

TCBS 培养基筛选的虾池细菌分析

韩 宁^{1,2}, 李卓佳², 曹煜成², 胡晓娟², 王奕玲^{1,2}

(1.大连海洋大学生命科学与技术学院,辽宁 大连 116000;2.中国水产科学研究院南海水产研究所,广东 广州 510300)

摘要:通过 TCBS 培养基分离筛选对虾养殖水体中的细菌,采用 16S rDNA 分子生物学方法和 Biolog 微生物自动分析系统进行鉴定分析。结果显示:以 TCBS 培养基分离筛选的 60 株菌中,采用 16S rDNA 分子生物学方法鉴定,只有 SWG-27、SWG-28、SWG-29 为弧菌属,占总鉴定细菌的 5%,其他细菌大部分为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)和大洋芽孢杆菌属(*Oceanobacillus* sp.),分别占总鉴定细菌的 36.7%和 43.3%;自 60 株细菌中随机挑选 15 株作 Biolog 微生物自动分析系统鉴定,弧菌属细菌也只占很小比例;60 株细菌接种于 6 种不同品牌的 TCBS 培养基上均可很好地生长。结果表明,TCBS 培养基能够培养养殖水体中的弧菌,但其他细菌也能在其上良好生长,利用 TCBS 培养基检测养殖水体弧菌数量的结果值得商榷。

关键词:TCBS 培养基; 16S rDNA; Biolog; 虾池**中图分类号:**S917.1**文献标识码:**A**文章编号:**1004-874X(2012)07-0141-04

Analysis on bacteria screened from TCBS culture medium in shrimp ponds

HAN Ning^{1,2}, LI Zhuo-jia², CAO Yu-cheng², HU Xiao-juan², WANG Yi-ling^{1,2}

(1.College of Life Science and Technology,Dalian Ocean University,Dalian 116000, China;

2.South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences,Guangzhou 510300, China)

Abstract: Using TCBS culture medium, some bacteria were isolated and screened from *Litopenaeus vannamei* culture ponds., and they were identified by 16S rDNA and Biolog identification system. The results of 16S rDNA showed that among 60 strains, SWG-27, SWG-28, SWG-29 were *Vibrio* sp. These only accounted for 5% of all the identified bacteria. Most of them were *Bacillus* sp. and *Oceanobacillus* sp., which accounted for 36.7% and 43.3%. We selected 15 strains from the 60 bacteria, with Biolog we knew that most of the 15 bacteria were not *Vibrio* sp.. Only one bacteria was *Vibrio* sp., others were *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., etc. And all the bacteria we selected could grow well on 6 different TCBS culture mediums. The results demonstrated that *Vibrio* sp. could be cultivated using TCBS culture medium. However, other bacteria also could grow well on TCBS culture medium. Therefore, it is worth to discuss on using TCBS medium to test the quantity of *Vibrio* sp.. We could use molecular method and biology method to identify *Vibrio* sp. accurately.

Key words: TCBS culture medium; 16S rDNA; Biolog; shrimp pond

随着对虾养殖业集约化的发展,对虾疾病已成为制约产业健康发展的瓶颈。虾病的发生是其机体自身免疫力、病原生物及环境条件等多种因素相互作用的结果^[1],其中弧菌病是对虾养殖中常见且危害较严重的一类疾病。弧菌是养殖环境和水产动物体内的正常菌群之一,是环境污染的指示菌,同时也是对虾养殖的条件致病菌(opportunistic pathogen)。大多数病原性弧菌在外界环境条件恶化、对虾体质衰弱时大量繁殖,导致弧菌病的爆发和迅速蔓延^[2];而少量的对虾弧菌(*Vibrio penaeicida*)就可使对虾致病^[3];对虾肝胰腺中的弧菌虽然可能不诱发疾病,却影响对虾生长^[4]。因此,预防弧菌病对对虾健康养殖具有极其重要的意义。

