

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240909006

基于 16S rRNA 测序技术分析桶装水中野生铜绿假单胞菌的系统发育

徐 越^{1,2*}, 王芳妹^{1,2}, 李 政¹, 洪振柏^{1,2}, 林 丹^{1,2}

(1. 湖南省产商品质量检验研究院, 长沙 410007; 2. 食品安全监测与预警湖南省重点实验室, 长沙 410007)

摘 要: **目的** 以铜绿假单胞菌 16S rRNA 为研究对象, 利用 16S rRNA 测序分析技术构建系统发育树, 研究湖南省内 28 株野生水源性铜绿假单胞菌的系统发育。**方法** 收集 28 株野生阳性铜绿假单胞菌, 利用 27F/1492R 通用引物进行 16S rRNA PCR 扩增, 将胶回收产物进行测序, 测序结果利用 MEGA 11.0 构建系统发育树, 并进行遗传距离计算。**结果** 28 株铜绿假单胞菌可分为 3 支, 一株来源于永州的菌株单独为一支, 3 株分别来源于常德、永州、郴州的菌株聚为一支, 其余 24 株聚为一支; 28 株铜绿假单胞菌平均遗传距离为 0.0064。**结论** 28 株野生铜绿假单胞菌之间具有高度同源性, 通过实验进一步完善了水源性铜绿假单胞菌溯源数据库, 为桶装水铜绿假单胞菌污染源监测提供了理论依据。

关键词: 铜绿假单胞菌; 16S rRNA; 系统发育树

Phylogenetic analysis of wild *Pseudomonas aeruginosa* in bottled water based on the 16S rRNA sequencing technology

XU Yue^{1,2*}, WANG Fang-Mei^{1,2}, LI Zheng¹, HONG Zhen-Bai^{1,2}, LIN Dan^{1,2}

(1. Hunan Provincial Institute of Product and Commodity Goods Quality Inspection, Changsha 410007, China;

2. Hunan Provincial Key Laboratory of Food Safety Monitoring and Early Warning, Changsha 410007, China)

ABSTRACT: Objective To study the phylogeny of 28 wild water source *Pseudomonas aeruginosa* strains in Hunan Province, a phylogenetic tree was constructed using 16S rRNA sequencing analysis technology, with *Pseudomonas aeruginosa* 16S rRNA as the research object. **Methods** Twenty-eight wild-type *Pseudomonas aeruginosa* strains were collected and amplified using 27F/1492R universal primers for 16S rRNA. The PCR products obtained from the gels were sequenced. The phylogenetic tree was constructed using MEGA 11.0 and the genetic distance was calculated. **Results** The 28 strains of *Pseudomonas aeruginosa* could be divided into three branches, one strain from Yongzhou was a single strain, three strains from Changde, Yongzhou and Chenzhou were combined into one strain, and the other 24 strains were combined into one strain. The average genetic distance of 28 *Pseudomonas aeruginosa* strains was 0.0064. **Conclusion** There is a high degree of homology between 28 wild *Pseudomonas aeruginosa* strains. The traceability database of waterborne *Pseudomonas aeruginosa* is further

基金项目: 湖南省产商品质量检验研究院科研资助计划项目(Y2023N03)、湖南省自然科学基金一部门联合基金项目(2024JJ8244)

Fund: Supported by the Research Support Program of Hunan Provincial Institute of Product and Commodity Goods Quality Inspection (Y2023N03), and the Natural Science Foundation of Hunan Province-Department Joint Fund Project (2024JJ8244)

***通信作者:** 徐越, 工程师, 主要研究方向为食品及食品相关微生物检测。E-mail: xuyuexy199@163.com

***Corresponding author:** XU Yue, Engineer, Hunan Provincial Institute of Product and Commodity Goods Quality Inspection, 189 Xinjian West Road, Changsha 410007, China. E-mail: xuyuexy199@163.com

improved by the experiments and the theoretical basis for monitoring the source of *Pseudomonas aeruginosa* contamination in bottled water has been provided.

