

研究报告

蛭弧菌 BDE-1 的生物特性及促进其蛭质体形成的研究

李敏佳¹ 吴冰² 韩红操³ 蔡俊鹏^{1*}

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院 广东 广州 510640)

(2. 华南理工大学分析测试中心 广东 广州 510640)

(3. 华南理工大学生物科学与工程学院 广东 广州 510006)

摘要:【背景】蛭弧菌是众多海洋益生菌中的一类较新成员,应用前景十分广阔。但由于蛭弧菌特殊的繁殖方式和周期,它的应用效果受寄主特性和生物活性的影响,因而优选寄主,维持或者提高蛭弧菌微生态制剂的应用活性是关键。【目的】筛选出能够裂解枯草芽孢杆菌的蛭弧菌,以增进其益生性能;研究提高蛭弧菌的蛭质体密度,以利于保存。【方法】从海南取回海泥样后,以枯草芽孢杆菌作为宿主菌,通过稀营养肉汤(Dilute nutrient broth, DNB)双层平板法分离获得蛭弧菌,并对目标菌株进行透射电镜形态鉴定和 16S rRNA 基因序列分析;然后进行生物学特性研究,同时开展氨苄青霉素、吲哚、Ca²⁺和 Mg²⁺影响蛭质体形成的研究。【结果】分离出一株以枯草芽孢杆菌作为宿主的蛭弧菌并命名为 BDE-1,其最适温度、盐度和 pH 分别为 25 °C、2.0%和 7.0;BDE-1 可裂解 24 株试验菌,占总试验菌株数(28 株)的 85.7%,其中对试验弧菌(13 株)的裂解率达 92.3%;吲哚、氨苄青霉素、Ca²⁺和 Mg²⁺ 4 种因子对 BDE-1 蛭质体的形成均有促进作用,其中吲哚和 Ca²⁺的促进作用显著。【结论】研究结果不仅为蛭弧菌寄主优化选择提供了可行性解决思路,而且为维持或提高蛭弧菌微生态制剂的应用活性提供了理论依据。

关键词: 蛭弧菌, 蛭质体形成, 分离和鉴定, 吲哚, 氨苄青霉素, 钙镁离子

Characterization of a *Bdellovibrio*-and-like organism strain BDE-1 for promoting its Bdelloplast formation

LI Min-Jia¹ WU Bing² HAN Hong-Cao³ CAI Jun-Peng^{1*}

(1. College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510640, China)

(2. Analysis and Testing Center, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510640, China)

(3. College of Biological Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

Abstract: [Background] As a relatively new member of marine probiotics, *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALOs) have a wide application prospect. However, because of BALOs' special

Foundation item: Science and Technology Program Public Welfare Project of Guangdong Province (2016A020222002)

*Corresponding author: E-mail: febjpcai@scut.edu.cn

Received: November 21, 2017; **Accepted:** February 28, 2018; **Published online** (www.cnki.net): March 22, 2018

基金项目: 广东省科技计划公益项目(2016A020222002)

*通信作者: E-mail: febjpcai@scut.edu.cn

收稿日期: 2017-11-21; 接受日期: 2018-02-28; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-03-22

reproductive mode and cycle, the practical application of BALOs is greatly affected by their parasitic host characteristics and biological activities. Therefore, selecting appropriate parasitic hosts and maintaining the activity of BALOs preparation are very important for BALOs' application. **[Objective]** To isolate a strain of BALOs which can use gram-positive probiotics *Bacillus subtilis* as host, and increase its Bdelloplast concentration in the culture for storage. **[Methods]** *Bacillus subtilis* was used as host bacterium to isolate BALOs from sea mud samples from Hainan by DNB (Dilute nutrient broth) double plate method. Transmission electron microscope and partial 16S rRNA gene sequence analysis were conducted to identify the *Bdellovibrio* strain, and its biological characteristics and lysis spectrums were studied. In addition, the effects of ampicillin, indole, Ca^{2+} and Mg^{2+} on the formation of bdelloplast were researched. **[Results]** A strain of BALOs (named BDE-1) which could prey on *Bacillus subtilis* was isolated and identified successfully. The optimal temperature, salinity and pH for BDE-1 were 25 °C, 2.0% and 7.0 respectively. Lysis experiments on 28 pathogenic or potential pathogenic strains showed that BDE-1 lysed 24 strains, corresponding to 85.7% of lysis rate. For the 13 strains of tested vibrios, its lytic rate was as high as 92.3%. While all four factors (indole, ampicillin, Ca^{2+} and Mg^{2+}) promoted bdelloplast formation, the promotion effect of indole and Ca^{2+} was more significant. **[Conclusion]** This study not only provided a feasible solution for the optimal selection of parasitic hosts of *Bdellovibrio*, but also provided a theoretical basis for the maintenance or enhancement of the application of *Bdellovibrio* probiotic preparation.

Keywords: *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALOs), Bdelloplast formation, Isolation and identification, Indole, Ampicillin, Ca^{2+} and Mg^{2+}

蛭弧菌(*Bdellovibrio*)是一类寄生型革兰氏阴性菌, 大约只有典型细菌 1/5 的大小, 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^[1]。蛭弧菌的生活史包括因高耗能而易死亡的游泳体阶段和已进入到宿主胞质空间且受宿主细胞壁保护的蛭质体阶段^[2]。蛭弧菌的裂解谱非常广泛, 能裂解大多数革兰氏阴性菌和极少数的革兰氏阳性菌, 尤其是对水产动物肠道的病原弧菌具有较强的裂解作用^[3-7]。

由副溶血性弧菌、溶藻弧菌和鳃弧菌等各种弧菌引发的水产养殖生物疾病统称为弧菌病, 每年给水产养殖业造成巨大的经济损失。与此同时, 部分弧菌也是人类的致病菌, 它们不仅能引起人类肠胃炎, 还能引起肠道外感染。防治弧菌等细菌性致病菌最常用的方法是使用抗生素, 但长期使用抗生素会导致细菌产生耐药性^[8]。因此, 研究抗生素的有效替代品显得尤为迫切。蛭弧菌作为众多海洋益生菌研究中一类较新的成员, 2016年 Dharani 等^[9]和 马兰等^[10]研究发现蛭弧菌能够捕食革兰氏阴性耐药菌株, 因此在未来应用于防治耐药性致病菌方面具有很大潜力。

虽然蛭弧菌正在被越来越广泛地接受和使用, 但将蛭弧菌作为微生态制剂应用时, 其应用效果受到蛭弧菌寄生的宿主和蛭弧菌的生物活性两个方面的影响。蛭弧菌的寄生对象通常为易裂解的革兰氏阴性菌, 如大肠杆菌、沙门氏菌和弧菌类等, 而不是裂解难度较大的枯草芽孢杆菌等细胞壁较厚的革兰氏阳性菌。从国内外的研究报道来看, 几乎均是以革兰氏阴性菌株为寄生宿主来开展蛭弧菌的研究工作。

虽然蛭弧菌具有广谱裂解致病菌的能力, 但目前基本上是以革兰氏阴性菌如大肠杆菌为宿主, 而大肠杆菌是食品中有限量的菌株, 因此其应用也受限制, 因此, 蛭弧菌宿主的选择就显得尤为重要。再者, 目前市面上的蛭弧菌产品活性几乎没有或很低^[11], 导致我国农业部作出撤消其生产和应用的许可。蛭弧菌产品活性低下与其特殊的生活周期有关。相对于脆弱且高耗氧的游泳体, 低耗氧的蛭质体耐受恶劣环境且维持自身活性的能力更强。因此解决蛭弧菌产品活性低下问题的关键或许在于把蛭弧菌游泳体转变为蛭质体, 继而延缓蛭质体的发育。

已有研究表明^[12-13], 某些蛭弧菌菌株具备裂解

革兰氏阳性菌的能力,但目前尚无以枯草芽孢杆菌为宿主来分离蛭弧菌的报道;另外,氨基青霉素^[14]、吡啶^[15]、Ca²⁺^[16]和 Mg²⁺等对蛭弧菌的生长繁殖过程有着不同程度的影响。因此,本研究首次以枯草芽孢杆菌作为宿主从海水水泥样中分离筛选出目标蛭弧菌株,并探究上述几种因素对该蛭弧菌株蛭质体形成的影响,为蛭弧菌的发酵和水产养殖业中的应用提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 菌株和培养基

1.1.1 菌株

蛭弧菌分离材料采集自海南水产养殖区域 5 m–10 m 深处的海水水泥样品。宿主菌株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* GIM 1.136),购自广东省微生物研究所。28 株裂解试验菌分离自鲍鱼养殖场死亡九孔鲍体内。

1.1.2 培养基

所用的固体培养基和 DNB (Dilute nutrient broth) 培养液等均按照参考文献[1]配制。

1.2 主要试剂和仪器

吡啶、氨基青霉素和 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 提取试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司;氯化钙、硫酸镁均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

PCR 仪和测序仪, Applied Biosystems 公司;透射电子显微镜, JEOL 公司。

1.3 方 法

1.3.1 蛭弧菌的分离

将宿主菌制成一定密度的菌悬液,取来自海南水产养殖区域的海水泥样品,采用 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]。

1.3.2 蛭弧菌的初步鉴定

根据 DNB 双层平板上长出的噬菌斑大小、形状和透明度等特征来鉴别,初步鉴定分离菌株是否为蛭弧菌。挑取双层平板上 2–3 个透亮且呈圆形的噬菌斑到 DNB 培养液中进行纯化培养,待蛭弧菌

DNB 培养液在 25 °C、200 r/min 摇床培养至变清,此时蛭弧菌密度约为 10⁶ PFU/mL,直接取菌液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观察鉴定。

1.3.3 DNA 提取和测序

待蛭弧菌 DNB 培养液在 25 °C、200 r/min 摇床培养至变清后,先将菌液在 4 °C、6 000 r/min 离心 10 min,弃去宿主菌沉淀,再将上清液在 4 °C、20 000 r/min 离心 20 min,弃去上清液,用 500 μL 的 1×TE 溶液富集蛭弧菌沉淀。采用 SK8255 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取蛭弧菌的 DNA,并对其 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增和测序。按文献[1,17]设计一对蛭弧菌特异性引物进行 PCR 扩增,上游引物(63F)序列为: 5'-CAGGCCTAACACATG CAAGTC-3';下游引物(Bdg842R)序列为: 5'-CGWCA CTGAAGGGGTCAA-3'。PCR 反应体系(50 μL): Premix Taq 酶 25 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 2 μL, DNA 模板 2 μL, ddH₂O 19 μL。PCR 反应条件^[18]: 95 °C 3 min; 94 °C 1 min, 56 °C 45 s, 72 °C 1 min, 循环 35 次; 72 °C 10 min。PCR 反应结束后,将 PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测。

1.3.4 16S rRNA 基因序列分析

纯化后的 PCR 产物由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,将测得的蛭弧菌 16S rRNA 基因序列与 Ezbioclouda 数据库中已知的蛭弧菌典型菌株进行相似性比对后,使用 MEGA 7.0 进行多重比较构建系统进化树。

1.3.5 温度对蛭弧菌生长繁殖能力的影响

其他培养条件相同,将 1.1.2 中蛭弧菌 DNB 培养液分别置于 15、20、25、30、35 °C 的恒温摇床中以 200 r/min 培养,并检测培养 0、3、5、7、9、11 d 后的蛭弧菌密度。

1.3.6 盐度对蛭弧菌生长繁殖能力的影响

其他培养条件相同,调节 1.1.2 中蛭弧菌 DNB 培养液的 NaCl 含量分别为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%,在 25 °C、200 r/min 摇床培养,并检测培养 0、3、5、7、9、11 d 后的蛭弧菌密度。

1.3.7 pH 对蛭弧菌生长繁殖能力的影响

其他培养条件相同, 调节 1.1.2 中蛭弧菌 DNB 培养液的 pH 值分别为 6.5、7.0、7.5、8.0、8.5, 在 25 °C、200 r/min 摇床培养, 并检测培养 0、3、5、7、9、11 d 后的蛭弧菌密度。

1.3.8 蛭弧菌对 28 株试验菌的裂解谱

基于上述实验所确定的蛭弧菌最适生长条件, 研究该株蛭弧菌对 28 株试验菌的裂解谱。

1.3.9 4 种因子对蛭弧菌蛭质体密度的影响

基于上述实验所确定的蛭弧菌最适生长条件, 将蛭弧菌在其他培养条件均相同而添加的影响因子终浓度不同的培养环境中进行增殖, 同时制备空白对照。其中 3 组吡啶组终浓度分别为 1、2、3 mmol/L, 3 组氨基青霉素组终浓度分别为 50、100、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 3 组 Ca^{2+} 组终浓度分别为 4、20、40 mmol/L, 3 组 Mg^{2+} 组终浓度分别为 2、8、16 mmol/L。将增殖后的菌液在 4 °C、6 000 r/min 离心 10 min, 富集沉淀即为宿主和蛭质体混合液, 通过双层平板法观察生长的蛭弧菌蛭质体数目, 并进行计数和比较。

2 结果与分析

2.1 蛭弧菌的分离和初步鉴定

2.1.1 菌株的分离

以枯草芽孢杆菌为宿主菌(图 1), 采用 DNB 双层平板法分离纯化出一株可以出现噬菌斑的菌株, 命名为 BDE-1。BDE-1 在双层平板噬菌斑出斑时间大约为 4 d, 噬菌斑呈圆形、凹陷、表面湿润透亮

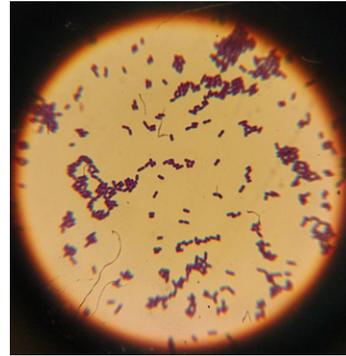


图 1 宿主菌的革兰氏染色镜检图(100×)
Figure 1 Gram staining of host bacteria (100×)

且边缘光滑整齐(图 2), 随着培养时间的延长而有规则地扩大, 直至扩满整个平板。挑取噬菌斑至 DNB 营养液中, 加入制备的枯草芽孢杆菌菌体浓缩悬浮液, 在 25 °C、200 r/min 摇床培养 4–5 d 后宿主菌被 BDE-1 裂解, 培养液由浑浊悬浮液变清亮(图 3)。

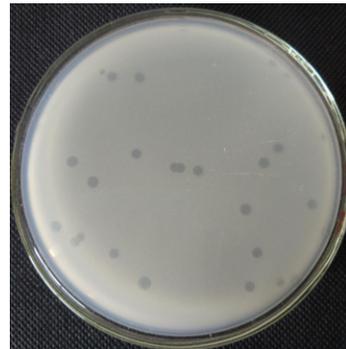


图 2 BDE-1 双层平板出斑图
Figure 2 The double-plate plaque of BDE-1

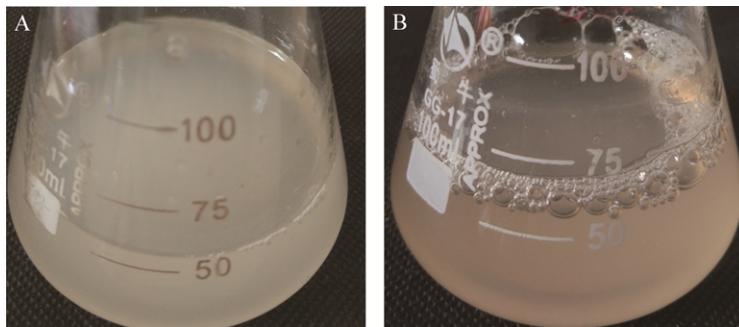


图 3 BDE-1 摇床培养液
Figure 3 The shaking table culture broth of BDE-1

注: A: 对照组; B: 实验组.

Note: A: Control group; B: Experimental group.

2.1.2 电镜观察

对 BDE-1 进行负染后,在透射电镜下观察其形态和大小(图 4)。在电镜下,可见 BDE-1 的菌体为椭圆杆状,大小为 $1.03\ \mu\text{m}\times 0.45\ \mu\text{m}$,端生长度约为 $4.8\ \mu\text{m}$ 的长鞭毛。根据 BDE-1 的双层平板噬菌斑特征和电镜观察特征并对照《伯杰氏细菌鉴定手册》^[19],确定其形态具有典型的蛭弧菌形态特征,因此可判定 BDE-1 为蛭弧菌。

2.1.3 16S rRNA 基因序列分析

为了进一步鉴定 BDE-1 的系统进化,特异性 PCR 扩增获得了长 774 bp 的 16S rRNA 基因产物。向 GenBank 数据库提交蛭弧菌 BDE-1 的 16S rRNA 基因序列,获得登录号为 MG897152。产物经过测序后在 EzBioClouda 数据库中已与收录的蛭弧菌典型菌株序列进行同源比对,利用 MEGA 7.0 软件进行多重比较,最后构建出系统进化树(图 5)。同源比对后发现 BDE-1 与 Bacteriovoracaceae JF727692 有 95.34% 的相似度,从 BDE-1 的系统进化树可以看出,其与 *Peredibacter* AY294220 处于同一个分支,但二者之间的亲缘关系相对较远。因此,BDE-1 被鉴定为 Bacteriovoracaceae 的新属。

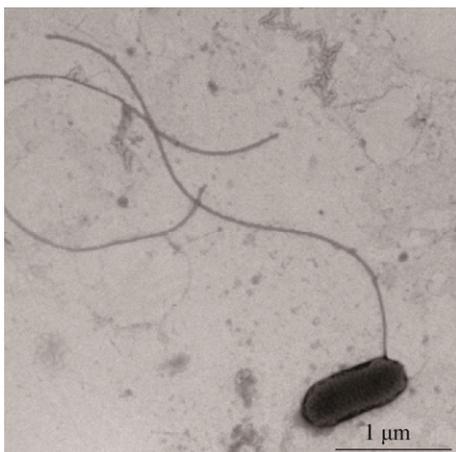


图 4 BDE-1 透射电镜观察图(17 000×)

Figure 4 Transmission electron micrograph of BDE-1 (17 000×)

2.2 不同培养环境对 BDE-1 生长繁殖能力的影响

2.2.1 温度对 BDE-1 生长繁殖能力的影响

BDE-1 生长繁殖能力表现最佳的适宜温度范围在 $20\text{--}25\ ^\circ\text{C}$ (图 6)。在 $25\ ^\circ\text{C}$ 下,培养 3 d 后密度达到了 $4.02\ \text{logPFU/mL}$,培养 5 d 后密度最高达 $7.90\ \text{logPFU/mL}$,而在 $15\ ^\circ\text{C}$ 和 $35\ ^\circ\text{C}$ 下培养 3 d 后密度却仅为 $2.70\ \text{logPFU/mL}$ 和 $1.90\ \text{logPFU/mL}$,而且分别在 7 d 和 9 d 后密度才达到最大值 $5.90\ \text{log PFU/mL}$ 和 $5.30\ \text{logPFU/mL}$,这说明温度对 BDE-1 生长繁殖能力的影响较大。

2.2.2 盐度对 BDE-1 生长繁殖能力的影响

BDE-1 生长繁殖能力表现最佳的适宜盐度范围在 $1.5\%\text{--}2.0\%$ (图 7)。在 2.0% 盐度下,其生长繁殖速度最快,培养 3 d 后密度可达 $4.23\ \text{logPFU/mL}$,远高于其他盐度,在培养 5 d 后能达到最高密度 $6.28\ \text{logPFU/mL}$;在其他盐度下,BDE-1 均能进行生长繁殖,只是生长速度变缓,这一现象从图 7 中即可看出:在 2.5% 盐度下,蛭弧菌 BDE-1 的密度虽还能达到 $6.02\ \text{logPFU/mL}$,但达到此密度的摇床培养时间是 9 d,而在 2.0% 盐度下达到此密度仅需 5 d。

2.2.3 pH 对 BDE-1 生长繁殖能力的影响

BDE-1 生长繁殖能力表现最佳的适宜 pH 范围为 $7.0\text{--}7.5$ (图 8)。在 pH 7.0 时,其生长繁殖速度最快,培养 3 d 后密度可达 $4.70\ \text{logPFU/mL}$,远高于其他 pH,在培养 5 d 后能达到最高密度 $6.59\ \text{logPFU/mL}$;在其他 pH 条件下,其生长较为缓慢,但基本上是在 3–5 d 迅速繁殖,这一生长趋势与不同盐度下的生长趋势一致,说明 BDE-1 是在培养 3 d 后才开始释放子代,随后其密度呈现出对数增长趋势。BDE-1 在 pH 6.5–8.5 的环境下均能生长,且密度均可达到 $5.00\ \text{logPFU/mL}$,说明 BDE-1 对 pH 的适应范围较为广泛。以上研究结果与秦生巨^[20]的结论相同,他观察蛭弧菌在不同 pH 自来水宿主双层琼脂平板上形成噬菌斑的能力时发现,蛭弧菌最适宜的 pH 范围是 $7.0\text{--}7.6$ 。

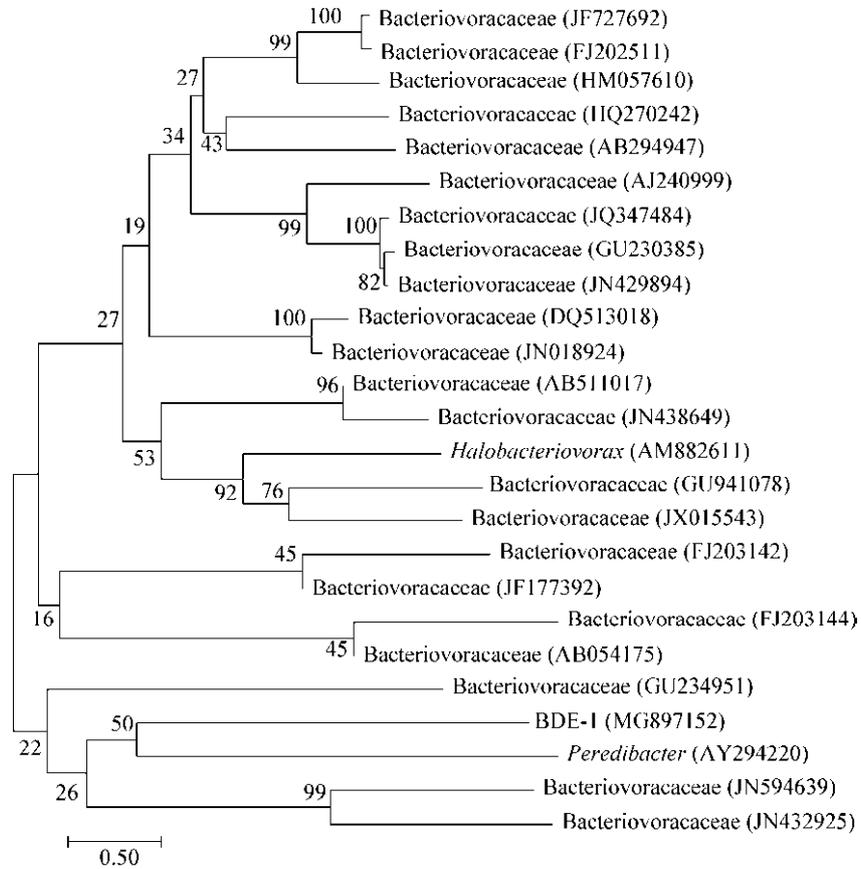


图 5 基于 16S rRNA 基因序列的系统进化树

Figure 5 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence

注: 括号内为菌株的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的登录号; 分支上数据结点处数字为 Bootstrap 值; 标尺的数据为进化距离.

Note: Numbers in parentheses represent the accession numbers in the GenBank for the 16S rRNA gene sequence of the strain; Number at the branch points indicated the Bootstrap values; Bar (0.50) represents sequence divergence.

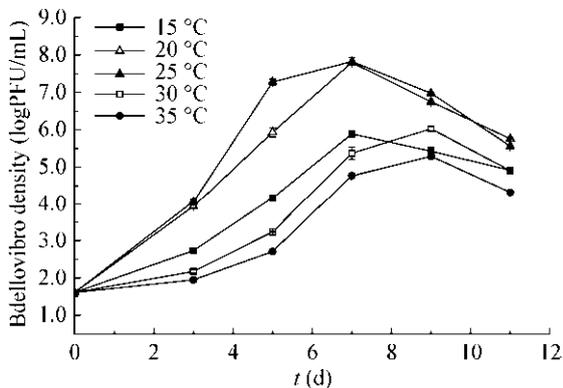


图 6 不同温度对 BDE-1 生长的影响

Figure 6 The effect of temperature on the growth of BDE-1

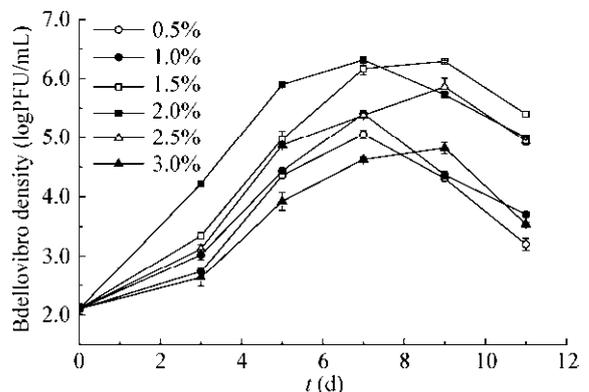


图 7 不同盐度对 BDE-1 生长的影响

Figure 7 The effect of salinity on the growth of BDE-1

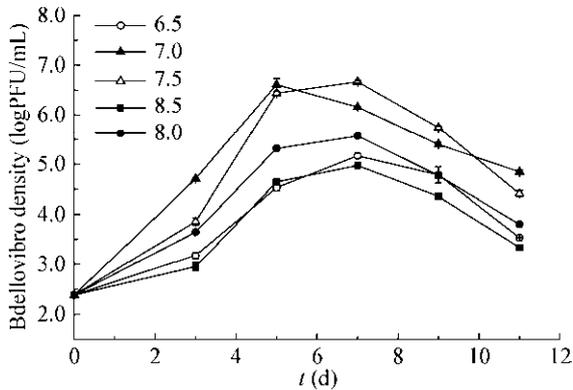


图 8 不同 pH 值对 BDE-1 生长的影响

Figure 8 The effect of pH on the growth of BDE-1

2.3 BDE-1 对 28 株宿主菌的裂解谱

蛭弧菌 BDE-1 的裂解谱如表 1 所示。结果表明, BDE-1 对不同属种的试验菌株均具有明显的裂解作用, 能裂解 24 株菌, 占总试验菌株的 85.7%, 不能裂解的只有 4 株菌, 分别为 2 号溶藻弧菌、15 号无花果沙雷氏菌、24 号腐败希瓦氏菌和 33 号杀鲑气单胞菌; 试验菌株中有 23 株常见的水产类动物致病菌, 分别为 13 株弧菌、5 株腐败希瓦氏菌和 5 株绿脓气单胞菌, BDE-1 对其中弧菌的裂解率达 92.3%, 对腐败希瓦氏菌裂解率达 80%, 对绿脓假单胞菌裂解率达 100%。

2.4 氨苄青霉素、吡啶、Ca²⁺和 Mg²⁺对 BDE-1 蛭质体密度的影响

如图 9 和 10 所示, 氨苄青霉素和吡啶对 BDE-1 蛭质体的形成具有促进作用, 而且这 2 种影响因子在试验浓度范围内, 随着浓度的增加 BDE-1 蛭质体的密度增加。当氨苄青霉素浓度为 150 mg/L 时, 蛭质体密度达 5.86 logPFU/mL。与对照组相比其密度增加了 2.60 logPFU/mL。当吡啶浓度为 3 mmol/L 时, 蛭质体密度高达 7.83 logPFU/mL, 与对照组相比增加了 4.60 logPFU/mL; 当吡啶浓度为 2 mmol/L 时, 蛭质体密度也达到了 5.50 logPFU/mL, 由此可见吡啶的添加对 BDE-1 蛭质体形成的促进作用显著。

如图 11 和 12 所示, Ca²⁺和 Mg²⁺对 BDE-1 蛭质体的形成同样具有促进作用。在试验设定浓度范围内蛭质体密度的变化均呈先增加后减少趋势, 实

验组蛭质体密度均高于对照组。从图 11 可以看出, Ca²⁺浓度为 20 mmol/L 时蛭质体密度最大, 达 7.72 logPFU/mL, 比对照组高 4.30 logPFU/mL, 可见 Ca²⁺对 BDE-1 蛭质体形成的促进作用明显。由图 12 可见, 当 Mg²⁺浓度仅为 2 mmol/L 时, 蛭质体密度达到最大(6.87 logPFU/mL), 而后随着 Mg²⁺浓度的增加, 其促进效果反而有所降低。

表 1 蛭弧菌 BDE-1 对 28 株宿主菌的裂解谱

Table 1 Lysis range of BDE-1 on 28 strains of prey bacteria

宿主菌株 Host strains	来源 Sources	裂解谱 Lysis
<i>Vibrio alginolyticus</i> 1	A	+
<i>Vibrio alginolyticus</i> 2	A	-
<i>Vibrio alginolyticus</i> 4	A	+
<i>Vibrio alginolyticus</i> 5	A	+
<i>Vibrio alginolyticus</i> 10	A	+
<i>Vibrio alginolyticus</i> 11	A	+
<i>Vibrio alginolyticus</i> 16	A	+
<i>Vibrio alginolyticus</i> 19	A	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> 8	A	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> 9	A	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> 25	A	+
<i>Vibrio cholera</i> 3	A	+
<i>Vibrio cholerae</i> 14	A	+
<i>Shewanella putrafaciens</i> 12	A	+
<i>Shewanella putrafaciens</i> 24	A	-
<i>Shewanella putrafaciens</i> 27	A	+
<i>Shewanella putrafaciens</i> 28	A	+
<i>Shewanella putrafaciens</i> 34	A	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 17	A	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 22	A	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 29	A	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 32	A	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 35	A	+
<i>Serratia ficaria</i> 15	A	-
<i>Serratia ficaria</i> 20	A	+
<i>Enterococcus agglometans</i> 30	A	+
<i>Klebsiella oxytoca</i> 31	A	+
<i>Aeromonas salmonicida</i> 33	A	-

注: A: 分离自鲍鱼养殖场死亡九孔鲍体内, 安瓿管冷冻干燥保藏于本实验室; +: 可裂解; -: 不可裂解。

Note: A: Isolated from dead abalone body of abalone farms, ampoules freeze drying preserved in our laboratory; +: Can be cracked; -: Can not be cracked.

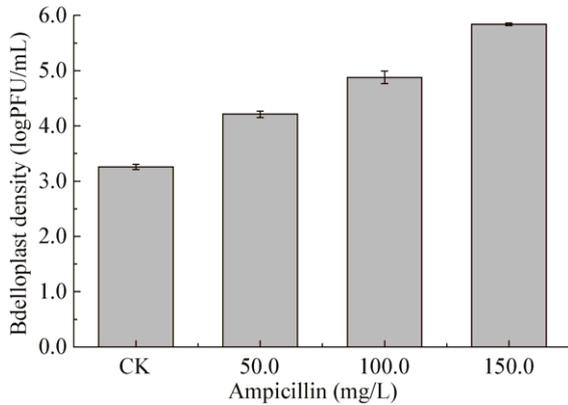


图 9 不同浓度氨苄青霉素对 BDE-1 蛭质体形成的影响
Figure 9 The effect of ampicillin on the growth of the Bdelloplast of BDE-1

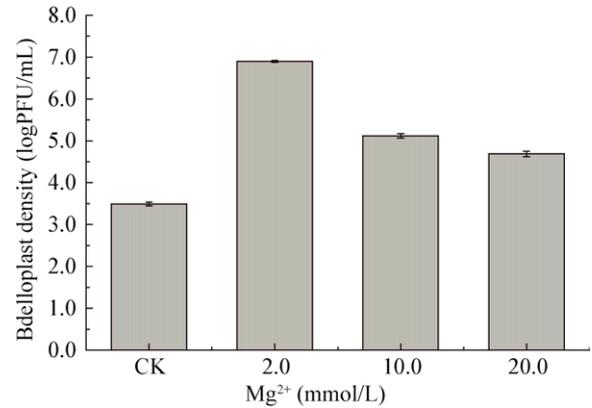


图 12 不同浓度 Mg²⁺对 BDE-1 蛭质体形成的影响
Figure 12 The effect of Mg²⁺ on the growth of the Bdelloplast of BDE-1

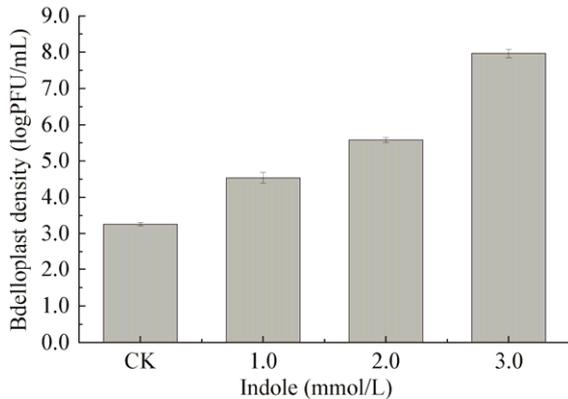


图 10 不同浓度吲哚对 BDE-1 蛭质体形成的影响
Figure 10 The effect of indole on the growth of the Bdelloplast of BDE-1

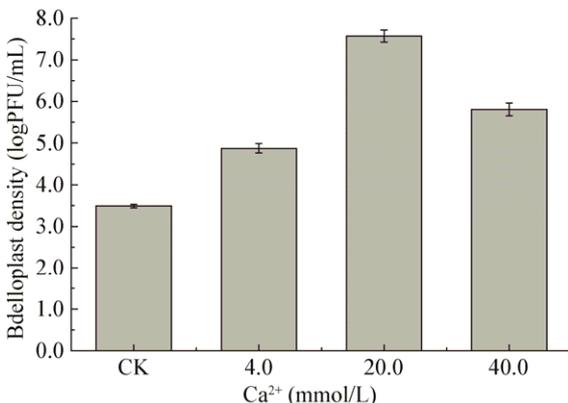


图 11 不同浓度 Ca²⁺对 BDE-1 蛭质体形成的影响
Figure 11 The effect of Ca²⁺ on the growth of the Bdelloplast of BDE-1

3 讨论与结论

蛭弧菌产品活性低下是蛭弧菌研究领域一直以来较难攻克的问题。由于蛭弧菌培养难、检测项目不全和产品活性极低等问题导致产品质量得不到稳定保障,应用效果不佳。根据实际检测情况可知,市面上流通的蛭弧菌产品所含具有活性的蛭弧菌数量较少,但商家仍宣称噬菌蛭弧菌微生态制剂有着防治水产致病弧菌的效果。我国农业部考虑到这层现实因素,在 2015 年 9 月份发出公告,禁止生产使用噬菌蛭弧菌微生态制剂(生物制菌王)产品。

就实验室研究而言,蛭弧菌确实具有裂解并防治有害细菌的效果。国外研究者 Iebba 等^[21]研究表明,蛭弧菌在健康人的肠道中数量众多,维持着肠道微生物生态系统的平衡,而在炎症性肠病、乳糜泻和囊性纤维化病人的肠道中则严重减少甚至消失,进而导致肠道微生物生态系统的失衡;Loozen 等^[22]研究表明蛭弧菌 HD100 可作为抑制口腔革兰氏阴性菌的益生菌,以达到预防牙周病的目的。这些研究结果均展示了蛭弧菌在调控微生物类群、维持生态平衡方面的重要作用。因此,加强蛭弧菌的活性和稳定性研究,解决蛭弧菌产品活性低下的问题,让蛭弧菌微生态制剂能够真正做到规模化生产并应用到

水产养殖中, 以改善水产动物肠道微生物菌群并防治水产类致病弧菌等意义重大。本研究以解决蛭弧菌产品活性低下问题为中心, 首次分离出一株能够以枯草芽孢杆菌作为寄生宿主的蛭弧菌株 BDE-1。

一般来说, 蛭弧菌的最佳生长温度为 22–30 °C, 最适生长 pH 为 7.2–7.6, 盐度适应范围为 0.5%–4.0%。我们通过研究发现 BDE-1 的最适生长温度为 25 °C, 最适生长盐度为 2.0%, 最适生长 pH 为 7.0, 这 3 个环境指标符合蛭弧菌生长繁殖条件的普遍特征。BDE-1 培养早期的双层平板出斑时间约为 4–5 d, 而众多研究者分离出的蛭弧菌菌株出斑时间仅需 2–3 d, 这意味着 BDE-1 的生长繁殖速度相对而言较为缓慢。究其原因, 是因为宿主及其生理生化特性不同所导致。革兰氏阳性菌和阴性菌的细胞壁结构以及个体大小的不同导致前者更难被蛭弧菌裂解。因而 BDE-1 裂解枯草芽孢杆菌就比裂解常见的革兰氏阴性宿主菌如大肠杆菌和副溶血性弧菌等难度大, 其生长繁殖速度也就相对下降。但随着 BDE-1 的适应性培养及各项培养条件的优化, 其生长繁殖周期会逐渐缩短, 生长繁殖能力逐渐增强。

从 BDE-1 的摇床培养菌液和出斑情况来看, 摇床培养 4–5 d 后, 培养菌液由浑浊变澄清, 双层平板噬菌斑呈圆形, 表面湿润且透亮, 说明该菌株对枯草芽孢杆菌的裂解作用好。虽然 BDE-1 培养早期的生长繁殖速度较为缓慢, 但这并不代表其裂解能力的下降。因为从 BDE-1 的裂解谱可以看出, 其裂解能力表现较强, 对试验菌株的裂解率达 85.7%, 对致病弧菌的裂解率也高达 92.3%。

呼兰等^[14]研究表明, 青霉素不会影响蛭弧菌的吸附和穿入, 但抑制蛭弧菌在宿主内的发育。本研究与他们的研究结果较为一致, 氨苄青霉素能够抑制蛭弧菌在宿主体内的生长过程, 进而减缓了其子代的释放, 这有助于蛭弧菌蛭质体的形成和稳定。Dwidar 等^[15]研究表明, 低浓度吡啶的添加能够减缓蛭弧菌子代从蛭质体中释放出来, 本研究也发现添

加适量的吡啶并不会完全抑制蛭弧菌的生长繁殖, 反而能够有助于其蛭质体阶段的稳定和延续。韩晓宁等^[16]研究表明, Ca^{2+} 能有效增长蛭弧菌的生长繁殖能力。但 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 对蛭弧菌促生长作用的具体机制尚不明确, 有待后续进行更深入的机制机理研究。从 4 种因子对 BDE-1 蛭质体形成的作用来看, 氨苄青霉素、吡啶、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 这 4 种因子对蛭质体的形成均表现为促进作用。总体而言, 吡啶和 Ca^{2+} 对蛭弧菌 BDE-1 蛭质体形成的促进作用最明显, 二者添加后蛭质体密度增加约 10^4 PFU/mL。在试验设定的浓度范围内, 氨苄青霉素、吡啶、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 这 4 种蛭质体促生长因子的最佳作用浓度分别为 150 mg/L、3 mmol/L、20 mmol/L 和 2 mmol/L。

目前, 关于蛭弧菌裂解革兰氏阳性菌的报道国内外均不多, 而以枯草芽孢杆菌为宿主进行蛭弧菌分离的研究则尚无报道。本研究首次分离出一株对枯草芽孢杆菌有较强裂解能力的蛭弧菌株, 并探究了吡啶、氨苄青霉素、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 这 4 种因子对蛭弧菌蛭质体生成量的影响, 研究结果表明吡啶和 Ca^{2+} 对蛭弧菌蛭质体的形成促进作用明显。蛭弧菌革兰氏阳性宿主的使用为蛭弧菌的安全应用提供了有效的探讨和可行性方案, 而促进蛭弧菌蛭质体形成的研究则是为维持或提高蛭弧菌微生态制剂的应用活性提供了理论基础, 这两方面的研究成果对蛭弧菌在水产养殖业的实际应用具有重要的意义。

REFERENCES

- [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[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(6): 2365-2371
- [2] Lambert C, Evans KJ, Till R, et al. Characterizing the flagellar filament and the role of motility in bacterial prey-penetration by *Bdellovibrio bacteriovorus*[J]. Molecular Microbiology, 2006, 60(2): 274-286
- [3] Cai JP, Han Y, Wang Z, et al. Lysis study of *Bdellovibrios* on seafood-borne potentially pathogenic vibrios[J]. Food Science, 2006, 27(1): 75-78 (in Chinese)
蔡俊鹏, 韩韪, 王志, 等. 蛭弧菌消除海产品中潜在致病性弧菌的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(1): 75-78
- [4] Lu F, Cai JP. The protective effect of *Bdellovibrio*-and-like

- organisms (BALO) on *Tilapia* fish fillets against *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar *Typhimurium*[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, 51(6): 625-631
- [5] Jiang XP, Cai JP. Effect of BDYJAL on controlling *Escherichia coli* DH5a on grass carp fillets[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(16): 9740-9742 (in Chinese)
蒋小平, 蔡俊鹏. 蛭弧菌对草鱼片大肠杆菌生长的控制研究[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(16): 9740-9742
- [6] Chen LY, Cai JP. Research of *Bdellovibrio*-and-like organisms on controlling *Scophthalmus maximus* enteric redmouths[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2011(18): 3-5 (in Chinese)
陈丽芸, 蔡俊鹏. 蛭弧菌防治大菱鲆红嘴病试验[J]. *广东农业科学*, 2011(18): 3-5
- [7] Li HH, Liu CJ, Chen LY, et al. 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[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 151(1): 36-43
- [8] Akinbowale OL, Peng H, Barton MD. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 100(5): 1103-1113
- [9] Dharani S, Kim DH, Shanks RMQ, et al. Susceptibility of colistin-resistant pathogens to predatory bacteria[J]. *Research in Microbiology*, 2018, 169(1): 52-55
- [10] Ma L, Zhao BH, Tan TY, et al. Study of *Bdellovibrio* on the lysis of pandrug-resistant Gram-negative bacterias and culture conditions[J]. *Journal of Sichuan University (Natural Science Edition)*, 2015, 52(4): 895-900 (in Chinese)
马兰, 赵博涵, 谭天宇, 等. 蛭弧菌裂解泛耐药革兰氏阴性菌及培养条件研究[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2015, 52(4): 895-900
- [11] Wen CQ, Xue M, Zhang JY, et al. The detection of *Bdellovibrio*-and-like organisms in commercial preparations used for aquaculture[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2009, 33(2): 326-333 (in Chinese)
温崇庆, 薛明, 张金燕, 等. 水产养殖用蛭弧菌类生物制剂的检测[J]. *水产学报*, 2009, 33(2): 326-333
- [12] Monnappa AK, Dwidar M, Seo JK, et al. *Bdellovibrio bacteriovorus* inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and invasion into human epithelial cells[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 3811
- [13] Iebba V, Totino V, Santangelo F, et al. *Bdellovibrio bacteriovorus* directly attacks *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* Cystic fibrosis isolates[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 280
- [14] Hu L, Liu BY. Studies on the biological characteristics of *Bdellovibrio bacteriovorus* isolated from human feces[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 1989(2): 28-32 (in Chinese)
呼兰, 刘秉阳. 人粪便中分离的噬菌蛭弧菌生物学特性的研究[J]. *中国微生态学杂志*, 1989(2): 28-32
- [15] Dwidar M, Nam D, Mitchell RJ. Indole negatively impacts predation by *Bdellovibrio bacteriovorus* and its release from the bdelloplast[J]. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(4): 1009-1022
- [16] Han XN, Xu SD, Yuan ED, et al. Study on growth characteristics of *Bdellovibrio* and optimization of its culturing conditions[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2009, 25(1): 19-23 (in Chinese)
韩晓宁, 许少丹, 袁尔东, 等. 蛭弧菌的生长特性及其培养条件的优化[J]. *现代食品科技*, 2009, 25(1): 19-23
- [17] 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[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(2): 795-799
- [18] Cai JP, Zhao J, Wang Z, et al. Lysis of vibrios by *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALOs) isolated from marine environment[J]. *Journal of Food Safety*, 2008, 28(2): 220-235
- [19] Buchanan RE, Gibbons NE. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*[M]. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984
布坎南 RE, 吉本斯 NE. *伯杰细菌鉴定手册*[M]. 8版. 北京: 科学出版社, 1984
- [20] Qin SJ. The application of *Bdellovibrio bacteriovorus* and its microbial ecological agents in aquaculture of aquatic animals[J]. *Fisheries Science and Technology Information*, 2007, 34(1): 29-32 (in Chinese)
秦生巨. 噬菌蛭弧菌及其微生物生态制剂在水生动物养殖上的应用[J]. *水产科技情报*, 2007, 34(1): 29-32
- [21] Iebba V, Santangelo F, Totino V, et al. Higher prevalence and abundance of *Bdellovibrio bacteriovorus* in the human gut of healthy subjects[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61608
- [22] Loozen G, Boon N, Pauwels M, et al. Effect of *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 on multispecies oral communities[J]. *Anaerobe*, 2015, 35: 45-53