鉴于弧菌病防控在对虾健康养殖中的重要地位,养殖过程中,池塘水体和底泥中致病弧菌的数量和种类成为研究者关注的焦点。目前在水产养殖中用于弧菌的分离筛选

大部分采用 TCBS 培养基,少数采用其他培养基^[5-7]。TCBS 培养基最初是医学临床上分离致病弧菌的常用方法,主要被用于霍乱弧菌、副溶血弧菌的分离与培养。而今已被广泛用于水产养殖业致病弧菌的数量检测。查广才等^[8]采用 TCBS 培养基检测凡纳对虾(*Litopenaeus vannamei*)虾池中弧菌数量,李卓佳等^[9]也在斑节对虾养殖池塘中,采用 TCBS 培养基检测弧菌数量。在这些研究中,对对虾养殖过程中弧菌种类的研究较少。本研究采用 TCBS 平板稀释法^[10]分离筛选凡纳对虾养殖过程中养殖水体的优势菌株,通过 16S rDNA 序列分析法对优势菌株进行鉴定,但研究结果与预期有所差异,再利用 Biolog 微生物自动分析系统对随机选取的 15 株不同属细菌进行了进一步的种类鉴定和 TCBS 培养基菌株培养验证。本研究对养殖生产中应用 TCBS 平板法检测弧菌数量的准确性进行了探讨,为建立和完善适宜生产应用的弧菌简易检测技术提供基本参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集与处理

在广东省汕尾市红海湾鸿泰养殖场选取 3 口条件相近的凡纳对虾集约化养殖铺膜池。自 2010 年 8 月至 2010 年 11 月底,每 14 d 定期在每口虾池四周以及中央各采集水样,充分混匀。取 100 mL 混合水样放入 250 mL 无菌三角玻璃瓶中,低温保存,迅速带回实验室进行处理。在

收稿时间:2012-02-13

基金项目:国家现代农业(虾)产业技术体系建设专项(nycytx46);国家公益性行业(农业)科研专项(201103034);国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BAD13B10);广东省科技计划项目(2010B02039001);南海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2010YD05);广东省疫病防治专项(2130108)

作者简介:韩宁(1984-),男,在读硕士生,E-mail:vc66@163.com

通讯作者:李卓佳(1956-),女,研究员,E-mail:zhuojiali609@163.com

com

水样中加入 1%(V/V)吐温 80,摇床振荡 30 min 后,样品进行 10 倍梯度稀释,分别取上述稀释液 0.1 mL 涂布于 TCBS 平板(广东环凯微生物科技有限公司),28℃培养 24 h,随机挑取生长良好的黄色或绿色菌落,进行菌种保藏^[14]。

1.2 菌株的分子鉴定

1.2.1 细菌 DNA 的提取 保藏菌株经活化后,接种在 2216 E 培养基斜面上,28℃培养 24 h 后用无菌水冲洗,制备菌悬液,利用 TIANGEN 公司提供的细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TIANamp Bacteria DNA Kit)提取细菌 DNA,并作为 16S rDNA 的模板^[12]。

1.2.2 16S rDNA PCR 扩增 16S rDNA 的扩增所采用的细菌通用引物由上海生工生物工程有限公司合成,正向引物(8f)为:5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3';反向引物(1492r)为:5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'^[13]。

50 μL PCR 反应体系包括:灭菌双蒸水 37 μL,引物各 1 μL,dNTPs(2.5 mmol/L)4 μL,Taq 酶 1 μL,10×PCR buffer 5 μL,DNA 模板 1 μL。PCR 反应条件:95℃ 预变性 3 min;95℃ 变性 1 min,48℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 2 min,共 30 个循环;72℃延伸 10 min,4℃保温。扩增结束,PCR 产物用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,送上海美吉生物医药科技有限公司测序。

1.2.3 序列分析 利用 Lasergene 软件将测序的基因组 DNA 序列拼接成全基因组 DNA 序列;通过 BLAST 网站在 GenBank 基因库中进行同源性比较,检索出相近的细菌,并利用 Sequin 软件为鉴定出的菌株申请 NCBI 网站的登录号。

