

董靖,张露珊,刘绍春,等. 1 株克氏原螯虾肺炎克雷伯菌的分离鉴定及药物敏感性分析[J]. 华中农业大学学报, 2021, 40(1): 93-98.

DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.01.011

# 1 株克氏原螯虾肺炎克雷伯菌的分离鉴定及药物敏感性分析

董靖<sup>1</sup>, 张露珊<sup>1</sup>, 刘绍春<sup>2</sup>, 张国栋<sup>1</sup>, 周顺<sup>1</sup>, 杨秋红<sup>1</sup>, 艾晓辉<sup>1</sup>

1. 中国水产科学研究院长江水产研究所/湖北省水产品质量安全工程技术研究中心, 武汉 430223;

2. 岳阳渔美康生物科技有限公司, 岳阳 414100

**摘要** 从湖北潜江患病克氏原螯虾肝胰腺内分离到 1 株致病菌, 经过生理生化特征测定、16S rRNA 序列分析和进化树构建对该菌株进行鉴定, 并通过琼脂扩散法检测该分离株的药物敏感性, 通过肉汤微量稀释法测定抗菌药物的最小抑菌浓度。结果发现, 该菌株具有与肺炎克雷伯菌一致的生理生化特征, 16S rRNA 测序和进化树分析发现该分离株与肺炎克雷伯菌的基因相似度达到 99% 以上, 因此将该菌株鉴定为肺炎克雷伯菌。通过药敏试验发现, 该菌株仅对头孢噻肟和多粘菌素 B 敏感, 为多重耐药菌株。

**关键词** 克氏原螯虾(小龙虾); 肺炎克雷伯菌; 药敏试验; 多重耐药; 药物滥用; 食品安全; 疾病防控

**中图分类号** Q 939.1; S 945.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)01-0093-06

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*) 俗称小龙虾, 原产于墨西哥东北部和中美洲南部地区, 1929 年经日本引进到中国, 因其可以为人类提供丰富的优质蛋白、维生素 B 和矿物质等营养成分而成为风靡多个国家和地区的食品<sup>[1-2]</sup>。近年来随着国内小龙虾养殖规模的逐渐扩大, 养殖的集约化程度也有所提升, 但由于基础薄弱、优质种苗供应不足、病害多发和药物滥用等问题严重阻碍小龙虾产业的健康发展。尤其小龙虾养殖进入 5 月份后往往会大面积暴发疾病, 造成小龙虾大量死亡, 通常称为“五月瘟”<sup>[3]</sup>。其中, 由强致病性的细菌、真菌、病毒和寄生虫等病原体导致的小龙虾各种感染性疾病尤为严重<sup>[4]</sup>。化学类抗菌药物是日常生产中用于防治小龙虾病害的主要手段, 但极易导致环境中抗菌药物的污染和细菌耐药性的产生。此外, 大量化学抗菌药物的使用容易造成药物在小龙虾体内的蓄积和残留, 影响小龙虾产品的质量安全<sup>[5-6]</sup>。

肺炎克雷伯菌隶属于肠杆菌科克雷伯菌属, 是一种常见的条件性致病菌, 也是一种重要的人兽鱼共患病原菌, 能导致鱼类、陆生动物和人的多种感染性疾病<sup>[7]</sup>。自 1992 年首次在海、淡水鱼水产品中检测到肺炎克雷伯菌后, 肺炎克雷伯菌被发现能导致多种水产养殖动物的感染, 如大鲵(*Andrias david-*

*ianus*)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)、中华鳖(*Trionyx sinensis*)等<sup>[8-10]</sup>。疫苗和化学抗菌药物是治疗肺炎克雷伯菌感染的主要手段, 但目前尚无用于水产养殖源肺炎克雷伯菌感染的疫苗面世。因此, 对水产养殖源肺炎克雷伯菌感染的治疗主要依赖化学抗菌药物<sup>[7, 11]</sup>。而抗菌药物的广泛应用和滥用也不可避免地导致了肺炎克雷伯菌耐药菌株的产生。

2019 年 5 月湖北省潜江市一小龙虾养殖场发生了小龙虾“五月瘟”, 导致了大量的小龙虾死亡。笔者通过对患病小龙虾的病原学检查发现其存在肺炎克雷伯菌感染的情况, 进一步通过回归感染试验确定了该分离菌株对小龙虾的致病力。此外, 通过药敏试验和最小抑菌浓度测定等方法研究了该分离菌株的敏感性, 旨在为小龙虾“五月瘟”病原分析和疾病防控提供参考和依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

