讲 座

噬菌蛭弧菌生物特性研究进展

秦生巨 李莉

(江苏省卫生防疫站中国医学细菌中心弧菌噬菌体专业实验室,南京)

提 要

本文介绍了噬菌蛭弧菌的培养特性,温度对噬菌蛭弧菌的影响,噬菌蛭弧菌的生化特征,感染宿主的机制,在死的宿主菌中生长的特性,宿主的特异性以及噬菌蛭弧菌对致病菌的生物净化作用等生物特性的研究进展。研究认为,噬菌蛭弧菌是自然环境(水、土壤)中致病微生物的生物拮抗体,且极有可能利用它的寄生和溶解宿主菌细胞的特殊性,对环境水体的生物净化。

一、前 言

噬菌蛭弧菌 (Bdellovibrio bacteriovorus,以下简称蛭弧菌)是 Stolp 等 1962 年发现的一类寄生性细菌[1]。它比一般细菌小,有似细菌噬菌体的作用,但不是病毒,具有细菌的特性。能通过细菌滤过器。

"寄生"和"裂解"细菌是蛭弧菌独特的特性,这一生物学特性引起了人们极大的兴趣和关注。20 多年来,国外许多实验室在对蛭弧菌进行研究。1982 年,司稞东、秦生巨等在国内首次报道了对这类菌的研究。近年来,作者在利用蛭弧菌消除环境水源中某些肠道致病菌方面做了许多探索,现已证明蛭弧菌对实验条件和模拟自然条件的河、湖水中的致病性大肠杆菌、福氏志贺氏痢疾杆菌、霍乱弧菌、大肠菌群、细菌总数等有显著的净化作用。目前,蛭弧菌被认为是环境水体中致病微生物自然净化的极为重要的生物因子之一[2-5]。本文就有关蛭弧菌生物特性方面的研究进展介绍如下。

二、蛭弧菌性状

1. 蛭弧菌培养特性[5,6]

蛭弧菌在灭菌自来水等数十种琼脂平板上均可形成噬斑,在自来水、矿泉水琼脂上很少有其他细菌生长,形成的噬斑最为清晰。用胨肉膏琼脂培养蛭弧菌,绝大多数不能检出噬斑。而在自来水双层琼脂平板上噬斑发育良好,分布均匀,操作亦简便。蛭弧菌在含有特定宿主菌的平板上,于 25℃ 培养 48 小时后形成肉眼可见的透明噬斑,无菌落形成。不同菌株的蛭弧菌,噬斑的形态大小也不相同,大的直径可超过 15 mm,小的直径约为 0.5 mm,而且可随培养时间的延长而扩展,直至宿主菌耗尽。

蛭弧菌生长要求的 pH 为 3.0—9.8,最适值为 7.2—7.6;温度为 4—37℃,最适温度为 25—30℃,极少数菌株的最适温度为37℃。40℃ 时则不能生长,50℃ 30 分钟均失活。可在热死的宿主菌中生长繁殖,在死的宿主菌上生长增殖的蛭弧菌,如果再回到活的宿主菌上增殖,仍可恢复在活菌上生长增殖的特性。

2. 温度对蛭弧菌的影响[6,7]

蛭弧菌生长的温度为 4—37℃。司稞东等 (1982)分离的 7 株蛭弧菌在 4℃ 中培育都形成了噬斑,但形成噬斑的时间都在 14 天以上。在 37℃ 中培育,Bd59 更为合适,但约有 1/3 的

蛭弧菌株不形成噬斑。大多数菌株形成噬斑的最适温度为25—30℃。进一步观察证明蛭弧菌活力对温度同样很敏感，若25℃培育30分钟，蛭弧菌的活菌数目为100%，40℃ 30分钟时则减少到42.1%—53.7%，50℃ 30分钟时则减少到0。

温度还对蛭弧菌参加污水净化有一定的影响，水温在26℃或33.5℃时净化率可相应地提高。蛭弧菌在25℃灭菌能使湖水中10^7个/ml大肠杆菌在24—27天后减少到0；7天后福氏志贺氏痢疾杆菌减少92.8%—97.4%；18—24天后霍乱弧菌也由10^6个/ml减少到0。因此，了解温度对蛭弧菌的影响，对进一步研究它的分布特性及其对其它病原菌的生物控制是十分重要的。

3. 蛭弧菌的生化特征[3,6,8-10]

