

广东中山地区气单胞菌环境株的分离、鉴定及系统发生关系*

杨五名^{1,2} 李爱华^{1**} 刘金玉^{1,2} 唐辉远¹

(中国科学院水生生物研究所 淡水生态与生物技术国家重点实验室 武汉 430072)

(中国科学院研究生院 北京 100039)

摘要 从广东省中山市的池塘水样、底泥、健康鱼、肠道及稻田土样中用 *Aeromonas* 的选择培养基分离到 10 株气单胞菌。通过生理生化测试、16S rDNA 序列测定、与气单胞菌典型菌株的 16S rDNA 序列进行比对和聚类分析,对它们进行了鉴定,并研究了它们之间的系统发生关系。结果显示该地区环境中气单胞菌的优势种除 *A. hydrophila* (HG1 组)外,还有 *A. caviae* (HG4 组)、*A. jandaei* (HG9 组)和 *A. veronii* (HG10 组),其中后两种是国内新记录。这是国内首次对环境气单胞菌多样性进行研究。

关键词 分离与鉴定,气单胞菌,多样性

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)04-0745-04

Isolation, Identification and Phylogenetic Relationship of Environmental Strains of *Aeromonas* spp. from Zhongshan Area, Guangdong Province*

YANG Wu-Ming^{1,2} LI Ai-Hua^{1**} LIU Jin-Yu^{1,2} TANG Hui-Yuan¹

(State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

(Postgraduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

Abstract Ten strains of *Aeromonas* spp. using a selective media *Aeromonas* agar base were isolated from the water, sediment and intestine content of healthy fish in fish ponds as well as the mud sample taken from rice fields, in Zhongshan city, Guangdong Province. They were identified by means of conventional physiological and biochemical tests together with 16S rDNA sequencing. In addition, the phylogenetic relationship between these strains and some type strains of *Aeromonas* spp. was analyzed based on their 16S rDNA sequences. *Aeromonas hydrophila* was found to be the most frequently isolated *Aeromonas* species as expected. Other isolates were identified as *Aeromonas caviae*, *A. jandaei*, *A. veronii*, respectively, among which *A. jandaei* and *A. veronii* were new record of *Aeromonas* species in China. This is the first study for the diversity of *Aeromonas* species in the environment in our country.

Key words Isolation and identification, *Aeromonas*, Diversity

气单胞菌分类上属于变形菌门,γ变形菌纲,气单胞菌科,气单胞菌属^[1],主要特征为:革兰氏染色阴性,具有圆端的直杆菌到细胞接近球状,直径 0.3μm~1.0μm,单个、成对或短链排列。一端有鞭毛,动力强。兼性厌氧,具有呼吸和发酵代谢类型。能利用葡萄糖和其它糖类并产酸,常产气,还原硝酸盐,氧化酶阳性,触酶阳性,抗弧菌抑制剂 2,4-二氨基-6,7-异丙基喋啶(O/129)。这类细菌在环境中分布极为广泛,在人和其它动物包括水生动物的肠道中均有正常分布^[2]。然而在某些情况下,这类细菌能引发人和动物肠道内外的多种感染性疾病,严

重时甚至能引起多种水产养殖动物的暴发性死亡^[3]。气单胞菌当前的分类主要依据 DNA 杂交和 16S rDNA 相似度,目前国际认可的种类包括至少 17 个杂交组(Hybridization Groups, HGs),模式种为嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)。国内至今只报道了 *A. hydrophila*, *A. sobria* 和 *A. caviae* 3 个种,而且主要是分离自罹病动物体内,对于环境中气单胞菌的分布以及种类组成一直缺乏研究。我国广东省中山地区气候非常适合气单胞菌的生存,引起该地区的水产养殖,鱼类发病频繁,人感染气单胞菌的病例也时有报道。我们在该地区采取池塘水样、池

* 国家自然科学基金资助项目(No. 30670112) 广东省中山市科技攻关资助项目(No. 2005019)

** 通讯作者 Tel: 027-68780053 E-mail: liaihua@ihb.ac.cn

收稿日期:2006-09-22,修回日期:2007-01-16

塘底泥、健康鱼肠道及稻田土壤样品,分离筛选气单胞菌,以期能了解该环境中其种类组成,发现国内已报道之外的其它种类,以及它们之间的系统发生关系,这将有助于今后进一步研究气单胞菌相关疾病的流行病学及其分子机理。

