

# 克氏原螯虾布氏柠檬酸杆菌的分离鉴定及药敏分析

朱若林, 杨彩桥, 蒋书东\*, 沈娇娇, 张晓华, 鲍传和, 唐绍帅

(安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036)

**摘要:** 从患病的克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 中分离纯化得到一株优势菌株 AX1707。通过革兰氏染色、氧化酶试验、生化鉴定、16S rRNA 基因测序和进化树构建等操作进行分析, 结果显示, AX1707 为布氏柠檬酸杆菌 (*Citrobter braakii*), 人工感染试验结果显示该菌具有较强致病性, 药敏试验结果显示其对恩诺沙星、氧氟沙星、氟苯尼考、复方新诺明、庆大霉素和多西环素敏感, 对四环素和新霉素中度敏感, 对红霉素和氨苄西林耐药。

**关键词:** 克氏原螯虾; 布氏柠檬酸杆菌; 分离鉴定; 药敏试验

中图分类号: S945.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2018)04-0617-04

## Isolation, identification and antibiotic sensitivity analysis of *Citrobter braakii* from *Procambarus clarkii*

ZHU Ruolin, YANG Caiqiao, JIANG Shudong, SHEN Jiaojiao, ZHANG Xiaohua, BAO Chuanhe, TANG Shaoshuai  
(School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

**Abstract:** One predominant bacteria strain named AX1707 was isolated and purified from diseased *Procambarus clarkii*, which was further identified as *Citrobter braakii* by means of gram stain, oxidase test, biochemical identification, sequencing of 16S rRNA gene and phylogenetic analysis. Artificial infection proved that AX1707 had strong pathogenicity to healthy *Procambarus clarkii*. The antibiotic sensitivity test showed that AX1707 was sensitive to enrofloxacin, ofloxacin, TMP/SMZ, gentamicin and doxycycline, and intermediate sensitive to tetracycline and fradiomycin, while it was resistance to erythromycin and ampicillin.

**Key words:** *Procambarus clarkia*; *Citrobter braakii*; isolation and identification; antibiotic sensitivity test

克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 俗称小龙虾, 隶属于螯虾科 (*Cambaridae*)、螯虾亚科 (*Cambarinae*)、原螯虾属 (*Procambarus*), 是具有重要经济价值的养殖品种, 现主要分布于长江中下游各水域, 并成为我国淡水虾类养殖的一种重要资源。随着小龙虾的大量养殖, 各类疾病也随之发生, 目前已报道的疾病主要由对虾白斑病毒、副溶血弧菌、金黄色葡萄球菌和螺原体等<sup>[1-4]</sup>引起。

2017年6月下旬安徽肥东某克氏原螯虾养殖场爆发疾病, 病虾伏于水边不动, 螯足无力, 行动迟缓, 最终死亡。本实验室从虾场用保温箱带回10只濒死虾, 经解剖, 从肝胰脏中分离纯化优势细菌, 并通过革兰氏染色、氧化酶试验、生化鉴定和16S rRNA 基因扩增测序与进化树构建、人工感染等方法

对细菌进行了鉴定, 并测定了该菌对不同抗生素耐药性, 期望为克氏原螯虾细菌性疾病防治提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

在安徽某克氏原螯虾养殖场采集了10尾濒死病虾, 平均体重20g左右, 虾体长7~10cm左右, 冰袋保存带回实验室。健康虾购于菜市场。

2×Taq MasterMix (Dye)、DH5α感受态细胞和胶回收试剂盒购于北京康为世纪生物科技有限公司, pBLUE-T载体购自合肥普鲁顿生物科技有限公司。MH培养基、营养肉汤培养基、革兰氏染色液、氧化酶试纸、微量生化鉴定管和抗生素纸片均购于杭州微生物试剂有限公司。

收稿日期: 2017-10-02

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (31402331) 和安徽省现代农业产业技术体系(2016-2020)水产产业体系 (皖农科[2016]84号) 共同资助。

