

# 噬菌蛭弧菌的研究进展

秦 生 巨

(江苏省卫生防疫站中国医学细菌中心弧菌噬菌体专业实验室,南京)

噬菌蛭弧菌 (*Bdellovibrio bacteriovorus* 以下简称蛭弧菌) 是一类专门以捕食细菌为生的寄生性细菌。它比通常的细菌还小, 有似噬菌体的作用, 它可以通过细菌滤器, 但不是病毒, 而是真正的细菌, 即具有一般细菌所有的各种特性。“寄生”和“裂解”细菌是蛭弧菌独特的特性, 也是它维持自己生命活动最突出的功能表现。近年来, 许多研究证明, 蛭弧菌是净化环境水源, 消除病原菌的极为重要的生物因子之一。

本文就有关蛭弧菌生物学特性、生态学、蛭弧菌与其它生物的关系、蛭弧菌对病原菌的作用机制和清除作用及其检测方法等方面的研究进展, 作一简要介绍。

## (一) 蛭弧菌生物学特性

1. 生理特性: 早期研究认为, 蛭弧菌仅能在活的宿主菌细胞内生长繁殖<sup>[1,2]</sup>, Huang<sup>[3]</sup> 等发现蛭弧菌在 70 或 100℃ 10 分钟或蒸汽致死的宿主菌中可以发育, 并可使其裂解。Varon<sup>[4]</sup> 等报道于 70℃ 15 分钟致死的宿主菌中也见到相同的现象。但如加热时间较长则宿主菌细胞不适于作为蛭弧菌的营养。Burger<sup>[5]</sup> 等也指出蛭弧菌于 80℃ 20 分钟加热致死的宿主菌细胞中生长, 但接种效率很低。Gillis<sup>[6]</sup> 等报道蛭弧菌可在加热 65℃ 20 分钟, 或加热 121℃ 15 分钟致死的鲍氏志贺氏菌菌苔上生长。秦生巨和司祺东在实验中发现, 蛭弧菌于活的宿主菌上约需 40—48 小时才能出现噬斑, 而 100 或 80℃ 加热及 1/5 (体积) 量氯仿处理致死的宿主菌琼脂平板上只需 14 小时即可形成噬斑, 而且形成噬斑的数目也大大增多, 约为在活的宿主菌上形成噬斑数的 40—100 倍左右, 噬斑的大小明显小于活菌上形成的。在灭菌自来水中也有相

似的结果。在用紫外线处理致死宿主菌的琼脂平板上, 形成噬斑的时间也较快(28小时), 数目也有增加, 但不如加热致死者显著。用氯霉素、土霉素、多粘菌素 B 及氨基青霉素等抗生素处理致死的宿主菌基本上与活的宿主菌结果相似。实验还说明, 在加热致死的宿主菌上生长增殖的蛭弧菌, 如再回到活的宿主菌上增殖, 仍可恢复其在活菌上生长增殖的原有特性。

2. 生化特性<sup>[7]</sup>: 蛭弧菌不能分解碳水化合物, 但分解蛋白质的能力极强。显然, 它是利用多肽与氨基酸作为碳源和能源的。它们是严格好氧菌, 按三羧酸循环途径进行好氧性呼吸作用。它们的全部营养来自宿主细胞而不是培养基。

大多数细菌的  $\gamma_{ATP}$  值 (每消耗一克分子 ATP 所得到细胞干重数) 大约为 10, 而蛭弧菌的  $\gamma_{ATP}$  值则为 20 到 30。Ritteuberg<sup>[8]</sup> 等认为, 达到这样高效率的部分原因, 是蛭弧菌具有直接从宿主细胞吸收核苷酸的能力, 因而贮存了高能磷酸键。它们还能够同化宿主的脂肪酸, 一部分直接变成脂类, 另一部分则转化成蛭弧菌特有的其它脂肪酸。

蛭弧菌能在含有宿主菌细胞抽提物而无宿主细胞的培养基中生长。在这种条件下, 加入核苷酸或冲洗细胞能使生长迅速停止在细胞发育中的任何一个阶段上。结果表明, 某种来源于宿主 RNA 的因子作用于蛭弧菌并起着一种调节作用。