患病小龙虾样品采集自湖北省潜江市某小龙虾养殖场; 用于回归感染试验的健康小龙虾来自长江水产研究所荆州基地; 抗生素标准品头孢拉定、氨曲南、氨苄西林、亚胺培南、头孢唑林、头孢吡肟、头孢

收稿日期: 2020-06-08

基金项目: 湖北省技术创新专项重大项目(2019ABA077); 国家自然科学基金项目(31702368)

董靖, E-mail: dongjing@yfi.ac.cn

通信作者: 艾晓辉, E-mail: aixh@yfi.ac.cn

噻肟、多粘菌素 E、美罗培南、环丙沙星、阿莫西林、头孢他啶、氟苯尼考、四环素、苯唑西林、恩诺沙星、多西环素购自北京索莱宝科技有限公司；头孢唑肟、庆大霉素、阿奇霉素购自上海源叶生物科技有限公司；药敏纸片购自杭州微生物试剂有限公司；细菌基因组提取试剂盒、PCR Master Mix 等分子生物学试剂购自 TaKaRa 公司；脑心浸液(BHI)培养基购自青岛海博生物有限公司。

## 1.2 细菌分离和纯化

取濒死小龙虾在无菌条件下用生理盐水反复冲洗体表 3~5 次,在超净工作台中剖取小龙虾的肝胰腺,用生理盐水冲洗后采用匀浆器将其研磨均匀。取研磨液在脑心浸液(BHI)固体培养基上划线,将平板置于 30 ℃ 培养 16~20 h。从平板中挑取单菌落反复划线纯化 2~3 次,将得到的纯化菌株置于 4 ℃ 保存,标记为 L20190516。

## 1.3 回归感染试验

从纯化好的平板无菌挑取 L20190516 菌株的单菌落接种至 BHI 液体培养基中,30 ℃ 振荡培养至对数生长期。培养好的菌液用麦氏比浊管稀释成  $1.5 \times 10^8$ 、 $1.5 \times 10^7$ 、 $1.5 \times 10^6$ 、 $1.5 \times 10^5$ 、 $1.5 \times 10^4$  cfu/mL 的菌悬液。选取活力较好、无明显外伤的小龙虾作为试验动物,每组 30 尾,通过腹腔注射的方式在第 2 腹节和第 3 腹节之间注射菌液 0.1 mL,阴性对照组注射 0.1 mL 无菌生理盐水。将注射后的虾暂养于玻璃缸内,保持水温 23~25 ℃,溶氧在 5.5~7.5 mg/L,期间正常换水但不投喂饲料。感染后每天观察并记录不同组别小龙虾的活动情况和死亡数,连续观察 10 d。通过 Bliss 法计算其半数致死浓度(LC<sub>50</sub>)<sup>[12]</sup>。取感染后濒死的小龙虾肝胰腺进行病原的分离和鉴定。

## 1.4 细菌生理生化鉴定

从纯化的平板上挑取 L20190516 菌株的单菌落进行革兰氏染色,在光学显微镜下观察细菌的形态特征。此外,将受试菌株的单菌落用无菌生理盐水重悬后加入到 API20E 生化鉴定试剂条上,按产品说明书操作,在 28 ℃ 条件下培养 24 h 后将鉴定试剂条置于 ATB 32GN 细菌鉴定系统中进行生化鉴定。

## 1.5 细菌分子鉴定

参照细菌基因组提取试剂盒操作说明书提取菌株 L20190516 的全基因,以提取的全基因组作为模板,采用 16S rRNA 通用引物进行扩增<sup>[13]</sup>。用于鉴定的通用引物核苷酸序列:上游引物(16S rRNA-F):5'-

AGAGTTTGATCATGGCTC-3',下游引物(16S rRNA-R):5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3',PCR 产物的长度约为 1 500 bp。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶检测并测序。采用 Blast 软件对测序结果进行同源性比对。从 Blast 结果中选取与菌株 L20190516 同源性较高的相关已知序列,采用 MEGA5.1 软件进行多重序列比对分析,采用邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发育树,校正模型为 Kimura 2-parameter,通过 Bootstraps 法自举数集 1 000 次。

