

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

李和阳¹ 陈明霞^{1 2 3} 郑天凌² 郑森林¹ 陈彬¹

(1. 国家海洋局第三海洋研究所 福建 厦门 361005; 2. 厦门大学生命科学学院 福建 厦门 361005;

3. 华侨大学化工学院 福建 厦门 361021)

摘要: 通过传统的 TCBS 培养基平板计数法、16S rDNA-RFLP(16S rRNA 基因的限制性酶切图谱多样性分析) 及 16S rDNA 序列分析等方法对深圳海域水体和九龙江口沉积物中弧菌数量分布进行研究. 结果表明 TCBS 菌群数中弧菌所占的比例因不同采样地点、不同季节而呈现较大差异. 在深圳西海域及九龙江口上游盐度较低(盐度 < 11) 的区域, TCBS 菌群中弧菌所占的比例为 0, TCBS 菌群数与弧菌总数不相关; 在河口下游盐度相对较高的区域, 弧菌占 TCBS 菌群数的 6.0% ~ 92.0%, TCBS 菌群数与弧菌总数不相关或相关性不大; 高盐度的海水区域弧菌占 TCBS 菌群数的 37.0% ~ 100.0%, TCBS 菌群数与弧菌数量显著相关($p < 0.05$). 因此环境监测过程中利用 TCBS 培养基检测海洋弧菌数量时, 应该通过分子鉴定或生理生化鉴定方法进行验证, 以保证数据的科学性.

关键词: 海洋微生物学; TCBS 菌群; 弧菌; 环境监测; 深圳海域; 九龙江口

DOI: 10.3969/J. ISSN. 1000-8160. 2011. 03. 015

中图分类号: P735

文献标识码: A

文章编号: 1000-8160(2011)03-0394-06

TCBS 培养基也称为弧菌选择培养基, 是由 Kobayashi 等(1963) 开发并广泛应用于弧菌的特异性筛选, 绝大多数的致病性弧菌在这种培养基上生长良好^[1]. 培养基中的牛胆酸钠、牛胆汁粉、硫代硫酸钠和柠檬酸钠及较高的 pH 值可抑制革兰氏阳性菌和大肠菌群, 配置好的 TCBS 琼脂平板相比于通用性的 2216E 或 LB 琼脂平板不容易染上杂菌. 当然除了弧菌属(*Vibrio*) 外, 还有其他一些细菌类群也可生长于 TCBS 培养基上, 比如已报道的发光杆菌属(*Photobacterium*)^[2-3]、希瓦氏属(*Shewanella*)^[4-5]、屈挠杆菌属(*Flexibacter*)^[6]、假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[7-8]、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)^[8]、气单胞菌属(*Aeromonas*)^[9]、邻单胞菌属(*Plesiomonas*)^[9]、肠球菌属(*Enterococcus*)^[2] 的部分细菌. 由此可见 TCBS 培养基并不是特异性非常强的选择培养基^[10]. 目前, 弧菌数量监测尚无国家标准, 许多学者在环境细菌学监测过程中经常直接将

TCBS 菌群数等同于弧菌数^[11-19], 这显然与实际情况并不完全相符. 本研究通过传统分离培养方法与分子生物学方法相结合, 探讨不同样品 TCBS 菌群中弧菌所占的比例, 分析二者之间的相关性, 指出环境监测方法中的不足并提出相关的改进措施.

1 材料与方法

1.1 样品采集

本研究调查范围包括深圳海域和九龙江口流域, 采样站位如图 1 所示. 深圳海域 10 个采样站位是根据深圳环境保护监测中心的长期环境监测而设定, 位于 22.24° ~ 22.70°N, 113.60° ~ 114.80°E. GDN053、GDN057、GDN058、GDN060、GDN062、GDN063 站位属于深圳西部海域(珠江口海域), GDN059、GDN061、GDN064、YMK001 站位属于深圳东部海域. 样品分别于 2008 年 4 月(春季) 和 2008 年 9 月(秋季) 采集. 水深 10 m 以上(东部海域) 的

