

研究报告

一株宽谱裂解性溶藻弧菌噬菌体 Φ V170 的分离鉴定及生物学特性付汉清¹ 林茂^{*1,2} 翟少伟¹ 李忠琴¹ 王淑红¹ 程聪¹

1 集美大学水产学院 厦门市渔用药物工程技术研究中心 福建 厦门 361021

2 农业部东海海水健康养殖重点实验室 福建 厦门 361021

摘要:【背景】溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)是水产养殖中重要的条件致病菌,对海水养殖业造成了极大的危害。传统的抗生素疗法引发的耐药问题已经成为全球面临的严峻挑战之一,而作为可替代抗生素的噬菌体疗法已被证实能够有效治疗弧菌病。【目的】深入研究溶藻弧菌噬菌体 Φ V170 的生物学特性,为该菌株在水产动物病害控制中的应用提供数据支持。【方法】以溶藻弧菌 V170 为宿主菌,采用斑点法从凡纳滨对虾养殖水体中筛选噬菌体,并以双层平板法对噬菌体进行纯化、生长、效价等方面的研究;利用电镜观察噬菌体形态;通过酶切方法分析噬菌体的基因组大小及其类型。【结果】分离得到一株宽谱裂解性噬菌体 Φ V170,其噬菌斑边缘整齐且通透,12 h 直径达 1.5 mm。鉴定结果显示,噬菌体 Φ V170 头部为正廿面体的立体对称结构,直径为 60 nm–65 nm,尾部长为 65 nm–75 nm,宽 14 nm–18 nm,核酸类型为 dsDNA,基因组大小约为 45 kb,对氯仿不敏感,属于有尾噬菌体目(Caudovirales)肌尾噬菌体科(Myoviridae)。此外,噬菌体 Φ V170 可裂解 15 株溶藻弧菌中的 7 株,属于种内宽谱;最佳感染复数为 0.01;一步生长曲线显示潜伏期为 10 min,裂解量为 101.3;对 65 °C 以上温度敏感。【结论】分离得到一株宽谱裂解性溶藻弧菌噬菌体,该噬菌体具有治疗海水养殖过程中溶藻弧菌病的潜力。

关键词: 噬菌体, 溶藻弧菌, 噬菌体治疗, 凡纳滨对虾, 生物学特性

Isolation and characterization of a wide-spectrum bacteriophage Φ V170 lysing *Vibrio alginolyticus*FU Han-Qing¹ LIN Mao^{*1,2} ZHAI Shao-Wei¹ LI Zhong-Qin¹ WANG Shu-Hong¹
CHENG Cong¹

1 Fisheries College, Jimei University, Engineering Research Center of the Fishery Drug, Xiamen, Fujian 361021, China

2 Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture, Xiamen, Fujian 361021, China

Abstract: [Background] *Vibrio alginolyticus*, one of the most important opportunistic pathogens, can

Foundation items: Modern Agriculture Industry Technology System Special Fund (CARS-46); Marine Economic Development Regional Demonstration Project (16PZY002SF18); Xiamen Special Fund for Marine and Fishery Development (18CZP001HJ06)

***Corresponding author:** E-mail: linmao@jmu.edu.cn

Received: 28-03-2018; **Accepted:** 04-06-2018; **Published online:** 25-06-2018

基金项目: 现代农业产业技术体系专项资金(CARS-46); 海洋经济发展区域示范项目(16PZY002SF18); 厦门市海洋与渔业发展专项资金(18CZP001HJ06)

***通信作者:** E-mail: linmao@jmu.edu.cn

收稿日期: 2018-03-28; **接受日期:** 2018-06-04; **网络首发日期:** 2018-06-25

cause significant morbidity, mortality and economic losses during shrimp aquaculture. At present, phage therapy acts as an alternative sanitizing agent to control *V. alginolyticus*. **[Objective]** To isolate and characterize phage Φ V170 lysing *V. alginolyticus* for the application of the phage to control aquatic animal diseases. **[Methods]** *V. alginolyticus* V170 was used as the host strain to isolate phage from *Penaeus vannamei* aquaculture water. Characterization was done by transmission electro-microscopy, optimal multiplicity of infection, one-step growth curve, lysis spectrum detection, thermal stability, and sensitivity to chloroform. The analyses of phage genome were based on enzyme digestion methods. **[Results]** A broad-spectrum lytic bacteriophage Φ V170 was isolated and the plaques were neat and transparent, with a diameter of 1.5 mm at 12 h. The identification results of transmission electron microscopy (TEM) showed that its head had a stereosymmetric structure of the quasi-diaphedron, with a diameter between 60 nm and 65 nm, and its tail was 65 nm to 75 nm long and 14 nm to 18 nm wide. The nucleic acid type was dsDNA and the genome about 45 kb. Besides, it was not sensitive to chloroform. In conclusion, bacteriophage Φ V170 belongs to *Caudovirales* and *Myoviridae*. The bacteriophage V170 can lyse 7 of 15 strains of *Vibrio alginolyticus*, possessing a broad host spectrum within the species. The optimal multiplicity of infection (MOI) was 0.01. One-step growth curve shows that the incubation period of Φ V170 was 10 min and the amount of lysis was 101.3. Phage Φ V170 was sensitive above 65 °C. **[Conclusion]** A lytic bacteriophage was isolated with potential functions to treat alginolyticosis in marine aquaculture.