蛭弧菌能使明胶液化，在综合培养基上需气生长，产生黄色色素及细胞色素a、b、c，还能产生各种酶类。如Bd6-5-S能产生胞外酶，诱导损伤宿主细胞的溶解和消化，它和Bd100，Bd109，BdA3·12等在蛇螺菌VHL细胞悬液中也能产生蛋白酶，Bd6-5-S还可以产生一种脂酶，迫使细胞壁降解，并可利用宿主细胞中的内含物。

蛭弧菌的细胞壁含有胞壁酸和葡糖胺，还有13种氨基酸，这些物质同其他细菌细胞壁成分相类似。在腐生的蛭弧菌株中分离到核糖及rRNA，Bd6-5-S在蛇螺菌中繁殖，则产生含有氨基糖和可溶性胞壁酸的亚微粒子。

蛭弧菌的蛋白质含量较丰富，可达干重的60—65%，DNA的含量为5%，含有典型的嘌呤和嘧啶，DNA的G＋C比例，大部分蛭弧菌株为50.2±0.8—50.8 ±0.9克分子%（浮力密度法），兼性寄生性蛭弧菌DNA的G＋C比例较低，为42.7±1.0—42.8±0.9克分子%。在蛭弧菌BdA3·12和Bd109中发现脱氧胞苷酸，尿苷酸、胞苷酸、核糖、腺嘌呤和鸟嘌呤，Bduki2含有磷脂，这些物质是在其生命中不可缺少的组成成分。到目前为止，除了蛭弧菌DNA的基因位置以及装配结构尚不清楚外，还未发现蛭弧菌DNA结构或成分的特殊性。

三、蛭弧菌在宿主体内的生长特性

1. 蛭弧菌感染宿主的机制

开始时蛭弧菌与宿主细胞激烈碰撞，以没有鞭毛的一端直接吸附到宿主细胞上，菌体转动速率可超过100 r/s，在此之后，蛭弧菌通过宿主细胞壁的细孔（附着位点）进到细胞壁和细胞膜之间，或直接进入细胞质中。侵入过程非常快，几秒钟即可完成。蛭弧菌进入宿主细胞后，形态发生了一系列变化，匀称地进行复分裂的裂解，分裂成许多带鞭毛的个体——子代细胞，完成这一繁殖的全过程约需要4—6小时。这时随着细胞增殖和某些酶的产生，宿主细胞壁裂解，蛭弧菌子代细胞同时被释放出来，这样就完成了它的整个生活周期。

蛭弧菌在侵入宿主细胞的过程中，可能需要寄生菌的酶解作用，蛭弧菌可以释放蛋白酶，脂肪酶，以及一种类似溶菌酶的胞壁酸酶。此外，吸附蛭弧菌的宿主菌细胞内三磷酸腺苷含量下降了90%左右，使细胞膜受到损伤，改变了膜的通透性，使细胞内三磷酸腺苷漏出。另一方面，蛭弧菌的快速翻转对于穿入过程也可能产生一种机械的钻孔作用。宿主细胞上出现的细孔直径比寄生菌小，因此，寄生菌在钻入过程中必须收缩。

2. 蛭弧菌在死的宿主菌中的生长特性[6,11]

秦生巨等发现蛭弧菌不但可以在热死（100℃、80℃ 15分钟）或三氯甲烷处理失活的宿主菌中生长繁殖，而且在加热致死的宿主琼脂平板上检查出噬斑，可比在活菌上形成噬斑更快，数目更多，约为活菌上形成噬斑数目的67—151倍。用三氯甲烷处理失活的宿主菌得到同样的结果。在100℃ 15分钟致死的宿主菌自来水培养液中也可更迅速的生长繁殖，使增殖高峰提前，生长繁殖的数目增加，约为活菌上增殖的35—265倍。

在失活宿主细胞上增殖生长以后的子代蛭弧菌，若接种到活的宿主琼脂平板上可以回复在活菌细胞上的生长特性，仍可形成噬斑。

蛭弧菌在死的宿主菌中生长的机理尚不清楚，有人推测，可能是加热或三氯甲烷处理宿主菌，破坏了宿主细胞中能抑制寄生菌侵入的活性物质，或使活菌中的这类活性物质失活。

四、蛭弧菌对宿主的特异性[3—6,12]

蛭弧菌是一类专门以捕食细菌为生的寄生物，它可同时裂解不同科属的革兰氏阴性菌的大部分，一些菌株可以裂解革兰氏阳性菌，钩端螺旋体，部分蛭弧菌对病毒也有较强的破坏力。蛭弧菌对沙门氏菌属，志贺氏菌属，埃希氏菌属，假单胞菌属，欧文氏菌属，变形杆菌属，弧菌属均有很高的裂解活性，特别是对沙门氏菌属和志贺氏菌属。

