

异育银鲫肠道噬菌蛭弧菌 BDF-H16 的分离及其对嗜 水气单胞菌的裂解活性

曹海鹏 杨先乐

(上海海洋大学, 农业部渔业动植物病原库, 上海 201306)

ISOLATION OF *BDELLOVIBRIO BACTERIOVORUS* BDF-H16 FROM THE GUT OF *CARASSIUS AURATUS GIBELIO* AND THE STUDY OF ITS LYSIS ACTIVITY ON *AEROMONAS HYDROPHILA*

CAO Hai-Peng and YANG Xian-Le

(Aquatic Pathogen Collection Center of Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

关键词: 噬菌蛭弧菌; 分离; 嗜水气单胞菌; 裂解活性

Key words *Bdellovibrio bacteriovorus*; Isolation; *Aeromonas hydrophila*; Lysis activity

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2009)05-0970-05

噬菌蛭弧菌 (*Bdellovibrio bacteriovorus*) 是一种通过裂解其他细菌进行生长繁殖的寄生性细菌, 是自然环境中病原菌滋生的天然生物控制因子, 誉有“活性抗生素”的美称。它在自然界中分布广泛, 在各种水体、土壤^[1]中均可分离到, 但从国内外文献资料来看, 从鱼肠道中检测出噬菌蛭弧菌的报道尚未见到。本研究采用对水产养殖危害大的温和气单胞菌作为筛选宿主菌, 从异育银鲫肠道中分离到一株具有噬菌特性的细菌 BDF-H16 通过对其噬菌斑和细菌形态观察、寄生性以及对噬菌范围的研究, 证实菌株 BDF-H16 为噬菌蛭弧菌; 并进一步研究了噬菌蛭弧菌 BDF-H16 在不同条件 (pH、温度、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}) 下对嗜水气单胞菌的裂解活性, 以期丰富噬菌蛭弧菌的生态分布特性, 为噬菌蛭弧菌的培养和合理应用到水产病害防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 宿主菌株 本实验所采用的细菌菌株均由农业部渔业动植物病原库提供。

1.2 实验动物 异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*), 平均体长为 5 cm, 平均体重为 10 g 由江苏省兴化市某养殖场提供, 在实验室暂养 1 个月。

1.3 稀释液与培养基 普通营养琼脂培养基, 普通营养肉汤 (NB) (pH 7.2), 10 倍稀释的普通营养肉汤 (1/10NB) (pH 7.2), 生理盐水 (0.85%), 均在 1×10^5 Pa 高压湿热灭菌 20 min 后备用。

自来水双层琼脂培养基, 底层琼脂浓度为 1.5%, 上层琼脂浓度为 0.6%。

1.4 噬菌蛭弧菌的分离、纯化与鉴定

1.4.1 检样处理 取健康异育银鲫 15 尾, 平均分为 3 组, 在无菌条件下, 用酒精棉仔细擦洗鱼体体表, 分别取其肠匀浆, 用无菌生理盐水制成悬液, 上清再通过 1.2 μ m 的滤膜, 滤液于 4℃ 冰箱保存备用。

1.4.2 宿主菌悬液的制备 将各宿主菌株接种于 NB 中, 于 30℃、150 r/min 摇床振荡培养 24 h, 然后将培养物于 4℃、4000 r/min 离心 20 min, 用无菌生理盐水洗涤 2 次后, 用无菌生理盐水将各宿主菌悬液浓度调节为 8.0×10^{11} cfu/mL, 于 4℃ 冰箱保存备用。

1.4.3 噬菌蛭弧菌的分离与纯化 以温和气单胞菌作为筛选宿主菌, 采用自来水双层琼脂平板法^[2]进行分离, 观察噬菌斑产生情况。若有噬菌斑产生, 挖取单个噬菌斑经过 4 次

收稿日期: 2007-11-12; 修订日期: 2009-01-02

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金; 上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项 (B-8101-08-0017); 农业部水产种质资源与利用重点开放实验室专项 (B-8201-08-0426); 对虾养殖管理信息系统研究与建立 (nyhyzx07-042); 淡水鱼类出血性疾病综合防治技术集成示范 (200803013)

