

文章编号:1000-4734(2010)01-0077-06

淡水湖泊中类蛭弧菌的分离方法

曾佳^{1 2} 梁小兵^{1*} 陆婷^{1 2}

(1. 中国科学院 地球化学研究所 环境地球化学国家重点实验室, 贵州 贵阳 550002;

2. 中国科学院 研究生院, 北京 100039)

摘要: 从贵州阿哈湖、百花湖及云南滇池不同深度的湖水中筛选出2株宿主菌株。经16S rRNA基因序列分析, 这2株宿主菌分别鉴定为肠杆菌(Enterobacteriales)和黄色单胞菌(Xanthomonadales)。分别利用这2株宿主菌, 从湖水样品中获得了类蛭弧菌噬菌斑。通过吸光度分析、用淡水类蛭弧菌的特异性引物进行基因扩增、DNA序列分析等一系列方法, 证实了所分离的菌株为类蛭弧菌。建立了用同一生长环境中的宿主菌来分离类蛭弧菌的方法, 并用该方法从淡水湖泊中分离出了不同类群的类蛭弧菌菌株。

关键词: 类蛭弧菌; 分离; 宿主菌; PCR; DNA序列分析

中图分类号: Q939.99; X172 文献标识码: A

作者简介: 曾佳, 男, 1976年生, 硕士研究生, 从事环境与生物地球化学的研究工作。E-mail: zjbioch@163.com

类蛭弧菌 [*Bdellovibrio*-and-like organisms (BALOs)] 为革兰氏阴性、捕食性细菌, 影响其它细菌的致死率, 如环境中的致病菌副溶血弧菌、创伤弧菌和霍乱弧菌等。1962年首次报道发现了蛭弧菌^[1]。目前将与蛭弧菌具有相似生活特性的一类细菌称为“类蛭弧菌”。根据耐盐性, 将蛭弧菌分为2大类, 淡水(或陆地)类群与海洋(或嗜盐)类群^[2-4]。我国现阶段对类蛭弧菌的研究主要集中在海洋类群, 对淡水类群却很少涉及。实际上, 淡水湖泊中的类蛭弧菌无论在水产养殖、环境治理方面都有很大的潜在价值, 需要我们去发掘。在本次实验中, 我们从贵州阿哈湖、百花湖和云南滇池三个淡水湖泊中分离类蛭弧菌进行研究。

从不同环境中分离类蛭弧菌然后作进一步的研究, 是目前研究类蛭弧菌最普遍的研究步骤。类蛭弧菌的分离培养方法有多种, 例如将宿主菌和样品充分混合后直接在培养基上涂布^[5]; 也可以将宿主菌液先均匀涂布在培养基上后再将样品点样于其上^[6]; 但最常用的是双层琼脂平板培养

法^[7-10]。人们通常采用副溶血弧菌菌株P-5、鳃弧菌、溶藻弧菌、嗜水气单胞菌、大肠杆菌^[8, 11-12]作为宿主来对类蛭弧菌进行分离培养。以上细菌虽能有效地分离类蛭弧菌, 但这些宿主菌不一定是所研究环境中的优势菌, 在研究类蛭弧菌与其所处环境之间的相互关系时, 没有太大的说服力。为了研究类蛭弧菌的生态和地球化学功能, 我们直接从所研究的环境中分离出宿主菌, 而不是采用从其他环境中分离出来的已知的宿主菌来分离类蛭弧菌。这样更能反映环境中类蛭弧菌及其被捕食细菌之间的相互关系。通过对阿哈湖、百花湖及滇池湖水中类蛭弧菌分离培养和鉴定的研究, 证明这是一种研究环境中类蛭弧菌的有效方法。

1 实验方法

1.1 样品采集

第一次样品采集分离被捕食细菌: 分别从阿哈湖、百花湖和滇池采集表层水用于分离宿主菌。第二次样品采集: 用已分离的宿主菌来分离样品中的蛭弧菌。从上述三个湖泊中(图1)采集表层、中层和底层水湖水(水深不足3m只采集表层和底层水或者只采集表层水)。每个采样点采集2个平行样。

收稿日期: 2009-06-16

基金项目: 贵州省科学技术基金(20092040); 国家自然科学基金项目(40473050); 国家重大基础研究项目(2006CB4003200)

