

蛭弧菌的分离及其生长条件和裂解能力的研究

宋志萍 蔡俊鹏* 王 志 韩 韫

(华南理工大学食品与生物工程学院 广州 510640)

摘 要 蛭菌蛭弧菌具有裂解病原菌、净化水体的功效,从海洋环境中分离到 4 株 Bh04 系列蛭弧菌,对其生长条件进行了测定,同时研究了它们对 61 株菌株的裂解能力。结果表明,在 1%~3% 的盐度范围内,蛭弧菌均可生长,最适盐度为 3%。在 15~30℃ 温度条件下蛭弧菌也可生长,但最适培养温度为 20-25℃;只有在用活的主菌的培养条件下,蛭弧菌才能生长。4 株蛭弧菌分别可裂解 21、24、40、43 菌株,各占总试验菌数(61)的 34.4%、39.3%、65.6% 和 70.5%。4 株蛭弧菌一起,则可裂解 55 菌株,占总试验菌株的 90.2%。研究结果揭示了蛭弧菌在消除海洋环境中有害细菌方面的潜在应用价值。

关键词 蛭弧菌,病原菌,生长条件,裂解能力

中图分类号 Q938 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2005)04-0571-05

蛭弧菌(*Bdellovibrio*)是 1962 年由 Stolp 等首次报道的,发现于菜豆枯萎病假单胞菌体中^[1]。蛭弧菌是一类体形小、运动极为活泼的革兰氏阴性菌,菌体大小约为(0.25~0.4)μm×0.8μm×1.2μm^[2],呈弧状或杆状,菌体尾部有一长鞭。蛭弧菌多见于土壤中,在自来水、盐水、海水、污水、下水管道以及水库中也都有所发现。水生蛭弧菌属倾向于在表面生长,是生物膜的重要组成部分^[3]。它引起人们兴趣和关注的一个最为突出的特性是可以侵染、裂解寄主细胞^[4]。据秦生巨等报告,灭菌的自来水、湖水和模拟自然条件下的河水中,蛭弧菌有清除病菌的作用,清除效率达 90% 以上,甚至 100%。还有文献报道,洁净的河水中检不出蛭弧菌,而污染的河水中则普遍存在,可用蛭弧菌作为水质污染指示菌^[5]。北京水产所曾做过蛭弧菌对鲤感染嗜水气单胞菌预防效果的观察实验,实验结果表明,蛭弧菌对嗜水气单胞菌有较强的裂解和净化作用,对水中氨氮有一定的降解作用,并且对鲤感染嗜水气单胞菌所致暴发性出血病有明显的预防作用^[6]。另有文献报道^[7~13],蛭弧菌在预防及防治鱼、虾、蟹类细菌性疾病方面均有一定效果。本实验从海洋环境中分离到 4 株 Bh04 系列蛭弧菌,对其生长条件进行了测定,同时研究了它们对 61 株菌株的裂解能力,为将来可能的应用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株 用于裂解实验的 61 株试验菌株,包括三大类,分别见表 1、表 2 和表 3。

表 1 回归感染实验证明是九孔鲍苗致病菌的 34 株菌株

Table 1 List of abalone post larvae pathogens used in this study

Strain number	Species	Strain number	Species
1	<i>Vibrio alginolyticus</i>	19	<i>Vibrio alginolyticus</i>
2	<i>Vibrio alginolyticus</i>	20	<i>Serratia odorifera</i>
3	<i>Vibrio alginolyticus</i>	21	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
4	<i>Vibrio alginolyticus</i>	22	<i>Providencia rettgeri</i>
6	<i>Vibrio cholerae</i>	23	<i>Vibrio alginolyticus</i>
7G+	Undetermined	24	<i>Shewanella putrefaciens</i>
8	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	25	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
9	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	26	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
10	<i>Vibrio alginolyticus</i>	27	<i>Shewanella putrefaciens</i>
11	<i>Vibrio alginolyticus</i>	28	<i>Shewanella putrefaciens</i>
12	<i>Shewanella putrefaciens</i>	29	<i>Providencia rettgeri</i>
13	<i>Vibrio alginolyticus</i>	30	<i>Enterococcus agglometans</i>
14G+	Undetermined	31	<i>Klebsiella oxytoca</i>
15	<i>Serratia ficaria</i>	32	<i>Providencia rettgeri</i>
16	<i>Vibrio alginolyticus</i>	33	<i>Aeromonas salmonicida</i>
17	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34	<i>Shewanella putrefaciens</i>
18	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

