

患病大鲵中弗氏柠檬酸杆菌的分离与鉴定

高正勇¹, 曾令兵^{1,2*}, 孟彦², 刘小玲^{1*}, 张波²

¹华中农业大学水产学院, 武汉 430070

²中国水产科学研究院长江水产研究所, 武汉 430223

摘要: 【目的】确定导致大鲵 (*Andrias davidianus*) 细菌性感染死亡的病原。【方法】从大鲵肝脏中分离细菌, 通过 Biolog 微生物自动鉴定系统及分子生物学方法对纯培养的细菌进行鉴定, 再用大鲵和鲫鱼分别进行人工感染试验, 以确定分离菌的致病性, 同时对分离到的病原菌进行药物敏感试验。【结果】从患病大鲵肝脏中分离到一株致病菌 JZ01, 经人工感染健康大鲵, 可复制与自然发病相同的症状, 且从人工感染病鲵体内再次分离到相同的病原菌。该致病菌对健康鲫鱼也有致病性。经 Biolog 微生物自动鉴定系统的鉴定, 以及进一步的 16S rDNA 基因序列和系统发育分析都表明, 此致病菌为弗氏柠檬酸杆菌。药物敏感性试验表明, 该菌株对氨曲南、头孢三嗪、先锋噻肟等 9 种药物高度敏感。【结论】弗氏柠檬酸杆菌是大鲵的一种致病菌。本文在国内外首次报道了该菌对大鲵具有致病性。

关键词: 大鲵, 弗氏柠檬酸杆菌, 分离鉴定, 药敏试验

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 02-0169-08

中国大鲵 (*Andrias davidianus*) 俗名“娃娃鱼”, 是现存个体最大的有尾两栖动物, 属于两栖纲、有尾目、隐鳃鲵科、大鲵属^[1]。中国大鲵是我国珍稀的名贵特产, 属于国家二级保护动物, 已被列入 CITES 公约附录 I 中。大鲵在食品、医药、科研等多方面具有重要的价值。1978 年, 大鲵在我国首次人工繁殖成功, 随后在我国各地陆续开展了大鲵的人工养殖和繁殖技术的研究, 大鲵养殖业迅速发展, 使中国成为世界上最大的养鲵国家。然而随着养殖规模的扩大, 以及集约化程度的提高, 病害对大鲵产业所造成的经济损失逐渐凸显出来。大鲵病害的病原主要有细菌、病毒、寄生虫等, 而由细菌性病原所引起的疾病最常见, 造成的损失也最大。目前已经报道的大

鲵细菌性病原有嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、温和气单胞菌 (*Aeromonas sobria*)、维氏气单胞菌 (*Aeromonas veronii*)、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、迟钝爱德华菌 (*Edwardsiella tarda*)、杀鲑气单胞菌杀鲑亚种 (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*)、恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)^[2-4] 等。

2010 年, 长江水产研究所养殖的大鲵幼体发病, 患病大鲵出现消化不良或拒食症状, 随着病情的发展, 大鲵浮于水面, 头部和腹部肿大, 皮下可见出血点, 随后死亡。解剖后发现患病大鲵腹腔有少量腹水, 其它器官未发现明显的病变。于无菌条件下从患病大鲵肝脏中分离出一株细菌, 对

基金项目: 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心基本科研业务费 (2011JBFZ01); 公益性行业 (农业) 科研专项经费 (201203086-05)

* 通信作者: 曾令兵, Tel/Fax: +86-27-81780158, E-mail: zenglingbing@gmail.com; 刘小玲, Tel/Fax: +86-27-87282113, E-mail: liuxl@mail.hzau.edu.cn

作者简介: 高正勇 (1984-), 男, 河北赵县人, 硕士研究生, 从事水生动物病害防治研究。E-mail: gaozhengyong2008@163.com

