

# 一株西藏牦牛源格氏乳球菌的分离鉴定

苏中华<sup>1</sup>,王冬经<sup>2</sup>,陈建春<sup>3</sup>,央 珍<sup>1</sup>,益西旺扎<sup>4</sup>,格桑卓玛<sup>1</sup>,宁立宏<sup>1</sup>,曾江勇<sup>2</sup>

(1. 西藏自治区动物疫病预防控制中心, 西藏 拉萨 850000; 2. 西藏自治区农牧科学院畜牧兽医研究所, 西藏 拉萨 850009; 3. 西藏昌都帽卡若区畜牧站, 西藏 昌都 854000; 4. 西藏山南市浪卡子县伦布学乡农牧综合服务中心, 西藏 山南 851100)

**摘 要:** 为了弄清引起西藏牦牛乳腺炎的病原, 采集患有乳腺炎的牦牛乳汁样品进行细菌培养, 将分离到的1株细菌命名为XZ-1并进行染色镜检和16S rRNA基因扩增、比对, 从GenBank上下载相似性最高细菌的16S rRNA基因, 采用DNA Star软件进行同源性和遗传进化分析。结果显示, 分离株细菌革兰氏染色, 镜检为阳性, 散在或成双或短链排列的球状菌; 16S rRNA基因比对表明, 与GenBank中格氏乳球菌的相似性达到99.43%~99.93%, 与格氏乳球菌参考株的同源性为99.5%~100%; 遗传进化分析表明, 西藏分离株XZ-1与格氏乳球菌参考株形成一个大的分支, 且与格氏乳球菌SCH和MS4-2参考株亲缘关系较近, 聚为一簇。研究表明, 该分离株为格氏乳球菌, 是引起乳腺炎的病原之一, 为今后开展牦牛乳腺炎病原及格氏乳球菌的研究提供参考依据。

**关键词:** 西藏; 牦牛; 格氏乳球菌; 分离鉴定

中图分类号: S823.8<sup>+</sup>5

文献标志码: A

## Isolation and Identification of a Strain of *Lactococcus garvieae* from Xizang Yaks

SU Zhonghua<sup>1</sup>, WANG Dongjing<sup>2</sup>, CHEN Jianchun<sup>3</sup>, Yangzhen<sup>1</sup>, Yixiwangzha<sup>4</sup>, Gesangzhuoma<sup>1</sup>, NING Lihong<sup>1</sup>, ZENG Jiangyong<sup>2</sup>

(1. Animal Disease Prevention and Control Center of Tibet Autonomous Region, Tibet Lhasa 850000; 2. Tibet Livestock and Veterinary Reserch Institution, Tibet Academy of Agriculture and Animal Husbandry Science, Tibet Lhasa 850009; 3. Animal Husbandry Station of Karuo District, Tibet Changdu 854000; 4. Agriculture and Animal Husbandry Comprehensive Service Center, Lumbuxue Township, Langjia County, Tibet shannan 851100, China)

**Abstract:** In order to clarify the pathogen causing mastitis in Xizang yaks, milk samples of yak with mastitis were collect for bacterial culture. A strain of bacteria isolated was named as XZ-1, and staining microscopy, and 16S rRNA gene amplification and comparison. The 16S rRNA gene of the most similar bacteria was download from GenBank. DNA Star software was used to analyze homology and genetic evolution. The results showed that the isolated strains of bacteria was positive, scattered or arranged in pairs or short chains of spherical bacteria by Gram-stained and microscopic examination. The 16S rRNA gene comparison showed that it had a similarity of 99.43% to 99.93% with *Lactococcus garvieae* in GenBank, and a similarity of 99.5% to 100% with the reference strain of *Lactococcus garvieae*. Genetic evolution analysis showed that the Xizang isolate strain XZ-1 formed a large branch with the reference strain of *Lactococcus garvieae*, and was closely related to the reference strains of *Lactococcus garvieae* SCH and MS4-2, forming a cluster. Studies have shown that this isolated strain is *Lactococcus garvieae* and is one of the pathogens causing mastitis, which provided a reference basis for future research on the pathogen of yak mastitis and *Lactococcus garvieae*.

