

大连近海河流弧菌Ⅱ噬菌体的分离与研究*

宁淑香 聂丽平** 邹侠 陆敏

(辽宁师范大学生物系 大连 116029)

摘要: 1996年、1997年两个夏季(5~8月)、从大连市水产养殖公司所属的不同的皱纹盘鲍养殖区采集海水及海底淤积物样品共76个。以河流弧菌Ⅱ(*Vibrio fluvialis*)为指示菌,从这些样品中分离到19株噬菌体。对它们进行了电子显微镜的观察,结果发现它们均属于Bradley A型。进一步的血清型分析表明,这19株噬菌体分别属于4个血清型,并对这4个血清型的代表株VP1, VP2, VP4及VP8进行了寄主范围、一次生长曲线测定及其他生物学特性的初步分析。

关键词: 河流弧菌Ⅱ, 噬菌体, 血清型, 皱纹盘鲍

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 06-0020-04

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIOPHAGES OF *VIBRIO FLUVIALIS* II IN THE COASTAL WATERS OF YELLOW SEA, DALIAN

NING Shu-Xiang NIE Ling-Ping ZOU Xia LU Min

(Biology Department of Liaoning Normal University, Dalian 116029)

Abstract: Using *Vibrio fluvialis* II as host bacteria, 19 bacteriophages have been isolated from the 76 samples which were collected from *Haliotis discus hannai* ~ growing seawater in Dalian marine culture company Dalian, Liaoning province from May in 1996 to August I 1997. Ultrastructure of 19 bacteriophages were observed with electron to Bradley the results showed that of these bacteriophages belonged to Bradley A type, they have hexagonal heads of bacteriophages were identified with VP1, VP2, VP4, VP8 as representatives respectively. The phages remain stable at pH6.0 ~ 10.0, moreover VP2, VP4 and VP8 are rather stable at basic pHs. Although the characterization of heat inactivation course of VP4 is different from others, four phages are sensitive to heat and inactivated at 80°C in 5 minutes. One step growth experiment showed that the eclipse period of VP1, VP2, VP4, VP8 are sensitive to heat and the eclipse period of VP1, VP2, VP4, VP8 are 42, 30, 46, 28 minutes. In this experiment we have isolated at least four different types phages, it suggest that in fact there is a population of phages in the seawater environment. The result of this study provided a way to find the potential value of phages as an indicator of pathogenic microorganisms *Vibrio fluvialis* II in marine environment.

Key words: *Vibrio fluvialis* II, Bacteriophages, Serotypes, *Haliotis discus hannai*

近年来,人们对海洋环境中噬菌体的研究兴趣日益增长。随着技术的发展,海洋环境中噬菌体的存在及其重要作用得到了认可。噬菌体广泛地存在于海洋环境中,电子显微镜研究结果表明,海水中噬菌体的数量可达 $10^4 \sim 10^7/\text{mL}^{[1]}$;海洋中的细菌,蓝细菌及真核微生物都发现有它们的噬菌体存在;它们对海洋环境中的细菌的群落、类型和数量等的变化产生重要的影响^[2]。此外,噬菌体作为指示微生物,在监测海洋环境,指示污染程度等方面的研究也有了一些进展^[3~4]。因此,分离和研究海洋环境中的噬菌体,进而弄清它们在海洋环境中生态学、遗传学等作用具有十分重要的意义。

* 辽宁省自然科学基金资助项目 (No.9522033)

** 联系人

收稿日期: 2001-07-06, 修回日期: 2001-11-30

河流弧菌Ⅱ (*Vibrio fluvialis* Ⅱ) 大量存在于海水中, 近年来, 曾多次导致大连地区人工养殖的皱纹盘鲍暴发脓包病^[5], 给大连地区海水养殖业造成了严重的经济损失。1991年以来, 本实验室一直从事皱纹盘鲍病害的防治工作, 为了探寻行之有效的快速检测及控制河流弧菌的方法, 开展了河流弧菌噬菌体的研究工作。我们从采自大连海域皱纹盘鲍养殖区的海水、海底淤积物中分离河流弧菌噬菌体, 并对它们进行了电子显微镜观察, 血清学分析和一系列的生物学特性研究。有关河流弧菌-噬菌体的研究国内外均未见报道, 本文属首次。

1 材料与方法

1.1 菌株

噬菌体分离所用的指示菌为河流弧菌-9301, 用于宿主范围测定的菌株共8株: 河流弧菌Ⅱ 9302, 9401, 9402, 9403, 9404, 9501, 9502及9503均为本实验室保存。

1.2 培养基

培养河流弧菌及噬菌体分离所用的培养基为海水胰蛋白胨培养基。其中: 胰蛋白胨 10g, 酵母膏 5g, 陈海水 1000mL, pH7.2~7.5。制作底层培养基时, 加琼脂 15g; 制作上层培养基时, 加琼脂 7g。