收稿日期: 2011-09-07; 修回日期: 2011-11-18

健康大鲵进行人工感染试验,可复制出与自然发病大鲵相同的症状,确定了其致病性。经 Biolog 微生物自动鉴定系统和分子生物学鉴定确定,该致病菌为弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)。本研究为大鲵细菌病害的防控技术研究奠定了一定的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物:患病大鲵为长江水产研究所养殖的大鲵幼体。用于感染试验的健康大鲵取自于长江水产研究所鱼类育种与养殖研究室,平均体长 10.0 ± 1.0 cm,暂养在 40 cm \times 25 cm \times 5 cm 塑料托盘中。健康大鲵暂养一周后用于人工感染试验。用于感染试验的健康鲫鱼取自长江水产研究所窑湾试验基地,平均体长 13.0 ± 1.0 cm,平均体重为 43.0 ± 2.4 g,暂养于 76 cm \times 33 cm \times 53 cm 水族箱内,养殖用水为充分曝气去氯的自来水,充氧饲养于本实验室内,一周后用于感染试验,试验期间控制水温 22 ± 1 °C。

1.1.2 主要试剂和仪器:BHI 培养基(BD, Becto™ Brain Heart Infusion), PCR 产物纯化试剂盒(Promega, Wizard Sv Gel and PCR Clean up System) 药敏试剂盒(杭州天和微生物试剂有限公司), Biolog 细菌鉴定试剂盒等。全自动微生物鉴定仪(Biolog, Omilog GEN III, USA), 生物安全柜(ESCO, Class II BSC, Singapore), 离心机(Sigma, 3K-15, Germany), 化学发光成像与分析系统(BiO-RAD, ChemiDoc™ XRS +, USA), PCR 仪(Biometra, T-professional, Germany), 生化培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司, Spx-250BS-II), 恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司, ZHWY-100B)等。

1.2 致病菌分离与培养

取症状典型的濒死大鲵,用 70% 酒精消毒体表,在生物安全柜中无菌操作取肝脏于 BHI 琼脂平板上划线接种,置 30°C 培养,24 h 后挑取形态特征一致的优势菌落在相同的条件下作纯培养。纯培养物接种 BHI 液体培养基扩大培养,培养菌液分装于冻存管中,加甘油(终浓度 25%)于 -80°C 保存备用。菌株编号为 JZ01。

1.3 人工感染试验

取保存的菌株接种于 BHI 液体培养液中,培养 24 h 后 $3600 \times g$ 离心集菌,所得菌体用无菌 PBS 离心洗涤 3 次,McFarland 比浊法结合平板菌落计数法测定细菌浓度,并调整细菌浓度为 1×10^9 cfu/mL, 10 倍梯度稀释得到 1×10^8 cfu/mL、 1×10^7 cfu/mL, 共 3 个浓度梯度。取浓度为 1×10^8 cfu/mL 的细菌悬液通过浸泡途径感染 15 尾健康大鲵,取与细菌悬液等体积的 PBS 浸泡 15 尾健康大鲵作为对照组;将暂养 1 周后的健康鲫鱼随机分成 4 组,每组 30 尾,3 个试验组以 0.2 mL/尾的剂量采用腹腔注射途径分别注射 3 种浓度的菌悬液,对照组以 0.2 mL/尾的剂量腹腔注射 PBS。每天观察记录死亡情况。取人工感染死亡的大鲵及鲫鱼进行细菌的分离及鉴定,以确定致病菌。

1.4 Biolog 全自动微生物鉴定仪的鉴定

取经过 BHI 固体培养基纯培养的 JZ01 菌株采用单菌落划线接种于 BUG 鉴定平板上,30°C 培养 16 h - 24 h,待菌落大小适宜时,取 Biolog 细菌鉴定试剂盒 IF-A 接种液,将管外壁擦拭干净,置入 Biolog 浊度仪中,调整其读数为 100% T;用无菌棉签蘸取适量的单菌落至接种液中,使浊度仪读数在 92% T - 98% T 之间,用 8 孔移液枪将混合液转移至 GEN III 鉴定板中,每孔 100 μ L,将鉴定板装载于 Biolog 系统中培养,系统自动读数并输出鉴定结果。

1.5 16S rDNA 序列的扩增和测定

1.5.1 引物:用于 16S rDNA 序列扩增的引物为细菌 16S rDNA 通用引物,上游引物为:5'-CACGGATCCAGAGTTTGAT (C/T) (A/C) TGGCTCAG-3',下游引物为:5'-GTGAAGCTTAGG G (C/T) TACCTTGTTACGACTT-3'。