收稿日期: 2010-09-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41006117); 国家海洋公益性行业科研专项经费资助项目(200805064); 福建省青年创新人才科学基金资助项目(2004Z055); 福建省自然科学基金资助项目(Z0515011); 国家海洋局第三海洋研究所引进人才基金资助项目(海三科 2005003、2005007); 国家海洋局第三海洋研究所基本科研业务费专项资助项目(海三科 2007021)

作者简介: 李和阳(1978 ~), 男, 副研究员; E-mail: heyangli@126.com

站位采集表层(S)、10 m层(M)和底层(B)水深10 m以下(西部海域)的站位仅采集表层(S),每个水

层采集500 cm³水样.样品于4℃下保存,带回实验室后(不超过48 h)立即进行菌株分离培养并计数.

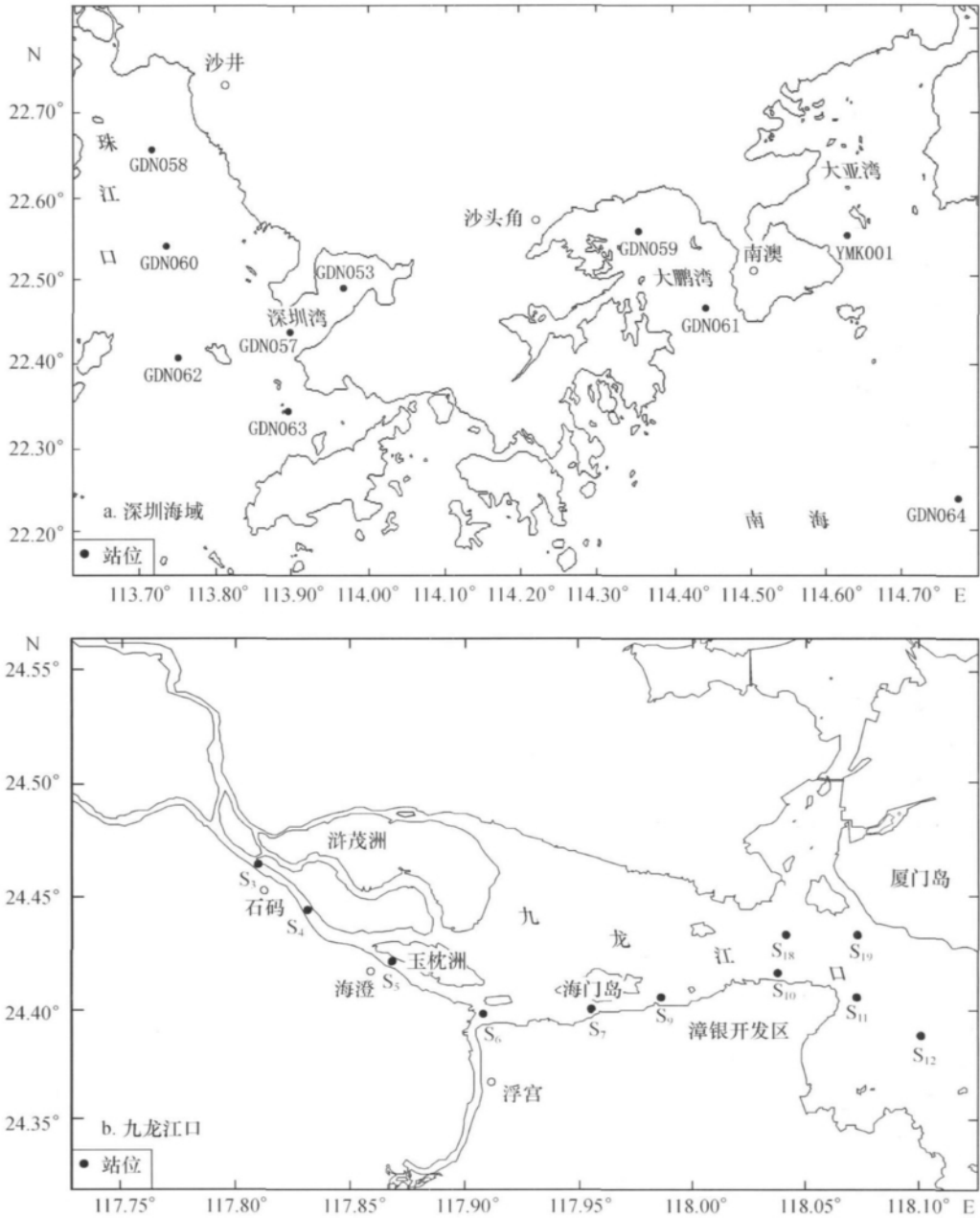


图1 深圳海域和九龙江口采样站位

Fig. 1 Sampling stations in Shenzhen waters and Jiulongjiang River Estuary

九龙江口流域共设10个站位,位于24.39°~24.47°N,117.80°~118.11°E,采集时间为2009年11月(秋季).采集的表层沉积物,于冰上放置,带回实验室后于4℃下存放并于72 h内分离培养.

1.2 TCBS 菌株的分离培养和计数

每个水样分别取5 mm³(用50~100 mm³灭菌蒸馏水稀释)、50 mm³和200 mm³(或100 mm³)直接涂布于TCBS琼脂平板上,于26±1℃培养26±2 h,并对典型菌落(蓝绿色、绿色和黄色)进行计数.称

取0.5~1.0 g沉积物样品,用事先灭菌好的原位海水将样品稀释5倍(质量比),充分混匀,静置片刻让土壤颗粒沉淀.取200 mm³上层水溶液于TCBS琼脂平板上,用涂布棒涂布至水样被完全吸收(操作时间不超过10 min).于26±1℃培养箱内培养26±2 h.并设置2组平行实验.

