

蛭弧菌 Bdh5221株理化特性和 16S rDNA 序列分析

梁思成^{1,2} 房文红¹ 汪开毓¹ 贾 娴^{1,2}

(1. 四川农业大学动物医学院, 雅安 625014; 2. 中国水产科学研究院东海水产研究所,
农业部海洋与河口渔业重点开放实验室, 上海 200090.)

摘要: 蛭弧菌海水菌株 Bdh5221 于 2005 年 8 月从海南琼海对虾养殖场周边排水沟水样中分离所得, 具有裂解多数革兰氏阴性菌的特性。在前期 Bdh5221 噬菌谱研究的基础上, 利用其可利用热致死革兰氏阴性菌的生长特性, 对其理化特性、药敏特性和 16S rDNA 序列分析进行了相关研究。结果表明: 该株蛭弧菌为革兰氏阴性菌, 呈杆状、弧状, 一端有极长的极生鞭毛, 细菌大小在 $(0.2-0.5) \mu\text{m} \times (0.6-1.5) \mu\text{m}$ 左右; 生化实验表明: Bdh5221 明胶穿刺试验和接触酶试验呈阳性, 氧化酶反应呈阴性, 对弧菌抑制剂 O/129 敏感; 药敏实验表明: 此菌对新霉素、卡那霉素、恩诺沙星敏感, 对青霉素、磺胺嘧啶和万古霉素不敏感; 对其 16S rDNA 序列的测定、分析表明, 与其同源性最高的细菌是一株新发现的海洋新种细菌 *Korlinomonas guangyungensis*, 同源性高达 99%, 而与其他蛭弧菌属细菌的同源性从 90% 到 70% 不等, 并针对其基因序列做了相关进化分析。

关键词: 蛭弧菌 Bdh5221; 理化特性; 药敏试验; 16S rDNA; 系统发育

中图分类号: S917.1; Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2009)05-0911-06

噬菌蛭弧菌 (*Bdellovibrio bacteriovorus*) 是一类微小的、有运动性的革兰氏阴性菌, 自 1962 年被 Stope 和 Peztold 发现以来^[1,2], 在海洋、湖泊、植物根系、污水中都先后分离到蛭弧菌^[3-5]。蛭弧菌能够捕食大多数革兰氏阴性细菌以抑制该类细菌的过度生长、维持微生态平衡^[4]。许多研究表明^[5-7], 蛭弧菌是环境水体自然净化极为重要的生物因子之一。

虽然这类细菌自发现以来已有 40 余年^[8], 但由于其生长时需要宿主菌的存在, 因此极大地限制了对它的研究。目前这类细菌的大多数生化指标和分子生物学的特征来源于其突变的菌株即非宿主依赖型蛭弧菌, 并依据 G+C 含量、DNA 相似性噬菌谱的不同将蛭弧菌分为 *B. Bacteriovorus*, *B. stolpii* 和 *B. starri*。然而, 因受宿主菌 DNA 的干扰, 研究宿主依赖型蛭弧菌的 16S rDNA 相对复杂。Jurkevitch *et al.*^[3] 首次采用分子生物学技术分析了环境中的宿主依赖型蛭弧菌, 通过 16S rDNA 特殊引物, 研究了土壤和植物根系的蛭弧菌特性。Baer *et al.*^[9] 通过 16S rDNA 序列分析和 DNA-DNA 杂交试验, 建议将

已知的三种蛭弧菌分为两个属, 即 *Bdellovibrio* 和 *Bacteriovorax*。Snyder *et al.* 提出了蛭弧菌样生物 (*Bdellovibrio*-and-like organisms BALO) 的概念, 并对全球 17 株 BALO 淡水菌株和 9 株海水菌株的 16S rRNA 序列进行了进化分析。虽然至今发现的 BALO 菌株很多, 但只有 *Bdellovibrio bacteriovorus*, *Bacteriovorax stolpii* 和 *Bacteriovorax starri* 三株被 Baer *et al.*^[9] 和 Seidler^[10] 所确认。

目前使用全基因蛭弧菌来鉴定和划分蛭弧菌还很困难, 至今只有一个涉及蛭弧菌对宿主菌攻击的基因位点被 Cotter 和 Tomashov^[11] 鉴定, 这个基因的改变和蛭弧菌的突变有关, 可使其变成非宿主依赖的腐物寄生性细菌。所以鉴定和分析 BALOs 多采用 GenBank 中有限的 16S rDNA 数据作系统进化树分析。