1.3 Biolog 微生物物种鉴定

通过 Biolog 微生物自动分析系统的数据库,随机选取已进行 16S rDNA 鉴定的 15 株不同属细菌,经革兰氏阴阳性、TSI 反应、氧化酶反应,确定细菌的基本类型、培养需要的条件以及选用的 Biolog GN2 或 GP2 96 孔微板。用 BUG 培养基培养细菌 16~24 h,挑取细菌菌落,利用干管技术分散菌落,加入接种液,调试浊度在可以使用的范围。将菌悬液倒入加样槽中,加样至 Biolog 微板中,根据条件培养,分别在 4~6 h 和 16~24 h 测试结果。通过 Biolog Microlog 4.2 软件分析纯菌株的代谢指纹与数据库中标准菌株的代谢指纹的相似性,得出鉴定结果。其中,Biolog 相似度(Similarity,SIM)大于 0.5 而位距(Digital Distance,DIST)小于 5.00 为较满意的结果。

1.4 细菌在不同品牌 TCBS 琼脂培养基上的培养

选取 5 种不同品牌的常用 TCBS 琼脂培养基,分别编号为:A(北京陆桥技术有限责任公司)、B(青岛高科园海博生物技术有限公司)、C(北京索莱宝科学技术有限公司)、D(Oxoid LTD., Basingstoke Hampshire, ENGLAND)、E(Becton, Dickinson and Company,USA)同时,按照Bolinches等^[14]的 TCBS 培养基配方自行配制培养基 F 配方为:酵母粉 5 g、蛋白胨 10 g、硫代硫酸钠 10 g、柠檬酸钠 10 g、牛胆汁盐 8 g、蔗糖 20 g、氯化钠 10 g、柠檬酸铁 1 g、溴麝香草酚蓝 0.04 g、麝香草酚蓝 0.04 g、琼脂粉 15 g,加入 1 000 mL 水,pH 8.6。将 6 种不同的 TCBS 琼脂培养基分别煮沸,冷却至 50℃,即可倒平板备用。

将细菌菌液进行稀释,分别在不同品牌的 TCBS 平板中加入相同体积的菌悬液,用涂布棒涂抹均匀。28℃培养 24 h 后,观察和比较同种细菌在 6 种不同 TCBS 琼脂培养基上的生长情况。

2 结果与分析

2.1 TCBS 培养基分离养殖水体中细菌

通过平板计数得出可在 TCBS 培养基上生长的细菌的平均数量为 9.6×10^3 CFU/mL。平板上生长的细菌菌落大多为黄色和绿色,同时也有少量黑色或者乳白色菌落存在。随机挑取黄色和绿色菌落分离纯化,得到 60 株菌,保存备用。

2.2 16S rDNA 鉴定

如表 1 所示,通过 16S rDNA 鉴定并测序,只有 SWG-27、SWG-28、SWG-29 等 3 株菌鉴定为弧菌属(*Vibrio* sp.),而其他多为大洋芽孢杆菌属(*Oceanobacillus* sp.)和芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)。其中 *Oceanobacillus* sp.和 *Bacillus* sp.在鉴定细菌总数中占有很大的比例,分别为 43.3%和 36.7%,而 *Vibrio* sp. 仅为 5%,假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)为 5%,还有一些其他的细菌如:假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas* sp.)、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter* sp.)等占细菌总数的 9%。可见,经过 TCBS 选择性培养基分离筛选出的细菌,弧菌只占少数,而大洋芽孢杆菌和芽孢杆菌所占比例较大。

2.3 Biolog 鉴定

随机选取 15 株经 16S rDNA 鉴定为不同属的菌株进行 Biolog 微生物自动分析系统鉴定。如表 2 所示,SWG-54、SWG-56、SWG-30、SWG-34 分别鉴定为莱壳伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia glumae*)、差异水螺菌(*Aquaspirillum dispar*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、耐盐芽孢杆菌(*Bacillus halodurans*),而 SWG-55、SWG-55、SWG-42、SWG-31、SWG-44、SWG-60、SWG-48、SWG-57、SWG-39、SWG-28、SWG-30、SWG-49 的可能性没有检出,相似性也偏低。

