

漳州紫泥围垦区海水中弧菌类群研究

陈明霞¹, 郑计瑞¹, 李和阳^{2*} (1. 华侨大学化工学院, 福建厦门 361021; 2. 国家海洋局第三海洋研究所, 福建厦门 361005)

摘要 [目的]调查紫泥围垦区海水中弧菌类群组成,为相关病害的预防和控制提供有价值的资料。[方法]采用 TCBS(Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose)培养基从紫泥围垦区海水中分离得到 48 株细菌,应用 16S rRNA 基因-RFLP(限制性酶切图谱多样性分析)、16S rRNA 基因序列及系统进化分析方法对 48 个菌株进行分子鉴定。[结果]紫泥围垦区海水弧菌包括 4 个类群,分别为 group 1 - *Vibrio crassostreae*, 占 14.6%; group 2 - *V. atlanticus*, 占 58.3%; group 3 - *V. splendidus*, 占 12.5%; group 4 - *V. lentus*, 占 14.6%。4 类弧菌皆属于 *V. splendidus* 进化分支,能引起虾类、贝类动物的疾病。[结论]该研究明确了特定时间段内紫泥围垦区弧菌为 *V. splendidus* 相关的类群,对于针对性地防控这些弧菌引起的养殖动物疾病具有一定的指导价值。

关键词 海水养殖区;弧菌;弧菌病;TCBS 类群
中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)09-0091-03

Diversity of *Vibrio* spp. in Zini Marine Aquaculture Area, Zhangzhou
CHEN Ming-xia¹, ZHENG Ji-rui¹, LI He-yang² (1. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen, Fujian 361021; 2. Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen, Fujian 361005)

Abstract [Objective] This study aimed to investigate the diversity of *Vibrio* spp. in Zini marine aquaculture area. [Method] 48 strains were isolated from sea water of Zini marine aquaculture area by using TCBS agar plates and pure-cultivated on 2216E agar plates. All strains were identified using the 16S rRNA gene-restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis, 16S rRNA gene sequence determination and phylogenetic analyses. [Result] 48 TCBS strains from Zini marine aquaculture area were classified as 4 *Vibrio* species, which were group 1 - *V. crassostreae* (14.6%), group 2 - *V. atlanticus* (58.3%), group 3 - *V. splendidus* (12.5%), group 4 - *V. lentus* (14.6%). All the strains belong to *V. splendidus* clade, which occupies a lot of species with pathogenic potential for shrimp, crab and shellfish. [Conclusion] The potential pathogens of *Vibrio* in Zini marine aquaculture area are related to *V. splendidus* clade, which is useful for the prevention and control of potential pathogen infections in aquaculture.

Key words Marine aquaculture area; *Vibrio*; Vibriosis; TCBS groups

弧菌作为近海、河口环境中微生物区系的主要成员,广泛分布于自然水域及渔业生物中,是引发人类细菌性疾病的主要病原之一。人们通过饮用不洁水,食用未加工或未加工熟的带有致病弧菌的食物,特别是海产品而感染发病^[1-4]。近年来,海水养殖业的快速发展,加快了海水生境的破坏,养殖环境不断恶化,使养殖动物病害不断发生。弧菌病(Vibriosis)主要是由弧菌属(*Vibrio*)细菌引起的一类细菌性疾病,也是海水养殖动物主要的细菌病害之一。已知海水养殖动物弧菌病病原菌超过 20 种,危害到鱼类、贝类及甲壳类中各种养殖动物,不仅给养殖业造成巨大的经济损失^[5],而且导致野生海水动物大量死亡,进而导致食用人员肠道疾病或食物中毒。弧菌病相关病原的研究已经成为养殖病害及养殖环境治理的主要研究领域之一。

福建省漳州龙海市东北部的紫泥镇,地处福建省第二大河九龙江出海口,属于咸淡水交汇处,水质较好,水产养殖发达。紫泥围垦区是其中重要的海水养殖区域,同样存在着养殖环境恶化及水产致病菌严重等问题。笔者采用传统的 TCBS 培养基分离筛选菌株及分子鉴定方法,对该养殖区域的弧菌类群进行分析,探讨该养殖区潜在的弧菌病病原菌种类及其可能的风险。

基金项目 国家自然科学基金项目(41506179);福建省自然科学基金项目(2015J01613);“全球变化与海气相互作用”专项(GASI-03-01-03-01, GASI-03-01-03-02);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(海三科 2016022)。
作者简介 陈明霞(1980—),女,福建惠安人,讲师,博士,从事海洋微生物资源研究。* 通讯作者,副研究员,博士,从事海洋微生物资源研究。
收稿日期 2018-01-17

