

两种培养基对对虾苗池海洋蛭弧菌的分离及其多样性分析

薛明 关敏丽 王飞燕 温崇庆*

(广东海洋大学 水产学院 广东 湛江 524025)

摘要:【目的】明确海水(Sw)和聚蛋白胨 20 (Pp20)两种双层琼脂培养基对海洋蛭弧菌的分离计数效果,了解对虾苗池可培养海洋蛭弧菌多样性。【方法】采用双层平板法,比较 Sw 和 Pp20 培养基对 2 株海洋蛭弧菌和对虾苗池未知海洋蛭弧菌的计数效果。通过宿主范围测试和 16S rRNA 基因序列分析评估两种培养基分离苗池海洋蛭弧菌的多样性。【结果】宿主菌含量高时,Sw 培养基对两株已知海洋蛭弧菌的计数值均显著高于($P<0.05$) Pp20。Sw 和 Pp20 培养基从同一苗池水样分别分离得到 21 和 22 株蛭弧菌。根据宿主裂解范围差异,43 株分离物可分为 15 种裂解模式,其中 Sw 和 Pp20 培养基各分离到 12 和 8 种。16S rRNA 基因序列分析表明,所有分离物都被鉴定为噬菌弧菌属(*Bacteriovorax*)菌株,并可分为 6 个类群,Sw 和 Pp20 培养基分别分离到 6 和 4 个类群。【结论】Sw 培养基在分离计数海洋蛭弧菌及其多样性检测上效果均优于 Pp20;对虾苗池可培养海洋蛭弧菌具有较高多样性,并以类群 XIII、X 及一个潜在新类群为优势种群。

关键词: 海洋蛭弧菌, 对虾苗池, 海水培养基, Pp20 培养基, 16S rRNA 基因, 多样性

Comparison of two media for isolation and diversity analysis of marine *Bdellovibrio*-and-like organisms in shrimp hatchery system

XUE Ming GUAN Min-Li WANG Fei-Yan WEN Chong-Qing*

(Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524025, China)

Abstract: [Objective] To isolate and enumerate marine *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALOs) by seawater (Sw) and polypeptone 20 (Pp20) double-layer agar media, and to reveal the diversity of cultivable marine BALOs in shrimp hatchery system. [Methods] We first compared the effects of the two media on enumeration of marine BALOs strains NA7 and NF1, as well as of BALOs in larval rearing water of *Litopenaeus vannamei*, then evaluated the diversities of BALOs isolated through prey range testing and 16S rRNA gene sequence analysis. [Results] Strains NA7 and NF1 both exhibited significantly higher ($P<0.05$) plaque numbers on Sw medium than on Pp20 medium if more prey bacteria were present. A total of 21 and 22 strains of BALOs were isolated from the same larviculture water by Sw and Pp20 media, respectively. According to prey range testing, 15 lytic

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31372536); 广东省自然科学基金项目(No. S2012040007698); 广东海洋大学大学生创新实验基金项目(No. 1056610002)

*通讯作者: Tel: 86-759-2339021; 邮箱: chongqingwen@163.com

收稿日期: 2014-04-10; 接受日期: 2014-06-11; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-06-12

patterns were differentiated from 43 isolates, of which 12 and 8 patterns corresponding to Sw and Pp20 were identified respectively. The 16S rRNA gene sequence analysis shows that all the BALOs isolates were affiliated to *Bacteriovorax* strains. Based on 97% sequence similarity, they could be divided into 6 phylogenetic clusters, and Sw and Pp20 media respectively recovered 6 and 4 clusters. **[Conclusion]** Medium Sw exhibited superior to medium Pp20 either for isolation and enumeration of marine BALOs or for diversity detection of their populations. The cultivable BALOs recovered from larviculture system of *L. vannamei* presented relatively high diversity. They all belong to the genus *Bacteriovorax* and are dominated by the clusters XIII, X and a potentially new cluster.

Keywords: Marine *Bdellovibrio*-and-like organisms, Shrimp hatchery system, Seawater medium, Pp20 medium, 16S rRNA gene, Diversity

蛭弧菌类生物(*Bdellovibrio*-and-like organisms, BALOs), 简称“蛭弧菌”, 是一类以裂解其它敏感革兰氏阴性菌为生的小型寄生性细菌, 具有独特生活周期: 游离的攻击期蛭弧菌识别、侵入并定居宿主菌周质空间中, 周质生长期蛭弧菌利用宿主细胞成分为营养进行丝状生长, 通过复分裂进行增殖, 最后裂解宿主并释放多个子代蛭弧菌细胞, 开始新一轮生活周期^[1]。蛭弧菌的这种捕食特性, 使其在替代抗生素生物防治有害细菌上具有显著应用价值和前景^[2]。在水产养殖实践中, 目前已有一些研究表明蛭弧菌具有防治水产养殖细菌病害的潜力^[3-5]。分类上, 蛭弧菌包括在 δ -变形细菌纲(Deltaproteobacteria)蛭弧菌目(*Bdellovibrionales*), 目前被分为两个科: 蛭弧菌科(*Bdellovibrionaceae*)和噬菌弧菌科(*Bacteriovoracaceae*)^[6]。其中海洋或嗜盐蛭弧菌迄今都归属于噬菌弧菌科, 普遍存在于各种咸水或高盐生境中, 在种的水平上至少可划分为 8 个类群和 3 个单一分离物^[7-9]。

