微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
48(11)：1425~1431; 4 November 2008
ISSN 0001-6209; CN11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn

两株海洋蛭弧菌的分离及生物学性质

彭宗辉[1]，蔡俊鹏[1,2]，吴冰[3]，袁尔东[2*]

（[1]华南理工大学生物科学与工程学院，广州 510006）
（华南理工大学，[2]轻工与食品学院，[3]分析测试中心，广州 510640）

摘要：【目的】从深圳湾海泥中分离鉴定蛭弧菌，并对其生物学性质进行初步研究。【方法】通过稀释营养肉汤(dilute nutrient broth，DNB)双层平板法分离蛭弧菌，对所分离的菌株进行电镜形态观测，并进行 16S rDNA 测序分析，之后结合 1994 年版伯杰氏鉴定细菌学手册对菌株进行鉴定，最后通过生理试验对其生物学性质进行研究。【结果】从深圳湾海泥中分离出 2 株蛭弧菌，分别命名为 5#-12 和 5#-sh06，它们可在 20℃~35℃范围内生长，最适温度分别是 25℃和 30℃；生长 pH 范围 6.1~8.6，最适 pH 均为 7.2；2 株蛭弧菌可分别裂解 46 和 48 株试验菌，各占总试验菌株数（58）的 79.3%和 82.8%；联合 2 株蛭弧菌，可裂解 56 株试验菌，占总试验菌株数的 96.6%；同时，它们一起能将所有试验弧菌裂解。【结论】研究结果揭示了蛭弧菌作为一种生物净化因子具有极大的潜在应用价值。

关键词：蛭弧菌；致病菌；分离；生物学性质
中图分类号：Q939　　文献标识码：A　　文章编号：0001-6209 (2008) 11-1425-07

蛭弧菌（*Bdellovibrio*），是一类体积比一般细菌小，呈短杆或弧状，细胞一端有极长鞭毛的革兰氏阴性菌，广泛分布于淡水、污水、沉淀物、土壤和植物根际[1]，甚至在哺乳动物粪便中也有发现[2]，一般来说，凡有细菌存在的地方都有它们的存在。蛭弧菌本身具有一种特性，即：依靠裂解宿主菌使自身得以生长繁殖[3]，它可以裂解大多数科、属的革兰氏阴性细菌和少数革兰氏阳性细菌[4,5]，尤其是对病原弧菌具有良好的裂解作用。目前，由各种致病菌引发的食源性疾病，已成为世界最为关注的卫生问题。针对这一问题，许多学者从蛭弧菌出发，研究其生物学性质、DNA 测序和序列分析，从而挖掘其在生物防治方面的应用价值。据 Wand 等报道，在消除污水致病菌过程中，蛭弧菌起到明显净化作用，从而有效降低其所带来的危害[6]。宋志萍[7]等报道蛭弧菌可用于控制九孔鲍苗的细菌性病害。同时，邵桂元等[8]报道蛭弧菌对引起鲫鱼出病的点状产气单胞菌 ST21 具有明显消除作用。蛭弧菌在其他水产品疾病防治方面也得到广泛应用[9~12]。此外，随着 *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 基因组测序工作的完成[13]，以及最新研究报道的一种快速分离非宿主依耐型蛭弧菌的方法[14]，有效促进了蛭弧菌的研究与利用。

本研究从深圳湾海泥中分离的 2 株蛭弧菌出发，分别在一定温度和 pH 范围内探求蛭弧菌最适生长条件，同时研究它们对 58 株致病菌的裂解能力，为蛭弧菌将来的开发利用提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 蛭弧菌分离材料：样品采集自深圳湾海泥样品（东经 113.98°，北纬 22.51°，5 m~10 m 水深处）。宿主菌株为副溶血性弧菌 sh06（*Vibrio parahaemolyticus* sh06），由本实验室分离保存。选择 58 株不同来源的致病菌作为裂解试验菌株(表 1)。

基金项目：国家自然科学基金(40776091)
*通讯作者。Tel: +86-20-33079179; E-mail: erdyuan@scut.edu.cn
作者简介：彭宗辉(1983–)，男，湖南人，硕士研究生，主要研究方向为海洋生物技术。E-mail: peng31644@163.com
收稿日期：2008-05-21；修回日期：2008-08-29