国内对蛭弧菌的研究着重于形态, 对细菌裂解特性和对细菌净化等方面尚未见蛭弧菌 16S rDNA 的报道。本文研究了从海水中分离得到的 Bdh5221 菌株的生长特性、理化特性和药敏特性, 通过对蛭弧菌和宿主菌 16S rDNA 的克隆、转化和对质粒的鉴

收稿日期: 2008-09-01; 修订日期: 2009-05-29

基金项目: 农业部动物检验检疫与防治项目 (2130108) 资助

作者简介: 梁思成 (1982-), 男, 汉族, 四川眉山人; 硕士研究生; 主要从事动物微生物和药理学研究。E-mail: quickjnh@yahoo.com.cn

通讯作者: 汪开毓, Tel: 86-835-2885910 Fax: 86-835-2886080; E-mail: kywang@sicau.edu.cn

定,筛选出蛭弧菌的 16S rDNA, 基因测序后进行进化分析。

1 材料与方法

1.1 实验菌株 蛭弧菌海水菌株 Bdh5221 为本实验室 2005 年 8 月从海南琼海对虾养殖场周边排水沟水样中分离所得; 施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*) 由中国科学院北京微生物研究所提供, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 为本实验室保存菌株。

1.2 主要试剂和仪器 PGEM-T 克隆载体、T4DNA 连接酶、限制性内切酶 (*Sau*3A I)、*Taq* 酶和 dNTP 购自 Takara 公司; DNA marker 购自上海生工生物工程技术服务有限公司; 弧菌抑制剂 O/129 药敏纸片 (规格分别为 10 μ g/片 和 150 μ g/片), 上海市疾病预防控制中心提供; 药敏纸片购自杭州微生物试剂公司。PCR 基因扩增仪, Mastercycler Gradient Eppendorf 公司; 自动凝胶成像系统, FR-98Q 复日科技公司; 透射电子显微镜, Hitachi-7650 光学显微镜, BX51, Olympus 公司。

1.3 培养基及宿主菌悬液制备 宿主培养基, 双层琼脂培养基及宿主菌悬液制备的制作参照先前报道的方法进行^[16]; 明胶培养基按参考文献的方法制作^[13]。

1.4 生长特性观察 分别采用 70℃ 30min 灭活、115℃ 15min 灭活和未经热处理的施氏假单胞菌作为宿主菌, 制作上层培养基, 接种蛭弧菌, 于 30℃ 培养 8d 连续观察蛭弧菌的生长和出斑情况。

1.5 形态观察 分别用革兰氏染色和鞭毛染色, 用普通光学显微镜观察。取 4mL 无菌海水加在长满蛭弧菌的平板上, 浸泡 6h 后, 取菌液滴在铜网上, 磷钨酸负染后, 在透射电子显微镜下观察。

1.6 生理生化指标的鉴定 明胶液化试验: 以施氏假单胞菌培养的蛭弧菌 Bdh5221 菌液穿刺明胶作为实验组, 同时以未经热处理的施氏假单胞菌穿刺明胶作为阴性对照, 以嗜水单胞菌为阳性对照, 放置 28℃ 培养箱内观察 5—10d。过氧化氢酶试验: 取浓度为 10^{12} cfu/mL 经 70℃ 30min 灭活的大肠杆菌 (经平板涂布确认无活菌) 制备双层培养基的上层, 接种蛭弧菌, 培养至噬菌斑布满整个平板。取毛细管吸入 3% H_2O_2 后, 插到平板上, 观察是否有气泡产生, 同时以灭活的大肠杆菌作为阴性对照。氧化酶试验: 取浓度为 10^{12} cfu/mL 经 70℃ 30min 灭活的大肠杆菌 (经平板涂布确认无活菌) 制备双

层培养基的上层, 接种蛭弧菌, 培养至噬菌斑布满整个平板。吸取一滴反应液 (10g/L 盐酸四甲基对苯二胺水溶液) 到平板上, 观察平板 1min 内是否变紫, 同时以灭活的大肠杆菌作为阴性对照。弧菌抑制剂 O/129 敏感性试验: 以施氏假单胞菌为宿主菌, 接种蛭弧菌, 在平板中央放置弧菌抑制剂 O/129 药敏纸片, 于 30℃ 培养箱中培养 2—3d 观察该药敏纸片对蛭弧菌抑制情况, 同时测量抑菌圈直径。

