



## 研究报告

环境有机碳源抑制食弧菌嗜盐噬菌弧菌(*Halobacteriovorax vibrionivorans*)的捕食生长何小玉<sup>1</sup> 陈明霞<sup>\*1</sup> 殷鹏鲲<sup>1</sup> 周仁桂<sup>1</sup> 李和阳<sup>\*2,3</sup>

1 华侨大学化工学院 福建 厦门 361021

2 自然资源部第三海洋研究所 福建 厦门 361005

3 福建省海洋生态保护与修复重点实验室 福建 厦门 361005

**摘要:**【背景】蛭弧菌类群(*Bdellovibrio*-And-Like Organisms, BALOs)的生长所需碳源主要来源于宿主菌,而环境中各类碳源对其生长的影响还有待探究。【目的】探究不同环境有机碳源对食弧菌嗜盐噬菌弧菌(*Halobacteriovorax vibrionivorans*)捕食生长的影响,为其后续捕食机制和微生物菌剂的应用研究提供理论基础。【方法】以溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)为宿主,采用96孔板测定细胞吸光度和双层平板法测定不同糖类化合物、酵母提取物和胰蛋白胨对食弧菌嗜盐噬菌弧菌 Y22 捕食生长的影响,设置热致死宿主和活宿主、人工海水和 Tris-HCl (25 g/L NaCl)培养体系的对比试验,结合菌株基因组信息分析,探索其可能的生长影响机制。【结果】食弧菌嗜盐噬菌弧菌 Y22 不具备转运外界糖类的相关基因,不能利用环境中的糖类物质作为碳源;宿主溶藻弧菌可以利用蔗糖、麦芽糖、甘露醇生长且产酸,降低人工海水混合培养体系的 pH 值,从而抑制菌株 Y22 的捕食;葡萄糖不仅可以改变人工海水混合培养体系的 pH 值,而且可影响宿主的细胞特性,抑制菌株 Y22 的捕食识别过程;宿主无法利用淀粉、 $\alpha$ -乳糖生长,该类碳源不影响菌株 Y22 捕食生长。菌株 Y22 具有蛋白和多肽膜转运蛋白基因,可以通过分解并摄取宿主细胞蛋白质类物质以获取碳源和氮源。外源添加质量浓度为 1–5 g/L 酵母提取物和胰蛋白胨都会抑制菌株 Y22 捕食生长,抑制效果随浓度增加而加强,酵母提取物浓度超过 4 g/L、胰蛋白胨浓度超过 5 g/L,菌株 Y22 捕食现象几乎不可见,抑制效果最强。【结论】环境中糖类可通过影响宿主菌代谢产酸或细胞特性,从而影响食弧菌嗜盐噬菌弧菌的捕食生长。食弧菌嗜盐噬菌弧菌可以吸收利用环境中的蛋白或多肽,并因此抑制其捕食生长。该研究结果将为嗜盐噬菌弧菌捕食机制的进一步探究和嗜盐噬菌弧菌微生物菌剂的开发应用提供重要的理论基础。

**关键词:** 食弧菌嗜盐噬菌弧菌, 碳源, 蛭弧菌类群, 捕食机制

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (41506179); National Program on Global Change and Air-Sea Interaction (GASI-03-01-03-01); Natural Science Foundation of Fujian Province (2015J01613); Foundation of Fujian Provincial Key Laboratory of Marine Ecological Conservation and Restoration (EPR2020002)

**\*Corresponding authors:** E-mail: CHEN Mingxia: chenmx1257@hqu.edu.cn; LI Heyang: heyang\_li@tio.org.cn

**Received:** 27-05-2020; **Accepted:** 31-08-2020; **Published online:** 24-12-2020

**基金项目:** 国家自然科学基金(41506179); 全球变化与海气相互作用国家专项(GASI-03-01-03-01); 福建省自然科学基金(2015J01613); 福建省海洋生态保护与修复重点实验室开放基金(EPR2020002)

**\*通信作者:** E-mail: 陈明霞: chenmx1257@hqu.edu.cn; 李和阳: heyang\_li@tio.org.cn

**收稿日期:** 2020-05-27; **接受日期:** 2020-08-31; **网络首发日期:** 2020-12-24

## Environmental organic carbon sources inhibit the predatory life of *Halobacteriovorax vibrionivorans*

HE Xiaoyu<sup>1</sup> CHEN Mingxia<sup>\*1</sup> YIN Pengkun<sup>1</sup> ZHOU Rengui<sup>1</sup> LI Heyang<sup>\*2,3</sup>

<sup>1</sup> College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen, Fujian 361021, China

<sup>2</sup> Third Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Xiamen, Fujian 361005, China

<sup>3</sup> Fujian Provincial Key Laboratory of Marine Ecological Conservation and Restoration, Xiamen, Fujian 361005, China

**Abstract:** [Background] The carbon sources required for the growth of *Bdellovibrio*-and-like organisms are mainly derived from the host, and the effects of various carbon sources in the environment remain to be explored. [Objective] The effects of different extracellular organic carbon sources on the predatory life of *Halobacteriovorax vibrionivorans* was investigated to provide a theoretical basis for subsequent research on the predation mechanism and microbiological control agent against pathogenic bacteria. [Methods] *Vibrio alginolyticus* was used as host strain, an absorbance-based assay with 96-well plates for cell lysis and double-layer plate method were applied to determine the effects of different carbohydrates, yeast extract and tryptone on the predatory growth of *H. vibrionivorans* Y22. Comparative experiments between nonviable heat-deactivated and viable hosts, artificial seawater and Tris-HCl (25 g/L NaCl) culture system, were adopted to explore possible growth mechanism of strain Y22, combined with genomic analysis of strain Y22 and its host strain. [Results] Strain Y22 had no phosphotransferase system and ABC transporters of sugars, and could not use extracellular carbohydrates as carbon sources; The host *V. alginolyticus* could utilize sucrose, maltose, mannitol for growth and produce acid, which lead to the decreased pH value of the artificial seawater co-culture system, thereby block the predation of strain Y22. Glucose could not only decrease the pH value of artificial seawater co-culture system, but also changed the cell characteristics of the host, thereby block the predation recognition process of strain Y22. The host could not grow with starch and  $\alpha$ -lactose, and these carbon sources did not affect the predation of strain Y22. Strain Y22 contained protein, polypeptide and amino acid membrane transporter genes, which allowed it to utilize the host protein as carbon sources and nitrogen sources. Around 1–5 g/L external yeast extract and tryptone could inhibit the predation of strain Y22, and the predation-inhibiting effect was found to be dose dependent. When the concentration of yeast extract was over 4 g/L, and the concentration of tryptone was over 5 g/L, the predation phenomenon of strain Y22 was strongly inhibited and almost invisible. [Conclusion] Environmental carbohydrates will affect the metabolic activity of host bacteria, acidify the co-culture system, and change the cell characteristics of the host, which inhibit the predatory activity of *H. vibrionivorans*. *H. vibrionivorans* can absorb and utilize the environmental protein or peptide, by which its predatory growth will be inhibited. The results will provide further insights into the predation mechanism and antibacterial application of *Halobacteriovorax*.

**Keywords:** *Halobacteriovorax vibrionivorans*, carbon source, *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALOs), predation mechanism

蛭弧菌类群(*Bdellovibrio*-and-like Organisms, BALOs)是一类捕食其他细菌的小型革兰氏阴性细菌,专性寄生于猎物细菌表面或胞间质内,以细胞内容为营养物质进行生长和繁殖<sup>[1-3]</sup>,广泛分布于自然界中,包括土壤、水系、动植物体表、动物肠道、动物粪便等环境<sup>[4-7]</sup>。目前已知的专性捕食BALOs有8个物种,隶属于5个属:蛭弧菌属

(*Bdellovibrio*)、噬菌弧菌属(*Bacteriovorax*)、嗜盐噬菌弧菌属(*Halobacteriovorax*)、吞菌弧菌属(*Peredibacter*)和麦卡弧菌属(*Micavibrio*)<sup>[8-11]</sup>。研究表明BALOs无法攻击真核细胞,对鱼类、动物和人类的健康无负面影响<sup>[12-13]</sup>,可作为“活性抗生素”,在净化水体、消除病原细菌以及水生生物的疾病防控方面具有广阔的应用前景<sup>[14-16]</sup>。

作为专性捕食微生物, BALOs 捕食过程受各类环境因素的影响, 比如宿主、温度、盐度、pH、金属离子、氧气及碳氮源等。一般而言, BALOs 的适宜生长温度为 15–35 °C, pH 为 7.0–8.0, 盐度适应范围为 0.5%–4.0%<sup>[8–11]</sup>。碳氮源是细菌生长繁殖所必需的营养成分, 有研究表明噬菌蛭弧菌 (*B. bacteriovorus*) 不具有利用碳水化合物的能力, 能以蛋白质、多肽与氨基酸作为碳氮源和能源<sup>[17–18]</sup>。嗜盐噬菌弧菌属于海洋细菌, 与蛭弧菌属亲缘关系远, 二者具有相似的捕食生活史。目前尚无关于嗜盐噬菌弧菌捕食生理特性方面的系统研究报道, 这限制了人们对该类群的认知和实际应用。菌株 Y22 来源于中国近海海水, 属于食弧菌嗜盐噬菌弧菌, 是目前已知的捕食效率最高的 BALOs 新物种, 适宜条件下, 12–18 h 内其可进入捕食生长稳定期<sup>[19]</sup>。为了进一步探索菌株 Y22 捕食生长的生理机制, 我们通过基因组序列分析其碳源代谢特性, 并结合蛭弧菌类菌剂在生产和水产养殖应用过程中涉及的常见碳源种类, 选择并系统研究 8 种常见有机碳源(包括 2 种碳氮源)对其捕食生长的影响, 以期为后续该微生物菌剂的开发和应用提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