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表 1　58 株不同来源的试验菌株

Table 1 List of bacteria strains used as potential prey

Prey bacteria strains	Source	Prey bacteria strains	Source
Aeromonas salmonicida 33	A	*Vibrio cholerae* 6	A
Enterococcus agglometans 30	A	*Vibrio cholerae* 10-211	C
Enterobacter salazakii Bh07	A	*Vibrio cholerae* 11-114	C
Enterobacter salazakii Bh08	A	*Vibrio cholerae* 11-201	C
Klebsiella oxytoca 31	A	*Vibrio cholerae* SWBC-A	D
Providencia rettgeri 22	A	*Vibrio cholerae* SWBC-B	D
Providencia rettgeri 29	A	*Vibrio fluvialis* Bh02	A
Providencia rettgeri 32	A	*Vibrio fluvialis* Bh03	A
Pseudomonas aeruginosa 17	A	*Vibrio fluvialis* Bh05	A
Pseudomonas aeruginosa 18	A	*Vibrio fluvialis* Bh11	A
Pseudomonas aeruginosa 35	A	*Vibrio fluvialis* Sh03	A
Serratia ficaria 15	A	*Vibrio fluvialis* Sh07	A
Serratia odorifera 20	A	*Vibrio fluvialis* Sh12	A
Shewanella putrafaciens 12	A	*Vibrio fluvialis* Sh13	A
Shewanella putrafaciens 24	A	*Vibrio hollisae* Be08	A
Shewanella putrafaciens 27	A	*Vibrio minicus* Bh10	A
Shewanella putrafaciens 28	A	*Vibrio minicus* Bh12	A
Shewanella putrefaciens 34	A	*Vibrio minicus* Bh13	A
Vibrio alginolyticus 1	A	*Vibrio minicus* Bh15	A
Vibrio alginolyticus 2	A	*Vibrio parahaemolyticus* 55	A
Vibrio alginolyticus 3	A	*Vibrio parahaemolyticus* 56	A
Vibrio alginolyticus 4	A	*Vibrio parahaemolyticus* 60	A
Vibrio alginolyticus 10	A	*Vibrio parahaemolyticus* 61	A
Vibrio alginolyticus 11	A	*Vibrio parahaemolyticus* 63	A
Vibrio alginolyticus 13	A	*Vibrio parahaemolyticus* 1615	B
Vibrio alginolyticus 16	A	*Vibrio parahaemolyticus* Sh06	A
Vibrio alginolyticus 19	A	*Vibrio parahaemolyticus* Vp-	E
Vibrio alginolyticus 23	A	*Vibrio parahaemolyticus* Vp+	E
Vibrio alginolyticus 1833	B	*Undetermined* 7 G+	A

A: Isolated from seafood guts and farming water, Guangdong. B: From Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing. C: Gifted from Professor Chuang_hua Cai of South China Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou. D: Gifted from Dr Li Zhu of South China Medical University, Guangzhou. E: From Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai.

1.1.2　培养基：本研究所用 DNB 液、固体培养基等培养基均按参考文献[1]配制。

1.1.3　主要试剂和仪器：dNTPs、*Taq* 酶、PCR 缓冲液和 PCR 仪均购自鼎国生物技术发展中心，InstaGene 基质购自美国伯乐公司，PCR 产物纯化试剂盒购自 TaKaRa 公司，MPS-2000 型分光光度计购自日本岛津公司，JEM-200CX 型透射电子显微镜购自日本 JEOL 公司，GL-21M 型高速冷冻离心机由长沙湘仪仪器厂生产。

1.2　蛭弧菌的分离

将宿主制成一定浓度的菌悬液，以取自深圳湾的海泥（盐度为 3%）为样品，采用稀释营养肉汤（dilute nutrient broth，DNB）双层平板法进行蛭弧菌筛选，具体方法步骤同参考文献[1]。

1.3　蛭弧菌的鉴定

1.3.1　初步鉴定：在 DNB 双层平板上，出现了不同形态大小的噬菌斑，对其进行形状、透明度、大小等特征的鉴别，初步鉴定分离出的菌株是否为蛭弧菌。利用 DNB 液体培养基将分离菌株制成菌悬液，浓度约为 10^6 pfu/mL，采用负染法对菌体进行处理，之后在透射电子显微镜下进行鉴定。

