

张生元,郑瑞珠,艾桃山,等. 克氏原螯虾源布氏柠檬酸杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 江苏农业科学,2018,46(12):129-131.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.12.031

克氏原螯虾源布氏柠檬酸杆菌的分离鉴定及药敏试验

张生元^{1,2}, 郑瑞珠¹, 艾桃山^{1,2}, 喻运珍², 张立强², 周伟东², 邓平², 丁桂珍^{1,2}

(1. 武汉中博水产生物技术有限公司, 湖北武汉 430070; 2. 武汉市农业科学技术研究院水产科学研究所, 湖北武汉 430207)

摘要:为确定湖北省某养殖场致克氏原螯虾死亡的病原,从克氏原螯虾中分离得到 1 株优势菌,命名为 X2016。药敏试验结果表明,分离菌株 X2016 对氟苯尼考、恩诺沙星、盐酸多西环素、硫酸新霉素、氯霉素和环丙沙星敏感,对红霉素、阿莫西林、庆大霉素、阿奇霉素耐药。经形态学观察、生化试验、16S rRNA 基因序列测定及系统发育学分析,鉴定为布氏柠檬酸杆菌。通过动物回归试验,可分离到与自然发病克氏原螯虾相同的细菌,且患病症状一致,本研究为克氏原螯虾源布氏柠檬酸杆菌的防治提供了科学依据。

关键词:克氏原螯虾;布氏柠檬酸杆菌;16S rRNA;药敏试验

中图分类号: S945.1⁺2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)12-0129-03

柠檬酸杆菌(*Citrobacter*)是一类条件性致病菌,在水、土壤、动物及人类肠道中广泛分布^[1]。其中弗氏柠檬酸杆菌(*C. freundii*)、布氏柠檬酸杆菌(*C. braakii*)、科氏柠檬酸杆菌(*C. koseri*)可引起人的菌血症、尿路感染、急性腹膜炎、胆囊炎等,是感染人类的常见菌群之一^[2-4]。同时研究表明,柠檬酸杆菌致病菌株也可以造成水生生物[中华绒毛蟹(*Eriocheir sinensis*)^[5]、鲟(*sturgeon*)^[6]]和哺乳动物[绵羊(*sheep*)^[7]]等出现败血症并死亡。近年来,人类感染布氏柠檬酸杆菌患病的报道日渐增多,但并未从患病克氏原螯虾中分离得到。布氏柠檬酸杆菌(布拉克枸橼酸杆菌)是革兰氏阴性短杆菌^[1]。湖北省某养殖场发生克氏原螯虾死亡情况,经理化方法和分子生物学鉴定,确定其病原为布氏柠檬酸杆菌,并对其耐药性进行了初步研究。

1 材料与方

1.1 病料来源

患病克氏原螯虾采自湖北省某养殖场,患病虾体质量约 20 g,体长约 7 cm,主要表现为活力降低、行动迟缓,解剖后头胸甲内有较多组织液流出。无菌采取肝胰腺,进行实验室病

原分离培养。

1.2 材料与试验动物

胰蛋白大豆琼脂(TSA)、胰蛋白大豆肉汤(TSB),均购自山东省青岛市高科园海博生物技术有限公司。10 × Buffer、dNTP、*Taq* DNA 聚合酶、切胶回收试剂盒、pMD18-T vector 及大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,均购自宝生物工程(大连)有限公司。所有化学试剂,均购于进口或国产分析纯。试验相关引物均由生工生物工程(上海)有限公司合成,核酸序列测序均由天一辉远生物科技有限公司完成。10 种抗生素来自武汉中博水产生物技术有限公司。健康克氏原螯虾 30 尾,平均体质量为 20~25 g,采自湖北省某养殖场。

1.3 病原菌的分离与纯化

无菌采集患病虾的肝胰腺组织,涂布在 TSA 培养基上,于 37 ℃ 下培养 18~24 h 后观察菌落形态,挑取单一菌落进行革兰染色,镜检观察,将单一形态细菌在 TSB 液体培养基中增殖备用,并将获得的单一形态的菌株命名为 X2016。

1.4 生化试验

取完成增殖的 X2016 菌株进行生化试验,试验结果参照《伯杰氏细菌鉴定手册》。

1.5 16S rRNA 基因序列分析

采用 CTAB 法提取细菌 DNA,提取后的细菌 DNA 经核酸电泳验证后,置于 -20 ℃ 冰箱保存。

扩增引物为^[8]: 16S-F, 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 16S-R, 5'-GGTACCTTGTACGACTT-3'。反应总体积 25 μ L: DNA 模板 0.5 μ L, 上下游引物各 1 μ L, 10 × Buffer 2.5 μ L, dNTP 2.5 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μ L, 去离子

brown trout(*Salmo trutta*) fry[J]. Aquaculture, 1995, 130: 67-68.

