

文章编号:1000-0615(2009)02-0326-08

## 水产养殖用蛭弧菌类生物制剂的检测

温崇庆<sup>1,2</sup>, 薛明<sup>1</sup>, 张金燕<sup>3</sup>, 黄瑜<sup>1</sup>, 周世宁<sup>2</sup>

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025;

2. 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;

3. 广东绿百多生物科技有限公司, 广东 湛江 524022)

**摘要:**通过双层平板法以不同细菌为宿主测定了8个厂家蛭弧菌类生物制剂的噬斑含量及噬斑分离物的宿主裂解范围;以3对靶向不同类群蛭弧菌类生物的特异引物对各产品及其噬斑分离物进行了PCR检测;对两株代表性蛭弧菌分离物的16S rRNA基因进行了测序,并通过构建蛭弧菌科进化树分析了它们的系统地位。结果表明,被检测的8个蛭弧菌类生物制剂中有6个质量明显不合格,仅两个样品被蛭弧菌科特异引物检测为阳性,被双层平板法证实有噬斑出现。其中一个样品JSF中存在两种形态和宿主范围不同的噬斑分离物,且不同宿主菌计数结果存在明显差异。16S rRNA基因序列分析表明这两种噬斑分离物JSF1和JSF2,分别属于蛭弧菌科的类群1(噬菌蛭弧菌)和未定种的类群5。但另一样品的噬斑分离物则被证实为非蛭弧菌类生物。

**关键词:**水产养殖;蛭弧菌类生物;微生物制剂;检测;16S rRNA基因

**中图分类号:**Q 939.9

**文献标识码:**A

蛭弧菌类生物 (*Bdellovibrio*-and-like organisms, BALOs), 是一类能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、水体等环境中<sup>[1]</sup>。根据16S rRNA基因序列等特征, 典型的BALOs均属于 $\delta$ -变形细菌, 目前被归为, 蛭弧菌科 (*Bdellovibrionaceae*) 和噬菌蛭弧菌科 (*Bacteriovoracaceae*)<sup>[2]</sup>。BALOs具有独特的二态生活周期, 游离的攻击期细胞通过黏附识别、侵入并定居在宿主菌周质空间中, 周质生长期细胞利用宿主细胞成分为营养进行丝状生长, 最后分裂成几个子代细胞并裂解宿主菌得以增殖<sup>[1]</sup>。

基于BALOs独特的捕食特性, 将其作为生物控制因子用于细菌性病害的生物防治上可能具有很好的应用前景<sup>[1]</sup>, 特别是应用在水产养殖等水体环境中。国内一些试验表明BALOs在一定程度上能够防治某些水产动物细菌性病害, 且市场上已有一些厂家生产和销售水产养殖用BALOs制剂<sup>[3]</sup>。由于水产微生物制剂的市场准入相对

容易, 对相关产品的质量监管不健全, 目前市场总体上比较混乱, 一些产品名不副实、鱼龙混杂, 给养殖户造成了误导和不必要的经济损失, 因此很有必要加强对水产微生物制剂的质量监控。

本研究主要对目前华南市场上销售的8种水产养殖用BALOs制剂进行检测, 以了解这些产品的内在质量及相关菌种特性, 为水产养殖用BALOs制剂的研究、应用和市场监管提供参考。

### 1 材料与方法

#### 1.1 样品来源

待检BALOs制剂购自广东和海南沿海对虾养殖业较集中的地区, 选择市场上销量多、具有明确生产厂家、包装完好且在保质期内的8个厂家生产的8个产品, 其主要成份均标为噬菌蛭弧菌或多种蛭弧菌, 被检测样品编号及包装上标识的部分信息见表1和表2。

收稿日期:2008-09-19 修回日期:2008-10-13

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2008AA09Z402)

