

一种消除九孔鲍苗细菌性病原的无公害绿色生物方法的研究

宋志萍, 蔡俊鹏, 王志, 韩 韞

(华南理工大学 食品与生物工程学院, 广东 广州 510640)

摘要:从海洋环境中分离出 4 株蛭弧菌(*Bdellovibrio* sp.), 并对 34 株九孔鲍 (*Haliotis diversicolor*) 苗细菌性病原进行了裂解试验。结果表明, Bh04-4、Bh04-41a、Bh04-A+和 Bh04-1f 等 4 株蛭弧菌分别可裂解 11 株、13 株、22 株和 28 株病原菌, 裂解率为 32.4%、38.2%、64.7%和 87.5%; 4 株共同作用, 则可裂解 32 株病原菌, 裂解率高达 94.1%。研究结果展示了应用蛭弧菌控制九孔鲍苗细菌性病原的可行性。

关键词:蛭弧菌(*Bdellovibrio* sp.); 裂解率; 九孔鲍 (*Haliotis diversicolor*) 苗; 细菌性病原菌; 无公害绿色生物方法

中图分类号: Q93-3 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2006)01-0044-05

近年来我国的鲍鱼养殖业发展迅猛, 伴随着鲍鱼人工育苗和养殖规模的发展, 病害也接踵而至。引起鲍鱼死亡的病原很多, 包括有细菌、真菌、寄生虫和病毒等^[1]。针对鲍鱼病害, 尤其是鲍苗病害的防治, 目前仍倚重于抗生素^[2]。但在水生动物育苗中使用抗生素存在许多潜在的危害^[3]: 导致抗药菌株的出现, 因此不得不加大剂量; 导致育苗池内水环境及幼苗机体内菌群失衡; 育苗池内水环境及机体内未被杀死的致病菌微生物种类因为生态失衡而大量繁殖, 反而造成更大的危害; 滥用抗生素使苗种免疫力降低, 对外部环境条件骤变极不适应, 容易因环境突变或应激性环境条件造成感染或并发症进而导致大量死亡现象。

基于以上滥用抗生素以及对环境与人体的危害, 我国农业部和国家药品监管局于 2002 年联合发布第 227 号公告, 已将氯霉素等抗生素列为禁用药物。世界各国也都在积极探索, 寻求可以替代或部分替代抗生素的环保型微生态制剂。国外学者曾研究用水产免疫调节剂来增强水产动物的抗病性^[4]。我国科技工作者也曾用克毒丹^[5]、光合细菌^[6]、中草药提取物^[7]等来代替抗生素防治水产动物病害。但效果并不显著, 仍难以完全取代抗生素。

作者从海洋环境中分离到 4 株 Bh04 系列蛭弧菌, 研究了其对 34 株病原菌的裂解能力, 为将来应用无公害绿色防治方法开辟了一条新途径。

1 材料与方法

1.1 培养基

1.1.1 DNB 培养基 (培养蛭弧菌)

0.08 g 营养肉汤, 0.05 g 酪氨酸水解物, 0.01g 酵母浸提物, 100 mL 海水, 高压灭菌后补充 1 mmol/LCaCl₂ 和 0.1mmol/LMgCl₂, 上层加 0.7%的琼脂, 下层加 1.7%的琼脂, pH 为 7.2^[8]。

1.1.2 2216E 培养基 (培养宿主菌)

0.5 g 蛋白胨, 0.1g 酵母浸膏, 0.001g 磷酸高铁, 100 mL 海水, pH 为 7.6~7.8, 高压灭菌后使用。

1.2 试验菌株

用于裂解实验的 34 株试验菌株已被回归感染实验证明为九孔鲍(*Haliotis diversicolor*)苗细菌性病原菌 (表 1)。

收稿日期: 2005-04-13; 修回日期: 2005-07-31

基金项目: 广东省自然科学基金重点项目 (020964); 广东省科技计划项目 (2005B20301021); 华南理工大学项目 (321-D76020)

作者简介: 宋志萍 (1978-), 女, 硕士生, 研究方向: 食品生物技术; 蔡俊鹏, 通信作者, 电话: 020-87538286, E-mail: febjpcai@scut.edu.cn