1 材料与方法

1.1 样品采集

采样时间为 2005 年 7 月,采样前连续多日天晴,水温为 30℃ ~ 31℃。具体采样方法如下。水样:采样前在同一水体中将采水器清洗数次后采取水面下约 20cm 深处的水样注入灭菌的玻璃瓶中保存;鱼肠道内容物样品:现场用无菌剪刀解剖鱼,剪开肠道,收集其内容物至灭菌的 EP 管内;稻田土壤

样品:用灭菌铁铲将表层约 2cm 的土层去掉后将土铲入已灭菌的塑料袋中,带回实验室 4℃ 保存。

1.2 菌株分离

对水样,取 20mL 用微孔滤膜富集并将滤膜投于 50mL TSB 中,于 28℃ 摇床上培养过夜后接种气单胞菌选择性培养基(*Aeromonas* agar base^[5])平板;土壤和鱼肠内容物样品则直接接入 TSB 振摇过夜后划平板。3 种样品于 28℃ 培养过夜后挑取白色单菌落接入 TSB 纯培养,次日将细菌离心收集,用 TE (pH8.0)洗涤并悬浮,菌液作 PCR 模板,用气单胞菌属特异性引物^[6]扩增(以本实验室已鉴定气单胞菌菌株 C2 作阳性对照),收集阳性反应的菌株,用含 15% 甘油的 LB 培养基保存于 -20℃,用作随后的生化分析和 16S rRNA 基因克隆(具体资料见表 1)。

表 1 10 株菌的相关资料与部分常规生化实验结果

菌株	LDC	ODC	ADH	V. P.	16S rDNA 序列登陆号	最终鉴定结果	菌株来源
DMA1	-	-	+	-	DQ313423	<i>A. caviae</i>	坦洲镇池塘底泥
DPF-9	+	-	+	-	DQ837030	<i>A. veronii</i>	坦洲镇罗非鱼小肠
DPW-9	+	-	+	+	DQ837031	<i>A. veronii</i>	坦洲镇池塘水样
DPW-10	+	-	+	+	DQ837032	<i>A. jandaei</i>	坦洲镇池塘水样
f30-3	+	-	+	+	DQ313425	<i>A. jandaei</i>	阜沙镇稻田土样
p10H-4	-	-	+	-	DQ313428	<i>A. caviae</i>	横栏镇稻田土样
p10H-5	-	-	+	-	DQ313429	<i>A. caviae</i>	横栏镇稻田土样
SF3-14	+	-	+	-	DQ837028	<i>A. veronii</i>	南荫镇草鱼小肠
SFA3-1	+	-	+	+	DQ837029	<i>A. veronii</i>	南荫镇草鱼小肠
SWA-3	+	-	+	+	DQ313431	<i>A. veronii</i>	南荫镇池塘水样

注:所有菌株均分离自广东省中山市,其中 DMA1、DPF-9、DPW-9、DPW-10 分别分离自中山坦洲镇同一池塘的底泥,健康罗非鱼小肠和池塘水样,p10H-4、p10H-5 分离自横栏镇同一稻田土样,SF3-14、SFA3-1、SWA-3 分离自南荫镇同一池塘中同一健康草鱼小肠和水样。

1.3 细菌的鉴定

由于气单胞菌的生化反应特征非常复杂,要将其鉴定到种水平,需要做大量的生化测定实验;为快速进行鉴定,本研究采取如下简易策略:先按照气单胞菌的定义(见前言部分)将各菌株鉴定到属水平,再根据其 16S rDNA 的分子特征以及部分重要的生化反应,将其鉴定到种的水平。除特别注明外,所有实验均以 XS91-4-1^[7]为参考菌株。

