

文章编号: 1004-7271(2008)06-0714-07

## 噬菌蛭弧菌 BDF-H16 长期简易保藏方法研究

邓璐, 杨先乐, 李圆圆, 李怡, 曹海鹏, 胡琨

(上海高校水产养殖学 E-研究院, 上海海洋大学农业部渔业动植物病原库, 上海 201306)

**摘要:** 实验使用自来水双层检测法与平板计数法, 研究了不同的保护液、保藏温度和保藏载体的选择对蛭弧菌长期保藏的影响, 以及对优化保藏条件下的蛭弧菌复苏率和复苏蛭弧菌的噬菌能力检测, 并且对保藏期限内宿主菌的存活情况与蛭弧菌的存活情况的相互影响做了首次的报道。结果表明: 以 1/100 NB 等低营养液体为保护液、琼脂为载体、加入适量宿主菌于 4 °C, 蛭弧菌保存可达 2 年以上, 保存期内蛭弧菌的复苏率和出斑数目较对照组都有极其显著的提高 ( $P < 0.01$ )。宿主菌与蛭弧菌浓度在保藏期内呈下降趋势, 在宿主菌浓度下降到  $10^6$  cfu/mL 之前, 蛭弧菌浓度下降至  $10^3$  pfu/mL; 在宿主菌的浓度下降到  $10^4$  cfu/mL 之后, 蛭弧菌的数目下降至  $1.0 \times 10^2$  pfu/mL。实验结束时, 二元保藏中宿主菌/蛭弧菌浓度比保持在  $10^4/10^2$ 。

**关键词:** 噬菌蛭弧菌; 宿主菌; 优化保藏; 复苏率; 噬菌能力

中图分类号: S 917.1 文献标识码: A

## Highly effective simple preservation method research for *Bdellovibrio bacteriovorus* BDF-H16

DENG Lu, YANG Xian-le, LI Yuan-yuan, LI Yi, CAO Hai-peng, HU Kun

(E-Institute of Shanghai Municipal Education Commission, Aquatic Pathogen

Collection Center of Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Enumeration of bdellovibrios was conducted by determination of plaque-forming units (PFU) and *E. coli* cells was determined by counting colony-forming units (CFU). The article has mainly considered the different protection fluids, the preservation temperature and the preservation carrier choice to the *Bdellovibrio bacteriovorus* long-term preservation influence. The anabiosis rate of the *Bdellovibrio bacteriovorus* under the optimization preservation condition and the bacteriolysis of them were compared. It is the first time to report that the host survival situation in the preserved time and the influence between the host and the *Bdellovibrio bacteriovorus*. The result indicated that: using the low nutrition liquid like 1/100 NB, agar-agar for the carrier and adding the right amount of host to preservation at 4 °C. The preservation time may amount to above two years. The anabiosis rate and pfu numbers of Bd have the extremely remarkable enhancement in the storage ( $P < 0.01$ ). The magnitude of the *E. coli* cells and the *Bdellovibrio bacteriovorus* assumes the drop tendency in the storage period. Before the magnitude of the *E. coli* cells falls to  $10^6$  cfu/mL, the magnitude of *Bdellovibrio bacteriovorus* falls to  $10^3$  cfu/mL, while after the magnitude of the *E. coli* cells falls to less than  $10^4$  cfu/mL, the magnitude of *Bdellovibrio bacteriovorus* falls to  $10^2$  cfu/mL.

收稿日期: 2008-04-25

基金项目: 国家自然科技资源共享平台项目 (2007DKA30470013)

作者简介: 邓璐 (1983-), 女, 安徽淮南人, 硕士研究生, 专业方向为微生态制剂研发。E-mail: denglu112983@yahoo.com.cn