捕食菌食弧菌嗜盐噬菌弧菌 Y22 来源于中国福建省安海海域(24.383 910°N, 118.262 397°E); 溶藻弧菌 LF TCBS 15 (MCCC 1K03520)作为菌株 Y22 的宿主菌, 来源于中国广东省陆丰海域(22.692°N, 115.888°E)。菌株 Y22 的 16S rRNA 基因序列 GenBank 登录号为 MH997664。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、可溶性淀粉、甘露醇、 $\alpha$ -乳糖、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、KCl、NaCl 等均为国产分析纯; 胰蛋白胨、酵母提取物、TCBS 固体培养基, 宝赛生物科技有限公司。酶标仪, Thermo Fisher Scientific 公司; 微量振荡器, 江苏大唐医疗器械有限公司; pH 计, 杭州奇威仪器有限公司。

### 1.1.3 培养基

(1) 2216E 培养基和 TCBS 培养基: 参考文献[20]配制;(2) 海水双层琼脂: 参考文献[21]配制;(3) 人工海水培养体系: 参考文献[22]并略做调整, 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 54 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 25 g/L NaCl, 0–8 g/L 的碳源, 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤除菌;(4) Tris-HCl 缓冲培养体系: 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0), 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 54 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 25 g/L NaCl, 0–8 g/L 的碳源, 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤除菌。

## 1.2 方法

### 1.2.1 基因组分析

菌株 Y22 和 LF TCBS 15 基因组 GenBank 登录号分别为 SGIQ00000000 和 SBIG00000000, 根据已有的基因组数据, 针对胞外碳源代谢通路进行重新注释及分析。基因注释根据美国 NCBI 原核基因组注释原则(Prokaryotic Genome Annotation Pipeline, PGAP, [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation\\_prok/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/))执行<sup>[23]</sup>, 细胞代谢通路通过 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, <https://www.kegg.jp>)数据库分析<sup>[24]</sup>, 膜转运蛋白通过 Transporter Classification Database (TCDB, <http://www.tcdb.org/>)数据库分析<sup>[25]</sup>。

### 1.2.2 宿主及食弧菌嗜盐噬菌弧菌的培养

宿主菌的培养、食弧菌嗜盐噬菌弧菌的双层平板培养及液体培养参照文献[21]。28 °C、150 r/min 培养 16–24 h, 食弧菌嗜盐噬菌弧菌浓度可达 10<sup>9</sup> cells/mL。宿主菌培养液于 10 000 r/min 离心 5 min 收集菌体沉淀, 用无菌海水重悬菌体, 菌悬液浓度调整至 10<sup>10</sup> cells/mL。因为食弧菌嗜盐噬菌弧菌菌液存放 24 h 后活力不稳定, 所以应新鲜培养以保证菌株活力。宿主菌悬液在–4 °C 冰箱中可存放 14 d 备用, 72 h 以内, 宿主菌株 LF TCBS 15 的活菌数量无明显变化, 7 d 后活菌数量可降 2 个数量级, 因此在对食弧菌嗜盐噬菌弧菌生理特性测定时要采用新鲜制备的宿主, 确保在试验过程中宿主保持活力。

### 1.2.3 糖类对宿主生长的影响

采用 96 孔板测定细胞吸光度法<sup>[19]</sup>测定不同糖类对溶藻弧菌(*V. alginolyticus*) LF TCBS 15 生长的影响, 每种糖类的质量浓度均为 3 g/L。每孔 200  $\mu\text{L}$  含糖人工海水培养体系, 1% 接种量。28  $^{\circ}\text{C}$  培养 12 h。每隔 3 h 测定培养液  $OD_{620}$ , 每个梯度取 3 个平行, 设置无糖空白对照。根据  $OD_{620}$  值的变化判断菌株 LF TCBS 15 对不同糖类的利用情况。培养过程中, 以 2 种精密 pH 试纸监测培养液的 pH 值变化状况, 并用 pH 计对 pH 试纸进行准确度验证。以下培养体系 pH 值的监测皆按此法。

### 1.2.4 不同 pH 对食弧菌嗜盐噬菌弧菌捕食生长的影响

采用 96 孔板测定细胞吸光度法和双层平板法分别测定人工海水培养体系下不同 pH 值对食弧菌嗜盐噬菌弧菌捕食生长的影响。pH 值梯度设置为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、8.0 和 9.0, 以 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 溶液调配培养体系的 pH 值, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌备用。根据文献[26]及本实验室前期研究经验, 当食弧菌嗜盐噬菌弧菌与宿主菌的细胞数量比例达到 1:10 时, 捕食生长速度快, 28–37  $^{\circ}\text{C}$  培养 12–18 h 后, 进入捕食生长稳定期。96 孔板中每孔加入 20  $\mu\text{L}$  宿主菌悬液( $10^{10}$  cells/mL)、20  $\mu\text{L}$  食弧菌嗜盐噬菌弧菌培养液( $10^9$  cells/mL)、160  $\mu\text{L}$  不同 pH 的人工海水培养体系, 使食弧菌嗜盐噬菌弧菌与宿主菌数量比接近 1:10, 混匀后 28  $^{\circ}\text{C}$  培养至对照培养体系捕食生长稳定期(12–18 h), 分别在 0、2、4、6、8、9、12 和 14 h 测定  $OD_{620}$ , 绘制食弧菌嗜盐噬菌弧菌裂解曲线图。采用双层平板法测定 3 个不同培养时间节点的食弧菌嗜盐噬菌弧菌噬菌斑的数量, 对食弧菌嗜盐噬菌弧菌的生长状态进行辅助验证。培养过程中监测培养液的 pH 值变化状况。同一批次试验中, 各培养体系中菌浓度和比例保持一致。

### 1.2.5 糖类对食弧菌嗜盐噬菌弧菌捕食生长的影响

采用 96 孔板测定细胞吸光度法和双层平板法

分别测定 Tris-HCl 缓冲培养体系和人工海水 2 种不同的培养体系下, 不同糖类对食弧菌嗜盐噬菌弧菌捕食生长的影响。每种糖类质量浓度为 3 g/L。96 孔板中每孔加入 20  $\mu\text{L}$  宿主菌悬液、20  $\mu\text{L}$  食弧菌嗜盐噬菌弧菌培养液、160  $\mu\text{L}$  人工海水培养体系或 Tris-HCl 缓冲培养体系, 使食弧菌嗜盐噬菌弧菌与宿主菌数量比接近 1:10, 混匀后 28  $^{\circ}\text{C}$  培养至无糖对照培养体系中食弧菌嗜盐噬菌弧菌进入捕食生长稳定期(12–18 h), 每隔 1 h 测定  $OD_{620}$ , 计算不同生长阶段宿主存留率并绘制食弧菌嗜盐噬菌弧菌裂解曲线图。培养过程中, 通过光学显微镜观测及食弧菌嗜盐噬菌弧菌噬菌斑数量检测, 对食弧菌嗜盐噬菌弧菌的生长状态进行辅助验证。

为了探讨糖类对食弧菌嗜盐噬菌弧菌捕食生长的影响机制, 同时测定 Tris-HCl 缓冲培养体系和人工海水培养体系下食弧菌嗜盐噬菌弧菌对热致死宿主的裂解曲线。宿主菌 LF TCBS 15 热致死条件: 70  $^{\circ}\text{C}$  水浴 3 h 致死, 取 100  $\mu\text{L}$  菌液( $1 \times 10^{10}$  cells/mL)进行 TCBS 琼脂平板涂布, 确认宿主菌处于死亡状态。食弧菌嗜盐噬菌弧菌接种前采用梯度离心法处理: 2 000 r/min 离心 10 min, 5 000 r/min 离心 10 min, 2 次离心均弃菌体沉淀, 尽可能除去多余宿主菌, 上层菌液于 14 000 r/min 离心 5 min, 收集食弧菌嗜盐噬菌弧菌菌体沉淀, 用无菌海水重新悬浮菌体, 通过光学显微镜检测确保每个视野中宿主细胞数量比例低于 0.1%, 食弧菌嗜盐噬菌弧菌菌悬液菌体浓度调整为  $10^9$  cells/mL。其他方法同上。由于目前已知的过滤法和梯度离心法皆无法完全排除食弧菌嗜盐噬菌弧菌培养物中的微量宿主, 培养过程中我们采用梯度稀释涂布平板法(TCBS 琼脂平板)监测残余活宿主的数量变化, 并测定活宿主数量与  $OD_{620}$  之间的对应关系, 判断残余活宿主菌在培养过程中是否会干扰食弧菌嗜盐噬菌弧菌对死宿主细胞的裂解曲线。同时, 为了排除培养过程中残余活宿主的代谢酶类对死

宿主的裂解可能,我们设定了在死细胞体系下的阴性对照(无捕食菌),体系中包含  $10^9$  cells/mL 热致死宿主及  $10^6$  CFU/mL 活宿主细胞,28 °C 培养 24 h,每隔 3 h 或 6 h 测定培养体系的  $OD_{620}$ ,并用稀释涂布平板法测定 0 h 和 24 h 活宿主的数量变化。

试验设定 3 组平行并设定空白对照(无糖体系),独立重复试验 2 次以上。同一批次试验中,各培养体系中菌浓度及比例保持一致。培养过程中监测培养液的 pH 值变化情况。

### 1.2.6 不同浓度酵母提取物及胰蛋白胨对食弧菌嗜盐噬菌弧菌捕食生长的影响

采用人工海水和 Tris-HCl 缓冲培养体系测定外源酵母提取物及胰蛋白胨对食弧菌嗜盐噬菌弧菌捕食生长的影响。酵母提取物和胰蛋白胨浓度梯度设置为 0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0 g/L。测定方法同 1.2.5。试验设定 3 组平行,独立重复试验 2 次以上。同一批次试验中,各培养体系中菌浓度及比例保持一致。培养过程中监测培养液的 pH 值变化情况。