## 1.6 药物敏感性测试

L20190516 菌株对常用抗菌药物的敏感性通过纸片扩散法(K-B)进行测定<sup>[14-15]</sup>。在超净工作台中无菌挑取 L20190516 单菌落至 BHI 液体培养基中,在 30 ℃ 摇床中振荡培养至对数生长期。培养好的菌液通过离心收集菌体并用无菌 PBS 重悬,通过麦氏比浊管将菌液浓度调整至  $1.5 \times 10^8$  cfu/mL。将菌液充分混匀后涂布至 MH 琼脂培养基上,在 30 ℃ 生化培养箱中继续培养 18~24 h 后用游标卡尺测定不同抗菌药物的抑菌圈直径。敏感性结果判定参照杭州微生物试剂有限公司提供的判定标准。

## 1.7 最小抑菌浓度测定

采用 CLSI 推荐的肉汤微量稀释法测定不同抗菌药物的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentrations, MICs)。在 96 孔板中将配好的抗菌药物进行倍比稀释,每孔内药物体积为 100 μL,然后加入 100 μL 稀释好的菌悬液,使每孔中菌悬液的浓度为  $5 \times 10^5$  cfu/mL。每种药物设置 3 次重复,不加药不加菌的孔设置为阴性对照,不加药加菌的孔设置为阳性对照。将加好的培养板放置于生化培养箱中,30 ℃ 条件下培养 18~24 h。MICs 定义为没有细菌生长的最小浓度。

# 2 结果与分析

## 2.1 分离株的培养特性

发病小龙虾活力降低,应激能力差,采食量下降,进地笼后死亡的现象较多,其中大虾死亡情况较为严重。剖检发现其肝胰腺发白,肠道内容物较少,肝胰腺积水。采取患病虾的肝胰腺进行细菌分离,得到的优势菌在平板上形成半透明、颜色灰白、中央隆起的光滑菌落。经革兰氏染色镜检发现该菌为短杆状革兰氏阴性菌。

## 2.2 分离株对小龙虾的毒力

健康小龙虾注射不同剂量的 L20190516 菌悬液后出现了一定程度的发病和死亡,高浓度攻毒组

出现了急性死亡现象,在 3 d 内全部死亡,而阴性对照组在试验期间没有明显的发病和死亡(表 1)。感染后的小龙虾表现为活动减缓、无力等症状,剖检发现其肝胰腺发白,有部分出现积水现象。采用 Bliss

法得到了该菌株对小龙虾的  $LC_{50}$  为  $2.13 \times 10^5$  cfu/mL。对出现典型症状及濒死小龙虾进行剖检、细菌分离得到了与 L20190516 菌株性状一致的菌落。

表 1 分离株感染健康小龙虾后的死亡率

Table 1 Mortality of the isolate on healthy crayfish

组别 Group	感染浓度/(cfu/mL) Concentration	感染后不同时间的死亡数 Deaths after infection								死亡率/% Mortality
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	
1	$1.5 \times 10^8$	10	11	9	0	0	0	0	0	100.00
2	$1.5 \times 10^7$	8	10	8	3	1	0	0	0	100.00
3	$1.5 \times 10^6$	3	6	4	2	1	0	2	0	60.00
4	$1.5 \times 10^5$	4	2	3	1	1	0	1	0	40.00
5	$1.5 \times 10^4$	2	1	2	0	2	1	0	0	26.67
阴性对照 Negative control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00

### 2.3 生化鉴定结果

对分离纯化的优势菌接种于 API20E 生化鉴定条,经过孵育后置于 ATB 细菌自动鉴定系统

中鉴定。结果发现该优势菌的生化特征符合肺炎克雷伯菌的特征,相似度大于 98%。生化鉴定结果见表 2。

表 2 分离株的生化鉴定结果

Table 2 Biochemical characterization of the isolate

测定项目 Tested parameters	反应结果 Reactions	测定项目 Tested parameters	反应结果 Reactions
$\beta$ -半乳糖苷 ONPG	+	肌醇 INO	+
精氨酸双水解酶 ADH	-	山梨醇 SOR	+
赖氨酸脱羧酶 LDC	+	鼠李糖 RHA	+
鸟氨酸脱羧酶 ODC	-	蔗糖 SAC	+
柠檬酸利用 CIT	+	蜜二糖 MEL	+
硫化氢产生 $H_2S$	-	苦杏仁苷 AMY	+
尿素酶 URE	+	阿拉伯糖 ARA	+
色氨酸脱氨酶 TDA	-	氧化酶 OX	-
吲哚产生 IND	-	运动性 MOB	-
丙酮酸盐 VP	+	硝酸盐还原 NIT	-
明胶酶 GEL	-	麦康凯平板 McC	+
葡萄糖 GLU	+	氧化型 OF-O	+
甘露醇 MAN	+	发酵型 OF-F	+