* 通讯作者, E-mail: liangxiaobing@vip.skleg.cn

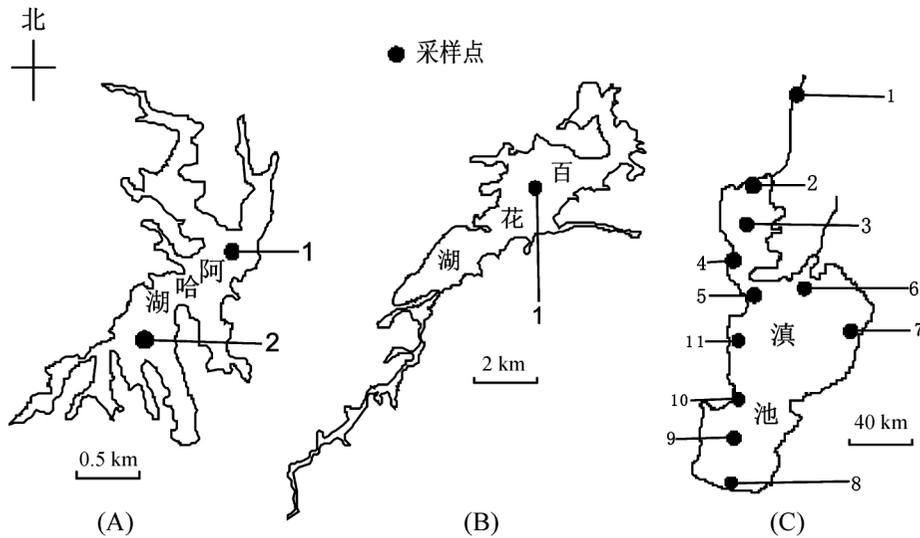


图1 阿哈湖、百花湖和滇池采样点

Fig. 1. The sampling stations in Lake Aha, Baihua and Dianchi.

1.2 宿主菌的分离培养

宿主菌 I 的分离:水样梯度稀释至 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4} 倍。分别涂布在富集培养基上 25 °C 培养至形成菌落。富集培养基组成:蛋白胨 10 g, 酵母浸汁 5 g, 氯化钠 10 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 L。调节至 pH 8.0^[6]。

宿主菌 II 的分离:水样分别稀释至 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4} 。分别涂布在培养基上 25 °C 培养至形成菌落。培养基组成: NaNO_2 1000 mg; NaCl 500 mg; KH_2PO_4 150 mg; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50 mg; CaCO_3 3 mg; $(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 0.05 mg; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 mg, 蒸馏水 1 L。调节至 pH 7.8^[13]。

1.3 类蛭弧菌的分离培养

蛭弧菌采用双层胶法进行分离^[9,14]。先配制营养肉汤 (Nutrient Broth 简称 NB) 培养基:蛋白胨 5 g, 牛肉浸汁 3 g, 蒸馏水 1L。NB 培养液都被稀释 500 倍后成为 NB500 培养液。

上层胶:NB × 500 培养液 2 mL, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3.94 mg, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 203.3 mg, 琼脂 7 g, 加入蒸馏水至 1000 mL。调节至 pH 8.0。

下层胶:NB × 500 培养液 2 mL, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3.94 mg, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 203.3 mg, 加入蒸馏水至 1000 mL, 琼脂 15 g。调节至 pH 8.0。

(1) 固体分离培养:先将下层胶倒于培养皿

中, 冷凝。上层胶先加热融化后置于 47 °C 恒温水浴。在 3.5 mL 上层胶中加入 4.5 mL 水样、0.5 mL 宿主细胞, 混均后倒于下层胶上 25 °C 培养至有透明噬菌斑生成。

(2) 液体培养:宿主菌固体培养长出菌苔, 加 5 mL 灭菌蒸馏水收集宿主菌悬液。然后取 30 mL 含 3.94 mg/L $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 203.3 mg/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的无菌水于三角瓶中。加入 0.5 mL 宿主细胞悬液, 挑取单个噬菌斑加入三角瓶中。在 25 °C 下震荡培养 3 d 或溶液由混浊变为澄清为止。

