

天津地区气单胞菌分离株的鉴定与 多位点序列分型

李倩 杨洪江* 何洋 石礼涛

(天津科技大学 生物工程学院 工业发酵微生物教育部重点实验室
天津市工业微生物重点实验室 天津 300457)

摘要: 【目的】研究气单胞菌菌株分类情况, 并分析其致病性。【方法】采集环境样品和鱼类标本, 分离并鉴定气单胞菌菌株, 并运用多位点序列分型(Multilocus sequence typing, MLST)方法进行分类研究, 利用 PCR 和测序方法分析毒力基因 *AerA*、*Hly*、*AhaI*、*GCAT* 和 *Nuc* 的分布。【结果】通过对分离菌株的 16S rRNA 基因进行分析, 确认属于 4 种不同气单胞菌的 7 个分离株。发现所有菌株至少有 1 种毒力基因阳性, 其中 3 株具有 4 种毒力基因。药物敏感实验显示, 6 株分离株对 3 种或 3 种以上抗菌素具有多重耐药性。最后, 对看家基因 *gyrB*、*groL*、*gltA*、*metG*、*ppsA* 和 *recA* 进行分析, 与 MLST 数据库中的等位基因序列比对, 发现 7 株分离株均为新的不同的序列型(Sequence type, ST)。【结论】气单胞菌具有较高的遗传多样性。

关键词: 气单胞菌, 16S rRNA 基因, 耐药性, 毒力基因, 多位点序列分型

Characterization and multilocus sequence typing of *Aeromonas* strains isolated in Tianjin area

LI Qian YANG Hong-Jiang* HE Yang SHI Li-Tao

(Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin, 300457, China)

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No. 30970114)

*通讯作者: Tel: 86-22-60601396; 信箱: hongjiangyang@tust.edu.cn

收稿日期: 2012-10-29; 接受日期: 2013-01-14

Abstract: [Objective] To study the classification of *Aeromonas* genus and its pathogenicity. **[Methods]** Various environmental samples were collected, *Aeromonas* strains were isolated and characterized, and multilocus sequence typing (MLST) method was adopted to classify the isolates. **[Results]** Among the isolates 7 *Aeromonas* strains were identified, belonging to 4 different species of the genus *Aeromonas* based on 16S rRNA sequence analysis. Furthermore, 5 major virulence genes including *Aera*, *Hly*, *AhaI*, *GACT* and *Nuc* were detected in the isolates by PCR and sequencing methods. All strains contained at least one virulence gene, and 3 of them contained 4 virulence genes, respectively. Antibiotic susceptibility test showed that 6 strains exhibited multiple drug resistances to at least 3 antibiotics. Finally, 6 housekeeping genes (*gyrB*, *groL*, *gltA*, *metG*, *ppsA*, and *recA*) were chosen for the MLST analysis by PCR and sequencing. Allele sequences were aligned by searching the MLST database. All 7 *Aeromonas* strains were assigned a new ST number. **[Conclusion]** High genetic diversity existed in *Aeromonas* strains.

Keywords: *Aeromonas*, 16S rRNA gene, Antibiotic resistance, Virulence gene, Multilocus sequence typing

气单胞菌属(*Aeromonas*)目前包括 25 个种^[1], 广泛存在于包括水环境的各种微生物生态系统中^[2], 是爬行类、两栖类和鱼类等重要病原菌, 也是人类的条件致病菌^[3]。在水产养殖业中, 气单胞菌能够在多种水产养殖动物中导致多种疾病, 造成严重的经济损失。

气单胞菌的基因组编码多种致病因子, 主要包括气溶素(Aerolysin)、溶血素(Hemolysin)、粘附因子(Adhesion)、肠毒素(Enterotoxin)、三型分泌系统(Type III secretion system)、凝集素(Lectin)、外膜蛋白(Outer membrane protein)、核酸酶(Nuclease)、卵磷脂酶(Lecithinase)、脂肪酶(Lipase)和蛋白酶(Proteinase)等^[4]。

气单胞菌的耐药性研究, 主要集中在 *A. hydrophila*、*A. caviae* 和 *A. veroni*。气单胞菌通常能够表达一种或多种可诱导的 β -内酰胺酶, 水解多种 β -内酰胺类抗菌素如青霉素类、头孢霉素类和广谱头孢霉素类等^[5]。氟喹诺酮类抗菌素能够有效预防和控制气单胞菌的感染, 广泛应用于临床治疗, 但是近年来临床上分离到针对环丙沙星和

