

嗜水气单胞菌的分离与 16S rDNA 鉴定

柳桐¹, 王生奎¹, 孙亭亭¹, 马志亮¹, 秦波¹, 张以芳¹, 信爱国^{2*} (1. 云南农业大学动物科学技术学院, 云南昆明 650201; 2. 云南省畜牧兽医科学院, 云南昆明 650224)

摘要 [目的]分离并鉴定鱼嗜水气单胞菌,并构建系统发育分析。[方法]从云南某鱼场采集发病鱼的病变组织进行细菌分离与培养,并对分离菌株进行初步鉴定、16S rDNA 鉴定和系统发育分析。[结果]分离培养到 1 株细菌,命名为 Ah1305。经表型鉴定、生化试验及 16S rDNA 系统发育分析,鉴定为嗜水气单胞菌。[结论]该研究可为快捷、准确检测鱼嗜水气单胞菌引起的疾病提供参考。

关键词 嗜水气单胞菌;分离鉴定;16S rDNA

中图分类号 S182;Q93-331 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)13-03907-04

Isolation and 16S rDNA Identification of *Aeromonas hydrophila*

LIU Tong, XIN Ai-guo et al (College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201; Yunnan Academy of Animal Husbandry and Veterinary Sciences, Kunming, Yunnan 650224)

Abstract [Objective] The aim was to isolate and identify *Aeromonas hydrophila* and establish the phylogeny. [Method] Lesion tissue of fish was collected from a certain farm in Yunnan Province, and then the isolated strain was identified by preliminary identification, 16S rDNA identification and phylogenetic analysis. [Result] The bacteria were isolated and named as Ah1305. Through the morphological identification, biochemical test and 16S rDNA phylogeny analysis, it was identified as *Aeromonas hydrophila*. [Conclusion] The study can provide reference for quick and accurately test the disease caused by *Aeromonas hydrophila*.

Key words *Aeromonas hydrophila*; Isolation and identification; 16S rDNA

致病性嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)属于气单胞菌科(Aeromonadaceae)气单胞菌属(*Aeromonas*),是革兰氏阴性短杆菌,两端钝圆,直或略弯,单个或成双排列,有极端单鞭毛,固体培养基上有周鞭毛,无荚膜,不形成芽孢,最适生长温度为 28 ℃。嗜水气单胞菌普遍存在于淡水、海水、污泥、淤泥以及土壤中,是一种人畜共患病的病原。患病鱼出现烂尾、鳍充血,导致出血性败血症和流行性溃疡综合症(EUS)等症[1-2],近些年来有大量的报道表明嗜水气单胞菌还可以引发人类的腹泻、中毒病、外伤性感染以及败血症等病症[3],其致病作用已引起公众的关注,该菌在国外被作为腹泻病原菌进行检测[4-5]。致病菌株除感染鱼及人类以外,还可以感染多种动物(如两栖类、爬行类、鸟类[6]等),给养殖业和公共卫生带来了巨大损失。

笔者从云南某发病鱼场送检病料中分离到 1 株细菌,并对其进行表型鉴定及 16S rDNA 鉴定,以期鱼场该病的检测与防治提供科学依据[7-11]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料。采集云南省某鱼场发病鱼。将发病症状明显的鱼无菌解剖,取病变明显的肝脏、脾脏及肌肉,4 ℃下保存。

1.1.2 培养基。TSA 培养基,购自北京路桥技术有限责任公司。糖类发酵等生化管,购自杭州天和微生物试剂有限公司。血液琼脂培养基。

1.1.3 主要试剂及仪器。细菌基因组 DNA 提取试剂盒

(DP2001)、多功能 DNA 纯化回收试剂盒(DP1501),购自 BIOTEKE 公司。TaKaRa rTaq DNA 酶、DL2000 Marker,购自宝生物工程(大连)有限公司。凝胶成像仪、PCR 扩增仪,购自 BIO-RAD 公司,电泳仪购自北京六一仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 分离培养。将病鱼体表消毒,无菌取病变组织,剪碎研磨。用无菌生理盐水对病料进行 10 倍稀释,分别接种于 TSA 培养基和血液琼脂培养基,置于 28 ℃培养 24 h。观察菌落形态,挑取灰白色发生溶血的可疑单菌落进行革兰氏染色。将染色中有阴性短杆菌的菌落在 TSA 培养基和血液琼脂培养基上分离与纯化。

