

九龙江口沉积物 TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose) 菌群的分布

陈明霞^{1,2}, 李和阳^{2*}, 马云飞¹, 史莹鑫¹, 傅毅凌¹, 郑天凌³, 郑森林², 陈彬²

¹ 华侨大学化工学院, 厦门 361021

² 国家海洋局第三海洋研究所, 厦门 361005

³ 厦门大学生命科学学院, 海岸和湿地生态系统教育部重点实验室, 厦门 361005

摘要: 【目的】调查九龙江流域对厦门海域潜在的病原菌“污染”, 为相关侵染性病害的预防和控制提供有价值的资料。【方法】通过 TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose) 培养基从九龙江河口沉积物中分离到 158 株细菌, 应用 16S rRNA 基因-RFLP (限制性酶切图谱多样性分析) 及 16S rRNA 基因序列分析等方法对 158 株细菌进行分子鉴定。【结果】研究结果表明九龙江口沉积物中分布的 TCBS 菌群分别属于 7 个属, 其中假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 占 28%, 气单胞菌属 (*Aeromonas*) 占 24%, 假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*) 占 19%, 希瓦氏菌属 (*Shewanella*) 占 13%, 芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 占 11%, 弧菌属 (*Vibrio*) 占 4%, 嗜冷杆菌属 (*Psychrobacter*) 占 1%。不同站位 TCBS 菌群的组成及各菌群的相对差异明显, 其中上游区域以非嗜盐或耐盐细菌为主, 下游区域以嗜盐细菌和耐盐细菌为主, 具有典型的河口细菌分布特征。盐度对各 TCBS 菌群的分布具有重要的影响。弧菌在整个河口区所占的比例不大 (6% - 19%) 且集中在下游区域。【结论】九龙江口存在大量的条件致病菌, 其中以气单胞菌属为代表的耐盐菌, 对厦门海域存在陆源性污染的风险; 绝大多数弧菌属于海洋土著细菌, 正常情况下 (非流行性弧菌病期间) 非来源于九龙江冲淡水的直接污染。

关键词: 九龙江口, TCBS 菌群, 细菌分布, 16S rRNA 基因, RFLP

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 05-0637-08

九龙江是福建仅次于闽江第二大河流, 位于福建省南部, 流经龙岩、漳州和厦门。九龙江流域由北溪、西溪两大支流及南溪组成, 于厦门港对岸的龙海市石码镇和浮宫注入台湾海峡。全长 258 km, 流域面积 1.4 万 km², 流域范围的坐标为东经 116.78° - 118.03°, 北纬 24.22° - 25.85°。九龙江是龙岩、漳

州和厦门三市的饮用水源和工农业生产重要水源, 随着经济的发展, 九龙江流域的水污染问题日渐突出, 所带来的污染物是造成厦门海域水质恶化的主要原因。

目前九龙江的污染源主要有 3 种: 一是上游无序开矿水土流失, 二是超标废水排入江中, 三是养殖

基金项目: 国家自然科学基金 (41006117); 国家海洋公益性行业专项经费项目 (200805064, 201205013)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-592-2195769; E-mail: heyangli@126.com

作者简介: 陈明霞 (1980 -), 女, 福建惠安人, 博士, 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

收稿日期: 2011-10-22; 修回日期: 2012-03-20

垃圾污染。此外,沿河的工业企业排放污染、船舶泄漏污染、居民向河道和水体倾倒生活垃圾等行为,也造成了很大程度的污染,九龙江水质令人担忧。环境污染对生物造成的影响可以通过细菌多样性研究进行直接快速地评估。目前,九龙江流域的细菌学研究资料比较缺乏^[1-4],本研究对九龙江口区域 TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose) (弧菌) 菌群进行调查,旨在探讨九龙江对厦门海域可能存在的致病性微生物“污染”,为相关病害的预防和控制提供有价值的资料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

调查重点是九龙江河口区域,东经 117.80° - 118.11°,北纬 24.39° - 24.47°,实测站位分布见图 1。用采泥器采集表层沉积物,然后以无菌采样瓶分装后于冰上放置,运回实验室 4℃ 存放,72 h 内进行菌株的分离培养。采集时间 2009 年 10 - 12 月。

