

# 一株大口黑鲈源 ST-873 型肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)的分离鉴定及生物学特性研究\*

曹馨月<sup>1</sup> 黄嘉怡<sup>1</sup> 杜诗钰<sup>1</sup> 侯天牧<sup>1</sup> 项 维<sup>1</sup> 郜卫华<sup>1</sup> 张付贤<sup>1,2,3</sup>

(1. 长江大学动物科学学院 湖北荆州 434023; 2. 长江大学湿地生态与农业利用教育部工程研究中心 湖北荆州 434023;  
3. 长江大学涝渍灾害与湿地农业湖北省重点实验室 湖北荆州 434023)

**摘要** 从患腹水病大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)的头肾、脾脏、肝脏组织中分离到一株优势菌,生长出圆形、边缘整齐的灰白色黏液状菌落;染色镜检可见短粗、卵圆形、有荚膜的革兰氏阴性杆菌。结合形态、生理生化特征、16S rRNA 基因序列分析鉴定为肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*), MLST 分析进一步确定其为 ST-873 型,与 ST-65 型聚为一支;该菌株携带 *aere*、*alls*、*wca* 和 *ybt* 四种毒力基因,具有溶血活性;人工感染大口黑鲈,发现患病鱼呈现腹水等与自然发病类似的症状,且病鱼内脏的分离菌株与攻毒菌株相同;经统计,其 LD<sub>50</sub> 为 3.4×10<sup>7</sup> CFU/mL,具有中等生物被膜形成能力。耐药性分析结果显示,该菌株携带 *bla-shv*、*sul2*、*aadA* 和 *tetB* 四种耐药基因,对 β-内酰胺类、氨基糖苷类、喹诺酮类、黏菌素类药物敏感,对四环素类、磺胺类、林可酰胺类、利福霉素类耐药;中药三七、款冬花对分离菌株有明显抑制作用。研究探明了大口黑鲈腹水病的主要病原,可为鱼源肺炎克雷伯菌的诊断和防治提供科学依据和数据参考。

**关键词** 大口黑鲈(*Micropterus salmoides*); 肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*); ST-873 型; 分离鉴定; 药敏分析; 中药

中图分类号 S941.42 doi: 10.11693/hyhz20220900235

大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)又称加州鲈,隶属于鲈形目(Perciformes)、太阳鱼科(Ceetrachidae)、黑鲈属,是一种名贵的肉食性鱼类。因其具有肉质鲜嫩、营养丰富、药用价值高、经济效益好等特点被广泛养殖 (Bai *et al.*, 2008); 大口黑鲈自 1983 年引进我国广东佛山,目前已成为我国重要的淡水养殖品种,至 2019 年全国大口黑鲈养殖总产量高达 47.8 万 t (Alexander *et al.*, 2012; 袁媛等, 2020)。但随着我国大口黑鲈养殖范围的扩大和养殖密度的增加,细菌、病毒和寄生虫等病害问题日益凸显,造成了重大的经济损失。目前,已报道的大口黑鲈病原菌有爱德华氏菌(*Edwardsiella*) (Fogelson *et al.*, 2016)、诺卡菌(*Nocardia*) (Yasuike *et al.*, 2017)、沙门氏菌

(*Salmonella*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、哈维弧菌(*Vibrio harveyi*) (Qiao *et al.*, 2021)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) (Zhou *et al.*, 2021)等,但大口黑鲈鱼源肺炎克雷伯菌的分离、鉴定、分型及生物学特性研究尚未见报道。

肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)属于肠杆菌科(Enterobacteriaceae)肺炎克雷伯氏菌属(*Klebsiella*),广泛存在于人和动物肠道、呼吸道以及水、土壤、农产品和林产品中(Ronald, 2002; Rock *et al.*, 2014)。正常情况下,肺炎克雷伯菌不会引起动物发病,但是当机体抵抗力下降或菌群大量增殖时,就会引起动物发病甚至暴发流行性疾病(滕涛等, 2016)。研究表明,肺炎克雷伯菌主要感染哺乳动物和家禽

\* 广东省重点领域研发计划资助项目, 2021B0202050002 号; 湖北省现代农业技术体系项目, HBHZD-ZB-2020-005 号; 湿地生态与农业利用教育部工程研究中心开放基金项目, KFT202003 号。曹馨月, E-mail: caoxinyue2002@163.com

通信作者: 张付贤, 博士, 副教授, E-mail: zhangfuxian99@163.com

收稿日期: 2022-09-15, 收修改稿日期: 2022-11-21

(Tansey *et al.*, 2010; Ewers *et al.*, 2014), 表现为呼吸困难、腹腔积液、肠道臌气、肺脏实变、肾脏出血等症状; 肺炎克雷伯菌也可感染海鱼, 导致肝脏、肾脏和脾脏发生明显组织病理性损伤(潘苑霞等, 2022)。肺炎克雷伯氏菌作为一种重要的人-畜-鱼共患传染病病原体, 其流行性、致病性和耐药性研究对于疫病防控和公共卫生安全十分重要。本研究从患腹水病大口黑鲈的组织中分离到一株优势菌, 通过形态、生理生化和 16S rRNA 基因序列分析等方法进行鉴定, 对分离菌株的毒力型、生物被膜形成能力、致病性和耐药性进行系统分析, 并筛选对分离菌株敏感的抗生素和中药, 旨在为大口黑鲈腹水病的诊断、精准施治和高效防控提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本实验患病大口黑鲈采集自湖北省荆州市某鱼场, 体长约 10 cm。健康大口黑鲈购自荆州市某大口黑鲈养殖基地, 体重(22.6±1.8) g, 水缸内暂养 10 d, 检测确认无特定病原后用于人工感染实验。

革兰氏染色剂购自北京索莱宝生物科技有限公司; Taq 酶购自上海碧云天生物技术有限公司; 实验相关引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成; 药敏片购自杭州微生物试剂有限公司; 琼脂粉购自北京索莱宝科技有限公司; 磷酸盐缓冲液(Phosphate-buffered saline, PBS)、无水乙醇和 DL2000 DNA Marker 购自北京聚合美生物科技有限公司; 绵羊血

平板购自青岛高科技工业园海博技术有限公司; 脱纤维绵羊血购自上海源叶生物科技有限公司。细菌基因组提取试剂盒和病毒基因组提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。

43 种中草药分别为: 黄芩、苏子、独活、麻黄、款冬花、桑皮、川贝母、天竹黄、大黄(熟)、白术、荆芥、半夏、黄连、僵蚕(炒)、白附子(炙)、茯苓、羌活、桔梗、明雄黄、朱砂、枳壳、连翘、板蓝根、鱼腥草、全蝎、朱砂、野菊花、薄荷、五味子、金银花、胖大海、五倍子、秦皮、石榴皮、首乌藤、肉桂、丁香、蒲公英、板蓝根、生地榆、槟榔、大青叶、乌梅。以上中药均购自同仁堂大药房。10 g 中草药剪碎后置于 20 mL ddH<sub>2</sub>O 中浸泡 1 h 后, 大火煮沸转小火熬制 2 h, 三层纱布滤过药液, 剩余药渣再加入 20 mL ddH<sub>2</sub>O 浸泡 1 h, 重复第一次熬制过程, 合并两次滤过药液, 小火浓缩至 50 mL, 使药液终浓度为 1 g/mL (即 1 000 mg/mL), 121 °C 灭菌 20 min, 置于 4 °C 备用。

### 1.2 病原检测

采集具有典型腹水病的大口黑鲈, 检查记录外观症状; 体表消毒后无菌条件下解剖, 取肾、脾脏、肝脏等病变组织(约 200 mg)放入 RNase free 的 1.5 mL EP 管中进行研磨, 分别按照细菌与病毒基因组提取试剂盒说明书提取细菌基因组的 DNA 和病毒基因组 DNA/RNA, 使用反转录试剂盒对提取的病毒基因组 RNA 进行反转录; 合成大口黑鲈常见病害特异性引物(见表 1), 以提取的细菌基因组、病毒基因组 DNA 及反转录产物作为病原检测的模板, 反应体系

