

一株海洋蛭弧菌类生物对海水细菌的生物控制和水质的影响*

温崇庆^{1,2,3}, 丁 贤^{2,3}, 薛 明¹, 纪建达¹, 周世宁³

(1. 广东海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524025;

2. 中国水产科学院 南海水产研究所//农业部渔业生态环境重点开放实验室, 广东 广州 510300;

3. 中山大学 生命科学学院 // 有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 研究了一株海洋蛭弧菌类生物 (*Bdellovibrio* - and - like organisms, BALOs) DA5 与溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 在海水中共培养时的相互作用; 并研究了 DA5 对添加营养的自然海水中细菌的生物控制效果及对水体 pH、化学需氧量 (COD)、氨氮 ($\text{NH}_3 - \text{N}$) 和亚硝酸氮 ($\text{NO}_2 - \text{N}$) 含量的影响。结果表明 DA5 在振荡培养条件下对溶藻弧菌具有明显的裂解作用, 较高的感染比有助于快速减少寄主菌, 但长时间的共培养也不能完全清除溶藻弧菌。DA5 对自然海水中异养细菌和弧菌均有一定的清除作用, 且对弧菌的消减作用更明显, 但对水体 pH、COD、 $\text{NH}_3 - \text{N}$ 和 $\text{NO}_2 - \text{N}$ 含量均无显著影响, 且 BALOs 含量总体上与细菌或弧菌的含量呈正相关。

关键词: 海洋蛭弧菌类生物; 生物控制; 细菌; 弧菌; 水质

中图分类号: Q938.1 文献标识码: A 文章编号: 0529-6579 (2008) 03-0085-04

蛭弧菌类生物 (*Bdellovibrio* - and - like organisms, BALOs), 是一类捕食其它革兰氏阴性菌为生的小型寄生性细菌, 普遍存在于土壤、水体和动物肠道等环境中^[1]。游离的 BALOs 细胞通过黏附识别、侵入寄主菌周质空间中利用寄主细胞成分为营养进行生长发育, 最后裂解寄主菌释放子代细胞得以增殖^[1]。

由于 BALOs 独特的生物学特征, 将其作为生物控制因子用于细菌性病害的生物控制和水质净化上具有一定的应用潜力^[1], 特别是应用在水产养殖等水体环境中的实践操作性更强。将 BALOs 应用于水体中, 需对其施放后对水体环境特别是对其中的细菌生态系统和水质的影响进行评估, 从而了解其发挥功效的可能机制及其应用中的安全性, 目前这方面的研究很少有报道。有关 BALOs 特别是陆生 BALOs 与其寄主菌的相互作用研究已有一些报道^[2], 但极少有海洋 BALOs 对环境中细菌生态系统影响的报道。本研究在了解一株海洋 BALOs 对其单一寄主菌裂解规律的基础上, 通过模拟试验研究了该菌株施放水体后对其中的可培养细菌含量和若干水质指标的动态影响, 以期海洋 BALOs 在海水养殖中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养基

溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) *zouA*, 为本实验室分离、鉴定和保存的一株对虾病原菌^[3], 以下简称 *zouA*; 海洋 BALOs 菌株 DA5, 是以 *zouA* 为寄主菌分离自海水并通过系统分类等方法鉴定为 *Bacteriovorax* sp. (另文报道), 以下简称 DA5。

2216E 培养基 (蛋白胨 5 g, 酵母粉 1 g, Fe-PO_4 0.1 g, 琼脂粉 15 g, 陈海水 1 L, pH 7.6 ~ 7.8), 用于异养细菌的计数; TCBS 培养基 (北京陆桥公司产品, 50 % 的海水配制) 用于弧菌的计数; 海水双层琼脂培养基 (底层含 $w = 1\%$ 琼脂, 上层含 $w = 0.5\%$ 琼脂和约 10^8 cfu/mL 预先用无菌海水漂洗过的 *zouA* 细胞), 用于包括 DA5 在内的 BALOs 的计数。

1.2 DA5 与 *zouA* 的相互作用

取新培养并通过 $0.45 \mu\text{m}$ 过滤去除寄主菌的 DA5 分别以初始感染比约 $1/10^6$ (试验组 I)、 $1/10^4$ (II) 和 $1/10^2$ (III) 接种于含有 4.3×10^8 cfu/mL 的 *zouA* 海水悬液中, 30°C 200 r/min 振荡培养, 同时设不接种 DA5 的 *zouA* 海水悬液作对照组。每组设两个平行, 试验容器为 500 mL 三角瓶,

