

# 蛭弧菌类菌株 JU-PX1 的生物学特性和 16S rDNA 序列分析

范红照<sup>1</sup> 林茂<sup>1,2\*</sup> 纪荣兴<sup>1</sup>

(1. 集美大学 水产学院 福建 厦门 361021)

(2. 农业部东海海水健康养殖重点实验室 福建 厦门 361021)

**摘要:** 【目的】研究蛭弧菌类菌株 JU-PX1 的噬菌特性、形态特征, 并分析 16S rDNA 序列从而对其进行种属鉴定。【方法】采用双层平板法和三角瓶培养法研究蛭弧菌类菌株 JU-PX1 的噬菌特性, 通过光镜和电镜观察其形态, 利用 16S rDNA 序列的蛭弧菌类特异性引物以及细菌通用引物进行 PCR 扩增。【结果】JU-PX1 对 10 株宿主菌中的 6 株具有噬菌作用, 特别对大肠杆菌和副溶血弧菌侵噬能力较强。菌体呈弧状或杆状, 单极鞭毛, 大小为(0.2–0.5)  $\mu\text{m}$  × (0.8–1.2)  $\mu\text{m}$ , 在其增殖阶段也有长约 3.2  $\mu\text{m}$  的较长个体。扩增后分别获得了一段长为 831 bp 和 1 515 bp 的 DNA 序列, 进一步通过 NCBI BLAST 和 MEGA 5.10 等软件分析并构建了系统发育树。【结论】蛭弧菌类菌株 JU-PX1 属于噬菌弧菌属(*Bacteriovorax*), 与海岸噬菌弧菌(*Bv. litoralis*)亲缘关系最近, 两者的 16S rDNA 序列相似性为 93%。

**关键词:** 蛭弧菌类, 噬菌弧菌属, 噬菌特性, 16S rDNA, 系统发育

# The predation characteristics and 16S rDNA sequence analysis of *Bdellovibrio*-and-like organism strain JU-PX1

FAN Hong-Zhao<sup>1</sup> LIN Mao<sup>1,2\*</sup> JI Rong-Xing<sup>1</sup>

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen, Fujian 361021, China)

(2. Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture, Xiamen, Fujian 361021, China)

**Abstract:** [Objective] The predation ability, morphological characteristics and 16S rDNA characteristics of *Bdellovibrio*-and-like organism (BALO) strain JU-PX1 will be studied. [Methods] The predation ability of JU-PX1 have been studied by double-layer agar and conical flask culture. The morphological characteristics of JU-PX1 were examined with optical microscope and transmission electron microscope. Using BALOs-specific primer and universal primer, 16S rDNA fragment of JU-PX1 were obtained by PCR amplification. [Results] Seven of the ten strains tested, especially *Escherichia coli* and *Vibrio parahaemolyticus*, could be hunted by JU-PX1. JU-PX1 exhibited typical BALOs pattern, showing vibrioid cell with a single polar flagellum. The cell size was (0.2–0.5)  $\mu\text{m} \times$  (0.8–1.2)  $\mu\text{m}$ , and there was also 3.2  $\mu\text{m}$  elongating cell in exponential phase. Two kinds of 16S rDNA fragment of JU-PX1 were obtained by PCR amplification, which lengths were 831 bp and 1 515 bp, respectively. The 16S rDNA was analysed on phylogenetic tree by NCBI BLAST and MEGA 5.10. [Conclusion] BALO JU-PX1 had the closest relationship with *Bacteriovorax litoralis* and the similarity was 93%.

**Keywords:** *Bdellovibrio*-and-like organism, *Bacteriovorax*, Phagocytic characteristics, 16S rDNA, Phylogenetic tree

1962年 Stolp 和 Petzold 发现了一种细小、寄生、弧状的革兰氏阴性细菌,他们将之命名为 *Bdellovibrio*, 即蛭弧菌<sup>[1]</sup>, 之后几十年国内外学者又在土壤、海水、污水等环境中发现了大量的这类细菌。这类细菌运动极为活泼,对其他众多的革兰氏阴性细菌包括一些致病菌等具有很强的裂解能力<sup>[2]</sup>,而对真核细胞无不利影响<sup>[3]</sup>,众多的研究结果也显示,以蛭弧菌类为生物制剂在水产动物细菌性疾病的预防和控制中具有良好的应用前景<sup>[4-5]</sup>。

