONG Ya-jiao^{1,2}

(1.Tianjin Key Lab of Aqua-Ecology and Aquaculture, College of Fisheries,

Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384,P.R.China;

2.College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007,P.R.China)

Abstract: *Acinetobacter* bacteria are opportunistic pathogens, widely distributed in water and soil, and can infect humans, animals and fish. Reports in the literature have described the isolation of several *Acinetobacter* species from sturgeon, catfish, crucian carp and grass carp including *A. junnii*, *A. bauman* and *A. xiamenensis*. However, no study has been reported on the isolation and identification of *Acinetobacter johnsonii* in fish. In this study, a bacterial strain isolated from the intestine of grass carp and labeled SW-2 was identified through morphological examination, physiological and biochemical analysis, and phylogenetic tree analysis based on 16S rDNA sequencing. Simultaneously, an artificial infection study was carried out on healthy grass carp by injecting different concentrations of a suspension of the SW-2 strain. An antibiotic susceptibility test was carried out using 21 antibiotics. The SW-2 strain is gram-negative, rod shaped, milky white, moist with a smooth surface and regular edges. It cannot produce acid from glucose, mannose or xylose and the test for citrate utilization was negative. The 16S rDNA gene sequence of the SW-2 strain was amplified and sub-cloned with the pMD18-T vector. The length of the 16S rDNA sequence was 1 503 bp, 99.7% homologous to the 16S rDNA sequences of *A. johnsonii*. Phylogenetic tree analysis shows that the SW-2 strain clustered into one group with *A. johnsonii*. Combined with the morphological characteristics and physiological and biochemical characteristics of the colony, the SW-2 strain was conclusively identified as *A. johnsonii*. Antibiotic sensitivity results showed that the isolated strain is sensitive to gentamicin, penicillin, amoxicillin, ampicillin and kanamycin. There was no mortality in grass carp within 7 days of artificial infection, but further study should be carried out to determine if it is an opportunistic pathogen in fish. This study provides a scientific reference on the antibiotic sensitivity and intestinal microbial ecology of *Acinetobacter* spp. in fish.

Key words: *Acinetobacter johnsonii*; 16S rDNA; isolation and identification; antibiotic sensitivity; grass carp