基金项目 广东省自然科学基金重点项目(020964),华南理工大学“高水平大学建设”苗子项目(321-D76020)

* 通讯作者。Tel 86-20-87538286 E-mail: febjpcai@scut.edu.cn

作者简介 宋志萍(1978-),女,黑龙江省人,硕士研究生,主要研究方向为生物技术。E-mail 10454song@163.com

收稿日期 2004-12-02,修回日期 2005-04-16

表 2 分离自九孔成鲍养殖水体和肠道的 16 株菌株^[16]

Table 2 List of bacterial strains used in this study and which were isolated from abalone guts and farming waters^[16]

Strain number	Species	Strain number	Species
Bh02	<i>Vibrio fluvialis</i>	Bh13	<i>Vibrio minicus</i>
Bh03	<i>Vibrio fluvialis</i>	Bh15	<i>Vibrio minicus</i>
Bh05	<i>Vibrio fluvialis</i>	Sh03	<i>Vibrio fluvialis</i>
Bh07	<i>Enterobacter salazarikii</i>	Sh06	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Bh08	<i>Enterobacter salazarikii</i>	Sh07	<i>Vibrio fluvialis</i>
Bh10	<i>Vibrio minicus</i>	Sh12	<i>Vibrio fluvialis</i>
Bh11	<i>Vibrio fluvialis</i>	Sh13	<i>Vibrio fluvialis</i>
Bh12	<i>Vibrio minicus</i>	Be08	<i>Vibrio hollisae</i>

表 3 其它来源的 11 株菌株

Table 3 List of strains used in this study but from other sources

Strain number	Species	Sources of origin	Strain characteristics
Mvm	<i>Vibrio anguillarum</i>	Gift from professor Yuan-bing Zhang of East China University of Science and Technology , Shanghai	Fish pathogen
Vp-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	From Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention	Human pathogen
Vp +	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	From Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention	Human pathogen
SWBC-A	<i>Vibrio cholerae</i>	Gift from Dr Li Zhu of South China Medical University , Guangzhou	Wild-type strain , not virulent
SWBC-B	<i>Vibrio cholerae</i>	Gift from Dr Li Zhu of South China Medical University , Guangzhou	Wild-type strain , not virulent
11-201	<i>Vibrio cholerae</i>	Gift from Professor Chuang-hua Cai of South China Institute of Oceanology , Academia Sinica , Guangzhou	Wild-type strain , not virulent
11-114	<i>Vibrio cholerae</i>	Gift from Professor Chuang-hua Cai of South China Institute of Oceanology , Academia Sinica , Guangzhou	Wild-type strain , not virulent
10-211	<i>Vibrio cholerae</i>	Gift from Professor Chuang-hua Cai of South China Institute of Oceanology , Academia Sinica , Guangzhou	Wild-type strain , not virulent
2	<i>Vibrio fluvialis</i>	Gift from Dr Hou-bo Wu of South China Institute of Oceanology , Academia Sinica , Guangzhou	Fish pathogen
1833	<i>Vibrio alginolyticus</i>	From Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing	Fish pathogen
1615	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	From Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing	Fish pathogen

1.2.3 特异性 PCR :为从基因水平印证我们所分离到的菌株为蛭弧菌 ,我们采用 UNIQ-10 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒 ,提取它们的基因组 DNA ,进行特异性 PCR 扩增反应。 *E. coli* 以及分离所用的宿主菌株 BH04 的 DNA 为阳性对照。在阳性对照无扩增条带时 ,凡在所预定的区域(约 800 bp)出现扩增条带的 ,均可定为阳性。