KEY WORDS: *Pseudomonas aeruginosa*; 16S rRNA; phylogenetic tree

0 引言

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)属于革兰氏阴性菌, 又称绿脓杆菌, 是一种专性需氧菌, 能够适应和定殖于不同的生态环境中, 其中包括土壤、湿地、空气、河水、动植物体表和体内等^[1-4]。同时其作为一种机会性人类病原体, 在临床中与多种危及生命的急性和慢性感染相关, 当人体的免疫力下降时, 会造成人体感染^[5-6], 包括肺炎、囊性纤维化、败血症、呼吸道和尿道感染等^[7-9]。

近年来, 随着经济水平的发展, 人们对于饮用水的安全意识日益提高, 包装饮用水中铜绿假单胞菌的污染情况受到越来越高的重视, 包括广东省、安徽省、浙江省和湖南省等市场监管总局均对包装饮用水进行了专项抽检, 其中铜绿假单胞菌的检出率很高, 部分地区甚至可达到 10%^[10-13], 这给广大的消费者带来了健康隐患。

在世界卫生组织(World Health Organization, WHO)发布的第四版《饮用水水质指南》中铜绿假单胞菌被认定为水污染的致病性指示菌。GB 19298—2014《食品安全国家标准 包装饮用水》和 GB 8537—2018《食品安全国家标准 饮用天然矿泉水》均对铜绿假单胞菌作出“ $n=5$, $c=0$, $m=0$ ”的限量要求, 即抽检 5 份样品, 每一份均不得检出铜绿假单胞菌。

16S rDNA 是细菌基因组上编码 16S rRNA 的基因序列, 存在于所有细菌基因组中^[14-16], 由于其在进化过程中高度保守, 又具有相对的独特性, 随着核酸测序技术的发展, 通过 16S rRNA 基因的序列测定, 从分子遗传进化和分子水平上对细菌进行鉴定, 已得到越来越广泛的应用^[17-21]。最新版的《伯杰氏细菌系统分类学手册》就参考 16S rRNA 序列, 不再是依据类型, 而是以系统进化框架为基础进行细菌分类和命名。一些研究人员对不同地理种群栖稻假单胞菌进行 16S rRNA 基因序列分析, 发现大部分栖稻假单胞菌可根据 16S rRNA 基因序列鉴别不同地理种群株^[22]。

本研究通过测定湖南省内水源性铜绿假单胞菌 16S rRNA 基因序列, 在分子生物学水平上对水源性铜绿假单胞菌进行系统发育分析, 研究湖南省各市区包装饮用水中典型铜绿假单胞菌菌株, 积累铜绿假单胞菌 16S rRNA 基因序列, 旨在为建立具有湖南特色的水源性铜绿假单胞菌种资源库奠定基础。以期监管部门防控桶装水中铜绿假单胞菌污染及溯源提供支持, 从而有利于提高湖南省地区包装饮用水的安全生产水平。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌株: 28 株菌株来源于 2021 年度至 2023 年度实验室通过 GB 8538—2016《食品安全国家标准 饮用天然矿泉水检验方法》和 GB 8538—2022《食品安全国家标准 饮用天然矿泉水检验方法》检测包装饮用水分离保存的阳性菌株(表 1)。并经 VITEK 2 COMPACT30 全自动微生物鉴定仪和实时荧光定量 PCR 方法确认。

革兰氏阴性菌鉴定卡(法国生物梅里埃公司); PCR Master Mix、DNA Marker、胶回收试剂盒(大连宝生物工程技术有限公司); 琼脂糖、4S Red Plus 核酸染色剂、Tris-硼酸-EDTA 缓冲液(Tris-borate-EDTA buffer, TBE)(上海生工生物工程股份有限公司); 细菌基因组提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司); 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

表 1 铜绿假单胞菌菌株来源信息
Table 1 Sources of strains of *Pseudomonas aeruginosa*

序号	菌株编号	菌株来源	序号	菌株编号	菌株来源
1	Pae-2101	邵阳	15	Pae-2211	郴州
2	Pae-2102	怀化	16	Pae-2301	衡阳
3	Pae-2103	湘西	17	Pae-2302	永州
4	Pae-2104	常德	18	Pae-2303	邵阳
5	Pae-2201	永州	19	Pae-2304	郴州
6	Pae-2202	湘潭	20	Pae-2305	常德
7	Pae-2203	岳阳	21	Pae-2306	永州
8	Pae-2204	张家界	22	Pae-2307	湘潭
9	Pae-2205	怀化	23	Pae-2308	张家界
10	Pae-2206	郴州	24	Pae-2309	怀化
11	Pae-2207	永州	25	Pae-2310	衡阳
12	Pae-2208	常德	26	Pae-2311	常德
13	Pae-2209	郴州	27	Pae-2312	邵阳
14	Pae-2210	郴州	28	Pae-2313	永州

