

噬菌蛭弧菌对鱼类常见致病菌裂解作用的研究*

马志宏 丁文 杨莉

高敬 李海 王秀茹

(北京市水产研究所 北京 100075)

(北京医科大学公共卫生学院 北京 100083)

摘要: 调查了北京地区 25 份水样,其中 24 份检出噬菌蛭弧菌。本次试验选用 4 株鱼类主要致病菌为宿主菌,检出的蛭弧菌对上述 4 种细菌的裂解范围有所不同。其中嗜水气单胞菌可被全部检出的蛭弧菌裂解(24/24),其他 3 株菌仅部分被裂解,依次为肠型点状气单胞菌(17/24),荧光假单胞菌(9/24),鳃弧菌(7/24)。本次试验直接从水样中检出 6 株对 4 种宿主菌均有裂解作用的蛭弧菌,为进一步利用蛭弧菌防治鱼类常见细菌性疾病提供了可用资料。

关键词: 噬菌蛭弧菌,鱼类常见致病菌,裂解

中图分类号: Q93-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(1999)-06-0408-04

STUDY ON *BDELLOVIBRIO BACTERIOVORUS* LYSIS EFFECT TO COMMON FISH PATHOGENS

MA Zhihong DING Wen YANG Li

(Beijing Fisheries Research Institute, Beijing 100075)

GAO Jing LI Hai WANG Xiuru

(School of Public Health, Beijing Medical University, Beijing 100083)

Abstract: Twenty-five water samples from Beijing area were detected for *Bdellovibrio bacteriovorus*. Twenty-four indicated positive results. Four strains of fish pathogens were used as the host bacteria in this experiment, the lysis range of *Bdellovibrio bacteriovorus* for four host bacterias were different. Among them *A. hydrophila* can be lysed by all detected *bdellovibrio bacteriovorus* (24/24), others can be lysed partly which in proper order are *A. punctata fluorescens intertinalis* (17/24), *P. fluorescens* (9/24), *V. anguillarum* (7/24). In this experiment, we have obtained six strains of *Bdellovibrio bacteriovourus* from water samples which can lysis four strains of host bacterias. It probable provide useful references for preventing bacteriosis fish disease.

Key words: *Bdellovibrio bacteriovorus*, Common Fish, Pathogens lysis

噬菌蛭弧菌(*Bdellovibrio bacteriovorus*)是一类普遍存在于天然水体的专门以捕食细菌为生的寄生性细菌,可穿入宿主菌细胞壁并在其内繁殖,最终造成宿主菌裂解死亡,其裂解范围以革兰氏阴性杆菌为主^[1]。蛭弧菌广泛分布于

自然水域、污水及土壤中,是环境中致病菌自然净化的重要生物因子之一^[2]。据 1998 年北京地

* 北京市自然科学基金资助课题

收稿日期:1998-10-11,修回日期:1999-04-28

区淡水鱼类主要流行病学调查,水产养殖病害近40种,其中细菌性疾病占49%^[1],鱼病调查证实,细菌性疾病以气单胞菌属(*Aeromonas*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、弧菌属(*Vibrio*)中的某些菌种为主要病原菌,此三属菌均为革兰氏阴性菌。在水产养殖方面用蛭弧菌防治细菌性疾病,国内报道较少。为探索利用蛭弧菌防治鱼病,开拓生物防治的新途径,我们对北京地区不同水体中蛭弧菌的分布,及其对鱼类致病菌的裂解作用进行了观察研究。

1 材料与方法

1.1 水样

采用未经处理的水样25份,其中水库水1份,河湖水5份,鱼池水17份,医院污水2份,多点采集后,置于无菌的采水瓶内,室温静置自然沉淀2h以上,取上清液作检测。

1.2 稀释液与培养基

1/500 NB(即1/500 nutrient broth),用经煮沸后去沉淀的自来水配制。

1/500 NB 琼脂培养基,底层含琼脂粉(日本进口分装)1%,上层含琼脂粉0.5%。

普通营养琼脂培养基,用于菌落计数。

1.3 宿主菌悬液的制备

选用4种鱼类主要致病菌为宿主菌,SC9624嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*),本所分离保存菌株。58-20-9肠型点状气单胞菌(*Aeromonas punctata fluorescens intertinalis*),56 12 10 荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*),E3-11 鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)由武汉水生生物研究所馈赠。对鱼无害的增殖宿主菌:9899施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)由中科院微生物所馈赠。将含有宿主菌的营养肉汤培养液于25℃增殖18~24h后,于营养琼脂上培养18~24h,用无菌1/500 NB液洗涤2次,离心后取沉淀。菌悬液最终浓度约为 5×10^{10} cfu/mL,置4℃冰箱备用。