Keywords: Phage, *Vibrio alginolyticus*, Phage therapy, *Penaeus vannamei*, Biological characteristics

溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)是导致鱼^[1]、虾^[2]和贝^[3]等海水养殖动物暴发严重疾病的重要条件病原体之一, 对人也有致病性^[4]。近年来, 随着对虾养殖模式由粗放化向高密度集约化的快速转变, 导致病害频发。使用抗生素及化学消毒剂等传统的治疗方法产生了诸多问题, 例如细菌产生耐药性、病原菌传播引发安全问题、养殖水环境微生态失衡、人类生存环境遭受毒害等。这些问题导致由弧菌等引发的对虾细菌性病害难以有效治疗, 成为制约凡纳滨对虾养殖可持续发展的一个关键性因素^[5]。当前, 随着人们生活水平的日益提高, 绿色、健康的生物防治越来越受到人们的重视, 这也敦促我们要寻找一种安全、有效的防控策略, 以提高水产养殖效率、水产品质量和安全性。

噬菌体作为一种新兴的微生态抗菌剂, 因其具有替代抗生素治疗疾病的潜在可能, 已受到越来越多的关注^[6]。许多研究表明, 噬菌体用于治疗弧菌病取得了良好效果。Vinod 等^[7]研究结果表明, 在哈维氏弧菌存在的条件下使用噬菌体治疗

的幼虾组存活率相较于空白对照组由 10% 提高到了 40%; Stalin 等^[8]研究证实了在水产养殖系统中应用噬菌体可以作为预防和治疗对虾副溶血弧菌病的有效方式; Li 等^[9]运用“鸡尾酒疗法”将 3 株噬菌体等比例混合后用于治疗海参灿烂弧菌病的效果优于单株; Sasikala 等^[10]研究的噬菌体可以裂解 6 株溶藻弧菌, 能有效控制溶藻弧菌的数量; 李男^[11]的研究表明, 分离的 2 株噬菌体只能裂解自身宿主, 而不能裂解其他弧菌。

噬菌体用于治疗细菌疾病的潜在价值不言而喻, 但因噬菌体具有高度的宿主特异性, 裂解谱普遍较窄, 极大限制了噬菌体治疗的发展, 因此开展宽谱噬菌体的研究工作对于噬菌体抗菌剂的发展就显得尤为重要。本研究利用溶藻弧菌 V170, 从凡纳滨对虾养殖水中分离出一株宽谱裂解性噬菌体 Φ V170, 进行了电镜观察噬菌体形态、最佳感染复数、一步生长曲线、裂解谱、热稳定性、氯仿敏感性等生物学特性的研究, 以及基因组酶切分析, 为新型噬菌体抗菌剂的开发奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株来源

分离和噬菌谱检测用的宿主菌株均由本实验室保藏, 其中溶藻弧菌菌株 V170 从养殖凡纳滨对虾肝胰腺中分离获得。

1.1.2 主要试剂和仪器

TCBS、LB 和 NA 培养基, 青岛海博生物技术有限公司; SM 缓冲液, 北京诺博莱德科技有限公司; DL15000、DL2000、DNase I、RNase A 和限制性内切酶 *EcoR* I、*EcoR* V、*Bam*H I、*Hind* III, TaKaRa 公司; TIANamp 病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒, 天根生化科技有限公司。透射电子显微镜, FEI 公司; PCR 仪, Biometra 公司。

1.2 方 法

1.2.1 噬菌体的分离与鉴定

取广东惠州平海地区 5 个凡纳滨对虾养殖场的养殖水样, 混合均匀; 将生长至对数期的溶藻弧菌宿主菌液倒入混合水样中, 体积分数 10%, 30 °C 恒温培养 24 h, 不时搅动, 对潜在的噬菌体进行富集。然后取 2 mL 水样 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液并用 0.22 μ m 滤器过滤, 采用斑点法^[12]观察有无噬菌斑出现。如果有空斑出现, 则采用双层平板法^[13]进一步验证, 观察有无单个噬菌斑出现。如果出现, 即确定获得了以 V170 为宿主菌的溶藻弧菌噬菌体。

1.2.2 噬菌体的纯化

采用双层平板法进行纯化。以生理盐水作为稀释液, 将噬菌体原液按 10 倍梯度稀释至合适浓度, 各取 0.1 mL 处于对数生长期的宿主菌液与噬菌体原液, 沿管壁依次加到 8 mL 冷却至 50 °C 左右的 LB 半固体培养基(琼脂浓度 0.65%)中, 混匀后迅速倒入准备好的 NA 固体培养基(琼脂浓度 1.5%)上制成双层平板; 待凝固后, 将平板倒置于 33 °C 恒温培养箱中培养 6–24 h; 用 1 mL 滤芯枪头从双层平板中挪取直径最大、中心通透的噬菌

斑, 吹打至 1 mL SM 缓冲液中, 振荡 15 s, 4 °C 放置过夜^[14]。继续用生理盐水稀释至 10^{-3} – 10^{-5} , 重复上述步骤 5–10 次, 直至获得大小一致的噬菌斑, 即纯化完成。

1.2.3 噬菌体效价的测定

噬菌体效价即噬菌体的滴度(Titer), 是指每毫升样品中含有侵染活性的噬菌体数量, 又称噬菌斑形成单位(Plaque-forming unit, PFU)^[15], 目前常用双层平板法进行检测。本研究采用生理盐水作为稀释液, 将纯化后的噬菌体进行 10 倍比稀释, 选取合适的梯度进行双层平板法检测。培养 6–24 h 至噬菌斑清晰可见为宜, 观察记录噬菌斑的数量。上述每个稀释度做 3 个平板, 每个平板上噬菌斑的数目在 30–300 之间为有效数据, 取平均数并计算效价:

噬菌体的效价(PFU/mL)=稀释倍数 \times 平均噬菌斑数/所取样品体积。

1.2.4 噬菌体的增殖

利用双层平板法进行固体增殖。将纯化好的噬菌体制成双层板, 使噬菌斑在 24 h 内铺满平板为宜; 刮取双层板上层部分到装有 5 mL SM 缓冲液的离心管中, 振荡 30 s, 4 °C 放置过夜; 将离心管取出, 再次振荡 30 s, 10 000 r/min 离心 1 min, 重复 1 次; 吸取 2 mL 上清液至无菌 EP 管中, 10 000 r/min 离心 3 min, 取上清液, 用 0.22 μ m 滤器过滤, 得到噬菌体富集液($>10^{10}$ PFU/mL), 4 °C 保存备用。

1.2.5 噬菌体的电镜观察

取 1.2.4 中的噬菌体增殖液 20 μ L ($>10^{10}$ PFU/mL) 滴到 300 目碳膜铜网上沉淀吸附 40 min, 2%磷钨酸(PTA)负染 30 s, 室温干燥 2 h, 用透射电子显微镜(TEM)观察噬菌体的形态。

