

# 克氏原螯虾肝胰腺病原菌的分离鉴定和药敏试验

唐庆权<sup>1</sup>, 韩阳<sup>1</sup>, 许晓牧<sup>1</sup>, 朱若林<sup>1</sup>, 鲍传和<sup>1</sup>, 江河<sup>2</sup>, 宋光同<sup>2</sup>, 彭开松<sup>1\*</sup>

(1. 安徽农业大学动物科技学院水产系水生健康与公共卫生实验室, 安徽合肥 230036; 2. 安徽省农业科学研究所, 安徽合肥 230031)

**摘要** 分离并鉴定克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)致病的疑似病原,并筛选有效内服药物。共鉴定出8种细菌,分别为乙酰外杆菌、费氏柠檬酸杆菌、维氏气单胞菌、嗜水气单胞菌、肺炎克雷伯氏菌、蜂房哈夫尼亚菌、拟态弧菌、鲁氏耶尔森菌。从患病克氏原螯虾肝胰腺中分离的主要病原菌是柠檬酸菌属和气单胞菌属的成员,而不是弧菌。恩诺沙星和氟苯尼考对上述菌有较好的治疗效果。

**关键词** 克氏原螯虾;费氏柠檬酸杆菌;气单胞菌属;恩诺沙星;氟苯尼考

中图分类号 S945.1<sup>2</sup> 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)21-0096-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.21.028



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

## Isolation, Identification and Drug Sensitivity Test of Pathogen from the Hepatopancreas of Diseased Crayfish

TANG Qing-quan, HAN Yang, XU Xiao-mu et al (Laboratory of Aquatic Health and Public Health, School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036)

**Abstract** The suspected pathogens of *Procambarus clarkii* was isolated and identified, and effective oral medicines were screened out. Eight kinds of bacteria were identified, including *Exiguobacterium acetylicum*, *Citrobacter fergusonii*, *Aeromonas veronii*, *Aeromonas hydrophila*, *Klebsiella pneumoniae*, *Hafnia paralvei*, *Vibrio mimicus* and *Yersinia ruckeri*. The main pathogenic bacteria isolated from the hepatopancreas of diseased *P. clarkii* were the members of the genus *Citrobacter* and *Aeromonas*, not *Vibrio*. Enrofloxacin and florfenicol had better control effects on the above bacteria.

**Key words** *Procambarus clarkii*; *Citrobacter fischeri*; *Aeromonas*; Enrofloxacin; Florfenicol

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*),又称红色沼泽螯虾或小龙虾,隶属甲壳纲十足目螯虾科原螯虾属,在我国主要分布在江苏、浙江、湖北、湖南、安徽、上海、山东等省(市)。国内报道的克氏原螯虾病原包括维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)<sup>[1]</sup>、费氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)<sup>[2]</sup>、螺原体(*Spiroplasma*)<sup>[3]</sup>等。笔者所在课题组整理了2017—2018年从舒城、定远、霍山、肥西、长丰、太湖等养殖场稻虾田中的濒死克氏原螯虾肝胰腺分离到的病原菌鉴定和药敏试验数据,以期为克氏原螯虾细菌性疾病的防治提供理论依据。

### 1 材料与方 法

**1.1 主要试剂** 琼脂营养培养基、药敏纸片购自杭州微生物试剂有限公司;细菌基因组DNA抽提试剂盒购于生物工程(上海)股份有限公司;Taq DNA聚合酶购于北京康为世纪生物科技有限公司;DNA胶回收试剂盒购于爱思进生物技术(杭州)有限公司;抗菌药物标准品均购自中国兽药监察所。