1.7 药敏实验 用 70℃ 灭活 30min 的施氏假单胞菌涂布平板, 确认无活菌并冷却以接种蛭弧菌。将不同的药敏纸片贴于双层平板上层, 培养 2—3d 后观察该药敏纸片对蛭弧菌抑制情况, 同时测量抑菌圈直径。

1.8 细菌 16S rRNA 测定

1.8.1 样品及其基因组的制备 在培养 2—3d 的双层平板中挑取一个空斑到 50mL 的含有 10^9 cfu/mL 施氏假单胞菌的海水培养基中 30℃ 培养箱中培养 2—3 天, 将培养液 1500 r/min 离心 15min, 离心三次后 12000 r/min 离心 30min, 用 1mL PBS 悬浮细胞后, 按照分子克隆实验指南^[12] 相关方法提取样品 DNA, -20℃ 保存备用。

1.8.2 细菌 PCR 的扩增 以 1.8.1 提取的总 DNA 为模板, 通用引物设计参照 Marcic *et al.*^[9], 其上、下游引物的序列分别为: 5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3' 和 5'-GGTTACCTGTGTTACGACTT-3'。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5min, 94℃ 1min, 52℃ 1min, 72℃ 1min, 共 36 个循环, 最后 72℃ 延伸 7min。所获 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳后使用 1% 琼脂糖凝胶回收。

1.8.3 克隆、转化及质粒的鉴定 按文献 [12] 的报道方法将 PCR 产物与 PGEM-T 连接后, 4℃ 冰箱保存过夜。用细菌通用引物扩增感受态大肠杆菌 *E. coli* Top10 菌液, 扩增产物用 *Sau*3A I 限制性内切酶酶切, 电泳后, 与宿主菌施氏假单胞菌扩增产物酶切电泳图谱比对, 筛选蛭弧菌的 16S rDNA。

1.8.4 克隆基因序列测定 酶切筛选后的阳性细菌委托上海生工生物公司测序。将该目的片段的基因序列与已经发表的蛭弧菌株进行序列比较后, 向 GenBank 提交其基因序列, 获得序列登录号。

1.9 序列分析及系统发育树的构建 将所得到的 Bdh5221 菌株 16S rDNA 序列在 GenBank 数据库中 Blast 分析, 获得相似性 $\geq 90\%$ 的已知种名细菌的 16S rDNA 和蛭弧菌属细菌的 16S rDNA 序列, 利用

C l u s t a K (1 . 8 3) 软件进行比对, 通过 M e g a 3 . 1 软件选用 K i n u r a 2 p a r a m e t e r 距离模型, 采用邻接法 (N e i g h b o u r j o i n i n g m e t h o d) 构建系统树, 通过自举分析 (B o o t s t r a p) 进行置信度检测, 自举数据集为 10000 次。

2 结 果

2.1 蛭弧菌 Bdh5221 生长特性

采用 70℃ 30m i n 灭活的和未经热处理的施氏假单胞菌作为宿主菌, 在蛭弧菌 Bdh5221 接种后 72h 左右出现噬菌斑; 随着时间的延长, 噬菌斑分别在第 6 天和第 5 天融合并布满整个平板。而经 115℃ 15m i n 灭活处理的施氏假单胞菌, 在 8d 内都没有噬菌斑出现。

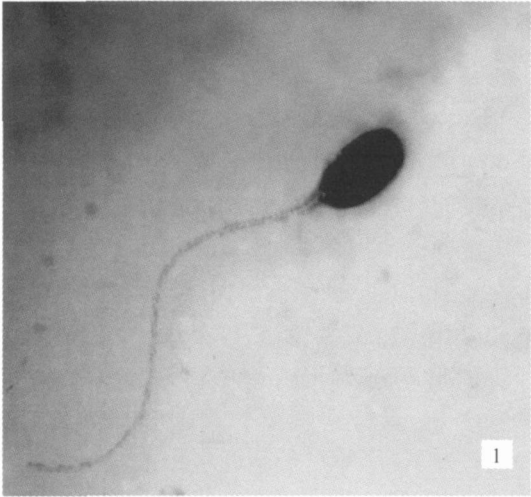


图 1 蛭弧菌 Bdh5221 的透射电镜负染照片 (19000 ×)
Fig. 1 The electron micrograph of strain *Bdellovibrio* sp. Bdh5221 (19000 ×)

