

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (10) :1314 – 1326; 4 October 2015
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20150206

湛江海水虾池免培养蛭弧菌类生物的多样性

温崇庆^{1*}, 薛明¹, 梁华芳¹, 周世宁^{2*}

¹广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025

²中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275

摘要:【目的】揭示湛江地区海水虾池蛭弧菌类生物 (*Bdellovibrio-and-like organisms*, BALOs) 多样性特点, 为了解 BALOs 在虾池生态系统中的作用与合理应用其防治养殖对虾细菌病害提供基础。【方法】从 8 个热带海水虾池采集水样, 提取总 DNA, 利用 BALOs 科特异引物对水样总 DNA 进行扩增, 通过构建 16S rRNA 基因克隆文库与系统发育分析, 对虾池水体 BALOs 多样性和种群结构进行研究。【结果】从嗜盐噬菌弧菌科 (*Halobacterioviraceae*) 和吞菌弧菌科 (*Peredibacteraceae*) 克隆文库中分别获得 726 个和 664 个有效克隆子, 在 16S rRNA 基因序列 99.5% 相似性水平上分别划分为 68 和 44 个 OTUs (operational taxonomic units)。在 16S rRNA 基因序列 97% 相似性上, 嗜盐噬菌弧菌可划分为 37 个种群, 且绝大多数属于未培养型, 但仅有的 5 个可培养类群占总文库克隆数量 43.5%, 其中可培养类群 IX 和未培养类群 B28 分别是最优势和次优势者; 吞菌弧菌文库共包含 28 个种群, 未培养类群 pa12 最为优势, 唯一可培养类群 A3.12 是第 2 优势者。嗜盐噬菌弧菌与吞菌弧菌多样性大小随盐度高低呈相反趋势, 但两者合起来的总 BALOs 多样性大小在不同虾池间则比较接近。【结论】湛江地区海水虾池中普遍存在高度多样的嗜盐噬菌弧菌和吞菌弧菌种群, 盐度显著影响虾池 BALOs 种群结构组成。

关键词:海水虾池, 蛭弧菌类生物, 嗜盐噬菌弧菌, 吞菌弧菌, 16S rRNA 基因, 多样性

中图分类号: Q939 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 10-1314-13

蛭弧菌类生物 (*Bdellovibrio-and-like organisms*, BALOs), 简称蛭弧菌, 是一类以捕食其它革兰氏阴性菌为生的小型寄生性细菌, 普遍存在于自然和人工生境中^[1]。蛭弧菌是“吃”细菌的细菌, 具有其独特生活周期^[1], 对环境细菌种群结构和功能具有重要但尚未被深入认识的影响^[2], 在生物防治有害细菌上也具有重要应用价值^[1, 3], 尤其在水产养殖上日益受到重视并一定程度得到应用^[4-5]。

根据 16S rRNA 基因序列相似性等特征, 蛭弧菌归属于 δ -变形细菌纲 (*Deltaproteobacteria*) 蛭弧菌目 (*Bdellovibrionales*)。最近蛭弧菌的分类有较大变化, 除最早定义的蛭弧菌科 (*Bdellovibrionaceae*) 和 2004 年中分立出的噬菌弧菌科 (*Bacterioviraceae*)^[6] 外, 还包括不久前从噬菌弧菌科正式独立出的吞菌弧菌科 (*Peredibacteraceae*)^[7-8] 和新划出的嗜盐噬菌弧菌科 (*Halobacterioviraceae*)^[8], 以及最新建议的一

基金项目: 国家自然科学基金 (31372536); 广东海洋大学引进人才启动项目 (E10046)

* 通信作者。温崇庆, Tel: +86-759-2339021, E-mail: chongqingwen@163.com; 周世宁, E-mail: lsszsl@mail.sysu.edu.cn

作者简介: 温崇庆 (1974 -), 男, 安徽郎溪人, 博士, 副教授, 主要从事海洋和水产微生物学研究。

收稿日期: 2015-05-03; 修回日期: 2015-06-01

个科一假噬菌弧菌科 (Pseudobacterioviracaceae)^[9]。其中已报道的海洋或嗜盐蛭弧菌系统进化上几乎都属于嗜盐噬菌弧菌科, 普遍存在于各种咸水和盐份较高生境, 在种水平上可分为多个类群^[10-13]。以往分离培养基础的大量研究, 为认识蛭弧菌尤其是海洋蛭弧菌多样性奠定了重要基础^[10-15]。像其它微生物一样, 环境中易被培养分离的蛭弧菌仅占很少一部分, 而且蛭弧菌通常必须依赖于敏感宿主菌才能被分离培养, 而其可利用的绝大多数潜在宿主菌可能尚未被培养^[16]。因此对蛭弧菌多样性研究, 更需借助于免培养 (culture-independent) 技术^[17], 才能更真实反映其多样性和生态功能。

对虾养殖是我国沿海特别是东南沿海的重要产业之一。其中湛江市对虾养殖面积、产量和出口量等位居全国第一, 是国内对虾产业集中度最高的地区, 号称“中国对虾之都”。病害问题长期制约着对虾养殖业的健康发展。近年来随着高密度对虾养殖业迅速发展和养殖区海水环境污染等原因, 进一步加剧了虾病尤其是弧菌病害的暴发和流行^[18]。海洋蛭弧菌对弧菌具有偏好性裂解, 尤其对与其分离自相同或相似环境的细菌更容易裂解^[12, 14]。近年一些研究表明海洋蛭弧菌能有效消减或调控养殖海水中弧菌含量^[19-22], 并能一定程度上防治对虾弧菌病害^[19, 21]。以往对养殖虾池蛭弧菌生态学研究受限于分离培养方法^[11, 23-24], 难以深入认识其多样性。本文通过构建 16S rRNA 基因文库和测序分析对湛江地区热带海水虾池蛭弧菌多样性进行研究, 为深入认识蛭弧菌在对虾养殖生态系统中的功能奠定基础, 为有效开发和合理应用其防治对虾细菌病害提供依据和参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 虾池水样: 从广东湛江市湖光镇和南三镇近海养殖区各选择 4 个无明显病害的凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 虾池, 分别以 A、B、C、D 和 E、F、G、H 代表湖光镇和南三镇的 4 个虾塘。从每个虾池 4 个边的中点离岸 1 m 处分别用无菌聚乙烯瓶采集距表层 10 cm 的水样各 500 mL, 保存于冰盒带回实验室处理。采样时湖光镇和南三镇虾池对虾放养时间分别为 3 周和 6 周, 各虾池平均水温、盐度

和 pH 信息如表 1 所示。

表 1. 虾池水温、盐度和 pH

Table 1. Temperature, salinity and pH of the shrimp ponds sampled

Shrimp pond ID	T/°C	Salinity /‰	pH
A	28.8	24.44	7.70
B	29.1	26.31	7.55
C	29.4	19.73	7.38
D	29.2	19.37	7.35
E	26.2	25.52	7.46
F	25.8	17.87	7.64
G	25.7	27.14	7.92
H	26.1	18.85	7.72

1.1.2 主要试剂与仪器: TGradient 96 Thermocycler (Biometra, 德国); GeneGenius 凝胶成像系统 (SynGene, 英国); EZNA[®] Water DNA Kit 和 EZNA[®] Gel Extraction Kit (Omega, 美国); Taq 酶, pMD20-T Vector, 限制性内切酶 *Hae* III 和 *Msp* I (TaKaRa, 大连); 限制性内切酶 *Bsh*1236I 和 *Rsa* I (Fermentas, 立陶宛)。

1.2 水样总 DNA 提取

将每个虾池采集的 4 份水样共 2 L 混合在一起, 先经 1.2 μm 混合纤维滤膜过滤, 以去除较大的颗粒性杂质等, 再取滤液 1 L 通过一张 0.2 μm 混合纤维滤膜。采用 Water DNA Kit 提取经 0.2 μm 滤膜浓缩的水样 DNA。

