

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

陈明霞^{1,4}, 李和阳^{2*}, 李刚³, 郑天凌¹, 焦昆^{1,2}, 韩永胜^{1,2}

(1. 厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2. 国家海洋局 第三海洋研究所, 福建 厦门 361005; 3. 深港产学研基地深圳市海岸与大气重点实验室, 广东 深圳 518057; 4. 华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 研究了深圳海域 2008 年 4 月、9 月的水体弧菌数量、种类组成及其分布, 探讨了弧菌总数及各优势类群的数量分布与环境因子间的相关关系。结果表明: 弧菌总数分布具有季节性, 东部海域春季(4 月)的弧菌数量高于秋季(9 月)的, 其均值分别为 1.50×10^4 , 8.89×10^2 CFU/cm³; 在西部海域秋季的略高于春季的, 其均值分别为 5.09×10^2 , 2.66×10^2 CFU/cm³; 弧菌数量最高值出现在大亚湾(4.40×10^4 CFU/cm³)。弧菌的优势类群具有季节性分布特征: 春季特有的优势类群有 *Vibrio gigantis* 类似种和 *V. splendidus* 类似种, 秋季特有的优势类群有 *V. natriegens* 类似种; *V. alginolyticus* 类似种是两个季节共有的优势类群, 其数量春季高于秋季的。弧菌种类、数量与海水温度、盐度及细菌总数、Chl a 等环境因子有一定的相关性, 其中盐度为弧菌种类及数量分布的主要影响因子。

关键词: 深圳海域; 弧菌种类与数量分布; 环境因子

中图分类号: R378.3(665)

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2010)05-0117-10

1 引言

弧菌是海洋细菌的优势类群之一, 广泛分布于世界各地各类河口、内湾、沿岸、水体养殖区和外海的水体及沉积物中, 各种海洋生物体表或体内也常生存着高密度海洋弧菌^[1-3], 在海洋环境中占据着重要的生态地位, 具有多种多样的生理、生态功能^[4-6], 在海洋微食物环中扮演重要角色^[7-8], 对海洋的营养物的循环起着非常重要的作用。弧菌又是水生动物(包括养殖动物)中的一类重要的病原菌, 还是人类的重要致病菌。目前发现至少有 12 种弧菌可引起人类疾病^[1], 20 种以上的弧菌可引起养殖动物的弧菌病。随着研究的不断深入, 发现越来越

多的弧菌具有条件致病性, 因此弧菌及弧菌病的研究引起广大科学家的关注, 已成为了海洋生态学、水产学研究的前沿热点之一。

深圳市位于我国南部沿海, 海岸线长达 257 km, 海域面积为 1 400 km², 按其自然地理条件分为东部海域(大鹏湾东部和北部、大亚湾西部)与西部海域(珠江口的东南部、深圳湾西北部)。深圳海域分布有 11 个主要海水增殖区, 2 个国家重点预报浴场, 6 个海洋保护区, 12 个港口、航道区, 沿海风景与度假旅游区共有 15 个, 与人类经济、生活和娱乐密切相关。海洋产业已成为深圳市重要产业之一。本文以深圳海域为典型研究海域, 分别于 2008 年 4 月、9 月对深圳海域弧菌的数量分布、种类组成

收稿日期: 2009 12-25; 修订日期: 2010 11-18。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41006117); 海洋公益性行业科研专项经费项目(200805064); 国家“908”专项课题评价项目(908-02-04-01); 国家“908”、福建“908”专项课题调查项目(908-01-ST06; FJ908-01-01-HS); 国家海洋局第三海洋研究所引进人才基金项目(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: 陈明霞(1980—), 女, 福建省惠安县人, 博士研究生, 微生物专业, 主要从事海洋微生物分子多样性研究。E-mail: chenmx1257@163.com

* 通信作者: 李和阳(1978—), 男, 福建省惠安县人, 副研究员, 主要从事海洋环境微生物生理生态学研究。E-mail: heyangli@126.com

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

的时空变化进行研究, 分析其与环境因子之间的关系, 探讨弧菌的条件致病特征及规律, 为海洋弧菌性疾病的预警、防治和环境质量评价提供依据。

2 材料与方法

2.1 样品采集

样品分别于 2008 年 4 月、2008 年 9 月两个季度采集。每个航次各设置 10 个站位(图 1)。在水深 10 m 以上的站位采集表层、10 m 层和底层, 在水深 10 m 以下的站位仅采集表层, 每个航次各采集 16 个水样。每个水层采集 500 mL 水样, 保存于 4 °C(不超过 48 h)带回实验室后立即分离培养。相关的水质水质参数由深圳市海岸及大气研究重点实验室提供(表 1, 2)。

2.2 培养和计数

取适量水样直接涂布于 TCBS 平板上, 于(26 ±

1) °C 培养(26 ± 2) h, 并对典型菌落(蓝绿色、绿色和黄色)进行计数。每个样品随机挑取 30~ 80 个菌株接种于 2216E 平板上, 尽可能保证每种类型的克隆子按比例挑取。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。各菌株用含 40% 甘油的 2216E 培养基保种。通过 16S rDNA-RFLP 和 16S rDNA 测序分析方法(见 2.3 节)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。

可培养细菌采用 2216E 平板计数法(《海洋监测规范, HY 003-91》), 粪大肠菌群的测定采用滤膜法; 细菌总数采用 SYB-green I 染色荧光显微镜直接计数法^[9], 结果见表 1、2。

