

文章编号: 1674 - 5566(2014)02 - 0167 - 06

嗜水气单胞菌 ERIC-PCR 指纹图谱多样性研究

叶诗尧^{1,2}, 梁利国², 谢 骏²

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081)

摘 要: 对采集自江苏、河南、福建等地淡水养殖区域的 105 株嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)进行了基因分型,并探讨嗜水气单胞菌的基因型与区域分布及生态位的关联性。该实验以 ERIC-PCR 技术进行分型,应用 Quantity one 4.6 对电泳图谱进行分析,采用非加权配对法(UPGMA 法)做遗传分析的树状图。结果表明,105 株嗜水气单胞菌可分为 28 个基因型。其中,XV 基因型的菌株相对最多,IV、XI、XXII、XXV、XXVI、XXVII 和 XXVIII 基因型的菌株相对最少。生态位背景来源相似的菌株有聚类趋势。此外,不同地域、不同生态位的嗜水气单胞菌也可能聚为同一种基因型。由此推断嗜水气单胞菌的基因型可能与生态位及地理位置有一定的关联性。

研究亮点: 首次阐述不同生态位上分离的嗜水气单胞菌之间的遗传关系。从不同池塘中不同患病鱼体的肠道、肝脏以及水体和池塘底泥等生态位分离出 105 株嗜水气单胞菌,并以 ERIC-PCR 分子分型方法对供试菌株进行了分型研究,为嗜水气单胞菌的流行及种源的追溯提供重要的参考依据。

关键词: 嗜水气单胞菌;ERIC-PCR;生态位

中图分类号: S 917

文献标志码: A

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)属于气单胞菌科(Aeromonadaceae)、气单胞菌属(*Aeromonas*),是有运动能力且嗜温的革兰氏阴性菌。该菌普遍存在于淡水、污水、淤泥和土壤中,可引起淡水养殖鱼类的爆发性出血病、败血病和烂鳃病等^[1]。此外,嗜水气单胞菌亦可引发人类腹泻、外伤性感染和畜禽的恶性传染病,是一种人-兽-鱼共患病病原菌^[2-3]。因此,对嗜水气单胞菌开展分离、鉴定以及对不同来源的菌株进行分型,比较它们之间的亲缘关系,对于嗜水气单胞菌流行病学的研究有着重要的意义。

传统的病原检测鉴定主要依据是形态特征和生理生化性状,采取的方法是对病原进行纯培养,然后从表型特征、理化特性等方面加以鉴定^[4]。但是这些方法既费时又费力,而且分辨率也不是很高。近年来,随着分子生物学技术的不断发展,PCR 技术的不断完善,多种基因分型方

法在病原微生物检测和分类方面得到了广泛的应用。这些分型方法从遗传进化的角度在分子水平对嗜水气单胞菌进行分类和鉴定^[5],其结果比传统的表型分型方法更具可信性。

目前,细菌基因分型的方法有很多,如随机扩增多态性 DNA 技术(RAPD)分型,限制性片段长度多态性(RFLP)分型、肠道细菌基因间重复共有序列 PCR(ERIC-PCR)分型、随机引物聚合酶链法(AP-PCR)分型和脉冲场凝胶电泳法(PFGE)等^[6-8]。其中,PFGE 法准确性最高,且稳定性好,被认为是分子分型的金标准^[9-10],但是该方法操作步骤繁杂,且需要特殊仪器,在普通实验室难以开展。而 ERIC-PCR 法操作简单,快速、灵敏且不需要特殊仪器,更易在普通实验室中推广。

本实验采用肠道细菌重复基因间共有序列(ERIC-PCR)分型方法对不同来源,不同生态位

收稿日期: 2013-10-14

修回日期: 2013-12-18

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46-10);江苏省水产三新工程(D2013-5)