1.4 PCR 扩增

气单胞菌属特异性引物^[6]:AstyF:5' CTACTT-TTGCCGCGCAGCGG 3'; AstyR:5' TGATTCCTCAAG-GCACTCCC 3'; 气单胞菌 16S rRNA 引物^[8]:16SF:5' AGAGTTTGATCATGGCTCAG 3'; 16SR:5' GGTACCTTGTACGACTT 3'。反应体系:50μL 体系中包含 PCR Buffer(10 ×)5μL, dNTP (2.5mmol/L each)4μL, Primers (F/R, 10μmol/L each)各 1μL, Taq

polymerase 1.25U,模板为 1μL 菌液。扩增程序:首次变性 94℃ 2min,接着 30 个循环:94℃ 30s,54℃ 或 58℃ 30s,72℃ 90s,最后 72℃ 延伸 10min。

1.5 基因克隆和测序

将用 16S rRNA 引物扩增得到的产物用 PCR 纯化试剂盒(赛百盛,上海)回收后克隆进 PMD18-T 载体(TaKaRa)中,转化 *E. coli* DH5α,所得阳性单克隆送联合基因公司测序,得到相应菌株的 16S rDNA 部分或全序列,到 NCBI 网站上做 Blast 搜索和比对。

1.6 系统发生树的构建

通过 GenBank 搜索到每个 DNA 杂交组的代表菌株(type strain)的 16S rDNA 序列,然后将它们与分离到的 10 株气单胞菌用 Clustal X(1.8)进行序列比对,再用 Mega(3.1)软件(NJ 法)构建系统发生树。鉴于 *A. ichthiosmia*, *A. allosaccharophila* 和 *A. enteropelogenes* 的最终分类地位尚未完全确定,可能

分别是 *A. veronii* 和 *A. trota* 的同物异名^[1],因此这 3 个种不参与构建系统发生树。

2 结果

由于 *A. hydrophila* 在我国有大量的报道,而且本研究中采集到约 40% 为 *A. hydrophila*(结果未显示),所以对其不再进行研究。除此之外,我们共分离收集了 10 株气单胞菌。这 10 株细菌具有共同的特征:革兰氏染色阴性,单个、成对排列,氧化酶及触酶反应均呈阳性,具有运动性,对 O/129 不敏感,能还原硝酸盐,O-F 测定为发酵型。气单胞菌属特异引物的 PCR 检测结果均为阳性,即与 C2 一样,均扩出近 1kb 的单一一条带,证实它们均为气单胞菌属细菌。通过基因克隆和测序,获得了这 10 株细菌的部分或全长 16S rDNA 序列。

各菌株常规生化实验结果见表 1。根据这些结果结合 16S rDNA 序列,确定了各菌株的最终分类地位。菌株 DMA1, p10H-4, p10H-5 等 3 株菌在系统发生关系上,与 *A. caviae* 和 *A. trota* 最接近,而且,在 16S rDNA 序列中的第一个可变区(相当于 *E. coli* 16S rDNA 序列中的 154bp ~ 167bp)^[9]和第二个可变区(相当于 *E. coli* 16S rDNA 序列中的 457bp ~ 476bp)序列完全一致,分别为:AGTTGGAAACGACT 和 CAGTAGCTAATATCTGCTGG;然而,这 3 株菌的 ADH 阳性,LDC 和 ODC 为阴性,V.P. 反应阴性,对氨苄青霉素具有抗性,根据这些特点最终确定其为 *A. caviae*,而非 *A. trota*。菌株 DPF-9, DPW-9, SF3-14, SFA3-1 及 SWA-3 等 5 株菌与 *A. veronii* 聚类到一起,而且,LDC 和 ADH 为阳性,ODC 为阴性,蔗糖发酵试验阳性,对氨苄青霉素具有抗性,这些正是这种细菌的生化特征,而且,第一可变区序列为 *A. veronii* 特征性的 TACTGGAAACGGTA;第二可变区序列为 *A. veronii* 特征性的 TGGTAGCTAATAA-CTGCCAG。因此,这 5 株菌被鉴定为 *A. veronii*。菌株 f30-3 被鉴定为 *A. jandaei*,因为它们聚合在一起,而且 LDC、ADH 和 ODC 等的生化反应特征也相吻合,由于 f30-3 的蔗糖发酵试验阴性,可以排除 *A. veronii*。第一个可变区序列与 *A. veronii* 以及 *A. jandaei* 的完全相同,但第二可变区序列为 *A. jandaei* 特征性的 CAGTAGCTAATATCTGCTGG。同理,菌株 DPW-10 也被鉴定为 *A. jandaei*。系统发生树见图 1。