[24] 孙盛明, 戈贤平, 朱健, 等. 零换水条件下饲料蛋白水平对团头鲂幼鱼生长、消化酶活力和血清生化指标的影响[J]. 水生态学杂志, 2017, 38(1): 68-74.

[25] 丁立云, 张利民, 王际英, 等. 饲料蛋白水平对星斑川鲈幼鱼生长、体组成及血浆生化指标的影响[J]. 中国水产科学, 2010, 17(6): 1285-1292.

收稿日期: 2016-12-19

基金项目: 武汉市农业科学技术研究院创新项目(编号: CX201612-04)。

作者简介: 张生元(1972—), 男, 湖北仙桃人, 高级工程师, 主要从事鱼病与水环境研究。E-mail: 437492716@qq.com。

通信作者: 郑瑞珠, 硕士, 工程师, 主要从事资源与环境微生物研究。E-mail: 371265318@qq.com。

[21] Chen H Y, Tsai J C, Su M S, et al. Optimal dietary protein level for the growth of juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*, fed semipurified diets[J]. Aquaculture, 1994, 119: 265-271.

[22] Adrian E, Shim K F. Growth response of juvenile *Barbodes altus* fed isocaloric diets with variable protein levels[J]. Aquaculture, 1997, 158: 321-329.

[23] Arzel J, Metailler R, Kerleguer C, et al. The protein requirement of

灭菌水 17.3 μL。

16S rRNA 基因扩增反应条件:94 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min, 50 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,34 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,回收目的片段,进行 T 载体克隆,并对重组质粒进行测序。测序结果比对接后在 NCBI 上在线分析。

1.6 系统发育树的构建

将菌株 X2016 与已报道的不同种柠檬酸杆菌的 16S rRNA 核酸序列进行比较分析,利用 Clustal X 软件进行比对排列,采用 MEGA 6.0 软件^[9] 进行系统发育分析,用 Neighbour-joining 方法和 Kimura 2-parameter 校正软件进行同源性比较并构建系统发育树,并通过自举分析(bootstrap) 1 000 次重复检测分析系统的置信度。

1.7 药物敏感试验

选用 10 种常用抗生素对 X2016 菌株进行抑菌试验:氟苯尼考(99.8%)、恩诺沙星(98.9%)、盐酸多西环素(99.8%)、硫酸新霉素(99.8%)、氯霉素(99.9%)、环丙沙星(99.8%)、红霉素(99.7%)、阿莫西林(99.9%)、庆大霉素(99.8%) 和阿奇霉素(99.9%)。药敏试验采用微量稀释法对菌株 X2016 进行 MIC(minimal inhibitory concentration)测定。

1.8 动物回归试验

将菌株 X2016 无菌接种至 TSA 平板上,37 ℃ 过夜培养后,挑取单菌株至 TSB 液体培养基中,180 r/min、37 ℃ 培养至稳定期(18~24 h)。细菌悬液离心去上清后,用无菌生理盐水 10 倍梯度稀释后涂布至 TSA 培养基上,平板计数,计算细菌悬液浓度为 5.0 亿 CFU/mL,随后用无菌 PBS 缓冲液制备菌悬液。

选取健康克氏原螯虾 30 尾,平均分为 2 组:A 组为对照组;B 组为试验组,采用浸泡方式感染,往试验组中添加 1.0 亿 CFU/mL 菌株 X2016。保证一致的养殖环境,连续观察 3 d。记录克氏原螯虾死亡情况,及时对死亡克氏原螯虾进行解剖,并分离鉴定病原。

2 结果与分析

2.1 病原菌的纯化分离

菌株 X2016 接种在 TSA 培养基上并于 37 ℃ 培养 24 h,菌落形态单一、呈圆形,其表面光滑、湿润,半透明状,镜检结果为革兰染色阴性,呈短杆状,两边钝圆(图 1)。

