



嗜盐噬菌弧菌 BALOs10 菌株的分离、鉴定及其裂解谱

叶晓声¹, 赵何¹, 陈明霞^{1*}, 李和阳^{2*}, 何小玉¹

¹ 华侨大学化工学院, 福建 厦门 361021

² 自然资源部第三海洋研究所, 福建 厦门 361005

摘要:【目的】从海水中分离得到蛭弧菌类群(*Bdellovibrio*-and-like organisms, BALOs)新型菌株, 丰富 BALOs 的种质资源。【方法】从中国深圳大亚湾取回海水样品后, 使用本实验室分离得到的 *Vibrio alginolyticus* LF TCBS 15 作为宿主, 通过海水双层平板法分离得到 BALOs 菌株, 通过光学显微镜及透射电镜观察菌体形态, 对 16S rDNA 序列进行系统发育分析, 完成分子鉴定。采用双层平板滤纸片法分析 NaCl 浓度、pH 及温度对菌株 BALOs10 生长的影响并测定菌株 BALOs10 对 16 株细菌的裂解效果。【结果】成功分离出一株以 *Vibrio alginolyticus* LF TCBS 15 为宿主的 BALOs 菌株 BALOs10。噬菌斑呈圆形、透明且边缘光滑整齐, 菌体为弧状, 极生单鞭毛, 菌体大小(0.21–0.44) $\mu\text{m} \times (1.25–1.87) \mu\text{m}$ 。菌株最佳生长温度、NaCl 浓度和 pH 范围分别为 35–37 °C、2%–3% (W/V) 和 7–8。菌株 BALOs10 可以裂解 9 株不同种的受试菌, 占总试验菌株数(16 株)的 56.3%, 主要是海杆菌属和弧菌属; 菌株 BALOs10 的 16S rDNA 与最相近的典型菌株 *Halobacteriovorax marinus* SJ 的相似性只有 92.14%, 可能是一个全新的物种, 将其命名为 *Halobacteriovorax* sp. BALOs10。【结论】本文研究发现了 *Halobacteriovorax* 属(嗜盐噬菌弧菌属)的一个新型菌株, 丰富了 BALOs 种质资源, 为后续的应用及理论研究奠定物质基础。

关键词: 嗜盐噬菌弧菌, 细菌捕食者, 蛭弧菌类群, 裂解谱

BALOs (*Bdellovibrio*-and-like organisms, 蛭弧菌类群)是一类特殊的细菌, 在自然界中主要起到一种捕食者的作用。因其具有侵染、裂解细菌的效果, 类似噬菌体的作用^[1], 所以在微生态环境中扮演了非常重要的角色。Stolp 和 Petiold^[2]于 1962

年首次在菜豆叶烧病假单胞菌 (*Pseudomonas phaseolicola* ATCC11355) 中发现后便成为了不少研究人员关注的对象, BALOs 的分类及系统发育学、基因组学、捕食机制、生态学以及应用是目前该类细菌的研究热点。

基金项目: 国家自然科学基金(41506179); 全球变化与海气相互作用(GASI-03-01-03-01); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(海三科 2014003); 福建省自然科学基金(2015J01613)

*通信作者。E-mail: 陈明霞, chenmx1257@163.com; 李和阳, heyangli@126.com

收稿日期: 2018-09-12; 修回日期: 2018-12-11; 网络出版日期: 2019-03-12

BALOs 中最具代表性的就是蛭弧菌属 (*Bdellovibrio*) 的细菌。BALOs 大约只有典型细菌 1/10–1/5 的大小, 也因此被称为“世界最小的捕食者”, 为单细胞结构, 一端生有一根极长的鞭毛, 拥有短杆、弧状、螺旋状和球状等多种形态^[3]。BALOs 目前有明确分类地位的有 7 个属 9 个种。外寄生的 *Micavibrio* 属^[4]隶属于 alpha-proteobacteria 纲, 包含 *Micavibrio admirandus*。真核藻外寄生的 *Vampirovibrio*^[5]隶属于 Melainabacteria 门, 包含 *Vampirovibrio chlorellavorus*, 该捕食菌目前尚无人可以复活培养, 且是捕食真核藻类, 有科学家认为其不属于 BALOs。拥有 BALOs 种类最多的是 Oligoflexia 纲, 拥有 5 个属 7 种 BALOs 典型菌株: *Bdellovibrio* 属包含 2 个种, 分别是最早被发现的 *Bdellovibrio bacteriovorus*^[2]及在 2013 年由 Koval 等发现的非周质寄生型 *Bdellovibrio exovorus*^[6]; *Bacteriovorax* 属在 2000 年由 Baer 等创立, 并将 *Bdellovibrio stopii* 重新归类为 *Bacteriovorax stolpii*^[7]; *Peredibacter* 属是 2004 年由 Davido 和 Jurkevitch 创立, 并将 *Bacteriovorax starrii* 重新归类为 *Peredibacter starrii*^[8]; *Halobacteriovorax* 属是由 Koval 等创立, 并将 *Bacteriovorax marinus* 和 *Bacteriovorax litoralis* 重新命名为 *Halobacteriovorax marinus* 和 *Halobacteriovorax litoralis*^[9]; *Pseudobacteriovorax* 属包含 1 个种, 将其命名为 *Pseudobacteriovorax antillogorgiicola*^[10], 是由 McCauley 等从珊瑚中分离出来的, 属于兼性捕食菌, 能独立生活, 该菌与其他 BALOs 亲缘距离远, 已被移出 Bdellovibrionales 目, 归入新目 Oligoflexales, 故而有科学家认为其不为 BALOs 菌种。最近, 李敏佳等^[11]从南海海水分离出一株新型 BALOs 菌株 BDE-1, 该菌株为目前报导^[12–13]的少数可以裂解