**Key Words:** Tibet; Yak; *Lactococcus garvieae*; isolation and identification

格氏乳球菌(*Lactococcus garvieae*)在分类学上属于厚壁菌门、芽孢杆菌纲、乳杆菌目、链球菌科、乳球菌属<sup>[1]</sup>, 是乳制品中的一种重要细菌<sup>[2]</sup>, 其产生的格氏乳球菌素LG34有较强的热稳定性, 对革兰

氏阳性菌和阴性菌均有较好的抑制作用<sup>[3]</sup>, 在乳制品生产中具有重要的作用<sup>[4]</sup>, 被认为是一种益生菌<sup>[5]</sup>。但也有研究表明, 格氏乳球菌携带多种毒力基因<sup>[6]</sup>, 具有致病性, 常引起鱼类、鳖类等水产动物发病<sup>[7-9]</sup>, 尤以虹鳟最易感, 是全球鱼类养殖中的一种新型病原体<sup>[5]</sup>; 该菌也经常从鲜奶中分离出来, 被认为是引起牛乳腺炎的病原之一<sup>[10-12]</sup>; 除此之外, 也可感染人类引起尿路感染、心内膜炎、腹膜

收稿日期: 2023-05-28

基金项目: 西藏自治区重点研发及转化项目(XZ202201ZY0007N-01)。

作者简介: 苏中华(1991-), 硕士, 兽医师, 研究方向为高原动物传染病防控, E-mail: 1737884741@qq.com。

炎和脑膜炎等疾病<sup>[13]</sup>,被认为是一种新型的人畜共患病病原体,在兽医和人医中具有重要的临床意义。本研究对患有乳腺炎的牦牛乳汁进行了细菌培养、分离纯化,经过染色镜检和16S rRNA基因比对,确定分离出1株格氏乳球菌,为今后开展牦牛乳腺炎病原及格氏乳球菌的研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 样品来源

无菌采集西藏山南市浪卡子县患有乳腺炎的牦牛乳汁样品9份,置于-20℃冰箱,保存备用,一周内开展细菌的分离。

1.2 主要试剂

胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)、大豆酪蛋白琼脂(TSA)培养基,均购自于青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;2×Taq PCR Master Mix、DNA Marker DL5000、核酸染料,均购自于TaKaRa公司;50×TAE,购自于北京鼎国昌盛生物技术有限公司;细菌基因组DNA提取试剂盒,购自于天根生化科技(北京)有限公司。

1.3 主要仪器

生物安全柜,购置于美国Nuair公司;全温振荡培养箱,购自于苏州培英实验设备有限公司;恒温恒湿培养箱,购自上海博讯实业有限公司医疗设备厂;优普超纯水制造系统,购自于成都超纯科技有限公司;电泳仪,购置于北京六一仪器厂;PCR仪、凝胶成像系统,均购置于Bio-Rad公司。

1.4 病原分离培养与染色镜检

将无菌采集的牦牛乳汁样品1:10的比例,接种于胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)中,37℃过夜培养。培养物在大豆酪蛋白琼脂(TSA)培养基上划线,37℃培养18~24 h。挑取单菌落进行纯化培养和染色、镜检。

1.5 16Sr RNA的PCR扩增及同源性分析

按照DNA提取试剂盒的方法提取细菌DNA,4℃备用。参照文献<sup>[14]</sup>合成细菌16S rRNA基因通用引物,进行PCR扩增。反应体系为50 μL:上游、下游引物(10 μmol/L)各1.0 μL,DNA模板2.0 μL,2×Taq PCR Master Mix 25 μL,ddH2O补足50 μL;扩增条件为94℃,5 min;94℃,30 s;58℃,30 s;72℃,90 s;35个循环;72℃,7 min。将PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,剩余产物送上海生工生物工程有限公司测序。测序结果在NCBI上进行比

对,下载比对相似性最高的16S rRNA基因序列作为参考株,以屎肠球菌CAU8318、无乳链球菌ATCC13813和大肠杆菌3985为外源参考株(表1),进行同源性比较;采用DNA Star软件构建系统发育树,进行遗传进化分析。

表1 参考株信息表

菌株	登录号	宿主	分离地区
格氏乳球菌SCH	KM088088.1	黄粉虫	中国
格氏乳球菌MS4-2	MG755394.1	酸奶	中国
格氏乳球菌CAU2666	MF354501.1	废水	中国
格氏乳球菌CAU3711	MF354132.1	水牛奶	中国
格氏乳球菌2542	MT611574.1	不详	中国
格氏乳球菌SRG4	MK743983.1	烂葡萄	中国
大肠杆菌3985	CP103623.1	人	美国
屎肠球菌CAU8318	MF424835.1	牛奶	中国
无乳链球菌ATCC13813	NR040821.1	牛奶	日本