表 1 PCR 鉴定常见水产病原的引物序列

Tab.1 Primer sequences of common aquatic pathogens for PCR identification

病原	引物序列(5'~3')	序列长度/bp
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	F: CCTGTT CAGCCAGATAGTG R: GGTGATCGGAGAGGACTT	202
维氏气单胞菌 <i>Aeromonas veronii</i>	F: GAGGAAAGGTTGGTAGCTAATAA R: CGTGCTGGCAACAAAGGACAG	688
肺炎克雷伯菌 <i>K. pneumoniae</i>	F: ATGAAACGACCTGATTGCATTCGC R: TTACTTTTCCGCGGCTTACCGTC	489
迟缓爱德华氏菌 <i>Edwardsiella tarda</i>	F: CATCGTCACCATTCACAGT R: CCTTAATCCCACCCTCATAGC	494
柱状黄杆菌 <i>Flavobacterium columniformis</i>	F: ACRGGRGATAAAGCAGAASA R: GACTTTTGTGTTGAAACGG	415
鳗诺卡氏菌 <i>Nocardia seriolae</i>	F: CCTGCACATGGCCTCGTTCT R: AGCGACTGGGTGAGTTCTCTG	249
弹状病毒 Rhabdoviridae	F: AATTTTGGCCAACTCGATT R: ACGAGAAAAAAGAAAAKAATATACAG	400
虹彩病毒 Iridoviridae	F1: ACCTGGTGGCTCCAGTGC R1: GAGAGACCCCAACACGAC F2: ATAACGACCAGTTCAAAC R2: GGCGGCGACAATGCCGTG	1 828 1 220

(20  $\mu\text{L}$ ): 模板 1  $\mu\text{L}$ 、2 $\times$ Taq PCR Master Mix 酶 10  $\mu\text{L}$ 、上下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 1  $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu\text{L}$ ; 扩增条件: 预变性 94  $^{\circ}\text{C}$  5 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 45 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火 45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 34 个循环, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

### 1.3 病原菌的分离及生理生化鉴定

无菌条件下使用接种环蘸取 PCR 检测肺炎克雷伯菌阳性的大口黑鲈组织, 划线接种于 LB 琼脂培养基上, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 12~24 h, 观察菌落的形态特征。挑取纯化的菌落进行涂片和革兰氏染色(谭啸等, 2019), 在光学显微镜下观察菌体形态及染色特征。取分离菌株的纯培养物接种至 LB 液体培养基, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 16 h, 取 10  $\mu\text{L}$  菌液加入细菌微量生化管中, 按照细菌微量生化反应管的说明书进行操作, 参考《伯杰氏鉴定细菌学手册》(Buchanan *et al*, 1994)和《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠等, 2001)等文献进行结果判定。

### 1.4 病原菌 16S rRNA 序列的 PCR 扩增和系统进化树构建

参考文献(Greisen *et al*, 1994)合成通用引物: 27F: 5'-AGAGTTTGTATYMTGGCTCAG-3', 1492R: 5'-TACCCTTGTTACGACTT-3', 以细菌基因组提取试剂盒提取的 DNA 为模板, PCR 扩增分离菌的 16S rRNA。PCR 反应体系 25  $\mu\text{L}$ : 模板 1  $\mu\text{L}$ 、2 $\times$ Taq PCR Master Mix 酶 12.5  $\mu\text{L}$ 、上下游引物各 0.5  $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O 10.5  $\mu\text{L}$ ; PCR 的扩增条件为: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 7 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 40 s, 50  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 34 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$

延伸 10 min。PCR 产物的测序结果利用 NCBI BLAST 工具进行比对分析, 通过 ClustalX(1.81)软件对与该菌株同源性较高的同属其他菌株序列进行多重序列匹配排列, 使用 MEGA7 软件的邻接法(Neighbor-joining)构建其与相近种基因的系统进化树, 进行 1 000 次的 Bootstrap 检验置信度。

### 1.5 Multilocus sequence typing (MLST)分析

依据 MLST 数据库网站(<https://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/>)提供的肺炎克雷伯菌 7 个管家基因 *gapA*、*infB*、*mdh*、*pgi*、*phoE*、*ropB* 和 *tonB* 的引物进行 PCR 扩增, 扩增产物测序后上传数据库获取等位基因的编号, 从而确定分离菌株的 ST 型别。采用 PHYLOViZ 软件 BURST 算法对 MLST 数据库中肺炎克雷伯菌的 ST 型进行分组和聚类, 通过相应的克隆谱系来分析分离菌株的进化关系。

### 1.6 致病性分析

**1.6.1 毒力基因检测** 选取肺炎克雷伯菌的 12 个主要毒力基因: 铁载体(*Siderophores*)、荚膜多糖(*Capsular Polysaccharide*)、菌毛(*Pilus*)、脂多糖(*Lipopolysaccharides*)、黏附素(*Adhesin*)、耶尔森菌素(*Esinomycin*)和尿囊素(*Allantoin*), 合成特异性引物(Yu *et al*, 2006; Hsieh *et al*, 2008; Gunnarsson *et al*, 2009; Lin *et al*, 2010, 2014; 胡仁静等, 2018; 欧冠标等, 2021; 施瑜等, 2021)(表 2), 以提取的分离菌株的 DNA 作为模板, PCR 检测肺炎克雷伯菌分离菌株的毒力基因。

表 2 扩增肺炎克雷伯菌毒力基因的引物序列  
Tab.2 Primer sequences of KP virulence gene for amplification

毒力因子	毒力基因	引物序列(5'~3')	序列长度/bp
沙门菌素 <i>Salmochetin</i>	<i>iroNB-F</i>	GGCTACTGATACTTGACTATTC	992
	<i>iroNB-R</i>	CAGGATACAATAGCCCATAG	
气杆菌素 <i>Aerobactin</i>	<i>iucB-F</i>	ATGTCTAAGGCAAACATCGT	948
	<i>iucB-R</i>	TTACAGACCGACCTCCGTGA	
	<i>aero-F</i>	GCATAGGCGGATACGAACAT	556
	<i>aero-R</i>	CACAGGGCAATTGCTTACCT	
荚膜多糖 <i>Capsular Polysaccharide</i>	<i>rmpA-F</i>	ACTGGGCTACCTCTGCTTCA	535
	<i>rmpA-R</i>	CTTGATGAGCCATCTTTCA	
	<i>wcaG-F</i>	GGTTGGKTCAGCAATCGTA	169
	<i>wcaG-R</i>	ACTATCCGCCAACTTTTGC	
菌毛 <i>Pilus</i>	<i>fimH-F</i>	ATGAACGCCTGGTCCCTTGC	688
	<i>fimH-R</i>	GCTGAACGCCTATCCCCTGC	
脂多糖 <i>Lipopolysaccharides</i>	<i>uge-F</i>	GATCATCCGGTCTCCCTGTA	534
	<i>uge-R</i>	TCTTCACGCCTTCCTTCACT	
	<i>wabG-F</i>	CGGACTGGCAGATCCATATC	683
	<i>wabG-R</i>	ACCATCGGCCATTTGATAGA	

续表

毒力因子	毒力基因	引物序列(5'~3')	序列长度/bp
黏附素 <i>Adhesin</i>	<i>cf29a-F</i>	GACTCTGATTGCACTGGCTGTG	825
	<i>cf29a-R</i>	GTTATAAGTTACTGCCACGTTTC	
耶尔森菌素 <i>Esinomycin</i>	<i>ybt-F</i>	ATGACGGAGTCACCGCAAAC	960
	<i>ybt-R</i>	TTACATCACGCGTTTAAAGG	
	<i>kfuBC-F</i>	GAAGTGACGCTGTTTCTGGC	797
	<i>kfuBC-R</i>	TTTCGTGTGGCCAGTGACTC	
尿囊素代谢相关因子 <i>Allantoin metabolism related factors</i>	<i>allS-F</i>	GCATAGGCGGATACGAACAT	508
	<i>allS-R</i>	CACAGGGCAATTGCTTACCT	