1.5.2 基因扩增:取 JZ01 菌种接种 BHI 液体培养基,30°C 培养 24 h 离心集菌。参照 GenElute Bacterial Genomic DNA Kit 使用说明书提取细菌总 DNA。采用 50 μ L 反应体系进行 PCR 扩增:10 \times PCR Buffer 5 μ L, dNTP (10 mmol/L) 1 μ L, Primers (F/R, 10 μ mol/L) 各 1 μ L, rTaq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.5 μ L, DNA 模板为 1 μ L, ddH₂O 补足至 50 μ L。PCR 扩增程序为:95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 1 min, 55°C 退火 1 min, 72°C 延伸 2 min, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,胶回收试剂盒回收,送上海生工生物工程有限公司测序。

1.6 序列同源性分析及系统发育树的构建

将测序所得到菌株 16S rDNA 序列通过 NCBI 的 Blast 检索系统进行序列同源性分析。检索出相似较高的序列采用 Clustal X (1.83) [5] 进行多序列匹配排列 (Multiple Alignments)。参照参考文献 [6] 使用 MEGA4.0 软件,采用邻接法 (Neighbor-joining method) 构建系统发育树,并通过 1000 次的自举分析 (boos trap) 进行置信度检测。

1.7 药敏试验

采用纸片扩散法 (K-B 法) 进行药敏性试验。取 100 μ L 新鲜菌悬液 (浓度约 1×10^7 cfu/mL) 均匀涂布于 BHI 固体培养基上,用无菌镊子将 35 种药敏纸片均匀贴在平板上,30 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后测量抑菌圈直径。

2 结果

2.1 致病菌分离

从患病大鲵的肝脏中分离到一株优势菌,该菌

株在 BHI 培养基上 30 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后出现菌落大小为 1 mm - 2 mm 圆形,边缘整齐,半透明,乳白色或淡黄色,有光泽的菌落。

2.2 人工感染试验

以浓度为 1×10^8 cfu/mL 的菌悬液浸泡感染的试验组在第 2 天出现了大鲵的死亡,7 天内累积死亡率达到了 60%。死亡大鲵的症状与自然发病的症状基本相同,且从人工感染病鲵体内再次分离到相同的病原菌。PBS 对照组在整个试验期间都没有出现死亡。

腹腔注射感染鲫鱼,可引起鲫鱼的死亡,结果见表 1。由表可知,菌液浓度为 1×10^7 cfu/mL 注射组鲫鱼在攻毒后 7 天内没有出现死亡, 1×10^8 cfu/mL 组鲫鱼在 7 天内累积死亡率达到了 13.3%, 1×10^9 cfu/mL 组鲫鱼在 7 天内累积死亡率达到了 60.0%,说明该菌株对鲫鱼也具有一定的致病性。人工感染死亡的鲫鱼下颌、腹部、各鳍条基部均出现出血点,解剖后,腹腔有大量血水,肠道出血严重,肝脏肿大。且从感染死亡的鱼体内再次分离该致病菌。

表 1 JZ01 对鲫鱼的人工感染试验结果

Table 1 Results of artificial infection of JZ01 in crucian carp

Groups	Concentration/ (cfu/mL)	Number of tested fish	Dose/ mL	No. of death at different time							Mortality/ %
				2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	
1	1×10^9	30	0.2	12	5	1	0	0	0	0	60.0
2	1×10^8	30	0.2	0	1	2	1	0	0	0	13.3
3	1×10^7	30	0.2	0	0	0	0	0	0	0	0.0
Control	PBS	30	0.2	0	0	0	0	0	0	0	0.0

2.3 Biolog 全自动微生物鉴定仪的鉴定

从患病大鲵、人工感染死亡的大鲵及鲫鱼中分离到的细菌经 Biolog 全自动微生物鉴定系统鉴定为同一种细菌。菌株 JZ01 的鉴定结果表明,该菌株为弗氏柠檬酸杆菌的可能性达 99.3%。各项参数为:PROB = 0.993; SIM = 0.759; DIST = 4.141。具体的反应项目及结果见表 2。