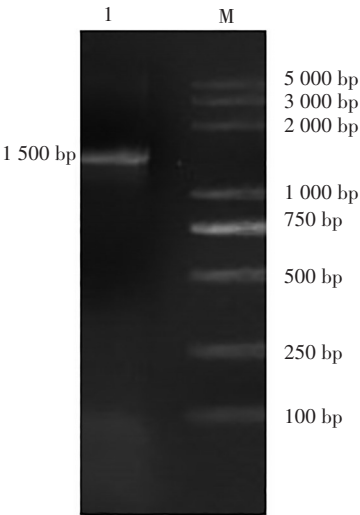
2 结果与分析

2.1 病原菌的分离培养及染色镜检

从9份牦牛乳汁样品中,分离出1株细菌,在TSA培养基上呈圆形、边缘整齐,半透明状,表面有光滑的黄白色菌落。革兰氏染色,镜检为阳性,成双或短链排列的球状菌。

2.2 16S rRNA PCR扩增

以分离株的纯培养物DNA为模板,扩增16S rRNA基因,得到1条1 500 bp的目的条带,与预期值一致,如图1所示,编号为XZ-1。



M:DNA Marker DL 5 000;1:分离株PCR产物。

图1 16S rRNA PCR扩增结果

2.3 16S rRNA同源性分析

将PCR扩增产物送公司测序,测序结果在NCBI上进行比对,与GenBank数据库中已发表的

格氏乳球菌相似性达到99.43%~99.93%。用DNA Star软件将分离菌与参考株16S rRNA序列进行同源性分析,结果表明,分离株16S rRNA序列与格氏乳球菌参考序列的同源性为99.5%~100%,与屎肠球菌和无乳链球菌参考株16S rRNA序列的同源性分别为84.5%和87.0%,与大肠杆菌参考株16S rRNA序列的同源性仅为76.8%(图2)。

Percent Identity											
Divergence	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
	1	99.5	99.5	99.5	99.9	100.0	99.5	84.5	87.0	76.8	1
	2	0.5	100.0	100.0	99.5	99.5	100.0	85.1	87.1	77.1	2
	3	0.5	0.0	100.0	99.4	99.5	100.0	84.6	87.1	77.0	3
	4	0.5	0.0	0.0	99.4	99.5	100.0	84.6	87.1	77.1	4
	5	0.0	0.5	0.5	0.5	100.0	99.5	86.0	88.1	77.1	5
	6	0.0	0.5	0.5	0.5	0.0	99.5	85.0	87.0	77.4	6
	7	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	85.1	87.1	77.1	7
	8	15.0	15.2	15.1	15.1	14.5	15.1	15.2	86.9	76.7	8
	9	13.3	13.1	13.1	13.1	12.5	13.4	13.1	12.8	75.6	9
	10	29.5	29.3	29.2	29.2	29.8	29.6	29.3	27.5	29.6	10
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

XZ-1

Lactococcus garvieae strain 2542

Lactococcus garvieae strain CAU2666

Lactococcus garvieae strain CAU3711

Lactococcus garvieae strain MS4-2

Lactococcus garvieae strain SCH

Lactococcus garvieae strain SRG4

Enterococcus faecium strain CAU8318

Streptococcus agalactiae strain ATCC138

Escherichia coli strain 3985

图2 分离株16S rRNA序列与参考株同源性分析

XZ-1与格氏乳球菌参考株形成一个大的分支,其中西藏分离株XZ-1与格氏乳球菌SCH和MS4-2亲缘关系较近,且与格氏乳球菌SCH的亲缘关系相对更近,三者形聚为一簇,格氏乳球菌2542、SRG4、CAU3711和CAU2666亲缘关系较近,聚为一簇。

