

鲍曼不动杆菌斑点叉尾鮰株的分离与鉴定*

顾泽茂^{1,2} 柳阳² 陈昌福² 朱健¹ 谢骏¹ 徐跑¹

1. 农业部水生动物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室/

中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 无锡 214081;

2. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070

摘要 从湖北省宜昌市清江水库网箱养殖发病的斑点叉尾鮰肝脏分离到1株细菌CH016,该菌可在淡水琼脂平板上生长,单菌落圆形白色,表面圆滑,边缘整齐。经腹腔注射回归感染试验,复制出与自然发病相同的病症,且从人工感染病鱼体内再次分离到与自然发病相同的细菌,表明该菌对斑点叉尾鮰具有致病性。经生理生化鉴定、16S rRNA基因序列及其系统发育分析,结果均显示该菌为鲍曼不动杆菌。

关键词 斑点叉尾鮰; 鲍曼不动杆菌; 生化鉴定; 16S rDNA

中图分类号 Q 939.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)04-0489-05

鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)是一种革兰阴性球杆菌、短棒状,稳定期呈球状,属于奈瑟氏球菌科(Neisseriaceae)不动杆菌属(*Acinetobacter*)。它广泛分布于自然界和医院环境,通常情况下被认为是条件致病菌^[1],常引起严重医源性感染,如伤口感染、尿路感染、脑膜炎、败血症等,易在重症监护病房流行^[2]。近年来,随着广谱抗生素在临床上的广泛和大量使用,多重耐药的鲍曼不动杆菌逐渐增多,严重威胁着人类健康^[3]。鲍曼不动杆菌在临床上的研究受到国内外的广泛关注,但作为鱼类的病原体,鲜有发现和报道,仅顾天钊等^[4]报道了1株致鳊死亡的鲍曼不动杆菌,然而该文作者仅做了生理生化相关指标鉴定,鉴定手段不够完善。分子生物学中的核酸杂交和序列分析可作为不动杆菌种鉴定的重要依据之一^[5]。随着养殖规模的不断扩大,疾病造成的危害也日益严重,特别是近年来,斑点叉尾鮰的细菌性疾病猖獗,且呈暴发流行之势。2007年8月,湖北省宜昌市清江水库网箱养殖的斑点叉尾鮰发病,解剖后,肝脏为白色,其他器官没有明显病变。从肝脏分离细菌,经培养、生理生化测定、分子生物学检测及回归感染试验,认为鲍曼不动杆菌为该病的病原菌。

1 材料与方法

1.1 细菌的分离和培养

2007年4~8月,选择湖北省宜昌市清江水库网箱养殖发病斑点叉尾鮰,取样3批共60尾,鱼体长7~10 cm。首先用显微镜检查体表和鳃部是否存在寄生虫和细菌,随后以70%酒精消毒鱼的体表,无菌操作取肝脏、肾脏、脾脏,接种于淡水琼脂平板(freshwater agar, FWA),置28℃培养,24 h后挑取单个菌落在同样条件下作纯培养。分离的纯培养菌株编号为CH016。

1.2 生理生化检测

CH016纯化的单菌落采用API 20E(BioMérieux, Marcy l'Etoile, France)自动卡按其说明方法进行鉴定,并附加氧化酶试验,其它生理生化检测参考东秀珠等^[6]的方法。

1.3 人工感染试验

健康斑点叉尾鮰由武汉市汤逊湖渔场赠送,3月龄,体长10~12 cm,饲养在华中农业大学水产学院实验基地的2个圆柱形玻璃箱(直径80 cm,水体积400 L)中,每天投喂斑点叉尾鮰的商业饲料(湖北海大饲料有限公司产品)2次。饲养用水为曝气

收稿日期:2008-12-29; 修回日期:2009-08-31

* 农业部水生动物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室开放基金(BZ2007-03)、农业部疫情监测项目(2130108)、科技部国家科技支撑计划项目(2006BAD03B0507)和农业公益性行业科研专项经费项目(200803013)资助