1 材料与方法

1.1 样品采集 海水样品采集点位于福建漳州龙海紫泥围垦区养殖区域的 01 站位(117.908 916°E, 24.448 861°N), 03 站位(117.906 578°E, 24.449 108°N)和 06 站位(117.907 878°E, 24.446 680°N),样品采集时间为 2011 年 2 月。

1.2 培养基 2216E 和 TCBS 培养基(Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose)参考文献[6]中描述。

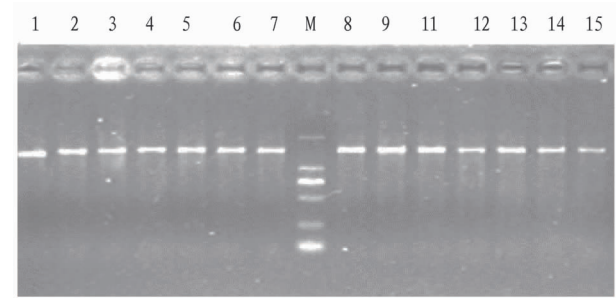
1.3 弧菌的分离培养 将 01、03、06 这 3 个站位的海水样品进行梯度稀释,得到 10⁰、10⁻¹、10⁻² 共 3 个样品梯度,每个梯度分别取 200 μL 于 TCBS 琼脂平板上,涂布均匀,于 25℃ 培养箱培养;每个梯度做 2 个重复。随机挑取分离良好的 48 个菌落接种于 2216E 琼脂平板上,尽可能保证挑取到所有的菌落类型。对所分离的菌株在 2216E 平板上进行 3 次以上纯化,以保证得到纯培养物。

1.4 弧菌的鉴定 对所分离得到的 TCBS 菌株进行 16S rRNA 基因-RFLP 酶切谱型分析,挑选各 RFLP 谱型代表菌,通过 16S rRNA 基因序列比对及系统发育分析进行菌种分子鉴定,16S rRNA 基因的 PCR 扩增及酶切分析方法参考文献[7-8]中描述。菌株 16S rRNA 基因序列由南京金斯特生物技术有限公司测定,所得序列校正后在 EzBioCloud 数据库比对分析并获取相近菌种的 16S rRNA 基因序列。利用 DNAMAN(version 5.1, Lynnon BioSoft)软件进行序列同源性分析及构建 16S rRNA 基因系统进化树。

2 结果与分析

2.1 弧菌 16S rRNA 基因-RFLP 分析 不同样品在 TCBS 培养基上生长的菌落皆属于典型的黄色或绿色,随机挑取 48

个菌落(尽可能包括所有不同菌落类型),纯化后,使用细菌通用引物 27F 和 1492R 对所分离的 48 个菌株进行 16S rRNA 基因-PCR 扩增(图 1),用 *Afa* I 和 *Msp* I 限制性内切酶对 48 个菌株 16S rRNA 基因扩增片段进行双酶切并进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析(RFLP 分析)。结果表明,48 个菌株可分为 6 种不同的 RFLP 分子谱型(I~VI),每种 RFLP 谱型挑出 1 个代表菌株进行 16S rRNA 基因的序列及系统发育学分析。



注:M. DL 2000;1~15. 紫泥围垦区 06 站位菌株编号
Note:M. DL2000;1~15. Strains numbers of station 06 of Zini marine aquaculture area

图 1 部分弧菌菌株 16S rRNA 基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 16S rRNA gene PCR amplification results of some *Vibrio* strains

2.2 弧菌 16S rRNA 基因序列及系统发育学分析 对 6 个代表菌株进行 16S rRNA 基因的序列比对鉴定(表 1)及系统发育分析(图 2),6 个菌株属于 4 种弧菌。I 型代表菌株 JR-5 和 II 型代表菌株 JR-12 属于同一个物种(group 1),与 *V. crassostreae* LGP7^T(大黄鱼弧菌)、*V. celticus* Rd 8.15^T(凯尔特人弧菌)、*V. gigantis* CAIM 25^T(牡蛎弧菌)的 16S rRNA 基因序列相似度皆为 100.00%,无法区分,但从系统发育树上明显可见菌株 JR-5、JR-12 与 *V. crassostreae* LGP7^T 距离更为接近,处在一个小分支上;III 型代表菌株 JR-10 和 IV 型代表菌株 JR-19 属于同一个物种(group 2),与 *V. atlanticus* Vb 11.11^T(大西洋弧菌)、*V. tasmaniensis* LMG 21574^T(塔斯马尼亚弧菌)皆有 99% 以上的同源性,但系统发育树分析显示菌株 JR-10、JR-19 与 *V. atlanticus* Vb 11.11^T 具有更近的亲缘关系;V 型代表菌株 JR-15 与 *V. splendidus* ATCC 33125^T(灿烂弧菌)有 99.85% 的同源性,为 group 3;VI 型代表菌株 JR-20 与 *V. lentus* 40M4^T(缓慢弧菌)有 98.60% 的同源性,为 group 4。不同弧菌类群所占比例不同,group 2 占有 58.3%,具有绝对的优势,其他 3 类比例相当:group 1 和 4 各占 14.6%、group 3 占 12.5%。