通讯作者:周世宁, Tel: 020-84110238, E-mail: lsszsl@mail.sysu.edu.cn

表 1 蛭弧菌类生物制剂的盐度、pH 和异养细菌含量

Tab.1 Salinity, pH and heterotrophic bacteria content of BALOs preparations

样品编号 sample no.	产地 origin	包装 packaging	保质期 (月) warranty period	盐度 salinity	pH	异养细菌数 (CFU/mL) heterotrophic bacteria count
JSA	江苏 Jiangsu	液体 liquid, 1000 mL	8	7.37	5.5	$1.37 \times 10^6$
JSB	江苏 Jiangsu	液体 liquid, 1000 mL	18	0.63	6.4	$4.60 \times 10^4$
JSC	江苏 Jiangsu	固体 solid, 10 g	-	-	-	$6.73 \times 10^7$
JSD	江苏 Jiangsu	液体 liquid, 500 mL	12	0.72	6.0	$6.93 \times 10^6$
JSE	江苏 Jiangsu	液体 liquid, 500 mL	10	0.84	6.0	$1.82 \times 10^6$
JSF	江苏 Jiangsu	液体 liquid, 1000 mL	12	0.84	5.5	$1.08 \times 10^7$
SD	山东 Shandong	液体 liquid, 1000 mL	18	5.35	7.2	$7.50 \times 10^6$
SX	山西 Shanxi	液体 liquid, 1000 mL	12	0.78	5.5	$1.93 \times 10^7$

注:“-”未标识或未检测

Notes:“-”Unlabeled or untested

表 2 蛭弧菌类生物制剂的噬斑计数

Tab.2 The plaque count of BALOs preparations

样品编号 sample no.	标识含量 declared content	宿主细菌 (PFU/mL) prey bacteria								
		zou30	AH1	zouB	zouAS	JSA-H1	JSD-H1	JSE-H1	JSF-H1	SD-H1
JSA	$\geq 10^5$	6450	4100	5500	3700	3600	-	-	-	-
JSB	$\geq 10^6$	0	0	0	0	-	-	-	-	-
JSC	-	0	0	0	0	-	-	-	-	-
JSD	-	0	0	0	0	-	0	-	-	-
JSE	-	0	0	0	0	-	-	0	-	-
JSF	-	128 550 <sup>a</sup>	14 300 <sup>b</sup>	650 <sup>c</sup>	90 <sup>c</sup>	-	-	-	254 <sup>c</sup>	-
SD	$\geq 2 \times 10^8$	0	0	0	0	-	-	-	-	0
SX	$5.6 \times 10^7$	0	0	0	0	-	-	-	-	-

注:“-”未标识或未检测;a. 包括 128 000 个小斑和 550 个大斑;b. 小斑;c. 大斑

Notes:“-”Unlabeled or untested; a. Comprising of 128 000 small plaques and 550 big plaques; b. Small plaques; c. Big plaques

## 1.2 宿主细菌

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) zou30 (以下简称 zou30)、副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) zouB (zouB) 和温和气单胞菌 (*Aeromonas sobria*) zouAS (zouAS), 均为本实验室保存菌种;嗜水气单胞菌 (*A. hydrophila*) AH1 (AH1) 为中山大学周文广博士馈赠。

## 1.3 产品理化性质和异养细菌的检测

**外观、pH 和盐度** 将各液体样品混匀后, 无菌操作取样, 直接肉眼观测颜色、浑浊度, 精密 pH 试纸测定 pH 值, 盐度比重计测定盐度, 对于固体粉状样品 JSC 仅记录颜色。

**异养细菌计数** 稀释涂布平板法计数异养细菌含量, 即将液体样品混匀后, 无菌操作取 1 mL 于 9 mL 0.85% 生理盐水中 10 倍梯度稀释; 对样品 JSC, 称取 1 g, 加生理盐水溶至 10 mL, 再进行稀释。取适度梯度稀释液 0.1 mL, 每个梯度 3 个平行, 涂布营养肉汤 (以下简称 NB, 北京陆桥公司) 琼脂平板, 30 °C 培养, 每天观察 NB 平板上的菌落数量与特征, 以培养 7 d 的平均菌落数为

最终计数结果。

**优势异养细菌的分离** 在计数样品异养细菌的同时, 根据 NB 平板上的菌落特征区分优势菌类型 (约占 5% 以上), 选取代表性单菌落纯化后编号转接 NB 斜面, 4 °C 保存备用, 通过革兰氏染色试验获取优势分离物的染色和形态特征。

## 1.4 BALOs 的计数、分离和宿主范围

**宿主细菌的制备** 取单菌落接种于 NB (用于 zou30、AH1 和样品中分离纯化的最优势革兰氏阴性菌) 或 1/3 海水 NB (盐度 30 的天然海水稀释 3 倍配制, 用于 zouB 和 zouAS), 分别于 37 °C 或 30 °C 振荡培养至对数后期,  $12\ 000 \times g$ , 4 °C 离心 10 min, 以稀释营养肉汤 (DNB) [4] 或 1/3 海水漂洗沉淀, 再次离心后, 配成含量约  $10^{10}$  CFU/mL 的 DNB 或 1/3 海水宿主细胞悬液, 4 °C 保存, 一周内使用。

