

克氏原螯虾病原弗氏柠檬酸杆菌的分离鉴定及其药敏与黏附特性

肖宁, 孔令严, 周昊, 曹际, 李谨年*, 相翊卿, 王蒙蒙

(安徽农业大学动物科技学院, 人兽共患病重点实验室, 安徽合肥 230036)

摘要: 为了明确安徽省当涂县淡水养殖克氏原螯虾暴发性疾病的病原, 取濒临死亡的病虾分离病原。从肝胰腺中分离到一株优势细菌(命名为XLX1分离株), 人工感染试验证实其具有较强的致病性; 采用形态学检查、生理生化特性测定和细菌16S rRNA基因序列分析, 确定XLX1分离株为弗氏柠檬酸杆菌。进一步对XLX1分离株进行药物敏感性、携带黏附素基因情况和细胞黏附性进行检测。结果显示: 该分离株对头孢噻肟、庆大霉素、阿米卡星、硫酸新霉素、恩诺沙星、诺氟沙星、替考拉宁和米诺环素敏感或中敏, 对其他7种测试药物呈现耐药。该分离株携带黏附素基因*cfa*和*ure*基因簇; 序列分析发现*ureABC*结构基因和*ureD*关键辅助基因高度保守, 在虾源分离株与人源参考株间前者的核苷酸和氨基酸序列同源性分别在93.2%~98.3%和91.7%~97.4%, 后者的核苷酸和氨基酸序列同源性分别在90.8%~98.3%和94.7%~98.7%; 与人源参考株相比, 虾源分离株UreABC结构蛋白中第294、600和608位氨基酸, 以及UreD蛋白中的第62和122位氨基酸发生了有意突变。XLX1分离株可以聚集方式黏附于EPC细胞周围, 平均黏附菌数为 29.8 ± 5.3 , 但随黏附时间延长, EPC细胞出现病变。上述研究结果可为防控弗氏柠檬酸杆菌引起的水产动物疾病提供理论依据。

关键词: 克氏原螯虾; 弗氏柠檬酸杆菌; 鉴定; 药敏性; 黏附性

中图分类号: S 941.4

文献标志码: A

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*), 俗称小龙虾, 是原螯虾属中很具有经济价值的养殖品种。近年来, 随着淡水虾人工养殖面积不断扩大, 病害发生日趋频繁和严重。国内外相继报道的虾细菌性疾病病原主要有副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、拟态弧菌(*Vibrio mimicus*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophil*)和弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)^[1-4]。

弗氏柠檬酸杆菌隶属肠杆菌科(Enterobacteriaceae)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)。该菌为革兰氏阴性杆菌, 需氧或兼性厌氧, 广泛分布于自然界, 是人畜和水生生物共患病的条件致病菌^[5]。在适宜条件下某些毒力较强的菌株不仅可导致

人畜的肠炎、脑膜炎、败血症等, 也可感染鱼、鳖、蟹、虾等多种水产养殖动物, 导致水产养殖动物大批发病死亡^[6-9]。弗氏柠檬酸杆菌通过黏附素黏附定殖于肠黏膜表面是引发感染的关键起始环节。已有研究表明尿素酶和肠杆菌科黏附定居因子是人源弗氏柠檬酸杆菌的重要黏附素^[10-11], 但虾源弗氏柠檬酸杆菌是否也携带这些黏附素基因及其黏附特性尚不清楚, 需要加以研究。

2014年6月, 安徽省当涂县河道拦网养殖克氏原螯虾突然大量发病, 发病初期病虾出现拒食、行动迟缓症状, 随着病情发展, 病虾腹部和尾部肌肉肿胀, 肝胰腺和心脏出现明显色素

收稿日期: 2015-09-26 修回日期: 2016-03-23

资助项目: 国家自然科学基金(31272696)

通信作者: 李谨年, E-mail: lijinnian2000@163.com

体, 累计死亡率达高达60%以上, 给当地养殖户带来了较大的经济损失。本研究从发病虾体内分离病原, 用分离到的优势细菌人工感染健康克氏原螯虾, 可复制出与自然病例相同的症状, 确定了其致病性。经表型鉴定和分子生物学鉴定确定该致病菌为弗氏柠檬酸杆菌, 并首次对虾源弗氏柠檬酸杆菌携带黏附素基因情况及其细胞黏附特性进行研究, 旨在为防控水产动物弗氏柠檬酸杆菌感染奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验用各种培养基和抗菌药物纸片均为杭州微生物试剂有限公司产品; 基因组DNA提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; 鲤(*Crprinus carpio*)上皮瘤细胞(epithelioma papulosum cyprinid, EPC)购自上海海洋大学农业部渔业动植物病原库; M199培养液和胎牛血清为美国Gibco公司产品; BioMereux ID 32 GN 革兰氏阴性杆菌鉴定试剂盒为法国梅里埃公司产品; 实验用克氏原螯虾购自合肥某农贸市场; 大肠埃希菌ATCC 25922为本实验室保存。

1.2 病原的分离培养

取濒死期虾肝胰腺接种营养琼脂培养基, 30℃培养24 h, 挑取优势菌落转种营养琼脂培养基纯化细菌。同时将肝胰腺剪碎, 加10倍体积PBS匀浆, 10 000 r/min离心5 min, 上清液经滤膜过滤和双抗液(100 U/mL青、链霉素)处理后, 接种EPC细胞, 28℃、5% CO₂培养箱培养, 逐日观察有无细胞病变, 并盲传3代, 以分离病毒。