作者简介: 叶诗尧(1989—),男,硕士研究生,研究方向为水产动物疾病防治。E-mail:liemingshi123@126.com

通信作者: 谢 骏,E-mail:xiej@ffrc.cn

分离出的 105 株嗜水气单胞菌进行分型。探讨从水、泥土表面、鱼体肠道、血液、肝脏、肾脏及表皮等不同生态位分离出的嗜水气单胞菌的亲缘关系。

1 材料与方法

1.1 样品采集

样品采集时间为 2012 年 7 - 10 月。具体采集方法如下,水样在发病池塘采集,采样前在同一水体中将采水器清洗数次后,从上风口、下风口和池塘中心等不同位置采取水面下约 20 cm 深处的水样,注入灭菌的离心管。在现场用无菌剪刀解剖鱼体(团头鲂、鲫等患病鱼体),收集肠道内容物分别放入灭菌的离心管。泥样用采泥器取发病池塘水中约 5 cm 处的底泥放入灭菌的离心管。所有样本放于离心管后置于冰盒中保存。

1.2 菌株的分离及鉴定

将水样稀释成 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 三个梯度,用涂布棒均匀涂在普通琼脂培养基平板上;泥样和肠道内容物直接接入营养肉汤中,震荡过夜培养后划平板。3 种样品于 28 °C 培养箱过夜培养后,用接种环挑取单菌落于营养肉汤中纯培养,次日离心收集菌株,按 DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA 作 PCR 模板。

用嗜水气单胞菌特异性引物扩增,气单胞菌属特异性引物为, *AstyF*: 5'-CTACTTTTGCCGGCGAGCGG-3'; *AstyR*: 5'-TGATTCCCGAAGGCACTCC C-3'^[11]。通过常规 PCR 方法扩增目的片段,筛选阳性单克隆菌落,并将收集的阳性菌株按照东秀珠和蔡妙英^[12]的方法进行生理生化试验。确定为嗜水气单胞菌后用甘油于 -80 °C 保存,以便用于进行 ERIC-PCR 分型。

1.3 ERIC-PCR 分型

ERIC-PCR 特异性引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列为,ERIC 正向引物(F): 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'; ERIC 反向引物(R): 5'-AAGTAAGTACTGGGGT GAGCG-3'^[12]。

在 20 μ L 反应体系中包含 PCR Buffer(10 \times) 2 μ L, dNTP 0.5 μ L, primers (F/R) 各 0.3 μ L, *Taq* polymerase 0.3 μ L, DNA 模板 2 μ L, 用超纯水补足至 20 μ L。

反应程序:95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1

min, 52 °C 退火 1 min, 68 °C 延伸 8 min, 共循环 25 次;再 65 °C 维持 16 min。

PCR 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶 120 V 电压电泳 60 min。

应用 Quantity one 4.6 对电泳图谱进行分析。采用“1”和“0”的方式记录在 Excel 中,每个样品的扩增带存在时赋值为“1”,不存在时赋值为“0”。采用 NTSYS-PC 2.1 计算软件,得到遗传相似性系数矩阵和遗传距离矩阵,采用非加权配对法(UPGMA 法)做遗传分析的树状图。凡相似度大于 0.8 者为同一亚型,小于 0.8 者为不同的基因型^[13]。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定结果

本实验共分离菌株 1 000 株,用于 ERIC-PCR 分型的共 105 株(表 1),其中 57 株为本实验室保存菌株,均已通过表型和分子鉴定;另 48 株(菌株编号为 40 - 87,表 1)经嗜水气单胞菌特异性引物检测为阳性且理化特征显示能分解利用甘露糖、蔗糖、枸橼酸盐、丙二酸盐、尿素、胆汁七叶苷等,不发酵松三糖、蜜二糖、肌醇等,发酵型、葡萄糖产酸产气,确认为嗜水气单胞菌。

2.2 嗜水气单胞菌的 ERIC-PCR 分型

实验结果表明,105 株嗜水气单胞菌经 ERIC-PCR 扩增,产生了 28 种不同的指纹图谱,且指纹图谱呈现多态性(图 1),其中 PCR 产物为 1 ~ 9 条,主带为 1 ~ 4 条,大小为 0.25 ~ 2 kb。

图 2 中,1 ~ 24 号代表菌株,分别对应图 1 中 95 - 86 号菌。从图中可以看出,95 号菌与 81 号菌的相似度最低,为 0%;73 与 74 号菌的相似度最高,为 100%。