* 收稿日期: 2007-10-09

基金项目: 国家高技术发展计划 (863 计划) 资助项目 (2003AA624010); 农业部渔业生态环境重点开放实验室开放基金资助项目//广东省渔业生态环境重点实验室开放基金资助项目 (2006-8)

作者简介: 温崇庆 (1974 年生), 男, 讲师, 博士研究生; 通讯联系人: 周世宁; E-mail: lsszsl@mail.sysu.edu.cn

初始体积均为 200 mL。定时取样 1 mL, 10 倍梯度稀释后取适当梯度稀释液 0.1 mL, 每个梯度 3 个平行 (以下同), 涂布 TCBS 平板, 30 °C 培养 1 d 计数 *zouA* 含量; 同时倾注海水双层琼脂平板, 30 °C 培养 4 d 计数 DA5 含量。

1.3 DA5 对海水中细菌数量的影响

实验分两组, 每组两个平行。于 50 L 的无菌带盖塑料桶中加入 24.6 L 于试验前 1 h 取自湛江市东海岛大堤邻近对虾养殖区的近岸海水 (pH 8.1, 盐度 29.7 ‰)。实验组加无寄主菌的 DA5 滤液 300 mL (9.27×10^3 pfu/mL) 和 100 mL 无菌营养液 (含 12.5 g 蛋白胨, 2.5 g 酵母粉), 对照组不加 DA5, 只加相应体积的无菌海水和营养液。水温在室温范围内 (25 ~ 30 °C) 波动, 每个桶保持同样的连续充气状态 (溶氧约为 5.6 mg/L)。连续 7 d 无菌操作定点取样 500 mL, 稀释涂布 2216E 平板和 TCBS 平板, 28 °C 培养 5 d, 分别计数水体中异养细菌和弧菌含量; 同时以海水双层平板法, 25 °C 培养 7 d, 计数包括 DA5 在内的 BALOs。

1.4 DA5 对海水中若干水质指标的影响

实验体系同 1.3, pH 值采用上海雷磁 PHS-3C 型精密酸度计测定, COD、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2\text{-N}$ 含量按照海洋监测规范 GB17387.4-1998 方法测定^[4], 每份水样每一指标两个平行样。

1.5 实验数据处理

采用 SPSS13.0 统计软件对水质指标进行 *t*-检验, 用 Spearman 相关性分析对对照组和试验组 BALOs 与异养细菌和弧菌的数量关系进行分析 ($p < 0.05$, 差异或相关性显著; $p < 0.01$, 差异或相关性极显著)。

2 结果

2.1 DA5 对溶藻弧菌 *zouA* 的裂解作用

DA5 与 *zouA* 以不同感染比共培养时的数量动态变化如图 1 所示。由于海水中本底营养的存在, 对照组 *zouA* 12 h 后就从初始的 4.3×10^8 cfu/mL 上升到 10^9 cfu/mL, 且维持较长时间的动态平衡。而加 DA5 的 3 个试验组中, 最初 *zouA* 含量下降的速度与感染比呈正相关, 即较高的感染比有助于快速消减寄主菌。如 12 h 时感染比最低的第 I 组, *zouA* 先略有上升后再呈指数下降, 第 II、III 组则呈明显的指数下降。1 d 后 3 个试验组 *zouA* 含量均下降至 $10^5 \sim 10^6$ cfu/mL 并维持较长时间的动态平衡。尽管不同感染比的 DA5 在较短时间内均能降低 *zouA* 3 个数量级, 但直至 32 d 都不能达到完全清除寄主菌的效果。

不同感染比的 DA5 与 *zouA* 共培养时, 随着寄主菌的下降 DA5 含量呈迅速上升趋势, 此后又快速下降至 10^5 pfu/mL 左右维持较长时间的动态平衡, 到后期随着 *zouA* 含量的下降, DA5 含量也明显减少。总体上 DA5 含量与寄主菌含量呈正相关 ($r = 0.755$, $p = 0.005$), 稍滞后于 *zouA* 的波动。