**1.6.2 固体溶血素试验和液体溶血素测定** 无菌条件下取分离菌株的纯培养物均匀涂布在含 5%绵羊血的 LB 平板上, 平板密封后在 37 °C 下孵育 48 h, 观察溶血情况。分离菌株的绵羊红细胞溶血活性使用 Das 等(2019)描述的方法测定, 并进行了一些修改: 将红细胞和分离菌株的纯培养物分别用无菌 PBS 洗涤三次, 并以 PBS 进行稀释; 取等体积的细菌培养物和红细胞均匀混合在离心管中, 在 37 °C 下分别孵育 12、24、36、48、60 和 72 h, 1 500 g 离心 5 min 后, 使用紫外分光光度计测量上清液在 540 nm 处的吸光度。

**1.6.3 回归实验** 分离菌株经活化和鉴定后, 接种 LB 液体培养基中 37 °C、180 r/min 培养至对数生长期( $OD_{600\text{ nm}}$  为 0.6), 以 12 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 平板计数后以 PBS 将菌液分别调整至攻毒浓度。特定病原体检测为阴性的健康大口黑鲈幼鱼随机分成 4 组:  $1.5 \times 10^{10}$ 、 $1.5 \times 10^9$ 、 $1.5 \times 10^8$  CFU/mL 和 PBS 组, 每组 15 尾, 采取腹腔注射的方式对大口黑鲈注射菌液, 每尾 0.3 mL; 对照组腹腔注射同等体积的无菌 PBS。攻毒后连续观察 8 d, 并记录临床症状及死亡情况; 对死亡的大口黑鲈进行解剖, 无菌采集肠、肝、胃、脾、头肾等病变组织, 分别称重并统计脏器菌载量; 取病变组织制成石蜡切片, 在光学显微镜下观察组织病变情况。

## 1.7 药物敏感性分析

**1.7.1 生物被膜形成能力测定** 采用结晶紫染色的方法测定分离菌株生物被膜形成能力的强弱。取分离菌株纯培养物以 1:100 接种于 LB 液体培养基中, 37 °C 180 r/min 振荡培养至  $OD_{600\text{ nm}}$  约为 0.4。在无菌 96 孔板的每孔中加入 200  $\mu$ L 菌液, 37 °C 静置培养 48 h; 以 PBS 洗涤、风干后以 200  $\mu$ L 4%多聚甲醛固定 15 min; PBS 洗涤 3 次, 待风干后以 200  $\mu$ L 0.1%结晶紫染色液室温染色 10 min, 加入 200  $\mu$ L 无水乙醇

脱色, 酶标仪测定  $OD_{570\text{ nm}}$  的值。依据临界的  $OD_c$  值 ( $OD_c$  等于对照 Control 的平均值)判定结果:  $OD < OD_c$  为无成膜能力,  $OD_c < OD < 2OD_c$  为弱成膜能力,  $2OD_c < OD < 4OD_c$  为中等成膜能力,  $OD > 4OD_c$  为强成膜能力。

**1.7.2 耐药基因检测** 采用 PCR 方法筛查分离菌株的耐药基因, 20 个耐药基因分为 7 类: 耐四环素类药物的 *tetA*、*tetC* 和 *tetM* 基因, 耐氟喹诺酮类药物的 *gyrA* 和 *gyrB* 基因, 耐红霉素类药物的 *erm(F)* 和 *ere(D)* 基因, 耐氨基糖苷类药物的 *aadA1* 和 *aadB* 基因, 耐磺胺类药物的 *sul1* 和 *sul2* 基因, 耐  $\beta$ -内酰胺类药物的 *bla-IMP*、*bla-TEM*、*bla-SHV*、*bla-CTX*、*bla-OXA*、*bla-DHA*、 $\beta$ -*KPC* 和  $\beta$ -*HDM* 基因, 耐林可霉素类药物的 *lnuH* 基因(Dallenne *et al*, 2010; Poirel *et al*, 2011; 曹菲菲, 2020)。

**1.7.3 药敏试验** 试验以金黄色葡萄球菌 ATCC25923 作为质控菌株验证药敏试验的有效性。取分离菌株的纯培养物均匀涂布在 LB 琼脂培养基上, 采用 Kirby-Bauer (K-B) 纸片扩散法, 将抗生素药物纸片贴在培养基上, 并置于 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h, 每组做三个重复。根据杭州微生物试剂有限公司的药敏试验判断标准和美国临床实验室标准化委员会(CLSI)标准(Wang *et al*, 1998; 周清德等, 2000)判定分离菌株的耐药性。

**1.7.4 中药体外抑菌试验** 将直径 6 mm 空白药敏纸片浸泡在 1 g/mL 中药提取液中, 待浸透后风干备用(李静等, 2020)。吸取分离菌株的菌液均匀涂布平板, 待菌液稍吸收后取含药纸片贴在平板上。每个平板贴 1 张对照药物药敏纸片(氨苄西林或头孢噻肟), 纸片间圆心距要大于 3 cm, 每组设置 3 个平行; 37 °C 静置培养 24 h 后分别测量抑菌圈直径, 计算平均值和标准差。抑菌强度判断标准: 抑菌圈直径大于 20 mm 为极敏, 抑菌圈直径在 15~19 mm 为高敏, 抑

菌圈直径在 10~14 mm 为中敏, 抑菌圈直径<10 mm 为低敏, 无抑菌圈为耐药。二倍稀释法测定中药的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)和最低杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC) (陈秀枢等, 1994)。

## 2 结果

### 2.1 病原检测结果

患病大口黑鲈的肛门周围红肿, 腹部隆起; 剖检可见其肝脏与脾脏显著肿大, 伴有腹水流出, 颜色浑浊。特定病原的 PCR 鉴定结果如图 1 所示, PCR 扩增出 489 bp 大小的条带, 与肺炎克雷伯菌阳性对照扩增的条带一致; 其他病原检测均为阴性, 推测该大口黑鲈养殖基地病鱼的腹水病疑似由肺炎克雷伯菌感染引起。

### 2.2 病原菌的分离和形态观察

从患腹水病大口黑鲈组织中划线培养的菌株在 LB 固体培养基上长出灰白色圆形菌落, 在麦康凯培

培养基上长成红色菌落; 革兰氏染色结果表明, 分离菌为革兰氏阴性短杆菌, 卵圆形, 有荚膜, 单个或成双存在; 接种环挑取单菌落, 拉丝长度小于 5 mm, 表明分离菌株为超黏性阴性菌株(图 2)。分离菌株的染色及菌落镜检形态皆符合肺炎克雷伯标准株生长特性。

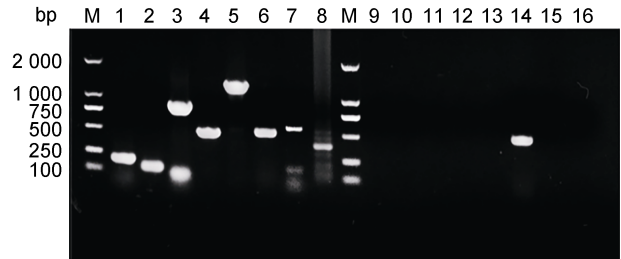


图 1 病鱼样品的特定病原检测

Fig.1 Detection of specific pathogens in diseased *M. salmoides* samples

注: M: Marker; 1~8: 诺卡氏菌、嗜水气单胞菌、维氏气单胞菌、柱状黄杆菌、虹彩病毒、肺炎克雷伯菌、迟缓爱德华氏菌、弹状病毒阳性对照; 9~16: 病鱼样品