1.3 病原的人工感染试验

分离菌株接种BHI液体培养基, 30℃振荡培养24 h, 将菌液调整为10⁶ CFU/mL。将暂养一周确认健康的克氏原螯虾(体质量为25 g左右)随机分为3组, 每组10只。第一组实验虾于第2 和第3腹节间肌肉注射上述菌液, 0.1 mL/只; 第二组实验虾注射处理后的组织上清液, 0.1 mL/只; 第三组实验虾注射等量PBS。各组实验虾放于3个玻璃缸中连续充气饲养10 d, 水温控制在(27±1)℃, 每天记录虾发病死亡情况, 从死亡虾体内再次分离细菌。

1.4 分离菌株XLX1的鉴定

形态学检查 将XLX1分离株接种BHI液体培养基, 30℃振荡培养18 h, 取菌液制片进行革兰氏染色, 油镜下观察菌体的形态与染色特性。同时滴加菌液至铜网上, 经磷钨酸染色后于透射电镜下观察细菌的形态结构。

生化特性检测 使用BioMereuxID 32 GN革兰氏阴性杆菌鉴定试剂盒检测分离株的生化特性。即挑取典型菌落至0.85%NaCl溶液中混匀并调整菌液浓度至0.5个麦氏单位, 取200 μL菌悬液加至7 mL硫酸铵琼脂培养基中混匀后加入ID32 GN试条孔, 135 μL/孔, 30℃培养24 h, 取出试条, 使用ATB Expression仪判读结果。

16S rRNA基因PCR扩增与系统发育树分析 使用基因组DNA提取试剂盒提取XLX1分离株的基因组DNA, 以文献[12]报道的细菌16S rRNA基因通用引物(表1)PCR扩增分离菌株的16S rRNA基因。PCR反应体系(25 μL)为10×PCR buffer 2.5 μL, MgCl₂ 1.5 μL, dNTP 0.5 μL, Taq酶 0.3 μL,

表 1 本研究中所用的PCR引物序列及退火温度

Tab. 1 PCR primers and annealing temperatures in this study

基因 gene	引物序列(5'→3') prime sequence (5'→3')	位置/nt location	预期长度/bp size	退火温度/℃ annealing temperatures
16S rRNA	F:agagtttgatctggtcag R:tacggctacctgttacgactt	1-1508	1508	52.0
cfa	F:tcacgcgcatcca R:tcacgccttcgcaaacg	289-388	100	60.5
ureABC	F:atggaactgactcccagag R:tcaaacagaaaatagcgttgccgc	1-2328	2328	56.5
ureD	F:ccggaagaggacgtttgc R:ccgaccagggatgatgt	55-513	459	60.0
ureE	F:accacacgccttgaccac R:aggattgcagcggaacg	13-305	293	63.7
ureF	F:tggaatcggtgggtga R:cccgactgcgtttctcatc	95-304	210	65.0
ureG	F:atcagcgcattctaccg R:caataatcgtcgccagacc	146-583	438	53.2

上、下游引物各0.5 μL ，模板2.0 μL ，ddH₂O 17.2 μL 。PCR循环条件为94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min、94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s、52 $^{\circ}\text{C}$ 退火50 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸100 s，30个循环后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。PCR产物送至上海生物科技有限公司测序，将获得的基因序列进行Blast检索，调出相似度较高的核苷酸序列，采用Clustal W软件进行多序列匹配排列，运用NEGA5.1软件采用邻接法构建系统发育树，并通过1000次的自举分析(Bootstrap)进行置信度检验。

1.5 分离菌株XLX1的药物敏感性检测

采用K-B纸片扩散法检测分离菌株对15种抗菌药物的药敏性。即挑取菌落接种于MH液体培养基，30 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜，将菌液浓度调整为 $1 \times 10^8 \text{ CFU/mL}$ 。将药敏纸片贴于涂布有菌液的MH琼脂培养基表面，30 $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h，测量抑菌圈直径大小，根据美国临床实验室标准化协会(clinical and laboratory standards institute, CLSI)手册判定细菌对药物的敏感性^[13]。试验中以大肠埃希菌ATCC 25922做质控菌。

1.6 分离菌株XLX1的黏附特性检测

黏附素基因检测与序列分析 根据GenBank中收录的人源弗氏柠檬酸杆菌尿素酶基因簇序列(accession No. JAPA01000011.1)设计合成5对特异性引物(表1)，同时合成文献[14]的肠杆菌科黏附定居因子*cfa*基因引物。采用PCR方法检测分离株是否携带*ureABC*、*ureD*、*ureE*、*ureF*、*ureG*和*cfa*基因，PCR反应体系与条件同前述16S rRNA基因。对尿素酶结构基因*ureABC*和关键辅助基因*ureD*进行测序测定，分析其同源性及其突变情况。

细胞黏附性检测 将浓度为 1×10^6 个/mL的EPC细胞接种于4个内置细胞爬片的细胞培养皿中，28 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂条件下培养至80%细胞长至单层，无菌PBS漂洗3次后，向3个培养皿中各加入1 mL浓度为 $5 \times 10^7 \text{ CFU/mL}$ 的XLX1分离株菌液，28 $^{\circ}\text{C}$ 分别孵育60、90和120 min，每一时间点设置2个重复；剩余一个细胞培养皿中加入等量PBS作为对照。弃去未黏附菌液，取出细胞爬片，无菌PBS漂洗3次，干燥、4%多聚甲醛固定、结晶紫染色，油镜下随机选择30个细胞，逐个计数黏附菌数，计算每一细胞周围的平均黏附菌数。

