



## 2 株溶藻弧菌烈性噬菌体的分离鉴定及其生物学特性

乔欢, 陈海, 徐旭凌\*, 丛郁, 刘墨,  
何四龙, 费文斌, 黄杰, 胡恽林  
(菲吉乐科生物科技有限公司, 江苏南京 210000)

**摘要:** 为寻找并丰富溶藻弧菌噬菌体资源, 实验以溶藻弧菌 VAHN1 为宿主菌, 采用双层平板法从海南虾塘水样及福建海产品样本中分离溶藻弧菌噬菌体。通过透射电镜、限制性内切酶及构建发育树等方法对所获溶藻弧菌噬菌体进行分类鉴定; 同时分析其生理生化性能。结果显示, 本研究分离获得 2 株溶藻弧菌噬菌体 VAP9 与 VAP21, 其噬菌斑均清晰透亮, 直径约 1.5~2.0 mm。2 株噬菌体核酸均为双链 DNA, 于透射电镜下可见其头部均呈正二十面体结构, 2 株噬菌体均属肌尾噬菌体科。噬菌体 VAP9 与 VAP21 对理化环境具有良好的耐受性; VAP9 最适 pH 为 6~8, VAP21 最适 pH 为 7~11; 2 株噬菌体可耐受通用杀菌浓度的过氧乙酸, 且对氯仿与乙醚不敏感, 同时对紫外线具有一定耐受性。2 株噬菌体的最佳感染复数均为 0.001, 对供试溶藻弧菌的裂解率达 95.2%, 可裂解部分副溶血性弧菌, 但无法裂解除溶藻弧菌与副溶血性弧菌外的弧菌属、葡萄球菌属、假单胞菌属等其他种属的供试细菌。噬菌体 VAP9 与 VAP21 可高效抑制溶藻弧菌 VAHN1 的生长, 且 2 株噬菌体的混合制剂对溶藻弧菌的抑制效果优于单株噬菌体。将噬菌体 VAP9 及 VAP21 保守蛋白序列于 NCBI 数据库上比对, 发现 2 株噬菌体与其他噬菌体间同源性较低, 因此噬菌体 VAP9 及 VAP21 很可能为 2 株新发现的肌尾科噬菌体。

**关键词:** 溶藻弧菌; 噬菌体; 分离; 生物学特性; 微生态抗菌剂

**中图分类号:** S 942.3

**文献标志码:** A

溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 是由 Miyamoto 于 1961 年命名的一种嗜温嗜盐性革兰氏阴性短杆菌<sup>[1]</sup>, 广泛分布于全球河口、海域及多种海洋动物体内<sup>[2]</sup>, 数量居海水类弧菌之首<sup>[1]</sup>。溶藻弧菌可产生如黏附素、耐热性肠毒素、溶血毒素<sup>[3]</sup>、河鲀毒素<sup>[4]</sup>等多种毒力因子, 是鱼类<sup>[2,5]</sup>、虾类、贝类<sup>[6]</sup>、刺参<sup>[4]</sup>等海洋经济动物的主要病原菌之一。溶藻弧菌可导致伤口感染、腐皮病、败血症等严重疾病<sup>[7]</sup>, 且发病率高, 暴发面积广, 对全球海水动物养殖业造成了极大的危害, 经济损失严重<sup>[2,8]</sup>。

有研究发现, 水产养殖业中的溶藻弧菌主要通过活体虫饵如卤虫被大量带入养殖水体中<sup>[8-9]</sup>。目前水产养殖中使用的臭氧、紫外线等物理灭菌方法无法全面覆盖水体, 溶藻弧菌仍大量存在; 而疫苗免疫法尚不成熟, 可用疫苗数量极其有限, 难以满足各类水产动物疾病的防治需求<sup>[10]</sup>。因此, 养殖生产中仍主要通过抗生素及消毒剂等化学药物对溶藻弧菌病进行防治。但养殖过程中化学药物的长期滥用不但造成环境严重污染、水产动物体内药物残留、食品安全问题日趋严峻, 同时使

收稿日期: 2021-01-07 修回日期: 2021-02-07

资助项目: 菲吉乐科—南美白对虾弧菌病害噬菌体防治方法的研究及应用

第一作者: 乔欢(照片), 从事噬菌体、水体微生物及森林微生物研究, E-mail: qh\_qiaohuan@163.com

通信作者: 徐旭凌, 从事噬菌体、动物细菌性病害及其病原微生物研究, E-mail: xuxuling1985@163.com



得溶藻弧菌出现大量多重耐药株,且其耐药基因在自然界中广泛传播,抗生素和消毒剂已无法达到理想的防治效果<sup>[11]</sup>,病害问题愈加严重,从而造成巨大的经济损失。因此,水产养殖中亟需寻找安全、有效的抗生素替代品用以防控渔业细菌性病害。