**BALOs 的计数** 采用双层琼脂平板 (底层 1% 琼脂, 上层含 0.5% 琼脂和约  $10^8$  CFU/mL 宿主菌) 计数 BALOs。每个样品均以四种供试宿主菌及从各自样品中分离到的最优势革兰氏阴性

菌为宿主分别计数,其中 zou30、AH1 和样品中分离的阴性菌用 DNB 双层平板<sup>[4]</sup>, zouB 和 zouAS 用 1/3 海水双层平板。分别取各待测样品原液、10 倍和 100 倍稀释液 0.1 mL 或 1 mL 计数,各 3 个平行样,30 °C 培养,每天观察噬斑的有无和数量,以培养 7 d 的平均噬斑数为最终计数结果。

**BALOs 的分离、培养和保存** 从各宿主菌双层平板上挑取形态、大小不同的代表性噬斑,编号转接于相应的宿主菌悬液中,噬斑的纯化、分离物的培养和保存参考文献<sup>[4]</sup>的方法,只是以 zouB 和 zouAS 为宿主菌时,采用 1/3 海水双层琼脂或 1/3 海水宿主菌悬液。

**宿主裂解范围测试** 对各噬斑分离物,分别与其分离时的宿主菌共培养,取 10 mL 新鲜裂解液点接在待测宿主菌双层平板上,30 °C 培养 1 周,根据接种点周围有无裂解圈出现判断是否裂解被测的宿主菌<sup>[5]</sup>。

### 1.5 PCR 检测

**基因组 DNA 的提取** 样品及其噬斑分离物基因组 DNA 的提取均采用细菌基因组试剂盒(北京百泰克生物技术公司)。对液体样品,根据浑浊度大小取 10 ~ 200 mL,27 000 × g,4 °C 离心 20 min<sup>[4]</sup>,再提取沉淀物的 DNA;对固体样品 JSC 则取 0.1 g 左右提取 DNA;对于噬斑分离物,则提取宿主裂解较为完全的二元培养物 DNA。

**PCR 扩增** 以一对靶向蛭弧菌科(Bd529F: 5'-GGTAAGACGAGGGATCCT, Bd1007 R: TCTT C CAGTACATGTCAAG)、两对分别靶向噬菌弧菌科噬菌弧菌属(*Bacteriovorax*) (Bac676F: ATTTTCGCATGTAGGGGTA, Bac1442R: GCCAC GGCTTCAGGTAAG) 和吞菌弧菌属(*Peredibacter*) (Per676F: ATTTTCACGTGTAGGGG TA, Per1443R: AGTCACGTCTTAAAATGAAA) 的 16S rRNA 基因特异引物<sup>[6]</sup>分别扩增各样品和噬斑分离物基因组 DNA,引物由北京赛百胜生物技术公司合成。噬菌弧菌属和吞菌弧菌属引物 PCR 扩增时的阳性对照模板分别是作者从海水中分离的 *Bacteriovorax* sp. NA7 (16S rRNA 基因 GenBank 登录号为 EF092446) 和非培养 *Peredibacter* sp. 16S rRNA 基因克隆子 pa1 (FJ648610)。PCR 扩增程序均为 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。实验用的 *Taq* 酶(DR001A)、dNTPs

和 DNA 分子量标准均为 Takara 公司产品。

### 1.6 BALOs 分离物 16S rDNA 序列分析

对两株代表性蛭弧菌分离物 JSF1 和 JSF2,以细菌通用引物 27F(5'-AGAG TTTGATCCTGG CTCAG-3') 结合 Bd1007R,及 Bd529F 结合细菌通用引物 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 分别扩增,阴性对照模板为宿主菌 zou30 的基因组 DNA,扩增程序同“1.5 PCR 检测”。PCR 产物由上海生工公司完成测序,再拼接完整。通过 NCBI BLAST 程序从 GenBank 中调出同源性最高序列,并选取蛭弧菌科不同类群 1 000 bp 以上的代表性菌株或克隆子 16S rRNA 基因序列<sup>[2,6]</sup>,以噬菌弧菌科模式菌株海洋噬菌弧菌(*B. marinus*) SJ (AF084854) 为外类群,通过 MEGA 4.0 软件<sup>[7]</sup>以 ClustalW 进行序列比对,以 Kimura-2 模型估算系统进化矩阵,采用邻接法(neighbor joining)法构建蛭弧菌科系统进化树,并自举(bootstrap) 1000 次分析来评估进化树的拓扑稳定性。