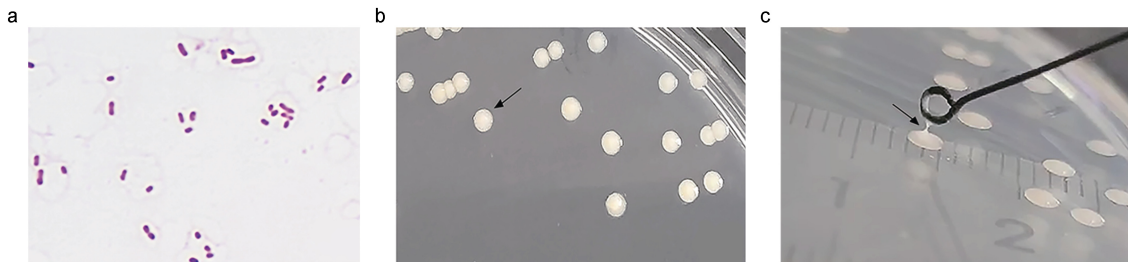


图 2 分离菌形态观察和革兰氏染色镜检

Fig.2 Morphological observation and Gram staining microscopy

注: a. 革兰氏染色后的显微镜观察(1000 $\times$ ); b. 分离菌在 LB 培养基上的菌落形态; c. 拉丝实验(<5 mm, 阴性)

### 2.3 生理生化鉴定结果

生理生化鉴定结果显示, 分离菌株能够利用葡萄糖、乳糖、山梨糖、阿拉伯糖、棉子糖、蔗糖、果糖、蕈糖、木糖、血清菊糖和甘露醇产酸产气, 具有赖氨酸脱羧酶、脲酶活性, 不具有鸟氨酸脱羧酶活性; 西蒙氏柠檬酸盐利用试验、甲基红试验和乙酰甲基甲醇试验呈阳性; 靛基质试验和硫化氢试验呈阴性。

### 2.4 16S rRNA 序列分析和系统进化树构建

使用 BLAST 在线分析工具对该菌株的 16S rRNA 基因序列测序结果进行同源序列比对分析, 结果如图 3 显示, 在系统发育树中分离菌株与肺炎克雷伯菌聚为一支, 与肺炎克雷伯菌 NCCP-139 株 (AB558499.1) 基因序列的同源性最高; 综合生理生化

特性和系统进化树分析结果, 确定分离菌株为肺炎克雷伯菌, 命名为 KP0123。

### 2.5 MLST 分析结果

对菌株 KP0123 管家基因(*gapA*、*infB*、*mdh*、*pgi*、*phoE*、*rpoB*、*tonB*)进行测序, 序列比对结果显示: KP0123 的 7 个等位基因的编号分别为 14、1、2、1、7、4、182, 属于 ST-873 型。数据库中北美洲的肺炎克雷伯菌分离株主要来源于海鸥和人, 来自非洲和欧洲分离株则主要来源于人(表 3)。使用 PHYLOViZ 软件对肺炎克雷伯菌的 370 个型进行分组聚类分析, 结果如图 4 显示, 大口黑鲈源 ST-873 型肺炎克雷伯菌与 ST-65 型聚为一支, 二者之间有较近的亲缘关系。

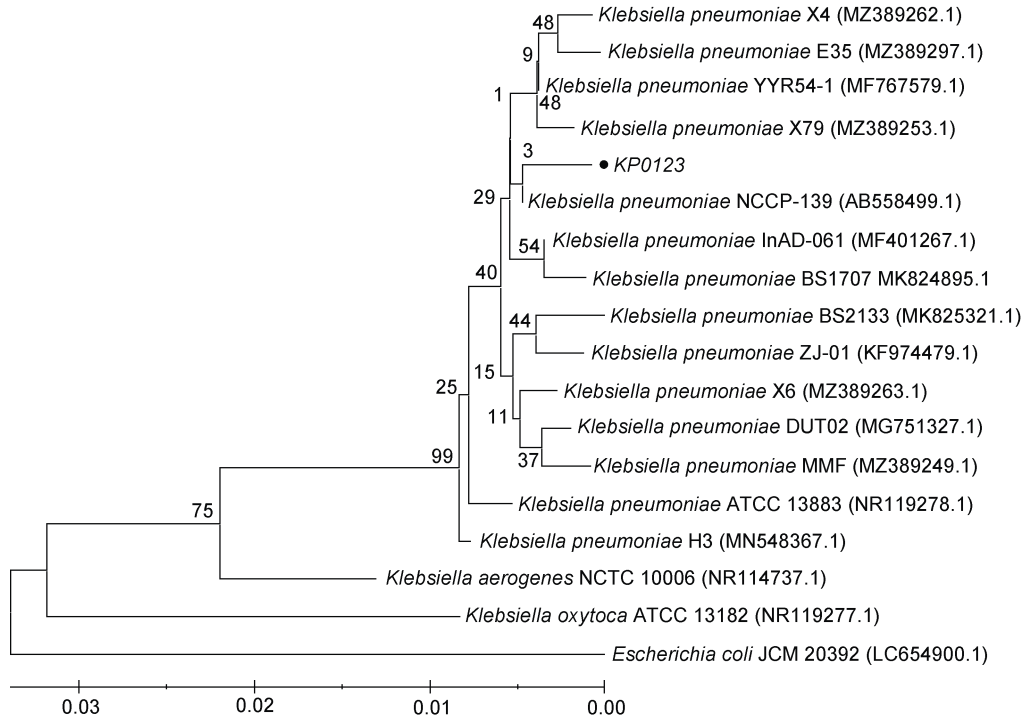


图 3 基于 16S rRNA 基因序列的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence

表 3 ST-873 型肺炎克雷伯菌部分信息

Tab.3 Partial information of ST-873 *K. pneumoniae* in the world

分离株	地区	宿主	样品详情	MLST							
				gapA	infB	Mdh	pgi	phoE	ropB	tonB	ST
Kp59	北美洲	海鸥	—	14	1	2	1	7	4	182	873
CAV1416	北美洲	人类	腹水	14	1	2	1	7	4	182	873
SB5389	非洲	人类	粪便	14	1	2	1	7	4	182	873
SB5393	非洲	人类	粪便	14	1	2	1	7	4	182	873
SB5000	非洲	人类	粪便	14	1	2	1	7	4	182	873
T7058	欧洲	人类	粪便	14	1	2	1	7	4	182	873

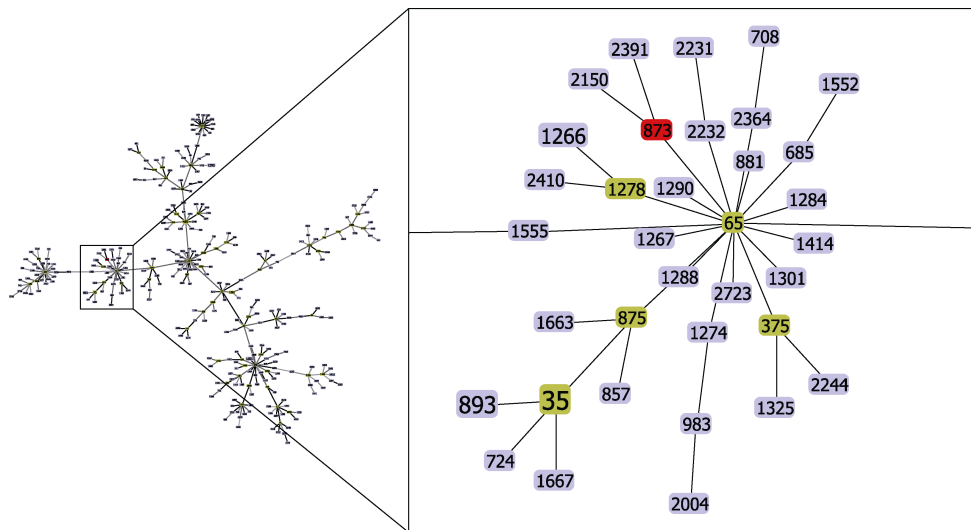


图 4 MLST 分析

Fig.4 MLST analysis

### 2.6 致病性实验结果

**2.6.1 固体溶血素试验和液体溶血素测定** 分离菌株 KP0123 在血平板上培养 48 h 后, 菌落周围出现透明无色区域, 显示红细胞完全裂解, 呈现典型的  $\beta$  溶血(图 5a)。液体溶血素测定结果显示, 分离株 KP0123 的红细胞溶血活性在感染早期迅速增加, 在