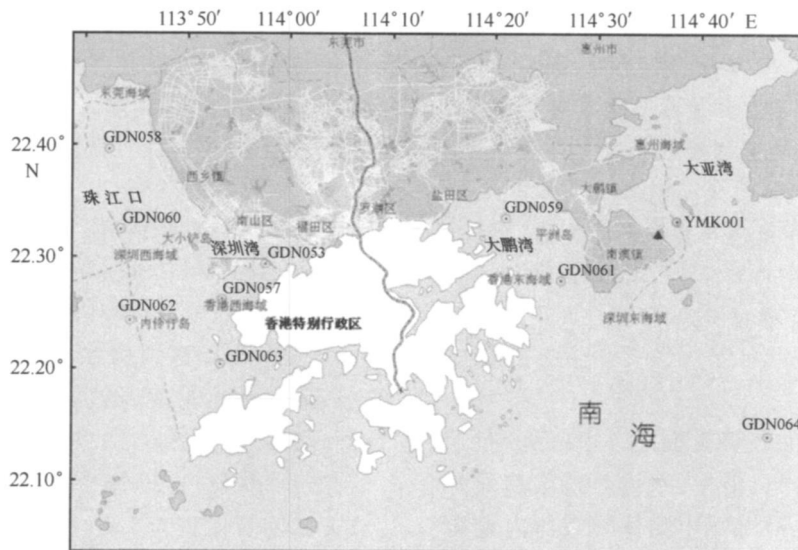


图 1 深圳海域采样站位

表 1 2008 年 4 月航次环境数据

站位号	日期	时间	细菌总数/ 个·cm ⁻³	可培养细菌数/ CFU·cm ⁻³	粪大肠菌群数/ CFU·dm ⁻³	水温/°C	盐度	pH	Chl a 浓度/ μg·dm ⁻³
YMK001	2008 04 22	07: 58	3.97 × 10 ⁶	3.70 × 10 ⁵	310	24.29	32.76	8.07	1.987
GDN064	2008 04 22	11: 05	1.44 × 10 ⁶	8.39 × 10 ⁵	240	26.53	33.79	8.07	0.104
GDN061	2008 04 22	14: 52	1.18 × 10 ⁶	1.28 × 10 ⁵	3400	26.14	31.67	8.08	1.589
GDN059	2008 04 22	16: 00	7.49 × 10 ⁵	3.40 × 10 ⁵	55	25.24	31.04	8.24	2.126
GDN053	2008 04 24	06: 55	3.25 × 10 ⁶	5.01 × 10 ⁴	16 500	23.56	20.78	7.77	1.991
GDN057	2008 04 24	08: 00	2.32 × 10 ⁶	5.49 × 10 ⁴	13500	23.42	23.81	7.86	1.538
GDN063	2008 04 24	08: 30	1.99 × 10 ⁶	6.80 × 10 ⁴	7000	23.38	23.98	7.87	2.292
GDN062	2008 04 24	10: 03	2.32 × 10 ⁶	2.63 × 10 ⁵	1140	22.85	17.18	7.79	1.834
GDN060	2008 04 24	12: 08	2.46 × 10 ⁶	2.03 × 10 ⁴	2060	23.23	7.33	7.49	2.495
GDN058	2008 04 24	13: 35	1.72 × 10 ⁶	2.30 × 10 ³	7000	23.41	5.19	7.41	5.513

表2 2008年9月航次环境数据

站位号	日期	时间	细菌总数/ 个·cm ⁻³	可培养细菌数/ CFU·cm ⁻³	粪大肠菌群数/ CFU·dm ⁻³	水温/℃	盐度	pH	Chl a 浓度/ μg·dm ⁻³
YMK001	2008 09 22	07: 36	4.42×10 ⁶	2.93×10 ⁵	1 430	31.3	30.42	8.15	1.177
GDN064	2008 09 22	12: 33	3.55×10 ⁶	6.28×10 ⁴	240	31.1	30.81	8.23	0.240
GDN061	2008 09 22	15: 17	1.84×10 ⁶	1.85×10 ⁵	360	31.5	30.44	8.24	0.471
GDN059	2008 09 22	16: 31	3.11×10 ⁶	1.91×10 ⁵	620	30.9	30.17	8.71	0.619
GDN053	2008 09 20	06: 52	3.88×10 ⁶	1.09×10 ⁵	24 500	29.7	19.40	6.33	0.656
GDN057	2008 09 20	07: 36	1.94×10 ⁶	4.76×10 ⁵	31 000	30.1	20.66	7.39	0.656
GDN063	2008 09 20	08: 21	1.65×10 ⁶	3.38×10 ⁵	2350	29.0	19.97	7.54	0.861
GDN062	2008 09 20	09: 40	1.51×10 ⁶	6.94×10 ⁵	335	29.7	11.15	7.36	0.461
GDN060	2008 09 20	11: 07	1.46×10 ⁶	1.39×10 ⁵	1380	30.5	3.80	7.48	3.232
GND058	2008 09 20	12: 10	1.19×10 ⁶	6.05×10 ⁴	3 000	32.2	2.38	7.55	4.289