## 2 结果

### 2.1 样品理化指标和异养细菌含量

外观上,除样品 SD 淡黄色浑浊和 SX 无色微浑浊外,其它液体样品均呈无色、透明状;固体样品 JSC 则为白色粉末状。各样品盐度、pH 和异养细菌含量的检测结果见表 1。

### 2.2 优势异养细菌的分离

从计数异养细菌的平板上,根据菌落特征分离纯化各样品代表性优势菌,革兰氏染色表明,JSB、JSC 和 SX3 个样品所有优势异养细菌均为革兰氏阳性菌,且最优势分离物均为芽孢杆菌,其中 JSC 完全由单一的芽孢杆菌组成。其余 5 个样品, JSA、JSD、JSE、JSF 和 SD 的优势分离物均为革兰氏阴性菌,最优势代表菌株分别编号为 JSA-H1、JSD-H1、JSE-H1、JSF-H1 和 SD-H1。

### 2.3 噬斑含量和宿主裂解范围检测

仅 JSA 和 JSF 两个样品在双层平板上被检出噬斑(表 2)。JSA 样品在各宿主平板上 3 d 后开始出现略凹陷状的透明圆斑,随后噬斑不断扩大。5 种宿主菌计数的 JSA 噬斑含量比较接近,但都不超过 10<sup>4</sup> PFU/mL,远低于其包装上的标识数量。不同宿主菌检测 JSF 的结果则明显不同,其中 zou30 为宿主的双层板上形成的噬斑最多,且

包含两种大小明显不同的噬斑,其中小斑数量占绝对优势,3 d 后才可见,而大斑 2 d 时直径就达到 2 mm 左右,且扩大速度也明显快于小斑的;AH1 平板上也形成较多小斑,但计数结果较 zou30 的约少一个数量级,而且没有出现大斑;zouB 平板上形成的均为大斑,测得的噬斑数也与 zou30 计数的大斑含量相近;zouAS 平板和优势菌 JSF-H1 平板上也只出现大斑,但数量明显小于 zou30 或 zouB 的计数结果。

分别从计数样品 JSA 的 zou30、AH1、zouB、zouAS 和 JSA-H1 为宿主的双层平板上各挑一个代表性噬斑,用相应的宿主双层平板纯化为二元培养物,编号分别为 JSA1、JSA2、JSA3、JSA4 和 JSA5。从计数 JSF 的 zou30 平板上挑大斑和小斑各一个,纯化后分别编号为

JSF1 和 JSF2;从 AH1、zouB、zouAS 和 JSF-H1 平板上各挑一个噬斑,分别编号为 JSF3、JSF4、JSF5 和 JSF6。

JSA 样品噬斑分离物在测试的所有宿主双层平板上均可形成裂解圈,表明这些分离物对宿主范围选择性弱,且可能为同一种菌(表 3)。而 JSF 样品噬斑分离物中,zouA30 和 AH1 为宿主的小斑分离物 JSF2 和 JSF3 具有相同的宿主裂解模式,而四种不同宿主菌的大斑分离物也具有相同的宿主裂解范围,但不同于小斑分离物。其中所有大斑分离物仅对 AH1 不能裂解,而小斑分离物则对 zouB、zouAS 和 JSF-H1 都不能裂解。斑的形态和宿主裂解试验均表明 JSF 中可能至少存在两种不同类型的 BALOs。

表 3 噬斑分离物的宿主范围  
Tab.3 Prey range of plaque isolates

噬斑分离物(分离用的宿主菌) plaque isolates (prey used for isolation)	宿主菌 prey bacteriazou30					
	zou30	AH1	zouB	zouAS	JSA-H1	JSF-H1
JSA1 (zou30)	+	+	+	+	+	+
JSA2 (AH1)	+	+	+	+	+	+
JSA3 (zouB)	+	+	+	+	+	+
JSA4 (zouAS)	+	+	+	+	+	+
JSA5 (JSA-H1)	+	+	+	+	+	+
JSF1 (zou30)	+	-	+	+	+	+
JSF2 (zou30)	+	+	-	-	+	-
JSF3 (AH1)	+	+	-	-	+	-
JSF4 (zouB)	+	-	+	+	+	+
JSF5 (zouAS)	+	-	+	+	+	+
JSF6 (JSF-H1)	+	-	+	+	+	+

