



## 鳖源柠檬酸杆菌属新种的分离鉴定与多位点序列

刘乃瑜<sup>1</sup>, 王至诚<sup>1</sup>, 何宏港<sup>1</sup>, 王卫民<sup>1</sup>, 刘静霞<sup>1</sup>, 罗毅<sup>1,2\*</sup>

(1. 华中农业大学水产学院, 农业农村部淡水生物繁育重点实验室,  
农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 湖北 武汉 430070;

2. 华中农业大学, 农业微生物学国家重点实验室, 湖北 武汉 430070)

**摘要:** 为确定 2020 年 10 月湖北一中华鳖发病的病原体及病原特征, 实验从该养殖场患病中华鳖个体肝脏中分离获得 1 株优势菌 A3, 经理化性状及 16S *rRNA* 序列鉴定, 表明菌株 A3 属于柠檬酸杆菌。进一步通过 *recN* 序列鉴定, 发现 A3 与布氏柠檬酸杆菌 *recN* 碱基一致性为 95.58%~96.01%, 与柠檬酸杆菌属其他种的 *recN* 碱基一致性均低于 93.72%, 表明菌株 A3 为柠檬酸杆菌属潜在新种。人工回归感染实验证实菌株 A3 是引起本次中华鳖患病的病原菌。与嗜水气单胞菌相比, A3 感染病程偏慢但致死率较高。药敏实验结果显示, 菌株 A3 对美罗培南等 10 种抗生素敏感, 对氟苯尼考等 9 种抗生素耐药。多位点序列分型 (MLST) 鉴定显示, 菌株 A3 属于新序列型 (ST)。对柠檬酸杆菌多位点序列分型的 7 个管家基因序列进行级联并构建系统发育树, 结果显示, 柠檬酸杆菌的进化与菌株的分离源及分离地点没有明显关系; 菌株 A3 与分离自欧洲人源的 ST120 型菌株 Citfre2580 亲缘关系最近。本研究对中华鳖的病原进行了分离鉴定, 并阐述了一种更可靠的柠檬酸杆菌鉴定方法, 旨在引起人们对柠檬酸杆菌致病性的重视, 为水产品健康养殖提供一定的参考依据。

**关键词:** 中华鳖; 柠檬酸杆菌; 分离鉴定; 耐药; 多位点序列分型

中图分类号: S 947.1<sup>+2</sup>

文献标志码: A

中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*), 又名甲鱼, 属龟鳖目 (Testudines) 鳖科 (Trionychidae) 鳖属 (*Pelodiscus*), 主要分布于我国的长江、黄河流域和华南地区, 尤在湖北、湖南、江西、安徽、江苏等省产量较高<sup>[1]</sup>。其肉质鲜美, 营养丰富, 广受消费者喜爱。随着集约化养殖程度的提高, 养殖规模迅速发展, 但也导致养殖过程中疾病频发, 其中病原体的感染可造成患病鳖生长缓慢, 行动迟缓, 最终导致大量患病个体死亡<sup>[2]</sup>。目前已发现的中华鳖致病菌多为气单胞菌 (*Aeromonas*), 其中主要是嗜水气单胞菌 (*A. hydrophila*), 可导致出血

性肠坏死、穿孔、腐皮、白点等多种病症<sup>[3]</sup>。此外, 中华鳖已报道的致病菌还有弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 和豚鼠气单胞菌 (*A. caviae*) 等<sup>[3-5]</sup>。

柠檬酸杆菌属曾被包含在沙门氏菌属 (*Salmonella*) 和埃希氏菌属 (*Escherichia*) 中, 于 1953 年被独立列出。最早只有弗氏柠檬酸杆菌 1 个种<sup>[6]</sup>。根据国际原核生物系统委员会认定, 目前柠檬酸杆菌属已包括 18 个种, 其中 6 个种为近 5 年认定<sup>[7]</sup>。在这些种中, 布氏柠檬酸杆菌 (*C. braakii*)、弗氏柠檬酸杆菌、沃克曼氏柠檬酸杆菌 (*C. werkmanii*)

收稿日期: 2021-06-27 修回日期: 2021-11-07

资助项目: 湖北省重点研发计划项目 (2020BBB122)

第一作者: 刘乃瑜, 从事水产动物疾病与防控研究, E-mail: 1359360362@qq.com;

王至诚, 从事水产动物疾病与防控研究, E-mail: 1965503476@qq.com

通信作者: 罗毅 (照片), 从事水产动物疾病与防控研究, E-mail: luoyi@mail.hzau.edu.cn



等几个种的亲缘关系较近, 原来均属于弗氏柠檬酸杆菌, 现在部分文献将之称为弗氏柠檬酸杆菌群<sup>[6]</sup>。已有报道表明, 弗氏柠檬酸杆菌可感染中华鳖并致死, 其所引起的主要症状表现为病鳖四肢软弱无力, 反应迟钝, 病鳖体表泛红, 底板有出血性红斑, 死亡率可达 70% 以上<sup>[1]</sup>。

多位点序列分型 (multilocus sequence type, MLST) 是近几年流行的一种基于核酸序列来测定细菌分型的方法。该方法分辨率高、重复性好, 结果便于不同实验室进行比较<sup>[8]</sup>, 因此被视为能进行国际间菌株比较的常用工具, 是一种更准确的分型系统方法<sup>[9]</sup>。张明洋等<sup>[10]</sup> 对一株分离自虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 的弗氏柠檬酸杆菌 GZBJ 2017 进行 MLST 鉴定及分析后发现, 该菌株属于新的序列型 (sequence type, ST), 且与该菌株亲缘关系最近的是 ST132 型。

2020 年 10 月在湖北省一中华鳖养殖场, 部分中华鳖个体发生严重感染并死亡。为探究引起此次中华鳖感染发病的病原, 实验从患病中华鳖肝脏分离获得 1 株优势菌 A3, 通过形态学观察、生理生化反应、16S *rRNA*、*recN* 序列比对分析, 发现该菌株为柠檬酸杆菌属的一个潜在新种, 进一步对该菌株的致病力、耐药特征及 MLST 分型进行了鉴定。本实验旨在为中华鳖疾病的有效检验与防治, 及水产养殖上的常见病原——柠檬酸杆菌的深入研究提供参考和依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

患病样本于 2020 年 10 月取自湖北省一中华鳖养殖场。

### 1.2 病原菌分离与纯化

在无菌环境下操作, 用乙醇擦拭体表后, 对中华鳖进行剖检, 记录病变情况。将肝脏样品磨成匀浆后, 进行梯度稀释, 每个梯度取 100  $\mu\text{L}$ , 用涂布器均匀涂在 LB 固体培养基上, 于 28  $^{\circ}\text{C}$  恒温倒置培养 48 h。根据菌落形态挑取优势菌株, 经 3 次以上纯化培养后再接种于 LB 液体培养基, 经 28  $^{\circ}\text{C}$  过夜培养, 将菌液和 60% 甘油按 2:1 (体积比) 混和, -80  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.3 分离株 A3 的鉴定

形态和生理生化鉴定 菌落形态观察。取

超低温保存的菌种活化后, 划线接种于 LB 固体培养基, 于 28  $^{\circ}\text{C}$  静置培养 24 h, 观察记录单菌落的形状、大小、边缘、表面、隆起形状、透明度等表型特征。

生理生化鉴定。取待检测菌落于生理盐水中, 稀释制备成 0.5 麦氏浊度 (McFarland, 约  $10^8$  CFU/mL) 的菌悬液, 取 100  $\mu\text{L}$  菌悬液加至肠杆菌科细菌生化鉴定管 (杭州微生物试剂有限公司) 中, 封口。按说明书进行培养, 参考说明书对结果的阳性和阴性进行分类。

