

裂解性弧菌噬菌体的分离及生理特性

孙佳^{1,2}, 叶德赞^{1,2}, Agnes Kochel³, Guenter Jost³

(¹ 国家海洋局第三海洋研究所, 厦门 361005)

(² 国家海洋局海洋生物遗传资源重点实验室, 厦门 361005)

(³ 德国莱布尼茨波罗的海研究所, 德国罗斯托克 D-18119)

摘要:【目的】弧菌是水产养殖生物中常见的病原菌, 本研究旨在寻求水产养殖病害可能的生物防治途径。【方法】本文于 2006 年春季、2005 年秋季从沿海水及淡水湖采样, 通过“双层平板法”分离裂解性弧菌噬菌体; 对噬菌体及宿主进行电镜形态观测, 同时采用 16S rDNA 分子测序技术鉴定宿主, 并对噬菌体进行生理特性测定。【结果】从 10 个样品中分离出 96 株弧菌、2 株裂解性噬菌体 (Vibrio/XM/P1、Vibrio/XM/P2), 噬菌体宿主分别属于 *Vibrio alginolyticus* (溶藻弧菌) 和 *Vibrio anguillarum* (鳃弧菌); 噬菌体头部都呈六边形, Vibrio/XM/P2 有尾; 两株噬菌体活性最适 pH 分别为 7、8, 最适温度分别为 25、30, 并都对高温和紫外线敏感; Vibrio/XM/P1 对乙醚、氯仿不敏感, Vibrio/XM/P2 对乙醚、氯仿敏感。

关键词: 弧菌; 噬菌体; 16S rDNA; 电子显微镜观察; 生理特性

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 06-0780-05

弧菌是一类革兰氏阴性、具极生鞭毛、能运动、无芽胞的短杆状细菌, 很多弧菌是作为病原菌而报道, 但目前大部分的弧菌并未被《伯杰氏细菌鉴定手册》收录^[1]。海水经济动物高密度、集约化养殖的兴起, 促进了养殖水体中弧菌的研究。迄今分离报道的致病性弧菌有鳃弧菌、创伤弧菌、河弧菌、溶藻弧菌等^[2]。海产品污染了致病性弧菌引发各种疾病呈明显上升趋势, 超过沙门氏菌食物中毒, 跃居首位^[3]。如何从源头防治弧菌引起的感染性疾病是未来研究新方向。

噬菌体是一类可以侵袭细菌的病毒, 2005 年, 国际病毒分类委员会把核酸类型、形态结构、基本特性、宿主菌类型等特征及基因组的组织和复制方式作为噬菌体分类的依据, 分为 14 科 36 属^[4]。病毒是生态环境中重要环节, 其数量 10 倍于细菌, 通过调节细菌的生命活动而改变能量和化合物的循环。分离和

研究水体中弧菌及其相应噬菌体, 对于监测海洋环境, 控制海洋污染等方面的工作具有指导意义^[5]。溶藻弧菌和鳃弧菌作为海水鱼、虾、贝类养殖业重要致病菌, 已经在世界范围内造成过重大损失。传统的防治利用抗菌药物和消毒剂, 容易造成药物残留污染, 并且会产生抗药性菌株, 噬菌体作为致病细菌的病毒, 在生物防治领域已经呈现曙光^[6]。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集: 2005 年 10 月和 2006 年 3 月进行采样, 站位为太阳湾水域、筴筴湖水域、轮渡水域、厦大芙蓉湖水、万石湖水。样品为高潮时水面下 20 cm 处海水, 用棕色瓶采样后, 4℃ 避光保存。

1.1.2 培养基与试剂: TCBS 成品购于 Difco laboratories, Detroit Michigan USA; 牛肉膏蛋白胨培养

基金项目: 国家海洋局中德合作项目 (HD07002)