由于相似性(SIM)大于 0.5 为比较满意的结果,所以 SWG-54、SWG-56、SWG-30、SWG-34 的结果可信度比较高,其余几株菌的结果相对不明确。结果表明,随机选取的 15 株菌,通过 Biolog 鉴定系统鉴定的部分结果与 16S rDNA 鉴定的结果并不相同,但可以肯定弧菌数量较少。

2.4 细菌在不同品牌 TCBS 琼脂培养基上的生长情况

所有经过鉴定的细菌都可以在 6 种 TCBS 培养基上生长。其中(表 3),SWG-18、SWG-28、SWG-50、SWG-56、SWG-59、SWG-60 在 6 种 TCBS 培养基上的生长良好,SWG-16、SWG-30、SWG-41、SWG-57 在 D 培养基上的数量较其他 5 种培养基略少。

3 讨论

弧菌是对虾细菌性疾病的条件致病菌,一般水体中弧菌数量决定于养殖环境的优劣,当水体中弧菌的数量达到一定值后,就有发生疾病的危险^[15],对对虾的产量以及质量影响很大。TCBS 培养基中氯化钠可刺激弧菌生长,胆酸钠、牛胆汁盐、硫代硫酸钠、柠檬酸钠及较高的 pH 可

表 1 菌株 16S rDNA 鉴定结果

菌株编号	GenBank 登录号	同源性检索	登陆号	相似度 (%)	菌株编号	GenBank 登录号	同源性检索	登陆号	相似度 (%)
SWG-01	JN039415	<i>Oceanobacillus</i> sp. YH3-15	FJ386521.1	99	SWG-31	JN120179	<i>Bacillus</i> sp. 13	AB043839.1	99
SWG-02	JN039416	<i>Oceanobacillus</i> sp. YH3-15	FJ386521.1	99	SWG-32	JN120180	<i>Bacillus</i> sp. 13	AB043839.1	99
SWG-03	JN122458	<i>Oceanobacillus</i> sp. DB-16	FJ386521.1	100	SWG-33	JN120181	<i>Bacillus</i> sp. 13	AB043839.1	99
SWG-04	JN039417	<i>Oceanobacillus</i> sp. YH3-15	FJ386521.1	99	SWG-34	JN120182	<i>Bacillus</i> sp. 13	AB043839.1	99
SWG-05	JN039418	<i>Oceanobacillus</i> sp. YH3-15	FJ386521.1	99	SWG-35	JN120183	<i>Bacillus</i> sp. 13	AB043839.1	99
SWG-06	JN039419	<i>Oceanobacillus</i> sp. YH3-15	FJ386521.1	99	SWG-36	JN120184	<i>Bacillus</i> sp. 13	AB043839.1	99
SWG-07	JN039420	<i>Oceanobacillus</i> sp. YH3-15	FJ386521.1	99	SWG-37	JN120185	<i>Bacillus</i> sp. 13	AB043839.1	99
SWG-08	JN039421	<i>Oceanobacillus</i> sp. YH3-15	FJ386521.1	99	SWG-38	JN120186	<i>Bacillus</i> sp. 13	AB043839.1	99
SWG-09	JN039422	<i>Oceanobacillus</i> sp. YH3-15	FJ386521.1	99	SWG-39	JN120187	<i>Bacillus</i> sp. 13	AB043839.1	99
SWG-10	JN039423	<i>Oceanobacillus</i> sp. YH3-15	FJ386521.1	99	SWG-40	JN120188	<i>Bacillus</i> sp. 13	AB043839.1	99
SWG-11	JN039427	<i>Oceanobacillus</i> sp. DB-16	JU326361.1	99	SWG-41	JN120189	<i>Bacillus</i> sp. 13	AB043839.1	99
SWG-12	JN039428	<i>Oceanobacillus</i> sp. BZ-03	GU326360.1	99	SWG-42	JN120190	<i>Bacillus</i> sp. 13	AB043839.1	99
SWG-13	JN039429	<i>Oceanobacillus</i> sp. BZ-03	GU326360.1	99	SWG-43	JN120191	<i>Bacillus</i> sp. 13	AB043839.1	99