1.3 BALOs 16S rRNA 基因扩增和克隆文库构建

以 Davidov 等^[16]设计的嗜盐噬菌弧菌科特异引物 Bac676F 和 Bac1442R、吞菌弧菌科特异引物 Per676F 和 Per1443R、蛭弧菌科特异引物 Bd529F 和 Bd1007R 分别扩增各水样基因组 DNA。PCR 反应体系和条件参考 Wen 等方法^[11]。Bd 引物扩增时另以蛭弧菌菌株 JSF1 基因组 DNA 为阳性对照模板, JSF1 是以往从商品化蛭弧菌制剂中分离鉴定属于蛭弧菌属的菌株^[4]。每个样品 3 次重复的阳性扩增产物混合后通过 Gel Extraction Kit 纯化目的片段。目的片段与 pMD20-T 载体进行连接, 转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞, 3 次重复。通过氨苄青霉素 (100 μg/mL) 抗性和蓝白菌落筛选阳性克隆, 以相应特异引物对阳性克隆进行菌落 PCR 扩增, 再选取有效克隆进行后续的扩增 rDNA 限制性酶切片段分析 (Amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA)。

1.4 ARDRA 分型和测序

按 Wen 等方法^[11]对阳性克隆目的 PCR 产物分别通过限制性内切酶 *Hae* III、*Msp* I 和 *Bsh*1236I 酶切消化和电泳检测。对三种酶切图谱完全一致的克隆确定为同一 ARDRA 类型,对不同类型根据其克隆数量选择 1–6 个克隆测序。测序后如发现同一 ARDRA 类型的克隆序列相似性不到 99.5%,则以 *Rsa* I 进一步酶切分型后再测序,或者直接将全部克隆测序。

1.5 克隆文库分析

结合测序比较,将 3 种(个别为 4 种)内切酶分型确定的 ARDRA 类型作为一个操作分类单元(Operational taxonomic unit, OTU),同一 OTU 的克隆序列间相似性 $\geq 99.5\%$ 。以 16S rRNA 基因序列相似性 97% 作为界定本研究噬菌弧菌科和吞菌弧菌科类群或“种”的标准^[6],且同一类群序列在系统进化树上的 bootstrap 值大于 50%,新类群名称以其某一测序的代表克隆编号表示。以此计算各克隆文库 OTU 或类群的覆盖度(Coverage, C)、Shannon 多样性指数(H')。覆盖度 C 按公式 $C = 1 - n1/N$ 计算,其中 N 代表分析的有效克隆数, $n1$ 则代表在某一克隆文库中仅出现一次的 OTU 或类群数。通过 CANOCO 4.5 软件运用除趋势对应分析(Detrended correspondence analysis, DCA)^[25] 分别从 OTU 和类群水平上比较不同虾池文库间总 BALOs 种群结构

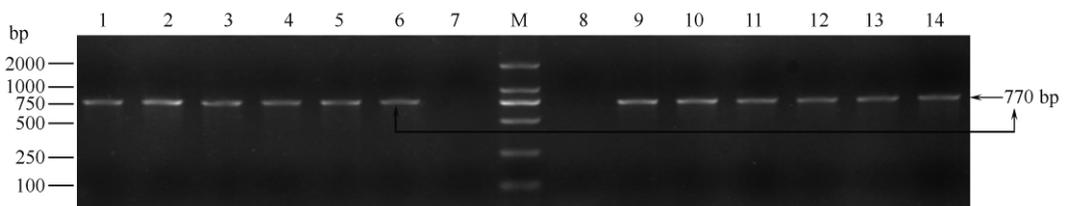


图 1. 嗜盐噬菌弧菌科和吞菌弧菌科 16S rRNA 基因特异引物对水样 DNA 的 PCR 扩增

Figure 1. PCR amplification of water samples DNA by Halobacteriovoraceae-specific (1–7), and Peredibacteraceae-specific (8–14) 16S rRNA gene primers. M: DNA marker; lanes 1–7: shrimp pond water samples A, B, C, D, E, F and negative control; lanes 8–14: negative control and water samples A, B, C, D, E, F.

2.2 16S rRNA 基因克隆文库构建

根据上述 PCR 扩增结果,对 8 个虾池水样分别构建了嗜盐噬菌弧菌科(Hal)和吞菌弧菌科(Per) 16S rRNA 基因克隆文库。从每一水样 Hal 和 Per 转化平板上分别挑取 100 个和 90 个菌落, Hal 克隆直接根据虾池编号加数字表示,如 A1–A100、B1–B100 和 H1–H100 等; Per 克隆则以 pa1–pa90、pb1–pb90 和

的差异。

1.6 系统进化分析

将所得序列在 GenBank 中进行 BLAST 同源性比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),调出其序列相似性最高(97%–100%)的典型序列作为参考序列,结合 BALOs 不同科代表菌株的 16S rRNA 基因序列,通过 MEGA 5.0 软件^[26]以 ClustalW 进行序列比对,以 Kimura-2 参数模型估算系统进化矩阵,采用邻接法(Neighbor-Joining)分别构建嗜盐噬菌弧菌科和吞菌弧菌科系统进化树,Bootstrap 1000 次评估进化树的拓扑稳定性,并以 Kimura-2 参数模型计算本研究系统树上不同分枝间进化距离。

2 结果

2.1 BALOs 16S rRNA 基因扩增

从 8 个虾池水样提取的总 DNA 经琼脂糖电泳检测迁移位置均在 23 kb 左右,片段完整。嗜盐噬菌弧菌科和吞菌弧菌科引物从各水样 DNA 中都扩增出约 770 bp 特异条带,部分样品扩增结果如图 1 所示。而蛭弧菌科特异引物除从阳性对照菌(*Bdellovibrio* sp. JSF1)扩出约 480 bp 特异带外,对所有水样 DNA 均不能获得阳性扩增(图 2)。这表明本研究海水虾池中明显存在嗜盐噬菌弧菌科和吞菌弧菌科蛭弧菌,而不存在或极少存在蛭弧菌科成员。

ph1–ph90 等表示。菌落 PCR 验证显示 90% 左右的克隆都插入有约 800 bp 目的片段。

2.3 克隆文库 OTU 多样性分析

根据 ARDRA 结合测序结果分析,8 个虾池 Hal 文库共包含 68 种 OTU。其中虾池 C 和 H 文库 OTU 数最多,均为 28 个, A 文库最低(17)。计算得到各文库 OTU 覆盖度 C 和 Shannon 多样性指数 H' 如表

2 所示。各虾池 Hal 文库 C 值均在 90% 左右, 表明所建文库覆盖度都比较高, 能较全面反映其多样性。 H' 值反映的多样性大小与各文库 OTU 个数总体一致, 即 $H > C > F > D > E > B > G > A$ 。

8 个虾池 Per 文库共包含 44 种 OTU。与 Hal 文库相似, 各文库都具有较高 (95% 左右) 的 OTU 覆盖度 (表 2)。Per 文库 H' 值大小顺序为 $E > A > G > B > H > F > D > C$, 与 Hal 文库的 H' 值大小顺序呈相反趋势, 即 Hal 文库中盐度较高的 4 个虾池 (A, B, E, G) 平均 H' 值 (2.25 ± 0.15) 显著低于其他 4 个盐度较低虾

池 (C, D, F, H) 的平均 H' 值 (2.87 ± 0.22) ($P < 0.05$), 而在 Per 文库中, A, B, E, G 的平均 H' 值 (2.37 ± 0.29) 则显著高于 C, D, F, H 的平均值 (1.51 ± 0.17) ($P < 0.05$)。若将 Hal 和 Per 文库合起来作为总 BALOs 文库 (Hal + Per) 分析, A, B, E, G 的平均 H' 值 (3.00 ± 0.16) 则与 C, D, F, H 的平均值 (2.90 ± 0.14) 无明显差异 ($P > 0.05$) (表 2)。这表明: OTU 水平上 8 个虾池都具有较高的 Hal 和 Per 多样性, 两者多样性大小受盐度影响明显, 但不同虾池间总的 BALOs 多样性大小趋于一致。