1.2 仪器与设备

VITEK 2 COMPACT30 全自动微生物鉴定仪(法国生物梅里埃公司); C1000 Touch 梯度 PCR 仪、ChemiDoc XRS+凝胶成像系统(美国伯乐公司); DYCP-31DN 琼脂糖水平电泳仪(北京六一生物科技有限公司); Fresco 17 冷冻离心机(美国赛默飞世尔科技公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株培养及鉴定

将保存于超低温培养箱中的 28 株铜绿假单胞菌磁珠取出, 在脑心浸出液肉汤(brain heart infusion broth, BHI)中 36 °C 培养 24 h, 然后在营养琼脂上平板划线, 36 °C 培养 24 h, 挑取单菌落利用 VITEK 2 COMPACT30 全自动微生物鉴定仪进行菌种鉴定。

1.3.2 PCR 扩增

利用北京天根的细菌基因组提取试剂盒提取 28 株阳性铜绿假单胞菌 DNA, DNA 采用细菌 16SrRNA 通用引物 27F/1492R 进行扩增, 扩增引物为 27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', 1492R: 5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 扩增体系为 DNA 模板 2 μL、上下游引物各 0.5 μL、EmeraldAmp PCR Master Mix (2X Premix) 10 μL、dH₂O 7 μL。PCR 反应条件为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 共 40 个循环; 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。

1.3.3 琼脂糖凝胶电泳及胶回收

称取 0.75 g 琼脂糖配制 50 mL 琼脂糖凝胶, 利用 4S Red Plus 核酸染色剂进行染色, 然后检测 PCR 扩增产物, 目标片段大小约为 1500 bp。电泳结束后, 根据 DNA Marker 指示, 将 1500 bp 附近产物利用胶回收试剂盒进行回收, 回收产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进

行测序。

1.4 数据处理

胶回收产物的基因测序结果利用基于局部比对算法的搜索工具(basic local alignment search tool, BLAST)进行序列比对及系统发育分析, 利用 MEGA 11.0 软件通过邻接距离矩阵法进行系统发育树的构建。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果及分析

28 株阳性铜绿假单胞菌 DNA 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳结果如图 1 所示, 大约在 1500 bp 处出现明亮的单一一条带, 符合预期结果。将双向测序得到的 16S rRNA 序列进行相互拼接, 以 2 段波峰独立不交互为准, 得到有效的序列进行下一步分析。部分测序序列波峰图如图 2。

2.2 铜绿假单胞菌 16S rRNA 基因系统发育树构建

通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)中 BLAST 比对胶回收产物的基因序列, 发现比对结果均在 99.7% 以上, 进一步说明 28 株阳性菌均为铜绿假单胞菌。利用 28 株铜绿假单胞菌 16S rRNA 测序序列构建系统发育树(图 3), 从系统发育树中可以看到: 28 株野生铜绿假单胞菌主要聚集在 3 个不

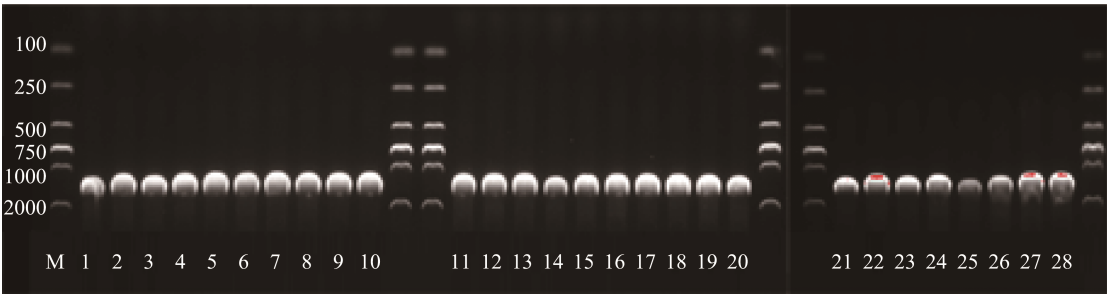


图 1 铜绿假单胞菌 16S rRNA 序列的 PCR 扩增结果
Fig.1 Results of PCR amplification of the 16S rRNA sequence of *Pseudomonas aeruginosa*

