

蛭弧菌 BDH21-02 对鱼类细胞及病原菌的作用*

林 茂¹ 杨先乐^{1,2**} 薛 晖² 曹海鹏² 邱军强²

(上海高校水产养殖学 E-研究院 上海水产大学 上海 200090)¹

(农业部渔业动植物病原库 上海 200090)²

摘要: 蛭弧菌 BDH21-02 在双层琼脂平板上能裂解所有检测的 17 种共 36 株宿主菌, 在水中蛭弧菌对受试病原菌的裂解程度在 $2.96 \pm 0.13 \sim 4.46 \pm 0.28$ lg 值之间。其中, BDH21-02 使嗜水气单胞菌浓度下降 4.32 ± 0.25 lg 值的同时, 自身浓度上升 3.40 ± 0.30 lg 值。BDH21-02 对 PCK、CIK、EPC、FHM 等鱼类细胞的毒性实验表明, 实验组和对照组没有显著差异 ($P > 0.05$)。由实验结果可以看出蛭弧菌 BDH21-02 在生物防治鱼病方面具有良好的应用价值。

关键词: 蛭弧菌, 鱼类, 细胞, 病原菌

中图分类号: Q939.96 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 01-0007-05

Effect on Fish Cell Lines and Pathogens by *Bdellovibrio* BDH21-02 Strain*

LIN Mao¹ YANG Xian-Le^{1,2**} XUE Hui² CAO Hai-Peng² QIU Jun-Qiang²

(E-Institute of Shanghai Municipal Education Commission, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090)¹

(Aquatic Pathogen Collection Center of Ministry of Agriculture, Shanghai 200090)²

Abstract: *Bdellovibrio* BDH21-02 could lyse all 33 test strains from 15 species in the double-layer agar plate. Farther research showed that BDH21-02 could reduce logarithmic density of seven representative species of pathogens with 2.96 ± 0.13 to 4.46 ± 0.28 . The logarithmic density of BDH21-02 increased with 3.40 ± 0.30 while *A. hydrophilia* decreased with 4.32 ± 0.25 . On the contrary, the population doubling level of PCK, CIK, EPC and FHM cells revealed that BDH21-02 had no remarkable cytotoxicity ($P > 0.05$).

Key words: *Bdellovibrio*, Fish, Cell, Pathogen

蛭弧菌 (*Bdellovibrio*) 具有类似噬菌体的作用, 但它的宿主范围更为广泛, 能够裂解多数 G⁻ 细菌^[1]。目前, 国内外许多学者围绕蛭弧菌已开展了生物学特性、微生物生态学和生物消毒等方面的研究工作^[2,3]。而蛭弧菌应用于裂解鱼类病原菌的研究才刚刚起步, 对宿主范围的研究较为零散, 不能明确蛭弧菌防治鱼类病害的适用范围。此外, 迄今为止尚未有研究指明蛭弧菌对鱼类细胞生长的影响, 无法保证蛭弧菌使用的安全性。为此本研究针对蛭弧菌 BDH21-02 菌株的鱼类病原菌噬菌谱进行了较为全面的研究, 同时探明了其对鱼类细胞的毒性, 从而为蛭弧菌制剂的开发和应用提供坚实的理论基础。

*上海市教育委员会 E-研究院建设资助项目 (No. E03009)
上海市重点学科建设项目资助 (No. Y1101)

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

收稿日期: 2005-03-17, 修回日期: 2005-05-29

1 材料与方 法

1.1 细胞系与菌株

本实验所采用鱼类细胞系与细菌菌株均为农业部渔业动植物病原库 (APCCMA) 保藏物, 实验细胞有大黄鱼肾细胞 PCK、草鱼肾细胞 CIK、鲤鱼上皮瘤细胞 EPC、胖头鲤上皮细胞 FHM。

1.2 蛭弧菌和宿主菌的显微计数^[4]

取 50 μL 待测菌液均匀涂布于直径 2cm 的载玻片圆面内, 以刚果红染色后在油镜 (内径为 0.2mm) 下观察, 随机数 10~20 个视野中的菌数。待测菌液浓度根据下列公式进行计算: 菌数/mL = (视野平均菌数 \times 涂布面积/油镜内孔面积) / 0.05。