每个样品随机挑取15~80个菌落接种于2216E琼脂平板上,尽可能保证每种类型的菌落按比例挑取.对所分离的菌株在2216E平板上进行3

次以上的纯化,以保证得到纯培养物.通过 16S rDNA-RFLP 分析和 16S rDNA 序列比对分析对上述分离的菌株进行分型和鉴定,确定不同 RFLP 谱型所代表的细菌类群及其所占的比例,从而确定弧菌及其他 TCBS 类群的数量.

1.3 TCBS 类群的鉴定

对所分离得到的 TCBS 菌株进行 16S rDNA-RFLP 分析并通过 16S rDNA 序列比对分析进行菌种鉴定.用牙签挑取菌株的部分菌落于 50 mm³ 碱裂解液中 [SDS 的含量为 1% (m/m), NaOH 的浓度为 0.1 mol/dm³] 进行碱裂解.裂解产物用无菌蒸馏水稀释 5~10 倍.取 1.0 mm³ 上述细胞裂解物为模板,以细菌通用引物 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')、1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') 对每个模板进行 2 个平行的 PCR 反应;将所有产物集合并纯化;将纯化后的 PCR 产物用限制性内切酶 *Afa* I 和 *Msp* I 进行双酶切.以 5.0% (m/m) 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,分析 16S rDNA 的酶切谱型,计算每种不同酶切谱型的出现频率.挑取不同 RFLP 酶切谱型的代表菌株进行 16S rDNA 序列测定和 GenBank 数据库比对分析,确定各类群的种属特性.TCBS 种类组成的数据庞大,已另文发表^[20] 本文只讨论不同样品中 TCBS 菌群数与弧菌

数量的相关性.

1.4 数据统计分析

本研究的数据统计、相关性分析及图片制作使用 Microsoft Office Excel 软件(2007)及 SPSS13.0 统计软件进行分析.

