

# 乌龟鲍曼不动杆菌的分离鉴定及药敏试验

丁利<sup>1</sup>, 黎俊榆<sup>1</sup>, 代小梅<sup>1</sup>, 汪继超<sup>1</sup>, 方振华<sup>2</sup>, 史海涛<sup>1</sup>

(1. 海南师范大学 生命科学学院, 海南 海口 571158; 2. 海南职业技术学院 生物工程学院, 海南 海口 570216)

**摘要:** 自患病乌龟肝脏中分离出 1 株优势菌 DL01221, 对其进行形态学观察、生化试验、16S rRNA 基因序列分析, 同时采用 Kriby-Bauer 纸片扩散法进行药物敏感性试验。试验结果表明, 该菌为革兰氏阴性球杆菌, 将该菌株 16S rRNA 序列进行同源性和系统进化树分析, 发现它与鲍曼不动杆菌处于同一群, 同源性超过 98%, 结合菌株形态和生化指标, 确定该菌株为鲍曼不动杆菌。致病性试验结果显示, 其对乌龟具有较强的致病作用; 耐药性结果显示其对头孢他啶、卡那霉素及氟罗沙星敏感, 对其他多种抗生素耐药。

**关键词:** 乌龟; 鲍曼不动杆菌; 分离鉴定; 药敏试验

中图分类号: S947

文献标识码: A

文章编号: 1003-1111(2016)04-0426-05

近年来, 随着龟鳖养殖业的迅猛发展, 养龟场规模在不断扩大, 龟类疾病也日益频发, 其中尤以细菌性和病毒性传染病为甚<sup>[1-3]</sup>, 常发生爆发性流行, 死亡一般在 15% 左右, 严重的可高达 80%, 甚至全军覆没, 使养殖场遭受巨大的经济损失, 严重制约着龟鳖养殖产业的可持续发展<sup>[4]</sup>。目前鉴定病原种类是确诊病因及对症下药的前提, 但人们对龟类疾病的研究起步较晚, 基础理论研究和病原分离方法与技术落后, 多数养殖场存在盲目用药现象, 给龟类养殖户造成不必要的经济损失。

细菌病是水生动物常发病。鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*) 作为重要条件致病菌引发的动物感染已被广泛报道<sup>[5-6]</sup>, 也有发现不动杆菌存在于患病的水生动物体内<sup>[7-8]</sup>, 如感染鲍曼不动杆菌株后斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 死亡<sup>[7]</sup>。本研究自患病乌龟 (*Mauremys nigricans*) 体内分离出致病菌, 通过培养特性、生化和分子生物学鉴定, 判定分离菌为鲍曼不动杆菌; 通过致病性研究发现该菌可引起乌龟发病; 同时采用 Kriby-Bauer 纸片扩散法对分离菌株进行耐药性分析, 旨在为龟鳖的健康养殖提供参考依据, 并为龟类养殖业细菌病害的防治提供科学参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 病料来源

患病乌龟由海南省某龟鳖养殖场提供。病龟腹甲和背甲均有明显的溃烂, 颈部和四肢有大小不一的白点。剖解发现, 发病龟肝、脾肿大, 表面出血, 质脆易碎, 呈紫黑色, 腹腔内有积液, 恶臭。

#### 1.1.2 主要试剂及仪器

革兰氏染色试剂 (杭州微生物试剂有限公司); 细菌基因组 DNA 提取试剂盒及琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 [中科瑞泰 (北京) 生物科技有限公司]; PCR 试剂 (Promega 公司); 药敏纸片 (北京天坛药物生物技术开发公司); 生化鉴定试剂 (广东环凯微生物科技有限公司); PCR 仪及凝胶成像分析系统 (BIORAD 公司); 冷冻高速离心机 (EPPENDORF 公司); 生物安全柜 (力康发展有限公司); 引物合成和测序均由上海生物工程技术服务有限公司完成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 病原菌的分离纯化、镜检

病龟经低温麻醉后, 体表用 75% 的酒精消毒, 迅速剖检并分离肝脏, 低温条件下研磨后, 用无菌生理盐水进行稀释, 无菌接种于普通营养琼脂平板上, 置于 28 °C 恒温箱中培养 18~24 h, 再挑取单个

收稿日期: 2015-10-19; 修回日期: 2016-01-26.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31502036、31372228); 海南省自然科学基金资助项目 (314076、20153086); 海南省高等学校科学研究项目 (Hnky2016-15).