### 2.4 16S rRNA 序列分析

通过 PCR 扩增得到了分离株 L20190516 的 16S rRNA 片段,长度约为 1 500 bp,PCR 产物经纯化后直接测序。将得到的序列(MT409892)与 GenBank 数据库中的已知基因序列同源性比对,构建系统发育树。结果发现,分离株 L20190516 与肺炎克雷伯菌(KX237750.1、KU937377.1)、大肠杆菌(LR025099.1)、产气克雷伯菌(LR134254.1)聚为一支(图 1),同源性为 99%。结合该菌株的生理生化特征和系统发育树情况将该菌株判定为肺炎克雷伯菌。

### 2.5 药敏试验结果

通过 K-B 法测定 20 种化学抗菌药物的敏感性,其结果见表 3。该菌株对头孢噻肟、多粘菌素 B 敏感,对新霉素、亚胺培南中度敏感,对恩诺沙星、多西

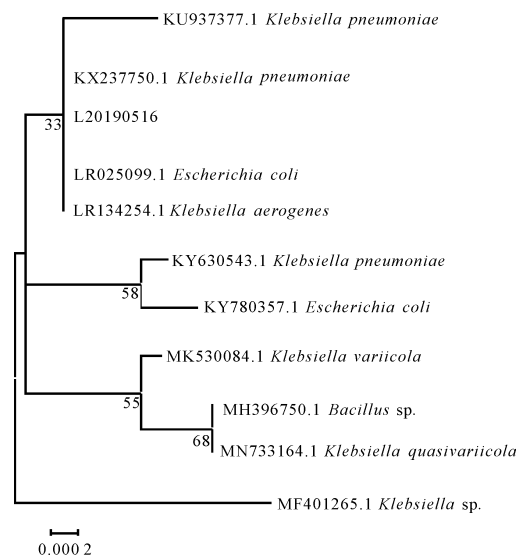


图 1 L20190516 菌株的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA genes sequence of L20190516

环素、氟苯尼考等 16 种药物耐药。通过肉汤微量稀释法测定 20 种药物的最小抑菌浓度,结果如表 4 所示。

表 3 L20190516 分离株对 20 种抗菌药物敏感性

药物名称 Antibiotics	每片含量/ $\mu\text{g}$ Content	抑菌圈直径/mm Inhibition zone	敏感度 Sensitivity
庆大霉素 Gentamicin	10	0	R
妥布霉素 Tobramycin	10	8.00 $\pm$ 1.34	R
新霉素 Neomycin	30	15.00 $\pm$ 2.27	I
链霉素 Streptomycin	10	7.00 $\pm$ 1.85	R
卡那霉素 Kanamycin	30	0	R
亚胺培南 Imipenem	10	14.00 $\pm$ 2.38	I
头孢唑啉 Cefazolin	30	0	R
头孢噻肟 Cefotaxime	30	27.00 $\pm$ 3.11	S
阿莫西林 Amoxicillin	20	0	R
氨苄西林 Ampicillin	10	0	R
苯唑西林 Oxacillin	1	0	R
氟苯尼考 Florfenicol	30	0	R
多粘菌素 B Polymyxin B	300	13.00 $\pm$ 2.06	S
红霉素 Erythromycin	15	0	R
阿奇霉素 Azithromycin	15	0	R
恩诺沙星 Enrofloxacin	10	9.00 $\pm$ 2.13	R
多西环素 Doxycycline	30	0	R
四环素 Tetracycline	30	0	R
阿米卡星 Amikacin	30	9.00 $\pm$ 1.19	R
头孢拉定 Cefradine	30	0	R

注 Note; S: 敏感 Susceptible; I: 中度敏感 Intermediate; R: 耐药 Resistant.