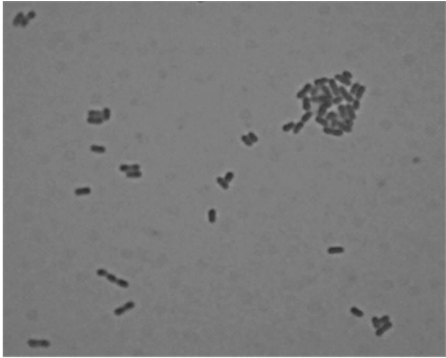


图1 分离菌株 X2016 的革兰氏染色

2.2 生化试验

生化试验结果(表 1)显示,分离株 X2016 参考《伯杰氏

细菌鉴定手册》进行对比,其生化特性与布氏柠檬酸杆菌一致,初步确定为布氏柠檬酸杆菌。

表 1 分离株 X2016 的生理生化特征

指标	结果
蛋白胨水	+
MR	+
VP	-
尿素酶	+
赖氨酸脱羧酶肉汤	-
西蒙氏枸橼酸盐	+
甘油生化管	-
KCN	+
蔗糖	-
硫化氢	+
葡萄糖产气	+
乳糖发酵管	+
硝酸盐肉汤	+

注:“+”表示阳性;“-”表示阴性。

2.3 16S rRNA 序列分析

采用试剂盒提取 X2016 的 DNA,以其为模板进行 PCR 扩增 16S rRNA 基因。将 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,获得目的片段长约 1 500 bp(图 2)。

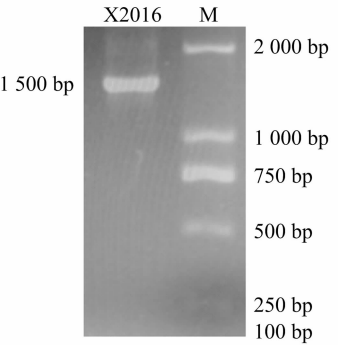


图2 16S rRNA 的 PCR 扩增结果

2.4 系统进化分析

测序结果在数据库中进行比对,应用 MEGA 6.0 构建系统进化树(图 3),X2016 株与布氏柠檬酸杆菌(GenBank 登录号为 HQ288930.1) BLAST 软件比对结果显示,同源性为 99%,且与其为同一分支,置信度为 91%。

2.5 药敏试验

由表 2 可知,分离菌株 X2016 对氟苯尼考、恩诺沙星、盐酸多西环素、硫酸新霉素、氯霉素和环丙沙星敏感,对 X2016 菌株具有良好的抑菌效果,且 X2016 菌株对氟苯尼考敏感性最强。X2016 菌株对红霉素、阿莫西林、庆大霉素、阿奇霉素耐药。

2.6 动物回归试验

试验组克氏原螯虾通过浸泡方法接种布氏柠檬酸杆菌 X2016,12 h 开始出现行动迟缓的现象,36 h 后出现死亡,72 h 内试验组全部死亡,致死率为 100%。试验组克氏原螯虾经解剖后头胸甲内有较多组织液流出。试验组克氏原螯虾肝胰腺组织中分离到与 X2016 形态特征、生化性质一致的细菌,而对照组未分离出该细菌。

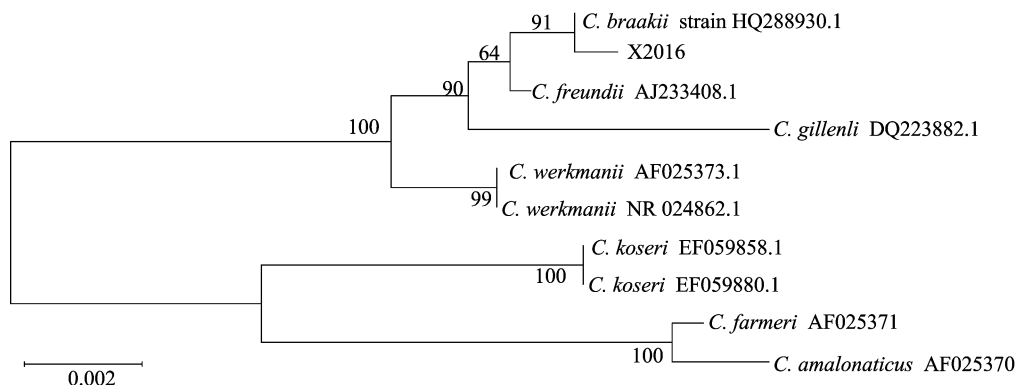


图3 基于 16S rRNA 基因序列的 X2016 菌株与部分相关菌株的系统发育树

表 2 分离株 X2016 的药敏试验结果

抗生素	最小抑菌浓度 (μg/mL)	判定标准浓度 (μg/mL)			敏感 程度
		敏感	中介	耐药	
氟苯尼考	0.50	≤8	16	≥32	S
恩诺沙星	0.25	≤1	2	≥4	S
盐酸多西环素	0.50	≤2	4	≥8	S
硫酸新霉素	1.00	≤8	16	≥32	S
红霉素	256.00	≤0.5	4	≥8	R
氯霉素	1.00	≤8	16	≥32	S
阿莫西林	64.00	≤0.25	0.5	≥1	R
庆大霉素	16.00	≤4	8	≥16	R
阿奇霉素	64.00	≤0.5	4	≥8	R
环丙沙星	0.25	≤1	2	≥4	S