蛭弧菌的分离培养和计数与噬菌体相似, 需要敏感宿主细菌, 故常用双层平板培养法, 上层培养基中加入宿主菌供其裂解以生长繁殖^[10]。分离计数海洋蛭弧菌的培养基通常需要海水配制, 目前主要使用含 0.1% 聚蛋白胨(Polypeptone)的双层琼脂培养基^[7-8]和不另加营养的双层琼脂培养基^[11-13], 也有用其它培养基分离海洋蛭弧菌的报道^[3,14-15]。不同培养基对同一类微生物的分离培养效果可能会有很大差异。目前, 对上述两种报道较多的培养基分离和计数海洋蛭弧菌的效果还未见比较研究,

因此在分离和检测海洋蛭弧菌时选用何种培养基更有效率尚不明确。

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*), 目前是世界, 尤其是我国养殖面积和产量最高的虾种。对虾产业可持续发展的首要问题是苗种供应, 其市场需求量巨大。而对虾育苗系统相对封闭, 仔虾期前通常很少甚至不换水, 同时由于饵料、残骸和排泄物的积累, 育苗水质易于恶化, 细菌大量滋生, 极易诱导细菌性特别是弧菌病害暴发, 造成幼体尤其是蚤状期幼体大量甚至全部死亡^[16]。因此如何有效预防弧菌病是对虾育苗中长期面临的突出问题。以往对海洋蛭弧菌的研究表明它们更易裂解与其分离自相同或相似环境的细菌, 特别是其中的弧菌^[7]。近年一些报道也都表明海洋蛭弧菌能有效消减或调控人工和自然养殖海水中弧菌含量^[15,17-18], 鉴此, 从对虾苗池分离海洋蛭弧菌用于幼体弧菌病的防治可能更显成效。但迄今为止, 还鲜见有从水产动物育苗环境分离海洋蛭弧菌的报道, 对其多样性更是缺乏认识。

本文在研究两种常用培养基对海洋蛭弧菌计数效果基础上, 结合凡纳滨对虾苗池可培养海洋蛭弧菌多样性研究, 进一步比较两种培养基分离未知海洋蛭弧菌的效率, 为更有效分离和检测海洋蛭弧菌提供方法依据, 并为利用海洋蛭弧菌生物防治对虾育苗期弧菌病害提供依据和基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*) zouA, 副溶血弧

菌(*V. parahaemolyticus*) zouB, 以下分别简称 zouA 和 zouB, 是以往分离鉴定的对虾幼体病原菌^[19], 用作本研究分离、培养和计数海洋蛭弧菌的宿主菌。噬菌弧菌(*Bacteriovorax*) NA7 和 NF1 是以往分离鉴定分别属于噬菌弧菌科类群IV和IX的海洋蛭弧菌^[13,20], 简称 NA7 和 NF1, 用于测试培养基对已知海洋蛭弧菌的检测效果。

盐单胞菌(*Halomonas* sp.) ZJ2214, 拉布伦茨氏菌(*Labrenzia* sp.) ZJ2801, 副球菌(*Paracoccus* sp.) ZJ2215, 假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp.) ZJ6102, *Thalassobius* sp. ZJ2407 和 *Phaeobacter* sp. ZJ3003 是本实验室从凡纳滨对虾正常育苗水体中分离鉴定的细菌; 哈氏弧菌(*V. harveyi*) LW1 是本实验室从发病对虾育苗水体中分离鉴定的细菌, 它们与 zouA、zouB 一同作为宿主裂解范围测试用菌株。

1.2 培养基

SWYE 培养基^[21], 用作本研究宿主菌的培养。

海水双层琼脂(Sw)培养基(g/L)^[13]: 底层琼脂 10, 上层琼脂 5, 海水配制。上层宿主细胞参考 Wen 等^[13]方法制备。

聚蛋白胨 20 双层琼脂(Pp20)培养基(g/L)^[22]: 聚蛋白胨 1, 底层琼脂 10, 上层琼脂 5, 海水配制。上层宿主细胞参考 Williams 等^[22]方法制备。

1.3 对虾苗池水样

采样苗场位于广西北海, 选择一个正常育苗的凡纳滨对虾苗池, 当幼体变态至蚤状 2-3 期时, 采集上层水样, 4 °C 运输和保存。采样时苗池水温、盐度和 pH 分别为 32.3 °C、32.1‰ 和 8.08。

1.4 两种培养基对已知海洋蛭弧菌的计数

取 zouB 为宿主菌培养的噬菌弧菌 NA7 攻击期细胞悬液, 用无菌海水做 10 倍梯度稀释。取连续 3 个梯度的稀释样 0.5 mL, 分别与 Sw 和 Pp20 培养基用的宿主菌 zouB 细胞混合, 加入融化并冷却至 42 °C 的相应上层培养基, 立即混匀并倾注到底层培养基上。两种培养基用宿主菌均设 5 个浓度使用, 即上层琼脂中宿主细胞初始含量分别设为