表 1 九孔鲍苗细菌性病原菌

Tab. 1 Bacterial pathogens of postlarvae of *Haliotis diversicolor*

| 菌株编号 | 菌株名称 | 菌株编号 | 菌株名称 |
|------|--------------------------------|------|---------------------------------|
| 1 | <i>Vibrio alginolyticus</i> | 19 | <i>V. alginolyticus</i> |
| 2 | <i>V. alginolyticus</i> | 20 | <i>S. odorifera</i> |
| 3 | <i>V. alginolyticus</i> | 21 | <i>V. parahaemolyticus</i> |
| 4 | <i>V. alginolyticus</i> | 22 | <i>Providencia rettgeri</i> |
| 6 | <i>V. cholerae</i> | 23 | <i>V. alginolyticus</i> |
| 7 | G+ | 24 | <i>S. putrefaciens</i> |
| 8 | <i>V. parahaemolyticus</i> | 25 | <i>V. parahaemolyticus</i> |
| 9 | <i>V. parahaemolyticus</i> | 26 | <i>V. parahaemolyticus</i> |
| 10 | <i>V. alginolyticus</i> | 27 | <i>S. putrefaciens</i> |
| 11 | <i>V. alginolyticus</i> | 28 | <i>S. putrefaciens</i> |
| 12 | <i>Shewanella putrefaciens</i> | 29 | <i>P. rettgeri</i> |
| 13 | <i>V. alginolyticus</i> | 30 | <i>Enterococcus agglomerans</i> |
| 14 | G+ | 31 | <i>Klebsiella oxytoca</i> |
| 15 | <i>Serratia ficaria</i> | 32 | <i>P. rettgeri</i> |
| 16 | <i>V. alginolyticus</i> | 33 | <i>Aeromonas salmonicida</i> |
| 17 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 34 | <i>Shewanella putrefaciens</i> |
| 18 | <i>P. aeruginosa</i> | 35 | <i>P. aeruginosa</i> |

G+:革兰氏阳性细菌, 种类尚未确定

1.3 蛭弧菌菌株

实验所用蛭弧菌 (*Bdellovibrio* sp.) 菌株取自盐度为 30 的海水, 用 DNB 固体培养基双层平板法进行分离纯化, 方法同参考文献[8]。通过电镜观测^[9]和特异性 PCR^[10]的方法对它们进行了鉴定。

参考文献[8]设计特异性 PCR 引物一对, 由上海基康生物技术有限公司合成。PCR 反应条件为: 94 预变性 5 min; 主循环 94 1 min, 50 1 min, 72 1 min, 循环 35 次; 终延伸 72 5 min; 4 保存。DNTPs、Taq 酶、PCR 缓冲液、UNIQ-10 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒购自鼎国生物技术发展中心。

1.4 蛭弧菌对 34 株病原菌的裂解能力

采用平板法, 确定 4 株蛭弧菌对 34 株病原菌的裂解能力。能在双层平板上产生噬菌斑即为蛭弧菌对该菌株具有裂解能力, 可裂解的菌株越多, 蛭弧菌的裂解能力越强。

2 结果和讨论

2.1 分离及鉴定结果

采用双层平板法, 从海洋环境中共分离到 4 株

菌, 分别命名为 Bh04-4、Bh04-41a、Bh04-A+ 和 Bh04-1f。

对所分离到的 4 株菌进行负染, 并在电镜下观察其大小和形态 (图 1)。在电镜下, 可见菌体为弧状或杆状, 其尾部有一长长的鞭毛, 为典型的蛭弧菌形态特征。它们菌体大小和鞭毛长度分别如下: Bh04-4 菌体为 7.89 μm × 5.26 μm, 鞭毛长为 1.84 μm; Bh04-41a 菌体为 8.3 μm × 2.76 μm, 鞭毛长 1.15 μm; Bh04-A+ 菌体为 5.8 μm × 1.9 μm, 鞭毛长 1.05 μm; Bh04-1f 菌体为 5.26 μm × 2.28 μm, 鞭毛长 2.1 μm。据此, 初步确认这 4 株菌均为蛭弧菌。

2.1.3 蛭弧菌特异性 PCR 扩增反应

为在基因水平上印证所分离到的菌株为蛭弧菌, 作者又进行了特异性 PCR 扩增反应。以大肠杆菌以及分离所用的宿主菌株 BH04 的 DNA 为阴性对照, 在阴性对照无扩增条带时, 凡在所预定的区域 (约 800 bp) 出现扩增条带的, 均可定为阳性。特异性 PCR 扩增结果表明, 该 4 株菌在大约 800 bp 处均有一阳性条带的出现, 而作为阴性对照 PCR 则无条带出现,