2 结果

2.1 病原的分离及其致病性

从病虾肝胰腺中分离到几乎接近纯培养的菌落，经纯化后命名为分离株XLX1，而病料上清液接种EPC细胞后连续盲传3代，均未出现细胞病变。分离株XLX1在营养琼脂培养基上生长形成圆形、直径为2 mm、表面隆起、边缘整齐、半透明、无色菌落。以浓度为 10^6 CFU/mL 的分离株菌液人工感染克氏原螯虾，7 h后陆续开始发病，24~48 h内全部死亡，死亡克氏原螯虾外观和剖检病变与自然病例一致(图1)，并从肝胰腺中再次分离到大量人工感染细菌。而对照组和注射病料上清液的实验虾均未见异常。说明分离株XLX1是该次虾病的病原菌。

2.2 分离菌株XLX1的形态结构特征

XLX1分离株在光学显微镜下呈革兰氏阴性长短不一的杆菌、多呈散在排列(图2)；在透射电镜下可见菌体呈杆状、二端钝圆，大小约为 $1.5 \mu\text{m} \times 2.7 \mu\text{m}$ ，有鞭毛，无菌毛、芽孢和荚膜。

2.3 分离菌株XLX1的生化特性

用BioMereuxID 32 GN革兰氏阴性杆菌鉴定试剂盒鉴定XLX1分离株，结果显示，该分离株为弗氏柠檬酸杆菌，其具体生化特性见表2。根据鉴定百分率(%id)为99.9，T(期望值)为0.88，以及无不符试验，确定该鉴定结果为极好的鉴定。

2.4 分离菌株XLX1的16S rRNA基因序列系统发育分析

PCR扩增XLX1分离株的16S rRNA基因，测序结果显示该基因长度为1508 bp。Blast检索发现分离株16S rRNA序列与柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*) 16S rRNA基因序列自然聚类，从中选取6个同源性较高的参比菌株进化系统发育分析，结果如图3所示，XLX1分离株与弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii* strain MH16)聚为一分支，同源性达99.2%，置信度为99%。综合表型鉴定和16S rRNA基因序列分析确定XLX1分离株为弗氏柠檬酸杆菌。

2.5 分离菌株XLX1的药物敏感性

药敏试验结果显示，分离菌株XLX1对头孢噻肟、庆大霉素、阿米卡星、硫酸新霉素、恩诺沙星、诺氟沙星和替考拉宁敏感；对米诺环

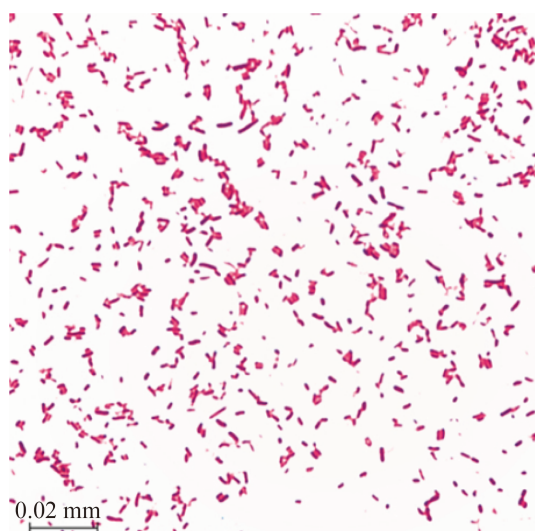


图1 克氏原螯虾人工感染XLX1分离株前后的外观及剖检变化

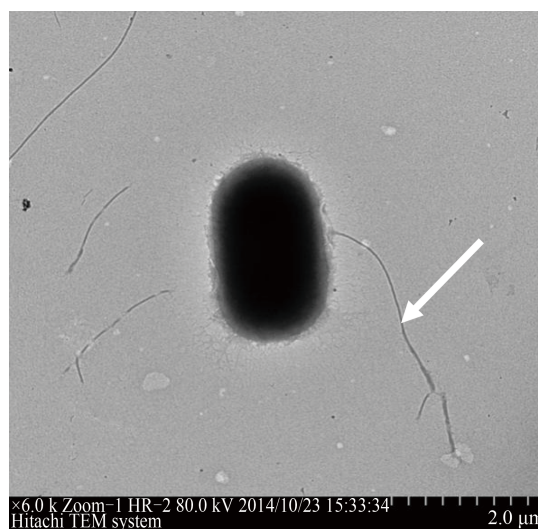
1. 健康虾头胸部与腹背部连接处肌肉; 2. 病虾头胸部与腹背部连接处肌肉肿胀; 3. 健康虾心脏; 4. 病虾心脏出现明显色素体; 5. 健康虾腹部肌肉; 6. 病虾腹部肌肉肿胀; 7. 健康虾肝胰腺; 8. 病虾肝胰腺颜色变深

Fig. 1 Appearance and necropsy lesions of *Procambarus clarkii* pre-and post-infected by XLX1 isolate

1. normal muscles located in the joint of cephalothorax with abdomen and back; 2. swollen muscles located in the joint of cephalothorax with abdomen and back; 3. normal heart; 4. obvious chromatoplast in the heart; 5. normal abdominal muscles; 6. swollen abdominal muscles; 7. normal hepatopancreas; 8. hepatopancreas darker in color



(a)



(b)

图2 XLX1分离株的光镜和电镜图

(a) 光镜照片($\times 1000$); (b) 电镜照片($\times 6000$); 箭头表示鞭毛

Fig. 2 Light micrograph and electron micrograph of XLX1 isolate

(a) light micrograph($\times 1000$); (b) electron micrograph($\times 6000$); Arrow shows flagellum