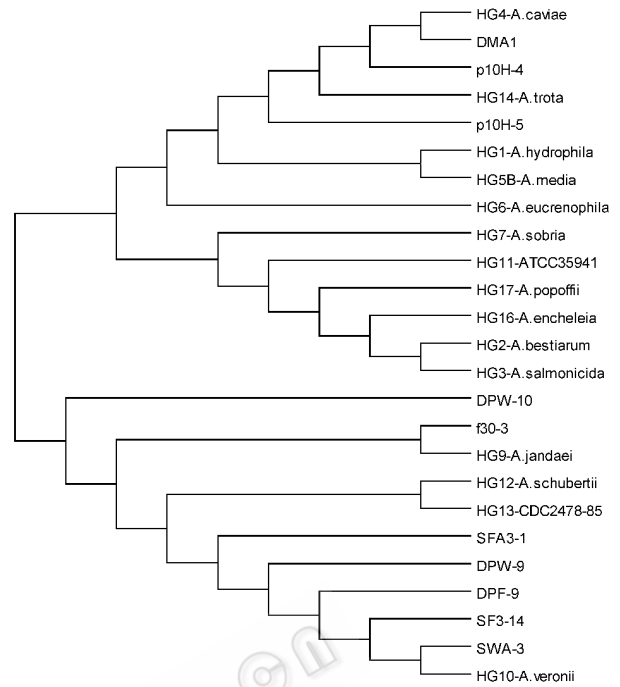


图 1 气单胞菌系统发生关系图

图中各杂交组(HG)标准菌株的 GenBank 登陆号为:HG1:X74677, HG2:X60406, HG3:X74681, HG4:AY347680, HG5B:X74679, HG6:X74675, HG7:X74683, HG9:X74678, HG10:X74684, HG12:X74682, HG13:U88663, HG14:X60415, HG16:AJ458408, HG17:AJ223180。

3 讨论

气单胞菌广泛存在于各种水体、土壤及多种动物体内,而且其多样性与异质性比较突出。国内至今只有 3 种气单胞菌的记录,本研究发现了气单胞菌的至少 2 个国内新记录。本文分离到的气单胞菌株显示出其分布的广泛性:如池塘的底泥、水体、罗非鱼和草鱼的小肠及稻田土壤中均分离到这类细菌。另外,气单胞菌的生物多样性表现在同一水体中存在着多种气单胞菌,如中山坦洲的同一池塘中存在 *A. caviae* 和 *A. veronii* 及 *A. jandaei*。气单胞菌的异质性则表现在同一种细菌不同菌株之间在表型上存在一定的差异。例如,菌株 DPF-9 与 DPW-9 在 O/129 和 V.P. 等两种表型方面不一致;f30-3 与 SF3-14 在 V.P. 表型方面也是如此。气单胞菌的这种多样性与异质性不仅被我们的 16S rRNA 和毒力基因分析检测(资料未显示)所证实,也被前人的研究论文所佐证^[10]。

从本研究结果看,该地区 *Aeromonas* 的多样性并不丰富,主要以 *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii*。中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

及 *A. jandaei* 为主。至于 *A. salmonicida* 未被分离到,可能与当时的温度过高有关。

由于气单胞菌的表型比较复杂,有些种之间常常难以区分,所以有学者将气单胞菌划分为3个复合组(complex)^[1],包括 *A. hydrophila* complex, *A. caviae* complex 以及 *A. sobria* complex。其中 *A. hydrophila* complex 包括 *A. hydrophila*, *A. bestiarum* 和 *A. salmonicida*; *A. caviae* complex 主要包括 *A. caviae*, *A. media* 和 *A. eucrenophila*; *A. sobria* complex 主要包括 *A. veronii*, *A. jandaei*, *A. scubertii* 以及 *A. trota*。系统发生关系中 *A. veronii* 及 *A. jandaei* 之间的亲缘关系比较接近,两者的 16S rDNA 相似度高达 99.5%^[11],但仍可以通过 DNA 杂交的方式将它们区分开来。这两种细菌生化反应特征也极为相似,难以分开,属于同一复合组。*A. veronii* biovar *sobria* 与 *A. jandaei* 之间仅仅在能否使蔗糖是否产酸方面有差别^[13]。根据对蔗糖是否分解产酸以及根据第二可变区序列来加以鉴别是一种简便可行的区别鉴定方法。我们的结果显示,16S rRNA 基因可变区序列和蔗糖产酸试验在鉴别 *A. veronii* 及 *A. jandaei* 的作用是完全一致的。

