

红嘴鸥产酸克雷伯菌 的生物学特性

赵思越 段 纲 项 勋 代飞燕 常 华*

云南农业大学动物科学技术学院,昆明 650302

摘要 采集红嘴鸥的粪便并进行细菌分离培养,首次分离到产酸克雷伯菌。红嘴鸥产酸克雷伯菌在普通琼脂、麦康凯、伊红美蓝(EMB)、营养肉汤及 SS 琼脂培养基上均可生长,多数为单个存在或两两相连,少数依傍聚堆成锯齿状排列。本菌为无鞭毛、无芽孢的革兰氏阴性杆菌,能利用葡萄糖(产酸产气)、可发酵乳糖、甘露醇、麦芽糖及蔗糖;靛基质试验为阳性,MR 阴性,VP 试验阳性,不产生 H₂S,可利用尿素及西蒙氏柠檬酸盐,但半固体琼脂(动力)试验为阴性;本菌对氧氟沙星最为敏感;小白鼠对本菌易感,且腹腔接种易感性高。

关键词 红嘴鸥;产酸克雷伯菌;生物学特性

克雷伯菌属细菌归属于肠杆菌科,分 5 个种:产酸克雷伯菌(*K. oxytoca*)、肺炎克雷伯菌(*K. pneumoniae*)、植生克雷伯菌(*K. planticola*)、土生克雷伯菌(*K. terrigena*)和变形克雷伯菌(*K. preteus*)^[1]。前两者可导致人畜患病,后三者一般不导致人畜患病。国内外已从兔、乌鸡、鸡、孔雀等动物体内分离到克雷伯菌^[2-5],目前国内外对肺炎克雷伯菌的研究比较多,而有关产酸克雷伯菌的报道甚少。产酸克雷伯菌是重要的条件致病菌,在自然界曾从植物及水生环境中检出,也存在于人和动物肠道,可导致人畜患病^[6]。到目前为止,未见季节性迁徙候鸟红嘴鸥感染产酸克雷伯菌的报道。

红嘴鸥(*Larus ridibundus Linnaeus*)是分布于欧亚大陆和北美洲东部沿海的一种候鸟,在欧亚大陆繁殖,到非洲北部、印度、菲律宾和日本一带越冬。在中国其繁殖地在新疆、内蒙、黑龙江、吉林等地,而越冬地却很广阔,北起东北地区的南部,西抵西藏南部,东至台湾,沿海各省常见^[7-8]。昆明位于中国西南云贵高原中部,属北纬低纬度亚热带高原山地季风气候,受印度洋西南暖湿气流影响,年温差

较小,年平均气温 14.6 ℃。昆明滇池地区和翠湖公园是红嘴鸥在云南的主要越冬地之一,从每年 10 月中旬至次年 4 月中旬滞留约半年^[9],已成为昆明人的老朋友,但是红嘴鸥在迁徙过程中是否会感染传染性疾病,这些病原菌是否会通过密切接触而导致人群的感染,是否会通过水源污染而导致产酸克雷伯菌的暴发流行还未被研究。为此,笔者对红嘴鸥的粪便进行细菌分离培养,首次检查到有产酸克雷伯菌的存在,并对此株产酸克雷伯菌的生物学特性作了研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1) 试验样品及试验动物。采集云南昆明滇池红嘴鸥粪便 50 份,健康的昆明系雌雄种小白鼠 20 只(购自昆明医科大学实验动物中心)。

2) 主要仪器。MCV-131BNF 无菌超净台、MLS-3020 高压灭菌器、MOV-212 电热恒温干燥箱(SANYO/日本)、恒温培养箱、电子分析天平(上海)。

3) 培养基。根据禽类肠道正常菌群的特点,选

收稿日期:2014-11-20

基金项目:云南省野生禽类重大动物疫病监测

* 通讯作者

赵思越,男,1989 年生,硕士生。

表 1 产酸克雷伯氏菌在不同条件下的培养特性

培养基	培养温度 /℃	培养时间 /h	培养特性
普通琼脂平板	37	32	菌落大小适中、灰白色隆起、圆形菌落
	29	32	菌落较小、粉红色、表面光滑、圆形菌落
伊红美蓝琼脂平板(EMB)	37	32	中部蓝紫、外部粉红的黏稠样菌落
	37	48	粉红色、黏稠、鼻涕样、粗大的菌落
	45	32	生长不良
	29	32	粉红色黏稠菌落、表面湿润、菌落较小
麦康凯琼脂平板	37	32	粉红色黏稠菌落、表面湿润、菌落较小
	45	32	生长缓慢、粉红色黏稠菌落、表面湿润、菌落较小
	29	32	菌落较小、灰白色隆起、圆形菌落
营养肉汤琼脂平板	37	32	菌落大小适中、灰白色隆起、圆形菌落
	45	32	菌落大小适中、灰白色隆起、圆形菌落
SS 琼脂平板	37	32	粉红色菌落、隆起、表面湿润、培养基变为红色
	37	48	菌落及培养基变为黄色

