



美洲鳗鲡致病性鲍曼不动杆菌的分离、鉴定及致病性分析

孙云^{1,2}, 何明旺^{1,2}, 张盼盼², 李海平², 曹贞洁^{1,2*}, 周永灿^{1,2*}

(1. 海南大学, 南海海洋资源利用国家重点实验室, 海南海口 570228;

2. 海南大学, 海南省热带水生生物技术重点实验室, 海南海口 570228)

摘要: 为确定海南某鳗鲡养殖场患病美洲鳗鲡大量死亡的原因, 从患病美洲鳗鲡肝脏和脾脏中分离获得 1 株优势菌株 AB01, 回归感染证实该菌株为导致此次美洲鳗鲡患病的病原菌。经生理生化鉴定、16S rDNA 基因序列比对及系统发育分析, 判定菌株 AB01 为鲍曼不动杆菌。致病性分析结果显示, 菌株 AB01 对美洲鳗鲡的半致死浓度为 4.63×10^6 CFU/mL。组织病理学观察显示, 患病美洲鳗鲡的肝脏、脾脏均发生不同程度的病变, 其中, 肝脏中部分肝索排列紊乱, 细胞肿胀, 胞核溶解, 胞质疏松, 结构模糊, 有大量大小不等的空泡; 脾脏中胞质多处稀疏, 伴有大面积损伤。药敏检测显示, 鲍曼不动杆菌 AB01 对头孢噻吩、头孢唑啉、阿奇霉素、丁胺卡那霉素、利福平、依诺沙星、环丙沙星、氧氟沙星敏感, 对氟苯尼考、氨苄西林等 9 种抗生素中度敏感, 对氨曲南和四环素等 20 种抗生素有多重耐药性。

关键词: 美洲鳗鲡; 鲍曼不动杆菌; 分离鉴定; 16S rDNA; 药敏

中图分类号: S 941.42

文献标志码: A

美洲鳗鲡 (*Anguilla rostrata*) 隶属鳗鲡目 (Anguilliformes)、鳗鲡科 (Anguillidae)、鳗鲡属 (*Anguilla*), 为热带和亚热带江海洄游鱼类, 主要分布于西大西洋, 在我国主要分布于长江、闽江、珠江、南渡江等江河湖泊中。美洲鳗鲡肉质鲜美, 营养丰富, 深受消费者喜爱, 是一种珍贵水产资源, 目前已成为我国的重要养殖品种^[1]。随着美洲鳗鲡集约化养殖的发展, 其病害种类越来越多, 危害日趋严重, 其中尤以细菌性疾病为甚。已报道的养殖鳗鲡病原菌包括创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*)、鳗弧菌 (*V. anguillarum*)、维氏气单胞菌 (*Aeromonas veronii*)、嗜水气单胞菌 (*A. hydrophila*)、迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*)、柠檬酸杆菌 (*Citrobacter Werkman and Gilen*) 和鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) 等^[2-4]。

2019 年 7 月, 海南海口某养殖场养殖的美

洲鳗鲡患暴发性疾病, 死亡率达 80%。为了解其发病原因, 本实验从患病美洲鳗鲡的肝脏和脾脏中进行细菌分离, 通过人工感染实验、生理生化鉴定、16S rDNA 序列比对及系统发育分析, 确定了病原菌及其种类, 对病原菌进行药敏分析, 以期为该病防治提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

患病美洲鳗鲡来自海南海口某美洲鳗鲡养殖场, 体长 (18.3±5.6) cm, 体质量 (15.6±3.5) g; 健康美洲鳗鲡购自海南琼海某美洲鳗鲡养殖场, 体长 (18.8±3.2) cm, 体质量 (16.2±5.4) g, 用于人工回归感染实验及致病菌 LD₅₀ 测定。

收稿日期: 2020-08-19 修回日期: 2020-09-10

资助项目: 海南省自然科学基金(2019RC078); 海南省重大科技计划(ZDKJ2019011); 海南省南海名家青年项目

通信作者: 曹贞洁, E-mail: 1057319886@qq.com; 周永灿, E-mail: zychnu@163.com

1.2 病原菌分离与纯化

取具典型症状的患病美洲鳗鲡,经无菌操作分别取肝脏、脾脏、头肾和脑4种组织,经研磨后以无菌PBS稀释并涂布于LB琼脂培养基,30℃倒置培养24h,根据菌落形态挑取优势菌株,经3次以上纯化培养后再接种于LB液体培养基,于30℃培养至菌液浓度接近 $OD_{600} \approx 0.8$ 时,将菌液和25%甘油等比例混和,-80℃保存备用。

1.3 人工感染

健康美洲鳗鲡经1周暂养,随机取3尾,取肝脏和脾脏组织研磨涂布于LB平板,确认其无细菌感染后,将实验鱼随机分为实验组和对照组,每组分3个平行,每个平行10尾。从患病美洲鳗鲡中分离并保存的优势菌株经活化后,以无菌PBS调整菌液浓度至 1×10^7 CFU/mL,对实验组的美洲鳗鲡进行腹腔注射感染,感染量0.1 mL/尾;对照组腹腔注射等量无菌PBS。观察并记录注射后14 d内各组鳗鲡的行为表现、外观症状及死亡情况,死鱼及时捞出。取感染患病的濒死实验鱼再次进行病原分离与鉴定。

1.4 组织病理观察

分别取患病和健康美洲鳗鲡的肝脏和脾脏组织,以Bouin氏液固定24h,参考Martoja等^[5]的方法制备组织切片并经H.E染色,显微镜(Olympus CX-23,日本)观察并拍照。

1.5 病原菌鉴定

菌落形态观察 超低温保存的菌种经活化后划线接种于LB琼脂培养基,30℃静置培养24h,观察记录单菌落的形状、大小、边缘、表面、隆起形状、透明度等表型特征。

染色形态观察 超低温保存的菌种经活化后接种于LB液体培养基,30℃振荡培养18h。取20 μL菌液滴于无菌载玻片中央,经火焰固定后进行革兰氏染色,显微观察确定革兰氏染色结果。

生理生化特征分析 参考顾泽茂等^[6]的方法,以梅里埃API20E生化鉴定系统(Bi-omerieux, Marcy I Etoile, France)及附加氧化酶试验、其他生理生化检测对病原菌株进行生理生化分析。