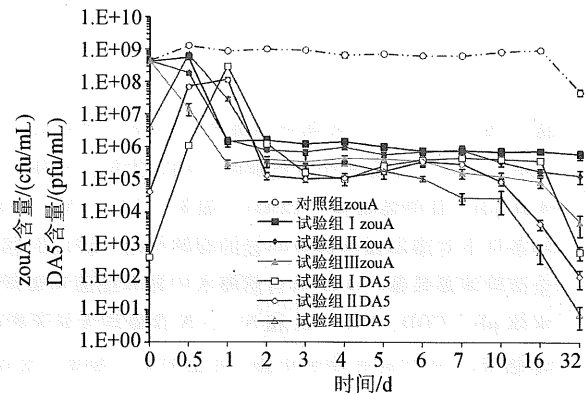


图 1 海洋 BALOs DA5 对溶藻弧菌 *zouA* 数量的影响

Fig. 1 The effect of marine BALOs DA5 on the amount of *V. alginolyticus zouA*

(试验组 I、II、III 分别表示初始 DA5 与 *zouA* 感染比为 $1/10^6$ 、 $1/10^4$ 和 $1/10^2$)

2.2 DA5 对海水中异养细菌、弧菌和 BALOs 数量的动态影响

结果见图 2, 对照组和试验组可培养异养细菌含量的变化趋势相同, 1 d 后均由最初的 4 950 cfu/mL 迅速上升到约 2×10^8 cfu/mL, 此后又呈指数型下降, 类似于培养基中的对数生长期和衰亡期。除第 1 d 两组异养细菌含量相差不到 9% 外, 此后加 DA5 的试验组含量均比对照组减少 30% ~ 60%; 弧菌含量的变化趋势总体上与异养细菌的相似, 只是试验组减少趋势更明显, 1 d 后就比对照组减少约 30%, 此后为 40% ~ 70%。

BALOs 含量总体变化趋势也似异养细菌和弧菌的变化。由于初始试验组水体中加入 DA5 含量 (约 10^5 pfu/mL) 远高于对照组本底 BALOs 含量 (195 pfu/mL), 且第 1 d 内异养细菌和弧菌含量均迅速增加, 使得试验组以 DA5 为优势类群的 BALOs 也迅速增殖到约 6×10^7 pfu/mL, 但接着又较快地下降 2 ~ 3 个数量级并维持在 10^5 pfu/mL 左右至试验结束; 而对照组本底 BALOs 2 d 后才增殖到 4.87×10^7 pfu/mL, 接着相对平缓地下降, 最后 2 d 也以 10^5 pfu/mL 左右维持动态平衡。除了初始加入较高含量 DA5 的试验组外, 对照组和试验组 BALOs 含量总体上与异养细菌或弧菌的含量都呈

正相关（对照组： $r = 0.786$, $p = 0.036$ ；试验组： $r = 0.991$, $p < 0.001$ ）。

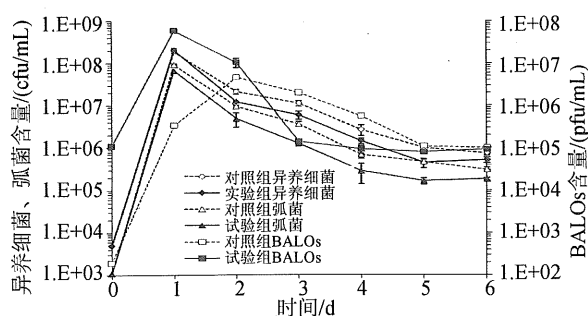


图2 海洋 BALOs DA5 对异养细菌、弧菌和蛭弧菌类生物数量的影响

Fig. 2 The effects of marine BALOs DA5 on the amount of heterotrophs, vibrios and BALOs

2.3 DA5 对海水 pH、COD、 $\text{NH}_3 - \text{N}$ 和 $\text{NO}_2 - \text{N}$ 含量的动态影响

DA5 对添加营养的自然海水 pH 和 COD 的影响结果见图 3，对 $\text{NH}_3 - \text{N}$ 和 $\text{NO}_2 - \text{N}$ 含量的影响结果见图 4。由于添加的蛋白胨、酵母粉等营养被细菌分解产生氨氮，使得氨氮含量总体上呈上升趋势，pH 值也由此呈上升趋势，COD 含量则稍有升高后接着不断下降；水体中的 $\text{NO}_2 - \text{N}$ 含量比较低，呈先上升再下降又上升的波动。试验组和对照组所测的四种水质指标间均无显著差异 ($p > 0.05$)。表明 DA5 在本实验体系下对上述水质指标的影响不大。