由于这类细菌不能利用常规的细菌生理生化

实验进行鉴定,长期以来一直被划分到  $\delta$ -变形杆菌门 ( $\delta$ -Proteobacteria)、蛭弧菌科 (*Bdellovibrionaceae*)、蛭弧菌属 (*Bdellovibrio*) 中。直到 20 世纪 90 年代,16S rDNA 序列分析技术的广泛运用,使得这类细菌的多样性和亲缘关系被逐渐探明。2002 年, Snyder 等<sup>[6]</sup>首次使用“*Bdellovibrio*-and-like organisms (BALOs, 蛭弧菌及其类似生物)”一词来对这类细菌进行描述,并得到了学术界的广泛认可。到目前,通常认为 BALOs 分为 3 个科<sup>[7-12]</sup>: (1) 蛭弧菌科 (*Bdellovibrionaceae*), 只有一个蛭弧菌属

(*Bdellovibrio*), 一个种噬菌蛭弧菌(*Bd. bacteriovorus*); (2) 噬菌弧菌科(Bacteriovoraceae), 下有噬菌弧菌属(*Bacteriovorax*)和裂菌弧菌属(*Bacteriolyticum*) 2个属, 前者有海洋噬菌弧菌(*Bv. marinus*)和海岸噬菌弧菌(*Bv. litoralis*) 2个种, 后者有斯托普裂菌弧菌(*Bl. stolpii*)一个种; (3) 吞菌弧菌科(Peredibacteraceae), 只有一个吞菌弧菌属(*Peredibacter*), 有唯一一种斯塔吞菌弧菌(*P. starrii*)。

对于 BALOs 的分类和命名问题, 国内的研究相对滞后, 在许多研究中并未给出种属的明确划分, 而只是将其统称为蛭弧菌。这给 BALOs 的研究造成了诸多混淆和不便, 有些报道就误把蛭弧菌属(*Bdellovibrio*)与 BALOs 混为一谈。而温崇庆<sup>[13]</sup> (2009年)在其论文中对 BALOs 的分类现状做了较为细致和准确的阐述, 且尝试对 BALOs 有关种属的拉丁学名进行了翻译, 本文即采用他翻译的中文学名。此外, 温崇庆还将 BALOs 简译为“蛭弧菌类生物”, 而我们认为“蛭弧菌类”也可以作为一个比较贴切, 但更为简洁和便于交流的简称。

关于蛭弧菌类的研究国内多集中于蛭弧菌类的噬菌功效, 少数研究对蛭弧菌类的鉴定也多通过生物学特性分析或部分 16S rDNA 序列分析等方法<sup>[14-17]</sup>。本研究结合噬菌特性、形态特征和 16S rDNA (近)全长序列分析等方法鉴定了一株噬菌弧菌属 *Bacteriovorax* sp. JU-PX1, 这将丰富和完善蛭弧菌类的鉴定和分类方法, 也为 JU-PX1 后续的应用研究奠定了基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株和试剂

**1.1.1 菌株:** 蛭弧菌类海水菌株 JU-PX1 为本实验室从厦门集美龙舟池水域海水样中分离所得; 大肠杆菌 *Escherichia coli* ATCC25922、河流弧菌

*Vibrio fluvialis* CGMCC1.1872、副溶血弧菌 *V. parahaemolyticus* JU-VP11、溶藻弧菌 *V. alginolyticus* JU-VA21、哈维氏弧菌 *V. harveyi* JU-V2002、迟缓爱德华菌 *Edwardsiella tarda* JU-ET3、铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* JU-PA1, 以及弧菌 *Vibrio* spp. B1、B2、B3 为本实验室保存菌株。

**1.1.2 宿主菌制备:** 将宿主菌接种于 NB 培养基中振荡培养 24 h, 6 000 r/min 离心 5 min, 倒掉上清液, 加入生理盐水重悬后 6 000 r/min 离心 5 min, 倒掉上清液, 加入无菌海水重悬, 利用平板菌落法计数后配制成菌浓度为  $1.0 \times 10^9$  CFU/mL 的菌悬液, 放于 4 °C 冰箱中备用。

**1.1.3 主要试剂:** *Taq* 酶、*Taq* Buffer 和  $MgCl_2$  购自 Fermentas 公司; dNTPs Mix 购自 Solarbio 公司; DNA Marker、细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自 TIANGEN 生物公司。NB 和 TCBS 培养基, 购自青岛海博生物技术有限公司。

### 1.2 噬菌特性

**1.2.1 固体培养观察:** 蛭弧菌类采用双层琼脂平板法进行培养和计数<sup>[3]</sup>, 将 1 mL  $5.0 \times 10^5$  PFU/mL 的 JU-PX1 菌悬液和 1 mL  $1.0 \times 10^9$  CFU/mL 的宿主菌悬液与 8 mL 0.7%琼脂混合后倾注于预制的自来水琼脂(含琼脂 1.5%)上, 28 °C 培养, 连续 5 d 观察蛭弧菌类的生长和出斑情况。