2.3 嗜水气单胞菌 ERIC-PCR 指纹图谱聚类分析

结果表明,105 株嗜水气单胞菌共分为 28 个基因型(表 2,图 3)。其中 XV 基因型的菌株相对最多,有 20 株,这 20 株嗜水气单胞菌分别采自常州、盐城、南通、高邮等不同地点,并且分离自发病塘口的水、泥、患病鱼体的血液、腹水、肝脏、肠道等不同生态位;I 基因型相对较多,有 15 株,除了 99 号菌株采自常熟外,其余菌株均采自常州;IV、XI、XXII、XXV、XXVI、XXVII、XXVIII 基因型的菌株最少,均只有 1 株,这些基因型的菌株

除了XXV型采自无锡外,其余均采自常州。从图 和 XVI基因型的相似性最高,大概在0.8左右。3中可以看出,I基因型和II基因型、XV基因型

表 1 菌株来源及生态位

Tab. 1 Source and ecological niche of the strains

菌株来源	菌株代号	生态位	菌株代号	生态位	菌株代号	生态位	菌株代号	生态位	
常州	1	肝脏	2	肝脏	3	食糜	4	血液	
	5	肝脏	6	食糜	7	血液	8	肝脏	
	9	血液	10	肝脏	11	肝脏	12	肝脏	
	13	肝脏	14	肝脏	15	水	16	肝脏	
	17	肝脏	18	肝脏	19	肝脏	20	肝脏	
	21	血液	22	肝脏	23	血液	24	肝脏	
	25	血液	26	肝脏	27	肝脏	28	肝脏	
	29	肝脏	30	底泥	31	血液	32	食糜	
	33	肝脏	34	肝脏	35	血液	36	肝脏	
	37	肝脏	38	血液	39	血液	40	水	
	41	水	42	水	43	血液	44	肠道	
	45	肠道	46	水	47	水	48	水	
	49	水	50	水	51	水	52	水	
	53	水	54	水	55	水	56	肠道	
	57	肠道	58	肠道	59	肠道	60	水	
	61	底泥	62	底泥	63	底泥	64	底泥	
	65	底泥	66	底泥	67	底泥	68	底泥	
	69	底泥	70	底泥	71	底泥	72	底泥	
	73	底泥	74	底泥	75	底泥	76	肠道	
	77	肠道	78	肠道	79	肠道	80	肠道	
	81	肠道	82	肠道	83	肠道	84	肠道	
	85	肠道	86	肠道	87	肠道			
	南通	88	表皮	89	肝脏	90	水	91	水
	扬州	92	腹水						
	无锡	93	鳃						
高邮	94	腹水	95	腹水					
盐城	96	肾	97	腹水	98	腹水			
常熟	99	肾							
福建	100	肝脏							
苏州	101	肝脏	102	肠道					
河南	103	肝脏	104	肝脏					
连云港	105	肾脏							