3. 血清学特性<sup>[9]</sup>: 用灭活的生长期蛭弧菌培养物免疫动物, 可获得蛭弧菌特异的抗血清制剂。免疫化学研究结果证明, 蛭弧菌的抗原

本文承中国预防医学科学院流行病学和微生物学研究所刘秉阳教授审阅, 特此致谢。

组分主要是固定在  $\alpha_2$ -球蛋白的带上。免疫扩散试验查明,蛭弧菌至少有 4 种抗原成份,但与一系列菌株的抗血清不形成明显的沉淀线,因此,蛭弧菌的抗原组成可能还不够完善。Scheilling 等报道,他检查的 29 株蛭弧菌都有抗原性,发现蛭弧菌的变种斯托普氏蛭弧菌至少由 9 种特异性抗原组成,此变种主要是由于蛭弧菌的组分不同。他还指出,蛭弧菌血清学分型研究,可以弄清蛭弧菌种内各型的可变性。同时用血清凝集沉淀反应和间接免疫荧光方法检测,两种方法的结果相似。

## (二) 蛭弧菌的生态学特性

蛭弧菌在自然界分布非常广泛<sup>[10,11]</sup>。一般说来,凡有细菌存在的地方都有它们的存在,特别是污水环境中它的分布较为普遍。Ибрагимов 报道<sup>[12]</sup>,马、牛、猪和鸭等动物肠道中都含有蛭弧菌,并可随粪便排到外环境中。相反,在人体、白鼠、蛙和鱼体内的粪便中没有检出蛭弧菌。这可能与检索的样本数较少有关。Jeffrey 指出<sup>[13]</sup>,在食品中没有分离到蛭弧菌。若把蛭弧菌培养物接种在食品表面,能显著减少食品表面细菌的繁殖数目,而蛭弧菌本身也略有增长。Мосивитина 等报道<sup>[14]</sup>,蛭弧菌在污水环境中生存时间为 100 天,河水为 75 天,而在高压灭菌的自来水中生存时间很长,可达 160 天以上。秦生巨等研究报道<sup>[15]</sup>,蛭弧菌在 4℃ 灭菌自来水中可生存 8 个月以上。许多研究证明,温度对蛭弧菌活力产生一定的影响,但当它寄生于宿主细胞内时,于 75℃ 加热 15 分钟或用紫外线照射,对蛭弧菌无影响,但蛭弧菌生长所要求的温度却不同,4—37℃ 都可以生长,最适为 25—30℃,超过 40—45℃ 即停止生长,45—50℃ 30 分钟即失活。由此可以看出,蛭弧菌是一类嗜中温性细菌,温度还对蛭弧菌参加污水净化和消除致病菌有一定影响,水温在 26℃ 或 33.5℃ 时蛭弧菌除菌能力相应地提高<sup>[16]</sup>。因此,了解温度因素对蛭弧菌的影响,对进一步研究它的生态分布特性和生物控制是非常重要的。

## (三) 蛭弧菌与其它生物的关系

1. 毒性作用: Мосивитина 等<sup>[17]</sup>实验证明,以蛭弧菌  $10^9$  个菌的剂量对小白鼠、豚鼠和家兔等动物无毒性作用;就是用于猴肾、Hela 细胞组织培养亦不引起任何细胞病变;有人指出,蛭弧菌菌剂外用有预防某些动物的角膜结膜炎的效果。蛭弧菌对人体有无毒力和毒性作用尚待进一步探讨。

2. 藻类寄生性细菌<sup>[18]</sup>: 近年来,Coder 等发现寄生在藻类(如 *Apelidium*) 上的一类弧菌。它们在活的藻类细胞中生长繁殖,使藻类丝状体逐渐裂解死亡。Громов 等还发现 *Chlorella* 属(小球藻)中存在寄生性弧菌,同样是以活的藻类细胞为宿主,专营异养性寄生生活,在有机培养基和被杀死的藻类细胞上不能生长。它们的某些特性和功能很近似于蛭弧菌,故定名为 *Bdellovibrio chlorellavorus* (噬藻蛭弧菌)。尽管它们有许多相似之处,但两者还有显著的不同,噬藻蛭弧菌是小球藻细胞外寄生物,而噬菌蛭弧菌是细胞内寄生菌,两者的宿主和寄生方式有所不同。