2.3 分子鉴定

采用 16S rDNA-RFLP 和 16S rDNA 序列分析方法对所分离的菌株进行菌种鉴定。用牙签挑取已纯化菌株的部分菌落于 50 μL 碱裂解液中 (SDS 1%, NaOH 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 μL 上述稀释液为模板, 以细菌通用引物 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')、1492 R (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% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 分析 16S rDNA 的酶切电泳谱型, 计算每种酶切电泳谱型的出现频率, 挑取不同 RFLP 谱型的代表菌株进行 16S rDNA 测序。

3 结果与讨论

3.1 弧菌数量分布及其变化

2008 年 4 月、9 月深圳海域各站位的弧菌数量分布见图 2。

珠江口(包括 GDN058, GDN060, GDN062 和 GDN063 站位)弧菌数量变化: 4 月份该海域弧菌高发区位于伶仃洋的 GDN062 站位附近, 为 3.15×10^2 CFU/cm³, 在 GDN063 站位有少量弧菌检出, 为 6.30×10 CFU/cm³, 在 GDN58 站位和 GDN60 站位未检出弧菌; 9 月份弧菌高发区在 GDN063 站位附近, 为 1.28×10^3 CFU/cm³, 比 4 月份高出 19.3 倍, 而在其余各站位皆无弧菌检出。

珠江口上游站位由于珠江冲淡水的影响, 各站

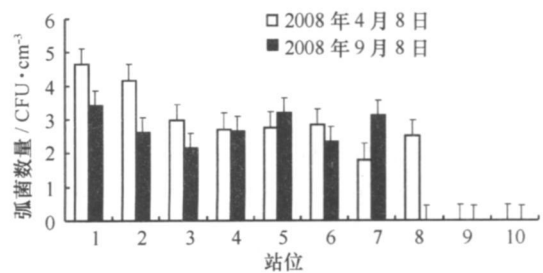


图2 深圳海域 2008 年 4 月、9 月表层海水弧菌数量分布

1 YMK001, 2 GDN064, 3 GDN061, 4 GDN059, 5 GDN053, 6 GDN057, 7 GDN063, 8 GDN062, 9 GDN060, 10 GDN058。误差棒代表标准误差

位的盐度明显低于其他海域(见表 1、2), 在水体盐度低于 11 的站位没有检测到相关弧菌。这种分布现象与弧菌的特性有关: NaCl 对弧菌的生长具有促进作用, 多数弧菌生活是需要 NaCl, 属于嗜盐性弧菌, 是海洋中的土著微生物, 只有少数弧菌(如 *V. cholerae*) 可以生活于淡水环境或少数弧菌(如 *V. parahaemolyticus*) 能耐受淡水环境, 但其数量不多。

珠江口下游站位的弧菌数量变化主要与水体中的有机物含量相关。根据深圳市环境保护局 2008 年海水水质监测数据表明: 4 月份属于珠江枯水期, 珠江口下游 GDN062 站位和 GDN063 站位受冲淡水影响较弱, 盐度为 17.18~23.98, 属嗜盐性弧菌可正常生长的范围, 温度为 $(23 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$, pH 为 7.85 ± 0.05 , 二站位的 COD 分别为 0.8 和 0.4, 弧菌数量在 GDN062 站明显高于 GDN063 站的; 9 月

份属于珠江平水期, GDN063 站位受冲淡水影响较弱, 盐度为 19.97, 属嗜盐性弧菌可正常生长的范围, 温度为 29.0 °C, pH 为 7.54, COD 为 1.10, 此时弧菌数量显著高于该站位及 GDN062 站位 4 月份的弧菌数量。

由上述分析可见, 影响珠江口弧菌数量分布的主要环境因子为盐度、有机物浓度和温度, 其数量分布的变化是各种环境因子共同作用的结果。

GDN053 站位的水质特征与 GDN063 站位的相似, 具有季节性变化, 其主要影响因素是温度及有机物浓度。9 月份该站位海域水体温度为 (29.0 ± 0.5) °C, 比 4 月份的 (23 ± 0.5) °C 高, 细菌代谢快, 生物量更大, 其次 9 月份该站位海域的有机物含量相对高于 4 月份, 综合影响导致弧菌数量 9 月份 (1.56 × 10³ CFU/cm³) 显著高于 4 月份 (5.53 × 10² CFU/cm³)。

GDN057 站位的水质特征与 GDN053 站位的十分相似, 但其 9 月份弧菌数量却出现了异常状况 (2.12 × 10² CFU/cm³), 推测其主要原因可能在于弧菌生态位被该季节高速繁殖生长的其他细菌所占据。在此站位, 弧菌只占所分离细菌的 12%, 而另外一类细菌 *Pseudoalteromonas* 却高居 81%。*Pseudoalteromonas* 细菌的生态功能与弧菌的相近, 根据其在 TCBS 平板上生长的情况观察, 其生理特性也与弧菌的相似, 可能在某一特定的条件下占据了弧菌的生态位, 成为海域的优势类群, 从而导致该站位弧菌数量的异常分布。

大鹏湾 (GDN059, GDN061 站位)、大亚湾 (YMK001 站位) 及近南海开阔水域 (GDN064 站位) 属于深圳近海东部海域, 水质良好, 属于清洁海域。在该海域分布着大量的弧菌, 而且弧菌数量呈现季节分布特征。4 月份弧菌出现高数值, 其中 YMK001 站位弧菌数量高达 4.40 × 10⁴ CFU/cm³, 在 GDN064 站位高达 1.46 × 10⁴ CFU/cm³; 9 月份数量明显较低。该结果与 Harriague 等^[10] 对意大利 Adriatic 海北部海滩水体弧菌的研究结果相似, 但与吴建平等^[11] 2006 年对大亚湾网箱养殖区域弧菌的数量动态研究结果相异。