1.4 水质检测

水样采集后立即测定其pH值、水温等,用倾注培养法测得菌落总数。

1.5 水中蛭弧菌检测及蛭弧菌对鱼类常见致病菌裂解能力的测定

1.5.1 用致病性宿主菌直接检测:采用双层琼脂平板法,取0.5mL水样,分别加入上述4种致病性宿主菌悬液0.2mL于已融化并保温在45℃3mL半固体琼脂试管内混匀,倾注于固体平板底层上,摇匀,待凝固后于25℃温箱内24~120h连续观察噬菌斑是否出现及其大小、形态及扩展情况。

1.5.2 首先用增殖宿主菌检测:采用双层培养法,先用增殖宿主菌9899分离到蛭弧菌噬菌斑,经纯化后,再分别对4种致病性宿主菌进行裂解试验。

1.6 蛭弧菌的纯化与菌种保藏

蛭弧菌纯化采用常规单斑传代,经3~5代取得均匀一致噬菌斑后,用高层半固体琼脂法或甘油法保存,每月传代1次^[4,5]。

2 结果

2.1 水样理化性质与细菌污染情况

本次水样采集自1998年4~9月底,所测定之水温10℃~28℃;pH6.5~8.5;菌落总数 6.6×10^1 cfu/mL~ 1.0×10^7 cfu/mL。详见表1。

2.2 蛭弧菌的检出及对鱼类常见致病菌的裂解作用

2.2.1 在25份水样中,分别以SC9624、58-20-9、56-12-10、E3-11为宿主菌检测蛭弧菌,其中24份水样不同程度地出现噬菌斑。只有1份水样(密云水库)未检出蛭弧菌的噬菌斑。检出的蛭弧菌均可裂解SC9624(24/24),17株蛭弧菌可裂解58-20-9(17/24),9株蛭弧菌可裂解56-12-10(9/24),7株蛭弧菌可裂解E3-11(7/24)。其中17、19、20、21、24、25号水样蛭弧菌对4种致病性宿主菌均有裂解作用。结果见表2。

2.2.2 首先以9899作为增殖宿主菌,对19、20、25号水样进行检测,取得3株纯化蛭弧菌Bd-19-9899, Bd-20-9899, Bd-25-9899后,再以此纯化菌株,对4株致病性宿主菌进行裂解。结果除Bd-25-9899可对4株菌全部裂解外, Bd-19-9899、Bd-20-

表1 水样的理化性质与细菌污染情况

水样编号	水样来源	采集时间	水温(℃)	pH值	菌落总数
1	积水潭	98.4.1	—	6.8	3.0×10 ³
2	小月河	98.4.1	—	6.8	6.0×10 ³
3	本所51 [#] 鱼池	98.4.1	—	6.8	6.0×10 ³
4	本所35 [#] 鱼池	98.4.1	—	6.5	5.0×10 ³
5	本所13排3 [#] 鱼池	98.4.13	—	6.5	9.0×10 ⁴
6	本所13排6 [#] 鱼池	98.4.13	—	6.5	1.0×10 ⁵
7	本所13排7 [#] 鱼池	98.4.13	—	6.5	7.8×10 ³
8	温榆河	98.4.13	—	6.8	2.0×10 ⁴
9	密云水库	98.4.27	10	6.5	6.6×10 ¹
10	小汤山鲤鱼池	98.4.27	20	7.0	1.3×10 ⁴
11	密云养殖场	98.4.27	16	7.0	2.1×10 ⁵
12	小汤山鲫鱼池	98.4.27	22	7.0	6.0×10 ⁴
13	清河	98.5.11	18	6.8	7.0×10 ⁶
14	北医三院污水	98.5.11	20	6.8	9.7×10 ⁶
15	本所5排2 [#] 鱼池	98.7.17	23	7.4	4.0×10 ⁴
16	本所31 [#] 鲫鱼池	98.7.17	21	7.5	7.5×10 ⁴
17	本所甲鱼池	98.8.6	25	7.6	9.1×10 ⁴
18	本所19 [#] 草鱼种池	98.8.6	27	7.9	1.1×10 ⁵
19	本所26 [#] 成鱼池	98.8.6	28	8.5	1.5×10 ⁵
20	本所1排4 [#] 鱼池	98.9.10	25	7.8	2.2×10 ³
21	本所52 [#] 鲢鳙鱼池	98.9.10	26	7.9	8.1×10 ⁴
22	北医三院污水	98.9.10	24	7.1	1.0×10 ⁷
23	小月河	98.9.10	23	7.2	2.0×10 ³
24	本所14 [#] 鱼池	98.9.21	20	7.8	9.0×10 ³
25	本所5排1 [#] 鱼池	98.9.21	21	7.7	1.8×10 ⁴