素中敏; 而对青霉素、阿莫西林、红霉素、四环素、强力霉素、克林霉素和磺胺甲基异唑表现耐药。

2.6 分离菌株XLX1的黏附素基因分析

在接近2328、459、100、293、210和438 bp处出现6条清晰的DNA条带, 分别与预期的

ureABC、*ureD*、*cfa*、*ureE*、*ureF*和*ureG*基因片段大小一致(图4)。测序结果显示*ureABC*基因ORF长2329 bp, 编码776个氨基酸;*ureD*基因长459 bp, 编码153个氨基酸。序列分析发现,*ureABC*结构基因在虾源分离菌株与人源参考株(UCI32、MGH56、UCI31、NBRC12681、

表 2 分离菌株XLX1的ATB Expression系统鉴定结果

Tab. 2 Identification of XLX1 isolate by ATB Expression system

鉴定项目 characteristics	分离株 XLX1 isolate	弗氏柠檬酸杆菌 <i>C. freundii</i>	鉴定项目 characteristics	分离株 XLX1 isolate	弗氏柠檬酸杆菌 <i>C. freundii</i>
鼠李糖 rhamnose	+	+	D-甘露醇 mannitol	+	+
N-乙酰葡萄糖胺 N-acetyl-glucosamine	+	+	D-葡萄糖 glucose	+	+
D-核糖 D-ribose	+	+	水杨酸 salicylic acid	-	-
肌醇 inositol	+	+	D-蜜二糖 melibiose	+	+
蔗糖 sucrose	+	+	L-岩藻糖 fucose	+	+
D-麦芽糖 maltose	+	+	D-山梨醇 sorbitol	+	+
衣康酸盐同化 itaconic acid assimilation	-	-	阿拉伯糖 arabinose	+	+
辛二酸盐同化 suberate assimilation	-	-	丙氨酸同化 alanine assimilation	+	+
丙酸盐同化 propionate assimilation	+	+	癸酸盐 decanoate	-	-
乙酸盐 acetates	+	+	戊酸盐同化 valerate assimilation	-	-
DL-乳酸盐同化 DL- lactate assimilation	+	+	柠檬酸盐利 citrate	+	+
丙氨酸同化 alanine assimilation	+	+	组氨酸同化 histidine assimilation	-	d
5-酮基-葡萄糖酸盐 5-oxo-gluconate	+	+	2-酮葡萄糖酸盐 2-keto-gluconate	+	+
糖原 glycogen	-	-	3-羟基-丁酸盐 3-hydroxy-butyrate	+	+
3-羟基-苯甲酸盐 3-hydroxy-benzoate	+	+	4-羟基-苯甲酸盐 4-hydroxy-benzoate	-	+
丝氨酸同化 serine assimilation	+	+	脯氨酸 proline	+	+

注：+. 阳性；-. 阴性；d. 75%阳性
Notes: +. positive; -. negative; d. 75% positive

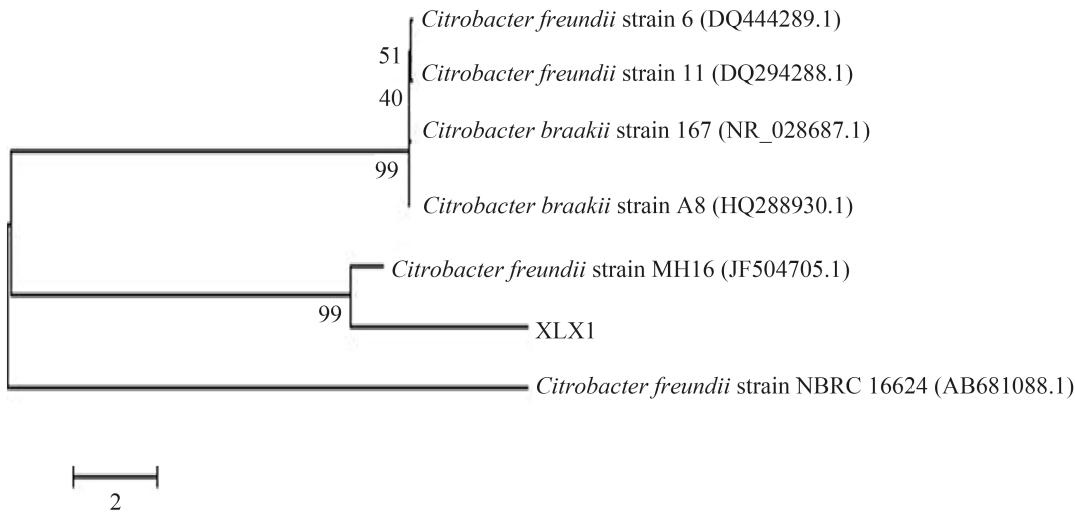


图 3 分离菌株XLX1的16S rRNA 基因序列构建的系统进化树

括号内数字代表各菌株在GenBank中的收录号；每一分支上的数字表示分离菌株与对比菌株被分在同一支中的百分比，且存在2%的序列分歧度

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of XLX1 isolate

Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar shows 2% sequence divergence