注:“+”阳性“-”阴性  
Notes: “+” Positive,“-”Negative

#### 2.4 BALOs 制剂及其噬斑分离物的分子检测

3 对靶向不同类群 BALOs 特异引物的检测表明,仅 JSA 和 JSF 两个样品 DNA 可被蛭弧菌科引物扩增出约 500 bp 的特异带(图 1),而另两对引物除阳性对照被扩出约 800 bp 目的带外,所有样品检测结果均为阴性。样品 JSF 中纯化的 6 株大、小斑分离物基因组 DNA 都可被蛭弧菌科引物特异扩增,进一步证实样品 JSF 中具有存活的蛭弧菌细胞;但以 JSA 中纯化的 5 株噬斑分离物的 DNA 为模板时,3 对引物均不能从中扩增出阳性结果,表明 JSA 样品中检测到的噬斑可能为非 BALOs 斑或属于还未知的 BALOs。

#### 2.5 16S rRNA 基因序列分析

细菌通用引物结合蛭弧菌科特异引物对样品 JSF 两种噬斑分离物的 PCR 扩增结果如图 2 所示,两对组合后的引物均扩增出约 1 000 bp 目的带。JSF1 和 JSF2 扩增产物测序拼接后的长度分别为 1 421 bp 和 1 405 bp,GenBank 登录号分别为 EU884925 和 EU884926。NCBI BLAST 分析表明两者都与蛭弧菌科相关序列最相似。根据蛭弧菌科 16S rRNA 基因序列系统进化树(图 3),JSF1、JSF2 分别与蛭弧菌科类群 1 即噬菌蛭弧菌和尚未定种的类群 5 亲缘关系最为接近,相似性分别为 99% 和 98% 以上。该结果进一步证实 JSF

样品中含有两种可检测到的存活蛭弧菌。

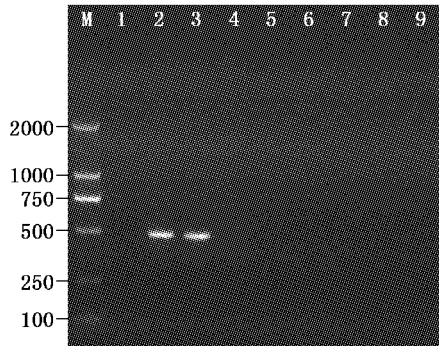


图1 蛭弧菌科特异引物对蛭弧菌类生物制剂的PCR检测

M: DL2000 DNA 标准; 1-9: 阴性对照, JSA, JSF, JSB, JSC, JSD, JSE, SD, SX

Fig.1 PCR identification of BALOs preparations by *Bdellovibrionaceae*-specific primers

M: DL2000 DNA marker; 1-9: negative control, JSA, JSF, JSB, JSC, JSD, JSE, SD and SX

### 3 讨论

养殖病害一直是制约水产养殖业持续健康发展的瓶颈之一,仅2004年我国监测到的水产病害损失就达151亿元。随着对水产品安全要求的提高和对耐药菌株危害的重视,以化学疗法为特征的抗生素防治手段正在世界范围内逐渐被禁用和取缔,符合环境友好和可持续发展的生态防治技术则是当前和今后水产养殖病害最有希望的发展方向之一,而微生物则在其中扮演着最重要的角色<sup>[8]</sup>。特别是近年来随着微生物制剂(益生菌)在水产养殖中广泛应用并取得显著效果<sup>[8]</sup>,水产微生物制剂市场方兴未艾,各种产品层出不穷。其中BALOs制剂则是最近几年国内发展较迅速的水产微生物制剂之一,在华南沿海对虾养殖业较集中的地区已较广泛销售和一定程度使用,但相关产品的质量如何却未见有明确报道。

