

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

阎斌伦^{1*}, 张晓君¹, 梁利国^{1,2}, 杨维², 杨家新²

(1. 淮海工学院江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005;

2. 南京师范大学生命科学院, 江苏 南京 210046)

摘要: 2009年10月江苏赣榆地区某养殖场养殖的三疣梭子蟹出现大量死亡, 症状主要表现为: 病蟹行动缓慢、不摄食, 蟹体消瘦, 打开头胸甲可见肝胰腺、鳃、肌肉等内脏组织水肿, 部分肝胰腺和肌肉组织呈腐烂状。从患病梭子蟹肌肉、肝胰脏、体内积液中分离到大量优势生长的细菌。人工感染试验, 证明分离菌(JG091120-1)对健康三疣梭子蟹具有很强的致病性。对分离菌进行了形态特征、理化特性等常规表型生物学检验, 同时利用分子生物学方法测定了代表菌株的16S rRNA和gyrB基因序列, 其中分离菌16S rRNA基因序列长度为1451 bp(登录号HQ170626), gyrB基因序列长度为1186 bp(登录号HQ170627), 分析了16S rRNA和gyrB两种基因序列的同源性。根据分离菌的表型及分子生物学特性, 判定该菌为肠杆菌科枸橼酸属的弗氏柠檬酸杆菌。定居因子抗原cfa是肠杆菌科产肠毒素细菌的一种重要致病因子, 利用特异性引物进行cfa基因的PCR扩增, 分离菌可以扩增出大小在100 bp的基因片段, 表明本次分离的病原弗氏柠檬酸杆菌具有cfa毒力因子。

关键词: 三疣梭子蟹; 弗氏柠檬酸杆菌; 16S rRNA; gyrB; cfa

中图分类号: S 917; Q 93-331; Q 939.91

文献标志码: A

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)又称梭子蟹、枪蟹、海螃蟹, 隶属于甲壳纲(Crustacea), 十足目(Decapoda), 梭子蟹科(Portunidae), 梭子蟹属(*Portunus*), 广泛分布于中国、日本、朝鲜及马来西亚群岛等海域^[1], 是一种食用与药用价值较高的大型海产经济蟹类, 1981年被列为我国海洋水产养殖对象, 现已成为中国沿海地区重要的养殖蟹类。

从20世纪50年代开始, 国内外学者相继对三疣梭子蟹生活习性、胚胎发育、超微结构观察和核型分析等方面做了广泛的研究^[2-4], 有关三疣梭子蟹疾病的研究, 许文军等^[5]于2004年曾报道在浙江舟山地区养殖梭子蟹发生“牛奶病”导致大量死亡的情况, 并进行了病原的分类鉴定, 确定为血卵涡鞭虫(*Hematodinium*)。王国良等^[6]对

三疣梭子蟹肌肉乳化病病原菌进行分离及致病性研究, 经证实为溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)和葡萄牙假丝酵母菌(*Candida lusitanae*)共同感染。王高学等^[7]报道恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)可导致三疣梭子蟹暴发疾病, 并对其病原性和生物学特性进行了研究, 此外一些学者报道过三疣梭子蟹黑鳃病^[8]、甲壳溃疡病^[9]、才女虫病和阿脑虫病等。

2009年10月至11月江苏赣榆沿海养殖的梭子蟹出现大规模死亡, 发病非常迅速, 传播面积很广, 死亡率高达40%。病蟹主要症状为蟹体消瘦, 不摄食、行动缓慢, 掀开头胸甲可见肝胰腺、肌肉组织水肿, 并有大量浑浊的积液, 严重者肌肉糜烂并伴有腐臭的气味。通过光学显微镜观察排除真菌及寄生虫感染。本研究利用从病死蟹体内分离得

收稿日期: 2010-09-23 修回日期: 2011-12-05

资助项目: 国家“十一五”科技支撑计划重大项目(2006BAD09A01); 连云港市科技攻关项目(CG0907)

通讯作者: 阎斌伦, E-mail: yanbinlun@yahoo.com.cn

到的优势菌株对健康梭子蟹进行人工回感试验以确定其致病性,并采用常规的细菌表型特征及生理生化特性测定并结合分子生物学 16S rRNA 和 *gyrB* 两对基因序列的系统发育学分析等方法对病原菌进行了分类鉴定;同时针对肠杆菌科细菌的主要毒力因子——定居因子抗原 *cfa* 基因进行了检测,同时对病原菌进行了耐药性试验,以期能为三疣梭子蟹病原多样性研究及进一步查清其发病机理、传播途径及有效的防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 病原菌的分离纯化方法

