

文章编号: 1674-7054(2013)04-0332-03

蟒蛇肺炎克雷伯氏菌的分离与鉴定

郭桂英¹ 李祥² 黎丹² 廖承红² 杨诺² 曾纪峰²
郑继平^{2,3,4,5} 张立领² 余集楠⁶

(1. 海南大学 教务处, 海南 海口 570228; 2. 海南大学 农学院, 海南 海口 570228; 3. 海南省热带生物资源可持续利用重点实验室/省部共建国家重点实验培育基地, 海南 海口 570228; 4. 海南大学 热带生物资源教育部重点实验室, 海南 海口 570228; 5. 热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室, 海南 海口 570228; 6. 海南大学 材料与化工学院, 海南 海口 570228)

摘要: 亚洲岩蟒主要栖息在热带与亚热带森林, 具有较高的药物、营养和经济价值, 人工养殖中常因肺炎而死亡。为调查该病病因, 对海南省养殖场发病蟒蛇进行心脏穿刺采集血样、细菌培养、革兰氏染色镜检、16S rRNA 基因序列测定和 BLAST 分析等方法寻找病原, 结果表明, 分离菌株为肺炎克雷伯氏菌。

关键词: 蟒蛇; 肺炎; 肺炎克雷伯氏菌

中图分类号: R 378.991

文献标志码: A

亚洲岩蟒(*Python molurus*) 具有的药用、营养和经济价值刺激了蟒蛇人工养殖业的发展。由于海南具有蟒蛇生存所需要的热带雨林和亚热带潮湿森林等得天独厚的野生环境, 从而成为我国蟒蛇养殖规模最大和最成功的省份^[1]。不过, 作为较原始的爬行蛇类, 人们对蟒蛇的生活习性、驯化方法、病害特点与防治技术等内容尚处于摸索阶段, 每年仍有成批的蟒蛇因饲养不当、气候变化和病菌感染等原因而死亡, 呈现出冬春病害高发、高死亡率的典型季节性病害, 给人工养殖业造成了严重的经济损失。导致蟒蛇死亡的主要病害是感染性肺炎^[2-8], 因此, 加强对蟒蛇肺炎的病因学研究具有重要的现实意义。笔者对海南养殖的发病蟒蛇进行心脏穿刺采集血样, 通过细菌培养、革兰氏染色镜检、16S rRNA 基因序列测定和 BLAST 分析等方法寻找病原, 旨在为蟒蛇的病害防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 发病蟒蛇 2013 年春, 笔者对送检的发病蟒蛇进行了临床观察, 发现其主要症状表现为, 常张嘴、抬头, 并发出异常声音, 鼻腔冒泡, 口腔存有大量粘液, 显示出明显的呼吸困难症状, 同时因为发病, 皮肤颜色也明显变暗, 失去光泽, 行动和反应迟缓, 呈现典型的肺炎病症。

1.1.2 试剂与培养基 基因组提取试剂盒、T 载体、T4 DNA 连接酶、*Taq*-Plus 聚合酶、感受态细胞 DH5 α 等均购自上海生物公司; 高氏 II (用于分离放线菌)、牛肉膏蛋白胨 (用于分离细菌) 及 YPED (用于分离真菌) 培养基均依分子克隆常规配制。

1.2 方法

1.2.1 血样采集 采用心脏穿刺的方法收集病蛇血样。

收稿日期: 2013-11-28

基金项目: 海南省自然科学基金项目(313043); 海南大学校青年基金(qnjj1147, qnjj1229); 地方高校国家级大学生创新创业训练计划项目(201210589004)

作者简介: 郭桂英(1973-), 女, 山东聊城人, 海南大学实验师, 沈阳农业大学 2013 级博士研究生。

通信作者: 郑继平, E-mail: jiping.zheng@gmail.com

1.2.2 血样病原菌培养分析 首先采用加血清的高氏Ⅱ(用于分离放线菌)、牛肉膏蛋白胨(用于分离细菌)及 YPED(用于分离真菌)的固体与液体培养基对血样进行涂布平板和液体培养,然后将各培养基分别置于常规培养箱、 $\varphi=5\%$ 的 CO_2 培养箱和恒温振荡摇床,在 $33\text{ }^\circ\text{C}$ 下培养并观察。对生长出的菌落和变混浊的试管,再次涂布于上述3种培养基,以确定微生物所属类型和培养特征。