**1.2.2 液体培养观察:** 将 1 mL  $5 \times 10^5$  PFU/mL 的 JU-PX1 菌悬液和 1 mL  $1 \times 10^9$  CFU/mL 的宿主菌悬液混合接种在 50 mL 无菌天然海水中, 设置不添加 JU-PX1 的空白对照组, 置于 28 °C 培养 7 d, 每 24 h 对 JU-PX1 噬菌组和对照组培养液测一次  $OD_{600}$  值。噬菌组  $OD_{600}$  值减小显著的, 判断为有噬菌现象。

### 1.3 形态观察

**1.3.1 光学显微镜观察:** 采用简单染色法, 每隔 24 h 取一次噬菌组的菌液滴到载玻片上, 自然风

干后进行热固定, 用 1% 结晶紫染液染色 2 min 后水洗, 用普通光学显微镜观察并拍照。

**1.3.2 透射电子显微镜观察:** 以副溶血弧菌 JU-VP11 为宿主, 采用液体培养法培养 JU-PX1 至第 3-4 天时, 清洗菌液后取一滴到铜网上, 磷钨酸负染, 在透射电子显微镜下观察。

## 1.4 细菌 16S rDNA 测定

**1.4.1 样品制备及 DNA 提取:** 取副溶血弧菌 JU-VP11 为宿主培养的 JU-PX1 悬液, 10 000 r/min 离心 5 min, 加无菌海水重悬后再次离心; 使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取二元培养物的总 DNA。同时提取单独培养的副溶血弧菌 JU-VP11 的 DNA 为阴性对照。

**1.4.2 PCR 扩增 16S rDNA 序列:** 参照文献[18], 设计了 16S rDNA 序列的 BALOs 特异性引物和细菌通用引物, 并委托上海捷瑞生物工程有限公司合成。特异性引物上游 F63: 5'-CAGGCCTAACA CATGCAAGTC-3'; 下游 R842: 5'-CGWCACTGA AGGGGTCAA-3'。通用引物上游 F27: 5'-AGAG TTTGATCCTGGCTCAG-3'; 下游 R1492: 5'-GGT TACCTTGTTACGACTT-3'。采用 25  $\mu$ L 反应体系扩增, 各组分如下: 10 $\times$ PCR Buffer 2.5  $\mu$ L, 2 mmol/L dNTPs 0.5  $\mu$ L, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2.0  $\mu$ L, 10 mmol/L 引物各 0.5  $\mu$ L, Taq 酶 1.25 U, DNA 模板 0.5  $\mu$ g。PCR 反应条件为: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 1 min, 52  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 90 s, 共 32 个循环; 72  $^{\circ}$ C 1 min。所获 PCR 产物以 1% 琼脂糖凝胶进行电泳, 使用自动凝胶成像系统观察。

**1.4.3 PCR 产物的质粒连接、转化及克隆的筛选:** 将通用引物扩增得到的 JU-PX1 (含无法去除彻底的宿主菌 JU-VP11) 的 16S rDNA 与 pMD-18T 连接, 转化到感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中, 挑取 12 个单克隆分别培养, 以各菌液为模板用细菌通用引物进行 PCR 扩增。各个克隆的扩增产物与单独培养的副溶血弧菌 JU-VP11 的 16S rDNA 分别用

限制性内切酶 EcoR I 进行酶切, 酶切产物电泳后比较, 筛选到仅转化了 JU-PX1 16S rDNA 的疑似克隆。同时使用 BALOs 特异性引物对上述克隆进行扩增, 根据电泳结果做进一步的判断。

**1.4.4 序列测定及分析:** 经过琼脂糖凝胶成像系统观察得到目的条带后, 将特异性引物得到的 PCR 产物和转化并鉴定后的 DH5 $\alpha$  菌液交由英潍捷基(上海)有限公司测序。将所得到的序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 分析, 获得相似性  $\geq 90\%$  的已知种名细菌的 16S rDNA 序列和蛭弧菌类 5 个属代表菌株的 16S rDNA 序列, 通过 MEGA 5.10 软件选用 Kimura 2-parameter 距离模型, 采用邻接法(Neighbour-Joining method)构建系统树, 自举(Bootstrap)分析后进行置信度检测, 自举数据集为 1 000 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 蛭弧菌类菌株 JU-PX1 的噬菌特性

双层平板培养结果表明, JU-PX1 对 10 种宿主菌中的 6 种具有侵噬能力(表 1)。其中, 大肠杆菌和副溶血弧菌为宿主的平板接种后第 2 天有噬菌斑出现, 在第 4 天噬菌斑开始融合并布满整个平板, 噬菌斑扩散效率高于其他各宿主菌, 说明 JU-PX1 对这两种菌的噬菌作用明显。

表 1 蛭弧菌类菌株 JU-PX1 的噬菌范围  
Table 1 The lysis characters of *Bacteriovorax* sp. JU-PX1 against to microbes

菌种 Strains	噬菌作用 Phagocytosis	菌种 Strains	噬菌作用 Phagocytosis
<i>E. coli</i>	++	<i>V. fluvialis</i>	-
<i>V. para-haemolyticus</i>	++	<i>V. alginolyticus</i>	+
<i>P. aeruginosa</i>	-	<i>V. sp. B1</i>	-
<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. sp. B2</i>	+
<i>E. tarda</i>	-	<i>V. sp. B3</i>	+

注: ++: 强烈噬菌; +: 噬菌; -: 无噬菌。

Note: ++: Strong phagocytosis; +: Phagocytosis; -: No phagocytosis.