分子生物学鉴定 参考熊静等^[7]的方法,菌种经活化后转接于LB液体培养基,30℃振

荡培养24h,离心收集细菌,按细菌基因组DNA提取试剂盒(Tiagen, Beijing)说明书提取细菌基因组DNA,使用10 μL TE buffer溶解,4℃保存备用。选取16S rDNA通用引物,上游引物27 F: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTCAG-3';下游引物1492 R: 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACTT-3',扩增菌株基因组DNA的16S rDNA基因片段。50 μL反应体系: 10×PCR Buffer 5 μL, dNTP Mix 4 μL,上下游引物(25 μmol/L)各0.5 μL, ExTaq DNA polymerase (5 U/μL) 0.5 μL, DNA模板2 μL,加水补足至50 μL。PCR反应程序:首次94℃预变性5 min,接着30个循环:94℃变性30 s,56℃退火1 min,72℃延伸2 min,最后72℃延伸10 min。PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测,预期目的片段大小为1 500 bp左右。将符合预期大小的PCR产物送广州华大生物科技有限公司测序。

序列分析 将病原菌株的16S rDNA基因序列提交至GenBank,并通过NCBI的BLAST检索系统进行同源性比对。在NCBI数据库中下载鲍曼不动杆菌(*A. baumannii*)、琼氏不动杆菌(*A. junii*)、乙酸钙不动杆菌(*A. calcoaceticus*)、约氏不动杆菌(*A. johnsonii*)、溶血不动杆菌(*A. haemolyticus*)、鲁氏不动杆菌、抗辐射不动杆菌(*A. radioresistens*)、皮特不动杆菌(*A. pittii*)等9种常见不动杆菌属常见种类,大肠杆菌(*Escherichia coli*)以及创伤弧菌、迟缓爱德华氏菌这2种美洲鳗鲡常见致病菌的16S rDNA序列,以DNAMAN软件进行多序列同源性分析,利用MEGA 6.0软件以Neighbor-Joining法构建系统发育树,设置Bootstraps为1 000。

1.6 药物敏感分析

参考梅冰等^[8]的K-B纸片法,将病原菌株接种于LB液体培养基,30℃振荡培养过夜。取100 μL浓度为 1×10^8 CFU/mL的菌悬液均匀涂布于LB琼脂培养基表面,无菌操作将药敏纸片贴于培养基表面,30℃培养24h后测量抑菌圈直径,根据药敏试验纸片法的抑菌范围解释标准确定病原菌株对不同药物的敏感性。

1.7 病原菌对美洲鳗鲡的LD₅₀值测定

取健康美洲鳗鲡180尾,暂养1周后进行人工感染。菌株参考蒋魁等^[9]的方法进行稀释。实验分6组,即菌液浓度分别为 5×10^4 、 5×10^5 、 $5 \times$

10^6 、 5×10^7 和 5×10^8 CFU/mL 的 5 个感染组和 1 个 PBS 对照组, 每组 3 个平行, 每个平行实验鱼 10 尾。实验组分别腹腔注射不同浓度的菌悬液 100 μ L/尾, 对照组腹腔注射 PBS 100 μ L/尾。注射后连续 14 d 观察和记录各组鳗鲡的发病和死亡情况, 以寇氏法计算该病原菌对美洲鳗鲡的 LD_{50} 值。

$$\lg LD_{50} = X_m - i \left(\sum P - 0.5 \right)$$

式中, X_m 为死亡率为 100% 组的剂量对数值, i 为相邻两组对数剂量之差, $\sum P$ 为各组死亡率之和。

2 结果

2.1 患病美洲鳗鲡的临床病症

患病美洲鳗鲡在水中浮头, 游动迟缓, 体表黏液增多, 鳃部及腹部多处红肿溃烂(图版 I-4, I-7)。对病鱼解剖后发现, 腹腔内有不同程度的积液, 肝脏呈土黄色(图版 I-5, I-8), 脾脏充血肿大等(图版 I-6, I-9)。

2.2 细菌分离结果及优势菌株的形态特征

从患病美洲鳗鲡的肝脏及脾脏处分离得到大量形态大小一致的优势菌落, 命名为 AB01。

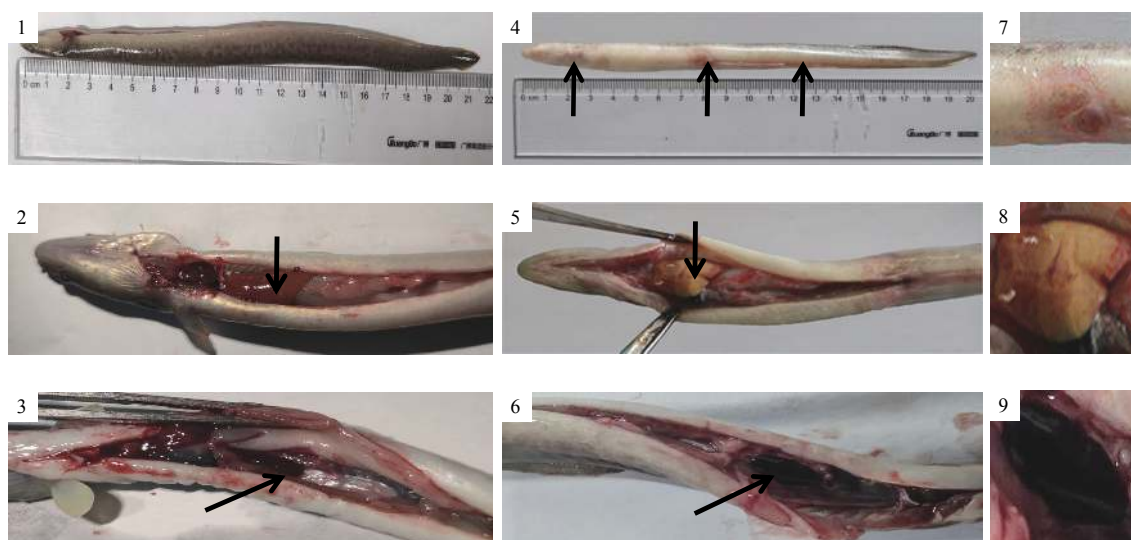
AB01 经纯化后在 LB 琼脂培养基上的菌落特征为圆形, 直径 1~1.5 mm, 边缘及表面光滑, 半透明。革兰氏染色结果呈红色, 为 G 菌。显微镜观察与测量表明, 该菌呈短杆状, 大小为 $(0.9 \sim 1.5) \mu\text{m} \times (1.4 \sim 2.4) \mu\text{m}$ 。