1.2.6 噬菌体 Φ V170 基因组的提取和酶切分析

取 200 μ L 噬菌体增殖液, 分别加入 DNase I 与 RNase A 至终浓度为 8 U/mL 和 2 mg/mL, 37 °C 消化 1 h, 80 °C 灭活 15 min, 目的是排除噬菌体

悬液中宿主菌 DNA/RNA 的干扰。利用 TIANamp 病毒基因组 DNA/RNA 试剂盒提取噬菌体基因组 (>100 ng/ μ L)。

将噬菌体基因组分别用 DNase I、RNase A 和限制性内切酶 *EcoR* I、*EcoR* V、*Bam*H I 及 *Hind* III 于 37 °C 酶解 1 h。采用 10 μ L 反应体系^[16]：噬菌体核酸 8 μ L，酶 1 μ L，10×Loading buffer 1 μ L。将酶切产物于 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳 (110 V) 22 min，使用凝胶成像系统观察电泳结果。

1.2.7 噬菌体 Φ V170 对氯仿的敏感性^[17]

验证噬菌体对氯仿是否敏感，推断噬菌体是否含有脂类物质。室温下将噬菌体悬液 (滴度为 7.80×10^8 PFU/mL) 与氯仿混合，体积比 3:1，振荡 5 min 后 10 000 r/min 离心 1 min，静置直至重新分层，测定噬菌体滴度。

1.2.8 噬菌体 Φ V170 裂解谱检测

参考赵俊杰^[18]的方法，略有改动。从本实验菌种库选取 15 株溶藻弧菌，取 1.2.4 中得到的噬菌体增殖液与各菌株进行裂解试验，测定裂解谱。将受试菌培养过夜至对数期，进行斑点法试验。取 200 μ L 菌液涂 NA 平板，25 °C 静置 20 min；再吸取 20 μ L 噬菌体富集液滴于 NA 板上，室温静置 20 min，待噬菌体富集液被吸收后，倒置于 33 °C 培养箱中于 6–24 h 观察有无噬菌斑产生。

1.2.9 噬菌体最佳感染复数测定

感染复数 (Multiplicity of infection, MOI) 是感染初始噬菌体与细菌的数量比值。最佳感染复数是可使噬菌体获得最佳生长状态时的感染复数。本研究在邢少贞等^[19]方法的基础上进一步改进。将噬菌体混合液和宿主菌液按照 MOI 为 1 000、100、10、1、0.1、0.01、0.001、0.000 1、0.000 01 的比例各取 50 μ L 加入 900 μ L 新鲜无菌的 LB 肉汤培养基中，总体积为 1 mL，33 °C、150 r/min 振荡培养 8 h；10 000 r/min 离心 3 min，取上清，0.22 μ m 滤器过滤，双层平板法测定噬菌体的滴度，其中噬菌体滴度最高的 MOI 即为最佳感染复数。

1.2.10 噬菌体一步生长曲线测定

参考李男^[11]的方法，略有改动。将浓度为 4.0×10^7 CFU/mL 的菌液，按照 MOI 为 0.01 的比例加入噬菌体 Φ V170，振荡 15 s，33 °C 温育 20 min，使噬菌体在宿主上充分吸附；10 000 r/min 离心 3 min，弃上清，LB 液体培养基洗涤 2 次；加入 1 mL LB 液体培养基重悬，吸取 100 μ L 到无菌 50 mL LB 肉汤培养基中，置于 33 °C 培养箱中振荡培养，分别在 0、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110 和 120 min 时间点取样，测定噬菌体滴度并绘制 Φ V170 的一步生长曲线。

裂解量 = 裂解末期噬菌体效价 / 感染初期宿主菌浓度。

1.2.11 噬菌体 Φ V170 的热稳定性

首先将噬菌体裂解液分装 1 mL 于多个无菌 EP 管中。

(1) 测定短时间内 (0.5 h 和 1 h) 噬菌体及其宿主的耐受温度。将 EP 管分别置于不同温度 (30、40、45、50、55、60、65、70、80 °C) 下作用 0.5 h 和 1 h。取出冷却至室温，10 倍梯度稀释，采用双层平板法计算噬菌体效价，裂解液中的宿主菌采用 TCBS 平板涂布法计数并计算其效价，每个梯度 3 个平行。

(2) 测定噬菌体在耐受高温作用下的衰减趋势。噬菌体放置在耐受高温 (60 °C) 下，取 0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、8、12、24、36、48 h 共 12 个时间点，采用双层平板法绘制噬菌体在高温下的衰减曲线，每个梯度 3 个平行。

2 结果与分析

2.1 噬菌体 Φ V170 的形态

以溶藻弧菌 V170 为宿主菌，经 5 次纯化，分离到一株裂解性溶藻弧菌噬菌体 Φ V170。该噬菌体双层平板法培养 12 h 形成到直径约 1.5 mm 的噬菌斑 (图 1A、B)，噬菌斑清晰透亮，大小一致，无晕环。电镜观察，该噬菌体头部具有正廿面体结构 (图 1C)，头部直径 60 nm–65 nm，尾长 65 nm–75 nm，宽 14 nm–18 nm。

2.2 基因组酶切分析结果

通过酶切分析结果可知, Φ V170 的基因组能被 DNase I 降解, 不能被 RNase A 降解, 说明噬菌体核酸类型为 DNA。基因组中含有 *Hind* III 酶切位点(被切开), 不含有 *Eco*R I、*Eco*R V、*Bam*H I 酶切位点(图 2)。据估算, 基因组大小约为 45 kb。

2.3 噬菌体 Φ V170 对氯仿的敏感性

经过氯仿处理后, 噬菌体 Φ V170 的滴度由最初的 7.80×10^8 PFU/mL 下降到 6.85×10^8 PFU/mL, 滴度没有发生明显变化(图 3), 表明噬菌体对氯仿不敏感, 即外壳无脂质包膜。