分子生物学鉴定 16S *rRNA* 鉴定。利用碱裂解法提取细菌总 DNA, 所用引物和反应体系参照 Clarridge 等<sup>[11]</sup> 的方法, 利用引物 27F (5'-AGAG TTTGATCCTGGCTCAG-3') 及 1492R (5'-GGTTAC CTTGTTACGACTT-3') 扩增菌株 A3 的 16S *rRNA* 序列。PCR 产物送北京擎科生物技术有限公司测序, 序列经 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 比对分析后提交 GenBank 注册序列号。

*recN* 鉴定。基于 *recN* (编码 DNA 修复蛋白) 序列可准确区分柠檬酸杆菌属的各个种<sup>[7]</sup>。参照 Ribeiro 等<sup>[7]</sup> 的方法, 利用引物 *recN*-Fw (5'-ATTG CCATTGATGCTCTCGG-3') 及 *recN*-Rv (5'-ANCG AGTCGGCCTGATCGT-3') 对菌株 A3 进行 *recN* 的 PCR 扩增及鉴定。PCR 产物送北京擎科生物技术有限公司测序, 通过 MEGA X 软件对序列进行分析及遗传进化树的构建。

### 1.4 人工感染实验

取 99 只体长为 (92.3 $\pm$ 10.5) mm, 体重为 (52.7 $\pm$ 11.8) g 的健康中华鳖, 随机分为 3 组, 每组 33 只。将分离株 A3 和嗜水气单胞菌菌株 B3 (本实验室分离获得的高致病力菌株) 的单菌落转接至液体 LB 中过夜培养后, 稀释成  $2\times 10^7$  CFU/mL 的菌悬液, 分别将 2 种菌液以 200  $\mu\text{L}$  的剂量由中华鳖右后腿股沟处注射入腹腔, 阴性对照组注射等量的无菌生理盐水, 连续观察 8 d。感染期间每天观察, 同时记录中华鳖的病症和死亡情况, 并对濒死的实验中华鳖进行剖检和病原菌分离鉴定<sup>[12-13]</sup>。用 Graphpad prism 8.0.2 软件绘制生存曲线。

本研究获得了华中农业大学实验动物管理和使用伦理委员会批准, 实验过程中操作人员严格遵守华中农业大学实验动物相关伦理规范, 并按照华中农业大学伦理委员会制定的规章制度执行。

## 1.5 细菌耐药性实验

采用常规琼脂扩散 (K-B) 法对分离株进行 20 种抗菌药物敏感性测定, 依据美国临床和实验室标准协会 (CLSI) 药敏试验标准鉴定手册, 以抑菌圈直径大小作为敏感与耐药的判定指标<sup>[14]</sup>。药敏纸片均购自杭州微生物试剂有限公司。

## 1.6 多位点序列分型 (MLST)

多位点序列分型参照 Martino 等<sup>[15]</sup> 描述的引物和方法。从 PubMLST (<https://pubmlst.org/organisms/citrobacter-spp>) 下载管家基因数据库, 比较 *aspC*、*clpX*、*fadD*、*mdh*、*arcA*、*dnaG* 和 *lysP* 这 7 个管家基因位点处的等位基因的差异, 并获取各菌株 7 个基因的等位基因序列信息。使用

MEGA X, 根据这 7 个管家基因的级联序列构建 N-J (Neighbor-Joining) 系统发育树, 通过 ITOL 美化系统发育树 (<https://itol.embl.de/>) 进行<sup>[16]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 患病鳖的病症

患病中华鳖为 3 龄, 体重约 1 500 g, 临床表现为行动迟缓、四肢无力、攻击力弱, 不主动摄食, 濒死前常趴于食台或晒背台; 底板泛红, 有出血斑 (图版 I -1), 背甲板顶部溃疡呈小坑状, 有感染损伤。解剖可见肝脏发黑 (图版 I -2), 有出血点 (图版 I -3)。



图版 I 濒死中华鳖的临床病症

1. 底板泛红, 有血斑; 2. 肝脏发黑, 肿大; 3. 肝脏有出血点。

### Plate I Clinical signs of moribund *P. sinensis*

1. the bottom plate was flushed with bleeding spots; 2. the liver was black; 3. bleeding spots in the liver.

## 2.2 分离株 A3 的鉴定

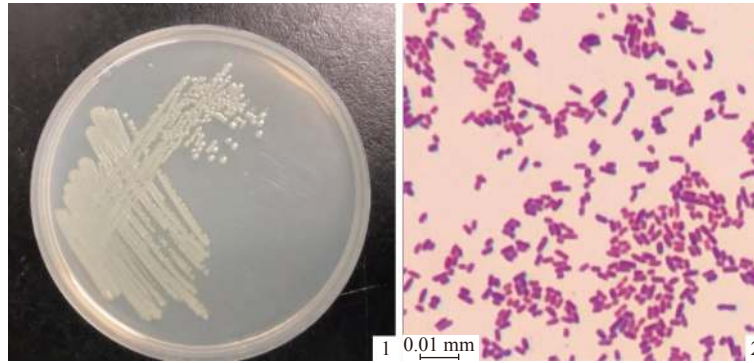
**菌落形态特征** 利用 LB 固体培养基, 从濒死中华鳖肝脏中分离到大量形态一致的圆形不透明、表面有光泽、中央隆起、淡黄色、直径多为约 2 mm 的菌落 (图版 II -1)。菌体革兰氏染色呈阴性, 短杆状, 两边钝圆 (图版 II -2)。将优势菌株进行纯化, 命名为 A3。

**生理生化鉴定** 生化鉴定结果显示, 菌株 A3 与分离自患病巴西红耳龟 (*Trachemys scripta elegans*) 的弗氏柠檬酸杆菌菌株 TC-1、分离自中华鳖的弗氏柠檬酸杆菌菌株 PS01 及分离自患病克

氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 的布氏柠檬酸杆菌 AX1707 生化特性基本一致 (表 1)。

**16S rRNA 鉴定** 实验首先选择 16S rRNA 对 A3 在分子水平上进行鉴定。从测得的 A3 的 16S rRNA 序列在 BLAST 比对得到的结果来看, A3 的 16S rRNA 基因序列 (GenBank 登录号: MW513445) 与 GenBank 数据库中布氏柠檬酸杆菌代表菌株 MiY-A (GenBank 登录号: NZ\_CP045 771) 碱基一致性为 99.57%, 与葡萄牙柠檬酸杆菌 (*C. portucalensis*) 代表菌株 FDAARGOS617 (GenBank 登录号: NZ\_CP044098) 碱基一致性为 99.57%,





图版 II 分离株 A3 的菌落及染色形态

1. 菌株 A3 在 LB 固体培养基上的菌落形态; 2. 菌株 A3 的革兰氏染色形态 (×1 000)。

Plate II Growing states and the stained morphological characteristics of strain A3

1. growth of strain A3 on LB agar plate; 2. Gram staining morphology of strain A3 (×1 000).