诺氟沙星的耐受菌株^[6]。

目前, 对细菌的 16S rRNA 基因进行序列分析, 来判定菌株间遗传距离的远近, 是细菌种属鉴定最常使用的分子生物学方法^[7]。然而在气单胞菌属的分类过程中, 该技术的特异性和灵敏度一直存在争议^[1]。其主要原因是气单胞菌属大多数种类 16S rRNA 基因的相似性超过 99%, 不同种类该基因的差别只有几个核苷酸^[8], 另外有研究表明部分气单胞菌中基因组内存在不同的 16S rRNA 基因拷贝^[9]。

多位点序列分型 MLST (Multilocus sequence typing) 是近年发展起来的分子生物学分析方法, 它是基于看家基因内部片段的序列多态性, 通过对多个看家基因的扩增与测序, 并采用生物信息学方法对序列进行比对分析, 获得等位基因的型别和菌株的序列型 ST (Sequence type), 具有很高的分辨率, 能够准确地反映细菌群体的变异进化^[10], 为流行病学监测、微生物分型以及微生物进化的基础研究提供了一种简便可行的方法^[11]。

本文分别采集天津地区健康鱼类、新鲜牛奶、

蓟运河水样以及渤海湾海水标本, 通过分析 16S rRNA 基因序列对分离菌株进行确认; 进一步对分离的气单胞菌菌株的毒力基因、溶血性和凝固酶等致病因子进行分析; 并对分离菌株对 14 种抗菌素的敏感性等进行了相关研究, 最后采用多位点序列分型(MLST)方法, 通过分析 6 个看家基因的序列, 对分离的气单胞菌菌株进行进一步分类。

1 材料与方法

1.1 标本来源、处理与培养条件

分别采集天津地区蓟运河入海口附近河水标本、附近渤海湾海水标本、新鲜牛奶标本以及农贸市场健康鱼类标本多份。其中健康鱼类标本品种包括黄花鱼、鲤鱼、鲢鱼、草鱼、鲫鱼和鳊鱼。采集的样品均置于 4 °C 冰箱保存, 24 h 内进行检验。

用酒精棉球擦拭鱼类标本表面, 在火焰上烧灼剪刀灭菌, 无菌打开鱼的腹腔, 取鳃、肝、肠和心脏等脏器为材料, 研磨后取 1 mL 研磨浆用生理盐水做梯度稀释^[12]; 水样标本 35 °C 振荡培养 30 min 后, 取 1 mL 水样用生理盐水做梯度稀释; 牛奶标本直接用生理盐水做梯度稀释。

在 LB 固体培养基上, 涂布已经处理的标本, 35 °C 培养 18–48 h 后, 挑取淡黄色、圆形、光滑湿润、稍凸起的单菌落^[13]。

1.2 主要试剂与仪器

主要试剂包括: *Taq* DNA 聚合酶、10×PCR Buffer、dNTPs mixture 和 DL15000 DNA Marker, 购于天津宝生物工程有限公司; pGEM-T Easy 克隆载体、T4 DNA 连接酶和 *EcoR* I, 购于普洛麦格(北京)生物技术有限公司; 引物由上海英淮捷基生物技术有限公司合成。

主要仪器包括: 微量移液器(德国 Eppendorf 公司)、PCR 基因扩增仪(美国 Bio-Rad 公司)、高速离心机(上海医用分析仪器厂)和全自动凝胶成像系统(美国 SYNGENE 公司)。

1.3 分离菌株的分子鉴定

按照参考文献描述的方法, 提取细菌基因组 DNA^[14–15], 作为扩增 16S rRNA 基因的 DNA 模板。本文采用 16S rRNA 通用引物(表 1), 对分离菌株的 16S rRNA 基因片段进行扩增^[16]。

反应体系为 50 μ L, 包括: ddH₂O 34.6 μ L、10×Buffer 5 μ L、dNTPs (10 mmol/L) 4 μ L、27F (10 μ mol/L) 2 μ L、1492R (10 μ mol/L) 2 μ L、模板 2 μ L 和 *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 0.4 μ L。扩增条件为: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 53 °C 45 s, 72 °C 1 min, 循环 33 次; 72 °C 10 min。

PCR 产物经切胶纯化后与 pGEM-T Easy 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑选白色菌落提取质粒进行酶切鉴定。测序后 NCBI 的 BLAST 软件进行检索, 在 GenBank 的已知序列中进行同源性分析^[17]。用 MEGA 4.0 软件, 构建系统发育树, 分析分离菌株的进化地位^[18]。