本研究中部、东部海域 4 月份弧菌数量显著高于 9 月份, 究其原因可能有两个方面: (1) 9 月份东部海域的平均温度为 (31 ± 0.5) °C, 4 月份平均温度为 (25 ± 0.5) °C, 而此海域分布的大部分弧菌最适生长温度一般在 (22 ± 0.5) ~ (29 ± 0.5) °C, 故而 9 月份的

高温水体反而不利于部分弧菌种类的生长繁殖, 从而导致两个季节弧菌种类组成及数量出现较大差异; (2) 其他与弧菌具有相似生态位的细菌在 9 月份大量生长繁殖, 竞争并占据了弧菌本来具有的部分生态位, 从而导致此次调查中 9 月份弧菌数量低于 4 月份。

此外, 4 月份大亚湾弧菌数量出现最高值, 明显高出其他海域的可能原因: (1) 该海域是高生产力的珊瑚礁海域, 此站位的细菌总数或可培养细菌总数基数较大, 弧菌作为海洋优势细菌类群之一, 其数量相应较高; (2) 弧菌所占的生态位较全, 其从 TCBS 平板分离的得率在 95% 以上; (3) 该海域 4 月份的绝对优势弧菌是 *V. gigantis* 类似种, 该弧菌最早分离自发病的牡蛎, 是贝类生物的正常菌群及可能的条件致病菌, 而 4 月份正是许多贝类特别是牡蛎的收获季节, 该海域是牡蛎的重要养殖区, 收获过程水体扰动及共生或寄生体的消失可能导致大量弧菌快速生长并扩散到该海域的养殖海区以外。

3.2 弧菌种类组成及变化

对各站位菌株进行 16S rDNA-RFLP 分析, 结果表明 4 月份 642 个菌株分别属于 29 种不同的 RFLP 谱型; 9 月份 753 个菌株分别属于 34 种不同的 RFLP 谱型。从每种 RFLP 谱型挑取 1 株代表性菌株对其 16S rDNA 进行足量 PCR 扩增及产物胶回收, 送测序公司进行序列测定。对所得序列进行比对分析, 各谱型菌株具体微生物学信息详见表 3、4, 所有序列提交 GenBank 数据库, 其序列登录号为 GU371661—GU371719。Drancourt 等^[12-13] 在研究环境及临床病原菌过程中提出 16S rDNA 序列同源性超过 99% 的细菌为同一个种, 16S rDNA 序列同源性在 97%~99% 之间的细菌为同一个属, 16S rDNA 序列同源性小于 97% 的则为新的种类。我们根据这个规则确定菌株的种属类别。

本次调查中我们发现 4 月份在深圳海域分布着 *V. gigantis*、*V. splendidus*、*V. alginolyticus*、*V. cyclitrophicus*、*V. rotiferianus*、*V. mytili*、*V. natriegens*、*V. parahaemolyticus* 和 *V. harveyi* 弧菌的类似种, 其中主要优势类群是 *V. gigantis* 类似种、*V. alginolyticus* 类似种、*V. splendidus* 类似种; 9 月份在深圳近海海域分布着 *V. alginolyticus*、*V. natriegens*、*V. mytili*、*V. splendidus* 和 *V. fortis* 弧菌的类似种, 其中主要优势类群是 *V. natriegens* 类似种和 *V. alginolyticus* 类似种。

表 3 不同 RFLP 谱型代表菌株 16S rDNA 序列分析结果(2008 年 4 月)

RFLP 谱型	代表性克隆子编号	相近序列登录号	相近种株系	相似性(%)
1	001S-13	EF094888.1	<i>Vibrio gigantis</i> strain CAIM 25	99
1'	64M-14	AY620972.1	<i>V. splendidus</i> strain 636	99
2	64S-4	FJ906750.1	<i>V. alginolyticus</i> strain HN08801	100
3	001M-23	AM422804.1	<i>V. cyclitrophicus</i>	100
4	53S-26	AF500080.1	<i>Shewanella affinis</i> KMM 3586	99
5	001M-29	FJ906750.1	<i>V. alginolyticus</i> strain HN08801	99
6	57S-12	FM204863.1	<i>V. rotiferianus</i> strain LPD 1- 1- 84	100
7	57S-2	DQ481610.1	<i>V. cyclitrophicus</i> strain LMG21359	100
8	57S-5	FJ168777.1	<i>Aeromonas punctata</i> strain 782c	100
9	53S-29	FJ589034.1	<i>S. aquimarina</i> strain S5	99
10	64S-10	X99761.1	<i>V. mytili</i>	100
11	57S-9	EU091325.1	<i>V. splendidus</i> isolate PB1- 10rrnA	99
12	64B-5	FJ154796.1	<i>V. harveyi</i> strain WG1702	99
13	64B-38	EU603456.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain PTG4- 15	100
14	64B-17	FJ172044.1	<i>V. parahemolyticus</i> strain RW 1	100
15	61S-12	FJ200650.1	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> strain I 84	99
16	61S-28	FM204870.1	<i>V. alginolyticus</i> culture collection CECT 609	99
17	61S-38	FJ906751.1	<i>V. alginolyticus</i> strain HN08811	100
18	61M-70	AY770691.1	<i>Pseudomonas segetis</i> strain FR1439	100
19	61M-69	AF212215.2	<i>Halomonas</i> sp. Ssw 2. 1856c	99
20	NA48	FJ906748.1	<i>V. alginolyticus</i> strain HN08155	99
21	YT13	DQ530294.1	<i>Photobacterium damsela</i> strain UCP4	99
22	YT19	FJ171336.1	<i>V. natriegens</i> strain WT01	99
23	62S-6	EU309475.1	<i>Halomonas</i> sp. YD- 6	99
24	62S-9	EU440965.1	<i>H. aquamarina</i> strain 2PR52- 11	99
26	SK17	FJ240422.1	<i>Photobacterium leiognathi</i> strain DH123	99
27	SK41	EU373418.1	<i>Citrobacter freundii</i> strain YRL11	100
28	SK23	FJ866781.1	<i>Rhodobacter capsulatus</i> strain PSB- 04	100
29	SK50	DQ480145.1	<i>Marinomonas</i> sp. D6084	99

