

红螯螯虾弗氏柠檬酸杆菌病原的分离与鉴定

沈锦玉, 顾志敏, 潘晓艺, 周保中, 尹文林, 曹 铮

(浙江省淡水水产研究所, 浙江 湖州 313001)

摘要:从濒死的红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)的肝胰脏中分离得到可疑病菌 L1 和 L2, 经细菌学鉴定 2 株细菌均为弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*); 经人工感染试验证实 L1 和 L2 均导致健康虾发病死亡, 其 LD_{50} 分别为 2.2×10^5 CFU/ind, 7×10^5 CFU/ind; 2 株细菌对 14 种药物的敏感性相似, 对 9 种抗生素敏感, 对 5 种抗生素有抗性。从中筛选出有效药物, 应用于生产中取得了较好效果。

关键词:红螯螯虾; 弗氏柠檬酸杆菌; 病原; 药敏试验

中图分类号:S943.211 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)02-0197-04

红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)俗称澳洲淡水龙虾, 属甲壳纲、十足目、长尾亚目、拟螯虾科、光壳虾属, 原产地澳大利亚, 具有个体大、生长快、食性杂、易饲养等养殖性能优势。其肉味鲜美, 富含低胆固醇蛋白质, 是目前世界上较名贵的淡水经济虾之一。目前, 美国、法国、西班牙、南非和东南亚的一些国家引进了此虾, 并进行工厂化育苗及养殖。中国国内最早于 1992 年进行养殖, 并在繁殖生物学、自然水温育苗、室内工厂化育苗等方面进行了初步研究。有关红螯螯虾病害的研究较少, 国内外仅报道了红螯螯虾的寄生虫病^[1-4]。有关此虾的细菌性病原的研究未见报道。本研究主要针对养成阶段红螯螯虾的细菌性疾病进行分析, 着重对细菌的分离、生理生化特性、致病性等作一报道, 以期为该病的防治提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源

患病红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)来源于湖州某温室养殖场。健康虾购于湖州某养殖场, 体重 10~20 g, 健康虾在室内暂养 7 d, 无异常, 进行实验。

1.2 细菌分离

从患病虾的肝胰脏、血、肌肉等组织取样进行琼脂平板划线分离。所用培养基为普通营养肉汤及脑心浸液培养基(BHI)。培养温度为 28~30 ℃, 培养 1~2 d 后挑选优势菌落进行琼脂平板上划线分离数次, 获得纯培养物后, 用含 15% 甘油的生理盐水保存于 -80 ℃ 低温冰箱备用。

1.3 细菌分类鉴定

纯培养的细菌经 28~30 ℃、18~20 h 平皿培养物作革兰氏染色, 进行细菌形态观察, 生理生化特性测定参照 API 20E 系统进行^[5]。

1.4 药物敏感试验

药物纸片购自浙江省军区后勤部, 共 14 种抗菌药物, 参照纸片法抗菌药物敏感试验操作标准进行^[6]。并筛选敏感药物进行防病试验。

1.5 感染试验

1.5.1 细菌感染试验 取 1.2 中所得细菌, 将细菌浓度分别制成 7×10^7 CFU/mL, 7×10^6 CFU/mL, 7×10^5 CFU/mL。每组 10 只虾, 肌节间注射菌液 0.1 mL/只, 对照组注射无菌生理盐水, 剂量同试验组。饲养水温 22~24 ℃。按 Reed 和 Muench 氏法^[7]计算 LD_{50} 。

1.5.2 组织滤液感染试验 用同批病虾的肝胰脏 10 倍稀释的匀浆液, 经高速台式离心机以 6 000 r/min, 5 min 及 10 000 r/min, 10 min 离心, 再经 0.22 μm 滤膜过滤的除菌滤液, 肌节间注射 0.1 mL/只, 每组 5 只, 其余同上。

2 结果

2.1 症状

浙江省湖州某温室(水温 19~21 ℃)养殖场, 于 2003 年 11 月发生螯虾死亡(体重 10~20 g), 死亡虾中, 有的虾的尾部似肉质样肿胀, 时间一长便结有疤痕; 有的虾有烂尾; 有的则没有肉眼可见的外表症状。剥离头胸甲, 肝胰脏呈淡黄色到棕黄色。