2 结果与分析

2.1 各站位 TCBS 菌群中弧菌的相对比例

各站位 TCBS 菌群中弧菌所占的比例详见表 1. 深圳海域:深圳西部海域(GDN058、GDN060、GDN062、GDN063 站位)盐度低于 11 的站位未检测到弧菌,其余站位在 2 个季节中弧菌比例各不相同.整体而言,各站位(盐度高于 11)水体中弧菌所占比例 4 月份(平均比例为 91.0%)高于 9 月份(平均比例为 58.0%).东部海域站位水体弧菌所占比例(4 月份平均比例为 99.0%,9 月份平均比例为 66.0%)高于西部海域站位(4 月份平均比例为 74.0%,9 月份平均比例为 33.0%).九龙江口:盐度较低的河口内侧区域未检测到弧菌,盐度较高的河口外侧区域只有 S₉ 站位和 S₁₈ 站位有弧菌检出,其所占比例分别为 6.0% 和 19.0%.该结果与深圳西部海域的相似.

表 1 各调查站位 TCBS 菌群中弧菌的相对比例

Tab. 1 Percentage of vibrios in TCBS groups at each station

站位	水层	深圳海域水体中弧菌比例/%		站位	九龙江口沉积物中弧菌比例/%
		2008 年 4 月	2008 年 9 月		
YMK001	表层	100.0	82.0	S ₃	0
YMK001	中层	97.0	39.0	S ₄	0
YMK001	底层	100.0	93.0	S ₆	0
GDN064	表层	100.0	82.0	S ₇	0
GDN064	中层	100.0	63.0	S ₉	6.0
GDN064	底层	95.0	96.0	S ₁₀	0
GDN061	表层	97.0	37.0	S ₁₁	0
GDN061	中层	97.0	22.0	S ₁₂	0
GDN059	表层	100.0	41.0	S ₁₈	19.0
GDN059	中层	100.0	100.0	S ₁₉	0
GDN053	表层	70.0	62.0	-	-
GDN057	表层	92.0	12.0	-	-
GDN063	表层	42.0	24.0	-	-
GDN062	表层	90.0	0	-	-
GDN060	表层	0	0	-	-
GDN058	表层	0	0	-	-

2.2 TCBS 菌群数与弧菌总数的相关性分析

深圳海域各站位 TCBS 菌群数与弧菌总数分布如图 2 所示. 由图 2 可以看出, 在珠江口近上游盐度较低的区域(盐度小于 11) 2 个季节皆没有检测出相关弧菌, 该结果与九龙江口的类似. 因此我们推测淡水或盐度较低的半咸水区域, TCBS 菌群数与弧菌总数无直接相关性. 这种分布特征与弧菌本身的特性有关, 绝大多数弧菌是嗜盐性或盐度对其生长有促进作用^[2], 淡水或盐度较低的半咸水区域不适宜弧菌生长, 弧菌数量少且可能多数以 VBNC(活的但

不可培养) 状态存在(该结果另文发表). 以下相关性分析不包含盐度低于 11 的站位.

4 月份各站位弧菌所占的比例较高(平均比例为 91.0%) , 因此弧菌数量与 TCBS 菌群数呈现极显著的正相关关系($r=1$ $p<0.01$, 图 2a) .

9 月份深圳东部海域, 弧菌所占的平均比例为 66.0% , 弧菌数量与 TCBS 菌群数仍然呈现显著的相关关系($r=0.986$ $p<0.05$) ; 但西部海域弧菌所占的平均比例仅为 33.0% , 弧菌数量与 TCBS 菌群数的相关关系不显著($r=0.503$ $p>0.05$, 图 2b) .