2.3 主要组织器官的病理特征

组织病理学检测表明, 健康美洲鳗鲡肝脏的肝索排列整齐, 肝细胞无水肿, 未见炎性细胞浸润(图版 II-1); 而患病美洲鳗鲡的肝脏和脾脏均出现不同程度病变, 其中, 患病美洲鳗鲡肝脏的部分肝索排列紊乱, 细胞肿胀, 胞核溶解, 胞质疏松, 结构模糊, 有大量大小不等的空泡, 肝窦轻度扩张淤血且有轻度的炎性细胞浸润(图版 II-2)。健康美洲鳗鲡脾脏细胞排列整齐、紧密, 细胞间界限清晰(图版 II-3); 患病美洲鳗鲡脾脏的部分细胞无规律排列, 脾脏中胞质多处稀疏, 伴有大面积损伤(图版 II-4)。

2.4 病原菌种类鉴定

生理生化鉴定 菌株 AB01 的氧化酶、尿素酶、 β -半乳糖苷酶为阴性, 接触酶阳性, 可发酵葡萄糖、乳糖和木糖(表 1)。其基本特征与鲍曼不动杆菌相似, 与鲍曼不动杆菌 CH016^[6] 的

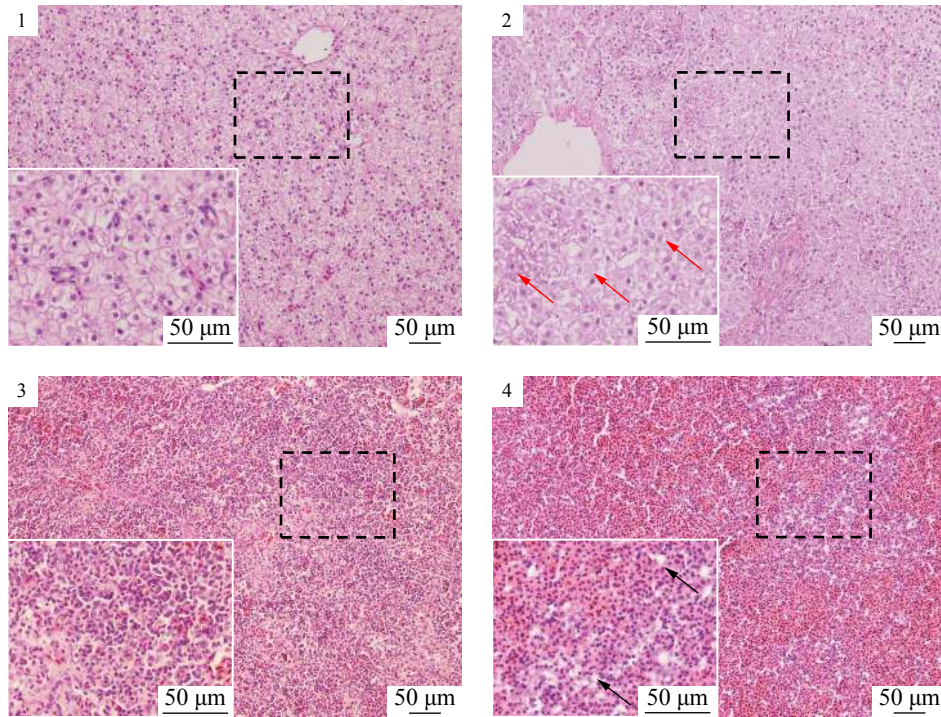


图版 I 患病美洲鳗鲡主要临床症状

1. 健康美洲鳗鲡外观(已解剖开); 2. 健康美洲鳗鲡肝脏; 3. 健康美洲鳗鲡脾脏; 4. 患病美洲鳗鲡鳃部及腹部多处红肿溃烂; 5. 患病美洲鳗鲡肝脏土黄色; 6. 患病美洲鳗鲡脾脏充血肿大; 7-9. 病灶部位局部放大

Plate I Main clinical symptoms of diseased *A. rostrata*

1. the exterior appearance of healthy *A. rostrata*; 2. the liver of healthy *A. rostrata*; 3. the spleen of healthy *A. rostrata*; 4. the red and ulcerated abdomen of diseased *A. rostrata*; 5. the wheat liver of diseased *A. rostrata*; 6. the hematose and swollen spleen of diseased *A. rostrata*; 7-9. partial enlarged images of lesions of diseased *A. rostrata*



图版 II 患病美洲鳗鲡的组织病理学观察

1. 健康美洲鳗鲡肝脏组织切片；2. 患病美洲鳗鲡肝脏组织切片：部分肝索排列紊乱，细胞肿胀，胞核溶解，胞质疏松，结构模糊，出现大量大小不等的空泡，肝窦轻度扩张淤血，有轻度的炎性细胞浸润；3. 健康美洲鳗鲡脾脏组织切片；4. 患病美洲鳗鲡脾脏组织切片：部分脾脏细胞无规律排列，脾脏中胞质多处稀疏，伴有大面积损伤

Plate II Pathohistological observation of diseased *A. rostrata*

1. pathohistological observation of liver from healthy *A. rostrata*; 2. pathohistological observation of liver from diseased *A. rostrata*. The arrangement of some hepatic cords was disordered, and the cells were swollen together with dissolved nucleus, loose cytoplasm, and fuzzy structure. A lot of vacuoles of different sizes were present and the sinus of liver with extravasated blood was dilated. Inflammatory cell infiltration was relatively slight. 3. pathohistological observation of spleen from healthy *A. rostrata*; 4. pathohistological observation of spleen from diseased *A. rostrata*, showing irregularly arranged, sparse cytoplasm, and extensive injury of splenic cells

生理生化特征完全相同。

分子生物学鉴定 以菌株 AB01 基因组 DNA 为模板扩增 16S rDNA，得到大小为 1 438 bp 的片段，符合预期结果。基因序列提交 GenBank 数据库，获得登录号为 MT982220。将菌株 AB01 的 16S rDNA 序列提交至 NCBI 数据库进行 Blast 比对发现，其与不动杆菌属的同源性较高，并与其中鲍曼不动杆菌 S-X9A (GenBank 登录号为 KJ806391.1) 同源性最高，相似度达 100%。利用 MEGA 6.0 软件采用邻接法构建系统发育树，结果菌株 AB01 与鲍曼不动杆菌 S-X9A 聚为同一分支，并与琼氏不动杆菌 (ATCC 17908、MTCC 1686)、乙酸钙不动杆菌 (ATCC 23055、MTCC 127)、约氏不动杆菌 (ZY86, ATCC 17909、MTCC 9820)、溶血不动杆菌 (ATCC 17906、DSM 6962)、鲁氏不动杆菌 (ATCC 17925、MTCC 496)、抗辐射不动杆菌 (A617、MTCC 9821)、皮特不动杆菌

(ATCC 19004、W26) 的 16S rDNA 序列自然聚类；与大肠杆菌 (ATCC 25922)、创伤弧菌 (ATCC 33147)、迟缓爱德华氏菌 (ATCC 15947) 明显分为 2 个分支 (图 1)。