1.4 毒力基因的检测

选定 5 种毒力基因为待检测靶基因, 包括气溶素基因(Aerolysin gene, *Aera*)^[4]、溶血素基因(Hemolysin gene, *Hly*)^[19]、粘附素基因(Adhesin gene, *AhaI*)^[20]、甘油磷脂胆固醇乙酰基转移酶基因(Glycerol phospholipid cholesterol acyltransferase gene, *GCAT*)^[4]和核酸酶基因(Nuclease gene, *Nuc*)^[21]。分别以 7 株气单胞菌的 DNA 作为模板, 利用 PCR 进行扩增检测, 所用引物和引物退火温度如表 1 所示。

1.5 溶血实验和凝固实验

按照文献所述方法, 挑取气单胞菌单菌落划线于血琼脂平板上, 35 °C 培养 16–24 h, 观察结果^[22]。

凝血试验分析时, 将 0.5 mL 兔血浆与 0.5 mL 分离菌株 24 h 培养物充分混匀, 置 37 °C 水浴, 每隔 30 min 观察一次, 连续观察 6 h, 观察是否出现凝固^[22]。

1.6 耐药性分析

采用纸片扩散法(K-B 法), 分析分离菌株的抗菌素敏感性。具体方法步骤按照 2011 年 CLSI 标准进行, 培养 24 h 后记录抑菌圈直径并判读结果^[23]。

1.7 MLST 分型

根据 Elena M. M.等的研究结果^[24], 选择 6 个

看家基因(*gyrB*、*groL*、*gltA*、*metG*、*ppsA* 和 *recA*) 作 MLST 分析, 引物序列如表 1 所示。得到 6 个靶基因的序列用 BLAST 来检验扩增片段是否与靶位基因具有同源性, 然后将等位基因的序列与 <http://pubmlst.org/aeromonas> 数据库进行比对分析, 确定每个看家基因的等位基因型别, 并最终确定每株菌的 ST 型别。

表 1 PCR 所用引物 Table 1 Primers used in PCR				
引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'→3')	基因 Gene	退火 温度 <i>T_m</i> (°C)	基因大小 Gene size (bp)
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16S rRNA	53.0	1 500
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT			
<i>gyrB</i> _F	GGGGTCTACTGCTTCACCAA	DNA gyrase, β-subunit	50.9	669
<i>gyrB</i> _R	CTTGTCCGGTTGTACTCGT			
<i>groL</i> _F	CAAGGAAGTTGCTTCCAAGG	Chaperonin GroEL	50.2	782
<i>groL</i> _R	CATCGATGATGGTGGTGTTT			
<i>gltA</i> _F	TTCCGTCTGCTCTCCAAGAT	Citrate synthase I	50.2	626
<i>gltA</i> _R	TTCATGATGATGCCGGAGTA			
<i>metG</i> _F	TGGCAACTGATCCTCGTACA	Methionyl-tRNA synthetase	54.2	657
<i>metG</i> _R	TCTTGTTGGCCATCTCTTCC			
<i>ppsA</i> _F	AGTCCAACGAGTACGCCAAC	Phosphoenolpyruvate synthase	55.0	619
<i>ppsA</i> _R	TCGGCCAGATAGAGCCAGGT			
<i>recA</i> _F	AGAACAAACAGAAGGCACTGG	Recombinase A	56.9	640
<i>recA</i> _R	AACTTGAGCGCGTTACCAC			
<i>Aera</i> _F	ACTGTCTGCCCTGGATATTC	Aerolysin	56.2	759
<i>Aera</i> _R	GTTCCAGTTCGGACGGTTGT			
<i>Hly</i> _F	GCTATGAAAAAACTAAAAATAACTG	Hemolysin	43.1	1 500
<i>Hly</i> _R	CAGTATAAGTGGGGAAATGGAAAG			
<i>AhaI</i> _F	AGGGAATTCATGAAAAAGACAATTCTGG	Adhesion	52.8	1 100
<i>AhaI</i> _R	TATGTCGACGGGAAGCAGATAAAACAAAAC			
<i>GCAI</i> _F	CATGTCTCCGCCTATCACAACAAGC	Glycerol phospholipid cholesterol acyltransferase	54.0	339
<i>GCAI</i> _R	CCAGAACATCTTGCCCTCACAGTTG			
<i>Nuc</i> _F	TCGAACAGTTTACGTTGTTGCGCGG	Nuclease	54.2	536
<i>Nuc</i> _R	CTGCCCCCTTCATGCCCAGACTTTTC			