感染后 36 h 降低并随着感染时间的增加趋于稳定, 其最大溶血活性在 12~24 h (图 5b), 表明分离菌株 KP0123 具有溶血活性。

**2.6.2 毒力基因检测结果** 毒力基因 PCR 检测结果显示, 分离菌株 KP0123 携带 *aere*、*alls*、*wca*、*ybt* 四种毒力基因(图 6), 其毒力基因型为  $aero^+alls^+wca^+ybt^+$ 。

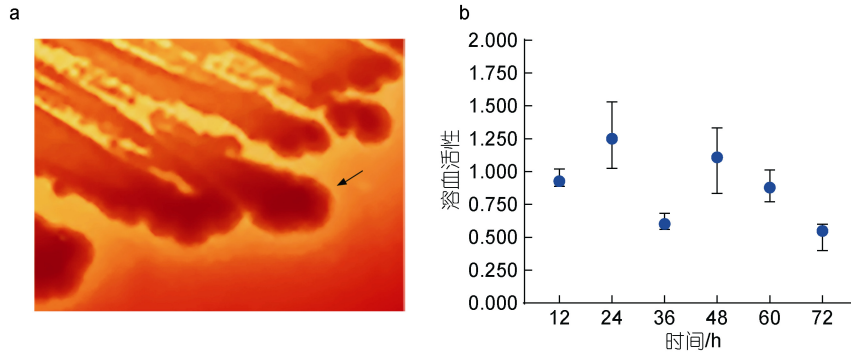


图 5 分离菌株的溶血活性(a)及其在细菌生长周期中的变化(b)

Fig.5 Hemolysis activity (a) of the isolated strain and the changes (b) during different phases of bacterial growth circle

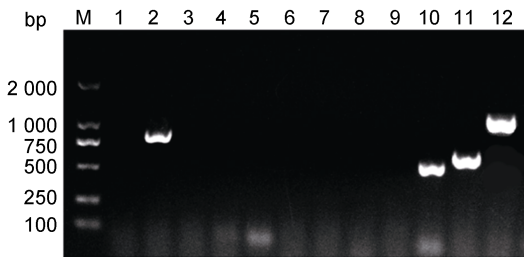


图 6 分离菌株的毒力基因检测

Fig.6 Results of virulence gene detection of the isolated strain  
注: M: Marker; 1~12: *iucB*、*aero*、*rmpA*、*fim*、*Kfu*、*uge*、*ironB*、*cf29a*、*wabG*、*wcaG*、*allS*、*ybt* 基因

**2.6.3 回归实验结果** 分离菌株 KP0123 人工感染健康大口黑鲈, 最高浓度组( $1.5 \times 10^{10}$  CFU/mL 组)的

大口黑鲈在腹腔注射后 4 h 开始出现反应迟钝、摄食减少的现象; 感染 24 h 后,  $1.5 \times 10^{10}$  CFU/mL 组大口黑鲈开始死亡, 并于 72 h 内全部死亡; 死亡的大口黑鲈体表无明显的溃疡(图 7a), 可见注射部位红肿(图 7d); 解剖发现病鱼腹水较多(图 7c), 肠道出血(图 7b), 与健康鱼相比, 脾脏明显肿大(图 7e, 7f); 感染组试验鱼出现与自然发病大口黑鲈类似的临床症状。

感染后 3 d,  $1.5 \times 10^9$  CFU/mL 组大口黑鲈死亡 1 尾, 并在之后 3 d 连续死亡;  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL 组的实验鱼在感染后 4 d 后出现连续死亡的情况; 对照组大口黑鲈未见异常, 死亡率为 0。从死亡大口黑鲈脾脏、胃、肠、肝脏、头肾等组织均可分离出圆形、光滑的



图 7 分离菌株感染大口黑鲈的临床症状

Fig.7 Clinical symptoms of *M. salmonae* infected by the isolated strain  
注: a. 感染组; b. 肠道肿胀出血; c. 腹腔含有腹水; d. 体表泛红; e. 脾脏出血泛红; f. 脾脏对照组

菌株, 经PCR和测序分析鉴定与攻毒菌株一致, 对照组中未发现该菌。病理组织学观察发现, 与健康对照组相比, 感染组大口黑鲈的肾小球细胞水肿, 肾单位结构不清晰; 脾脏的红髓白髓界限不明显, 组织出现颗粒变性和空泡; 肝细胞水肿、排列紊乱, 细胞核出现溶解现象(图 8)。结果表明, 分离株 KP0123 感染可造成大口黑鲈严重的脏器损伤。经统计和计算, 分离株 KP0123 对大口黑鲈的半数致死量为  $3.4 \times 10^7$  CFU/mL (图 9a); PCR 检测发现, 在病鱼的胃、肠、肝、

脾、头肾组织中均可检测到分离株 KP0123 (图 9b), 载菌量分别为  $4.4 \times 10^5$ 、 $1.0 \times 10^5$ 、 $4.2 \times 10^5$ 、 $9.6 \times 10^8$ 、 $1.64 \times 10^9$  CFU/mg, 其中头肾部位细菌载量最高(图 9c), 表明分离菌株具有一定的组织嗜性和致病性。

2.7 耐药性研究结果

2.7.1 生物被膜形成能力测定结果 分离菌株 KP0123 样品 OD<sub>570 nm</sub> 为 0.176, 阴性对照均值为 0.084 (图 10a), 由此可知分离菌株 KP0123 为中等被膜形成能力的菌株。