综合形态观察、生理生化特征检测、16S rDNA 序列及系统发育分析结果，菌株 AB01 为不动杆菌属的鲍曼不动杆菌。

2.5 人工回归感染及半致死浓度测定

以 1×10^7 CFU/mL 的菌株 AB01 人工回归感染美洲鳗鲡后第 3 天开始死亡，14 d 内累计存活率为 27% (图 2-a)。并且，人工感染患病美洲鳗鲡与养殖场患病美洲鳗鲡存在类似的患病特征，且从感染患病鱼肝脏和脾脏中分离得到菌株的菌落特征和革兰氏染色结果均与菌株 AB01 相同，生理生化鉴定及 16S rDNA 测序结果也与菌株 AB01 完全一致，表明美洲鳗鲡感染患病的病原菌与养殖场暴发疾病的病原菌相同，且均有较强致

表 1 菌株 AB01 与参照菌株的生理生化特征

Tab. 1 Physiological and biochemical characteristics of isolated strain AB01 and reference strain

检测指标 items	分离菌株AB01 isolated strain AB01	参考菌株 reference strains	
		<i>A. baumannii</i> (ATCC)	<i>A. baumannii</i> CH016 ^[6]
细胞色素氧化酶 cytochromeoxidase	-	-	-
过氧化氢酶 catalase	+	ND	+
丙酸盐利用 sodium malonate utilization	-	ND	-
乙酰胺利用 acetamide utilization	-	ND	-
去氨基苯基丙氨酸 phenylalanine deamination	-	ND	-
β -半乳糖 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	-	-	-
尿素酶 urease	-	-	-
色氨酸脱氨酶 tryptophane deaminase	-	-	-
吲哚试验 indole production	-	-	-
丙酮试验 acetoin production	-	-	-
明胶液化 gelatinase	-	-	-
葡萄糖 glucose	+	+	+
麦芽糖 maltose	-	ND	-
葡萄糖苷酶 glucosidase	-	ND	-
棉子糖 raffinose	-	ND	-
乳糖 lactose	+	ND	+
木糖 xylose	+	ND	+
甘露糖 mannitol	-	-	-
纤维糖 inositol	-	-	-
山梨糖 sorbitol	-	-	-
鼠李糖 rhamnose	-	-	-
蔗糖 saccharose	-	-	-
蜜二糖 melibiose	+	+	+
杏苷 amygdalin	-	-	-
树胶醛糖 arabinose	+	+	+

注: “+”表示阳性, “-”表示阴性, “ND”表示没有相关数据

Notes: “+”. positive; “-”. negative; “ND” means no determination

病性。实验过程中, 对照组的美洲鳗鲡没有发生死亡, 存活率为 100%(图 2-a)。

对致病菌 AB01 对美洲鳗鲡的 LD₅₀ 进行测

定。以不同浓度菌液腹腔注射实验美洲鳗鲡后, 最高浓度组 (5×10⁸ CFU/mL) 的美洲鳗鲡于第 1 天出现病症并死亡, 第 7 天全部死亡; 最低浓度

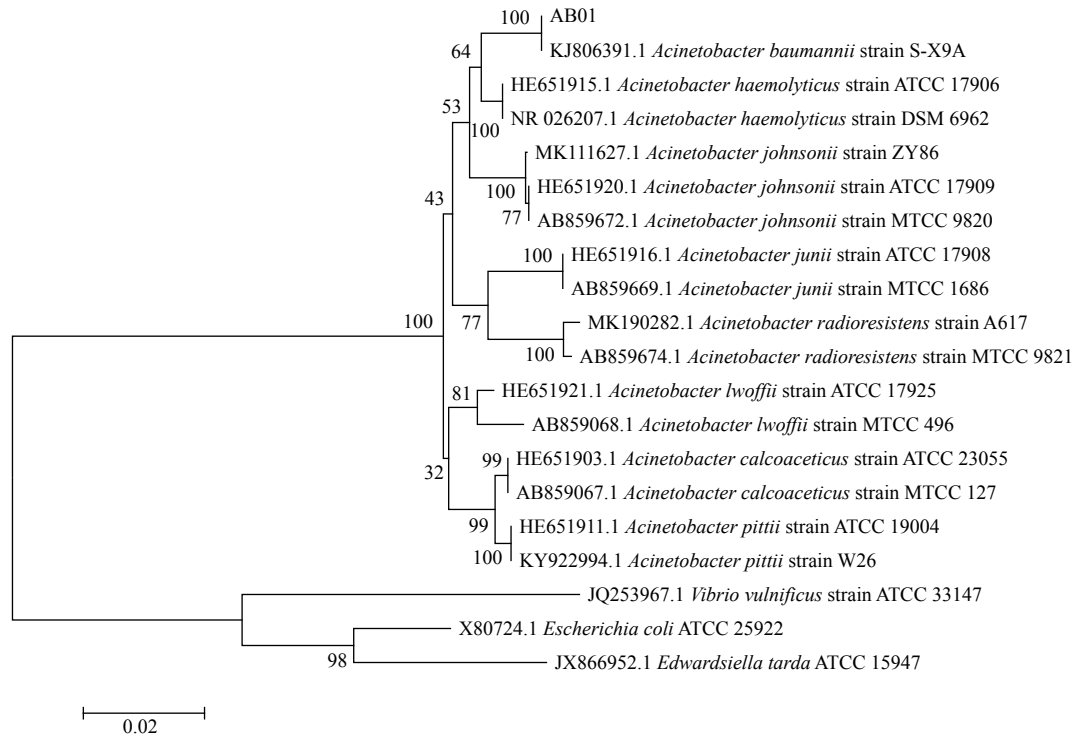


图 1 基于菌株 AB01 的 16S rDNA 基因序列的系统发育进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence of the strain AB01

组 (5×10^4 CFU/mL) 美洲鳗鲡于感染后第 3 天出现病症并于第 5 天出现死亡; 不同浓度组其死亡率依次分别为 0、16.7%、46.7%、90.0% 及 100% (图 2-b)。采用寇氏法计算测定 AB01 菌株的 LD_{50} 值为 4.63×10^6 CFU/mL。

2.6 药物敏感性分析

药敏试验结果显示, AB01 菌株对喹诺酮类 (依诺沙星、环丙沙星、氧氟沙星), 氨基糖苷类 (丁胺卡那), 利福霉素类 (利福平), β -内酰胺类 (头孢噻吩、头孢唑啉) 均表现为敏感; 对喹诺酮类 (氯霉素、克林霉素、呋喃妥因、诺氟沙星、氟苯尼考和呋喃唑酮), β -内酰胺类 (氨苄西林), 氨基糖苷类 (卡那霉素), 大环内酯类 (红霉素) 均表现为中度敏感; 对 β -内酰胺类 (头孢拉定、头孢哌酮、头孢噻肟、头孢他啶、头孢氨苄、头孢吡肟、苯唑西林、美洛西林、阿洛西林、氨曲南), 氨基糖苷类 (妥布霉素、链霉素、庆大霉素) 等 20 种药物表现为耐药 (表 2)。