材料来源 病蟹样品于发病高峰期取自连云港赣榆地区某三疣梭子蟹养殖场。所检病蟹头胸甲宽度为 10~13 cm,体质量为 160 g。病蟹主要症状为行动迟缓、不摄食,打开头胸甲可见体腔内积有大量浑浊液体,肝胰腺及肌肉等内脏组织轻度糜烂,鳃丝发白并伴有杂物。

细菌的分离纯化 无菌操作取患病梭子蟹病灶组织,分别以其肝胰腺、肌肉、淋巴液为材料,划线接种于普通营养琼脂培养基,28℃培养 24 h 做细菌分离,结果所检的 10 只病蟹均分离到菌落数量分布不等但大量优势生长的菌落。代表菌株编号为 JG091120-1。

1.2 人工感染试验

试验材料 健康梭子蟹购自连云港赣榆佳信水产开发有限公司,平均体质量为 50 g,头胸甲长 8~10 cm,饲养于实验室养殖槽中。健康的三疣梭子蟹大眼幼体、幼蟹 I~III 期,暂养于实验室。取分离得到的纯培养菌株 JG091120-1 作为供试菌做致病性试验,无菌操作接种于普通营养肉汤中,28℃恒温培养 18 h,制成菌悬液。试验共设 5 组菌液浓度梯度,分别为 3×10^8 、 3×10^7 、 3×10^6 、 3×10^5 、 3×10^4 CFU/mL。试验分为成蟹注射感染、创伤浸泡感染和对照组及幼苗(大眼幼体及 I~III 期幼蟹)的浸泡感染和对照组。

成蟹注射感染 试验用蟹选用暂养 1 周后的健康梭子蟹,每组梯度菌液经第 3 步足关节薄膜处接种于 8 只健康梭子蟹,每只梭子蟹接种 0.1 mL;同时设立接种同剂量、同批无菌营养肉汤作为对照。

成蟹创伤浸泡感染 利用灭菌解剖刀将梭子蟹第 3 步足划破,直接浸泡于各浓度的菌液中,

对照组直接划破置于清洁过滤海水中暂养。试验梭子蟹均隔离养殖于试验水族箱中,每 2 小时进行一次观察,并记录其感染后的发病与死亡情况,并对感染发病的梭子蟹均在无菌操作下进行细菌的再分离培养,以引起试验梭子蟹发病死亡并能重新分离回收到原感染菌作为分离菌致病性的判定标准。

大眼幼体及幼蟹浸泡感染 供试验用的菌液浓度仍为上述 5 组梯度,每组梯度放置大眼幼体 30 尾,每组设置 3 个平行。I~III 期幼蟹也按照此方法进行试验。对照组同样投放 30 尾大眼幼体和对应的各期幼蟹并加入等量的灭菌海水。每隔 1 小时观察记录死亡情况。

1.3 细菌形态特征观察和理化特性检查

取纯培养菌 JG091120-1 进行革兰氏染色镜检形态。同时将供试菌株接种于普通营养琼脂培养基、2216E 海水培养基及 TCBS 培养基中,28℃培养 24 h 观察生长情况。将供试菌株无菌操作接种于细菌理化特性反应管中,按照常规方法进行硝酸盐还原、O-F 试验、V-P、MR 试验、氧化酶反应及糖(醇、苷)类代谢等较系统的理化特性测定。细菌各项生理生化指标的测定参照《伯杰氏细菌鉴定手册》^[10](第九版)和《常见细菌系统鉴定手册》^[11]中的方法进行。

1.4 细菌的分子鉴定

PCR 模板 DNA 制备 水煮法提取 DNA 模板,主要步骤:取纯培养细菌接种于普通营养肉汤中 28℃培养 18 h,吸取 2 mL 置于离心管,12 000 r/min 离心 2 min 弃上清,用 100 μL 灭菌双蒸水将沉淀悬起之后于 100℃水浴锅内煮沸 10 min 冰浴冷却,再煮沸 10 min 后于 4℃12 000 r/min 离心 10 min,上清液即为模板 DNA,于 -20℃冰箱保存备用。

16S rRNA、*gyrB* 基因序列的 PCR 扩增与测序 16S rRNA 和 *gyrB* 两种基因序列的 PCR 扩增方法参照张晓君等^[12]的方法进行。利用生物工程(上海)有限公司的 DNA 快速纯化试剂盒进行 PCR 产物的回收纯化。纯化产物直接送至上海生工进行测序分析。