作者简介: 朱若林, 博士, 讲师。E-mail: jollinz@163.com

\* 通信作者: 蒋书东, 副教授。E-mail: jshudong@163.com

## 1.2 细菌分离纯化

取濒死的患病克氏原螯虾，摘除头胸甲，用无菌接种环沾取肝胰脏，在营养肉汤固体培养基上划线，28℃培养24 h后，挑取优势菌落进行重复划线纯化，直至得到形态大小一致的纯菌落，挑取纯化的菌株用营养肉汤培养基于28℃培养12~16 h，加终浓度20%甘油，-20℃冰箱保存待用。

## 1.3 革兰氏染色及生理生化鉴定

纯化后的细菌于28℃培养24 h后，观察菌落形态；挑取单个菌落做革兰氏染色，采用光学显微镜观察菌体形态；对革兰氏阴性菌进行氧化酶试验，并利用细菌微量生化鉴定管进行各项生理生化指标的测定，根据说明书判断菌株所属类型。

## 1.4 人工感染试验

挑取已纯化的单菌落到营养肉汤培养基中震荡培养16 h，用培养基将菌液进行10倍梯度稀释。将体长约9 cm的试验用健康克氏原螯虾分成5组，每组10尾虾，分别注射原浓度、10倍稀释、100倍稀释、1 000倍稀释的菌液和生理盐水，注射生理盐水组作为对照。每只虾采用第3~4附肢之间肌肉注射方式进行攻毒，注射剂量为0.05 mL·尾<sup>-1</sup>，注射后虾饲养于4 cm水深的塑料箱中，水温控制在25℃左右，7 d内逐日观察并记录克氏原螯虾的发病症状及死亡情况，按照Reed-Muench法<sup>[5]</sup>计算虾的半数致死量(LD<sub>50</sub>)，并从濒死克氏原螯虾的肝脏中进行细菌再分离，确定是否与原菌相同。

## 1.5 16S rRNA 基因的扩增及测序

使用扩增16S rRNA通用引物27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3')进行PCR扩增，PCR反应体系为20 μL：正反引物各1 μL，PCR Mix 10 μL，ddH<sub>2</sub>O 4 μL，模板2 μL；反应条件为：94℃预变性5 min，94℃变性30 s，50℃退火30 s，72℃延伸1 min 30 s，32个循环，72℃终延伸10 min，4℃保温。琼脂糖凝胶电泳分析PCR结果，将条带位置正确的进行切胶回收，连接T载体，转化到DH5α感受态细胞中，12~16 h后挑取单一白色菌落，菌液PCR检测阳性克隆(PCR条件同上)，将阳性克隆送上海生工测序。

## 1.6 系统进化树的构建

将16S测序结果输入NCBI的Blast检索系统进行序列同源性检索，选取相似性较高的序列，使用MEGA5.1软件采用邻接法构建系统进化树。

## 1.7 药敏试验

采用纸片扩散法<sup>[6]</sup>，在超净工作台内，取稀释好的浓度为1.5×10<sup>8</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>的菌液，用玻璃涂布器均匀涂布在MH培养基上，再将待测药敏纸片均匀贴于培养基上，正向放置30 min后，倒置于28℃培养箱培养，24 h后测量抑菌圈直径。

## 2 结果与分析

### 2.1 病原的分离纯化及生理生化鉴定

解剖病虾，可观察到胸头甲下有大量透明的液

表1 菌AX1707与标准菌株的生理生化特征比较

Table 1 Comparison of strain AX1707 with standard bacterial strains in Biochemical and physiological characteristics

测定项目 Test item	AX1707	弗氏柠檬酸杆菌 <i>Citrobter freundii</i>	布氏柠檬酸杆菌 <i>Citrobter braakii</i>
硫化氢 H <sub>2</sub> S	+	d	d
苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine ammonia lyase	-	-	-
葡萄糖酸盐 Gluconate	-	-	-
靛基质试验 Indole test	+	d	d
甲基红试验 Methyl red test	+	+	+
枸橼酸盐 Citrate	+	d	d
尿素 Urea	-	d	d
半固体动力试验 Motility test	+	+	+
葡萄糖产气 Glucose gas production	+	+	+
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	-	-	-
山梨醇 Sorbitol	+	*	*
侧金盏花醇 Adonitol	-	-	-
木糖 Xylose	+	+	+
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	+	-	+
棉子糖 Raffinose	-	d	-
蔗糖 Sucrose	-	+	-

注：“+”，90%~100%阳性；“-”，0%~10%阳性；“d”，26%~75%阳性；“\*”，无已知数据。

Notes: “+”, 90%~100% positive, “-”, 0%~10% positive, “d”, 26%-75%positive, “\*”, no data.

