

海洋蛭弧菌的分离鉴定及其对副溶血弧菌的作用

储卫华^{1*} 朱 卫¹ 康春涛²

(1. 中国药科大学生命科学与技术学院 江苏 南京 210009)

(2. 江苏星海动物药业科技有限公司 江苏 东台 224233)

摘要: 蛭弧菌广泛存在于自然水体, 具有噬菌的特性, 对水体中细菌数量控制具调节作用。以副溶血弧菌为宿主菌, 利用双层琼脂法, 从海洋水体中分离出 15 株具有噬菌作用的细菌, 对形成噬菌斑能力最强的 1 株菌株进行特异性 16S rDNA 扩增, 确认为蛭弧菌, 命名为 Bd-M1。Bd-M1 对大多数海水养殖动物病原菌有裂解作用, 裂解率在 90%(20/22) 以上, 模拟水环境实验发现, 蛭弧菌对副溶血弧菌有较强的裂解和净化作用, 102 h 内能使副溶血弧菌从 3.0×10^8 CFU/mL 下降到 8.7×10^3 CFU/mL。动物实验表明蛭弧菌能有效预防对虾弧菌病的发生, 表明蛭弧菌有望成为水产动物疾病防治的一种有效的生物制剂。

关键词: 副溶血弧菌, 蛭弧菌, 对虾, 生物防治

Isolation, Identification of Marine *Bdellovibrios* and Its Effect on *Vibrio parahaemolyticus*

CHU Wei-Hua^{1*} ZHU Wei¹ KANG Chun-Tao²

(1. Department of Microbiology, School of Life Science & Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

(2. Jiangsu Xinghai Veterinary Pharmaceutical Co., Ltd., Dongtai, Jiangsu 224233, China)

Abstract: *Bdellovibrios* are obligate predatory bacteria, widely distribute in nature and regulate the counts of bacterium in water. Fifteen strains of predatory bacteria were isolated from marine environment using *Vibrio parahaemolyticus* DX-1 as host and one of them formed large plaques designated as Bd-M1. The strain was confirmed by *Bdellovibrio* species-specific 16S rDNA fragment amplified using PCR method. Determination of host range on species of fish pathogenic bacteria (*Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio vulnificus* and *Edwardsiella tarta*) indicated that Bd-M1 was able to parasitize 20 strains out of a total of 22 tested. Co-culture experiment shown that Bd-M1 have purification function on *Vibrio parahaemolyticus*, the number of *V. parahaemolyticus* decreased from 3.0×10^8 CFU/mL to 8.7×10^3 CFU/mL during 102 h. Immersion *Penaeus vannamei* in water at different concentration of Bd-M1 was used in protection against experimental infection with *V. parahaemolyticus* DX-1 infection. Results shown that the mortality of groups bathed with Bd-M1 was lower than that group without Bd-M1. These results suggest that it may be possible to use *bdellovibrio* to control fish disease.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, *Bdellovibrios*, *Penaeus vannamei*, Bio-therapy

随着海洋集约化水产养殖业的发展, 新的病害越来越多, 抗生素的使用在一定程度上促进了养殖业的发展, 但同时由于药物的长期使用, 细菌耐药菌株不断出现, 使得抗生素使用量增加而药物效果却不明显, 同时药害也越来越明显, 生物预防日益显出其优越性。蛭弧菌(*Bdellovibrio*)是一类寄生于其他细菌并能导致其裂解的一类细菌。它虽然比通常的细菌小, 能通过细菌滤器, 有类似噬菌体的作用, 但它不是病毒, 是一类能“吃掉”细菌的细菌。1962年首次发现于菜豆叶烧病假单胞菌体中, 随后从土壤和污水中都分离到了这种细菌^[1]。目前, 国内外对蛭弧菌的形态、分布和生物学特性等基础性研究报道较多, 而将蛭弧菌应用于水产病害防治方面的应用已有报道^[2-5], 但对其作为生物防治的基础性研究报道较少。

本研究以对虾病原菌——副溶血弧菌为宿主菌, 从海洋环境中分离蛭弧菌, 对其裂解谱和对副溶血弧菌的净化作用及蛭弧菌防治对虾弧菌病做了初步研究, 为蛭弧菌作为生物防治的应用提供了科学依据, 并为海水养殖动物疾病的防治提供了一种绿色的有效方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样本的来源及采集: 2007年7~8月采集于江苏大丰沿海对虾养殖场及其周边排水沟, 虾池水、虾池底泥水、排水沟水及排水沟底泥水, 样品采集后冷藏运至本实验室, 将100 mL的样品液通过0.22 μm的微孔滤膜过滤后用10 mL的pH 7.2的PBS冲洗下来备用。