16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列同源性分析 将菌株 JG091120-1 的 16S rRNA 基因和 *gyrB* 基因序列通过 NCBI 的 BLAST 检索系统进行序列同源性分析,并使用 ClustalX 2.0 软件与从

GenBank 数据库中获得的核酸序列相似性较高的菌株序列进行多序列比对,并进行序列同源性分析。

1.5 定居因子抗原 *cfa* 基因检测

检测定居因子抗原 *cfa* 基因的 PCR 扩增的正向引物序列 Crt4F: 5'-TCCAGCGCATTCA-3'; 反向序列 Crt4R: 5'-TCCAGCCTTCGGCAAACG-3'^[13]。20 μ L 体积; 灭菌双蒸水 13.5 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 2 μ L, 1.5 mmol/L MgCl₂ 2 μ L, 4 \times dNTP 混合液 0.5 μ L, 引物各 0.1 μ L, 5 U/ μ L 的 *Taq* DNA 聚合酶 0.3 μ L, 模板 1.5 μ L。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 15 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60.5 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 温育 8 min。之后将产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析。实验所用菌株包括本次分离鉴定的弗氏柠檬酸杆菌 (JG091120-1)、嗜水气单胞菌 (分离自东方虾)、鳃利斯顿氏菌 (分离自半滑舌鳎)、副溶血弧菌 (分离自凡纳滨对虾)、温和气单胞菌 (分离自泥鳅)、哈氏弧菌 (分离自矛尾复虾虎鱼)。

1.6 病原菌耐药性试验

采用常规琼脂扩散 (纸片) 法对经过鉴定的菌株进行 43 种常用抗生素的耐药性检测。于 28 $^{\circ}$ C 培养 16 h 后进行观察并记录抑菌结果, 根据抑菌圈的大小判断病原菌对药物的敏感程

度^[14]。所用药敏纸片均购自杭州天和微生物有限公司。

2 结果

2.1 病原菌菌落和形态观察及培养特性

病原菌在普通营养琼脂平板上其菌落特征为圆形、表面光滑、边缘整齐、中央稍隆起、不透明或半透明、淡黄色, 培养 24 h 检查直径多在 1.5 mm 左右, 生长丰盛; 纯培养菌在 2216E 海水培养基上的菌落特征与在普通营养琼脂培养基上的基本一致, 生长良好。然而纯培养菌在 TCBS 培养基上不生长。革兰氏染色结果显示, 被检细菌为革兰氏阴性、短杆状、散在、两端钝圆。在普通营养肉汤中 28 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 呈均匀混浊生长, 试管底有点状菌体沉淀 (摇动后呈线状上升易消散)。

2.2 供试细菌的致病性

对成蟹的致病性 健康梭子蟹成体在人工感染供试菌株后, 短时间内出现死亡情况, 而对照组梭子蟹在实验观察期内均正常未出现死亡, 具体情况见表 1。取感染死亡的梭子蟹进行细菌学检查, 并作革兰氏染色镜检, 结果发现在形态特征上同原感染菌, 而且在死亡梭子蟹内脏组织及淋巴液中再次分离到原感染菌, 再分离的细菌经细菌学特征鉴定, 其性状与原菌株一致。

表 1 JG091120-1 菌株对健康梭子蟹的感染试验

Tab. 1 Challenge test of *P. trituberculatus* with isolate strain JG091120-1

注射组 (CFU/mL) injection	菌液浓度 concentration			浸泡组 immersion		
	试验蟹/只 no. of crab	死亡数/只 no. of dead crab	感染率/% infection	试验蟹/只 no. of crab	死亡数/只 no. of dead crab	感染率/% infection
3×10^8	8	8	100.0	8	8	100.0
3×10^7	8	8	100.0	8	8	100.0
3×10^6	8	7	87.5	8	5	62.5
3×10^5	8	3	37.5	8	2	25.0
3×10^4	8	0	0	8	0	0
对照组 control	8	0	0	8	0	0

对大眼幼体及幼蟹的致病性 各期的梭子蟹幼蟹及大眼幼体在不同浓度的菌液里, 呈现出不同程度的死亡情况, 当菌液浓度较高的 3×10^8 、 3×10^7 CFU/mL 时, 幼苗在短时间 (2~4 h) 即可出现死亡, 而在菌液浓度为 3×10^6 、 3×10^5 CFU/mL 时, 死亡时间延长, 死亡率也降低, 而当

菌液浓度为 3×10^4 CFU/mL 时未出现死亡。而且从致病性结果看出, 随着梭子蟹幼苗的成长, 死亡率呈现小幅度的降低 (表 2)。各组试验中对照组梭子蟹及幼苗均未出现死亡现象。由此可以证实分离菌 JG091120-1 菌株为梭子蟹大量死亡的病原菌, 并且具有相当强的致病性。