参考文献 [3] 设计特异性 PCR 引物一对。上引物 (63F) 碱基序列为 : 5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3' ,下引物 (Bdg842R) 碱基序列为 : 5'-

1.1.2 培养基 :本研究所用培养基均按照参考文献 [3] 制备。

1.1.3 主要试剂和仪器 :dNTPs、 *Taq* 酶、PCR 缓冲液、UNIQ-10 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒、电泳槽和 PCR 仪均购自鼎国生物技术的发展中心。

1.2 蛭弧菌菌株的分离和初步鉴定

1.2.1 分离 :取样自盐度为 3% 的海水 ,用 NB 固体培养基双层平板法进行分离纯化 ,方法同参考文献 [3]。

1.2.2 电镜观测 :将分离到的菌株制成菌悬液 ,浓度为 10⁶ 个/mL。采用负染法对样品进行处理^[14]。电镜观察菌株形态。

CGWCACTGAAGGGGTCAA-3'。由上海基康生物技术有限公司合成。预计 PCR 扩增产物长度为 779 bp。

参考《分子克隆实验指南》PCR 设计原则^[15] ,综合考虑各个因子的影响水平 ,采用 50μL 反应体系 ,其比例如下 :7.5μL 的 10 × PCR buffer(含 Mg²⁺ 1.5mmol/L) ,0.4μL 的 dNTPs (10mmol/L) , *Taq* 酶 0.625μL(2U/μL) ,引物各 2μL ,5μL 模板(10ng/μL) ,PCR 反应条件 :94℃ 5min ;94℃ 1min ,50℃ 1min ,72℃ 1min ,循环 35 次 ,延伸 72℃ 5min。琼脂糖凝胶电泳检查扩增结果。

1.3 培养条件对蛭弧菌生长的影响

将实验菌株于其他条件相同而盐度、温度、宿主菌状态等条件不同的培养环境中增殖,然后双层平板涂布,观察生长的蛭弧菌的数目,进而判断这些条件的不同对实验菌株生长数目的影响,并确定最适生长条件。

1.4 蛭弧菌对 61 株菌的裂解谱

在上述实验所确定的蛭弧菌适宜的生长条件下,研究 4 株蛭弧菌对 61 株菌的裂解谱。

2 结果和分析

2.1 菌株的分离和鉴定

2.1.1 分离:采用双层平板法,从海洋环境中分离到 4 株菌,分别命名为 Bh04-4、Bh04-41a、Bh04-A + 和 Bh04-1f。

2.1.2 电镜观测:对所分离到的 4 株菌进行负染,并在电镜下观察其大小和形态(图 1)。在电镜下,可见菌体为弧状或杆状,其尾部有一长长的鞭毛,为典型的蛭弧菌形态特征。它们菌体大小和鞭毛长度分别如下:Bh04-4 菌体大小为 $7.89 \times 5.26\mu\text{m}$,鞭毛长 $1.84\mu\text{m}$;Bh04-41a 菌体大小为 $8.3 \times 2.76\mu\text{m}$,鞭毛长 $1.15\mu\text{m}$;Bh04-A + 菌体大小为 $5.8 \times 1.9\mu\text{m}$,鞭毛长 $1.05\mu\text{m}$;Bh04-1f 菌体大小为 $5.26 \times 2.28\mu\text{m}$,鞭毛长 $2.1\mu\text{m}$ 。据此,初步确认这 4 株菌均为蛭弧菌。

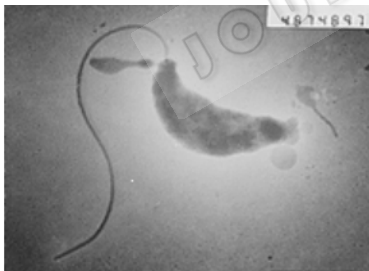


图 1 电镜下的蛭弧菌(48000 ×)
Fig.1 Photos showing *Bdellovibrio* sp. under the electron microscope (48000 ×)