1.3 样品的采集和噬菌体的分离

1996、1997年两个夏季, 从大连市水产养殖公司所属皱纹盘鲍养殖区的不同地点采集海水和海底淤积物, 每次采集10个样品, 每个样品为同一地点采集的3份不同水样或海底淤积物混合而成。为了分离噬菌体, 取海底淤积物 100g, 加入等量海水, 充分振荡 30min, 静置, 过滤, 取上清液 100mL 加入 50mL 3倍浓缩的海水胰蛋白胨及 2mL 浓度为 10^{12} 个/mL 的河流弧菌-菌悬液, 30℃培养过夜, 以促进噬菌体的增殖。海水样品过滤后按上述方法直接富集。经富集后的培养液加入 1/10 的氯仿, 30℃静置 1h, 于 4000r/min 离心 20min, 取上清液用于双层琼脂法分离噬菌体。为了纯化噬菌体, 挑取单斑连续传代, 重复进行 5 次以上, 选择平板上所有噬菌斑形态和大小基本一致的材料, 进行下一步研究。

1.4 电子显微镜观察

取纯化后效价达到 $10^{10} \sim 10^{12}$ PFU/mL 的噬菌体原液, 以 pH7.2, 2% 的磷钨酸负染 5min 后, 用电子显微镜进行观察。

1.5 抗噬菌体血清的制备和中和实验

按 Adams 法^[6]进行。制备的抗血清经 56℃处理 30min。

1.6 宿主范围测定

按 Feary 法^[7]进行。

1.7 一次生长曲线的测定

按 Adams 法^[6]进行。

1.8 热稳定性测定

参照余茂效等^[8]方法进行。

1.9 pH 稳定性的测定

按余茂效等^[8]方法进行, 处理介质同上。

2 结果与讨论

2.1 噬菌体的分离与纯化

在 1996 年和 1997 年两个夏季, 5~8 月间, 我们从大连水产养殖公司所属的皱纹盘鲍养殖海域, 分批采集海水样品及海底淤积物样品, 共采集到 76 个。利用双层琼脂法从这些样品中分离噬菌体, 一般在 30℃, 培养 16h, 即出现噬菌斑; 通过观察噬菌斑的形态及单斑分离进行纯化, 得到了 19 个不同的噬菌体。

2.2 噬菌体的电子显微镜观察

对上述 19 株噬菌斑大小、形态明显不同的噬菌体, 进行了电子显微镜观察。结果表

明它们在电子显微镜下的形态明显不同, 但是均属于 Bradley A 型。它们头部的平面轮廓均为六角形, 在尾髓外面具有可收缩的尾鞘并可见基板和尾锥。但不同的噬菌体各部位的大小有所不同。其中: VP1, VP2, VP4 及 VP8 的超微结构如图 1 所示。

2.3 血清型分析

噬菌体血清型特性的差异, 可以反映不同的噬菌体之间蛋白质外壳结构的不同, 因此, 血清学特性可以作为分类依据之一。利用血清中和反应将上述 19 株噬菌体分成了 4 类, 各类血清型的代表菌株分别为 VP1, VP2, VP4 和 VP8。在 19 株噬菌体中属于 VP1 型的有 7 株, 属于 VP2

型的有 6 株, 属于 VP4 型和 VP8 型的各有 3 株。表 1 指出了 4 株噬菌体的抗血清交叉中和反应结果, 此结果表明它们在血清学上是不相关的。

2.4 宿主范围测定

通过液体侵染和双层平板法测定, 均得到一致的结果, 4 个血清型的代表株 VP1, VP2, VP4, VP8 的宿主范围一致, 对 8 株河流弧菌 II (9302, 9401, 9402, 9403, 9404, 9501, 9502, 9503) 均能侵染。

2.5 一次生长曲线的测定

噬菌体的一次生长曲线测定结果指出, 4 种不同的噬菌体的潜伏期在 28~46min 之间 (图 2), 其中 VP1、VP2、VP4 及 VP8 的潜伏期分别为 42min、30min、46min 和 28min。VP1、VP2、VP4 和 VP8 的裂解量分别为 113、87、84 和 128。4 种噬菌体之间存在着明显的差异。

2.6 噬菌体热稳定性的测定

VP 系列噬菌体的热失活临界温度为 60℃~70℃之间, 80℃处理 5min 足以使全部游离

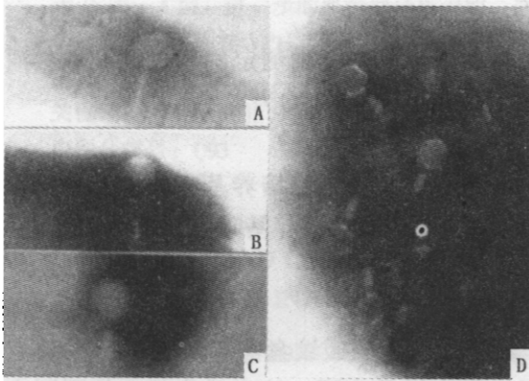


图 1 不同噬菌体的电子显微镜观察结果 (×120,000)