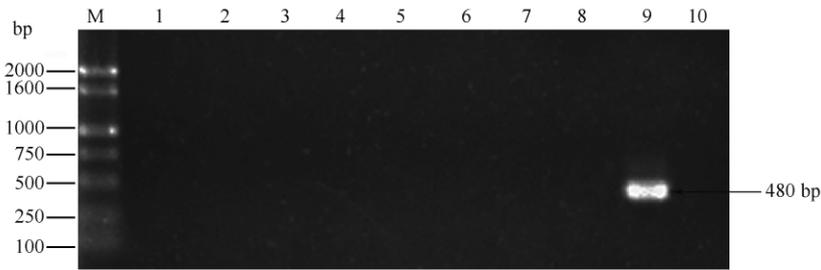


图 2. 蛭弧菌科 16S rRNA 基因特异引物对水样基因组 DNA 的 PCR 扩增

Figure 2. PCR amplification of water samples DNA by Bdellovibrionaceae-specific 16S rRNA gene primers

M: DNA marker; lanes 1–8: Shrimp ponds water samples A–H; lane 9: Positive control (*Bdellovibrio* sp. JSF1); lane 10: Negative control

表 2. 嗜盐噬菌弧菌和吞菌弧菌 16S rRNA 基因克隆文库分析

Table 2. Analysis of Halobacteriovoraceae and Peredibacteraceae 16S rRNA gene clone libraries

Libraries ID*	Clone number**	OTU (99.5%)			Cluster (97%)		
		Number	Coverage (C) (%)	Shannon index (H')	Number	Coverage (C) (%)	Shannon index (H')
Hal A	92	17	89.13	2.09	11	93.48	1.43
Hal B	92	21	89.13	2.35	17	92.39	1.96
Hal C	91	28	89.01	3.03	22	93.41	2.82
Hal D	89	20	94.38	2.58	18	94.38	2.44
Hal E	93	20	92.47	2.41	11	98.92	1.78
Hal F	90	25	92.22	2.80	21	94.44	2.52
Hal G	92	18	92.39	2.15	12	95.65	1.60
Hal H	87	28	90.80	3.06	20	95.40	2.69
Per A	79	18	93.67	2.43	14	97.47	2.20
Per B	81	14	93.83	1.98	14	93.83	1.98
Per C	87	9	95.40	1.27	8	96.55	1.21
Per D	87	8	96.55	1.52	8	96.55	1.52
Per E	82	20	95.12	2.68	15	95.12	2.26
Per F	85	9	95.29	1.60	8	95.29	1.41
Per G	83	19	95.18	2.40	15	96.39	2.14
Per H	80	11	95.00	1.66	9	96.25	1.55
Hal + Per A	171	35	91.23	2.94	25	95.32	2.48
Hal + Per B	173	35	91.33	2.87	31	93.06	2.66
Hal + Per C	178	37	92.13	2.86	30	94.94	2.73
Hal + Per D	176	28	95.45	2.75	26	95.45	2.68
Hal + Per E	175	40	93.71	3.23	26	97.14	2.70
Hal + Per F	175	34	93.71	2.91	29	94.86	2.67
Hal + Per G	175	37	93.71	2.96	27	96.00	2.55
Hal + Per H	167	39	92.81	3.08	29	95.81	2.84

* Hal, Per, and Halo + Per denote the libraries of Halobacteriovoraceae, Peredibacteraceae, and the total BALOs, respectively. ** Clone number indicates the number of valid clones being analyzed.

2.4 嗜盐噬菌弧菌多样性分析

本研究 Hal 文库的代表克隆 16S rRNA 基因序列在 GenBank 收录号为 GQ179996-GQ180058 和 KR153959-KR153974。BLAST 得到的最相似序列均来自咸水（主要是海水）环境的嗜盐噬菌弧菌分离物或与其相近的未培养细菌克隆。从类群（序列相似性 $\geq 97\%$ ）角度分析 Hal 文库多样性特点与上述从 OTU 角度分析结果相似，只是各文库的类群数及 H' 值都随着相似性标准降低而相应减小（表 2）。16S rRNA 基因序列系统进化分析显示（图 3），8 个文库共包含 37 个类群或潜在种，其中有 14 个（A48, B6, B14, B35, B53, C8, C58, C62, C74, C77, D31, D47, F5, F13）是暂不能与 GenBank 中序列聚为群的单一序列，只有 5 个（IX, X, XI, XII, P10）属于已知可培养 Hal 类群（图 3, 图 4）。这表明本研究虾池嗜盐噬菌弧菌在类群或种水平上也具有较高多样性，且绝大多数目前尚未能分离培养。另一方面，属于上述 5 个可培养类群的克隆数在总文库中占 43.5%（图 4）。可见，仅从数量上看，本研究虾池中相当一部分嗜盐噬菌弧菌是相对容易分离培养的。

以克隆数 $\geq 5\%$ 的种群作为文库中优势型，文库 C 优势种群数最多（9），H 次之（7），E 最少（3），其余文库优势种群分别为 4（A, B, G）或 5 个（D, F）（图 4）。类群 IX 的克隆数以 27.6% 的总比例为 8 个 Hal 总文库中的绝对优势者，除了在 C 和 F 文库中分别仅占 1.1% 和 2.2% 外，在其余 6 个文库中或为最优势（A, B, E, G）或为第 2（H）或第 3 优势（D）；类群 XI 以 9.4% 的比例为总文库中的第 3 优势类群，且数量上分别占 A/G, E, B/D 文库的第 2、3、5 位，但在 C/F 和 H 文库中分别仅检测到 1 和 2 个克隆；类群 XII 在 A、C 文库中优势出现，也是 C 文库的最优势类群，但在 E, F, G, H 文库中只有 1-4 个克隆，在文库 B 和 D 中未被检测到。另两个可培养类群（X 和 P10）只在部分文库中以非优势存在。

系统发育树上（图 3），克隆 B28, C81 和 G7 序列与 GenBank 中 2 个未培养克隆 MoSur84（HM023615）和 251-53（FN553492）序列共聚为 B28 类群。B28 类群是总文库的第 2 优势类群，除在 A 和 E 文库中未被检测到外，在另外 6 个文库中均有分布，也是 D, F 和 H 文库的最优势类型。克

隆 B10, B21, B54, E5, F23, H30 和未培养克隆 Reef M20（GU119229）序列共聚为 B10 类群，其在 8 个文库中均有分布，也是总文库的第 4 优势类群。类群 A13, A21, C4, C48, C80, D43, F64 和 H62 均是本研究克隆序列相互聚集的优势类群，其中类群 A13 和 A21 分别是 Hal 总文库的第 5 和第 6 优势者，在所有文库中均有存在，其余类群只在某些文库中出现。单一序列 B14, C8 和 C77 暂未与其它序列聚群，它们各自独立成优势群，分别只在 F、C 和 C/G 文库中优势存在。此外，不属于上述可培养或优势类群的非优势未培养种群在不同文库中所占比例也有所差异（图 4）。

系统发育树上本研究所有 Hal 克隆序列及其相近序列共聚在一起，归属于嗜盐噬菌弧菌科 Halobacteriovoraceae（图 3），它们与另外 4 个 BALOs 科的模式菌株序列差异分别为 8.82%（噬菌弧菌科 *Bacteriovorax stolpii* Uki2^T）、10.85%（吞菌弧菌科 *Peredibacter starrii* A3.12^T）、17.45%（假噬菌弧菌科 *Pseudobacteriovorax antillogorgiicola* RKEM611^T）和 19.06%（蛭弧菌科 *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100^T），即从其与模式菌株距离上看，嗜盐噬菌弧菌整个群体与非嗜盐的噬菌弧菌科亲缘关系最相近，而与蛭弧菌科距离最远。