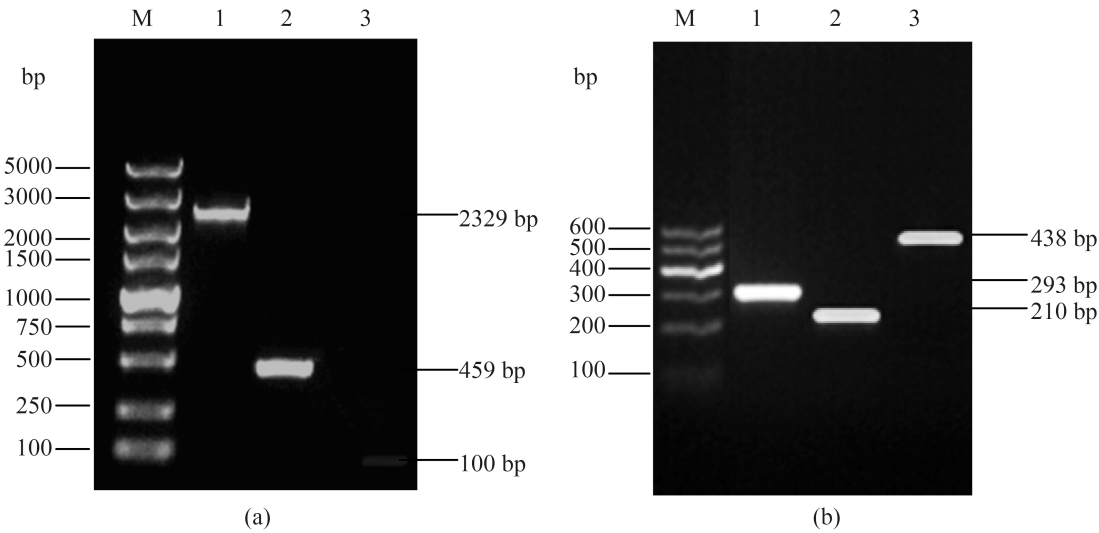


图 4 分离菌株XLX1的黏附素基因PCR检测

(a) M.DNA分子质量标准; 1. *ureABC*基因PCR产物; 2. *ureD*基因PCR产物; 3. *cfa*基因PCR产物. (b)M.DNA分子质量标准; 1. *ureE*基因PCR产物; 2. *ureF*基因PCR产物; 3. *ureG*基因PCR产物

Fig. 4 PCR detection of adhesion genes from XLX1 isolate

(a) M. DNA Marker; 1. PCR product *ure ABC* gene from XLX1 isolate; 2. PCR product *ure D* gene from XLX1 isolate; 3. PCR product *cfa* gene from XLX1 isolate. (b)M. DNA Marker; 1. PCR product *ure E* gene from XLX1 isolate; 2. PCR product *ure F* gene from XLX1 isolate; 3. PCR product *ure G* gene from XLX1 isolate

4_7_47CFAA)之间高度保守, 其核苷酸和氨基酸序列的同源性分别介于93.2%~98.3%和91.7%~97.4%; 同样*ureD*关键辅助基因也高度保守, 其核苷酸和氨基酸序列同源性分别介于90.8%~98.3%和94.7%~98.7% (表3, 表4)。与人源参考株相比, 虾源分离株*ure*基因无缺失和插入现象, 但存在有意突变。*ureABC*结构基因序列中3处发生有意突变, 使UreABC结构蛋白第394位精氨酸(Arg)、600位天冬氨酸(Asn)和608位

丙氨酸(Ala)分别改变为半胱氨酸(Cys)、异亮氨酸(Ile)和 丝氨酸(Ser); *ureD*关键辅助基因序列中2处发生有意突变, 使UreD蛋白第62位丙氨酸(Ala)和122位亮氨酸(Leu)改变为苏氨酸(Thr)和谷氨酰胺(Gln)(表5)。

2.7 分离菌株XLX1的细胞黏附特性

PBS对照组EPC细胞形态完好, 无细菌黏附 (图5); 分离株XLX1与EPC细胞共孵育60 min后,

表 3 弗氏柠檬酸杆菌虾源分离株与人源参考株的*ureABC*基因同源性分析
Tab. 3 Identity analysis of *ureABC* gene among the XLX1 isolate and *C.freundii* reference strains %

菌株 strain	氨基酸序列相似度 amino acid identity					
	XLX1	UCI32	MGH56	UCI31	NBRC12681	4_7_47CFAA
XLX1		91.7	97.4	94.0	93.8	92.5
UCI32	98.3		95.5	94.2	93.8	98.4
MGH56	94.2	93.6		95.2	94.9	97.5
UCI31	93.4	92.9	94.1		92.8	95.1
NBRC12681	93.2	92.6	93.8	97.9		94.7
4_7_47CFAA	96.9	96.3	94.6	94.2	93.9	
核苷酸序列相似度 nucleotide identity						

注: 上三角形表示氨基酸序列相似度; 下三角表示核苷酸序列相似度, 下同
Notes: The upper triangle represents the sequence similarity of amino acid, while the lower triangle represents the sequence similarity of nucleotide, the same below

表 4 弗氏柠檬酸杆菌虾源分离株与人源参考株的 *ureD* 基因相似性分析
Tab. 4 Identity analysis of *ureD* gene among the XLX1 isolate and *C.freundii* reference strains %

菌株 strain	氨基酸序列相似度 amino acid identity					
	XLX1	UCI32	MGH56	UCI31	NBRC12681	4_7_47CFAA
XLX1		98.7	94.7	95.4	96.1	96.1
UCI32	98.3		95.4	96.4	96.4	98.0
MGH56	91.9	92.3		93.7	93.7	93.7
UCI31	90.8	93.3	91.3		98.8	94.7
NBRC12681	91.3	93.0	91.3	98.9		94.7
4_7_47CFAA	95.4	96.4	91.3	91.6	91.4	
核苷酸序列相似度 nucleotide identity						

表 5 虾源分离株 XLX1 *ureABC* 及 *ureD* 基因有意突变位点
Tab. 5 The sense mutation sites of *ureABC* and *ureD* gene from XLX1 isolate