### 1.2.7 数据分析

用 Excel (2003)软件整理和分析数据计算宿主存留率,宿主存留率计算公式为:宿主存留率(Host Retention Rate)=(培养  $n$  h 的  $OD_{620}$  值/培养 0 h 的  $OD_{620}$  值) $\times 100\%$ 。计算宿主存留率有利于批次间试验数据的比较。使用软件 OriginPro (2016)绘制曲线图,使用 SPSS 在线分析软件(<https://spssau.com/front/spssau/index.html>)  $t$  检验分析数据组之间的差异性。

进入捕食生长稳定期(12–18 h)后,由于培养体系中宿主菌的缺乏,食弧菌嗜盐噬菌弧菌无法通过捕食宿主获取能源物质,同时由于“高速运动”快速消耗细胞内营养物质,从而丧失捕食能力或死亡<sup>[27–28]</sup>。为了保证数据的准确性和严谨性,捕食稳定期(12–18 h)之后的数据不在本研究的分析范围之内,我们将稳定期以后的数据归入“菌种常温保藏”的研究专题。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组水平阐释菌株对糖及蛋白质的吸收利用

糖类是异养型微生物最广泛利用的有机碳源,一般单糖优于双糖和多糖。蛋白质是最常用的有机碳氮源,牛肉膏、酵母粉和蛋白胨尤为广泛使用。KEGG 代谢通路和基因功能注释结果表明独立生长菌株 LF TCBS 15 与专性捕食菌株 Y22 的碳源谱差异极大,在外源糖类及蛋白的吸收利用上具有明显的差异。

菌株 LF TCBS 15 细胞膜上具有完整的磷酸转运系统(Phosphotransferase System, PTS)和 ATP 结合盒转运系统(ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters),可以通过基因移位和主动运输的方式从外界环境中吸收葡萄糖、N-乙酰氨基葡萄糖、葡萄糖苷、海藻糖、麦芽糖、甘露糖、核糖、D-木糖、甘露醇、山梨醇、蔗糖、纤维二糖、几丁二糖、麦芽糖糊精、麦芽低聚糖和半乳糖低聚糖;缺乏乳糖膜转运通道,无胞外淀粉酶和胞外纤维素酶,因此无法吸收利用环境中的乳糖、淀粉及纤维素。菌株 LF TCBS 15 具有胞外胶原酶,不具有胞外肽酶,细胞膜上具有 39 种以上的蛋白、多肽及二肽转运相关蛋白,可以直接吸收、转运细胞外蛋白、多肽及二肽进入细胞作为生命活动所需的碳源、氮源及能源物质。

菌株 Y22 细胞膜上缺失上述糖类的磷酸转运系统(完全缺失,KEGG 代谢通路无注释)和 ABC 转运系统,也无糖类协助扩散的蛋白通道,不能吸收利用环境中的糖类作为生长的主要碳源物质。菌株 Y22 具有胞外蛋白酶和胞外肽酶,能水解细胞外的蛋白质成多肽或二肽。细胞膜上具有 15 种以上的蛋白、多肽及二肽转运相关蛋白,可以直接吸收、转运细胞外蛋白、多肽及二肽进入细胞作为生命活动所需的碳源、氮源及能源物质。

### 2.2 不同糖类对溶藻弧菌 LF TCBS 15 生长的影响

溶藻弧菌 LF TCBS 15 可以利用葡萄糖、蔗糖、

麦芽糖、甘露醇生长并产酸, 其中, 对麦芽糖的利用效率最高, 其次是葡萄糖、蔗糖、甘露醇; 然而淀粉和  $\alpha$ -乳糖对菌株 LF TCBS 15 生长无影响, 体系中 pH 值无明显变化。该试验结果与基因组分析结果及以往的研究报道相符<sup>[29-30]</sup>。此外, 培养过程中麦芽糖培养体系 pH 值从 7.0 降至 5.0 左右, 细胞数量持续增长并进入稳定生长期, 可见 pH 5.0-5.5 时溶藻弧菌 LF TCBS 15 仍然具有正常活力, 不会因为培养体系 pH 降低而引起细胞死亡。

### 2.3 不同 pH 值对食弧菌嗜盐噬菌弧菌 Y22 捕食生长的影响

在人工海水培养体系中, 菌株 Y22 可以在 pH 6.0-9.0 的范围内捕食生长(图 1), pH 6.0 条件下捕食生长延滞了 4 h, pH 6.5-9.0 条件下捕食能力无明显差异( $P \geq 0.868$ ); 当培养体系 pH 值处于 5.0-5.5 时, 培养体系的  $OD_{620}$  值几乎没有变化, 菌株 Y22 未表现出明显的捕食现象。通过测定培养体系培养前后的噬菌斑数量变化, 发现培养 18 h 后 pH 值为 5.0 和 5.5 的培养体系中食弧菌嗜盐噬菌弧菌数量降低了一个数量级左右(表 1)。试验结果表明, 当

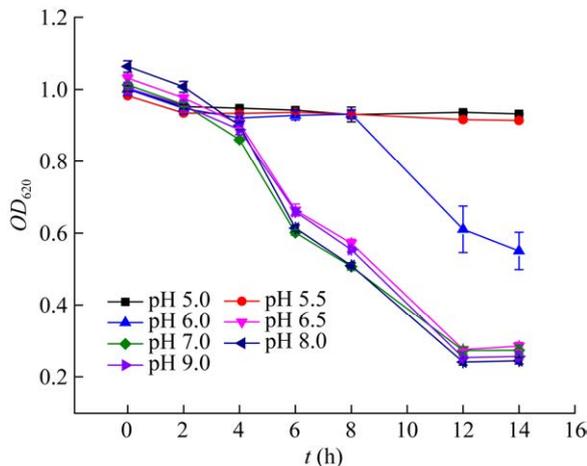


图 1 不同 pH 对菌株 Y22 捕食的影响

Figure 1 Effect of different pH on the predation of strain Y22

注: 在每种条件下进行 3 个平行实验, Mean $\pm$ SD 代表数据 $\pm$ 标准误差

Note: Data and standard error bars represent mean $\pm$ SD from three parallel experiments at each condition

表 1 不同 pH 条件对菌株 Y22 生长的影响(噬菌斑数量, PFU/mL)

Table 1 Effect of different pH on the growth of strain Y22 (number of plaques, PFU/mL)

pH value	Culture time (h)		
	0	9	18
5.0	$2.40 \times 10^8$	$1.57 \times 10^8$	$3.05 \times 10^7$
5.5	$2.40 \times 10^8$	$1.66 \times 10^8$	$3.55 \times 10^7$
6.0	$2.40 \times 10^8$	$3.70 \times 10^8$	$1.92 \times 10^9$
6.5	$2.40 \times 10^8$	$5.60 \times 10^8$	$2.26 \times 10^9$
7.0	$2.40 \times 10^8$	$6.80 \times 10^8$	$2.55 \times 10^9$
8.0	$2.40 \times 10^8$	$6.45 \times 10^8$	$2.48 \times 10^9$
9.0	$2.40 \times 10^8$	$6.00 \times 10^8$	$2.30 \times 10^9$

培养体系中 pH 值低于 6.0 时菌株 Y22 的活力会受到严重抑制, 而且这种抑制几乎不可逆, 培养 18 h 后只有 13%-15% 菌体保持活力(表 1)。

### 2.4 蔗糖、麦芽糖、甘露醇对食弧菌嗜盐噬菌弧菌 Y22 捕食生长的影响

在菌株 Y22 的实验室培养过程中, 添加糖类物质对其捕食生长有抑制作用, 为了探究其生理机制, 采用人工海水培养体系和 Tris-HCl 缓冲培养体系进行试验验证。2 种培养体系的主要差别在于后者在培养过程中可以保持培养体系的 pH 稳定性, 而前者不具有 pH 缓冲性, 容易受到干扰。在人工海水培养体系下, 添加蔗糖培养 18 h 后, 培养体系的 pH 值由初始 7.0 降低至 5.4 左右, 未观察到  $OD_{620}$  值降低(图 2A), 噬菌斑的数量未增加, 而且从初始的  $1.52 \times 10^8$  PFU/mL 降至  $4.50 \times 10^7$  PFU/mL, 在光学显微镜下同样未见菌株 Y22 细胞数量增多, 菌株 Y22 无明显的捕食表现, 捕食生长被完全抑制, 该结果与 2.3 的结果相符合。在 Tris-HCl 缓冲培养体系下 pH 保持恒定(pH 7.0), 菌株 Y22 的捕食生长不受影响, 与空白组结果无明显差别(图 2B,  $P=0.768$ ), 初步断定蔗糖对菌株 Y22 的抑制是由于宿主菌代谢产酸使培养基酸化导致。

为了验证上述推断, 将人工海水培养体系(添加 3 g/L 蔗糖)初始 pH 调整为 9.0, 并观察菌株 Y22 的生长情况。培养 18 h 后, 培养液的 pH 值由 9.0