值得注意的是,菌株 DPW-10 在系统发生中与 *A. jandaei* 亲缘关系较近,它的第一个可变区序列也与 *A. veronii* 和 *A. jandaei* 的相同,但第二个可变区的序列为独特的 GGTGGCTAATACCCAATCG。通过搜索发现,这段序列在 RDP 数据库中,只出现在从蚯蚓中分离到的细菌(GenBank 登陆号为 S000398436 和 S000398503)中的 16S rDNA 第二个可变区中,但它们第一个可变区的序列与 *A. hydrophila* 及 *A. caviae* 等的相同,而与 *A. veronii* 和 *A. jandaei* 的不同,鉴于其蔗糖发酵试验阳性,该株细菌很可能是 *A. veronii*;不过,最近有学者报道了蔗糖发酵试验阳性的 *A. jandaei*-like 菌株^[12],所以也很可能是一个新种,这需要更详细的研究。

有关气单胞菌的生化鉴定已有大量的研究文献,有些学者经过分析发现了用于区别各种气单胞菌的特征性生化反应表型(如 LDC, ODC, ADH 三个

指标^[6], V.P. 试验以及对某些糖的产酸或产气等)以及特征性的 16S rDNA 结构。本研究中正是根据这些特征以及气单胞菌的定义,快速正确地鉴定了 10 株气单胞菌。气单胞菌一般对氨基青霉素具有抗性,但 *A. trota* 是个例外,只有 6% 的菌株具有这个特性,其余约 94% 对氨基青霉素敏感。所以,在筛选气单胞菌的过程中,不能使用含有氨基青霉素的选择培养基,否则无法得到 *A. trota*。

本实验采用的气单胞菌属特异性 PCR 引物具有很好的特异性,PCR 阳性反应菌株经生化测定和 16S rDNA 测序证实,无一例外全部为气单胞菌,可见该引物可以非常可靠地应用于气单胞菌的快速鉴定。

参考文献

- [1] Martin Camahan A, Joseph S W. Aeromonadaceae. In Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, et al, eds. The Proteobacteria, Part B, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition [B]. New York, USA: 2005, Vol. 2, pp.556.
- [2] Haruo S, Katsunao T, Makoto Y, et al. Applied and environmental microbiology, Nov. 1995, 61(11): 4128 ~ 4130.
- [3] 董传甫, 林天龙. 福建农业学报, 2003, 18(4): 243 ~ 248.
- [4] Austin B, Austin D. Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish. Praxis Publishing Ltd, 1999, pp.63 ~ 80.
- [5] Farmer JJ, Arduino MJ, Hickman-Brenner FW. The genera Aeromonas and Plesiomonas. In The Prokaryotes (Balows A, Trüper HG, Dworkin M, et al, eds), New York, USA. 1992, Vol. 3, pp.3012 ~ 3043.
- [6] Lee C, Cho JC, Lee SH et al. J Appl Microbiol, 2002, 93(6): 976 ~ 985.
- [7] 徐伯亥, 殷战, 吴玉琛, 等. 水生生物学报, 1993, 17(3): 259 ~ 266.
- [8] Borrell N, Acinas SG, Figueras MJ, et al. J Clin Microbiol, 1997, 35(7): 1671 ~ 1674.
- [9] Demarta A, Tonolla M, Caminada AP, et al. FEMS Microbiol Lett, 1999, 172(2): 239 ~ 246.
- [10] Aguilera Arreola MG, Hernandez-Rodriguez C, Zuniga G, et al. FEMS Microbiol Lett, 2005, 242(2): 231 ~ 240.
- [11] Martı́nez-Murciá, AJ, Benlloch S, Collins MD. Int J Syst Bacteriol, 1992, 42(3): 412 ~ 421.
- [12] Esteve C, Valera L, Gutierrez C, et al. Int J Syst Evol Microbiol, 2003, 53(Pt5): 1411 ~ 1419.