3 讨论

不动杆菌属是一类非发酵革兰氏阴性杆菌, 广泛分布于水体和土壤中, 一般毒力较低, 不

易致病。但近年来, 有研究发现不动杆菌在机体抵抗力下降或免疫功能受损时容易诱发临床脓毒症等危重疾病, 已成为引起医院内感染的常见病原之一^[10], 并且, 因其可诱发人类多种危重疾病且易产生多重耐药性而备受关注^[11-12]。在鱼类中, 也有许多不动杆菌属种类为重要病原菌的报道, 如鲍曼不动杆菌可引起鳊 (*Siniperca chuatsi*)^[12]、异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*)^[13]、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)^[5]、线鲢 (*Channa striata*)^[14]、露斯塔野鲮 (*Labeo rohita*)^[15] 等发生疾病, 琼氏不动杆菌对石鲮 (*Kareius bicoloratus*)^[16]、锦鲤 (*Cyprinus carpio*)^[17] 均具有致病性。本研究从海南海口患病美洲鳗鲡肝脏和脾脏中分离到一株优势菌株 AB01, 应用 16S rDNA 序列测定与系统发育进化树的分析, 结合形态观察、生理生化特征, 对菌株 AB01 的分类地位进行了综合评价, 鉴定菌株 AB01 为不动杆菌属的鲍曼不动杆菌, 是首次有关养殖美洲鳗鲡感染鲍曼不动杆菌的报道。

鲍曼不动杆菌可引起不同鱼类的组织和器官发生不同程度的病变。顾天钊等^[12]发现鲍曼不动杆菌可引起鳊肝脏严重变形, 呈土黄色, 而其他器官无明显病变; 顾泽茂等^[6]也发现, 感

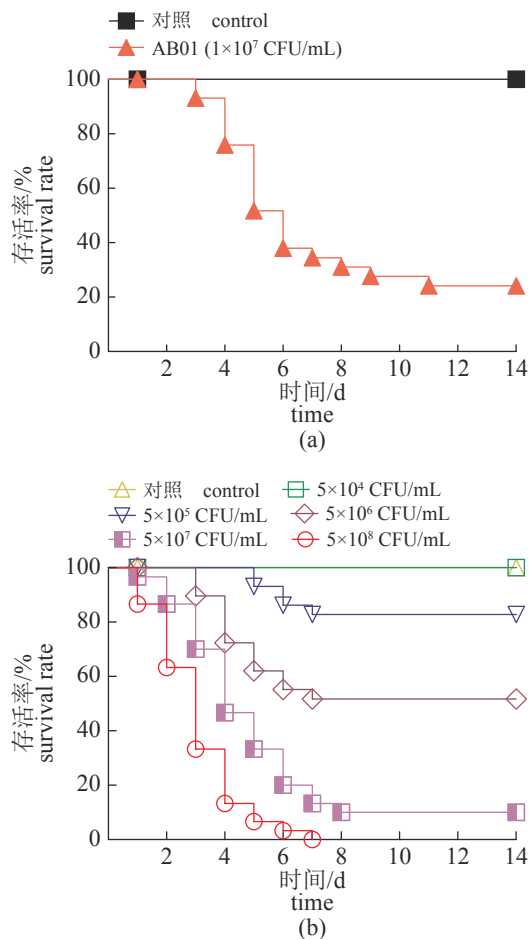


图2 菌株AB01人工回归感染及LD₅₀测定实验

(a) 菌株AB01人工感染结果; (b) 菌株AB01的LD₅₀测定结果

Fig. 2 Artificial infection and LD₅₀ of the strain AB01

(a) artificial infection of the strain AB01 to *A. rostrata*; (b) LD₅₀ of the strain AB01 to *A. rostrata*

染鲍曼不动杆菌的斑点叉尾鲟肝脏发白, 其他部位无明显变化; 陆文浩等^[13]的研究还发现, 鲍曼不动杆菌感染异育银鲫后, 不仅肝组织呈土黄色, 腹腔内还存在不同程度的积液, 且鳃组织也出现发炎等症状。本研究表明, 鲍曼不动杆菌感染美洲鳗鲡出现的症状与其感染异育银鲫相似: 肝脏土黄色、腹腔积液、鳃部发炎等。组织病理学研究表明, 感染鲍曼不动杆菌的美洲鳗鲡的肝脏出现部分肝索排列紊乱, 细胞肿胀, 胞核溶解, 胞质疏松, 结构模糊, 有大量大小不等的空泡, 肝窦轻度扩张淤血, 有轻度的炎性细胞浸润的病变; 部分脾脏细胞无规律排列, 脾脏中胞质多处稀疏, 伴有大面积损伤。Behera等^[15]的报道显示, 感染鲍曼不动杆菌的露斯塔野鲮的肝脏出现退化, 且空泡化的肝细胞数量明显增多; 肾脏呈现出肾小球

出血和萎缩。斑点叉尾鲟感染鲍曼不动杆菌后的组织病理学结果显示, 其肝脏空泡变性较多, 而鳃、肾脏和脾脏则无明显病变^[18]。另外, 鲍曼不动杆菌对不同鱼类的致病性研究表明, 其对鳊和异育银鲫均有较强的致病性 ($LD_{50} \leq 6 \times 10^6$ CFU/mL)^[12-13]。本研究结果显示鲍曼不动杆菌菌株AB01对美洲鳗鲡也具有强的致病性, 其LD₅₀为 4.63×10^6 CFU/mL, 可为后续研究鲍曼不动杆菌对美洲鳗鲡的致病机理提供重要的依据。