2 结果与分析

2.1 气单胞菌的分离与分子鉴定

在 LB 固体培养基上涂布样品, 培养后挑选直径 2 mm–3 mm、圆形、中央微凸、光滑湿润的淡黄色菌落。显微镜观察显示菌体呈杆状、两端钝圆, 革兰氏染色呈阴性。选择 7 个分离菌株作为继续研究的对象, 分别命名为 QL01、QL03、QL102、QL07、QL303、QL402 和 QL16 (表 2)。其中菌株 QL03 在琼脂平板上产生水溶性棕色色素, 随培养时间延长颜色逐渐加深。

按照材料方法所述, 分析分离菌株的 16S rRNA 基因序列。比对结果如表 2 所示, 7 株细菌均为气单胞菌, 分别属于 4 个不同的气单胞菌种, 将 7 株菌的 16S rRNA 序列上传至 GenBank。

在 GenBank 中选择嗜水气单胞菌(*A. hydrophila* NR042155.1)、维罗纳气单胞菌(*A. veronii* NR044845.1)、异嗜糖气单胞菌(*A. allosaccharophila* JX014444.1)、杀鲑气单胞菌(*A. salmonicida* AY987757.1)、鱼蛭属气单胞菌(*A. piscicola* HQ832417.1)和中间气单胞菌(*A. media* X74679.1)作为参比菌株, 构建系统发育树如图 1 所示。

图 1 结果显示, 依据 16S rRNA 序列的相似性, 7 株气单胞菌被分成 3 组, 第 1 组包括 QL01、QL03 和 QL303; 第 2 组包括 QL102、QL16 和 QL07; 第 3 组包括 QL402。

2.2 致病因子分析

毒力基因扩增结果如图 2 所示, 菌株 QL102、QL07 和 QL16 检出 *Aera* 基因 759 bp 特异性条带, 其余 4 株出现条带为非特异性; 菌株 QL102、QL07 和 QL16 检出 *Hly* 基因 1 500 bp 特异性条带; 菌株 QL303 和 QL402 检出 *Aha1* 基因 1 100 bp 特异性条带; 菌株 QL303、QL402、QL102、QL07 和 QL16 检出 *GCAT* 基因 339 bp 特异性条带; 7 株分离菌株全部检出 *Nuc* 基因 539 bp 特异性条带。

将毒力基因扩增产物进一步测序, 序列比对分析结果如表 3 所示, 毒力基因编码蛋白的氨基酸序列与已知序列均具有很高的同源性 (85%–100%)。 *Aera* 基因扩增的非特异性条带均非气溶素基因, 在菌株 QL01 和 QL03 中, 扩增产物与赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase 具有一定程度同源性; 在菌株 QL303 和 QL402 中, 扩增产物与十八烷基二磷酸合酶 Octaprenyl-diphosphate synthase 具有一定程度同源性。

表 2 分离菌株的 16S rRNA 基因分析				
Table 2 Comparative analysis of 16S rRNA gene sequences of the isolates				
菌株 Strains	来源 Source	序列号 Accession No.	同源最高的种属 Most similar strains	相似性 Similarity (%)
QL01	鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>	KC130967	<i>A. allosaccharophila</i>	99
QL03	海水 Brackish-saline water	KC130961	<i>A. allosaccharophila</i>	99
QL102	鲢鱼 <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	KC130963	<i>A. salmonicida</i>	99
QL07	牛奶 Bovine milk	KC130964	<i>A. salmonicida</i>	99
QL303	草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	KC130965	<i>A. media</i>	99
QL402	草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	KC130966	<i>A. media</i>	99
QL16	黄鱼 <i>Pseudosciaena polyatis</i>	KC130962	<i>A. piscicola</i>	99