3 讨论

紫泥围垦区属于海水养殖区域,盐度相对较高,以 TCBS

表 1 不同 RFLP 谱型代表菌株 16S rRNA 基因序列系统关系分析结果

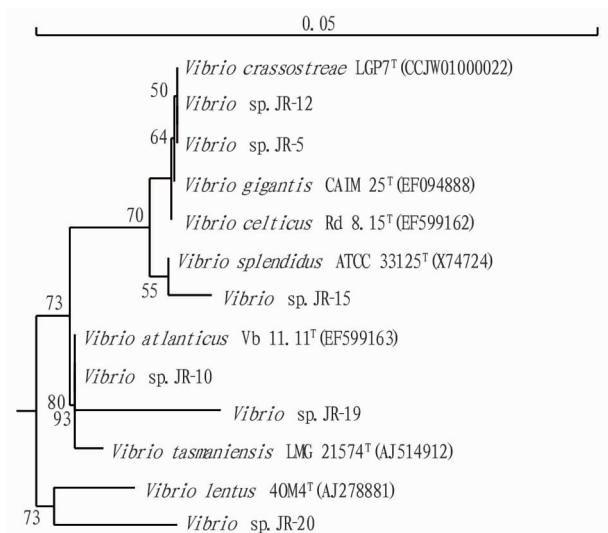
Table 1 Phylogenetic affiliations of 16S rRNA gene sequences of different RFLP type strains

RFLP 分子谱型 RFLP type	菌株 Strains	代表菌株 Representative strain	类别 Group	相似种及登录号 Nearest species and accession number	同源性 Identity//%
I	01 站点:5	JR-5	1	<i>Vibrio crassostreae</i> LGP7(T)	100
II	01 站点:9、11、12 03 站点:3、9、12	JR-12		CCJW01000022, <i>V. celticus</i> Rd 8.15(T) EF599162, <i>V. gigantis</i> CAIM 25(T) EF094888	
III	01 站点:2、4、6、7、10、23、39、47 03 站点:1、2、4、5、6、7、8、10	JR-10	2	<i>V. atlanticus</i> Vb 11.11(T) EF599163, <i>V. tasmaniensis</i> LMG 21574(T) AJ514912	99.84
IV	01 站点:13、16、17、19、22、26、29、30、34、36、37、46	JR-19	—		99.51
V	01 站点:15、18、21、24、35 03 站点:11	JR-15	3	<i>V. splendidus</i> ATCC 33125(T) X74724	99.85
VI	01 站点:8、20、23、27、31、39、47	JR-20	4	<i>V. lentus</i> 40M4(T) AJ278881	98.60

培养基分离获取的菌株 100% 为弧菌,不包含有其他非弧菌 TCBS 类群,该结果与陈明霞等^[6]、李和阳等^[9] 研究结果相符,TCBS 培养类群中弧菌所占的比例与盐度息息相关。
根据 Drancourt 等^[10-11] 提出 16S rRNA 基因序列同源性鉴定规则及相关的系统进化树分析,紫泥围垦区主要的弧菌类群有 4 类,分别为 group 1 - *V. crassostreae*; group 2 - *V. atlanticus*; group 3 - *V. splendidus* 和 group 4 - *V. lentus*。其中 *V. crassostreae* 和 *V. atlanticus* 至少含有 2 种类型的 16S rRNA 基因拷贝,因此具有 2 个的 RFLP 谱型。这 4 类弧菌都属于专性需盐细菌,是海水或咸水养殖水体的重要弧菌成员。

弧菌属包含 100 多个不同物种,分属于 14 个进化分支^[12],紫泥围垦区的 4 种弧菌类群皆属于 *V. splendidus* 进化分支^[13-15]。*V. splendidus* 可引起鱼类、对虾和牡蛎的疾病^[5];