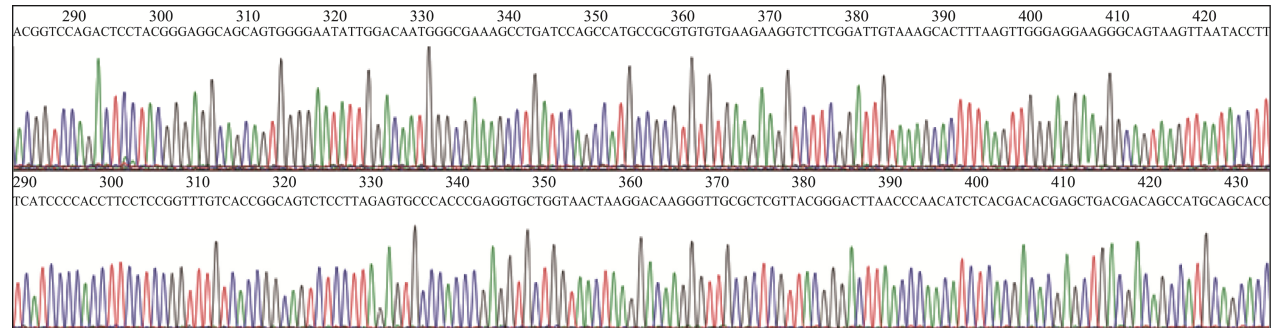


图 2 部分序列测序波峰图
Fig.2 Partial sequence sequencing peak map

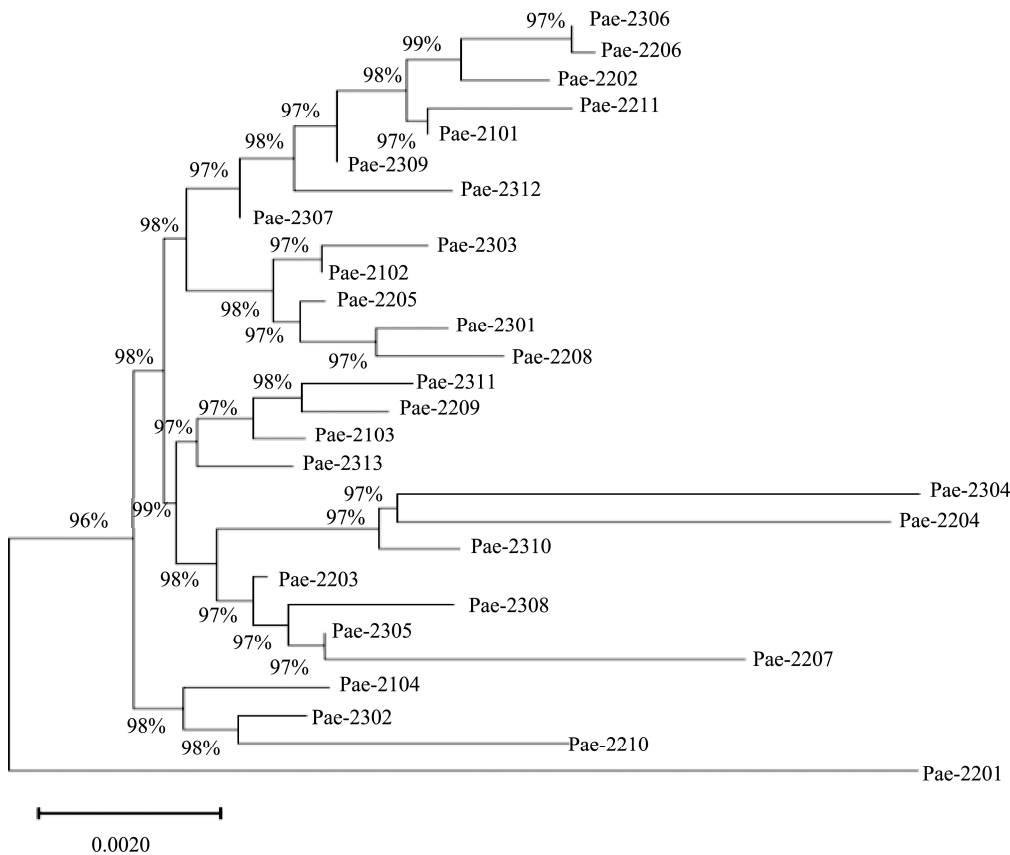


图 3 铜绿假单胞菌 16S rRNA 系统发育树
Fig.3 16S rRNA phylogenetic tree of *Pseudomonas aeruginosa*

同分支, 其中 Pac-2201 单独聚为一支, Pac-2104、Pac-2302、Pac-2210 聚为一支, 其余 24 株聚为一支。结合菌株来源信息, Pac-2201 来源于永州, Pac-2104、Pac-2302、Pac-2210 分别来源于常德、永州、郴州, 说明 28 株水源性铜绿假单胞菌的亲缘远近与地域来源无关。