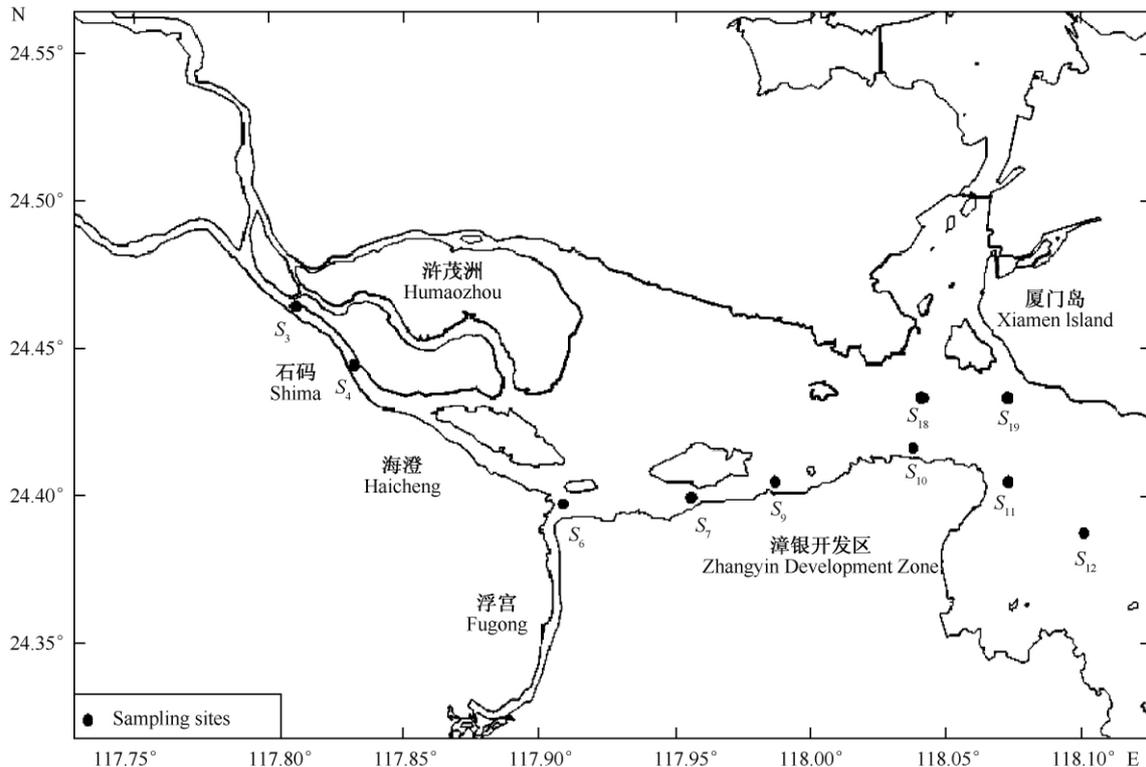


图 1 调查站位图

Fig. 1 Sampling stations.

1.1.2 主要试剂和仪器: *Afa* I、*Msp* I、*Taq* DNA Polymerase 为 TaKaRa 公司产品; *RNase* A、蛋白酶 K、溶菌酶、Tris 碱、IPTG、丙烯酰胺、N,N'-甲叉双丙烯酰胺、TEMED、PVPP、过硫酸铵和 SDS 为 Sigma 公司产品; 蛋白胨、酵母提取物为 Difco 公司产品; dNTPs、Agarose、X-gal、DNA 分子量标准为上海生工生物工程技术有限公司产品; DNA 纯化试剂盒 (Tiangen); DNA 胶回收试剂盒 (Biodev); 其余试剂均为国产分析纯试剂。

PCR 仪 (Bio-rad), 凝胶成像分析系统 (天能科技 (上海) 有限公司), TG16-W 微量高速离心机 (长

沙湘仪离心机仪器有限公司), 电泳系统 (北京六一仪器厂)。

1.1.3 培养基: 2216E 培养基: 酵母提取物 5 g, 蛋白胨 10 g, 陈海水 1000 mL, 琼脂粉 15 g, pH 7.2 - 7.8。

TCBS 培养基 (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar, 广东环凯微生物科技有限公司): 酵母提取物 5 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 10 g, 柠檬酸钠 10 g, 硫代硫酸钠 10 g, 胆酸钠 3 g, 牛胆粉 5 g, 蔗糖 20 g, 柠檬酸铁 1 g, 琼脂 15 g, 溴麝香草酚兰 0.04 g, 麝香草酚兰 0.004 g, 蒸馏水补足体积至 1000 mL, pH 8.6 ± 0.2。