顾泽茂,男,1976年生,博士,副教授。研究方向:水产动物疾病学与免疫学。E-mail: guzemaomail@mail.hzau.edu.cn

过滤的循环水,平均水温 22 ℃。

用淡水琼脂固体培养基(FWA)活化 CH016, 0.65%的生理盐水洗脱菌苔,重复洗涤 3 次后,按李爱华^[7]所述用分光光度计精确调配,使终浓度为 1.0×10^7 cfu/mL。为验证鲍曼不动杆菌的科赫法则,将上述养殖的斑点叉尾鲷分为试验组和对照组,每组 50 尾。试验组每尾腹腔注射 CH016 细菌悬液 0.3 mL,对照组每尾腹腔注射 0.65%的生理盐水 0.3 mL,观察 30 d,统计死亡率。将出现症状濒临死亡的斑点叉尾鲷带回实验室,同上操作取肝脏、肾脏、脾脏组织进行细菌分离培养和鉴定。

1.4 16S rDNA 序列的扩增和测定

用牙签挑取单菌落置于 FWA 肉汤培养基, 28 ℃下震动培养 12 h,离心收集菌体,按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取细菌总 DNA。用于 16S rDNA 序列 PCR 扩增的引物为细菌通用引物,引物序列为:U8f: 5'-AGAGTTTGATCMTG-GCTCAG-3', U1492r: 5'-TACGGYTACCTTGT-TACGACTT-3'。50 μ L 反应体系中包括 PCR Buffer(10 $\times$) 5 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 4 μ L, Primers (F/R, 10 μ mol/L) 各 1 μ L, ExTaq polymerase 1.25 U(大连宝生物有限公司),DNA 模板为 1 μ L。PCR 扩增程序为:首次 95 ℃变性 4 min,接着 30 个循环:95 ℃变性 1 min,56 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 2 min,最后 72 ℃延伸 10 min。PCR 产物用 PCR 纯化试剂盒(赛百盛,上海)回收后克隆进 PMD18-T 载体(TaKaRa 大连宝生物)中,转化 *E. coli* (DH5 α),阳性单克隆采用 ABI PRISM[®] 3730 DNA 分析测序仪(Applied Biosystem, USA)测序。

1.5 系统发育分析

将测序获得的 16S rDNA 序列提交到 GenBank,获得登录号为:FJ009590,并做 Blast 搜索。系统发育分析来源有约翰逊不动杆菌 *A. johnsoni*: AF188300、AB099655、X81663、Z93440;溶血不动杆菌 *A. haemolyticus*: X81662、Z93437;沃氏不动杆菌 *A. lwoffii*: AY176770、X81665、U10875;鲍曼不动杆菌: AB109775、NC009085、X81667、X81660;琼氏不动杆菌 *A. junii*: AB101444、X81664、X81658;醋酸钙不动杆菌 *A. calcoaceticus*: AY277552、AF159045。外群为莫拉氏菌 *Moraxella lacunata*: AF005165、D64049、AF005171。所有序列采用

Clustal X(1.83)^[8]进行全部对位排列,比对中采用默认设置,比对结果再用软件 SeaView 进行手工调整。系统发育分析中不包括假定的空缺(gap)和不明确的比对区域。应用软件 MEGA3.0^[9]构建邻接树。

2 结果与分析

2.1 发病鱼症状

病鱼游动缓慢,死鱼体表无出血症状,镜检鳃部和体表无寄生虫,眼球突出,剖检的显著特点是肝脏发白,胃空(无食物)。

2.2 细菌的分离培养

病鱼的肝脏接种淡水琼脂平板,28 ℃培养 24 h 后,可见一种较小的圆形白色单菌落,菌落表面圆滑,边缘整齐,3 批患病鱼用上述方法均分离到相同的细菌,且未发现菌株外形的差异。