2.5 吞菌弧菌多样性分析

本研究 Per 文库的代表克隆序列在 GenBank 登录号为 FJ648610-FJ648643 和 KR153975-KR153989。从种群角度分析 Per 文库多样性情况与前述 OTU 水平上的完全一致或极其相似（表 2）。8 个 Per 文库共包含 28 个类群或潜在种，其中有 16 个是暂不能与其它序列聚为群的单一序列（图 5）。克隆 pa11、pe3、pe16、pf75 与模式菌株 A3.12 为代表的可培养吞菌弧菌序列最相近，在 98.5% 的相似水平上聚为一个分枝；pa9 和 pb8 与未培养克隆序列 SSmCB08-82（AB176243）和 236（EF188429）在 98.2% 的相似水平上聚为一个分枝，两个分枝共聚于 A3.12 类群。A3.12 类群是 Per 总文库的第 2 优势类群，只在盐度较高的虾池 A, B, E, G 文库中优势存在，并且是文库 B, E, G 的最优势类群（图 6），但在盐度较低的 4 个虾池文库中未被检测到（C, D, H）或只检测到一个克隆（F）。

本研究 5 个克隆序列（pa12, pc24, pc50, pd65 和 pd79）与未培养克隆 ARTE4 265（GU230385）和

SBXY 5713 (JN430389) 序列一同组成 Per 总文库中最优势的 pa12 类群。除 G 文库外, pa12 类群在所有文库中都有分布, 且是盐度较低的虾池 C, D, H 文库的最优势类群和 F 文库的第 3 优势群 (图 6)。另外 6 个优势未培养类群 (pa1, pa8, pa46, pa52, pe1, pg14) 为本研究克隆序列相互聚群而成的 (图 5, 图 6), 其中类群 pa46 是 Per 总文库中第 4 优势类群, 并在 5 个文库 (D, E, F, G, H) 中优势存在, 但在 D 文库中未被检测到; 类群 pa8 是盐度较高虾池 A, B, E, G 文库的优势群和总文库的第 6 优势群, 但在 C 文库只出现一次, 在 D, F, H 文库中未被检测到; 类群 pa1 是文库 A 的最优势群, 也是 E 文库的优势群, 但在 H 和 G 文库中分别只有 1 个和 2 个克隆, 在盐度低的 4 个虾池文库中均未检测到; 类群 pe1 只在 E, G, H 文库中检测到, 且均为它们的优势群; 类群 pa52 和 pg14 分别只在 A 和 G 文库中优势存在, 在其他文库中为非优势或未检测到。

pd1, pc7, pb2, pa2 和 pa5 序列都是暂未与其它序列聚群的单一序列 (图 5, 图 6), 其中 pd1 是 Per 总文库的第 3 优势类型, 只在盐度较低的 4 个虾池文库中以最优势 (D) 或第 2 优势 (C 和 H) 或第 3 优势 (F) 存在; pc7 是总文库的第 5 优势类型, 除了在文库 E 中未检测到外, 在其余文库中都有分布, 且分别是 D, C, H 文库的第 2、第 3 和第 4 优势型; pb2 只在 B 和 D 文库中优势存在, 以及在 E 和 G 文库中非优势存在; pa2 和 pa5 分别是 A 文库的第 2 和第 3 优势型, pa5 也是 E 文库的优势型, 它们在其它文库中未被检测到或只在 G 文库中非优势存在。此外, 由 4 个非优势类群 (pb5, pd68, pg3, pe50) 和 11 个单一序列 (pa3, pa6, pa38, pb1, pb14, pb22, pb68, pb90, pc52, pc56, pd82) 共同组成 Per 文库的非优势未培养种群, 它们在不同文库所占比例也有所差异。

系统发育树上, 吞菌弧菌目前唯一一个可培养类群 (A3.12) 与 pb1 序列聚为一个分枝, 而其余未培养吞菌弧菌序列聚为另一大分枝, 两者构成总的吞菌弧菌科分枝。吞菌弧菌科分枝与其它几个科模式菌株序列差异分别为 8.89% (嗜盐噬菌弧菌科 *Halobacteriovorax marinus* SJ^T)、10.37% (噬菌弧菌科 *Bacteriovorax stolpii* Uki2^T)、18.04% (假噬菌弧菌科 *Pseudobacteriovorax antillogorgicola* RKEM611^T) 和 19.62% (蛭弧菌科 *Bdellovibrio bacteriovorus* HD

100^T)。从其与模式菌株距离看, 吞菌弧菌整个群体与嗜盐噬菌弧菌科亲缘关系最密切, 与蛭弧菌科亲缘关系最远。

2.6 虾池间 BALOs 种群结构差异

对 Hal 和 Per 文库组成的总 BALOs 文库分别在 OTU 和类群水平上进行除趋势对应分析 (DCA), 结果如图 7 所示。从图中可看出 8 个虾池文库中, 无论在 OTU 还是类群水平上, 4 个盐度较高的虾池 (A, B, G, E) 都与盐度较低的 4 个虾池 (C, D, F, H) 相互分开, 各自聚为一群, 两者间 adonis Jaccard 和 adonis Bray 差异都达极显著水平 ($P < 0.01$), 这表明盐度显著影响了虾池 BALOs 种群结构组成。

3 讨论

蛭弧菌生态学研究, 长期依赖于直接培养方法, 免培养的分子生态学方面研究起步较晚^[17]。Davidov 等^[16]最早设计了针对不同蛭弧菌科属特异 16S rRNA 基因引物, 并通过变性梯度凝胶电泳技术分析了一个土壤样品蛭弧菌多样性, 发现土壤中存在高度多样的蛭弧菌种群; Zheng 等^[27]和 Essche 等^[28]分别开发了针对嗜盐噬菌弧菌科和蛭弧菌科的荧光定量 PCR 技术, 前者对海水和后者对淡水样品的定量结果均比用经典双层平板法计数结果高两个数量级。Kandel 等^[2]研究了零排放海水和淡水养殖实验体系中嗜盐噬菌弧菌科和蛭弧菌科丰度变化, 荧光定量 PCR 检测到的蛭弧菌含量占总细菌含量的 0.13%–1.4%, 而从 16S rRNA 基因序列数量上分析, 蛭弧菌含量只相当于定量 PCR 结果 1/5 到 2/3。最近 Li 和 Williams^[13]通过 454 测序分析了海水样品嗜盐噬菌弧菌科和淡水样品蛭弧菌科多样性, 发现前者多样性明显高于后者, 并揭示了一些新的未培养嗜盐噬菌弧菌类群。这些免培养研究从不同角度揭示了不同生境中蛭弧菌多样性或丰度。本研究则通过构建蛭弧菌不同科的 16S rRNA 基因克隆文库和测序分析研究了海水虾池免培养蛭弧菌多样性。

2004 年以来, 几乎所有咸水来源蛭弧菌分离物都被包括在噬菌弧菌属 (*Bacteriovorax*), 与非嗜盐的吞菌弧菌属 (*Peredibacter*) 一同构成噬菌弧菌科^[6]。最近, Koval 等^[8]将噬菌弧菌属中嗜盐成员转移到新设立的嗜盐噬菌弧菌科嗜盐噬菌弧菌属