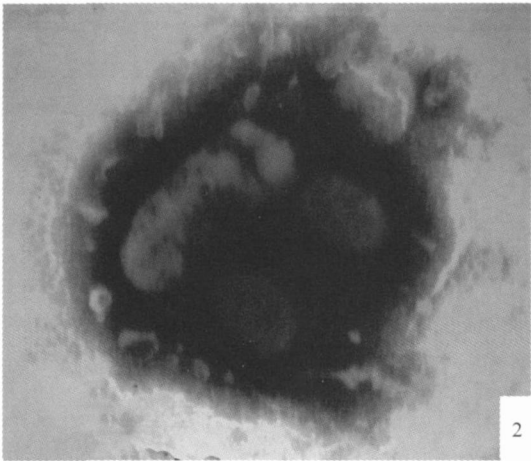


图 2 蛭弧菌 Bdh5221 对宿主菌施氏假单胞菌的吸附 (29000 ×)
Fig. 2 The *Bdellovibrio* sp. Bdh5221 sticking to the host bacterium (29000 ×)

2.2 形态观察

光镜下蛭弧菌 Bdh5221 为短小细菌, 大小在 (0 . 2 — 0 . 5) μ m × (0 . 6 — 1 . 5) μ m 左右。电镜下蛭弧菌呈杆状、弧状, 一端有极长的极生鞭毛, 鞭毛长是菌体长度的 10—13 倍 (图 1), 同时还可以看见蛭弧菌吸附宿主菌 (图 2) 和在宿主菌菌体内由丝状体裂解为单个蛭弧菌的现象 (图 3)。

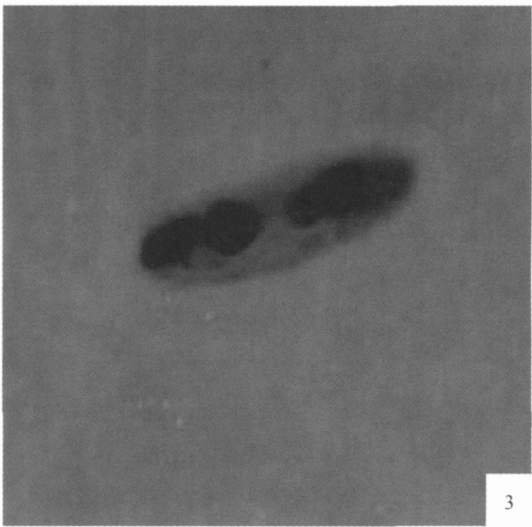


图 3 蛭弧菌 Bdh5221 在宿主菌施氏假单胞菌内的增殖 (29000 ×)
Fig. 3 Multiplication of *Bdellovibrio* sp. Bdh5221 in the cytoplasm of the host bacterium (29000 ×)

2.3 生理生化特征与药敏实验

生理生化实验表明, 蛭弧菌 Bdh5221 明胶穿刺试验和接触酶试验呈阳性, 氧化酶反应呈阴性, 对 10 μ g 和 150 μ g 的弧菌抑制剂 O / 129 均敏感。药敏实验表明, 蛭弧菌 Bdh221 对新霉素、卡那霉素和恩诺沙星敏感; 对青霉素、庆大霉素、磺胺嘧啶和万古霉素不敏感 (表 1)。

表 1 蛭弧菌 Bdh221 药敏实验结果			
Tab. 1 Drug sensitive test of Bdh5221			
Drug	Dose (μ g / d i s c)	D i a m e t e r o f a n t i b a c t e r i a l c i r c l e (m m)	S e n s i t i v i t y
O / 129	10	23	H
O / 129	150	48	H
N e o m y c i n	15	23	H
B i o g r a n c e t i n	15	26	H
E n r o f l o x a c i n	15	29	H
P e n i c i l l i n	15	9	R
S u l f a d i a z i n e	15	8	R
V a n c o c i n	15	12	M

Note H. High sensitive M. Medium sensitive R. Resistant Drug sensitivity test through disk diffusion method