表2 JG091120-1菌株对健康梭子蟹幼苗的感染试验
Tab.2 Challenge test of juvenile *P. trituberculatus* with isolate strain JG091120-1 %

	大眼幼体 megalopa			I期幼蟹 juvenile crab I			II期幼蟹 juvenile crab II			III期幼蟹 juvenile crab III		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
3×10^8	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100	100.0	100.0	100.0	100.0
3×10^7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
3×10^6	76.7	73.3	73.3	70	73.3	73.3	66.7	63.3	63.3	53.3	56.6	50.0
3×10^5	26.7	26.7	26.7	26.7	26.7	23.3	23.3	23.3	20	16.7	13.3	13.3
3×10^4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
对照组 control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

2.3 病原菌生理生化特性

菌株 JG091120-1 氧化酶阴性; V. P. 反应阴性; 发酵葡萄糖产酸产气; 具有运动性; 还原硝酸盐; 淀粉酶阳性、明胶酶阴性; 利用葡萄糖、麦芽

糖、甘露糖、枸橼酸盐、山梨醇、蜜二糖等, 不利用丙二酸盐、蔗糖、棉子糖、阿拉伯醇、卫茅醇、苯丙氨酸脱氨酶、脲酶等; 具体供试菌主要生理生化特性见表3。

表3 JG091120-1株的生理生化性状
Tab.3 Physiological and biochemical characterizations of isolate strain JG091120-1

特性 character	分离菌 isolates	弗氏柠檬酸杆菌 ^① <i>C. freundii</i>	特性 character	分离菌 isolates	弗氏柠檬酸杆菌 ^① <i>C. freundii</i>
37 °C生长 growth at 37 °C	+	+	β-半乳糖苷酶 ONPG	+	+
氧化酶 oxidase	-	-	丙二酸盐利用 malonate	-	-
接触酶 catalase	+	+	枸橼酸盐利用 citrate	+	+
O-F 试验 O-F test	F	F	醋酸盐利用 acetate	+	+
动力 motility	+	+	酒石酸盐利用 tartrate	+	+
葡萄糖:产酸 glucose, acid production	+	+	粘液酸盐利用 mucate	+	+
产气 gas production	+	+	海藻糖 trehalose	+	+
乳糖 lactose	+	+	棉子糖 raffinose	-	d
麦芽糖 maltose	+	+	果糖 fructose	+	·
甘露醇 mannitol	+	+	蜜二糖 melibiose	+	d
甘露糖 mannose	+	+	纤维二糖 cellobiose	+	d
蔗糖 sucrose	-	d	甲基红 MR test	+	+
阿拉伯糖 arabinose	-	+	V-P 试验 V-P test	-	-
阿拉伯醇 arabitol	-	-	葡萄糖胺 glucosamine	+	+
木糖 xylose	+	+	H ₂ S 产生 H ₂ S production	+	+
半乳糖 galactose	-	+	硝酸盐还原 nitrate reduction	+	+
山梨醇 sorbitol	+	d	α-甲基-D-葡萄糖苷 α-methyl-D-glucoside	-	-
苯丙氨酸脱氨酶 phenylalanine deaminase	-	-	吲哚 indole	-	-
卫茅醇 dulcitol	-	d	淀粉酶 diastase	+	-
胆汁七叶苷 esculin	+	d	DNA 酶 DNase	-	-
苦杏仁苷 amygdalin	-	·	明胶酶 gelatinase	-	-
水杨苷 salicin	-	·	NaCl 0%	+	·
卵磷脂酶 lecithinase	-	·	1%	+	·
脲酶 urease	-	d	3%	(+)	·
KCN 生长 KCN growth	+	+	6%	-	·
鼠李糖 rhamnose	+	-	侧金盏花醇 adonitol	-	-
糊精 oextrin	-	·	赖氨酸脱羧酶 lysine decarboxylase	-	-
肌醇 inositol	-	-			

注: + 示阳性; (+) 示弱阳性; d, 10% ~ 90% 阳性; - 示阴性; F 示发酵型; · 表示在原文中无记载. ①指表中数据取自《Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed》(1994)和《Bacterial Fish Pathogens; Disease of Farmed and Wild Fish》。

Notes: +, positive; (+), weak positive; d, 10% - 90% positive; -, negative; F, ferment; ·, not reported. ① means the data of *C. freundii* come from "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed" (1994) and "Bacterial Fish Pathogens; Disease of Farmed and Wild Fish".