(3) 以液体分离培养后的溶液为样品作第二次固体分离培养和第二次液体分离培养; 最后做固体培养至生长噬菌斑形状大体一致。传代保存。

1.4 宿主菌的鉴定

取被捕食细菌的菌液 1.5 mL 离心 (16000 r/m 60 min) 弃上清, 加入 30 μL 无菌水混匀。以该溶液为样品作 PCR 检测。引物 EUB27F: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG; 1492R: GGT TAC CTT GTT ACG ACT T^[15-16]。95 °C, 15 min; 94 °C, 30 s; 56 °C, 1 min; 72 °C, 45 s; 72 °C, 7 min; 4 °C, ∞ 。PCR 产物测序。数据在 NCBI (National Center of Biotechnology Information 美国国家生物技术信息中心) 中用 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool 序列相似性检索程序) 进行分析。

1.5 蛭弧菌的鉴定

取 1.5 mL 液体培养的蛭弧菌液离心(16000 r/m 60 min)弃上清再加入 30 μ L 无菌水混匀。以该溶液为样品作 PCR 检测。正链引物: CAGGCCTA-ACACATGCAAGTC; 负链引物: CGWCACT-GAAGGGGCAA^[17]。94 $^{\circ}$ C, 4 min; 94 $^{\circ}$ C, 1 min; 56 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 5 min; 4 $^{\circ}$ C, ∞ 。产物测序。数据在 NCBI 中进行 BLAST 分析。

2 结果

2.1 宿主菌的分离和鉴定

宿主菌 I 的筛选过程中 经过 25 $^{\circ}$ C 的恒温培

表 1 利用宿主菌 I 和 II 分离类蛭弧菌形成嗜菌斑的数量

Table 1. The numbers of plaques forming in isolating of BLAOs by using prey I and II

方法	宿主菌 I 分离方法							宿主菌 II 分离方法				
菌株编号	I-1	I-2	I-3	I-4	I-5	I-6	I-7	II-1	II-2	II-3	II-4	II-5
形成噬菌斑数量	17	14	5	7	13	18	0	27	38	32	0	0

宿主菌 II 的筛选过程中, 10^{-2} 及更低的稀释度涂布的培养基上, 生长的菌落较密; 而 10^{-4} 稀释度涂布的培养基上没有菌落生长。因此, 挑选 10^{-3} 稀释度涂布培养基上的菌落。经鉴定有 5 株革兰氏阴性细菌。除了 2 株在用于进一步的类蛭弧菌的分离培养中没有形成嗜菌斑外, 其余 3 株都形成了不同数量的噬菌斑(表 1)。选择生成噬菌斑数量最多的 2 号作为进一步分离类蛭弧菌的宿主菌, 并作对其 16S rDNA 序列进行分析, 鉴定其种类。

经过 16S rRNA 基因序列分析, 宿主菌 I 的 6

养后, 在 10^0 、 10^{-1} 和 10^{-2} 稀释度下, 因培养基上菌落生长过密而未加挑选; 10^{-4} 稀释度下, 培养基上没有菌落生长。因此, 在有菌斑生长的最大稀释度 10^{-3} 的平板中挑选菌落作为候选宿主菌。通过革兰氏染色法检测, 有 7 株革兰氏阴性细菌。这 7 株细菌作为宿主菌, 分别从样品中分离类蛭弧菌。经过培养后, 有 1 株细菌培养时没有形成类蛭弧菌的嗜菌斑而被排除, 其余 6 株用于 BLAOs 培养时分别形成了不同数量的菌斑数(表 1)。选择生成嗜菌斑数量最多的 6 号菌株作为进一步分离类蛭弧菌的宿主菌, 并作对其 16S rDNA 序列进行分析, 鉴定其种类。

号菌株和宿主菌 II 的 2 号菌株分别为肠杆菌 (Enterobacteriales) 和黄色单胞菌 (Xanthomonadales)。

2.2 利用宿主菌 I 和 II 分离类蛭弧菌

分别利用宿主菌 I (肠杆菌) 和 II (黄色单胞菌) 分离滇池、阿哈湖和百花湖中的类蛭弧菌。经过 1 d 的培养后, 可见少量的和小个的噬菌斑出现。2 d 后可看到培养基上明显有透明的噬菌斑出现(图 2)。噬菌斑大多是圆形, 边缘平滑。