收稿日期: 2004-06-01; 修订日期: 2004-11-01。

作者简介: 沈锦玉(1963-), 女, 副研究员, 主要从事水生动物病害防治研究。E-mail: sjy@126.com

2.2 细菌分离

从不同颜色肝胰腺虾的心脏(血液)、肝胰腺、肌肉等处用普通培养基及BH11分离,从肌肉处未分离到细菌,从心脏(血液)、肝胰腺等处分离到大量较纯的菌落,挑选肝胰腺在普通培养基及BH11培养基生长的色泽一致、形态一致的优

势菌落(L1,L2)进行多次划线分离,纯培养,保存。
2.3 人工感染试验
2.3.1 细菌感染试验 对L1、L2菌株人工感染试验的结果见表1。

表1 红螯螯虾感染细菌后的死亡情况(n=10)
Tab.1 Challenge test of red claw crayfish with bacteria(n=10)

菌株 Strain	死亡时间/h Death time	细菌感染剂量/(CFU·ind ⁻¹) Dose			对照 Control	LD ₅₀ /(CFU·ind ⁻¹)
		7×10 ⁵ /ind	7×10 ⁵ /ind	7×10 ⁵ /ind		
L1	4~22	6	5	0	0	2.2×10 ⁵
	22~136	4	2	3	0	
L2	4~22	4	2	0	0	7×10 ⁵
	22~136	6	3	0	0	

2.3.2 组织滤液感染试验 从分离到上述菌的同批肝胰腺的组织滤液感染健康虾时,观察20 d,不引起发病或死亡。
2.4 细菌分类鉴定
经18~20 h平板培养的L1与L2细菌,进行氧化酶、O/F试验,两菌株为氧化酶阴性及发酵型,因此属肠杆菌科细菌,

其生理生化性状见表2。
这2株菌均为革兰氏阴性,短杆状,能运动,在普通琼脂平皿上,菌落圆形,微凸,表面光滑,边缘整齐,肉色,结合表2的生理生化特性。这2株菌鉴定结果均为弗氏(弗劳地)柠檬杆菌(*Citrobacter freundii*)。

表2 L1、L2菌株的生理生化性状
Tab.2 Physiological and biochemical characterizations of L1 and L2

鉴定项目 Characteristics	L1	L2	弗氏柠檬酸杆菌 <i>Citrobacter freundii</i>	鉴定项目 Characteristics	L1	L2	弗氏柠檬酸杆菌 <i>Citrobacter freundii</i>
革兰氏染色 Gram stain	-	-	-	明胶酶 Gelatinase	-	-	-
氧化酶 Oxidase	-	-	-	V-P	-	-	-
O/F	F	F	F	吲哚 Indole	-	-	-
葡萄糖产气 Gas from glucose	+	+	+	葡萄糖 Glucose	+	+	+
运动性 Motility	+	+	+	肌醇 Inositol	-	-	-
β-半乳糖苷酶 β-galactosidase	+	+	+	甘露糖 Mannose	+	+	+
精氨酸双水解酶 Arg dihydrolase	-	-	d	蜜二糖 Melibiose	+	+	d
赖氨酸脱羧酶 Lys decarboxylase	-	-	-	鼠李糖 Rhamnose	+	+	+
鸟氨酸脱羧酶 Orn decarboxylase	-	-	-	苦杏仁苷 Amygdalin	+	+	+
柠檬酸盐 Citrate	+	+	+	山梨醇 Sorbitol	+	+	+
H ₂ S	+	+	+	蔗糖 Saccharose	+	+	d
脲酶 Urease	-	-	d	木糖 Xylose	+	+	+
色氨酸 Tryptophane	-	-	-	阿拉伯糖 Arabinose	+	+	+
苯丙氨酸 Phenylalanine	-	-	-	棉籽糖 Raffinose	+	+	d
葡萄糖酸盐 Gluconate	-	-	-	侧金盏花醇 Adonitol	-	-	-