*通讯作者: Tel: +86-592-2195275; E-mail: yedezan@public.xm.fj.cn

作者简介: 孙佳 (1983-), 男, 福建人, 硕士研究生, 从事海洋微生物研究。E-mail: oscar_0406@163.com

收稿日期: 2007-12-07; 修回日期: 2008-03-01

基^[7],固体、半固体培养基琼脂浓度为 1.5%和 0.75%; SM 缓冲液^[10]; *E.coli* DH5 α 、质粒、PCR 试剂等购自 TaKaRa 公司, DNA 纯化试剂盒购自 OMEGA 公司。

1.2 弧菌及其裂解性噬菌体的分离

弧菌分离采用 TCBS 培养基分离法^[9]进行。对弧菌培养液和经 0.22 μm 孔径滤膜过滤的样品,采用双层平板分离法^[7]分离裂解性噬菌体。噬菌斑以缓冲液溶解并重复检验纯化。

1.3 宿主弧菌分子鉴定

用改良的 CTAB 提取法^[10]提取宿主总 DNA,通过目前广泛应用的 16S rDNA 序列分析技术鉴定,方法参照文献^[11],扩增采用通用引物^[12]。序列同源性通过互联网与欧洲分子生物实验室网上数据库 (www.ebi.ac.uk)比较。

1.4 弧菌革兰氏染色性质判定

采用革兰氏染色法^[7]对菌株斜面培养物进行判定,并用氢氧化钾拉丝法^[13]验证。

1.5 宿主弧菌及其裂解性噬菌体的形态观察

采用滴液法和醋酸铀负染法^[14]制片后在 100 kV 条件下观察。

1.6 噬菌体的生化特性

1.6.1 pH:噬菌体处理参考文献^[15],采用双层平板法测定效价。

1.6.2 温度:噬菌体于 10 ~40 温度下放置,待温度平衡后,测定其效价^[16]。同时分别在不同温度下处理不同时间 1~20 min 处理后,25 检验热稳定性^[17]。

1.6.3 紫外线灭活:噬菌体悬液置于紫外灯 50 cm 处^[18]处理不同时间后(见图 5),25 测定效价。

1.6.4 理化因子敏感性:噬菌体中加入 5%无水乙醇^[19],4 作用 24 h,3000 r/min 离心 15 min,吸取

下层水相吹打,使乙醇挥发后测定效价。氯仿处理终浓度为 5%,摇匀后于 37 作用 30 min,3000 r/min 离心 15 min,上清液用于测定效价^[20]。

2 结果

2.1 宿主弧菌、裂解性噬菌体的分离

以 TCBS 培养基分离的 96 株弧菌为宿主,分离到两株噬菌体 Vibrio/XM/P1 和 Vibrio/XM/P2。Vibrio/XM/P1 来自秋季芙蓉湖滤液感染一株春季芙蓉湖的黄色弧菌;Vibrio/XM/P2 来自秋季芙蓉湖滤液感染一株秋季太阳湾水样的黄色弧菌。两株噬菌体都可形成带有半透明光晕的噬菌斑,24 h 噬菌斑内径/外径(mm)分别为:6.7/9.4,8.2/10.9。

2.2 宿主弧菌的分子鉴定

经扩增得到 1500 bp 的片段,表明已获得完整的 16S rDNA 片断;序列通过网络数据库同源性比较,两株宿主分别鉴定为 *Vibrio alginolyticus*(溶藻弧菌,AM921803)和 *Vibrio anguillarum*(鳗弧菌,AM921804),它们与模式菌 16S rDNA 同源性分别为 99.29%和 99.62%。

2.3 宿主菌革兰氏染色性质判定和噬菌体的电镜观察经过革兰氏染色法和 KOH 拉丝法验证, *Vibrio alginolyticus* 和 *Vibrio anguillarum* 都呈革兰氏阴性,宿主及其噬菌体的电子显微镜观察照片如图 1。

以上为 24 h 培养物照片, Vibrio/XM/P1 无尾,呈正六边形,边长 46 nm,菌体半径 80 nm, *Vibrio alginolyticus* 大小 0.92 μm \times 0.42 μm ,一条端生鞭毛,长时间培养的菌体略显弧形。Vibrio/XM/P2 有一条 151 nm 长尾巴,头部呈正六边形,边长 50 nm,半径约 86 nm, *Vibrio anguillarum* 大小 0.57 μm \times 1.02 μm ,无鞭毛。