表 2 菌 AX1707 人工感染健康克氏原螯虾的试验结果

Table 2 Artificial infection results of strain AX1707

分组 Group	细菌浓度/CFU·mL <sup>-1</sup> Bacterial concentration	各时间段死亡数 Deaths of per period							累计死亡数 Cumulative death toll	死亡率/% Death rate
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d		
AX1707	1×10 <sup>8</sup>	4	1	3	0	0	1	0	9	90
	1×10 <sup>7</sup>	0	1	4	0	1	2	0	8	80
	1×10 <sup>6</sup>	1	0	1	1	1	0	0	4	40
对照组 Control group	培养基 Medium	0	0	0	0	0	0	0	0	0

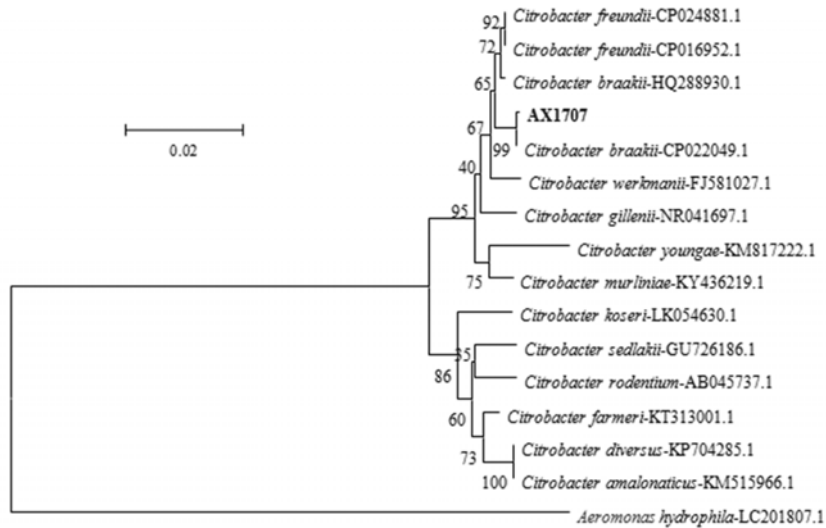


图 1 菌株 AX1707 16S rRNA 基因系统进化树分析

Figure 1 Phylogenetic analysis of strain AX1707 based on 16S rRNA gene

表 3 分离菌药敏试验结果

Table 3 Drug sensitivity of strain AX701

药物名称 Antibiotic	药物含量/μg·片 <sup>-1</sup> Dose	抑菌圈直径/mm Diameter of inhibition zone	
		AX1701	敏感度 Sensibility
庆大霉素 Gentamicin	10	20	S
氟苯尼考 Florfenicol	30	22	S
四环素 Tetracycline	30	16	I
氧氟沙星 Ofloxacin	5	22	S
新霉素 Fradiomycin	30	16	I
复方新诺明 TMP/SMZ	23.75/1.225	22	S
红霉素 Erythromycin	15	6	R
恩诺沙星 Enrofloxacin	10	37	S
多西环素 doxycycline	30	20	S
氨苄西林 Ampicillin	10	6	R

注: S: 敏感; I: 中介; R: 耐药。Notes: S: susceptible, I: intermediate, R: resistance.