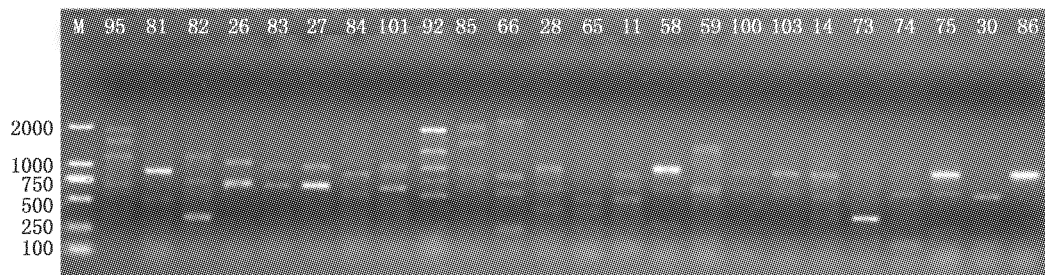


图 1 部分嗜水气单胞菌菌株 ERIC-PCR 指纹图

Fig. 1 ERIC-PCR fingerprints of partial *Aeromonas hydrophila* strains

1	100.0	0.0	11.0	10.0	10.2	8.4	7.1	10.1	9.2	62.8	0.0	10.4	0.0	65.6	20.3	8.7	0.0	65.6	0.0	0.0	0.0	6.7	0.0	0.0
2	0.0	100.0	0.0	19.4	5.9	16.3	0.0	0.0	18.0	47.3	82.7	0.0	0.0	0.0	6.4	28.7	21.8	0.0	21.8	36.9	36.9	0.0	36.9	21.8
3	11.0	0.0	100.0	86.8	0.0	67.8	0.0	23.7	29.5	0.0	0.0	16.2	0.0	0.0	0.0	57.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
4	10.0	19.4	86.8	100.0	7.1	80.1	0.0	20.9	47.4	0.0	15.6	14.2	0.0	0.0	7.6	51.5	26.3	0.0	26.3	0.0	0.0	0.0	0.0	26.3
5	10.2	5.9	0.0	7.1	100.0	5.7	93.3	0.0	6.4	9.2	4.7	0.0	0.0	15.0	92.6	0.0	8.1	15.0	8.1	0.0	0.0	9.0	0.0	8.1
6	8.4	16.3	67.8	80.1	5.7	100.0	0.0	16.7	75.3	0.0	26.8	11.2	0.0	0.0	6.2	42.6	64.4	0.0	64.4	0.0	0.0	0.0	0.0	64.4
7	7.1	0.0	0.0	0.0	93.8	0.0	100.0	0.0	0.0	6.4	0.0	0.0	0.0	10.7	86.4	0.0	10.7	0.0	0.0	0.0	0.0	9.6	0.0	0.0
8	10.1	0.0	23.7	20.9	0.0	16.7	0.0	100.0	18.9	0.0	0.0	96.2	88.1	0.0	0.0	17.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	84.2	0.0	0.0
9	9.2	18.0	29.5	47.4	6.4	75.3	0.0	18.9	100.0	0.0	34.9	12.7	0.0	0.0	6.9	22.5	77.4	0.0	77.4	0.0	0.0	0.0	0.0	77.4
10	62.8	47.3	0.0	0.0	9.2	0.0	6.4	0.0	0.0	100.0	40.1	0.0	0.0	54.4	18.5	0.0	0.0	54.4	0.0	0.0	0.0	6.1	0.0	0.0
11	0.0	82.7	0.0	15.6	4.7	26.8	0.0	0.0	34.9	40.1	100.0	0.0	0.0	0.0	5.2	26.5	33.9	0.0	33.9	32.3	32.3	0.0	32.3	33.9
12	10.4	0.0	16.2	14.2	0.0	11.2	0.0	96.2	12.7	0.0	0.0	100.0	91.9	0.0	0.0	11.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	87.6	0.0	0.0
13	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	88.1	0.0	0.0	0.0	91.9	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	95.0	0.0	0.0
14	65.6	0.0	0.0	0.0	15.0	0.0	10.7	0.0	0.0	54.4	0.0	0.0	0.0	100.0	28.9	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	10.1	0.0	0.0
15	20.3	6.4	0.0	7.6	92.6	6.2	86.4	0.0	6.9	18.5	5.2	0.0	0.0	28.9	100.0	0.0	8.6	28.9	8.6	0.0	0.0	8.6	0.0	8.6
16	8.7	28.7	57.1	51.5	0.0	42.6	0.0	17.6	22.5	0.0	26.5	11.8	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	71.5	71.5	0.0	71.5
17	0.0	21.8	0.0	26.3	8.1	64.4	0.0	0.0	77.4	0.0	33.9	0.0	0.0	0.0	8.6	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
18	65.6	0.0	0.0	0.0	15.0	0.0	10.7	0.0	0.0	54.4	0.0	0.0	0.0	100.0	28.9	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	10.1	0.0	0.0
19	0.0	21.8	0.0	26.3	8.1	64.4	0.0	0.0	77.4	0.0	33.9	0.0	0.0	0.0	8.6	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
20	0.0	36.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	32.3	0.0	0.0	0.0	0.0	71.5	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	0.0	100.0	0.0
21	0.0	36.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	32.3	0.0	0.0	0.0	0.0	71.5	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	0.0	100.0	0.0
22	6.7	0.0	0.0	0.0	9.0	0.0	9.6	84.2	0.0	6.1	0.0	87.6	95.0	10.1	8.3	0.0	0.0	10.1	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0
23	0.0	36.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	32.3	0.0	0.0	0.0	0.0	71.5	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	0.0	100.0	0.0
24	0.0	21.8	0.0	26.3	8.1	64.4	0.0	0.0	77.4	0.0	33.9	0.0	0.0	0.0	8.6	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0