表 4 抗菌药物对 L20190516 分离株的 MICs

药物名称 Antibiotics	MIC/ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	药物名称 Antibiotics	MIC/ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
头孢拉定 Cefradine	8	环丙沙星 Ciprofloxacin	16
氨曲南 Aztreonam	<0.06	阿莫西林 Amoxicillin	>32
氨苄西林 Ampicillin	>32	头孢他啶 Ceftazidime	0.25
亚胺培南 Imipenem	>32	头孢唑肟 Ceftizoxime	>32
头孢唑啉 Cefazolin	8	氟苯尼考 Flufenicol	>32
头孢吡肟 Cefepime	<0.06	四环素 Tetracycline	>32
庆大霉素 Gentamicin	>32	苯唑西林 Oxacillin	>32
头孢噻肟 Cefotaxime	<0.06	阿奇霉素 Azithromycin	>32
多粘菌素 E Colistin	1	恩诺沙星 Enrofloxacin	32
美罗培南 Meropenem	<0.06	多西环素 Doxycycline	8

### 3 讨论

近年来,随着水产养殖业的迅猛发展,有关水产养殖来源的致病菌的报道越来越多,病害频发对水产养殖业的发展造成了一定的影响。随着小龙虾消费市场的打开,人们养殖小龙虾的热情高涨,养殖规模不断扩大,随着养殖规模和面积的不断增加,小龙虾病害也越来越多,给小龙虾养殖造成了惨重的损失<sup>[16]</sup>。小龙虾的细菌性病害主要由柠檬酸杆菌属、气单胞菌属、假单胞菌属、弧菌属等引起<sup>[16-19]</sup>。本试验首次从湖北潜江发病小龙虾中分离到 1 株优势菌,经过回归感染试验发现该菌株对健康小龙虾致病,在感染小龙虾体内再次分离到该菌株,而阴性对照组未分离到;进一步通过生理生化鉴定、16S rRNA 鉴定和系统发育树构建将该菌株鉴定为肺炎克雷伯菌。此外,本试验通过 ELISA 法(酶免生物)和镜检法分别排除了患病小龙虾感染白斑综合征病毒和寄生虫的可能。回归感染试验前将小龙虾暂养 10 d 后再选取健康个体入组,试验时设置了注射无菌生理盐水的阴性对照组且在试验过程中阴性对照组未发生死亡,表明各试验组小龙虾的死亡均由感染肺炎克雷伯菌引起,而非未检测到的未知病原体。

谭爱萍等<sup>[11]</sup>、卢玉婷等<sup>[20]</sup>、滕涛等<sup>[9]</sup>分别从鳊、鲤、团头鲂体内分离到肺炎克雷伯菌,发现该菌

主要引起养殖鱼类的腹水、内脏器官充血肿胀等症状,认为肝脏(肝胰腺)可能是肺炎克雷伯菌主要侵害的靶器官。本试验发现肺炎克雷伯菌能导致小龙虾肝胰腺发白、采食量下降和肠道内容物减少等主要症状,该菌感染主要发生于 5 月中旬水温在 25 ℃ 左右时。综合以上信息可以推断肺炎克雷伯菌是小龙虾“五月瘟”的病原体之一。

自 2001 年首次发现了对碳青霉烯类抗菌药物耐药的肺炎克雷伯菌后,产 KPC 酶及耐碳青霉烯类抗菌药物的肺炎克雷伯菌不断被发现,导致临床中对肺炎克雷伯菌的治疗越来越难<sup>[21]</sup>。滕涛等<sup>[9]</sup>研究了团头鲂源肺炎克雷伯菌对 27 种抗菌药物的敏感性,发现仅对磷霉素、复方新诺明和氨曲南 3 种药物敏感。谭爱萍等<sup>[11]</sup>发现鳗源肺炎克雷伯菌仅对亚胺培南、链霉素和阿米卡星 3 种药物敏感,对其余 17 种受试药物均耐药。童桂香等<sup>[22]</sup>分析了山瑞鳖(*Palea steindachneri*)肺炎克雷伯菌的耐药性,发现该菌对受试的 30 种药物中的头孢西叮、舒普深(头孢哌酮、舒巴坦)和阿米卡星敏感,对特治星(哌拉西林、他唑巴坦)中度敏感,对其余 26 种药物耐药。从以上研究可以推断出水产源肺炎克雷伯菌耐药性较为严重,且大部分分离菌株具有多重耐药性。本试验所分离的肺炎克雷伯菌仅对受试的 20 种抗菌药物中的头孢噻肟和多粘菌素 B 敏感,该结果提示本次分离的菌株为多重耐药肺炎克雷伯菌。