**1.2 临床诊断分析** 对各养殖场发病前后的养殖管理、水质情况和寄生虫进行了临床分析。

**1.3 细菌分离、纯化及鉴定** 将濒死的克氏原螯虾(全长7~8 cm)进行体表消毒后,在无菌操作台完成解剖操作。解开头胸甲,将肝胰腺的截面涂布于营养琼脂平面上,用营养琼脂分离纯化细菌。

将纯化的细菌置于28℃恒温培养箱中培养16 h,观察菌落形态;鉴定细菌,参照朱若林等<sup>[4]</sup>的方法进行16S rRNA

基因扩增和系统进化分析。

**1.4 患病虾内服药物的筛选** 参考欧盟标准<sup>[5]</sup>,采用纸片法和微量肉汤稀释法进行内服抗菌药物的药敏试验。敏感性判定标准如下:7 mm≤抑菌圈直径≤14 mm,判为R(耐药);抑菌圈直径≥20 mm,判为S(敏感);15 mm≤抑菌圈直径≤19 mm,判为I(中敏)。药敏纸片直径约6 mm、厚度约1 mm,平板琼脂饼的平均厚度约5 mm。

微量肉汤法结果判定标准如下。磺胺甲噁唑:最小抑菌浓度>152 μg/μL,为耐药;20 μg/μL≤最小抑菌浓度≤152 μg/μL,为中敏;最小抑菌浓度≤19 μg/μL,为敏感。恩诺沙星、多西环素:最小抑菌浓度>32 μg/μL,为耐药;9 μg/μL≤最小抑菌浓度≤32 μg/μL,为中敏;最小抑菌浓度≤8 μg/μL,为敏感。氟苯尼考和硫酸新霉素:最小抑菌浓度>16 μg/μL,为耐药;5 μg/μL≤最小抑菌浓度≤16 μg/μL,为中敏;最小抑菌浓度≤4 μg/μL,为敏感。

### 2 结果与分析

**2.1 临床症状** 各养殖场发病田水温均为25~28℃,各项水质指标良好,症状为病虾不摄食,螯足无力,行动迟缓,应激能力较弱;部分个体体表皮肤变黑,甲壳内壁无白斑及其他明显症状,经解剖可见肝胰脏颜色淡黄。水浸片检查未发现寄生虫。

**2.2 细菌16S rRNA鉴定** 实验室累计从各地濒死克氏原螯虾分离纯化到30株细菌,并对30株菌的16S rRNA基因测序进行BLAST比对,结果见表1,分别与对应参考株的相似性在99%以上。

其中,费氏柠檬酸杆菌和维氏气单胞菌为优势种,分别占病原菌数的43.3%和26.67%。以上克氏原螯虾患病是由细菌混合感染所致,其中费氏柠檬酸和氣单胞菌属为主要疑

**基金项目** 安徽省现代农业产业技术体系项目(皖农科[2016]84号)。  
**作者简介** 唐庆权(1995—),男,安徽霍邱人,硕士研究生,研究方向:水生动物疾病与渔用保健品研发。\*通信作者,副教授,博士,硕士生导师,从事养殖健康与公共卫生研究。  
**收稿日期** 2019-04-12;修回日期 2019-04-24

表 1 30 株分离菌的 16S rRNA 鉴定结果

Table 1 16S rRNA identification results of 30 strains of isolated bacteria

分离菌 Isolated strains	实验室编号 Laboratory number	分离菌数量 Number of isolated strains//株
弗氏柠檬酸杆菌 <i>Citrobacter freundii</i>	17J144、17J153、17J156、 17J158、17J161、18J021、 18J024、18J025、18J029、 18J030、18J151、18J154、 18J155	13
维氏气单胞菌 <i>Aeromonas veronii</i>	17J155、17J159、18J022、 18J027、18J028、18J031、 18J032、18J034、	8
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	17J154、17J160、17J162	3
哈夫尼亚菌 <i>Hafnia paralvei</i>	18J152、18J153	2
鲁氏耶尔森菌 <i>Yersinia ruckeri</i>	17J147	1
肺炎克雷伯氏菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	18J150	1
拟态弧菌 <i>Vibrio mimicus</i>	17J163	1
乙酰外杆菌 <i>Exiguobacterium acetylicum</i>	18J020	1

似致病菌。费氏柠檬酸杆菌和维氏气单胞菌的进化树如图 1 所示。采用 Mega 4 软件进行多序列匹配分析后,采用邻位相连法(neighbor-joining method)构建系统发育树,所构建发育树各分支的置信度由 Bootstrap 进行 1 000 次循环检验。