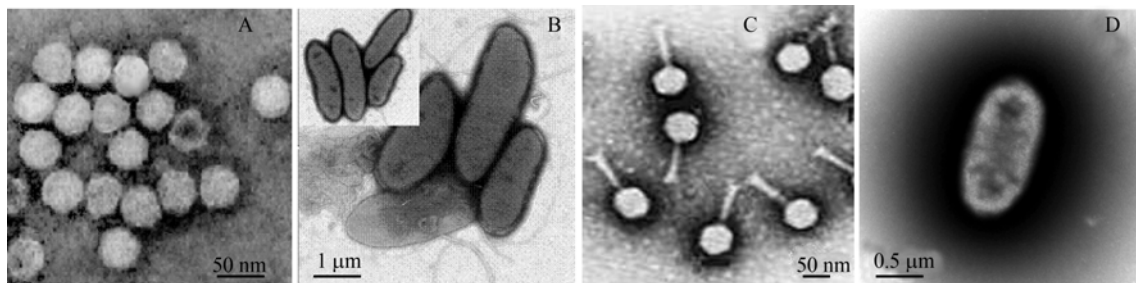


图 1 噬菌体及宿主的电镜形态

Fig. 1 Morphology of phages and hosts ($\times 10^7$). A: Vibrio/XM/P1; B: *Vibrio alginolyticus*; C: Vibrio/XM/P2; D: *Vibrio anguillarum*.

2.4 噬菌体的生理特性研究

2.4.1 pH:两株噬菌体活性与 pH 关系都呈图 2 抛物线形

状,活性最高时 pH 分别为 7 和 8;pH4 和 pH12 活性都降到约 50%,此范围内 vibrio/XM/P2 敏感性低于 vibrio/XM/P1。

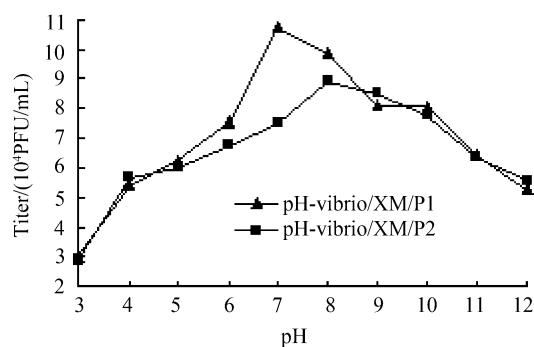


图2 pH对噬菌体活性的影响
Fig. 2 The effect of pH on the phages.

2.4.2 温度: 两株噬菌体分别在 25、30 时活性最高, 如图 3。在测试温度范围, 其活性都保持在 50% 以上。

2.4.3 热稳定性: 由图 4 中看出, 两株噬菌体对高温稳定性趋势一样, 温度越高, 处理时间越长, 噬菌体裂解活性越低。两株噬菌体在 30 时活性基本上保持

稳定, 在 50 以下, 随处理时间的延长, *Vibrio/XM/P2* 活性丧失比 *Vibrio/XM/P1* 明显; 两者在 60 处理 5 分钟分别剩余 30% 和 15% 活性, 而在 70 处理 1 分钟, 活性分别降为 14% 和 7%。

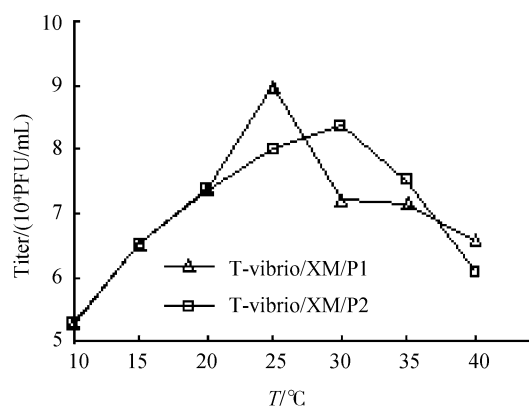


图3 温度对噬菌体活性的影响
Fig. 3 The effect of temperature on the phages.