通讯作者: 杨先乐, E-mail: xlyang@shou.edu.cn

**Key words:** *Bdellovibrio bacteriovorus*; optimized preservation; anabiosis rate; bacteriolysis

噬菌蛭弧菌 *Bdellovibrio bacteriovorus* (以下简称蛭弧菌 Bd) 作为一类专门以捕食细菌为生的寄生性细菌, 具有独特的裂解细菌的生物学特性<sup>[1-2]</sup>。经大量的实验证明可以安全、有效的利用其生物学特性用于防治水产动物病害<sup>[3-6]</sup>。但关于蛭弧菌的保藏方法国内外研究报道较少, 始终没有一种高效简易保藏方法来进行广泛的推广<sup>[7-8]</sup>。冷冻真空干燥法<sup>[9]</sup>和液态氮超低温保藏蛭弧菌法是国际公认的长时、高效保存菌株的方法, 但操作显得繁琐或成本较高, 不适合我国微生物制剂生产厂家和部分科研机构的技术条件。另一些方法, 如用自来水宿主软琼脂保存蛭弧菌培养物虽然简单易行, 但保存效果却不够理想。为了确定一种高效简易保藏方法来进行广泛的推广, 作者选择了实验室保存的蛭弧菌 BDF-H16 用不同的保藏方法对其存活效果进行了观察试验, 确定了蛭弧菌高效简易保藏方法, 为蛭弧菌的保藏工作提供了科学的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用宿主菌大肠杆菌 BYK00105-01-01 (*Escherichia coli* BYK00105-01-01) 为上海海洋大学农业部渔业动植物病原库保藏菌株。

噬菌蛭弧菌 BDF-H16 (以下简称 BDF-H16) 由上海海洋大学农业部渔业动植物病原库保藏<sup>[10]</sup>。

蛭弧菌噬菌范围检测宿主菌: 温和气单胞菌 (*A. sobria*) (1株)、嗜水气单胞菌 (*A. hydrophilia*) (1株)、豚鼠气单胞菌 (*A. caviae*) (1株)、副溶血弧菌 (*V. Parahaemolyticus*) (1株)、鳃弧菌 (*V. anguillarum*) (1株)、溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*) (1株)、金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) (1株)、枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) (1株)、蜡状芽孢杆菌 (*B. cereus*) (1株)、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) (1株)、嗜菌假单胞菌 (*Pseudomonas mycophaga*) (1株) 全部由农业部渔业动植物病原库提供。

双层琼脂培养基: 底层——自来水培养基 (1.8%) 琼脂条; 上层——1/500 NB 琼脂培养基 (0.6%), 用  $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  调节培养基  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  分别到 0.002 mol/L 和 0.003 mol/L。

营养牛肉膏 (NB) 保护液: 牛肉膏 3 g/L; 蛋白胨 10 g/L; NaCl 3 g/L, 灭菌后备用。

营养琼脂 (NA) 宿主菌计数平板: 蛋白胨 10 g/L; 牛肉膏粉 3g/L; NaCl 5 g/L; 琼脂粉 14 g/L, 灭菌后备用。

PBS 保护液: NaCl 137 mmol/L, KCl 2.7 mmol/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  4.3 mmol/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.4 mmol/L (pH 7.2~7.4) 灭菌后备用。

1/10 甘油保护液: 甘油为原料级丙三醇溶液 (产地为马来西亚), 1/10 蒸馏水稀释之后灭菌备用。

1/10 大豆植物油保护液: 植物油主要成分为脂肪酸 (亚油酸: 50%~60%, 油酸: 22%~30%, 棕榈酸: 7%~10%, 亚麻酸: 5%~9%, 硬脂酸: 2%~5%, 花生酸: 1%~3%), 1/10 蒸馏水稀释之后灭菌备用。

1/500 NB 保护液: 营养牛肉膏 (NB) 1/500 蒸馏水稀释之后灭菌备用。

葡萄糖保护液: 5% 的葡萄糖, 过滤除菌备用。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 宿主菌的制备

移取宿主菌母液于普通营养琼脂培养基涂布, 30℃ 培养箱培养, 24 h 之后取出; 用接种环轻轻刮下宿主菌, 于离心管内备用; 2 500 r/min 离心, 调节菌液浓度为  $3.0 \times 10^9$  cfu/mL 置 4℃ 保存备用。