2.1.3 蛭弧菌(*Bdellovibrio*)特异性 PCR 扩增反应:为在基因水平上印证所分离到的菌株为蛭弧菌,我们又进行了特异性 PCR 扩增反应。以 *E coli* 以及分离所用的宿主菌株 BH04 的 DNA 为阳性对照,在阳性对照无扩增条带时,凡在预定的区域(约 800bp)出现扩增条带的,均可定为阳性。特异性 PCR 扩增结果表明,该 4 株菌在大约 800bp 处均有一阳性条带的出现,而作为阳性对照 PCR 则无条带出现,由此再一次证明,该 4 株菌为蛭弧菌(PCR 电泳图未附)。

2.2 盐度对蛭弧菌生长的影响

为研究它们对盐度的适应性,同时考虑到将来在咸(淡)水中应用的可能,我们选择 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5% 和 3% 等 6 个盐度梯度进行试验。结果表明,盐度对 4 株蛭弧菌的生长有明显的影响(表 4)。盐度较低时,4 株蛭弧菌的生长均受到不利的影响,其中 Bh04-4 在 0.5%、1% 盐度下不能存活, Bh04-41a 在 0.5% 盐度下不能存活,而 Bh04-A +、Bh04-1f 在 0.5%、1% 和 1.5% 盐度下不能存活;相反,在接近海水盐度(2.5%)的环境下生长较好,3% 盐度时数量级均达到 10^4 ,其他盐度下则密度有限。因此我们认为蛭弧菌对于环境盐度是比较敏感的。这将限制它们在淡水和/或咸淡水中的应用。

表 4 盐度对蛭弧菌生长的影响(个/mL)

Strains	Salinity					
	0.5%	1%	1.5%	2%	2.5%	3%
Bh04-4	—	—	50	1000	5×10^3	5×10^4
Bh04-41a	—	200	125	2250	5×10^3	5×10^4
Bh04-A +	—	—	—	50	5×10^3	5×10^4
Bh04-1f	—	—	—	2500	5×10^3	5×10^4
— No. grow.						

2.3 温度对蛭弧菌生长的影响

为研究它们对温度的适应能力,我们选择 15℃、20℃、25℃、30℃4 个温度梯度进行试验(因通常情况下海水温度不会超过 30℃,故 30℃以上未做试验)。结果表明,温度对蛭弧菌的生长也有影响(表 5)。虽然在这 4 个温度梯度下,蛭弧菌均可生长,但 Bh04-A +、Bh04-1f、Bh04-41a3 在 25℃时密度最大,而 Bh04-4 则在 20℃时密度最大。在其他温度梯度下,虽然也能生长,但 4 株蛭弧菌均数量有限。因此,总体上可认为 20~25℃是它们的最适温度。

表 5 温度对蛭弧菌生长的影响(个/mL)

Strains	Temperature			
	15℃	20℃	25℃	30℃
Bh04-A +	25	50	7820	55
Bh04-1f	320	5580	6890	842
Bh04-41a	578	6590	7520	780
Bh04-4	643	5740	88	70

2.4 宿主菌状态的影响

为研究蛭弧菌对实验宿主菌株状态的依赖性,为我们在发酵培养蛭弧菌时提供多种选择,我们进行了分别以死、活宿主菌培养蛭弧菌的试验。结果

表明,对于用灭活后的宿主菌对蛭弧菌进行液体培养,或用前者作为宿主菌进行双层平板涂布培养,蛭弧菌均不能生长;而只要是用活的宿主菌对蛭弧菌进行培养,不管是那种方法,蛭弧菌均可生长,在双层平板上出现了噬菌斑。此中原由,很可能是由于灭活后的宿主菌失去了某些蛭弧菌攻击的表面特征,进而导致蛭弧菌不能进入宿主菌生长繁殖。因为,我们曾用高压灭菌后的宿主菌进行过显微镜观察,发现其细胞的整体结构比较完整,没有出现破裂的情况,菌体萎缩。