作者简介: 曹海鹏 (1981—), 男, 山东招远人; 助教; 主要从事水产动物病害防治与微生态制剂的开发研究。E-mail: hpc@shou.edu.cn

通讯作者: 杨先乐 (1948—), 男, 湖南桃源人; 教授, 博士生导师; 主要从事水产动物病害防治研究。Tel: 021-61900453 E-mail: xlyang@shou.edu.cn

以上传代培养获得纯菌株。

1.4.4 噬菌蛭弧菌的鉴定 (1)形态观察,即以大肠杆菌为增殖宿主菌,挖取单个噬菌斑于 1/10 NB 中,于 30℃、150 r/min 下摇床振荡扩大培养,并将新鲜培养的菌液进行革兰氏染色,在光学显微镜(油镜)下观察。此外,将新鲜培养的噬菌斑在相差显微镜(油镜)下进行观察,并用载网贴斑法^[3]在电子显微镜下进行观察;(2)寄生性的测定,即将分离菌株的培养液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤后,取滤液接种到热灭活(65℃水浴 48h)的宿主琼脂平板上,28℃ 恒温培养,待长出噬菌斑后,用无菌生理盐水浸泡 4h 后洗涤,取洗涤液 0.1 mL 涂布于普通营养琼脂平板上,然后于 28℃ 恒温培养 144h 观察是否有菌落形成。若无菌落形成,则为专性寄生菌株;若有菌落形成,则挑取该菌落,采用自来水双层琼脂平板法^[2]进一步检测其是否形成噬菌斑,若能形成噬菌斑,则为兼性寄生菌株;(3)噬菌范围测定,即采用自来水双层琼脂平板法^[2],检测分离菌株对 1.1 选用的各宿主菌株(8.0×10^{11} cfu/mL)的裂解活性,记录出斑时间、噬菌斑数目以及噬菌斑大小。

1.5 不同因素对噬菌蛭弧菌裂解嗜水气单胞菌效果的影响

采用自来水双层琼脂平板法^[2],检测噬菌蛭弧菌在不同温度(4、15、20、28、33℃)、pH(5.5—6.0、6.0—6.5、6.5—7.0、7.0—7.5、7.5—8.0、8.0—8.5、8.5—9.0)、 Ca^{2+} (0.05、2.0、5.0、10.0 mmol/L)、 Mg^{2+} (0.05、2.0、5.0、10.0 mmol/L)

等条件下对嗜水气单胞菌裂解活性的影响。

2 结果

2.1 噬菌蛭弧菌的分离、纯化与鉴定

以温和气单胞菌作为筛选宿主菌,用自来水双层琼脂平板法^[2]检测 3 组异育银鲫肠匀浆液后发现,培养 96h 后 3 组检样均产生不同数目的噬菌斑,噬菌斑大小在 1.5—3 mm 不等。根据噬菌斑的形状、大小及透明度,从中挑选出 4 个透明、深且大的噬菌斑进行纯化,纯化 4 代后,初筛得到一株活性较好的纯株,暂命名为 BDF-H16 菌株。BDF-H16 在固体培养 120h 后,在自来水双层琼脂平板上形成的噬菌斑均为圆形、透明、清晰、光滑、边缘整齐(图 1-1,图 1-2),这是噬菌蛭弧菌的典型噬菌斑^[3]。噬菌斑直径一般约为 2 mm,噬菌斑大小随时间的延长而不断增大,噬菌斑直径最大可达 4 mm,并且有噬菌斑融合现象;菌株 BDF-H16 为革兰氏阴性菌,为杆状或弧杆状(图 1-3),菌体大小一般为(0.2—0.5) μm × (0.8—1.2) μm,也有菌体长为 3.2 μm 的较长个体;在相差显微镜下可见菌株 BDF-H16 运动活泼,偶尔可见其吸附宿主菌的现象;在电镜下菌株 BDF-H16 为弧杆状或杆状,端生极长鞭毛(图 1-4),也可见其吸附、侵入宿主的现象(图 1-5,图 1-6)。此外,菌株 BDF-H16 在普通营养琼脂平板上不形成菌落,为专性寄生菌株;而且菌株 BDF-H16 对实验选用的所有革兰氏阴性菌和部分革兰氏阳性菌均有裂解活性,但对实验选用的芽孢杆菌无裂解性。而且菌株