1.2 TCBS 菌株的分离培养

称取 0.5 - 1 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 μ L 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 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 培养箱内培养 26 ± 2 h。设置 2 组平行实验。每个样品随机挑取 15 - 30 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 rRNA 基因-RFLP 分析和 16S rRNA 基因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。

1.3 TCBS 菌群的鉴定

对所分离得到的 TCBS 菌株进行 16S rRNA 基因-RFLP 酶切谱型分析并进一步对各谱型代表菌通过 16S rRNA 基因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 μ L 碱裂解液中(SDS 1% (m/v), NaOH 0.1 mol/L)进行碱裂解。裂解产物用无菌蒸馏水稀释 5 - 10 倍。取 1.0 μ L 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 (Takara 公司)进行双酶切。以 5.0% (m/v) 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,分析 16S rRNA 基因的酶切谱型,计算每种不同酶切谱型的出现频率,每种 RFLP 谱型各挑取 1 - 2 株代表性菌株,对其 16S rRNA 基因进行足量 PCR 扩增及产物胶回收,送测序公司进行测序。所得序列先应用 Pintail (<http://www.bioinformatics-toolkit.org/Web-Pintail/>)在线软件排除 PCR 产物嵌合体,然后在 GenBank 进行比对分析,确定各菌群的种属特性,运用 DNAMAN (version 5.0)构建系统发育树,所有序列提交到 GenBank 数据库。

2 结果和分析

2.1 九龙江口沉积物 TCBS 菌群的组成

通过 TCBS 琼脂平板直接对沉积物样品进行分

离培养。随机挑取的 158 个 TCBS 菌株进行进一步的纯化培养及 16S rRNA 基因-RFLP 分析。

RFLP 分析结果表明 158 个菌株分别属于 15 种不同的 RFLP 分子谱型,各谱型菌株具体微生物学信息及其系统发育关系详见图 2。通过图表比较分析,此次调查中,九龙江口流域沉积物中分布的 TCBS 菌群分别属于 7 个属,11 个类似种,其中荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 类似种占 20%,软体动物气单胞菌 (*Aeromonas molluscorum*) 类似种占 15%,伊氏假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas elyakovii*) 类似种占 13%,嗜冷希瓦氏菌 (*Shewanella algidipiscicola*) 类似种占 12%,皮基诺伊芽孢杆菌 (*Bacillus pichinotyti*) 类似种占 11%,杀鲑气单胞菌 (*Aeromonas salmonicida*) 类似种占 9%,莓实假单胞菌 (*Pseudomonas fragi*) 类似种占 8%,半透明假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas translucida*) 类似种占 6%,副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 类似种占 4%,福氏嗜冷杆菌 (*Psychrobacter fozii*) 类似种占 1%,波罗的海希瓦氏菌 (*Shewanella baltica*) 类似种占 1%。

2.2 各站位 TCBS 菌群的分布

不同站位,TCBS 菌群的组成及各菌群相对比例各不相同(表 1),整体表现为河口上游区域以非嗜盐或耐盐细菌为主,河口下游区域以嗜盐细菌和耐盐细菌为主,弧菌在整个河口区域所占的比例不大(6% - 19%)且集中在河口下游区域。

2.3 不同 TCBS 菌群的分布特征

2.3.1 *Aeromonas* 属: *Aeromonas* 属曾被归入弧菌科,广泛分布于自然水体及土壤中,生长于 0% - 3% NaCl,分布于淡水、河口及海洋中^[5]。2008 年,韩善桥等^[1]报道了九龙江北溪流域至河口区段细菌的分布,发现该 *Aeromonas* 属细菌广泛分布干流水域,而河口区域则相对较少。本研究发现 *Aeromonas* 属细菌在河口沉积物中分布较广,主要集中在 S_4 站位至 S_9 站位之间,其相对数量分布呈现类正态分布趋势——自 S_3 站位至 S_7 站位,其相对数量逐渐递增; S_7 站位之后,其相对数量逐渐减少。出现这样的分布特征,与该细菌对盐度的适应性有关。河口上游至河口下游区域,水体盐度呈现递增趋势,(表 1),盐度变化范围 1.87 - 28.18,而 *Aeromonas* 属细菌生长于 0 - 30 盐度范围,在该范围内的细菌生长状况在理论上是符合正态分布的。此