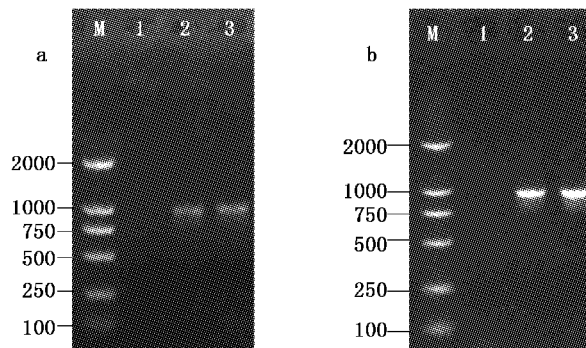


图2 细菌通用引物和蛭弧菌科特异引物对菌株JSF1和JSF2的PCR扩增

a: 引物27F和Bd1007R PCR扩增; b: 引物Bd529F和1492R PCR扩增

M: DL2000 DNA 标准; 1-3: 阴性对照, JSF1, JSF2

Fig.2 PCR amplification of strains JSF1 and JSF2 by universal bacterial primers and *Bdellovibrionaceae*-specific primers

a: PCR amplification with primers 27F and Bd1007R; b: PCR amplification with primers Bd529F and 1492R

M: DL2000 DNA marker; 1-3: negative control, JSF1 and JSF2

双层平板法一直是分离和计数BALOs的最经典方法,对于淡水或陆生来源BALOs通常使用大肠杆菌等为宿主的DNB双层平板,而对海洋或嗜盐BALOs,则多用弧菌特别是副溶血弧菌为宿主的海水双层平板<sup>[1]</sup>。由于BALOs对不同细菌具有一定的裂解差异,即使对能裂解的不同宿主菌也存在差异性捕食<sup>[9]</sup>,可导致不同宿主菌检测的BALOs类型和含量存在或多或少的差异。为尽可能检测出样品中的BALOs,本研究分别采

用以大肠杆菌和嗜水气单胞菌为宿主的DNB双层平板,以副溶血弧菌和温和气单胞菌为宿主的海水双层平板,以检测其中可能存在的不同类型BALOs。考虑到BALOs通常以专性寄生方式生活,另以各产品中分离的最优势革兰氏阴性菌(可能是相应制剂BALOs的适合宿主菌)为宿主检测相关产品。本研究对样品JSF的噬斑计数和宿主范围测试证实了不同宿主菌检测结果存在明显差别(表2,表3),和应用多种宿主菌检测样品

的必要性。5 种不同细菌对样品 JSA 噬斑计数结果相近(表 2)且斑的形态也一致,以及从不同宿主菌平板中纯化的噬斑分离物具有相同的宿主裂解模式(表 3),表明这些噬斑分离物可能是宿主

范围广且对不同宿主菌裂解差异不明显的 BALOs,也可能是通过分泌胞外酶等方式降解宿主菌而形成噬斑的某种非 BALOs 细菌。

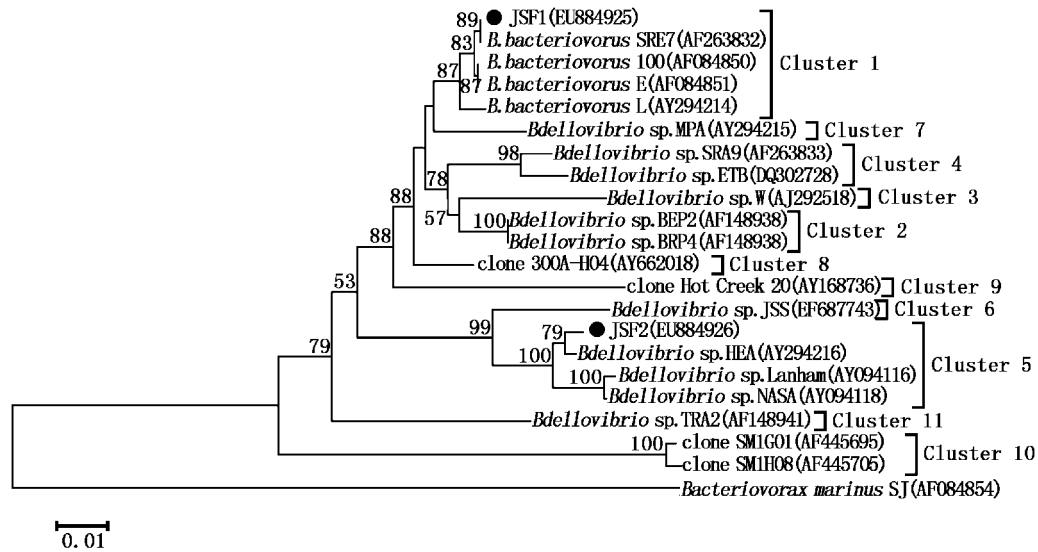


图 3 蛭弧菌科 16S rRNA 基因序列系统进化树

分支旁的数字为 Bootstrap 超过 50% 的置信值; 标尺表示 1% 的核苷酸序列差异

Fig. 3 Phylogenetic tree of Bdellovibrionaceae based on the 16S rRNA gene sequences