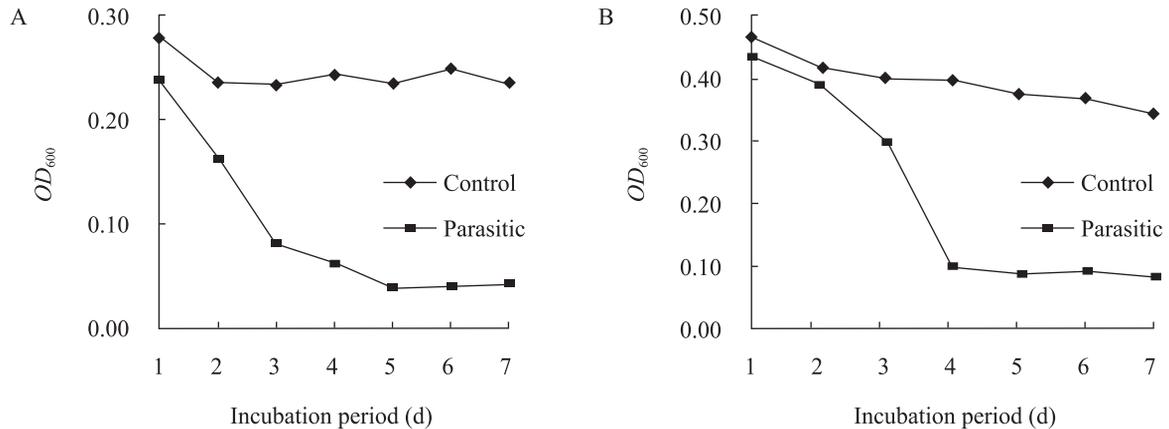


图1 蛭弧菌类菌株 JU-PX1 对副溶血弧菌(A)和大肠杆菌(B)的裂解作用  
Fig. 1 Lysis of *V. parahaemolyticus* (A) and *E. coli* (B) by BALO strain JU-PX1

液体培养中 JU-PX1 以副溶血弧菌和大肠杆菌为宿主时噬菌能力最强。两者分别与 JU-PX1 构成二元培养体系,前者二元培养物 OD<sub>600</sub> 在第 1-5 天由 0.25 不断下降至 0.05 (图 1A), 后者二元培养物 OD<sub>600</sub> 在第 1-4 天由 0.45 下降至 0.05 (图 1B)。

## 2.2 蛭弧菌类菌株 JU-PX1 的形态学观察

**2.2.1 光镜观察:** 样品经 1% 结晶紫染液单染后, 在光学显微镜下可见 2 种菌体, 其中大的为宿主菌 JU-VP11, 小的为蛭弧菌类菌株 JU-PX1 (图 2A)。在第 3-5 天还可观察到大量较长的弧形菌体 (图 2B), 之后分裂为小菌体。

**2.2.2 电镜观察:** 培养 4 d 后的菌悬液用透射电子显微镜观察 (图 2C), 可见蛭弧菌类菌株 JU-PX1 为弧状, 单极鞭毛, 大小为 (0.2-0.5)  $\mu\text{m}$   $\times$  (0.8-1.2)  $\mu\text{m}$ , 还可发现光镜下曾观察到的较长菌体, 其长约 3.2  $\mu\text{m}$ , 电镜下清晰可见复分裂前断裂界面的形成 (图 2D 箭头所指处)。

## 2.3 蛭弧菌类菌株 JU-PX1 的 16S rDNA 克隆与鉴定

宿主 JU-VP11 和 JU-PX1 二元培养物的 16S rDNA 扩增片段长约 1 500 bp (图 3A), 以 *EcoR* I 分别酶切的结果 (图 3B) 显示, JU-VP11 的 16S

rDNA 序列无法被酶切, 而 JU-PX1 培养物的 16S rDNA 则被酶切为约 1 100 bp 和 400 bp 的片段, 但后者酶切产物中明显残留约 1 500 bp 的片段表明 JU-PX1 培养物的 16S rDNA 产物中可能还有宿主菌 16S rDNA 的存在。