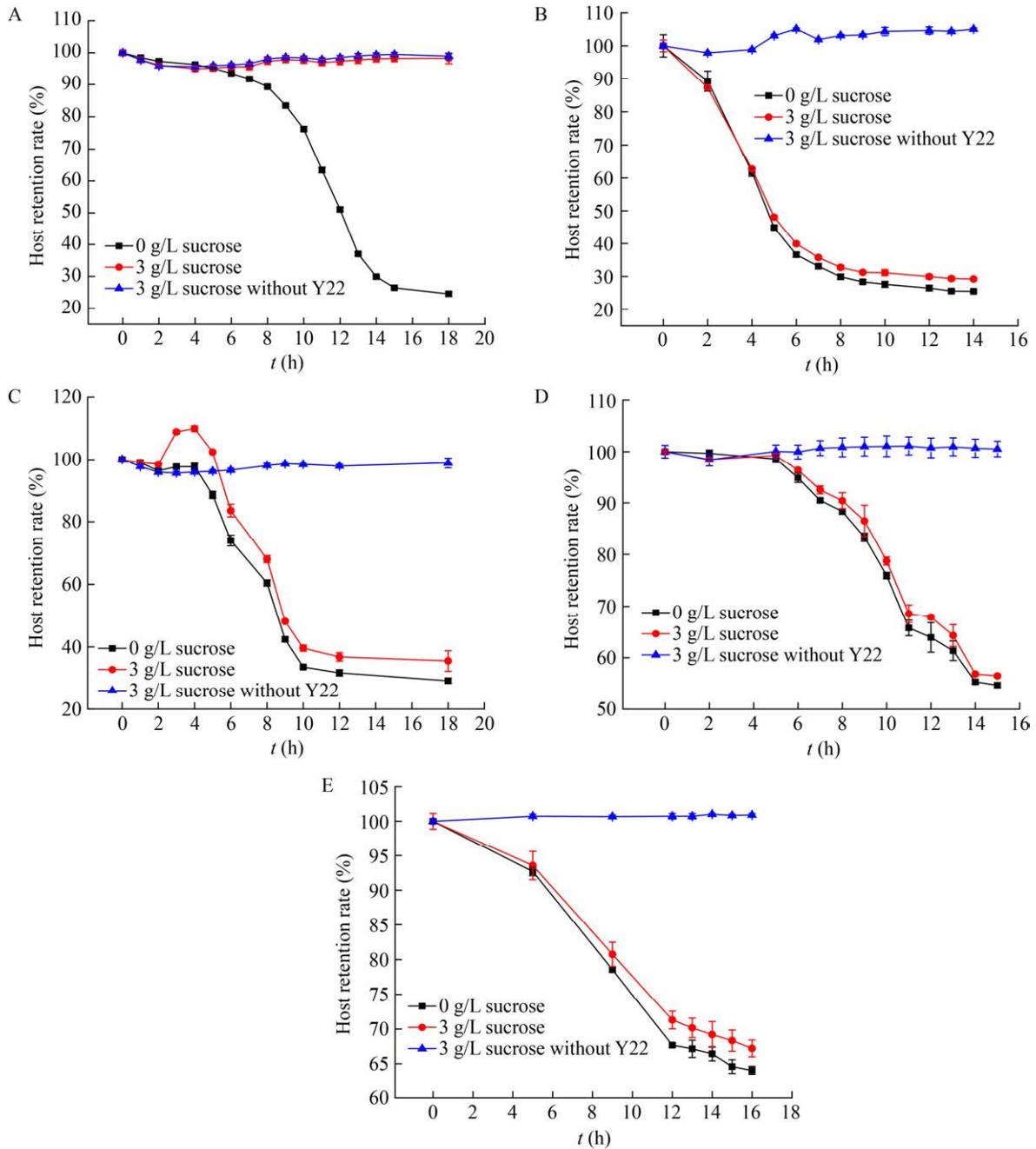


图 2 蔗糖对菌株 Y22 捕食的影响

**Figure 2 Effect of sucrose on the predation of strain Y22**

注: A: 人工海水培养体系(pH 7.0, 活细胞); B: Tris-HCl 缓冲培养体系(pH 7.0, 活细胞); C: 人工海水培养体系(pH 9.0, 活细胞); D: 人工海水培养体系(pH 7.0, 热致死细胞); E: Tris-HCl 缓冲培养体系(pH 7.0, 热致死细胞)。在每种条件下进行 3 个平行实验, Mean±SD 代表数据±标准误差

Note: A: Artificial seawater co-culture system (pH 7.0, viable host); B: Tris-HCl buffer co-culture system (pH 7.0, viable host); C: Artificial seawater co-culture system (pH 9.0, viable host); D: Artificial seawater co-culture system (pH 7.0, heat-deactivated host); E: Tris-HCl buffer co-culture system (pH 7.0, heat-deactivated host). Data and standard error bars represent mean±SD from three parallel experiments at each condition

降低至 7.2 左右, 该 pH 值范围适合菌株 Y22 的生长(图 1), 结果发现菌株 Y22 生长良好, 与空白对照组(无蔗糖)裂解宿主的趋势无明显差异(图 2C,  $P=0.583$ ), 菌株形成的噬菌斑数量从初始的  $1.52 \times 10^8$  PFU/mL 增加至  $1.17 \times 10^9$  PFU/mL。该结果验证了我们的推断, 说明宿主菌代谢蔗糖产酸引起人工海水培养体系 pH 值降低, 当 pH 值低于菌株 Y22 的生长范围( $< \text{pH } 6.0$ )时, 几乎不可逆( $>85\%$ )地抑制菌株 Y22 的捕食生长(表 1)。

此外, 为了排除菌株 Y22 本身生长可能存在对上述推断的影响, 将宿主进行加热致死, 重复上述试验过程。菌株 Y22 在人工海水培养体系和 Tris-HCl 缓冲培养体系下培养, 2 种培养体系的 pH 值均未发生明显变化, 而且菌株 Y22 均可以捕食死宿主,  $OD_{620}$  从 0.75 降低到 0.40 左右, 对死宿主的捕食效率比活宿主差, 但与对照组无明显差别(图 2D、2E,  $P_D=0.783$ ,  $P_E=0.708$ )。在这个热致死宿主培养体系中, 由于梯度离心无法完全去除菌株 Y22 培养液中的宿主活细胞, 所获取的菌株 Y22 “种子液”仍然含有极其微量( $<0.1\%$ )的残余活宿主细胞。为了进一步排除残留宿主活细胞是否会影响菌株 Y22 对热致死宿主菌的裂解曲线, 测定了热致死宿主共培养体系中宿主活细胞数量变化及其与  $OD_{620}$  值的对应关系。人工海水培养体系初始的活宿主数量为  $4.55 \times 10^4$  CFU/mL, 在整个培养过程中数量增至  $5.40 \times 10^6$  CFU/mL; Tris-HCl 缓冲培养体系初始的活宿主菌数量为  $4.40 \times 10^4$  CFU/mL, 在整个培养过程中数量增至  $5.30 \times 10^6$  CFU/mL, 其对应的  $OD_{620}$  变化低于 0.009, 相对于整个培养体系的  $OD_{620}$  变化(0.75–0.40), 这种波动可以忽略不计, 排除了残留宿主活细胞对热致死宿主培养体系  $OD_{620}$  变化的影响。此外, 在阴性对照培养体系(包含热致死宿主和少量活宿主)中, 培养 24 h 后活宿主从初始的  $3.10 \times 10^6$  CFU/mL 增加为  $6.85 \times 10^6$  CFU/mL, 培养体系  $OD_{620}$  保持在 0.80 左右, 未发现死宿主细胞因活宿主的增加而裂解, 可见培养过程中活细

胞代谢产生的水解酶不足以使热致死宿主细胞快速溶解而影响体系的  $OD_{620}$  值。这些结果进一步证明了蔗糖对菌株 Y22 的捕食抑制现象主要是通过宿主菌代谢产酸引起的, 与菌株 Y22 本身的相关性不大。麦芽糖和甘露醇对菌株 Y22 的捕食影响与蔗糖的结果相似, 在此不再赘述。

## 2.5 葡萄糖对食弧菌嗜盐噬菌弧菌 Y22 捕食生长的影响

菌株 Y22 在葡萄糖人工海水培养体系和 Tris-HCl 缓冲培养体系下生长情况无明显的差异(图 3A、3B), 捕食生长现象均被显著抑制。培养 18 h 后, 人工海水培养体系 pH 值同样从 7.0 降至 5.4 左右, 而 Tris-HCl 缓冲培养体系 pH 保持恒定(pH 7.0)。在人工海水培养体系下菌株 Y22 的活力受到抑制, 培养 18 h 后, 噬菌斑的数量由初始值  $1.52 \times 10^8$  PFU/mL 降至  $3.80 \times 10^7$  PFU/mL, 而 Tris-HCl 缓冲培养体系下菌株 Y22 形成噬菌斑的能力没有下降, 噬菌斑数量略有增加, 由初始值  $2.45 \times 10^8$  PFU/mL 微增至  $4.95 \times 10^8$  PFU/mL, 该试验结果与 2.3 和 2.4 的结果相一致, 进一步证明较低的 pH (5.0–5.5) 可以不可逆地破坏菌株 Y22 的捕食能力, 完全抑制菌株 Y22 捕食生长(表 1)。Tris-HCl 缓冲培养体系由于 pH 值未发生改变, 从而保持菌株 Y22 的捕食活力, 但其培养过程中裂解宿主现象不明显, 培养体系  $OD_{620}$  值未降低(图 3B), 与空白对照相比, 捕食抑制现象明显, 说明存在除 pH 值以外其他影响捕食的因素。

为了验证葡萄糖对菌株 Y22 抑制的可能机理, 同样进行了 2 个不同的试验。(1) 将人工海水培养体系(3 g/L 葡萄糖)初始 pH 调整为 9.0, 观察菌株 Y22 的生长情况。在 18 h 的培养过程中, 培养体系的 pH 值由 9.0 降至 7.0 左右, 该 pH 值范围适合菌株 Y22 的生长, 其噬菌斑数量略有增加, 保持了捕食活力, 但是裂解宿主现象仍未明显体现(图 3C), 培养体系  $OD_{620}$  值未降低, 捕食受到极大抑制。该结果进一步说明葡萄糖对菌株 Y22 的抑