**2.3 药敏试验** 汇总统计分离株对常用国标抗菌药药敏感、中敏、耐药的菌株数量,见表 2 和表 3。综合纸片法和肉汤法测定结果可知,分离株对氟苯尼考或恩诺沙星的敏感性较高。

### 3 讨论

笔者从患病克氏原螯虾肝胰腺中分离的细菌共 8 种,作为克氏原螯虾已知病原菌的有费氏柠檬酸杆菌<sup>[2]</sup>、维氏气单胞菌<sup>[1]</sup>、嗜水气单胞菌<sup>[6]</sup>、拟态弧菌<sup>[7]</sup>,而乙酰外杆菌、哈夫尼亚菌、肺炎克雷伯氏菌、鲁氏耶尔森菌是否对克氏原螯虾有致病性目前尚未见报道。

弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)是一种典型的人-畜-鱼共患条件性致病菌,陆生动物和人均可感染致病性弗氏柠檬酸杆菌而发生腹泻、食物中毒和继发感染<sup>[8-9]</sup>。近些年,关于弗氏柠檬酸杆菌致水产动物患病的报道越来越多<sup>[10-11]</sup>。维氏气单胞菌和嗜水气单胞菌均是淡水水生动物的重要病原菌和重要新发人-兽-鱼共患病原<sup>[12-13]</sup>。拟态弧

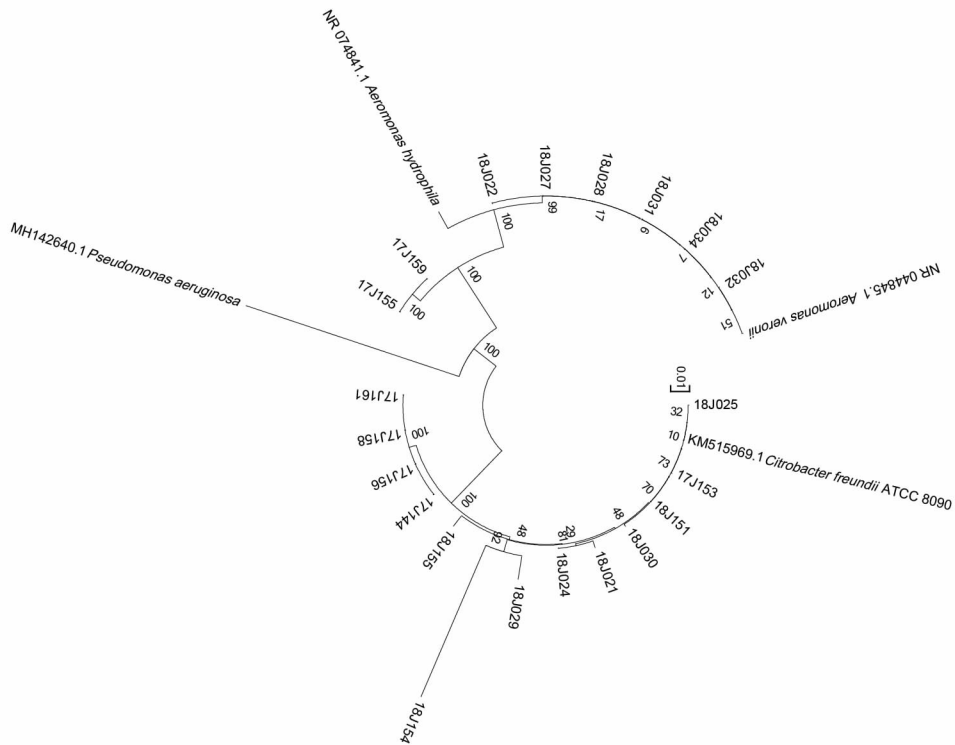


图 1 费氏柠檬酸杆菌和维氏气单胞菌基于 16S rRNA 序列构建的系统进化树

Fig. 1 Construction of phylogenetic tree based on 16S rRNA sequence of *Citrobacter freundii* and *Aeromonas veronii*