上述研究结果表明, 溶藻弧菌噬菌体 Φ V170 头部为正廿面体、直径 60 nm–65 nm, 尾部(14–18) nm \times (65–75) nm, 核酸类型 dsDNA, 基因组大小约为 45 kb, 外壳无囊膜。根据国际病毒分类委员会 (ICTV) 第九次报告的病毒分类系统^[20], 溶藻弧菌噬菌体 Φ V170 在分类上属于有尾噬菌体目 (*Caudovirales*) 肌尾噬菌体科 (*Myoviridae*)。

2.4 噬菌体 Φ V170 对 15 株溶藻弧菌的裂解谱

噬菌体 Φ V170 采用斑点法对 15 株溶藻弧菌进行裂解试验(表 1)。结果显示噬菌体对 7 株溶藻弧菌有裂解能力, 覆盖率为 46.7%。其中对 V114、V130、V173 及宿主 V170 裂解效果好(图 4)。

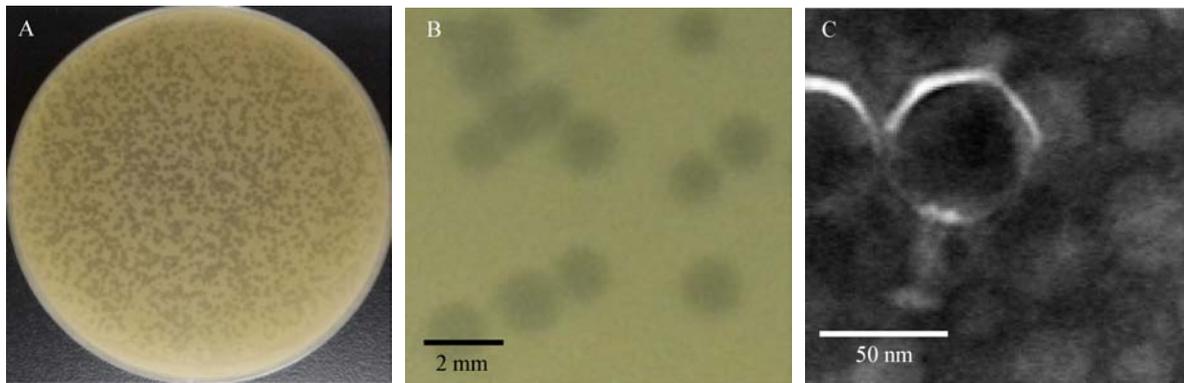


图 1 噬菌体 Φ V170 形成的噬菌斑(A、B)以及显微形态(C)

Figure 1 The plaques (A, B) formed by Φ V170 and the morphology (C) of phage Φ V170

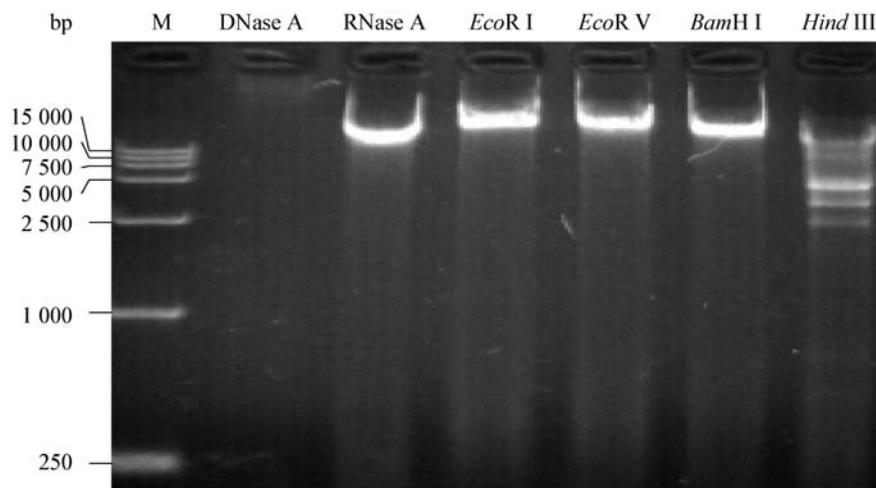


图 2 噬菌体 Φ V170 基因组酶切图谱

Figure 2 DNA restriction endonuclease digestion of Φ V170

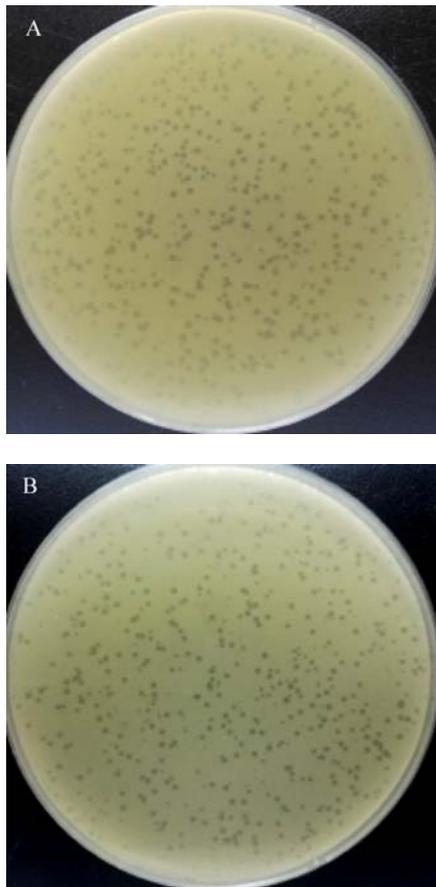


图3 噬菌体 Φ V170 对氯仿的敏感性
Figure 3 Sensitivity of phage Φ V170 to chloroform

注: A: 未加氯仿; B: 加氯仿。
Note: A: Without chloroform; B: Add chloroform.