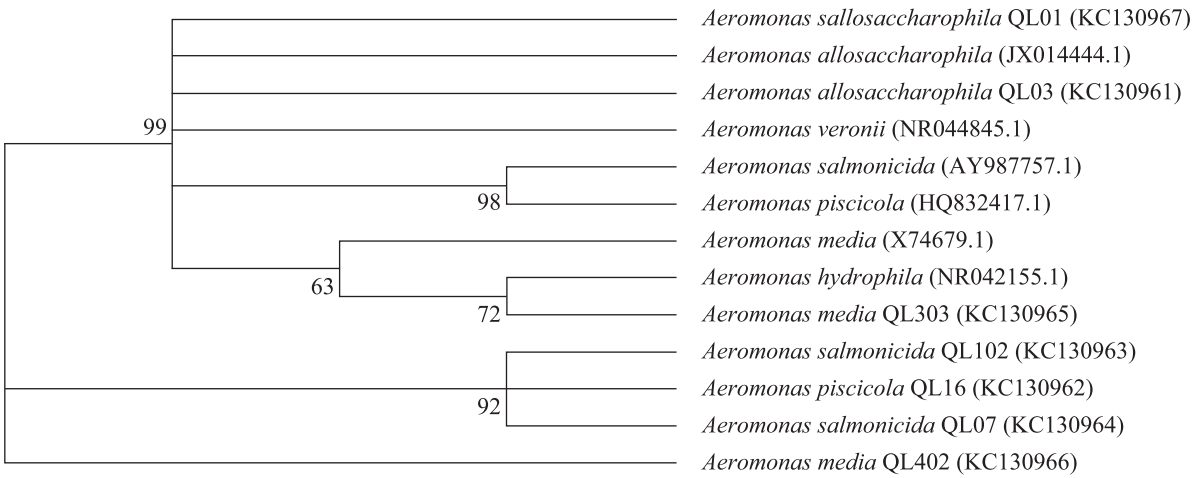


图 1 分离菌株系统发育树的构建
Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences

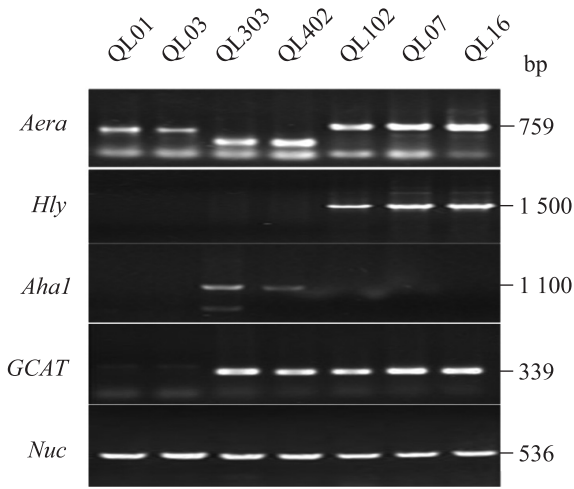


图 2 毒力基因检测
Fig. 2 Detection of virulence genes
注: *Aera*: 气溶素基因; *Hly*: 溶血素基因; *AhaI*: 粘附素基因; *GCAT*: 甘油磷脂胆固醇酰基转移酶基因; *Nuc*: 核酸酶基因。
Note: *Aera*: Aerolysin gene; *Hly*: Hemolysin gene; *AhaI*: Adhesion gene; *GCAT*: Glycerol phospholipid cholesterol acyl-transferase gene; *Nuc*: Nuclease gene.

溶血性与凝固酶分析结果见表 3, QL03、QL102、QL07 和 QL16 为 β -溶血即完全溶血, 其中菌株 QL102、QL07 和 QL16 的溶血素基因检测为阳性, 二者检测结果一致。菌株 QL03 溶血素基因检测为阴性, 可能该菌株的溶血素编码基

因与基因 *Hly* 同源性较低, 所用引物无法扩增该基因, 还需要实验进一步研究。凝固酶分析中, 只有菌株 QL303 分析结果为阳性。

2.3 耐药性分析
采用左氧氟沙星、头孢噻吩、妥布霉素、复方新诺明、亚胺培南、四环素、头孢唑林、萘啶酸、氨基糖苷、庆大霉素、环丙沙星、氯霉素、哌拉西林和氨苄西林等 14 种抗菌素纸片, 对分离菌株进行耐药性分析, 结果如表 4 所示, 所有菌株对氨苄西林具有耐药性, 6 株菌株对 3 种或 3 种以上抗菌素具有多重耐药性, 分离菌株对左氧氟沙星、亚胺培南、环丙沙星、氯霉素高度敏感。

2.4 MLST 分析
将分离菌株的 42 个看家基因序列上传至 GenBank, 获得序列号。序列接受号分别为: KC210630–KC210636 (*gyrB* 基因), KC210690–KC210696 (*groL* 基因), KC210450–KC210456 (*gltA* 基因), KC210510–KC210516 (*metG* 基因), KC210570–KC210576 (*ppsA* 基因), KC210750–KC210756 (*recA* 基因)。