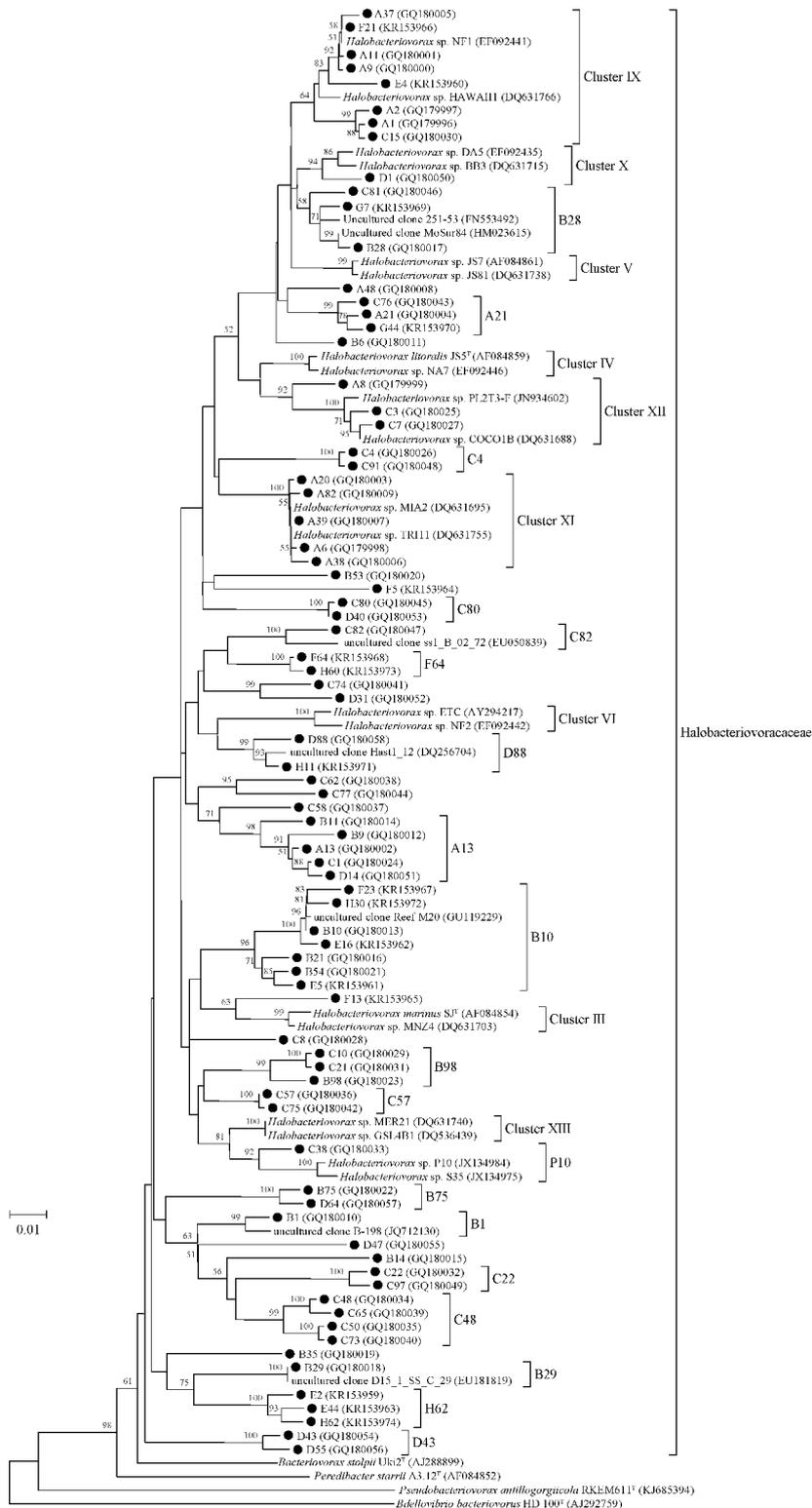


图 3. 嗜盐噬菌弧菌 16S rRNA 基因系统进化树

Figure 3. Phylogenetic tree of 16S rRNA gene of the Halobacterioviraceae by using Neighbor-Joining method. Numbers at branch points indicate bootstrap values above 50%. The sequences accession number in GenBank were shown in parentheses. The scale bar corresponds to 1% sequence divergence. Uncultured clone sequences from this study are indicated by filled circles.

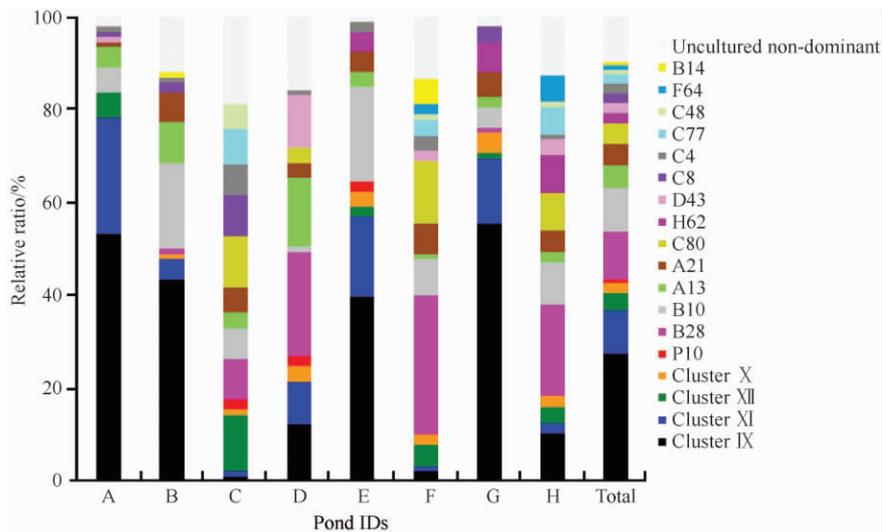


图 4. 嗜盐噬菌弧菌优势类群组成

Figure 4. Dominant cluster composition of Halobacteriovoraceae from shrimp ponds water samples. A, B, C, D, E, F, G, H indicated shrimp pond IDs, and the “Total” denoted the total of the eight shrimp ponds.

(*Halobacteriovorax*), 同时将吞菌弧菌属也从中剥离出并升级为以前就建议但未被正式认可的吞菌弧菌科^[7], 而其它非嗜盐的噬菌弧菌属菌株仍保留在噬菌弧菌科噬菌弧菌属。本研究所用特异引物 Bac676F 和 Bac1442R 是 Davidov 等^[16] 设计针对以往噬菌弧菌科中非吞菌弧菌属成员的, 也即涵盖了目前的嗜盐噬菌弧菌科和噬菌弧菌科。该引物很容易从本研究水样 DNA 模板获得目的扩增片段, 说明虾池水样中不仅存在咸水环境中最容易分离的嗜盐噬菌弧菌, 也可能存在噬菌弧菌。但噬菌弧菌的非嗜盐性以及本研究虾池盐度总体上相对较高, 减少了这种可能性。系统发育树上本研究所有 Hal 克隆序列及相近序列共聚为嗜盐噬菌弧菌科(图 3), 它们与噬菌弧菌科模式菌株 *B. stolpii* Uki2^T 明显分开, 进一步降低了噬菌弧菌在本研究虾池中存在的可能性。

引物 Per676 和 Per1443R 则完全针对吞菌弧菌科^[16]。吞菌弧菌科被认为是非嗜盐的淡水型或陆生型蛭弧菌, 目前报道仅有的 4 株分离物都来源于土壤^[6-8], 其中菌株 EPA 和 EPC3 都源自一个盐份较高的土壤样品, 而菌株 SRP1 和模式菌株 A3.12 则来自盐份未知的土壤样品, 它们的生长盐度范围目前尚未明确报道。本研究吞菌弧菌科引物对所有样品 DNA 都获得阳性扩增, 说明海水虾池中存在吞菌弧菌。系统发育树上, 除克隆 236 (EF188429) 来自盐份未知的样品外, 所有其它未培养克隆序列均源自海洋或盐份较高的土壤环境。可见, 吞菌弧菌可能普遍存在于盐

份较高的生境, 即使不嗜盐, 很可能是比较耐盐的。

蛭弧菌科菌株是典型的陆生或淡水型蛭弧菌, 其耐盐性较差, 通常很难在盐度高于 5‰ 的环境中生存和分离到^[2, 8, 14]。RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>) 16S rRNA 基因数据库中几乎也未见有来自咸水环境蛭弧菌科分离物或未培养克隆。这表明蛭弧菌科成员难以适应盐度较高的环境, 很可能只在盐度较低的生境中存在。因此, 很自然, 本研究中蛭弧菌科特异引物对所有水样 DNA 模板都不能获得阳性扩增, 即使通过提高 PCR 扩增循环数或二次 PCR 也未获得阳性扩增(结果未显示)。可见, 海水环境包括本研究海水虾池在内不存在或只是较少存在某些较耐盐的蛭弧菌科成员, 如储卫华等^[19] 报道过从盐度未知的对虾养殖环境中分离鉴定到一株属于蛭弧菌属的海洋蛭弧菌, 以及 Kandel 等^[2] 定量 PCR 检测到蛭弧菌科成员存在于盐度 20‰ 的海水养殖体系。