V. crassostreae 于 2004 年分离自生病的长牡蛎(*Crassostrea gigas*)血淋巴^[13],是长牡蛎的条件致病菌^[16]; *V. atlanticus* 最早分离自海湾扇贝(*Ruditapes philippinarum*)^[15],目前并无实例证明该菌属于致病菌^[12],但其近似种 *V. tasmaniensis* 却被报道可以引起柳珊瑚疾病^[17]; *V. lentus* 可引起野生章鱼(*Octopus vulgaris*)疾病^[18],其对养殖生物同样具有严重威胁。
据调查,许多养殖户会自购现成的 TCBS 培养基平板进行弧菌的分离培养,并通过观察菌落的颜色和数量以判断可能潜在的副溶血弧菌(*V. parahemolyticus*)病害危机,这显然并不科学而且经常会背道而驰。该研究明确了特定时间段内紫泥围垦区弧菌的类群组成,即该区域的弧菌主要为 *V. splendidus* 相关种类,对于针对性地防控这些弧菌引起的养殖动物疾病具有一定的指导价值。



注:结点处数字表示 Bootstrap 1 000 次重复检验的自举值(仅显示高于 50% 的数值;括号中为每个 16S rRNA 基因序列的登录号;比例尺代表每 100 bp 5 个碱基替换数

Note: The bootstrap values above 50% from 1 000 replicates are shown. The accession number of each 16S rRNA gene sequence is given in parenthesis. The scale bar represents 5 substitutions per 100 bp

图 2 根据 16S rRNA 基因序列构建的紫泥围垦区海水弧菌代表菌株系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of representative *Vibrio* strains from Zi-ni marine aquaculture area based on bacterial 16S rRNA gene

参考文献

- [1] FARMER J J, JANDA J, BIRKHEAD K. *Vibrio* [M]//MURRAY P, BARON E, JORGENSEN J, et al. Manual of clinical microbiology, 8th ed. Washington, DC: ASM Press, 2003: 706–718.
- [2] JOHNSON C N, BOWERS J C, GRIFFITT K J, et al. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in the coastal and estuarine waters of Louisiana, Maryland, Mississippi, and Washington (United States) [J]. Applied & environmental microbiology, 2012, 78(20): 7249–7257.
- [3] HLADY W G, KLONTZ K C. The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981–1993 [J]. Journal of infectious diseases, 1996, 173(5): 1176–

(上接第 48 页)

时期。此外,该研究仅在玉溪典型烟区开展,研究结果在其他烟区的适用性需进一步验证。该研究为完善烤烟上部叶提质增效技术体系,提高区域烤烟上部叶可用性的实用技术提供理论支撑。

参考文献

- [1] 朱尊权. 提高上部烟叶可用性是促“卷烟上水平”的重要措施[J]. 烟草科技, 2010, 43(6): 5–9, 31.
- [2] 王涛, 贺帆, 徐成龙, 等. 提高烤烟上部叶可用性技术的研究进展[J]. 南方农业学报, 2011, 42(9): 1127–1131.
- [3] 杨磊, 易克, 简永兴, 等. 提高烤烟上部叶可用性研究进展[J]. 作物研究, 2011, 25(1): 71–75.
- [4] 齐群钢, 郭月清, 韩锦峰. 植物激素和无机营养元素对烟草根系内烟碱生物合成调节机理的研究[J]. 河南农业大学学报, 1990, 24(3): 332–339.
- [5] 邹焱, 苏以荣. 打顶及施用植物生长调节剂对烟草内源激素的影响[J]. 烟草科技, 2008(10): 50–52, 57.
- [6] 李代强, 刘朝科, 古力, 等. 不同植物生长调节剂对烤烟上部叶品质及可用性的影响[J]. 江西农业学报, 2013, 25(5): 107–109.

1183.