2.4 16S rRNA 和 *gyrB* 基因同源性分析

分离菌(JG091120-1)所扩增的 16S rRNA 基因序列长度为 1 451 bp, 登录号为 HQ170626, 将分离菌所扩增的 16S rRNA 基因序列通过 NCBI 的 BLAST 检索系统 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行序列同源性分析, 所检结果均与枸橼酸属细菌的 16S rRNA 基因序列自然聚类, JG091120-1 菌株与在检索出的弗氏柠檬酸杆菌(登录号 AB548826)相似性最近, 为 99%, 其系统发育树如图 1 所示。

分离菌(JG091120-1)所扩增的 *gyrB* 基因序列长度为 1 186 bp 和登录号为 HQ170627, 将菌

株所扩增的 *gyrB* 基因序列通过 NCBI 的 BLAST 检索系统进行序列同源性分析, 结果检索出的均为肠杆菌科的细菌 *gyrB* 基因序列, 主要包括大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、鲍氏志贺菌 (*Shigella boydii*) 和弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*), 相似性为 91% ~ 97%。其中分离株与弗氏柠檬酸杆菌(登录号 AF005701)相似性最近, 同源性为 97%, 其系统发育树如图 2 所示。

综合供试菌株的表型特征、理化特性及 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列的系统发育分析结果, 判定分离菌为枸橼酸杆菌属 (*Citrobacter*) 的弗氏柠檬酸杆菌。

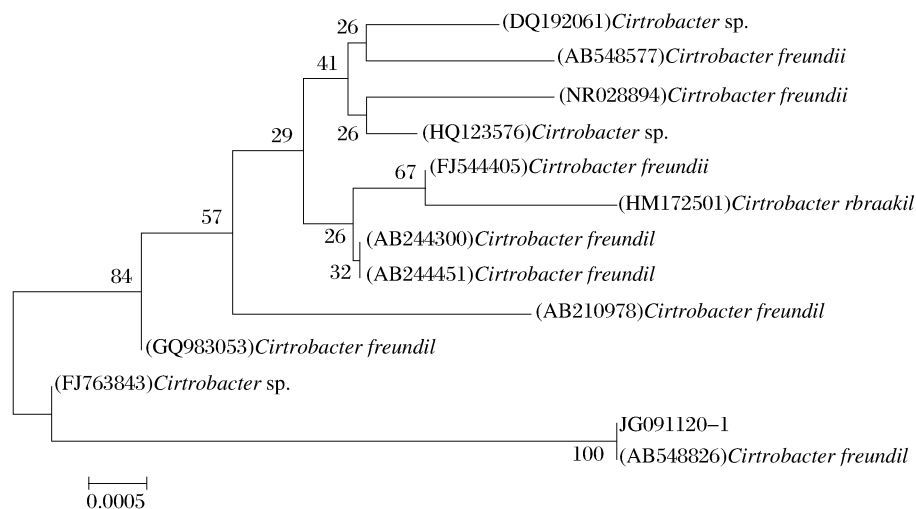


图 1 JG091120-1 株 16S rRNA 基因序列系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on JG091120-1 16S rRNA gene sequences

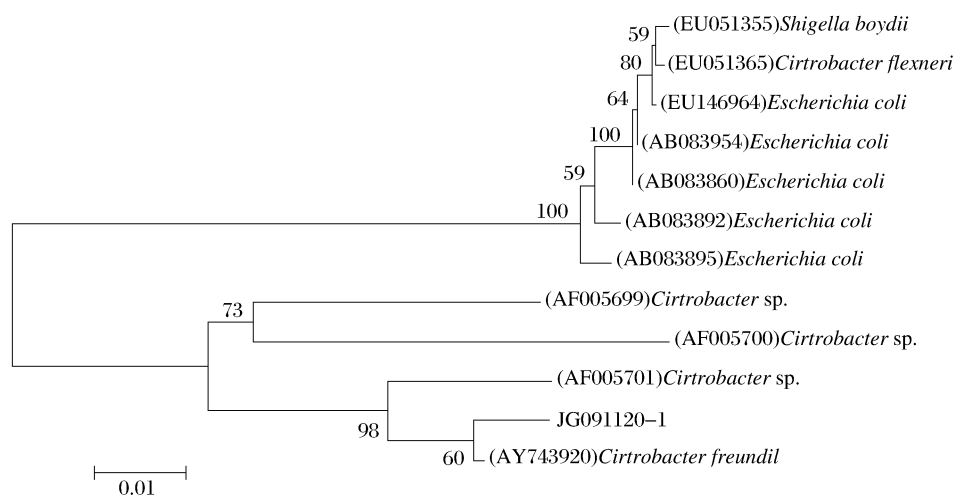


图 2 JG091120-1 株 *gyrB* 基因序列 MP 系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on JG091120-1 *gyrB* gene sequences