次研究发现的 *Aeromonas* 属细菌以 *A. salmonicida* 类 似种 *A. molluscorum* 类似种为主。

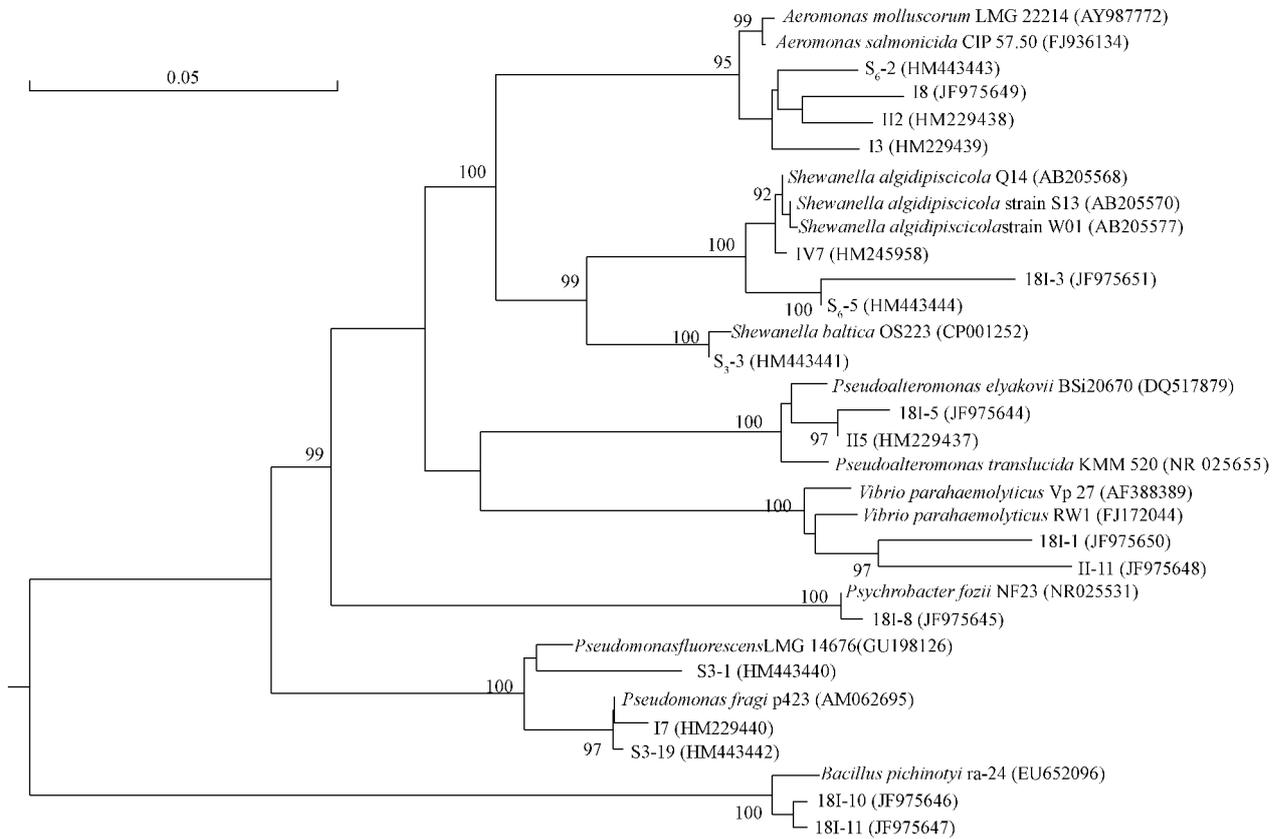


图 2 九龙江口沉积物 TCBS 菌株 16S rRNA 基因系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of bacterial 16S rRNA gene of the TCBS strains from the sediments of Jiulong River estuary

The dendrogram was constructed from a matrix of pairwise genetic distances by the neighbor-joining method using the DNAMAN program. The bootstrap values above 90% from 1000 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.