蛭弧菌对植物病原菌同样有广泛的侵染力，如大豆疫假单胞菌，水稻白叶枯病黄单胞菌，柑橘溃疡病黄单胞菌，桑卷叶病菌，番茄溃疡病菌和白菜软腐病菌等有较强的感染力。秦生巨还报道，蛭弧菌对水生物致病菌也有裂解作用，如蛭弧菌对生产珍珠的河蚌致病菌裂解率可高达 90%。蛭弧菌还对某些病毒，钩端螺旋体以及某些藻类也具有寄生或侵染作用。

五、蛭弧菌的生物净化作用[2,13—17]

在灭菌湖水中蛭弧菌对浓度为 5.0×10^6—8.0×10^6 个/ml ElTor 霍乱弧菌有除菌作用，25℃ 条件下，经 18—24 天可使霍乱弧菌全部消失。相同时间内不加蛭弧菌的对照组仅减少到 2000个/ml。随着蛭弧菌与宿主菌投入比的增加，霍乱弧菌被清除的速度也相应增快。

Venosa 检查 5 株蛭弧菌在模拟自然环境的河水中对 6 株浮游球衣菌的裂解作用。结果，在 15—18 小时后，5 株蛭弧菌对 6 株浮游球衣菌均有不同程度的裂解作用。对照组检查结果表明，在培养期内未见浮游球衣菌的自溶或变形等现象。

秦生巨等以蛭弧菌 Bd 81 在灭菌湖水中进行净化试验证明，当水体中加入的蛭弧菌数量为 60—6600 pfu/ml 时，于 25℃ 条件下，能使浓度为 2.3×10^7—3.6×10^7 个/ml 的大肠杆菌逐日减少，随着蛭弧菌与大肠杆菌投入比的增加，大肠杆菌被清除的速度也增快，24—27 天后全部消失，而对照组仍含有大肠杆菌 1000 个/ml 以上。

司稚东等报道，蛭弧菌 Bd 81 和 Bd 98 可以清除在灭菌湖水中的福氏志贺氏痢疾杆菌。试验证明，湖水中原含痢疾杆菌 2500 个/ml，7 天后，被清除 92.8%（Bd81），或 97.4%（Bd98）。对照仅减少 20%。

秦生巨和司稚东在较大体积的不加任何处理的自然河水（pH 8.24）中，于露天（瓷缸）的自然环境条件下和室温（塑料桶）中观察了蛭弧菌对 ElTor 霍乱弧菌的清除作用。6 天后加有蛭弧菌和 ElTor 霍乱弧菌的试验组河水澄清透明，而仅加有 ElTor 霍乱弧菌的对照组河水到第 13 天实验终了时仍呈混浊。活菌计数结果表明，9 天后加有蛭弧菌的露天缸试验组 ElTor 霍乱弧菌由 2.5×10^7 个/ml 减少到363 个/ml，而未加蛭弧菌的对照组仅由 1.7×10^7 个/ml 减少到 2.0×10^4 个/ml；室内桶水的试验组，则由 5.8×10^7 个/ml 减少到 20 个/ml，而对照组由 2.1×10^7 个/ml 仅减少到 3700 个/ml。13 天后，露天缸试验组 ElTor 霍乱弧菌减少到 50 个/ml，而对照组为 1800 个/ml；室内桶试验组，第 11 天即减少到 0，而对照组仍有 1200 个/ml。

Scherff 等实验观察了蛭弧菌 Bd17、Bd19 和 Bd10 对大豆叶表面大豆假单胞菌的杀灭作用。结果发现蛭弧菌 Bd17 接种在 10—14 天大豆幼苗叶子的表面，能有效地抑制大豆假单胞菌引起的大豆枯萎病的发展。Bd19 有中等效果，Bd10 效果不明显。据推测这种差别可能与各蛭弧菌的裂解能力以及蛭弧菌与宿主大豆假单胞菌的比率有关系。

六、结束语

蛭弧菌的发现至今已 26 年了，发表的文章近 500 篇，研究者对它的分类学、生物学、生理学、生态学以及蛭弧菌净化水源等方面进行了大量的研究工作，它在环境水体中对某些肠道