由此再一次证明, 该 4 株菌为蛭弧菌 (图 2)。

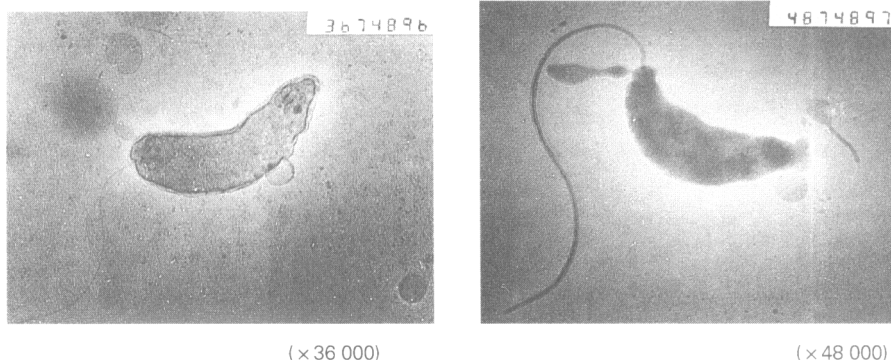


图 1 电镜下的蛭弧菌

Fig.1 Photos showing *Bdellovibrio* sp. under the electron microscope

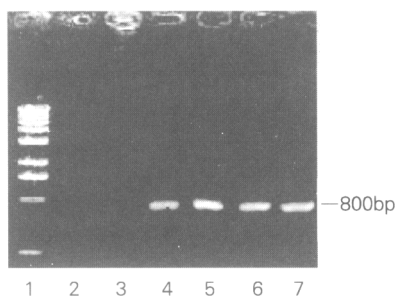


图 2 PCR 电泳图

Fig.2 Photo showing the result of PCR

1. 分子量标记, 2. 阴性对照 1, 3. 阴性对照 2, 4. Bh04-4, 5. Bh04-41a, 6. Bh04-A+, 7. Bh04-1f
1. marker, 2. negative comparison 1, 3. negative comparison 2, 4. Bh04-4, 5. Bh04-41a, 6. Bh04-A+, 7. Bh04-1f

2.2 4 株蛭弧菌对 34 株宿主菌的裂解能力

为探索 4 株蛭弧菌在海水养殖病害防治方面的潜在应用前景, 同时也为了解决目前困扰南方九孔鲍育苗的问题, 选用了 34 株已被回归感染实验证明是鲍苗掉板的致病菌作为被试菌株, 开展了 4 株蛭弧菌对 34 株菌的裂解试验 (表 2)。从表 2 可知:

(1) Bh04-4、Bh04-41a、Bh04-A+和 Bh04-1f 等 4 株蛭弧菌分别可裂解 11 株、13 株、22 株、28 株病原

菌, 裂解率分别为 32.4%、38.2%、64.7%、87.5%。

(2) 可同时被 4 株蛭弧菌裂解的菌株共计 3 株 (17, 18, 32), 同时裂解率 8.8%。

(3) 4 株蛭弧菌均不可裂解的菌株共计 2 株 (7, 23), 不可裂解率 5.9%。

(4) 可被 4 株蛭弧菌裂解的总菌株共计 32 株 (1~4, 6, 8~22, 24~35), 总裂解率 94.1%。

研究结果显示, 4 株蛭弧菌分别可裂解 11 株、13 株、22 株、28 株病原菌, 占总病原菌的 32.4%、38.2%、64.7%、87.5%; 共可裂解 32 株病原菌, 占总病原菌的 94.1%。其中有 3 株可被 4 株蛭弧菌同时裂解。在分离所得的 4 株蛭弧菌中, Bh04-1f 裂解谱最宽, 共可裂解 28 株菌株, 裂解率为 87.5%, 其次为裂解率为 64.7% 的 Bh04-A+, 裂解率弱的是 Bh04-4 和 Bh04-41a, 裂解率分别为 13% 和 11%; 除菌株 7, 23 不能被 4 种蛭弧菌中的任一种裂解外, 有 94.1% 的菌株至少可被一种蛭弧菌裂解, 有 79.4% 的病原菌可至少被 2 株蛭弧菌裂解; 菌株 17, 28, 32 则可同时被 4 株蛭弧菌裂解。

很明显, 在引起九孔鲍苗大量掉板死亡的菌株中 (表 1), 除菌株 7 和菌株 23 外, 所有的菌株至少可被一种蛭弧菌裂解, 由此初步显示了蛭弧菌对病原菌的裂解率, 为采用生物技术防治九孔鲍苗病害提供了一定的科学基础。

表 2 蛭弧菌裂解谱

Tab. 2 Lysis spectrum of *Bdellovibrio* sp.

| 可裂解的宿主菌 | 蛭弧菌 | | | |
|-------------|------------------------------|--|---|-----------------------|
| | Bh04-4 | Bh04-1f | Bh04-A+ | Bh04-41a |
| 可同时被裂解的宿主菌 | 17, 18, 32 | | | |
| 其他各自可裂解的宿主菌 | 1,3,6,8,11, 16, 24, 26,28,30 | 1,2, 4,6, 9, 10, 12, 13,14, 15, 16, 19,20, 21, 22, 24, 34, 25, 26,27, 28,29, 30, 31,33 | 1, 2, 3, 4, 6, 11, 13,14, 15, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 28,30, 33 | 3,4,8,13,29,31, 34,35 |
| 菌株数目 (株) | 13 | 28 | 22 | 11 |
| 裂解率 (%) | 38.2 | 87.5 | 64.7 | 32.4 |