- [4] 郑经川. 弧菌性腹泻的若干问题[J]. 中国实用内科杂志, 1995, 14(3): 133–135.
- [5] 郑天伦, 王国良, 金珊. 海水养殖动物弧菌病防治的研究进展[J]. 台湾海峡, 2002, 21(3): 372–378.
- [6] 陈明霞, 李和阳, 马云飞, 等. 九龙江口沉积物 TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose) 菌群的分布[J]. 微生物学报, 2012, 52(5): 637–644.
- [7] 陈明霞, 李和阳, 陈维维, 等. 68 株北极产蛋白酶菌株的筛选、鉴定以及部分酶学性质[J]. 微生物学报, 2013, 53(7): 702–709.
- [8] DELONG E F. Archaea in coastal marine environments [J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 1992, 89(12): 5685–5689.
- [9] 李和阳, 陈明霞, 郑天凌, 等. 深圳海域水体和九龙江口沉积物中 TCBS 菌群与弧菌相关性的研究[J]. 台湾海峡, 2011, 30(3): 394–399.
- [10] DRANCOURT M, BOLLET C, CARLIOZ A, et al. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates [J]. Journal of clinical microbiology, 2000, 38(10): 3623–3630.
- [11] DRANCOURT M, BERGER P, RAOULT D. Systematic 16S rRNA gene sequencing of atypical clinical isolates identified 27 new bacterial species associated with humans [J]. Journal of clinical microbiology, 2004, 42(5): 2197–2202.
- [12] ROMALDE J L, DIÉGUEZ A L, LASA A, et al. New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: A review [J]. Frontiers in microbiology, 2013, 4(1): 413.
- [13] FAURY N, SAULNIER D, THOMPSON F L, et al. *Vibrio crassostreae* sp. nov., isolated from the haemolymph of oysters (*Crassostrea gigas*) [J]. International journal of systematic & evolutionary microbiology, 2004, 54(6): 2137–2140.
- [14] LE ROUX F, GAY M, LAMBERT C, et al. Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus*-related strains based on *gyrB* gene sequences [J]. Diseases of aquatic organisms, 2004, 58(2/3): 143–150.
- [15] DIÉGUEZ A L, BEAZ-HIDALGO R, CLEENWERCK I, et al. *Vibrio atlanticus* sp. nov. and *Vibrio artabrorum* sp. nov. isolated from the clams *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus* [J]. International journal of systematic & evolutionary microbiology, 2011, 61(10): 2406–2411.
- [16] BRUTO M, JAMES A, PETTON B, et al. *Vibrio crassostreae*, a benign oyster colonizer turned into a pathogen after plasmid acquisition [J]. The ISME Journal, 2017, 11(4): 1043–1052.
- [17] VATTAKAVEN T, BOND P, BRADLEY G, et al. Differential effects of temperature and starvation on induction of the viable-but-nonculturable state in the coral pathogens *Vibrio shiloi* and *Vibrio tasmaniensis* [J]. Applied & environmental microbiology, 2006, 72(10): 6508–6513.
- [18] FARTO R, ARMADA S P, MONTES M, et al. *Vibrio lentus* associated with diseased wild octopus (*Octopus vulgaris*) [J]. Journal of invertebrate pathology, 2003, 83(2): 149–156.
- [7] 蔡良勇, 王玉川, 常凯, 等. 施用赤霉素对烟叶生长和品质的影响[J]. 作物研究, 2012, 26(5): 496–499.
- [8] 张映翠, 胡小东. 外源赤霉素对滇中旱区烤烟生长和产质量的影响[J]. 云南农业科技, 2012(5): 25–26.
- [9] 戴冕. 戴冕烟草科技论文选集 [M]. 广州: 广东科技出版社, 1996: 62–70.
- [10] 史金钟, 赵东方, 尚现超, 等. 外源赤霉素对旱区烤烟叶片生长和品质的影响[J]. 中国农学通报, 2007, 23(5): 221–225.
- [11] 张学伟, 张玺, 余金恒, 等. 植物生长物质对烤烟上部叶香味品质的影响[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(6): 660–663.
- [12] 罗定棋, 张永辉, 谢强, 等. 赤霉素在烤烟栽培上的应用研究[J]. 耕作与栽培, 2010(2): 5–6.
- [13] 刘芳, 李永忠, 王国松, 等. 不同植物生长调节剂对烤烟上部叶质量的影响[J]. 广西农业科学, 2005, 36(4): 303–305.
- [14] 肖遂, 周冀衡, 何伟, 等. GA 施用方式对烤烟主要产质量指标的影响[J]. 作物研究, 2009, 23(3): 184–187.
- [15] 李健忠, 薛立新, 朱金峰, 等. 赤霉素和茶乙酸互作对烤烟生长、碳氮代谢及烟叶品质的影响[J]. 植物生理学报, 2015, 51(9): 1473–1481.
- [16] 付鑫钟, 任竹, 李小玲, 等. 赤霉素对烟叶生理特性及产量和质量的影响[J]. 广东农业科学, 2006(6): 23–25.
- [17] 李浩亮, 史金钟, 何登峰, 等. 外源赤霉素对烤烟叶片生长和品质的影响[J]. 河南农业科学, 2006, 35(4): 51–54.