2.5 4株蛭弧菌对61株宿主菌的裂解谱

为探索这4株蛭弧菌在海水养殖病害防治方面的潜在应用前景,我们选用了弧菌等作为被试菌株。其中, *Vibrio alginolyticus* 10株, *Vibrio anguillarum* 1株, *Vibrio cholerae* 6株, *Vibrio fluvialis* 11株, *Vibrio hollisae* 1株, *Vibrio minicus* 4株, *Vibrio parahaemolyticus* 7株。

在确定了蛭弧菌的最佳生长条件后,我们进行了4株蛭弧菌对61株所试弧菌等的裂解试验。结果表明:①可同时被4种蛭弧菌裂解的有6株菌:17, 18, 32, Sh06, SWBC-A, Vp-;②不可被4种蛭弧菌裂解的也有6株菌:7, 23, 10-211, 2, 1615, 1833;③可被其中任何一株蛭弧菌裂解的则有55株菌(占总试验菌株90.2%):1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, Bh02, Bh03, Bh05, Bh07, Bh08, Bh10, Bh11, Bh12, Bh13, Bh15, Sh03, Sh06, Sh07, Sh12, Sh13, Be08, 11-201, 11-114, SWBC-A, SWBC-B, Mvm, Vp+, Vp-;④Bh04-4可裂解21株菌(裂解率为34.4%):17, 18, 32, Sh06, SWBC-A, Vp-, 1, 3, 6, 8, 11, 16, 24, 26, 28, 30, Bh10, Bh11, Bh13, 11-114, SWBC-B;⑤Bh04-41a可裂解24株菌(裂解率为39.3%):17, 18, 32, Sh06, SWBC-A, Vp-, 3, 4, 8, 13, 29, 31, 34, 35, Bh03, Bh05, Bh08, Bh10, Bh12, Bh15, Be08, Sh12, Sh13, 11-201;⑥Bh04-A+可裂解40株菌(裂解率为65.6%):17, 18, 32, Sh06, SWBC-A, Vp-, 1, 2, 3, 4, 6, 11, 13, 14, 15, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 28, 30, 33, Bh02, Bh03, Bh05, Bh07, Bh08, Bh11, Bh15, Sh03, Sh07, Sh12, Sh13, Be08, 11-114, SWBC-B, Vp+;⑦Bh04-1f可裂解43株菌(裂解率为70.5%):17, 18, 32, Sh06, SWBC-A, Vp-, 1, 2, 4, 6, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 20, 21, 22, 24, 34, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 33,

Bh05, Bh08, Bh10, Bh11, Bh12, Bh13, Bh15, Sh03, Sh13, 11-201, SWBC-B, Mvm。

至于为何有些菌可被某一蛭弧菌裂解而不能被另一所裂解,有些又可被所有的蛭弧菌所裂解,此中机理,将值得我们的进一步的探讨。

3 结论

通过研究,我们可以获知:在1%~3%的盐度范围内,4株蛭弧菌均可生长,最适盐度为3%;在15~30℃温度条件下,4株蛭弧菌均可生长,最适培养温度为20~25℃;只有在使用活的宿主菌的培养条件下,蛭弧菌才能生长;4株蛭弧菌分别可裂解21、24、40、43株菌,各占总试验菌数(61)的34.4%、39.3%、65.6%和70.5%。4株蛭弧菌一起,则可裂解55菌株,占总试验菌株的90.2%。另有6株菌可同时被4株蛭弧菌裂解。

