

胡秀彩,李旭,吕爱军,等. 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,2016,44(11):256-258.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.11.076

# 草鱼肠道不动杆菌的分离鉴定及药敏试验

胡秀彩<sup>1</sup>,李旭<sup>2</sup>,吕爱军<sup>1</sup>,石洪玥<sup>1</sup>,孙敬锋<sup>1</sup>,陈成勋<sup>1</sup>,冯照军<sup>2</sup>

(1. 天津农学院水产学院/天津市水产生态及养殖重点实验室,天津 300384; 2. 江苏师范大学生命科学学院,江苏徐州 221116)

**摘要:**从草鱼肠道中分离获得 1 株细菌,编号为 CAX1,进行细菌形态学观察、理化特征、16S rDNA 序列分析及药敏试验等研究。结果表明 CAX1 菌株为革兰氏阴性短杆菌,进一步采用 PCR 方法扩增其 16S rDNA,测序显示其大小为 1 531 bp,序列比对表明 CAX1 分离株与厦门不动杆菌新种 (*Acinetobacter xiamenensis*) 16S rDNA 同源性达 97.1%,系统进化树分析显示 CAX1 菌株与不动杆菌亲缘关系最近,自然聚类为 1 支;药敏试验结果显示 CAX1 菌株对庆大霉素、阿莫西林、氨苄西林、头孢哌酮等药物敏感。

**关键词:**草鱼;肠道细菌;分离鉴定;药敏试验;系统进化树

**中图分类号:**S943.112.42 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)11-0256-02

不动杆菌属(*Acinetobacter*)菌株在自然界广泛存在,主要分布在水体和土壤中,易在潮湿环境中生存,目前确定的不动杆菌属至少有 10 多个种<sup>[1-3]</sup>,包括鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、鲁菲不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*)、溶血不动杆菌(*Acinetobacter haemolyticus*)、琼氏不动杆菌(*Acinetobacter junii*)、约翰逊不动杆菌(*Acinetobacter johnsonii*)、醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*),以及新发现的厦门不动杆菌(*Acinetobacter xiamenensis*)、不动杆菌(*Acinetobacter guillouiae*)等。近年来,一般认为不动杆菌多为条件致病菌,其中鲍曼不动杆菌引起医院内感染频发,耐药菌株不断增多,因此该属细菌被广泛关注<sup>[4]</sup>。最近,国内学者从异育银鲫、锦鲤等鱼类体内分离到致病性鲍曼不动杆菌、琼氏不动杆菌等<sup>[5-6]</sup>。但是,目前尚未见鱼源厦门不动杆菌分离鉴定相关研究。本研究以草鱼为研究对象,从其肠道中分离获得 1 株不动杆菌,并进行细菌形态学、生理生化以及 16S rDNA 测序等分析鉴定为厦门不动杆菌,这为草鱼不动杆菌的分离鉴定以及肠道微生态研究积累了科学资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

草鱼购自徐州市某市场。LB 培养基、细菌生化微量鉴定和药敏试纸均购自杭州微生物制剂有限公司。细菌基因组 DNA 提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、pMD18-T、Master Mix 均购自 TaKaRa 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 细菌分离、鉴定、理化性质及药敏试验 参照沈晓静等的方法<sup>[7]</sup>进行细菌分离纯化、革兰氏染色及生化鉴定,将

纯化培养后的细菌分别接种于 21 种生化管中,28 ℃ 培养 24~28 h,观察分离细菌的生理生化反应。无菌环境下将药敏纸片分别置于涂有均匀菌液的 LB 固体培养基表面,28 ℃ 培养 16~18 h 后测量抑菌圈直径,计算平均值,确定该菌对不同药物的敏感程度。