2.5 噬菌体 Φ V170 的最佳感染复数

将噬菌体和宿主菌混合培养 8 h, 双层平板法测定各 MOI 的噬菌体滴度(表 2)。噬菌体与宿主菌的个数比为 1:100 时, 即 MOI=0.01, 噬菌体滴度最高, 达到 1.10×10^{10} PFU/mL。所以噬菌体 Φ V170 的最佳感染复数为 0.01, 此时产出率最高。

2.6 噬菌体 Φ V170 的一步生长曲线

研究噬菌体的一步生长曲线规律可以了解噬菌体的裂解性能。由 0 开始, 每隔 10 min 用双层平板法计数(图 5)。0–10 min 为潜伏期, 噬菌体数量基本没有变化; 10–50 min 时, 噬菌体的滴度急剧增加, 整个暴发期持续 40 min。根据裂解量公式, 即得出裂解量为 101.3。

表 1 噬菌体 Φ V170 对 15 株溶藻弧菌的裂解谱

Table 1 The lytic spectrum of 15 strains of *Vibrio alginolyticus* by phage V170

菌株 Strains	菌株来源地 Origin of the strain	分离部位 Separation site	噬菌斑形成情况 Plaque formation
V039	福建漳浦 Zhangpu, Fujian	养殖水体 Aquaculture water	-
V067	福建长乐 Changle, Fujian	养殖水体 Aquaculture water	-
V114	福建长乐 Changle, Fujian	养殖水体 Aquaculture water	+
V130	福建长乐 Changle, Fujian	养殖水体 Aquaculture water	+
V141	福建长乐 Changle, Fujian	养殖水体 Aquaculture water	-
V154	福建长乐 Changle, Fujian	养殖水体 Aquaculture water	+
V170	广东汕尾 Shanwei, Guangdong	虾体 Shrimp	+
V172	广东汕尾 Shanwei, Guangdong	养殖水体 Aquaculture water	+
V173	广东汕尾 Shanwei, Guangdong	虾体 Shrimp	+
V177	广东汕尾 Shanwei, Guangdong	养殖水体 Aquaculture water	+
V195	山东滨州 Binzhou, Shandong	养殖水体 Aquaculture water	-
V201	山东滨州 Binzhou, Shandong	虾体 Shrimp	-
V208	山东滨州 Binzhou, Shandong	养殖水体 Aquaculture water	-
V213	山东滨州 Binzhou, Shandong	虾体 Shrimp	-
V214	山东滨州 Binzhou, Shandong	虾体 Shrimp	-

注: +: 有斑; -: 无斑。

Note: +: Plaque; -: No plaque.

2.7 噬菌体 Φ V170 与宿主的热稳定性

研究噬菌体与宿主对高温耐受能力的差异, 对噬菌体抗菌剂生产中灭活宿主菌具有重要指导意义。实验结果显示(图 6), 噬菌体 Φ V170 相对于宿主可耐受更高的温度。温育温度在 30–60 °C 之间,

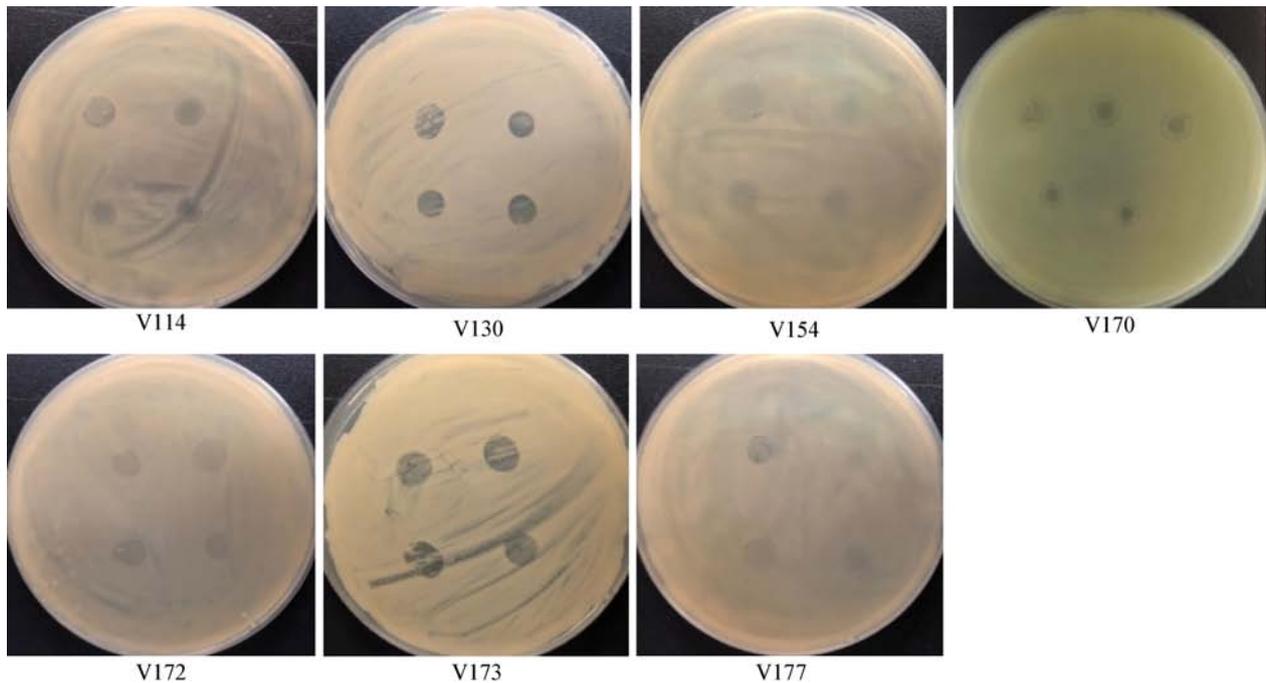
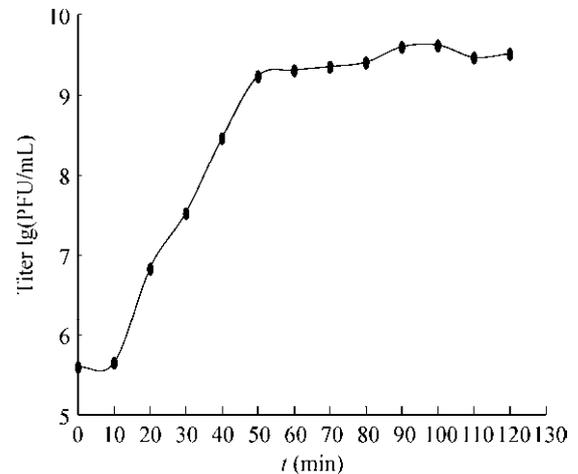
图4 噬菌体 Φ V170 裂解 7 株溶藻弧菌的噬菌斑(斑点法)Figure 4 Plaque of phage Φ V170 formed by lysing 7 strains of *Vibrio alginolyticus* (speckling method)表2 噬菌体 Φ V170 最佳感染复数