用肉汤培养基、血清普通琼脂培养基、LB 琼脂培养基、伊红美蓝(EMB)琼脂培养基、麦康凯培养基等选择培养基(购自上海生工生物试剂有限公司)。

1.2 方法

1) 细菌形态学和培养特性观察。将采集的红嘴鸥粪便分别接种于普通肉汤培养基,置于 37℃ 下培养 36~48 h,观察其生长情况;挑取肉汤培养基中的菌液分别接种于普通琼脂、麦康凯及伊红美蓝(EMB)琼脂培养基上,每种培养基均匀分成 3 组,分别置于 29℃、37℃、45℃ 下培养 36~48 h,观察其生长情况;挑取菌落涂片染色镜检,观察其形态并测定其大小。

2) 生化试验。将分离出的菌种,接种于肉汤培养基扩增,并分别接种于各种生化试验培养基中,置于 37℃ 培养 48~96 h,测定其生化反应。

3) 药敏试验。将该菌种均匀接种于普通琼脂平板上,以各种药敏试纸(头孢拉定、庆大霉素、阿米卡星、呋喃妥因、氨苄西林、新霉素、妥布霉素、诺氟沙星、氧氟沙星、阿莫西林、头孢噻肟)进行药物敏感性试验研究。

4) 动物接种试验。将分离出的菌种,接种于肉汤培养基扩增,取菌液分别经皮下、肌肉、尾静脉、腹腔、滴鼻等途径接种小鼠进行动物试验,观察其致病性。

2 结果与分析

2.1 培养特性

本菌在普通琼脂、麦康凯、伊红美蓝(EMB)、营养肉汤及 SS 琼脂培养基上均可生长,在不同培养

条件下的培养特性见表 1。

2.2 细菌形态及大小

37℃ 培养 40 h 观察,本菌为革兰氏阴性菌,两端钝圆,两侧平直,且长短不一,有的较长。大小为(0.93~1.25) μm × (0.31~0.75) μm。无鞭毛,无芽孢。多数为单个存在或两两相连,少数依傍聚堆成锯齿状排列。

2.3 生化特性

本菌生化特性见表 2,本菌能利用葡萄糖(产酸产气)、可发酵乳糖、甘露醇、麦芽糖及蔗糖;靛基质试验为阳性,M.R 阴性,V.P 试验阳性,不产生 H₂S,可利用尿素及西蒙氏柠檬酸盐,但半固体琼脂(动力)试验为阴性。

表 2 产酸克雷伯氏菌生化鉴定结果

生化鉴定指标	生化鉴定结果
葡萄糖(产酸产气)	+
发酵乳糖	+
发酵麦芽糖	+
发酵甘露醇	+
发酵蔗糖	+
靛基质	+
葡萄糖磷酸盐胨水(MR)	-
葡萄糖磷酸盐胨水(VP)	+
西蒙氏柠檬酸盐	+
硫化氢	-
尿素	+
半固体琼脂(动力)	-

注:“+”代表反应结果为阳性,“-”代表反应结果为阴性。

2.4 药物敏感性

本菌除了对阿莫西林耐药外,对其他抗生素药物皆比较敏感,其中对氧氟沙星最为敏感(表 3)。

表 3 产酸克雷伯氏菌药敏实验结果

抗生素	纸片含量/(μg /片)	敏感度
头孢拉定	30	S
庆大霉素	30	M
阿米卡星	30	M
呋喃妥因	300	S
氨苄西林	10	M
新霉素	10	M
妥布霉素	10	M
诺氟沙星	10	S
氧氟沙星	5	S
阿莫西林	20	R
头孢噻肟	10	S

注：“S”为敏感；“M”为中度敏感；“R”为耐药。

2.5 致病性

通过腹腔、尾静脉、滴鼻、皮下及肌肉分别接种 21 日龄小鼠,接种量约 200 μL 原菌液。腹腔接种的小鼠初期症状为精神萎靡、毛发凌乱、活动量小、食欲不佳、扎堆等情况,最短死亡时间为 18 h,其余小鼠于 48 h 前全部死亡;尾静脉注射和滴鼻途径的小鼠未见死亡;皮下和肌肉注射仅引起部分小鼠感染死亡,灌胃小鼠于 16 h 内引起 3 只小鼠死亡,死亡时均伴有腹泻症状。结果表明,小鼠对本菌易感,且腹腔接种易感性高。