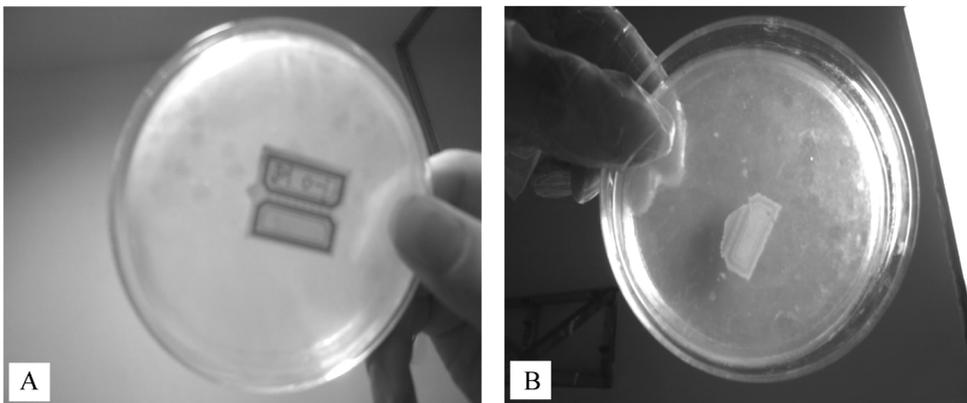


图 2 以宿主菌 I (A) 和 II (B) 为被捕食细菌分离培养类蛭弧菌形成嗜菌斑

Fig. 2. The plaques forming on the mediums in isolating BALOs by using prey I (A) and II (B).

2.3 分离蛭弧菌的进一步液体培养鉴定

液体培养因加入宿主细胞悬液,溶液变得混浊。如果溶液中含有类蛭弧菌,宿主细胞会被类蛭弧菌分解,使溶液变澄清。固体培养形成的类蛭弧菌噬菌斑转入液体培养后,在1~3 d内浑浊

的培养液明显变清。进一步证实形成噬菌斑的微生物是类蛭弧菌。挑选部分液体培养液进行培养前后的光密度测定。在600 nm的波长下的测定结果表明接种后的培养液和澄清后的培养液光密度有明显的下降(表2)。

表2 类蛭弧菌液体培养前后吸光度变化

Table 2. The change of absorbency during liquid culture processes

样品	宿主菌 I					宿主菌 II				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
培养前	0.12	0.125	0.11	0.136	0.166	0.157	0.13	0.123	0.142	0.181
培养后	0.011	0.03	0.026	0.006	0.042	0.01	0.025	0.014	0.026	0.066
下降率	91%	76%	76%	96%	75%	94%	81%	89%	82%	64%

2.4 类蛭弧菌的分离和鉴定

通过16S rDNA序列分析表明用宿主菌 I (肠杆菌)和 II (黄色单胞菌)分离得到的细菌为类蛭弧菌。从不同的湖泊和水深位置以及采用两株宿主菌都分离得到了类蛭弧菌(表3)。类蛭弧菌 A1-16-1 菌株与已知类蛭弧菌 Uncultured Bdell-

ovibrio sp. clone M13-54 相近。从阿哈湖分离得到的类蛭弧菌 A1-12-1、A2-0-1、A2-0-2、A2-9-2 以及从百花湖分离得到的类蛭弧菌 BH-0-2、BH-27-2 菌株与已知类蛭弧菌 EPC3 属于同一类群(cluster)。而从滇池分离得到的类蛭弧菌 D3-0-1、D4-2-2、D5-0-1、D8-0-1、D10-2-2 菌株属于新的类群。

表3 用两株宿主菌分离得到的类蛭弧菌

Table 3. The obtained isolates of BLAOs by using the two kinds of preys

类蛭弧菌编号	样品来源	采样点	水深	宿主菌	类蛭弧菌种类
A1-16-1	阿哈湖	取水口	16.5 m	肠杆菌	Uncultured Bdellovibrio sp. clone M13-54
A1-12-1	阿哈湖	取水口	12 m	肠杆菌	Bacteriovorax sp. EPC3
A2-0-1	阿哈湖	麻窝寨	表层水	肠杆菌	Bacteriovorax sp. EPC3
A2-0-2	阿哈湖	麻窝寨	表层水	肠杆菌	Bacteriovorax sp. EPC3
A2-9-2	阿哈湖	麻窝寨	9m	肠杆菌	Bacteriovorax sp. EPC3
BH-0-2	百花湖	老凹	表层水	黄色单胞菌	Bacteriovorax sp. EPC3
BH-27-2	百花湖	老凹	27 m	肠杆菌	Bacteriovorax sp. EPC3
D3-0-1	滇池	内湖	表层水	肠杆菌	New Bdellovibrio sp.
D4-2-2	滇池	海埂内侧	3 m	肠杆菌	New Bdellovibrio sp.
D5-0-1	滇池	海埂外侧	表层水	黄色单胞菌	New Bdellovibrio sp.
D8-0-1	滇池	滇池南端	表层水	黄色单胞菌	New Bdellovibrio sp.
D10-2-2	滇池	工人疗养院	3 m	黄色单胞菌	New Bdellovibrio sp.