SWG-14	JN039430	<i>Oceanobacillus</i> sp. BZ-03	GU326360.1	99	SWG-44	JN120192	<i>Bacillus</i> sp. 13	AB043839.1	99
SWG-15	JN039424	<i>Oceanobacillus</i> sp. YH3-15	FJ386521.1	100	SWG-45	JN120193	<i>Bacillus</i> sp. 13	AB043839.1	99
SWG-16	JN039431	<i>Oceanobacillus</i> sp. BZ-03	GU326360.1	99	SWG-46	JN120194	<i>Bacillus</i> sp. 13	AB043839.1	100
SWG-17	JN039432	<i>Oceanobacillus</i> sp. BZ-03	GU326360.1	99	SWG-47	JN120195	<i>Bacillus</i> sp. 13	AB043839.1	99
SWG-18	JN039433	<i>Oceanobacillus</i> sp. DB-16	JU326361.1	100	SWG-48	JN120196	<i>Bacillus oshimensis</i> steain	EU977653.1	99
SWG-19	JN039425	<i>Oceanobacillus</i> sp. YH3-15	FJ386521.1	100	SWG-49	JN120197	<i>Bacillus</i> sp. 13	AB043839.1	99
SWG-20	JN039426	<i>Oceanobacillus</i> sp. YH3-15	FJ386521.1	99	SWG-50	JN120198	<i>Bacillus</i> sp. 13	AB043839.1	99
SWG-21	JN039434	<i>Oceanobacillus</i> sp. DB-16	JU326361.1	99	SWG-51	JN120199	<i>Bacillus</i> sp. 13	AB043839.1	99
SWG-22	JN039435	<i>Oceanobacillus</i> sp. BZ-03	GU326360.1	99	SWG-52	JN120200	<i>Cobetia</i> sp. SB J92	AB167062.1	99
SWG-23	JN039414	<i>Oceanobacillus</i> sp. YH3-15	FJ386521.1	99	SWG-53	JN120201	<i>Halomonas</i> sp. whb35	FJ444981.1	99
SWG-24	JN039436	<i>Oceanobacillus</i> sp. BZ-03	GU326360.1	99	SWG-54	JN120202	<i>Pseudomonas</i> sp. wp33	AJ551110.1	98
SWG-25	JN039413	<i>Oceanobacillus</i> sp. YH3-15	FJ386521.1	99	SWG-55	JN120203	<i>Pseudomonas</i> sp. wp33	AJ551110.1	98
SWG-26	JN039437	<i>Oceanobacillus</i> sp. DB-16	JU326361.1	99	SWG-56	JN120204	<i>Pseudomonas</i> sp. wp33	AJ551110.1	98
SWG-27	JN039438	<i>Vibrio owensii</i> train F75028	HQ908693.1	99	SWG-57	JN120205	<i>Psychrobacter</i> sp. YSC2-I	EU781517.1	100
SWG-28	JN039439	<i>Vibrio owensii</i> train F75062	HQ908697.1	99	SWG-58	JN120206	<i>Alcaligenes</i> sp. BJ-23	GQ280033.1	99
SWG-29	JN039440	<i>Vibrio owensii</i> train F75062	HQ908697.1	99	SWG-59	JN120207	<i>Marine bacterium</i> Tw-4	AY028199.1	98
SWG-30	JN120178	<i>Bacillus</i> sp. 13	AB043839.1	99	SWG-60	JN120208	<i>Pseudoalteromonas</i> sp SM9913	CP001796.1	98