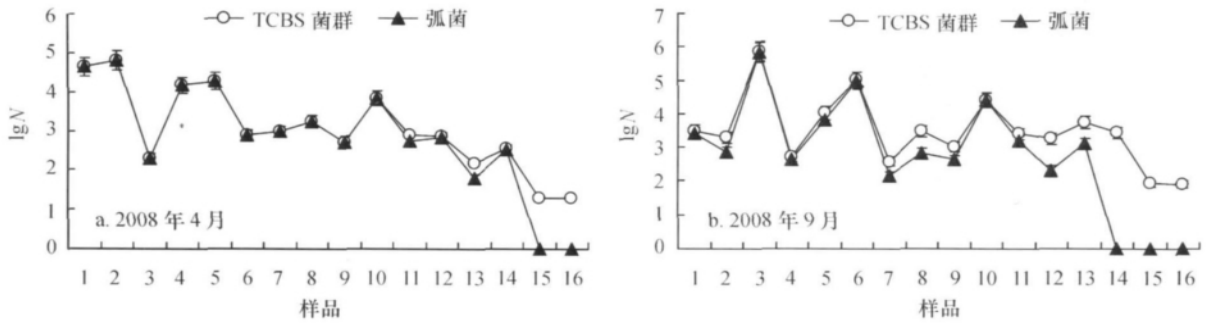


图 2 深圳海域 TCBS 菌群数与弧菌总数的相关性

Fig. 2 Correlation between abundance of TCBS groups and vibrio bacteria in Shenzhen waters

1. YMK001 站表层, 2. YMK001 站中层, 3. YMK001 站底层, 4. GDN064 站表层, 5. GDN064 站中层, 6. GDN064 站底层, 7. GDN061 站表层, 8. GDN061 站中层, 9. GDN059 站表层, 10. GDN059 站中层, 11. GDN053 站表层, 12. GDN057 站表层, 13. GDN063 站表层, 14. GDN062 站表层, 15. GDN060 站表层, 16. GDN058 站表层,
 N 代表 TCBS 菌群数或弧菌总数的丰度

3 讨论

TCBS 培养基上生长的细菌简称 TCBS 菌群. 过去传统观念认为, 弧菌占 TCBS 菌群数的绝对优势, 而实际研究过程中弧菌所占的比例因不同采样地点及采样时间而有所差异.

Maugeri 等(2000) 从半盐水湖中分离 152 株 TCBS 菌株中, 其中 125 株为弧菌属细菌, 另外 27 株则为其他属细菌, 弧菌所占比例为 82.0%^[9]. Lafis-ca 等(2008) 分离到 127 株 TCBS 菌株, 其中 105 株属于弧菌属, 比如 *V. alginolyticus* (32.4%)、*V. harveyi* (19.0%) 和 *V. parahaemolyticus* (7.6%) , 20 株属于 *Aeromonas* 属, 2 株属于 *Plesiomonas* 属, 弧菌所占比例为 83.0%^[21]. Uchiyama 等(2000) 利用 TCBS 培养基研究日本水体环境中弧菌的分布发现: 非嗜盐菌株占河流水体来源的 TCBS 菌株的 85.3% ~ 92.1%; 河口来源 TCBS 菌株的 40.9% 属于非嗜盐菌株, 57.4% 属于嗜盐菌株; 嗜盐菌株占海水来源的 TCBS 菌株的 69.2% ~ 86.8%; TCBS 菌株中弧菌的比例占 11.9% ~ 47.9%^[22]. 吴玲等(2005) 对中国沿海十省、市、自治区(辽宁、河北、山东、江苏、

上海、浙江、福建、广东、广西和海南) 26 个地区的 132 份(海水 39 份, 淡水 93 份) 水样进行了致病性弧菌的分布调查; 结果发现不同水体 TCBS 菌群的类别差异很大, 淡水 TCBS 类群以气单胞菌属为主, 而海水中 TCBS 类群以弧菌属为主, 两类细菌的分布特征与其对盐度的适应性息息相关^[23].

本研究结果表明珠江口及九龙江口近上游盐度较低的区域, TCBS 菌群中弧菌的比例为 0, TCBS 菌群数与弧菌总数不相关; 河口下游盐度相对较高的区域, 弧菌占 TCBS 菌群数的 6.0% ~ 92.0% , TCBS 菌群数与弧菌总数不相关或相关性不大; 盐度高的海水区域弧菌数量占 TCBS 菌群数的 37.0% ~ 100.0% , TCBS 菌群数与弧菌数量显著相关($p<0.05$) .