1.1.2 宿主菌株: 用于分离、培养和检测蛭弧菌的宿主菌共22株, 蛭弧菌分离用菌株为副溶血弧菌DX-1, 系作者自行分离自患病对虾, 其他菌株为弧菌和爱德华菌, 由本研究室保存。蛭弧菌标准菌株, 噬菌蛭弧菌109 J由以色列希伯来大学Edouard Jurkevitch教授惠赠。

1.1.3 培养基: 宿主菌培养基为营养肉汤培养基(含氯化钠1.0%), 蛭弧菌分离和纯化用培养基为双层琼脂, 下层为含1.5%琼脂的海水琼脂, 上层用含0.7%琼脂的1/10的牛肉膏蛋白胨液体(Nutrient broth, NB)培养基。

1.1.4 主要试剂和仪器: dNTPs、*Taq* 酶、PCR 缓

冲液、UNIQ-10 柱式基因组DNA抽提试剂盒、均购自上海生工生物工程公司。

1.2 蛭弧菌菌株的分离和初步鉴定

1.2.1 蛭弧菌分离: 采用双层琼脂平板法^[6]。取100 μL预处理的样品浓缩重悬液加入含有400 μL副溶血弧菌DX-1悬液的试管中, 混匀; 然后加入5 mL融化后冷却至50°C左右灭菌含0.7%的1/10 NB的半固体培养基, 充分摇匀后, 倾注至27°C预热的灭菌1.5%海水琼脂固体平板, 27°C培养箱内培养。定期观察记录噬斑产生情况。待有明显噬菌斑后, 挑取不同噬斑双层琼脂平板法传代, 单斑传代至无杂菌、噬斑均一为止。根据噬菌斑大小判断其噬菌能力, 噬菌斑大者为噬菌能力强。

1.2.2 特异性引物PCR: 为从基因水平印证所分离到的菌株为蛭弧菌, 采用UNIQ-10 柱式基因组DNA抽提试剂盒, 提取蛭弧菌基因组DNA, 进行特异性PCR扩增反应。蛭弧菌109J的DNA为阳性对照。参考文献[7]设计特异性PCR引物。上游引物(63F): 5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3', 下游引物(Bd-842R): 5'-CGWCACTGAAGGGTCA A-3', 引物由宝生物大连有限公司合成。参照文献[8]进行PCR扩增。采用50 μL反应体系, 其比例如下: 7.5 μL的10 ×PCR buffer(含Mg²⁺ 1.5mmol/L), 0.4 μL的dNTPs (10 mmol/L), *Taq*酶0.625 μL(2 U/μL), 引物各2 μL, 5 μL模板(10 ng/μL)。PCR反应条件: 94°C 5 min; 94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 1 min, 循环32次; 延伸72°C 5 min。琼脂糖凝胶电泳检查扩增结果。

1.3 蛭弧菌对22株水产致病菌的裂解谱

采用双层琼脂法研究3株蛭弧菌海洋分离株对22株海水养殖动物致病菌的裂解情况, 在102 h内平板上出现噬菌斑, 就说明蛭弧菌对该细菌有裂解作用, 裂解率=能形成噬菌斑的菌株数/总菌株数 × 100%。

1.4 水体中蛭弧菌对弧菌的裂解

将蛭弧菌Bd-M1(终浓度为5.0 × 10⁵ PFU/mL)与副溶血弧菌DX-1(终浓度为3.0 × 10⁸ CFU/mL)接种到装有100 mL灭菌海水的三角烧瓶中, 27°C、200 r/min振荡培养, 在不同时间下取样检测蛭弧菌和副溶血弧菌的数量, 以相同浓度的副溶血弧菌DX-1作对照。

1.5 蛭弧菌对对虾人工感染弧菌病防治实验

南美白对虾购自江苏大丰某水产养殖场, 规格

表 1 海洋蛭弧菌分离株对常见病原菌的裂解作用
Table 1 Lytic activities of *Bdellovibrios* isolated from marine on pathogenic bacteria