3×10^9 、 1×10^9 、 3×10^8 、 1×10^8 和 3×10^7 CFU/mL, 每种培养基每个梯度稀释样各做 3 个以上重复平板。根据 NA7 的适宜生长温度^[20], 采用 30 °C 培养, 连续培养 4 d, 每天观测平板上噬斑数量, 以某一梯度稀释样在平板上形成的平均噬斑数量表示, 以比较两种培养基及宿主细胞含量对 NA7 的计数效果。按同样方法, 比较两种培养基对 NF1 的检测效果。

1.5 两种培养基对对虾苗池海洋蛭弧菌分离计数

对虾苗池水样先以 1.2 μm 滤膜过滤, 以去除原生动物和较大颗粒性杂质, 以过滤后的水样为原液做 10 倍梯度稀释^[13]。参考 1.4 中双层平板法, 采用 Sw 和 Pp20 培养基, 分别以溶藻弧菌 zouA 和副溶血弧菌 zouB 为宿主菌检测苗池水样蛭弧菌。宿主菌在上层琼脂中用量按其两种培养基通常使用量^[13,22]进行。水样采集后, 3 h 内完成上述处理。25 °C 培养 7 d^[13], 每天观测平板上噬斑数量及杂菌生长情况等, 以比较两种培养基不同宿主条件下对同一苗池中未知海洋蛭弧菌的培养计数效果。

以 zouB 为宿主菌计数的同时, 从 Sw 和 Pp20 平板上分别随机挑取大小不一且充分分散的噬斑各 35 个, 再以双层琼脂平板单斑纯化 3 次以上, 编号保存备用。

1.6 宿主裂解范围

参考温崇庆等^[20]方法, 以液体培养法测试蛭弧菌分离物对副溶血弧菌 zouB (阳性对照), 溶藻弧菌 zouA, 哈氏弧菌 LW1, 盐单胞菌 ZJ2214, 副球菌 ZJ2215, 假交替单胞菌 ZJ6102, 拉布伦茨氏菌 ZJ2801, *Thalassobius* sp. ZJ2407 和 *Phaeobacter* sp. ZJ3003 的裂解能力。取 zouB 为宿主菌培养的各蛭弧菌攻击期培养液 0.1 mL, 分别接种于各测试菌为宿主的海水宿主菌培养基中(10 mL 螺口试管装 1.2 mL), 同时做不接种裂解液只接种无菌海水的阴性对照, 30 °C、180 r/min 振荡培养。连续 4 d, 每天观察蛭弧菌对上述细菌的裂解情况。与阴性对照相比宿主菌浊度明显变清澈者为裂解阳

性, 记为“+”, 反之则为阴性, 记为“-”。每个样品做 2 个平行管, 结果一致时给出结论性判断, 不一致时则以重复试验为准。根据宿主范围差异, 区分海洋蛭弧菌的宿主裂解模式。

1.7 对虾苗池海洋蛭弧菌分离物的 16S rRNA 基因序列分析

采用细菌基因组试剂盒(OMEGA, D3350-01), 提取蛭弧菌裂解培养物的基因组 DNA。以噬菌弧菌科特异的 16S rRNA 基因引物 Bac676F (5'-ATTTCGCATGTAGGGGTA-3')和 Bac1442R (5'-GCCACGGCTTCAGGTAAG-3')^[23]PCR 扩增各菌株 DNA。PCR 反应体系和条件按 Wen 等^[13]方法进行。

阳性 PCR 扩增产物委托上海生工生物工程有限公司完成测序。通过 NCBI BLAST 程序与 GenBank 中的核酸序列数据进行比对分析, 调出相似性最高且有效发表的典型菌株序列, 结合噬菌弧菌科不同类群代表菌株及噬菌蛭弧菌(*Bdellovibrio bacteriovorus*)模式菌株的 16S rRNA 基因序列, 通过 MEGA 5.0 软件以 ClustalW 进行序列比对, 以 Kimura-2 模型估算系统进化矩阵, 采用邻接法(Neighbor-Joining)法构建系统进化树, 并自举(Bootstrap) 1 000 次分析评估进化树的拓扑稳定性。根据已报道的噬菌弧菌科类群信息^[8], 以 97% 序列相似性划分本研究海洋蛭弧菌分离物的系统类群。同时, 以 99%序列相似性为标准进一步评估群内分离物的系统多样性。

1.8 统计分析

采用 SPSS 15.0 软件对两种培养基检测的噬斑数量作统计分析, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对海洋蛭弧菌 NA7 和 NF1 的检测结果, 采用单因素方差分析(ANOVA)统计显著性, 并用 Tukey B 进行多重比较; 对苗池水体噬斑数量采用独立样本 t 检验; 检验标准均为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 两种培养基对已知海洋蛭弧菌计数结果

两种培养基对已知海洋蛭弧菌 NA7 和 NF1 某

一稀释样 30 °C 培养 4 d 时, 每一平板上的平均噬斑数量如表 1 所示。宿主菌用量不同时, Pp20 培养基检测到的 NA7 或 NF1 噬斑数量间并无明显差异($P > 0.05$), 但均显著低于($P < 0.05$)高含量宿主菌($\geq 10^9$ CFU/mL)时 Sw 培养基的计数结果。同时, Sw 平板上噬斑出现时间较 Pp20 早 12 h 左右, 因此噬斑相对更大。但宿主菌用量较少时, Sw 培养基计数效率会显著下降, 甚至因宿主背景太淡而无法观察计数噬斑。