表 4 不同 RFLP 谱型代表菌株 16S rDNA 序列系统分析结果(2008 年 9 月)

RFLP 谱型	克隆编号	相近序列登录号	相近种型	相似性(%)
1	572S-1	DQ520896.1	<i>P. tetraodonis</i> strain BS120588	99
2	572S-11	NR_025509.1	<i>P. pseudoalteromonas agarivorans</i> strain KMM 255	99
3	532S-9	FJ906750.1	<i>V. alginolyticus</i> strain HN08801	100
4	622S-2	EF179615.1	<i>Psychrobacter pacificensis</i> strain WP02- 1- 40- 1	100
5	572S-34	DQ520896	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	98
6	572S-45	AF212218.2	<i>Halomonas hydrothermalis</i> strain Slthf2	99
7	0012S-16	EU660320.1	<i>Vibrio natriegens</i> strain CM 3	99
8	622S-5	NR_025458.1	<i>Psychrobacter marincola</i> strain KMM 277	99

续表 4

RFLP 谱型	克隆编号	相近序列登录号	相近种系型	相似性 (%)
9	612M-23	EU 684464.1	<i>H. aquamarina</i> strain Vel-10-83	95
10	64M-14(532S-34)	AY 620972.1	<i>V. splendidus</i> strain 636	99
13	642M-3	AJ309941.1	<i>Psychrobacter marincola</i>	99
14	602S-5	EF125186.1	<i>Brachy bacterium zhongshanense</i> strain JB	99
15	642S-17	DQ480145.1	<i>Marinomonas</i> sp. D6084	99
16	592S-4	EF121853.1	<i>H. shenglis</i> strain SL014B-85T	100
17	612M-40	AM229317.1	<i>H. denitrificans</i>	99
18	612S-14	AF212217.2	<i>H. meridiana</i> strain Slthfl	99
19	612S-1	DQ641475.1	<i>Pseudomonas mendocina</i>	99
20	642B-15	AJ551127.1	<i>Psychrobacter</i> sp. es5	99
21	632S-14	AY538714.1	<i>Oceanimonas smirnovii</i>	98
22	612M-54	EU 440965.1	<i>H. aquamarina</i> strain 2PR52-11	100
23	632S-9	FJ472851.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain JM1-1	100
24	64S-10(592S-36)	X99761.1	<i>V. mytili</i>	100
25	0012S-20	AB021419.1	<i>Pseudomonas denitrificans</i>	99
26	582S-4	CP000285.1	<i>Chromohalobacter salexigens</i> DSM 3043	100
27	0012M-54	DQ011614.1	<i>Pseudomonas ganghwensis</i>	100
28	SK2-36	AJ514914.1	<i>V. fortis</i>	99
29	SK2-38	DQ190440.1	<i>Oceanisphaera donghaensis</i> strain BL11	99
30	602S-8	EU 099382.1	<i>Brevibacterium</i> sp. SC9	100
31	622S-23	DQ224384.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99
32	0012S-21	EU 660320.1	<i>V. natriegens</i> strain CM3	100
33	632S-19	FJ472851.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain JM1-1	100
34	602S18	AY513646.1	<i>Psychrobacter alimentarius</i> strain JG-102	99

V. gigantis 类似种是本次调查中在我国海域首次发现的新型弧菌, 该类弧菌最早于 2005 年法国一实验室分离自发病养殖牡蛎的血淋巴, 该细菌可能是牡蛎等贝类生物体内及周围环境的正常优势类群, 在某特定条件下具有致病性^[14]。该类细菌在 4 月份的爆发性存在, 分布范围遍及整个海区, 在大亚湾数量高达 4.40×10^4 CFU/cm³, 对该类弧菌的存在不得不引起足够的重视, 对未来可能暴发的新型疾病能起到预防和预警作用; 9 月份在该海域未发现此类弧菌的分布, 可见该弧菌具有季节分布特性, 主要分布温度在 26 °C 以下水域。