表 1 分离株 A3 的生理生化特性

Tab. 1 Physiological and biochemical characteristics of strain A3

| 检测项目<br>items         | 分离株 A3<br>isolated<br>strain A3 | 参考菌株<br>reference strains |                     |                        |
|-----------------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------|------------------------|
|                       |                                 | TC-1 <sup>[17]</sup>      | PS01 <sup>[1]</sup> | AX1707 <sup>[18]</sup> |
| 硫化氢 hydrothion        | +                               | +                         | +                   | +                      |
| 苯丙氨酸 phenylalanine    | -                               | -                         | -                   | -                      |
| 葡萄糖酸盐 gluconate       | -                               | -                         | ND                  | -                      |
| 蛋白胨水 peptone water    | -                               | -                         | ND                  | ND                     |
| M-R实验 M.R test        | +                               | +                         | +                   | +                      |
| V-P实验 V-P test        | -                               | -                         | -                   | ND                     |
| 枸橼酸盐 citrate          | -                               | -                         | +                   | +                      |
| 尿素 carbamide          | -                               | -                         | -                   | -                      |
| 半固体琼脂 semi-solid agar | +                               | +                         | +                   | +                      |
| 葡萄糖(产气) glucose (gas) | +                               | +                         | -                   | +                      |
| 赖氨酸 lysine            | -                               | -                         | -                   | -                      |
| 鸟氨酸 ornithine         | +                               | +                         | -                   | +                      |
| 棉子糖 raffinose         | -                               | +                         | -                   | -                      |
| 山梨醇 sorbitol          | +                               | +                         | +                   | +                      |
| 侧金盏花醇 adonitol        | -                               | -                         | ND                  | -                      |
| 木糖 timber             | +                               | +                         | -                   | +                      |

注: “+”阳性, “-”阴性, “ND”没有相关数据。  
Notes: “+”, positive, “-”, negative, “ND” means no data.

与弗氏柠檬酸杆菌代表菌株 FDAARGOS549 (GenBank 登录号: NZ\_CP033744) 碱基一致性为 99.43%, 与沃克曼氏柠檬酸杆菌代表菌株 CB00044 (GenBank 登录号: NZ\_JADVIS01000013) 碱基一致性为 99.36%, 与欧洲柠檬酸杆菌 (*C. europaeus*) 代表菌株 67A (GenBank 登录号: NZ\_PQSZ01000025) 碱基一致性为 98.64%。初步判定分离株 A3 属于柠檬酸杆菌属中的一种。

**recN 鉴定** *recN* 是柠檬酸杆菌的重组和修复蛋白基因, 可作为柠檬酸杆菌属中不同种菌株的分类标准<sup>[7]</sup>。为进一步鉴定菌株 A3, 实验测得了 A3 菌株 *recN* 的序列片段 (GenBank 登录号: MZ146451), 并与柠檬酸杆菌属中相近的几个种 (布氏柠檬酸杆菌、葡萄牙柠檬酸杆菌、弗氏柠檬酸杆菌、欧洲柠檬酸杆菌、沃克曼氏柠檬酸杆菌等) 的 *recN* 的序列片段相似度进行了比较 (表 2)。结果显示, A3 与布氏柠檬酸杆菌亲缘关系最为接近, 其碱基一致性为 95.58%~96.01%; 与柠檬酸杆菌属其他种的碱基一致性均不超过 93.72%。柠檬酸杆菌属种内菌株 *recN* 序列较为保守, 碱基一致性均大于等于 97.29%, 以上数据表明菌株 A3 与布氏柠檬酸杆菌最为接近。进一步利用 *recN* 序列片段构建系统发育树 (图 1), 结果显示, 菌株 A3 靠近布氏柠檬酸杆菌的分支, 但是单独形成一支, 与表 2 的结果一致。以上结果表明, A3 菌株与柠檬酸杆菌属中的已知种在分类标准上均存在一定的差别, 属于柠檬酸杆菌属中的新种。

2.3 分离株 A3 对中华鳖的致病力

人工回归感染实验结果显示, 相较于嗜水气单胞菌 B3 的处理组, 柠檬酸杆菌 A3 处理组中华鳖的发病较慢, 但最终造成的死亡率并不低。A3 处理组从攻毒后第 96 小时 (第 4 天) 开始出现个体死亡; 而嗜水气单胞菌 B3 处理组从攻毒后第 24 小时 (第 1 天) 即出现个体死亡。到攻毒后第 8 天, A3 和 B3 处理组中华鳖个体全部死亡。对照组无中华鳖个体死亡 (图 2)。

从 A3 处理组死亡中华鳖的肝脏可分离到与菌株 A3 形态一致的菌落, 对其 *recN* 进行鉴定,

表 2 柠檬酸杆菌属中不同种细菌 *recN* 相似性比较Tab. 2 Comparison of *recN* similarity among different *Citrobacter* spp.

| 种类<br>species                           | A3          | 布氏柠檬酸杆菌<br><i>C. braakii</i> | 葡萄牙柠檬酸杆菌<br><i>C. portucalensis</i> | 弗氏柠檬酸杆菌<br><i>C. freundii</i> | 欧洲柠檬酸杆菌<br><i>C. europaeus</i> | 沃克曼氏柠檬酸杆菌<br><i>C. werkmanii</i> |
|---|-------------|------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| A3 (本研究) A3 (this study)                | <b>100</b>  |                              |                                     |                               |                                |                                  |
| 布氏柠檬酸杆菌 <i>C. braakii</i> (n=16)        | 95.58~96.01 | <b>98.29~100</b>             |                                     |                               |                                |                                  |
| 葡萄牙柠檬酸杆菌 <i>C. portucalensis</i> (n=16) | 92.01~93.72 | 91.16~93.3                   | <b>97.29~100</b>                    |                               |                                |                                  |
| 弗氏柠檬酸杆菌 <i>C. freundii</i> (n=6)        | 91.3~92.15  | 90.01~92.15                  | 93.01~94.29                         | <b>99.29~100</b>              |                                |                                  |
| 欧洲柠檬酸杆菌 <i>C. europaeus</i> (n=6)       | 93.01~93.44 | 92.72~93.87                  | 92.44~94.44                         | 90.73~93.3                    | <b>98.72~100</b>               |                                  |
| 沃克曼氏柠檬酸杆菌 <i>C. werkmanii</i> (n=6)     | 91.3~91.73  | 89.87~90.87                  | 89.73~92.15                         | 88.02~88.87                   | 90.16~91.16                    | <b>97.29~100</b>                 |

注: 加粗表示序列相似度区间大于97%。  
Notes: interval values higher than 97% are in bold.

结果显示为同一菌株。以上数据表明, 分离株 A3 虽然导致中华鳖发病相对较慢, 但具有较高的致死率, 是导致此次中华鳖死亡的主要病原菌。

## 2.4 分离株 A3 的药敏分析

依据 CLSI 药敏试验标准鉴定手册<sup>[14]</sup>及《中华人民共和国兽药典》<sup>[19]</sup>中公布的水产用药物, 对菌株 A3 进行药敏实验。药敏实验结果显示, 分离株 A3 对哌拉西林-他唑巴坦、美罗培南、丁胺卡那霉素、庆大霉素、四环素、环丙沙星、左氧氟沙星、氯霉素、新霉素、诺氟沙星高度敏感; 对恩诺沙星中度敏感; 对头孢吡肟、头孢噻肟、头孢他啶、头孢曲松钠、头孢呋辛、氨曲南、复方新诺明、多西环素、氟苯尼考耐药(表 3)。

## 2.5 分离株 A3 的 MLST 分型结果及系统发育分析

将菌株 A3 扩增出的 7 个管家基因上传到柠檬酸杆菌多位点序列分型 PubMLST 数据库 (<https://pubmlst.org/organisms/citrobacter-spp>) 进行比对分析, 结果显示, 菌株 A3 除基因 *arcA* 和 *mdh* 可与数据库中已有的等位基因 *arcA*\_39 与 *mdh*\_150 完全匹配外, 其余 5 个管家基因 *aspC*、*clpX*、*fadD*、*dnaG* 及 *lysP* 均无匹配, 菌株 A3 属于全新的 ST 型。