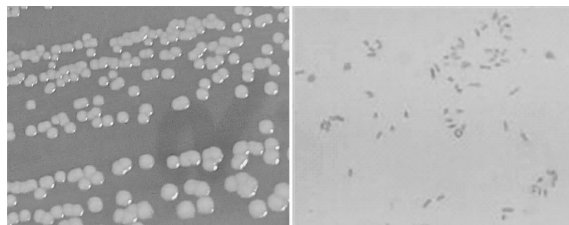
1.2.2 细菌总 DNA 提取、16S rDNA 基因 PCR 扩增 采用细菌基因组提取试剂盒提取细菌总 DNA,PCR 扩增反应体系(25 μL):DNA 模板 1 μL,细菌通用引物(27F:AGAGTTT-GATCATGGCTCA,1492R:TACGGTTACCTTGTTACGACTT)各 1 μL,Master Mix 12.5 μL,ddH<sub>2</sub>O 9.5 μL。PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 2 min;94 ℃ 变性 40 s,53 ℃ 复性 40 s,72 ℃ 延伸 30 s,30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳进一步检测 PCR 结果,PCR 产物切胶回收,连接 pMD18-T 载体,转化后筛选阳性克隆,送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.2.3 系统发育树分析 将 16S rDNA 序列通过 NCBI 的 Blast 检索系统进行序列同源性分析,使用 ClustalX 1.81 软件进行多序列比对,采用 MEGA 4.1 软件邻接法(neighbor joining)构建系统发育树。

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌分离

从市售草鱼肠道内分离纯化获得 1 株细菌,编号为 CAX1,革兰氏染色观察为阴性小杆菌,多为单个分散分布。CAX1 菌株接种于 LB 培养基 28 ℃ 培养 24 h 后,为光滑、透明、表面湿润、边缘整齐的圆形菌落(图 1)。



(a) CAX1 菌株菌落 (a) 及革兰氏染色 (b)

收稿日期:2015-09-17

基金项目:国家自然科学基金(编号:31272692);江苏省高等学校大学生实践创新训练计划项目(编号:201410320046Z)。

作者简介:胡秀彩(1976—),女,江苏徐州人,实验师,主要从事微生物学研究。E-mail:huxiucal@126.com。

通信作者:吕爱军,副教授,主要从事微生物及免疫学研究。

E-mail:lajand@126.com。

## 2.2 理化特征及药敏试验结果

对分离菌进行生化特性检测,结果(表1)表明,CAX1菌株为葡萄糖、阿拉伯糖、甘露糖检测试验呈阳性,精氨酸双水解、赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶、葡萄糖酸盐、肌醇、麦芽糖、甘露醇、乳糖、蜜二糖、鼠李糖、硫化氢、山梨醇、木糖醇、木糖检测试验呈阴性。药敏试验结果显示 CAX1 菌株对庆大霉素、阿莫西林、头孢哌酮、复方新诺明等 9 种抗生素敏感,对诺氟沙星、头孢孟多、头孢噻吩、先锋霉素 IV、氯霉素、四环素等抗生素不敏感。

## 2.3 16S rDNA 基因测序及系统发育树分析

以 CAX1 细菌基因组 DNA 为模板,采用 PCR 方法扩增 CAX1 菌株的 16S rDNA 序列,电泳检测发现约在 1 500 bp 处有明显目的条带;进一步对 16S rDNA 测序表明目的片段大小为 1 531 bp。将 16S rDNA 通过 Blast 检索系统进行序列比对分析,结果表明 CAX1 菌株与厦门不动杆菌新种序列同源性为 97.1%。系统进化树分析结果显示 CAX1 菌株与不动杆菌的亲缘关系最近,自然聚类为 1 支(图2)。

