

文章编号: 1674-5566(2009)02-0193-05

鳎肺炎克雷伯菌的分离与鉴定

邓国成, 罗霞, 江小燕, 刘礼辉, 林明辉, 彭勇鳌, 廖国礼

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380)

摘要:从 6 尾患肠道胀气的病鳎腹水和肝脏病灶中分离、筛选出一株致病菌 EP4。通过细菌形态学、生理生化测定及 ATB Expression 半自动细菌鉴定仪鉴定均符合肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 特性。以细菌 16S rRNA 基因通用引物进行 PCR 扩增, 得到 EP4 的部分 16S rRNA 基因序列, 长约 1 502 bp。将所测序列与 GenBank 中序列进行 BLAST 比对并构建系统进化树, 结果表明其与肺炎克雷伯氏菌 [DQ444287] 的同源性最高 (98.9%)。人工感染证明该菌株具有较强的致病力 (致死率达 70%), 30 种药物筛选结果显示, EP4 对菌必治 (头孢三嗪)、先锋 V、头孢克洛、氧氟沙星、氟罗沙星、依诺沙星、萘啶酸等高度敏感, 而对苯唑青霉素、氨苄青霉素、青霉素 G、阿莫西林等不敏感。

关键词:鳎; 肺炎克雷伯菌; 16S rRNA

中图分类号: S 941 **文献标识码:** A

Separation and identification of the eel *Klebsiella pneumoniae*

DENG Guo-cheng LUO Xia JIANG Xiao-yan LIU Li-hui LIN Ming-hui PENG Yong-ao LIAO Guo-li
(Pearl River Fisheries Research Institute Chinese Academy of Fishery Sciences Guangzhou 510380, China)

Abstract: A pathogenic bacterial strain EP4 was isolated from the ascites and liver of 6 diseased eels. The EP4 was identified as *Klebsiella pneumoniae* according to its morphologic and physio-biochemical characteristics as well as ATB Expression systematic identification. Using the general primers of bacteria 16S rRNA, the gene fragments were amplified by PCR with about 1 502 bp. And also we compared the obtained gene sequence with GenBank and constructed phylogenetic tree on basis of 16S rRNA. The BLAST results showed that EP4 had the highest homologies (i.e., 98.9%) with sequence of *K. pneumoniae* DQ444287; and the phylogenetic tree results revealed further that this strain clustered together with *K. pneumoniae* [DQ444287, EF197996 and EU231611]. On the other hand, the results of artificial infection experiments verified that EP4 had a strong ability of the diseases induction. By testing with 30 medicaments, high sensitivity was found to Ceftriaxone, Cephadrine, Cefaclor, Ofloxacin, Fleroxacin, Enoxacin and Nalidixic acid; however, the strain of EP4 was insensitive to Oxacillin, Ampicillin, Penicillin G and Amoxicillin.

Key words: eel *Klebsiella pneumoniae* 16S rRNA

鳎 (Eel) 是我国池塘养殖和出口创汇的重要经济鱼类之一。近年来, 随着养殖业的发展和养殖密度的提高, 各种疾病时常发生, 给现有养殖业造成了巨大的经济损失, 如爱德华氏病、烂鳃病和赤鳍病等已有大量报导^[1-3]; 而鳎肠道胀气病是本课题组新近发现的一种疾病, 迄今为止在国内外尚未见报道。本

收稿日期: 2008-08-27

基金项目: 广东省农业领域重点项目 (2008A020100016)

作者简介: 邓国成 (1955-), 男, 广东顺德人, 副研究员, 主要从事水产动物病害防治研究。E-mail: deng_guocheng@126.com

文在鳎病原体分离、鉴定及药物筛选方面进行了研究,旨在弄清该病发病原因,并为开发相应防治药物提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

病鳎取自广东省顺德一养殖场,平均体重(0.3 ± 0.05) kg 体色暗黑、腹部膨大、肝脏出血,肠道充气并伴有腹水;供感染用健康鳎购自广东省清远市,平均体重(0.3 ± 0.04) kg

1.2 细菌分离培养

从6尾病鳎的肝脏、腹水分离病原菌,营养琼脂培养基 28°C 恒温培养 $24 \sim 48$ h,挑取优势菌落再次纯化后,获得一株纯培养物,编号为 EP4。用脱脂牛奶作保护剂冻干, -70°C 低温保存。