综上所述, TCBS 培养基并不是特异性非常强的弧菌选择培养基, 在生产实践及环境评价过程中, 单纯通过测定 TCBS 菌群数以代表弧菌数量的做法, 可能会导致弧菌数量的高估和错估, 尤其是在淡水或咸淡水区域. 为获取更加接近弧菌总数的真实值, 应该在 TCBS 琼脂平板计数的同时, 进行 TCBS 菌株的种属鉴定. 菌株种属鉴定可以采用传统的生理生

化鉴定方法^[24-25],也可以采纳准确度更高、稳定性更好的分子鉴定方法,如细菌 16S rDNA 序列分析法^[26-28]。此外,可对 TCBS 培养基进行适当的优化,在不影响弧菌生长的情况下,添加抑制其他细菌生长的抑制剂或弧菌特异性的底物。

参考文献:

- [1] Kobayashi T, Enomoto S, Sakazaki R, et al. A new selective medium for pathogenic vibrios, TCBS (modified Nakanishi's agar) [J]. Japanese Journal of Bacteriology, 1963, 18: 387-391.
- [2] Farmer III J J, Janda J M. *Vibrionaceae* [M]//Brenner D J, Krieg N R, Staley J T, et al. Bergey's manual of systematic bacteriology. Berlin: Springer-Verlag KG, 2004: 491-540.
- [3] Gomez-Gil B, Roque A, Rotllant G, et al. *Photobacterium swingsii* sp. nov. isolated from marine organisms [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2010 61(2): 315-319.
- [4] 汪永禄, 王多春, 詹圣伟, 等. 从食物中毒患者标本中分离鉴定海藻和腐败施万菌 [J]. 中华流行病学杂志, 2009, 30(8): 836-840.
- [5] Kida N, Matsuzaki M, Matsukawa A, et al. A simple method for differentiation of hydrogen sulfide-producing bacteria by the pH-dependent EDTA-sensitivity test [J]. Nippon Saikingaku Zasshi, 1994, 49(5/6): 769-777.
- [6] Mourinho J L, Vinatea L, Buglione-Neto C, et al. Characterization and experimental infection of *Flexibacter maritimus* (Wakabayashi et al. 1986) in hatcheries of post-larvae of *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931 [J]. Brazilian Journal of Biology, 2008, 68(1): 173-177.
- [7] Hernández-López J, Gollas-Galván T, Magallón-Barajas F, et al. Isolation of *Vibrio* and *Pseudomonas* from brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes) intestine [J]. Revista Latinoamericana de Microbiología, 1997, 39(3/4): 109-115.
- [8] Míguez B, Combarro M P. Bacteria associated with sardine (*Sardina pilchardus*) eggs in a natural environment (Ríade Vigo, Galicia, northwestern Spain) [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 44(3): 329-334.
- [9] Maugeri T L, Caccamo D, Gugliandolo C. Potentially pathogenic vibrios in brackish waters and mussels [J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 89(2): 261-266.
- [10] 肖辉川, 李术惠, 德玮. 微生物在不同培养基上生长情况的研究 [J]. 实用医技杂志, 2006, 13(10): 1638-1640.
- [11] 肖慧. 渤海湾近岸海域的细菌学研究及其在海岸带环境质量评价中的应用 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2005.
- [12] 乔旭东. 渤海湾天津海域的细菌学研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2005.
- [13] 吴建平, 蔡创华, 周毅频, 等. 大亚湾网箱养殖区异养细菌和弧菌的数量动态 [J]. 湛江海洋大学学报, 2006, 26(3): 21-25.
- [14] 徐怀恕, 许冰. 海洋微生物学试验法 [M]. 青岛: 青岛海洋大学, 1992.
- [15] 李春雁, 贾建军. 山东荣成湾月湖细菌生态学研究 [J]. 青岛大学学报: 自然科学版, 2000, 13(1): 67-71.
- [16] 谢立民. 拓林湾细菌、弧菌和异养菌数量的时空分布和细菌生产力研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2004.
- [17] 王晓颖, 席峰, 袁建军, 等. 虾池沉积环境中若干功能菌及弧菌的时空变化 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45(5): 250-256.
- [18] 陈绍铭, 郑福寿. 水生微生物学实验法(上) [M]. 北京: 海洋出版社, 1990.
- [19] 黄美珍, 吴立峰, 罗冬莲. 厦门对虾养殖水域异养细菌和弧菌的研究 [J]. 福建水产, 1997(4): 1-5.
- [20] 陈明霞, 李和阳, 李刚, 等. 深圳海域弧菌种类组成、数量分布及其与环境因子的关系研究 [J]. 海洋学报, 2010, 32(5): 117-126.
- [21] Lafisca A, Pereira C S, Giaccone V, et al. Enzymatic characterization of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from bivalves harvested at Venice Lagoon (Italy) and Guanabara Bay (Brazil) [J]. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 2008, 50(4): 199-202.
- [22] Uchiyama H. Distribution of *Vibrio* species isolated from aquatic environments with TCBS agar [J]. Environmental Health and Preventive Medicine, 2000, 4(4): 199-204.
- [23] 吴玲, 张景隆, 付利军. 中国沿海十省、市、自治区水域中致病性弧菌的分布调查 [J]. 中华航海医学与高气压医学杂志, 2005, 12(3): 171-172.
- [24] 倪纯治, 叶德赞, 林燕顺, 等. 大亚湾和厦门港水域的嗜盐弧菌 [J]. 海洋学报, 1995, 17(5): 124-129.
- [25] 刘文华, 叶德赞, 倪纯志, 等. 厦门浔江湾牡蛎养殖区弧菌研究 [J]. 台湾海峡, 1996, 15(4): 412-415.
- [26] Montes M, Farto R, Pérez M J, et al. Characterization of *Vibrio* strains isolated from turbot (*Scophthalmus maximus*) culture by phenotypic analysis, ribotyping and 16S rRNA gene sequence comparison [J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 95