V. alginolyticus 广泛存在于我国近海海域。韩善桥等^[15]、吴玲等^[16]、赖福才等^[17] 调查不同海域海水细菌分布情况, 虽然分离出细菌种类和数量不

同, 但分离出最多的细菌都是溶藻弧菌, 表明溶藻弧菌是海水中的优势细菌。本次调查 *V. alginolyticus* 类似种广泛分布于深圳近海海域, 而且数量相当多, 最高占可培养细菌的 3.03% (4 月份在南澳码头), 是一类在两个季节中都占优势地位的弧菌类群, 但数量上 *V. alginolyticus* 类似种仍然表现出季节分布特点——4 月份该类弧菌主要分布区域在深圳东部海域, 而 9 月份则主要分布于除珠江口上游区域外的西部海域, 由此我们认为深圳近海海域分布的 *V. alginolyticus* 类似种适宜生态分布温度可能在 26~ (29 ± 1) °C 之间, 低于其最适生长温度 (36 °C)。总体上 4 月份水温较低, 该类弧菌的平均数量高于 9 月份, 该结果有别于吴建平^[18] 的结论, 这种差别可能来自于年际的不同, 也可能来自于

研究区域的不同。

V. mytili 类似种也是一类在两个季节中都占一定优势地位的弧菌类群, 主要分布于近南海开阔水域(GDN064 站位), 其9月份的分布范围较4月份广。

V. natriegens 是一类嗜盐性弧菌, 生长速度非常快, 代时为 9.8 min。Mullenger 等^[19] 发现该类细菌生长速度快、代时短, 而且对人没有致病性, 是非常适合实验室操作使用的菌株, 但该类细菌属于许多水产养殖动物的条件致病菌^[20-22], 在养殖动物肠道中大量存在。Maeda 等^[23] 通过 16S rDNA PCR-RFLP 方法研究发现日本 Yoshimi 海湾温度在 20℃ 以上时分布着大量该类弧菌, 在 20℃ 以下则相对较少。本研究发现该类弧菌类似种在 9 月份(平均温度 30.6℃) 广泛而大量分布于深圳各海域, 而在 4 月份(平均温度 24.2℃) 则几乎未检测到, 可见该类弧菌的分布具有十分明显的季节特性。

V. parahaemolyticus 类似种、*V. harveyi* 类似种和 *V. fortis* 类似种在深圳海域仅有少量分布, 与以往的调查结果相差甚远^[18]。

本调查发现的弧菌种类与吴建平等^[18] 在深圳大亚湾养殖海域调查的弧菌种类相比, 除了溶藻弧菌仍为优势类群外, 其他差异则甚大, 主要原因在于所采用的鉴别方法不同以及采样的时间频率和范围等等存在差异。本文采用 16S rDNA PCR-RFLP 方法对弧菌进行分类, 再通过 DNA 序列分析进行鉴定, 16S rDNA 数据库是目前数据量最大、更新最快的核酸序列数据库, 是国际上菌种鉴定权威刊物《IJSEM》认可的分类依据之一, 因此通过这种方式得到的鉴定结果相对于传统的生理生化鉴定方法更

准确。

此外, 9 月份在各站位同时广泛分布着 *Halomonas* sp., *Psychrobacter* sp., *Pseudoalteromonas* sp., *Pseudomonas* sp.。在部分站位分布着 *Brevibacterium* sp., *Brachybacterium* sp., *Chromohalobacter* sp., *Oceanimonas* sp., *Oceanisphaera* sp., *Marinomonas* sp.。在 9 月份水温高的情况下这些细菌类群大量繁殖, 在多数站位中与弧菌竞争生态位, 在一定程度上占据主要生态地位, 并取代弧菌的分布, 导致弧菌的分离得率降低(10%~74%, 平均为 42.9%), 远低于 4 月份(42%~100%, 平均为 86%)。

3.3 弧菌数量及优势类群与环境因子的相关性

海洋中影响细菌分布的因素多种多样, 其中可利用的有机物和环境因素如温度、盐度和无机盐等对异养细菌产生重要影响, 环境条件与细菌之间的相互关系是非常重要的。

倪纯治^[24]、林美兰^[25] 对对虾养殖池弧菌数和环境因子进行相关和回归分析, 认为它们之间不存在相关性, 而吴建平^[11] 认为弧菌数量与部分环境因子存在相关性, 有些甚至相当密切。本次调查结论与吴建平等的相近, 弧菌总数与部分环境因子之间具有明显的相关性(表 5 和 6)。

细菌与环境因子相关性是比较复杂的, 当某类环境因子存在明显的数量变化时, 该因子对细菌的数量分布将起决定性作用。如珠江口的盐度变化, 此处的弧菌表现出与盐度间的极显著相关性, 在盐度低于 11 的水域没有分离到相关弧菌; 在海水养殖区域中有机物浓度是环境的主要影响因子, 对弧菌数量分布起主要影响作用, 两者之间呈明显正相关

表 5 各优势类群弧菌数量与环境因子的相关性(2008 年 4 月)

弧菌类群	水温 (22.85~26.53℃)	盐度 (17.19~33.78)	pH (7.77~8.24)	Chl a	细菌总数	粪大肠 菌群数	可培养 细菌总数
弧菌总数(n=8)	0.17	0.530 1	0.324 3	-0.107 2	0.592 9	-0.406 3	0.441 1
<i>V. gigantica</i> 类似种(n=6)	0.01	0.49	0.26	0.295 3	0.676 9	-0.366 3	0.579 5
<i>V. splendens</i> 类似种(n=7)	0.139 0	0.540 8	0.311 7	0.052 2	0.651 1	-0.398 7	0.585 6
<i>V. alginolyticus</i> 类似种(n=8)	0.6	0.64 ¹⁾	0.37	-0.760 3	0.056 1	-0.467 1	0.908 5 ²⁾
<i>V. cyclotrophicus</i> 类似种(n=4)	0.100 0	0.071 8	-0.193 7	0.530 1	0.561 5	0.771 0	-0.730 5

