

异育银鲫肠道蛭弧菌的分离及其生物学特性的研究*

曹海鹏 杨先乐** 钱云云 邓 璐

(农业部渔业动植物病原库上海水产大学 上海 200090)

摘要:以一株具有致病力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蛭弧菌,暂命名为BDF-H16。通过光学显微镜、相差显微镜、电子显微镜对蛭弧菌BDF-H16进行形态观察,并研究了其部分生物学特性。结果表明:蛭弧菌BDF-H16为革兰氏阴性菌,杆形或弧杆形,端生一根鞭毛,菌体大小多为 $0.2\mu\text{m} \sim 0.5\mu\text{m} \times 0.8\mu\text{m} \sim 1.2\mu\text{m}$;蛭弧菌BDF-H16对实验所选用的革兰氏阴性菌和部分革兰氏阳性菌均有裂解作用;以大肠杆菌为宿主菌,其最佳生长条件为宿主菌浓度 $6.75 \times 10^9 \text{ cfu/ml}$ 、 $\text{pH} 7.0 \sim 7.5$ 、温度 28°C ;在NaCl含量 $0.85\% \sim 5.00\%$ 的培养基中能够生长;恩诺沙星、诺氟沙星对其有抑制作用。

关键词:异育银鲫, 蛭弧菌, 分离, 生物学特性

中图分类号: Q939.96 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2007) 01-0052-05

Isolation of *Bdellovibrio* Bacteria from the Gut of *Carassius auratus gibelio* and the Study of its Biological Characteristics*

CAO Hai-Peng YANG Xian-Le** QIAN Yun-Yun DENG Lu

(Aquatic Pathogen Collection Center of Ministry of Agriculture, SHFU, Shanghai 200090)

Abstract: *Bdellovibrio* bacteria BDF-H16 was isolated from the gut of *Carassius auratus gibelio* with *Aeromonas sobria*. Its shape was observed by light microscopy, phase-contrast microscopy, electron microscopy and some of its biological characteristics were also studied. It was demonstrated that BDF-H16 was an gram-negative bacterium and had a bacilliform or arc bacilliform shape with a flagellum at one end. Its size was mostly $0.2\mu\text{m} \sim 0.5\mu\text{m} \times 0.8\mu\text{m} \sim 1.2\mu\text{m}$. It had a wide prey area and could lyse all tested gram-negative bacteria and some gram-positive bacteria. The best lysis conditions to *Escherichia coli* were $6.75 \times 10^9 \text{ cfu/mL}$ of prey bacteria concentration, $\text{pH} 7.0 \sim 7.5$, 28°C . It could grow in the solid culture added $0.85\% \sim 5.00\%$ NaCl and was inhibited by enrofloxacin and norfloxacin.

Key words: *Carassius auratus gibelio*, *Bdellovibrio* bacteria, Isolate, Biological characteristics

蛭弧菌是一类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为筛选宿主菌,从异育银鲫肠道中分离到一株蛭弧菌,并对其形态、噬菌范围、耐盐性、抗药性以及最适生长条件(宿主菌浓度、pH、温度)等生物学特性进行了研究,以期丰富蛭弧菌的生态分布特性,为蛭

弧菌的培养以及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,平均体长为5 cm,平均体重为10g,由江苏省兴化市某养殖场提供,在实验室暂养1个月。

*上海市重点学科建设资助项目 (No. Y1101)

上海市教育委员会 E-研究院建设资助项目 (No. E03009)

**通讯作者 Tel: 021-65710870, Email: xlyang@shfu.edu.cn

收稿日期: 2006-03-15, 修回日期: 2006-06-09

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) (pH7.2), 10 倍稀释的普通营养肉汤 (1/10NB) (pH7.2), 生理盐水 (0.85%), 均在 1×10^5 Pa 高压湿热灭菌 20min 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%。

恩诺沙星溶液 (500 μ g/mL), 诺氟沙星溶液 (500 μ g/mL)。

1.4 蛭弧菌的分离与纯化

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℃、150r/min 摇床振荡培养 24h, 然后将培养物于 4℃、4,000r/min 离心 20min, 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 蛭弧菌的分离、纯化与培养: 蛭弧菌分离与计数采用自来水双层琼脂平板法^[2], 分离方法如下: 将各检滤液 300 μ L 与温和气单胞菌悬液 100 μ L 加入半固体软琼脂中, 混匀后倾注于自来水平板上, 待凝固后 30℃ 恒温培养, 观察噬斑产生情况。若有噬斑产生, 挖取单个噬斑经过 4 次以上传代培养获得纯蛭弧菌株。

以大肠杆菌为宿主菌, 挖取蛭弧菌单个噬斑于 1/10NB 中, 于 30℃、150r/min 下摇床振荡培养, 直至蛭弧菌浓度大于 10^5 pfu/mL, 于 4℃ 冰箱保存。