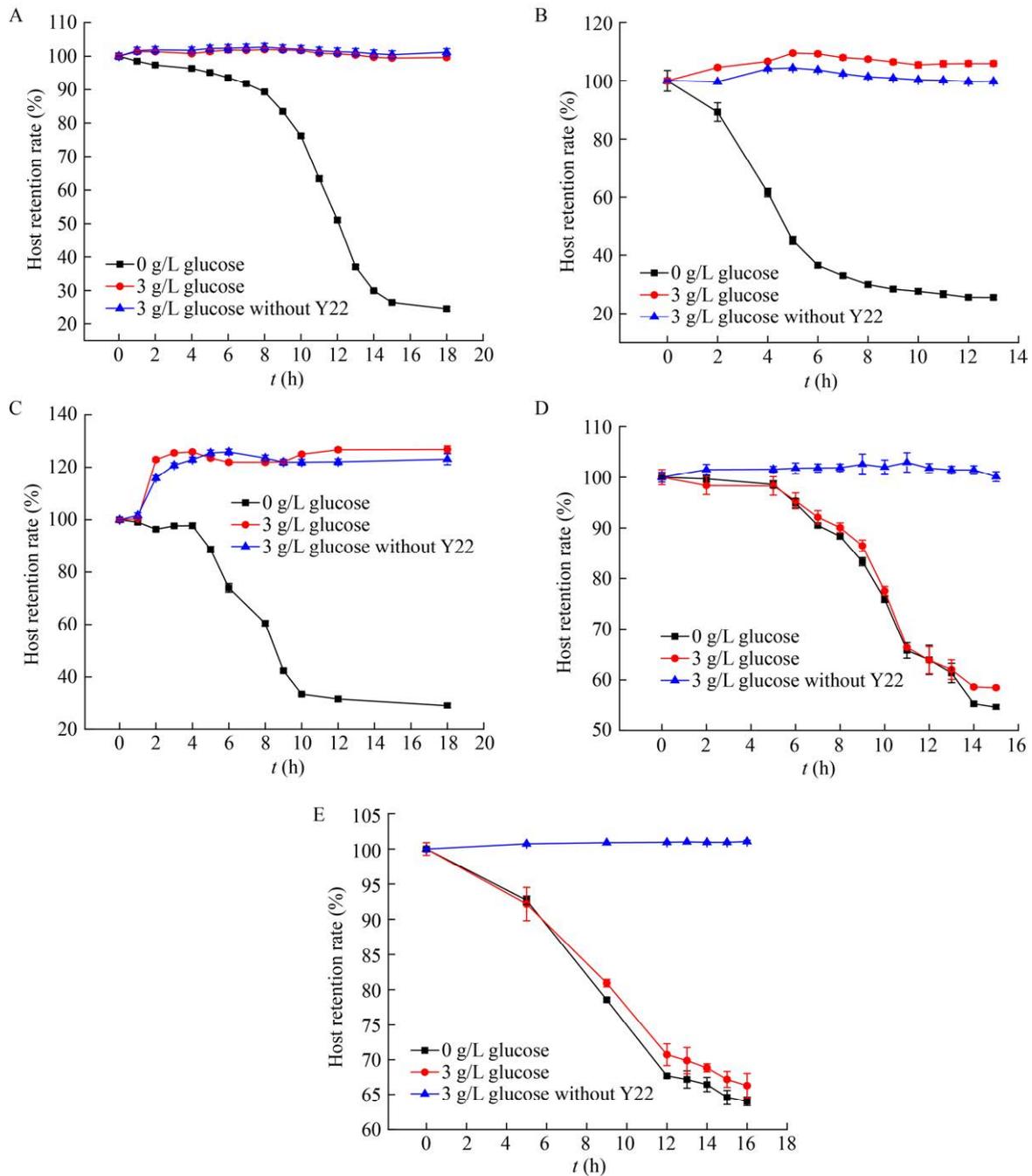


图3 葡萄糖对菌株 Y22 捕食的影响

Figure 3 Effect of glucose on the predation of strain Y22

注: A: 人工海水培养体系(pH 7.0, 活细胞); B: Tris-HCl 缓冲培养体系(pH 7.0, 活细胞); C: 人工海水培养体系(pH 9.0, 活细胞); D: 人工海水培养体系(pH 7.0, 热致死细胞); E: Tris-HCl 缓冲培养体系(pH 7.0, 热致死细胞)。在每种条件下进行 3 个平行实验, Mean±SD 代表数据±标准误差

Note: A: Artificial seawater co-culture system (pH 7.0, viable host); B: Tris-HCl buffer co-culture system (pH 7.0, viable host); C: Artificial seawater co-culture system (pH 9.0, viable host); D: Artificial seawater co-culture system (pH 7.0, heat-deactivated host); E: Tris-HCl buffer co-culture system (pH 7.0, heat-deactivated host). Data and standard error bars represent mean±SD from three parallel experiments at each condition

制作用除了受 pH 值变化影响以外, 还存在其他影响捕食的因素。(2) 为了验证这种影响捕食因素的来源, 同样采用热致死宿主培养的方法, 发现菌株 Y22 在人工海水培养体系和 Tris-HCl 缓冲培养体系下(pH 值在培养过程中无明显变化), 皆可以捕食死宿主, 与空白对照无显著差异(图 3D、3E,  $P_D=0.861$ ,  $P_E=0.786$ ), 说明在培养过程中葡萄糖对菌株 Y22 生长的抑制与菌株 Y22 自身无关, 而与宿主活性有关。葡萄糖对菌株 Y22 生长的抑制可能由多方面的因素引起的: 一是在培养过程宿主代谢葡萄糖导致人工海水培养体系的酸化影响菌株 Y22 的生长; 二是葡萄糖进入宿主细胞可能发

生了异化作用(如蛋白糖基化), 改变了宿主的表面结构或成分组成, 影响菌株 Y22 对宿主的识别吸附, 从而抑制捕食生长。

## 2.6 淀粉、 $\alpha$ -乳糖对食弧菌嗜盐噬菌弧菌 Y22 捕食生长的影响

菌株 Y22 在淀粉、 $\alpha$ -乳糖的人工海水培养体系和 Tris-HCl 缓冲培养体系下生长情况与空白对照无明显差异(图 4,  $P_A=0.982$ ,  $P_B=0.920$ ,  $P_C=0.521$ ,  $P_D=0.992$ ), 淀粉和  $\alpha$ -乳糖不影响菌株 Y22 的捕食生长。由于宿主菌不吸收或利用淀粉和  $\alpha$ -乳糖, 培养过程中人工海水培养体系的 pH 也未发生变化, 而且菌株 Y22 本身也不吸收和利用这些物质,

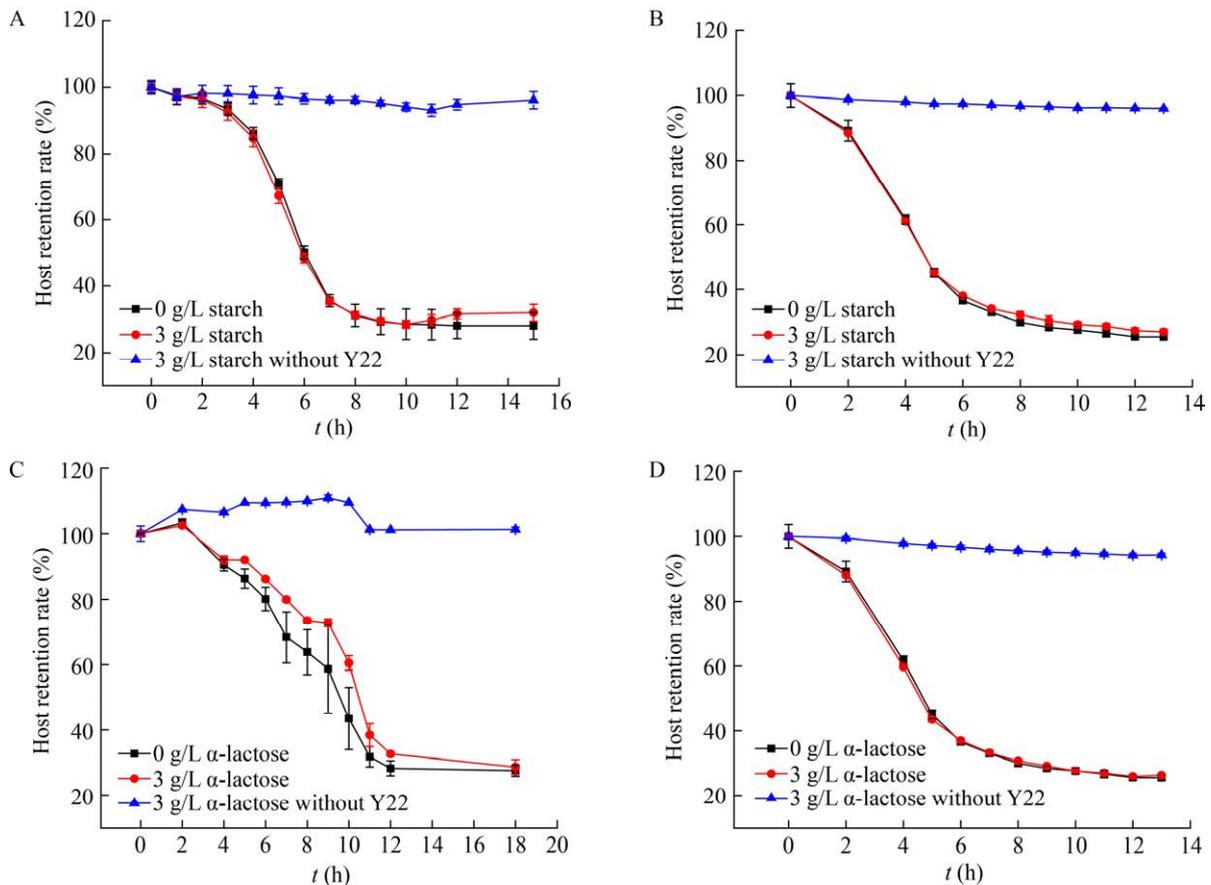


图 4 淀粉、 $\alpha$ -乳糖对菌株 Y22 捕食的影响

Figure 4 Effect of starch and  $\alpha$ -lactose on the predation of strain Y22

注: A 和 C: 人工海水培养体系(pH 7.0, 活细胞); B 和 D: Tris-HCl 缓冲培养体系(pH 7.0, 活细胞)。在每种条件下进行 3 个平行实验, Mean $\pm$ SD 代表数据 $\pm$ 标准误差