2.4 16S rDNA 序列分析及系统发育树的构建

用一对细菌 16S rDNA 的通用引物 PCR 扩增获得该菌株的 16S rDNA 基因片段,对此片段进行回收、测序,得到 1446bp 的序列。将测序所得序列输入到 NCBI 进行 Blast 检索,发现菌株 JZ01 与柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter*) 细菌的 16S rDNA 序列自然聚类。在最相近的 100 个序列中,柠檬酸杆菌属细菌占 94%,菌株 JZ01 与它们的同源性为 98% - 99%,

从中选择同源性较高的柠檬酸杆菌属以及其他属细菌的 16S rDNA 基因序列,并以肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis*) 和嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 为外群,进行分子系统发育分析。结果如图 1 所示,菌株 JZ01 (GenBank accession number: JN831090) 与 *Citrobacter freundii* (AB548829.1) 聚合,且置信度高达 94%。

2.5 药敏试验

药敏试验结果见表 3。其表明该菌株对氨曲南、头孢三嗪、先锋噻肟、先锋必等 9 种药物敏感;对氧哌嗪青霉素、左氟沙星、米诺环素、壮观霉素、卡那霉素、对氟沙星、氟哌酸、头孢西丁、环丙沙星、妥布霉素中度敏感;对四环素、克林霉素、红霉素、克拉霉素、氯霉素等 16 种药物不敏感。与已报道的一些水产动物弗氏柠檬酸杆菌的药敏试

表2 JZ01 菌株的 Biolog 鉴定结果
Table 2 Results of Biolog identification of JZ01

Reaction item		Result		Reaction item		Result
A1	Negative Control	N	E1	Gelatin		N
A2	Dextrin	N	E2	Glycyl-L-Proline		MN
A3	D-Maltose	P	E3	L-Alanine		P
A4	D-Trehalose	P	E4	L-Arginine		N
A5	D-Cellobiose	P	E5	L-Aspartic Acid		P
A6	Gentiobiose	P	E6	L-Glutamic Acid		P
A7	Sucrose	P	E7	L-Histidine		N
A8	D-Turanose	N	E8	L-Pyrogutamic Acid		N
A9	Stachyose	N	E9	L-Serine		P
A10	Positive Control	P	E10	Lincomycin		P
A11	Acidic PH PH6	P	E11	Guanidine HCl		P
A12	Acidic PH PH5	B	E12	Niaproof 4		P
B1	D-Raffinose	P	F1	Pectin		P
B2	α -D-Lactose	P	F2	D-Galacturonic Acid		P
B3	D-Melibiose	P	F3	L-Galactonic Acid Lactone		P
B4	β -Methyl-D-Glucoside	P	F4	D-Gluconic Acid		P
B5	D-Salicin	N	F5	D-Glucuronic Acid		P
B6	N-Acetyl-D-Glucosamine	P	F6	Glucuronamide		P
B7	N-Acetyl- β -D-Mannosamine	P	F7	Mucic Acid		P
B8	N-Acetyl-D-Galactosamine	P	F8	Quinic Acid		N
B9	N-Acetyl Neuraminic Acid	P	F9	D-Saccharic Acid		P
B10	1% NaCl	P	F10	Vancomycin		P
B11	4% NaCl	N	F11	Tetrazolium Violet		P
B12	8% NaCl	N	F12	Tetrazolium Blue		P
C1	α -D-Glucose	P	G1	P-Hydroxy-Phenylacetic Acid		L
C2	D-Mannose	P	G2	Methyl Pyruvate		P
C3	D-Fructose	P	G3	D-Lactic Acid Methyl Ester		N
C4	D-Galactose	P	G4	L-Lactic Acid		P
C5	3-Methyl Glucose	P	G5	Citric Acid		P
C6	D-Fucose	N	G6	6 α -Keto-Glutaric Acid		N
C7	L-Fucose	P	G7	D-Malic Acid		P
C8	L-Rhamnose	P	G8	L-Malic Acid		P
C9	Inosine	P	G9	Bromo-Succinic Acid		P
C10	1% Sodium Lactate	P	G10	Nalidixic Acid		N
C11	Fusidic Acid	P	G11	Lithium Chloride		P
C12	D-Serine	B	G12	Potassium Tellurite		N
D1	D-Sorbitol	P	H1	Tween 40		N
D2	D-Mannitol	P	H2	γ -Amino-Butyric Acid		N
D3	D-Arabitol	N	H3	α -Hydroxy-Butyric Acid		P
D4	myo-Inositol	P	H4	β -Hydroxy-D,L-Butyric Acid		P
D5	Glycerol	P	H5	α -Keto-Butyric Acid		N
D6	D-Glucose-6-PO4	P	H6	Acetoacetic Acid		N
D7	D-Fructose-6-PO4	P	H7	Propionic Acid		P
D8	D-Aspartic Acid	P	H8	Acetic Acid		P
D9	D-Serine	P	H9	Formic Acid		N
D10	Troleandomycin	P	H10	Aztreonam		P
D11	Rifamycin SV	P	H11	Sodium Butyrate		P
D12	Minocycline	P	H12	Sodium Bromate		N