基因 gene	突变碱基位点 mutation base site	突变氨基酸位点 mutant amino acid site
<i>ureABC</i>	1180, C→T 1799, A→T 1824, A→G	394, Arg→Cys 600, Asn→Lle 608, Ala→Ser
<i>ureD</i>	184, G→A; 365, T→A	62, Ala→Thr 122, Leu→Gln

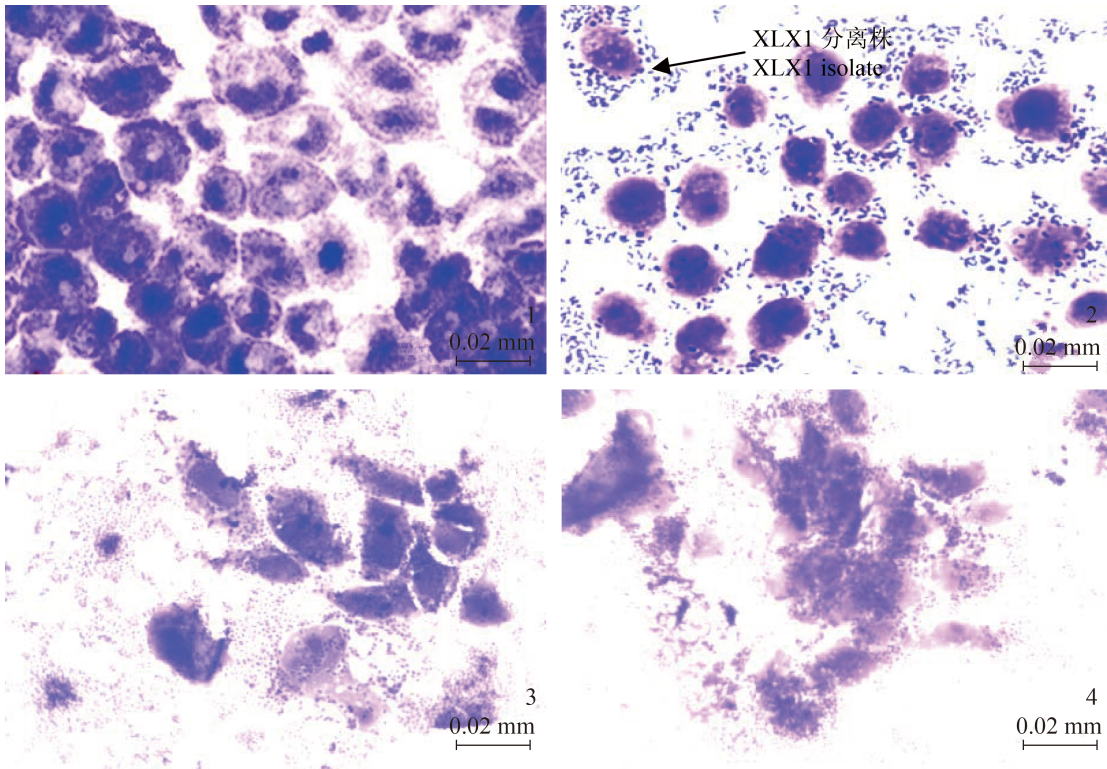


图 5 分离菌株 XLX1 对 EPC 细胞的黏附 (1000×)
1. 细胞对照; 2. 分离菌株与 EPC 细胞共孵育 60 min; 3. 分离菌株与 EPC 细胞共孵育 90 min; 4. 分离菌株与 EPC 细胞共孵育 120 min
Fig. 5 Adhesion of XLX1 isolate to EPC cells (1000×)
1. EPC cells control; 2. incubation of EPC cells with XLX1 isolate for 60 min; 3. incubation of EPC cells with XLX1 isolate for 90 min; 4. incubation of EPC cells with XLX1 isolate for 120 min

以聚集方式黏附细胞周围,每个细胞周围平均黏附菌数为 29.8 ± 5.3 ;但随孵育时间延长,细菌对EPC细胞呈现致病作用,多数细胞膜逐渐破裂,细菌散在细胞间隙中,至孵育120 min时,可见细胞膜完全破裂,几乎无贴壁细胞。

3 讨论

本实验对引起安徽省当涂县河道拦网养殖克氏原螯虾突然大量死亡的病原进行研究。在濒死克氏原螯虾体内多个组织中均分离到大量接近纯培养的优势分离株XLX1,综合表型鉴定和分子鉴定以及动物回归感染实验结果,确定引发此次虾暴发性疾病的病原是弗氏柠檬酸杆菌。尽管弗氏柠檬酸杆菌是一种存在水环境中的条件致病菌,但由于此疾病暴发前当地连续多日气温偏高,养殖环境恶化,弗氏柠檬酸杆菌侵入虾体大量生长繁殖产生毒力因子,导致疾病暴发。

尽管近几年来有关弗氏柠檬酸杆菌引起水产动物疾病的报道陆续增多,但相关研究主要集中在病原菌的分离鉴定和药物敏感性检测^[15-16],有关虾源弗氏柠檬酸杆菌的黏附素基因及黏附特性的研究尚未见有报道。已有研究表明,尿素酶是人源弗氏柠檬酸杆菌的重要黏附素,通过尿素酶分解尿素,在菌体周围形成氨云以抵御酸性外环境对菌体的损伤,使该菌顺利通过胃肠黏液层到达黏膜表面而黏附定殖下来^[17-18]。人源弗氏柠檬酸杆菌尿素酶基因簇由*ureA*、*ureB*、*ureC*、*ureD*、*ureE*、*ureF*和*ureG* 7个基因亚单位组成,其中发挥主要作用的*ureABC*为结构蛋白基因,*ureD*为决定尿素酶能否表达的关键辅助基因^[19]。本研究首次对虾源弗氏柠檬酸杆菌的尿素酶基因簇进行检测,发现虾源分离株XLX1也携带尿素酶基因簇7个基因亚单位,且与人源参考株的同源性高,仅少数几处碱基发生了有意突变,表明尿素酶基因簇在细菌种内高度保守。