图 2 部分嗜水气单胞菌菌株相似性分析

Fig. 2 Similarity matrix of partial *Aeromonas hydrophila* strains

表 2 嗜水气单胞菌 ERIC-PCR 指纹图谱聚类表

Tab. 2 ERIC-PCR fingerprint clustering table of *Aeromonas hydrophila*

基因型	菌株代号	基因型	菌株代号
I	87, 40, 41, 42, 46, 54, 99, 32, 65, 66, 82, 51, 11, 13, 39, 85	XV	5, 59, 26, 57, 27, 97, 75, 86, 69, 95, 19, 58, 72, 21, 79, 44, 91, 37, 55, 83
II	9, 94, 80	XVI	63, 18, 38, 22, 25, 23, 103, 24, 81, 20
III	7, 31	XVII	89, 14
IV	12	XVIII	102, 50, 28, 92
V	100, 53	XIX	56, 52
VI	3, 4, 6, 105	XX	90, 68, 15
VII	101, 45, 43, 84, 74, 77, 34, 104, 73	XXI	16, 35
VIII	33, 60, 62	XXII	29
IX	1, 2, 61	XXIII	11, 70
X	88, 96	XXIV	98, 30
XI	71	XXV	93
XII	67, 76, 8	XXVI	8
XIII	47, 48	XXVII	17
XIV	49, 64	XXVIII	36

3 讨论

嗜水气单胞菌作为水产养殖动物的重要病原菌之一,广泛存在于水体中。它引起的大规模流行性细菌败血症对水产行业造成了巨大的经济损失^[14]。然而,嗜水气单胞菌的分类系统一直较为混乱,这给疾病控制和科研交流都带来很大不便^[15]。笔者采用肠道细菌基因间重复共有序列(ERIC-PCR)分型方法对不同来源,不同生态位分离出的105株嗜水气单胞菌进行分型,样本量较大,菌株的流行情况也比较复杂。实验结果表明,采自同一地域不同生态位的嗜水气单胞菌有聚为一类的趋势,如第I种基因型中除99号菌株分离自常熟患病鱼体的肾脏以外,其余菌株均采自常州发病塘口的水、泥、鱼体肠道、肾脏、血液、肝脏等不同的生态位;同时,采自同一地区

同一生态位的菌株也聚为了同一种基因型,如采自常州患病塘口水样的菌株47与48均归为了第XIII种基因型;此外,同一种基因型中各菌株间的相似性在80%~100%之间,如分离自常州地区底泥的菌株73与74,根据图2中的结果,它们的相似度为100%。这与AGUILERA-ARREOLA等^[16]得出的结论是一致的,即背景来源相似的嗜水气单胞菌菌株有聚类趋势一致的特征。

然而,肖丹等^[17]采用ERIC-PCR方法对分离的49株致病性嗜水气单胞菌进行分型后得出,部分背景来源相似的致病性嗜水气单胞菌呈现出不同的聚类特征。在本实验中,同样分离自常州地区团头鲂肝脏的菌株12、8、17、36和89、14却聚为了IV、XXVI、XXVII、XXVIII和XVII等5种不同的基因型,此结果可能与这6株嗜水气单胞菌分离自常州不同的养殖塘口、不同鱼体有关;例

如, I 基因型中的菌株 87 采自常州地区, XXVIII 基因型中的 36 号菌株同样采自常州,但是, I 基因型和 XXVIII 基因型的遗传距离最远,表明背景来源相似的菌株可能存在着相对较远的亲缘关系(表 2,图 3)。