表 1 九龙江口各站位的盐度及 TCBS 菌群的百分比分布

Table 1 Distribution of TCBS strains and salinity in each station of Jiulong River estuary

Station	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Salinity
S ₃	-	-	6	-	-	61	33	-	-	-	-	1.87
S ₄	-	-	-	-	-	-	43	-	57	-	-	3.08
S ₆	-	5	-	-	-	26	-	-	-	69	-	9.79
S ₇	-	-	-	-	-	17	-	-	-	83	-	15.74
S ₉	6	6	-	-	55	-	-	-	33	-	-	20.24
S ₁₀	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	25.16
S ₁₁	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	26.94
S ₁₂	-	92	-	-	-	-	-	-	8	-	-	28.18
S ₁₈	19	19	-	43	-	-	-	4	-	-	15	27.00
S ₁₉	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	27.60

- , not detected; 1. *Vibrio parahaemolyticus*-like; 2. *Shewanella algidipiscicola*-like; 3. *Shewanella baltica*-like; 4. *Pseudoalteromonas elyakovii*-like; 5. *Pseudoalteromonas translucida*-like; 6. *Pseudomonas fluorescens*-like; 7. *Pseudomonas fragi*-like; 8. *Psychrobacter fozii*-like; 9. *Aeromonas salmonicida*-like; 10. *Aeromonas molluscorum*-like; 11. *Bacillus pichinotyi*-like.

A. salmonicida 广泛分布于世界各地, 是许多海洋及淡水鱼类的致病菌, 能侵害鲑鱼和许多其它鱼类 (包括鳟鱼、嘉鱼、河鲈、金鱼、鲫、鲤等), 主要引

起的疗疮, 导致鱼类皮肤溃烂、败血症等症状并引起死亡^[6-8]。该类细菌的类似种大量存在于 S₄ 和 S₉ 站点, 并且在河口 S₁₂ 站点也有少量存在, 对九龙江

沿岸及河口养殖业及野生鱼类是一个重大的威胁, 应该引起重视。 *A. molluscorum* 是 2002 年由西班牙科学家从双壳类软体动物体内或体表分离并于 2004 年定名^[9]的一类细菌。目前尚无关于此类细菌引起其他动植物疾病的报道。

2.3.2 *Vibrio* 属: *Vibrio* 属多数细菌是海洋土著细菌, NaCl 对其生长是必需或具有重要的生理意义的, 少数弧菌种类亦可分布于淡水中^[5]。此次调查, 在河口近上游的盐度低的区域未检测到弧菌, 只有河口下游盐度较高的区域 (S_9 和 S_{18} 站位) 有少量弧菌分布, 且 S_{18} 站位数量高于 S_9 站位, 弧菌种类以 *V. parahaemolyticus* 类似种为主。

V. parahaemolyticus 是一种嗜盐或需盐弧菌, 广泛分布于海洋、河口环境, 尤其是近海鱼类、贝类等海产品中。人类食用被致病性副溶血弧菌污染或未煮熟的海产品可导致急性胃肠炎等严重脱水症状。此次调查表明九龙江口盐度低的区域环境中并无该弧菌的类似种存在, 而河口盐度较高的区域有少量分布, 这样的分布特征与该类弧菌对盐度的适应性息息相关。虽然该类弧菌在河口数量较少, 但是由于细菌可以通过贝类等海洋生物的滤食特性实现富集, 人们通过食物链可导致感染该类细菌而致病, 因此九龙江河口区域仍然应该重视对该类弧菌病的防治。

2.3.3 *Shewanella* 属: *Shewanella* 属也是一类海洋细菌, 兼性厌氧类群, 多数细菌种类可产 H_2S , 一般生长需要 NaCl, 是导致冻存海产品腐败的主要细菌之一^[10]。部分种类可以修饰重金属使之成为无毒或少毒状态, 对于环境治理具有一定的意义^[5]。由于该属细菌与弧菌科细菌在基因水平上相近, 所以 MacDonell 和 Colwell 1985 年^[11]曾建议将 *Shewanella* 和另一类相关菌属 *Listonella* 归入弧菌科。该属部分细菌可引起人类败血症等疾病^[12-13]。据目前日本相关报道发现由该属细菌引起的疾病有增加的趋势^[14]。此次调查发现, 该属细菌 (主要为 *S. algidipiscicola* 和 *S. baltica* 类似种) 少量分布于九龙江口近上游盐度低的区域, 主要分布于河口下游盐度较高的区域 (S_{12} 和 S_{18} 站位)。