1.3 感染实验

1.3.1 细菌感染

腹腔注射感染 取经普通营养琼脂平皿培养 $18 \sim 24$ h 的细菌,用生理盐水稀释至约 6×10^8 CFU/mL (McF. 2号比浊管),腹腔注射 10尾健康鳎 (0.2 mL/尾)。对照组 (10尾) 注射等量 0.65% 无菌生理盐水。水温 $25 \sim 28^{\circ}\text{C}$ 。

浸泡感染 以 6×10^8 CFU/mL 菌液浸泡健康草鱼 10尾,对照组 (10尾) 浸泡 0.65% 无菌生理盐水。20 min 后移至无菌水族箱 ($25 \sim 28^{\circ}\text{C}$),连续观察 7 d 记录实验鱼症状及死亡情况。

1.3.2 组织过滤液感染

取病鱼肝、脾、肾组织按 1:10 (质量体积比) 比例加入生理盐水研磨,离心 ($10\,000$ r/min, 30 min),取上清经微孔滤膜过滤 ($0.22 \mu\text{m}$),注射 10尾健康鳎 (0.2 mL/尾);对照组 (10尾) 注射等量 0.65% 灭菌生理盐水。水温 $25 \sim 28^{\circ}\text{C}$ 。

1.4 细菌分类鉴定

1.4.1 常规生化鉴定

纯化细菌 28°C 培养 $18 \sim 24$ h,进行革兰氏染色和细菌形态观察;生理生化特性测定采用细菌生化微量鉴定管和 ATB Expression 半自动细菌鉴定仪 (法国生物—梅里埃 bio merieux 公司) 进行。

1.4.2 16S rRNA 基因扩增与序列分析

将菌株 EP4 在 0.5% 胰蛋白胨液体培养基中培养 24 h,离心 ($5\,000$ r/min, 20 min) 收集菌体,按 Bacterial DNA Extraction Kit 说明书提取细菌总 DNA。以细菌 16S rRNA 基因通用引物 F1: $5'$ -AGAGTTTIGATCCTGGTCAGAACGAACGCT- $3'$, R1: $5'$ -TACGGCTACCTGTGTTACGACTTCACCCC- $3'$ 为引物,进行 PCR 扩增; 94°C 预变性 3 min 随后 94°C 30 s 50°C 1 min 72°C 90 s 30 个循环; 72°C 延伸 10 min, 反应体系 ($50 \mu\text{L}$) 如表 1。

PCR 产物经纯化后,利用 ABI PRISM TM 377 全自动 DNA 测序仪进行测序,并与 GenBank 中序列进行 BLAST 比对,从中选取部分相关 16S rRNA 序列,用 Vector NTI suite 9.0 软件分析序列同源性和构建系统进化树。

1.5 药物敏感性试验

药敏实验参照文献 [4] 进行,所用药物纸片购自北京天坛生物公司。

表 1 PCR 反应体系

Tab. 1 System of PCR reaction

反应物	用量
$10 \times$ PCR 缓冲液 (Mg^{2+})	$5 \mu\text{L}$
10 mmol/L dNTP (each dNTP)	$1 \mu\text{L}$
引物 F1 (20 mmol/L)	$1 \mu\text{L}$
引物 R1 (20 mmol/L)	$1 \mu\text{L}$
Taq 酶	$0.5 \mu\text{L}$
模板	$1 \mu\text{L}$
ddH ₂ O	$40.5 \mu\text{L}$
总计	$50 \mu\text{L}$

2 结果

2.1 细菌感染试验

经细菌感染后,注射组和浸泡组实验鳗 48 h 内均出现死亡,且腹部膨大。解剖发现,肠道充气并伴有腹水,与自然发病鳗症状相似(图 1),注射组和浸泡组发病死亡率分别为 70% 和 60%。从显症病鳗中再次分离致病菌,进行回归感染,仍得到上述结果。

2.2 组织除菌液感染试验

组织除菌液注射健康鳗后,连续观察 10 d 均未出现发病症状,试验鱼全部健活。

2.3 菌落和细菌形态特性

EP4 菌株营养要求较低,在普通营养琼脂培养基上生长良好,可长成较大灰白色粘液菌落,以接种环挑之,易拉成丝;革兰氏染色呈阴性,电子显微镜下观察为较粗短的杆菌,单独、成双或短链状,无芽胞和鞭毛,有荚膜和菌毛(图 2)。