菌也是一种重要的人-兽-鱼的重要病原菌,可引起水产动物的腹水病,引起人类腹泻和食物中毒<sup>[14]</sup>。目前乙酰外杆菌、哈夫尼亚菌、鲁氏耶尔森菌并没有出现报道致病水产动物的病例,卢玉婷等<sup>[15]</sup>从鲤鱼中分离鉴定出肺炎克雷伯氏菌。

陈红莲等<sup>[2]</sup>和彭博文等<sup>[1]</sup>研究表明费氏柠檬酸杆菌对

恩诺沙星和新霉素敏感,对四环素和复方新诺明中度敏感。维氏气单胞菌对磺胺异噁唑、氟苯尼考、新霉素、多西环素等药物高度敏感,其药敏结果与该药敏试验结果相一致。

笔者从安徽省 6 个县患病克氏原螯虾中分离到 30 株细菌,鉴定出 8 种疑似病原菌。虽然氟苯尼考或恩诺沙星敏感

性较高,但也有 20% 分离株有耐药性。因此,在水生动物病害防控时,进行药敏试验非常有必要。

表 2 纸片法测定分离株药敏试验结果

Table 2 Results of drug sensitivity test of isolate strains determined by disk method

药物 Drug	敏感 Sensitive	中敏 Intermediately sensitive	耐药 Tolerant
复方新诺明 Compound sulfamethoxazole	19	2	9
恩诺沙星 Enrofloxacin	18	6	6
氟苯尼考 Florfenicol	23	1	6
多西环素 Doxycycline	16	12	2
新霉素 Neomycin	14	12	4

表 3 微量肉汤法测定的分离株药敏试验结果

Table 3 Results of drug sensitivity test of isolated strains determined by microbroth method

药物 Drug	敏感 Sensitive	中敏 Intermediately sensitive	耐药 Tolerant
磺胺甲噁唑 Sulfamethoxazole	16	10	4
恩诺沙星 Enrofloxacin	22	1	7
氟苯尼考 Florfenicol	17	4	9
多西环素 Doxycycline	15	6	9
硫酸新霉素 Neomycin sulfate	15	7	8

(上接第 63 页)

生长造成影响<sup>[8]</sup>。过量的重金属会阻碍植物叶绿素的合成与分解,降低细胞内叶绿素的含量,对幼苗生长初期正常的光合作用造成损害<sup>[13]</sup>。该试验表明一定浓度的重金属 Ni (6.25 mg/kg) 和 Pb (2.58 和 5.15 mg/kg) 可以促进散叶生菜地上生物量的积累。鲁艳等<sup>[14]</sup>利用镍胁迫对 7 种旱生植物种子萌发及幼苗生长的影响研究镍对幼苗生长产生抑制作用,而且浓度越高,抑制作用就越明显,这与该研究的结论基本一致。

土壤中过量的重金属镍和铅能够抑制散叶生菜种子萌发和幼苗生长,同时也会影响产量和人体健康。因此,在设施蔬菜种植过程中需要严格控制镍和铅等重金属的含量,建立长期有效的监测预警机制,同时对于已产生毒害效果的蔬菜采取相应补救措施,减轻损失,降低风险。

#### 4 结论

(1) 低浓度的 Ni 处理 (6.25 mg/kg) 对于散叶生菜的发芽率、发芽势、发芽指数均起促进作用,当浓度增高为 12.50~75.00 mg/kg,则逐渐转变为抑制作用,且浓度 >75.00 mg/kg 时抑制作用更明显,甚至出现绝收的现象。