1.5 蛭弧菌形态观察

将新鲜培养的蛭弧菌进行革兰氏染色, 在光学显微镜油镜下观察; 选取蛭弧菌噬斑在相差显微镜油镜下观察其活动; 用载网贴斑法^[3] 在电子显微镜下观察其形态。

1.6 蛭弧菌寄生性的测定

采用自来水双层琼脂平板法^[2], 检测蛭弧菌对 1.1 选用的各宿主菌株 (8.0×10^{11} cfu/mL) 的裂解性, 记录出斑时间、噬斑数目以及噬斑大小。

1.7 蛭弧菌最适生长条件的测定

采用自来水双层琼脂平板法^[2], 以大肠杆菌为宿主菌, 检测蛭弧菌在不同浓度宿主菌 (6.75×10^9 , 6.75×10^7 , 6.75×10^5 , 6.75×10^3 cfu/mL)、不同初始 pH 范围 (6.0~6.5, 6.5~7.0, 7.0~7.5, 7.5~8.0, 8.0~8.5, 8.5~9.0)、不同温度 (15℃, 20℃, 28℃, 33℃) 等条件下的生长情况, 记录出斑时间、噬斑数日以及噬斑大小。

1.8 蛭弧菌耐盐性的测定

采用自来水双层琼脂平板法^[2], 以大肠杆菌为宿主菌, 检测蛭弧菌在含不同浓度 NaCl (0.85%, 5.00%, 10.00%, 15.00%, 25.00%) 的培养基中的生长情况, 记录出斑时间、噬斑数目以及噬斑大小。

1.9 蛭弧菌耐药性的测定

采用自来水双层琼脂平板法^[2], 以大肠杆菌为宿主菌, 检测蛭弧菌对不同浓度恩诺沙星和诺氟沙星的耐受性, 记录噬斑数日以及噬斑大小。

2 结果

2.1 蛭弧菌的分离与纯化

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斑, 噬斑大小在 1.5mm~3.0mm 不等。根据噬斑的形状、大小及透明度, 从中挑选出 4 个透明、深且大的噬斑进行纯化, 纯化 4 代后, 初筛得到一株活性较好的纯株, 暂命名为 BDF-H16。

2.2 蛭弧菌的培养特征

蛭弧菌 BDF-H16 在固体培养 120h 后, 在自来水双层琼脂平板上形成的噬斑相似, 均为圆形、透明、清晰、光滑、边缘整齐 (图 1-1, 图 1-2), 这是蛭弧菌典型的噬斑^[3]。噬斑直径一般约为 2mm, 噬斑大小随时间的延长而不断增大, 最大噬斑直径可达 4mm, 并且有噬斑融合现象。

2.3 蛭弧菌的形态特征

蛭弧菌 BDF-H16 为革兰氏阴性菌, 在油镜下菌体为杆状或弧杆状 (图 1-3), 菌体大小一般为 0.2 μ m~0.5 μ m \times 0.8 μ m~1.2 μ m, 也有菌体长为 3.2 μ m 的较长个体; 在相差显微镜下可见蛭弧菌 BDF-H16 运动活泼, 偶尔可见其吸附宿主菌的现

象；电镜下蛭弧菌 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

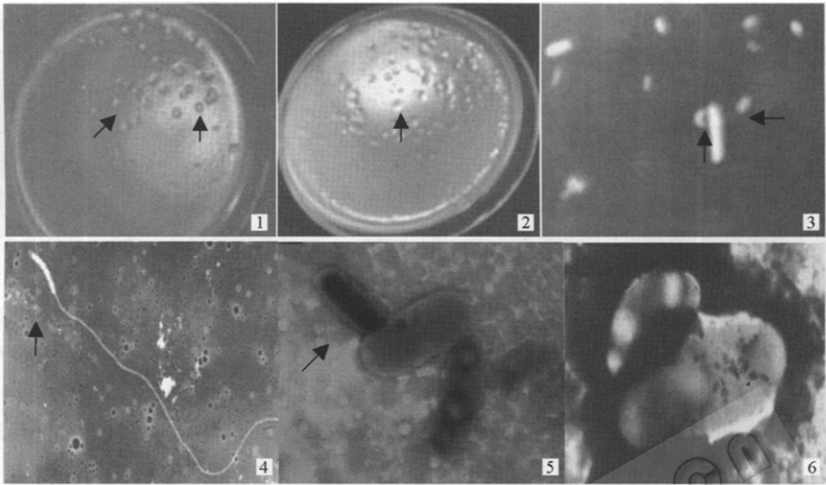


图 1 蛭弧菌 BDF-H16 的噬菌斑及其在显微镜和电镜下的形态

1 蛭弧菌 BDF-H16 培养 72h 的噬斑, 2 蛭弧菌 BDF-H16 培养 120h 的噬斑, 3 显微镜 (×100) 下蛭弧菌 BDF-H16 通过 Moti Images Advanced 3. 0 放大 10 倍的图像, 4 电镜下蛭弧菌 BDF-H16 的较长个体 (×5,800), 5 电镜下吸附宿主菌的蛭弧菌 BDF-H16 (×14,000), 6 电镜下侵入宿主菌的蛭弧菌 BDF-H16 (×19,000)