3. 噬菌体: Hashimoto 等指出<sup>[19]</sup>,蛭弧菌可使一些细菌遭到毁灭性的溶解,可是,蛭弧菌本身也受另一类生物的威胁,那就是蛭弧菌噬菌体 (*Bdellophage*)<sup>[2,18,20-22]</sup>。它们对寄生性和非寄生性的蛭弧菌都有裂解作用。然而,蛭弧菌噬菌体具有严格的专一性,并有其自己的裂解过程。当蛭弧菌直接吸附宿主菌之前,或在完成侵入宿主的周质以前,蛭弧菌噬菌体尾部首先吸附在蛭弧菌细胞上,然后该噬菌体的核酸注入到蛭弧菌细胞中,便完成它对宿主细菌的侵入,头部完全以空壳保留在宿主细胞外。感染特异噬菌体的蛭弧菌仍保持其原来的状态和大小,蛭弧菌噬菌体在蛭弧菌细胞中发育,而蛭弧菌本身仍处于宿主细胞中,其结果,蛭弧菌必然在细胞中导致其宿主细菌的破裂,在这时,蛭弧菌噬菌体被释放到体内。

4. 蛭弧菌对宿主细胞的作用<sup>[18]</sup>: Печников 等发现蛭弧菌不仅进入宿主细胞的周质中间,并在那里进行一系列生命活动,而且,在某情况下直接进入细胞质中,并在其间生长繁殖。另

外,就蛭弧菌作用宿主菌细胞而言,当宿主细胞处于对数增殖期这种最适的生理状态时,蛭弧菌的裂解活性最强,作用也很有效。当宿主菌处于休止期时裂解活性也是显著的。第8天以后的培养物则不易受蛭弧菌的感染,可是,蛭弧菌对大肠杆菌  $K_{12}$  的任何生长发育期即使是生长在缓慢时期,蛭弧菌也是有作用的,它的产量也很高。实验证明,蛭弧菌的活性与菌龄也有一定的相关性。蛭弧菌感染还取决于培养基成分、pH 值、温度和通气程度等一系列因素。总之,蛭弧菌的感染力及其作用活性不仅取决于双方的菌龄,而且与其双方所处的生态环境因素等也密切相关。

#### (四) 蛭弧菌对病原微生物的作用

1. 作用机制<sup>[9,23,24]</sup>: 蛭弧菌开始与宿主细胞激烈碰撞,以没有鞭毛的一端直接吸附到宿主细菌上,菌体转动速率每秒超过 100 转,在此之后,蛭弧菌通过宿主细胞壁的细胞孔(附着位点)进到细胞壁和细胞膜之间,或直接进入细胞质中。它的进入同其释放的蛋白酶、脂肪酶和胞壁质酶有关系。使蛭弧菌的进入宿主细胞起着酶促作用。侵入过程非常快,只有几秒钟即可完成整个过程。蛭弧菌进入宿主细胞后,形态发生一系列变化,失去鞭毛,菌体延伸比原始菌体要长几倍,而后均匀地进行二分裂的裂殖,分裂成众多带鞭毛的个体——子代细胞,完成这一增殖的全过程约需要 4—6 小时。这时随着细胞增殖和某些酶的产生,宿主细胞壁裂解,蛭弧菌子代细胞同时被释放出来,这样就完成其整个生活周期。子代细胞遇上合适的宿主时又可再侵染。

2. 蛭弧菌的宿主范围: 蛭弧菌的宿主范围极为广泛<sup>[13,14,17,19-26]</sup>。它的寄生性不限于革兰氏阴性细菌,对某些革兰氏阳性菌亦有着寄生性。蛭弧菌对沙门氏菌属、志贺氏菌属、钩端螺旋体、假单胞菌属、变形杆菌属、霍乱弧菌及不凝集弧菌等均有很强的裂解活性,特别是对沙门氏菌属和志贺氏菌属极为显著。如秦生巨等<sup>[27]</sup>报道,蛭弧菌 Bd81 和 Bd98 对 206 株伤寒沙门氏菌的裂解率可高达 96.6 和 99.2%。蛭