最新设立的假噬菌弧菌科属于嗜盐型蛭弧菌, 目前只有一个分离物, 即其模式菌株 *Pseudobacteriovorax antillogorgiicola* RKEM611^T, 该菌株只裂解 *Pseudoalteromonas* sp. RMEK680, 对其它测试的潜在宿主菌都不能裂解^[9]。GenBank 中暂时也极少见与其同源性超过 97% 的序列, 因此, 推测假噬菌弧菌科蛭弧菌很可能不存在或者仅以极低形式存在于虾池, 尽管本研究未对其进行分析。

本研究表明湛江地区虾池海水中不仅存在高度多样的嗜盐噬菌弧菌, 也普遍存在多样性较高的吞

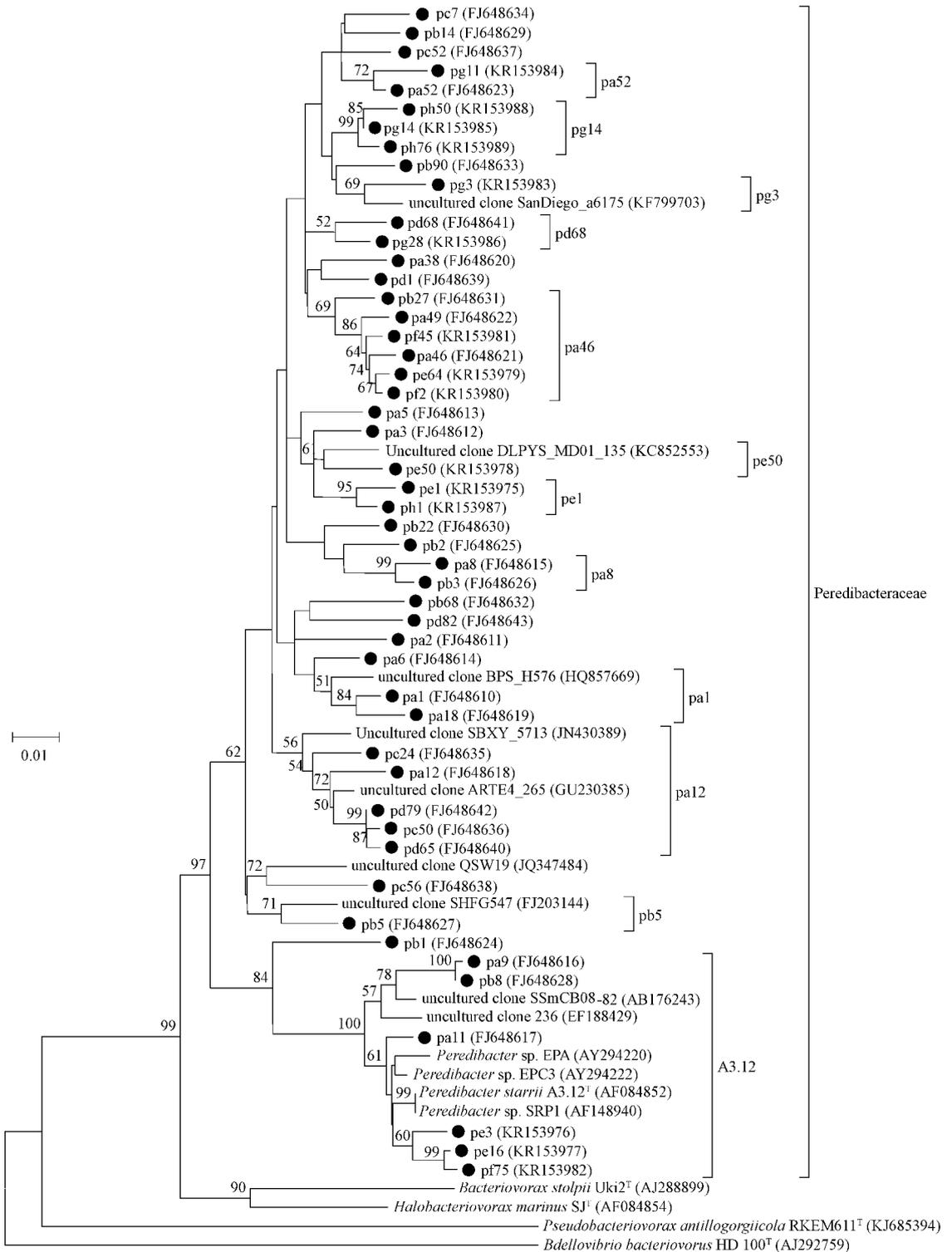


图 5. 吞菌弧菌 16S rRNA 基因系统进化树

Figure 5. Phylogenetic tree of 16S rRNA gene of the Peridibacteraceae by using Neighbor-Joining method. Numbers at branch points indicate bootstrap values above 50%. The sequences accession number in GenBank were shown in parentheses. The scale bar corresponds to 1% sequence divergence. Uncultured clone sequences from this study are indicated by filled circles.

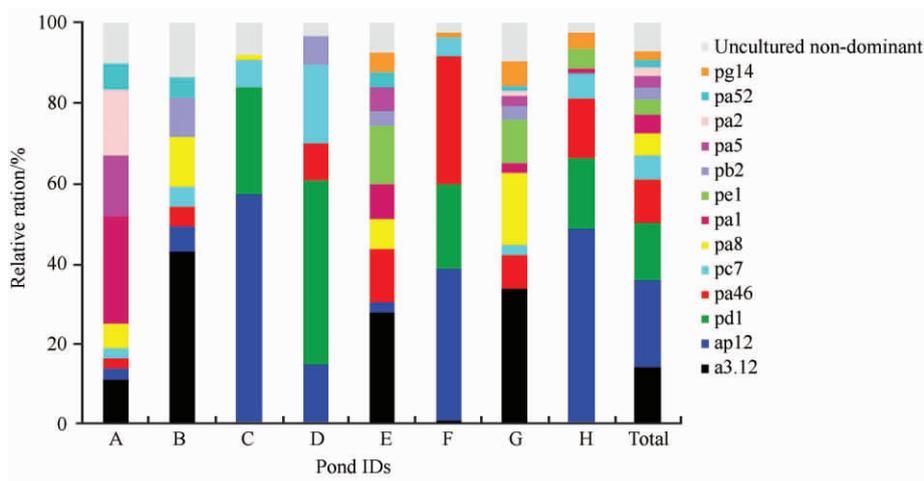


图 6. 吞菌弧菌优势类群组成

Figure 6. Dominant cluster composition of Peredibacteraceae from shrimp ponds water samples. A, B, C, D, E, F, G, H indicated shrimp pond IDs, and the “Total” denoted the total of the eight shrimp ponds.

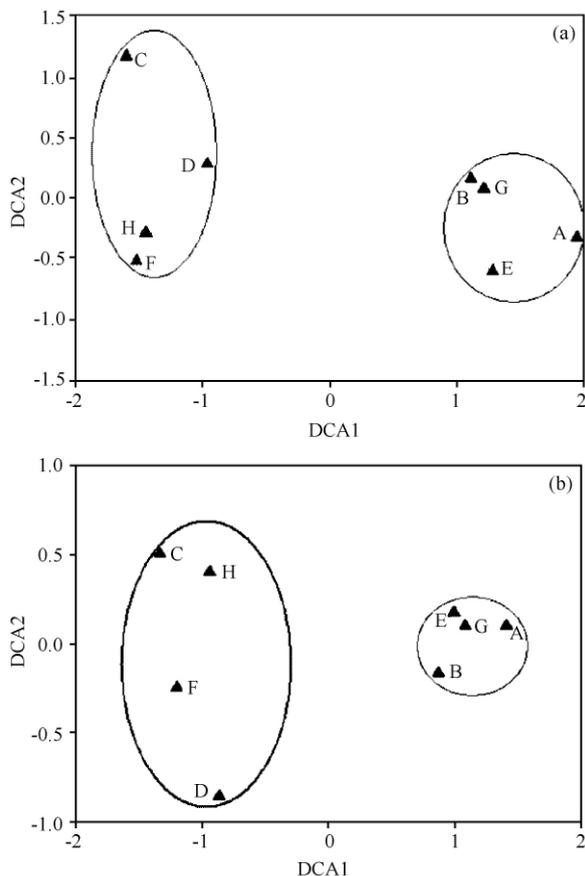


图 7. 基于 OTU (a) 和类群 (b) 水平除趋势对应分析虾池 BALOs 种群结构组成

Figure 7. Detrended correspondence analysis of community structure and composition of BALOs in shrimp ponds based on OTU (a) and cluster (b). A, B, C, D, E, F, G indicated shrimp pond IDs.