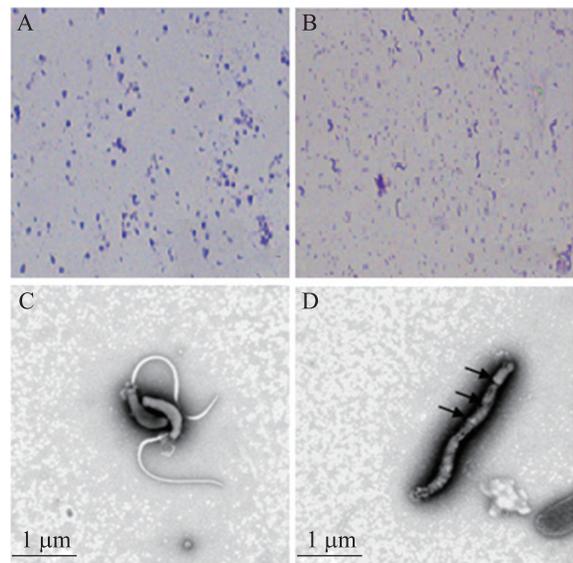


图2 蛭弧菌类菌株 JU-PX1 的形态学观察

Fig. 2 Microscopy of BALO strain JU-PX1

注: 以副溶血弧菌 JU-VP11 为宿主。A: 第 2 天 (1 000 $\times$ ); B: 第 4 天 (1 000 $\times$ ); C: 第 4 天 (12 500 $\times$ ); D: 第 4 天 (11 500 $\times$ ). 箭头指向菌体分裂界面。

Note: *V. parahaemolyticus* JU-VP11 was used as host. A: 2 d (1 000 $\times$ ); B: 4 d (1 000 $\times$ ); C: 4 d (12 500 $\times$ ); D: 4 d (11 500 $\times$ ). The arrows point divisive interface.

对 JU-PX1 培养物的 16S rDNA 进行质粒转化和克隆筛选, 得到 a、b 两类克隆, a 克隆的 16S rDNA 产物无法以 *EcoR* I 酶切, 而 b 克隆可被 *EcoR* I 酶切为约 1 100 bp 和约 400 bp 的片段(图 4A)。进一步使用 BALOs 特异性引物

对 a、b 两种克隆进行 PCR 扩增, 结果只有 b 克隆得到了一条约 800 bp 的特异性条带(图 4B)。这两个结果都证明了 a、b 两类克隆分别转化了宿主菌 JU-VP11 和蛭弧菌类 JU-PX1 的 16S rDNA。

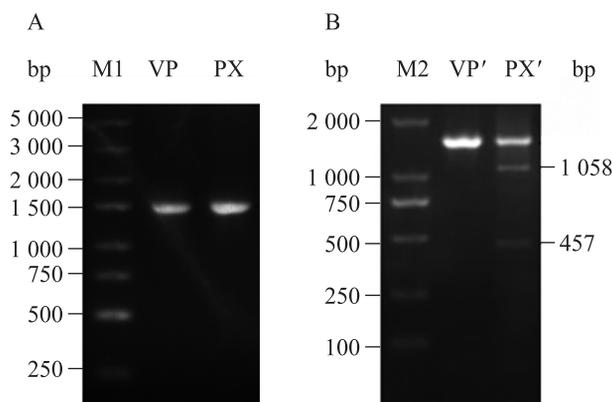


图 3 蛭弧菌类 JU-PX1 培养物和宿主菌 JU-VP11 的 16S rDNA 及其 *EcoR* I 酶切片段

Fig. 3 The 16S rDNA and its fragment digested with *EcoR* I of JU-PX1 culture and the prey JU-VP11

注: M1 和 M2 分别表示 DNA 分子量标准 DL2502 和 DL2501; VP 和 PX 分别表示 JU-VP11 纯菌株和 JU-PX1 二元培养物的 16S rDNA; VP'和 PX'则分别表示这二者的 *EcoR* I 酶切片段。

Note: M1 and M2 mean DNA ladder DL2502 and DL2501, respectively; VP and PX show 16S rDNA fragments amplified from JU-VP11 strain and JU-PX1 binary culture; VP' and PX' exhibit their 16S rDNA fragment digested with *EcoR* I.