为分析菌株 A3 的起源和传播, 实验选取 PubMLST 数据库中全部柠檬酸杆菌, 利用多序列分型的 7 个管家基因共 3 468 bp 的级联序列构建了 N-J 系统发育树(图 3)。在数据库全部的 474 个菌株中, 287 个菌株(分属 225 个 ST 型)分离自人类 (*Homo sapiens*); 22 个菌株(分属 16 个 ST 型)分离自动物, 如山羊 (*Capra hircus*)、家鸡 (*Gallus gallus domesticus*)、家猫 (*Felis catus*) 以及龟类

(*Tesudines*) 等; 64 个菌株(分属 42 个 ST 型)分离自环境, 其中以水环境居多。以上数据表明, 柠檬酸杆菌最常见的感染分离源是人类, 且具有多种变异 ST 型。在龟类中, 仅有一株柠檬酸杆菌收录于 MLST 数据库中, 即 2017 年分离自巴西的葡萄牙柠檬酸杆菌 LOL, 为 ST264 型, 但菌株 A3 与 ST264 型之间无明显亲缘关系, 二者的 7 个管家基因序列存在多达 64 个碱基对的差别。

从分离地点来看, 大部分菌株分离自亚洲, 其中中国共计分离了 283 株(分属 227 个 ST 型), 占已分离菌株中的绝大多数。此外, 有 93 株(分属 82 个 ST 型)分离自欧洲, 其中荷兰 22 株, 西班牙 21 株, 意大利 14 株, 爱尔兰 11 株等, 另外还有 33 株分离自美国。这些数据表明, 中国是柠檬酸杆菌感染的主要流行区域, 欧洲次之。

综上所述, 根据系统发育树结果, 柠檬酸杆菌的进化与分离源或分离地点之间无明显关系。而菌株 A3 与分离自欧洲人类囊肿灶灶中的 ST120 型菌株 Citfre2580 亲缘关系最为密切(图 3)。

## 3 讨论

柠檬酸杆菌为革兰氏阴性菌, 广泛存在于水、土壤以及食物中, 是一种典型的人-鱼共患条件致病菌, 是导致水产养殖发病的重要病原菌之一<sup>[20-21]</sup>。王家祯等<sup>[22]</sup>对患病青鱼 (*Mylopharyngodon piceus*) 进行解剖, 发现其肝脏、脾脏肿大, 肠道发炎出血, 对其病原菌分离, 经鉴定确定为布氏柠檬酸杆菌。张冬星等<sup>[23]</sup>对养殖的患病团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 进行病原分离, 从其肝脏中分离得到弗氏柠檬酸杆菌。另有研究显示, 弗氏柠檬酸杆菌还可引起虹鳟<sup>[10]</sup>、巴西红耳龟<sup>[24]</sup>、克氏原螯虾<sup>[25]</sup>、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)<sup>[26]</sup>、

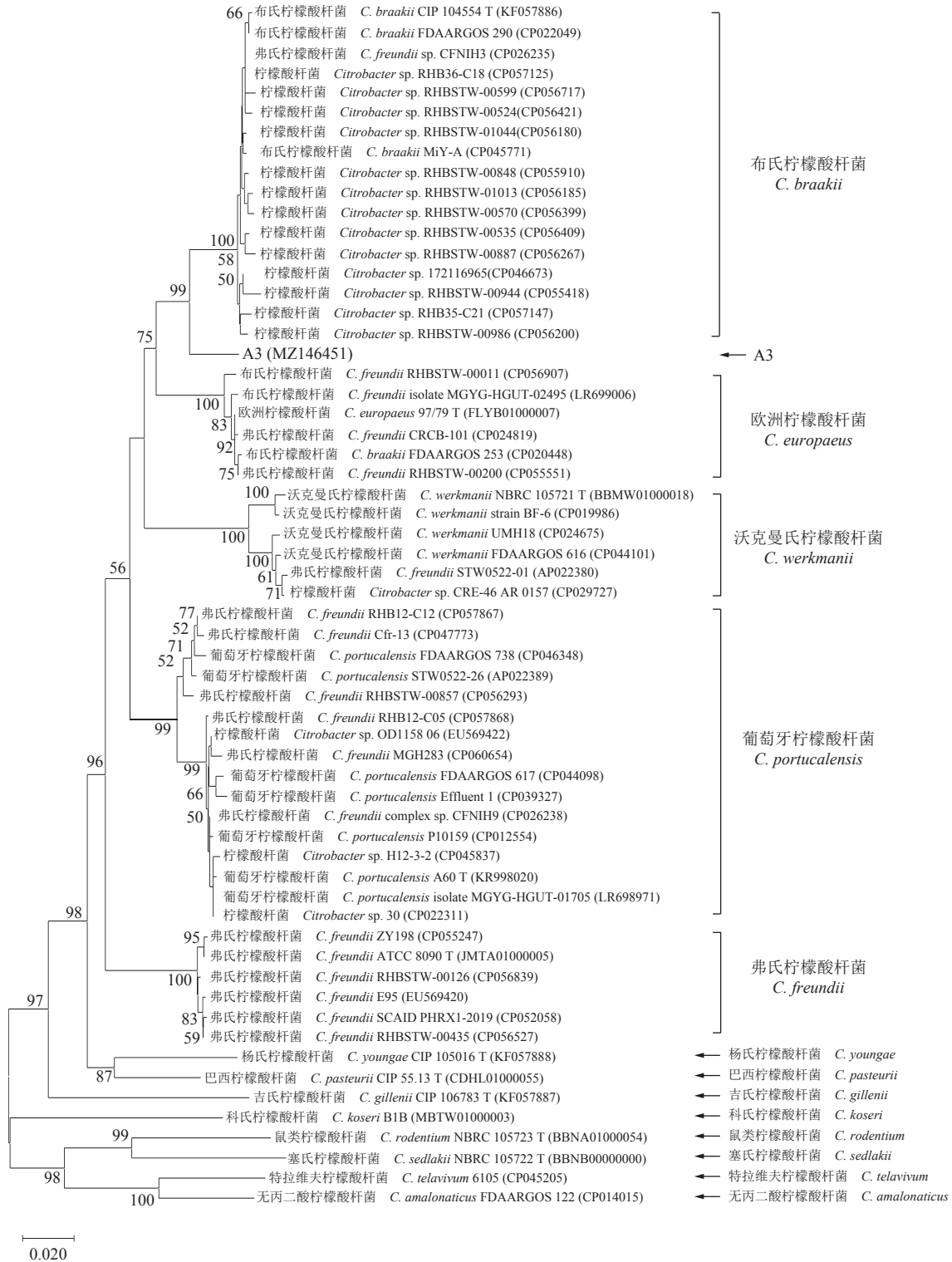


图 1 基于 *recN* 基因序列的 N-J 系统发育树

菌株名后面括号中所示为该菌株 *recN* 序列在 GenBank 中的登录号; 遗传距离的计算利用 p-distance 模型; 比例尺表示遗传距离每单位 0.02。

Fig. 1 Neighbor-joining (N-J) tree based on the comparison of *recN* gene sequences of *Citrobacter* spp.

GenBank accession numbers are given in parentheses; genetic distances were constructed using p-distance model; the scale bar, genetic distance of 0.02.