2.4 16S rDNA 基因序列和系统发育的分析

图 4 为施氏假单胞菌和蛭弧菌 Bdh5221 的 16S rDNA 经质粒转化后的 PCR 扩增产物及其酶切后的

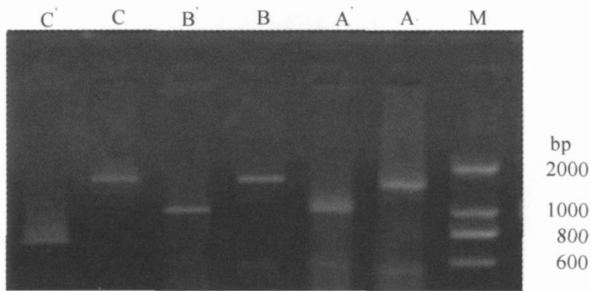


图 4 16S rDNA 扩增产物及其质粒转化后酶切产物的电泳图谱
Fig. 4 The electrophoresis of 16S rDNA PCR amplification of strain and clone

A: 通用引物扩增出纯宿主菌施氏假单胞菌 16S rDNA 的条带; A': 使用 *Sau*3AI 限制性内切酶酶切 A 产物的电泳条带; B: 质粒转化后大肠杆菌 (iv) 采用通用引物扩增的电泳条带; B': 使用 *Sau*3AI 限制性内切酶酶切 B 产物的电泳条带; C: 质粒转化后大肠杆菌 (⊕) 采用通用引物扩增的电泳条带; C': 使用 *Sau*3AI 限制性内切酶酶切 C 产物的电泳条带

A, B, C: PCR amplification A', B', C': The product of restriction endonuclease M: DNA Marker

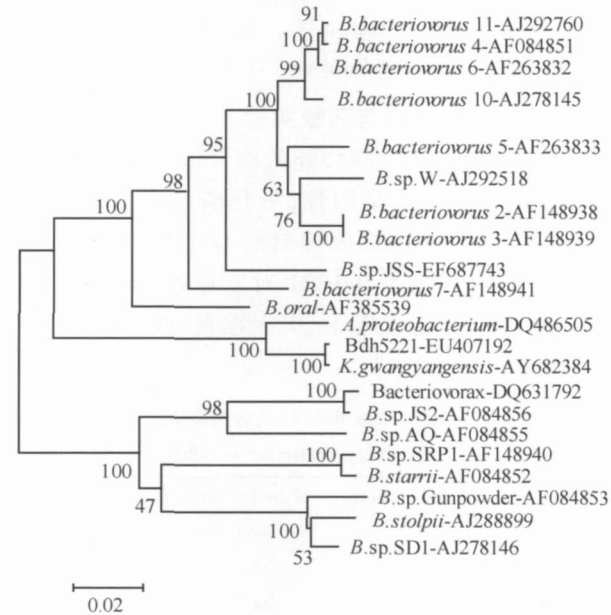


图 5 Bdh5221 与相关菌株的系统发育树
Fig. 5 Neighbour-joining tree of strain Bdh5221 and its relatives
The tree was constructed by Mega3.1 based on 16S rDNA sequence of strain Bdh5221 and its relatives in Bdellovibrio genus and Bacteriovorax genus. Numbers behind the bacterium name represent the sequences' accession number in GenBank. Numbers at branch-points represent confidence values obtained after bootstrap analysis of the neighbour-joining tree using 10000 replicates

电泳图。B 和 A 一样, 在 1500 bp 左右有一明显的条带。B' 和 C' 分别为 B 和 C 的 16S rDNA 扩增产物酶切电泳图。B' 和 A' 在 1000 bp 左右有一酶切条带, 而 C' 的酶切条带在 600—800 bp 之间, 这说明 C 是挑选出的与宿主菌酶切产物不同的克隆菌株, 即目标菌株 Bdh5221。PCR 扩增出 Bdh5221 菌株的 16S rDNA 片段约 1500 bp (图 4 C), 测序结果表明该片段有 1350 bp 在 Genbank 中登录序号为 EU 407192。将获得的序列与 Genbank 中已报道的 16S rDNA 序列进行比对, 并建系统发育树 (图 5), 发现该菌与一株新发现的海洋新种细菌 *Kondimonas gwangyangensis* 位于同一分支。通过该菌的 16S rDNA 基因序列的同源性分析发现其与 *Kondimonas gwangyangensis* 同源性高达 99%, 与其他蛭弧菌属的细菌同源性从 70%—90% 之间。