表 2 菌株 Biolog 鉴定结果

菌株编号	鉴定结果	可能性 (PROB)	相似性 (SIM)	位距 (DIST)
SWG-54	<i>Burkholderia glumae</i>	98	0.601	5.96
SWG-34	<i>Bacillus halodurans</i>	97	0.590	6.02
SWG-56	<i>Aquaspirillum dispar</i>	97	0.833	1.44
SWG-30	<i>Bacillus licheniformis</i>	94	0.742	2.57
SWG-55	<i>Pedobacter heparinus</i>		0.188	10.25
SWG-42	<i>Bacillus licheniformis</i>		0.239	13.96
SWG-31	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		0.332	11.32
SWG-44	<i>Bacillus licheniformis</i>		0.199	10.43
SWG-60	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>		0.279	12.56
SWG-48	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		0.396	11.23
SWG-57	<i>Psychrobacter immobilis</i>		0.389	14.03
SWG-36	<i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i>		0.323	14.77
SWG-28	<i>Vibrio tubiashii</i>		0.401	11.48
SWG-30	<i>Bacillus licheniformis</i>		0.269	13.09
SWG-49	<i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i>		0.373	12.19

抑制革兰氏阳性菌和大肠菌群的生长, 硫代硫酸钠与柠檬酸铁反应作为检测硫化氢产生的指示剂, 溴麝香草酚蓝和麝香草酚蓝为 pH 指示剂。pH 8.6 为弧菌生长最好的条件^[10]。由于弧菌菌株的不同, 生长分解的代谢产物也不同, 生长在平板上的菌落颜色也各异, 利用指示剂可区分菌株是否发酵蔗糖; 副溶血性弧菌不发酵蔗糖, 菌落呈蓝绿色。霍乱弧菌发酵蔗糖产酸, 菌落呈黄色, 从而可以观察不同弧菌的形态和数量^[7]。而本研究采用 TCBS 培养

表 3 细菌在 6 种 TCBS 培养基上的生长情况比较

菌株编号	A	B	C	D	E	F
SWG-28	++	++	++	++	++	++
SWG-30	++	++	++	+	++	++
SWG-41	++	++	++	+	++	++
SWG-50	++	++	++	++	++	++
SWG-16	++	++	++	+	++	++
SWG-18	++	++	++	++	++	++
SWG-56	++	++	++	++	++	++
SWG-57	++	++	++	+	++	++
SWG-59	++	++	++	++	++	++
SWG-60	++	++	++	++	++	++

注: “++”表示生长旺盛 “+”表示生长良好 “-”表示不生长。

基自养殖水体中对优势弧菌进行分离筛选, 通过 16S rDNA 序列分析和 Biolog 微生物自动分析系统鉴定, 发现在 TCBS 培养基上生长的细菌中弧菌只占很少的比例, 而大洋芽孢杆菌和芽孢杆菌可以在 TCBS 培养基上大量生长。而使用不同品牌的 TCBS 培养基对筛选菌株进行比较培养验证, 发现筛选细菌均可较好的生长。可见, 经 TCBS 培养基筛选的细菌并非全为弧菌, 而且弧菌可能只占很少的一部分, 其余大量的是其他种类的细菌。结果表明, 仅依靠 TCBS 培养基鉴定弧菌, 其结果会与实际情况存在较大的差别, 应该考虑结合多种菌种鉴定手段建立适宜生产应用的弧菌简易鉴定技术。