2.3 遗传距离

利用 MEGA 11.0 软件计算 28 株铜绿假单胞菌的遗传距离(图 4), 28 株铜绿假单胞菌的遗传距离在 0~0.0205, 平均遗传距离为 0.0064。其中 Pac-2201 和 Pac-2304 的遗传距离最远, 达到 0.0205。遗传距离在 0~0.005 范围内占比

	Pac-2313	Pac-2312	Pac-2311	Pac-2310	Pac-2309	Pac-2308	Pac-2307	Pac-2306	Pac-2305	Pac-2304	Pac-2303	Pac-2302	Pac-2301	Pac-2211	Pac-2210	Pac-2209	Pac-2208	Pac-2207	Pac-2206	Pac-2205	Pac-2204	Pac-2203	Pac-2202	Pac-2201	Pac-2104	Pac-2103	Pac-2102
Pac-2313																											
Pac-2312	0.0045																										
Pac-2311	0.0045	0.0089																									
Pac-2310	0.0045	0.0111	0.0067																								
Pac-2309	0.0000	0.0000	0.0022	0.0022																							
Pac-2308	0.0045	0.0045	0.0067	0.0045	0.0022																						
Pac-2307	0.0022	0.0022	0.0022	0.0022	0.0000	0.0045																					
Pac-2306	0.0022	0.0045	0.0089	0.0089	0.0000	0.0067	0.0022																				
Pac-2305	0.0022	0.0045	0.0045	0.0045	0.0022	0.0022	0.0022	0.0044																			
Pac-2304	0.0090	0.0135	0.0112	0.0067	0.0090	0.0090	0.0135	0.0090	0.0112																		
Pac-2303	0.0045	0.0044	0.0067	0.0089	0.0022	0.0067	0.0022	0.0067	0.0045	0.0112																	
Pac-2302	0.0045	0.0044	0.0044	0.0067	0.0022	0.0045	0.0022	0.0089	0.0045	0.0112	0.0044																
Pac-2301	0.0045	0.0067	0.0067	0.0067	0.0022	0.0067	0.0022	0.0067	0.0045	0.0112	0.0044	0.0067															
Pac-2211	0.0022	0.0089	0.0089	0.0111	0.0000	0.0089	0.0022	0.0045	0.0045	0.0135	0.0089	0.0089	0.0045														
Pac-2210	0.0067	0.0089	0.0067	0.0089	0.0045	0.0089	0.0045	0.0112	0.0067	0.0135	0.0067	0.0044	0.0089	0.0112													
Pac-2209	0.0022	0.0089	0.0022	0.0067	0.0022	0.0067	0.0022	0.0067	0.0022	0.0112	0.0067	0.0044	0.0067	0.0089	0.0067												
Pac-2208	0.0067	0.0067	0.0067	0.0067	0.0045	0.0067	0.0045	0.0089	0.0067	0.0112	0.0045	0.0067	0.0022	0.0045	0.0089	0.0067											
Pac-2207	0.0068	0.0067	0.0112	0.0112	0.0067	0.0067	0.0045	0.0090	0.0045	0.0157	0.0089	0.0089	0.0089	0.0090	0.0135	0.0112	0.0067										
Pac-2206	0.0022	0.0045	0.0089	0.0089	0.0000	0.0089	0.0022	0.0000	0.0045	0.0157	0.0067	0.0089	0.0067	0.0022	0.0112	0.0089	0.0067	0.0112									
Pac-2205	0.0022	0.0045	0.0022	0.0045	0.0022	0.0067	0.0022	0.0045	0.0022	0.0112	0.0022	0.0045	0.0022	0.0045	0.0067	0.0022	0.0022	0.0089	0.0067								
Pac-2204	0.0090	0.0134	0.0112	0.0067	0.0090	0.0089	0.0090	0.0135	0.0090	0.0112	0.0112	0.0112	0.0135	0.0134	0.0112	0.0089	0.0135	0.0137	0.0112								
Pac-2203	0.0022	0.0022	0.0045	0.0022	0.0000	0.0022	0.0022	0.0045	0.0000	0.0090	0.0045	0.0022	0.0067	0.0067	0.0045	0.0045	0.0067	0.0045	0.0045	0.0089							
Pac-2202	0.0022	0.0045	0.0089	0.0089	0.0000	0.0067	0.0022	0.0022	0.0044	0.0135	0.0067	0.0089	0.0067	0.0045	0.0112	0.0067	0.0089	0.0090	0.0022	0.0045	0.0135	0.0045					
Pac-2201	0.0136	0.0136	0.0136	0.0136	0.0136	0.0159	0.0136	0.0136	0.0136	0.0205	0.0136	0.0136	0.0136	0.0159	0.0136	0.0159	0.0136	0.0136	0.0182	0.0136	0.0136						
Pac-2104	0.0045	0.0067	0.0044	0.0067	0.0022	0.0045	0.0022	0.0089	0.0045	0.0112	0.0067	0.0022	0.0067	0.0089	0.0067	0.0044	0.0067	0.0089	0.0045	0.0112	0.0022	0.0089	0.0136				
Pac-2103	0.0022	0.0067	0.0022	0.0022	0.0022	0.0045	0.0022	0.0067	0.0022	0.0090	0.0045	0.0045	0.0067	0.0067	0.0022	0.0045	0.0112	0.0089	0.0022	0.0089	0.0022	0.0067	0.0136	0.0045			
Pac-2102	0.0022	0.0022	0.0022	0.0022	0.0022	0.0045	0.0022	0.0045	0.0022	0.0090	0.0000	0.0022	0.0000	0.0022	0.0045	0.0022	0.0067	0.0045	0.0000	0.0089	0.0022	0.0045	0.0136	0.0022	0.0022		
Pac-2101	0.0000	0.0000	0.0045	0.0045	0.0000	0.0045	0.0000	0.0000	0.0022	0.0113	0.0022	0.0045	0.0022	0.0000	0.0067	0.0045	0.0045	0.0067	0.0000	0.0022	0.0112	0.0022	0.0000	0.0136	0.0045	0.0045	0.0022