#### 1.2.2 蛭弧菌悬液的制备

当蛭弧菌平板形成融汇成片的蛭弧菌噬斑时, 分别加入灭菌自来水, 浸泡 30 min 后, 制成蛭弧菌悬液。

### 1.2.3 自来水双层琼脂平板法<sup>[11-12]</sup>

取蛭弧菌和宿主菌悬液,用此方法检测噬菌斑,待凝固后于30℃温箱内培养24~72h,检测。

### 1.2.4 蛭弧菌保藏温度的优化

将BDF-H16灭菌自来水菌悬液平均分装到三只无菌小清瓶中,分别放置于25℃、4℃、-20℃下进行保藏。在蛭弧菌悬液保存之后的0、10、30、60、90、120、180、240d用自来水双层琼脂平板法进行检测。

### 1.2.5 蛭弧菌保藏液的优化

用1.2.2方法分别用营养牛肉膏(NB)保护液、1/500NB保护液、1/10甘油保护液、1/10植物油保护液、PBS保护液、5%的葡萄糖保护液取代灭菌自来水,制成六种不同保护液保存的BDF-H16菌悬液,置于4℃下进行保藏。以灭菌自来水保存为对照组,在保存之后的1~12个月内用自来水双层琼脂平板法进行检测。

### 1.2.6 蛭弧菌保藏载体的优化(沸石、麦麸、玻璃球、琼脂)

将BDF-H16灭菌自来水菌悬液分别加入沸石(0.5g)、麦麸(0.5g)、玻璃球(少许),自来水软琼脂(1cm<sup>3</sup>)作为细菌载体,放置于4℃下进行保藏。以灭菌自来水保存为对照组,在保存之后的1~12个月内用自来水双层琼脂平板法进行检测。

### 1.2.7 蛭弧菌与宿主菌的存活情况的相互影响

将BDF-H16分别用四种方法:A 无菌无载:无菌自来水保存;B 无菌有载:无菌自来水、琼脂保存;C 有菌无载:无菌自来水、100μL宿主菌保存;D 有菌有载:无菌自来水、琼脂、100μL宿主菌保存。放置于4℃下,保存之后的25个月用自来水双层琼脂平板法和平板计数法检测蛭弧菌和宿主菌的数量。

### 1.2.8 复苏蛭弧菌活性的检测

将复苏的BDF-H16进行自来水双层培养,于15℃、25℃、35℃恒温培养24~72h检测出斑数量,用于检测复苏菌株BDF-H16对温度的适应性。

调节自来水双层琼脂平板pH值分别为6.5、7.5、8.5制成BDF-H16蛭弧菌自来水双层琼脂平板,于30℃恒温培养24~72h检测出斑数量,用于检测复苏菌株BDF-H16对pH的适应性。

分别以1.1所述菌株为宿主菌以1.2.3所述方法检测复苏菌株BDF-H16的噬菌范围。

## 2 结果

### 2.1 蛭弧菌保藏温度的优化

不同的保存温度对于保存期内BDF-H16的复苏率有明显的影 响。在最初的一个月中3种保存温度下的复苏率下降都不大,在一个月之后3种保存温度下的复苏率有着明显的下降。25℃保藏下的BDF-H16复苏率在3个月之后降到了50%以下,4℃与-20℃保藏下的BDF-H16复苏率分别在5个月和6个月之后降到了50%以下。240d后25℃、4℃、-20℃保藏下的复苏率分别为0%、20%、30%。与25℃相比,4℃、-20℃保藏下的BDF-H16复苏率有极其显著的提高( $P < 0.01$ ),-20℃保藏下的复苏率比4℃保藏下要高,但差异不显著。

### 2.2 蛭弧菌保藏液的优化

不同的保存温度对于保存期内BDF-H16的复苏率有明显的影 响。在最初的一个月中3种保存温度下的复苏率下降都不大,在一个月之后3种保存温度下的复苏率有着明显的下降。25℃保藏下的