由于蛭弧菌具有裂解病原菌、净化养殖水体的作用,是一种有益菌。本实验结果展示了蛭弧菌对病原菌的裂解能力,为蛭弧菌在海水养殖中的潜在应用提供了科学的基础。

参 考 文 献

- [1] 刑华,何义进,黄钰,等.噬菌蛭弧菌的生物学特性研究.淡水渔业,1997,27(1):17-19.
- [2] 冯晓英,顾玲,庄菱.噬菌蛭弧菌研究进展.江苏预防医学,2000,11(4):75-76.
- [3] Jurkevitch E, Minz D, Barak R. Prey range characterization, ribotyping and diversity of soil and rhizosphere *Bdellovibrio* spp. isolated on phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental*, 2000, 66(6):2365-2371.
- [4] 焦鹏,胡江春,马成新,等.2-KGA蛭弧菌J26基因组DNA文库的构建.云南大学学报(自然科学版),1999,21(3):387.
- [5] 杨淑专,黄庆辉.蛭弧菌指示和净化海水的研究.厦门大学学报,1999,36(6):931-934.
- [6] 杨莉,马志宏,黄文,等.蛭弧菌对鲤感染嗜水气单胞菌预防效果的观察.大连水产学院学报,2000,15(4):288-292.
- [7] 邵桂元,沈启华,宏黎民.鱼病蛭弧菌的微生物生态学初步研究.中国微生物学杂志,1995,7(5):17-19.
- [8] 何义进,邢华,黄钰.噬菌蛭弧菌防治鱼类细菌性疾病的应用研究.水产科技情报,1996,23(5):220-224.
- [9] 马志宏,丁文,杨莉,等.蛭弧菌弧菌对鱼类常见致病菌裂解作用的研究.微生物学通报,1999,26(2):408-411.
- [10] 曾地刚,雷爱莹,彭敏,等.菌预防和治理斑点叉尾回细菌性败血病的初步研究.广西农业科学,2004,35(3):218-220.
- [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.厦门大学学报(自然科学版),1997,36(3):449-453.
- [12] 赵明森.蛭弧菌弧菌在虾蟹病害防治上的作用及其使用方法.现代渔业信息,2002,17(12):14-16.
- [13] 杨吉霞,徐丽,蔡俊鹏.海水养殖中应用蛭弧菌控制病原菌的前景与问题.湛江海洋大学学报,2004,24(3):79-82.

- [14] 林加涵,魏文铃,彭宣宪.现代生物学实验(上册).北京:高等教育出版社,2000,55.
- [15] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南.金冬雁,黎孟枫,等译.第二版.北京:科学出版社,1999,19-30.
- [16] 蔡创华,周毅频,蔡俊鹏,等.九孔鲍(*Haliotis diversicolor supertexta*)养殖水体及消化道细菌学的研究.水产科学,2005(1):1-5.

Study of bacteria-lysis abilities and growth conditions of 4 *Bdellovibrio*

SONG Zhi-ping CAI Jun-peng* WANG Zhi Han Yun

(College of Food Science and Biotechnology , South China University of Technology , Guangzhou 510640 , China)

Abstract : *Bdellovibrio* can lyse pathogenic bacteria and clean up waters. 4 strains of *Bdellovibrio* sp. , designated Bh04-4 , Bh04-41a , Bh04-A + and Bh04-1f , were isolated from seawaters used Bh04 as host bacterium. After confirmation to be *Bdellovibrio* sp. by electron microscopy and specific PCR method , their growth conditions and lytic ability on 61 bacteria from various sources were performed. Results showed that all four *Bdellovibrio* grew in salinity in the range of between 1% and 3% , with 3% salinity being the most suitable one. They grew in the range of temperature from 15 to 30℃ , with 20 ~ 25℃ as their best growth temperature. These four *Bdellovibrio* only grew on live host bacteria rather than the dead ones. When 61 strains of bacteria were used as hosts , Bh04-4 lysed 21 strains , corresponding to 34.4% of lysis ability (21/61) , Bh04-41a lysed 24 strains (39.3% lysis ability) , Bh04-A + lysed 40 strains (65.6% lysis ability) and Bh04-1f 43 strains (70.5% lysis ability). Taken all four *Bdellovibrio* together , they lysed 55 out of 61 strains , amounting to 90.2% lysis ability. Results fully demonstrate the potential application of *Bdellovibrio* in lysing pathogenic bacteria from the marine environments.

Key words : *Bdellovibrio* sp. , Pathogenic bacteria , Growth conditions , Lysis ability

Foundation item : Natural Science Foundation of Guangdong Provincial (020964)

* Corresponding author. Tel 86-20-87538286 E-mail : febjpcai@scut.edu.cn

Received date :12-02-2004