## 参考文献 References

- [1] YI S, LI Y, SHI L, et al. Characterization of population genetic structure of red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, in China [J/OL]. Scientific reports, 2018, 8(1): 5586 [2020-06-08]. <https://www.nature.com/articles/s41598-018-23986-z>. DOI: 10.1038/s41598-018-23986-z.
- [2] TANG D, SHI X, GUO H, et al. Comparative transcriptome analysis of the gills of *Procambarus clarkii* provides novel insights into the immune-related mechanism of copper stress tolerance [J]. Fish shellfish immunol, 2020, 96: 32-40.
- [3] 陈孝合. 稻田养虾“五月瘟”的形成原因及防控措施 [J]. 渔业致富指南, 2019(16): 52-54. CHEN X H. The causes and prevention of *Procambarus clarkii* “May diseases” cultivated in paddy field [J]. Fishery guide to be rich, 2019(16): 52-54 (in Chinese).
- [4] 付应三. 克氏原螯虾传染性疾病的初步研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2010. FU Y S. Preliminary study on infectious diseases of red swamp crayfish [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2010 (in Chinese with English abstract).
- [5] 孟愷, 胡骞, 金玉立, 等. 复方中草药制剂对克氏原螯虾生长、免疫功能及肝胰腺组织的影响 [J]. 中国饲料, 2019(21): 60-65. MENG Y, HU Q, JIN Y L, et al. Effects of compound Chinese herbal medicine on growth, immunity and hepatopancreas of crayfish *Procambarus clarkii* [J]. China feed, 2019(21): 60-65 (in Chinese with English abstract).
- [6] 骆玉玲, 张辉, 白海峰, 等. 微生态制剂在克氏原螯虾生态养殖中的应用试验 [J]. 河北渔业, 2019(7): 17-19. LUO Y L, ZHANG H, BAI H F, et al. Application of probiotics in the ecological culture of crayfish *Procambarus clarkii* [J]. Hebei fisheries, 2019(7): 17-19 (in Chinese).
- [7] 朱利霞, 王洪彬, 赵希艳, 等. 肺炎克雷伯菌研究进展 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2019(13): 42-45. ZHU L X, WANG H B, ZHAO X Y, et al. Research progress on *Klebsiella Pneumoniae* [J]. Heilongjiang animal science and veterinary medicine, 2019(13): 42-45 (in Chinese).
- [8] 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 with English abstract).
- [9] 滕涛, 梁利国, 谢骏, 等. 团头鲂源肺炎克雷伯氏菌的分离鉴定 [J]. 水生态学杂志, 2016, 37(6): 95-100. TENG T, LIANG L G, XIE J, et al. Isolation and identification of pathogenic *Klebsiella pneumoniae* from *Megalobrama amhlycephala* [J]. Journal of hydroecology, 2016, 37(6): 95-100 (in Chinese with English abstract).
- [10] 李晓英, 周卫平, 樊汶樵. 大鲵肺炎克雷伯菌的部分生物学特性与致病性分析 [J]. 中国预防兽医学报, 2017, 39(8): 628-632. LI X Y, ZHOU W P, FAN W J. The partial biological characteristics and pathogenic analysis of *Klebsiella pneumoniae* from Chinese Giant salamander [J]. Chinese journal of preventive veterinary medicine, 2017, 39(8): 628-632 (in Chinese with English abstract).
- [11] 谭爱萍, 邓玉婷, 姜兰, 等. 一株多重耐药鳗源肺炎克雷伯菌的分离鉴定 [J]. 水生生物学报, 2013, 37(4): 744-750. TAN A P, DENG Y T, JIANG L, et al. Isolation and identification of a multiple-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* from *Anguilla marmorata* [J]. Acta hydrobiologica sinica, 2013, 37(4): 744-750 (in Chinese with English abstract).
- [12] FINNEY D J. The median lethal dose and its estimation [J]. Archives of toxicology, 1985, 56(4): 215-218.
- [13] 董靖, 阮晶, 胥宁, 等. 一株有抑菌活性解淀粉芽孢杆菌的鉴定 [J]. 吉林农业大学学报, 2016, 38(4): 410-415. DONG J, RUAN J, XU N, et al. Identification of a *Bacillus amyloliquefaciens* strain with antibacterial activity [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2016, 38(4): 410-415 (in Chinese with English abstract).
- [14] CLYDE T. NCCLS standards for antimicrobial susceptibility tests [J]. Laboratory medicine, 1983, 14(9): 549-553.
- [15] 董靖, 刘永涛, 胥宁, 等. 日本医蛭水肿病病原分离鉴定及敏感性