注: n=4: P=0.05 时, r=0.811 4; P=0.01 时, r=0.917 2。n=6: P=0.05 时, r=0.706 7; P=0.01 时, r=0.834 3。n=7: P=0.05 时, r=0.666 4; P=0.01 时, r=0.797 7。n=8: P=0.05 时, r=0.631 9; P=0.01 时, r=0.764 6。

1) 相关性显著; 2) 相关性极显著。

表 6 各优势类群弧菌数量与环境因子的相关性(2008 年 9 月)

弧菌类群	水温 (29.0~31.5℃)	盐度 (19.40~30.81)	pH (6.33~8.71)	Chf a	细菌总数	粪大肠 菌群数	可培养 细菌总数
弧菌总数(n=7)	-0.248 8	-0.213 4	-0.386 6	0.741 1 ¹⁾	0.578 8	-0.020 0	0.016 6
<i>V. alginolyticus</i> 类似种(n=7)	-0.576 3	-0.583 1	-0.813 5 ²⁾	0.042 9	0.364 5	-0.280 52	0.347 9
<i>V. natriegens</i> 类似种(n=6)	0.321 15	0.272 3	0.100 0	0.805 7 ^①	0.669 9	-0.183 1	-0.265 5

注: n=6: P=0.05 时, r=0.706 7; P=0.01 时, r=0.834 3。n=7: P=0.05 时, r=0.666 4; P=0.01 时, r=0.797 7。

1) 相关性显著; 2) 相关性极显著。

关系^[26]。当环境因子的数量变化不明显时, 即各环境因子都处于微量变化或弧菌适宜生存的范围时, 弧菌数量的变化与环境因子则没有明显的相关关系。因此, 在对不同研究结果进行比较时, 不能简单地比较相关系数, 还应该比较环境因子所处的尺度范围。

4 总结

(1) 本研究发现深圳海域的弧菌数量分布具有季节性分布特征, 表层水体中弧菌数量占可培养细菌数量最高达到 11.89%, 弧菌是海洋细菌中的优势类群之一, 表明弧菌在海洋生态系统的物质循环和能量流动占有重要的地位。

(2) 弧菌数量高发区出现在大亚湾养殖区以外的水域及东部海域开放水体, 表明弧菌并非陆源污染微生物, 而是海洋土著微生物类群。

(3) 深圳海域分布的可培养弧菌有 *V. gigantis*, *V. splendidus*, *V. alginolyticus*, *V. cyclitro-*

phicus, *V. rotiferianus*, *V. mytili*, *V. fortis*, *V. natriegens*, *V. parahaemolyticus* 和 *V. harveyi* 的类似种。各类优势弧菌分布都具有季节性: *V. alginolyticus* 类似种是两个季节的优势类群, 其平均数量 4 月份高于 9 月份; 4 月份特有的优势类群有 *V. gigantis* 类似种和 *V. splendidus* 类似种, 9 月份特有的优势类群有 *V. natriegens* 类似种。 *V. gigantis* 类似种在我国海域的分布为本文首次报道, 该弧菌在深圳海域分布广泛, 占据优势地位, 而且具有季节性分布特征。深圳海域分布的弧菌种类多数可引起人类或海洋生物的疾病, 是条件致病菌, 有些弧菌在特定季节具有爆发性发生的趋势, 应该引起相关疾病预防和预警部门的重视。

(4) 从季节变动来看, 弧菌平均数量春季高于秋季, 温度可能为弧菌分布的主要控制因子; 从不同海区弧菌数量分布状况来看, 外海区的数量高于河口区, 主要受盐度控制。

参考文献:

- [1] FARMER III J J, JANDA J M. *Vibrionaceae*[K]// BRENNER D J, KRIEG N R, STALEY J T, et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*[M], 2nd, vol. 2. Part B. Berlin: Springer Verlag KG, 2004: 491—540.
- [2] BALCÁZAR J L, GALLO-BUENO A, PLANAS M, et al. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from captive bred seahorses with disease symptoms[J]. *Antonie Leeuwenhoek*, 2010, 97(2): 207—210.
- [3] MAHMUD Z H, NEOGI S B, KASSU A, et al. Occurrence, seasonality and genetic diversity of *Vibrio vulnificus* in coastal seaweeds and water along the Kii Channel, Japan[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2008, 64(2): 209—218.
- [4] HSIEH J L, FRIES J S, NOBLE R T. *Vibrio* and phytoplankton dynamics during the summer of 2004 in a eutrophying estuary[J]. *Ecol Appl*, 2007, 17(5 Suppl): S102—S109.
- [5] HEDLUND B P, STALEY J T. *Vibrio cyclitrophicus* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon(PAH)-degrading marine bacterium[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, 51: 61—66.
- [6] RAMAIAH N, HILL R T, CHUN J, et al. Use of a *chiA* probe for detection of chitinase genes in bacteria from the Chesapeake Bay[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2000, 34(1): 63—71.
- [7] SHERR E B, SHERR B F. *Marine microbes: an overview*[M]// KIRCHMAN D L. *Microbial Ecology of the Oceans*. London: Wiley-Liss, 2000: 13—46.
- [8] SHERR EB, SHERR BF. Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs[J]. *Antonie Leeuwenhoek*, 2002, 81(F4):

293—308.