Note: A and C: Artificial seawater co-culture system (pH 7.0, viable host); B and D: Tris-HCl buffer co-culture system (pH 7.0, viable host). Data and standard error bars represent mean $\pm$ SD from three parallel experiments at each condition

淀粉和  $\alpha$ -乳糖在该培养体系中属于惰性物质, 菌株 Y22 捕食生长过程不受影响。

## 2.7 不同浓度酵母提取物及胰蛋白胨对食弧菌嗜盐噬菌弧菌 Y22 生长的影响

在活宿主(图 5A、5B)和热致死宿主(图 5C、5D) Tris-HCl 缓冲培养体系以及人工海水培养体系(未附图)中添加不同浓度的外源酵母提取物及胰蛋白胨, 培养过程中 2 种培养体系的 pH 皆无明显变化, 菌株 Y22 捕食生长趋势相当。在酵母提取物和胰蛋白胨浓度范围分别为 0–4.0 g/L 和 0–5.0 g/L

时, 菌株 Y22 均可捕食裂解宿主, 捕食效率与培养体系中营养物浓度成反比。酵母提取物和胰蛋白胨浓度分别高于 4.0 g/L 和 5.0 g/L 时, 菌株 Y22 的捕食生长受到严重抑制, 培养 18 h 后, 共培养体系的噬菌斑数量几乎没变化, 菌株 Y22 的捕食现象未能体现。该结果表明, 酵母提取物和胰蛋白胨对于菌株 Y22 捕食生长的抑制与宿主的活性无关, 酵母提取物和胰蛋白胨可能被捕食菌株 Y22 直接吸收利用并引起捕食相关机能的抑制, 而且这种抑制是可逆的, 所有菌体保留了攻击宿主的能力。

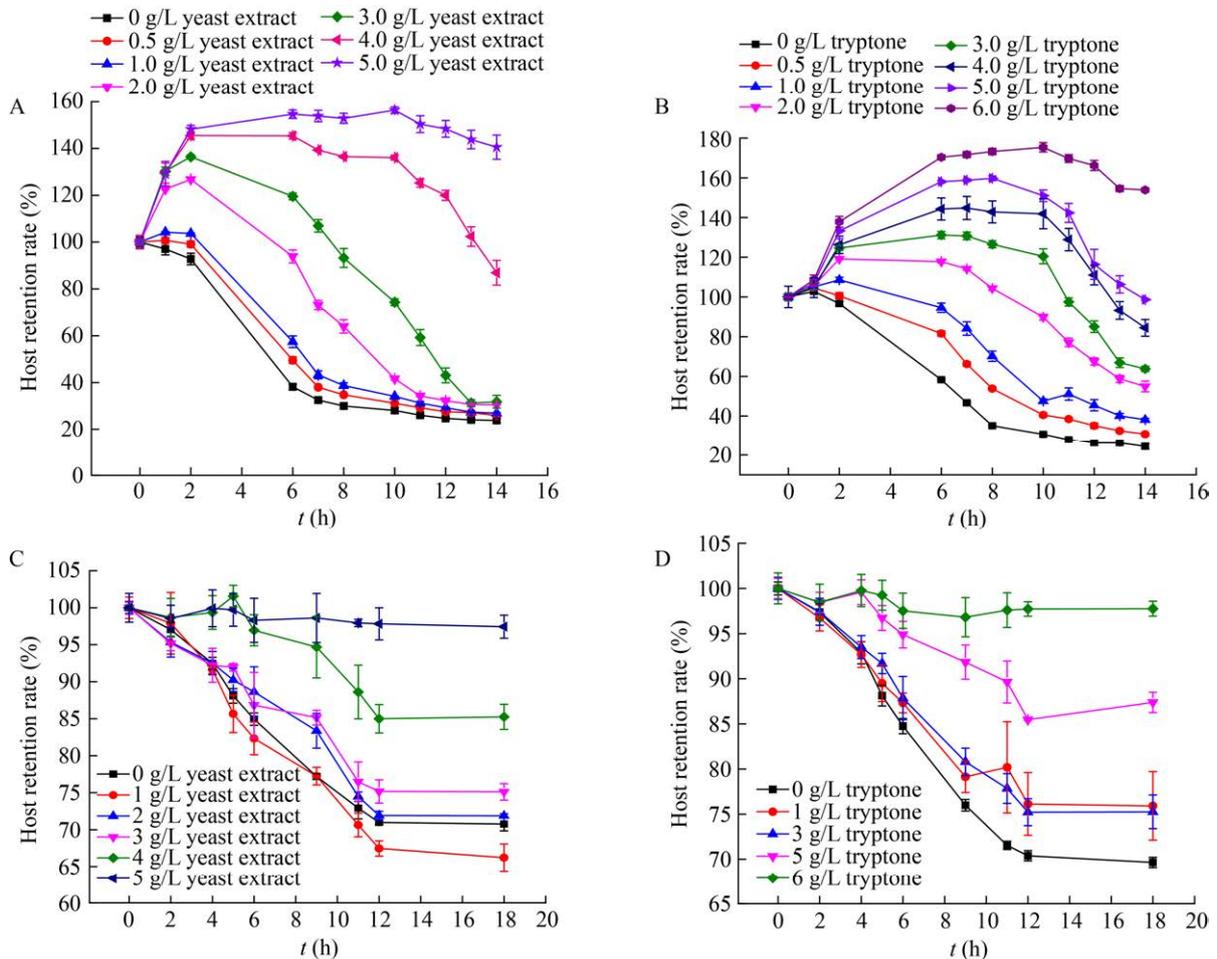


图 5 不同浓度酵母提取物和胰蛋白胨对菌株 Y22 捕食的影响

### Figure 5 Effect of different concentrations of yeast extract and tryptone on the predation of strain Y22

注: A 和 B: Tris-HCl 缓冲培养体系(pH 7.0, 活细胞); C 和 D: Tris-HCl 缓冲培养体系(pH 7.0, 热致死细胞)。在每种条件下进行 3 个平行实验, Mean $\pm$ SD 代表数据 $\pm$ 标准误差

Note: A and B: Tris-HCl buffer co-culture system (pH 7.0, viable host); C and D: Tris-HCl buffer co-culture system (pH 7.0, heat-deactivated host). Data and standard error bars represent mean $\pm$ SD from three parallel experiments at each condition

### 3 讨论与结论

本研究探索了 8 种有机碳源(包括 2 种碳氮源)对菌株 Y22 捕食生长的影响, 结果表明: 菌株 Y22 无法直接利用培养体系中糖类化合物作为碳源, 但糖类化合物可以通过影响宿主进而影响菌株 Y22 的捕食生长; 酵母提取物、胰蛋白胨对捕食菌株的生长抑制具有浓度依赖性, 这种抑制与宿主无关, 可能与捕食菌本身的反馈调节有关。这种碳源抑制捕食的现象在食弧菌嗜盐噬菌弧菌菌株 BL9<sup>T</sup> 中也检测到相似的结果, 并非特例。1984 年, Chemeris 等通过向共培养基中添加糖以及使用伴刀豆球蛋白 A 和高碘酸钠对宿主细胞表面多糖进行修饰, 发现噬菌弧菌的捕食受到抑制<sup>[31]</sup>; Dashiff 等报道<sup>[32]</sup>葡萄糖和甘油会因为宿主的代谢而改变培养体系的 pH 值, 从而抑制噬菌弧菌和食铜绿菌迈卡弧菌(*M. aeruginosavorus*)的捕食, 他们认为这种抑制与蛋白的糖基化没有关系。本研究证实了碳水化合物可以通过宿主细胞的代谢活性导致培养基酸化, 从而抑制食弧菌嗜盐噬菌弧菌的捕食; 同时发现不同糖类的作用机制存在差异, 其中, 培养基中葡萄糖的添加不仅使培养体系 pH 降低, 而且还可使宿主细胞特性发生改变。根据以往的文献报道<sup>[33-34]</sup>, 我们猜测这种细胞特性改变可能是由于细胞表面蛋白糖基化引起的。蛋白糖基化不仅仅在真核细胞中存在, 在原核细胞和古细菌也有发现, 大多数发生在细胞表面, 对细胞具有保护、稳定、组织及屏障等多方面作用<sup>[33]</sup>。蛋白质的 O-GlcNAc 糖基化(O-N-Acetylglucosamine)是糖基化反应的一类, 由 O-连接 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶(O-B-N-Acetylglucosaminyltransferase, OGT)催化 GlcNAc 连接到目标蛋白丝氨酸(Ser)或苏氨酸(Thr)的羟基上<sup>[34]</sup>。我们通过基因组信息分析发现, 宿主菌 LF TCBS 15 细胞内具有 O-GlcNAc 糖基化代谢途径相关基因(图 6), 过量的葡萄糖进入宿主细胞后可转化成 GlcNAc, 然后通过细胞膜上的 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶(N-Acetylglucosaminyltransferase)