3 结语

蛭弧菌是一类专门以捕食细菌为生的寄生性细菌,由于它具有寄生和裂解细菌的生理特性,尤其是对许多致病菌有裂解作用,越来越多的科研工作者将其视为重要的生物净化因子之一^[11]。蛭弧菌作为一种微生态制剂取代抗生素药物用于海水养殖具有一定的优势和前景^[12]。首先,蛭弧菌的宿主范围广泛,对水产动物常见致病菌都有较强的清除作用;其次,蛭弧菌对致病菌的裂解能力明显大于非致病菌,蛭弧菌制剂清除致病菌的同时,对养殖环境中的有益细菌危害不大,这是抗生素类药物不能做到的;再次,很少有抗蛭弧菌的细菌突变株,蛭弧菌能对致病菌发挥稳定持久的裂解作用;最后,蛭弧菌在没有宿主菌存在的环境中会因为“饥饿”而死,使用蛭弧菌制剂,不存在残留问题。有鉴于此,1994年农业部把蛭弧菌列入饲料药物添加剂允许使用的微生物有益菌类中^[13]。可以相信,随着研究的深入,更多裂解能力强的菌株的发现,产品质量的保证,蛭弧菌在海水养殖业中的应用将得到迅速发展。

参考文献:

[1] 燕敬平,刘世禄. 我国鲍增养殖现状、问题与发展对策[J]. 海洋水产研究, 1999, 19(1): 91-96.
 [2] 张昕, 蔡俊鹏. 四种海洋致病弧菌对抗生素敏感性的测定[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2003, 31(9): 66-69.
 [3] 宋怀龙. 水生生物育苗中滥用抗生素的弊害及对策[J]. 中

国水产, 1999, 11: 42-43.
 [4] 彭开松, 余锐. 国外水产动物免疫调节剂研究现状[J]. 世界农业, 2004, 5: 45-48
 [5] 周文坚, 陈毕生, 林巧慈, 等. 克毒丹防治斑节对虾 (*Penaeus monodon* Fabricius) 苗种病毒的试验[J]. 生态科学, 1999, 18(2): 31-35.
 [6] 丁志起, 王桂英. 梭子蟹育苗使用光合细菌替代抗生素技术[J]. 齐鲁渔业, 2004, 21(2): 4-5.
 [7] 陆彤霞. 中草药在水产育苗疾病防治中的应用[J]. 科学养鱼, 2002, 1: 47.
 [8] Jurkevitch E, Minz D. Prey range characterization, ribotyping, and diversity of soil and rhizosphere *Bdellovibrio* spp. Isolated on phytopathogenic bacteria[J]. *Applied and Environmental*, 2000, 66(6): 2365-2371.
 [9] 林加涵, 魏文铃, 彭宣宪. 现代生物学实验(上册)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.55.
 [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1999.19-30.
 [11] 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[J]. 湛江海洋大学学报, 2004, 24(3): 79-82.
 [12] 王丽娜, 吴联熙. 蛭弧菌的噬菌特性及其在水污染检测和控制应用中的研究进展[J]. 微生物学通报, 1994, 21(1): 54-57.
 [13] 冯晓英, 顾玲, 庄菱. 噬菌蛭弧菌研究进展[J]. 江苏预防医学, 2000, 11(4): 75-76.

研究报告 REPORTS

Studies of an environmental-friendly biological method eliminating abalone postlarval bacterial pathogens

SONG Zhi-ping, CAI Jun-peng, WANG Zhi ,HAN Yun

(College of Food Science and Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510640 ,China)

Received: Apr.,13,2004

Key words: *Bdellovibrio* sp.; lysis ability; *Haliotis diversicolor* postlarvae; bacterial pathogen ; environmental-friendly biological method

Abstract: In this study, 4 strains of *Bdellovibrio* sp., designated Bh04-4, Bh04-41a, Bh04-A+ and Bh04-1f, were isolated from seawaters. Their lytic abilities on 34 strains *Haliotis diversicolor* postlarval bacterial pathogens were investigated. Results showed that *Bdellovibrio* strain Bh04-4 lysed 11 out of the 34 strains of pathogens, corresponding to 32.4% lysis ability, Bh04-41a lysed 13 strains of pathogens (38.2% lysis ability), Bh04-A+ lysed 22 strains of pathogens (64.7% lysis ability) and Bh04-1f 28 strains of pathogens (87.5% lysis ability). Taken all four *Bdellovibrio* stains together, they lysed 32 out of 34 strains of pathogens, amounting to 94.1% lysis ability. Results of this study fully demonstrated the feasibility of utilizing *Bdellovibrio* in eliminating abalone postlarval pathogens.

(本文编辑:张培新)