Table 2 The optimal multiplicity of infection (MOI) of bacteriophage V170

编号 No.	噬菌体浓度 Phage (PFU/mL)	细菌浓度 Bacteria (CFU/mL)	感染复数 MOI	8 h 滴度 8 h Titer (PFU/mL)
1	10^9	10^6	1 000	9.30×10^7
2	10^9	10^7	100	1.54×10^8
3	10^9	10^8	10	1.43×10^9
4	10^8	10^8	1	4.60×10^9
5	10^7	10^8	0.1	9.80×10^9
6	10^6	10^8	0.01	1.10×10^{10}
7	10^5	10^8	0.001	1.32×10^8
8	10^4	10^8	0.000 1	2.80×10^6
9	10^3	10^8	0.000 01	2.00×10^5

作用时间为 0.5 h 和 1 h 时, 噬菌体 Φ V170 (初始 4.67×10^9 PFU/mL) 能保持较高的效价。60 °C 时效价为 3.61×10^9 PFU/mL (0.5 h) 和 3.18×10^9 PFU/mL (1 h), 与 30 °C 时基本在一个数量级。而 65 °C 时迅速下降至 1.74×10^8 PFU/mL (0.5 h) 和 1.50×10^8 PFU/mL

图5 噬菌体 Φ V170 的一步生长曲线Figure 5 One-step growth curve of phage Φ V170

(1 h), 80 °C 时噬菌体效价均为 0。而对于宿主菌(初始 3.30×10^7 CFU/mL)而言, 其效价在 40 °C 时几乎没有变化, 45 °C 时存活率急剧下降至 1.80×10^6 CFU/mL (0.5 h) 和 2.50×10^5 CFU/mL (1 h), 50 °C 全部失活。

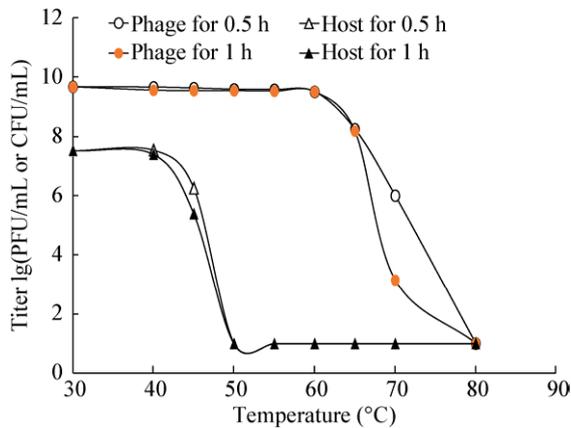


图6 噬菌体 Φ V170 及其宿主作用 0.5 h 和 1 h 的耐受温度

Figure 6 Tolerance temperatures of bacteriophage and host V170 during 0.5 h and 1 h

噬菌体放置在耐受高温(60 °C)下, 随着时间的增加 Φ V170 滴度逐渐降低。2 h 时噬菌体存活数为 1.53×10^9 PFU/mL; 4 h 时噬菌体滴度 (4.52×10^8 PFU/mL) 下降一个数量级; 24 h 时噬菌体滴度 (2.05×10^7 PFU/mL) 下降 2 个数量级, 存活率约 1%; 48 h 时仍有浓度为 2.05×10^6 PFU/mL 的噬菌体存活(图 7)。由研究结果可见, 温度在 60 °C 时作用 0.5–1 h, 既可灭活宿主菌的同时噬菌体又能保持较高的滴度。但该温度下作用时间不宜超过 2 h, 时间太长对噬菌体的活力有较大影响。

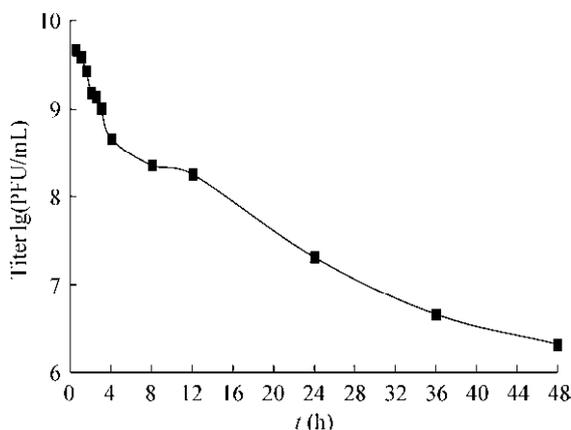


图7 噬菌体 Φ V170 在耐受高温(60 °C)下的衰减曲线

Figure 7 The attenuation curve of bacteriophage V170 at high temperature of 60 °C

3 讨论与结论

随着细菌耐药性问题, 特别是“超级细菌”的出现, 运用抗生素进行抗菌治疗面临着巨大的挑战。然而噬菌体治疗具有其独特的优势: 能自我扩增, 消灭病原菌之后自我死亡; 特异性强, 只针对特定的病原菌, 对人体、动植物和环境没有任何毒副作用等^[21]。噬菌体治疗中噬菌体抗菌剂的研发及应用研究必不可少, 已成为研究的热点, 受到了广大专家学者的普遍关注。2016 年第二届噬菌体国际学术研讨会指出噬菌体治疗是抵御抗药性的一种战略, 是蒸蒸日上的朝阳产业。2017 年 10 月, 第五届针对传染病世界大会上也重申了这一点。