(4) : 693-703.

- [27] Urakawa H , Kita-Tsukamoto K , Ohwada K. 16S rDNA genotyping using PCR/RFLP (restriction fragment length polymorphism) analysis among the family *Vibrionaceae* [J]. FEMS Microbiology Letters , 1997 , 52(1) : 125-132.
- [28] Maeda T , Matsuo Y , Furushta M , et al. Seasonal dynamics in a coastal *Vibrio* community examined by a rapid clustering method based on 16S rDNA [J]. Fisheries Science , 2003 , 69(2) : 385-394.

Relationship between TCBS groups and vibrios in Shenzhen waters and Jiulongjiang River Estuary

LI He-yang¹ , CHEN Ming-xia^{1 2 3} , ZHENG Tian-ling² , ZHENG Sen-lin¹ , CHEN Bin¹

(1. Third Institute of Oceanography , SOA , Xiamen 36100 , China; 2. School of Life Science , Xiamen University , Xiamen 361005 , China; 3. College of Chemical Engineering , Huaqiao University , Xiamen 361021 , China)

Abstract: The distribution of the abundance of vibrio bacteria was detected in the Shenzhen coastal waters and sediments of the Jiulongjiang River Estuary , using the traditional thiosulphate citrate bile sugar (TCBS) agar count , 16S rDNA-RFLP (16S rRNA gene restriction fragment length polymorphism) and 16S rDNA sequence analysis methods. It was found that the ratio of vibrio bacteria to TCBS groups displayed relatively large variance depending on the sampling sites and seasons. In low salinity waters , such as the Zhujiang River Estuary and Jiulongjiang River Estuary , where the salinity is lower than 11 , the percentage of vibrio bacteria was 0 , indicating no correlation between the abundance of TCBS groups and vibrio bacteria. In lower parts of the rivers , where the salinity is higher than 11 , the percentage of vibrio bacteria was 6.0% ~ 92.0% , and there was no significant correlation between the abundance of TCBS groups and vibrio bacteria. In high salinity seawaters , the percentage of vibrios was 37.0% ~ 100.0% , and the correlation between the abundance of TCBS groups and vibrio bacteria was significant. These results suggested that identification by molecular or physiological and biochemical methods are necessary to detect vibrios abundance in seawaters with a TCBS agar count.

Key words: marine microbiology; TCBS groups; vibrio; environmental monitoring; Shenzhen waters; Jiulongjiang River Estuary

DOI: 10.3969/J. ISSN.1000-8160.2011.03. 015

(责任编辑: 王 静)