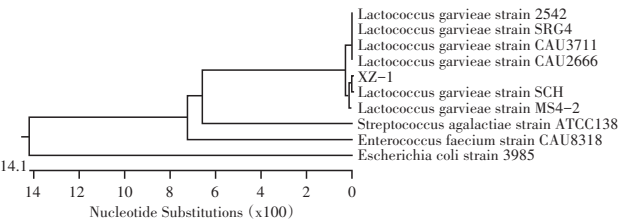


图3 分离株16S rRNA序列与参考株遗传进化树

3 讨论

格氏乳球菌最早被划分在链球菌属,称为格氏链球菌,是Collins等<sup>[15]</sup>于1983年从患有乳腺炎的牛体内分离到的,但有研究表明,格氏链球菌、乳酸链球菌等一些原来被划分在链球菌属的细菌之间关系更密切,且与其他链球菌存在一些差异<sup>[16]</sup>,1985年Schleifer等<sup>[17]</sup>提出将格氏链球菌、乳酸链球菌及其相关的链球菌重新划分为一个新的菌属,即乳球菌属,并于1986年正式公布<sup>[18]</sup>。

目前,关于格氏乳球菌的研究相对较少,主要

2.4 16S rRNA 遗传进化分析

根据西藏分离株与格氏乳球菌参考株及屎肠球菌、无乳链球菌、大肠杆菌参考株16S rRNA序列的同源性分析结果,用DNAStar软件构建了遗传进化树,如图3所示。屎肠球菌、无乳链球菌和大肠杆菌参考株与西藏分离株、格氏乳球菌参考株亲缘关系比较远,分别单独形成一个分支;西藏分离株

集中在3个方面。一是格氏乳球菌是一种益生菌。格氏乳球菌产生的格氏乳球菌素LG34能够抑制革兰氏阳性菌和阴性菌,常用于乳制品的加工,延长乳制品的保质期,在食品加工行业中具有较好的应用前景<sup>[3-4]</sup>。付娜娜等<sup>[19]</sup>在益生菌研究中发现,将格氏乳球菌制成单一菌剂作为饲料添加剂使用,能够显著增加实验小鼠平均日增重,降低料重比,可促使肠黏膜内SIgA分泌增强,提高肠道黏膜免疫,降低肠道大肠杆菌数量,优化肠道菌群。二是格氏乳球菌是一种致病菌。格氏乳球菌携带黏附素、烯醇化酶、黏附素簇1等多种毒力基因,具有致病性<sup>[5-6]</sup>,可引起水生动物及家畜禽感染发病。房海等<sup>[20]</sup>于2006年从细菌败血症引起死亡的牙鲈体内分离出致病性的格氏乳球菌;史金莲等<sup>[5]</sup>从乳腺炎的牛乳汁中分离到格氏乳球菌,能够引起实验小鼠死亡,是引起奶牛乳腺炎的病原之一。三是格氏乳球菌是一种人畜共患病病原。研究表明,格氏乳球菌能够感染人,引起胆囊炎、肺炎、乳腺炎、腹膜炎、尿道炎等多种病型<sup>[21]</sup>。2018年,王凤霞等<sup>[22]</sup>从1名急性结石性胆囊炎患者胆汁中分离到格氏乳球菌,根据药敏试验用药后,患者痊愈,证实该起急性结石性胆囊炎是由格氏乳球菌引起的。2020年,罗

棉等<sup>[23]</sup>应用宏基因组二代测序技术诊断出引起1例重症社区获得性肺炎的病原为格氏乳球菌。

目前,人类感染格氏乳球菌一般认为与接触或食用受污染的水产品、鲜奶及奶制品有关<sup>[6]</sup>。本研究从患乳腺炎的牦牛乳汁中分离到格氏乳球菌,表明格氏乳球菌是引起乳腺炎的病原之一;西藏地区农牧民群众有食用生肉、生奶和制作奶制品的饮食习惯,提示可能存在人类感染的风险。

## 4 结论

本研究采集山南市浪卡子县乳腺炎牦牛乳汁进行细菌分离,对分离到的1株细菌进行革兰氏染色镜检和16S rRNA基因扩增、序列,进行同源性、遗传进化分析,确定为格氏乳球菌,为今后深入开展牦牛乳腺炎主要病原的预防和治疗及格氏乳球菌的深入研究提供了参考依据。