1.3.2　PCR 反应：应用 InstaGene 基质提取分离菌株的基因组 DNA，提取的 DNA 用分光光度计测定浓度与纯度。为防止宿主 DNA 得到扩增，按文献[1，15]设计一对特异性 PCR 引物，上引物（63F）为：5’-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3’，下引物（Bdg842R）碱基序列为：5’-CGWCACTGAAGGGG TCAA-3’，由上海基康生物技术有限公司合成。同时，参考《分子克隆实验指南》PCR 设计原则[16]，综合考虑各个因子的影响水平，采用 50 μL 反应体系进行 PCR 反应：94℃ 3 min；94℃ 1 min，56℃ 45 s，72℃ 1 min，循环 35 次；72℃ 10 min。PCR 产物在 1%的琼脂糖凝胶上进行电泳检测。

1.3.3　16S rDNA 部分序列分析：应用 PCR 产物纯化试剂盒对 16S rDNA 片段进行纯化，之后送至上海生工生

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

物技术公司测序。测序后，对 2 株菌的 16S rDNA 部分序列与 GenBank 中已知序列进行比对，接着应用 Blastn 在 GenBank 中进行同源性搜索，最后使用非加权类平均法(unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA)和 Mega 软件进行多重比较后构建系统进化树。

1.4 培养条件对蛭弧菌生长的影响

以 *Vibrio parahaemolyticus* sh06 为宿主，将分离的菌株于其他条件相同，而温度和 pH 条件不同的培养环境中增殖，之后通过双层平板涂布法，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，并确定最适生长温度和 pH。

1.5 蛭弧菌的保存

由于蛭弧菌具有强烈的内源性呼吸作用与特殊寄生的生活周期，在低温条件下又容易死亡，因而对蛭弧菌进行有效而简便的保藏显得比较困难[17]，根据实验需要，采用参考文献[17]所示方法保存。

1.6 蛭弧菌对 **58** 株菌的裂解谱

基于上述实验所确定的蛭弧菌最适生长条件，研究 2 株蛭弧菌对 58 株致病菌的裂解谱。

2 结果和分析

2.1 蛭弧菌的分离和鉴定

2.1.1 菌株的分离：以 *Vibrio parahaemolyticus* sh06 为宿主，应用 DNB 双层平板法分离出 2 株菌，并分别命名为：5#-12 和 5#-sh06，菌株噬菌斑的性状见表 2。

2.1.2 电镜检测：对所分离的 2 株菌进行负染，并在电镜下观察其形态和大小（图 1）。在电镜下，可见 5#-12 和 5#-sh06 的菌体分别是球杆（卵）状和长杆状，分别为 0.38 μm×1.42 μm 和 0.40 μm×1.07 μm。它们极端均带有一长长的单极鞭毛，长度分别为 2.15 μm 和 1.35 μm。

表 2 2 株菌所形成的噬菌斑的性状

Table 2 Characterization of different plaques formed by two strains

Strains	Plagues time /h	Initial diameter of plagues /mm	Diameter of cultured plagues /mm	Morphologies of plaques
5#-12	60	1~2	8~9 (5 d)	Round in shape and transparent
5#-sh06	72	2~3	6~7 (5 d)	Round in shape and transparent

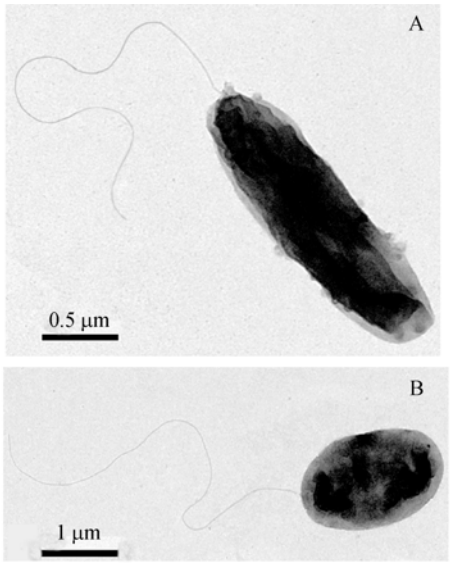

图 1 电镜下 **5#-12**(A, 26000×)和 **5#-sh06**(B, 17000×)

Fig. 1 Transmission electron micrographs of 5#-12 (A, 26000×) and 5#-sh06 (B, 17000×).