(2) 当土壤 Pb 含量为 2.58~10.30 mg/kg 时,可以促进其萌发过程。当浓度为 31.02~51.49 mg/kg 时,萌发受到明

#### 参考文献

- [1] 彭博文,杨移斌,艾晓辉,等.克氏原螯虾源维氏气单胞菌分离鉴定及药敏特性研究[J].海洋湖沼通报,2018(4):108-114.
- [2] 陈红莲,宋光同,何吉祥,等.克氏原螯虾弗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.
- [3] WANG W, GU W, DING Z F, et al. A novel *Spiroplasma* pathogen causing systemic infection in the crayfish *Procambarus clarkia* (Crustacea: Decapod), in China [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, 249(1): 131-137.
- [4] 朱若林,马腾,陈露,等.鳙鱼维氏气单胞菌的分离鉴定及其毒力基因检测[J].安徽农业大学学报,2017,44(2):229-233.
- [5] 刘玉庆,李璐璐,骆延波,等译. EUCAST 欧盟药敏试验标准[S].北京:中国质检出版社,2016:3-20.
- [6] 陆承平.致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述[J].水产学报,1992,16(3):282-288.
- [7] 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.
- [8] 周加利.柠檬酸杆菌 O 抗原基因簇 RFLP 分型及 5 个 O 血清型基因簇的破译[D].天津:南开大学,2011:6-16.
- [9] 吕爱军,胡秀彩,朱静榕,等.弗氏柠檬酸杆菌感染诱导斑马鱼皮肤免疫相关基因的差异表达[J].水产学报,2012,36(3):359-366.
- [10] 王利,魏勇.鲫鱼弗氏柠檬酸杆菌的鉴定及系统发育分析[J].水产科学,2012,31(8):481-484.
- [11] 沈锦玉,顾志敏,潘晓艺,等.红螯螯虾弗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.
- [12] 彭开松,余锐萍,杨玉荣,等.鸡  $\beta$ -防御素 13 对尼罗罗非鱼生长和疾病抗性的影响[J].中国兽医科学,2009,39(5):432-436.
- [13] JANDA J M, ABBOTT S L. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection [J]. *Clinical microbiology reviews*, 2010, 23(1): 35-73.
- [14] 张玉晴.拟态弧菌模拟表位的串联表达及其对草鱼的免疫应答研究[D].合肥:安徽农业大学,2013.
- [15] 卢玉婷,郑丹丹,胡扬扬,等.鲤鱼肺炎克雷伯氏菌分离与鉴定[J].中国兽药杂志,2014,48(9):9-13.

显的抑制作用。同时重金属 Ni 对散叶生菜生长状况的影响程度要大于 Pb。

#### 参考文献

- [1] 黄昌勇,徐建明.土壤学[M].北京:中国农业出版社,2000.
- [2] 周启星,宋玉芳.污染土壤修复原理与方法[M].北京:科学出版社,2004.
- [3] 骆永明,滕应.我国土壤污染退化状况及防治对策[J].土壤,2006,38(5):505-508.
- [4] 王正根.蔬菜营养与品质[M].北京:科学出版社,2009.
- [5] 陈俭霖,史公军.城郊菜地土壤和蔬菜重金属污染研究进展[J].北方园艺,2005(3):8-9.
- [6] 邹邦基.镍在植物生活中的作用[J].植物生理学通讯,1982(1):22-27.
- [7] 张西科,张福锁,李春欣.植物生长必需的微量营养元素——镍[J].土壤,1996(4):176-179.
- [8] 夏立江,王宏康.土壤污染及其防治[M].上海:华东理工大学出版社,2007.
- [9] 马永刚.铅污染现状、原因及对策[J].中国资源综合利用,2001(2):26-28.
- [10] 宗良纲,孙静克,沈倩宇,等. Cd、Pb 污染对几种叶类蔬菜生长的影响及其毒害症状[J].生态毒理学,2007,2(1):63-68.
- [11] 陈丁红.种子发芽势对作物田间出苗率的重要性探讨[J].中国种业,2012(3):49-50.
- [12] 王海华,康健,曾富华,等.高浓度镍对水稻幼苗生长及酶活性的影响[J].作物学报,2001,27(6):953-957.
- [13] LUSK C H. Leaf area accumulation helps juvenile evergreen trees tolerate shade in a temperate rainforest [J]. *Oecologia*, 2002, 132: 188-196.
- [14] 鲁艳,何明珠,马全林,等.镍胁迫对 7 种旱生植物种子萌发及幼苗生长的影响[J].种子,2009,28(6):26-29,33.