体, 肝胰脏颜色变暗。从病虾肝胰脏中分离到的菌落, 经纯化后命名为 AX1707。AX1707 在营养琼脂培养基上生长形成圆形、直径约 2 mm、表面隆起、边缘整齐、半透明、无色的菌落。革兰氏染色结果显示该菌为革兰氏阴性短杆菌, 氧化酶阴性。采用生化鉴定试剂盒(杭州微生物试剂有限公司)进行生化鉴定结果见表 1, 经查阅产品说明书, 并参考《伯杰细菌鉴定手册》<sup>[7]</sup>, 该菌的生化特性与布氏柠檬酸杆菌一致。

## 2.2 人工感染试验

人工感染试验中, 患病克氏原螯虾在发病初期无明显临床表现, 开始发病时, 病虾螯足无力, 行动迟缓, 解剖可见肝胰脏肿大。攻毒后第 2 天, 开始有克氏原螯虾死亡。整个试验持续 7 d, 结果见表 1。经计算, 7 d 内, 病菌对克氏原螯虾的 LD<sub>50</sub> 为 4×10<sup>6</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>。从刚死亡的克氏原螯虾中进行细菌分离, 通过生化鉴定和 16S rRNA 分析与原分离菌相同, 表明 AX1707 是致病菌。

### 2.3 系统进化树的构建

通过与柠檬酸杆菌属不同种细菌 16S rRNA 基因序列进行多序列比对后构建进化树, 结果显示 AX1707 与布氏柠檬酸杆菌聚为一支, 如图 1 所示。

### 2.4 菌 AX1707 的药物敏感性

药敏试验结果显示(表 3), 病原菌 AX1707 对使用的 10 种药物中的 6 种药物敏感, 分别为: 恩诺沙星、氧氟沙星、氟苯尼考、复方新诺明、多西环素和庆大霉素; 对四环素和新霉素中度敏感; 而对氨苄西林和红霉素耐药。

## 3 讨论和结论

柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter*) 细菌属于肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*), 普遍存在于土壤、水等自然环境中, 是动物和人肠道内的正常菌群, 在机体抵抗力下降时, 该属细菌可引起人类、陆生动物和某些水产动物的感染发病。该属细菌中的模式种布氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*) 是一种典型的人-畜-鱼共患性条件致病菌, 不仅可引起人类和陆生动物的腹泻、食物中毒、尿道炎、腹膜炎、肺炎、脑脓肿和细菌性败血症等<sup>[8-10]</sup>, 还可造成大量水生动物发病<sup>[11-12]</sup>。目前已报道的从发病的克氏元螯虾中分离出柠檬酸杆菌均属于布氏柠檬酸杆菌<sup>[13-14]</sup>, 也有从红螯螯虾中分离到布氏柠檬酸杆菌的报道<sup>[15]</sup>。而本研究中分离的致病性布氏柠檬酸杆菌, 亦属于柠檬酸杆菌属, 但目前研究较少。据报道, 该菌可引起人和动物的菌血症, 造成腹膜炎、肠粘膜溃疡、胆囊炎甚至急性休克<sup>[16-18]</sup>, 在水生动物方面也仅有引起中华鳖、棘胸蛙和青鱼<sup>[19-21]</sup>发病的报道。虽然两种柠檬酸杆菌非常相似, 但本研究从生化鉴定特别是其中的鸟氨酸脱羧酶、棉子糖和蔗糖利用项目中能明显分辨出本研究中分离的为布氏柠檬酸杆菌, 分子生物学鉴定角度也证明如此。因此, 本文首次报道了布氏柠檬酸杆菌引起克氏元螯虾发病。

本研究中对 10 种药物的药敏试验结果显示, 病原菌的耐药性尚好, 其中喹诺酮类药物效果较好, 经养殖场拌料喂服, 效果较好。在实际生产过程中, 应该加强药敏试验在水产养殖细菌性疾病治疗过程中的应用, 防范滥用药物引起的耐药性现象。

### 参考文献:

[1] JIANG L Z, XIAO J Z, LIU L Y, et al. Characterization and prevalence of a novel white spot syndrome viral genotype in naturally infected wild crayfish, *Procambarus clarkii*, in Shanghai, China[J]. *Virus Dis*, 2017, 28(3): 250-261.  
[2] DONG X X, LI Z, WANG X H, et al. Characteristics of

*Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from crayfish (*Procambarus clarkii*) in freshwater[J]. *INT J FOOD MICROBIOL*, 2016, 238:132-138.