2.4 细菌分类鉴定

2.4.1 生理生化特性

EP4 菌株生理生化鉴定结果见表 2。赖氨酸脱羧酶、脲酶、 α -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶呈阳性;鸟氨酸脱羧酶、精氨酸双水解酶、N-乙酰- β -葡萄糖苷酶等呈阴性。

2.4.2 16S rRNA 基因序列分析结果

以提取总 DNA 为模板,以细菌 16S rRNA 基因通用引物 F1、R1 为引物,PCR 扩增得到约 1 500 bp 的条带(图 3),与预期目标大小一致。

EP4 菌株 16S rRNA 基因测序发现其长度 1502 bp。将所测序列(登录号为 Bankit153681)与 GenBank 中序列进行 BLAST 分析,结果表明菌株(EP4) 16S rRNA 基因序列与肺炎克雷伯菌 *Klebsiella pneumoniae*[DQ444287] 同源性最高,达 98.9%。将所测序列与 GenBank 中已登录 16S rRNA 基因序列进行匹配排列,构建系统进化树(图 4)。结果发现,菌株 EP4 与肺炎克雷伯菌 *K. pneumoniae*[DQ444287], *K. pneumoniae*[EF197996] 聚为一支,综合分析结果将其鉴定为肺炎克雷伯菌。

2.5 药敏试验

药敏实验结果显示,EP4 菌株对菌必治(头孢三嗪)、先锋 V、头孢克洛、氧氟沙星、氟罗沙星、依诺沙星、萘啶酸等高度敏感,对头孢噻吩、诺氟沙星、链霉素、庆大霉素中度敏感,而对苯唑青霉素、氨苄青霉素、青霉素 G、阿莫西林等不敏感(表 3)。



图 1 细菌回归感染后鳗症状

Fig 1 Symptom of eel after re-infection with bacteria

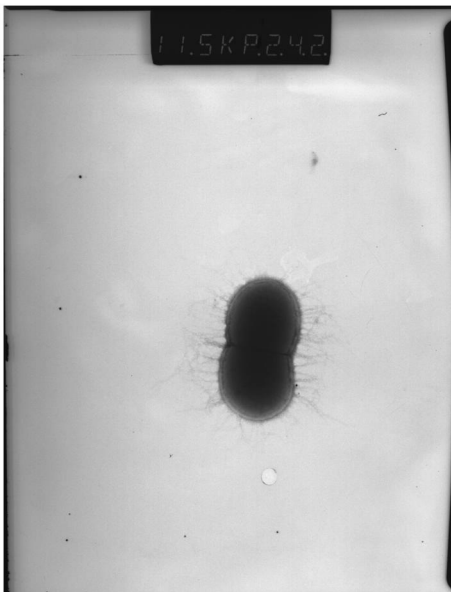


图 2 EP4 电镜图片 ($\times 11\ 500$)

Fig 2 Electron microscopic picture of EP4 ($\times 11\ 500$)

表 2 EP4菌株的生理生化特性测定

Tab. 2 Physiological and biochemical characteristics of the strain EP4

鉴定项目	EP4	肺炎克雷伯菌	鉴定项目	EP4	肺炎克雷伯菌
鸟氨酸脱羧酶	—	—	丙二酸	+	+
精氨酸双水解酶	—	—	L天门冬素芳酰胺酶	—	—
赖氨酸脱羧酶	+	+	氧化酶	—	—
脲酶	+	+	甲基红	—	—
L阿拉伯糖醇	—	—	V-P	+	+
半乳糖酸盐	+	+	H ₂ O ₂ 酶	+	+
5 酮基 葡萄糖酸钠	—	—	苯丙 AA 脱氨酶	—	—
脂肪酶	—	—	明胶水解	+	+
酚红	—	—	KCN	+	+
β 葡萄糖甙酶	+	+	葡萄糖发酵 (OF)	+	+
甘露醇	+	+	D 甘露糖	+	+
麦芽糖	+	+	棉子糖	+	+
吲哚产生	—	—	七叶苷水解	+	+
N 乙酰 -β 葡萄糖甙酶	—	—	西蒙氏柠檬酸盐	+	+
β 半乳糖甙酶	+	+	蛋白胨水	—	—
葡萄糖产气	+	+	DNA 酶	—	—
蔗糖	+	+	硝酸盐还原	+	+
L阿拉伯糖	+	+	PLE	—	—
D阿拉伯糖醇	+	+	β 葡萄糖酸酶	—	—
α 葡萄糖	—	—	纤维二糖	—	—
α 半乳糖甙酶	+	+	山梨醇	—	+
海藻糖	—	+	α 麦芽糖甙酶	+	—
鼠李糖	+	+	侧金盏花醇	+	+
肌醇	+	+			