## 3 讨论

不动杆菌属是一类非发酵革兰氏阴性杆菌,在水体和土壤中分布广泛。研究表明不动杆菌是一种条件致病菌,一般认为毒力较低,在机体抵抗力下降或免疫功能受损时易出现

表1 CAX1 菌株药敏试验结果

抗生素	抑菌圈直径 (mm)	判定标准(mm)			敏感程度
		耐药 R	中敏 I	敏感 S	
头孢孟多	11	≤14	15 ~ 17	≥18	R
头孢哌酮	22	≤15	16 ~ 20	≥21	S
头孢噻肟	21	≤14	15 ~ 22	≥23	I
头孢噻吩	0	≤14	15 ~ 17	≥18	R
先锋霉素 IV	14	≤14	15 ~ 17	≥18	R
阿莫西林	22	≤13	14 ~ 17	≥18	S
哌拉西林	23	≤17	18 ~ 20	≥21	S
氨苄西林	19	≤11	12 ~ 14	≥15	S
庆大霉素	20	≤12	13 ~ 14	≥15	S
卡那霉素	21	≤13	14 ~ 17	≥18	S
红霉素	0	≤13	14 ~ 22	≥23	R
阿奇霉素	0	≤13	14 ~ 17	≥18	R
万古霉素	0	≤9	10 ~ 11	≥12	R
克林霉素	0	≤14	15 ~ 20	≥21	R
羧苄青霉素	21	≤13	14 ~ 16	≥17	S
氯霉素	0	≤12	13 ~ 17	≥18	R
诺氟沙星	9	≤12	13 ~ 16	≥17	R
替考拉宁	0	≤10	11 ~ 13	≥14	R
四环素	12	≤14	15 ~ 18	≥19	R
复方新诺明	19	≤10	11 ~ 15	≥16	S
磺胺异恶唑	25	≤12	13 ~ 16	≥17	S