2.1.3 PCR 反应：为进一步确认所分离到的菌株为蛭弧菌，本研究利用 16S rDNA 部分序列分析对菌株进行系统进化鉴定。经过特异性 PCR 扩增，2 株菌在大约 800 bp 处均有电泳带出现（图略）。

2.1.4 16S rDNA 部分序列分析：应用 Blastn 对 2 株菌的 16S rDNA 部分序列与 GenBank 中已收录的序列进行同源比较后，使用 UPGMA 方法和 Mega 软件进行多重比较，最后构建出系统进化树（图 2）。通过 Blastn 进行各菌株间相似性比较，2 株菌相似性达到 100%，但它们与所选的典型蛭弧菌亲缘关系较远，出现这种结果主要有如下几方面的原因：(1) 目前国内外学者对蛭弧菌及其 16S rDNA 基因序列分析等研究较少，许多新的、未知的菌株、乃至种、属仍有待发掘；(2) 即使在已有涉及的菌株中，最新研究也表明，作为一类特殊的细菌，蛭弧菌在进化上有较大分歧[2, 19]；(3) 在种属水平上，16S rRNA 基因的系统发育关系与形态分类并不完全对应[20]，反映在进化树上则出现不类聚的现象；(4) 研究表明[21~23]，16S rDNA 基因全序列与部分序列分析相比，在阐明菌株的亲源关系上，即使不是完全相同的话，也是没有明显差异的。因此，目前蛭弧菌的鉴定与分类主要以其形态特征和生理反应特征为依据，16S rRNA 基因序列相似性分析只能为蛭弧菌相近种属的分类提供可参考的依据。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