1.2.2 形态观察。将分离纯化后的细菌按照常规方法进行革兰氏染色并镜检。

1.2.3 生理生化试验。将纯培养的分离菌接种于生化培养基,进行各种糖发酵试验、精氨酸双水解酶试验、硫化氢试验、明胶液化试验、硝酸盐还原试验,28 ℃下培养 24~48 h,记录培养结果。

1.2.4 分子生物学鉴定。

(1)引物设计。参照 GenBank 已发表的 16S rDNA 序列设计 1 对引物,上游引物:27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG-3'),下游引物:1492R(5'-GGTACCTGTTCAGACTT-3')。引物由上海生工生物技术工程有限公司合成。

(2)制备模板:将分离菌株用 TSA 液体培养基培养至对数生长期,按照细菌 DNA 提取试剂盒说明书步骤操作,提取细菌总 DNA。

(3)PCR 反应体系:TaKaRa rTaq(5 U/μl) 0.5 μl、10 × PCR Buffer 3 μl、2.5 mmol/L dNTP Mixture 2.5 μl、上游引物 0.5 μl(10 pmol/L)、下游引物 0.5 μl(10 pmol/L)、模板 DNA 2 μl(50 ng)、灭菌双蒸水 21 μl、共 30 μl。

PCR 反应条件为:95 ℃预变性 5 min;95 ℃变性 30 s,55

基金项目 云南省应用基础研究重点项目(2011FA014);云南省科技创新人才计划项目(2011HB035);国家自然科学基金项目(31260598)。

作者简介 柳桐(1987-),男,山东昌邑人,硕士研究生,研究方向:动物微生物与免疫学。*通讯作者,副研究员,从事预防兽医学研究。

收稿日期 2014-04-16

℃退火 30 s, 72 ℃延伸 90 s, 35 个循环; 72 ℃ 8 min, 4 ℃保存, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果。

按照 DNA 纯化(胶回收)试剂盒说明书操作步骤对 PCR 产物进行纯化, 并送交华大基因测序。

1.2.5 系统发育树的构建。用 BLAST 将分离株的 16S rDNA 测序结果与 GenBank 中登录的序列进行比对, 并选取 19 株作为参比序列。将分离株序列与参比序列使用软件 DNA-MAN 进行同源性分析, 计算同源性数值。使用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树, 分析分离株与参比株的亲缘关系, 鉴定分离株的种属。参比序列的名称、登录号、登录时间、分离来源及分离地区见表 1。

2 结果与分析

2.1 培养特性 通过细菌分离, 得到 1 株细菌, 命名为 Ah1305。在 TSA 固体培养基上, 形成半透明、圆形、中央凸起、边缘光滑的小菌落, 直径在 1 mm 左右。在血液琼脂培养基上形成灰白色的菌落, 产生 β 型溶血圈(图 1)。