分别将 7 株菌的 6 个看家基因序列在 <http://pubmlst.org/aeromonas/submission.shtml> 数据

表 3 致病因子分析							
Table 3 Virulence factors analysis							
菌株 Strains	氨基酸序列相似度					溶血性 Hymolysis	凝固酶 Coagulase
	Amino acid sequence similarity (%)						
	气溶素 <i>Aera</i>	溶血素 <i>Hly</i>	粘附素 <i>Aha1</i>	转移酶* <i>GACT</i>	核酸酶 <i>Nuc</i>		
QL01	—	—	—	—	99	α	—
QL03	—	—	—	—	99	β	—
QL303	—	—	88	89	99	γ	+
QL402	—	—	85	89	99	γ	—
QL102	100	99	—	94	98	β	—
QL07	100	99	—	94	98	β	—
QL16	100	99	—	98	99	β	—

注: *: 甘油磷酸胆固醇乙酰基转移酶。
Note *: Glycerol phospholipid cholesterol acyltransferase.

表 4 分离菌株耐药性分析														
Table 4 Antibiotic susceptibility analysis of the isolates														
菌株 Strains	抗菌素													
	Antibiotics													
	LV	CE	TM	ST	IP	TC	CZ	NA	AN	GM	CI	CP	PC	AP
QL01	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	R
	31.7	29.0	21.6	29.7	25.2	16.1	16.4	25.9	30.0	19.8	31.5	28.5	28.3	0
QL03	S	R	R	S	S	S	R	R	I	I	S	S	S	R
	25.7	0	12.3	22.3	31.7	20.5	0	0	16.0	13.8	26.2	29.9	28.0	0
QL303	S	R	S	R	S	I	R	R	S	S	S	S	I	R
	23.3	0	15.6	0	25.8	13.2	11.0	0	34.4	18.6	24.3	26.3	20.7	0
QL402	S	R	S	R	S	R	S	R	S	S	S	S	R	R
	25.2	13.3	16.8	0	25.2	9.3	18.9	0	34.0	16.5	22.8	18.7	16.7	0
QL102	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R
	29.7	0	18.4	20.5	20.5	17.2	8.7	25.4	27.8	18.5	30.5	30.3	21.5	0
QL07	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	I	R
	33.6	0	19.0	17.7	20.9	16.8	8.3	26.2	28.8	18.3	32.3	27.8	20.8	0
QL16	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	I	R
	33.5	0	20.2	17.9	18.7	15.8	0	28.2	32.3	19.8	33.3	25.8	20.7	0

注: LV: 左氧氟沙星; CE: 头孢噻吩; TM: 妥布霉素; ST: 复方新诺明; IP: 亚胺培南; TC: 四环素; CZ: 头孢唑林; NA: 萘啶酸; AN: 氨曲南; GM: 庆大霉素; CI: 环丙沙星; CP: 氯霉素; PC: 哌拉西林; AP: 氨苄西林; S: 高度敏感; I: 中度敏感; R: 耐药或不敏感。数字为抑菌圈直径(mm)。
Note: LV: Levofloxacin; CE: Cefalotin; TM: Tobramycin; ST: Sulfamethoxazole-trimethoprim; IP: Imipenem; TC: Tetracycline; CZ: Cefazolin; NA: Nalidixic acid; AN: Aztreonam; GM: Gentamicin; CI: Ciprofloxacin; CP: Chloramphenicol; PC: Piperacillin; AP: Ampicillin; S: Sensitive; I: Intermediate; R: Resistant. The numbers represented the diameters of the inhibition zones.

库中进行比对, 获得等位基因型别和 ST 型别 (表 5)。42 个等位基因型别中, 只有 7 个等位基因(*gyrB54*、*gyrB23*、*groL57*、*gltA54*、*metG55*、*ppsA64* 和 *recA56*)是数据库中已经存在的型别, 其余 35 个等位基因为本论文新发现的型别。7 株菌分别具有新的不同的 ST 型别。MLST 方法将 7 株菌中同一种类的菌株划分为不同的 ST 型别, 与 16S rRNA 基因分类结果存在明显不同。

表 5 分离菌株 MLST 分析
Table 5 MLST of the isolates

菌株 Strains	种类 Species	ID	ST	等位基因 Allele					
				<i>gyrB</i>	<i>groL</i>	<i>gltA</i>	<i>metG</i>	<i>ppsA</i>	<i>recA</i>
QL01	<i>A. allosaccharophila</i>	125	113	100	110	103	104	107	105
QL03	<i>A. allosaccharophila</i>	126	114	54	57	54	105	108	56
QL07	<i>A. salmonicida</i>	129	115	101	111	104	106	109	106
QL16	<i>A. piscicola</i>	127	116	23	112	105	55	64	107
QL102	<i>A. salmonicida</i>	128	117	102	113	106	107	110	108
QL303	<i>A. media</i>	130	118	103	114	107	108	111	109
QL402	<i>A. media</i>	131	119	104	115	108	109	112	110