本研究使用鲤上皮瘤细胞(EPC)初步检测了弗氏柠檬酸杆菌分离株XLX1的细胞黏附性,发现该分离株能以聚集性方式良好地黏附在EPC细胞周围,并且随着孵育时间延长,细菌对细胞呈现致病作用,最终导致细胞破裂死亡。由于EPC来源于脊椎动物鲤科鱼类,而克氏原螯虾属于无脊椎动物的甲壳类,故后期仍需分离培

养克氏原螯虾的血淋巴细胞,利用血淋巴原代细胞模型进一步验证分离株的细胞黏附性。

由于抗菌药物在水产养殖生产中的长期使用,诱导弗氏柠檬酸杆菌产生耐药性,并且不同地域分离株以及不同水产动物来源分离株的耐药性均有差异。如高正勇等^[20]报道大鳌源弗氏柠檬酸杆菌分离株JZ01对16种抗菌药物产生耐药;田飞焱等^[21]检测到中华鳖源弗氏柠檬酸杆菌分离株LCJY-002对6种抗菌药物表现耐药;阎斌伦等^[22]对中华鳖源弗氏柠檬酸杆菌进行药敏试验,结果显示分离株SX43对15种抗菌药物呈现耐药。本研究药敏试验结果显示虾源弗氏柠檬酸杆菌分离株XLX1对青霉素、四环素、磺胺甲基异唑等8种抗菌药物均存在不同程度的耐药性,虽然对头孢噻肟、庆大霉素、阿米卡星、硫酸新霉素、恩诺沙星、诺氟沙星和替考拉宁7种药物敏感,但阿米卡星和头孢噻肟尚未纳入国标渔药,不宜选用。这些结果提示,弗氏柠檬酸杆菌多重耐药现象严重,亟需研发不产生耐药性的新型药物,如抗细菌毒力药物,选择性地遏制病原菌的黏附、毒素表达、毒素传递和免疫逃避等,从而降低病原菌的毒力,达到有效预防和治疗细菌感染的目的。

参考文献:

- [1] Kumar B K, Deekshit V K, Raj J R M, et al. Diversity of *Vibrio parahaemolyticus* associated with disease outbreak among cultured *Litopenaeus vannamei* (Pacific white shrimp) in India[J]. Aquaculture, 2014, 433(6): 247-251.
- [2] Thune R L, Hawke J P, Siebeling R J. Vibriosis in the red swamp crawfish [J]. Journal of Aquatic Animal Health, 1991, 3(3): 188-191.
- [3] Dong C H, Wei Z, Yang G P. Involvement of peroxinectin in the defence of red swamp crayfish *Procambarus clarkia* against pathogenic *Aeromonas hydrophila*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30(6): 1223-1229.
- [4] Meruvu H, Donthireddy S R R. Optimization studies for chitinase production from *Parapeneopsis hardwickii* (spear shrimp) exoskeleton by solid-state fermentation with marine isolate *Citrobacter freundii* str. nov. haritD11[J]. Arabian Journal for Science and