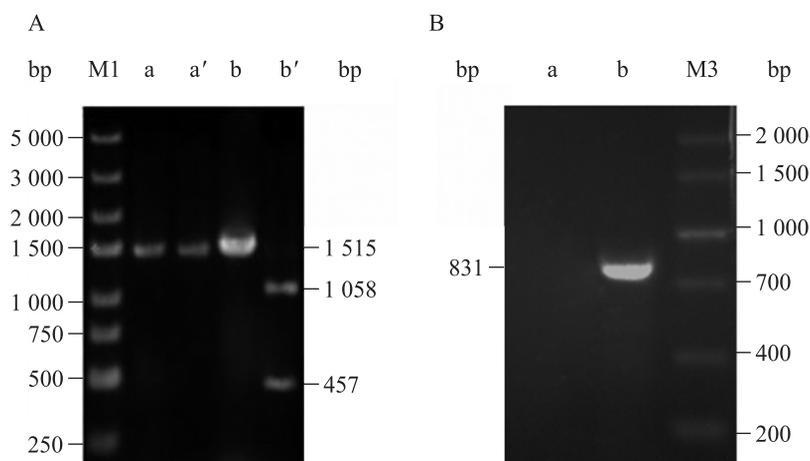


图 4 转化后 a、b 两种克隆的 16S rDNA 片段

Fig. 4 The 16S rDNA fragment amplified from clone a and b after transformation

注: M1 和 M3 分别表示 DNA 分子量标准 DL2502 和 MD105; A: 克隆 a 和 b 以通用引物扩增的 16S rDNA 片段, 其 *EcoR* I 酶切产物分别以 a'和 b'表示; B: 克隆 a 和 b 以特异性引物扩增的 16S rDNA 片段。

Note: M1 and M3 mean DNA ladder DL2502 and MD105, respectively; A: 16S rDNA fragments amplified from clone a and b with universal primer, and their digested products by *EcoR* I marked as a' and b', respectively; B: 16S rDNA fragments amplified by BALOs specific primer.

## 2.4 蛭弧菌类菌株 JU-PX1 的 16S rDNA 序列分析

测序和BLAST结果表明, b克隆的16S rDNA特异性扩增片段大小为831 bp, 与海岸噬菌弧菌 *Bv. litoralis* 的同源性(91%)最高。将 b 克隆以 16S rDNA 通用引物扩增, 得到了大小为 1 515 bp 的产物, 提交 GenBank 得到登录号 JQ937290。将该序列与 GenBank 已报道的 16S rDNA 序列进行比对, 并构建了系统发育树(图 5)。发现 JU-PX1 与 *Bv. litoralis* 和 *Bv. marinus* 位于同一分支, 与 *Bv. litoralis* 16S rDNA 序列的相似度最高, 为 93%。

## 3 讨论

### 3.1 噬菌特性

蛭弧菌类对多数革兰氏阴性菌和少量革兰氏阳性菌都具有侵噬作用。在本研究中, 蛭弧菌类菌株 JU-PX1 对 10 株宿主菌中的 6 种能产生侵噬现象, 其中对大肠杆菌和副溶血弧菌 JU-VP11 的侵噬现象最为明显, 侵噬效率也显著高于其他宿

主菌, 这不仅说明了 JU-PX1 的噬菌特性, 也说明 JU-PX1 在噬菌时对宿主具有一定的选择性, 与 Amy M. R. 等对蛭弧菌类噬菌性的研究结果相近<sup>[19]</sup>。JU-PX1 的噬菌性不仅是 JU-PX1 属于蛭弧菌类的证据, 也为其推广应用到水产养殖业提供了依据。

Lambina W. 等证明了自然水体中噬菌蛭弧菌菌数与菌群细菌总数呈现一定的相关性<sup>[11,18,20]</sup>, 蛭弧菌类的生存依赖于其周边环境中的细菌; 反过来看, Huan Chen 等<sup>[21-22]</sup>在近年的研究表明, 宿主种类不同, 蛭弧菌类的数量和种类也会不同。在蛭弧菌类菌株 JU-PX1 的 10 株宿主中, 有 3 株弧菌 B1、B2 和 B3 是与 JU-PX1 分离于同一水样, JU-PX1 对其中的 2 株具有侵噬作用, 可推断其对水体微生物菌群的调节控制起到重要作用。

### 3.2 宿主依赖性

蛭弧菌类野生菌株在突变或其它适合条件下会转变为可纯培养生长的非宿主依赖(Host-independent)菌株<sup>[1,23-25]</sup>。蛭弧菌类非宿主依赖菌株在其纯培养生长周期中会呈现为丝状生长, 最