2.4 蛭弧菌的噬菌范围

蛭弧菌 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性，但对实验选用的芽孢杆菌无裂解性（表 1）。此外，蛭弧菌 BDF-

H16 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蛭弧菌 BDF-H16 敏感性较革兰氏阳性菌大，相同实验条件下，前者出斑时间要比后者早。

表 1 蛭弧菌 BDF-H16 对各宿主菌的裂解性

实验菌株			出斑时间	噬斑直径	噬斑数目
属	种	株	(h)	(mm)	(PFU)
气单胞菌 <i>Aeromonas</i>	温和气单胞菌 <i>A. sobria</i>	1	72	1.5 ~ 3	48
	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	1	80	2 ~ 2.5	24
	豚鼠气单胞菌 <i>A. caviae</i>	1	80	2 ~ 3	20
发光杆菌 <i>Photobacterium</i>	美人鱼发光杆菌	1	80	2	15
	<i>P. damsela</i> subsp.				
利斯顿菌 <i>Listonella</i>	鳗利斯顿菌 <i>L. anguillarum</i>	1	72	2 ~ 3	26
希瓦菌 <i>Shewanella</i>	腐败希瓦菌 <i>S. putrefaciens</i>	1	96	2 ~ 3	19
	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	1	80	2 ~ 2.5	24
弧菌 <i>Vibrio</i>	溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	1	72	2 ~ 3	15
	哈氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	1	96	1.5	9
		1	96	2 ~ 3	27
爱德华氏菌 <i>Edwardsiella</i>	迟钝爱德华氏菌 <i>E. tarda</i>	1	96	2.5	31

续表 1

埃希氏菌 <i>Escherichia</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	1	48	2~3	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	6
微球菌 <i>Micrococcus</i>	藤黄微球菌 <i>M. luteus</i>	1	144	2	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，下同

2.5 蛭弧菌的最适生长条件

结果见表2、表3、表4。在固体培养条件下，蛭弧菌 BDF-H16 在宿主浓度 $6.75 \times 10^5 \sim 6.75 \times 10^9$ cfu/mL、pH6.0~8.5、温度 20℃~33℃ 范围内均能生长，在宿主浓度 6.75×10^3 cfu/mL、pH8.5~9.0、15℃ 不生长；而且宿主浓度 6.75×10^9 cfu/mL、pH7.0~7.5、28℃ 是其最适生长条件，主要表现在产生噬斑的时间最早，噬斑的数目最多（表2、表3和表4）。

表2 蛭弧菌 BDF-H16 在不同浓度宿主悬液条件下的生长

浓度 log (cfu/mL)	出斑时间 (h)	噬斑直径 (mm)	噬斑数目 (PFU)
9.83	60	4.0~5.0	43
7.83	72	2.5~4.0	16
5.83	96	3.0~4.0	10
3.83	-	-	-

表3 蛭弧菌 BDF-H16 在不同 pH 条件下的生长

pH	出斑时间 (h)	噬斑直径 (mm)	噬斑数目 (PFU)
6.0~6.5	56	1.5	44
6.5~7.0	48	1.0	116
7.0~7.5	48	1.0	160
7.5~8.0	60	1.5~2.0	30
8.0~8.5	60	2.0	36
8.5~9.0	-	-	-

表4 蛭弧菌 BDF-H16 在不同温度条件下的生长

温度 (℃)	出斑时间 (h)	噬斑直径 (mm)	噬斑数目 (PFU)
15	-	-	-
20	72	1.5	12
28	36	0.5~1.0	320
33	36	0.5~1.0	220

2.6 蛭弧菌的耐盐性

结果见表5。蛭弧菌 BDF-H16 在 NaCl 含量 0.85%~5% 的培养基中能够生长，但 NaCl 浓度增加对其生长具有一定程度的抑制作用，如在 NaCl 含量 5% 的培养基中，蛭弧菌 BDF-H16 产生噬斑数目比在 0.85% NaCl 条件下少，在 NaCl 含量大于 10% 的培养基中，蛭弧菌不生长。

表5 蛭弧菌 BDF-H16 的耐盐能力

NaCl 含量 (%)	出斑时间 (h)	噬斑直径 (mm)	噬斑数目 (PFU)
0.85	48	2	58
5.00	60	1	36
10.00	-	-	-
15.00	-	-	-
25.00	-	-	-