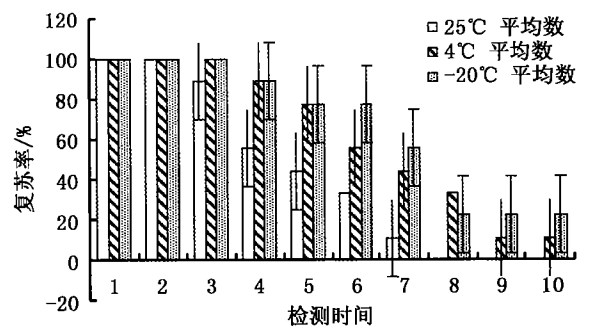


图1 不同保存温度对蛭弧菌存活率的影响  
Fig.1 Effect of different preserved temperatures on the livability of *Bdellovibrio bacteriovorus*

BDF-H16 复苏率在 3 个月之后降到了 50% 以下,4 ℃ 与 -20 ℃ 保藏下的 BDF-H16 复苏率分别在 5 个月和 6 个月之后降到了 50% 以下。240 d 后 25 ℃、4 ℃、-20 ℃ 保藏下的复苏率分别为 0、20%、30%。与 25 ℃ 相比,4 ℃、-20 ℃ 保藏下的 BDF-H16 复苏率有极其显著的提高 ( $P < 0.01$ ), -20 ℃ 保藏下的复苏率比 4 ℃ 保藏下要高,但差异不显著。

### 2.3 蛭弧菌保藏载体的优化(沸石、麦麸、玻璃球、琼脂)

保藏 12 个月之后,以沸石、麦麸、玻璃球、琼脂为载体的 BDF-H16 复苏率分别为 0、0、0、40%。相对无菌自来水保护组,只有以琼脂为载体的 BDF-H16 复苏率有极其显著的提高 ( $P < 0.01$ ),但是另外的 3 种载体作用不显著。

### 2.4 蛭弧菌与宿主菌的存活情况的相互影响

#### 2.4.1 Bdfu-16 在四种不同保藏方法下出斑数量的变化

结果表明加入宿主菌和琼脂载体都可以提高蛭弧菌保存期的出斑数量。在保藏第九月时,无菌无载、无菌有载、有菌无载、有菌有载组保藏方法组的出斑数目分别为:600 cfu/mL、5 600 cfu/mL、18 000 cfu/mL、11 000 cfu/mL。与无菌无载组相比,其他各组出斑数目有极其显著的提高 ( $P < 0.01$ );与无菌有载、有菌无载组相比,有菌有载组的出斑数目有极其显著的提高 ( $P < 0.01$ );与无菌有载组相比,有菌无载组出斑数目有显著的提高 ( $P < 0.05$ )。如图 4 所示,除无菌无载组外其他保藏组在保藏期的开始有 1~2 个月蛭弧菌数量上升至稳定的特殊时期。

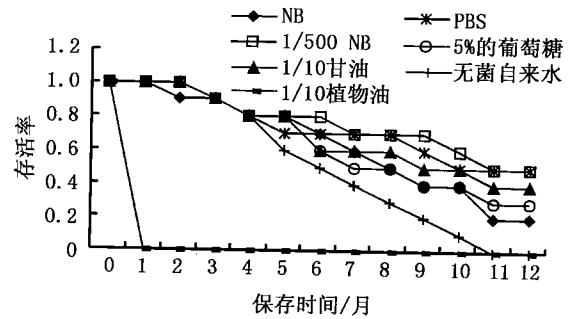


图 2 不同保护液对 4 ℃ 保存下蛭弧菌存活率的影响  
Fig. 2 Effect of different preserved liquids on the livability of *Bdellovibrio bacteriovorus* protected at 4 ℃