P: Positive; N: Negative; MP: Mismatched Pos; MN: Mismatched Neg; B: Borderline; L: Less than A1 well.

验^[7-11]进行对比,发现虽然同为弗氏柠檬酸杆菌,但不同生物来源的菌株对药物的敏感性不尽相同,即便同种生物来源的菌株药敏试验结果也不

是完全相同,但是不同来源的菌株都对阿米卡星、复达欣敏感,对红霉素、青霉素 G、氨苄青霉素耐药。见表 4。

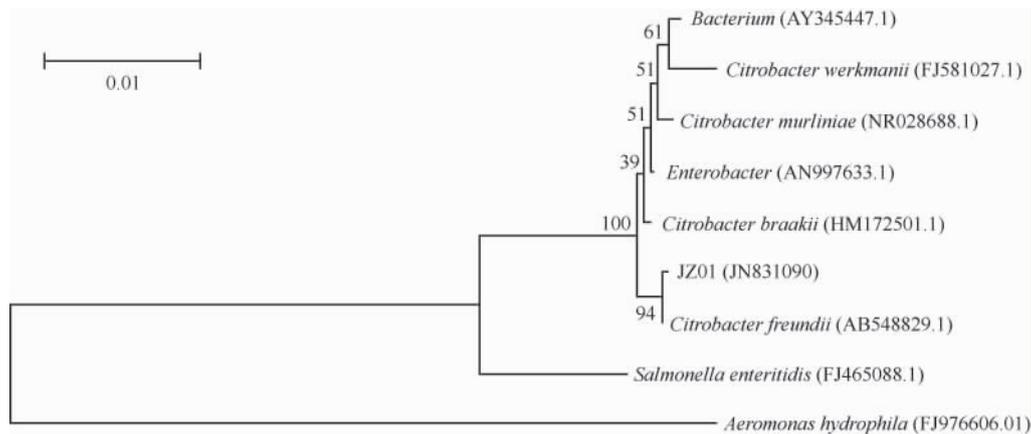


图1 以菌株 JZ01 的 16S rDNA 基因序列构建的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of *Citrobacter freundii* based on 16S r DNA gene sequence of strain JZ01. JZ01 refers to the strain isolated. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar , 1% sequence divergence.

表3 药物敏感性试验

Table 3 Antibiotic susceptibility test

Antibiotics	Diameter of inhibited halo (mm)	Susceptibility	Antibiotics	Diameter of inhibited halo (mm)	Susceptibility
Ofloxacin	10	I	Cefepime	24	S
Clarithromycin	≤6	R	Levofloxacin	11	I
Fortum	17	S	Clindamycin	≤6	R
Zinacef	≤6	R	Minocycline	15	I
Piperacillin	11	I	Erythromycin	≤6	R
Vancomycin	≤6	R	Oxacillin	≤6	R
Norfloxacin	9	I	Spectinomycin	12	I
Sulfamethoxazole	≤6	R	Ciprofloxacin	8	I
Amikacin	18	S	Tobramycin	9	I
Cefobid	20	S	Penicillin G	≤6	R
Gentamycin	≤6	R	Ampicillin	≤6	R
Cefotamine	28	S	Kanamycin	12	I
Ceftriaxone	27	S	Streptomycin	≤6	R
Cefoxitin	9	I	Midecamycin	≤6	R
Nitrofurantoin	17	S	Novaporin V	≤6	R
Aztreonam	24	S	Polymyxin B	16	S
Chloramphenicol	≤6	R	Tetracycline	≤6	R
Cefalotin	≤6	R			