3 讨论

根据《伯杰氏细菌鉴定手册》^[5]及陆承平《兽医微生物学》^[6],肺炎克雷伯菌通常以鸟氨酸脱羧酶、精氨酸双水解酶、吲哚阴性,赖氨酸脱羧酶、脲酶、葡萄糖产气、蔗糖、L阿拉伯糖阳性为指标。本实验所分离菌株均符合上述生化特性。

细菌 16S rRNA 序列具有高度保守性,被细菌学家及分类学家公认为细菌分类依据^[7-8]。根据这一特性,沈智华等^[9]从患病红拟石首鱼 (*Sciaenops ocellatus*)肾脏和肝脏中分离致病菌,并鉴定为海豚链球菌 (*Streptococcus iniae*);同样,甘西等^[10]也对罗非鱼海豚链球菌进行了 16S rRNA 基因克隆及序列分析。本实验菌株 (EP4) 16S rRNA 基因序列长 1 502 bp 与 *K. pneumoniae* [DQ444287] 16S rRNA 基因高度同源,同源性达 98.9%。系统进化树结果也显示,菌株 EP4 与 *K. pneumoniae* [DQ444287]、*K. pneumoniae* [EF197996] 及 *K. pneumoniae* [EU231611] 聚为一支。综合上述生理生化指标,将本实验分离到的鳗致病菌 EP4 鉴定为肠杆菌科,克雷伯菌属的肺炎克雷伯菌。

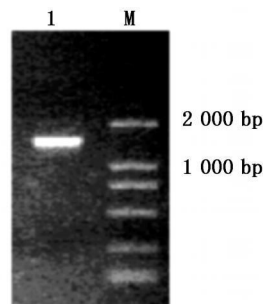


图 3 EP4 16S rRNA 基因的 PCR 扩增产物
Fig 3 Amplified product of 16S rRNA
M; 2 000 bp Marker; 1; EP4

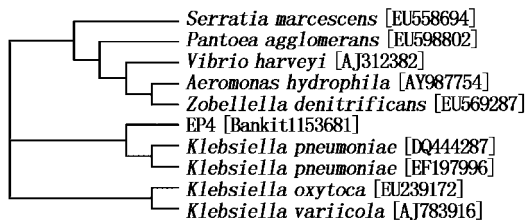


图 4 以 16S rRNA 基因序列构建的进化树
Fig 4 Phylogenetic tree based on sequences of 16S rRNA genes
[]内代表在 Genbank 中序列登录号

表 3 EP4株菌的药敏试验结果
Tab. 3 Sensitivity of the EP4 strains to antibacterial agents

抗菌药物	含药量 ($\mu\text{g}/\text{片}$)	抑菌圈 (mm)	抗菌药物	含药量 ($\mu\text{g}/\text{片}$)	抑菌圈 (mm)
苯唑青霉素	1	0	丁胺卡那霉素	15	15
头孢噻吩	30	19	罗美沙星	10	28
氨苄青霉素	10	0	诺氟沙星	10	13
青霉素 G	10	0	恩诺沙星	5	11
哌拉西林	100	0	氧氟沙星	5	30
阿莫西林	10	0	依诺沙星	10	28
先锋 V	30	30	氟罗沙星	10	30
先锋必	75	12	萘啶酸	30	30
链霉素	10	15	麦迪霉素	15	0
新霉素	10	27	乙酰螺旋霉素	30	0
庆大霉素	10	15	阿米卡星	30	22
妥布霉素	10	23	菌必治	30	28
壮观霉素	100	25	红霉素	15	10
四环素	30	14	杆菌肽	0.04	0
头孢克洛	30	28	头孢氨苄	30	20