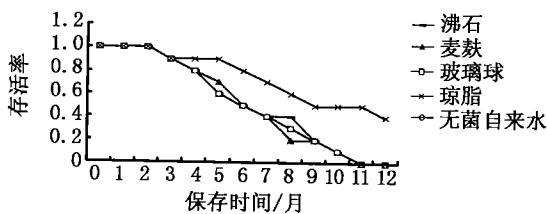


图 3 不同载体对 4 ℃ 保存下蛭弧菌存活率的影响

Fig. 3 Effect of different preserved carriers on the livability of *Bdellovibrio bacteriovorus* protected at 4 ℃

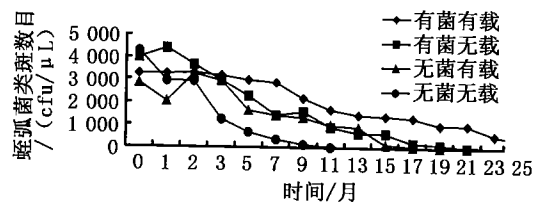


图 4 四种不同保藏方法对 Bdfu-16 在 4 ℃ 保存下出斑数量的影响

Fig. 4 Effect of four different preserved ways on pfu of *Bdfu-16* protected at 4 ℃

#### 2.4.2 Bdfu-16 在带菌保藏方法下宿主菌数量的变化

宿主菌在有载体的保藏状态下数量的下降速率是明显的小于无载体状态下。但是,在保存后期,两种不同保存状态下的宿主菌数量都是趋于同样的浓度 ( $1.0 \times 10^4$  pfu/mL)。

#### 2.4.3 Bdfu-16 在两种带宿主菌保藏方法下蛭弧菌和宿主菌数量变化关系

在保藏期内,有载体保存状态下的蛭弧菌和宿主菌出斑数量和稳定性都好于没有载体状态下的。但是,在长期保藏后,不同保藏方法下的宿主菌和蛭弧菌的数量都趋于一个相同的比值 ( $10^4/10^2$ )。

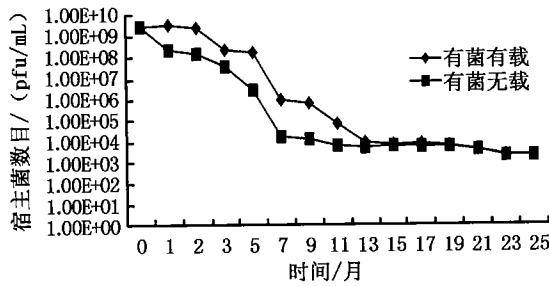


图5 带菌保藏方法对 Bdfu-16 在 4 °C 下宿主菌数量变化的影响

Fig. 5 Effectr of tow different preserved ways with prey on cfu of Bdfu-16 protected at 4 °C

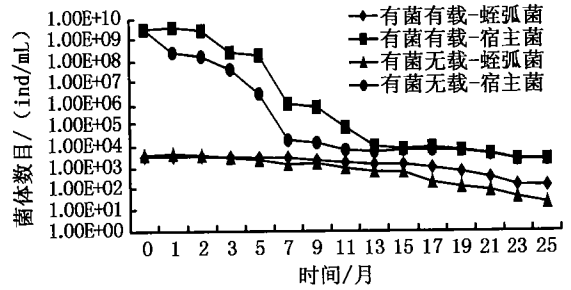


图6 两种带宿主菌保藏方法下蛭弧菌和宿主菌数量变化关系

Fig. 6 Quantity change relations between BD and prey under the two differnt preserved ways prey