连接到蛋白的 Ser 或 Thr 的羟基上, 使宿主细胞内或细胞膜蛋白发生糖基化, 从而可能导致食弧菌嗜盐噬菌弧菌对宿主菌无法识别, 抑制其捕食。

以往研究表明噬菌弧菌不能利用糖类化合物, 但可以利用多肽类化合物作为碳源, 宿主菌和捕食菌株均含有二肽及多肽转运通道, 可以将环境中多肽或短肽转运至细胞内部进行生长代谢<sup>[17-18]</sup>, 与本研究的结果相符。蛋白或多肽也是嗜盐噬菌弧菌生长所必需的碳源, 酵母提取物和胰蛋白胨富含各类蛋白多肽, 原则上能为其生长提供充足的碳源和氮源。但我们发现, 当外界酵母提取物和胰蛋白胨浓度增加到一定程度时却抑制了捕食菌株的捕食生长, 而且这种抑制与宿主菌的活性无关。令我们疑惑的是, 捕食菌可以且必须以蛋白质或多肽为碳源, 为什么添加了蛋白类碳源后反而会不同程度地抑制其捕食? 我们猜测, 当外界环境蛋白类碳源浓度较低(<1 g/L)时, 只是少量蛋白或多肽转运至捕食菌细胞内, 达不到抑制捕食的阈值, 不影响捕食过程; 当外界环境蛋白类碳源浓度增高时, 蛋白、多肽的内运量增加, 捕食菌细胞可能会产生“食物足够”的假象, 导致某些捕食相关基因的表达或蛋白活性受到抑制; 或者蛋白质、多肽及氨基酸的大量存在可能干扰了捕食菌的化学感应系统, 从而干扰捕食菌的运动能力, 使得捕食菌无法对宿主进行有效的定位和攻击, 捕食过程因此受到了抑制。另外, 由于培养体系中缺乏可供食弧菌嗜盐噬菌弧菌吸收和利用的外源核苷酸原料, 所以这种“食物足够”的环境中存在的单一营养物质不足以满足其生长繁殖需求, 无法触发其丝状生长或细胞分裂。研究表明噬菌弧菌对酵母提取物和多种氨基酸表现出趋向性, 通过化学趋向运动寻找碳源和能源, 缓和“饥饿”状态<sup>[35-36]</sup>。这些研究间接证明了培养基中酵母提取物和胰蛋白胨的添加可能会干扰食弧菌嗜盐噬菌弧菌对宿主的趋化性, 一定程度上支持了我们推断的合理性。

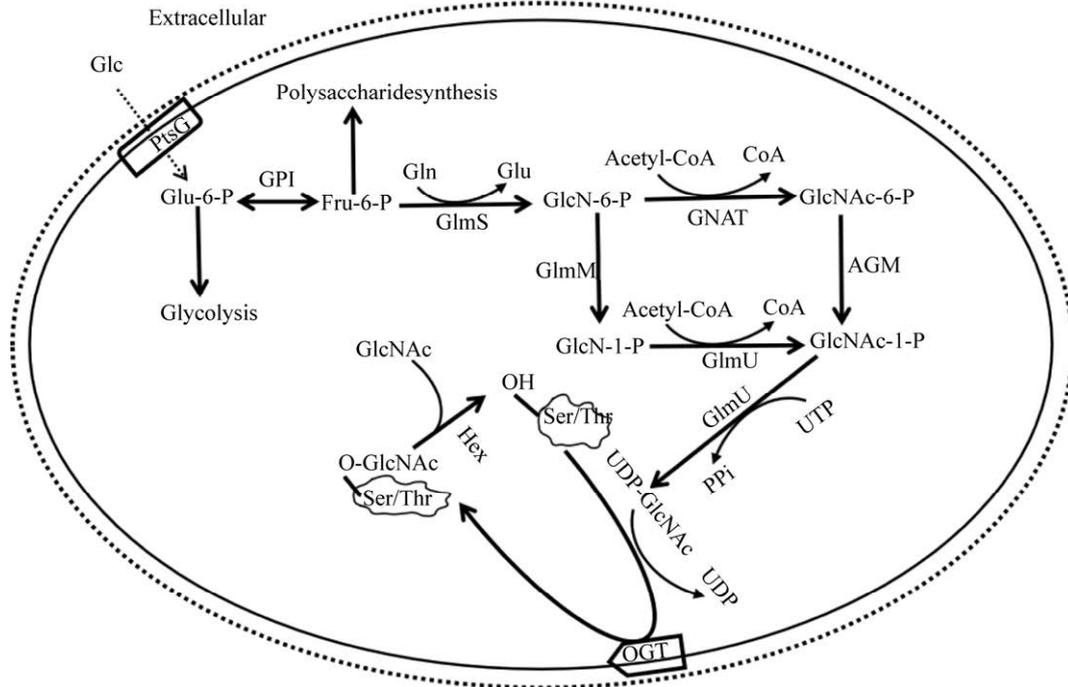


图 6 溶藻弧菌 LF TCBS 15 的 O-GlcNAc 糖基化修饰途径

Figure 6 O-GlcNAcylation pathway of *V. alginolyticus* LF TCBS 15

注: Glc: 葡萄糖; PtsG: 葡萄糖磷酸转移系统; Gln: 谷氨酰胺; Glu-6-P: 6-磷酸葡萄糖; Fru-6-P: 6-磷酸果糖; Glu: 谷氨酸; GlcN-6-P: 6-磷酸葡萄糖胺; GlcN-1-P: 1-磷酸葡萄糖胺; O-GlcNAc: O-N-乙酰葡萄糖胺; GNAT: 乙酰转移酶; GlcNAc-1-P: N-乙酰葡萄糖胺-1-磷酸; GlcNAc-6-P: N-乙酰氨基葡萄糖-6-磷酸; GPI: 葡萄糖-6-磷酸异构酶; GlmS: 葡萄糖胺-果糖-6-磷酸氨基转移酶; GlmU: 氨基葡萄糖-1-磷酸 N-乙酰基转移酶/N-乙酰氨基葡萄糖-1-磷酸尿嘧啶转移酶; UDP-GlcNAc: UDP-N-乙酰葡萄糖胺; GlcNAc: N-乙酰葡萄糖胺; GlmM: 磷酸葡萄糖胺磷酸化酶; AGM: 葡萄糖胺磷酸突变酶; OGT: O-N-乙酰葡萄糖胺氨基转移酶; Hex:  $\beta$ -N-乙酰基己糖胺酶

Note: Glc: Glucose; PtsG: Glucose phosphotransferase system; Gln: Glutamine; Glu-6-P: Glucose-6-phosphate; Fru-6-P: Fructose-6-phosphate; Glu: Glutamic acid; GlcN-6-P: Glucosamine-6-phosphate; GlcN-1-P: Glucosamine-1-phosphate; O-GlcNAc: O-N-acetylglucosamine; GNAT: Acetyltransferase; GlcNAc-1-P: N-acetylglucosamine-1-phosphate; GlcNAc-6-P: N-acetylglucosamine-6-phosphate; GPI: Glucose-6-phosphate isomerase; GlmS: Glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase; GlmU: N-acetylglucosamine-1-phosphate N-acetyltransferase/N-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase; UDP-GlcNAc: UDP-N-acetylglucosamine; GlcNAc: N-acetylglucosamine; GlmM: Phosphoglucosaminemutase; AGM: GlcNAc phosphomutase; OGT: O-N-acetylglucosaminyltransferase; Hex:  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase

本研究从生理机制上系统揭示了外源碳源对食弧菌嗜盐噬菌弧菌捕食生长的抑制作用。碳源作为生长能源物质对绝大多数细菌的生长、分裂具有至关重要的促进作用,但本研究发现,碳源对捕食性细菌的作用却恰好相反,不仅无法促进该类细菌的生长繁殖,反而导致其捕食生长受到抑制。以往研究报道也表明了采用高度稀释的营养培养基(Diluted Nutrient Broth, DNB)或纯海水可更好地分离获得嗜盐噬菌弧菌菌株<sup>[19,37-38]</sup>,从侧面

反映了低碳/氮源营养环境更适于该类细菌生长。因此,在此类捕食益生菌的生产培养过程中,降低培养基中的营养成分可以提高其捕食效率,缩短生产周期。此外,本研究结果对于捕食细菌在水产养殖应用上有广泛的指导意义:比如,捕食细菌不适合与芽孢杆菌等常用的水产养殖益生菌一同活化,因为芽孢杆菌等益生菌常采用葡萄糖、红糖等糖类进行菌种活化,而这类碳源能抑制捕食细菌的生长;水产养殖中的饲料残余及养

殖动物粪便分解所释放的富含碳/氮营养物质也会影响捕食益生菌的使用效率,甚至可能导致捕食菌失效;捕食益生菌不适宜与饵料(以糖类及蛋白质为主要成分)一同拌食投饵,更适宜以直接喷洒于水体等方式进行菌群调控。总之,本研究结果可为 BALOs 的生态分布、捕食机制研究、菌株的分离培养及微生物菌剂的开发、生产和应用提供重要的理论依据。