3 讨论

细菌分离培养结果表明本菌在普通琼脂平板上形成灰白色隆起的圆形菌落,麦康凯琼脂平板上形成表面湿润、粉红色的黏稠菌落,营养肉汤琼脂平板上形成灰白色隆起的圆形菌落,SS 琼脂平板上形成粉红色菌落,培养基变为红色,伊红美蓝琼脂平板上形成表面湿润的粉红色黏稠菌落,且菌落较小。生化试验表明本菌能利用葡萄糖(产酸产气)、可发酵乳糖、甘露醇、麦芽糖及蔗糖,靛基质试验为阳性,M.R 阴性,V.P 试验阳性,不产生 H_2S ,可利用尿素及西蒙氏柠檬酸盐,但半固体琼脂(动力)试验为阴性,这些特性可与肠杆菌科的其他属成员进行鉴别。将上述细菌进行形态学观察、革兰氏染色和生化试验,与《伯杰氏系统细菌学手册》和《常见细菌系统鉴定手册》比对,判定该菌为产酸克雷伯氏菌。此外,动物致病性试验表明小鼠对本菌均有易感性,且以腹腔接种最为易感。这与 Bleich^[10]和 Foreman^[11]的报道是相符的,本菌易感染啮齿类动物。

红嘴鸥是野生迁徙候鸟,在迁徙过程中细菌感

染后都未能及时使用抗生素治疗,推测其粪便中分离的细菌应该不会产生耐药性,因此对本研究中分离得到的产酸克雷伯菌进行药敏试验,结果与预期相符,该菌对大多数抗生素药物皆比较敏感,其中对氧氟沙星最为敏感。如果红嘴鸥在迁徙过程中受到产酸克雷伯菌大范围感染,药敏试验研究将为其治疗提供重要的试验依据。

产酸克雷伯菌是重要的条件致病菌,主要寄生于人和动物的呼吸道或肠道。红嘴鸥每年冬天飞到昆明越冬,很多游人来此观赏,可如果红嘴鸥携带该菌,那粪便是否会通过水源污染,或是否会通过密切接触而导致人群的感染,这为进一步监测红嘴鸥产酸克雷伯菌提出预警。但红嘴鸥是重要的保护动物,进行试验动物模型时不可以选择红嘴鸥,而小鼠极易感染该菌,这为进一步研究产酸克雷伯菌的致病性奠定基础。

参 考 文 献

- [1] 李刚山,范泉水,朱媛,等.云南边防部队产酸克雷伯菌生化特性与致病性研究[J].中国热带医学,2009,9(11): 21-50.
- [2] NEMET Z, SZENCI O, HORVATH A, et al. Outbreak of *Klebsiella oxytoca* enterocolitis on a rabbit farm in Hungary[J]. The Veterinary record, 2011(168):243-245.
- [3] 黄印尧,万三元,孔繁德,等.鸡克雷伯氏菌病研究[J].福建畜牧兽医,1996(4):3-5.
- [4] 刘华英.乌鸡产酸克雷伯氏菌病诊疗报告[J].中国畜禽传染病,1996(6):40-42.
- [5] 高旭.一起孔雀产酸克雷伯氏菌病的诊疗 [J]. 畜牧与兽医,2006,38(1):36-37.
- [6] 方文珍,陈志鸿,陈小麟,等.厦门滨海湿地冬季鸟类群落多样性研究[J].海洋科学,2007,3(1): 10-16.
- [7] 王紫江,赵雪冰,杨明.红嘴鸥在贝加尔湖的分布和繁殖[J].四川动物,2007,26(3): 552-554.
- [8] 李世宗,刘震.昆明翠湖越冬红嘴鸥数量变化及投食量调查分析 [J]. 野生动物,2012,33(3):146-148.
- [9] DARBY A, LERTPIRIYAPONG K, SARKAR U, et al. Cytotoxic and pathogenic properties of *Klebsiella oxytoca* isolated from laboratory animals [J]. PLoS One,2014,9(7): 540-542.
- [10] BLEICH A, KIRSCH P, SAHLY H, et al. *Klebsiella oxytoca*: opportunistic infections in laboratory rodents [J]. Lab Anim,2008(42):369-375.
- [11] FOREMAN O, KAVIRAYANI AM, GRIFFEY SM, et al. Opportunistic bacterial infections in breeding colonies of the NSG mouse strain[J]. Vet Pathol,2011(48):495-499.