### 2.5 复苏蛭弧菌活性的检测

Bdfu-16 复苏菌对温度、pH 值的适应性以及其噬菌范围的检测见表 1、2、3。

表 1 Bdfu-16 复苏菌对温度的适应性

Tab. 1 The flexibility of the anabiosis bdfu-16 to temperature

温度(°C)	出斑时间(h)	噬菌斑直径(mm)	噬菌斑数目(PFU)
15	96	0.5	124
25	24	1.2	212
35	18	1.0	304

表 2 Bdfu-16 复苏蛭弧菌对 pH 值的适应性

Tab. 2 The flexibility of the anabiosis bdfu-16 to pH

pH	出斑时间(h)	噬菌斑直径(mm)	噬菌斑数目(PFU)
6.5	24	0.5	200
7.5	24	1.5	220
8.5	24	3.0	180

表 3 Bdfu-16 复苏蛭弧菌噬菌范围的检测

Tab. 3 The inspection of the prey range of the anabiosis Bdfu-16

菌种	出斑时间(h)	噬菌斑直径(mm)	噬菌斑数目(PFU)
温和气单胞菌( <i>A. sobria</i> )	48	1~2	48
嗜水气单胞菌( <i>A. hydrophilia</i> )	48	1.5~2	43
豚鼠气单胞菌( <i>A. caviae</i> )	48	1.5~2	32
副溶血弧菌( <i>V. Parahaemolyticus</i> )	72	1~2	24
鳗弧菌( <i>V. anguillarum</i> )	24	2	42
溶藻弧菌( <i>V. alginolyticus</i> )	72	2	15
荧光假单胞菌( <i>P. fluorescens</i> )	72	1	23
嗜菌假单胞菌( <i>P. mycophaga</i> )	72	1	13
大肠杆菌( <i>E. coli</i> )	24	1.5	220
金黄色葡萄球菌( <i>S. aureus</i> )	48	3	6
枯草芽孢杆菌( <i>B. subtilis</i> )	-	-	0
蜡状芽孢杆菌( <i>B. cereus</i> )	-	-	0

### 3 讨论

#### 3.1 蛭弧菌简易高效保藏方法确立的必要性

关于蛭弧菌的保藏,最早国外 1963 年 Stolp 提出了在含有宿主菌细胞的 YP 琼脂中保藏蛭弧菌,每月转种培养 1 次的方法;1968 年 Burger 等发现在 YP 软琼脂中保藏蛭弧菌培养物,蛭弧菌的效价很不稳定,室温保藏 36 d 后,蛭弧菌的数目由  $10^8$  pfu/mL 减少到 10 pfu/mL。1969 年 Huang 等报道,在 4 °C 冰箱中保存蛭弧菌培养物,4 ~ 8 个月蛭弧菌在加有宿主的软琼脂中仍能保持一定的活力;1979 MookBmHHBa 等报道,蛭弧菌在高压灭菌的自来水中,生存时间可达 160 d 以上。国内 1987 年秦生巨等<sup>[8]</sup>报道蛭弧菌在灭菌自来水中于 4 °C 冰箱保藏 180 ~ 240 d,大部分菌株不丧失活力;黄文等<sup>[9]</sup>发现冷冻干燥保藏法效果最好,21 个月的复活率为 100%,复活后其形态和噬菌特性不变;其次为 -20 °C 甘油和 4 °C NB 液保藏法,17 个月的复活率为 67%。

目前,以蛭弧菌为优势菌的微生态制剂成为了水产用微生态制剂的一个新型的热点<sup>[13]</sup>。作为一种生产用菌必然涉及菌种的保藏问题,包括了如何保持蛭弧菌菌株的原有优良特性,推延变异的时间和有效菌的数量,在实际生产和科研工作中都具有重要意义。微生物菌种保存方法因微生物种类的不同而异<sup>[13-16]</sup>。确立适合我国微生态制剂生产厂家和部分科研机构的技术条件的高效简易保藏方法势在必行。

#### 3.2 蛭弧菌保藏温度的选择

目前,大多数的菌种保藏机构和单位都是选择 4 °C 低温冰箱下保存菌种。目前国际上正大力推广的是液态氮超低温保藏法,此方法在超低温的条件下(-150 °C ~ -196 °C)能使微生物的代谢降到最低水平,因而菌种基本上不发生变异。但是,这种方法的缺点是对设备性能要求高、操作复杂、且需要相当的维持费用。而且由于蛭弧菌具有强烈的内源性呼吸作用,在低温条件下又容易死亡,所以作者选取了 25 °C、4 °C、-20 °C 进行实验。结果表明,相对与 25 °C 的高温,在低温条件下蛭弧菌的复苏率有显著提高。但是 4 °C、-20 °C 保藏条件下蛭弧菌的复苏率差异不显著,所以推荐使用 4 °C 保藏。