目前已报道的能够感染溶藻弧菌的噬菌体有多种形态, 其中 Kalatzis 等^[1]、Sasikala 等^[10]报道的能够感染溶藻弧菌的噬菌体与 Φ V170 同属有尾噬菌体目 (Caudovirales) 肌尾噬菌体科 (Myohoviridae)。肌尾噬菌体科有以下特征: 头部呈廿面体或正廿面体, 头部直径 60 nm–145 nm, 有尾, 尾部为 (16–20) nm × (80–455) nm, 有尾鞘, 核酸类型为 dsDNA, 大小为 31–317 kb。根据这些特征可以判断噬菌体 Φ V170 属于肌尾噬菌体科中个体较小且尾相对较短的一种。

噬菌体具有极强的宿主特异性, 裂解谱窄的噬菌体通常不能满足治疗要求, 所以宽谱噬菌体的研究更有意义。随着更多广谱噬菌体的发现, 噬菌体抗菌剂的“鸡尾酒疗法”也会提高其裂解谱的覆盖率。Li 等^[9]报道的噬菌体可以裂解 4 株灿烂弧菌, 不能裂解其他弧菌。Sasikala 等^[10]研究报道分离的噬菌体 VP01 可以裂解除溶藻弧菌以外的拟态弧菌、创伤弧菌和 *V. mediterraneii*。本研究中噬菌体 Φ V170 能够裂解 7 株溶藻弧菌, 裂解谱较宽。从受试菌株的来源地来看, 能够被裂解的 7 株溶藻弧菌来自福建长乐和广东汕尾, 距离 Φ V170 分离地的地理位置相对较近; 而来自距离 Φ V170 分离地相对较远的山东滨州地区的 5 株溶

藻弧菌不能被裂解, 这说明噬菌体的宿主特异性可能存在一定的地域关联。

研究最佳感染复数能够了解噬菌体的裂解效率, 可对实际生产噬菌体抗菌剂起到指导作用。Kalatzis 等^[1]报道了噬菌体 Φ St2 和 Φ Grn1 的最佳 MOI 分别为 10 和 100; 曾林等^[22]的研究中最佳 MOI 为 10; Li 等^[23]的研究中最佳感染复数为 1; 也有研究报道^[24]最佳感染复数为 0.000 1。在本研究中, Φ V170 的最佳感染复数为 0.01, 具有较高的裂解效率, 即少量的噬菌体母液就可产生大量的噬菌体, 在噬菌体抗菌剂生产中可降低生产成本, 提高生产效率。

研究噬菌体的一步生长曲线能够掌握噬菌体增殖规律和确定最短生产周期, 对噬菌体抗菌剂的生产及应用有重要意义。Ripabelli 等^[3]报道噬菌体的潜伏期为 30 min, 裂解期为 30 min; Stalin 等^[8]报道的 3 株噬菌体的潜伏期分别为 20、10 和 20 min, 裂解期为 50、50 和 60 min。由此可见, 噬菌体 Φ V170 潜伏期较短(10 min), 暴发期适中(40 min), 裂解量较高(101.3), 具有较好的裂解性能, 短时间内即可完成整个裂解过程。这对于生产而言, 能够缩短生产周期并达到快速生产的效果。

研究裂解液中噬菌体及宿主菌的耐受高温并确定其温度耐受相反区间, 是为了更好地灭活裂解液中的宿主, 避免噬菌体抗菌剂在实际应用过程中对水环境造成二次危害, 更好地指导噬菌体抗菌剂的生产及应用。曾林等^[22]报道的溶藻弧菌噬菌体对 60 °C 以下的温度耐受性较强, 对 65 °C 以上的高温敏感, 与本研究结果基本一致。在此基础上我们研究了裂解液中宿主菌的耐受高温, 发现噬菌体与宿主菌在 50–60 °C 之间热稳定性截然相反, Φ V170 在 50–60 °C 之间滴度几乎无变化, 而宿主菌在 50 °C 作用 30 min 即全部失活。由此可以推断, 噬菌体裂解液可以通过控制温度完成对宿主菌的灭活, 还能保证噬菌体的较高滴度。

综合分析噬菌体 Φ V170 的各项生物学特性, 可知该噬菌体有非常大的潜力, 可以用于新型噬菌体抗菌剂的研发。随着大量的噬菌体被发现, 噬菌体会像细菌一样, 逐渐进入细化、优选、整合的阶段。而裂解谱广、裂解速度快、抗极端条件强、宿主菌无害的噬菌体会脱颖而出, 随之噬菌体抗菌剂会大量涌现, 细菌性疾病的治疗将由“后抗生素时代”转向“噬菌体时代”。

REFERENCES

- [1] Kalatzis PG, Bastias R, Kokkari C, et al. Isolation and characterization of two lytic bacteriophages, ϕ St2 and ϕ Grn1; phage therapy application for biological control of *Vibrio alginolyticus* in aquaculture live feeds[J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0151101
- [2] Luo CX, Huang XX, Li S, et al. Expressions of Toll receptor, IMD and lysozyme mRNA in the gills of the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) after acute challenge with *Vibrio alginolyticus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(1): 189-196 (in Chinese)
罗词兴, 黄旭雄, 李桑, 等. 溶藻弧菌感染后凡纳滨对虾鳃组织免疫相关基因的表达[J]. 中国水产科学, 2014, 21(1): 189-196
- [3] Ripabelli G, Sammarco ML, Grasso GM, et al. Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* (mussels) harvested from Adriatic Sea, Italy[J]. International Journal of Food Microbiology, 1999, 49(1/2): 43-48
- [4] Lee DY, Moon SY, Lee SO, et al. Septic shock due to *Vibrio alginolyticus* in a cirrhotic patient: the first case in Korea[J]. Yonsei Medical Journal, 2008, 49(2): 329-332
- [5] Wang DH. A study on the problems and countermeasures of scale economy of marine aquaculture in China[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2014 (in Chinese)
王大海. 海水养殖业发展规模经济及规模效率研究[D]. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 2014
- [6] Cao ZH. Isolation, identification and application of *Pseudomonas aeruginosa* lytic bacteriophages[D]. Dalian: Doctoral Dissertation of Dalian University of Technology, 2015 (in Chinese)
曹振辉. 铜绿假单胞菌裂解性噬菌体的筛选、鉴定及应用[D]. 大连: 大连理工大学博士学位论文, 2015
- [7] Vinod MG, Shivu MM, Umesha KR, et al. Isolation of *Vibrio harveyi* bacteriophage with a potential for biocontrol of luminous vibriosis in hatchery environments[J]. Aquaculture, 2006, 255(1/4): 117-124
- [8] Stalin N, Srinivasan P. Efficacy of potential phage cocktails against *Vibrio harveyi* and closely related *Vibrio* species isolated from shrimp aquaculture environment in the south east coast of India[J]. Veterinary Microbiology, 2017, 207: 83-96
- [9] Li Z, Li XY, Zhang JC, et al. Use of phages to control *Vibrio splendidus* infection in the juvenile sea cucumber *Apostichopus*