2.5 *cfa* 基因检测结果

PCR 扩增结果显示(图 3),分离鉴定的菌弗氏柠檬酸杆菌(JG091120-1)可扩增出一条大小在 100 bp 的特异性条带,结果表明,分离菌具有肠杆菌科产肠毒素细菌所具有的定居因子抗原 *cfa* 毒力因子。供试的其他 5 种水产动物病原菌未检测到该毒力基因。

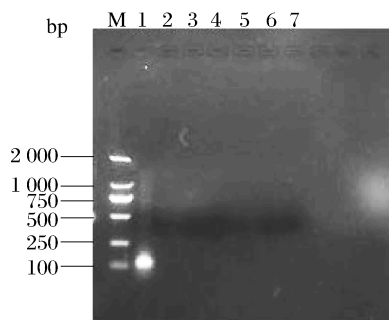


图 3 *cfa* 基因的扩增

M. DL2000 Marker; 1. 菌株 JG091120-1 *cfa* 基因; 2. 对照嗜气单胞菌; 3. 对照温和气单胞菌; 4. 对照哈氏弧菌; 5. 对照副溶血弧菌; 6. 对照曼利斯顿氏菌; 7. 对照灭菌水。

Fig. 3 *cfa* gene amplified by PCR

M. DL2000 Marker; 1. the *cfa* gene of isolated strain JG091120-1; 2. *Aeromonas hydrophila*; 3. *Aeromonas sobria*; 4. *Vibrio harveyi*; 5. *Vibrio parahaemolyticus*; 6. *Listonella anguillarum*; 7. sterile water.

2.6 药敏试验

用 48 种抗生素对致病菌株进行了耐药性试验,具体试验结果为分离菌 JG091120-1 对供试的氟罗沙星、菌必治、环丙沙星、恩诺沙星、依诺沙星、氟哌酸、左氧沙星等 7 种抗生素高度敏感,对舒普深、氨曲南、洛美沙星、羧苄青霉素、复达欣、四环素、庆大霉素、氟苯尼考、痢特灵、强力霉素、红霉素、头孢拉啶、美满霉素、复方新诺明、阿奇霉素、克拉霉素、妥布霉素、链霉素、阿洛西林和米诺环素等 20 种药物敏感,而对青霉素 G、万古霉素、头孢噻酚、苯唑青霉素、氨苄青霉素、麦迪霉素、先锋 V、先锋必、林可霉素、洁霉素、先锋霉素 IV、乙酰螺旋霉素、克林霉素、头孢氨苄、甲氧胺嘧啶、罗红霉素、阿莫西林、吉他霉素、新霉素、青霉素、新生霉素等 21 种药物耐药。

3 讨论

弗氏柠檬酸杆菌隶属肠杆菌科(Enterobacteriaceae)枸橼酸杆菌属(*Citrobacter*)。

该菌革兰氏阴性,需氧或兼性厌氧,为条件致病菌,广泛分布于自然界中,是人和动物(哺乳类、鸟类、爬行类及两栖类)肠道内正常的菌群。国内外关于弗氏柠檬酸杆菌导致水产养殖动物患病死亡的病例不是很多,李华等^[15]首次报道弗氏柠檬酸杆菌可引起河蟹感染败血症,病蟹鳃组织大面积肿胀、坏死。舒新华等^[16]报道了养殖乌鳢(*Ophicephalus argus*)感染弗氏柠檬酸杆菌后引发腹水病,主要表现为突眼,竖鳞,皮下积水,肛门红肿,肝脾肾肿大等症状。沈锦玉等^[17]报道红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)感染该菌后,虾尾部肉质样肿胀或溃烂,肝胰腺棕黄色。同时该菌还可以导致尼罗罗非鱼^[18]、大麻哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)^[19]、牛蛙(*Rana catesbeiana*)^[20]爆发疾病,导致养殖动物大量死亡。