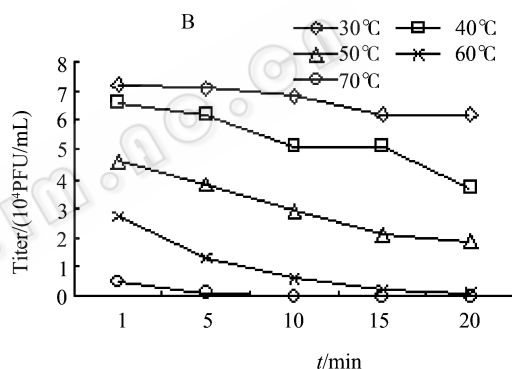
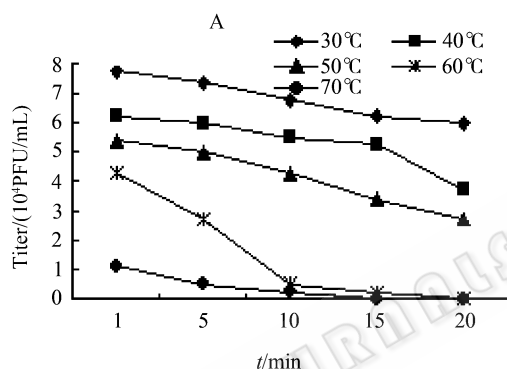


图4 噬菌体的热稳定性
Fig. 4 The sensitivity of phages to heat. A: *Vibrio/XM/P1*, B: *Vibrio/XM/P2*.

2.4.4 紫外线灭活: 两株噬菌体对紫外线都非常敏感, 照射 0.3 min 活性都下降了 60% 以上, 其后随照射时间延长而平稳丧失活性; 照射 12 min 后, 活性都略微上升, 恢复到原来的 19% 和 17% (图 5)。

2.4.5 理化因子: *Vibrio/XM/P1* 处理组与对照组效价差别不大, *Vibrio/XM/P1* 对乙醚和氯仿不敏感; *Vibrio/XM/P2* 处理组效价显著降低, 说明 *Vibrio/XM/P2* 对乙醚和氯仿都敏感 (图 6)。

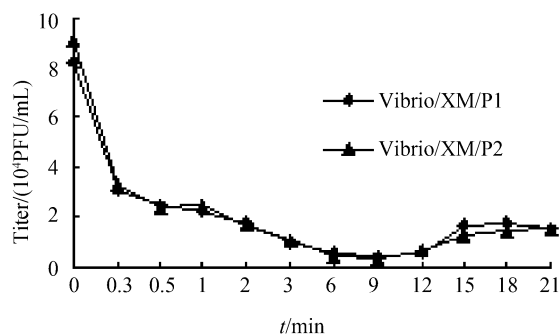


图5 紫外线对噬菌体灭活作用
Fig. 5 The effect of UV on phages.

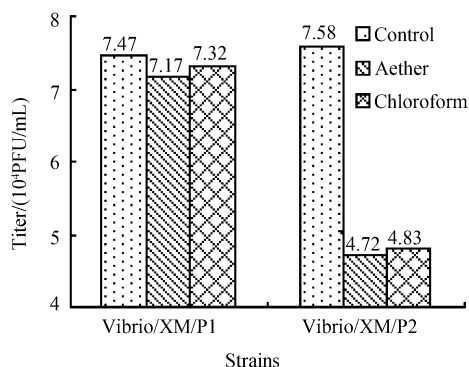


图6 噬菌体对乙醚、氯仿敏感性
Fig. 6 Sensitivity to Aether and Chloroform.