Numbers at branch points indicate Bootstrap values above 50%; Bar corresponds to 1% sequence divergence

由于检测用的宿主菌并不能保证可被样品中所有未知 BALOs 裂解和在双层平板上形成可见噬斑,对因贮存于人工环境可能导致裂解能力下降甚至死亡的 BALOs,更难以或无法被传统方法检测出。为补充双层平板法的不足,本研究以 BALOs 特异引物检测各样品及其噬斑分离物。对样品 JSA 和 JSF 的 PCR 检测结果(图 1)证实两者都含有蛭弧菌。但对 JSA 样品,5 种宿主菌的噬斑分离物检测结果均为阴性,一方面证实检测到的噬斑为非 BALOs 形成的(另根据其液体培养物的 0.45  $\mu\text{m}$  滤液不具有裂解性进一步确证),可能被相关厂家也当作某种 BALOs;另一方面也表明样品中原有的蛭弧菌可能已死亡,或者仍不能被本研究采用的多种宿主菌双层平板检测到。

根据 16S rRNA 基因序列同源性,蛭弧菌科目前包括 11 个系统群,其中发现最早和研究最多的噬菌蛭弧菌所在的群 1,是分类上唯一确定种名的类群<sup>[2, 6]</sup>。16S rRNA 基因序列系统分析表明样品 JSF 中分离的两种类型噬斑分离物,JSF1

和 JSF2,分别属于类群 1 和类群 5 的蛭弧菌(图 3)。蛭弧菌属于非嗜盐的 BALOs,在陆生或淡水环境中普遍存在,但至今还没有从海水或盐分较高的其它环境中分离到<sup>[2, 10]</sup>。这表明蛭弧菌在淡水环境中可能发挥其生物防治或水质净化的功效,但难以很好地适应海水环境。目前所有已知海水或嗜盐 BALOs 均属于噬菌蛭弧菌科成员<sup>[2, 10]</sup>,遗憾的是所有样品中均未检测到其存在。而且对各液体样品所测盐度(表 1)可知,除样品 JSA 和 SD 具有较低的盐度可能适合某些嗜盐性较低的 BALOs 生存外,其余样品的盐度几乎可忽略不计,不太可能维持嗜盐 BALOs 活性。然而,本研究检测的 8 种 BALOs 制剂中除 JSC 未明确使用对象外,其余均标明主要适用于对虾等水产养殖动物细菌性病害的控制和水质改良,而且几乎针对海水对虾养殖。

当然,未检测到 BALOs 的样品,并不表明其最初生产时没有使用相关菌种,或者在水产养殖环境中没有功效。一种可能的情况是,某些产品最初确实含有活性的 BALOs 细胞,甚至可以达到

其包装上的标识含量,但所用的生产工艺或保存液配方可能并不适合相关菌株较长时间维持较高的存活数,特别是几乎所有制剂中均含有大量异养细菌(表1),可能通过拮抗、竞争等方式减少或消除 BALOs 细胞甚至降解其 DNA,尽管其中某些革兰氏阴性菌也可能作为宿主一定程度上维持了 BALOs 存活。另一种更可能的情况是某些产品中含有对水产养殖动物或养殖水体有益的其它微生物,而不是 BALOs,只是某些企业为获取更大利润在包装上声称是 BALOs 制剂。这从样品 JSB、JSC 和 SX 中分离到的最优势异养细菌都是芽孢杆菌,其中 JSC 完全是由单一的芽孢杆菌构成可说明,而芽孢杆菌则是目前水产养殖中应用最多和广泛证实有一定效果的微生物制剂之一<sup>[8,11]</sup>。

本研究通过经典的双层平板法结合 PCR 基础的分子检测法对 8 个厂家生产的水产养殖用 BALOs 制剂检测结果表明,绝大多数被检产品质量不合格,名不副实,根本不存在 BALOs。即使唯一被证实与其标识符合的样品 JSF,其中的菌种也不适于海水养殖环境。因此,为保护广大养殖户利益,亟需有关部门加强对相关产品的市场监管。同时,相关产品的研发和生产需要更多建立在对 BALOs 的基础研究上,特别是有关的生理和生态学方面。