图 4 基于铜绿假单胞菌 16S rRNA 序列遗传距离矩阵
Fig.4 Genetic distance matrix of *Pseudomonas aeruginosa* based on 16S rRNA sequences

48.7%, 0.005~0.015 占比 48.9%, 0.015~0.025 占比 2.4%, 说明 28 株野生铜绿假单胞菌同源性很高, 未出现明显进化。

3 讨论与结论

铜绿假单胞菌作为一种机会致病菌, 不仅会造成局部性的损伤, 如呼吸道感染、尿路感染等, 还可以造成全身性的疾病, 例如菌血症、败血症等^[23]。本研究收集了 28 株野生铜绿假单胞菌, 主要从 2021 年至 2023 年湖南省监督抽查的包装饮用水中分离得到, 利用 16S rRNA 基因构建系统发育树研究 28 株野生阳性菌的系统发育。

16S rRNA 基因长度约 1500 bp, 序列长度较为适中, 其包含 9 个保守区以及 9 个可变区, 可变区的变异程度与细菌进化水平息息相关, 同时 16S rRNA 广泛存在于所有细菌中, 是研究细菌进化的有效靶标^[24]。16S rRNA 在细菌的漫长进化史中, 由于其特殊的构成, 使其具有高度的保守性, 细菌保守性对于研究细菌间的亲缘关系尤为重要, 因此选择 16S rRNA 构建系统发育树。同时 16S rRNA 具有特定可变区, 可以通过可变区碱基的不同区分不同的种、属^[25-26]。

系统发育反映的是某个物种的演化历史, 而系统发育树是用图形表示上述演化历史, 记录物种之间的相互关系^[27-29]。进化树是由一系列的节点和分支组成, 末端节点代表研究的物种或者基因, 内部节点是指推断的共同祖先, 节点之间通过分支相连接^[30]。系统发育树可以分为有根树和无根树, 有根树指所有的节点有共同的祖先, 能够反映节点形成顺序, 而无根树只能反映物种间的相互关系^[31-34]。

本研究中, 28 株野生阳性铜绿假单胞菌之间具有高度同源性, 平均遗传距离仅为 0.0064, 主要聚集在 3 个不同的分支, 其中 Pac-2201 单独聚为一支, Pac-2104、Pac-2302、Pac-2210 聚为一支, 其余 24 株聚为一支。但是结合菌株来源研究发现, 系统发育树的分支与菌株的地缘没有明显关系, 表明地域差异不是导致铜绿假单胞菌发育进化不同的原因, 其具体原因有待进一步研究发现。