宿主菌 Host	海洋蛭弧菌 Marine <i>Bdellovibrios</i>		
	Bd-M1	Bd-M2	Bd-M3
副溶血弧菌			
DX-1	+	+	+
DX-2	+	+	+
DX-3	+	+	+
DX-4	+	+	-
HY-2	+	+	+
Vp1	+	+	+
Vp2	+	+	+
89001	+	-	+
溶藻弧菌			
HY-1	+	+	+
Val	+	+	+
鳗弧菌			
E-3-11	+	-	+
M8-1	+	+	+
哈维氏弧菌			
BK	+	+	+
海-1	+	+	+
创伤弧菌			
Vv-1	+	+	+
A1	+	+	+
A2	+	+	-
迟缓爱德华菌			
M1	-	+	+
M2	+	+	+
ET-1	+	-	+
ET-13	-	-	+
ET753	+	+	-

为 8 cm~10 cm, 暂养于 200 L 的水族箱内, 水温为 25°C~28°C, 盐度为 5~6。水族箱不间断连续充气, 每天投饵 2 次(早晚各 1 次), 投饵量为实验对虾体重的 3%左右, 每天吸污、换水, 换水量为 30%。驯养 7 d 后确认无病用于实验。

实验设 4 个组, 每组 100 尾对虾。分别向 1~3 组水族箱内投放终浓度 5.0×10^8 CFU/mL 的副溶血弧菌 DX-1 培养物, 向 1、2 两组同时投放终浓度为 5.0×10^5 PFU/mL、 5.0×10^3 PFU/mL 的蛭弧菌 Bd-M1, 第四组为对照, 不加任何菌液(表 2)。每天观察对虾死亡情况和发病情况。每组设 3 个重复, 试验期为 7 d。

2 结果

2.1 蛭弧菌的分离结果

经双层平板法分离纯化, 获得 15 株具有噬菌能力的菌株, 其中 3 株对对虾副溶血弧菌 DX-1 裂解能力较强的蛭弧菌, 24 h 能形成噬菌斑, 并且噬菌斑较大, 分别命名为 Bd-M1、Bd-M2、Bd-M3。选用 Bd-M1 做进一步的实验研究(图 1)。

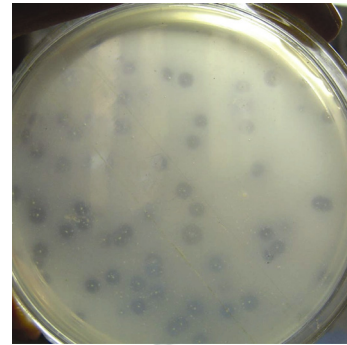


图 1 海洋蛭弧菌 Bd-M1 在以副溶血弧菌 DX-1 为宿主菌的双层平板上形成的噬菌斑

Fig. 1 Plaques formed of Bd-M1 on double plate with *V. parahaemolyticus* DX-1 as host

2.2 蛭弧菌特异性 PCR 扩增反应

为从基因水平上证实所分离到的菌株为蛭弧菌, 根据蛭弧菌 16Sr DNA 序列设计引物, 对 Bd-M1 进行特异性 PCR 扩增反应。以噬菌蛭弧菌 109J 和对对虾致病菌副溶血弧菌 DX-1 的 DNA 为阳性对照和阴性对照。扩增序列经琼脂糖电泳, 结果如图 2 所示, Bd109J 和分离株 Bd-M1 在预定的区域内(约 800 bp)均出现扩增条带, 而阴性对照则无条带出现, 由此可以证实分离菌株为蛭弧菌。

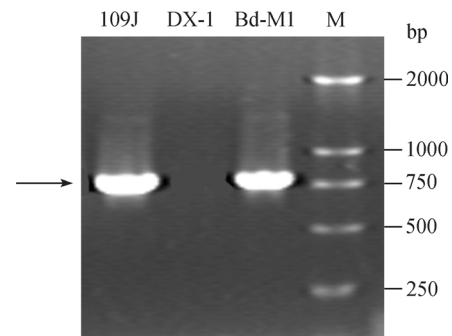


图 2 蛭弧菌 16S rDNA 基因扩增产物琼脂糖电泳结果
Fig. 2 PCR amplification of *Bdellovibrio* 16S rDNA

2.3 蛭弧菌对副溶血弧菌的裂解效果

采用双层琼脂法研究 3 株蛭弧菌海洋分离株对

表 2 海洋蛭弧菌对对虾人工感染副溶血弧菌的保护

Table 2 Protection effect of marine *Bdellovibrios* on the treatment of *Penaeus vannamei* infected with *V. parahaemolyticus*