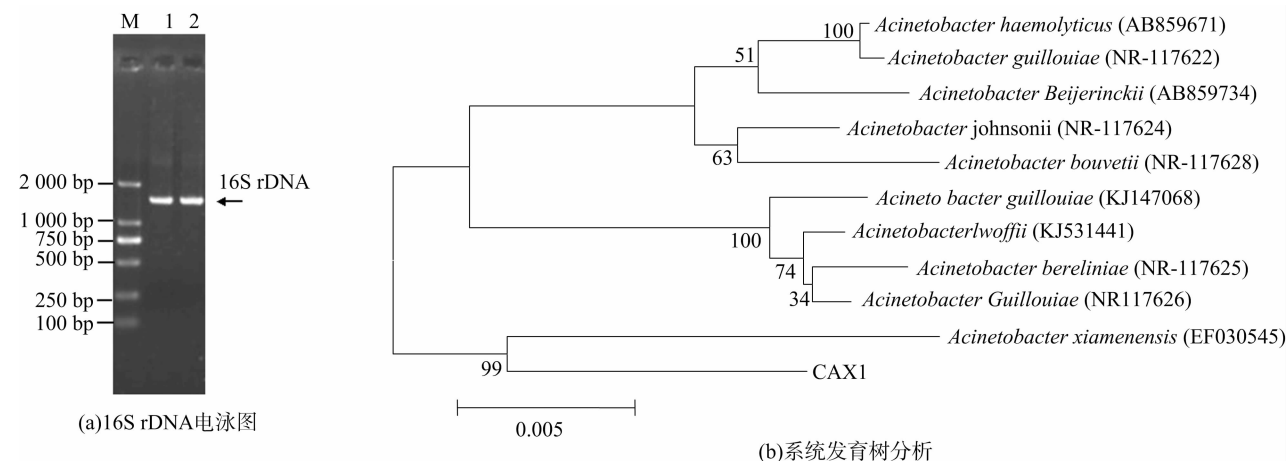


图2 CAX1 菌株 16S rDNA 电泳图与系统发育树分析

机会感染<sup>[6-8]</sup>。鲍曼不动杆菌是医院感染的重要病原菌之一。刘子骥等认为洛菲不动杆菌与呼吸道感染有关<sup>[3]</sup>。明德松等研究报道鲁氏不动杆菌对β-内酰胺类药物普遍耐药,对氨基糖苷类、氟喹诺酮类、磺胺类、四环素类等敏感<sup>[2]</sup>。黄林等研究发现不动杆菌能引起肉质腐败,主要利用氨基酸,防腐能力较低<sup>[9]</sup>。在鱼类中,目前对不动杆菌研究报道主要有鲍曼不动杆菌、琼氏不动杆菌和洛菲不动杆菌<sup>[10-11]</sup>。陈翠珍等从锦鲤体内分离出琼氏不动杆菌<sup>[5]</sup>。毛芝娟等分离获得琼氏不动杆菌,引起患病史氏鲟症状为体表褪色、肛门红肿、腹腔肿大伴有大量血性腹水<sup>[10]</sup>。陆文浩等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、咽组织充血和鳃组织发炎等<sup>[6]</sup>。张涵等研究表明三角帆蚌、银鲫、青鱼、鳊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<sup>[11]</sup>。目前尚无研究表明厦门不动杆菌对鱼类

具有致病性<sup>[12]</sup>。本研究从草鱼肠道分离获得 CAX1 菌株,采用细菌形态学观察、理化特征、16S rDNA 序列以及系统发育树分析等方法,最终鉴定为厦门不动杆菌,在鱼类肠道中尚属首次报道,有待于进一步深入研究。药敏试验结果表明,CAX1 菌株对庆大霉素、阿莫西林、氨苄西林、头孢哌酮、复方新诺明等抗生素敏感,以上研究为鱼类不动杆菌的分离鉴定以及肠道微生态研究提供科学参考。

## 参考文献:

- [1] 胡源,何丽华,张建中. 鲍曼不动杆菌临床分离株分子生物学鉴定分析[J]. 疾病监测,2010,25(3):202-204.
- [2] 明德松,潘艳萍,朱炎. 鲁氏不动杆菌的临床分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2014,24(10):2351-2353.
- [3] 刘子骥,王焱,岳启安,等. 新型洛菲不动杆菌的分离与鉴定

杨秀荣,王庆容,刘惠茹. 保存温度对黄颡鱼肝组织总 RNA 质量的影响[J]. 江苏农业科学,2016,44(11):258-260.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.11.077

# 保存温度对黄颡鱼肝组织总 RNA 质量的影响

杨秀荣,王庆容,刘惠茹

(遵义师范学院生命科学院,贵州遵义 563002)

**摘要:**以黄颡鱼肝脏为试验材料,用 TRIzol 法提取肝脏组织总 RNA,将试验样品置于不同温度下保存,在 1% 琼脂糖凝胶中电泳检测 RNA 的质量。结果显示:在低温没有密封储存的情况下,RNA 保存较长时间,完整性好; -70 ℃ 下 RNA 可以保存 8 个月, -20 ℃ 下 RNA 可以保存 4 个月;在其他温度条件下,若密封保存,4 ℃ 下可保存 2 周,10 ℃ 下可保存 4 d 以上,20 ℃ 下保存 3 d 时条带清晰,保存 4 d 时条带模糊,30 ℃ 下保存 2.5 d 时条带变得模糊,到 3 d 时全部降解,40 ℃ 下保存 1 d 条带清晰,保存 2 d 条带变得模糊,保存 2.5 d 时完全降解。此外应注意的是,RNA 如果暴露于空气中,5 h 内所有试验组的 RNA 大多数降解。

**关键词:**黄颡鱼;肝脏总 RNA;保存温度;RNA 完整性

**中图分类号:**S917 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)11-0258-03

近年来,分子生物学各项技术无论在医学方面还是生物学方面的各个领域均得到广泛应用,高质量的 RNA 则是其他后续试验的基础。如 Northern blot 及杂交分析、寡聚(dT)纤维素选择分离 mRNA、cDNA 文库的构建、逆转录酶聚合酶链式反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction,简称 RT-PCR)、RNA 原位杂交、转基因材料鉴定、基因克隆及其表达等试验的成败,在很大程度上取决于 RNA 的质量<sup>[1]</sup>,对于 RNA 的质量评价,完整性和均一性是其关键因素<sup>[2]</sup>。RNA 特殊的单链结构导致其自身结构极不稳定,加上周围环境中广泛分布 RNA 酶(RNase)并且难以灭活,导致 RNA 很容易降解。有些试验过程中使用 RNA 的时间跨度较大,因此确定 RNA 在不同温度下能保存的最长时间就尤其重要。关于