1.2.3 染色与镜检 对分离培养的微生物单菌落进行革兰氏染色和镜检。

1.2.4 16S rRNA 基因序列测定与分析 根据文献[9]的方法,采用大肠细菌 16S rRNA 基因通用引物: 27F: $5'\text{-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'}$ 和 1492R: $5'\text{-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3'}$,依反应条件: $94\text{ }^\circ\text{C}$ 4 min 预变性; $94\text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $45\text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^\circ\text{C}$ 2 min,反应30个循环;最后 $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸5 min,对分离菌株进行 PCR 扩增。PCR 产物经纯化后,通过 T4 DNA 连接酶作用,与 T 载体 $16\text{ }^\circ\text{C}$ 过夜连接,采用 CaCl_2 转化方法,将连接产物转入感受态大肠杆菌 DH5 α ,重组子经菌落 PCR 和质粒电泳分析确定后,送检上海生工进行序列测定。

2 结果与分析

2.1 分离菌的培养特征与细胞形态 发病蟒蛇的血样培养结果显示,无论是常规培养还是 $\varphi=5\%$ 的 CO_2 培养,连续培养48 h后,在牛肉膏蛋白胨和高氏Ⅱ号固体培养基上均开始出现少数的黄色光滑圆形菌落,对应的液体培养基也明显混浊,而用于培养真菌的 YEPD 固体或液体培养基中均未发现任何产物。将黄色菌落再次接种到 YEPD 也不生长,从而判断本次血样中的微生物应为细菌,而不是真菌,从形态上也不是放线菌,因为放线菌的菌落为紧密的绒状,或坚实、干燥而多皱。对该黄色菌落革兰氏染色后的镜检结果显示,该菌细胞为红色、短粗杆状,单独、成双或短链状排列,显示为革兰氏阴性(图1)。

2.2 分离菌株的分类地位 对上述分离菌随机挑取3个菌落进行 16S rRNA 基因扩增,经 T 载体连接后,转化入大肠杆菌 DH5 α ,经 PCR 鉴定后(图2),并送检上海生工进行序列测定,对测定结果经序列拼接后进行 BLAST 分析。结果表明,3个菌落序列完全一致,且与 GenBank 序列号为 NR_074913.1 的肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* MGH 78578 strain ATCC 700721)和序列号为 KC832934.1 的肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae* strain 12BJSW46)等菌株的对应基因序列完全相同,说明肺炎蟒蛇血液分离菌株为肺炎克雷伯氏菌。培养结果也表明,该菌无论在常规细菌还是通放线菌培养基中,以及在有氧或是在有 $\varphi=5\%$ CO_2 的条件下均表现为生长良好。

3 讨论

肺炎是指终末气道、肺泡和肺间质炎症,可因细菌、病毒、真菌以及原生动物感染,或者粉尘、辐射等物化因子引起,病因复杂。针对蟒蛇肺炎的病因学研究十分少见,可能与野生蟒蛇栖息在原始森林或沙漠腹地,人们难以或惧于接触,人工驯养时间较短等因素相关。目前发现的可能病原有假结核棒状杆菌

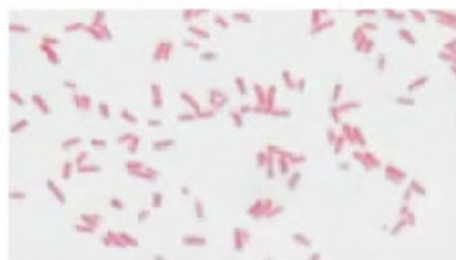


图1 分离菌革兰氏染色(1 000 ×)

Fig. 1 Gram staining of Bacteria isolated from the blood of a farmed Burmese python (*Python molurus bivittatus*) infected with pneumonia in Hainan (1 000 ×)

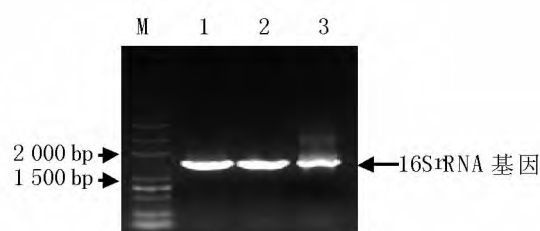


图2 分离菌 16S rRNA 基因扩增

M: DNA 分子标记 DL2000(5 000 3 000 2 000 1 500 800 500 200 100 bp); 1~3: 3个随机挑取的蟒蛇血样分离菌落