2.7 蛭弧菌对抗菌药物的敏感性

结果见表6、表7。诺氟沙星、恩诺沙星对蛭弧菌 BDF-H16 的生长均有抑制性，但抑制程度不同。蛭弧菌 BDF-H16 对恩诺沙星的耐受性较强些，如当培养基中含 5μg/mL 诺氟沙星时，蛭弧菌 BDF-H16 的出斑率较对照组降低了 86.8%，而在同样浓度恩诺沙星条件下，蛭弧菌 BDF-H16 的出斑率较对照组降低了 27.3%。

表6 蛭弧菌 BDF-H16 对诺氟沙星的敏感性

诺氟沙星浓度 (μg/mL)	噬斑直径 (mm)	噬斑数目 (PFU)
0	2.0	91
5	3.0	12
10	3.5	4
20	2.5	2
50	-	-

注：以上是蛭弧菌培养 56h 的结果

表7 蛭弧菌 BDF-H16 对恩诺沙星的敏感性

恩诺沙星浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	噬斑直径 (mm)	噬斑数目 (PFU)
0	3.0	44
5	2.5~2.0	32
10	1.5	11
20	—	—
50	—	—

注：以上为蛭弧菌培养 56h 的结果

3 讨论

在自然界中蛭弧菌、噬菌体、真菌、粘液菌和原虫都可能产生噬斑^[3]，因此在分离时必须将蛭弧菌产生的噬斑与其它微生物产生的噬斑加以区别。排除方法除了观察噬斑的大小、形状、出现时间外，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获得了蛭弧菌 BDF-H16，不仅丰富了蛭弧菌的分布特性，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。

邢华等^[4]以嗜水气单胞菌为宿主菌，研究了蛭弧菌 BDNAI 的最适生长条件，认为蛭弧菌 BDNAI 的最适生长条件为 pH7.0~8.0、温度 25℃ 或 30℃。邵桂元等^[5]以点状气单胞菌为宿主菌，检测了 6 株蛭弧菌的最适生长条件，发现 6 株蛭弧菌的最适生长条件为 pH7.2、温度 25℃~28℃ 均生长良好。本实验以大肠杆菌为宿主，发现蛭弧菌 BDF-H16 的最适生长条件为 pH7.0~7.5、温度 28℃，与上述^[4,5]的研究结果有所差异，这可能是蛭弧菌之间的菌株差异，也可能与选用的宿主菌不同有关。此外，实验发现大肠杆菌悬液浓度小于 10^4 cfu/mL 时，蛭弧菌 BDF-H16 不生长，这与 Rice 等^[6]的报道是一致的。

杨淑专等^[7]、Pineiro 等^[8]对蛭弧菌的噬菌范围作了研究，已证实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。本实验表明蛭弧菌 BDF-H16 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，但各菌株对蛭弧菌 BDF-H16 的敏感性有所不同。其中蛭弧菌 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^[9]。但杨淑专等^[7]报道蛭弧菌对枯草杆菌也能裂解，这可能与蛭弧菌的菌株不同有关。

关于药物对蛭弧菌活性的影响，1971 年 Wehr 和 Kelven^[10]曾经研究了除草剂对蛭弧菌活性的影响，发现 11 种除草剂能够抑制蛭弧菌噬斑的产生。本实验发现，诺氟沙星、恩诺沙星对蛭弧菌 BDF-H16 的生长也具有抑制作用，主要表现在随着药物剂量的增加，产生噬斑的数目下降，这说明诺氟沙星、恩诺沙星能够降低蛭弧菌的活性，因此，蛭弧菌与诺氟沙星、恩诺沙星在细菌性病害防治时不能同时使用。

参考文献

- [1] Klein D A, Casida J. Can J Microbiol, 1967, 13 (9): 1235~1241.
- [2] Stolp H, Starr M P. J Microbiol Serol, 1963, 29: 217~248.
- [3] 王秀茹, 高 康, 梁 钢, 等. 微生物学通报, 1994, 21 (4): 228~232.
- [4] 邢 华, 何义进, 黄 钰, 等. 淡水渔业, 1997, 27 (1): 17~19.
- [5] 邵桂元, 沈启华, 洪黎民. 中国微生物生态学杂志, 1995, 7 (5): 17~19.
- [6] Rice T D, Williams H N, Turng B F. Microbial Ecology, 1998, 35 (3): 256~264.
- [7] 杨淑专, 黄庆辉. 厦门大学学报(自然科学版), 1997, 36 (3): 449~453.
- [8] Pineiro S A, Sahaniuk G E, Romberg E, et al. Current Microbiology, 2004, 48 (2): 113~117.
- [9] 秦生巨. 微生物学通报, 1993, 20 (4): 237~241.
- [10] Wehr N B, Kelven D A. Soil Biology and Biochemistry, 1971, 3 (2): 143~149.