本实验对发生于江苏赣榆地区某养殖场大量病死的养殖梭子蟹进行病原研究。从濒死梭子蟹肌肉、肝胰脏及血淋巴等病变组织分离到大量优势生长细菌,并作纯化培养,经鉴定表明分离菌为同种细菌。人工回感试验证实,分离菌对健康梭子蟹具有较强的致病性,而且从被感染死亡的梭子蟹体内可回收得到单一的原感染菌,由此可证实分离菌为梭子蟹的致病菌。结合常规的细菌学及现代分子生物学鉴定,发现该分离菌为枸橼酸属的弗氏柠檬酸杆菌。本实验一方面对弗氏柠檬酸杆菌引起三疣梭子蟹病害进行了报道,丰富了梭子蟹病害防治的研究内容,同时也进一步表明了该菌在水产养殖动物中的具有致病作用。另一方面,通过本次较系统地弗氏柠檬酸杆菌的鉴定,丰富了该菌在形态特征、培养特性、理化特性等表型生物学及 16S rRNA 和 *gyrB* 两对基因序列与系统发育学发面的内容,为该菌的有效检验提供了参考依据。

肠杆菌科细菌的毒力因子主要包括粘附素、肠毒素、内毒素、溶血素等^[21]。粘附素,又称为定居因子(colonization factor)是产肠毒素大肠杆菌的重要致病因子,当病原菌感染宿主时,主要靠其菌体表面抗原——定居因子抗原 *cfa* 粘附于肠道细胞,经过定居、繁殖产生肠毒素而引发宿主死亡^[22]。本研究对分离菌进行了 *cfa* 基因片段的检测,用设计的特异性引物进行了菌体 PCR 扩增,产物经过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析,可见扩增

得到大小为 100 bp 的 *cfa* 基因,而同时使用该引物检测的哈氏弧菌、嗜水气单胞菌、曼利斯顿氏菌、温和气单胞菌、副溶血弧菌均未扩增出条带,一方面表明分离的病原弗氏柠檬酸杆菌具有 *cfa* 毒力因子,本次赣榆地区养殖梭子蟹可能为弗氏柠檬酸杆菌定居因子抗原粘附梭子蟹肠道细胞之后繁殖并产生肠毒素最终导致死亡;同时也表明该特异性引物可用于检测弗氏柠檬酸杆菌。

在筛选适合的抗生素时,本研究中用到了红霉素、环丙沙星和痢特灵等水产禁用渔药,但是其目的只是为了检验这些药物对弗氏柠檬酸杆菌的敏感程度。而在实际用药时应结合耐药性试验结果有针对性选择药物去预防和治疗由弗氏柠檬酸杆菌引起的疾病,具体的用药量还需要考虑养殖动物的耐受力,合理的安排,以便达到高效、低残留,同时又能保证减少病害发生的目的。

参考文献:

- [1] Hamasaki K, Fukunaga K, Kitada S. Batch fecundity of the swimming crab *Portunus tnuberculatus* (Brochure: Portunidae) [J]. *Aquaculture*, 2006 (25):359-365.
- [2] 薛俊增,吴惠仙,方李宏. 三疣梭子蟹胚胎发育过程中生殖腺的形态[J]. *动物学研究*,2003,24(4):319-320.
- [3] 薛俊增,堵南山,赖伟. 三疣梭子蟹胚胎发育早期的组织学研究[J]. *动物学研究*,2001,22(1):69-73.
- [4] 朱冬发,王春琳,李志强. 三疣梭子蟹核型分析[J]. *水产学报*,2005,29(5):649-653.
- [5] 许文军,施慧,徐汉祥,等. 养殖梭子蟹血卵涡鞭虫感染的初步研究[J]. *水生生物学报*,2007,31(5):637-640.
- [6] 王国良,金珊,陈寅儿,等. 三疣梭子蟹肌肉乳化病的病原及其致病性研究[J]. *海洋科学进展*,2006,24(4):526-531.
- [7] 王高学,黄增荣,袁明. 三疣梭子蟹牛奶病病原的分离鉴定[J]. *西北农林科技大学学报:自然科学版*,2007,35(6):29-33.
- [8] 何伟贤. 三疣梭子蟹鳃病的病因与防治[J]. *中国水产*,2004,1:50-51.
- [9] 何伟贤. 三疣梭子蟹养殖常见病及防治办法[J]. *水产养殖*,2004,25(5):29-30.
- [10] Holtj G, Krieg N R, Sneath P H A, et al. *Bergey's manual of determinative bacteriology* [M]. 9th ed. USA:Williams & Wilkins,1994.
- [11] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:106-120.
- [12] 张晓君,秦国民,阎斌伦,等. 半滑舌鳎病原曼利斯顿氏菌表型及分子特征研究[J]. *海洋学报*,2009,31(5):112-122.
- [13] Kaclikova E, Krascenicsova 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):229-232.
- [14] 叶应妩,王毓三. 全国临床检验操作规程[M]. 2版. 南京:东南大学出版社,1997:552-562.
- [15] 李华,邢殿楼,白国福,等. 弗氏柠檬酸杆菌对河蟹的致病性研究[J]. *水生生物学报*,2001,25(3):217-223.
- [16] 舒新华,婁理,肖克宇,等. 乌鳢腹水病原的分离和鉴定[J]. *湖南农业大学学报*,1998,24(4):286-290.
- [17] 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.
- [18] Salah M A, Azza M A, George J, et al. Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as Probiotics[J]. *Aquaculture*,2008(277):1-6.
- [19] Claudio D M, Rodrigo R. Occurrence of florfenicol resistance in bacteria associated with two Chilean salmon farms with different history of antibacterial usage[J]. *Aquaculture*,2007(266):39-46.
- [20] Mauel M J, Miller D L. Bacterial pathogens isolated from cultured bullfrog (*Rana catesbeiana*) [J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*,2002,14(5):431-433.
- [21] 袁万哲,何孔旺,陆承平,等. 产肠毒性大肠杆菌主要毒力因子的研究进展[J]. *动物医学进展*,2005,26(2):6-9.
- [22] 黄雪萍,王勇,罗耀玲,等. 产肠毒素大肠杆菌定居因子 I 基因克隆与表达[J]. *重庆医科大学学报*,2008,33(7):814-816.