菌弧菌。将两个科合在一起作为总 BALOs 分析显示,即使多样性最小的虾池 A 文库也包含 25 个系统群或潜在“种”。本研究揭示的绝大多数 BALOs 类群尤其是吞菌弧菌类群目前还未被分离到,一方面是因为 BALOs 分离培养时通常严格依赖于宿主菌的存在,而且分离培养时所用宿主菌一般仅用一种或少数几种,不太可能满足不同 BALOs 对宿主菌的差异要求。另一方面,可能由于类群 IX 等易于培养的嗜盐噬菌弧菌数量上占优势^[10-11],且分离培养时不同 BALOs 间缺乏易于区分的表型差异,从而减少了其它种群 BALOs 在双层平板上被分离的机会。

除趋势对应分析 (DCA) 是一种间接排序方法,可将被分析对象作为点在二维或三维空间进行排列,从而客观反映它们的相似关系或差异性^[25]。本研究以 8 个虾池为对象,通过除趋势对应分析对虾池 BALOs 种群结构组成模式进行定量分析。结果显示 OTU 和类群水平上,8 个虾池,无论其位于湖光镇养殖 3 周的还是南三镇养殖 6 周的,也无论其水温或 pH 差异,都依其盐度高低明显划分为两大群(图 7)。这表明本研究已知的几个因素中盐度是影响虾池 BALOs 种群结构组成的最主要因素。这与 Wen 等^[11]和 Pineiro 等^[29]对可培养海洋蛭弧菌相关研究结果是一致的,他们分别发现盐度对虾池和海湾环境特定类群海洋蛭弧菌的分布有重要影响。本研究一个值得关注的现象是,无论从 OTU 还是类群角度分析,Hal 文库与 Per 文库 Shannon 多样性指数 (H') 大小随盐度高低呈相反趋势,即盐度较高时 Per 多样性较高,反之盐度较低时 Hal 多样性较

高,但 Hal 与 Per 合起来的总 BALOs 多样性大小在不同虾池间又趋于一致,暗示着海水虾池中嗜盐噬菌弧菌和吞菌弧菌两大种群间可能存在竞争但互补的关系。BALOs 多样性的这种现象在咸水环境中是否普遍存在及其生态学意义都值得进一步研究。

微生物生态系统中的优势种群通常担当重要功能,对整个种群的微生态平衡起决定性作用。本研究嗜盐噬菌弧菌可培养类群 IX, XI 以及未培养类群 B28 分别是 Hal 总文库的第 1、第 3 和第 2 优势类群,共占总文库比例的 47.1%。以往对可培养海洋蛭弧菌研究也显示类群 IX 是咸水环境中最普遍分离的 BALOs^[10],在绝大多数海水虾池中也优势存在^[11],而类群 XI 还未在虾池中被分离报道过。吞菌弧菌 3 个最优势种群 pa12, A3.12 和 pd1 占其总文库比例的 50.3%。最优势的 pa12 类群几乎普遍存在于各虾池;类群 A3.12 是吞菌弧菌科目前唯一可培养类群,只在本研究盐度相对较高的 4 个虾池(A, B, E, G)中优势存在。相反, pd1 只在盐度相对较低的 4 个虾池(C, D, F, H)中优势出现。虾池等咸水环境中某些优势种群蛭弧菌的普遍性及其适应性机制还不清楚,除了盐度和温度等环境因子起重要影响外^[14],作为蛭弧菌宿主的细菌多样性和种群结构可能是最直接和最关键因素,值得进一步探究。

凡纳滨对虾是广盐性虾种,在海水、咸淡水和淡水中均可养殖。研究表明盐度对 BALOs 种群结构和多样性影响显著,因此,在应用 BALOs 防治对虾细菌病害时,必须根据虾池盐度等条件选用适合菌种。普遍存在于虾池的优势种群如嗜盐噬菌弧菌类群 IX 和吞菌弧菌 pa12,在防治对虾海水养殖细菌病害上最具潜力,而适应特定盐度的优势种群如吞菌弧菌类群 A3.12 和 pd1 则分别适用于盐度相对较高和较低的虾池。如果用于盐度极低(如 5‰以下)或者淡水虾池的话,嗜盐噬菌弧菌甚至吞菌弧菌都不适用,而蛭弧菌科或噬菌弧菌科 BALOs 则能发挥作用。今后在广泛采样基础上,对不同地域和不同养殖环境虾池 BALOs 种群多样性及其与细菌种群多样性间的相互关系进行研究,将有助于更全面阐明虾池 BALOs 多样性特点,为应用 BALOs 防治对虾细菌病害提供更具针对性依据。

本研究通过免培养技术,对海水虾池未培养 BALOs 多样性进行了研究,揭示了许多新的 BALOs 种群,发现湛江地区热带海水虾池中不仅存在高度多样的嗜盐噬菌弧菌,也普遍存在以往未曾报道过的吞

菌弧菌,这两个科的种群多样性受盐度影响明显,且两者间可能存在竞争而互补的关系。这种高度多样性暗示着 BALOs 在虾池细菌生态系统和物质循环中扮演重要角色,为应用 BALOs 防治对虾养殖细菌病害提供了一定依据和参考,也提出了新的挑战:选用哪个或哪些种群蛭弧菌最为合理,不同种群蛭弧菌对虾池病原菌裂解效果如何,如何分离到优势未培养蛭弧菌,影响防治效果的主要因素是什么,蛭弧菌与细菌种群结构间如何相互作用,虾池细菌病害发生与否与蛭弧菌种群多样性和丰度有何关联等。