病菌的清除作用亦已得到实验证实，许多研究者均认为用之于净化环境水体中较常见的革兰氏阴性细菌和用于防治环境污染给人类带来的危害是极有可能的。目前，我国对蛭弧菌的研究动向，一是努力将蛭弧菌由模拟自然条件的河水中净化致病菌过渡到应用于自然环境水源中净化水体，改善水源，保护环境，控制或减少肠道传染病的发生和流行，保护人群健康。二是专家们呼吁进一步研究蛭弧菌在生物防治中的作用，扩大蛭弧菌研究范围等。我国科研人员也正在沿着这两个方面深入研究。

参 考 文 献

[1] Stolp H. et al.: *Phytopathol.z*, 1962. **45**, 364.
[2] 秦生巨: «消毒与灭菌», 1987, **4**(2), 92。
[3] Starr M. et al.: *Adv. in microbiol. physiol.*, 1972, 8, 215.
[4] 秦生巨: 环境与健康杂志», 1988, **5**(3), 48。
[5] 司穉东、秦生巨: «中华微生物学和免疫学杂志», 1982, **2**(1), 12。
[6] 秦生巨: «微生物学通报», 1987, **14**(4), 184。
[7] 戴华生: «环境微生物学», 江西教育出版社, 1985, 408。
[8] 罗明典: «应用微生物», 1980, **4**, 29。
[9] Rosson R.et al.: *J. bacteriol.*, 1981, **146**(1), 108.
[10] Rosson R.et al.: *J. bacteriol.*, 1979, **145**(5), 620.
[11] 司穉东、秦生巨: «卫生防疫资料汇编» (腹泻病专辑), 江苏省卫生防疫站, 1986, 143。
[12] 钱伯钦译: «国外医学», 微生物学分册, 1980, **6**, 264。
[13] Venosa D.: *Appl. Microbiol.*, 1975, **29**(5), 702.
[14] Scherff R.: *Phytothology*, 1973, **63**, 400.
[15] 秦生巨等: «消毒与灭菌», 1988, **5**, (1), 17。
[16] Москвитина: *ЭАИЛ: ЖМЭ* 1979, **5**, 3.
[17] 秦生巨等: «消毒与灭菌», 1988, **5**(3), 135。

[本文于 1988 年 7 月 8 日收到]

(上接第441页)

有丝分裂和光反应等有关[17]。这些研究结果鼓励人们去研究生长素、毒素对质子泵的直接调节作用。初步结果表明：生长素增加质子泵对 ATP 的亲和力，质子泵的作用直接引起细胞内含物含量的变化[17,18]。质子或其它离子跨膜电化学梯度的变化可能是一个信号，或者是导致一系列生理生化变化过程的一个步骤。总之在膜 H^+-ATPase 的质子泵功能与植物生长、发育的关系中，有许多问题值得深入研究。

参 考 文 献

[1] Giaquinta, R. T.: *Ann. Rev. Plant Physiol*, 1983, **34**, 347.
[2] Sze, H.: Physiol. *Plant*, 1984, **61**, 683.
[3] Blumwald, E.: *Physiol. Plant.*, 1987, **69**, 731.
[4] Hodges, T. K.: *Adv. Agron.*, 1973, **25**, 163.
[5] Tazawa, M. et al.: *Top. Membr. Transp.*, 1982, **16**, 49.
[6] Wang, Y. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1985, **26**, 10434.
[7] Sze, H.: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 1985, **36**, 175.
[8] Sze, H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, **77**, 5904.
[9] Rosen, B. P.: *Methods Enzymol.*, 1979, **56**, 233.
[10] Rottenberg, H.: *Methods Enzymol.*, 1979, **55**, 547.
[11] Lee, H. C. et al.: *Intracellular pH: Its Measurement, Regulation and Utilization in Cellular Functions*, Alan R. Liss, New York, 1982, 136—158.
[12] Larsson, C. et al.: *FEBS Lett.*, 1984, **171**, 271.
[13] Bennett, A. B. et al.: *J. Membr. Biol.*, 1983, **71**, 95.
[14] Serrano, R.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, **121**, 735.
[15] Cocucci, M. C. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 1984, **771**, 42.
[16] Randall, S. K. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1987, **262**, 7135.
[17] Kimber, A. et al.: *Plant Physiol.*, 1984, **74**, 804.
[18] Zocchi, G. et al.: *Plant Cell Environ.*, 1983, 203.
[19] Alberts, B. et al.: *Molecular Biol. of The Cell*, Garland Publishing, Inc., New York & London, 1983, 288.

[本文于1988年4月22日收到]