作者简介: 丁利 (1982—), 女, 副教授, 博士; 研究方向: 动物疾病. E-mail: dingli705@163.com. 通讯作者: 史海涛 (1963—), 男, 教授, 博士生导师; 研究方向: 龟鳖生态学. E-mail: haitao-shi@263.net.

菌落于无菌条件下进行划线分离、培养,重复以上步骤,直至菌落特征相同时,再挑取单个菌落涂片,进行革兰氏染色并镜检,观察菌落形态及染色特点;将单菌落分别接种于麦康凯培养基和 SS 琼脂培养基进行选择培养,观察菌落的生长情况。

### 1.2.2 生化试验鉴定

将分离菌纯培养物进行生化试验,按文献[9]方法进行。

### 1.2.3 16S rRNA 的 PCR 扩增及序列分析

取适量的菌液离心收集菌体,采用 SDS 裂解法提取细菌 DNA,按文献[10]方法进行。采用 16S rRNA 通用引物进行 PCR 扩增,引物序列为:

上游引物:5'-AGAGTTTGATCATGGCTCA G-3';

下游引物:5'-TACGGTTACCTTGTTACGAC TT-3'。

PCR 反应体系如下: TaqMix 12.5  $\mu$ L, 去离子水 8.5  $\mu$ L, 上、下游引物各 1  $\mu$ L(引物浓度均为 10 pmol/L), 模板 DNA 2  $\mu$ L, 共 25  $\mu$ L。PCR 反应程序为: 95  $^{\circ}$ C 10 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s; 54  $^{\circ}$ C 45 s; 72  $^{\circ}$ C 60 s, 34 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min; 扩增产物依照琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒对 PCR 扩增产物进行切胶回收,并送往上海生物工程技术服务有限公司测序。分离菌的 16S rRNA 基因序列通过美国国立生物技术信息中心 NCBI 的 Blast 检索系统进行序列同源性分析,并构建系统进化树。

### 1.2.4 人工感染试验

将分离菌稀释至密度为  $1.0 \times 10^7$  cfu/mL 的菌液,腹腔注射 12 只健康乌龟(10 月龄,平均体质量为 95 g/只),每只 0.5 mL,对照组 12 只乌龟注射 0.65% 等量生理盐水,观察 14 d,统计发病率和死亡率。取肝脏、肾脏、脾脏组织进行细菌分离培养和鉴定。

### 1.2.5 药物敏感性试验

采用世界卫生组织推荐的纸片琼脂扩散法即 Kirby-Barere 法,无菌条件下,将菌液均匀涂布于 LB 培养基,贴上临床常用的动物疾病治疗的药敏纸片,将培养皿放于培养箱,37  $^{\circ}$ C 培养 24 h 后,测量各抑菌环直径。依据说明书上“不动杆菌抑菌圈直径判断标准”判别试验菌对所用抗生素的敏感程度。

## 2 结果

### 2.1 细菌培养特征及形态

经分离所得的细菌,在普通营养琼脂平板培养基上纯化培养后,呈圆形乳白色、不透明、边缘整

齐、表面圆滑湿润、中间微凸起的菌落(图 1a);在麦康凯平板上生长良好,呈圆形、表面湿润光滑、淡粉色的菌落(图 1b);在 SS 琼脂培养基中不生长。该菌革兰氏染色不易脱色,镜检结果显示为阴性短小球杆菌,多成双排列,近似双球菌,有时呈丝状或链状(图 1c),将分离菌命名为 DL01221。