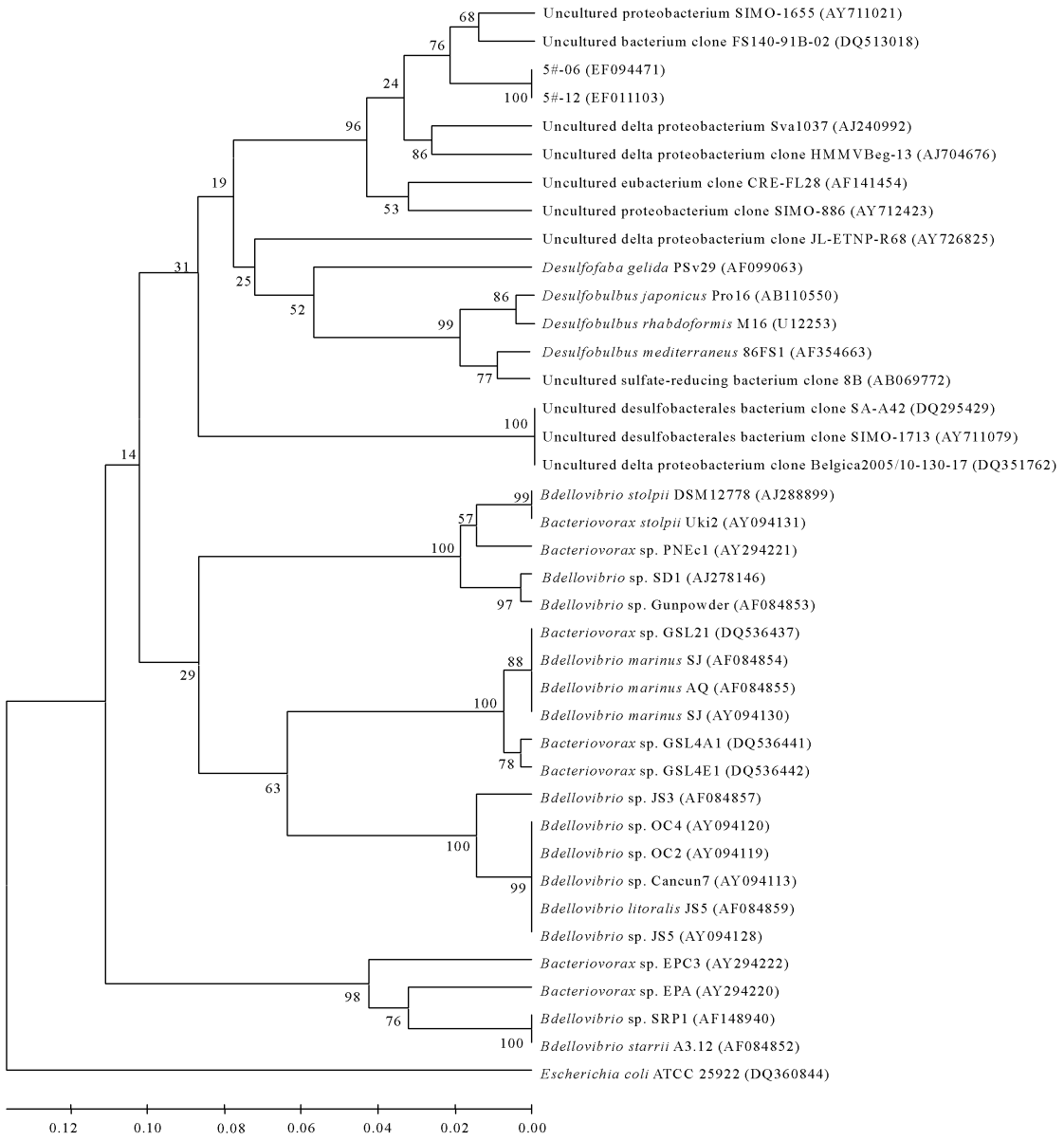

图 2 基于供试菌株与各类蛭弧菌等 39 株菌株 16S rDNA 基因序列得到的 UPGMA 分子系统树

Fig. 2 UPGMA phylogenetic tree resulting from the sequences 16S rDNA gene fragment of 39 strains including tested strain, members of *Bdellovibrionales* and other proteobacteria. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank, and the number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. The scale shown below is the measure of genetic similarity coefficients.

根据所分离菌株的形态学特征和生理反应特征，结合《伯杰细菌鉴定手册》第九版对蛭弧菌的描述，以及参考 16S rDNA 部分序列分析的结果，可以认为这 2 株菌均为蛭弧菌，只是它们具体的种属关系尚不能确定罢了。

2.2 温度对蛭弧菌生长影响

为研究 2 株菌对温度的适应能力，在 4℃~40℃范围内选择 7 个温度条件进行试验。结果表明（表 3），温度变化对 5#-12 和 5#-sh06 的生长有明显的影响，2 株菌在 4℃~35℃内均有生长，但在 40℃时二者均不能存活，表明过高温度抑制蛭弧菌生长。此外，在 4℃时 2 株菌的数目在整个培养期间都没有明显变化，这一生长趋势与秦生巨[24]等所研究蛭弧菌可在 4℃灭菌自来水中存活 8 个月以上的结论相一致。5#-12 和 5#-sh06 分别在 25℃和 30℃时密度最大，且数量级均达到 10^4。由此，可认为 2 株蛭弧菌最适生长温度分别是 25℃和 30℃。

2.3 **pH** 对蛭弧菌生长影响

为研究 2 株菌对 pH 的适应性，在 pH5.6~8.6 范围内选择八个 pH 值进行试验。结果表明，pH 对 5#-12 和 5#-sh06 的生长也有影响（表 4）：尽管在八个 pH 值下，

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表 3 温度对蛭弧菌生长的影响

Table 3 Effects of temperature on *Bdellovibrio* growth

Temperature/℃	Numbers of bdellovibrios/(pfu/mL)	
	5#-12	5#-sh06
4	250	160
20	610	460
25	6×10^4	900
30	2×10^4	7×10^4
35	320	950
40	–	–

–: No bdellovibrio grows. *Bdellovibrio* counts are the fifth day data.

表 4 pH 对蛭弧菌生长的影响

Table 4 Effects of pH on *Bdellovibrio* growth

pH	Numbers of bdellovibrios/(pfu/mL)	
	5#-12	5#-sh06
5.6	20	85
6.1	160	220
6.5	740	420
6.8	920	450
7.2	2×10^5	3×10^5
7.6	9×10^4	8×10^4
8.1	110	90
8.6	75	40

Bdellovibrio counts are the fifth day data.

2 株蛭弧菌均可生长，但 pH 过高或过低时均不利于它们的生长，可能是因为蛭弧菌的鞭毛对 pH 的变化很敏感[25]，过高或过低 pH 均可使蛭弧菌的鞭毛脱落，从而导致蛭弧菌运动能力下降，对宿主的捕食能力也相应下降。而 5#-12 和 5#-sh06 的最适生长 pH 值均为 7.2，此时它们的密度最大，数量级均达到 10^5。

2.4 两株蛭弧菌对 58 株宿主菌的裂解谱

为探求 2 株蛭弧菌在海产品养殖病害防治方面的潜在应用前景，选用 58 株致病菌作为被试菌株，其中包括: 39 株能引起流行性传染疾病的常见弧菌和 19 株包括致病性球菌，致病性假单胞菌等在内的其他致病菌，详见表 1。