目前, 抗生素仍是治疗水生动物细菌性疾病的常用方法之一, 但药物残留和细菌耐药性等负面影响, 对水产养殖业和人类健康都构成了严重的威胁。细菌耐药性目前已成为亟待解决的世界级难题, 而鲍曼不动杆菌也出现了多重耐药菌株, 导致治疗非常困难^[19-20]。另外, 不动杆菌携带多种耐药基因, 形成多种耐药机制, 也是造成不动杆菌菌株耐药的主要原因^[21]。了解鲍曼不动杆菌的耐药性变化, 对预防和治疗养殖过程中该菌引起的疾病十分重要。熊薇等^[21]在研究鲍曼不动杆菌的耐药性时发现, 分别有38.3%、32.8%和26.1%的鲍曼不动杆菌对β-内酰胺类药物头孢噻肟、头孢他啶和头孢吡肟产生了耐药, 30.9%的鲍曼不动杆菌对氨基糖苷类药物庆大霉素表现耐药。陆文浩等^[13]在报道中指出, 鲍曼不动杆菌异育银鲫分离株YCS07-04对β-内酰胺类药物(头孢他啶、头孢噻肟、头孢哌酮、头孢三嗪和氨曲南)均产生耐药。有研究表明, 鲍曼不动杆菌对β-内酰胺类抗生素的耐药机制主要是产生β-内酰胺酶, 由于不动杆菌极易经质粒结合方式获得耐药性, 因此鲍曼不动杆菌可能通过质粒介导的β-内酰胺酶, 或由染色体介导β-内酰胺酶而对β-内酰胺类抗生素产生耐药性^[21]。除此之外, 该菌对氨基糖苷类抗生素产生耐药性的主要机制是修饰酶的产生^[21]。本研究初步分析了美洲鳗鲡源鲍曼不动杆菌的药物敏感性。结果显示, 菌株AB01对多种β-内酰胺类药物均产生了耐药性, 如头孢噻肟、头孢吡肟、头孢他啶等。此外, 菌株AB01对3种氨基糖苷类药物(如庆大霉素)也表现出耐药性, 表明导致此次美洲鳗鲡患病的鲍曼不动杆菌AB01存在多重耐药性, 且耐受药物的种类也与以往报道基本一致^[13, 21]。目前有关不动杆菌的耐药机制仍然是一个非常复杂的问题, 亟待进行深入研究。本研究结果显示, 鲍曼不动杆菌AB01菌株对多种喹诺酮类药物敏感, 对氯霉素、克林霉

表 2 病原菌 AB01 的药物敏感性实验结果

Tab. 2 Antibiotics susceptibility test of the strain AB01

抗菌药物 antibiotics	药量/(μ L/片) dose	标准抑菌圈直径/mm standard diameter of inhibited zones			抑菌圈直径/mm diameter of inhibited zone	敏感性 susceptibility
		R	I	S		
氨曲南 aztreonam	30	≤ 15	16~21	≥ 22	15	R
依诺沙星 enoxacin	10	≤ 14	15~18	≥ 19	21	S
阿莫西林 amoxicillin	20	≤ 13	14~17	≥ 18	10	R
呋喃妥因 furantoin	300	≤ 14	15~16	≥ 17	16	I
麦迪霉素 midecamycin	30	≤ 13	14~17	≥ 18	8	R
氨苄西林 ampicillin	10	≤ 13	14~16	≥ 17	14	I
多粘菌素B polymyxin B	300	≤ 8	8~11	≥ 12	6	R
头孢噻吩 cephalothin	30	≤ 14	15~17	≥ 18	22	S
利福平 rifampicin	5	≤ 16	17~19	≥ 20	24	S
妥布霉素 tobramycin	10	≤ 12	13~14	≥ 15	11	R
卡那霉素 kanamycin	30	≤ 13	14~17	≥ 18	16	I
氯霉素 chloramphenicol	30	≤ 12	13~17	≥ 18	17	I
苯唑西林 oxacillin	1	≤ 10	11~12	≥ 13	/	R
头孢唑啉 cefalun	30	≤ 14	15~17	≥ 18	18	S
头孢拉定 cefradine	30	≤ 14	15~17	≥ 18	/	R
头孢哌酮 cefoperazone sodium	75	≤ 15	16~20	≥ 21	12	R
头孢噻肟 cefotaxime Sodium	30	≤ 14	15~22	≥ 23	13	R
克林霉素 clindamycin	2	≤ 14	15~20	≥ 21	20	I
美洛西林 mezlocillin	75	≤ 17	18~20	≥ 21	14	R
万古霉素 vancomycin	30	≤ 14	15~16	≥ 17	8	R
新生霉素 novobiocin	30	≤ 12	13~16	≥ 17	12	R
四环素 tetracycline	30	≤ 14	15~18	≥ 19	/	R
诺氟沙星 norfloxacin	10	≤ 12	13~16	≥ 17	16	I
头孢他啶 ceftazidime	30	≤ 14	15~17	≥ 18	14	R
阿洛西林 azlocillin	75	≤ 17	--	≥ 18	7	R
氧氟沙星 ofloxacin	5	≤ 12	13~15	≥ 16	23	S
环丙沙星 ciprofloxacin	5	≤ 15	16~20	≥ 21	25	S
头孢氨苄 cephalexin	30	≤ 14	15~17	≥ 18	/	R
红霉素 erythromycin	15	≤ 13	14~22	≥ 23	19	I
新霉素 neomycin	30	≤ 12	13~16	≥ 17	/	R
头孢吡肟 cefepime	30	≤ 14	15~17	≥ 18	/	R
丁胺卡那 amikacin	30	≤ 14	15~16	≥ 17	20	S
链霉素 streptomycin	10	≤ 11	12~14	≥ 15	/	R
庆大霉素 gentamycin	10	≤ 12	13~14	≥ 15	10	R
氟苯尼考 florfenicol	30	≤ 12	13~17	≥ 18	16	I
呋喃唑酮 furazolidone	300	≤ 14	15~16	≥ 17	15	I

注：“/”表示无抑菌圈，“R”表示耐药，“I”表示中度敏感，“S”表示敏感，“--”表示无标准抑菌圈直径

Notes: “/” represents no inhibition zone, “R” means antibiotics resistance, “I” means medium sensitivity to antibiotics, “S” means highly sensitive to antibiotics, and “--” means no standard diameter of inhibited zones

素、呋喃妥因、诺氟沙星、氟苯尼考和呋喃唑酮中度敏感,结合我国批准的水产用兽药标准,多数敏感药物属于水产禁药,因此本研究未对AB01菌株敏感药物,包括环丙沙星、氧氟沙星、利福平、头孢噻吩、头孢唑啉、氯霉素、克林霉素、呋喃妥因、诺氟沙星、呋喃唑酮、红霉素等的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)进行深入研究,养殖场则建议可使用AB01菌株中度敏感的氟苯尼考进行疾病的防治。因此,开发新的药物以及探索其他绿色健康的方法已迫在眉睫。