2.3.4 其他种属: *Pseudoalteromonas* 是一类常见的海洋细菌^[15-16], NaCl 对其生长是必需的。该调查

发现该类细菌 (*P. elyakovii* 和 *P. translucida* 类似种) 主要分布于盐度较高的河口下游区域, 盐度较低的河口上游区域未发现该类细菌。 *P. elyakovii* 据报道是一类海带斑点病的致病菌^[17], *P. translucida* 目前尚未见到与疾病有关的报道^[18]。

Pseudomonas 属广泛存在于土壤、淡水、海水中, 该属的 *P. aeruginosa* 是一类重要的条件致病菌, 是医院伤口感染化脓的主要病原之一。该属细菌在环境中所占比例未必很大, 但一旦条件适宜 (比如温度、盐度或有机物浓度或者某一种特殊化学物质存在) 可激发其快速生长并成为优势类群^[5]。本调查主要发现有 *P. fluorescens* 和 *P. fragi* 类似种, 前者在九龙江口分布较广, 后者主要分布于河口上游区域。 *P. fluorescens* 能产生荧光素, 有人将该类细菌作为一类生物防治剂, 用于防治其他病原菌生长^[19], 有可能开发为水产养殖的益生菌。 *P. fragi* 是一类嗜冷性细菌, 可引起牛奶等食物酸败^[20]。

Psychrobacter fozii 是一类嗜冷性及耐盐海洋细菌^[21], 其类似种少量分布于九龙江口。

Bacillus pichinoty 是一类革兰氏阳性细菌, 广泛分布于世界各地。此次调查发现该类细菌类似种大量分布于河口下游区域 (S_{18} 和 S_{19} 站位) 的沉积物中, 可能在物质循环中起到重要作用。

总之, 不同站位各 TCBS 菌群相对比例各不相同, 河口上游站位以非嗜盐或耐盐细菌为主, 河口下游区域以嗜盐细菌和耐盐细菌为主, 具有典型的河口细菌分布特征, 盐度对各类细菌的分布具有重要的影响。

3 讨论

TCBS 培养基广泛应用于弧菌的特异性筛选。理论上, TCBS 菌群中弧菌应占据绝对优势, 而本次调查研究发现弧菌在整个河口区域所占的比例不大 (6% - 19%) 且集中在河口下游区域, 这种分布状态与弧菌的嗜盐生理特性有直接的相关性。TCBS 菌群数中弧菌所占的比例因不同采样地点而呈现较大差异, 这种差异在生产实践及环境评价过程具有重要的指导作用。关于 TCBS 菌群与弧菌之间相关性的研究, 我们已经另文讨论^[22]。

众所周知,弧菌广泛分布于海洋、河口以及海产品中,但多数关于弧菌多样性分布的研究并未直接讨论海洋弧菌的来源问题,且大多数文章的前言部分都会介绍弧菌广泛分布于淡水、河口和近岸海水中,有些研究还发现海水养殖区域及排污口区域弧菌数量高于其他海区^[23],所有这些都给人予错误的印象,认为海洋弧菌是人类活动频繁而引起的,是陆源性污染的结果。

根据我们对九龙江口、珠江口及深圳洁净海域的弧菌分布特征^[24]的研究以及 Cavallo 和 Stabili^[25]、Grimes 等^[26]、吴玲等^[27]的研究结果,我们认为自然生态环境下,弧菌(以弧菌属细菌为主)主要属于海洋土著细菌,并非来源于陆源性污染。正常状态下(非流行性弧菌病期间),海洋环境陆源性弧菌的污染威胁不显著。而近岸、养殖区和排污口海域弧菌数量较高主要是因为:陆源性的有机物污染刺激土著弧菌大量生长,而保证这种刺激生长机制的前提条件是海水盐度变化不大或不受影响。比如,同样具有大量的陆源性有机物污染的河口上游区域,由于冲淡水携带来大量有机物的同时也改变了水体的盐度,使得盐度过低,弧菌数量不但未能增加,反而大规模减少,甚至很难通过培养的方法直接获取。