肺炎克雷伯菌广泛存在于人和动物肠道、呼吸道以及水、土壤和谷物中,是陆生动物呼吸道和肠内寄生性致病菌,常引起肺炎、泌尿系统疾病、创伤感染败血症等^[11],而引起水生动物染病的报导很少。Singh等^[12]于1992年在鱼、虾、蟹等水产类食品中检测到肺炎克雷伯菌,但未对其致病性展开研究。随后,一些学者先后在患病石龟、中华鳖(*Trionyx sinensis*)、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)中分离到该菌^[13-15];而在鳊体内分离到肺炎克雷伯菌,并发现它具有较高的致病性尚属首次。

目前,肺炎克雷伯菌引起池塘鳊发病仅是个例,但水质分析显示,氨氮、亚硝酸盐和 pH 值等环境因子均未超标,该菌如何导致鳊发病、是否喂食受污染的饲料及其致病机理等均待进一步研究。同时,揭示肺炎克雷伯菌如何从感染陆生动物到感染水生动物的过程也是一个不容忽视的问题。另外,鳊肺炎克雷伯菌对多种抗菌素不敏感,而对菌必治(头孢三嗪)、头孢克洛、氧氟沙星、依诺沙星、氟罗沙星、萘啶酸等沙星类高度敏感。鳊是我国出口创汇的重要种类之一,主要出口欧盟、日本,但这些国家对药物使用有严格规定,上述敏感药物均属禁用范围。因此,选用药物控制时尚需慎重考虑,最好通过改善水质,降低放养密度,加强饲料营养成份,提高鱼体免疫力,达到预防效果。

感谢汕头大学海洋生物研究所李刚博士对本论文作出修改并提出宝贵意见!

参考文献:

- [1] 陈昌福,吴志新,高汉娇.日本鳊鲷爱德华氏菌病原菌的分离与鉴定[J].华中农业大学学报,1998,17(4):382-388.
- [2] 陈会波,林阳东,翁燕玲,等.鳊鲷赤鳍病原菌的分离鉴定和耐药性的研究[J].水生生物学报,1992,16(1):40-46.
- [3] 樊海平,徐娟儿,黄晓沅.福建省养殖鳊鲷细菌性疾病的调查与防治[J].海洋湖沼通报,1996,(2):67-70.
- [4] 马绪荣,苏德模.药品微生物学检验手册[M].北京:科学出版社,2001,215-216.
- [5] Holt J.G., Krieger N.R., Sneath P.H. et al. Bergey's manual of determinative bacteriology[M]. Ninth edition. Baltimore: William and Wilkins 1994:187-217.
- [6] 陆承平.兽医微生物学[M].(第四版).北京:中国农业出版社,2007:117-118.
- [7] 周煜.16S rRNA序列分析法在医学微生物鉴定中的应用[J].生物技术通讯,1999,10(4):297.
- [8] 李聪智,谭德明,鲁猛厚,等.聚合酶链式反应检测细菌16S rRNA基因[J].湖南医科大学学报,1999,24(2):136-138.
- [9] 沈智华,钱冬,许文军,等.红拟石首鱼海豚链球菌分离、鉴定及致病性研究[J].水生生物学报,2005,29(6):678-683.
- [10] 甘西,陈明,余晓丽,等.罗非鱼海豚链球菌16S rRNA基因的序列测定和系统进化分析[J].水产学报,2007,31(5):618-623.
- [11] 黄印尧,万沅,陈信忠,等.鸡源肺炎克雷伯氏菌的致病性和生物学特性研究[J].福建畜牧兽医,1996,18(2):4-5.
- [12] Singh B.R., Kulshreshtha S.B. Preliminary examinations on the enterotoxigenicity of isolates of *Klebsiella pneumoniae* from seafoods [J]. Int J Food Microbiol 1992, 16(4): 349-352.
- [13] 陶锦华,李康然,韦平.石龟肺炎克雷伯氏菌感染的诊断与防治[J].广西畜牧兽医,2002,18(6):20.
- [14] 徐海圣,舒妙安.中华鳖肺炎克雷伯氏菌病的病原研究[J].浙江大学学报,2002,29(6):702-706.
- [15] 唐毅,张芬,孙翰昌,等.白鲢肺炎克雷伯氏菌的分离鉴定[J].西南大学学报,2007,29(6):73-76.