2.2 两种培养基对苗池海洋蛭弧菌计数结果

25 °C 培养 7 d 时, 两种培养基对同一苗池水样海洋蛭弧菌检测结果如表 2 所示。不同弧菌为宿主菌时, Sw 培养基计数值均显著高于($P < 0.05$) Pp20 的。与检测已知海洋蛭弧菌相似, Sw 平板上蛭弧菌噬斑出现时间较 Pp20 早 12 h 左右, 因此总体上相对较大。尤其是与 Pp20 平板上有较多杂菌菌落相比, Sw 平板上极少见到杂菌, 因此噬斑相对更清晰和易于辨认。图 1 所示是 *zouB* 为宿主菌

表 1 Sw 和 Pp20 培养基对海洋蛭弧菌 NA7 和 NF1 的计数			
Table 1 Enumeration of marine BALOs NA7 and NF1 by Sw and Pp20 media			
培养基 Media	宿主菌含量 Prey concentration (CFU/mL)*	噬斑数量 Plaques number (PFU/plate)	
		NA7	NF1
Sw	3×10^9	$104 \pm 12^{**}$	203 ± 14^a
	1×10^9	99 ± 11^a	195 ± 12^a
	3×10^8	66 ± 12^b	161 ± 35^{ab}
	1×10^8	30 ± 3^c	38 ± 8^c
	3×10^7	ND***	ND
Pp20	3×10^9	65 ± 7^b	147 ± 9^b
	1×10^9	65 ± 9^b	136 ± 12^b
	3×10^8	63 ± 14^b	131 ± 10^b
	1×10^8	62 ± 7^b	140 ± 13^b
	3×10^7	56 ± 10^b	125 ± 26^b

注: *: 宿主细胞在上层琼脂中初始浓度; **: 同一列数据上标不同字母者表示差异显著($P < 0.05$); ND***: 未决定, 因宿主背景太淡无法计数。

Note: *: Initial concentration of prey cell in top-layer agar; **: Means with different superscript letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$); ND***: Not determined, as the prey background was too light to count.

表 2 Sw 和 Pp20 培养基对凡纳滨对虾溞状期苗池海洋蛭弧菌的计数		
Table 2 Enumeration of marine BALOs from larval rearing water of <i>L. vannamei</i> at zoea stage by Sw and Pp20 media		
培养基 Media	BALOs 数量	
	BALOs number (PFU/mL)	
	溶藻弧菌 <i>zouA</i> 为宿主 <i>V. alginolyticus</i> <i>zouA</i> as prey	副溶血弧菌 <i>zouB</i> 为宿主 <i>V. parahaemolyticus</i> <i>zouB</i> as prey
Sw	375±59 ^{a*}	413±72 ^a
Pp20	185±33 ^b	207±25 ^b

注：*：同一列数据上标不同字母者表示差异显著($P<0.05$)。
Note: *: Means with different superscript letters in the same column are significantly different ($P<0.05$).

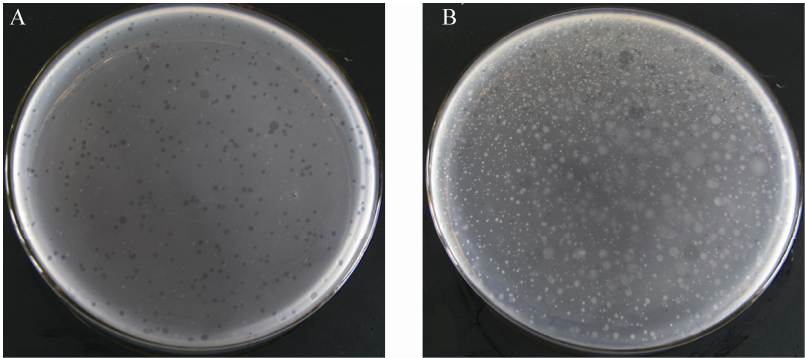


图 1 Sw (A)和 Pp20 (B)培养基对对虾苗池水样海洋蛭弧菌的培养

Figure 1 The plate cultures of marine BALOs from shrimp larviculture water examined by Sw (A) and Pp20 (B) media

注：25 °C 培养 60 h.

Note: Cultured at 25 °C with 60 h.

时,对苗池水样原液培养 60 h 两种平板上噬斑和杂菌的生长情况。此外,无论是 Sw 还是 Pp20 培养基, *zouB* 为宿主时对苗池水样噬斑的检出值均高于 *zouA* 为宿主时,但两者间并无显著性差异($P>0.05$)。

2.3 对虾苗池海洋蛭弧菌宿主裂解模式

鉴于 *zouB* 为宿主时对苗池水样检出的噬斑数量相对更高,故以其为宿主菌分离海洋蛭弧菌。最终, Sw 和 Pp20 培养基从同一苗池水样分别分离纯化到 21 和 22 株噬斑分离物,编号分别以字母 S 和 P 加数字表示(表 3)。宿主裂解范围测试显示: 43 株分离物对 3 种测试弧菌均能有效裂解,而对其他 6 种细菌则表现差异裂解(表 3)。根据宿主裂解差异,可将 43 株分离物区分成 15 种裂解模式。其中菌株 S3、S6、S9、S22、S27、S28、S33、P16

和 P29 各自为独立模式;菌株 P11 和 P13 为同一种模式,其余 5 种为两种培养基分离物共有。因此, Sw 和 Pp20 培养基分离的海洋蛭弧菌分别包含 12 和 8 种裂解模式。