弧菌 Bd81 和 Bd98 对灭菌河水中的福氏志贺氏(F2a)菌可清除 92.8 或 97.4%,对照组仅减少 20%。Ибрагимов 等报道,蛭弧菌不仅对细菌有强力的裂解作用,而且对某些病毒亦有良好的破坏力,对肠道病毒有着很高的裂解活性。有人指出,它不仅与 RNA 病毒,而且与 DNA 病毒相互作用后可导致病毒明显的失活,这一现象很有实践意义。另外,蛭弧菌对植物病原菌也有很强的感染力。所以人们认为蛭弧菌有可能被用来防治人类、动物和植物病原菌所带来的危害。

3. 蛭弧菌的除菌作用<sup>[11,14,25,26,28]</sup>: Москвитина 等报道,同时加入蛭弧菌和沙门氏菌、志贺氏菌的河水中,蛭弧菌可显著的影响沙门氏菌和志贺氏菌的生存时间。经蛭弧菌作用后,在河水中 20℃ 和 4℃ 时,沙门氏菌的生存时间为 25—37 天,志贺氏菌为 19—29 天。蛭弧菌和 EITor 霍乱弧菌相互作用后,出现不典型的菌落,此时,它与霍乱 O-1 血清(1:50)的凝集反应呈阴性。秦生巨发现<sup>[14]</sup>,在实验室条件下,在灭菌自来水和灭菌湖水中均证实蛭弧菌对 EITor 霍乱弧菌、福氏志贺氏菌和大肠杆菌的清除作用。7 天以后,清除率可分别达到 98、92 和 99% 以上。在模拟自然条件的河水中,蛭弧菌对 EITor 霍乱弧菌和大肠菌群,以及对细菌总数等也均有显著的净化效果。这些研究,为利用蛭弧菌对极易污染环境的致病菌的净化提供了依据。Lépine 等<sup>[28]</sup>也报道,蛭弧菌对污水中的沙门氏菌属的细菌有重要的消除作用。此外,Venosa 报道<sup>[29]</sup>,蛭弧菌还能清除污水中的浮游球衣菌。实验还证明,蛭弧菌除了对人体致病菌有清除作用外,对植物病原菌亦有较显著的消除作用。秦生巨等还报道,蛭弧菌对自蚌体内分离的嗜水气单胞菌同样有裂解作用,裂解率为 77.78—100%。因此,有可能利用这类寄生菌控制或减少致病菌对环境水体的污染,预防一些疾病的发生,尤其是肠道传染病的发生和流行,保护人体健康。

#### (五) 检测方法

用适量的污水(或泥土的悬液)接种在含有

敏感的宿主细胞的双层琼脂平板上, 2—3天后, 如有蛭弧菌细胞存在, 便可出现类似噬菌体的噬斑, 此斑逐渐扩展, 宿主菌完全被溶解而形成透明区。利用这一特性可计算蛭弧菌的数目。另外, 噬斑计数法可追踪蛭弧菌的增殖过程, 寄生潜伏时间和子代蛭弧菌的产生数量以及它们的活性等。但有些蛭弧菌, 只消化宿主细胞的内含物, 而在菌苔上不出现噬菌斑。遇到这种情况, 就很难用噬斑计数法来测定其数目及其潜伏期了。司稗东和秦生巨报道, 在自来水和海水琼脂平板上很少见细菌生长, 蛭弧菌形成的噬斑最为清晰, 培养基的制作也很简便。因此, 自来水琼脂为分离蛭弧菌的首选培养基。如被检样品中蛭弧菌含量过少, 用双层琼脂平板法检查不易检出噬斑, 也可先在液体中加入宿主菌, 增殖2—3天后, 再检测蛭弧菌是否存在, 但这种方法不适用于定量分析[3,11,13,16]。