注：“S”表示敏感；“R”表示耐药。

3 讨论与结论

布氏柠檬酸杆菌属于柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter*) 肠杆菌科 (Enterobacteriaceae), 是一种条件致病菌, 能引起人类食物中毒^[2-4]。在水生动物中报道较少, 其传播机制尚不明确, 对于其毒力及毒力相关的蛋白研究还在探索中^[10]。

本研究从患病克氏原螯虾肝胰腺组织中顺利分离得到细菌, 进行革兰氏染色、生化试验, 并将其 16S rRNA 序列与柠檬酸杆菌属不同种构建系统进化树。结果显示, 该菌株为布氏柠檬酸杆菌。药敏试验表明, 分离株 X2016 对氟苯尼考、恩诺沙星、盐酸多西环素、硫酸新霉素、氯霉素和环丙沙星敏感, 与从中华鳖及绵羊体内分离得到的菌株药物敏感性互相间都存在差异^[7,11], 这可能是由于动物源和地域的差异。目前, 对布氏柠檬酸杆菌的相关致病研究相对较少, 直至 2013 年才初步建立布氏柠檬酸杆菌的 PCR 检测方法^[12]。

本研究首次报道从克氏原螯虾中分离得到布氏柠檬酸杆菌, 并对其药敏性进行初步研究, 为该病的防治提供了理论依据。由于该菌主要在细胞内繁殖, 抗菌药物和抗体均不易进入, 从而该病很难根治^[4]。为防止耐药株的产生、减少疾病复发并提高疗效, 考虑联合用药, 延长抗菌治疗时间。养殖过程中使用抗生素时应根据药敏结果合理地选用抗生素, 减少抗生素滥用对养殖环境微生态平衡的破坏以及对人类带来的潜在危害^[13]。

布氏柠檬酸杆菌作为条件致病菌, 无论是侵袭性的还是

非侵袭性的, 都有可能引起人类的菌血症, 导致食物中毒^[4]。结合克氏原螯虾食物中毒的症状^[14] (呕吐、全身无力), 本研究不排除克氏原螯虾食物中毒是由布氏柠檬酸杆菌引起的可能性, 并在后续研究中进行相关工作。

参考文献:

[1] 赵克义, 阚方琦. 柠檬酸杆菌的分类近况[J]. 中国卫生检验杂志, 2001, 11(2): 252-255.

[2] 晋清云, 周国芹, 程庆祥. 一起由布拉克枸橼酸杆菌引起食物中毒[J]. 中国卫生检验杂志, 1997(6): 382.

[3] 张健, 侯天文, 龙建国. 从胆汁中培养出布氏枸橼酸杆菌 1 例[J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(5): 457-457.

[4] 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.

[5] 陈翠珍, 张晓君, 房海, 等. 中华绒螯蟹病原布氏柠檬酸杆菌的鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(2): 136-141.

[6] 杨移斌, 夏永涛, 赵蕾, 等. 鲟源布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(4): 766-771.

[7] 刘会胜, 赵战勤, 薛云, 等. 羊源致病性布氏柠檬酸杆菌的分离与鉴定[J]. 畜牧兽医学报, 2015, 49(9): 1593-1599.

[8] Bochner B R. New technologies to assess genotype - phenotype relationships[J]. Nature Reviews Genetics, 2003, 4(4): 309-314.

[9] 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(5): 602-606.

[10] Saitou N, Nei M. The neighbor - joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Nature Reviews Genetics, 1987, 4(4): 406-425.

[11] 李本旺, 李春枝, 张邦杰, 等. 中华鳖口咽腔溃烂综合症病原的研究[J]. 水产科技情报, 2000(5): 210-213.

[12] 周昱, 陈琼, 孔繁德, 等. PCR 快速检测布氏枸橼酸杆菌方法的建立与初步应用[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2013(5): 42-43, 48.

[13] Li P, Burr G S, Gatlin D M, et al. Dietary supplementation of short - chain fructooligosaccharides influences gastrointestinal microbiota composition and immunity characteristics of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, cultured in a recirculating system[J]. Journal of Nutrition, 2007, 137(12): 2763-2768.

[14] 韩丽岚, 徐荣靖. 南京“小龙虾事件”调查处理分析[J]. 中国卫生监督杂志, 2012, 19(1): 75-78.