2.4 对虾苗池海洋蛭弧菌的鉴定和系统发育分析

对噬斑分离物基因组 DNA 的 PCR 扩增和测序分析表明,所有分离物都可被噬菌弧菌科特异引物扩增,并鉴定为噬菌弧菌属蛭弧菌,其 16S rRNA 基因序列在 GenBank 登录号为 JX134955–JX134997。16S rRNA 基因序列系统进化树分析显示(图 2), 43 株海洋蛭弧菌在 97% 的序列相似性水平上可划归为 6 个系统类群,其中 5 个(III, IX, X, XI, XIII)是已知类群,另有 9 个菌株组成一个潜在的新类群,以代表菌株 P10 表示。本研究对虾

表 3 43 株海洋蛭弧菌对 6 种细菌的裂解 Table 3 Lysis of 43 strains of marine BALOs to 6 bacterial species							
蛭弧菌分离物 BALOs isolates		宿主细菌 Prey bacteria					
编号 ID	类群 Cluster	<i>Halomonas</i> sp. ZJ2214	<i>Labrenzia</i> sp. ZJ2801	<i>Paracoccus</i> sp. ZJ2215	<i>Phaeobacter</i> sp. ZJ3003	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. ZJ6102	<i>Thalassobius</i> sp. ZJ2407
S1	XI	—	—	—	—	+	+
S2	X	—	—	—	—	+	+
S4	IX	—	—	—	—	+	+
S7	X	—	—	—	—	+	+
S8	X	—	—	—	—	+	+
P1	X	—	—	—	—	+	+
P2	X	—	—	—	—	+	+
P4	X	—	—	—	—	+	+
P5	X	—	—	—	—	+	+
P6	X	—	—	—	—	+	+
P7	XI	—	—	—	—	+	+
P8	X	—	—	—	—	+	+
P9	XI	—	—	—	—	+	+
S11	XIII	—	+	+	+	—	+
S17	P10	—	+	+	+	—	+
S18	XIII	—	+	+	+	—	+
S26	XIII	—	+	+	+	—	+
S34	XIII	—	+	+	+	—	+
P14	XIII	—	+	+	+	—	+
P18	XIII	—	+	+	+	—	+
P22	XIII	—	+	+	+	—	+
P23	P10	—	+	+	+	—	+
P25	XIII	—	+	+	+	—	+
P33	XIII	—	+	+	+	—	+
S13	P10	+	+	+	—	—	+
S21	XIII	+	+	+	—	—	+
P15	P10	+	+	+	—	—	+
P27	XIII	+	+	+	—	—	+
S25	XIII	+	+	+	+	—	+
P20	P10	+	+	+	+	—	+
S35	P10	+	—	+	+	—	+
P10	P10	+	—	+	+	—	+
P11	XIII	—	+	+	—	—	+
P13	XIII	—	+	+	—	—	+
S3	X	—	—	—	—	—	+
S6	III	—	—	+	—	+	+
S9	XIII	+	+	+	+	+	—
S22	XIII	—	+	+	—	—	—
S27	XIII	+	+	+	+	+	+
S28	P10	+	—	+	—	—	+
S33	XIII	—	+	+	+	+	+
P16	P10	+	—	+	+	—	—
P29	XIII	—	—	+	+	—	+

注：+：阳性裂解；—：不裂解。
Note: +: Positive lysis; —: No lysis.



图 2 对虾苗池海洋蛭弧菌分离物 16S rRNA 基因序列系统进化树

Figure 2 Phylogenetic tree of marine BALOs isolates from a shrimp hatchery system based on the 16S rRNA gene sequences
注: 系统树由 MEGA 5 软件 Kimura 2 参数模型构建, 比对时删除所有缺失位点; 括号内为序列登录号; 分支旁的数字为自展 1 000 次超过 80% 的置信值; 标尺代表 1% 的序列差异; Cluster I–XIII 和 Cluster P10 表示基于 97% 序列相似性基础上划分的噬菌弧菌科系统类群。
Note: The tree was constructed through MEGA 5 with Kimura 2-parameter model and complete deletion treatment for gaps and missing data. GenBank accession numbers are provided in the parentheses. Numbers at each branch point indicate the percentage supported by bootstrap values based on 1 000 replications. Bootstrap values > 80% are shown at branching points. The scale bar indicates 0.01 substitutions per nucleotide position. Cluster I to XIII and Cluster P10 are phylogenetic clusters of the family Bacteriovoraceae based on 97% sequences similarity.