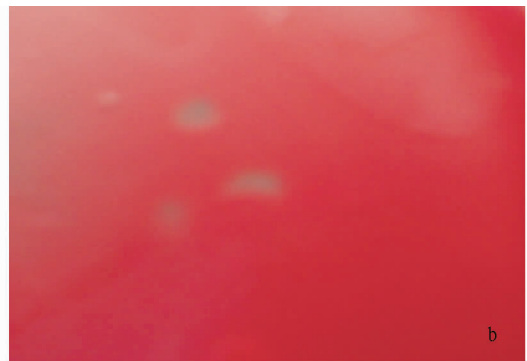
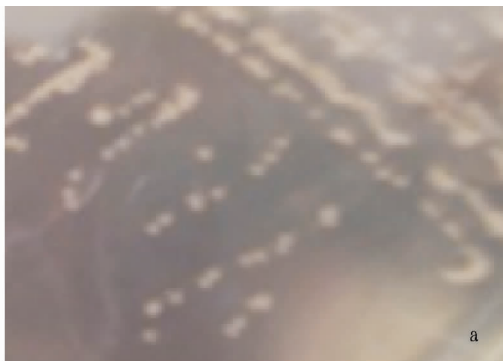
2.2 细菌形态 从图 2 可以看出, 涂片镜检为革兰氏阴性菌, $(1 \sim 1.2) \mu\text{m} \times (2.1 \sim 2.4) \mu\text{m}$, 形状大多数呈短杆状, 两端钝圆, 多分散排列, 无荚膜和芽孢。

2.3 分离菌生化特性 取纯培养的分离菌株分别接种到各生化培养基, 置于 28 ℃ 培养 24 h 观察, 结果见表 2。

2.4 DNA 提取结果 从图 3 可以看出, 分离菌株的全基因组 DNA 提取凝胶电泳图中条带清晰可见, 与预期结果相符。

表 1 序列分析所引用的参比序列

名称	基因登录号	登录日期	分离来源	分离地区
<i>Aeromonas hydrophila</i>	KC202278	16 - JAN - 2013	沉淀物	中国
<i>Aeromonas hydrophila</i>	AB610604	01 - OCT - 2010	淡水湖	日本
<i>Aeromonas salmonicida</i>	JN051353	07 - APR - 2012	大菱鲆	中国
<i>Aeromonas salmonicida</i>	KF413416	08 - SEP - 2013	鲫鱼	中国
<i>Aeromonas veronii</i>	KF561994	11 - SEP - 2013	草鱼	中国
<i>Aeromonas veronii</i>	FJ494902	17 - JUN - 2009	鳊鲴	中国
<i>Aeromonas sobria</i>	KC213891	09 - FEB - 2013	斜齿鲷	立陶宛
<i>Aeromonas sobria</i>	KC213903	09 - FEB - 2013	斜齿鲷	立陶宛
<i>Aeromonas eucrenophila</i>	JF920496	17 - OCT - 2011	水	葡萄牙
<i>Aeromonas media</i>	FJ940831	29 - OCT - 2009	水	中国
<i>Aeromonas media</i>	GU174504	29 - NOV - 2009	斑点叉尾鲷	中国
<i>Aeromonas cavive</i>	HQ407259	06 - MAR - 2012	家蝇	印度
<i>Aeromonas cavive</i>	KC904094	27 - MAY - 2013	鲜乳	巴西
<i>Aeromonas cavive</i>	HQ407268	06 - MAR - 2012	家蝇	印度
<i>Aeromonas enteropelogenes</i>	FJ940842	29 - OCT - 2009	大闸蟹	中国
<i>Aeromonas enteropelogenes</i>	JN644602	05 - OCT - 2011	致倦库蚊	印度
<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	KF625182	21 - SEP - 2013	鱼	巴基斯坦
<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	FJ940841	29 - OCT - 2009	鲮鱼	中国
<i>Aeromonas encheleia</i>	AJ458416	16 - JAN - 2006	欧洲鳊鲴	瑞士



注: a. TSA; b. 血液琼脂。

图 1 分离菌的菌落形态观察

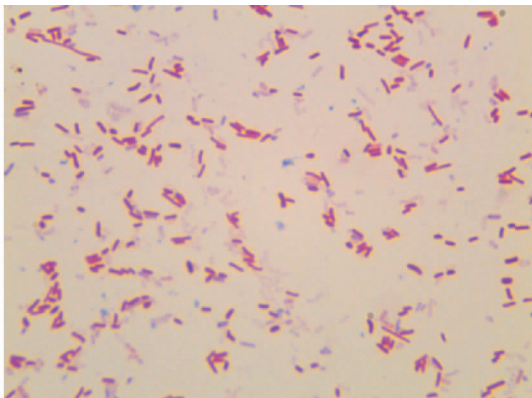


图 2 分离菌 Ah1305 的形态观察(1 000 ×)