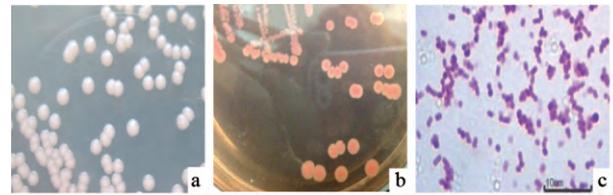


图1 分离菌形态

a,普通营养琼脂平板生长菌落; b,麦康凯平板生长菌落; c,分离菌革兰氏染色观察。

### 2.2 生化特性鉴定

对分离到的革兰氏阴性菌进行生化鉴定,结果见表 1。根据以上形态学观察和生化鉴定结果,参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[11]</sup>,初步鉴定该菌为鲍曼不动杆菌。

表1 分离菌株的生化鉴定结果

生化项目	结果	生化项目	结果
乳糖	+	触酶	+
葡糖糖	+	氧化酶	-
果糖	-	吲哚	-
蔗糖	-	肌醇	-
木糖	+	七叶苷	-
麦芽糖	-	尿素酶	-
半乳糖	+	明胶	-
蜜二糖	+	柠檬酸盐	+

### 2.3 回归感染试验

经纯培养的分离菌悬液腹腔注射乌龟后,试验组在接种后第 4 d 出现精神萎靡,食欲减退等症状,注射 7 d 累计死亡率为 42%。死亡的乌龟症状与自然病例相似。对照组在整个试验期间未出现异常。从人工感染发病的龟体肝脏中,均分离到与自然发病分离菌相同的细菌。

### 2.4 16S rRNA 序列分析

分离菌 16S rRNA PCR 扩增结果见图 2,产物经凝胶回收提纯后测序。测序结果显示,分离菌株 16S rRNA 基因序列长度为 1416 bp。同源性分析结果显示,分离菌与多数鲍曼不动杆菌菌株同源性超过 99%,与斑点叉尾鮰鲍曼不动杆菌株的同源性为 98.7%;而与醋酸钙不动杆菌(*A. calcoaceticus*)、琼氏不动杆菌(*A. junii*)、约翰逊不动杆菌(*A. johnsonii*)、溶血不动杆菌(*A. haemolyticus*)及沃氏

不动杆菌 (*A. lwoffii*) 同源性分别为 97%、97.4%、96%、97% 和 95.7%。分离菌株 DL01221 的 16S rRNA 序列构建的系统进化树见图 3, 结果显示本试验分离菌株 DL01221 处于鲍曼不动杆菌群内, 其中与法国和印度分离菌亲缘关系最近, 与中国斑点叉尾鲴分离菌亲缘关系较远。