参考文献

- [1] 韩善桥,虞积耀,姜涛,王大鹏,王强. 九龙江细菌分布情况调查分析. 中国卫生检验杂志 (*Chinese Journal of Health Laboratory Technology*) 2008, 18(5):899-900.
- [2] 韩善桥,虞积耀,姜涛,王大鹏,王强. 九龙江水中肠杆菌科细菌分布及耐药性监测结果. 实用预防医学 (*Practical Preventive Medicine*) 2009, 16(1):18-19.
- [3] 张瑜斌,林鹏,庄铁诚. 九龙江口红树林土壤微生物的时空分布. 厦门大学学报自然科学版 (*Journal of Xiamen University Natural Science*) 2007, 46(4):587-592.
- [4] 张瑜斌,林鹏,邓爱英,庄铁诚. 九龙江口红树林鹧鸪菜藻体自生固氮细菌. 生态学杂志 (*Chinese Journal of Ecology*) 2007, 26(9):1384-1388.
- [5] Farmer III JJ, Janda JM. *Vibrionaceae*// Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. vol. 2, Part B. 2nd eds. Berlin: Springer, 2004:491-540.
- [6] 吕俊超,张晓华,王燕,兰建新,韩茵,刘云. 养殖大菱鲆病原菌——杀鲑气单胞菌无色亚种的分离鉴定和组织病理学研究. 中国海洋大学学报自然科学版 (*Periodical of Ocean University of China Natural Science*) 2009, 39(1):91-95.
- [7] Wiklund T, Tabolina I, Bezgachina TV. Recovery of atypical *Aeromonas salmonicida* from ulcerated fish from the Baltic Sea. *Ices Journal of Marine Science*, 2011, 56(2):175-179.
- [8] Loch TP, Faisal M. Isolation of *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* from lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) inhabiting lakes Michigan and Huron. *Journal of Great Lakes Research*, 2010, 36(sp1):13-17.
- [9] Miñana-Galbis D, Farfán M, Fusté MC, Lorén JG. *Aeromonas molluscorum* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(6):2073-2078.
- [10] Gram L, Huss HH. Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, 33(1):121-137.
- [11] MacDonell MT, Colwell RR. Phylogeny of the family *Vibrionaceae* and recommendations for two new genera: *Listonella* and *Shewanella*. *Systematic & Applied Microbiology*, 1985, 6(2):171-182.
- [12] To KK, Wong SS, Cheng VC, Tang BS, Li IW, Chan JF, Seto WK, Tse H, Yuen KY. Epidemiology and clinical features of *Shewanella* infection over an eight-year period. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 2010, 42(10):757-762.
- [13] Tsai MS, You HL, Tang YF, Liu JW. *Shewanella* soft tissue infection: case report and literature review. *International Journal of Infectious Diseases*, 2008, 12(6):e119-e124.
- [14] Otsuka T, Noda T, Noguchi A, Nakamura H, Ibaraki K, Yamaoka K. *Shewanella* infection in decompensating liver disease: a septic case. *Journal of Gastroenterology*, 2007, 42(1):87-90.
- [15] Nam YD, Chang HW, Park JR, Kwon HY, Quan ZX, Park YH, Lee JS, Yoon JH, Bae JW. *Pseudoalteromonas morina* sp. nov., a marine bacterium isolated from tidal flats of the Yellow Sea, and