2.5 PCR 扩增结果 分离株 16S rDNA 基因 PCR 扩增后得到约为 1.5 kb 大小的目的片段, 凝胶电泳结果其与预期结果相符(图 4)。

2.6 16S rDNA 同源性分析及系统发育树构建 对分离株及 19 株参比菌株, 共 20 株构建的系统发育树。

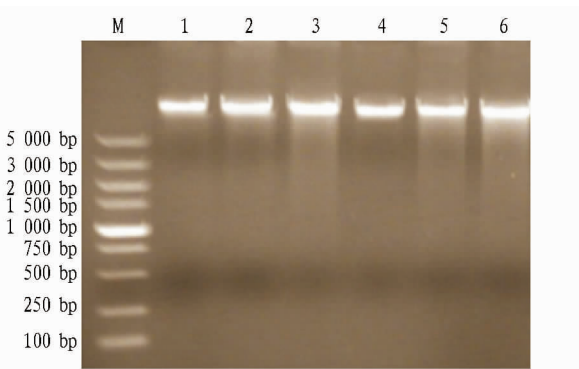
从图 5 可以看出, 该分离菌株 Ah1305 与进化树远端的豚鼠气单胞菌 *Aeromonas cavive* (HQ407259, HQ407268) 的同源性均为 98.2%, 表明分离菌与其亲缘关系较远。与嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila* (KC202278, AB610604) 的同源性均为 99.9%, 且处于同一分支, 亲缘关系较近。分离菌株 Ah1305 根据其形态特征、培养特性、生化特性, 对照《伯杰氏细菌鉴定手册》(第 9 版) 的鉴定方法, 初步鉴定为嗜水气单

胞菌,结合 16S rDNA 序列系统发育分析结果鉴定为嗜水气单胞菌。

表 2 分离菌的生化试验结果

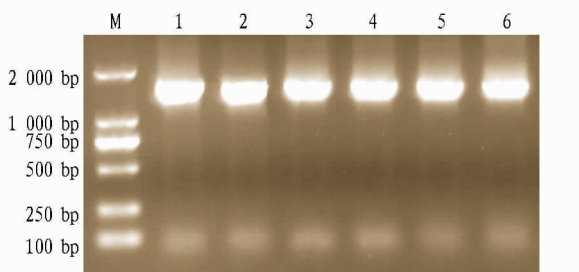
试验内容	观察结果	试验内容	观察结果
麦芽糖	+	赖氨酸	+
葡萄糖	+	精氨酸	+
半乳糖	+	鼠李糖	-
蔗糖	+	肌醇	-
甘露糖	+	卫矛醇	-
甘露醇	+	鸟氨酸	-
阿拉伯糖	+	尿素	-
七叶苷	+	硫化氢产气	+
水杨苷	+	硝酸盐还原	+
靛基质	+	明胶液化	+