参考文献

- [1] MORIN CD, DEZIEL E, GAUTHIER J, *et al.* An organ system-based synopsis of *Pseudomonas aeruginosa* virulence [J]. Virulence, 2021, 12(1): 1469–1507.
- [2] YAO Z, ZHOU X, JIN T, *et al.* Remediation of phenanthrene contaminated soil by persulphate coupled with *Pseudomonas aeruginosa* GZ7 based on oxidation prediction model [J]. Environ Sci Pollut R, 2024, 31(31): 44415–44430.
- [3] HAYASHI S, UMEZAWA K, TSUZUKIBASHI O, *et al.* Study on distribution of four *Pseudomonas* species in living environment using multiplex PCR [J]. Open J Stomatol, 2024, 14(2): 77–86.
- [4] FARHAN MB, ALI HA. The effect of treated sulfur water on the

- microbial content of the soil and the extent of resistance of these bacteria to antibiotics [J]. IOP Pub Ltd, 2023, 1222(1): 012046.
- [5] HAENNI M, HOCQUET D, PONSIN C, *et al.* Population structure and antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* from animal infections in France [J]. BMC Vet Res, 2015, 11: 9.
 - [6] ZHENG C, WANG G, QIU L, *et al.* Clinical characteristics, risk factors, and outcomes of patients with polymicrobial *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections [J]. J Chin Med Assoc, 2023, 86(12): 1066–1073.
 - [7] TASHIRO Y, YAWATA Y, TOYOFUKU M, *et al.* Interspecies interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and other microorganisms [J]. Microb Environ, 2013, 28(1): 13–24.
 - [8] BREEN SKJ, HARPER M, LÓPEZ-CAUSAPÉ C, *et al.* Synergistic effects of inhaled aztreonam plus tobramycin on hypermutable cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a dynamic biofilm model evaluated by mechanism-based modelling and whole genome sequencing [J]. Int J Antimicrob Ag, 2024, 63(6): 107161.
 - [9] HUSSEINI NE, MEKONNEN SA, CHERISSE L, *et al.* Characterization of the entner-doudoroff pathway in *Pseudomonas aeruginosa* catheter-associated urinarytract infections [J]. J Bacteriol, 2024, 206(1): e0036123-e.
 - [10] 黄建锋, 汪新, 刘鹏, 等. 包装饮用水铜绿假单胞菌污染情况调查分析[J]. 食品工业, 2018(1): 232–233.
HUANG JF, WANG X, LIU P, *et al.* The analysis of *Pseudomonas aeruginosa* in packaged drinking water [J]. Food Ind, 2018(1): 232–233.
 - [11] 许宇振, 赵成仕. 安徽省包装饮用水和饮用天然矿泉水中铜绿假单胞菌的污染情况分析[J]. 食品安全导刊, 2020(27): 124–126.
XU YZ, ZHAO CS. Analysis on contamination of *Pseudomonas aeruginosa* in packaged drinking water and natural mineral water in Anhui province [J]. China Food Saf Magaz, 2020(27): 124–126.
 - [12] 杨俊业, 黄玲玲. 2018 年广东省市售 275 份包装饮用水及天然矿泉水铜绿假单胞菌污染情况分析 & 检测[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(7): 1853–1856.
YANG JY, HUANG LL. Analysis and detection of *Pseudomonas aeruginosa* contamination in 275 packaged drinking water and natural mineral water in Guangdong in 2018 [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(7): 1853–1856.
 - [13] 张丽, 汪霞丽, 蒋昊, 等. 湖南省包装饮用水铜绿假单胞菌风险控制[J]. 食品安全导刊, 2024(4): 34–36.
ZHANG L, WANG XL, JIANG H, *et al.* Risk prevention and control of *Pseudomonas aeruginosa* in packaged drinking water in Hunan Province [J]. China Food Saf Magaz, 2024(4): 34–36.
 - [14] MOLANO LAG, VEGA-ABELLANEDA S, MANICHANH C. GSR-DB: A manually curated and optimized taxonomical database for 16S rRNA amplicon analysis [J]. MSystems, 2024, 9(2): e00950–23.
 - [15] CALLICOTT KA, STERN NJ, HIETT KL. Isolation of DNA for PCR assays from noncultivable campylobacter jejuni isolates [J]. Pou Sci, 2005, 84(10): 1530–1532.
 - [16] GÜNTHER B, MARRE S, DEFOIS C, *et al.* Capture by hybridization for full-length barcode-based eukaryotic and prokaryotic biodiversity inventories of deep sea ecosystems [J]. Mol Ecol Resour, 2022(2): 22.
 - [17] LI MN, WANG T, WANG N, *et al.* A detailed analysis of 16S rRNA gene sequencing and conventional PCR-based testing for the diagnosis of bacterial pathogens and discovery of novel bacteria [J]. Anton Leeuw,