花鳗鲡 (*Anguilla marmorata*)<sup>[27]</sup>、莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*)<sup>[28]</sup> 等水生动物体表局部

充血、出血或内部组织充血、肿大等症状, 其对感染个体的肝脏状态影响较明显。随着毒力的增

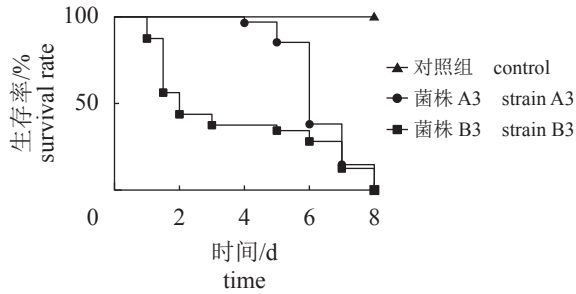


图 2 柠檬酸杆菌 A3 和嗜水气单胞菌 B3 对中华鳖的致病力

Fig. 2 Pathogenicity of *Citrobacter* strain A3 and *A. hydrophila* strain B3 to *P. sinensis*

强和感染的加重, 脾脏、肾脏及肠道等也会受到影响。近年来, 柠檬酸杆菌危害水产动物种类逐渐增多, 且有危害程度逐渐加重的趋势<sup>[29]</sup>。

柠檬酸杆菌也是中华鳖养殖的重要病原之一。李本旺等<sup>[30]</sup>发现布氏柠檬酸杆菌可引起中华鳖口腔溃烂综合症, 其发病率为 60%~70%, 具体表

现为口腔溃烂, 头颈部肿胀发红, 解剖后可见肝脏略肿胀, 颜色暗红且伴有不规则出血斑。林启存等<sup>[31]</sup>报道了弗氏柠檬酸杆菌可感染中华鳖引起败血症, 使病鳖全身水肿, 解剖可见肝脏肿大且块状充血。有研究显示, 弗氏柠檬酸杆菌感染龟鳖类还可使其不肯下水、反应迟钝、精神不振、食欲减退甚至不摄食、底板出血、背甲糜烂, 解剖后可发现, 患病个体肝脏土黄色且肿大充血, 还有报道称可见病鳖脾脏、肾脏肿大, 肠道出血和有少量腹水<sup>[31-32]</sup>。本研究中, 患病中华鳖个体腹甲及背甲与已报道的患病中华鳖情况基本一致; 解剖后可发现肝脏也有较多出血点, 局部肿大, 但并未见发黄; 部分个体有少量腹水, 并未发现脾脏、肾脏及肠道有明显病理变化。这可能与感染病鳖的致病菌浓度有关。在高浓度致病菌环境中, 柠檬酸杆菌会侵染更多的组织器官, 进而导致更多的病症和更高的死亡率<sup>[31]</sup>。

16S *rRNA* 具有保守性、普遍性以及序列重现

表 3 分离菌株 A3 药敏实验结果

Tab. 3 Drug susceptibility test of strain A3

| 抗生素名称<br>antibiotics                | 药物含量(μL/片)<br>dose | 抑菌圈直径判断标准/mm<br>zone diameter interpretive criteria |       |     | 抑菌圈直径/mm<br>diameter of inhibited zon | 敏感性<br>susceptibility |
|-------------------------------------|--------------------|---|-------|-----|---------------------------------------|-----------------------|
|                                     |                    | S   | I     | R   |                                       |                       |
| 哌拉西林-他唑巴坦 piperacillin-tazobactam   | 100/10             | ≥21   | 18~20 | ≤17 | 26                                    | S                     |
| 头孢吡肟 cefepime                       | 30                 | ≥18   | 15~17 | ≤14 | 10                                    | R                     |
| 头孢噻肟 cefotaxime                     | 30                 | ≥26   | 23~25 | ≤22 | 15                                    | R                     |
| 头孢他啶 ceftazidime                    | 30                 | ≥21   | 18~20 | ≤17 | 6                                     | R                     |
| 头孢曲松钠 ceftriaxone                   | 30                 | ≥23   | 20~22 | ≤19 | 17                                    | R                     |
| 头孢呋辛 cefuroxime sodium              | 30                 | ≥18   | 15~17 | ≤14 | 9                                     | R                     |
| 氨曲南 aztreonam                       | 30                 | ≥21   | 18~20 | ≤17 | 6                                     | R                     |
| 美罗培南 meropenem                      | 10                 | ≥16   | 14~15 | ≤13 | 29                                    | S                     |
| 丁胺卡那霉素 amikacin                     | 30                 | ≥17   | 15~16 | ≤14 | 20                                    | S                     |
| 庆大霉素 gentamicin                     | 10                 | ≥15   | 13~14 | ≤12 | 28                                    | S                     |
| 四环素 tetracycline                    | 30                 | ≥15   | 12~14 | ≤11 | 18                                    | S                     |
| 环丙沙星 ciprofloxacin                  | 5                  | ≥21   | 16~20 | ≤15 | 22                                    | S                     |
| 左氧氟沙星 levofloxacin                  | 5                  | ≥17   | 14~16 | ≤13 | 22                                    | S                     |
| 复方新诺明 trimethoprim-sulfamethoxazole | 1.25/23.75         | ≥16   | 11~15 | ≤10 | 9                                     | R                     |
| 氯霉素 chloramphenicol                 | 30                 | ≥18   | 13~17 | ≤12 | 26                                    | S                     |
| 新霉素 neomycin                        | 30                 | ≥17   | 13~16 | ≤12 | 19                                    | S                     |
| 多西环素 doxycycline                    | 30                 | ≥16   | 13~15 | ≤12 | 10                                    | R                     |
| 氟苯尼考 florfenicol                    | 30                 | ≥18   | 13~17 | ≤12 | 12                                    | R                     |
| 恩诺沙星 enrofloxacin                   | 5                  | ≥21   | 16~20 | ≤15 | 19                                    | I                     |
| 诺氟沙星 norfloxacin                    | 10                 | ≥17   | 13~16 | ≤12 | 18                                    | S                     |

注: S.高度敏感; M.中度敏感; R.耐药。  
Notes: S. highly susceptible; M. moderately susceptible; R. reduced susceptible.