- [9] 国家海洋局 908 专项办公室. 海洋生物生态调查技术规程[S]. 北京: 海洋出版社, 2006.
- [10] HARRIAGUE A C, BRINO M D, ZAMPINI M, et al. Vibrios in association with sedimentary crustaceans in three beaches of the northern Adriatic Sea (Italy) [J]. Mar Pollut Bull, 2008, 56(3): 574—579.
- [11] 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.
- [12] 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]. J Clin Microbiol, 2000, 38(10): 3623—3630.
- [13] DRANCOURT M, BERGER P, RAOULT D. Systematic 16S rRNA gene sequencing of atypical clinical isolates identified 27 new bacterial species associated with humans[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(5): 2197—2202.
- [14] LE ROUX F, GOUBET A, THOMPSON F L, et al. *Vibrio gigantis* sp. nov., isolated from the haemolymph of cultured oysters (*Crassostrea gigas*) [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2005, 55: 2251—2255.
- [15] 韩善桥, 虞积耀, 姜涛, 等. 东南沿海海域海水细菌的分布[J]. 解放军预防医学杂志, 2008, 26(1): 18—21.
- [16] 吴玲, 张景隆, 倪语星, 等. 我国沿海五省市致病性弧菌的分布调查及病原学研究[J]. 中华流行病学杂志, 1998, 19(5): 301—303.
- [17] 赖福才, 王前, 周一平, 等. 南海西沙海域海水细菌学调查及药敏检测[J]. 第一军医大学学报, 2004, 24(3): 347—348.
- [18] 吴建平, 蔡创华, 周毅频, 等. 大亚湾网箱养殖水体弧菌种类组成及变化[J]. 湛江海洋大学学报, 2006, 26(4): 42—48.
- [19] MULLENGER L, GILL N R. *Vibrio natriegens*: a rapidly growing microorganism ideally suited for class experiments[J]. J Biol Educ, 1973, 7(5): 33—39.
- [20] 周海平, 李卓佳, 杨莹莹, 等. 乳酸杆菌 LH 对几种水产养殖病原弧菌的抑制作用[J]. 台湾海峡, 2006, 25(3): 388—395.
- [21] 王斌, 李华, 何幽峰. 引起中国对虾红腿病的两种新病原菌的研究[J]. 大连水产学院学报, 1993, 8(2-3): 43—48.
- [22] SARJITO, RADJASA O K, SABDONO A, et al. Phylogenetic diversity of the causative agents of vibriosis associated with groupers fish from Karimunjawa Islands, Indonesia[J]. Curr Res Bacteriol, 2009, 2(1): 14—21.
- [23] MAEDA T, MATSUO Y, FURUSHITA M, et al. Seasonal dynamics in a coastal *Vibrio* community examined by a rapid clustering method based on 16S rDNA[J]. Fish Sci, 2003, 69(2): 385—394.
- [24] 倪纯治, 林燕顺, 叶德赞, 等. 海水养虾池的几种致病弧菌生态[J]. 台湾海峡, 1995, 14(1): 73—79.
- [25] 林美兰, 倪纯治, 刘文华, 等. 厦门同安西柯对虾养殖池的细菌数量动态[J]. 台湾海峡, 1998, 17(2): 156—161.
- [26] BINSZTEIN N, COSTAGLIOLA M, PICHEL M, et al. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment of Argentina[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(12): 7481—7486.

The study on the diversity and distribution of vibrios and the correlation between them and their ambient environmental factors in Shenzhen coastal waters

CHEN Ming-xia^{1,4}, LI He-yang², LI Gang³, ZHENG Tian-ling¹, JIAO Kun^{1,2}, HAN Yong-sheng^{1,2}

(1. School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China; 3. Key Laboratory for Coastal and Atmospheric Research, PKU HKUST Shenzhen Hong Kong Institution Industry Education Research, Shenzhen 518048, China; 4. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The diversity and distribution of vibrios in Shenzhen coastal waters were studied, and the relationships between environmental factors and vibrio quantity were investigated. Results showed that the seasonal variations of culturable vibrios in Shenzhen coastal sea seemed to be obvious. In the east coastal sea, the number of marine vibrios in April (with an average value of 1.50×10^4 CFU/cm³) was higher than that in September (with an average value of 8.89×10^2 CFU/cm³), while in the west coastal sea, the number of marine vibrios in September (with an average value of 5.09×10^2 CFU/cm³) was higher than that in April (with an average value of 2.66×10^2 CFU/cm³). The highest number was detected in the Daya Bay. The seasonal variations of each dominant *Vibrio* sp. in the coastal waters indicate that *V. gigantis*-like

species and *V. splendidus*-like species were dominant in April with lower temperature, while *V. natr-iegens*-like species were dominant in September with higher temperature; *V. alginolyticus*-like species were the dominant group in both seasons, the average number of it in April are higher than that in September. The vibrios density showed certain relationship between temperature, salinity, pH, level of fecal coliforms, level of total bacteria and culturable bacteria, and the salinity controls the distribution of vibrios obviously.

Key words: Shenzhen coastal waters; diversity and distribution of vibrios; environmental factors