Susceptibility: R means resistant; I means intermediate sensitive; S means sensitive

表4 药敏试验结果比较分析

Table 4 Comparative analysis of antibiotic susceptibility test results

Antibiotics	source	<i>Andrias davidianus</i>	<i>Eriocheir sinensis</i> ^[7]	<i>Eriocheir sinensis</i> ^[8]	<i>Trionyx sinensis</i> ^[9]	<i>Trionyx sinensis</i> ^[10]	<i>Cherax quadricarinatus</i> ^[11]
Cefotamine		S	S	-	-	-	-
Cefepime		S	S	-	-	-	-
Aztreonam		S	S	-	-	-	-
Amikacin		S	S	S	S	S	S
Fortum		S	S	-	-	S	-
Nitrofurantoin		S	I	S	-	S	-
Polymyxin B		S	I	-	-	-	-
Spectinomycin		I	S	-	-	-	-
Kanamycin		I	S	R	-	R	S
Ofloxacin		I	S	-	S	-	-
Norfloxacin		I	-	S	-	-	S
Cefoxitin		I	-	-	-	S	-
Tobramycin		I	S	-	-	S	-
Ciprofloxacin		I	S	I	-	I	-
Vancomycin		R	R	-	-	R	-
Sulfamethoxazole		R	S	R	R	R	S
Gentamycin		R	S	S	S	S	S
Chloramphenicol		R	S	R	-	S	S
Tetracycline		R	I	R	R	I	R
Novaporin V		R	-	-	-	-	I
Streptomycin		R	S	S	-	S	I
Ampicillin		R	R	R	-	R	-
Penicillin G		R	R	-	-	-	R
Erythromycin		R	R	-	-	R	R
Clindamycin		R	R	-	-	-	-

S means sensitive; I means intermediate sensitive; R means resistant, “-” means antibiotics used in this study hadn't been used in others

3 讨论

弗氏柠檬酸杆菌是革兰氏阴性短杆菌,需氧或兼性厌氧,属于沙门氏菌族中的柠檬酸杆菌属。柠檬酸杆菌属包括3个种及1个生物群——弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)、无丙二酸盐柠檬酸杆菌(*Citrobacter amalonaticus*)、差异柠檬酸杆菌(*Citrobacter diversus*)、无丙二酸盐柠檬酸杆菌生物群1(*Citrobacter amalonaticus* biogroup 1),分为11个基因种^[12]。弗氏柠檬酸杆菌为该属中的模式种,是一种条件致病菌,广泛分布于自然界中,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^[11]。在一定的条件下弗氏柠檬酸杆菌可引致人的感染,引发败血症、食物中毒、腹泻、关节炎等。孙洋等^[13]报道了该菌可导致东北虎出血性腹泻病。在水产动物方面,李华等^[8]报道了该菌可导致河蟹的肝胰腺、鳃、肌肉轻度水肿,最终引起

败血症而死亡。沈锦玉等^[11]从红螯螯虾中分离到该菌,病虾的尾部呈肉质样肿胀、烂尾等症状。陈翠珍等^[7]从中华绒螯蟹分离到该菌,证明了该菌对中华绒螯蟹的致病性。胡广洲等^[10]从患暴发性败血症中华鳖体内分离到该菌。Aijun Lü等^[14]从草鱼肠道分离到该菌,并证明其对小鼠和斑马鱼具有致病性。本次试验中分离到弗氏柠檬酸杆菌可导致大鲵头部肿大、腹部肿大、轻度腹水、皮下有出血点等症状,人工感染试验证明其对大鲵和鲫鱼都有致病性。

Biolog全自动微生物鉴定系统(Omilog GEN III)是根据微生物在新陈代谢过程中产生的酶类能使四唑类物质发生颜色反应、以及由于微生物自身的增殖而引起浊度改变的原理,通过对71种碳源的利用情况、以及23种化学物的灵敏性测试(GEN III)而产生的特征性指纹图谱,基于此而建立起来的与微生物种类相对应的数据库。待鉴定微生物与包被在鉴定板上各种物质反应产生特异性的指纹图谱,通过与数据库进行对比,得出鉴定结果。Biolog全自