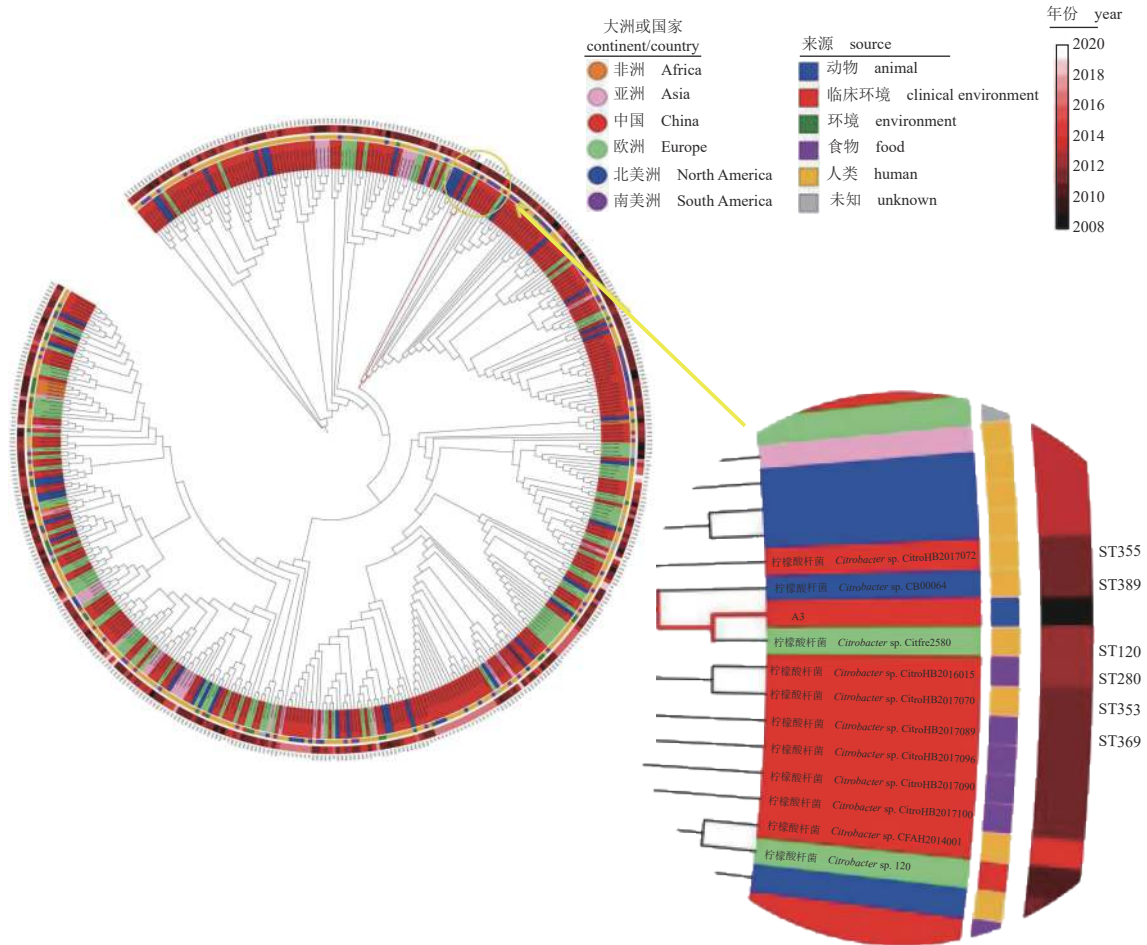


图3 A3与已发表的474株柠檬酸杆菌菌株多位点序列聚类分析

Fig. 3 Multi-locus sequence typing analysis of A3 and the 474 published *Citrobacter* strains

性高等特点<sup>[33]</sup>。通过 16S *rRNA* 进行细菌分类鉴定已被广泛应用于养殖环境微生物群落的分析和致病菌鉴定中<sup>[34-35]</sup>。胡广洲等<sup>[33]</sup>通过 16S *rRNA* 测序,对分离自中华鳖体内的 8 株细菌进行了分类鉴定,结果显示,其中的一株为弗氏柠檬酸杆菌。此外,有研究者从克氏原螯虾肝胰腺中分离出一株优势菌,经 16S *rRNA* 测序鉴定,最终鉴定其为弗氏柠檬酸杆菌<sup>[25]</sup>。本研究发现,由于柠檬酸杆菌属中 16S *rRNA* 的多态性、分辨率不够,导致达不到准确鉴定柠檬酸杆菌属中的菌株到具体种的目的。GenBank 数据库中布氏柠檬酸杆菌代表菌株 MiY-A、葡萄牙柠檬酸杆菌代表菌株 FDAARGOS617、弗氏柠檬酸杆菌代表菌株 FDAARGOS549、欧洲柠檬酸杆菌代表菌株 67A、沃克曼氏柠檬酸杆菌代表菌株 CB00044 的 16S *rRNA* 碱基序列一致性的两两比对结果显示,不同种柠檬酸杆菌代表菌株间的 16S *rRNA* 碱基一致性均在 99.07% 以上。这表明,以往仅通过 16S *rRNA* 进行的柠檬酸杆菌

鉴定,结果可能存在一定的不准确性。另一方面,有研究表明,利用 *recN* 序列可以准确区分柠檬酸杆菌属中不同种的菌株<sup>[36-37]</sup>。基于以上原因,本研究通过 16S *rRNA* 和 *recN* 相结合的方法,对分离菌株 A3 进行了鉴定,结果显示,菌株 A3 为柠檬酸杆菌属中的潜在新种(表 2, 图 1)。

胡广洲等<sup>[33]</sup>研究显示,在弗氏柠檬酸杆菌感染中华鳖 3~4 d 会出现暴发性死亡,在 7~9 d 死亡率达 90% 以上,这与本研究 A3 人工感染中华鳖病程相对较慢的结果一致。有研究表明,弗氏柠檬酸杆菌对于中华鳖并非弱毒菌株,当其数量级达到 10<sup>6</sup> CFU/mL 便可引起大部分中华鳖死亡<sup>[31]</sup>。本研究中分别以相同浓度的柠檬酸杆菌 A3 和本实验室分离获得的高毒力嗜水气单胞菌 B3 对健康中华鳖进行了攻毒实验。由生存曲线(图 2)可以看出,菌株 A3 导致的中华鳖发病过程显著慢于嗜水气单胞菌 B3 ( $P < 0.01$ ),但是二者均能够在 8 d 内使攻毒群体全部死亡。这表明虽然柠檬酸杆



菌引起中华鳖发病的过程相对偏慢, 但如果不能及时发现, 同样会给养殖造成严重后果。

朱若林等<sup>[18]</sup> 研究显示, 从患病克氏原螯虾体内分离到的布氏柠檬酸杆菌对恩诺沙星、氟苯尼考、庆大霉素敏感, 对多西环素、新霉素中度敏感, 对红霉素耐药。石征宇等<sup>[38]</sup> 研究显示, 其从罗非鱼分离到的弗氏柠檬酸杆菌对哌拉西林-他唑巴坦、庆大霉素敏感, 对氟苯尼考、恩诺沙星、左氧氟沙星、新霉素耐药。陈绮梨等<sup>[29]</sup> 研究显示, 从大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 体内分离到的弗氏柠檬酸杆菌对诺氟沙星、恩诺沙星、庆大霉素敏感, 对氟苯尼考、多西环素、氯霉素耐药。在以上研究中, 病原菌对庆大霉素均表现出了高度敏感性, 与本研究结果一致, 表明在实际生产中可适当选取庆大霉素治疗此类柠檬酸杆菌导致的感染。在本研究分离到的柠檬酸杆菌对氟苯尼考表现为耐药, 这与陈绮梨等<sup>[29]</sup> 及石征宇等<sup>[38]</sup> 的研究结果一致, 但朱若林等<sup>[18]</sup> 的研究显示, 其分离到的病原菌对氟苯尼考表现为敏感, 这种差异可能与菌株本身遗传性状有关, 也可能是环境因素作用的结果。张冬星等<sup>[23]</sup> 从患病团头鲂分离到的弗氏柠檬酸杆菌对诺氟沙星、恩诺沙星等喹诺酮类抗生素表现为耐药, 这与本研究结果有差异。有研究显示, 在水产动物源气单胞菌中存在质粒介导的喹诺酮类抗生素耐药现象, 其可能会导致喹诺酮类抗生素耐药性在水产养殖动物间快速、广泛传播<sup>[39]</sup>。因此本研究与张冬星等<sup>[23]</sup> 研究结果的差异可能是由耐药质粒的转移造成的。

多位点序列分型是对流行性病原菌追根溯源的有力工具<sup>[2]</sup>。本研究结果显示, 菌株 A3 属于新的 ST 型, 且与分离自人类伤口的 ST120 型菌株 Citfre2580 亲缘关系最近 (图 3), 这表明该菌株存在感染人类的风险。根据刘广义<sup>[40]</sup> 的研究结果, 柠檬酸杆菌引起人类感染发病主要集中在呼吸内科, 约占全部病例的 39%。这提示, 在中华鳖养殖生产中, 除了要尽早发现柠檬酸杆菌对中华鳖造成的感染、采取及时有效的防治措施外, 还要重视柠檬酸杆菌感染人类的风险, 特别应着重防护对人类呼吸系统造成的感染。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

[1] 黄莉萍, 安莉丽, 李芳, 等. 中华鳖弗氏柠檬酸杆菌的

鉴定及病理组织观察[J]. *浙江农业学报*, 2020, 32(7): 1176-1186.