确定蛭弧菌最适生长条件后，进行 2 株蛭弧菌对 58 株致病菌的裂解试验。结果表明，这 2 株蛭弧菌对不同来源，不同种属的致病菌具有明显的裂解作用（表 5）：(1) 可同时被 2 株蛭弧菌裂解的共有 38 株菌，占总试验菌株 65.5%；不可被 2 株蛭弧菌裂解的只有 2 株菌；可被其中任何一株蛭弧菌裂解的则有 56 株菌，占总试验菌株 96.6%；(2) 2 株蛭弧菌各自的裂解谱也不相同，5#-12 可裂解 46 株菌，裂解率为 79.3%，5#-sh06 可裂解 48 株菌，裂解率为 82.8%。此外，联合 2 株蛭弧菌，对全部试验弧菌的裂解率为 100%。

表 5 蛭弧菌 5#-12 and 5#-12 对 58 株宿主菌的裂解谱

Table 5 Lysis range of 5#-12 and 5#-12 on 58 strains of prey bacteria

Prey bacteria strains	Lysis		Prey bacteria strains	Lysis	
	5#-12	5#-06		5#-12	5#-06
Vibrio alginolyticus 1	–	+	*Providencia rettgeri* 32	+	–
Vibrio alginolyticus 2	+	+	*Aeromonas salmonicida* 33	+	+
Vibrio alginolyticus 3	+	+	*Shewanella putrefaciens* 34	+	–
Vibrio alginolyticus 4	+	+	*Pseudomonas aeruginosa* 35	–	+
Vibrio cholerae 6	+	+	*Vibrio cholerae* 10-211	–	+
Undetermined 7G+	–	–	*Vibrio cholerae* 11-114	+	–
Vibrio parahaemolyticus 8	–	+	*Vibrio cholerae* 11-201	+	+
Vibrio parahaemolyticus 9	+	+	*Vibrio parahaemolyticus* 1615	–	+
Vibrio alginolyticus 10	+	+	*Vibrio alginolyticus* 1833	–	+
Vibrio alginolyticus 11	+	+	*Vibrio hollisae* Be08	–	+
Shewanella putrafaciens 12	+	+	*Vibrio fluvialis* Bh02	+	+
Vibrio alginolyticus 13	+	+	*Vibrio fluvialis* Bh03	–	+
Serratia ficaria 15	+	+	*Vibrio fluvialis* Bh05	+	+
Vibrio alginolyticus 16	+	+	*Enterobacter salazakii* Bh07	+	–
Pseudomonas aeruginosa 17	+	+	*Enterobacter salazakii* Bh08	+	+
Pseudomonas aeruginosa 18	+	–	*Vibrio minicus* Bh10	+	+
Vibrio alginolyticus 19	+	+	*Vibrio fluvialis* Bh11	+	+
Serratia odorifera 20	+	+	*Vibrio minicus* Bh12	+	+
Vibrio parahaemolyticus 21	+	+	*Vibrio minicus* Bh13	+	+
Providencia rettgeri 22	–	–	*Vibrio minicus* Bh15	+	+
Vibrio alginolyticus 23	+	–	*Vibrio fluvialis* Sh03	+	+
Shewanella putrafaciens 24	+	–	*Vibrio parahaemolyticus* Sh06	+	+
Vibrio parahaemolyticus 25	+	+	*Vibrio fluvialis* Sh07	–	+
Vibrio parahaemolyticus 26	+	+	*Vibrio fluvialis* Sh12	+	+
Shewanella putrafaciens 27	+	+	*Vibrio fluvialis* Sh13	+	+
Shewanella putrafaciens 28	+	+	*Vibrio cholerae* SWBC-A	+	–
Providencia rettgeri 29	+	+	*Vibrio cholerae* SWBC-B	+	+
Enterococcus agglometans 30	+	+	*Vibrio parahaemolyticus* VP+	+	+
Klebsiella oxytoca 31	+	+	*Vibrio parahaemolyticus* VP-	–	+

+: Susceptibility; −: Nonsusceptibility.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