参考文献

- [1] Rotem O, Pasternak Z, Jurkevitch E. The Genus *Bdellovibrio* and Like Organisms // Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. (Eds.) The Prokaryotes (4th edition), Deltaproteobacteria and Epsilonproteobacteria. Berlin: Springer, 2014.
- [2] Kandel PP, Pasternak Z, van Rijn J, Nahum O, Jurkevitch E. Abundance, diversity and seasonal dynamics of predatory bacteria in aquaculture effluent discharge systems. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 89 (1): 149-161.
- [3] Dwidar M, Monnappa AK, Mitchell RJ. The dual probiotic and antibiotic nature of *Bdellovibrio Bacteriovorus*. *BMB Reports*, 2012, 45 (2): 71-78.
- [4] Wen CQ, Xue M, Zhang JY, Huang Y, Zhou SN. The detection of *Bdellovibrio-and-like* organisms in commercial preparations used for aquaculture. *Journal of Fisheries of China*, 2009, 33 (2): 326-333. (in Chinese)
温崇庆, 薛明, 张金燕, 黄瑜, 周世宁. 水产养殖用蛭弧菌类生物制剂的检测. *水产学报*, 2009, 33 (2): 326-333.
- [5] Cao HP, He S, Ou RJ, Hou SL, Gao XH, Yan XL. Progress on *Bdellovibrio bacteriovorus* used in aquaculture. *Progress in Veterinary Medicine*, 2013, 34 (1): 86-90. (in Chinese)
曹海鹏, 何珊, 欧仁建, 侯三玲, 高晓华, 杨先乐. 水产用噬菌蛭弧菌研究进展. *动物医学进展*, 2013, 34 (1): 86-90.
- [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.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54 (5): 1439-1452.
- [7] 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.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58 (5): 1203-1209.
- [8] Koval SF, Williams HN, Stine OC. Reclassification of *Bacteriovorax marinus* as *Halobacteriovorax marinus* gen. nov., comb. nov. and *Bacteriovorax litoralis* as *Halobacteriovorax litoralis* comb. nov.; description of Halobacteriovoraceae fam. nov. in the class Deltaproteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65 (2): 593-597.
- [9] McCauley EP, Haltli B, Kerr RG. Description of *Pseudobacteriovorax antillogorgiicola* gen. nov., sp. nov., a bacterium isolated from the gorgonian octocoral *Antillogorgia elisabethae*, belonging to a novel bacterial family, *Pseudobacteriovoracaceae* fam. nov., within the order Bdellovibrionales. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65 (2): 522-530.
- [10] Pineiro SA, Stine OC, Chauhan A, Steyert SR, Smith R, Williams HN. Global survey of diversity among environmental saltwater *Bacteriovoracaceae*. *Environmental Microbiology*, 2007, 9 (10): 2441-2450.
- [11] Wen CQ, Lai XT, Xue M, Huang YL, Li HX, Zhou SN. Molecular typing and identification of *Bdellovibrio*-and-like organisms isolated from seawater shrimp ponds and adjacent coastal waters. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106 (4): 1154-1162.
- [12] Xue M, Guan ML, Wang FY, Wen CQ. Comparison of two media for isolation and diversity analysis of marine *Bdellovibrio*-and-like organisms in shrimp hatchery system. *Microbiology China*, 2014, 41 (9): 1723-1732. (in Chinese)
薛明, 关敏丽, 王飞燕, 温崇庆. 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. 微生物学通报, 2014, 41 (9): 1723-1732.
- [13] Li N, Williams HN. 454 Pyrosequencing reveals diversity of *Bdellovibrio* and like organisms in fresh and salt water. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2015, 107 (1): 305-311.
- [14] Williams HN, Piñeiro S. Ecology of the predatory *Bdellovibrio* and like organisms // Jurkevitch E. *Predatory Prokaryotes*. Berlin: Springer, 2007.
- [15] Peng ZH, Cai JP, Wu B, Yuan ED. Isolation and characterization of *Bdellovibrio* strains from the ocean. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48 (11): 1425-1431. (in Chinese)
彭宗辉, 蔡俊鹏, 吴冰, 袁尔东. 两株海洋蛭弧菌的分离及生物学性质. 微生物学报, 2008, 48 (11): 1425-1431.
- [16] 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. *Environmental Microbiology*, 2006, 8 (9): 1667-1673.
- [17] Koval SF. The Search for hunters: culture-dependent and -independent methods for analysis of *Bdellovibrio* and like organisms // Jurkevitch E. *Predatory Prokaryotes*. Berlin: Springer, 2007.
- [18] De Schryver P, Defoirdt T, Sorgeloos P. Early mortality syndrome outbreaks: a microbial management issue in shrimp farming? *PLoS Pathogen*, 2014, 10 (4): e1003919.
- [19] Chu WH, Zhu W, Kang CT. Isolation, identification of marine *Bdellovibrios* and its effect on *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiology China*, 2009, 36 (1): 20-24. (in Chinese)
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. 微生物学通报, 2009, 36 (1): 20-24.
- [20] Richards GP, Fay JP, Dickens KA, Parent MA, Soroka DS, Boyd EF. Predatory bacteria as natural modulators of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in seawater and oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78 (20): 7455-7466.
- [21] Wen C, Xue M, Liang H, Zhou S. Evaluating the potential of marine *Bacteriovorax* sp. DA5 as a biocontrol agent against vibriosis in *Litopenaeus vannamei* larvae. *Veterinary Microbiology*, 2014, 173 (1-2): 84-91.
- [22] Li H, Chen C, Sun Q, Liu R, Cai J. *Bdellovibrio* and like organisms enhanced growth and survival of *Penaeus monodon* and altered bacterial community structures in its rearing water. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80 (20): 6346-6354.
- [23] Zheng TL, Cai LZ. Investigation of the role of *Bdellovibrio* in shrimp pond ecosystems. *Marine Sciences*. 1992, 16 (1): 70-70. (in Chinese)
郑天凌, 蔡立哲. 蛭弧菌在虾池生态系统中的作用研究. 海洋科学, 1992, 16 (1): 70-70.
- [24] Xiao ZM, Xiong SL, Yang JF, Chen CF. Distribution analysis of the functional *Bdellovibrios* in aquaculture area of Ningbo Xiangshangang Bay. *Journal of Marine Sciences*, 2007, 25 (3): 50-58. (in Chinese)
肖志猛, 熊尚凌, 杨季芳, 陈昌福. 象山港养殖区域功能性蛭弧菌的分布特征. 海洋学研究, 2007, 25 (3): 50-58.
- [25] Hill MO, Gauch HG. Detrended correspondence analysis: an improved ordination technique. *Vegetatio*, 1980, 42 (1/3): 47-58.

- [26] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5.0: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28 (10) : 2731-2739.
- [27] Zheng G, Wang C, Williams HN, Pineiro SA. Development and evaluation of a quantitative real-time PCR assay for the detection of saltwater *Bacteriovorax*. *Environmental Microbiology*, 2008, 10 (10) : 2515-2526.
- [28] Essche MV, Sliopen I, Loozen G, Van Eldere J, Quiryneen M, Davidov Y, Jurkevitch E, Boon N, Teughels W. Development and performance of a quantitative PCR for the enumeration of *Bdellovibrionaceae*. *Environmental Microbiology Reports*, 2009, 1 (4) : 228-233.
- [29] Pineiro S, Chauhan A, Berhane TK, Athar R, Zheng G, Wang C, Dickerson T, Liang X, Lympelopoulou DS, Chen H, Christman M, Louime C, Babiker W, Stine OC, Williams HN. Niche partition of *Bacteriovorax* operational taxonomic units along salinity and temporal gradients in the Chesapeake Bay reveals distinct estuarine strains. *Microbial Ecology*, 2013, 65 (3) : 652-660.

Diversity of *Bdellovibrio-and-like* organisms from shrimp mariculture ponds in Zhanjiang

Chongqing Wen^{1*}, Ming Xue¹, Huafang Liang¹, Shining Zhou^{2*}

¹Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, Guangdong Province, China

²School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, Guangdong Province, China

Abstract: [Objective] *Bdellovibrio-and-like* organisms (BALOs) are small-sized, parasitic bacteria that rely on other Gram-negative bacteria for survival. Our work aimed to characterize the community diversity of BALOs associated with tropical shrimp ponds. [Methods] We collected water samples from eight shrimp ponds culturing *Litopenaeus vannamei*, in Zhanjiang, China, and extracted total DNA of the samples. Then the 16S rRNA gene clone libraries were constructed following PCR amplification with BALOs family-specific primers. The community composition and structure of BALOs were further analyzed based on phylogenetic analysis. [Results] A total of 726 and 664 valid clones were obtained from the 16S rRNA gene libraries of families Halobacteriovoracaceae and Peredibacteraceae, respectively. Subsequently, they were respectively grouped into 68 and 44 OTUs (operational taxonomic units) at 99.5% sequence similarity, and assigned into 37 and 28 clusters at 97% similarity. For the Halobacteriovoracaceae libraries, most clusters were so far uncultured with the exception of 5 members, which accounting for 43.5% clones. And the cultivable cluster IX and the uncultured cluster B28 were the first and second dominant ones respectively. For the Peredibacteraceae libraries, the cluster pa12 and the only cultivable cluster A3.12 were the first and second dominant ones respectively. Notably, the values of Shannon diversity indices of Halobacteriovoracaceae and Peredibacteraceae tend to be reversed with the change of salinity, but the total BALOs diversities among the eight shrimp ponds were similar. [Conclusion] Shrimp mariculture ponds in Zhanjinag harbor a high diversity of BALOs comprising of Halobacteriovoracaceae and Peredibacteraceae, and salinity affect their community structure and composition greatly.

Keywords: shrimp mariculture pond, *Bdellovibrio-and-like* organisms, Halobacteriovoracaceae, Peredibacteraceae, 16S rRNA gene, diversity

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31372536) and by the Startup Program for Introduction Personnel of Guangdong Ocean University (E10046)

* Corresponding author. Chongqing Wen: Tel: +86-759-2339021, E-mail: chongqingwen@163.com; Shining Zhou: E-mail: lsszsl@mail.sysu.edu.cn

Received: 3 May 2015 / Revised: 1 June 2015