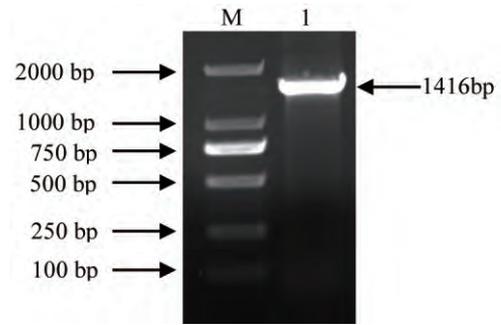


图 2 分离菌株 DL01221 的 16S rRNA 基因 PCR 扩增结果

M. DNA 标准 DL2000; 1. 分离

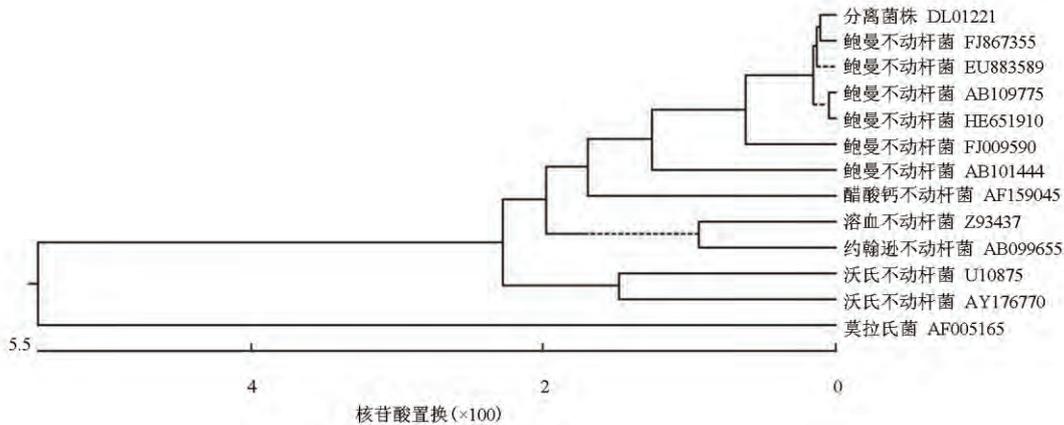


图 3 分离菌株 DL01221 的 16S rRNA 基因系统进化树

## 2.5 药敏试验结果

用 15 种药物敏感试纸对鲍曼不动杆菌 DL01221 进行药敏试验, 结果发现, 对头孢噻肟、头孢噻吩、头孢曲松、庆大霉素、妥布霉素、克林霉素、克拉霉素及四环素等 7 种药物具有耐药性; 对头孢他啶、卡那霉素及氟罗沙星敏感; 对阿米卡星、环丙沙星、诺氟沙星、左氟沙星、链霉素等中度敏感; 抗菌药纸片种类、含药量、抑菌圈直径及判断结果见表 2。

表 2 药敏试验结果

抗菌药物	纸片规格	试验菌抑菌	结果
	$\mu\text{g}/\text{片}$	圈直径/ $\text{mm}$	
头孢噻吩	30	6	R
头孢他啶	30	21	S
头孢噻肟	30	11	R
头孢曲松	30	12	R
庆大霉素	10	11	R
卡那霉素	10	24	S
妥布霉素	10	9	R
链霉素	10	14	I
克林霉素	2	6	R
克拉霉素	15	6	R
四环素	30	9	R
环丙沙星	5	18	I
氟罗沙星	5	27	S
诺氟沙星	5	18	I
阿米卡星	30	16	I
左氟沙星	5	16	I

注: CLSI 药敏试验纸片法判定标准: S, 敏感; I, 中介; R, 耐药。

## 3 讨论

目前, 随着龟养殖业的快速发展, 龟的养殖规模在不断扩大, 但水质恶化、养殖密度过高等原因导致龟鳖疾病发生也日益频繁, 严重影响了龟鳖养殖产业的可持续发展<sup>[4]</sup>。龟类疾病大多由细菌、真菌和病毒感染引起, 而细菌感染引起的疾病是水生动物的常发传染病<sup>[12-22]</sup>, 在龟鳖养殖业中也属于高发和频发疾病<sup>[4]</sup>, 特别是近年来, 龟鳖的细菌性疾病呈现了爆发流行之势。鲍曼不动杆菌是奈瑟氏球菌科不动杆菌属中的一种革兰阴性球杆菌, 该菌对人和动物是一种常见的条件性致病菌, 能通过多种方式感染人体使其患病, 最常见的是引起人的肺炎、败血症、脑膜炎、骨髓炎等<sup>[23]</sup>。该菌感染动物可引起新生驹患败血症, 牛患乳腺炎, 鲟患败血症, 水牛感染后会流产等<sup>[24]</sup>, 目前有发现不动杆菌存在于患病的水生动物体内<sup>[7-8, 25]</sup>。本研究自患病乌龟体内分离出致病菌, 通过形态学和生化特性初步鉴定为鲍曼不动杆菌。该菌革兰氏染色不易脱色, 与其他研究报道的鲍曼不动杆菌脱色不易的结果相似, 但是具体原因尚不明确, 猜测可能与该菌的细胞壁有关<sup>[7-8, 20]</sup>。本研究基于 16S rRNA 序列进行了不动杆菌属的系统发育分析, 发现本试验分离菌

DL01221 落于鲍曼不动杆菌群, 与其他鲍曼不动杆菌同源性超过 98%, 确定该菌株为鲍曼不动杆菌。通过动物回归试验证实, 该分离株可感染龟, 并导致其发病。