1.3 蛭弧菌双层琼脂培养法^[5]

保温于 50 $^{\circ}\text{C}$ 含有 1/100 营养肉汤培养基的 5mL 琼脂 (0.6%), 加入 100 μL 蛭弧菌液和 200 μL 宿主悬液混匀, 倾注于下层自来水琼脂 (1.5%) 上, 凝固后 28 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养。

1.4 蛭弧菌对病原菌的裂解实验^[3]

将蛭弧菌 (10^4 cells/mL) 与病原菌 (10^9 cells/mL) 接种于装有 100mL 曝气自来水的三角瓶中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、200r/min 振荡培养 5d, 每隔 24h 取样检测。

1.5 蛭弧菌对鱼类细胞的毒性实验

接种有蛭弧菌 (10^4 cells/mL) 的鱼类细胞 (5×10^4 cells/mL), 在 24 孔培养板 (每孔 1mL) 中 28 $^{\circ}\text{C}$ 连续培养 6d, 每隔 24h 计数作细胞生长曲线。根据公式计算群体倍增水平 (次数): $L_D = (\lg N_t - \lg N_0) / \lg 2$, N_0 和 N_t 分别表示最初和最终的细胞数。

2 结果

2.1 BDH21-02 的形态特征

显微镜和电镜观察显示, 蛭弧菌 BDH21-02 具有极生单鞭毛, 个体较小, 约是大肠杆菌体积的 1/5, 它能寄生在大肠杆菌周质空间中并以其为营养进行迅速增殖, 同时使宿主菌数量锐减 (图 1)。在 BDH21-02 培养后期发现少数尚未分裂完全就释放出来的特殊个体, 其长度是一般个体的 3~5 倍 (图 2)。

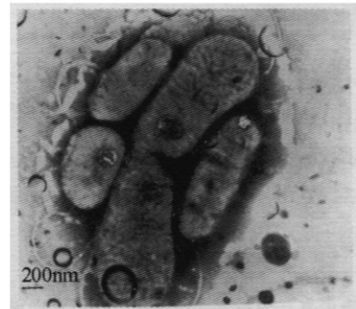
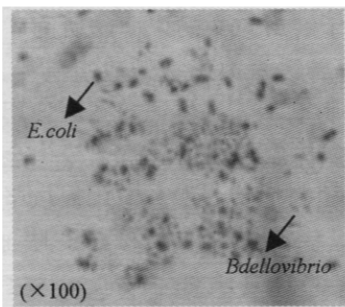


图 1 蛭弧菌在大肠杆菌中的寄生与复分裂增殖

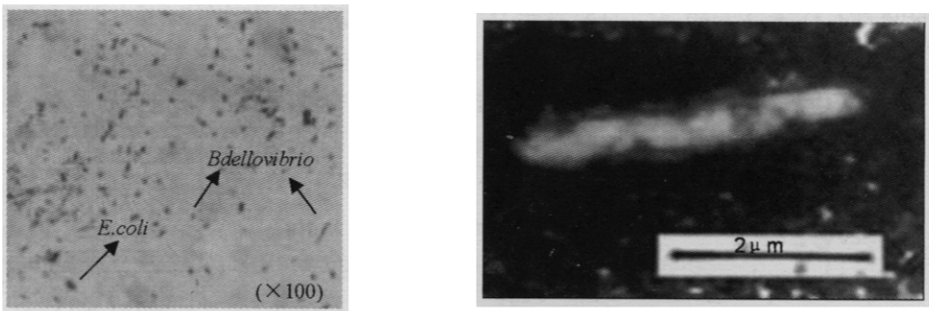


图2 尚未完全分裂的蛭弧菌超长个体

2.2 BDH21-02 的宿主范围的检测

选取最为常见的一些鱼类病原菌以及枯草芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、大肠杆菌等共 17 种 36 株细菌, 研究蛭弧菌 BDH21-02 的噬菌谱, 结果在所有双层固体培养基上均产生了噬菌斑, 噬菌斑大小为 0.74 ± 0.30 cm, 出斑时间为 68.4 ± 5.6 h (表 1)。