动微生物鉴定系统能对微生物进行快速、准确的鉴定,显著优于常规的生理生化鉴定方法。在 Biolog 鉴定结果中, DIST 和 SIM 是最重要的两个值。DIST 值表示鉴定结果与数据库相应的数据条的匹配程度, DIST < 5.0 时匹配良好。而 SIM 值越接近 1.00, 鉴定结果的可靠性越高。在本项研究的细菌鉴定中, DIST 值为 4.141, SIM 值为 0.759, 表明鉴定结果准确。

药物敏感性试验表明大鲵弗氏柠檬酸杆菌对氨曲南、头孢三嗪、先锋噻肟、先锋必等药物敏感,对氧哌嗪青霉素、左氟沙星、米诺环素等药物中度敏感。该结果在大鲵生产实践中对该病的防治提供了一些科学依据。大鲵弗氏柠檬酸杆菌与其他水产生物来源的弗氏柠檬酸杆菌的药敏结果不尽相同,这可能与所处地域及生物体不同有关系,也可能是近年来普遍存在的滥用药物导致菌株随着时间的推移抗药性逐渐改变的结果。在本实验中我们也可以发现 35 种药物中有 16 种对该菌株不敏感。以上这些问题都对该菌的药物防治带来了困难,因此建议对不同地区、不同生物来源的特定菌株进行有针对性的药物筛选,选择最有效的药物进行治疗或预防,谨防菌株抗药性的产生。

大鲵养殖虽已有 30 多年的发展,然而病害研究起步相对较晚,采用先进的仪器设备以及分子鉴定的方法对病原进行系统研究的结果比较缺乏。本试验首次从大鲵中分离到了弗氏柠檬酸杆菌,并确定了其致病性,为大鲵病害防治提供了科学依据。

参考文献

- [1] Morescalchi A, Odierna G, Olmo E. Karyological relationships between the *Cryptobranchid* salamanders. *Experientia*, 1977, 33: 1579-1581.
- [2] 孟彦, 曾令兵, 杨焱清, 肖汉兵. 大鲵腹水病原菌的分离与鉴定研究. 西北农林科技大学学报 (*Journal of Northwest A & F University*), 2009, 37(3): 77-81.
- [3] 王旭, 颜其贵, 雷燕, 左兰, 曾晖. 中国大鲵腐皮病原菌的分离与鉴定. 中国人兽共患病学报 (*Chinese Journal of Zoonoses*), 2010, 26(10): 944-948.
- [4] 王高学, 白占涛, 张向前, 张联丽. 大鲵赤皮病病原分离鉴定及防治试验. 西北农业大学学报 (*Acta of Northwest Agricultural University*), 1999, 27(8): 71-74.
- [5] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25: 4876-4882.
- [6] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molec Biol Evol*, 1987, 4(4): 406-425.
- [7] 陈翠珍, 张晓君, 房海, 巩元芳, 葛慕湘. 中华绒螯蟹病原弗氏柠檬酸杆菌的鉴定. 中国人兽共患病杂志 (*Chinese Journal of Zoonoses*), 2006, 22(2): 136-141.
- [8] 李华, 邢殿楼, 白国福, 李向晖. 弗氏柠檬酸杆菌对河蟹致病性的研究. 水生生物学报 (*Acta Hydrobiologica Sinica*), 2001, 25(3): 217-223.
- [9] 林启存, 朱丽敏, 李忠全, 许宝青, 谢楠. 中华鳖弗氏柠檬酸杆菌败血症病原分离鉴定与药敏试验. 水产科学 (*Fisheries Science*), 2008, 27(1): 42-43.
- [10] 胡广洲, 李登峰, 苏秀榕, 李太武, 贺静静, 王孟前, 李慧, 李晔. 患暴发性败血症中华鳖体内细菌的分离与鉴定. 中国水产科学 (*Journal of Fishery Sciences of China*), 2010, 17(4): 859-868.
- [11] 沈锦玉, 顾志敏, 潘晓艺, 周保中, 尹文林, 曹铮. 红螯螯虾弗氏柠檬酸杆菌病原的分离与鉴定. 中国水产科学 (*Journal of Fishery Sciences of China*), 2005, 12(2): 197-200.
- [12] 赵克义, 阚方琦. 柠檬酸杆菌的分类近况. 中国卫生检验杂志 (*Chinese Journal of Health Laboratory Technology*), 2001, 11(2): 252-254.
- [13] 孙洋, 郭学军, 周博, 冯书章. 东北虎出血性腹泻病原分离与鉴定. 中国兽医杂志 (*Chinese Journal of Veterinary Medicine*), 2008, 44(9): 89-90.
- [14] Aijun L, Xiucai H, Lu Z, Aihua Z, Chengliang C, Jihong J. Isolation and characterization of *Citrobacter* spp. from the intestine of grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. *Aquaculture*, 2011, 313: 156-160.