3 讨论

目前报道的多数噬菌体都是有尾病毒。本文获得两株噬菌体在电镜下全为正六面形头部,推测两者都是正廿面体结构头部,Vibrio/XM/P2 尾部长约 151nm。活性实验表明,Vibrio/XM/P1、Vibrio/XM/P2 最适生长 pH 分别为 7、8;Vibrio/XM/P1 活性保持在 70% 以上为 pH6~9,对于 Vibrio/XM/P2 是 pH5~11。Vibrio/XM/P1 最适裂解温度为 25℃,随着温度的上升或下降,其裂解活性明显降低,但降低速度仍低于邱德全^[19]研究的溶血弧菌噬菌体。Vibrio/XM/P2 对高温敏感,温度高于活性最高时条件,活性丧失速度超过 Vibrio/XM/P1。紫外线对两株噬菌体的活性影响基本相同,短时间紫外线照射即对噬菌体有强烈的杀灭作用,这个结果与杨水云等^[15]研究结果一样。宁淑香等^[17]用紫外线较长时间照射河流弧菌噬菌体后噬菌体全部失活,而本文未出现完全失活现象,反而当照射时间长于 12 分钟后,Vibrio/XM/P1 活性先是微弱上升后下降,Vibrio/XM/P2 上升后活性平稳。氯仿、乙醚对 Vibrio/XM/P1 几乎没影响,而 Vibrio/XM/2 对乙醚、氯仿敏感。通过以上实验,推想结构简单的噬菌体是否对外界因素有更强适应性,有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 吴后波,潘金培. 弧菌属细菌及其所致海水养殖动物疾病. 中国水产科学(*Journal of Fishery Sciences of China*), 2001, 8(1): 89-93.
- [2] 马光刚,郭福生,王娟,等. 海产品中副溶血弧菌的分离与鉴定. 中国动物检疫(*Chinese Journal of Animal Health*), 2002, 19(9): 25-28.
- [3] 陈建琳,刘明辉. 细菌性食物中毒流行趋势及预防对策. 中国卫生检验杂志(*Chinese Journal of Health Laboratory Technology*), 2002, 12(4): 481.
- [4] Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, et al. Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee Taxonomy Viruses. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005.
- [5] 杨小茹,郑天凌. 海洋病毒——一种新的、潜力巨大的赤潮防治工具. 应用与环境生物学报(*Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*), 2005, 11(5): 651-656.
- [6] 钱震雯,岳启安,田凤丽. 噬菌体治疗的研究概况. 医学综述(*Medical Recapitulate*), 2007, 13(16): 256-1258.
- [7] 乐毅全,王士花,等. 环境微生物学. 北京: 化学工业出版社, 2005, p19.
- [8] 徐励新,王凡,刘彦仿,等. 两种纯化噬菌体 DNA 方法的比较. 细胞与分子免疫学杂志(*Journal of Cellular and Molecular Immunology*), 1996, 13(1): 58-59.
- [9] 曹琛,黄金勇,李举鹏,等. TCBS 培养基在虾病防治监测中的应用. 水产科学(*Fisheries Science*), 2003, 22(6): 46-47.
- [10] 吴志红,汪天虹,黄卫,等. 简单易行的丝状真菌 DNA 提取方法. 菌物系统(*Mycosystema*), 2001, 20: 575-557.
- [11] 姚文,朱伟云,毛胜勇. 16S rDNA 技术研究新生腹污仔猪粪样细菌区系的多样性变化. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2006, 46(1): 150-154.
- [12] J. Chen, D Banks, R.L. Jarret, et al. Use of 16S rDNA Sequences as Signature Characters to Identify *Xylella fastidiosa*. *Current Microbiology*, 2000, 40: 29-33.
- [13] Gregersen T. Rapid method for distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1978, 5: 123-127.
- [14] 朱丽霞,程乃乾,高信曾. 生物学中的电子显微镜技术. 北京: 北京大学出版社, 1983: 73-79.
- [15] 杨水云,郭春林,赵文明. 理化因素对苏云金芽孢杆菌噬菌体活性影响的研究. 陕西师范大学学报(*Journal of Shaanxi Normal University*), 1998, 26: 225-228.
- [16] 余茂效. 多粘芽孢杆菌噬菌体的分离及其特性研究. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 1974, 14(2): 216-223.
- [17] 宁淑香,聂丽平,陆敏,等. 一株海洋噬菌体的分离及特性研究. 水产科学(*Fisheries Science*), 2003, 19(2): 14-16.
- [18] 曹文伟,张德民. 红霉素链霉菌抗噬菌体菌株的选育. 中国抗生素杂志(*Chinese Journal of Antibiotics*), 1993, 18(6): 420-424.
- [19] 邱德全,蔺红苹,谭龙艳. 一株副溶血弧菌噬菌体生理特性的研究. 微生物学通报(*Microbiology*), 2007, 34(4): 735-739.
- [20] 黄祯祥,洪涛,刘崇柏,等. 医学病毒学基础及实验技术. 北京: 科学出版社, 1990: 293.