#### 3.3 蛭弧菌保护液的选择

本实验选取了常见的营养牛肉膏(NB)、1/500 NB、1/10 甘油、1/10 植物油、PBS、5% 的葡萄糖作为菌种低温保护液<sup>[9,17-18]</sup>。蛭弧菌适宜在不含营养成分的自来水双层固体平板<sup>[11-12]</sup>上生长,在实验中发现营养成分低的保护液中,蛭弧菌的复苏率更高。冷藏温度一般选择在 0 °C 左右,因为冷藏使代谢降低,菌体不会在环境中积累有害的代谢产物,也不会因持续的代谢引起基因变异。但冷藏是一种逆境,经常胁迫膜脂发生过氧化。在低浓度的保护液中,蛭弧菌更容易形成还没有分化的蛭弧菌小体,起到稳定磷脂双层膜的作用。

#### 3.4 蛭弧菌保藏载体的选择

国外 1963 年 Stolp 提出了在含有宿主菌细胞的 YP 琼脂中保藏蛭弧菌,之后 1968 年 Burger 等发现在 YP 软琼脂中保藏蛭弧菌培养物,都取得了一定的效果。实验选取沸石、麦麸、玻璃球、琼脂载体,但只有琼脂载体组的复苏率有极其显著的提高( $P < 0.01$ )。沸石、麦麸、玻璃球只可以作为表面的载体,而且多是在干燥保藏方法下使用。但蛭弧菌本身就可以在双层琼脂固体培养,蛭弧菌不仅在固体培养基的表面生长,而且还可以在固体培养基里分裂宿主菌进行增殖。实验表明,以琼脂为保存载体可以稳定蛭弧菌在保存期内的数量变化。

#### 3.5 蛭弧菌保藏过程中宿主菌和蛭弧菌数量变化关系

蛭弧菌不能分解碳水化合物,但分解蛋白质能力强,可以利用多肽与氨基酸作为碳源和能源。蛭弧菌按三羧酸循环途径行有氧呼吸,其全都营养来自宿主细胞而非培养基。在分离和纯化蛭弧菌的时候,宿主菌和蛭弧菌的培养比例一般不小于  $10^9 / 10^3$ <sup>[19]</sup>。本实验在保藏时宿主菌浓度选取  $3.0 \times 10^9$  cfu/mL。

实验数据表明,宿主菌的数量在保藏期内呈下降趋势,但当下降到 $1.0 \times 10^4$  cfu/mL时就进入稳定期,数目就不再有数量级的变化了。在宿主菌的浓度下降到 $1.0 \times 10^6$  cfu/mL之前,蛭弧菌的数目保持在 $1.0 \times 10^3$  pfu/mL;在宿主菌的浓度下降到 $1.0 \times 10^6$  cfu/mL之后,蛭弧菌的数目下降至 $1.0 \times 10^2$  pfu/mL。最后,二元保藏中宿主菌/蛭弧菌浓度比保持在 $10^4/10^2$ 。

### 3.6 复苏蛭弧菌噬菌范围的检测与宿主菌的选择

蛭弧菌的宿主范围极为广泛,包括革兰氏阴性菌与某些阳性菌。蛭弧菌对沙门氏菌属、志贺氏菌属、钩端螺旋体、假单胞菌属、变形杆菌属、霍乱弧菌及不凝集弧菌等均有较强裂解活性。蛭弧菌是水产微生态制剂的一种优势菌株,它通过裂解其他细菌,利用分解宿主菌的营养物质进行生长,有实验表明它还可以明显降低水体中的氨氮<sup>[20]</sup>,并且可以提高养殖对象肠道吸收能力和免疫水平<sup>[10]</sup>。我们通过对蛭弧菌噬菌范围的检测来测定蛭弧菌的活力。实验中选取了蛭弧菌的广谱噬菌谱中常见的水产病原菌作为复苏蛭弧菌噬菌范围的检测宿主菌,结果显示,复苏蛭弧菌噬菌能力良好,噬菌范围没有缩小和减弱,在实验室条件下由于经常以大肠杆菌作为宿主菌,在长时间的复苏过程中蛭弧菌对大肠杆菌的噬菌能力较其它细菌有明显的增强。