组别 Groups	DX-1 浓度 Concentration of DX-1 (CFU/mL)	Bd-M1 浓度 Concentration of Bd-M1 (PFU/mL)	对虾死亡数 The number of dead <i>Penaeus vannamei</i>			平均死亡率 Mortality (%)
			重复 1 Repeat 1	重复 2 Repeat 2	重复 3 Repeat 3	
1	5.0×10^8	5.0×10^5	7	6	6	6.3
2	5.0×10^8	5.0×10^3	24	27	35	28.7
3	5.0×10^8	—	56	78	81	71.7
4	—	—	0	0	0	0

22 株海水养殖动物致病菌的裂解情况, 结果表明所分离的 3 株蛭弧菌对常见的海水养殖动物致病菌有较好的裂解效果, 裂解率在 80% 以上。模拟自然环境中海洋蛭弧菌 Bd-M1 对副溶血弧菌 DX-1 的裂解效果, 结果(图 3)表明, 海洋蛭弧菌 Bd-M1 对副溶血弧菌 DX-1 有良好的裂解作用。实验表明, 海洋蛭弧菌与副溶血弧菌同时存在于灭菌海水中振荡, 副溶血弧菌数量不断下降, 到 102 h 时仅为 8.7×10^3 CFU/mL, 而蛭弧菌的数量却不断上升, 102 h 时达到 5.6×10^7 PFU/mL; 而仅接种副溶血弧菌的对照组, 其细菌数在短暂上升后缓慢下降, 102 h 时其浓度下降为 4.5×10^7 CFU/mL。

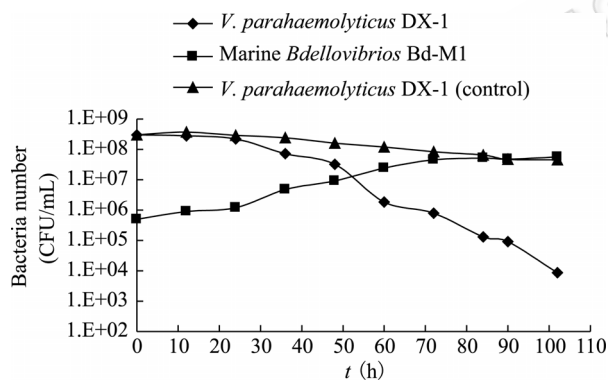


图 3 海洋蛭弧菌 Bd-M1 对副溶血弧菌 DX-1 的裂解效果
Fig. 3 Lytic effect of marine *Bdellovibrios* Bd-M1 on *V. parahaemolyticus* DX-1

2.4 海洋蛭弧菌 Bd-M1 对对虾人工感染副溶血弧菌 DX-1 的保护性实验

通过浸泡对对虾进行人工感染副溶血弧菌, 并在不同组投放不同浓度的海洋蛭弧菌 M1, 7 d 后对虾的死亡率见表 2。由实验结果可见蛭弧菌的浓度越高, 其保护率越高。蛭弧菌浓度在 5.0×10^5 PFU/mL 时, 对虾的平均死亡率为 6.3%, 而蛭弧菌浓度为 5.0×10^3 PFU/mL 时, 对虾的平均死亡率为 28.7%, 对照组死亡率为 71.7%。

3 讨论

弧菌是海水养殖动物常见的病原菌之一, 能感染大多数对虾品种, 病虾主要表现为不摄食, 在池边缓慢游动, 对外界刺激反应迟钝, 应激能力差, 体表发红, 肝胰脏病变或坏死等^[9]。目前对水产养殖动物细菌病多用抗生素进行防治, 但其弊端日益明显, 寻找抗生素替代产品防治水产养殖病害已成为人们研究的热点。蛭弧菌(*Bdellovibrio*)是一类专门以捕食细菌为生的寄生性细菌, 它具有“裂解”细菌的生物学特性, 有望成为“活抗生素”^[10]。