2.5 与其它海洋蛭弧菌的比较

与宋志萍等[26]报道的 4 株分离自海洋的 Bh04 系列蛭弧菌相比较，5#-12 和 5#-sh06 对试验菌株的裂解率（79.3%和 82.8%，试验菌株总数 58 株）明显高于这 4 株蛭弧菌（34.4%、39.3%、65.6%和 70.5%，试验菌株总数 61 株），并且 5#-12 和 5#-sh06 对试验菌株的协同裂解率（96.6%）也高于这 4 株蛭弧菌（90.2%）。此外，5#-12 和 5#-sh06 对于试验弧菌的协同裂解率达到 100%（试验弧菌总数 39 株），明显高于这 4 株蛭弧菌的裂解率（87.8%，试验弧菌总数 41 株）。综上，相比于 4 株 Bh04 系列蛭弧菌，本研究分离出的蛭弧菌 5#-12 和 5#-sh06 对于致病菌展示出很强的裂解能力，尤其是对病原弧菌的裂解能力，充分说明这 2 株蛭弧菌在裂解致病菌方面具有较大的优势和潜力，同时也揭示其在海产品疾病防治方面具有重要的潜在应用价值。

3 结论

通过实验研究，可以得出：在 20℃~35℃温度范围内，蛭弧菌 5#-12 和 5#-sh06 均可生长，最适生长温度分别是 25℃和 30℃；在 pH6.1~8.6 条件下，2 株蛭弧菌均可生长，最适生长 pH 均为 7.2：2 株菌蛭弧菌可分别裂解 46 和 48 株试验菌，分占总试验菌株数（58）的 79.3%和 82.8%，并且 2 株蛭弧菌的协同裂解率达到 96.6%，还有 38 株试验菌可同时被 2 株蛭弧菌裂解。此外，联合 2 株蛭弧菌，能将所有的试验弧菌裂解。该实验结果，清晰地表现出蛭弧菌具有裂解病原菌、净化养殖水体的特性，为今后蛭弧菌的应用，尤其是在海水养殖中除去致病菌的应用提供了坚实的理论基础

参 考 文 献

[1] Jurkevitch E, Minz D, Ramati B, *et al*. Prey range characterization, ribotyping, and diversity of soil and rhizosphere *Bdellovibrio* spp. isolated on phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66: 2365–2371.

[2] Schwudke D, Strauch E, Krueger M, *et al*. Taxonomic studies of predatory bdellovibrios based on 16S rRNA analysis, ribotying and the *hit* locus and characterization of isolates from the gut of animals. *Systematic and Applied Microbiology*, 2001, 24(3): 385–394.

[3] Stolp H, Petzhold H. Untersuchugen über einen obligat parasitischen milroorganismus mit lytischer activitär für *Pseudomonas-bakterien*. *Phytopathol Z*, 1962, 45: 364–390.

[4] 张昕, 蔡俊鹏. 噬菌体在水产养殖中的应用. 粮食与饲料工业(*Cereal & Feed Industry*), 2004, 6: 38–39.

[5] 徐丽, 王志, 蔡俊鹏. 蛭弧菌作为鱼用饲料添加剂在海水养殖中的应用. 粮食与饲料工业(*Cereal & Feed Industry*), 2004, 3: 39.

[6] Wand H, Vacca G, Kuschk P, *et al*. Removal of bacteria by filtration in planted and non-planted sand columns. *Water Research*, 2007, 41: 159–167.

[7] 宋志萍, 蔡俊鹏, 王志, 等. 一种消除九孔鲍苗细菌性病原的无公害绿色生物方法的研究. 海洋科学(*Marine Sciences*), 2006, 30(1): 44–48.

[8] 邵桂元, 沈启华, 洪黎民. 鱼病蛭弧菌的微生态学初步研究. 中国微生态学杂志(*Chinese Journal of Microecology*), 1995, 7(5): 17–19.

[9] 赵明森. 噬菌蛭弧菌(*Bdellovibrio bacteriovorus*)在虾蟹病害防治上的作用及其使用方法. 现代渔业信息(*Modern Fisheries Information*), 2002, 17(12): 14–16.

[10] 林茂, 杨先乐, 薛晖, 等. 蛭弧菌 BDH21-02 对鱼类细胞及病原菌的作用. 微生物学通报(Microbiology), 2006, 33(1): 7–11.

[11] 李怡, 曹海鹏, 陈水祥, 等. 噬菌蛭弧菌对乌鳢养殖水质的影响. 渔业现代化(Fishery Modernization), 2008, 35(2): 11–14.

[12] 韩韫, 蔡俊鹏, 宋志萍, 等. 应用蛭弧菌清除海产品潜在致病弧菌的研究. 水产科学(*Fisheries Science*), 2005, 24(11): 23–25.