3 讨论

3.1 该细菌的培养特性观察

该细菌在 30℃ 培养条件下第 2 天或第 3 天形成噬菌斑, 并且其形成的噬菌斑随着时间的延长出现噬菌斑融合的现象。结合相差显微镜观察, 证明不是黏液菌、原虫、真菌和噬菌体形成的噬菌斑。配合电镜照片, 该菌的形态和大小与李楠、曹海鹏等^[13-14]的报道大致一致, 呈杆状, 弧状, 一端有极长的极生鞭毛。另外在电镜下, 观察到该菌在吸附宿主时没有鞭毛, 这与蛭弧菌在吸附和穿入阶段脱掉鞭毛的报道一致^[15]。根据谢群英等^[16]的报道, 该菌除能裂解包括嗜水气单胞菌、副溶血弧菌、鳃弧菌、溶藻弧菌、哈维氏弧菌、大肠杆菌、荧光假单胞菌和迟钝爱德华氏菌等菌在内的革兰氏阴性菌外, 还能在超声波破碎的革兰氏阳性菌中生长。盐度 25‰ 温度 30℃、pH 7.0—7.5 为其最佳生长条件。据该菌的理化特性和寄生属性, 参照伯杰氏手册第九版的描述, 基本判定该菌为蛭弧菌属细菌。

3.2 生长特性的思考

蛭弧菌能生长在 70℃ 30 min 灭活的宿主菌双层琼脂培养基上, 却不能生长在 115℃ 15 min 高压灭活的宿主菌双层琼脂培养基上。根据 Hespell^[17]报道, 对宿主轻微的热处理不影响蛭弧菌生长。而李楠^[13]和宋志萍^[18]等分别用灭活的宿主菌培养其各自分离到的蛭弧菌, 前者的可以生长但后者的却不能, 这说明不同蛭弧菌对宿主生理状态的要求可能是不同的。通过光镜观察, 宿主菌 70℃ 30 min 灭活的宿主菌细胞膜完好, 而 115℃ 15 min 高压灭活的宿

主菌则细胞结构不完整,只剩下一些大小不等的细胞碎片。这有可能与蛭弧菌生活周期有关,当宿主细胞结构不完整时,则不能完成在宿主细胞内的丝状延伸,使得蛭弧菌不能生长。另外蛭弧菌能否在灭活的宿主上生长是否与蛭弧菌嗜菌性有关的 *hit* 基因位点的改变有关,或者是否存有其他原因尚待研究。

3.3 生理生化特征和药敏结果的探讨

由于许多蛭弧菌不能离开宿主而单独培养,所以大多数生理生化指标都来源于非宿主依赖的蛭弧菌。据 Seidler 和 Starr *et al.* 的报道^[19],宿主依赖的蛭弧菌和其突变菌株(非宿主依赖的蛭弧菌)的生理生化特征应该是相同的,变异的基因不涉及它的基本代谢,只和其攻击宿主菌的能力有关。因此,本研究利用该株蛭弧菌能生长在 70℃ 30min 灭活的宿主菌双层琼脂培养基上,对其生理生化特性进行分析。该菌的 O/129 敏感性和过氧化氢酶特性与先前报道的蛭弧菌相关特性相一致^[19]。李楠等利用其分离的蛭弧菌在高压灭菌的宿主上生长的特点也做了蛭弧菌生理生化相关研究,其结果与本实验的部分结果有所不同,说明仅使用有限的生理生化特性对相关蛭弧菌进行鉴定的可能性不大。此外,本研究及先前的研究均表明^[20],蛭弧菌类微生物生态制剂在使用中应考虑抗生素药物对其的影响,以提高其在养殖生产中的“药效”。