2.3 细菌的生理生化鉴定

该分离菌氧化酶阴性,接触酶阳性,发酵葡萄糖产酸产气,能发酵乳糖和木糖,对尿素酶, β -半乳糖苷酶的利用亦为阴性。详细结果见表 1。

2.4 回归感染试验

在驯养期没有鱼体死亡。经纯培养的分离菌悬液腹腔注射斑点叉尾鲷后,试验组在接种后第 3 天出现鱼体死亡现象,累计死亡率为 35%。发生死亡的斑点叉尾鲷症状与自然病例相同,全身无明显出血症状。对照组在整个试验期间都没有鱼体死亡。从人工感染发病的鱼体肝脏中,均再次分离到与自然发病分离菌相同的细菌。

2.5 分子生物学鉴定

通过 PCR 扩增获得 CH016 菌株 16S rRNA 基因片段约 1 500 bp,对此片段进行回收、克隆、测序,获得长度为 1 502 bp 的序列。该序列平均 G+C 含量为 53.1%。与鲍曼不动杆菌标准株(ATCC: GenBank 的序列号为 NC-009085)的 16S rDNA 序列存在 7 个位点的碱基差异,序列相似性为 99.5%。用 MEGA 和 PAUP 2 种方法构建的系统发育树具有一致的拓扑结构。图 1 是基于 16S rDNA 序列构建的邻接树(NJ),系统发育分析显示所有的不动杆菌聚成 1 枝,内分 5 个群。CH016 菌株处于鲍曼不动杆菌群内,与其他鲍曼不动杆菌株形成姊妹群,且具有较高的 bootstrap 值。

表 1 CH016 的表型特征及与其已报道鲍曼不动杆菌种类的比较¹⁾

生化检测 Biochemical test	CH016	<i>A. baumannii</i> (ATCC)	<i>A. baumannii</i> ^[4]
细胞色素氧化酶 Cytochromeoxidase	—	—	—
过氧化氢酶 Catalase	+	n. a	+
丙酸盐利用 Sodium malonate utilization	—	n. a	—
乙酰胺利用 Acetamide utilization	—	n. a	—
去氨基苯基丙氨酸 Phenylalaninedeamination	—	n. a	—
β-牛乳糖 β-Galactosidase	—	—	—
盐酸精氨酸脱水酶 Arginine dihydrolase	—	—	—
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	—	—	—
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	—	—	—
柠檬酸盐利用 Citrate utilization	—	—	—
产 H ₂ S H ₂ S production	—	—	n. a
尿素酶 Urease	—	—	—
色氨酸脱氨酶 Tryptophane deaminase	—	—	n. a
吲哚试验 Indole production	—	—	n. a
丙酮试验 Acetoin production	—	—	n. a
明胶液化 Gelatinase	—	—	n. a
氧化发酵酶 Fermentation/Oxidation			
葡萄糖 Glucose	+	+	+
麦芽糖 Maltose	—	n. a	—
葡萄糖苷酶 Glucosidase	—	n. a	—
棉子糖 Raffinose	—	n. a	—
乳糖 Lactose	+	n. a	+
木糖 Xylose	+	n. a	+
甘露糖 Mannitol	—	—	—
纤维糖 Inositol	—	—	—
山梨糖 Sorbitol	—	—	—
鼠李糖 Rhamnose	—	—	—
蔗糖 Saccharose	—	—	—
蜜二糖 Melibiose	+	+	n. a
杏仁 Amygdalin	—	—	n. a
树胶醛糖 Arabinose	+	+	+

1)“+”表示阳性,“—”表示阴性,“n. a”表示没有相关数据 “+” positive; “—” negative; “n. a”not applicable,this test was not done for reference strain.