- reclassification of *Pseudoalteromonas sagamiensis* as *Algicola sagamiensis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(1):12-18.
- [16] Ivanova EP, Gorshkova NM, Zhukova NV, Lysenko AM, Zelepuga EA, Prokofeva NG, Mikhailov VV, Nicolau DV, Christen R. Characterization of *Pseudoalteromonas distincta*-like sea-water isolates and description of *Pseudoalteromonas aliena* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(5):1431-1437.
- [17] Sawabe T, Tanaka R, Iqbal MM, Tajima K, Ezura Y, Ivanova EP, Christen R. Assignment of *Alteromonas elyakovii* KMM 162 (T) and five strains isolated from spot-wounded fronds of *Laminaria japonica* to *Pseudoalteromonas elyakovii* comb. nov. and the extended description of the species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50(1):265-271.
- [18] Ivanova EP, Sawabe T, Lysenko AM, Gorshkova NM, Hayashi K, Zhukova NV, Nicolau DV, Christen R, Mikhailov VV. *Pseudoalteromonas translucida* sp. nov. and *Pseudoalteromonas paragorgicola* sp. nov., and emended description of the genus. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52(5):1759-1766.
- [19] Haas D, Défago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(4):307-319.
- [20] Ferrocino I, Ercolini D, Villani F, Moorhead SM, Griffiths MW. *Pseudomonas fragi* strains isolated from meat do not produce N-acyl homoserine lactones as signal molecules. *Journal of Food Protection*, 2009, 72(12):2597-2601.
- [21] Harriague AC, Brino MD, Zampini M, Albertelli G, Pruzzo C, Misic C. Vibrios in association with sedimentary crustaceans in three beaches of the northern Adriatic Sea (Italy). *Marine Pollution Bulletin*, 2008, 56(3):574-579.
- [22] 李和阳, 陈明霞, 郝天凌, 郑森林, 陈彬. 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. 台湾海峡 (*Journal of Oceanography in Taiwan Strait*) 2011, 30(3):394-299.
- [23] 吴建平, 蔡创华, 周毅频, 吴灶和. 大亚湾网箱养殖区异养细菌和弧菌的数量动态. 湛江海洋大学学报 (*Journal of Zhanjiang Ocean University*) 2006, 26(3):21-25.
- [24] 陈明霞, 李和阳, 李刚, 郝天凌, 焦坤, 韩永盛. 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. 海洋学报 (*Acta Oceanologica Sinica*), 2010, 32(5):117-125.
- [25] Cavallo RA, Stabili L. Presence of vibrios in seawater and *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) from the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea). *Water Research*, 2002, 36(15):3719-3726.
- [26] Grimes DJ, Atwell RW, Brayton PR, Palmer LM, Rollins DM, Roszak DB, Singleton FL, Tamplin ML, Colwell RR. The fate of enteric pathogenic bacteria in estuarine and marine environments. *Microbiological Science*, 1986, 3(11):324-329.
- [27] 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. 中华航海医学与高气压医学杂志 (*Chinese Journal of Nautical Medicine and Hyperbaric Medicine*) 2005, 12(3):171-172.

Composition and distribution of TCBS bacteria groups from sediments of Jiulong River estuary

Mingxia Chen^{1,2}, Heyang Li^{2*}, Yunfei Ma¹, Yingxin Shi¹, Yiling Fu¹, Tianling Zheng³, Senlin Zheng², Bin Chen²

¹ College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China

² Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China

³ Key Lab of Coast and Wetland Ecosystem, Ministry of Education, School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Abstract [Objective] To investigate potential pathogens in waters of Xiamen from Jiulong River, and to provide useful information for the prevention and control of potential pathogen infections. **[Methods]** All samples were spread on Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose (TCBS) agar plates, and then incubated at $26 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 ± 2 h. In total 158 TCBS strains were isolated from TCBS agar plates and pure-cultivated on 2216E agar plates. All strains were identified using the 16S rRNA gene-Restriction fragment length polymorphism (RFLP), 16S rRNA sequence analysis, GenBank database Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) and phylogenetic analysis. **[Results]** The results show that 158 TCBS strains from the sediments of Jiulong River estuary were classified as 7 genus, which were *Pseudomonas* (28%), *Aeromonas* (24%), *Pseudoalteromonas* (19%), *Shewanella* (13%), *Bacillus* (11%), *Vibrio* (4%) and *Psychrobacter* (1%). The composition and distribution of TCBS bacteria groups varied with stations. Non-halophilic or haloduric bacteria groups were dominant in the upper area of Jiulong River estuary, and halophilic and haloduric bacteria were dominant in the lower area, which characterized a typical estuary feature. The salinity played a key role in the distribution of TCBS groups. *Vibrios* did not constitute a significant proportion (6%–19%) of the total TCBS strains at different stations, and most of them distributed at the lower region. **[Conclusion]** There were a lot of potential pathogens in Jiulong River estuary. *Aeromonas*, a typical genus of halotolerant bacteria, was the potentially terrigenous bacteria contamination to the waters of Xiamen. Most *Vibrio* specieses were marine aborigines, which was not directly contaminated from the runoff of Jiulong River.

Keywords: Jiulong River estuary, TCBS bacteria groups, distribution, 16S rRNA gene, RFLP

(本文责编: 王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41006117) and by the Marine Public Welfare Project (200805064, 201205013)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-592-219-5769; E-mail: heyangli@126.com

Received: 22 October 2011 / Revised: 20 March 2012