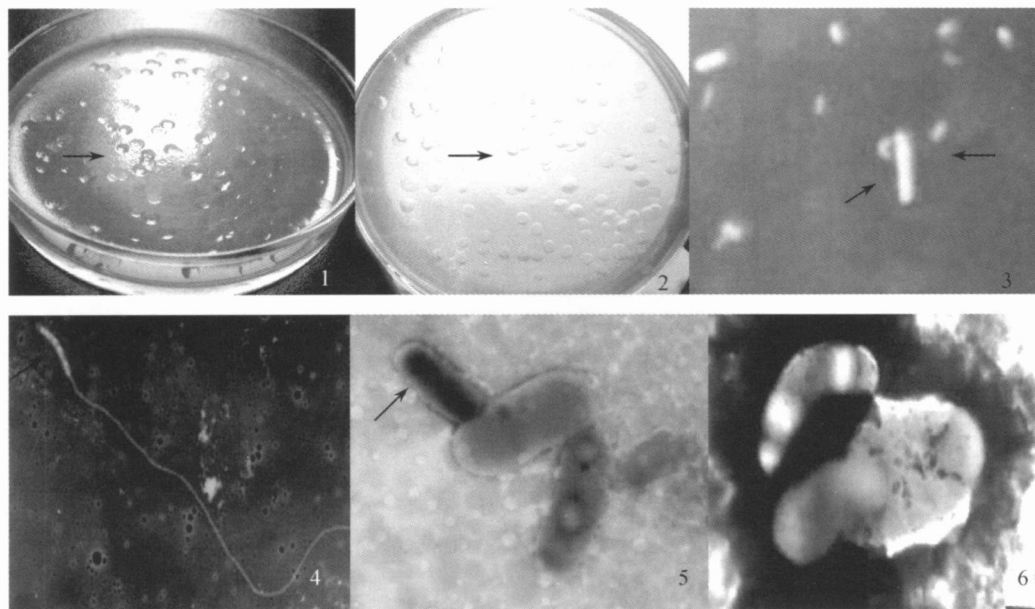


图 1 噬菌蛭弧菌 BDF-H 16 的噬菌斑及其在显微镜和电镜下的形态

Fig. 1 Plaque and morphology of *Bdellovibrio bacteriovorus* BDF-H16

1. 噬菌蛭弧菌 BDF-H 16 培养 120h 形成的噬菌斑; 2. 噬菌蛭弧菌 BDF-H 16 培养 120h 形成的透明噬菌斑; 3. 显微镜(×100)下噬菌蛭弧菌 BDF-H 16 通过 Motic Images Advanced 3.0 放大 10 倍的图像; 4. 电镜下噬菌蛭弧菌 BDF-H 16 的较长个体(×5800); 5. 电镜下吸附宿主菌的噬菌蛭弧菌 BDF-H 16(×14000); 6. 电镜下侵入宿主菌的噬菌蛭弧菌 BDF-H 16(×19000)

1. Plaques of *Bdellovibrio bacteriovorus* BDF-H 16 under 120h culture; 2. transparent plaques of *Bdellovibrio bacteriovorus* BDF-H16 under 120h culture; 3. *Bdellovibrio bacteriovorus* BDF-H16 under microscopy (×100) magnified 10 times by Motic Images Advanced 3.0; 4. A longer strain of *Bdellovibrio bacteriovorus* BDF-H 16(×5,800); 5. *Bdellovibrio bacteriovorus* BDF-H16 attaching to prey bacteria(×14,000); 6. *Bdellovibrio bacteriovorus* BDF-H 16 penetrating prey bacteria(×19,000)

表 1 噬菌蛭弧菌 BDF-H16的宿主范围
Tab. 1 Prey bacteria of *Bdellovibrio bacteriovorus* BDF-H 16

实验菌株 Tested strains			出斑时间	噬斑直径	噬斑数目
属 Genus	种 Species	株数 Strains	Plaque-producing time (h)	Plaque dimension (mm)	Plaque numbers (PFU)
气单胞菌 <i>Aeromonas</i>	温和气单胞菌 <i>A. sobria</i>	1	72	1.5—3.0	48
	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	1	80	2.0—2.5	24
	豚鼠气单胞菌 <i>A. caviae</i>	1	80	2.0—3.0	20
发光杆菌 <i>Photobacterium</i>	美人鱼发光杆菌 <i>P. damselae</i> subsp. <i>damselae</i>	1	80	2.0	15
利斯顿菌 <i>Listonella</i>	鳗利斯顿菌 <i>L. anguillarum</i>	1	72	2.0—3.0	26
希瓦菌 <i>Shewanella</i>	腐败希瓦菌 <i>S. putrefaciens</i>	1	96	2.0—3.0	19
弧菌 <i>Vibrio</i>	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	1	80	2.0—2.5	24
	溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	1	72	2.0—3.0	15
	哈氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	1	96	1.5	9
		1	96	2.0—3.0	27
爱德华氏菌 <i>Edwardsiella</i>	迟钝爱德华氏菌 <i>E. ictaluri</i>	1	96	2.5	31
埃希氏菌 <i>Escherichia</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	1	48	2.0—3.0	98
葡萄球菌 <i>Staphylococcus</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	1	144	3.0	6
微球菌 <i>Micrococcus</i>	藤黄微球菌 <i>M. luteus</i>	1	144	2.0	5
芽孢杆菌 <i>Bacillus</i>	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	1	—	—	0
	蜡状芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	1	—	—	0

注：“—”表示“无”Note “—” means “non-existent”

BDF-H 16对裂解菌株的敏感性不同, 主要表现在出斑时间和噬斑大小、数目有所差异, 其中革兰氏阴性菌对噬菌蛭弧菌 BDF-H16敏感性较革兰氏阳性菌高, 相同实验条件下, 前者出斑时间要比后者早 (表 1)。以上实验结果表明, 菌株 BDF-H 16为噬菌蛭弧菌 (*Bdellovibrio bacteriovorus*)。

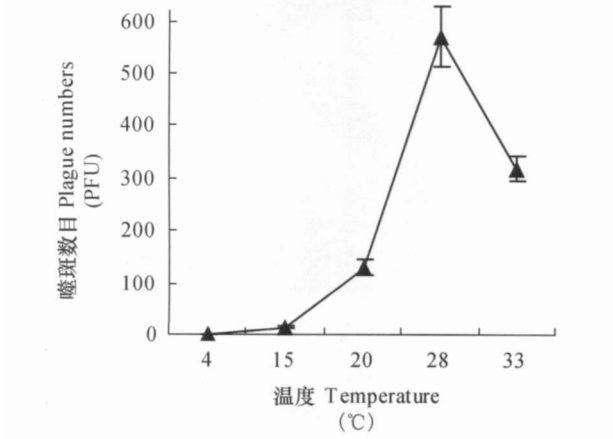


图 2 不同温度下噬菌蛭弧菌 BDF-H 16对嗜水气单胞菌的裂解活性

2.2 温度对噬菌蛭弧菌裂解嗜水气单胞菌活性的影响
实验结果 (图 2) 表明, 噬菌蛭弧菌 BDF-H 16 在温度 15—33℃ 条件下对嗜水气单胞菌均具有裂解活性。其中噬菌蛭弧菌 BDF-H 16 在 28℃ 时对嗜水气单胞菌的裂解活性最高, 但 4℃ 条件下没有噬菌斑产生, 说明低温条件下噬菌蛭弧菌 BDF-H 16 的裂解活性低, 不利于噬菌蛭弧菌 BDF-H 16 对嗜水气单胞菌的裂解。

2.3 pH 对噬菌蛭弧菌裂解嗜水气单胞菌活性的影响
实验结果 (图 3) 表明, 噬菌蛭弧菌 BDF-H 16 在 pH 5.5—9.0 条件下对嗜水气单胞菌均具有裂解活性。其中噬菌蛭弧菌 BDF-H 16 在 pH 7.0—7.5 范围内对嗜水气单胞菌的裂解活性最高, 出斑数目高达 165PFU, 而在 pH 5.5—6.5 和 8.5—9.0 时, 噬菌蛭弧菌 BDF-H 16 对嗜水气单胞菌的裂解活性相对较低, 出斑数目仅为 pH 7.0—7.5 条件下的 23.0%—45.3% ($P < 0.05$)。

2.4 Ca^{2+} 浓度对噬菌蛭弧菌裂解嗜水气单胞菌活性的影响
实验结果 (图 4) 表明, 噬菌蛭弧菌 BDF-H 16 在 Ca^{2+} 浓度 $\leq 5.0\text{ mmol/L}$ 条件时, 对裂解嗜水气单胞菌具有一定的促进作用。其中 Ca^{2+} 浓度为 0.5 mmol/L 时, 噬菌蛭弧菌 BDF-H 16 对嗜水气单胞菌的裂解活性最高, 相同条件下产

Fig. 2 Lysis activity of *Bdellovibrio bacteriovorus* BDF-H16 on *A. hydrophila* at different temperatures

斑数目较 Ca^{2+} 浓度为 0 mmol/L 时多 92.7% ($p < 0.05$), 但当 Ca^{2+} 浓度为 10.0 mmol/L 时, 噬菌蛭弧菌 BDF-H 16 对嗜水气单胞菌的裂解活性开始降低, 产斑数目降低至对照组的 63.7% ($p < 0.05$)。

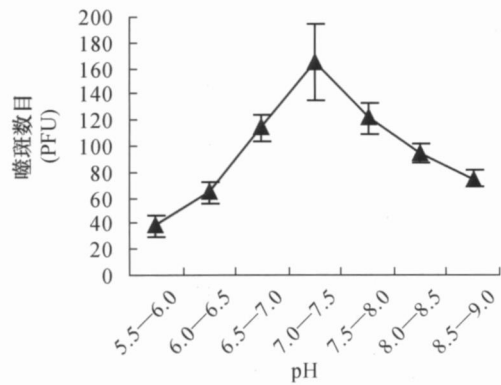


图3 不同 pH 范围下噬菌蛭弧菌 BDF-H16 对嗜水气单胞菌的裂解活性

Fig. 3 Lysis activity of *Bdellovibrio bacteriovorus* BDF-H16 on *A. hydrophila* at different pH

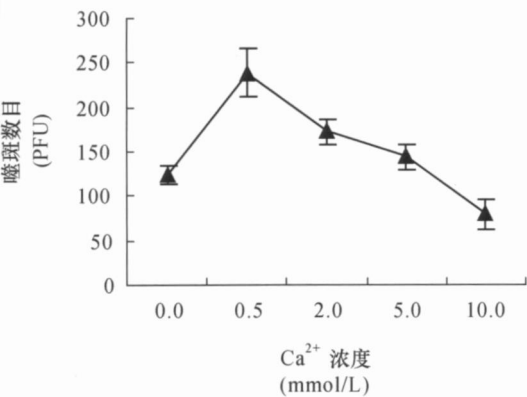


图4 不同 Ca^{2+} 浓度下噬菌蛭弧菌 BDF-H16 对嗜水气单胞菌的裂解效果

Fig. 4 Lysis effect of *Bdellovibrio bacteriovorus* BDF-H16 on *A. hydrophila* at different concentrations of Ca^{2+}

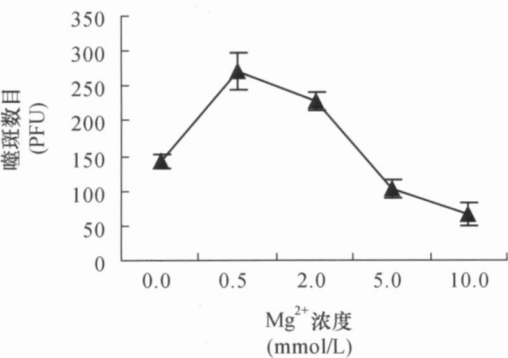


图5 不同 Mg^{2+} 浓度下噬菌蛭弧菌 BDF-H16 对嗜水气单胞菌的裂解效果

Fig. 5 Lysis effect of *Bdellovibrio bacteriovorus* BDF-H16 on *A. hydrophila* at different concentrations of Mg^{2+}

2.5 Mg^{2+} 浓度对噬菌蛭弧菌裂解嗜水气单胞菌活性的影响

实验结果 (图 5) 表明, 噬菌蛭弧菌 BDF-H16 在 Mg^{2+} 浓度 $\leq 2.0\text{ mmol/L}$ 范围内时, 对裂解嗜水气单胞菌具有一定的促进作用。其中 Mg^{2+} 浓度为 0.5 mmol/L 时, 噬菌蛭弧菌 BDF-H 16 对嗜水气单胞菌的裂解活性最高, 产斑数目较 Mg^{2+} 浓度 0 mmol/L 时多 91.5% ($p < 0.05$), 但当 Mg^{2+} 浓度 $> 5.0\text{ mmol/L}$ 时, 噬菌蛭弧菌 BDF-H 16 对嗜水气单胞菌的裂解活性开始降低。

3 讨论

在自然界中噬菌蛭弧菌、噬菌体、真菌、粘液菌和原虫都可能产生噬菌斑^[3], 因此在分离时必须将噬菌蛭弧菌产生的噬菌斑与其他微生物产生的噬菌斑加以区别。排除方法除了观察噬菌斑的大小、形状、出斑时间外, 主要依据挖斑压片显微形态观察。本实验从异育银鲫肠道中分离的噬菌蛭弧菌 BDF-H 16 形成的噬菌斑具有噬菌蛭弧菌噬菌斑的典型特征, 而且还具有吸附和侵染宿主菌, 宿主范围广, 专性寄生等噬菌蛭弧菌的独特特性, 这不仅进一步丰富了噬菌蛭弧菌的分布、形态和生长特性, 而且对防治肠道病原菌引起的细菌性疾病具有重要的意义。

杨淑专等^[4]、Pineiro *et al.*^[5]对噬菌蛭弧菌的噬菌范围作了研究, 已证实噬菌蛭弧菌对沙门氏菌属、志贺氏菌属、变形杆菌属、埃希氏菌属、假单胞菌属、气单胞菌属、欧文氏菌属、弧菌属中的众多菌株均有很强的裂解能力。本实验表明噬菌蛭弧菌 BDF-H 16 对实验采用的气单胞菌属、发光杆菌属、利斯顿菌属、弧菌属、爱德华氏菌属的鱼类病原菌株均能够裂解, 但各菌株对噬菌蛭弧菌 BDF-H 16 的敏感性有所不同。其中噬菌蛭弧菌 BDF-H16 对芽孢杆菌不能裂解, 这可能与宿主菌菌体细胞壁的屏障作用有关^[6]。但杨淑专等^[4]报道噬菌蛭弧菌对枯草杆菌也能裂解, 这可能与噬菌蛭弧菌菌株的不同有关。

pH 和温度能够影响噬菌蛭弧菌对宿主菌的吸附, 是影响噬菌蛭弧菌对宿主菌裂解活性的重要因素^[7]。众多研究表明, 噬菌蛭弧菌对宿主菌裂解的最适温度为 28°C , 最适 pH 基本为中性或偏碱性。如李戈强等^[7]研究了不同条件下噬菌蛭弧菌对河流弧菌的裂解后指出: 噬菌蛭弧菌在 $25\text{--}30^{\circ}\text{C}$ 和 $\text{pH } 6.5\text{--}8.1$ 范围内对河流弧菌的裂解活性最强; 徐恒等^[8]对 4 株噬菌蛭弧菌最适温度和的 pH 的研究结果也表明, 噬菌蛭弧菌的最适生长温度及 pH 分别为 30°C 和 $7.0\text{--}8.0$ 。本实验结果表明噬菌蛭弧菌 BDF-H 16 在 28°C 和 $\text{pH } 7.0\text{--}7.5$ 条件下对嗜水气单胞菌具有良好的裂解效果, 与大多数学者的报道基本一致。

此外, 国内外学者研究表明, 一定浓度的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 有助于噬菌蛭弧菌对宿主菌的裂解。如李戈强等^[7]研究发现 $2\text{ mmol/L } \text{Ca}^{2+}$ 、 $3\text{ mmol/L } \text{Mg}^{2+}$ 对噬菌蛭弧菌 HD-94-12-7 的生长繁殖具有促进作用, 培养 1d 可使噬菌蛭弧菌浓度增加 $1.8\log$ 值。本实验也发现, 在 $0.5\text{--}5.0\text{ mmol/L } \text{Ca}^{2+}$ 、 $0.5\text{--}2.0\text{ mmol/L } \text{Mg}^{2+}$ 条件下, 噬菌蛭弧菌 BDF-H 16 产斑数目明

显增多。这可能是因为 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 在一定条件下有助于增强噬菌蛭弧菌对宿主菌的吸附率,对噬菌蛭弧菌-宿主菌系统具有稳定作用^[7]。

本实验证实了在不同因素水平下噬菌蛭弧菌 BDF-H 16 对嗜水气单胞菌的裂解活性不同。因此,研究噬菌蛭弧菌在不同条件下对病原菌的裂解活性,将有利于提高噬菌蛭弧菌制剂在水产动物病害防治中的应用效果,而如何增强噬菌蛭弧菌的环境适应能力,提高噬菌蛭弧菌在对环境中对病原菌的裂解活性,无疑将是今后噬菌蛭弧菌研究的热点。

参考文献:

- [1] Klein D A, Casida J. Occurrence and enumeration of *Bdellovibrio bacteriovorus* in soil capable of parasitizing *Escherichia coli* and indigenous soil bacteria [J]. *Can J Microbiol*, 1967, **13** (9): 1235—1241
- [2] Stolp H, Petzold H. Untersuchungen über einen obligat parasitischen microorganismus mit lytischer aktivität für *Pseudomonas* bacteria [J]. *Phytopathol*, 1962, **45**: 364—390
- [3] Wang X R, Gao J, Liang G, et al. Study on identification of plaques and purification of *Bdellovibrio bacteriovorus* [J]. *Microbiology*, 1994, **21** (4): 228—232 [王秀茹, 高墩, 梁钢, 等. 噬菌蛭弧菌噬斑的鉴别与纯化的研究. 微生物学通报, 1994, **21** (4): 228—232]
- [4] Yang S Z, Huang Q H. Parasitic action of marine *Bdellovibrios* on prawn-pathogenic bacteria and other bacteria [J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 1997, **36** (3): 449—453 [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]
- [5] Pineiro S A, Sahaniuk G E, Romberg E, et al. Predation pattern and phylogenetic analysis of *Bdellovibrionaceae* from the Great Salt Lake, Utah [J]. *Current Microbiology*, 2004, **48** (2): 113—117
- [6] Qing S J. The current study on parasitization and lysis mechanism of *Bdellovibrio bacteriovorus* on prey bacteria [J]. *Microbiology*, 1992, **19** (6): 357—362 [秦生巨. 噬菌蛭弧菌对宿主菌细胞寄生和裂解机制的研究现状. 微生物学通报, 1992, **19** (6): 357—362]
- [7] Li G Q, Zhang Y L. The ability of *Bdellovibrio* in the lysis of *Vibrio fluvialis* under various conditions [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1998, **22** (3): 265—271 [李戈强, 章勇良. 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): 265—271]
- [8] Xu H, Cen Y H. Finding of *Bdellovibrio bacteriovorus* infecting *Rhizobium japonicum* [J]. *Microbiology*, 1992, **20** (1): 5—7 [徐恒, 岑英华. 大豆根瘤菌蛭弧菌的发现. 微生物学研究与应, 1992, **20** (1): 5—7]