表 1 蛭弧菌 BDH21-02 的噬菌谱

宿主菌		株数	噬斑直径 (cm)	出斑时间 (h)	相关论文 (篇)
属	种				
气单胞菌 (<i>Aeromonas</i>)	嗜水气单胞菌 (<i>A. hydrophilia</i>)	7	0.5~0.8	60~96	224
	温和气单胞菌 (<i>A. sobria</i>)	3	0.6~1.5	60~96	85
	豚鼠气单胞菌 (<i>A. caviae</i>)	2	0.8~1.2	72	38
弧菌 (<i>Vibrio</i>)	溶藻弧菌 (<i>V. alginolyticus</i>)	7	0.6~1.6	60~96	104
	副溶血弧菌 (<i>V. parahaemolyticus</i>)	3	1.2~1.5	72~84	72
	鳃弧菌 (<i>V. anguillarum</i>)	3	0.5~1.1	60~72	70
	河弧菌 (<i>V. fluvialis</i>)	1	0.1	72	64
	哈佛氏弧菌 (<i>V. horveyi</i>)	1	1.0	72	29
	菲尼斯弧菌 (<i>V. furnissii</i>)	1	0.5	72	12
	拟态弧菌 (<i>V. mimicus</i>)	1	0.5	60	10
假单胞菌 (<i>Pseudomonas</i>)	荧光假单胞菌 (<i>P. fluorescens</i>)	1	0.6	72	40
	腐败假单胞菌 (<i>P. putrefaciens</i>)	1	0.6	60	12
爱德华氏菌 (<i>Edwardsiella</i>)	迟缓爱德华氏菌 (<i>E. tarda</i>)	1	1.0	60	38
	福建爱德华氏菌 (<i>E. fujianensis</i>)	1	0.9	60	4
芽孢杆菌 (<i>Bacillus</i>)	枯草芽孢杆菌 (<i>B. subtilis</i>)	1	0.6	72	-
	蜡状芽孢杆菌 (<i>B. cereus</i>)	1	0.4	60	-
埃希氏菌 (<i>Escherichia</i>)	大肠杆菌 (<i>E. coli</i>)	1	0.6	72	-

注: “相关论文”栏表示维普中文期刊数据库中收录的涉及某种鱼类病原菌的文章篇数

2.3 BDH21-02 对水产动物病原菌的裂解实验

研究 BDH21-02 与嗜水气单胞菌在水中共培养 5d 的数量消长变化, 结果表明 (图 3) 嗜水气单胞菌的数量不断下降, 5d 后与起始值相比其浓度对数值下降了 4.32 ± 0.25 , 而单独培养的嗜水气单胞菌数量略有上升。实验组蛭弧菌浓度对数值上升了 3.40 ± 0.30 , 对照组则没有明显变化。这说明蛭弧菌 BDH21-02 在裂解嗜水气单胞菌的同时, 其种群也利用宿主的营养物质得到了大量增殖。此外, 还分别研究了 BDH21-02

对其它几种有代表性的病原菌的裂解能力(图4),其裂解程度在 $2.96 \pm 0.13 \sim 4.46 \pm 0.28$ lg 值之间。

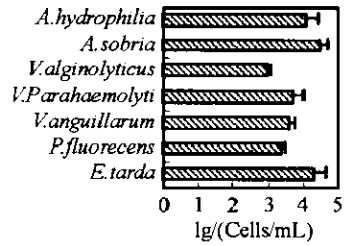
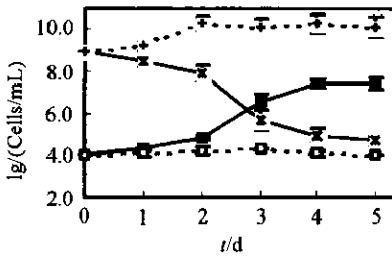


图3 蛭弧菌与嗜水气单胞菌的动态变化

图4 蛭弧菌对病原菌的裂解程度

■, × 分别表示共培养实验组中的蛭弧菌与病原菌, □, + 分别表示单独培养对照组的蛭弧菌和病原菌

2.4 BDH21-02 对鱼类细胞的毒性实验

通过生长曲线研究蛭弧菌对 PCK 细胞生长的影响(图5),结果表明蛭弧菌对 PCK 细胞的生长没有明显影响,形态学观察的结果也显示细胞没有发生异常变化。PCK、CIK、EPC、FHM 细胞群体倍增水平的研究结果表明(表2),实验组和对照组没有显著差异 ($P > 0.05$),这说明蛭弧菌对鱼类细胞无毒性。