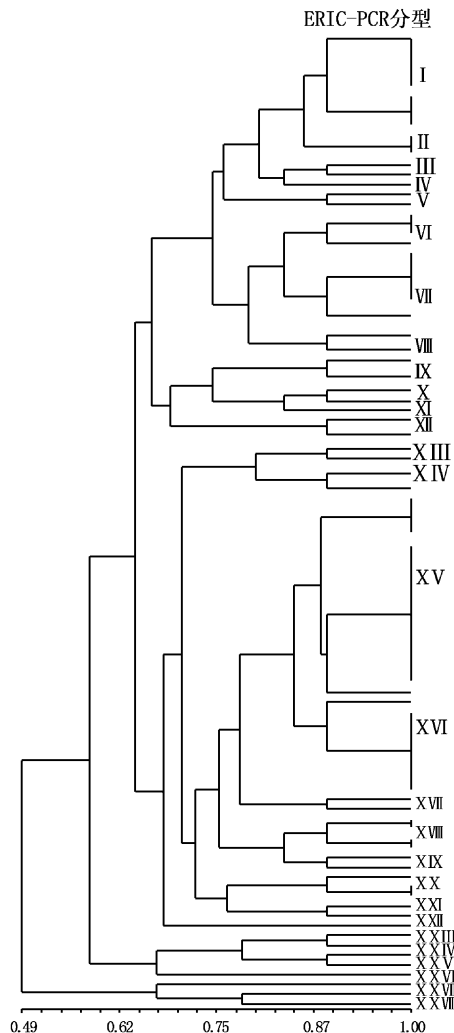


图 3 105 株嗜水气单胞菌指纹图谱聚类分析图

Fig. 3 Results of ERIC-PCR genotyping and UPGMA clustering of 105 strains

此外,部分采集自不同地域不同生态位的嗜水气单胞菌却呈现了相似的聚类特征,如分离自福建鲫肝脏的菌株 100 和分离自常州鲫养殖池塘水体的菌株 53 归为了 V 基因型;分离自常州发病塘口的团头鲂血液、肠道等生态位的菌株 21 和 79,分离自南通养殖池塘水体的菌株 91,分离自盐城发病塘口鲫腹水的菌株 97 和分离自高邮患病鲫腹水的菌株 95 均归为 XV 基因型。图 3 中,VI 基因型与 VII 基因型的遗传距离相对较近,

但是这两类基因型中的菌株分别分离自常州、连云港、苏州和河南等不同的地区。这可能跟自然水体的流动,地域之间养殖鱼种的运输等诸多因素有关,说明不同地域和不同生态位的菌株也可能有着很近的亲缘关系^[18-19]。

综上所述,嗜水气单胞菌的基因型与地理位置以及生态位可能有一定的关联性,但是关系并不绝对。嗜水气单胞菌受自然水体流动、地域间养殖产品及苗种的运输等诸多因素影响而产生的跨地域传播,可能是造成菌株基因型多样性的主要原因。对 105 株嗜水气单胞菌分型得到的聚类特征表明,ERIC-PCR 方法可以快速而方便地分析致病菌背景及追溯其传染源,可为某一地区或某养殖基地的嗜水气单胞菌的流行及种源的追溯提供重要的参考依据,以便于进行嗜水气单胞菌流行病学的研究。

参考文献:

- [1] 沈锦玉. 嗜水气单胞菌的研究进展[J]. 浙江海洋学院学报, 2008, 27(1): 78-86.
- [2] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述[J]. 水产学报, 1992, 16(3): 282-288.
- [3] HUYS G, KERSTERS I, VANCANNEYT M, et al. Diversity of *Aeromonas* spp. in flemish drinking water production plants as determined by gas liquid chromatographic analysis of cellular fatty acid methyl esters (FAMEs) [J]. Journal of Applied Bacteriology, 1995, 78(4): 445-455.
- [4] 钱冬, 陈月英, 沈锦玉, 等. 引起鱼类暴发性流行病的嗜水气单胞菌的血清型、毒力及溶血性[J]. 微生物学报, 1995, 35(6): 460-464.
- [5] 方苹, 陈静, 李婧慧, 等. 嗜水气单胞菌分型研究进展[J]. 淮海工学院学报:自然科学版, 2011, 20(2): 90-92.
- [6] MAITI B, RAGHUNATH P, KARUNASAGAR I, et al. Typing of clinical and environmental strains of *Aeromonas* spp. using two PCR based methods and whole cell protein analysis[J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 78(3): 312-318.
- [7] van BELKUM A, KLUYTMANS J, van LEEUWEN W, et al. Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1995, 33(6): 1537-1547.
- [8] FIGUERAS M J, GUARRO J, MARTINEZ-MURCIA A. Use of restriction fragment length polymorphism of the PCR amplified 16S rRNA gene for their identification of *Aeromonas* spp. [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(5): 2023-2025.
- [9] BRIAN M J, VAN R, TOWNSEND I, et al. Evaluation of