A VP1, B VP2, C VP4, D VP8

表 1 4 株噬菌体的抗血清交叉中和反应

抗血清 (稀释度 = 1:100)	噬菌体			
	VP1	VP2	VP4	VP8
VP1 K = 580	0	240	250	268
VP2 K = 540	242	0	265	264
VP4 K = 430	236	256	0	258
VP8 K = 620	239	235	261	0
对照 1%海水胰蛋白酶	244	237	259	271

注: 表中数据表示每个平皿噬菌斑的平均数目

表 2 不同 pH 条件下噬菌体的存活百分率

PH	噬菌体			
	VP1	VP2	VP4	VP8
4.0	1.7	3.6	~	3.8
5.0	34	52	1.4	47
6.0	64	80	68	76
7.0	100	82	100	82
8.0	84	100	91	100
9.0	65	100	88	89
10.0	56	88	73	87
11.0	34	76	71	51
12.0	30	50	54	47

的噬菌体失去活性。热失活过程曲线基本符合一级反应规律（图 3）。其中 VP1, VP2, VP8 3 株噬菌体的热失活曲线相近，而 VP4 的热失活曲线表现出明显的差异。

2.7 pH 对噬菌体稳定性的影响

pH 值对噬菌体的稳定性具有显著的影响。实验结果表明，4 株噬菌体 pH6.0 ~ 10.0 范围内比较稳定。表 2 指出 VP2、VP4、VP8 3 株噬菌体对碱性环境具有较强的抗性，在 pH 值高达 12.0 时，仍有约 50% 的存活率。值得注意的是，当 pH 值低于 4.0 所有 4 株噬菌体均不稳定，10min 内既失去活性。

以河流弧菌 II 为宿主，直接从海洋环境中分离到了至少 4 种不同血清型的噬菌体，也分离到了属于同一血清型，但形态结构明显不同的噬菌体（电子显微镜照片未给出）。这一结果表明，在海洋环境中实际上存在着一个噬菌体的群体。因此，可以预期不同的噬菌体的相对数量将会随着环境条件，尤其是宿主菌数量的变化而消长。分离和研究海洋噬菌体，弄清噬菌体与其宿主之间的生态学关系，对于监测海洋环境，控制海洋污染等方面的工作无疑具有指导意义。

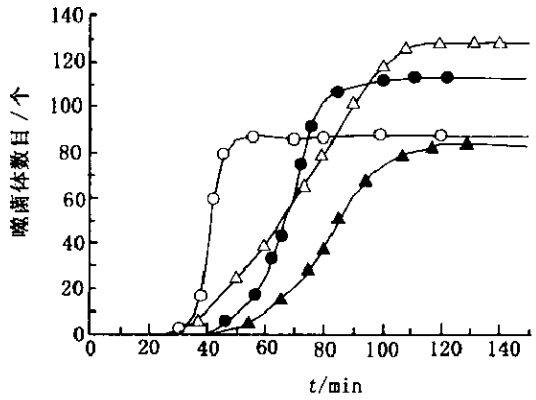


图 2 一次生长曲线

—●—VP1, —○—VP2, —△—VP8, —▲—VP4

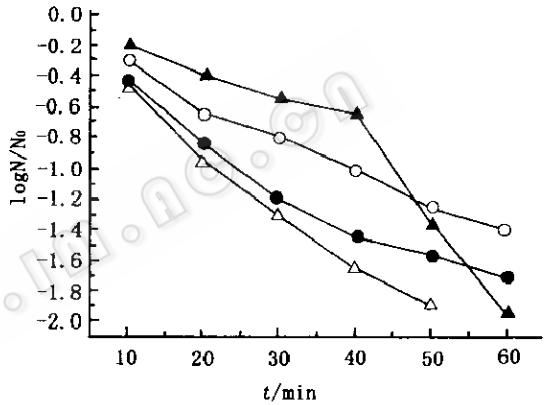


图 3 噬菌体的热失活曲线

—△—VP8, —●—VP1, —○—VP2, —▲—VP4

参考文献

[1] Wichels, Biel S S, Geldwelom H R, et al. Appl Environ Microbiol, 1998, 64 (11): 4128 ~ 4133.
[2] 陈世阳, 徐怀恕. 海洋湖沼通报, 1986, 24 (3): 69 (76).
[3] Fuller N J, Wilson W H, Joint I R, et al. Appl Environ Microbiol, 1998, 64 (6): 2051 ~ 2060.
[4] Wommack K E, Hill R T, Muller T A, et al. Appl Environ Microbiol, 1996, 62 (4): 1336 ~ 1340.
[5] 刘金屏, 聂丽平, 李太武, 等. 中国水产科学, 1995, 2 (2): 21 ~ 25.
[6] Adams M H, Wade E. J Bact, 1954, 68: 320 ~ 331.
[7] Feary, T W, Fisher, E, Fisher, Jr N, et al. J Bact., 1964, 87: 196 ~ 208.
[8] 余茂效, 司樛东. 噬菌体实验技术 (第一版). 北京: 科学出版社, 1991. 19 ~ 45.