2.5 药物敏感试验

从药敏试验结果可看出,L1与L2对14种药的敏感性相似,对复方新诺明、庆大霉素、丁胺卡那、卡那霉素、氯唑酸、新霉素、氯霉素敏感,对先锋V、链霉素中度敏感,对痢特灵、强力霉素、青霉素G、四环素、红霉素有抗药性。
从上述药敏试验中选择对L1和L2均敏感的丁胺卡那按质量分数0.1%拌于红螯螯虾的饲料中,连续投喂5 d,同

时投酒三氯异氰尿酸0.3 mg/L消毒,1星期后死亡逐渐减少,收到了较好的治疗效果。
3 讨论
3.1 弗氏柠檬酸杆菌病原
弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)为沙门氏菌属中柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)的代表菌^[8]。该菌为革兰氏阴

性杆菌,需氧或兼性厌氧,为人和动物肠道的正常菌群,和大肠菌群一样,可视为粪便污染的卫生学指标。其常作为条件致病菌^[9],广泛分布于自然界,常见于食物、人类和尿液,也可寄生于肠道。文献报道^[10-14],某些毒力很强的菌株可导致人类患肠炎、脑膜炎、脑脓肿、败血症等。1946年 Barnes等^[15]就曾报告过弗氏柠檬酸杆菌与人类腹泻有关,此后 Baylet等^[16]及 Wadstrom^[17]也分别有过报告,1987年 Alfredo等^[18]分离出产生耐热性肠毒素的菌株,初步认定其是引起腹泻的病原菌之一;国内这方面的报道较少,近年也有学者针对弗氏柠檬酸杆菌与腹泻的关系开展了一些研究,认为弗氏柠檬酸杆菌与小儿腹泻有关^[19]。

柠檬酸杆菌导致水产动物患病死亡的病例较少,经文献查阅,李华等^[20]首次报道弗氏柠檬酸杆菌是河蟹的致病菌;李本旺等^[21]首次报道布氏柠檬酸杆菌引起中华鳖口腔溃烂综合症。本研究认为,弗氏柠檬酸杆菌是红螯螯虾的致病菌。经多次人工感染试验证实,菌株的毒力很强;用人工感染发病的虾体内分离出的该病菌再感染健康虾,也导致红螯螯虾患病死亡。

3.2 弗氏柠檬酸杆菌防治

对药物的敏感与否是细菌的特征之一。虽然实验中使用了国家禁用的药物如氯霉素、红霉素、痢特灵等,其目的只是为说明细菌对这些药的敏感度。但另一方面可根据药敏实验结果有针对性的选择药物,结合国家允许的渔用药物^[22],指导养殖户采用适当药物如三氯异氰尿酸杀灭池水中的病原菌,减少病害的发生。

参考文献:

- [1] Herbert B. Notes on diseases and epibionts *Cherax quadricarinatus* and *Cherax tenuimanus* (Decapoda: Parastacidae) [J]. Aquaculture, 1987, 64: 165-173.
- [2] Jones T C, Lester R J G. The life history and biology of *Dicerocephala boeckhii* (Platyhelminthes: Trematoccephalida), an ectosymbiont on the redclaw crayfish *Cherax Quadricarinatus* [J]. Hydrobiologia, 1992, 248: 193-199.
- [3] Mills B J. A review of the diseases of freshwater crayfish, with particular reference to the yabby (*Cherax destructor*) [J]. Fish Res Pap, 1983, 9: 1-18.
- [4] 吴志新, 陈孝煊, 林娟娟. 澳大利亚红螯螯虾体表切头虫 (*Dicerocephala* sp.) 的初步研究 [J]. 水产科技情报, 1998, 25(1): 14-16.
- [5] Brooks K A, Jens M, Sodeman T M. A clinical evaluation of the API microtube system for identification of *Enterobacteriaceae* [J]. Am J Med Techn, 1974, 40: 55-61.
- [6] 姜永新. 临床细菌检验与质量控制 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1987. 120-129.
- [7] 黄植祥, 洪涛, 刘崇柏. 医学病毒学基础及实验技术 [M]. 科学出版社, 1987. 143-144.
- [8] 王道岩. 微生物学 [M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 1998. 164.
- [9] 刘恭植. 微生物学和微生物学检验 [M]. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1994. 172-174.
- [10] 纪新梅. 小儿枸橼酸杆菌性肠炎 110 例临床分析 [J]. 中华医院感染杂志, 1997, 7(2): 95.
- [11] 孙晓春. 新生儿弗劳地枸橼酸杆菌肺炎并阻塞性肺积水 1 例 [J]. 中国现代医学杂志, 1997, 7(1): 46.
- [12] 刘明娟. 枸橼酸杆菌肠炎 26 例临床分析 [J]. 实用儿科临床杂志, 1991, 6(3): 128-129.
- [13] 周文华, 刘俊凌, 冯子, 等. 25 例枸橼酸杆菌肠炎临床分析 [J]. 中华流行病学杂志, 1998, 19(4-B): 164-165.
- [14] 余德文. 弗劳地枸橼酸杆菌败血症 10 例报告 [J]. 云南医药, 1991, 12(4): 348-349.
- [15] Barnes L A, Cherry W B A. A group of paracolon organism having apparent pathogenicity [J]. Am J Public Health, 1946, 36: 481-483.
- [16] Baylet R J, Linahard J. Paracoli bethesda (citrobacter) et escherichia freundii en pathologie dakaroise [J]. Bull Soc Path Exot, 1959, 52: 723-726.
- [17] Wadstrom T, Aust-kettis A, Habte D, et al. Enterotoxin producing bacteria and parasites in stools of Ethiopian children with diarrhea disease [J]. Arch Dis Child, 1976, 51: 865-870.
- [18] Alfredo Guarino. Production of escherichia coli STa-like heat-stable enterotoxin by citrobacter freundii isolated from humans [J]. J Clin Microbiology, 1987, 25(1): 110-114.
- [19] 张乐海, 马丽霞, 傅云霜, 等. 弗劳地枸橼酸杆菌基因种与小儿腹泻关系、耐药性的研究 [J]. 中国微生态学杂志, 2000, 12(1): 23-26.
- [20] 李华, 邢殿楼, 白国福, 等. 弗氏柠檬酸杆菌对河蟹致病性的研究 [J]. 水生生物学报, 2001, 25(3): 217-223.
- [21] 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.
- [22] NY5071-2002, 无公害食品、渔用药物使用准则 [S].

Isolation and identification of *Citrobacter freundii* from *Cherax quadricarinatus*

SHEN Jin-yu, GU Zhi-min, PAN Xiao-yi, ZHOU Bao-zhong, YIN Wen-lin, CAO Zheng
(Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China)

Abstract: Red claw cray fish (*Cherax quadricarinatus*) were widely cultured in America, France, Spain, South Africa and some south east Asian countries. This species was introduced into China in 1992. For so many years seldom research was reported on its bacterial pathogen in China. In November 2003, mass death of red claw cray fish in Huzhou fishery farms, Zhejiang Province, broke out. The bacteria strains L1 and L2 were isolated from hepatopancreas of the moribund red claw crayfish and identified by bacteriological method, which were identified as *Citrobacter freundii*. The LD₅₀ of L1 and L2 were 2.2×10^5 CFU·ind⁻¹ and 7×10^5 CFU·ind⁻¹ respectively when the health crayfish at body weight 10–20 g were injected by these two strains. The sensitivities of the two strains to antibiotics were similar. L1 and L2 were sensitive to nine kinds of antibiotics and resistant to five kinds of antibiotics. Effective medicine was screened through medicinal sensitive test to the pathogen from 14 kinds of medicines, and their curative effect was observed in production.

Key words: *Cherax quadricarinatus*; *Citrobacter freundii*; pathogen; medicinal sensitive test

信 息 服 务

中国水产科学研究院渔业信息研究中心是专业从事水产信息研究和服务的科研机构,愿竭诚为广大水产企业、事业单位和个人提供信息服务,内容包括:国内外渔业相关技术文献、专利、市场信息查询和咨询。

联系人:邵 萍 E-mail: shp@cafs.ac.cn

通讯地址:北京市永定路南青塔村 150 号中国水产科学研究院渔业信息研究中心

邮 编:100039 电话:010-68673921