16S rDNA 分子生物学鉴定方法主要是通过测定细菌的 DNA 序列,然后与 NCBI 网站上的已知序列做对比,从而得出相应的结果,Biolog 微生物自动分析系统是根据细菌对不同碳源的利用,在生理生化基础上确定细菌的种类^[7]。两种鉴定方法均可以快速、方便地鉴定出结果。本研究中,经过 16S rDNA 鉴定,SWG-54、SWG-55 为 *Pseudomonas* sp.,而 SWG-30 为 *Bacillus* sp.;在 Biolog 微生物鉴定结果中,SWG-54 为 *Burkholderia glumae*,SWG-55 为 *Pedobacter heparinus*,SWG-56 为 *Aquaspirillum dispar*,SWG-30 为 *Bacillus licheniformis*。由此可以看出,16S rDNA 鉴定的结果与 Biolog 微生物鉴定的结果是有差别的。16S rDNA 鉴定是通过技术得到鉴定细菌的 DNA 基因序列,而 DNA 序列是物种特有的,然后与基因库中的序列做对比,从而得到相应的细菌种类^[8]。Biolog 微生物自动分析系统是通过在一块含有脱水碳源的 96 微孔板进行氧化和同化反应,细菌利用碳源时会将微孔中的四唑紫(Tetrazolium Violet,TV)染色剂由无色还原为紫色,同时随着细菌的增长其浊度也会改变,从而在 96 孔板上形成该菌株特征性的反应模式或“指纹图谱”,利用光学纤维设备可以瞬间得到鉴定结果,确定所分析细菌的属名或种名^[9]。本研究中,对于同一菌株,采用 16S rDNA 鉴定法和微生物生理生化鉴定法的结果存在差别,这可能与细菌新陈代谢缓慢、氧化和同化反应不彻底有关。16S rDNA 是根据核酸的序列,分析鉴定细菌,准确度相对高,但是由于同一属细菌的核酸序列相似性高,利用分子方法鉴定到种还需要进一步的试验验证。


基于上述分析,本研究认为仅使用通用的 TCBS 培养基作为弧菌属的选择性培养基,用以确定弧菌数量,并推断诱发对虾疾病发生的弧菌数量阈值,其科学性和准确性值得商榷。同时 16S rDNA 鉴定与 Biolog 微生物鉴定的结果不同,也值得作更进一步的深入分析。在致病性弧菌的检测方面,一般采用 TCBS 培养基检测副溶血弧菌等致病性弧菌、在水产养殖业中,吴建平等^[10]采用 TCBS 培养基和 API 研究了大亚湾网箱养殖水体弧菌种类组成及变化,江晓等^[24]采用分子鉴定的方法研究了大亚湾水体弧菌种类变化。在弧菌筛选方面,Angela 等^[25]提出 CHRO Mager Vibrio (CAV)对弧菌的筛选能力比 TCBS 培养基能力强,所以可以考虑利用 CAV 培养基进行养殖水体中弧菌的筛选;同时可以结合利用微生物生理生化方面的特点来进行弧菌的鉴定。此外,还可以利用分子生物学的方法,如王宏萍等^[26]利用 16S rDNA 方法分离鉴定副溶血性弧菌,特异 DNA 片段在弧菌鉴定中具有明显的优势,多个基因位点的分析增加了结果的丰富度,结合梯度凝胶电泳、单链构象多态性、温度梯度凝胶电泳等高灵敏性的序列分析方法,用以更好的鉴定弧菌株型^[27]。总之,弧菌做为对虾疾病的条件致病菌,确定其主要的致病菌株,还需要进一步的试验研究。

参考文献:

[1] 管越强,俞志明,宋秀贤,主要环境因子对虾类免疫反应及疾病发生的影响[J].海洋环境科学,2008,27(5):554-560.
[2] 孔凡骏,周凯,郑国兴,三种弧菌对池养中国对虾的急性致死剂量