- 试验[J].淡水渔业,2018,48(6):46-52.DONG J,LIU Y T,XU N,et al.Identification and susceptibility test of pathogenic *Aeromonas veronii* isolated from leech *Hirudo nipponia*[J].Freshwater fisheries,2018,48(6):46-52 (in Chinese with English abstract).
- [16] 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.PENG B W,YANG Y B,AI X H,et al.Isolation and identification of *Aeromonas veronii* from *Procambarus clarkii* and its antibiotic sensitivity[J].Transactions of oceanology and limnology,2018(4):108-114 (in Chinese with English abstract).
- [17] 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 with English abstract).
- [18] 张英豪,顾泽茂,兰江凤.虾应对感染的先天免疫反应研究进展[J].华中农业大学学报,2019,38(3):119-130.ZHANG Y H,GU Z M,LAN J F.Recent advances in study of immune response of shrimp to pathogen infection:a review[J].Journal of Huazhong Agricultural University,2019,38(3):119-130 (in Chinese with English abstract).
- [19] LONGSHAW M.Diseases of crayfish:a review[J].Journal of invertebrate pathology,2011,106(1):54-70.
- [20] 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.LU Y T,ZHENG D D,HU Y Y,et al.Isolation and identification of *Klebsiella pneumoniae* from carp[J].Chinese journal of veterinary drug,2014,48(9):9-13 (in Chinese with English abstract).
- [21] 杜伟勤,薛婷,王桂琴.肺炎克雷伯菌感染的临床分布及耐药分析[J].中国药物与临床,2019,19(6):991-992.DU W Q,XUE T,WANG G Q.Clinical distribution and drug resistance analysis of *Klebsiella pneumoniae* infection[J].Chinese remedies & clinics,2019,19(6):991-992 (in Chinese).
- [22] 童桂香,吴建坤,吴祥庆,等.山瑞鳖源肺炎克雷伯菌的分离鉴定及其药敏特性分析[J].中国兽医学报,2016,36(5):750-755.TONG G X,WU J K,WU X Q,et al.Isolation,identification and antibiotic sensitivity of *Klebsiella pneumoniae* from *Palea steindachneri*[J].Chinese journal of veterinary science,2016,36(5):750-755 (in Chinese with English abstract).

## Isolation, identification and susceptibility analysis of pathogenic *Klebsiella pneumonia* from diseased *Procambarus clarkii*

DONG Jing<sup>1</sup>, ZHANG Lushan<sup>1</sup>, LIU Shaochun<sup>2</sup>, ZHANG Guodong<sup>1</sup>,  
ZHOU Shun<sup>1</sup>, YANG Qihong<sup>1</sup>, AI Xiaohui<sup>1</sup>

1. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences/  
Hubei Province Engineering and Technology Research Center of Aquatic Product  
Quality and Safety, Wuhan 430223, China;  
2. Yueyang Yumeikang Biological Technology Co., Ltd., Yueyang 414100, China

**Abstract** A pathogenic bacterium was isolated from the diseased *Procambarus clarkii* in Qianjiang, Hubei Province. The strain was identified by physiological and biochemical assay, 16S rRNA sequencing and phylogenetic analysis. Then susceptibility of the strain to antibiotics was performed by the agar diffusion method, and the minimum inhibitory concentrations (MICs) were evaluated by the micro-dilution method. The results showed that the physiological and biochemical characteristics of the isolated strain were similar to that of *Klebsiella pneumoniae*. The 16S rRNA sequencing and phylogenetic analysis showed that the 16S rRNA sequence of the strain shared over 99% similarities with that of *K. pneumoniae*. Therefore, the strain was identified as *K. pneumoniae*. According to the susceptibility results, the strain was sensitive to cefotaxime and polymyxin B among all the tested antibiotics. These results above indicated that the strain was a multi-resistant *K. pneumoniae* strain.

**Keywords** *Klebsiella pneumoniae* (crayfish); *Procambarus clarkii*; susceptibility test; multi-resistant; drug abuse; food safety; disease prevention and control

(责任编辑:边书京)