Detection of *cfa* gene and isolation and identification of the pathogen *Citrobacter freundii* isolated from *Portunus trituberculatus*

YAN Bin-lun^{1*}, ZHANG Xiao-jun¹, LIANG Li-guo^{1,2}, YANG Wei², YANG Jia-xin²

(1. Key Laboratory of Oceanic Biotechnology of Jiangsu, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China;

2. College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract: *Portunus trituberculatus*, mainly distributed in East China Sea and Yellow Sea, is a large marine economic crabs with rich nutritional and medicinal properties. In recent years, *P. trituberculatus* aquaculture has developed rapidly along the Jiangsu coastal waters, while some epidemic diseases broke out which was attributed to many factors, for example, pathogenic microorganism. In the late autumn of 2009, the cultured *P. trituberculatus* suffered from serious disease in one farm of Ganyu County in Jiangsu Province. The main symptom displayed as drumble, not feeding, the tissue oedema of liver, gill and muscle; the liver and muscle were rotten in some crabs. Virtually pure dense cultures were obtained from liver, muscle, and lymph fluid of diseased *P. trituberculatus*, and strong pathogenicity of the isolate strain (JG091120-1) to the *P. trituberculatus*. The phenotypic characteristics of isolate strain were examined, including morphological characteristics, physiological, and biochemical characteristics, the 16S rRNA and *gyrB* genes were amplified and compared with those sequences deposited in databases. Phylogenetic analysis of 16S rRNA and *gyrB* genes indicated high homogeneity between the isolate strain and *Citrobacter freundii* from GenBank database. The 16S rRNA gene fragment length is 1 451 bp (GenBank accession number HQ170626) and *gyrB* gene fragment length is 1 186 bp (GenBank accession HQ170627). The results showed that the identified isolate strain belonged to *C. freundii*. Colonization factor antigen was a pathogenic factor of enterobacteriaceae which could produce enterotoxin that was capable of causing death. And the *cfa* gene (100 bp) could be amplified by PCR. It was concluded that the isolated strain *C. freundii* carried *cfa* and provided an effective method for detecting the *C. freundii*. *C. freundii* was a conditional pathogen that is gram-negative, bacillus, aerobic or amphimicrobial. And many diseases were attributed to the *C. freundii* for man, reptiles, amphibians. In recent years, a lot of aquatic animals such as *Cherax quadricianalus*, *Ophicephalus argus*, *Oreochromis niloticus*, *Eriocheir sinensis* etc., were also infected by the *C. freundii*. In order to choose the appropriate antibiotic the drug sensitive was tested, and testing results by paper extension methods for drug sensitive showed that among 48 antibiotics, ciprofloxacin, fleroxacin, ceftriaxone, enoxacin, enrofloxacin, floxacilin and levofloxacin had the most inhibitive effects on the strain. The paper reported for the first time that *C. freundii* could lead to the mass mortality of *P. trituberculatus* in Jiangsu coastal waters and a detailed study of the pathogen was made, which would be helpful in the disease control and health management in *P. trituberculatus* cultivation.

Key words: *Portunus trituberculatus*; *Citrobacter freundii*; 16S rRNA; *gyrB*; *cfa*

Corresponding author: YAN Bin-lun. E-mail: yanbinlun@yahoo.com.cn