- Engineering, 2014, 39(7): 5297-5306.
- [5] 薛巧, 赵战勤, 刘会胜, 等. 弗氏柠檬酸杆菌对动物和人致病性研究进展[J]. 动物医学进展, 2015, 36(7): 81-85.
- Xue Q, Zhao Z Q, Liu H S, *et al.* Progress on *Citrobacter freundii* Pathogenicity in Animals and Humans[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2015, 36(7): 81-85 (in Chinese).
- [6] Carrica S A, Belloni R, Baldoni F, *et al.* Intraparenchymal hepatic haematoma after endoscopic retrograde cholangiopancreatography over infected by *Citrobacter freundii* and *Klebsiella pneumoniae* BLEE[J]. Acta Gastroenterologica Latinoamericana, 2014, 44(2): 125-128.
- [7] Svetlana J, Dobrila J D, Lj V. *Citrobacter freundii* as a cause of disease in fish [J]. Acta Veterinaria, 2003, 53: 399-410.
- [8] 毛烁君, 斯广杰, 任晓金, 等. 一株多重耐药中华鳖源弗氏柠檬酸杆菌的分离鉴定[J]. 淡水渔业, 2015, 45(2): 102-106.
- Mao S J, Si G J, Ren X J, *et al.* Isolation and identification of multidrug resistant *Citrobacter freundii* from diseased soft-shelled turtle, *Pelodiscus sinensis*[J]. Freshwater Fisheries, 2015, 45(2): 102-106 (in Chinese).
- [9] 陈翠珍, 张晓君, 房海, 等. 中华绒螯蟹病原弗氏柠檬酸杆菌的鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(2): 136-141.
- Chen C Z, Zhang X J, Fang H, *et al.* Identification of *Citrobacter freundii* isolated from crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2006, 22(2): 136-141 (in Chinese).
- [10] Kakinuma Y, Iida H, Sekizuka T, *et al.* Molecular characterisation of urease genes from urease-positive thermophilic campylobacters (UPTC) [J]. British journal of biomedical science, 2008, 65(3): 148-152.
- [11] Liu L Y, Hao S, Lan R T, *et al.* The type VI Secretion System Modulates Flagellar Gene Expression and Secretion in *Citrobacter freundii* and Contributes to Adhesion and Cytotoxicity to Host Cells[J]. Infection and immunity, 2015, 83(7): 2596-2604.
- [12] Thomas M C, Thomas D K, Selinger L B, *et al.* SPYDER, a new method for *in silico* design and assessments of 16S rRNA gene primers for molecular microbial ecology [J]. FEMS Microbiology Letters, 2011, 320(2): 152-159.
- [13] Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 22th informational supplement. M100-S22[S]. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institue, 2012.
- [14] Kacliková E, Krascenicsová K, Pangallo D, *et al.* Detection and quantification of *Citrobacter freundii* and *C. braakii* by 5'-Nuclease Polymerase Chain Reaction[J]. Current Microbiology, 2005, 51(4): 229-232.
- [15] Gao Z, Zeng L, Meng Y, *et al.* Isolation and identification of *Citrobacter freundii* from diseased giant salamander, *Andrias davidianus* [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(2): 169-176.
- [16] 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.
- Yang Y B, Xia Y T, Zhao L, *et al.* Isolation and identification of *citrobacter freundii* from Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii* Brandt) and its antibiotic sensitivity[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2013, 37(4): 766-771 (in Chinese).
- [17] Minkara M S, Ucisik M N, Weaver M N, *et al.* Molecular dynamics study of *Helicobacter pylori* urease[J]. Journal of Chemical Theory and Computation, 2014, 10(5): 1852-1862.
- [18] Takako O, Katsuhiko M, Tomoko H, *et al.* Urease-positive bacteria in the stomach induce a false-positive reaction in a urea breath test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection[J]. Journal of Medical Microbiology, 2008, 57(7): 814-819.
- [19] Harry L T M, Michael D I. Robert P H. Molecular biology of microbial urease[J]. Microbiology Reviews, 1995, 59(3): 451-480.
- [20] 高正勇, 曾令兵, 孟彦, 等. 患病大鲵中弗氏柠檬酸杆菌的分离与鉴定[J]. 微生物学报, 2012, 52(2): 169-176
- Gao Z Y, Zeng L B, Meng Y, *et al.* Isolation and identification of *Citrobacter freundii* from diseased giant salamander, *Andrias davidianus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(2): 169-176 (in Chinese).
- [21] 田飞焱, 欧阳敏, 张晓燕, 等. 中华鳖弗氏柠檬酸杆菌的分离、鉴定及药物敏感性试验[J]. 水产学杂志, 2013, 26(4): 42-46.
- Tian F Y, Ouyang M, Zhang X Y, *et al.* Isolation,

- Identification and Antibiotic Sensitivity of Pathogenic Bacterium *Citrobacter freundii* from Soft Shell Turtle, *Trionyx sinensis* [J]. Chinese Journal of Fisheries, 2013, 26(4): 42-46 (in Chinese).
- [22] 阎斌伦, 张晓君, 梁利国, 等. 三疣梭子蟹病原弗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.
- Yan B L, Zhang X J, Liang L G, *et al.* Detection of *cfa* gene and isolation and identification of the pathogen *Citrobacter freundii* isolated from *Protunus trituberculatus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(3): 391-398 (in Chinese).

Isolation and identification of *Citrobacter freundii* from diseased *Procambarus clarkii* and its antibiotics susceptibility and adhesion characteristics

XIAO Ning, KONG Lingyan, ZHOU Hao, CAO Ji, LI Jinnian*, XIANG Yiqing, WANG Mengmeng
(Key Laboratory of Zoonoses, College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: In order to define the potential pathogens causing fulminant illness of *Procambarus Clarkii* in Dangtu County, Anhui Province, pathogens were isolated from the moribund *Procambarus Clarkii*. A dominant strain named XLX1 was isolated from the hepatopancreas and was confirmed to be pathogenic to *Procambarus Clarkii* by artificial challenge test. The XLX1 isolate was identified as *Citrobacter freundii* by means of the morphology, physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequencing. The antibiotics sensitivity, adhesin-carrying genes and cell adhesion of XLX1 isolate were further detected. The results showed that the XLX1 isolate was sensitive or medium sensitive to cefotaxime, gentamicin, amikacin, neomycin sulfate, enrofloxacin, norfloxacin and teicoplanin, but resistant to other 7 kinds of antibiotics. The XLX1 isolate carried adhesin genes *cfa* and *ure* clusters. It was found that *ureABC* structure gene and *ureD* key accessory gene was relatively conservative by the sequences analysis. The nucleotide and amino acid homology of former respectively ranged from 93.2% to 98.3% and 91.7% to 97.4%, and the latter ranged from 90.8% to 98.3% and 94.7% to 98.7% between XLX1 isolate and reference strains. Compared with reference strains derived from patient, the 294th, 600th, 608th amino acids in UreABC structure protein and the 62 nd and 122 nd amino acids in UreD key accessory protein generated sense mutation amino acids from XLX1 isolate. XLX1 isolate adhered to the epithelioma papulosum cyprinid (EPC) cells mainly in aggregative pattern, and the average adhesive bacterial number was 29.8 ± 5.3 , which caused EPC cells lesion with the extension of adhesion time. This study may contribute to providing a theoretical basis for controlling aquatic animal disease caused by *Citrobacter freundii*.

Key words: *Procambarus clarkii*; *Citrobacter freundii*; identification; antibiotics susceptibility; adhesion

Corresponding author: LI Jinnian. E-mail: lijinnian2000@163.com

Funding projects: National Natural Science Foudation of China (31272696)