不同温度对 RNA 质量的影响及不同保存温度下 RNA 能够保存的最长时间方面的研究,目前相关报道较少。本试验以黄颡鱼肝组织 RNA 为试验材料,研究不同保存温度对 RNA 质量的影响,以期对分子生物学研究者日后如何保存 RNA 提供可行性参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂配制

0.5 × TBE 的配制。将 10.8 g Tris、5.5 g 硼酸、0.744 g EDTA-Na<sub>2</sub> 溶解于经高温灭菌的 2 000 mL 蒸馏水中,充分摇匀,调节 pH 值至 8.0。

琼脂糖凝胶的制备。取 0.7 g 琼脂糖溶解于盛有 70 mL 0.5 × TBE 溶液的蓝盖瓶中,将其放入微波炉中反复加热 3 ~ 4 次,直至琼脂糖完全溶解;待胶液冷却至 60 ℃,向其中加入 7 μL GoldView I 型核酸染色剂(其中琼脂糖的比例为 1%,核酸染料的比例为 0.01%),将胶液倒入事先已清洗干净、晾干且插入制胶梳子的胶槽之中,等到胶块冷却凝固后,即可将梳子拔出,完成用于电泳的琼脂糖胶块制作。

### 1.2 RNA 的提取与检测

1.2.1 TRIzol 法提取总 RNA<sup>[3]</sup> 取健康黄颡鱼,用剪刀钝处猛击其头部使其昏厥,立即由泻殖孔剪至鳃盖后缘,迅速取肝脏组织(50 mg),将所取组织块放入 1.5 mL EP 管内并迅速置于液氮中速冻。

收稿日期:2015-11-11

基金项目:贵州省科技厅农业攻关项目(编号:黔科合 NZ[2013]3027 号);贵州省“125 计划”重大科技专项(编号:黔教合重大专项字[2013]025);贵州省科技厅联合基金(编号:黔科合 J 字 LKZS[2012]17 号)。

作者简介:杨秀荣(1962—),男,贵州沿河人,教授,主要从事遗传学、分子生物学教学与科研以及养殖动物疾病的中草药防治工作。  
E-mail: yangxiurong7525@163.com。

通信作者:王庆容,硕士,教授,研究方向为动物分子生物学、鱼类遗传多样性、养殖动物疾病的中草药防治。E-mail: 610194977@qq.com。

[J]. 中国病原生物学杂志,2011,6(7):494-496.

[4] 韩 蕾,张旭燕,韩少山,等. 临床致病性不动杆菌的分子生物学鉴定[J]. 西安交通大学学报:医学版,2012,33(5):611-616.

[5] 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]. 水生生态学杂志,2009,2(1):86-90.

[6] 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.

[7] 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.

[8] 李劲松,魏殿军,祁 伟,等. 鲍曼不动杆菌临床分离株的耐药分析[J]. 天津医药,2003,31(6):373-375.

[9] 黄 林,陈全胜,张燕华,等. 冷却猪肉优势腐败菌分离鉴定及腐败能力测定[J]. 食品科学,2013,34(1):205-209.

[10] 毛芝娟,毛雨州,汪建萍. 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,2013,37(10):1572-1576.

[11] 张 涵,周 涛,王 岩. 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,2013,37(5):824-835.

[12] 刘 君,宋晓玲,陈志鑫. 益生菌对水产动物的作用研究进展[J]. 动物医学进展,2009,30(9):78-81.