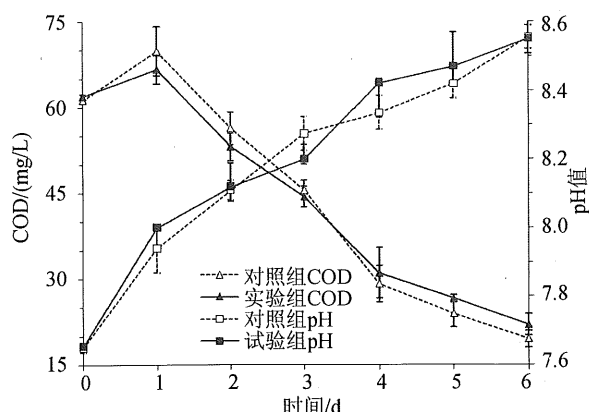


图3 海洋 BALOs DA5 对水体 pH 和 COD 的影响
Fig. 3 The effects of marine BALOs DA5 on the pH and COD in water body

3 讨论

3.1 BALOs 与单一寄主菌的相互作用

有关 BALOs 与单一寄主菌共培养时的相互作用已有一些报道，且多侧重于陆生 BALOs 较短时

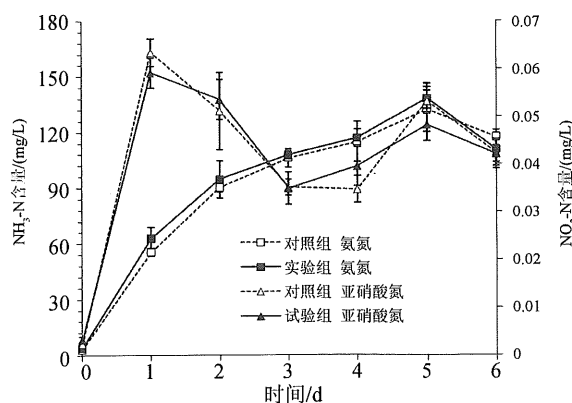


图4 海洋 BALOs DA5 对水体 $\text{NH}_3 - \text{N}$ 和 $\text{NO}_2 - \text{N}$ 含量的影响

Fig. 4 The effects of marine BALOs DA5 on the $\text{NH}_3 - \text{N}$ and $\text{NO}_2 - \text{N}$ content in water body

间内以较高的感染比 (1/10 以上) 对相关寄主菌裂解作用的研究^[2]。这些研究表明 BALOs 能迅速减少但并不能完全清除寄主菌；维持 BALOs 捕食存活的最低寄主菌浓度约为 $10^5 \sim 10^6$ cfu/mL。自然条件下的 BALOs 数量相对细菌总数要少得多，即使将其应用到水体中生物控制细菌，从生产成本和使用上考虑一般也不会以 1/10 以上的高感染比应用，因此研究低感染比下的 BALOs 与寄主菌的相互作用规律有助于指导实践应用。本实验中 DA5 以不同的感染比与溶藻弧菌较长时间的共培养结果也符合上述规律。BALOs 不能完全清除寄主菌的主要原因可能是残存寄主细胞适应性表型抗性的增强导致 BALOs 捕食效率的下降，这种机制有助于捕食者和被捕食者长期共存^[5]，但对利用 BALOs 生物控制细菌的效率可能造成一定影响。

3.2 BALOs 对混合细菌群体的影响

自然条件下的 BALOs 并不只是面对某一种或少数几种寄主细菌，而是在复杂多样的细菌生态环境中猎食。其中有 BALOs 可侵染的寄主菌，也有许多特别是革兰氏阳性菌等非寄主菌，即使不同类型寄主细菌间也存在差异性捕食情况^[6]，此外还有大量非细菌性颗粒等作为诱饵物而影响 BALOs 的捕食，以及原生动物、噬菌体等对 BALOs 本身的捕食作用使得问题更加复杂化^[7]。因此研究 BALOs 对环境中细菌群体的影响，了解 BALOs 在自然环境中的真实角色和作用是很意义也是颇具挑战性的工作^[1]。

本文通过室内模拟实验旨在了解 DA5 应用到海水养殖环境中对其中可培养细菌含量的影响程度。试验组中 DA5 与水体初始异养细菌的感染比虽然高达 22.4:1，考虑到自然水体中绝大多数