中草药具有良好的广谱抗菌活性^[22]。在鲍曼不动杆菌的中草药防治方面,于小红等^[23]发现柴胡桂枝汤联合替加环素对鲍曼不动杆菌引起的小鼠肺炎具有疗效。娄茜等^[24]发现五倍子水煎剂对鲍曼不动杆菌的生长及生物膜具有明显的抑制作用。其他中草药,如黄芩、黄连、连翘、红血藤、石榴皮、金钱草、穿心莲、大蒜等都被证实对鲍曼不动杆菌的生长具有较好的抑制作用^[25]。除中草药外,疫苗也是预防鲍曼不动杆菌暴发的重要手段。已有的研究,包括鲍曼不动杆菌灭活全菌体疫苗、外膜囊泡、重组蛋白亚单位疫苗、荚膜多糖候选疫苗、联合疫苗等均能有效预防鲍曼不动杆菌的侵染^[26-29]。鲍曼不动杆菌不仅感染哺乳动物,对水生动物也具有较强的感染力,而且其大多数具有多重耐药性,治疗困难,因此,提倡“预防为主,防治结合”的绿色健康养殖模式。

参考文献 (References):

[1] 吴小梅,林茂,鄢庆枇,等. 美洲鳗鲡及其养殖水体分离耐药菌的多样性和耐药性分析[J]. 水产学报, 2015, 39(7): 1043-1053.
Wu X M, Lin M, Yan Q P, et al. Diversity and antimicrobial susceptibility of drug-resistant bacteria isolated from *Anguilla rostrata* and the farming water[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(7): 1043-1053(in Chinese).

[2] 郑芳艳,石存斌,潘厚军,等. 鳗鲡溃烂病病原的分离与鉴定[J]. 上海水产大学学报, 2005, 14(3): 3242-3247.
Zheng F Y, Shi C B, Pan H J, et al. Isolation and identification of pathogen from diseased *Anguilla anguilla*[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2005, 14(3): 3242-3247(in Chinese).

[3] 杨求华,郭松林,关瑞章,等. 鳗鲡病原性维氏气单胞菌的分离与鉴定[J]. 生物技术通报, 2012(7): 134-139.
Yang Q H, Guo S L, Guan R Z, et al. Isolation and identification of pathogenic *Aeromonas veronii* from *Anguilla japonica*[J]. Biotechnology Bulletin, 2012(7): 134-139(in Chinese).

[4] 杨方园,关瑞章,李忠琴,等. 花鳗鲡病原菌弗氏柠檬酸杆菌的鉴定[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2013, 18(2): 81-87.
Yang F Y, Guan R Z, Li Z Q, et al. Identification of pathogenic *Citrobacter freundii* isolated from *Anguilla marmorata*[J]. Journal of Jimei University (Natural Science), 2013, 18(2): 81-87(in Chinese).

[5] Martoja R, Martoja-Pierson M. Initiation aux techniques de l'histologie animale[M]. Masson et Cie, Paris, 1967, 1232.

[6] 顾泽茂,柳阳,陈昌福,等. 鲍曼不动杆菌斑点叉尾鲷株的分离与鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(4): 489-493.
Gu Z M, Liu Y, Chen C F, et al. Isolation and Identification of *Acinetobacter baumannii* from the diseased channel catfish[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2010, 29(4): 489-493(in Chinese).

[7] 熊静,关瑞章,郭松林,等. 不同方法提取鳗鲡病原菌DNA模板的差异分析[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2012, 17(3): 161-166.
Xiong J, Guan R Z, Guo S L, et al. Differentiation analysis of the templates DNA extracted by different methods from three pathogenic bacteria strains of eels[J]. Journal of Jimei University (Natural Science Edition), 2012, 17(3): 161-166(in Chinese).

[8] 梅冰,周永灿,徐先栋,等. 斜带石斑鱼烂尾病病原菌的分离与鉴定[J]. 热带海洋学报, 2010, 29(6): 118-124.
Mei B, Zhou Y C, Xu X D, et al. Isolation and identification of bacteria pathogens from *Epinephelus coioides* with tail-rotted disease[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2010, 29(6): 118-124(in Chinese).

[9] 蒋魁,徐力文,苏友禄,等. 两株珍珠龙趸病原性哈维弧菌(*Vibrio harveyi*)的分离与鉴定[J]. 生态科学, 2017, 36(6): 16-24.
Jiang K, Xu L W, Su Y L, et al. Isolation and identification of two pathogenetic *Vibrio harveyi* strains from pearl gentian[J]. Ecological Science, 2017, 36(6): 16-24(in Chinese).