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of 16S rRNA gene PCR products

Lane M: DNA molecular weight marker DL2000 (5 000 3 000 2 000 1 500 800 500 200 100 bp); Lane 1~3: 3 randomly selected colonies isolated from the blood sample

(*Corynebacterium pseudotuberculosis*)^[2]、博德特氏菌(*Bordetella*)^[4]、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)^[4-5]、肠沙门氏菌(*Salmonella enterica* ssp. IV)^[6]、阴沟杆菌(*Enterobacter cloacae*)^[6]、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)^[6]、光照病毒(*Sunshine virus*)^[7]和 1 种与 *Mycoplasma agassizii* 近缘的未命名支原体^[8]等。

2013 年,笔者从发病肺炎蟒蛇中分离到 1 株铜绿假单胞菌^[5]。在感染实验中,以该菌的 2×10^8 剂量接种,所试的 3 只 1.5~2 月龄幼蛇,在 4 d 内全部死亡,显示了铜绿假单胞菌的致病作用。在本次分离的病原中,笔者未发现铜绿假单胞菌,而是肺炎克雷伯氏菌,结果表明,引起蟒蛇肺炎的病原种类很多,仍有待深入探索。

肺炎克雷伯氏菌是 1882 年由 FRIEDLANDER 首次在大叶性肺炎人类患者痰液中发现的^[10],故又称为 Friedlander 杆菌,或肺炎杆菌,为肠道或呼吸道常居菌,在分类学上属于克雷伯氏菌属(*Klebsiella*),也是克雷伯氏菌属中致病性最强的条件性或机会性致病菌(conditional pathogenic bacteria or opportunistic pathogenic bacteria)。该菌除可引起肺炎外,还可在机体免疫力下降时,导致脑膜炎、呼吸道感染、泌尿系感染、腹膜炎、腹泻及败血症等疾病产生。

从 2 次对蟒蛇病原分离的结果显示,无论是铜绿假单胞菌或是肺炎克雷伯氏菌,两菌的共同特点都是在机体免疫力下降时才易感染的条件性致病菌,联系蟒蛇肺炎发病时间一惊蛰前后的冬春季节,不难推测免疫力下降才是诱发蟒蛇肺炎发病的重要原因。同时值得注意的是,致病性铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯氏菌均具有超强的多重耐药性^[11-12],皆是感染课题中最难对付的烫手山芋,盲目使用抗生素治疗效果并不一定有效,甚至可能会造成更严重的后果。因此,建议在此期间多加强对蟒蛇的营养供给和卫生管理,做好此类病原的积极预防和严密控制,以期通过提高免疫力和增强安全措施降低感染。

在本研究中,为防止在筛选病原时出现纰漏,笔者尝试采用了 3 种分别适用于细菌、真菌和放线菌的不同培养基,并在增加血清的条件下培养。结果显示,仅有放线菌和细菌培养基生长出细菌菌落,从而排除了真菌感染的可能。不过,由于未对病蟒进行相应的解剖和组织镜检,所以难以排除存在病毒或支原体共感染的可能。

参考文献:

- [1] 武文,陈志维,卢小凤,等. 蟒蛇的药用价值[J]. 蛇志, 2010, 22(2): 145-147.
- [2] MARTÍNEZ J, SEGURA P, GARCÍA D, et al. Septicaemia secondary to infection by *Corynebacterium macginleyi* in an Indian python (*Python molurus*) [J]. The Veterinary Journal, 2006, 172(2): 382-385.
- [3] STIEF B, HÄFNER M. Pneumonie durch *Bordetella spec*-ein seltener Erreger bei einem Tigerpython [J]. Der Zoologische Garten, 2010, 79(2): 121-131.
- [4] 冯华娟,尤宗耀,陈月妃,等. 中西医结合治疗网纹蟒蛇铜绿假单胞菌病[J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(3): 58-59.
- [5] 曾纪锋,林杰材,李笑春,等. 蟒蛇铜绿假单胞菌的分离鉴定及抗性分析[J]. 热带生物学报, 2013, 4(2): 173-176.
- [6] SCHROFF S, SCHMIDT V, KIEFER I, et al. Ultrasonographic diagnosis of an endocarditis valvularis in a Burmese python (*Python molurus bivittatus*) with pneumonia. [J]. J Zoo Wildl Med 2010, 41(4): 721-724.
- [7] SHILTON H T H, DONELEY C M, NICHOLLS R J T, et al. Sunshine virus in Australian pythons [J]. Veterinary Microbiology, 2012, 161(1/2): 77-87.
- [8] PENNER J D, JACOBSON E R, BROWN D R, et al. A novel *Mycoplasma* sp. associated with proliferative tracheitis and pneumonia in a Burmese python (*Python molurus bivittatus*) [J]. Journal of Comparative Pathology, 1997, 117(3): 283-288.
- [9] 潘晓磊,丛茜,李晓陀,等. 海口地区产脂肪酶菌株的分离与 16srRNA 序列分析[J]. 热带生物学报, 2012, 3(1): 32-35.
- [10] FRIEDLANDER C. Über die scizomyceten bei der acuten fibrosen pneumonie [J]. Arch Pathol Anat Physiol Klin Med, 1882, 87: 319-324.
- [11] 李苏利,华川. 铜绿假单胞菌多重耐药及泛耐药研究进展[J]. 山西医药杂志, 2013, 42(16): 891-892.
- [12] 王林峰,王选锭. 肺炎克雷伯氏菌耐药机制研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2004, 29(6): 324-328.

(下转第 346 页)

Screening of Cellulase Producing Bacteria from Termites Living in Trees in Hainan

HUANG Yaohua¹, CAO Zhifang¹, WANG Xuemei¹, WANG Jinhua¹, ZHAO Jianguo¹, YANG Yuhui^{1,2}

(1. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228; 2. Hainan Key Lab of Tropical Animal Reproduction & Breeding and Epidemic Disease Control, Haikou 570228, China)

Abstract: Termites *Indotermes isodontatus*'s varietas living in *Pterocarpus indicus* Willd were collected in Hainan to isolate cellulase producing bacteria from the intestinal tract of the termites. A bacterial strain producing cellulase was screened by selective culture with CMC-Na as the only source of carbon. This bacterial strain was preliminarily identified to be under *Bacillus*. The cellulase produced from the bacteria strain showed an activity of $(7.813 \pm 0.340) \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ when the strain was cultured for 48h.

Key words: termite; cellulase producing bacterial strain; Screening; Hainan

(上接第 334 页)

Isolation and Identification of *Klebsiella pneumonia* from the blood of a farmed *Python molurus bivittatus* infected with pneumonia

GUO Guiying¹, LI Xiang², LI Dan², LIAO Chenghong², YANG Nuo², ZENG Jifeng²,
ZHENG Jiping^{2,3,4,5}, ZHANG Liling², YU Jinan⁶

(1. Academic Affairs Office, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China; 3. Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources: State Key Laboratory Breeding Base, Haikou 570228, China; 4. Ministry of Education Key Laboratory of Tropical Biological Resources, Hainan University, Haikou 570228, China; 5. Ministry of Education Key Laboratory for Conservation, Development and Utilization of Tropical Crop Germplasm Resources, Hainan University, Haikou 570228, China; 6. College of Materials and Chemical Engineering, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: *Python molurus*, as a large nonvenomous python species found in many tropical and subtropical forests, has been farmed for its high value in fine skin, nutrition and medicine in recent years. But pneumonia, the most serious and the most common disease of python, has caused death of python at a high rate. Blood sample was collected from a farmed Burmese python (*Python molurus bivittatus*) with pneumonia to determine the pathogens of pneumonia. The specimens were incubated at 33 °C for 48 h to produce colony growth under the aerobic condition or with 5% CO₂ in bacterial, actinomycetal and fungal mediums, separately. The isolated colonies were then characterized by gram staining and resorted to 16S rRNA gene sequencing and GenBank BLAST. The result showed that the isolates from the python was identified to be *Klebsiella pneumonia*.

Key words: *Python molurus*; pneumonia; *Klebsiella pneumonia*