- the molecular epidemiology of an outbreak of multiply resistant *Shigella sonnei* in a Day-care center by using Pulsed-Field gel electrophoresis and plasmid DNA analysis [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1993, 31 (8): 2152 – 2156.
- [10] 卢强, 任瑞文, 胡岩, 等. 嗜水气单胞菌的随机扩增多态 DNA 分型[J]. *中国兽医学报*, 2002, 22(1): 34 – 36.
- [11] 杨五名, 李爱华, 刘金玉, 等. 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[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(4): 745 – 748.
- [12] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 9 – 42.
- [13] 伍晓锋, 黎毅敏, 卓超, 等. 18 株铜绿假单胞菌的耐药谱和 ERIC-PCR 分型[J]. *中国抗生素杂志*, 2007, 32(9): 560 – 563.
- [14] 郭闯, 王永坤, 袁锦屏, 等. 嗜水气单胞菌研究进展[J]. *水产科学*, 2003, 22(6): 48 – 51.
- [15] SWAMINATHAN B, BARRETT T J, HUNTER S B, et al. PulseNet: the molecular sub-typing network for food borne bacterial disease surveillance, United States [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2001, 7(3): 382.
- [16] AGUILERA-ARREOLA M G, HERNANDEZ-RODRIGUEZ C, ZUNIGA G, et al. *Aeromonas hydrophila* clinical and environmental ecotypes as revealed by genetic diversity and virulence genes [J]. *Fems Microbiology Letters*, 2005, 242 (2): 231 – 240.
- [17] 肖丹, 曹海鹏, 胡鲲, 等. 淡水养殖动物致病性嗜水气单胞菌 ERIC-PCR 分型与耐药性[J]. *中国水产科学*, 2011, 18(5): 1092 – 1099.
- [18] 王春瑞. 嗜水气单胞菌的分子流行病学调查及其两种分型方法的研究[D]. 宁波: 宁波大学, 2011: 1 – 57.
- [19] 曹波, 杨红, 许华强, 等. 基于 16S rRNA 技术的长江口微生物分子生物学鉴定与分析[J]. *上海海洋大学学报*, 2011, 20(2): 191 – 197.

Characterization of the diversity of *Aeromonas hydrophila* field isolates by using of ERIC-PCR

YE Shi-yao^{1,2}, LIANG Li-guo², XIE Jun²

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, Jiangsu, China)

Abstract: In the experiment, enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC-PCR) was used to analyze the typing of the 105 strains of *Aeromonas hydrophila* collected from freshwater aquaculture area in Jiangsu, Henan, and Fujian. The genotyping technique was used to apply in the epidemiological investigation of the strains and evaluate the relationship of the genotype, regional distribution and the ecological niches. Electrophoresis prints was analysed by using Quantity one 4.6 and used UPGMA to make a tree plot to analyse hereditary character. 28 special genotypes were identified from the 105 isolates. Genotype XV was the dominant genotype, consisting of 20 strains, whereas genotypes IV, XI, XXI, XXV, XXVI, XXVII and XXVIII contained only one strain. There is a tendency that the strains from the same geographic area or ecological niches could be clustered into one group. In addition, *A. hydrophila* from different regions and ecological niches might get together for the same genotype. The results suggest that there is likely some relevance between the genotype and ecological niche among *A. hydrophila* strains.

Key words: *Aeromonas hydrophila*; ERIC-PCR; ecological niche