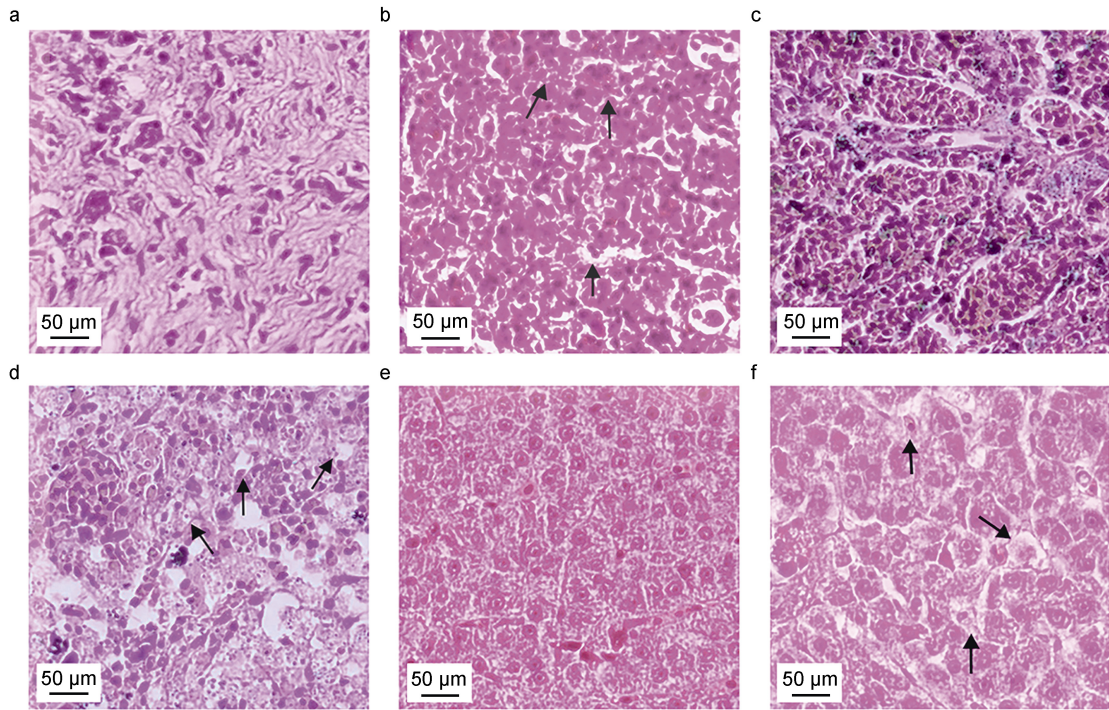


图 8 分离菌株感染大口黑鲈的组织损伤

Fig.8 Tissue damages of *M. salmoides* infected by the isolated strain

注: a. 对照组肾脏; b. 感染组肾脏; c. 对照组脾脏; d. 感染组脾脏; e. 对照组肝脏; f. 感染组肝脏

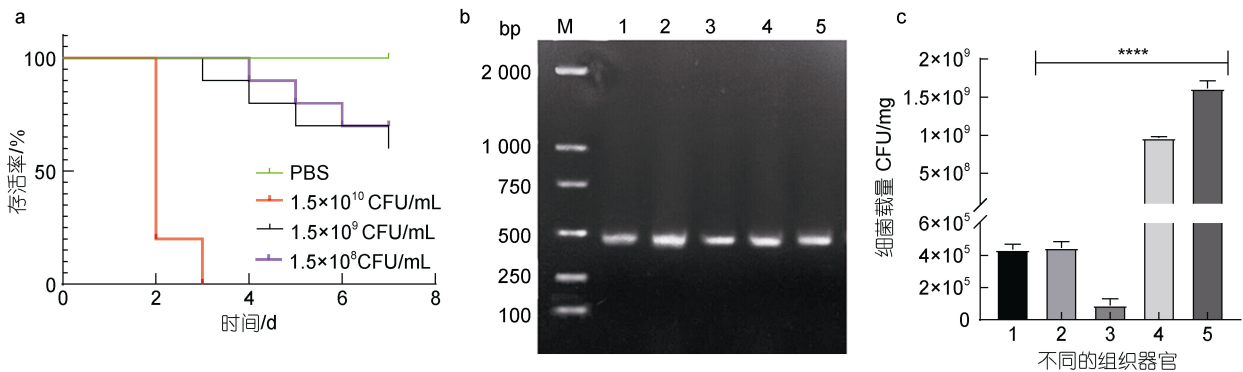


图 9 生存曲线(a)及分离菌株感染大口黑鲈的脏器分布(b)和组织载菌量(c)

Fig.9 Survival curve (a) and isolation and identification of pathogens (b) and bacterial loads in different organs and tissues (c) of *M. salmoides* infected by the isolated strain

注: b 图中, M. Marker, 1. 肝脏, 2. 头肾, 3. 肠, 4. 脾, 5. 胃; c 图中, 1. 胃, 2. 肝, 3. 肠, 4. 脾, 5. 头肾



**2.7.2 耐药基因结果** 耐药基因 PCR 筛查结果显示, 分离菌株 KP0123 携带 *bla-SHV*、*sul2*、*aadA* 和 *tetB* 四种耐药基因(图 10b), 其余耐药基因检测为阴性, 表明分离菌株具有一定的耐药性。

**2.7.3 药物敏感性结果** 以金黄色葡萄球菌(ATCC25923)为质控菌株进行药敏试验。结果显示, 分离菌株对氨苄西林、红霉素、四环素、多西环素、复方新诺明、克林霉素等 7 种药物耐药; 对头孢曲松、头孢美唑、丁胺卡那、氧氟沙星等 5 种药物敏感; 对万古霉素和呋喃唑酮为中介(表 4), 分离菌株表现为多重耐药。

**2.7.4 中药体外抑菌实验结果** 体外抑菌结果如

表 5 所示, 中药水提取液中三七、款冬花的抑菌直径大于 15 mm, 对 KP0123 抑菌作用较强, 属高度敏感; 全蝎、野菊花的抑菌直径在 10~15 mm, 为中度敏感; 薄荷、乌梅、熟大黄 3 种中药的抑菌直径小于 10 mm, 属于低度敏感; 而蒲公英和板蓝根无抗菌作用。进一步测定具有体外抑菌效果中药的 MIC 与 MBC, 全蝎、三七和款冬对 KP0123 的抑菌效果最佳, 其 MIC 值均为 62.5 mg/mL, MBC 值在 62.5~125 mg/mL; 野菊花的抑菌效果次之, MIC 为 250 mg/mL, MBC 为 500 mg/mL; 中药薄荷、熟大黄和乌梅的 MIC, MBC 均为 500 mg/mL。

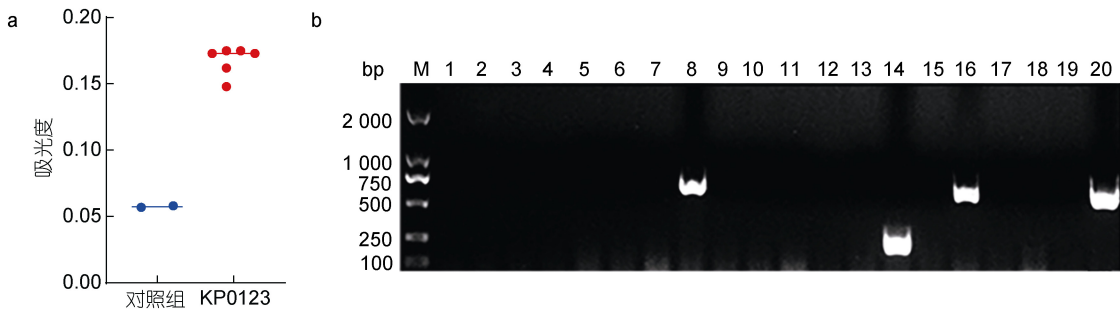


图 10 分离株的生物被膜形成能力(a)和耐药基因鉴定结果(b)

Fig.10 The biofilm capacity (a) and the identification of drug resistance genes (b) of the isolate strain

注: M: Marker; 1~20: *bla-TEM*、*bla-IMP*、*bla-OXA*、*bla-DHA*、*sul1*、*ere(D)*、*erm(F)*、*aadA*、*aadB*、*tetA*、*tetC*、*tetM*、 $\beta$ -*NDM*、*bla-SHV*、 $\beta$ -*KPC*、*tetB*、*gyrA*、*gyrB*、*inu(H)*、*sul2*

表 4 分离菌株的药物敏感性

Tab.4 Antimicrobial susceptibility of the isolated strain

药物类别	药物名称	临界范围/mm			抑菌圈直径/mm	敏感性
β-内酰胺类	氨苄西林	13	14~16	17	0	耐药
	头孢曲松	14	15~17	18	24	敏感
	头孢美唑	15	16~20	21	24	敏感
大环内酯类	红霉素	13	14~22	23	0	耐药
氨基糖苷类	丁胺卡那	14	15~16	17	17	敏感
四环素类	四环素	14	15~18	19	0	耐药
	多西环	14	15~18	19	10	耐药
喹诺酮类	氧氟沙星	12	13~16	17	19	敏感
磺胺类	复方新诺明	≤13	14~17	18	0	耐药
黏菌素类	多黏菌素	8	8~11	12	13	敏感
林可酰胺类	克林霉素	14	15~16	17	0	耐药
利福霉素类	利福平类	13	14~16	17	0	耐药
硝基呋喃类	呋喃唑酮	12	13~17	18	17	中介
糖肽类	万古霉素	10	11~13	14	12	中介