- [10] Eliopoulos G M, Maragakis L L, Perl T M. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2008, 46(8): 1254-1263.
- [11] 何先弟, 邹琪, 陈振东, 等. 鲍曼不动杆菌脓毒症大鼠中性粒细胞的蛋白质组学研究[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2012, 32(5): 385-394.
He X D, Zhou Q, Chen Z D, *et al.* Proteomic analysis of neutrophils of rats with *Acinetobacter baumannii* sepsis[J]. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2012, 32(5): 385-394(in Chinese).
- [12] 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.
Gu T Z, Lu C P, Chen H Q. *Acinetobacter baumannii* a novel pathogen of acute epidemic in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)[J]. *Microbiology Bulletin*, 1997, 24(2): 104-106(in Chinese).
- [13] 陆文浩, 陈辉, 王习达, 等. 异育银鲫致病性鲍曼不动杆菌的鉴定和系统发育分析[J]. *中国兽医科学*, 2009, 39(4): 303-309.
Lu W H, Chen H, Wang X D, *et al.* Identification and phylogenetic analysis of the pathogenic *Acinetobacter baumannii* from hybridized prussian carp[J]. *Veterinary Science in China*, 2009, 39(4): 303-309(in Chinese).
- [14] Rauta P R, Kumar K, Sahoo P K. Emerging new multidrug resistant bacterial pathogen, *Acinetobacter baumannii* associated with snakehead *Channa striatus* eye infection[J]. *Current Science*, 2011, 101 (4): 548-553.
- [15] Behera B K, Paria P, Das A, *et al.* Molecular characterization and pathogenicity of a virulent *Acinetobacter baumannii* associated with mortality of farmed Indian major carp *Labeo rohita* (Hamilton 1822)[J]. *Aquaculture*, 2017, 471: 157-162.
- [16] 陈翠珍, 房海, 张晓君. 石鲈病原琼氏不动杆菌形态型I的鉴定[J]. *微生物学通报*, 2005, 32(3): 32-39.
Chen C Z, Fang H, Zhang X J. Identification of *Acinetobacter junii* morphovari from diseased stone flounder (*Kareius bicoloratus* L.)[J]. *Microbiology Bulletin*, 2005, 32(3): 32-39(in Chinese).
- [17] 陈翠珍, 张晓君, 房海, 等. 锦鲤中琼氏不动杆菌的分离与鉴定[J]. *水生态学杂志*, 2009, 30(1): 86-90.
Chen C Z, Zhang X J, Fang H. Isolation and identification of *Acinetobacter junii* from ornamental carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Journal of Hydroecology*, 2009, 30(1): 86-90(in Chinese).
- [18] Xia L, Xiong D, Gu Z, *et al.* Recovery of *Acinetobacter baumannii* from diseased channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in China[J]. *Aquaculture*, 2008, 284(1-4): 285-288.
- [19] Karageorgopoulos D E, Falagas M E. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections[J]. *Lancet Infectious Diseases*, 2008, 12(8): 751-762.
- [20] Seifert H, Stefanik D, Sutcliffe J A, *et al.* In-vitro activity of the novel fluorocycline eravacycline against carbapenem non-susceptible *Acinetobacter baumannii*[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2018, 51(1): 62-64.
- [21] 熊薇, 张文池. 鲍曼不动杆菌的耐药性[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2001, 1(2): 96-97.
Xiong W, Zhang W C. Resistance of *Acinetobacter baumannii*[J]. *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy*, 2001, 1(2): 96-97(in Chinese).
- [22] 尹璐, 胡仁火, 丘日光, 等. 7种中草药醇提取物抑菌杀菌作用的研究[J]. *安徽农业科学*, 2014(28): 9722-9724.
Yin L, Hu D H, Qiu R G, *et al.* Study on action of bacteriostasis and disinfection of alcohol extracts from 7 kinds of Chinese medicinal herbs[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2014(28): 9722-9724(in Chinese).
- [23] 于小红, 章从恩, 王铁山, 等. 柴胡桂枝汤联合替加环素对大鼠白细胞减少性耐药鲍曼不动杆菌感染肺炎的干预作用[J]. *中药药理与临床*, 2018, 34(4): 15-20.
Yu X H, Zhang C E, Wang T S, *et al.* Efficacy of Chaihu Guizhi decoction/tigecycline combination in a leukopenic rat pneumonia model caused by multiresistant *Acinetobacter baumannii*[J]. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, 2018, 34(4): 15-20(in Chinese).
- [24] 娄茜, 杨翼, 刘大鹏, 等. 五倍子水煎剂抑制鲍曼不动杆菌生物膜形成分子机制的研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2019, 40(20): 2439-2443.
Lou Q, Yang Y, Liu D P, *et al.* Molecular mechanism of *Galla chinensis* decoction inhibiting biofilm formation of *Acinetobacter baumannii* Bauman[J]. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2019, 40(20): 2439-2443(in Chinese).
- [25] 陈深元, 曾敏敏, 杨焯健, 等. 20种中药对碳青霉烯耐

- 药鲍曼不动杆菌的体外抑菌作用[J]. 中国中医药科技, 2020, 27(3): 370-372.
- Lu S Y, Zeng M M, Yang Y J, *et al.* Inhibitory effect of 20 kinds of Chinese herbal medicines on carbapenem-resistant *Acinetobacter Baumannii* *in vitro*[J]. Chinese Journal of Traditional Medical Science and Technology, 2020, 27(3): 370-372(in Chinese).
- [26] 郭三君, 谢勇恩. 鲍曼不动杆菌疫苗的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2017, 45(6): 75-79.
- Guo S J, Xie Y E. Progress in *Acinetobacter baumannii* vaccine[J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2017, 45(6): 75-79(in Chinese).
- [27] 李笋, 张卫军, 陈大群, 等. 鲍曼不动杆菌外膜蛋白疫苗
- 苗的制备及其保护作用评价[J]. 免疫学杂志, 2020, 36(2): 93-101.
- Li S, Zhang W J, Chen D Q, *et al.* Preparation and protective effect evaluation of outer membrane protein from *Acinetobacter baumannii*[J]. Immunological Journal, 2020, 36(2): 93-101(in Chinese).
- [28] Mcconnell M J, Pachón J. Active and passive immunization against *Acinetobacter baumannii* using an inactivated whole cell vaccine[J]. *Vaccine*, 2010, 29(1): 1-5.
- [29] Harris G, Kuo Lee R, Lam C K, *et al.* A mouse model of *Acinetobacter baumannii* associated pneumonia using a clinically isolated hypervirulent strain[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57(8): 3601-3613.

Isolation, identification, and pathogenicity analysis of *Acinetobacter baumannii* in *Anguilla rostrata*

SUN Yun^{1,2}, HE Mingwang^{1,2}, ZHANG Panpan², LI Haiping², CAO Zhenjie^{1,2*}, ZHOU Yongcan^{1,2*}

(1. State Key Laboratory of Marine Resource Utilization in South China Sea, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. Key Laboratory of Tropical Hydrobiology and Biotechnology, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: In order to determine the cause of the large number of deaths of the sick American eel (*Anguilla rostrata*) in an aquaculture farm in Haikou (Hainan), one dominant strain (named AB01) was isolated from the liver and spleen of the diseased American eels. The dominant strain AB01 was identified as *Acinetobacter baumannii* based on the results from physiological and biochemical testing, sequence alignment of 16S rDNA gene and phylogenetic analysis. The challenge test in healthy American eels by artificial reentry indicated that *A. baumannii* was the pathogenic bacteria. Further analysis of pathogenicity showed that the semi-lethal concentration of *A. baumannii* (AB01) was 4.63×10^6 CFU/mL. Histopathological observation of liver from diseased *Anguilla anguilla* showed the arrangement of some hepatic cords was disordered, and the cells were swollen, together with dissolved nucleus, loose cytoplasm, and fuzzy structure. Moreover, a lot of vacuoles of different sizes were present in liver. In addition, spleen from diseased *Anguilla rostrata* presented sparse cytoplasm and extensive injury. The results of antimicrobial susceptibility test showed that *A. baumannii* (AB01) was resistant to many antibiotics, but was highly sensitive to cephalothin, cefazolin, azithromycin, amikacin, enoxacin, rifampicin, ciprofloxacin, ofloxacin, and medium sensitivity to nine antibiotics, such as florfenicol and so on. Moreover, *A. baumannii* (AB01) was resistant to twenty antibiotics, such as aztreonam and so on. Thus, this study provides scientific support for the prevention and control of the disease of the American eel.

Key words: *Anguilla rostrata*; *Acinetobacter baumannii*; isolation and identification; 16S rDNA; antibiotic sensitivity test

Corresponding authors: CAO Zhenjie. E-mail: 1057319886@qq.com;
ZHOU Yongcan. E-mail: zychnu@163.com

Funding projects: Natural Science Foundation of Hainan Province (2019RC078); Key Research Project of Hainan Province (ZDKJ2019011); Nanhai Famous Youth Project