试验[J].海洋科学,1998(4):6-7.
[3] Saulnier D,Jean C A,Gilies L M,et al.Rapid and sensitive PCR detection of *Vibrio penaeicida*, the putative etiological agent of syndrome 93 in New Caledonia [J].Inter-Research,2000,49 (2): 109-115.
[4] Sung H H,Hsu S F,Chen C K,et al.Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp and the composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation[J].Amsterdam,PAYS-BAS: Elsevier,2001,192:101-110.
[5] Krupesha Sharma S R,Shankar K M,Sathyanarayana M L,et al. Development of biofilm of *Vibrio alginolyticus* for oral immunostimulation of shrimp[J].Aquaculture International, 2010,19 (3):421-430.
[6] Angala D P,Valenina T,Lucia N,et al.Comparison between thiosulphate-citrate-bile salt sucrose(TCBS) agar and CHROMagar *Vibrio* for isolating *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Food Control, 2011,22(1):124-127.
[7] 曹琛,黄金勇,李举鹏,等.TCBS 培养基在虾病防治监测中的应用[J].水产科学,2003,22(6):46-47.
[8] 查广才,周昌清,黄建荣,等.凡纳对虾淡化养殖健康虾池水体生态研究[J].中山大学学报,2005,44(1):78-84
[9] 李卓佳,李烁寒,杨莺莺,等.凡纳滨对虾高位池养殖水体细菌变动及其理化因子的关系[J].南方水产,2010,6(4):6-12
[10] 丁燊,简纪常,吴灶和,等.湖光岩拮抗菌的研究[J].海洋与湖沼, 2009,40(3):380-384.
[11] 沈萍,陈向东.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,2005:135-137.
[12] 刘淮德.应用微生物分子生态学方法研究对虾肠道细菌组成及其变化规律[D].广州:中国科学院研究生院(海洋研究所),2010.
[13] 苏波,康建平,黄静,等.16S rDNA 序列分析鉴定一株芽孢杆菌[J].食品与发酵科技, 2010,46(5):1-3.
[14] Jorge B,Romalde J L,Toranzo A E.Evaluation of selective media for isolation and enumeration of vibrios from estuarine waters[J]. Journal of Microbiological Methods,1988,8(3):151-160.
[15] 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.
[16] Uchiyama H.Distribution of vibrio species isolated from aquatic environments with TCBS agar[J]. Environmental Health and Preventive Medicine,2000(4):199-204.
[17] 张朝正,郭兰珍.利用 16S rDNA 序列分析和 Biolog 快速鉴定方法鉴定产脂肪酶菌株[J].河北工业大学学报,2009,38(5):52-55.
[18] Klocke M,Mundt K,Jiler C,et al.Monitoring *Lactobacillus plantarum* in grass silages with the aid of 16S rDNA-based quantitative real-time PCR assays [J].Systematic and Applied Microbiology, 2006,29(1):49-58.
[19] 刘宏媛,李光辉,罗惠波,等.大曲中酵母菌的分离及 Biolog 微生物系统分析鉴定[J].食品与发酵科技,2011,47(1):1-3.
[20] 江晓,任春华,胡超群,等.分子鉴定方法研究大亚湾水体弧菌种类变化[J].热带生物学,2010,29(4):154-159
[21] 巫结冰,陈德云,胡伟宁,等.I 弧菌显色培养基进行多种弧菌分离鉴定的研究[J].中国卫生检验杂志,2007,17(8):1451-1452.
[22] 王宏萍,张继伦,吴文娟,等.使用 16S rDNA 序列分析鉴定副溶血性弧菌[J].中国卫生检验杂志,2009,19(9):2034-2036.
[23] 谢珍玉,周永灿.弧菌分型与鉴定研究的新进展[A].第三届海洋生物高科技论坛论文集[C].厦门,2005:141-146.

TCBS培养基筛选的虾池细菌分析

作者：	韩宁 ， 李卓佳 ， 曹煜成 ， 胡晓娟 ， 王奕玲 ， HAN Ning ， LI Zhuo-jia ， CAO Yu-cheng ， HU Xiao-juan ， WANG Yi-ling
作者单位：	韩宁, 王奕玲, HAN Ning, WANG Yi-ling(大连海洋大学生命科学与技术学院, 辽宁大连 116000; 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东广州510300) ， 李卓佳, 曹煜成, 胡晓娟, LI Zhuo-jia, CAO Yu-cheng, HU Xiao-juan(中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东广州, 510300)
刊名：	广东农业科学 
英文刊名：	Guangdong Agricultural Sciences
年，卷(期)：	2012, 39(7)

本文读者也读过(2条)

1. [曹琛](#). [黄金勇](#). [李举鹏](#). [陈军昌](#). [吴兆林](#) TCBS培养基在虾病防治监测中的应用[期刊论文]-[水产科学](#)2003, 22(6)
2. [李筠](#) 与海水养殖相关的细菌多样性的研究及方法评价[学位论文]2002

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_gdnykx201207047.aspx