### 参考文献:

- [1] 秦生巨. 噬菌蛭弧菌对宿主菌细胞寄生和裂解机制的研究现状[J]. 微生物学通报, 1992, 19(6): 357 - 364.
- [2] Stolp H. The bdellovibrios; bacterial parasites of bacteria[J]. Annu Rev Phytopathol, 1973, 11: 53 - 76.
- [3] 陈家长, 简纪常, 胡庚东, 等. 利用有益微生物改善养殖生态环境的研究[J]. 湛江海洋大学学报, 2002, 22(4): 33 - 37.
- [4] 赵明森. 噬菌蛭弧菌(*Bdellovibrio bacteriovorus*)在虾蟹病害防治上的作用及其使用方法[J]. 现代渔业信息, 2002, 17(12): 14 - 16.
- [5] 曾地刚, 雷爱莹, 彭敏, 等. 噬菌蛭弧菌预防和治疗斑点叉尾鲷细菌性败血病的初步研究[J]. 广西农业科学, 2004, 35(3): 218 - 221.
- [6] 张梁, 周维祿. 蛭弧菌对草鱼生长及免疫力的影响[J]. 粮食与饲料工业, 2005, 4: 36 - 38.
- [7] Stolp H. Antonie van leeuwenhock[J]. J Microbiol Serol, 1963, 29: 217 - 248.
- [8] 秦生巨, 司稚东. 噬菌蛭弧菌简易保存方法的研究[J]. 微生物学通报, 1988, 15(3): 115 - 117.
- [9] 黄文, 杨莉, 马志宏. 噬菌蛭弧菌 Bd-9 五种保藏方法的比较研究[J]. 大连水产学院学报, 2002, 17(4): 341 - 345.
- [10] 曹海鹏, 杨先乐, 钱云云, 等. 异育银鲫肠道蛭弧菌的分离及其生物学特性的研究[J]. 微生物学通报, 2007: 33 - 38.
- [11] 王秀茹, 梁钢. 噬菌蛭弧菌噬菌斑的鉴别与纯化的研究[J]. 微生物学通报, 1994, 21(4): 228 - 232.
- [12] Sydney C. Rittenberg, Energy Efficiency of Intraperiplasmic Growth of *Bdellovibrio bacteriovorus*[J]. J Bacter Mar, 1975, 1158 - 1165.
- [13] 杨先乐, 曹海鹏, 钱云云, 等. 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 - 61.
- [14] 宋新. 华斜面传代法保藏食用菌菌种的方法改进[J]. 淄博学院学报(自然科学与技术版), 2006, 2(2): 86 - 88.
- [15] 周宇光. 嗜碱细菌的液氮超低温冻结保藏[J]. 微生物学通报, 1992, 19(1): 47 - 50.
- [16] 张文齐, 魏甲乾, 孙智敏, 等. 不同保藏条件对醋酸菌菌种生长及产酸能力的影响[J]. 甘肃科学学报, 2006, 18(2): 22 - 25.
- [17] 石艳丽, 徐东, 丁洁. 冻融对发酵用大肠杆菌甘油保存的影响[J]. 中国生化药物杂志, 2000, 21(4): 202 - 203.
- [18] 马小来, 姚启斐, 袁勤生. 肝素黄杆菌菌种保存方法的研究[J]. 食品与药品, 2006, 8(4): 39 - 42.
- [19] Markelova N Y, Gariev I A. Predatory bacteria *Bdellovibrio*; survival strategy[J]. Process Biochemistry, 2005, 40(3-4): 1089 - 1094.
- [20] 张梁, 陈佳毅, 王红伟, 等. 蛭弧菌对养殖草鱼水体主要水化指标的影响[J]. 河南水产, 2004, 45 - 46.