## REFERENCES

- [1] Li N, Williams HN. 454 pyrosequencing reveals diversity of *Bdellovibrio* and like organisms in fresh and salt water[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2015, 107(1): 305-311
- [2] Jurkevitch E, Minz D, Ramati B, Barel G. Prey range characterization, ribotyping, and diversity of soil and rhizosphere *Bdellovibrio* spp. isolated on phytopathogenic bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(6): 2365-2371
- [3] Mahmoud KK, Koval SF. Characterization of type IV pili in the life cycle of the predator bacterium *Bdellovibrio*[J]. *Microbiology*, 2010, 156(4): 1040-1051
- [4] Chauhan A, Williams HN. Response of *Bdellovibrio* and like organisms (BALOs) to the migration of naturally occurring bacteria to chemoattractants[J]. *Current Microbiology*, 2006, 53(6): 516-522
- [5] Fry JC, Staples DG. Distribution of *Bdellovibrio bacteriovorus* in sewage works, river water, and sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1976, 31(4): 469-474
- [6] Guo YB, Yan LH, Cai JP. Effects of *Bdellovibrio* and like organisms on survival and growth performance of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2016, 47(5): 633-645
- [7] Snyder AR, Williams HN, Baer ML, Walker KE, Stine OC. 16S rDNA sequence analysis of environmental *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALO) reveals extensive diversity[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52(6): 2089-2094
- [8] Stolp H, Petzold H. Untersuchungen über einen obligat parasitischen mikroorganismus mit lytischer aktivität für *Pseudomonas*-Bakterien[J]. *Journal of Phytopathology*, 1962, 45(4): 364-390
- [9] Koval SF, Hynes SH, Flannagan RS, Pasternak Z, Davidov Y, Jurkevitch E. *Bdellovibrio exovorax* sp. nov., a novel predator of *Caulobacter crescentus*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63(Pt\_1): 146-151
- [10] Koval SF, Williams HN, Stine OC. Reclassification of *Bacteriovorax marinus* as *Halobacteriovorax marinus* gen. nov., comb. nov. and *Bacteriovorax litoralis* as *Halobacteriovorax litoralis* comb. nov.; description of *Halobacteriovoraceae* fam. nov. in the class *Deltaproteobacteria*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(2): 593-597
- [11] Lambina VA, Afinogenova AV, Romai Penabad S, Konovalova SM, Pushkareva AP. *Micavibrio admirandus* gen. et sp. nov.[J]. *Mikrobiologiya*, 1982, 51(1): 114-117
- [12] Guo YB, Pan Q, Yan SQ, Chen YH, Li MJ, Chen D, Han HC, Wu B, Cai JP. *Bdellovibrio* and like organisms promoted growth and survival of juvenile abalone *Haliotis discus hannai* Ino and modulated bacterial community structures in its gut[J]. *Aquaculture International*, 2017, 25(4): 1625-1643
- [13] Li HH, Cai JP. Effects of *Bdellovibrio*-and-like organism on growth of *Haliotis diversicolor aquatilis* and bacterial community in rearing system[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2014, 41(12): 127-132 (in Chinese)  
李欢欢, 蔡俊鹏. 蛭弧菌对九孔鲍生长及养殖体系细菌群落的影响[J]. *广东农业科学*, 2014, 41(12): 127-132
- [14] Chen KY, Zhong WM, Gao ZP. Research progress on utilization of *Bdellovibrio* in aquaculture[J]. *Fisheries Science*, 2018, 37(2): 283-288 (in Chinese)  
陈康勇, 钟为铭, 高志鹏. 蛭弧菌在水产养殖中应用研究进展[J]. *水产科学*, 2018, 37(2): 283-288
- [15] Cao HP, He S, Wang HC, Hou SL, Lu LQ, Yang XL. *Bdellovibrios*, potential biocontrol bacteria against pathogenic *Aeromonas hydrophila*[J]. *Veterinary Microbiology*, 2012, 154(3/4): 413-418
- [16] Özkan M, Yilmaz H, Çelik MA, Şngezer Ç, Erhan E, Keskinler B. Application of *Bdellovibrio bacteriovorus* for reducing fouling of membranes used for wastewater treatment[J]. *Turkish Journal of Biochemistry*, 2018, 43(3): 296-305
- [17] Qin SJ. Bacterial parasites: *Bdellovibrio bacteriovorus*[J]. *Microbiology China*, 1987, 14(4): 184-186 (in Chinese)  
秦生巨. 细菌寄生菌——噬菌蛭弧菌[J]. *微生物学通报*, 1987, 14(4): 184-186
- [18] Crothers SF, Fackrell HB, Huang JC, Robinson J. Relationship between *Bdellovibrio bacteriovorus* 6-5-S and autoclaved host bacteria[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1972, 18(12): 1941-1948
- [19] Ye XS, Chen MX, Li HY, He XY, Zhao Y. *Halobacteriovorax vibrionivorans* sp. nov., a novel prokaryotic predator isolated from coastal seawater of China[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2019, 69(12): 3917-3923
- [20] Chen MX, Li HY, Ma YF, Shi YX, Fu YL, Zheng TL, Zheng SL, Chen B. Composition and distribution of TCBS bacteria groups from sediments of Jiulong River estuary[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(5): 637-644 (in Chinese)  
陈明霞, 李和阳, 马云飞, 史莹鑫, 傅毅凌, 郑天凌, 郑

- 森林, 陈彬. 九龙江口沉积物 TCBS(Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose)菌群的分布[J]. 微生物学报, 2012, 52(5): 637-644
- [21] Ye XS, Zhao H, Chen MX, Li HY, He XY. Isolation, identification and prey range of *Halobacteriovorax* sp. BALOs10[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(7): 1331-1341 (in Chinese)  
叶晓声, 赵何, 陈明霞, 李和阳, 何小玉. 嗜盐噬菌弧菌 BALOs10 菌株的分离、鉴定及其裂解谱[J]. 微生物学报, 2019, 59(7): 1331-1341
- [22] Marbach A, Shilo M. Dependence of marine *Bdellovibrios* on potassium, calcium, and magnesium ions[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1978, 36(1): 169-177
- [23] Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, Chetvermin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, Lomsadze A, Pruitt KD, Borodovsky M, Ostell J. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(14): 6614-6624
- [24] Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(1): 27-30
- [25] Saier Jr MH, Reddy VS, Tsu BV, Ahmed MS, Li C, Moreno-Hagelsieb G. The transporter classification database (TCDB): recent advances[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(D1): D372-D379
- [26] Fratamico PM, Cooke PH. Isolation of *Bdellovibrios* that prey on *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* species and application for removal of prey from stainless steel surfaces[J]. Journal of Food Safety, 1996, 16(2): 161-173
- [27] Lu YY, Wen CQ, Li ZH, Liu YF, Zou LS, Liang XY, Chen GQ, Huang ZJ, Xue M. Control efficiency of marine *Bdellovibrio*-and-like organism DA5 on *Vibrio alginolyticus* under different multiplicities of infections[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2018, 38(2): 30-36 (in Chinese)  
陆友云, 温崇庆, 李志桦, 刘杨锋, 邹乐诗, 梁栩云, 陈国权, 黄子靖, 薛明. 不同感染复数下海洋蛭弧菌 DA5 对溶藻弧菌的控制效率[J]. 广东海洋大学学报, 2018, 38(2): 30-36
- [28] Li MJ, Guo YB, Wu B, Han HC, Cai JP. Research status and advances in *Bdellovibrios*: a review[J]. Fisheries Science, 2017, 36(3): 377-382 (in Chinese)  
李敏佳, 郭衍彪, 吴冰, 韩红操, 蔡俊鹏. 蛭弧菌(类群)研究现状及最新进展[J]. 水产科学, 2017, 36(3): 377-382
- [29] Sakazaki R. Proposal of *Vibrio alginolyticus* for the biotype 2 of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Japanese Journal of Medical Science and Biology, 1968, 21(5): 359-362
- [30] Li ZY, Bao YJ, Shang YM, Yuan ZZ. Isolation and identification of a strain of *Vibrio alginolyticus*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2019, 47(5): 100-103,146 (in Chinese)  
李卓昱, 鲍玉杰, 尚玉曼, 袁增智. 一株溶藻弧菌 H1B6 的分离与鉴定[J]. 安徽农业科学, 2019, 47(5): 100-103,146
- [31] Chemeris NA, Afinogenova AV, Tsarikaeva TS. Role of carbohydrate-protein recognition in the process of *Bdellovibrio* attaching to bacterial host cells[J]. Mikrobiologiya, 1984, 53(4): 556-558
- [32] Dashiff A, Keeling TG, Kadouri DE. Inhibition of predation by *Bdellovibrio bacteriovorus* and *Micavibrio aeruginosavorus* via host cell metabolic activity in the presence of carbohydrates[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(7): 2224-2231
- [33] Zhu F. The functional study of Fap1 glycosylation associated gene-*nss* in *Streptococcus parasanguis*[D]. Luoyang: Master's Thesis of Henan University of Science and Technology, 2010 (in Chinese)  
朱凡. 副血链球菌粘附素 Fap1 糖基化相关基因-*nss* 的功能研究[D]. 洛阳: 河南科技大学硕士学位论文, 2010
- [34] Yang XY, Li J, Geng MY. Protein O-GlcNAc modification and its cytobiology function[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2007, 29(5): 682-686 (in Chinese)  
杨新颖, 李静, 耿美玉. 蛋白质 O-GlcNAc 糖基化及其细胞生物学功能[J]. 细胞生物学杂志, 2007, 29(5): 682-686
- [35] Qin SJ. Studies on the molecular biological characteristics of *Bdellovibrio bacteriovorus* (4)[J]. Current Fisheries, 2015, 40(9): 76 (in Chinese)  
秦生巨. 噬菌蛭弧菌分子生物学特性的研究(四)[J]. 当代水产, 2015, 40(9): 76
- [36] Straley SC, Conti SF. Chemotaxis in *Bdellovibrio bacteriovorus*[J]. Journal of Bacteriology, 1974, 120(1): 549-551
- [37] Xu J, Zhang XJ, Qin L, Fan P, Yan BL. Isolation and the biological characteristics of *Bdellovibrio* sp. LBd02-1[J]. Fisheries Science, 2010, 29(10): 587-590 (in Chinese)  
徐静, 张晓君, 秦蕾, 范朋, 阎斌伦. 海洋蛭弧菌 LBd02-1 的分离及其生物学特性的研究[J]. 水产科学, 2010, 29(10): 587-590
- [38] Wen CQ, Lai XT, Xue M, Huang YL, Li HX, Zhou SN. Molecular typing and identification of *Bdellovibrio*-and-like organisms isolated from seawater shrimp ponds and adjacent coastal waters[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 106(4): 1154-1162