近年来, 随着广谱抗生素在临床上的广泛使用, 多重耐药的鲍曼不动杆菌逐渐增多, 严重威胁着人类健康<sup>[26]</sup>。鲍曼不动杆菌在临床上的研究受到国内外的广泛关注, 但作为龟类的病原菌, 尚未见报道。本研究从患病乌龟体内分离的鲍曼不动杆菌 DL01221 进行药敏试验, 发现分离到的菌株耐药性与陆文浩等<sup>[8]</sup>报道的鱼源鲍曼不动杆菌菌株的耐药性有一定差异, 如本分离鲍曼不动杆菌 DL01221 对头孢他啶、卡那霉素及氟罗沙星等抗生素敏感; 对阿米卡星、环丙沙星、诺氟沙星、左氟沙星、链霉素等抗生素中度敏感; 对头孢噻肟、头孢噻吩、头孢曲松、庆大霉素、妥布霉素、克林霉素、克拉霉素及四环素等抗生素具有较强耐药性, 而鱼源的鲍曼不动杆菌对妥布霉素、庆大霉素、左氟沙星和链霉素高度敏感, 对四环素中度敏感, 对头孢他啶、头孢噻肟等产生耐药。这也符合不同报道中提到的国内不同地区分离的鲍曼不动杆菌的耐药性有一定差异<sup>[8, 27]</sup>。可能因为菌株所处的环境和当地的用药习惯不同而导致同种菌对同种抗生素表现出不同的耐药性。

随着龟类疾病的高发, 养殖场为追求暂时的经济效益, 滥用化学药物或盲目加大药物的使用剂量, 使许多致病菌产生抗药性, 治疗困难。鲍曼不动杆菌不但影响人类健康, 对龟鳖动物的潜在威胁也逐渐暴露出来, 而且鲍曼不动杆菌对多种抗生素具有天然耐药性, 临床上治疗较为困难。因此, 关注药物残留对水源的影响, 不仅是实施龟鳖健康养殖的有效措施, 而且对人类的健康具有促进意义。

#### 参考文献:

[1] 章剑, 王保良. 龟鳖病害防治黄金手册[M]. 2版. 北京: 海洋出版社, 2012.

[2] 朱凌宇, 戴爱敏, 董明倩, 等. 中华鳖养殖水体光合细菌的分离、鉴定与固定化[J]. 水产科学, 2014, 33(8):493-497.

[3] 林亚歌, 叶键, 石婷婷, 等. 中华鳖源奇异变形杆菌的分离鉴定与致病性研究[J]. 水产科学, 2014, 33(12):800-803.

[4] 洪美玲, 付丽容, 王锐萍, 等. 龟鳖动物疾病的研究进展[J]. 动物学杂志, 2003, 38(6):115-119.

[5] 赵剑, 黎昆, 李科, 等. 639株鲍曼不动杆菌分布及耐药性分析[J]. 中国执业药师, 2015, 12(8):7-9.

[6] El-Ageery S M, Abo-Shadi M A, Alghaithy A A, et

al. Epidemiological investigation of nosocomial infection with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2012, 16(13): 1834-1839.

[7] 顾泽茂, 柳阳, 陈昌福, 等. 鲍曼不动杆菌斑点叉尾鲴株的分离与鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2010, 24(4):489-493.

[8] 陆文浩, 陈辉, 邹勇, 等. 银鲫不动杆菌病原菌鉴定及药敏试验[J]. 水产科学, 2010, 29(3):156-161.

[9] 李建强, 李六金. 兽医微生物学实验实习指导[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1999:32-40.

[10] 彭凌, 杨旭夫, 朱必凤, 等. 猪链球菌广东株的分离鉴定及药敏试验[J]. 动物医学进展, 2015, 36(2): 130-133.

[11] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.

[12] 张晓君, 毕可然, 阎斌伦, 等. 矛尾复鰕虎鱼病原哈氏弧菌的鉴定及特异性检测方法的建立[J]. 水产科学, 2011, 30(12):758-763.