(95 % 以上) 细菌未可培养以及水体中其它生物和非生物性颗粒等对 BALOs 捕食的影响, 实际感染比要小得多。上述条件下 DA5 虽达不到如裂解单一寄主菌那样显著的效果, 但在一定程度上仍能消减细菌, 特别是对弧菌的消减作用更明显, 这与海洋 BALOs 对弧菌的裂解效率总体上高于对其它类群细菌的作用相一致^[1]。当然, DA5 不仅对细菌含量造成一定的影响, 更主要的是对细菌种群和结构的影响, 这种影响产生的后果应该更深远, 值得深入研究。

3.3 BALOs 对养殖相关水质指标的影响

水质质量的好坏, 对水产养殖动物的健康具有重要影响, 因此应用 BALOs 于养殖水体时要充分考虑其对水质的可能影响。室内模拟实验表明, 较高含量的 DA5 施放水体后虽然对其中的细菌含量造成一定的影响, 但对所测的 4 种水质指标均无显著影响。BALOs 可能主要通过调控细菌种群和数量减少某些类群细菌, 相对增加其它类群细菌, 从而影响水体环境, 并由此可能对水质造成间接影响。本实验对 DA5 的研究结果表明这种对水质的间接影响很难被放大。当然, 不同的 BALOs 菌株及其作用环境对相关水质的影响可能不尽相同, 通过筛选专门或优先捕食某类生理型细菌的 BALOs, 也有可能用于调控水质。

参考文献:

- [1] JURKEVITCH E. Predatory Prokaryotes [M]. Berlin: Springer, 2006: 24 - 248.
- [2] SHEMESH Y, DAVIDOV Y, KOVAL S, et al. Small eats big: ecology and diversity of *Bdellovibrio* and like organisms, and their dynamics in predator - prey interactions [J]. *Agronomie*, 2003, 23: 433 - 439.
- [3] 温崇庆, 薛明, 何红, 等. 两株对虾幼体弧菌病原的分离和鉴定[J]. *微生物学通报*, 2008, 35: 346 - 352. WEN Chongqing, XUE Ming, HE Hong, et al. Isolation and identification of two pathogenic strains associated with vibriosis of shrimp larvae [J]. *Microbiology*, 2008, 35: 346 - 352.
- [4] 国家质量技术监督局发布. 中华人民共和国国家标准 (GB17378.4 - 1998) 海洋监测规范第四部分: 海水分析 [S]. 北京: 中国标准出版社, 1998: 142 - 156.
- [5] SHEMESH Y, JURKEVITCH E. Plastic phenotypic resistance to predation by *Bdellovibrio* and like organisms in bacterial prey [J]. *Environ Microbiol*, 2004, 6: 12 - 18.
- [6] ROGOSKY A M, MOAK P L, EMMERT E A B. Differential predation by *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J [J]. *Curr Microbiol*, 2006, 52: 81 - 85.
- [7] HOBLEY L, KING J R, SOCKETT R E. *Bdellovibrio* predation in the presence of decoys: three - way bacterial interactions revealed by mathematical and experimental analyses [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72: 6757 - 6765.

Biocontrol of Bacteria in Seawater by a Marine *Bdellovibrio*-and-Like Organisms and its Effect on Water Quality

WEN Chong-qing^{1, 2, 3}, DING Xian^{2, 3}, XUE Ming¹, JI Jian-da¹, ZHOU Shi-ning³

(1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. Key Laboratory of Fishery Ecology Environment of Ministry of Agriculture, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

3. State Key Laboratory of Biocontrol, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The strain of marine *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALOs) DA5 was co-cultured in seawater with *Vibrio alginolyticus* and their interrelationship was investigated. The effects of strain DA5 on the biocontrol of bacteria, and on the variation of pH, chemical oxygen demand (COD), ammonia-N ($\text{NH}_3\text{-N}$) and nitrite-N ($\text{NO}_2\text{-N}$) were also studied in natural seawater media. The results show that DA5 lysed *V. alginolyticus* obviously under shaking culture conditions. With the higher infection rate, the reduction of prey cells is faster, however co-cultured with DA5 cannot clear up *V. alginolyticus* completely. The elimination effect of DA5 is better on vibrios than that on heterotrophs, though both are decreased. There is no significant effect on the variation of pH, COD, $\text{NH}_3\text{-N}$ and $\text{NO}_2\text{-N}$ between control and treatment, but there is a positive correlation between the content of BALOs and heterotrophs or vibrios.

Key words: Marine *Bdellovibrio*-and-like organisms; biocontrol; bacteria; vibrio; water quality