### 参考文献:

- [1] 叶巧真,何建国,江静波. 致病性细菌与病毒的研究[J]. 中山大学学报论丛, 1996(S1): 66-72.
- [2] FERRARIO C, RICCI G, BORGO F, et al. Genetic Investigation within *Lactococcus garvieae* Revealed Two Genomic Lineages [J]. FEMS Microbiology Letters, 2012, 332(2): 153-161.
- [3] 刘 姗,高玉荣. 格氏乳球菌素 LG34 生物稳定性的研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2013, 25(3): 67-70, 96.
- [4] 李本领,高玉荣,赵新竹,等. 乳品主要成分及添加剂对格氏乳球菌素 LG34 抑菌活性的影响[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2014, 26(3): 45-48.
- [5] 史金莲,达举云,宋 倩,等. 张掖市某牛场1例牛源格氏乳球菌的分离鉴定及毒力基因检测[J]. 中国预防兽医学报, 2022, 44(8): 837-841, 849.
- [6] 乌仁达来. 奶牛乳汁中格氏乳球菌的分离鉴定及致病性评估[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2021.
- [7] 王森,黄宇希,彭欢,等. 一例格氏乳球菌引起的大竹荚鱼细菌性疾病诊治[J]. 科学养鱼, 2022(2): 55-56.
- [8] 洪宝华,马荣荣,袁 娜,等. 养殖梭鱼格氏乳球菌的分离鉴定及致病性研究[J]. 农业生物技术学报, 2020, 28(8): 1458-1470.
- [9] 陈泽祥,褚雄标,许力干,等. 鳖源格氏乳球菌的分离及鉴定[J]. 现代农业科技, 2008(10): 151, 154.
- [10] DEVRIESE L A, HOMMEZ J, LAEVENS H, et al. Identification of Aesculin-Hydrolyzing Streptococci, Lactococci, Aerococci and Enterococci from Subclinical Intramammary Infections in Dairy Cows [J]. Veterinary Microbiology, 1999, 70(1-2): 87-94.
- [11] AUBIN G G, BÉMER P, GUILLOUZOUIC A, et al. First Report of a Hip Prosthetic and Joint Infection Caused by *Lactococcus garvieae* in a Woman Fishmonger [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2011, 49(5): 2074-2076.
- [12] CARVALHO M G, VIANNI M C, ELLIOTT J A, et al. Molecular Analysis of *Lactococcus Garvieae* and *Enterococcus Gallinarum* Isolated from Water Buffalos with Subclinical Mastitis [J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 1997, 418: 401-404.
- [13] CHAN J F W, WOO P C Y, TENG J L L, et al. Primary Infective Spondylodiscitis Caused by *Lactococcus Garvieae* and a Review of Human *L. Garvieae* Infections [J]. Infection, 2011, 39(3): 259-264.
- [14] COLLINS M D, ASH C, FARROW J A E, et al. 16S Ribosomal Ribonucleic Acid Sequence Analyses of Lactococci and Related Taxa. Description of *Vagococcus Fluvialis* Gen. Nov., Sp. Nov [J]. Journal of Applied Bacteriology, 1989, 67(4): 453-460.
- [15] COLLINS M D, FARROW J A E, PHILLIPS B A, et al. Streptococcus *Garvieae* Sp. Nov. and *Streptococcus Plantarum* Sp. Nov [J]. Microbiology, 1983, 129(11): 3427-3431.
- [16] KILPPER-BÄLZ R, FISCHER G, SCHLEIFER K H. Nucleic Acid Hybridization of Group N and Group D Streptococci [J]. Current Microbiology, 1982, 7(4): 245-250.
- [17] SCHLEIFER K H, KRAUS J, DVORAK C, et al. Transfer of *Streptococcus lactis* and Related Streptococci to the Genus *Lactococcus* Gen. Nov [J]. Systematic and Applied Microbiology, 1985, 6(2): 183-195.
- [18] 李仲兴,张新华,王永祥. 乳球菌及其感染的研究进展[J]. 国外医学 临床生物化学与检验学分册, 2005, 26(12): 928-931, 935.
- [19] 付娜娜,来琳琳,张天园,等. 格氏乳球菌促进小鼠生长的研究[J]. 微生物学杂志, 2014, 34(5): 87-89.
- [20] 房海,陈翠珍,张晓君,等. 格氏乳球菌分离株的血清同源性及其血清学检验[J]. 海洋水产研究, 2007, 28(2): 51-55.
- [21] SAHU K K, SHERIF A A, SYED M P, et al. A Rare Cause of Sepsis: *Lactococcus Garvieae* [J]. QJM, 2019, 112(6): 447-448.
- [22] 王凤霞,王 涛,刘 晓. 格氏乳球菌致急性结石性胆囊炎1例[J]. 山东大学学报(医学版), 2021, 59(6): 122-124.
- [23] 罗 棉,谢丽华. 应用宏基因组二代测序诊断格氏乳球菌引起的重症社区获得性肺炎一例[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2022, 21(6): 441-442.