- [3] DONG X X, WANG X H, CHEN X C, et al. Genetic diversity and virulence potential of *Staphylococcus aureus* isolated from crayfish (*Procambarus clarkii*)[J]. *Curr Microbiol*, 2017, 74(1): 28-33.  
[4] DING Z F, XIA S Y, XUE H, et al. Direct visualization of the novel pathogen, *Spiroplasma eriocheiris*, in the freshwater crayfish *Procambarus clarkii* (G irard) using fluorescence in situ hybridization[J]. *J Fish Dis*, 2015, 38(9): 787-794.  
[5] 杨移斌, 夏永涛, 赵蕾, 等. 鲟源弗氏柠檬酸杆菌分离鉴定及药敏特性研究[J]. *水生生物学报*, 2013, 37(4): 766-771.  
[6] REED L J, MUENCH H. A simple method of estimating fifty percent endpoints[J]. *Am J Epidemiol*, 1938, 27(3): 493-497.  
[7] 霍尔特. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 刘复今, 等译. 济南: 山东大学出版社, 1988.  
[8] EWERS C, BETHE A, WIELER L H, et al. Companion animals: a relevant source of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing fluoroquinolone-resistant *Citrobacter freundii*[J]. *Int J Antimicrob Ag*, 2011, 37(1): 86-87.  
[9] DU X X, WANG J F, FU Y, et al. Genetic characteristics of bla<sub>NDM-1</sub>-positive plasmid in *Citrobacter freundii* isolate separated from a clinical infectious patient[J]. *J Med Microbiol*, 2013, 62(Pt 9): 1332-1337.  
[10] WEI Y, WANG J. Identification of ACT-1 plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase Producing *Citrobacter freundii* from a chinese patient[J]. *Ann Lab Med*, 2013, 33(1): 86.  
[11] 张冬星, 康元环, 田佳鑫, 等. 团头鲂致病性布氏柠檬酸杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. *中国兽医科学*, 2016, 46(12): 1589-1595.  
[12] 阎斌伦, 张晓君, 梁利国, 等. 三疣梭子蟹病原布氏柠檬酸杆菌的分离鉴定及定居因子抗原基因检测[J]. *水产学报*, 2012, 36(3): 391-398.  
[13] 肖宁, 孔令严, 周昊, 等. 克氏原螯虾病原布氏柠檬酸杆菌的分离鉴定及其药敏与黏附特性[J]. *水产学报*, 2016, 40(6): 946-955.  
[14] 陈红莲, 宋光同, 何吉祥, 等. 克氏原螯虾布氏柠檬酸杆菌的分离鉴定与药敏试验[J]. *淡水渔业*, 2014, 44(1): 73-77.  
[15] 沈锦玉, 顾志敏, 潘晓艺, 等. 红螯螯虾布氏柠檬酸杆菌病原的分离与鉴定[J]. *中国水产科学*, 2005, 12(2): 197-200.  
[16] BAE S H, KIM S J. Periungual abscess caused by *Citrobacter braakii* in a patient with chronic paronychia[J]. *Ann Dermatol*, 2016, 28(4): 528-529.  
[17] YUMOTO T, KONO Y, KAWANO S, et al. *Citrobacter braakii* bacteremia-induced septic shock after colonoscopy preparation with polyethylene glycol in a critically ill patient: a case report[J]. *Ann Clin Microb Anti*, 2017, 16(1): 1-4.  
[18] 刘岚, 兰英华, 李用国. 吃涮羊肉感染布氏柠檬酸杆菌 1 例[J]. *中国热带医学*, 2008, 8(12):2184-2184.  
[19] 李本旺, 李春枝, 张邦杰, 等. 中华鳖口腔溃烂综合症病原的研究[J]. *水产科技情报*, 2000, 27(5): 210-213.  
[20] 程晓云, 郑芊芷, 宋婷婷, 等. 棘胸蛙白内障病原鉴定及药敏试验[J]. *浙江农业科学*, 2016, 57(7): 1141-1143.  
[21] 王家祯, 耿昕颖, 朱世馨, 等. 青鱼源布氏柠檬酸杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. *中国兽医科学*, 2016, 46(5): 602-606.