Huang L P, An L L, Li F, *et al.* Identification and pathological observation of *Citrobacter freundii* from *Pelodiscus sinensis*[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2020, 32(7): 1176-1186 (in Chinese).

[2] 颜丹凤. 中华鳖“大脖子病”的病原菌分离与鉴定 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2015.

Yan D F. Isolation and identification of bacterial pathogen of *Trionyx sinensis* big neck disease[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2015 (in Chinese).

[3] 尹梦雅. 中华鳖暴发性死亡症流行性调查及病原菌的致病性、耐药性研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2018.

Yin M Y. The study on the epidemiology investigation and pathogenicity, drug-resistance characteristics about fulminant death of *Pelodiscus sinensis*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018 (in Chinese).

[4] 尹梦雅, 陈静涛, 黄松钱, 等. 中华鳖3种细菌的鉴定及致病性研究[J]. *中国农学通报*, 2019, 35(7): 145-152.

Yin M Y, Chen J T, Huang S Q, *et al.* Three bacteria isolated from *Trionyx sinensis*: identification and pathogenicity[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2019, 35(7): 145-152 (in Chinese).

[5] 孙红祥, 舒妙安. 中华鳖几种常见疾病病原的分离鉴定及药敏试验[J]. *中国兽医学报*, 2002, 22(2): 140-142.

Sun H X, Shu M A. Isolation, identification and drug sensitivity of the pathogens of common bacterial disease in soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis*)[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2002, 22(2): 140-142 (in Chinese).

[6] 何晓青. 柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)的分类与鉴定[J]. *中国卫生检验杂志*, 2005, 15(12): 1535-1536.

He X Q. Classification and identification of *Citrobacter* spp.[J]. *Chinese Journal of Health Inspection*, 2005, 15(12): 1535-1536 (in Chinese).

[7] Ribeiro T G, Gonçalves B R, da Silva M S, *et al.* *Citrobacter portucalensis* sp. nov., isolated from an aquatic sample[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(9): 3513-3517.

[8] 赵翠, 张庆, 郭树源, 等. 山东省动物源沙门氏菌MLST和血清分型与分布研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2017, 33(9): 793-799.

Zhao C, Zhang Q, Guo S Y, *et al.* Distribution and typing of animal-derived *Salmonella* with MLST and serotype[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2017, 33(9): 793-799 (in Chinese).

- [9] Maiden M C J, Bygraves J A, Feil E, *et al.* Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(6): 3140-3145.
- [10] 张明洋, 胡安东, 程振涛, 等. 虹鳉柠檬酸杆菌的分离鉴定与多位点序列分型[J]. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(6): 2521-2528.  
Zhang M Y, Hu A D, Cheng Z T, *et al.* Identification of the *Citrobacter freundii* in *incoerhynchus mykiss* by multilocus sequence typing[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2020, 39(6): 2521-2528 (in Chinese).
- [11] Clarridge III J E. Impact of 16S *rRNAs* gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2004, 17(4): 840-862.
- [12] 何晟毓, 魏文燕, 刘韬, 等. 大口黑鲈致死性结节病原的分离、鉴定及组织病理学观察[J]. *水产学报*, 2020, 44(2): 253-265.  
He S Y, Wei W Y, Liu T, *et al.* Isolation, identification and histopathological study on lethal sarcoidosis of *Micropterus salmoides*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(2): 253-265 (in Chinese).
- [13] 韩书煜, 梁静真, 覃志彪, 等. 山瑞鳖细菌性败血症病原菌的分离鉴定及其毒力基因检测[J]. *水产学报*, 2017, 41(9): 1443-1454.  
Han S Y, Liang J Z, Qin Z B, *et al.* Isolation, identification and virulence genes detection of pathogenic bacteria from *Palea steindachneri* with bacterial septicemia[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(9): 1443-1454 (in Chinese).
- [14] Jean B P, Melvin P W, George M F, *et al.* Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[M]. 27th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017: 42-44.
- [15] Martino M E, Fasolato L, Montemurro F, *et al.* Determination of microbial diversity of *Aeromonas* strains on the basis of multilocus sequence typing, phenotype, and presence of putative virulence genes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(14): 4986-5000.
- [16] Letunic I, Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v4: recent updates and new developments[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(W1): 256-259.
- [17] 白杰, 周美红, 胡秀彩, 等. 龟源弗氏柠檬酸杆菌的分离鉴定及药敏特性研究[J]. *大连海洋大学学报*, 2019, 34(6): 798-803.  
Bai J, Zhou M H, Hu X C, *et al.* Isolation, identification and drug sensitivity of pathogenic bacterium *Citrobacter freundii* from diseased turtle[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2019, 34(6): 798-803 (in Chinese).
- [18] 朱若林, 杨彩桥, 蒋书东, 等. 克氏原螯虾布氏柠檬酸杆菌的分离鉴定及药敏分析[J]. *安徽农业大学学报*, 2018, 45(4): 617-620.  
Zhu R L, Yang C Q, Jiang S D, *et al.* Isolation, identification and antibiotic sensitivity analysis of *Citrobacter braakii* from *Procambarus clarkii*[J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2018, 45(4): 617-620 (in Chinese).
- [19] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2015.  
Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. *Veterinary pharmacopoeia of the People's Republic of China*[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2015 (in Chinese).
- [20] 林威, 李登峰, 孙智同, 等. 弗氏柠檬酸杆菌与迟钝爱德华氏菌拮抗菌的筛选与鉴定[J]. *宁波大学学报(理工版)*, 2019, 32(1): 14-19.  
Lin W, Li D F, Sun Z T, *et al.* Screening and identification of antagonistic bacteria against *Citrobacter freundii* and *Edwardsiella tarda*[J]. *Journal of Ningbo University (Natural Science & Engineering Edition)*, 2019, 32(1): 14-19 (in Chinese).
- [21] 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).
- [22] 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, 46(5): 602-606.  
Wang J Z, Geng X Y, Zhu S X, *et al.* Isolation, identification and drug susceptibility test of *Citrobacter braakii* from *Mylopharyngodon piceus*[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2016, 46(5): 602-606 (in Chinese).
- [23] 张冬星, 康元环, 田佳鑫, 等. 团头鲂致病性弗氏柠檬酸杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. *中国兽医科学*, 2016, 46(12): 1589-1595.  
Zhang D X, Kang Y H, Tian J X, *et al.* Isolation, identification and drug susceptibility of the pathogenic *Cit-*