3 讨论

16S rRNA 基因具有高度的保守性和特异性,是种属鉴定的分子基础^[25]。16S rRNA 基因检测技术已成为病原菌检测和鉴定的强有力工具,应用该技术可以实现对病原菌进行快速、微量和准确的分类鉴定^[26]。然而对于气单胞菌属的分类,16S rRNA 基因序列无法提供足够的信息。其原因包括几个方面:(1) 气单胞菌属大多数种类 16S rRNA 基因的相似性超过 99%,不同种类该基因差别只有几个核苷酸^[8];(2) 气单胞菌在同一基因组中 16S rRNA 基因的不同拷贝存在不一致性^[9];(3) 16S rRNA 基因序列高度同源的菌株,其染色体相关性却较低^[27]。这些方面限制了该技术在气单胞菌鉴定中的应用,本文的研究结果也证实了这一点。

MLST 方法分析多个看家基因的序列,根据基因的多态性将其定义为一个独特的等位基因,赋予一个独特的等位基因编号,不同看家基因的等位基因组合,归类为一个序列分型(ST)^[24]。MLST 的优势在于分析多个位点的序列信息,同时将测序结果数字化,易于保存和比较^[28]。本文研究发现,7 株气单胞菌中,6 个看家基因共存在

42 个等位基因型别,没有相同的等位基因型别存在,同时只有 7 个等位基因型别与数据库中已知的型别完全匹配,其余 35 个型别为本研究首次发现(表 5)。7 株细菌均被赋予新的 ST 型别,进一步经过 eBURST 聚类分析,发现 6 个菌株的 ST 型别属于独特型(Singleton),不互相所属。而分离于渤海湾海水的菌株 QL03,其 ST 型别为 114,与 1999 年在意大利的海鲤(Sea bream)中分离的气单胞菌属于一组,同源关系比较接近,其中 4 个看家基因的等位基因型别完全相同^[24,29]。16S rRNA 基因序列分析将 7 株分离株鉴定为 4 个不同种类气单胞菌,而 MLST 方法则发现每一个分离株具有不同的新 ST 型别,显示 MLST 分类方法具有较高的灵敏度和特异性^[30],同时也表明气单胞菌具有高度的遗传多样性和地域差异^[31]。

核酸酶基因存在于所有分离菌株中,且氨基酸序列相似度为 98%–99%,具有高度的保守性。气溶素基因在 4 株菌株中出现非特异性条带,其原因可能是菌株中不存在该基因或气溶素基因序列变化较大,需要进一步实验证实气溶素是否存在。粘附素氨基酸序列与已知序列比较差异较大,分别为 85%和 88%,可能与其致病机制

相关^[32]。

本文分离的菌株均来自各种环境样品, 属于气单胞菌环境菌株, 但是耐药性分析发现, 7株分离株中, 6株对3种或3种以上抗菌素具有多重耐药性, 可能与抗菌素的滥用有着紧密联系^[33], 应该进一步加强抗菌素的管理和合理使用, 降低耐药性菌株出现的风险。