革兰氏阳性细菌的 BALOs 菌株之一。BALOs 在环境中的分布十分广泛, 来源于土壤^[14]、植物根际^[15]、淡水^[16]的 BALOs 多属于蛭弧菌科 (*Bdellovibrionaceae*); 来自海水和咸淡水的 BALOs 多分布在嗜盐噬菌弧菌科 (*Halobacteriovoraceae*)。BALOs 具有改变环境微生态群落结构的作用^[17], 是重要的微生态平衡调节者; BALOs 能够寄生及裂解海水养殖中常见的弧菌等致病菌, 提高养殖个体的存活率^[18–19], 对水产养殖生物细菌性疾病具有重要的防控作用; Yu 等的研究中还将 BALOs 用于城市废污泥的生物分解^[20]。然而, 目前系统发育地位明确的 BALOs 只有 9 种, 占总数的不到 1/10^[21], BALOs 新种发掘及系统发育研究具有重要科学及应用价值, 机遇和挑战并存。

本文从深圳大亚湾海水中分离得到一株 *Halobacteriovorax* (嗜盐噬菌弧菌) 新型菌株 BALOs10, 通过培养、形态学观察、生理特性分析和 16S rDNA 系统发育分析完成其初步鉴定, 并对该菌株的裂解谱进行了测定分析, 为后续该菌株的开发利用提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品: 海水样品于 2017 年 1 月 17 日采集于大亚湾 02 号站位 (22.36684° N, 114.34682° E, 水深 30 m, 水温 21.2 °C), 样品采集后冷藏运至实验室并于 48 h 内完成分离培养。

1.1.2 主要试剂和仪器: Premix-Taq (上海宝赛生物技术有限公司), DNA Marker (宝生物工程大连有限公司), 细菌基因组快速抽提试剂盒 (生工生物工程 (上海) 股份有限公司), PCR 仪 T-100 (Bio-Rad), 凝胶成像分析系统 JS-680D (上海培

清), 高速离心机 1-14 (Sigma), 高速冷冻离心机 5408 R (Eppendorf), 电泳系统 DYY-5 型(北京六一仪器厂), Multiskan FC 型酶标仪 (Thermo scientific), 透射电子显微镜 JEM-1230 (JEOL)。

1.1.3 培养基: (1) 2216E 培养基: 参考陈明霞等^[22]的描述配制; (2) 海水双层琼脂: 上层琼脂, 琼脂粉 7 g, 加过滤海水补足 1 L; 下层琼脂, 琼脂粉 15 g, 加过滤海水补足体积至 1 L。

1.2 BALOs 菌株分离与培养

1.2.1 宿主菌制备: 用于分离、培养菌株 BALOs10 的宿主菌为本实验室分离的 *Vibrio alginolyticus* LF TCBS 15, 将宿主接种于 100 mL 2216E 液体培养基中, 150 r/min、28 °C 振荡培养 24 h。10000×g 离心 5 min, 倒掉上清液, 加入 10 mL 的无菌海水重悬, 制成 1×10^9 CFU/mL 宿主菌悬液, 4 °C 保存。

1.2.2 BALOs 分离纯化: 采用海水双层琼脂平板法。取 1 mL 水样加入含有 1 mL 1×10^9 CFU/mL 宿主菌悬液的离心管中, 混匀, 放置 30 min; 然后加入 10 mL 融化后冷却至 50 °C 的海水上层琼脂, 快速混匀, 倾注至海水下层琼脂平板上, 于 28 °C 正置培养。每隔 24 h 观察噬菌斑的出斑情况, 挑取单个噬菌斑进行 3 次以上的双层平板纯化培养, 至噬菌斑大小均一。

1.2.3 BALOs 的液体培养: 将 10 mL 1×10^9 CFU/mL 宿主菌悬液加入至 90 mL 无菌海水中, 同时接种单个噬菌斑, 150 r/min、28 °C 振荡培养 24 h。镜检观察 BALOs 的生长情况。

在 96 孔板中将 20 μ L 1×10^9 CFU/mL 宿主菌悬液加入至 160 μ L 无菌海水中, 再加入 20 μ L 1×10^9 CFU/mL 菌株 BALOs10 菌液, 于 25 °C 振荡培养, 使用酶标仪测定培养液的 OD_{620} 值, 因 BALOs 在培养时会裂解宿主, 从而导致 OD_{620} 降

低, 以此反映了 BALOs 的生长情况, 每隔 1 h 测定 1 次, 连续测定 30 h。

1.3 形态观察

1.3.1 光学显微镜观察: 取培养 24 h 后的菌株 BALOs10 与宿主的共培养液 1 μ L, 采用 1% (W/V) 草酸铵结晶紫染液进行简单染色, 在光学显微镜下观察。

1.3.2 透射电子显微镜观察: 将培养 24 h 后的 100 mL 菌株 BALOs10 与宿主共培养液通过 15500×g 离心收集菌体, 用无菌水清洗 3 次, 采用磷钨酸负染液对菌体进行处理, 在透射电子显微镜下观察并拍照。

1.4 BALOs 16S rDNA 系统发育分析

1.4.1 样品制备及 DNA 提取: 将培养 24 h 后的 100 mL BALOs 菌液通过 3 次 2000×g 离心 15 min, 每次都取上清液, 最后使用 15500×g 离心收集 BALOs 菌体, 使用 1 mL 无菌海水重悬 BALOs 菌体沉淀, 之后进行镜检, 视野中宿主比例低于 1% 即可。使用细菌基因组快速抽提试剂盒, 提取 BALOs 基因组 DNA。

1.4.2 PCR 扩增 16S rDNA 片段: 上游引物(27F): 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 下游引物(1492R): 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3', 引物由上海生工合成。采用 25 μ L 反应体系, 12.5 μ L 2×Premix-Taq, 引物各 0.5 μ L (10 μ mol/L), 模板 0.5 μ L, ddH₂O 补足体系至 25 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s, 32 个循环; 72 °C 10 min。1% (W/V) 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。将扩增后的 16S rDNA 片段 TA 克隆至 pMD®18-T 载体, 并导入到 Trans 5 α 感受态细胞中, 筛选阳性克隆子。

1.4.3 序列测定及系统发育分析: 将符合要求的

阳性克隆子交由厦门铂瑞生物科技有限公司进行测序。将所得到的序列在 EzBioCloud 中进行同源性比对, 获得其他相关的 BALOs 典型菌株的 16S rDNA 序列。使用 MEGA 7 软件采用最大似然法构建系统进化树, 自举(Bootstrap)分析后进行置信度检测, 自举数据集为 1000 次。

1.5 NaCl 浓度、pH 及温度对菌株 BALOs10 生长的影响

使用海水双层平板滤纸片法, 在 50 °C 上层琼脂中加入 1 mL 1×10^9 CFU/mL 宿主菌悬液, 倾注入下层琼脂平板上, 待其凝固后, 在双层平板上贴上无菌的 6 mm 滤纸片, 滴加 5 μ L 新鲜培养了 24 h 的 BALOs 10 菌液于滤纸片上。测定的 NaCl 浓度梯度设置为 0%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%, 置于 28 °C 培养; 测定的温度梯度设置为 8、15、20、25、28、30、35、37、40、45、50 °C; 测定的 pH 梯度设置为磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH 5, 6, 7, 8), Tris-HCl 缓冲液(pH 7, 8, 9), 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液(pH 9, 10), 置于 28 °C 培养。上述 3 个指标分别于 0、12、24、36、48、60、72、84、96、108、120 h 测定噬菌斑直径的大小, 从而判断菌株 BALOs10 的生长情况。

1.6 菌株 BALOs10 裂解谱

采用海水双层平板滤纸片法, 将 1 mL 1×10^9 CFU/mL 受试菌悬液与上层琼脂混匀后倾注入底层琼脂平板中, 待其凝固后, 在双层平板上贴上无菌的 6 mm 滤纸片, 滴加 5 μ L 新鲜培养了 24 h 的菌株 BALOs10 菌液于滤纸片上, 28 °C 培养 5 d, 每 24 h 观察噬菌斑的生长情况。用于裂解谱测试的菌株共 16 株(表 1)。

表 1. 菌株 BALOs10 对 16 株受试细菌的裂解谱

Table 1. Prey range of strain BALOs10 on 16 tested bacteria

Tested strains	Lysis ability
<i>Vibrio alginolyticus</i> LF TCBS 15	+
<i>Aliiroseovarius sediminilitoris</i> L04 17	-
<i>Alteromonas macleodii</i> XTJ 1-5 DCM 36	+
<i>Erythrobacter citreus</i> XTJ 1-4 200M 33	-
<i>E. lutimaris</i> XTJ 1-1B 31	-
<i>Halomonas meridiana</i> XTJ 1-4 200M 32	+
<i>Labrenzia alba</i> L08 28	-
<i>Marinobacter adhaerens</i> L08 25	+
<i>M. algicola</i> L01 1	+
<i>M. flavimaris</i> L03 13	+
<i>M. hydrocarbonoclasticus</i> XTW 3-1B 51	+
<i>Pseudoalteromonas shioyasakiensis</i> XTW 2-2B 47	+
<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> XTW 3-10 64	-
<i>Bacillus subtilis</i> A217	-
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	+
<i>Staphylococcus aureus</i> A219	-

+: Susceptibility; -: Nonsusceptibility.

2 结果和分析

2.1 菌株 BALOs10 的培养特性

以 *V. alginolyticus* LF TCBS 15 为宿主, 通过使用双层平板分离纯化得到一株噬菌能力较强的菌株 BALOs10, 能在 24 h 内形成直径 1–2 mm 的噬菌斑, 噬菌斑呈圆形、透明且边缘光滑整齐(图 1), 可随培养时间的延长而有规则地扩大, 具有



图 1. 菌株 BALOs10 噬菌斑形态(24 h)

Figure 1. Plaque morphology of strain BALOs10 (24 h).

典型的 BALOs 噬菌斑特性。液体培养过程中, BALOs10 可以在 25 °C、30 h 内将宿主浓度从 OD_{620} 0.88 降至 0.25 (图 2), 裂解率达 99% 以上。

2.2 菌株 BALOs10 菌体形态

经过 24 h 的液体培养并制片观察, 菌株 BALOs10 共培养物在光学显微镜下可见 2 种菌体, 其中大的为宿主菌 *V. alginolyticus* LF TCBS 15, 小的为菌株 BALOs10, 呈现弧状或杆状, 菌体数量多, 大小远小于宿主细胞(图 3-A)。

在透射电镜下菌株 BALOs10 形态为弧杆状, 极生单鞭毛, 鞭毛长度 4.88 μm , 宽度 19–25 nm, 有鞘; 菌体大小(0.21–0.44) $\mu\text{m} \times$ (1.25–1.87) μm , 具有典型的 BALOs 的形态特征(图 3-B)。

2.3 菌株 BALOs10 的 16S rDNA 序列及系统发育分析

测序获得菌株 BALOs10 的 16S rDNA 有效序列 1447 bp, 提交 GenBank 的登录号为 MH590696。通过使用 EzBioCloud 对菌株 BALOs10 菌株的 16S rDNA

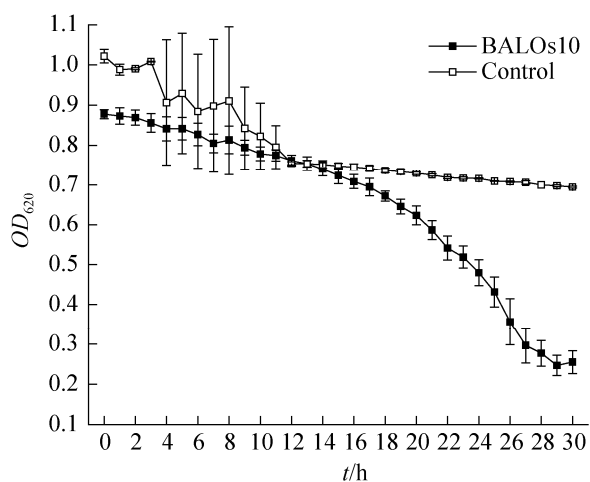


图 2. 菌株 BALOs10 对宿主 *Vibrio alginolyticus* LF TCBS 15 的裂解曲线

Figure 2. Lysis of *Vibrio alginolyticus* LF TCBS 15 by strain BALOs10.

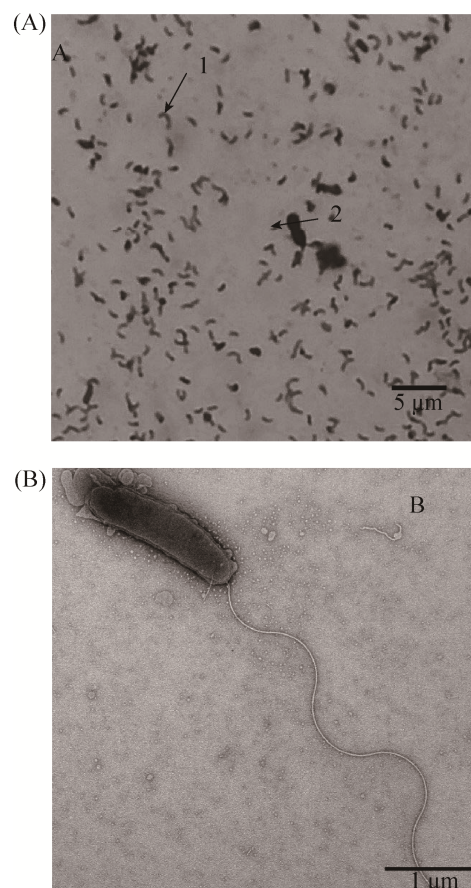


图 3. 菌株 BALOs10 的个体形态

Figure 3. Cell morphology of strain BALOs10. A: Light micrograph of strain BALOs10 (24 h liquid co-culture), arrow 1 represents BALOs10 cell, arrow 2 represents prey cell; B: Transmission electron micrograph of strain BALOs10.

序列进行比较, 结果显示菌株 BALOs10 与已知典型菌株 *H. littoralis* JS5 和 *H. marinus* SJ 的相似性分别为 92.14% 和 90.68%, 系统发育分析表明菌株 BALOs10 处于 *Halobacteriovorax* 的分类簇中(图 4), 且处于一个独立的进化分支上, 可能属于一个全新的物种, 因为只有一株, 故将其暂归于 *Halobacteriovorax* 属。

2.4 菌株 BALOs10 的生理特性

2.4.1 NaCl 浓度对菌株 BALOs10 生长的影响:

菌株 BALOs10 生长的适宜 NaCl 浓度在 2%–4% (W/V)(图 5), 在 2%左右生长最快, 在 NaCl 浓度为 0 时不生长, NaCl 浓度高于 4%也可以生长, 生长延迟 24–36 h, 5%以上的 NaCl 浓度下不生长。说明菌株 BALOs10 是一株需盐性的海洋细菌。

2.4.2 pH 对菌株 BALOs10 生长的影响: 本研究设定了 3 个缓冲体系: 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲体系(pH 5–7), Tris-HCl 缓冲体系(pH 7–9)及碳酸钠-碳酸氢钠缓冲体系(pH 9–10)。在 pH 7–8 时, 菌株 BALOs10 生长速度最快, pH 6 及 pH 9 时生长较为缓慢(图 6)。可见, 菌株 BALOs10 的最佳生长 pH 值为 7–8, 与自然环境中海水的 pH 值相当, 再次暗示该菌株可能属于原生的土著海洋细菌。

2.4.3 温度对菌株 BALOs10 生长的影响: 菌株 BALOs10 可以在 15–40 °C 的范围内生长(图 7)。35–37 °C 下菌株 BALOs10 的噬菌斑的扩张速度最快, 低于 15 °C 不生长或者生长速度十分缓慢, 高于 45 °C 也不生长, 说明菌株 BALOs10 的温度适应范围相对较广, 利于其在不同海域的生存及分布。

2.5 BALOs10 的裂解谱

16 株准受试菌中有 9 株能被菌株 BALOs10 裂解(表 1), 裂解率达到 56.3%, 其中可裂解弧菌属(*Vibrio*)、麦氏交替单胞菌属(*Alteromonas*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)、海杆菌属(*Marinobacter*)、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)、埃希氏菌属(*Escherichia*), 对弧菌属和海杆菌属裂解能力最强。

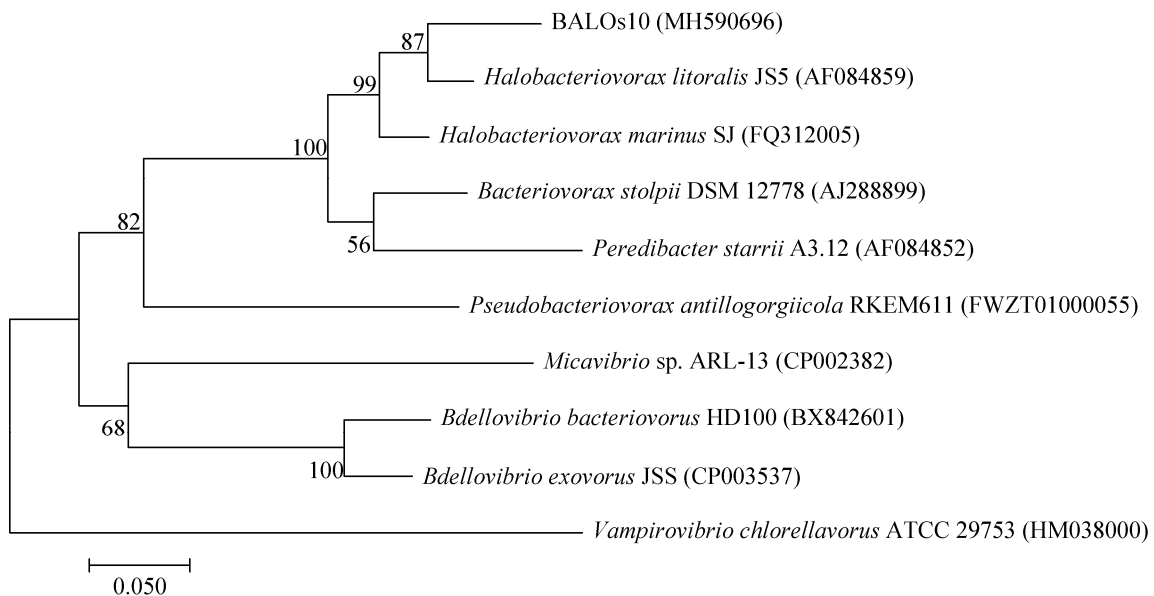


图 4. 基于 16S rDNA 序列构建的菌株 BALOs10 及其相关菌株的系统进化树

Figure 4. Phylogenetic tree of strain BALOs10 and its related strains based on 16S rDNA sequences. Numbers in parentheses represent the accession numbers in the GenBank for the 16S rDNA sequences of the strain. Numbers at the branch points indicated the bootstrap values. Bar (0.050) represents sequence divergence.

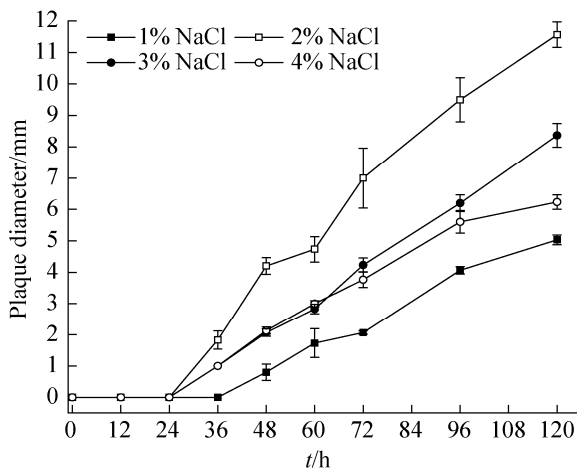


图 5. NaCl 浓度对菌株 BALOs10 生长的影响

Figure 5. The effect of NaCl concentration on the growth of strain BALOs10.

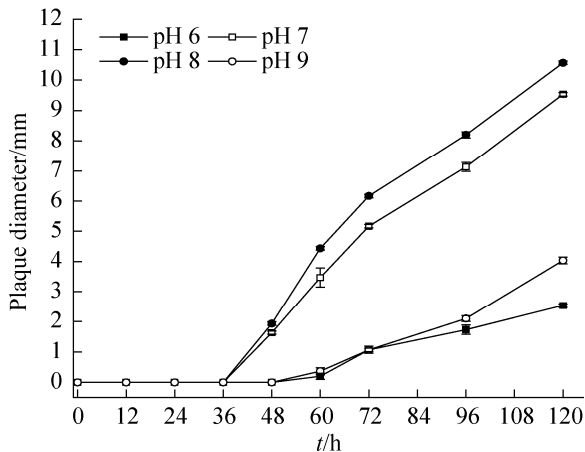


图 6. pH 对菌株 BALOs10 生长的影响

Figure 6. The effect of pH on the growth of strain BALOs10.

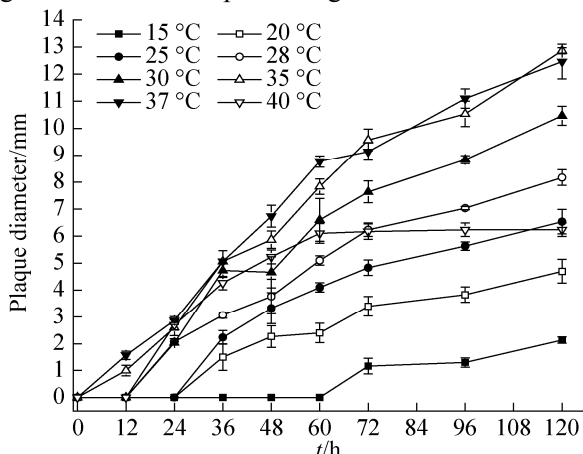


图 7. 温度对菌株 BALOs10 生长的影响

Figure 7. The effect of temperature on the growth of strain BALOs10.

3 讨论

本研究所分离得到的菌株 BALOs10 有着噬菌弧菌目的典型特征, 菌体大小、形态和噬菌斑的形成与典型 *Halobacteriovorax* 属(嗜盐噬菌弧菌属)相似。基于 16S rDNA 序列的比对结果分析表明, BALOs10 菌株与典型菌株 *H. marinus* SJ 的相似性只有 92.14%。一般菌株间的 16S rDNA 序列的相似性大于 98% 可以认定为是同一物种^[23], 相似性在 95%–97% 之间为同一个属, 所以菌株 BALOs10 可能属于一个新属新种, 因为只有一株菌, 故将菌株 BALOs10 暂时归于 *Halobacteriovorax* 属, 将其命名为 *Halobacteriovorax* sp. BALOs10。菌株 BALOs10 与其他典型菌株 BALOs 菌株的特性比较如表 2 所示。

菌株 BALOs10 的最佳生长条件为 pH 在 7.0–8.0, NaCl 浓度为 2%–4%, 温度为 35–37 °C, 其他 BALOs 菌株的最佳培养条件为 pH 7.2–7.6, NaCl 浓度为 0.5%–4.0%, 温度为 22–30 °C (表 2)。

表 2. 菌株 BALOs10 与 BALOs 相关典型菌株特性比较
Table 2. Classification general features of strain BALOs10 and related type strains of BALOs

Characteristic	1	2	3	4	5	6	7
Gram stain	-	-	-	-	-	-	-
Na ⁺ required (≥0.5%)	+	+	+	-	-	-	-
Optimum NaCl (% W/V)	2–3	0.5	2–3	ND	ND	ND	ND
Optimum pH	7.0–8.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Optimum temperature/°C	35–37	15–35	15–30	15–35	15–35	ND	20–30
Width of flagellum/nm	19–25	ND	ND	ND	28	29	ND
Intracellular growth	+	+	+	+	+	-	+
Bdelloplast formation	+	+	+	+	+	-	+

Strains: 1: BALOs10; 2: *Halobacteriovorax litoralis* JSS^[9]; 3: *H. marinus* SJ^[9]; 4: *Bacteriovorax stolpii* DSM 12778^[7]; 5: *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100^[2]; 6: *B. exovorax* JSS^[6]; 7: *Peredibacter starrii* A3.12^[8]; +: positive; -: negative; ND: no data available.

菌株 BALOs10 的最适 pH 值和 NaCl 浓度与其他 BALOs 生长繁殖的普遍特征相符合,但是生长温度范围更广,最佳的生长温度为 35–37 °C,与已知的 BALOs 有明显的差异。该温度与温血动物相近,对于未来该菌株应用于温血动物的益生菌具有重要的参考价值。此外,菌株 BALOs10 生长速度较快,在最佳生长条件下,接种量为 5%,12–18 h 生长达到最高值,说明菌株 BALOs10 具有较强的裂解细菌的活力,在生产和应用中具有更好的应用价值。

菌株 BALOs10 可以裂解 16 株受试菌种的 9 株,裂解率达到 56.3%。菌株 BALOs10 的裂解谱范围较广,可以裂解多种革兰氏阴性细菌,其表现出对弧菌属和海杆菌属细菌的裂解能力较强,这也与之前 Henry 的研究中海洋 BALOs 在有其他细菌的存在的情况下优先裂解弧菌属的细菌^[24]的结果相一致。对于不同来源的细菌表现出不同的裂解情况,这可能是因为 BALOs 对不同的宿主外膜成分所表现出的不同的粘附效率^[25]。Pineiro 等^[26]对大盐湖 BALOs 宿主裂解实验中首先报道了 BALOs 对某些弧菌表现出不同的裂解能力。在本文的裂解谱实验中菌株 BALOs10 对于同属于 *Pseudoalteromonas* 属的 2 个不同种的菌株表现出不同的裂解能力。尽管裂解谱的测试并不能为 BALOs 的系统分类与鉴定提供可靠的依据,但是可以据此对特定环境 BALOs 的表型差异进行区分以及了解捕食者对特定细菌群落的存在的可能影响,具有重要的生态学意义。此外,菌株 BALOs10 对 16 株细菌的裂解谱的分析表明,其具有成为海水养殖微生态制剂的潜力。以往对嗜盐的 BALOs 的裂解谱研究发现它们优先裂解弧菌^[24]。弧菌是近海中常见的细菌类群之一,由其引起的弧菌病是海水养殖中最普遍的细菌性疾

病,会导致鱼、虾和贝类的大量死亡^[27]。本研究中作为宿主使用的溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)能引起对虾和海水鱼类的败血症,表现为溃疡、烂鳍,在全世界范围内皆有流行^[28]。菌株 BALOs10 可以在 25 °C、30 h 内将溶藻弧菌(*V. alginolyticus* LF TCBS 15) OD_{620} 由 0.88 降至 0.25 以下,裂解效果达到 99%以上,具有防控海水养殖生物弧菌病的应用潜力。

目前,关于 BALOs 新种的文章并不多,其研究也主要集中在对 *B. bacteriovorus* HD100 的基因以及应用相关的研究。BALOs 的分类工作进展较为缓慢,分类上较为混乱,菌种资源较少,应用范围较小,这些都是目前 BALOs 研究所存在的问题。BALOs 广泛存在于各类环境中并且其种类十分丰富,Pineiro 等^[29]发表的环境嗜盐噬菌弧菌的全球多样性调查的结果显示嗜盐噬菌弧菌的系统发育和环境中的多样性要比之前所知的更多。Kandel 等应用荧光定量 PCR (qPCR)和高通量测序方法研究零排放养殖系统(ZDS)中的 BALOs 的丰度和多样性,结果表明淡水和咸水 ZDS 系统中 BALOs 占细菌总数 0.13%–1.40%,并且具有丰富多样性^[30]。Li 与 Williams 运用 454 焦磷酸测序分析也发现海水中的 BALOs 存在大量的全新的物种^[21]。因此,发掘不同环境的 BALOs 种质资源,发现并鉴定新菌株,完善 BALOs 的分类体系,将为 BALOs 的应用及更深层次的理论研究打下坚实的基础。

参 考 文 献

- [1] Zhang QY. Advances in studies on biodiversity of cyanophages. *Microbiology China*, 2014, 41(3): 545–559. (in Chinese)
张奇亚. 噬藻体生物多样性的研究动态. 微生物学通报,

- 2014, 41(3): 545–559.
- [2] Stolp H, Petzold H. Untersuchungen über einen obligat parasitischen mikroorganismus mit lytischer aktivität für *Pseudomonas*-Bakterien. *Journal of Phytopathology*, 1962, 45(4): 364–390.
- [3] Wu CL, Yang Z. Preliminary studies on biological characteristics of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Chinese Journal of Public Health*, 1996, 15(5): 309–311. (in Chinese)
吴承龙, 杨忠. 噬菌蛭弧菌生物学特性的初步研究. *中国公共卫生学报*, 1996, 15(5): 309–311.
- [4] Lambina VA, Afinogenova AV, Romāi Penabad S, Konovalova SM, Pushkareva AP. *Micavibrio admirandus* gen. et sp. nov.. *Mikrobiologija*, 1982, 51(1): 114–117.
- [5] Gromov BV, Mamkaeva KA. New genus of bacteria, *Vampirovibrio*, parasitizing chlorella and previously assigned to the genus *Bdellovibrio*. *Mikrobiologija*, 1980, 49(1): 165–167.
- [6] Koval SF, Hynes SH, Flannagan RS, Pasternak Z, Davidov Y, Jurkevitch E. *Bdellovibrio exovorax* sp. nov., a novel predator of *Caulobacter crescentus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63(1): 146–151.
- [7] Baer ML, Ravel J, Chun J, Hill RT, Williams HN. A proposal for the reclassification of *Bdellovibrio stolpii* and *Bdellovibrio starrii* into a new genus, *Bacteriovorax* gen. nov. as *Bacteriovorax stolpii* comb. nov. and *Bacteriovorax starrii* comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50(1): 219–224.
- [8] 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.
- [9] 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 *Halobacteriovoracaceae* fam. nov. in the class *Deltaproteobacteria*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(2): 593–597.
- [10] 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 the family *Pseudobacteriovoracaceae* fam. nov., within the order *Bdellovibrionales*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(2): 522–530.
- [11] Li MJ, Wu B, Han HC, Cai JP. Characterization of a *Bdellovibrio*-and-like organism strain BDE-1 for promoting its bdelloplast formation. *Microbiology China*, 2018, 45(8): 1641–1650 (in Chinese)
李敏佳, 吴冰, 韩红操, 蔡俊鹏. 蛭弧菌 BDE-1 的生物特性及促进其蛭质体形成的研究. *微生物学通报*, 2018, 45(8): 1641–1650.
- [12] Monnappa AK, Dwidar M, Seo JK, Hur JH, Mitchell RJ. *Bdellovibrio bacteriovorus* inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and invasion into human epithelial cells. *Scientific Reports*, 2014, 4: 3811.
- [13] Iebba V, Totino V, Santangelo F, Gagliardi A, Ciotoli L, Virga A, Ambrosi C, Pompili M, de Biase RV, Selan L, Artini M, Pantanella F, Mura F, Passariello C, Nicoletti M, Nencioni L, Trancassini M, Quattrucci S, Schippa S. *Bdellovibrio bacteriovorus* directly attacks *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* Cystic fibrosis isolates. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 280.
- [14] Seidler RJ, Mandel M, Baptist JN. Molecular heterogeneity of the *Bdellovibrions*: evidence of two new species. *Journal of Bacteriology*, 1972, 109(1): 209–217.
- [15] Jurkevitch E, Minz D, Ramati B, Barel G. Prey range characterization, ribotyping, and diversity of soil and rhizosphere *Bdellovibrio* spp. isolated on phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(6): 2365–2371.
- [16] Fry JC, Staples DG. Distribution of *Bdellovibrio bacteriovorus* in sewage works, river water, and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 1976, 31(4): 469–474.
- [17] Chen H, Athar R, Zheng GL, Williams HN. Prey bacteria shape the community structure of their predators. *ISME*