3.4 16S rDNA 基因与蛭弧菌属的差异的相关思考

除代谢变异的菌株外,多数蛭弧菌难以与宿主菌完全分离。由于宿主菌的干扰,获得蛭弧菌 16S rDNA 基因十分困难。目前报道获取蛭弧菌 16S rDNA 基因的方法主要有 3 种: 1) 通过细菌通用引物扩增非宿主依赖的蛭弧菌获得; 2) 利用蛭弧菌特异的引物扩增获得; 3) 利用克隆转化的方法获得。本实验与 Davilov Y 和 Jurkevitch E^[21] 采用的方法大致相同,即先扩增出蛭弧菌和宿主菌的 16SrDNA 基因,将其转入大肠杆菌进行分离;将分离的 16SrDNA 基因使用 *Sau*3A I 酶切鉴定,找出和确定蛭弧菌的序列。该株蛭弧菌的 16S rDNA 基因序列与 *Kordii onas gwangyangensis* 细菌的同源性最高。这株细菌是由韩国的 Kwon K K 和 Lee H S^[22] 在 2005 年发现的。前期研究表明, *Kordii onas gwangyangensis* 为革兰氏阴性细菌,能降解多环芳香族碳氢化合物,过氧化氢酶和氧化酶均为阳性;值得关注的是,该菌可利用乙酰葡萄糖胺酶和麦芽糖作为碳源,且该菌没有噬菌性和寄生性,与本株蛭弧菌的相关特

性(氧化酶阴性、具有噬菌性、不利用其他碳源的特性以及在形态特征)有很大的差异,因此,这两株细菌不是同属细菌。而两株细菌的 16S rDNA 序列如此接近,说明其株细菌的进化祖先存在交叉导致谱系共享问题。此外,蛭弧菌属本身存在的种间差异大以及 GenBank 中亚洲海域内蛭弧菌属细菌相关序列资料的匮乏也是导致该现象的原因。目前蛭弧菌的分类标准存在争议,该菌株与其他蛭弧菌类细菌的 16S rDNA 同源性较低,但其是否是蛭弧菌类细菌的一株新种细菌还需要结合其他较 16S rDNA 进化快的基因(如 23S rDNA)等方法加以验证。

参考文献:

- [1] Stolp H, Petzold H. Untersuchungen über einen obligat parasitischen mikroorganismus mit tydlicher aktivität für Pseudomonas-bakterien [J]. *Phytopathology*, 1962, **45**: 364—390
- [2] Stolp H, Starr M P. Bdellovibrio bacteriovorus gen. et sp. n., a predatory ectoparasitic and bacteriolytic microorganism [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1963, **29**: 217—248
- [3] 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]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 2365—2371
- [4] Varon M, Shib M. In *Advances in Aquatic Microbiology* [M]. New York: Academic Press, 1980, **2**: 1—48
- [5] Williams H N, Scheffield A J, Guether D, *et al.* Recovery of bdellovibrios from submerged surfaces and other aquatic habitats [J]. *Microbial Ecology*, 1995, **29** (1): 39—48
- [6] Lambin A W, Lebow A A, Tschurk A L G. Importance of Bdellovibrio in regulating microbial cenoses and self-purification processes in domestic sewage [J]. *Mikrobiologia*, 1987, **56**: 860—864
- [7] Schwudke D, Strauch E. Taxonomic Studies of Predatory Bdellovibrios Based on 16S rRNA Analysis, Ribotyping and the *hit* Locus and Characterization of Isolates from the Gut of Animals [J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2001, **24** (3): 385—394
- [8] Stolp H, Starr M P. Bdellovibrio bacteriovorus gen. et sp. n., a predatory, ectoparasitic, and bacteriolytic microorganism [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1963, **29**: 217—248
- [9] Baer M L, Ravel J, Chun J *et al.* 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 [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, **50**: 219—224
- [10] Seidler R J, Mandel M, Baptist J N. Molecular heterogeneity of Bdellovibrios: Evidence of two new species [J]. *Journal Bacteriology*, 1972, **109** (1): 207—217
- [11] Cotter T W, Thomashow M F. Identification of a Bdellovibrio bacteriovorus genetic locus *hit* associated with the host-inde-