[13] Rendulic S, Jagtap P, Rosinus A, *et al*. A predator unmasked: life cycle of *Bdellovibrio bacteriovorus* from a genomic perspective. *Science*, 2004, 303: 689–692.

[14] Ferguson MA, Schmitt JL, Sindhurakar AR, *et al*. Rapid isolation of host-independent *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Journal of Microbiological Methods*, 2008, 73: 279–281.

[15] Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, *et al*. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64: 795–799.

[16] Sambrook J, Fritsch EF, 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.

[17] 黄文, 杨莉, 马志宏. 噬菌蛭弧菌 Bd-9 五种保藏方法的比较研究. 大连水产学院学报(*Journal of Dalian Fisheries University*), 2002, 17(4): 341–344.

[18] Breed EG, Murray D, Smith NR. Berger's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Baltimore(USA): The Williams and Wilkins co, 1994.

[19] Bear ML, Ravel J, Pineiro SA, *et al*. Reclassification of salt-water *Bdellovibrio* sp. as *Bacteriovorax marinus* sp. nov. and *Bacteriovorax litoralis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54: 1011–1016.

[20] Snyder AR, Williams HN, Baer ML, *et al*. 16S rDNA sequence analysis of environmental *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALO) reveals extensive diversity. *International Journal of*

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002, 52: 2089–2094.

[21] Clarridge JE. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 2004, 17: 840–862.

[22] McNabb A, Eisler D, Adie K, *et al*. Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (*hsp65*) for routine identification of *Mycobacterium* species isolated from clinical sources. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42: 3000–3011.

[23] Petti CA, Polage CR, Schreckenberger P. The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43: 6123–6125.

[24] 秦生巨, 司耀东. 噬菌蛭弧菌在灭菌自来水中存活时间的研究. 微生物学通报(*Microbiology*), 1988, 15(2): 115–117.

[25] Varon M, Shilo M. Interaction of *Bdellovibrio bacteriovorus* and host bacteria. I. Kinetic studies of attachment and invasion of *Escherichia coli* B by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Journal of Bacteriology*, 1968, 95(3): 744–753.

[26] 宋志萍, 蔡俊鹏, 王志, 等. 蛭弧菌的分离及其生长条件和裂解能力的研究. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2005, 45(4): 571–575.

Isolation and characterization of *Bdellovibrio* strains from the ocean

Zonghui Peng[1], Junpeng Cai [1, 2], Bing Wu [3], Erdong Yuan[2*]

([1]*College of Bioscience and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou* 510006, *China*)
([2]*College of Light and Food*, [3]*Analytical and Testing Center, South China University of Technology, Guangzhou* 510640, *China*)

Abstract:[Objective] To isolate and identify the new *Bdellovibrio* strains from the sea mud of Shenzhen bay and to preliminarily study their biological characteristics. **[Methods]** We isolated *Bdellovibrio* strains by DNB(dilute nutrient broth) double-layer plate method. Their 16S rDNAs were sequenced and their morphologies were examined under electron microscope. We identified these strains according to the ninth edition of Bergey's manual of determinative bacteriology. We also studied their biological characteristics through physiological tests. **[Results]** We isolated 2 strains of *Bdellovibrio* sp. (5#-12 and 5#-sh06) from sea mud of Shenzhen bay. Both strains grew between 20℃ and 35℃, with 25℃ and 30℃ as optimal temperature for 5#-12 and 5#-sh06, respectively. They grew between pH 6.1 and 8.6, and the opti℃mal pH for both was 7.2. Lysis experiments on 58 strains of pathogens were conducted and the results showed that 5#-12 and 5#-sh06 lysed 46 and 48 strains, corresponding to 79.3% and 82.8% of lysis abilities. Taken both two *Bdellovibrio* strains together, they lysed 96.6% (56 strains) of tested pathogens and 100% of tested vibrios (39 strains). **[Conclusion]** The results demonstrated that *Bdellovibrio* have potential and significant application prospect for elimination of pathogens.

Keywords: *Bdellovibrio* sp.; pathogens; isolation; biological characteristics

Supported by the National Natural Science Foundation of China (40776091)
*Corresponding author. Tel: +86-20-33079179; E-mail: erdyuan@scut.edu.cn
Received: 21 May 2008/ Revised: 29 August 2008

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn