文章编号: 1673-1689(2011)02-0311-05

天津主要河流中耐高温蛭弧菌的分离及生物学特性

黄 亮, 宋虹霖, 王 莉, 丁 辉, 马 呈, 童应凯*
(天津农学院 农学系, 天津 300384)

摘 要: 从天津 4 条主要河流(独流减河, 南运河, 北运河, 子牙河)中分离出了耐高温的蛭弧菌并进行了纯化。通过采用宿主双层琼脂平板法对从河水中筛选出耐高温菌株并对其进行宿主范围、pH、温度等生物学特性的测定, 结果表明: 耐高温蛭弧菌在 pH 7.0~7.5 生长最好; 对热致死的大肠杆菌, 嗜水气单胞菌, 荧光假单胞菌等 3 种细菌仍有裂解作用且出斑时间较裂解活菌早; 寄生谱测定发现其可侵染绝大多数革兰氏阴性菌和部分革兰氏阳性菌, 且为专性寄生。

关键词: 蛭弧菌; 耐高温菌株; 生物学特性
中图分类号: Q 939.97 文献标识码: A

Purification of *Bdellovibrio* with High Temperature Resistance in Tianjin Rivers and Preliminarily Studies on Its Biological Characteristics

HUANG Liang, SONG Hong-lin, WANG Li, DING Hui, MA Cheng, TONG Ying-kai*
(Department of Agriculture, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

Abstract: *Bdellovibrio* which could grown at high temperature conditions was screened and purified in Tianjin four main rivers. The biological characteristics were tested by double deck agar plate, including its host spectra, pH resistance, and cultivation temperature. The results showed that the *Bdellovibrio* with high temperature resistance growed well at pH 7.0~7.5, and it could prey on the dead bacteria earlier compared with the living bacteria, such as *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, mass of gram negative bacteria and some gram positive bacteria could be preied on by the Bdellovibrio, which is an obligate parasite.

Key words: *Bdellovibrio*; thermostable strain; biological characteristics

蛭弧菌(*Bdellovibrio*)是 Stolp 和 Petold 1962 年从土壤中分离噬菌体时首次发现的。它广泛分布于自然水域、污水及土壤中。它是一类攻击、侵染、裂解其它细菌的革兰氏阴性寄生菌[1], 有类似噬菌体的作用。蛭弧菌是环境中致病菌自然净化的重要生物因子之一, 具有很大的潜在应用价值, 很可能成为生物防治有害细菌的一种有力武器。

蛭弧菌作为一种新发现的细菌, 因其独特的生

收稿日期: 2010-01-25
基金项目: 河北省科学技术厅项目(05215506D)。
* 通信作者: 童应凯(1964-), 男, 青海贵德人, 教授, 主要从事微生物遗传育种和发酵工艺学方面的研究。
Email: yingkaitong@yahoo.com.cn

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

物学特性,在微生态研究领域已被作为一种新型微生态制剂的菌种得到开发和应用,并取得明显效果。该菌从发现至今,尽管在基础研究方面已经取得明显进展,但是到目前为止,其生物学特性仍然没有得到全面了解,影响蛭弧菌生长的因素及其作用机制也未彻底探明,仍需作更深入、更广泛的研究[2]。

蛭弧菌对温度很敏感,超过40 ℃即停止生长,50 ℃保持30 min即失活,但是在将蛭弧菌用于水产养殖的时候,由于自然条件与实验室培养条件相差很大,抗逆性差,尤其是温度耐受范围小的菌株活性往往较低,且生长缓慢起不到裂解水中致病菌和净化水体的作用,这已经成为蛭弧菌在水产养殖应用中的一个瓶颈。但是一般野生型的细菌抗逆性较高,所以作者拟从自然水体中分离出来耐高温的蛭弧菌菌株,这样抗逆性强的菌株在大规模生产和实际应用中有着很高的利用价值。

1 材料与方法

1.1 菌种

大肠杆菌、嗜水气单胞菌等宿主菌:由天津农学院农学系生物技术教研室保存;野生型蛭弧菌:由天津市独流减河、南运河、北运河、子牙河分离。

1.2 培养基

1.2.1 宿主菌培养基

1) 肉汤液体培养基:牛肉膏0.5 g/dL、蛋白胨1 g/dL、氯化钠0.5 g/dL;pH 7.2~7.4,121 ℃灭菌20 min。

2) 肉汤斜面培养基:在以上培养基的基础上加入2 g/dL的琼脂。

1.2.2 蛭弧菌培养基

1) 采用自来水琼脂双层培养基。培养基下层:煮沸自来水+1 g/dL琼脂,pH 7.0~7.2,121 ℃灭菌20 min。

培养基上层:煮沸自来水+0.5 g/dL琼脂,pH 7.0~7.2,121 ℃灭菌20 min。

2) PPYE培养基。蛋白胨1.0 g,酵母膏0.3 g,5 g/dL的$MgCl_2$溶液12 mL,5 g/dL的$CaCl_2$溶液6 mL,蒸馏水1 000 mL,121 ℃灭菌20 min。

1.3 水样的采集及预处理

1.3.1 水样的采集 对天津周边地区的河流包括南运河、独流减河、北运河、子牙河进行了采样。将采来的水样用无菌的0.45 μm醋酸纤维滤膜过滤,除去水中的藻类、固体悬浮物、杂质等。将处理后的水样装于500 mL的摇瓶中,置于4 ℃冰箱保藏。

1.3.2 水样的预处理 将水样从4 ℃冰箱中的取出,吸取100 mL至已灭菌的500 mL三角瓶中,然后加入0.5 mL大肠杆菌高浓度菌悬液,30 ℃、180 r/min摇床培养至摇瓶中液体澄清为止,时间为48~72 h。将发酵液用无菌的0.45 μm醋酸纤维滤膜过滤,除去原生动物对蛭弧菌形成的噬菌斑的干扰。

1.4 以大肠杆菌为宿主菌的双层平板的制作

下层培养基凝固后加入蛭弧菌水样1 mL,加入含大肠杆菌浓度为10^8~10^9/mL于上层培养基,转动平皿使上层培养基与蛭弧菌样品混匀,等上层平板凝固后再放入30 ℃培养箱中培养,24 h后将平皿倒置培养。

1.5 蛭弧菌的分离

为了去除水样中噬菌体的干扰达到分离出蛭弧菌的目的,用接种环挑取培养3~4 d才产生的噬菌斑(且随着时间的延长噬菌斑可不断的扩大),放入50 mL无菌水的250 mL的三角瓶中,常温浸泡8~10 h。然后加入0.5 mL大肠杆菌高浓度菌悬液到摇瓶中,30 ℃、180 r/min摇床培养,至摇瓶中液体澄清为止。

1.6 蛭弧菌菌悬液的制备

将培养液继续做双层平板,当培养出斑后再经过1~2 d的培养,让噬菌斑连成了一片,在超净台中将无菌水倒入平板中,每个平皿加30 mL左右。常温浸泡6~8 h,用灭菌的10 mL吸量管将洗斑液移到500 mL摇瓶中,每个摇瓶装100 mL左右。然后放在4 ℃冰箱中保藏备用。

1.7 水样中耐高温蛭弧菌的筛选

将上述蛭弧菌菌悬液做双层平板,然后分别置于30、33、35、37、40、43 ℃的培养箱中培养,培养3~4 d后观察出斑情况。

1.8 水样中耐高温蛭弧菌的纯化

采用摇瓶培养和双层平板分离交替的方法进行:将蛭弧菌平板用无菌水浸泡6~8 h,用灭菌的10 mL吸量管将洗斑液移到500 mL摇瓶中,加入0.5 mL大肠杆菌高浓度菌悬液摇床培养至液体澄清;再将培养液做双层平板挑取噬菌斑,重复上述操作直至出斑大小一致为止。一般纯化2~3代后蛭弧菌出斑大小基本一致,纯化后的蛭弧菌平板于4 ℃冰箱保藏备用。

1.9 蛭弧菌基本生物学特性的测定

1.9.1 不同pH值对蛭弧菌生长的影响 分别取pH值5.0、6.0、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0等7种不同的pH值的灭菌水5 mL,加入已长满蛭弧菌的平板

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

上, 浸泡 2 h。然后, 分别从各个平板上吸取 1 mL 菌液, 做双层平板, 宿主菌为大肠杆菌, 待平板凝固后, 将其放置 43 ℃培养箱中培养。观察各个培养皿上的出斑情况。

1.9.2 蛭弧菌对热致死细菌的裂解　用适宜的培养基培养大肠杆菌、嗜水气单胞菌、荧光假单胞菌, 用灭菌自来水制成浓度为 10^{11} cfu/mL 的悬浊液, 在 115 ℃灭活 30 min。将在摇床中已摇清的蛭弧菌分别接入该混悬液, 加入软琼脂充分混匀后倾注自来水琼脂平板, 观察噬菌斑形成情况。

1.9.3 耐高温蛭弧菌对几种宿主菌的裂解情况　选用大肠杆菌、嗜水气单胞菌、枯草芽孢杆菌、荧光假单胞菌、金黄色葡萄球菌、乳酸链球菌这 6 种宿主菌, 采用自来水琼脂双层平板法观察耐高温蛭弧菌对这 6 种宿主菌的裂解情况, 培养温度为 30 ℃, 观察每个培养皿的出斑情况。

1.9.4 耐高温蛭弧菌噬菌谱的测定　选用了革兰氏阴性菌恶臭假单胞菌、嗜水气单胞菌、荧光假单胞菌、鼠伤寒沙门氏菌、鸡白痢沙门氏菌、绿脓杆菌、腐败假单胞菌、副溶血弧菌、温和气单胞菌; 革兰氏阳性菌藤黄八叠球菌、金黄色微球菌、金黄色葡萄球菌、乳酸链球菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、多粘杆菌、嗜酸乳杆菌、蜡样芽孢杆菌、纳豆芽孢杆菌进行噬菌谱的测定。采用 10^{-5} 稀释度发酵液所做的宿主双层平板进行检验。

1.9.5 检测耐高温蛭弧菌是否为兼性寄生　将分离纯化的耐高温蛭弧菌接种在死的宿主琼脂平板上, 待其将宿主菌全部裂解以后, 用灭菌自来水浸泡平板。4 h 后取该液体 0.1 mL 涂布 PPYE 平板, 将平板放置 28 ℃恒温培养箱中培养, 观察是否有菌落形成。如果有菌落形成, 则挑取该菌落接种至自来水宿主双层琼脂平板, 在 30 d 内观察能否形成噬菌斑。如果能够形成噬菌斑则判定该菌株为兼性寄生菌株。

2 结果与分析

2.1 水样中耐高温蛭弧菌的出斑情况及噬菌斑形态

从天津市各大主要河流中分离到了蛭弧菌, 并进行了耐高温菌株的筛选, 结果见表 1。从表 1 可知, 可以从自然水体中分离出蛭弧菌, 在独流减河和北运河中分离到能够耐受 37 ℃的蛭弧菌, 在子牙河分离到能够耐受 35 ℃的蛭弧菌, 在南运河分离到能够耐受 40 ℃的蛭弧菌, 从而可知野生型的蛭弧菌的抗逆性比较强; 对筛选出来的耐高温蛭弧菌进行纯化及扩大培养。结果表明, 其数量可以达到 $10^7 \sim 10^8$ pfu/mL。

表 1　水样中蛭弧菌在不同温度下的出斑情况

Tab. 1　Plaque of the *Bdeollvibrio* in dieffernt cultivation temperature

来源	30 ℃	33 ℃	35 ℃	37 ℃	40 ℃	43 ℃
独流减河	+	+	+	+	−	−
南运河	+	+	+	+	+	−
北运河	+	+	+	+	−	−
子牙河	+	+	+	−	−	−

注: “+” 出斑, “−” 无斑

在所采集的 4 条河流中, 均能检出蛭弧菌的噬菌斑, 噬菌斑形态见图 1, 2。

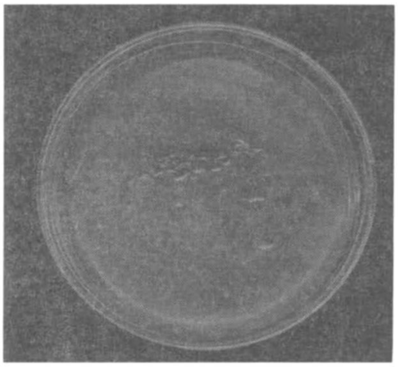

图 1　南运河双层平板噬菌斑

Fig. 1　Photo of plaques from the South Canal with double deck agar plate

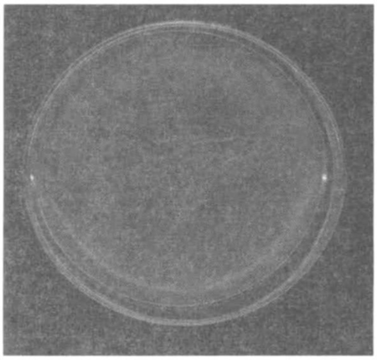

图 2　独流减河双层平板噬菌斑

Fig. 2　Photo of plaques from Duliujian River with double deck agar plate

其中河水所受污染最严重的是独流减河, 而北运河的水体环境最好, 污染也最轻。蛭弧菌在河流自净中起到一定作用, 水体污染越严重, 供蛭弧菌寄生的细菌品种和数量就越多, 蛭弧菌含量也越大, 因此可以反过来认为蛭弧菌的含量与河流的污染程度有关。污染越严重的河流则蛭弧菌含量越高, 进一步研究水体中蛭弧菌的分布及数量变化与

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

水体污染的相互关系, 可以用作指示污染指标。

2.2 耐高温蛭弧菌生物学特性

2.2.1 不同pH值对耐高温蛭弧菌生长的影响实验 从表2可看出, 蛭弧菌的生长对pH值的要求相对不是很严格, 耐高温蛭弧菌在pH 6.0~9.0均能生长, 在pH 7.0~7.5生长较好, 说明该蛭弧菌适合在中性偏碱的环境下生长; 而在酸性条件下, 随着pH值的下降, 耐高温蛭弧菌数量显著下降。由于在酸性条件下, 蛭弧菌鞭毛会脱落, 所以蛭弧菌的运动能力下降, 导致捕食能力也有所下降, 存活的蛭弧菌量也会相对减少。

表2 pH值对蛭弧菌出斑的影响

Tab.2 Effect of pH on the plaque

pH值	出斑时间/h	菌斑透明情况	噬菌斑个数/个
5.0	无	无	无
6.0	96	较模糊	8
7.0	72	透明	17
7.5	72	透明	19
8.0	72	透明	16
8.5	84	较模糊	15
9.0	96	较模糊	5

在李戈强的报道指出[3], 当pH值在5.6~6.0时, 蛭弧菌几乎没有裂解能力。在本试验中发现蛭弧菌在pH 6.0时仍然能够生长, 出现这种情况可能是与酸处理时间有关, 但其数量明显减少, 与报道的研究结论相符。

2.2.2 耐高温蛭弧菌对热致死细菌的裂解实验 将大肠杆菌、嗜水气单胞菌、荧光假单胞菌的菌悬液在121 ℃灭活处理20 min, 制成的自来水宿主琼脂平板, 接种耐高温蛭弧菌后都形成清晰透明的噬斑, 结果见表3。而且宿主菌热致死后出现噬斑的时间, 较宿主菌为活体时早。

表3 蛭弧菌对热致死细菌的裂解实验出斑时间

Tab.3 Plaque formation time in different dead bacteria

宿主菌	出斑时间/h
大肠杆菌	60
嗜水气单胞菌	72
荧光假单胞菌	72

近期研究发现[4-5], 蛭弧菌可以裂解经过热致死的革兰氏阴性菌、某些革兰氏阳性菌以及死的蛭弧菌。在本实验中, 耐高温蛭弧菌对热致死的大肠杆菌、嗜水气单胞菌、荧光假单胞菌等3种细菌仍有裂解作用, 而且其出斑时间也确实比用活的宿主菌要早。细胞破裂释放的蛋白质可能成为蛭弧菌的营养来源[6], 同时致死的宿主菌的生理结构发生变化, 宿主细胞膜遭到破坏, 可使得蛭弧菌更容易吸附与裂解。利用蛭弧菌的这一性质, 对所分离的菌株作生化鉴定, 能排除来自宿主的干扰, 使鉴定的结果更加可靠。

2.2.3 耐高温蛭弧菌噬菌谱的测定 分别用革兰氏阳性和阴性菌进行噬菌谱的测定, 取3次试验所得数据的平均值, 见表4, 5。在以上用于试验的19个菌种中, 能够被耐高温蛭弧菌侵染并产生噬菌斑的有: 恶臭假单胞菌、嗜水气单胞菌、荧光假单胞菌、藤黄八叠球菌、金黄色微球菌、金黄色葡萄球菌、乳酸链球菌、鼠伤寒沙门氏菌、鸡白痢沙门氏菌、绿脓杆菌、腐败假单胞菌、副溶血弧菌、温和气单胞菌13个菌种。

表4 耐高温蛭弧菌对革兰氏阴性菌产生噬菌斑情况

Tab.4 Plaques generated by the *Bdeollvibrio* and gram-negative bacteria

革兰氏阴性菌	噬菌斑数量/个	噬菌斑直径/cm	噬菌斑清晰度
恶臭假单胞菌	23	1~1.5	+++++
嗜水气单胞菌	29	1~1.5	+++++
温和气单胞菌	24	1~1.5	+++++
副溶血弧菌	26	1~1.5	+++++
腐败假单胞菌	25	1~1.5	++++
绿脓杆菌	26	1~1.5	+++++
鸡白痢沙门氏菌	28	1~1.5	+++++
鼠伤寒沙门氏菌	29	1~1.5	+++++
荧光假单胞菌	28	1~1.5	+++++

+++++: 最清晰 ++++: 较清晰 +++: 清晰

表5 耐高温蛭弧菌对革兰氏阳性菌产生噬菌斑情况

Tab.5 Plaques generated by the *Bdeollvibrio* and gram-posative bacteria

革兰氏阳性菌	噬菌斑数量/个	噬菌斑直径/cm	噬菌斑清晰度
藤黄八叠球菌	23	1~1.5	+++++
金黄色微球菌	27	1~1.5	+++++
金黄色葡萄球菌	27	1~1.5	+++++
乳酸链球菌	18	0.5~1.5	+++
枯草芽孢杆菌	无	无	无
地衣芽孢杆菌	无	无	无
多粘杆菌	无	无	无
嗜酸乳杆菌	无	无	无
蜡样芽孢杆菌	无	无	无
纳豆芽孢杆菌	无	无	无

+++++: 最清晰 ++++: 比较清晰 +++: 清晰

其中革兰氏阴性菌包括恶臭假单胞菌、嗜水气单胞菌、荧光假单胞菌、鼠伤寒沙门氏菌、鸡白痢沙

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

门氏菌、绿脓杆菌、腐败假单胞菌、副溶血弧菌、温和气单胞菌; 阳性菌包括藤黄八叠球菌、金黄色微球菌、金黄色葡萄球菌、乳酸链球菌。

不同的蛭弧菌菌株, 其宿主范围也不完全相同。耐高温蛭弧菌可侵染绝大多数革兰氏阴性菌和一少部分革兰氏阳性菌, 并使其产生噬菌斑, 但是对多数的杆菌而言都没有产生噬菌斑, 故可推测耐高温蛭弧菌有可能不侵染杆菌。

2 2 4　检测耐高温蛭弧菌是否为兼性寄生的实验　接种蛭弧菌菌悬液的 PPYE 平板上在 30 d 内没有长出黄色菌落, 说明分离的耐高温蛭弧菌为专性寄生。

3　结　语

蛭弧菌对水中细菌有很强的裂解作用, 并且还能改善水质的理化指标, 比如蛭弧菌对水中的氨氮有一定的去除作用; 同时, 充足的溶氧也有利于蛭弧菌裂解病原菌, 氧化降解氨氮, 净化水体, 提高透明度, 从而改善鱼类生存环境, 减少鱼类疾病的发生, 起到防治鱼类细菌性疾病, 提高生产性能的作用。

蛭弧菌微生态制剂又称生物治菌王, 是一种极有潜力的生物药, 为了更好地让这种环保药物在生产中广泛使用, 目前要做的工作仍然很多, 尤其在水产养殖方面要加大力度进行研究。单一的蛭弧菌菌株对致病弧菌的消除能力有限, 菌株间的协同作用有助于对更多的致病弧菌的裂解, 今后的研究工作将采用微生物学和发酵工程相结合的手段, 进一步开展蛭弧菌对更多弧菌的裂解实验, 从中找到裂解能力最强的菌株或组合, 然后再开展弧菌生物消除剂的工艺学研究, 进而为提高海洋食品质量安全提供强有力的实用措施, 为食物中毒、鱼类弧菌病害的防治提供新的手段。

采用双层琼脂法测定噬菌体的宿主范围及对相关特性的研究, 具有简便、快速、经济的优点[7]。作者从天津 4 大河流中分离出了蛭弧菌, 而且蛭弧菌耐受温度都较高, 在南运河分离到了能够耐受 40 ℃的耐高温蛭弧菌, 从而可知野生型的蛭弧菌的抗逆性比较强; 对耐高温蛭弧菌进行纯化及扩大培养, 其数量可以达到 10^8 pfu/mL; 耐高温蛭弧菌在 pH 7.0~7.5 生长最为良好; 耐高温蛭弧菌对热致死的大肠杆菌, 嗜水气单胞菌, 荧光假单胞菌等 3 种细菌仍有裂解作用且出斑速度快; 耐高温蛭弧菌侵染并产生噬菌斑的菌种有: 恶臭假单胞菌、嗜水气单胞菌、荧光假单胞菌、藤黄八叠球菌、金黄色微球菌、金黄色葡萄球菌、乳酸链球菌、鼠伤寒沙门氏菌、鸡白痢沙门氏菌、绿脓杆菌、腐败假单胞菌、副溶血弧菌、温和气单胞菌共 13 个菌种, 从而得出耐高温蛭弧菌与噬菌蛭弧菌的裂解能力基本一样, 但其耐受温度的能力更强; 通过连续 30 d 观察 PPYE 平板发现, 耐高温蛭弧菌不属于兼性寄生的细菌。

参考文献(References):

[1] Lambert C, Smith MCM, Sockett RE. A novel assay to monitor predator prey interactions for *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J reveals a role for methyl-accepting chemomtaxis prteins in predation[J]. **Environmental Microbiology**, 2003, 5(2): 127-132.

[2] 李楠. 鸡源蛭弧菌的分离、生物学特性研究及对鸡白痢的治疗实验[D]. 雅安: 四川农业大学, 2005.

[3] 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[J]. 水生生物学报, 1998, 22(3): 265-71.

LI Ge-qiang, ZHANG Yong-liang, XU Bo-hai. Studies on the *Bdellovibrio* splitting *Vibrio* fluvialis on different conditions [J]. **Acta Hydrobiologica Sinica**, 1998, 22(3): 265-71. (in Chinese)

[4] Beveridge T J, Pouwels P H, Sára M, et al. Functions of S-layers[J]. **FEMS Microbiol Rev**, 1997, 20: 99-149.

[5] Joml J Tudo, Miehael RMe Cann, Ivonne A. Aerieh. A new model of the penetartion of preyeells by *Bdeollvibrio*[J]. **Journal of Bacteriology**, 1990, 172(5): 2421-2426.

[6] Laura Hobley, John R King, R Elizabeth Sockett. *Bdellovibrio* predation in the presence of decoys: three-way bacterial interactions revealed by mathematical and experimental analyses[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2006, 72(10): 6757-6765.

[7] 凌振静, 张朝武. MS2 噬菌体宿主范围及其相关特性的实验研究[J]. 现代预防医学, 2009, 36(14): 2725-2727, 2730.

LING Zhen-jing, ZHANG Chao-wu. A preliminary study on the host range of MS2 phage and its related characteristics [J]. **Modern Preventive Medicine**, 2009, 36(14): 2725-2727, 2730. (in Chinese)

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net