[13] 夏飞, 梁利国, 谢骏. 团头鲂病原嗜水气单胞菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 水产科学, 2012, 31(10): 606-610.

[14] 陶诗, 何芳芳, 刘雪珠, 等. 海水养殖鱼类病原微生物研究进展[J]. 水产科学, 2013, 32(3):175-182.

[15] 魏黎丽, 王自蕊, 杨竹青. 草鱼 2 株气单胞菌的分离与鉴定[J]. 水产科学, 2013, 32(6):348-352.

[16] 李春涛, 杨秀营, 蒋自立. 大鳍鱠腹部一种感染性疾病病原菌确定及药敏研究[J]. 水产科学, 2014, 33(3): 171-174.

[17] 杨宁, 黄海, 张希, 等. 尼罗罗非鱼嗜水气单胞菌病的病原分离鉴定和药敏试验[J]. 水产科学, 2014, 33(5):306-310.

[18] 周毅, 张培培, 徐晔, 等. 金鱼嗜水气单胞菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 水产科学, 2014, 33(6):379-384.

[19] 沈晓静, 胡秀彩, 兰云, 等. 锦鲤荧光假单胞菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 水产科学, 2014, 33(7): 443-446.

[20] 张培, 朱爱华, 胡秀彩, 等. 金鱼类志贺单胞菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 水产科学, 2015, 34(6): 375-379.

[21] 李聪, 蔡岩, 周永灿, 等. 海南罗非鱼致病性维氏气单胞菌分离鉴定及药敏特性研究[J]. 水产科学, 2015, 34(10):640-646.

[22] 蓝胜华, 王利, 邓麟杰, 等. 黄颡鱼溶酪巨型球菌的鉴定与药敏试验[J]. 水产科学, 2015, 34(12):748-752.

[23] Méndez J A, Mateos J, Beceiro A, et al. Quantitative proteomic analysis of host-pathogen interactions: a study of *Acinetobacter baumannii* responses to host airways[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1):422.

[24] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 4版. 北京: 中国农业出

- 版社, 2007.
- [25] 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.
- [26] 黄一睿, 甘文思, 夏优秀, 等. 鲍氏不动杆菌的临床分布与耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(8):1693-1695.
- [27] 马越, 李景云, 姚蕾, 等. 不同地区鲍曼不动杆菌临床分离株的耐药性比较[J]. 中国抗感染化疗杂志, 2003, 3(5):306-308.

## Isolation, Identification and Drug Sensitivity of *Acinetobacter baumannii* from Tortoise *Mauremys nigricans*

DING Li<sup>1</sup>, LI Junyu<sup>1</sup>, DAI Xiaomei<sup>1</sup>, WANG Jichao<sup>1</sup>, FANG Zhenhua<sup>2</sup>, SHI Haitao<sup>1</sup>

( 1. College of Life Sciences, Hainan Normal University, Haikou 571158, China;

2. School of Biological Engineering, Hainan College of Vocation and Techniques, Haikou 570216, China )

**Abstract:** One predominant bacterial strain named DL01221 was isolated from the liver of diseased tortoise *Mauremys nigricans*, identified by morphologic observation, biochemical test, and sequencing analysis of 16S rRNA, and then the drug sensitivity was determined by Kirby-Bauer's agar diffusion method. Results showed that the strain was gram negative bacterial. By analyzing the homology and phylogenetic relationship of 16S rRNA sequences in the NCBI database, the homology was found to be more than 98% compared to *Acinetobacter baumannii*, which was in the same group with *A. baumannii*. Combining with the colonial morphology and biochemical results, the strain was identified as *A. baumannii*. Inoculating the strain to *M. nigricans* for lethality indicated that the strain had pathogenicity and the same bacterium could be isolated from these animals. Meanwhile the drug sensitivity test showed the bacterium was sensitive to ceftazidime, kanamycin and fleroxacin, and multi-resistant to most antibiotics.

**Key words:** *Mauremys nigricans*; *Acinetobacter baumannii*; isolation and identification; drug sensitive test