表2 水样中蛭弧菌的检出及对4种鱼类致病菌的裂解作用

水样编号	宿主菌			
	SC9624	58-20-9	56-12-10	E3-11
1	+	-	-	+
2	+	+	-	-
3	+	-	-	-
4	+	+	+	-
5	+	+	-	-
6	+	+	-	-
7	+	-	-	-
8	+	+	-	-
9	-	-	-	-
10	+	+	-	-
11	+	-	-	-
12	+	-	-	-
13	+	-	-	-
14	+	+	-	-
15	+	-	-	-
16	+	+	+	-
17	+	+	+	+
18	+	+	+	-
19	+	+	+	+
20	+	+	+	+
21	+	+	+	+
22	+	+	-	-
23	+	+	-	-
24	+	+	+	+
25	+	+	+	+

注: + 为出现蛭弧菌噬菌斑 - 为未出现蛭弧菌噬菌斑

表3 纯化后的蛭弧菌对4种鱼类致病菌裂解能力

宿主菌	蛭弧菌噬菌斑出现情况		
	Bd-19-9899	Bd-20-9899	Bd-25-9899
SC9624	+	+	+
58-20-9	+	+	+
56-12-10	-	(+)	+
E3-11	-	-	(+)

注: + 48~72h出现噬菌斑, (+) 72~120h出现噬菌斑,

- 不出现噬菌斑

-9899均不能全部裂解, 结果见表3.

3 讨论

(1) 本试验调查了北京地区几种不同类型的水体, 除9号密云水库的水样未检出蛭弧菌外, 其他水体检出了蛭弧菌。上述结果说明, 蛭弧菌广泛存在于天然水体、养殖水体及污水中。蛭弧菌对环境条件适应能力较强, 但不同的环境因素对其生长又有所影响。洁净的水(如9号密云水库)用4种宿主菌均未检出蛭弧菌, 而有机物含量高, 细菌总数高的水体中, 有利于蛭弧菌的增殖, 说明蛭弧菌与水的洁净程度具有一定的相关性。

此外温度与季节对蛭弧菌检出率影响较大,夏季检出率最高。对pH值适应范围较宽,pH8.5的水样蛭弧菌的检出依然未受到影响。

(2) 蛭弧菌对本次选用的4种革兰氏阴性鱼类常见致病菌均有裂解作用,但不同的蛭弧菌菌株裂解范围存在一定差异。已如前述,本次实验自25份水样中分离出6株蛭弧菌对4种鱼类病原菌均有裂解作用(见表2),我们又采用其中3个水样,以9899菌作为增殖宿主菌纯化菌株后,再对4株致病菌进行裂解。其结果(见表3)与表2的结果有所不同。其可能原因是:一种水样中存在多种蛭弧菌,当仅以施氏假单胞菌为宿主菌时,有些类型蛭弧菌就无法增殖,故无法分离之,导致裂解范围缩小。

(3) 蛭弧菌作为一种细菌的寄生菌常与宿主菌同在,两者不易分开,例如,呈融合性裂解的平板浸泡液蛭弧菌浓度可达 10^8 pfu/mL,而残留宿主菌仍为 10^5 cfu/mL。为了避免残留宿主菌对鱼类的不良影响,本次选用了经攻毒试验证实对鱼类无致病性的施氏假单胞菌(9899)作为蛭弧菌的增殖宿主菌。但从表3裂解范围

看,似有裂解范围缩小,或裂解时间延长的趋势。还需增加试验菌株进行深入的实验研究,以选出最佳增殖宿主菌及蛭弧菌菌株。

蛭弧菌被认为是自然界的自净因子之一。从本实验研究结果来看,蛭弧菌对鱼类致病菌有裂解作用,本研究为鱼类细菌性疾病的生物学防治提供了可用资料。而一旦将蛭弧菌应用于水产业,还须考虑其对水生生物及生态环境影响等诸方面的问题。关于蛭弧菌应用于生物防治鱼类细菌性疾病的研究正在进行中。

参 考 文 献

- [1] Stolp P H, Starr M P. *Antonie Van Leeuwenhoek Microbiol Serol*, 1963, 29:217~248.
- [2] 司稚东,秦生巨,秋频等. 中华微生物学和免疫学杂志, 1982, 2(1): 10.
- [3] 赵建民. 北京水产, 1998, 3: 21~22.
- [4] 王秀茹,高徽,梁钢等. 微生物学通报, 1994, 21(4): 228~232.
- [5] 赵孝先,蔡勉,白毓谦等. 微生物学杂志, 1990, 10(1~2): 80~89.