- robacter freundii* from *Megalobrama amblycephala*[J]. Chinese Veterinary Science, 2016, 46(12): 1589-1595 (in Chinese).
- [24] 罗福丽, 牛宇宸, 胡秀彩, 等. 巴西龟弗氏柠檬酸杆菌病的临床症状及组织病理观察[J]. 天津农学院学报, 2020, 27(2): 44-47.
- Luo F L, Niu Y C, Hu X C, et al. Clinical signs and histochemical observation of *Citrobacter freundii* disease in turtle (*Trachemys scripta elegans*)[J]. Journal of Tianjin Agricultural College, 2020, 27(2): 44-47 (in Chinese).
- [25] 肖宁, 孔令严, 周昊, 等. 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[J]. 水产学报, 2016, 40(6): 946-955.
- Xiao N, Kong L Y, Zhou H, et al. Isolation and identification of *Citrobacter freundii* from diseased *Procambarus clarkii* and its antibiotics susceptibility and adhesion characteristics[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(6): 946-955 (in Chinese).
- [26] Lü A J, Hu X C, Zheng L, et al. Isolation and characterization of *Citrobacter* spp. from the intestine of grass carp *Ctenopharyngodon idellus*[J]. *Aquaculture*, 2011, 313(1-4): 156-160.
- [27] 杨方园, 关瑞章, 李忠琴, 等. 花鳃鲃病原菌弗氏柠檬酸杆菌的鉴定[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2013, 18(2): 81-87.
- Yang F Y, Guan R Z, Li Z Q, et al. Identification of pathogenic *Citrobacter freundii* isolated from *Anguilla marmorata*[J]. Journal of Jimei University (Natural Science Edition), 2013, 18(2): 81-87 (in Chinese).
- [28] 胡秀彩, 吕爱军, 刘云燕, 等. 罗非鱼肠道中弗氏柠檬酸杆菌的分离与鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014(11): 174-176.
- Hu X C, Lv A J, Liu Y Y, et al. Isolation and identification of *Citrobacter freundii* from the intestine of tilapia[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2014(11): 174-176 (in Chinese).
- [29] 陈绮梨, 常藕琴, 张德峰, 等. 加州鲈源弗氏柠檬酸杆菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 南方农业学报, 2021, 52(2): 465-474.
- Chen Q L, Chang O Q, Zhang D F, et al. Isolation, identification and drug resistance analysis of *Citrobacter freundii* from *Micropterus salmoides*[J]. Journal of Southern Agriculture, 2021, 52(2): 465-474 (in Chinese).
- [30] 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(5): 210-213.
- Li B W, Li C Z, Zhang B J, et al. Study on the pathogen of oropharyngeal cavity ulcer syndrome in *Trionyx sinensis*[J]. Aquatic Science and Technology Information, 2000(5): 210-213 (in Chinese).
- [31] 林启存, 朱丽敏, 李忠全, 等. 中华鳖弗氏柠檬酸杆菌败血症病原分离鉴定与药敏试验[J]. 水产科学, 2008, 27(1): 42-43.
- Lin Q C, Zhu L M, Li Z Q, et al. Isolation, determination and antimicrobial susceptibility test of the *Citrobacter freundii* septicemia from soft shelled turtle *Trionyx sinensis*[J]. *Fisheries Science*, 2008, 27(1): 42-43 (in Chinese).
- [32] 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).
- [33] 胡广洲, 李登峰, 苏秀榕, 等. 患暴发性败血症中华鳖体内细菌的分离与鉴定[J]. 中国水产科学, 2010, 17(4): 859-868.
- Hu G Z, Li D F, Su X R, et al. Isolation and identification of bacteria from soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis*) associated with fulminant septicemia[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(4): 859-868 (in Chinese).
- [34] Kim M S, Jeong H D. Development of 16S *rRNA* targeted PCR methods for the detection and differentiation of *Vibrio vulnificus* in marine environments[J]. *Aquaculture*, 2001, 193(3-4): 199-211.
- [35] Paungfoo C, Prasertsan P, Burrell P C, et al. Nitrifying bacterial communities in an aquaculture wastewater treatment system using fluorescence in situ hybridization (FISH), 16S *rRNA* gene cloning, and phylogenetic analysis[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 97(4): 985-990.
- [36] Ribeiro T G, Clermont D, Branquinho R, et al. *Citrobacter europaeus* sp. nov., isolated from water and human faecal samples[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(1): 170-173.
- [37] Ribeiro T G, Novais Â, Branquinho R, et al. Phylogeny and comparative genomics unveil independent diversification trajectories of *qnrB* and genetic platforms within particular *Citrobacter* species[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015, 59(10): 5951-5958.



- [38] 石征宇, 易弋, 黄德生, 等. 一株弗氏柠檬酸杆菌的分离鉴定及致病性研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2018, 45(2): 479-485.
- Shi Z Y, Yi Y, Huang D S, *et al.* Isolation, identification and pathogenicity of a strain of *Citrobacter freundii*[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2018, 45(2): 479-485 (in Chinese).
- [39] 康兴宇, 王超杰, 王至诚, 等. 耐喹诺酮类抗生素的鱼源嗜水气单胞菌中内生质粒pAhW39的克隆及功能[J]. *水产学报*, 2021, 45(5): 760-768.
- Kang X Y, Wang C J, Wang Z C, *et al.* Cloning and functional identification of an endogenous plasmid pAhW39 from quinolone-resistant *Aeromonas hydrophila* isolated from fish[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(5): 760-768 (in Chinese).
- [40] 刘广义. 156株弗氏柠檬酸杆菌感染的分布与耐药性分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2011, 21(14): 3040-3041.
- Liu G Y. Distribution and drug resistance of 156 strains of *Citrobacter freundii*[J]. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2011, 21(14): 3040-3041 (in Chinese).

## Identification and multilocus sequence analysis of a novel species of *Citrobacter* isolated from diseased *Pelodiscus sinensis*

LIU Naiyu<sup>1</sup>, WANG Zhicheng<sup>1</sup>, HE Honggang<sup>1</sup>, WANG Weimin<sup>1</sup>, LIU Jingxia<sup>1</sup>, LUO Yi<sup>1,2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs,

Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Ministry of Education, College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** In October 2020, some *Pelodiscus sinensis* died in a farm in Hubei Province, China. To determine the pathogen and pathogenic characteristics of the disease, a dominant strain A3 was isolated from the liver of the diseased *P. sinensis*. Based on physiological and biochemical characteristics and 16S *rRNA* gene sequence identification, it was identified as *Citrobacter* sp.. Further identification of the *recN* gene showed that the *recN* gene sequence identities between A3 and *C. braakii* were 95.58%-96.01%, while the identities between A3 and other species of *Citrobacter* were less than 93.72%, which indicated that A3 belonged to a novel species of *Citrobacter*. Artificial infection tests confirmed its pathogenicity to *P. sinensis*. Compared with *Aeromonas hydrophila*, the course of A3 infection was slower, but the mortality was as high. Drug sensitivity tests showed that strain A3 was sensitive to 10 kinds of antibiotics such as meropenem, and resistant to 9 kinds of antibiotics such as florfenicol. Multilocus sequence typing (MLST) showed that strain A3 belonged to a new sequence type (ST). A phylogenetic tree based on the 7 housekeeping gene sequences of *Citrobacter* from MLST database was constructed. The results showed that the evolution of *Citrobacter* spp. had no significant relationship with the source and location of isolates. Moreover, strain A3 has the closest genetic relationship with ST120 strain Citfre2580 isolated from human in Europe. In this study, the pathogen of *P. sinensis* was isolated and identified, and a more reliable method for the identification of *Citrobacter* was described, in order to arouse people's attention to the pathogenicity of *Citrobacter*, and provide some reference for the healthy aquaculture of aquatic products.

**Key words:** *Pelodiscus sinensis*; *Citrobacter*; isolation and identification; drug resistance; multilocus sequence typing (MLST)

**Corresponding author:** LUO Yi. E-mail: luoyi@mail.hzau.edu.cn

**Funding projects:** Key Research and Development Project of Hubei Province (2020BBB122)