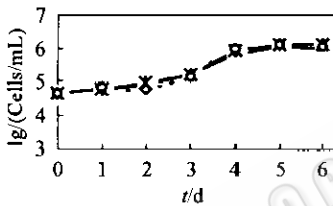


图5 蛭弧菌对 PCK 细胞生长的影响

▲ 表示接毒后无盲传, * 表示接毒后盲传 3 代, ○ 表示未接种蛭弧菌

表2 细胞群体倍增水平细胞系

细胞系	群体倍增水平(次数)		
	实验组 I	实验组 II	对照组
PCK	4.32 ± 0.31	4.67 ± 0.10	4.53 ± 0.22
EPC	4.51 ± 0.20	4.55 ± 0.19	4.69 ± 0.27
FHM	4.74 ± 0.19	4.67 ± 0.28	4.88 ± 0.25
CIK	3.84 ± 0.32	3.59 ± 0.24	3.89 ± 0.27

注:实验组 I 接毒后无盲传,实验组 II 接毒后盲传 3 代,对照组未接种蛭弧菌

3 讨论

鱼类细菌性疾病绝大多数是由 G⁻ 细菌引起的,其中又以气单胞菌、弧菌、假单胞菌等属中的某些菌种为主要病原菌^[6],本文着重研究了蛭弧菌 BDH21-02 对这些细菌的裂解能力。实验所选的这些病原菌菌株来自我国不同地区的各种水体,分布较广,具有很强的代表性。研究的结果可以看出 BDH21-02 的宿主范围极为广泛,对不同地区来源、不同种属的病原菌均有明显的裂解作用,这说明应用 BDH21-02 菌株可大大减少水中各种病原菌的数量,使其无法达到致病密度,从而获得防治病害的效果。

细胞毒性实验表明,蛭弧菌不影响鱼类细胞的生长。一些研究报道还认为蛭弧菌本身富含蛋白质,其代谢产物又含有促生长因子和多种营养元素,对于改善水生动物胃肠道环境、增强食欲、促进生长有着重要的保健功能,是水生动物的优质天然饵料^[7-9]。

在蛭弧菌增殖培养中,宿主菌逐渐减少,但很难被彻底裂解至无。因此,在生产时宿主菌必须选用对动物及人类安全不造成重大影响的菌种或菌株,这样蛭弧菌可无需过滤除菌就能直接投放,节约生产成本。对蛭弧菌 BDH21-02 宿主范围的检测结果发

现, 枯草芽孢杆菌和蜡状芽孢杆菌等也能作为它合适的寄主, 为了避免往水体中引入致病菌, 可选用这两者作为蛭弧菌生产过程中的营养来源。目前, 我们正在对蛭弧菌的发酵工艺及其在水产健康养殖中的应用做进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 秦生巨. 微生物学通报, 1993, **20** (4): 237 ~ 240.
- [2] Markelova N Y, Gariev I A. Proc Biochem, 2005, **40**: 1089 ~ 1094.
- [3] 李戈强, 章勇良, 徐伯亥. 水生生物学报, 1998, **22**: 265 ~ 272.
- [4] 焦 鹏, 马成新, 王书锦. 微生物学报, 2000, **40** (2): 174 ~ 179.
- [5] 王秀茹, 高 瞰, 梁 钢, 等. 微生物学通报, 1994, **21** (4): 228 ~ 232.
- [6] 章秋虎. 中国水产, 2003, **9**: 53 ~ 54.
- [7] Nunez M E, Martin M O, Duong L K, *et al.* Biophys J, 2003, **84**: 3379 ~ 3388.
- [8] Jackson L, Whiting R C. J of Protecion, 1991, **55**: 859 ~ 861.
- [9] 邵桂元, 沈启华, 洪黎民. 中国微生态学杂志, 1995, **7**: 17 ~ 20.