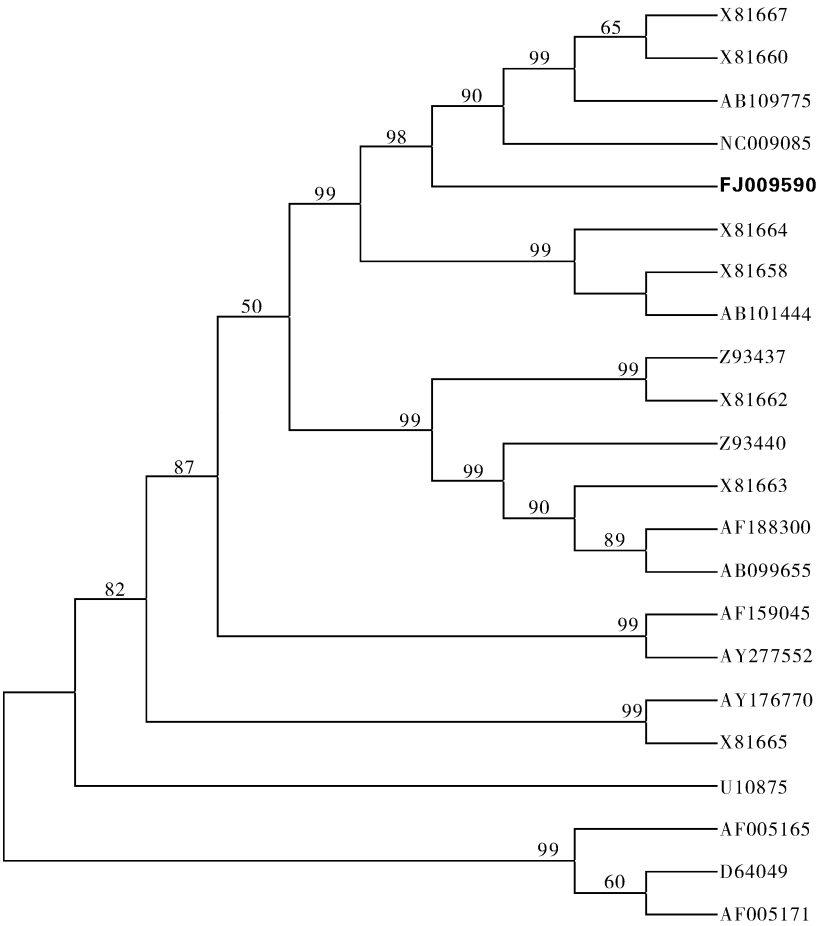
3 讨 论

本研究采用 API 20E 生化试剂条对该菌的常规生理生化指标进行了测定,并参考东秀珠等^[6]的方法进行了其他生理生化指标的补充测定,发现该菌具有氧化酶阴性、接触酶阳性、发酵葡萄糖产酸产气、不能使苯丙氨酸脱氨等特点,这与顾天钊等^[4]、Xia 等^[10]报道的鲍曼不动杆菌生理生化指标基本一致。检索第 9 版伯杰氏细菌鉴定手册,我们发现斑点叉尾鲷分离菌的生理生化指标与鲍曼不动杆菌标准株的非常接近。因此表型鉴定此菌株为鲍曼不动杆菌。

基于 16S rDNA 序列进行了不动杆菌属的系统发育分析。在本研究中,不动杆菌属是单系发育,内分 5 个亚群,斑点叉尾鲷分离菌落于鲍曼不动杆菌

亚群,处于亚群的最底部,与其他鲍曼不动杆菌形成姊妹群,且具有较高的支持率(98%),这表明该菌株可能是鲍曼不动杆菌,而且斑点叉尾鲷分离菌与鲍曼不动杆菌 ATCC 菌株的 16S rDNA 序列之间仅有 7 个位点的差异,相似性非常高(99.5%)。因此,从基因水平鉴定此菌株为鲍曼不动杆菌。但遗憾的是,顾天钊等^[4]从鳊鱼分离的鲍曼不动杆菌没有获得 16S rDNA 序列,无法从分子水平比较二者之间的异同。

不动杆菌广泛存在于自然界,通常认为它们毒力很低,很少致病^[11],但最近的研究表明不动杆菌引起人类医院内感染的病例不断增加,而且该菌对大多数抗生素具有抗药性,给治疗带来了一定的困难。近年来从患病的水生动物体内也分离到了不动杆菌^[4,12],除顾天钊等^[4]进行了科赫法则的验证外,



黑体表示鲍曼不动杆菌斑点叉尾鲷株(CH016)在不动杆菌属中的系统发育位置

Phylogenetic position of 16S rDNA sequence of *A. baumannii* (CH016) isolated from channel catfish in relation to other sequenced species.