Isolation and identification of *Citrobacter freundii* from diseased giant salamander , *Andrias davidianus*

Zhengyong Gao¹ , Lingbing Zeng^{1 2*} , Yan Meng² , Xiaoling Liu^{1*} , Bo Zhang²

¹ College of Fisheries , Huazhong Agricultural University , Wuhan 430070 , China

² Yangtze River Fisheries Research Institute , Chinese Academy of Fishery Sciences , Wuhan 430223 , China

Abstract: [**Objective**] To determine the pathogenic bacterium infecting giant salamander (*Andrias davidianus*). [**Methods**] Bacterium was isolated from the liver of diseased Chinese giant salamander and identified by the Biolog Microbial Identification System and molecular biology method. Healthy Chinese giant salamander and crucian carp were used for experimental infection with bacterial suspension. [**Results**] A bacterial strain JZ01 was isolated and identified from diseased giant salamander. Infection with the bacterial suspension to healthy giant salamander could reproduce the diseased symptoms as occurred naturally and the same bacterium could be recovered from these infected giant salamanders. The isolated bacterium also has certain pathogenicity to crucian carp. Identification by the Biolog Microbial Identification System , and further 16S rDNA sequence and phylogenetic analysis demonstrated that the bacterium isolated from diseased giant salamander was *Citrobacter freundii*. The susceptibility test to antibiotics demonstrated that the bacterial strain JZ01 was susceptible to aztreonam , cefepime and cefotamine. [**Conclusion**] *Citrobacter freundii* is a pathogen for cultured Chinese giant salamander.

Keywords: Giant salamander (*Andrias davidianus*) , *Citrobacter freundii* , isolation and identification , antibiotic susceptibility test

(本文责编:王晋芳)

Supported by the basic research grant of Freshwater Fishery Research Center , Chinese Academy of Fishery Sciences (2011JBFZ01)

* Corresponding authors. Tel/Fax: +86-27-81780158 , E-mail: zenglingbing@gmail.com; Tel/Fax: +86-27-87282113 , E-mail: liuxl@mail.hzau.edu.cn

Received: 7 September 2011 / Revised: 18 November 2011

《微生物学报》综述文章投稿最新要求

2011年12月第3次修订

为了避免篇幅庞大、罗列文献、内容空泛、缺乏观点,力求内容更加新颖、并更具可读性,自2003年本刊对综述类投稿提出了具体的要求,先后又作了两次修订。

1. 篇幅:主要刊登微型综述(mini review),来稿字数最好控制在5000字以内(不包括参考文献)。
2. 新意:选题要有新意,对读者及同行确有一定的启发作用和参考价值。
3. 述和评:结合文献扼要评述国内外学者在本领域的研究进展,不要泛泛罗列文献,只述不评。
4. 结合工作:结合自己的研究工作,就该研究领域存在的问题和解决的途径提出自己的观点。
5. 参考文献:控制在40篇以内,近3年发表的文献不少于10篇。
6. 作者:(1)数量不多于3人;(2)提供一份背景材料,内容包括:第一作者科研简介、责任作者(即通讯作者)科研简介、本课题组对相关工作情况的介绍(附已发文章)。

欢迎投送“能够反映国际研究热点、对学科发展有指导意义”的述评类文章。