苗池可培养海洋蛭弧菌以类群 XIII、X 和 P10 为绝对优势菌, 分别占总分离物的 44.2%、23.3% 和 20.9%。类群 XI 包含 3 株分离物。两种培养基均可分离到上述 4 种类群, 而 Sw 培养基还分离到属于类群 III 和 IX 的海洋蛭弧菌各一株。若以 99% 序列相似性为标准, 可进一步将类群 XIII 和 X 的分离物分别划分两个亚群, 即类群 XIII 中 S21 和 S22 菌株, 类群 X 中 S3 菌株分别与其所在群中其他菌株区分开; 而其余 4 个类群(III, IX, XI, P10) 分离物仍各自聚为同一系统型。因此, 在 99% 序列相似性水平上, Sw 培养基分离蛭弧菌的系统型数量较 97% 水平上又增加了 2 个, 而 Pp20 培养基分离物仍然属于 4 个系统型。

3 讨论

已有研究表明, 分离培养蛭弧菌时除宿主菌外, 培养基中的其他营养成分对其分离计数结果也有显著影响。如 Stolp 和 Starr^[24]最初用双层平板法分离和研究陆生蛭弧菌时, 就注意到低营养的培养基限制宿主菌生长而有利于蛭弧菌对宿主的裂解。Taylor 等^[25]研究夏威夷沿海蛭弧菌时, 也发现低营养盐的基础培养基较营养丰富的酵母提取物更有利于海洋蛭弧菌生长。Williams 等^[7]比较了包括 Pp20 等在内的多种培养基及不同营养盐含量条件下对海洋蛭弧菌的培养计数效果, 结果显示 Pp20 培养基最有效。但其研究未报道无营养盐培养基的计数效果。而国内在继杨淑专和黄庆辉^[11]率先用无营养盐的海水双层琼脂培养基分离计数海洋蛭弧菌后, 谢群英等^[12]比较了海水双层琼脂培养基上层营养盐(营养肉汤)含量对海洋蛭弧菌培养计数的影响, 结果显示营养盐含量较高时海洋蛭弧菌计数效率明显下降, 且平板上容易滋生大量杂菌, 以至噬斑模糊甚至看不到, 而无营养盐的 Sw 培养基计数效率高的同时, 噬斑清晰且无杂菌。本研究对两株已知海洋蛭弧菌及对虾苗池未知蛭弧菌的培养计数也表明 Sw 培养基较 Pp20 具有更高的检测效率。

Sw 和 Pp20 培养基相比, 除后者含有 0.1% 的聚蛋白胨成分之外, 两种培养基所用宿主菌的制备过程与使用浓度也有所差异。Sw 培养基用宿主菌培养后需通过离心和漂洗等步骤去除残留营养, 再用无菌海水调配成高浓度菌悬液^[11-13]; Pp20 培养基用宿主菌, 培养收集调整含量后即可直接使用, 一般无需漂洗^[22], 因此还会残留少量营养。Sw 培养基除海水和宿主菌自带的少量营养外, 无额外营养, 宿主细胞在上层琼脂中难以有效生长, 因此, 上层中需加入较高含量宿主细胞以形成一定浊度背景, 从而有利于蛭弧菌噬斑的形成和观察。本研究对两株海洋蛭弧菌检测显示(表 1), *zouB* 在 Sw 上层琼脂中初始含量大于或等于 10^9 CFU/mL 时, 宿主背景浊度高, 才可有效计数。而 Pp20 培养基所含的聚蛋白胨营养丰富, 可有效支撑宿主菌继续生长并形成浑浊背景, 因此其上层初始宿主菌含量并不需要太高, 且含量差异较大时, 如本研究 Pp20 上层中最高和最低宿主细胞含量相差 100 倍时(表 1), 计数结果间并无显著差异。对已知菌株或苗池海洋蛭弧菌检测时, Pp20 培养基计数值均显著低于高含量宿主时 Sw 检测值, 噬斑形成时间也相对推迟。其原因很可能是 Pp20 上层中宿主菌可继续生长, 从而延缓蛭弧菌对宿主细胞的裂解速度; 宿主菌生长时产生的代谢物一定程度上抑制了蛭弧菌的裂解作用, 或引起培养基理化环境改变而影响噬斑的形成。同时, Pp20 培养基营养较丰富, 易于滋生杂菌。杂菌过多时, 也会抑制蛭弧菌的生长或掩盖其噬斑, 从而影响计数效率。可见, 聚蛋白胨的有无是影响两种培养基计数效率差异的最主要原因, 同时宿主菌的制备和用量的不同也一定程度上增加了这种差异。

以往研究表明副溶血弧菌是目前最有效检测海洋蛭弧菌的宿主菌^[7]。同时副溶血弧菌是引起对虾幼体弧菌病的常见病原之一^[19,26]。因此, 本研究主要以副溶血弧菌为宿主比较两种培养基对海洋蛭弧菌的计数和分离差异。而对苗池蛭弧菌计数时, 另以溶藻弧菌为宿主菌。溶藻弧菌也是分离计

数海洋蛭弧菌常用宿主菌^[7,13], 并且也是对虾幼体弧菌病病原之一^[19,26]。以这两种弧菌为宿主菌计数苗池海洋蛭弧菌时, Sw 培养基计数值均显著高于 Pp20 的(表 2), 与以副溶血弧菌为宿主菌计数 NA7 和 NF1 的结果一致(表 1)。这表明 Sw 较 Pp20 培养基能更有效地计数海洋蛭弧菌并不因宿主菌种的改变而受影响。