注:“+”为阳性;“-”为阴性。



注:M. Marker DL5000;1-6. 细菌基因组 DNA。

图 3 细菌基因组 DNA 的凝胶电泳图谱



注:M. DL2000 Marker;1-6. PCR 产物。

图 4 菌株 16S rDNA 基因扩增电泳图谱

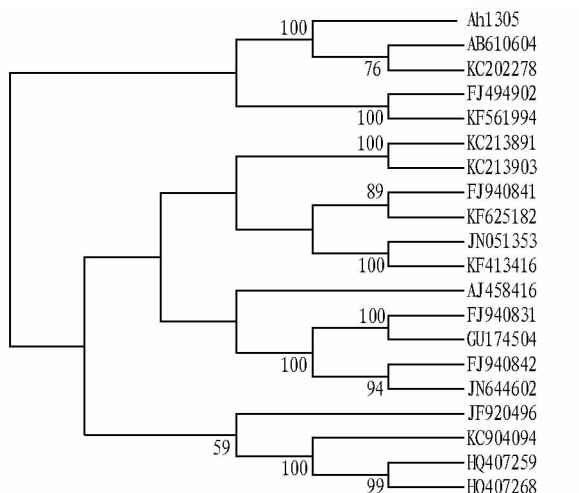


图 5 分离菌 Ah1305 的系统发育树

3 讨论

在临床上鱼类的细菌病中,很多具有共同的症状(如体表充血、发红、溃烂、腹部膨大、腹水等),只依靠临床症状来判断及治疗有很大盲目性,需要通过实验室诊断才能确诊^[12]。实验室鉴定鱼类细菌性疾病病原的方法有很多,主要包括生理生化特性鉴定技术(如用 ATB 细菌鉴定仪)^[13-14]、免疫学诊断技术(如间接 ELISA)^[15-16]、分子生物学方法^[17-20](如 LAMP)^[21-22]等。PCR 检测方法简便快捷,已被较多应用于嗜水气单胞菌的快速检测。检测的目的基因也有多种,如溶血素基因^[23-24]、气溶素基因^[25]、丝氨酸蛋白酶基因^[26]、16S rDNA^[27-28]等。

以 16S rDNA 为目的基因的 PCR 鉴定方法最为成熟,也取得了较显著的成果。与表形鉴定、生理生化鉴定等传统的细菌鉴定方法相比,该方法操作简便,省时,且避免了传统生化试验的不稳定性。与针对其他基因的 PCR 鉴定方法相比,16S rDNA 基因具有高度保守性的特点,稳定性好,可靠性高。对于混合感染的病例,可做到一次检测多种病原菌。该方法方便快捷,成本较低,准确性高,对于症状相似的疾病能够做到准确、快速鉴定病原菌,从而指导临床治疗,避免因误诊而造成的损失。

参考文献

- GORDEN R W, HAZEN T C, ESCH G W, et al. Isolation of *Aeromonas hydrophila* from American alligator, *Alligator mississippiensis* [J]. *J Wildlife Dis*, 1979, 15(2): 239-243.
- HOSSAIN M. Isolation of pathogenic bacteria from the skin ulcerous symptomatic gourami (*Colisa lalia*) through 16S rDNA analysis [J]. *Univer J Zool, Rajshahi Univer*, 2008, 27(12): 21-24.
- 叶方友, 江夏明, 王琳娜. 一起嗜水气单胞菌感染导致群体性腹泻的调查 [J]. *中华流行病学杂志*, 2004, 25(5): 406.
- 胡萌, 潘子豪, 陆承平, 等. 嗜水气单胞菌流行菌株的生物学特性 [J]. *中国兽医科学*, 2013, 43(05): 441-445.
- JANDA J M, ABBOTT S L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2010, 23(1): 35-73.
- 冷闯, 邓舜洲, 张文波, 等. 中华鳖致病性嗜水气单胞菌的分离鉴定及药敏试验 [J]. *动物医学进展*, 2012, 33(2): 124-129.
- 陈雪, 李太元, 常巧城, 等. 林蛙红腿病 PCR 诊断方法的建立 [J]. *兽医科技报*, 2009(5): 82-83.
- 韦信贤, 杨先乐, 童桂香, 等. 四重 PCR 检测致病性嗜水气单胞菌 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2013, 29(6): 587-593.
- MENG S, BAI XM, WANG Y, et al. Novel triplex real-time Taq-Man PCR assay for the detection of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Chin J Zoonoses*, 2012, 28(3): 217-222.
- Jumpstart Consortium Human Microbiome Project Data Generation Working Group. Evaluation of 16S rDNA-based community profiling for human microbiome research [J]. *PLOS One*, 2012, 7(6): 39315.
- JACOB D, WAHAB T, EDVINSSON B, et al. Identification and subtyping of *Francisella* by pyrosequencing and signature matching of 16S rDNA fragments [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2011, 53(6): 592-595.
- 张磊, 管越强, 李艳琴, 等. 患病罗汉鱼疑似病原菌分离鉴定与药敏试验 [J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(7): 3020-3022.
- 曹海鹏, 何珊, 刘丽玲, 等. 鲟源病原性嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌的鉴定及其生物学特性 [J]. *微生物学通报*, 2011, 38(9): 1377-1384.
- HORVAT RT, EL ATROUNI W, HAMMOUD K, et al. Ribosomal RNA sequence analysis of *Brucella* in fection misidentified as *Ochrobactrum anthropi* infection [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(3): 1165-1168.
- 王璐, 梁利国, 谢骏, 等. 嗜水气单胞菌双重 PCR 检测方法的建立及应用 [J]. *水产科学*, 2013, 32(4): 199-223.
- 辛志明, 樊海平, 吴斌, 等. 嗜水气单胞菌胶体金快速检测试纸条的研制 [J]. *中国兽医科学*, 2012, 42(7): 708-712.
- 白雪梅, 李太元, 杨兴, 等. 应用间接荧光抗体技术检测林蛙嗜水气单胞菌 [J]. *水产科学*, 2010, 29(10): 613-615.