蛭弧菌在自然水体广泛存在, 已有学者从海洋环境分离出蛭弧菌及其类食物。本研究从海水养殖场的水体中分离出具有噬菌特性的细菌 15 株, 经初步鉴定, 其中 3 株对副溶血弧菌有较强裂解能力的菌株为蛭弧菌。研究发现所分离的蛭弧菌对海水养殖动物常见的病原菌有较好的裂解效果, 3 株菌的裂解率均在 80% 以上, 说明蛭弧菌对水体中细菌数的控制有一定的作用。韩韞等^[11]在研究蛭弧菌清除海产品致病弧菌时发现, 其从海洋环境中分离的 4 株蛭弧菌对致病弧菌的裂解率为 24%、43.8%、68.8% 和 75%; 黄冬菊等^[12]通过模拟实验发现蛭弧菌对海水弧菌有很好的净化作用, 这与本研究重发现共培养体系中副溶血弧菌数量不断下降的结果相似。本研究还发现, 蛭弧菌对对虾感染副溶血弧菌有明显的预防效果, 能有效降低副溶血弧菌感染引起的对虾死亡率的降低, 研究发现, 蛭弧菌对对虾副溶血弧菌感染的控制与其使用浓度有关, 在 5.0×10^5 PFU/mL 时, 死亡率仅为 6.3%。众所周知, 细菌性鱼病的发生与水体中致病菌的数量有着密切的联系, 致病菌达到一定数量才能导致鱼病的发生, 有研究发现水体中弧菌总数高于 10^4 CFU/mL 对虾会发病^[13], 本

研究表明投放蛭弧菌可控制水中副溶血弧菌的数量,使其达不到发病数量,从而降低了对虾的发病率和死亡率,这一结果与杨莉等研究蛭弧菌预防嗜水气单胞菌感染的结果类似^[14]。采用生物净化因子以消除水产养殖动物致病菌的数量,从源头防治由其引起的感染性疾病是符合绿色养殖、生态养殖的研究方向。本研究结果为将蛭弧菌裂菌技术应用用于环境净化及水产病害生物防治奠定了基础,为将蛭弧菌作为一种生物“消毒剂”应用于环境净化提供了依据。

参 考 文 献

- [1] Strauch E, Beck S, Appel B. *Bdellovibrio* and like Organisms: Potential Sources for New Biochemicals and Therapeutic Agents? In *Predatory Prokaryotes*. (E. Jurkevitch, ed), Berlin/Heidelberg: Springer, 2006, pp.131-152.
- [2] 杨吉霞, 徐 丽, 蔡俊鹏. 海水养殖中应用蛭弧菌控制病原菌的前景与问题. 湛江海洋大学学报, 2004, 24(3): 79-82.
- [3] 黄华伟, 邓时铭, 廖伏初. 蛭弧菌的生物学特性及其在刺参养殖中的应用前景. 河北渔业, 2008, 173(5): 1-4.
- [4] 杨先乐, 曹海鹏, 钱云云. 噬菌蛭弧菌——水产动物病害生物防治的新工具. 淡水渔业, 2006, 36(2): 55-60.
- [5] 刘朝阳, 罗海中. 噬菌蛭弧菌及其在大菱鲆养殖中的应用探讨. 水产科技情报, 2007, 34(6): 271-274.
- [6] Starr MP, Stolp H. *Bdellovibrio* methodology. In *Methods in Microbiology*. J. R. Norris, ed. London: Academic Press, 1976, pp.217-244.
- [7] Jurkevitch E, Ramati B. Design and uses of a *Bdellovibrio* 16S rRNA-targeted oligonucleotide. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 184: 265-271.
- [8] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 第二版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999, pp.233-292.
- [9] 陶保华, 胡超群, 任春华. 海水鱼类病原弧菌对对虾的致病力及其疫苗的免疫预防. 热带海洋学报, 2001, 20(4): 68-73.
- [10] Sockett RE, Lambert C. *Bdellovibrio* as therapeutic agents: a predatory renaissance? *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2: 669-675.
- [11] 韩 韪, 蔡俊鹏, 宋志萍, 等. 应用蛭弧菌清除海产品潜在致病弧菌的研究. 水产科学, 2005, 24(11): 23-25.
- [12] 黄冬菊, 林红华, 白泉阳. 噬菌蛭弧菌微生态制剂对海水中弧菌的净化作用. 福建畜牧兽医, 2002, 24(5): 4.
- [13] 靳素英, 张成刚, 崔明学. 自然环境中噬菌体与其宿主间的相互作用. 生态学杂志, 1998, 17(3): 42-45.
- [14] 杨 莉, 马志宏, 黄 文, 等. 蛭弧菌对鲤感染嗜水气单胞菌预防效果的观察. 大连水产学院学报, 2000, 15(4): 288-292.

稿件书写规范

论文中阿拉伯数字的使用

凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方均应使用阿拉伯数字。世纪、年代、年、月、日、时刻必须使用阿拉伯数字,年份必须用全称。对科技期刊来说,凡处在计量单位和计数单位前面的数字,包括9以下的各位数字,除个别特例外,均应使用阿拉伯数字。不是表示科学计量和有统计意义数字的一位数可以用汉字,例如:一本教材、两种商品等。