迄今, 不同培养基对分离蛭弧菌多样性效率的研究尚未见报道, 尽管以往研究已明确不同宿主菌对蛭弧菌的分离计数可能产生显著影响^[7]。本研究首先通过宿主裂解范围测试比较 Sw 和 Pp20 培养基分离同一苗池海洋蛭弧菌的表型多样性。宿主裂解范围测试是蛭弧菌研究中常用方法, 尽管该方法在蛭弧菌系统分类和鉴定上并不能提供准确依据, 但却可有效区分蛭弧菌菌株间的表型差异和了解这些捕食者对特定细菌类群的可能影响, 因此具有重要的生态学意义^[7]。用于本研究宿主范围测试的 9 种细菌中, 3 种弧菌是引起对虾幼体弧菌病的最主要菌种^[16,19,26]。另外 6 个不同属的菌株均来自健康对虾育苗水体, 还极少见相关属的菌种是对虾幼体病原菌的报道。两种培养基从同一苗池水样中共分离得到的 43 株蛭弧菌, 根据宿主裂解差异, 鉴定出 15 种裂解模式(表 3), Sw 和 Pp20 培养基分别分离和检测到其中的 12 和 8 种裂解模式。因此, 从分离蛭弧菌表型多样性上看, Sw 培养基明显高于 Pp20 的。本研究进一步以 16S rRNA 基因序列 97%相似性为标准将 43 株分离物划分为 6 个系统类群, 21 株 Sw 分离物覆盖了所有类群, 而 22 株 Pp20 分离物只包括 4 个最优势类群(表 3 和图 2)。若以 99%序列相似性作为系统分型标准, 则可划分为 8 个系统型, Sw 培养基仍然分离到所有类型, 而 Pp20 分离物依旧只有 4 个类型。可见, Sw 培养基在分离海洋蛭弧菌系统多样性上也较 Pp20 具有明显优势。

双层平板法检测的海洋蛭弧菌含量通常只占实际数目的 1%以下^[27], 因此根据苗池可培养海洋

蛭弧菌计数结果(表 2), 本研究凡纳滨对虾溞状期水体海洋蛭弧菌实际含量应远高于 10^4 PFU/mL。本研究所有海洋蛭弧菌分离物都以副溶血弧菌为宿主分离纯化的, 除副溶血弧菌外, 所有分离物还都能裂解供试的溶藻弧菌和哈氏弧菌, 显示海洋蛭弧菌对弧菌的偏好性裂解^[7], 也暗示着对虾苗池中海洋蛭弧菌极可能对弧菌含量及其种群结构产生深刻影响。对同样来源于对虾育苗环境的 6 种其他细菌, 蛭弧菌分离物则表现出差异性裂解。对虾苗池海洋蛭弧菌的这种偏好性与差异性以及较高含量的优势, 为进一步筛选裂解对虾幼体病原弧菌而不滥杀有益菌的特异蛭弧菌菌株提供了可能性。

对苗池海洋蛭弧菌分离物的分子鉴定结果表明, 它们都属于噬菌弧菌属, 这与以往报道几乎所有海洋蛭弧菌分离物都属于该属的结果一致^[8,13]。本研究所得 43 株海洋蛭弧菌覆盖了 6 个系统类群, 包含了 15 种裂解模式, 代表着 15 种表型, 说明对虾苗池海洋蛭弧菌蕴含着丰富的生理生态多样性, 这也是迄今从同一环境样品中分离出最多海洋蛭弧菌类群的报道。其中最优势的是类群 XIII, 共有 19 株分离物。该类群蛭弧菌以往只报道过 2 株, 分别来源于地中海和大盐湖^[8]; 其次是类群 X, 类群 X 海洋蛭弧菌较普遍存在于不同来源咸水环境中^[8,13]; 由 9 株分离物组成的类群 P10 构成一个以往未分离过的潜在新类群或新种, 系统树上该类群与类群 XIII 进化距离最近。有 3 株分离物属于类群 XI, 与类群 X 相似, 该类群海洋蛭弧菌也较普遍存在于不同来源咸水环境中^[8]。而以往报道咸水环境中最普遍存在的类群 III 和类群 IX 海洋蛭弧菌^[8], 在本研究中只从 Sw 培养基各分离到一株。上述分离物特点不仅表明凡纳滨对虾苗池可培养海洋蛭弧菌具有较高的多样性, 还暗示对虾育苗水体中或许存在特定的优势蛭弧菌类群。

本研究比较了目前最常用两种海洋蛭弧菌培养基的分离和计数效果, 明确了 Sw 培养基无论在计数还是分离海洋蛭弧菌多样性上都优于 Pp20 培

培养基;率先揭示凡纳滨对虾苗池可培养海洋蛭弧菌在生态表型和种群水平上都具有较高多样性;分离鉴定到6个类群43株海洋蛭弧菌,并发现了一个新的潜在海洋蛭弧菌类群,为进一步利用海洋蛭弧菌生物防治对虾育苗期弧菌病害提供了依据和基础。此外,由于分离培养方法的固有局限性,苗池海洋蛭弧菌的实际类群数应远多于6个。因此,今后在广泛采样基础上结合培养和免培养分子生态学技术,将更有助于阐明对虾育苗环境海洋蛭弧菌种群多样性及其结构特点。