3 讨论

应用不同的宿主菌可分离海洋、淡水和土壤等环境的类蛭弧菌。副溶血弧菌 P5 被认为是最有效的分离盐水类蛭弧菌的宿主菌株被广泛采用。大肠杆菌(*E. coli*)也是最常用的宿主菌株之一,用分离来自废水和活性污泥等样品的类蛭弧菌^[18-22]。从淡水湖泊中分离获得的肠杆菌和黄色单胞菌被证明能有效的分离来自原环境淡水湖

泊中的类蛭弧菌(图2)。细菌的丰度与600 nm的波长下的吸光度具有正相关关系。当细菌细胞被裂解后,吸光度会表现出下降的结果。这一指标可用于指示细菌细胞的裂解。从淡水湖泊中分离的类蛭弧菌能使宿主菌肠杆菌和黄色单胞菌的吸光度有效的下降,甚至高达94%(表2)。说明分离的细菌具有裂解细菌的捕食作用。

从所研究的环境中分离宿主菌株然后再用于分离该环境中的类蛭弧菌的方法,对于研究环境

中细菌的捕食关系更能反映实际的状况。利用分离的宿主菌肠杆菌和黄色单胞菌获得了不同阿哈湖、百花湖和滇池的类蛭弧菌菌株(表3)。所分离菌株的类蛭弧菌有的与已知 EPC3 属于同一类群即类群(Clusters) VII。类蛭弧菌 EPC3 从土壤分离得到^[3], 该研究从淡水湖泊分离出该类群的类蛭弧菌, 对该类群类蛭弧菌的分布范围有了进一步的认识。从滇池分离的类蛭弧菌属于新的类群, 对这些菌株的生长特征和 DNA 分析正在研究, 将另文发表。从阿哈湖取水口分离获得类蛭

弧菌菌株与类蛭弧菌 clone M13-54 属于同一类群。类蛭弧菌 clone M13-54 是运用分子的方法得到鉴定的, 没有获得纯培养菌株^[23]。

4 结 论

采用从研究环境中分离宿主菌的方法, 成功地从淡水湖泊阿哈湖、百花湖和滇池中分离得到了类蛭弧菌菌株。所分离获得的类蛭弧菌有的属于新的类蛭弧菌类群, 也有首次从淡水湖泊样品中分离获得的类蛭弧菌纯培养菌株。

参 考 文 献:

- [1] Stolp H, Petzold H. Untersuchungen über einen obligat parasitischen Mikroorganismus mit lytischer Aktivität für Pseudomonas-Bakterien [J]. *Phytopath Z*, 1962, 45: 364-390.
- [2] Donze D, Mayo J A, Diedrich D L. Relationships among the Bdellovibrions revealed by partial sequences of 16S ribosomal RNA [J]. *Curr Microbiol*, 1991, 23: 115-119.
- [3] Davidov Y, Jurkevitch E. Diversity and evolution of Bdellovibrion-and-like organisms (BALOs), reclassification of *Bacteriovorax starrii* as *Peredibacter starrii* gen. nov. comb. nov., and description of the *Bacteriovorax-Peredibacter* clade as *Bacteriovoracaceae* famg. [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, 54: 1439-1452.
- [4] Snyder A R, Williams H N, Baer M L, Walker K E, Stine O C. 16S rDNA sequence analysis of environmental Bdellovibrion-and-like organisms (BALO) reveals extensive diversity [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2002, 52: 2089-2094.
- [5] 崔思列, 班进林, 杨润德, 等. 蛭弧菌的分离培养及其对病原菌噬菌作用的初步研究[J]. 河北农业大学学报, 1991, 14: 76-81.
- [6] 沈萍, 范秀荣, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 220-221.
- [7] 谢群英, 房文红. 海水蛭弧菌分离纯化方法研究[J]. 海洋渔业, 2008, 28: 211-217.
- [8] 邢华, 何义进. 噬菌蛭弧菌的生物学特性研究[J]. 淡水渔业, 1997, 27: 17-19.
- [9] Koval S F. The search for hunters: Culture-dependent and -independent methods for analysis of Bdellovibrion-and-like organisms [J]. *Microbiol Monogr* 2006, 27: 191-211.
- [10] 宋志萍, 蔡俊鹏. 蛭弧菌的分离及其生长条件和裂解能力的研究[J]. 微生物学报, 2005, 45: 571-575.
- [11] 储卫华, 朱卫. 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: 20-24.
- [12] Jurkevitch E, Minz D. Prey range characterization ribotyping and diversity of soil and rhizosphere Bdellovibrion spp. isolated on Phytopathogenic bacteria [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66: 2365-2371.
- [13] Bock E, Koops H-P, Moller U C, et al. A new facultatively nitrite oxidizing bacterium, *Nitrobacter vulgaris* sp. Nov. [J]. *Archives of Microbiology*, 1990, 153: 105-110.
- [14] Rogosky A M, Moak P L, Emmert E A B. Differential predation by Bdellovibrion bacteriovorus 109J [J]. *Curr Microbiol*, 2006, 52: 81-85.
- [15] Weisburg W, Barns S M, Pelletier D A, Lane D J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. *J Bacteriol*, 1991, 173: 697-703.
- [16] Reysenbach A L, Giver L J, Wickham G S, Pace N R. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58: 3417-3418.
- [17] Jurkevitch E, Ramati B. Design and uses of Bdellovibrion 16S rRNA-targeted oligonucleotides [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 184: 265-271.
- [18] Williams H N, Fakler W A J, Shay D E. Incidence of marine Bdellovibrions lytic against *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1980, 40: 970-972.
- [19] Dias F F, Bhat J V. Microbial ecology of activated sludge II. Bacteriophages, Bdellovibrion, coliforms, and other organisms [J]. *Appl Microbiol*, 1965, 13: 257-261.
- [20] Klein D A, Casida L E J. Occurrence and enumeration of Bdellovibrion bacteriovorus in soil capable of parasitizing *Escherichia coli* and indigenous soil bacteria [J]. *Can J Microbiol*, 1967, 13: 1235-1241.
- [21] Pineiro S A, Sahaniuk G E, Romberg E, Williams H N. Predation pattern and phylogenetic analysis of bdellovibrionaceae from the Great Salt Lake, Utah [J]. *Curr Microbiol*, 2004, 48: 113-117.

- [22] Pineiro S A , Stine O C , Chauhan A , Steyert S R , Smith R , Williams H N. Global survey of diversity among environmental saltwater Bacteriovoraceae [J] *Environ Microbiol* ,2007 ,9: 2441-2450.
- [23] Gucht V D , Vandekerckhove T , Vloemans N , et al. Characterization of bacterial communities in four freshwater lakes differing in nutrient load and food web structure [J] *FEMS Microbiol Ecol* ,2005 ,53: 205-220.

Study of a Method to Isolate the Bdellovibrio-and-Like Organisms (BALOs) from the Fresh Water Lakes

ZENG Jia^{1 2} , LIANG Xiao-bing¹ , LU Ting^{1 2}

(1. State Key Laboratory of Environment Geochemistry , Institute of Geochemistry , Chinese Academy of Science , Guiyang 550002 , China ;

2. Graduate University of Chinese Academy of Science , Beijing 100049 , China)

Abstract: Two kinds of preys were isolated from different water depths of Lake Aha and Baihua in Guizhou Province and Lake Dianchi in Yunnan Province. They are identified as Enterobacteriales and Xanthomonadales respectively by 16S rDNA sequence analysis. The plaques of BALOs were got from lake water samples. The isolates were verified as BALOs through absorbency determination , PCR with specific primers and DNA sequence analysis. A method of isolating BALOs by using isolated preys in the same inhabitants was established. Various clusters of BALOs were isolated from freshwater lakes by using the methods.

Key words: Bdellovibrio-and-like organisms (BALOs) ; isolate ; prey ; PCR ; DNA sequence analysis