- [18] PICOZZI C, BONACINA G, VIGENTINI I, et al. Genetic diversity in Italian *Lactobacillus sanfranciscensis* strains assessed by Multilocus sequence typing and Pulsed-field gel electrophoresis analyses [J]. *Microbiology*, 2010, 156: 2035-2045.
- [19] ZHOU H, LOTTNER S, GANTER M, et al. Identification of two new *Dichelobacter nodosus* strains in Germany [J]. *Veterinary Journal*, 2010, 184 (1): 115-117.
- [20] WRY N, MONTEIL C, POURCHER A M, et al. Human-specific fecal bacteria in wastewater treatment plant effluents [J]. *Water Research*, 2010, 44 (6): 1873-1883.
- [21] NOTOMI T. Loop-mediated isothermal amplification [J]. *Nippon Rinsho*, 2007, 65 (5): 957-961.
- [22] 曾桂芬, 龙北国, 姜蓉, 等. LAMP 和 PCR 法检测痢疾志贺菌的特异性和灵敏度比较 [J]. *热带医学杂志*, 2012, 12 (5): 547-549, 592.
- [23] 王蓉, 王忠发, 王志铮, 等. 实时荧光定量 PCR 快速检测嗜水气单胞菌方法的建立 [J]. *现代预防医学*, 2012, 39 (13): 3339-3341.
- [24] GOSWARNI R, GHOSH D, SAHA D R, et al. Effect of acute and chronic arsenic exposure on growth, structure and virulence of *Aeromonas hydrophila* isolated from fish [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2011, 50 (2): 63-69.
- [25] 朱建萍, 叶展翔, 朱焯, 等. 嗜水气单胞菌气溶胶毒力基因检测研究 [J]. *中国热带医学*, 2009, 9 (5): 810-811.
- [26] 单小枫, 郭伟生. 嗜水气单胞菌检测技术研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2010, 31 (5): 90-93.
- [27] KOMMEDAL O, SIMMON K, KARACA D, et al. Dual priming oligonucleotides for broad-range amplification of the bacterial 16S rDNA gene directly from human clinical specimens [J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50 (4): 1289-1294.
- [28] MAHLEN S D, CLARRIDGE J E. Evaluation of a selection strategy before use of 16S rRNA gene sequencing for the identification of clinically significant Gram-negative rods and coccobacilli [J]. *Am J Clin Pathol*, 2011, 136 (3): 381-388.