参考文献

- [1] Jurkevitch E, Davidov Y. Phylogenetic diversity and evolution of predatory prokaryotes[A]//Jurkevitch E. Predatory Prokaryotes[M]. Berlin: Springer, 2007: 11-56.
- [2] Dwidar M, Monnappa AK, Mitchell RJ. The dual probiotic and antibiotic nature of *Bdellovibrio bacteriovorus*[J]. Biochemistry and Molecular Biology Reports, 2012, 45(2): 71-78.
- [3] 储卫华, 朱卫, 康春涛. 海洋蛭弧菌的分离鉴定及其对副溶血弧菌的作用[J]. 微生物学通报, 2009, 36(1): 20-24.
- [4] Chu WH, Zhu W. Isolation of *Bdellovibrio* as biological therapeutic agents used for the treatment of *Aeromonas hydrophila* infection in fish[J]. Zoonoses and Public Health, 2010, 57(4): 258-264.
- [5] Cao H, Hou S, He S, et al. Identification of a *Bacteriovorax* sp. isolate as a potential biocontrol bacterium against snakehead fish-pathogenic *Aeromonas veronii*[J]. Journal of Fish Diseases, 2014, 37(3): 283-289.
- [6] Davidov Y, Jurkevitch E. Diversity and evolution of *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALOs), reclassification of *Bacteriovorax starrii* as *Peredibacter starrii* gen. nov., comb. nov., and description of the *Bacteriovorax-Peredibacter* clade as *Bacteriovoracaceae* fam. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(5): 1439-1452.
- [7] Williams HN, Piñeiro S. Ecology of the predatory *Bdellovibrio* and like organisms[A]//Jurkevitch E. Predatory Prokaryotes[M]. Berlin: Springer, 2007: 213-248.
- [8] Pineiro SA, Stine OC, Chauhan A, et al. Global survey of diversity among environmental saltwater *Bacteriovoracaceae*[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(10): 2441-2450.
- [9] Piñeiro SA, Williams HN, Stine OC. Phylogenetic relationships amongst the saltwater members of the genus *Bacteriovorax* using *rpoB* sequences and reclassification of *Bacteriovorax stolpii* as *Bacteriolyticum stolpii* gen. nov., comb. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(5): 1203-1209.
- [10] Koval SF. The search for hunters: culture-dependent and-independent methods for analysis of *Bdellovibrio* and like organisms[A]//Jurkevitch E. Predatory Prokaryotes[M]. Berlin: Springer, 2007: 191-211.
- [11] 杨淑专, 黄庆辉. 海洋噬菌蛭弧菌对对虾病原菌及其他细菌的寄生作用[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 1997, 36(3): 449-453.
- [12] 谢群英, 房文红, 乔振国. 海水蛭弧菌分离纯化方法初步研究[J]. 海洋渔业, 2006, 28(3): 211-216.
- [13] Wen CQ, Lai XT, Xue M, et al. Molecular typing and identification of *Bdellovibrio*-and-like organisms isolated from seawater shrimp ponds and adjacent coastal waters[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 106(4): 1154-1162.
- [14] 彭宗辉, 蔡俊鹏, 吴冰, 等. 两株海洋蛭弧菌的分离及生物学性质[J]. 微生物学报, 2008, 48(11): 1425-1431.
- [15] Li H, Liu C, Chen L, et al. Biological characterization of two marine *Bdellovibrio*-and-like organisms isolated from Daya bay of Shenzhen, China and their application in the elimination of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 151(1): 36-43.
- [16] 徐怀恕, 杨学宋, 李筠. 对虾育苗期细菌病害的诊断与控制[M]. 北京: 海洋出版社, 1999: 10-51, 146-152.
- [17] 温崇庆, 丁贤, 薛明, 等. 一株海洋蛭弧菌类生物对海水细菌的生物控制和水质的影响[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2008, 47(3): 85-88.
- [18] Richards GP, Fay JP, Dickens KA, et al. Predatory bacteria as natural modulators of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in seawater and oysters[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(20): 7455-7466.
- [19] 温崇庆, 薛明, 何红, 等. 两株对虾幼体弧菌病原的分离和鉴定[J]. 微生物学通报, 2008, 35(3): 346-352.
- [20] 温崇庆, 薛明, 周世宁. 四个类群海洋蛭弧菌类生物生长特性的比较[J]. 微生物学通报, 2009, 36(6): 815-820.
- [21] Kaneko T, Colwell RR. The annual cycle of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay[J]. Microbial Ecology, 1978, 4(2): 135-155.
- [22] Williams HN, Falkler WA, Shay DE. Seasonal distribution of bdellovibrios at the mouth of the Patuxent River in the Chesapeake Bay[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1982, 28(1): 111-116.
- [23] Davidov Y, Friedjung A, Jurkevitch E. Structure analysis of a soil community of predatory bacteria using culture-dependent and culture-independent methods reveals a hitherto undetected diversity of *Bdellovibrio*-and-like organisms[J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(9): 1667-1673.
- [24] Stolp H, Starr MP. *Bdellovibrio bacteriovorus* gen. et sp., a predatory, ectoparasitic, and bacteriolytic microorganism[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1963, 29(1): 217-248.
- [25] Taylor VI, Bauman P, Reichelt JL, et al. Isolation, enumeration, and host range of marine *Bdellovibrios*[J]. Archives of Microbiology, 1974, 98(1): 101-114.
- [26] Aguirre-Guzmán G, Vázquez-Juárez R, Ascencio F. Differences in the susceptibility of American white shrimp larval substages (*Litopenaeus vannamei*) to four *Vibrio* species[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2001, 78(4): 215-219.
- [27] Zheng G, Wang C, Williams HN, et al. Development and evaluation of a quantitative real-time PCR assay for the detection of saltwater *Bacteriovorax*[J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(10): 2515-2526.