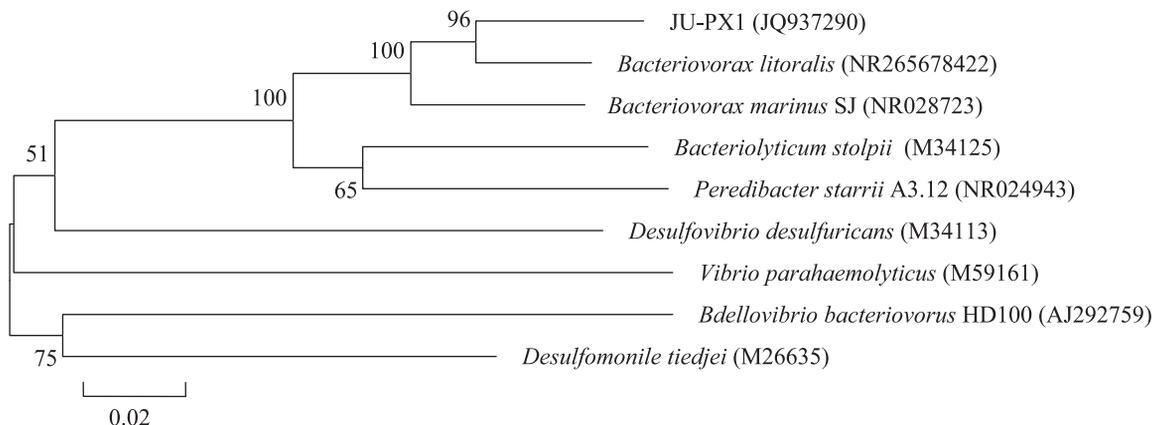


图 5 噬菌弧菌 JU-PX1 与相关菌株的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of *Bacteriovorax* sp. JU-PX1 and its relatives

注: 节点的数字为 Bootstrap 百分比支持率值(仅显示 50%以上), 自举数据集为 1 000 次; 括号内序列号为 GenBank 登录号; 标尺表示 2% 的序列差异。

Note: Branch points were supported by parsimony bootstrap values (1 000 replicates) of >50%. Sequence numbers in parentheses are the GenBank accession numbers. Clusters designated clades with 2% intraclade divergence.

终分裂成多个具极生鞭毛的子代细胞<sup>[13,26]</sup>。本研究中, 在使用副溶血弧菌 JU-VP11 为宿主通过液体法培养 JU-PX1 时, 第 3-4 天, JU-VP11 被侵袭而大量减少, 同时出现了大量呈复分裂状的细长弧形菌体(图 2B、D), 之后裂解为大量子个体。这一短期存在的丝状生长现象表明 JU-PX1 是兼性寄生菌株, 在宿主充裕时营寄生生活, 而在宿主欠缺且适合时可利用培养液中的低营养以及死亡宿主释放的营养进行非寄生生活。

### 3.3 16S rDNA 序列分析

蛭弧菌类的生长和繁殖依赖于宿主, 除了一些可不依赖宿主培养的菌株<sup>[25]</sup>外, 均难以将之与宿主分离开来, 因而利用细菌通用引物获得蛭弧菌类的全长 16S rDNA 序列十分困难。目前国内外报道获取蛭弧菌类菌株的 16S rDNA 序列主要是利用蛭弧菌类特异性引物扩增<sup>[18]</sup>和利用克隆转化这两种方法<sup>[27]</sup>。本实验同时采用了特异性引物和通用引物分别扩增蛭弧菌类的 16S rDNA 序列, 特异性引物扩增得到了部分 16S rDNA 序列, 通用引物扩增通过转化后得到了 16S rDNA 的(近)全长序列。

研究表明, 16S rDNA 部分序列与全序列分析相比, 也可以阐明菌株的亲缘关系, 但是其结果不完全相同<sup>[28-29]</sup>。本研究获得的 831 bp 16S rDNA 序列与 1 515 bp 16S rDNA 序列构建的蛭弧菌类系统发育树结果一致, 但是 831 bp 16S rDNA 序列与河流噬菌弧菌的相似性低于 1 515 bp 16S rDNA 序列的比对结果, 可见 16S rDNA 全序列阐明的结果更为可靠。

## 参 考 文 献

- [1] Stolp H, Starr MP. *Bdellovibrio bacteriovorus* gen. et sp. n., a predatory, ectoparasitic and bacteriolytic microorganism[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1963, 29(1): 217-248.
- [2] Fratamico PM, Whiting RC. Ability of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J to lyse gram-negative food-borne pathogenic and spoilage bacteria[J]. *Journal of Food Protection*, 1995, 58(2): 160-164.
- [3] 林茂, 杨先乐, 薛晖, 等. 蛭弧菌 BDH21-02对鱼类细胞及病原菌的作用[J]. *微生物学通报*, 2006, 33(1): 7-11.
- [4] Sockett RE, Lambert C. *Bdellovibrio* as therapeutic agents: a predatory renaissance[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2(8): 669-675.
- [5] Lerner TR, Lovering AL, Bui NK, et al. Specialized peptidoglycan hydrolases sculpt the intra-bacterial niche of predatory *Bdellovibrio* and increase population fitness[J/OL]. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(2): e1002524.
- [6] Snyder AR, Williams HN, Baer ML, et al. 16S rDNA sequence analysis of environmental *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALO) reveals extensive diversity[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52(Pt 6): 2089-2094.
- [7] David D, John AM, Diedrich DL. Relationships among the *Bdellovibrios* revealed by partial sequences of 16S ribosomal RNA[J]. *Current Microbiology*, 1991, 23(2): 115-119.
- [8] Baer ML, Ravel J, Chun J, et al. A proposal for the reclassification of *Bdellovibrio stolpii* and *Bdellovibrio starrii* into a new genus, *Bacteriovorax* gen. nov. as *Bacteriovorax stolpii* comb. nov. and *Bacteriovorax starrii* comb. nov., respectively[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50(Pt 1): 219-224.
- [9] Yaacov D, Edouard J. Diversity and evolution of *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALOs), reclassification of *Bacteriovorax starrii* as *Preredibacter starrii* gen. nov., comb. nov., and description of the *Bacteriovorax-Preredibacter* clade as *Bacteriovoracaceae* fam. nov.[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(5): 1439-1452.
- [10] Baer ML, Ravel J, Piñeiro SA, et al. Reclassification of salt-water *Bdellovibrio* sp. as *Bacteriovorax marinus* sp. nov. and *Bacteriovorax litoralis* sp. nov.[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004,