参 考 文 献

- [1] Martinez-Murcia AJ, Benlloch S, Collins MD. Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1992, 42(3): 412-421.
- [2] Janda JM, Duffey PS. Mesophilic aeromonads in human disease: current taxonomy, laboratory identification, and infectious disease spectrum[J]. *Reviews of Infectious Diseases*, 1988, 10(5): 980-997.
- [3] Schubert RW. The taxonomy and nomenclature of the genus *Aeromonas* Kluver and van Niel 1936[J]. Iowa State University Press, 1968, 18(1): 1-7.
- [4] Balakrishna K, Murali HS, Batra HV. Detection of toxigenic strains of *Aeromonas* species in foods by a multiplex PCR assay[J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2010, 50(2): 139-144.
- [5] 颜秉兴, 孟英红, 李秋荣, 等. 产 β -内酰胺酶气单胞菌检测及耐药性分析[J]. *大理学院学报: 自然科学*, 2005, 4(3): 57-59.
- [6] 王美珍, 陈昌福, 刘振兴, 等. 嗜水气单胞菌对四环素类和氟喹诺酮类药物的耐药性研究[J]. *华中农业大学学报*, 2011, 30(1): 89-93.
- [7] Woese CR. Bacterial evolution[J]. *Microbiological Reviews*, 1987, 51(2): 221-271.
- [8] Popoff MY, Coynault C, Kiredjian M, et al. Polynucleotide sequence relatedness among motile *Aeromonas* species[J]. *Current Microbiology*, 1981, 5(2): 109-114.
- [9] Alperi A, Figueras MJ, Inza I, et al. Analysis of 16S rRNA gene mutations in a subset of *Aeromonas* strains and their impact in species delineation[J]. *International Microbiology: the Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 2008, 11(3): 185-194.
- [10] Urwin R, Maiden MC. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology[J]. *Trends in Microbiology*, 2003, 11(10): 479-487.
- [11] 姬小薇, 廖亚玲, 毛旭虎, 等. MLST 分析在病原微生物基因分型应用中的研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(2): 246-249.
- [12] 张子华, 鄢庆彬, 邹文政, 等. 鳃鲶肠道中嗜水气单胞菌的拮抗菌筛选[J]. *集美大学学报: 自然科学版*, 2010, 15(3): 5-11.
- [13] Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2010, 23(1): 35-73.
- [14] 李长林, 吴建波, 杨殿林, 等. 转基因棉花根际土壤 DNA 的提取方法研究[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(5): 943-945.
- [15] 黄进勇, 岳彩鹏, 周伟. 麦田土壤细菌群落16S rDNA V3片段PCR产物的DGGE分析[J]. *河南农业大学学报*, 2007, 41(4): 396-400.
- [16] Kutter E. Bacteriophages: biology and applications[M]. Boca Raton, FL: CRC Press, 2004: 528.
- [17] 刘春, 李凯彬, 王庆, 等. 杂交鳢(斑鳢♀×乌鳢♂)内脏类结节病原菌的分离、鉴定与特性分析[J]. *水产学报*, 2012, 36(7): 1119-1125.
- [18] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [19] 龚晖, 林天龙, 俞伏松, 等. 鳃源嗜水气单胞菌 β -溶血素基因的克隆及表达[J]. *水产学报*, 2003, 27(2): 124-130.
- [20] 庄培德, 杨金先, 吴学敏, 等. 鳃源嗜水气单胞

- 菌主要粘附素基因克隆表达及产物粘附功能分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(2): 112-116.
- [21] 朱大玲, 李爱华, 钱冬, 等. 嗜水气单胞菌毒力基因的研究进展[J]. 水生生物学报, 2004, 28(1): 80-84.
- [22] 周建新. 食品微生物学检验[M]. 北京: 化学工业出版社, 2011: 167.
- [23] 张友平, 王军毅, 刘问, 等. 罗氏沼虾气单胞菌 MrM0602株的分离和致病性研究[J]. 水产科学, 2008, 27(1): 20-23.
- [24] Martino ME, 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.
- [25] Janssen PH. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(3): 1719-1728.
- [26] 刘杨, 崔晓龙, 李文均, 等. RNA 二级结构在微生物系统发育分析上的应用[J]. 微生物学通报, 2006, 33(2): 147-150.
- [27] Figueras MJ, Soler L, Chacón MR, et al. Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA RFLP analysis[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50(6): 2069-2073.
- [28] Hanage WP, Fraser C, Spratt BG. Sequences, sequence clusters and bacterial species[J]. Philosophical Transactions-Royal Society. Biological Sciences, 2006, 361(1475): 1917-1927.
- [29] 廖亚玲, 邹全明, 张卫军, 等. 对中国4个不同地区幽门螺杆菌菌株的多位点序列分析研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(11): 1049-1051.
- [30] 刘金华, 贺丹, 杨艳秋, 等. 多位点测序分型技术在病原微生物分型鉴定中的应用[J]. 微生物学通报, 2007, 34(6): 1188-1191.
- [31] 崔树玉, 孙启华, 李景学, 等. 260株气单胞菌的表型特性与毒素原性研究[J]. 微生物学通报, 1997, 24(4): 227-230.
- [32] 方兵, 李瑾年, 祖国掌, 等. 应用多重 PCR 检测水生动物源气单胞菌安徽分离株的毒力基因型分布[J]. 水产学报, 2005, 29(4): 473-477.
- [33] 曲芬, 郭桐生, 鲍春梅, 等. 气单胞菌中检出多种耐药基因[J]. 中国感染与化疗杂志, 2006, 6(3): 195-198.