- japonicus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 54: 302-311
- [10] Sasikala D, Srinivasan P. Characterization of potential lytic bacteriophage against *Vibrio alginolyticus* and its therapeutic implications on biofilm dispersal[J]. Microbial Pathogenesis, 2016, 101: 24-35
- [11] Li N. The separation and identification of bacteriophage of *Vibrio harveyi*, *Vibrio splendidus* and study of the biological characteristic[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2016 (in Chinese)
李男. 灿烂、哈维弧菌噬菌体的分离鉴定及其生物学特性的研究[D]. 大连: 大连海洋大学硕士学位论文, 2016
- [12] Lin YJ, Chen KC, Chen GL, et al. The isolation of *Vibrio alginolyticus* bacteriophage[J]. Acta Microbiologica Sinica, 1993, 33(4): 285-289 (in Chinese)
林业杰, 陈亢川, 陈拱立, 等. 溶藻弧菌噬菌体的分离[J]. 微生物学报, 1993, 33(4): 285-289
- [13] Gu JM, Xu W, Lei LC, et al. LysGH15, a novel bacteriophage lysin, protects a murine bacteremia model efficiently against lethal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2011, 49(1): 111-117
- [14] Su JF. Isolation, identification the phages of *Ralstonia solanacearum* and genomics of some phage[D]. Daqing: Master's Thesis of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2017 (in Chinese)
苏靖芳. 烟草青枯病菌噬菌体分离鉴定及部分噬菌体基因组学研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学硕士学位论文, 2017
- [15] Su JF, Sun JP, Gu G, et al. Isolation and biological characterization of virulent phage infecting *Ralstonia solanacearum*[J]. Tobacco Science & Technology, 2017, 50(10): 16-21 (in Chinese)
苏靖芳, 孙剑萍, 顾刚, 等. 烈性青枯雷尔氏菌噬菌体的分离与生物学特性分析[J]. 烟草科技, 2017, 50(10): 16-21
- [16] Zhang G, Huang DH, Jin J, et al. A preliminary study of the biological characteristics and genome of a lytic bacteriophage, LH-02, that infects *Klebsiella pneumoniae*[J]. Journal of Pathogen Biology, 2016, 11(1): 9-12 (in Chinese)
张改, 黄德海, 靳静, 等. 肺炎克雷伯菌噬菌体 LH-02 的生物学特性及基因组初步研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2016, 11(1): 9-12
- [17] Hong W, Han J, Dai X, et al. Isolation and characterization of a *Thermus* lytic bacteriophage from Tengchong Rehai hot spring[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(3): 322-327 (in Chinese)
洪伟, 韩剑, 戴欣, 等. 腾冲热海一株栖热菌裂解性噬菌体的分离及其特征[J]. 微生物学报, 2010, 50(3): 322-327
- [18] Zhao JJ. *E. coli* phage LZZ-17 biochemical characteristics and genome-wide research[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Gansu Agricultural University, 2016 (in Chinese)
赵俊杰. 大肠杆菌噬菌体 LZZ-17 生化特性及全基因组学研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文, 2016
- [19] Xing SZ, Zhang XLL, Pei GQ, et al. Characterization and genome analysis of a novel bacteriophage vB_EfaP_IME195 infecting *Enterococcus faecalis*[J]. Microbiology China, 2017, 44(2): 305-313 (in Chinese)
邢少贞, 张湘莉兰, 裴广倩, 等. 粪肠球菌噬菌体 vB_EfaP_IME195 的生物学特性及其全基因组分析[J]. 微生物学通报, 2017, 44(2): 305-313
- [20] Feng Y, Liu J, Sun Y, et al. An introduction to current classification and nomenclature of bacterial viruses[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2013, 33(12): 1954-1958 (in Chinese)
冯焯, 刘军, 孙杨, 等. 噬菌体最新分类与命名[J]. 中国兽医学报, 2013, 33(12): 1954-1958
- [21] Liu FN. Practise medicine offers to benefit for society--the 2nd Bacteriophage meeting Wuhan, China[J]. China High-tech Zone, 2016(19): 27-30 (in Chinese)
刘芳男. 悬壶济世 造福社会——第二届噬菌体国际学术研讨会在武汉成功召开[J]. 中国高新区, 2016(19): 27-30
- [22] Zeng L, Qiu DQ, Xie JH, et al. A study of the biochemical characteristics of the *Vibrio alginolyticus* bacteriophage[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2012, 32(1): 24-29 (in Chinese)
曾林, 邱德全, 谢警鸿, 等. 一株溶藻弧菌噬菌体的生理特性研究[J]. 广东海洋大学学报, 2012, 32(1): 24-29
- [23] Li SF, Deng RL, Zhang SL, et al. Isolation and biological characteristics of bacteriophage of an antibiotic-resistant *Escherchia coli* strain[J]. Agricultural Science & Technology, 2016, 17(12): 2692-2695
- [24] Song ZF, Xu HD, Peng MF, et al. Isolation and identification of two lytic phages against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2017, 41(4): 793-799 (in Chinese)
宋增福, 徐华东, 彭孟凡, 等. 两株副溶血弧菌烈性噬菌体的分离鉴定[J]. 水生生物学报, 2017, 41(4): 793-799