#### 参考文献:

- [1] Jurkevitch E. Predatory prokaryotes: biology, ecology and evolution [M]. Berlin: Springer, 2007.
- [2] Davidov Y, Jurkevitch E. Diversity and evolution of *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALOs), reclassification of *Bacteriovorax starrii* as *Peredibacter starrii* gen. nov., comb. nov., and description of the *Bacteriovorax-Peredibacter* clade as *Bacteriovoracaceae* fam. nov. [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(5):1439-1452.
- [3] 杨先乐,曹海鹏,钱云云. 噬菌蛭弧菌—水产动物病害生物防治的新工具[J]. *淡水渔业*, 2006, 36(2): 55-60.
- [4] Jurkevitch E, Minz D, Ramati B, et al. 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.
- [5] Pineiro S A, Sahaniuk G E, Romberg E, et al. Predation pattern and phylogenetic analysis of *Bdellovibrionaceae* from the Great Salt Lake, Utah [J]. *Current Microbiology*, 2004, 48(2): 113-117.
- [6] Davidov Y, Friedjung A, Jurkevitch E. Structure analysis of a soil community of predatory bacteria using culture-dependent and culture-independent methods reveals a hitherto undetected diversity of *Bdellovibrio*-and-like organisms [J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(9): 1667-1673.
- [7] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24:1596-1599.
- [8] Balcázar J L, Blas I, Ruiz I, et al. The role of probiotics in aquaculture [J]. *Veterinary Microbiology*, 2006, 114(3-4): 173-186.
- [9] Rogosky A M, Moak P L, Emmert E A B. Differential predation by *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J [J]. *Current Microbiology*, 2006, 52(2): 81-85.
- [10] Pineiro S A, Stine O C, Chauhan A, et al. Global survey of diversity among environmental saltwater *Bacteriovoracaceae* [J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(10): 2441-2450.
- [11] 温崇庆,赖心田,何红,等. 两株对虾育苗用益生芽孢杆菌的筛选和鉴定[J]. *水生生物学报*, 2007, 31(4): 453-459.

## The detection of *Bdellovibrio*-and-like organisms in commercial preparations used for aquaculture

WEN Chong-qing<sup>1,2</sup>, XUE Ming<sup>1</sup>, ZHANG Jin-yan<sup>3</sup>, HUANG Yu<sup>1</sup>, ZHOU Shi-ning<sup>2</sup>

(1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China;

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

3. Guangdong Lubaiduo Biotechnology Co., Ltd, Zhanjiang 524022, China)

**Abstract:** *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALOs) are predatory bacteria and have potential for biocontrol of pathogenic bacteria. In order to provide scientific reference for study, application and market supervision of the BALOs preparations, this study was to evaluate the quality of commercial BALOs preparations used for aquaculture. Using double layer agar technique, the plaques contents of BALOs preparations manufactured by eight companies was counted with different bacteria as preys, and the prey range of plaque isolates were tested. The preparations and the plaque isolates were also identified by PCR with three pairs of taxon-specific primers targeting various BALOs groups. The 16S rRNA genes of two representative *Bdellovibrionaceae* isolates were sequenced and compared with that of related sequences, and the phylogenetic tree of *Bdellovibrionaceae* was constructed based on genetic distance analysis. The results showed that most of the BALOs preparations being examined were not qualified, only two of the eight preparations gained positive amplification by *Bdellovibrionaceae* primers, and showed visible plaques on the double layer agar. One of the two *Bdellovibrionaceae* positive preparations, JSF, had two kinds of plaque isolates with different morphologies and prey patterns, and significant differences were found when counted with different preys. About 1.4 kb 16S rRNA genes were sequenced and deposited in the GenBank with accession numbers EU884925 and EU884926 for the two kinds of plaque isolates, JSF1 and JSF2, respectively. Based on the phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences, JSF1 and JSF2 were affiliated with cluster 1 (*B. bacteriovorus*) and cluster 5 (the species undefined) respectively in *Bdellovibrionaceae*. However, the plaque isolates of the other preparation contained no BALOs.

**Key words:** aquaculture; *Bdellovibrio*-and-like organisms; microbial preparation; detection; 16S rRNA gene