(上接第 3849 页)

烘烤、分级、运输等多个环节,要真正实现烟草全程机械化,仅配置全套烟草农机具费用至少在 5 万元以上,而烟农的经济能力难以承担此项费用。目前,虽然国家烟草行业和政府财政相应出台了农机购置补贴政策,但受政策计划限制和单一实施影响,难以满足当前烟草机械化正常需求。

表 2 烟草农业机械化与传统农业比较分析

生产环节	机械化用工 个/hm ²	传统农业用工 个/hm ²	减少用工 个/hm ²	增加效益 元/hm ²
育苗	7.5	22.5	15.0	1 200
耕地	10.5	27.0	16.5	1 320
起垄	6.0	13.5	7.5	600
移栽	7.5	22.5	15.0	1 200
中耕	9.0	22.5	13.5	1 080
编烟	7.5	18.0	10.5	840
回潮	1.5	4.5	3.0	240
合计	49.5	130.5	81.0	6 480

注:表中仅为开展机械化作业几个生产环节的分析对比,每个用工单价为 80 元。

3.4 烟田基础设施配套滞后 在试点烟田中,能够方便烟草农业机械通行的烟田面积 20.33 hm²,占试点总面积 38.1%。受山区交通不便、土地连片规模小等地理条件限制,烟田基础设施条件相对薄弱,难以保障烟草农业机械通行烟田作业,制约了烟草农业机械化进程。

4 建议

4.1 科学优化基本烟田 目前,旬阳县耕地总面积 4.46 万 hm²,宜烟面积 3.79 万 hm²,全县规划基本烟田面积 1.35 万 hm²。要按照“以烟为主、连片建设、合理利用、用养结合”的原则,进一步科学优化基本烟田,与烟区布局调整、烟田轮作、土壤保育、土地整理相结合,选择在土地增产潜力较大、经济基础薄弱、交通较为便利、种烟积极性高、生态环境良好并具有一定水源条件的区域重新规划基本烟田,加强基本烟田建设与保护,提高基本烟田综合生产能力。

4.2 加快山区烟草农业机械研发 目前,旬阳已经建立了

现代烟草农业机械研发中心,要紧紧依托这一平台,加强协调沟通,积极整合农机科研力量;与农机专业部门、生产厂家进行多方合作,采取外引内研相结合,加快山区适用的小型烟草专用农业机械研发;在做好试点较为适用烟草农业机械农艺标准持续改进的同时,重点做好施肥、覆膜、移栽、采收等环节山地适用型农业机械的研制开发,努力提升山区烟草农业机械化整体水平。

4.3 加快烟草农业机械政策配套 在积极争取和合理用好烟草行业农机补贴政策的同时,努力争取地方政府给予大力支持,将政府和烟草行业农机补贴政策进行捆绑,整合相关政策资源,确保烟草农业机械扶持的最大化;并积极调动政府农机职能部门和社会农机力量,逐步形成政府、烟草、社会等多元化投入的格局。

4.4 加快烟田配套设施建设 积极抢抓国家烟叶生产基础设施项目建设扶持政策,彻底调查摸清以烟田机耕路为重点的基本烟田设施配套状况,按照“整体规划、分步实施、注重实效”的原则,科学制定烟叶基础设施项目建设规划,用好烟田机耕路补贴政策,逐步实现基本烟田达到设施综合配套的目标,为烟草农业机械化提供有力的基础保障。

4.5 加快烟草农机推广服务体系 烟草农机推广服务体系,对加快推进烟草农业机械化具有重要保障作用。应加强政府职能部门、生产厂家和烟草部门的联手合作,充分发挥烟农的主体作用,构建多方协作、适应需求、保障服务的烟草农业机械化推广服务体系。在机械类型研发上,应注重山区适用型、科学经济型和生产全程型。在配套服务上,应加大烟草农机推广应用的技术培训和售后服务力度。逐步完善和形成一个比较完整的烟草农机推广和服务体系。

参考文献

- [1] 李玉山. 科学发展丘陵山区农业机械化的探索 [J]. *农业技术与装备*, 2008 (3): 25-27.
- [2] 于玉真, 高连兴. 小地块地区发展农业机械化的探讨 [J]. *农机化研究*, 2005 (6): 33-35.