- Journal*, 2011, 5(8): 1314–1322.
- [18] Wen CQ, Xue M, Liang HF, Zhou SN. 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.
- [19] Li HH, Liu CJ, Chen LY, Zhang XM, Cai JP. Biological characterization of two marine *Bdellovibrio*-and-like organisms isolated from Daya bay of Shenzhen, China and their application in the elimination of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 151(1): 36–43.
- [20] Yu R, Zhang SW, Chen ZK, Li CY. Isolation and application of predatory *Bdellovibrio*-and-like organisms for municipal waste sludge biolysis and dewaterability enhancement. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 2017, 11(1): 10.
- [21] 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.
- [22] Chen MX, Li HY, Ma YF, Shi YX, Fu YL, Zheng TL, Zheng SL, Chen B. Composition and distribution of TCBS bacteria groups from sediments of Jiulong River estuary. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(5): 637–644. (in Chinese)
陈明霞, 李和阳, 马云飞, 史莹鑫, 傅毅凌, 郑天凌, 郑森林, 陈彬. 九龙江口沉积物 TCBS(Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose)菌群的分布. *微生物学报*, 2012, 52(5): 637–644.
- [23] Tindall BJ, Rosselló-Móra R, Busse HJ, Ludwig W, Kämpfer P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(1): 249–266.
- [24] Williams HN, Piñeiro S. Ecology of the predatory *Bdellovibrio* and like organisms//Jurkevitch E. *Predatory Prokaryotes*. Berlin: Springer, 2006: 213–248.
- [25] Varon M, Shilo M. Interaction of *Bdellovibrio bacteriovorus* and host bacteria. II. Intracellular growth and development of *Bdellovibrio bacteriovorus* in liquid cultures. *Journal of Bacteriology*, 1969, 99(1): 136–141.
- [26] Pineiro SA, Sahaniuk GE, Romberg E, Williams HN. Predation pattern and phylogenetic analysis of *Bdellovibrionaceae* from the Great Salt Lake, Utah. *Current Microbiology*, 2004, 48(2): 113–117.
- [27] Thompson FL, Iida T, Swings J. Biodiversity of vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68(3): 403–431.
- [28] Wu HB, Pan JP. Progress in studies of vibriosis in aquaculture. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2001, 8(1): 89–93. (in Chinese)
吴后波, 潘金培. 弧菌属细菌及其所致海水养殖动物疾病. *中国水产科学*, 2001, 8(1): 89–93.
- [29] 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.
- [30] Kandel PP, Pasternak Z, van Rijn J, Nahum O, Jurkevitch E. Abundance, diversity and seasonal dynamics of predatory bacteria in aquaculture zero discharge systems. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 89(1): 149–161.

Isolation, identification and prey range of *Halobacteriovorax* sp. BALOs10

Xiaosheng Ye¹, He Zhao¹, Mingxia Chen^{1*}, Heyang Li^{2*}, Xiaoyu He¹

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

² Third Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Xiamen 361005, Fujian Province, China

Abstract: [Objective] The purpose of the study was to isolate and identify *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALOs) strains from seawater and increase the known species richness of BALOs. [Methods] *Vibrio alginolyticus* LF TCBS 15 was used as host bacterium to isolate BALOs from seawater samples with seawater agar double-layer plate method. The seawater samples were collected from Daya bay of Shenzhen, China. The morphology of the cells was observed by light microscopy and transmission electron microscopy. 16S rDNA was used for phylogenetic analysis to complete molecular identification. The prey range on 16 different strains and the effects of NaCl, pH and temperature on the growth of strain BALOs10 were determined by double-layer plate filter paper method. [Results] A novel strain, BALOs10, was isolated using *V. alginolyticus* LF TCBS 15 as prey. The plaques are round, transparent and the edges were smooth and tidy. The cells are curved (0.21–0.44 μm diameter×1.25–1.87 μm long) with a single polar flagellum. Optimum growth occurs at 35–37 °C, pH 7–8 and in the presence of 2%–3% (W/W) NaCl. Prey range on 16 tested strains showed that strain BALOs10 lysed 9 different strains, corresponding to 56.3% of lysis rate, and was especially susceptible to *Vibrio* and *Marinobacter*. 16S rDNA sequence analysis indicates that BALOs10 was most closely related to *Halobacteriovorax marinus* SJ with 92.14% similarity, demonstrating that the strain may represent a novel species. Therefore, *Halobacteriovorax* sp. BALOs10 is proposed. [Conclusion] strain BALOs10 may represent a novel predator of genus *Halobacteriovorax*, which will enrich the species resource of BALOs and lay the material foundation for subsequent application and theoretical research.

Keywords: *Halobacteriovorax*, predatory bacteria, *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALOs), prey range

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41506179), by the National Programme on Global Change and Air-Sea Interaction (GASI-03-01-03-01), by the Scientific Research Foundation of Third Institute of Oceanography, SOA (2014003) and by the Natural Science Foundation of Fujian Province (2015J01613)

*Corresponding author. E-mail: Mingxia Chen, chenmx1257@163.com; Heyang Li, heyangli@126.com

Received: 12 September 2018; Revised: 11 December 2018; Published online: 12 March 2019