表 5 中药的体外抑菌结果

Tab.5 Effect of bacteriostasis of traditional Chinese medicine *in vitro*

中药名称	抑菌圈直径/mm	敏感性	MIC/(mg/mL)	MBC/(mg/mL)
全蝎	13	++	62.5	125
薄荷	9	+	500	500
三七	18	++	62.5	62.5
款冬花	16	++	62.5	125
野菊花	12	++	250	500
熟大黄	7	+	500	500
乌梅	9	+	500	500
蒲公英	0	-	—	—
板蓝根	0	-	—	—

注: 抑菌圈的直径>20 mm 时为极敏, 用“+++”表示; 10~19 mm 时为高敏, 用“++”表示; 10 mm 以下为低敏, 用“+”表示; 无抑菌圈为耐药, 用“-”表示

### 3 讨论

本研究从患腹水病大口黑鲈的病变组织中成功分离出一株肺炎克雷伯菌, 经 MLST 鉴定为 ST-873 型菌株。该型主要分布于非洲和欧洲, 来源于人和海鸥, 尚未见该型在亚洲区域出现。本研究首次分离到大口黑鲈源的肺炎克雷伯菌 ST-873 型菌株, 提示肺炎克雷伯菌作为一种人-兽-鱼共患病病原, 存在对公共卫生安全的潜在威胁。

本研究对分离的大口黑鲈源肺炎克雷伯菌 ST-873 型菌株的毒力基因筛查发现, 在 12 种常见毒力基因中分离菌株 KP0123 携带 *aero*、*alls*、*wca* 和 *ybt* 四种毒力基因; 回归试验证实分离菌株 KP0123 可致大口黑鲈出现腹水等与自然发病鲈鱼类似的临床症状, 高剂量感染可导致大口黑鲈死亡; 同时从试验组死亡大口黑鲈的病变组织中分离到攻毒菌株, 表明分离株 KP0123 具有一定的组织嗜性, 也印证了其与此次养殖企业大口黑鲈腹水病的相关性。研究发现, 分离菌株在与红细胞孵育时具有溶血活性, 人工感染试验病鱼的组织切片验证了分离菌株 KP0123 能够导致肾细胞水肿、脾脏出现变性和肝细胞核溶解等病理变化, 结合其携带的毒力基因 *aero*、*alls*、*wca* 和 *ybt* 与细菌的抗吞噬、黏附能力的密切关系, 进一步说明分离菌株对大口黑鲈具有一定的致病性。

细菌性疾病仍然是水产养殖中最常见、危害最大的一类疾病, 随着精养密度的增加和水体环境的恶化, 细菌性感染的抗生素治疗也面临多重耐药、效果不稳定、影响生态等诸多问题(Gwenzi *et al.*,

2022)。传统的中草药应用于水产病害的治疗, 具有药源丰富、取材方便、毒副作用小、不易产生抗药性、不影响生态等方面的优势, 备受国内外水产专家的关注(Zhang *et al.*, 2022)。分离菌株的耐药基因筛查发现, 其携带 *bla-SHV*、*sul2*、*aadA* 和 *tetB* 共 4 种耐药基因, 属于多重耐药菌株; 药敏试验结果发现, 分离株 KP0123 对氨苄西林、红霉素、四环素、多西环素等抗菌药物耐药, 对头孢曲松、头孢美唑、丁胺卡那、氧氟沙星等药物敏感, 分离菌株的药物敏感性与其他动物源分离株存在显著不同(刘海月等, 2020; 李双双, 2020; 郭蕊等, 2021), 与大黄鱼源肺炎克雷伯菌分离株的耐药菌谱也存在一定的差异(潘苑霞等, 2022), 这可能由药物的滥用以及不同地区用药习惯和时空上的差异造成的。在生物被膜形成能力方面, 分离株 KP0123 具有中等的生物被膜形成能力, 与其在药敏试验中表现的多重耐药情况相符, 也预示其可能对该菌感染的治疗带来一定的困扰。43 味中药的体外抑菌试验发现, 三七、款冬花、全蝎、薄荷、野菊花对于肺炎克雷伯菌分离株的生长有显著的抑制作用, 因此在临床治疗时可以考虑使用中药复方或抗生素和中药联合用药, 以充分发挥中药提高动物机体免疫力和抗感染的作用。

结合分离株 KP0123 生物被膜形成能力、耐药基因以及药敏筛查结果, 在一定程度解释了该养殖基地前期抗生素治疗大口黑鲈腹水症时效果不理想的原因。该场利用敏感抗生物连续用药 5 d 后, 病情得到了有效控制。因此, 养殖生产上应兼顾多病原流行、耐药性和致病性的特点, 在提高水质环境的基础上, 通过敏感抗生素和中药联用, 为肺炎克雷伯菌感染的精准防控和综合施治奠定基础。

### 4 结论

本试验分离并鉴定出一株大口黑鲈源 ST-873 型肺炎克雷伯菌, 并验证其可导致大口黑鲈的腹水症, 进一步拓宽了肺炎克雷伯菌的感染谱; 肺炎克雷伯菌分离株携带 *aere*、*alls*、*wca* 和 *ybt* 四种毒力基因, 可致大口黑鲈肾脏等器官严重的病理损伤, 甚至死亡;  $\beta$ -内酰胺类、氨基糖苷类等抗生素和中药三七、款冬花对肺炎克雷伯菌分离菌株具有良好的抑制作用, 对生产上联合用药和精准施治具有指导意义。本研究为揭示大口黑鲈腹水症的病因和鱼源 ST-873 型肺炎克雷伯菌的生物学特性提供了科学依据。

## 参 考 文 献

- 东秀珠, 蔡妙英, 2001. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社: 114-116.
- 刘海月, 齐丽娜, 孙弋雅, 等, 2020. 鹅源肺炎克雷伯菌分离鉴定及其致病性分析[J]. 现代畜牧兽医(4): 20-25.
- 李双双, 2020. 吉林省部分地区猪源肺炎克雷伯菌分离鉴定及耐药性分析[D]. 长春: 吉林农业大学: 7-40.
- 李静, 韩燕雨, 2020. 忍冬非花蕾部位的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 38(4): 43-50.
- 陈秀枢, 屠湧涛, 1994. 微量肉汤稀释法测定 MIC 的评价[J]. 中华医学检验杂志, 17(2): 95-98.
- 欧冠标, 周雨晴, 彭昊, 等, 2021. 猪源肺炎克雷伯氏菌耐药性及毒力基因分析[J]. 中国动物检疫, 38(6): 102-111.
- 周清德, 缪竞智, 张秀珍, 2000. 产 ESBL 肺炎克雷伯菌医院感染分子流行病学研究[J]. 中华医院感染学杂志, 4(1): 10-12.
- 胡仁静, 汤怡颖, 胡锡池, 等, 2018. 肝脓肿相关肺炎克雷伯菌毒力基因检测及同源性分析[J]. 临床检验杂志, 36(4): 263-266.
- 施瑜, 王震, 张汉园, 等, 2021. 肺炎克雷伯菌荚膜血清型、毒力基因和耐药性研究[J]. 国际检验医学杂志, 42(14): 1720-1725.
- 袁媛, 袁永明, 代云云, 等, 2020. 中国特色淡水鱼产业竞争优势研究[J]. 中国农学通报, 36(35): 127-133.
- 郭蕊, 张召兴, 曹丽辉, 等, 2021. 貂源肺炎克雷伯菌分离鉴定与耐药性检测[J]. 野生动物学报, 42(4): 1187-1191.
- 曹菲菲, 2020. 规模化牧场奶牛乳腺炎病原菌分离鉴定及肺炎克雷伯菌耐药性和致病力研究[D]. 扬州: 扬州大学: 25-26.
- 谭啸, 章熙东, 2019. 革兰氏染色法观察与区分细菌[J]. 生物学教学, 44(7): 71-72.
- 滕涛, 梁利国, 谢骏, 等, 2016. 团头鲂源肺炎克雷伯氏菌的分离鉴定[J]. 水生态学杂志, 37(6): 95-100.
- 潘苑霞, 王文基, 陈庆涛, 等, 2022. 一株大黄鱼源肺炎克雷伯菌的分离鉴定与致病性分析[J]. 水产科学, 1(4): 1-15.
- ALEXANDER M E, DICK J T A, O'CONNOR N E, *et al*, 2012. Functional responses of the intertidal amphipod *Echinogammarus marinus*: effects of prey supply, model selection and habitat complexity [J]. Marine Ecology Progress Series, 468: 191-202.
- BAI J J, LUTZ-CARRILLO D J, QUAN Y C, *et al*, 2008. Taxonomic status and genetic diversity of cultured largemouth bass *Micropterus salmoides* in China [J]. Aquaculture, 278(1/2/3/4): 27-30.
- BUCHANAN B E, BERGEY N E, 1994. Manual of Common Determinative Bacteriology [M]. 9th ed. USA Baltimore: Williams & Wilkins Co: 597-635.
- DALLENNE C, DA COSTA A, DECRÉ D, *et al*, 2010. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 65(3): 490-495.
- DAS A, BEHERA B K, ACHARYA S, *et al*, 2019. Genetic diversity and multiple antibiotic resistance index study of bacterial pathogen, *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from diseased Indian major carps [J]. Folia Microbiologica, 64(6): 875-887.
- EWERS C, STAMM I, PFEIFER Y, *et al*, 2014. Clonal spread of highly successful ST15-CTX-M-15 *Klebsiella pneumoniae* in companion animals and horses [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 69(10): 2676-2680.
- FOGELSON S B, PETTY B D, REICHELLEY S R, *et al*, 2016. Histologic and molecular characterization of *Edwardsiella piscicida* infection in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 28(3): 338-344.
- GREISEN K, LOEFFELHOLZ M, PUROHIT A, *et al*, 1994. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid [J]. Journal of Clinical Microbiology, 32(2): 335-351.
- GUNNARSSON G L, BRANDT P B, GAD D, *et al*, 2009. Monomicrobial necrotizing fasciitis in a white male caused by hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* [J]. Journal of Medical Microbiology, 58(11): 1519-1521.
- GWENZI W, DANA A, KAM K Y, *et al*, 2022. Ecological health risks of antibiotic resistance: a perspective on the evidence, challenges, and research needs [M] // GWENZI W. Emerging Contaminants in the Terrestrial-Aquatic-Atmosphere Continuum. Amsterdam: Elsevier: 195-213.
- HSIEH P F, LIN T L, LEE C Z, *et al*, 2008. Serum-induced iron-acquisition systems and TonB contribute to virulence in *Klebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess [J]. The Journal of Infectious Diseases, 197(12): 1717-1727.
- LIN Y T, CHEN T L, SIU L K, *et al*, 2010. Clinical and microbiological characteristics of community-acquired thoracic empyema or complicated parapneumonic effusion caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan [J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 29(8): 1003-1010.
- LIN J C, KOH T H, LEE N, *et al*, 2014. Genotypes and virulence in serotype K2 *Klebsiella pneumoniae* from liver abscess and non-infectious carriers in Hong Kong, Singapore and Taiwan [J]. Gut Pathogens, 6(1): 21.
- POIREL L, WALSH T R, CUVILLIER V, *et al*, 2011. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes [J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 70(1): 119-123.
- QIAO Y, MA X W, ZHONG S P, *et al*, 2021. Interaction analysis of miRNA and mRNA in the head kidney of black seabass (*Centropristis striata*) after *Vibrio harveyi* infection [J]. Aquaculture, 542: 736886.
- ROCK C, THOM K A, MASNICK M, *et al*, 2014. Frequency of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing and non-KPC-producing *Klebsiella* species contamination of healthcare workers and the environment [J]. Infection Control & Hospital Epidemiology, 35(4): 426-429.
- RONALD A, 2002. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens [J]. The American Journal of Medicine, 113(1): 14-19.

- TANSEY F, GORMLEY R, BUTLER F, 2010. The effect of freezing compared with chilling on selected physico-chemical and sensory properties of *sous vide* cooked carrots [J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1): 137-145.
- WANG J H, LIU Y C, LEE S S J, *et al*, 1998. Primary liver abscess due to *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan [J]. *Clinical Infectious Diseases*, 26(6): 1434-1438.
- YASUIKE M, NISHIKI I, IWASAKI Y, *et al*, 2017. Analysis of the complete genome sequence of *Nocardia seriolae* UTF1, the causative agent of fish nocardiosis: The first reference genome sequence of the fish pathogenic *Nocardia* species [J]. *PLoS One*, 12(3): e0173198.
- YU W L, KO W C, CHENG K C, *et al*, 2006. Association between *rmpA* and *magA* genes and clinical syndromes caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan [J]. *Clinical Infectious Diseases*, 42(10): 1351-1358.
- ZHANG W N, ZHAO J P, MA Y F, *et al*, 2022. The effective components of herbal medicines used for prevention and control of fish diseases [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 126: 73-83.
- ZHOU J, ZHAO H, ZHANG L, *et al*, 2021. MiRNA-seq analysis of spleen and head kidney tissue from aquacultured largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in response to *Aeromonas hydrophila* infection [J]. *Functional & Integrative Genomics*, 21(1): 101-111.

## ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* TYPE ST-873 FROM *MICROPTERUS SALMOIDES*

CAO Xin-Yue<sup>1</sup>, HUANG Jia-Yi<sup>1</sup>, DU Shi-Yu<sup>1</sup>, HOU Tian-Mu<sup>1</sup>, XIANG Wei<sup>1</sup>, GAO Wei-Hua<sup>1</sup>, ZHANG Fu-Xian<sup>1, 2, 3</sup>

(1. College of Animal Science, Yangtze University, Jingzhou 434023, China; 2. Engineering Research Center for Wetland Ecology and Agricultural Utilization, Ministry of Education, Yangtze University, Jingzhou 434023, China; 3. Hubei Key Laboratory of Waterlogging Disaster and Agricultural Use of Wetland, Yangtze University, Jingzhou 434023, China)

**Abstract** A dominant bacterial strain was isolated from tissues of *Micropterus salmoides* with ascites disease. It grew into a gray colony with round and neat edges. Short, oval, capsular Gram-negative bacilli were observed under microscope. In terms of morphological, physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence analysis, the isolated strain was identified as *Klebsiella pneumoniae*. MLST (multilocus sequence typing) analysis confirmed that it was ST-873 type and merged with ST-65 type. The isolated strain carried four virulence genes, *aere*, *alls*, *wca*, and *ybt*, and showed hemolytic activity. After artificial infection of *M. salmoides*, it was found that the infected fish presented ascites and other symptoms similar to the natural diseases, and the isolated strains from the viscera of the infected fish were the same to the challenged strains. The LD<sub>50</sub> of the isolated strain was 3.4×10<sup>7</sup> CFU/mL, showing moderate biofilm formation ability. The results of drug resistance analysis showed that the strain carried four resistance genes, *bla-shv*, *sul2*, *aadA*, and *tetB* 4, and was sensitive to β-lactam, aminoglycosides, quinolones and colistin, and resistant to tetracycline, sulfa, lincoamide, and rifamycin. In addition, traditional Chinese medicine Panax Notoginseng and Flos Farfarae had obvious inhibitory effect on the isolated strain *in vitro*. This study found out the main pathogen of ascites disease of *M. salmoides*, which provided a scientific basis and data reference for the diagnosis and control of *K. pneumoniae* in fish.

**Key words** *Micropterus salmoides*; *Klebsiella pneumoniae*; ST-873 type; separation and identification; antimicrobial susceptibility test; traditional Chinese medicine