图 1 基于 16S rDNA 序列构建的不动杆菌属邻接树

Fig.1 Neighbour-joining tree based on 16S rDNA sequences

大部分没有进行确切的动物致病性研究。在本研究中,我们进行了动物回归感染试验,复制出与自然发病相同的病症,并分离到相同细菌,这表明该菌分离株对斑点叉尾鲷具有致病性。同时,在回归感染试验中,受感染的鱼出现了较高的死亡率(35%),因此,笔者认为这株鲍曼不动杆菌是具有毒力的菌株。另外,无论自然发病还是动物回归感染试验,病鱼的鳃、肾脏和脾脏都没有明显的病变特征,主要病症集中在肝脏,因此,笔者推测斑点叉尾鲷的肝脏可能是鲍曼不动杆菌主要的靶器官。

参 考 文 献

[1] SCHRECKENBERGER P C,DANESHVAR M I,WEYANT

R S, et al. Acinetobacter, achromobacter, chryseobacterium, moraxella, and other nonfermentative gram-negative rods, manual of clinical microbiology[M]. 8th ed. Washington D C: AM Society Microbiol, 2003:749-779.
[2] 张春环. ICU 鲍曼不动杆菌感染流行情况调查[J]. 哈尔滨医药, 2007, 27(3): 10-12.
[3] 陆春雨, 张正. 鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗生素耐药机制研究[J]. 临床检验杂志, 2006, 24(4): 295-298.
[4] 顾天钊, 陆承平, 陈怀青. 鲍氏不动杆菌——鳊鱼暴发性死亡的新病原[J]. 微生物学通报, 1997, 24(2): 104-106.
[5] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
[6] 东秀珠, 蔡妙英. 常用细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 364-398.
[7] 李爱华. 我国鱼类病原菌耐药性、耐药质粒及几种药物抗菌作用的研究[D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 1998: 108.
[8] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAC F, et al. The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence a-

lignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997,25:4876-4882.

[9] KUMAR S, TAMURA K, NEI M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5: 50-63.

[10] XIA L, XIONG D M, GU Z M, et al. Recovery of *Acinetobacter baumannii* from diseased channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in China[J]. Aquaculture, 2008, 284: 285-288.

[11] TURTON J F, KAUFMANN M E, WARNER M, et al. A prevalent, multiresistant clone of *Acinetobacter baumannii* in Southeast England[J]. Journal of Hospital Infection, 2004, 58: 170-179.

[12] 王玉群, 姜金忠. 一例鳊鱼病例的分析[J]. 内陆水产, 2007 (1): 28-29.

Isolation and Identification of *Acinetobacter Baumannii* from the Diseased Channel Catfish

GU Ze-mao^{1,2} LIU Yang² CHEN Chang-fu² ZHU Jian¹ XIE Jun¹ XU Pao¹

1. Key Laboratory for Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture Biology of the Ministry of Agriculture/Chinese Academy of Fishery Sciences Freshwater Fisheries Research Center, Wuxi 214081, China;
2. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Whereas it is well documented that *Acinetobacter baumannii* is associated with human clinical infections, there are few studies to date that reports it as a pathogen for aquatic animal. In the present study, one bacterial strain was isolated from diseased channel catfish (*Ictalurus punctatus*) from Qingjiang reservoir, Yichang, Hubei Province, China and named as CH016, which could be cultivated on freshwater agar and formed the round, white, smooth and margin-trim clone. Inoculating the strains to channel catfish for lethality indicated the germ had pathogenicity and the same bacterium could be isolated from these animals. The biochemical tests, the sequence analysis results of 16S rDNA sequence and phylogenetic analysis demonstrated that the microorganism isolated from channel catfish was *A. baumannii*.

Key words channel catfish (*Ictalurus punctatus*); *Acinetobacter baumannii*; biochemical test; 16S rDNA

(责任编辑:边书京)