Isolation and physiological characteristics of lytic bacteriophages of vibrio

Jia Sun^{1,2}, Dezan Ye^{1,2}, Agnes Kochel³, Guenter Jost³

(¹Third Institute of Oceanography, Xiamen 361005, China)

(²The Key Laboratory of Marine Biogenetic Resource, State Oceanography Administration, Xiamen 361005, China)

(³Leibniz Baltic Sea Research Institute(IOW), D-18119 Rostock, Germany)

Abstract: [Objective] Vibrio is a widely distributed pathogen in aquatic environment. Our study aimed at searching for possible biological control of pathogenic vibrio. **[Methods]** We collected natural samples from coast and lakes in spring of 2006 and autumn of 2005; and isolated lytic phages by double-layer plate method. We identified the hosts with 16S rDNA sequencing and observed their morphology with phages under electron microscopy. We also tested the physiological characteristics of phages. **[Results]** We isolated 96 bacteria and 2 phages (Vibrio/XM/P1, Vibrio/XM/P2). Their hosts belonged to *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio anguillarum*. Both phages were hexagonal-headed and one with a tail. Physiological tests show that their optimum grow condition were pH7, 25°C and pH8, 30°C. Both phages were sensitive to high temperature and UV light. Vibrio/XM/P2 was sensitive to aether and chloroform whereas Vibrio/XM/P1 not.

Keywords: vibrio; bacteriophage; 16S rDNA; electron microscopy; physiological characteristics

Supported by the Project of Sino-German Cooperative Project of State Oceanography Administration (HD07002)

*Corresponding author. Tel: +86-5922195275; E-mail: yedezan@public.xm.fj.cn

Received: 7 December 2007/ Revised: 1 March 2008

答 作 者 问

问：在学术会议上发表过的论文能否在《微生物学报》上发表？

答：这要分两种情况。(1)如果论文集属于正式出版物，有正式书号或刊号，则不能再在本刊发表；(2)如果不是正式出版物，属于交流材料，则论文可以投稿本刊。

问：投稿时都需要哪些材料，是否还需要纸稿？

答：从 2006 年起，本刊开始采用“稿件远程处理系统”。投稿时需要提供：(1)论文研究内容所属单位的介绍信(通常是第一单位)，介绍信模板可从我刊主页“下载专区”或“远程投稿时”下载。(2)在接到本刊 E-mail 发出的“收稿通知”后，需要及时补寄纸样的 1 份稿件和介绍信，并缴纳 100 元稿件受理费。

问：贵刊的审稿程序是怎样的？一般多长时间可以知道稿件是否被录用？

答：(1)收到来稿后，首先将请 2 位专家进行初审，再送主编进行总审，这个过程一般不会超过 2 个月。如果初审的 2 位专家的意见分歧较大，编辑部将再请第 3 位专家进行初审，之后再送主编总审，那么此稿的审理时间可能会超过 2 个月。

(2)完成审稿后(即主编给出总审意见)，编辑会给作者发出 e-mail 告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的)，作者在返回修改稿后经本刊审核合格后方可被录用。在此提醒作者不要在远程系统中看到初审意见时就急于修改稿件。