## (六) 结 语

近年来, 蛭弧菌的生物学、生理学、生态学、生物化学以及蛭弧菌清除环境微生物作用等研究进展很快, 但以下两个方面必须深入研究。一方面, “蛭弧菌-噬菌体-宿主菌”这一独特的“三位一体”的寄生体系, 已引起了人们的注意。蛭弧菌噬菌体可以侵染蛭弧菌, 并在蛭弧菌体内复制子代; 蛭弧菌又可以侵染宿主菌细胞, 同样是在宿主菌细胞内复制子代。而且已知蛭弧菌DNA的合成80%来自宿主, 蛭弧菌噬菌体DNA的合成则全部来自蛭弧菌。这一过程显然是需要分子生物学技术——基因重组。若能利用这一现象, 对工业生产及生物制品的研究可能是有积极意义的, 应引起研究者的重视; 另一方面, 现已证实蛭弧菌是水体自然净化的重要的生物因子之一。国内外许多实验结果表明, 蛭弧菌在实验条件和模拟自然环境的条件中对许多致病微生物有显著地清除效果, 但是, 如何将蛭弧菌使净化水体中的致病菌加以

应用从模拟自然条件过渡到自然环境下的应用, 目前我国已取得初步成果, 秦生巨等研究证实, 蛭弧菌 Bd81 在自然河水中对不凝集弧菌、大肠菌群、细菌总数等均有显著的清除作用。但如何推广使用还需进一步探索。蛭弧菌对致病微生物的作用, 不仅局限于人类, 对环境水源中的致病微生物等同样有显著的净化效果。为此, 如何扩大蛭弧菌的研究范围, 尤其是蛭弧菌在环境保护中的应用, 应引起有关部门的重视。

## 参 考 文 献

- [1] Stolp H, et al.: *Phytopathol*, Z, **45**(1):364, 1962.
- [2] Stolp H, et al.: *Antonie Van Leeuwenhoek*, **29**: 217, 1963.
- [3] Starr MP, et al.: *Adv Microbiol Physiology*, **8**: 215, 1972.
- [4] Varon M, et al.: *J. bacteriol*, **99**(1):136, 1969.
- [5] Burger A: *Arch Mikrobiol*, **61**(3):261, 1968.
- [6] Gillis TR, et al.: *Infection and Immunology*, **2**(3):340, 1970.
- [7] 《微生物世界》翻译组: 微生物世界, 科学出版社, 北京, 615页, 1983。
- [8] Rittenberg S, et al.: *J. bacteriol*, **121**(3):1137, 1975.
- [9] Schelling, et al.: *International Journal of Systematic bacteriology*, **33**(4):816, 1983.
- [10] 司稗东, 秦生巨: 中华微生物学和免疫学杂志, **2**(1): 12, 1982。
- [11] 秦生巨: 消毒与灭菌, **4**(2): 92, 1987。
- [12] Ибрагимов, ФХ. ЖМЭИ, **4**(5):97, 1979.
- [13] Jeffrey, et al.: *J. Food Science*, **42**(2):555, 1977.
- [14] 钱伯钦译: 《国外医学》微生物学分册, **6**: 264, 1980。
- [15] 秦生巨等: 微生物学通报, **15**(3): 115。
- [16] 司稗东, 秦生巨: 中国公共卫生, **6**(3): 139, 1987。
- [17] Мосвикина, ЭА: ЖМЭИ, **5**:3, 1979.
- [18] 戴华生等: 环境微生物, 江西教育出版社, 南昌, 40页, 1985。
- [19] Hashimoto, T: *J. virol*, **5**:95, 1970.
- [20] Althausen, M: *J. virol*, **10**(3):516, 1972.
- [21] Varon M, et al.: *J. virol* **9**(3): 519, 1972.
- [22] Crowley P, et al.: *J. theor. Biol*, **86**:377, 1980.
- [23] 罗明典: 应用微生物, **6**: 29, 1980。
- [24] 秦生巨: 微生物学通报, **14**(4): 184, 1987。
- [25] 秦生巨: 健康报, 2541, 2, 1987。
- [26] 秦生巨: 环境与健康杂志, **5**(3): 48, 1988。
- [27] Lépine P, et al.: *Acad. Sci, Paris*, **246**:2957, 1967.
- [28] © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>