- 54(Pt 4): 1011–1016.
- [11] Davidov Y, Friedjung A, Jurkevitch E. Structure analysis of a soil community of predatory bacteria using culture-dependent and culture-independent methods reveals a hitherto undetected diversity of *Bdellovibrio*-and-like organisms[J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(9): 1667–1673.
- [12] Piñeiro SA, Williams HN, Stine OC. Phylogenetic relationships amongst the saltwater members of the genus *Bacteriovorax* using *rpoB* sequences and reclassification of *Bacteriovorax stolpii* as *Bacteriolyticum stolpii* gen. nov., comb. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(Pt 5): 1203–1209.
- [13] 温崇庆. 海水养殖环境蛭弧菌类生物多样性及噬菌弧菌 DA5对细菌的生物控制[D]. 广州: 中山大学博士学位论文, 2009: 1–138.
- [14] 于雪芝, 章丽娇, 康冬柳, 等. 水环境中噬菌蛭弧菌的分离鉴定[J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(11): 6–9.
- [15] 储卫华, 朱卫, 康春涛. 海洋蛭弧菌的分离鉴定及其对副溶血弧菌的作用[J]. 微生物学通报, 2009, 36(1): 20–24.
- [16] 郑英珍, 汪建国, 李明, 等. 噬菌蛭弧菌的分离及初步鉴定[J]. 水生生物学报, 2009, 33(6): 1083–1087.
- [17] 曹海鹏, 杨先乐. 异育银鲫肠道噬菌蛭弧菌 BDF-H16的分离及其对嗜水气单胞菌的裂解活性[J]. 水生生物学报, 2009, 33(5): 970–974.
- [18] Jurkevitch E, Ramati B. Design and uses of *Bdellovibrio* 16S rRNA-targeted oligonucleotides[J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, 184(2): 265–271.
- [19] Rogosky AM, Moak PL, Emmert EA. Differential predation by *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J[J]. Current Microbiology, 2006, 52(2): 81–85.
- [20] Lambina VA, Lebowal LA, Tschurkina LG. Importance of *Bdellovibrio* in regulating microbial cenoses and self-purification processes in domestic sewage[J]. Mikrobiologiya, 1987, 56(5): 860–864.
- [21] Chen H, Athar R, Zheng G, et al. Prey bacteria shape the community structure of their predators[J]. The ISME Journal, 2011, 5(8): 1314–1322.
- [22] Chen H, Young S, Berhane TK, et al. Predatory bacteriovorax communities ordered by various prey species[J/OL]. PLoS One, 2012, 7(3): e34174.
- [23] Núñez ME, Martin MO, Duong LK, et al. Investigations into the life cycle of the bacterial predator *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J at an interface by atomic force microscopy[J]. Biophysical Journal, 2003, 84(5): 3379–3388.
- [24] Ferguson MA, Schmitt JL, Sindhurakar AR, et al. Rapid isolation of host-independent *Bdellovibrio bacteriovorus*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2008, 73(3): 279–281.
- [25] Tudor JJ, Davis JJ, Panichella M, et al. Isolation of predation-deficient mutants of *Bdellovibrio bacteriovorus* by using transposon mutagenesis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(17): 5436–5443.
- [26] Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[M]. New York: Springer, 2005: 1041–1058.
- [27] 梁思成, 房文红, 汪开毓, 等. 蛭弧菌 Bdh5221株理化特性和16S rDNA 序列分析[J]. 水生生物学报, 2009, 33(5): 911–916.
- [28] McNabb A, Eisler D, Adie K, et al. Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (*hsp65*) for routine identification of *Mycobacterium* species isolated from clinical sources[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(7): 3000–3011.
- [29] Petti CA, Polage CR, Schreckenberger P. The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(12): 6123–6125.