- 2024, 117(1): 1–15.
- [18] DENAY G, PRECKEL L, PETERSEN ABNC. Benchmarking and validation of a bioinformatics workflow for meat species identification using 16S rDNA metabarcoding [J]. *Foods*, 2023, 12(5): 968.
- [19] HOU X, WANG Y, CUIZHI LI, *et al.* Establishment of molecular biological method for identification of bacteria by 16S rDNA and *gyrB* gene [J]. *Asia Agric Res*, 2023, 15(4): 21–25.
- [20] ANA B, IVANA B, SANDRA VMSAJKNZ. Comparison of MALDI-TOF mass spectrometry and 16S rDNA sequencing for identification of environmental bacteria: A case study of cave mussel-associated culturable microorganisms [J]. *Environ Sci Pollut R*, 2024, 31(14): 21752–21764.
- [21] 黄蓬英, 罗莹, 曾琪, 等. 基于 COI 和 16S rRNA 基因序列的鱼胶基原鱼种 DNA 条形码鉴定[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, 15(9): 69–77. HUANG PY, LUO Y, ZENG Q, *et al.* DNA Barcoding identification on original species of isinglass through COI and 16S rRNA sequences [J]. *J Food Saf Qual*, 2024, 15(9): 69–77.
- [22] 吴至成, 伍丽娟, 李丽花, 等. 不同地理种群栖假单胞菌株的 16S rRNA 基因序列分析[J]. *中国热带医学*, 2012, 12(12): 4. WU ZC, WU LX, LI LH, *et al.* Phylogenetic analysis of *Pseudomonas oryzihabitans* of different geographical populations based on partial sequences of 16S rRNA gene [J]. *China Trop Med*, 2012, 12(12): 4.
- [23] STOVER CK, PHAM XQT, ERWIN AL, *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen [J]. *Nature*, 2000, 406(6799): 959–964.
- [24] 杨霞, 陈陆, 王川庆. 16S rRNA 基因序列分析技术在细菌分类中应用的研究进展[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2008, 36(2): 6. YANG X, CHEN L, WANG CQ. Advance in application of 16S rRNA gene in bacteriology [J]. *J Northwest Agric Forest Univ (Nat Sci Ed)*, 2008, 36(2): 6.
- [25] YVES VDP, SABINE C, RUPERT DW. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA [J]. *Nucl Acid Res*, 1996(17): 3381.
- [26] OYARZABAL O, WESLEY TV, TUCKER LS, *et al.* *Campylobacter fetus* by PCR targeting variable regions of the 16s rDNA [J]. *Vet Microbiol*, 2022, 58(1): 61–71.
- [27] VANITHA T, PRATIKSHA B, HEMALATA MS, *et al.* The phylogenetic tree of the ‘Nod D’ host-specific factor is incongruent with the rhizobial species tree and shows a possible hgt event between highly unrelated rhizobial bacteria [J]. *Int J Eng Tech Mgmt Sci*, 2023, 3(7): 840–848.
- [28] FRY M. The discovery of archaea: From observed anomaly to consequential restructuring of the phylogenetic tree [J]. *Hist Phil Life Sci*, 2024, 46(2): 16.
- [29] ZHANG L, BASS HW, MALLORY IX. Integrating SNVs and CNAs on a phylogenetic tree from single-cell DNA sequencing data [J]. *Genome Res*, 2023, 33(11): 2002–2017.
- [30] SAARELA JM, RAI HS, DOYLE JA, *et al.* Hydatellaceae identified as a new branch near the base of the angiosperm phylogenetic tree [J]. *Nature*, 2007, 446(7133): 312–315.
- [31] O’MEARA, BRIAN C. Evolutionary inferences from phylogenies: A review of methods [J]. *Annu Rev Ecol Evol*, 2012, 43(1): 267–285.
- [32] LIU L, YU L, KUBATKO L, *et al.* Coalescent methods for estimating phylogenetic trees [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2009, 53(1): 320–328.
- [33] BOS DH, POSADA D. Using models of nucleotide evolution to build phylogenetic trees [J]. *Dev Comp Immunol*, 2005, 29(3): 211–227.
- [34] ALLMAN ES, DEGNAN JH, RHODES JA. Identifying the rooted species tree from the distribution of unrooted gene trees under the coalescent [J]. *J Math Biol*, 2011, 62(6): 833–862.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)

作者简介



徐 越, 工程师, 主要研究方向为食品及食品相关微生物检测。
E-mail: xuyuey199@163.com