- pendent phenotype [J]. *Journal Bacteriology*, 174 (19): 6018—6024
- [12] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. Science Press, 2002, 96—98 [萨姆布鲁克, 拉塞尔. 分子克隆实验指南. 科学出版社, 2002, 96—98]
- [13] Li N, Ni X Q. Isolation of *Bdellovibrio* from Broiler and Its Therapeutic Test to *Salmonella typhimurium* Disease [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2007, 43 (1): 17—20 [李楠, 倪学勤. 鸡源蛭弧菌的分离及其对鼠伤寒沙门氏菌病的治疗作用. 中国兽医杂志, 2007, 43 (1): 17—20]
- [14] Cao H P, Yang X L. Isolation of *Bdellovibrio* Bacteria from the Gut of *Carassius auratus gibelio* and the Study of its Biological Characteristics [J]. *Microbiology*, 2007, 34 (1): 52—56 [曹海鹏, 杨先乐. 异育银鲫肠道蛭弧菌的分离及其生物学特性的研究. 微生物学通报, 2007, 34 (1): 52—56]
- [15] Lambert C, Morehouse K A, Chang C Y, et al. *Bdellovibrio* growth and development during the predatory cycle [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2006, 9: 639—644
- [16] Xie Q Y, Fang W H, Qiao Z G, et al. A Study on the lysis characters and influencing factors for growth of *Bdellovibrio* sp. Bdh5221 isolated from seawater [J]. *Marine Fisheries*, 2007, 29 (2): 97—102 [谢群英, 房文红, 乔振国, 等. 蛭弧菌海水菌株 Bdh5221 裂解特性及生长影响因子研究. 海洋渔业, 2007, 29 (2): 97—102]
- [17] Intraperiplasmic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* on heat-treated *Escherichia coli* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1978, 133 (3): 1156—1162
- [18] Song J P, Cai J P. Study of bacteria-lysis abilities and growth conditions of 4 *Bdellovibrio* [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45 (4): 571—575 [宋志萍, 蔡俊鹏. 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, 2005, 45 (4): 571—575]
- [19] Seidler R J, Starr M P. Isolation and Characterization of Host-Independent *Bdellovibrios* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1969, 100 (2): 769—785
- [20] Li G Q, Zhang Y L, Xu B H. The ability of *Bdellovibrio* in the lysis of *Vibrio fluvialis* under various condition [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1998, 22 (3): 266—271 [李戈强, 章勇良, 徐伯亥. 不同条件下蛭弧菌裂解河流弧菌的研究. 水生生物学报, 1998, 22 (3): 266—271]
- [21] 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. [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54: 1439—1452
- [22] Kwon K K, Lee H S. *Kordiimonas gwangyangensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic bacterium isolated from marine sediments that forms a distinct phylogenetic lineage (*Kordiimonadales* ord. nov.) in the 'Alphaproteobacteria' [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55: 2033—2037

THE PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS AND 16S rDNA SEQUENCE ANALYSIS OF *BDELLOVIBRIO* SP. Bdh5221

LIANG Si-Cheng^{1,2}, FANG Wen-Hong¹, WANG Kai-Yu¹ and JIA Xian^{1,2}

(1. The College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014 China; 2. Chinese Academy of Fish & Sciences Key and Open Laboratory of Marine and Estuarine Fisheries, East China Sea Fisheries Research Institute, Ministry of Agriculture Shanghai 200090 China)

Abstract A bacterium which isolated from prawn nursery wastewater in Qionghai Hainan Province in August 2005, was maintained by our laboratory and named Bdh5221. According to previous study, Bdh5221 could prey most Gram-negative bacterium and can also be cultivated by using heat-killed Gram-negative bacterium. In the present study, morphological, physiological characteristics, drug sensitivity and 16S rDNA sequence of Bdh5221 were analyzed. The morphological studies showed that the strain Bdh5221 were Gram-negative, motile and had a bacilliform or bacilliform shape with flagellum at one side, which size was mostly (0.2—0.5) μm $\times$ (0.6—1.5) μm . The physiological characteristics showed that this bacterium were catalase-positive, oxidase-negative, gelatin colligation-positive and sensitive to the vibriostatic agent O/129. Drug sensitive results indicated that this bacterium were enrofloxacin-positive, neomycin-positive, biogran-cetin-positive, penicillin-negative, Sulfadiazine-negative and vancocin-negative. 16S rDNA gene of *Bdellovibrio* sp. Bdh5221 was 99% similar with a novel marine bacterium *Kordiimonas gwangyangensis*. The similarity with all recognized *Bdellovibrio*- and-like organisms was from 90% to 70%. It indicated that the bacterium might be a novel *Bdellovibrio*- and-like organism.

Key words *Bdellovibrio* sp. Bdh5221; Physiological characteristics; Drug sensitive test; 16S rDNA gene; Phylogenetic tree