噬菌体作为一类对细菌具有强大裂解能力的病毒,在治疗细菌感染方面具有较高的生物安全性及严格的宿主特异性<sup>[12-13]</sup>,具备了替代抗生素治疗细菌性疾病的潜力。目前关于溶藻弧菌噬菌体的相关报道较少,且噬菌体裂解谱较窄,相关的溶藻弧菌菌株库也较小<sup>[1,4,14-22]</sup>。因此,寻找并丰富溶藻弧菌广谱噬菌体是目前发展抗溶藻弧菌制剂中亟需解决的问题。本研究通过大量采集全国各地水体及海产品样本,从中筛选获得溶藻弧菌,并以其为宿主分离获得溶藻弧菌烈性噬菌体,对目标噬菌体的生理生化特性进行初步测定,为噬菌体应用于防治水产动物细菌性病害提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 培养基与主要试剂

胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)、胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)和琼脂粉购自上海哈灵生物科技有限公司;1 kb DNA Ladder购自广州泛思生物科技有限公司;ETaq PCR Master Mix、限制性内切酶EcoR I、核酸内切酶DNase I、RNase A购自宝日医生物技术(北京)有限公司;λ噬菌体基因组DNA试剂盒购自MP生物医疗公司。

### 1.2 SM缓冲液

NaCl 5.8 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2 g, 1 mol/L Tris-HCl 50 mL (pH=7.5), 2%明胶 5 mL,以蒸馏水定容至1 000 mL,121 °C灭菌20 min,置于室温备用。

### 1.3 实验菌株

本研究中分离噬菌体所用溶藻弧菌菌株VAHN1为本实验室前期(2017年)自中国南部虾塘养殖水样中分离获得,分离及鉴定方法参照邬长祥<sup>[2]</sup>及彭喜春等<sup>[3]</sup>。

测定噬菌体裂解能力所用溶藻弧菌及其他种属细菌为本实验室2016—2019年自中国海水水样、越南进口海产品样本、中国南部虾塘养殖水样、河南驻马店猪场猪粪样本、安徽生姜种植田土样

等样本中分离获得。供试菌株共15种,合计220株;其中溶藻弧菌165株,副溶血性弧菌(*V. parahemolyticus*)、霍乱弧菌(*V. cholerae*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)等其他种属细菌55株。

### 1.4 溶藻弧菌噬菌体的分离与鉴定

**溶藻弧菌噬菌体的分离纯化** 本实验于2017—2019年分别采集海南虾塘水样及福建海产品样本,对其中噬菌体进行分离<sup>[23-24]</sup>:将各样本于5 000 r/min离心10 min后,分别取上清液经0.22 μm滤膜除菌,随后将各样本滤液与2倍浓度TSB培养基及对数期VAHN1菌液(OD<sub>600</sub>=0.6)以1:1:0.1体积比混合均匀,30 °C下150 r/min摇床培养12 h,将培养液5 000 r/min离心10 min后取上清液经0.22 μm滤膜除菌。通过双层平板法<sup>[23]</sup>观察噬菌斑生长情况,若出现噬菌斑,则确定分离获得溶藻弧菌噬菌体。

采用双层平板法<sup>[23]</sup>对所获噬菌体进行纯化:用无菌枪头在双层平板上挑取透亮的单个噬菌斑并置于1 mL无菌SM缓冲液中,25 °C下150 r/min摇培5 h后经0.22 μm滤膜过滤除菌。以无菌SM缓冲液对噬菌体滤液进行适当稀释后,取1 mL稀释液与300 μL对数期VAHN1菌液(OD<sub>600</sub>=0.6),分别加入4 mL琼脂含量为0.75%的TSB半固体培养基中,将其快速混匀后倒入已制好的TSA上制成双层平板,待凝固后于30 °C恒温培养箱中倒置培养6~8 h。重复上述双层平板纯化操作5次后获得纯的溶藻弧菌噬菌体株系。

**溶藻弧菌噬菌体增殖液的制备** 采用固体增殖法<sup>[15]</sup>,刮取适宜稀释梯度的具噬菌斑的双层平板上层部分,向其中加入10 mL SM缓冲液并振荡30 s,于4 °C下静置6 h后将静置液再次振荡30 s,6 000 r/min离心10 min,收集上清液并以0.22 μm滤膜过滤除菌,获得噬菌体增殖液,4 °C下保存备用。

**溶藻弧菌噬菌体效价测定** 噬菌体效价意为目标单位样本中具侵染活性的噬菌体数量,即噬菌斑形成单位(plaque forming unit, PFU)。将溶藻弧菌噬菌体滤液以无菌SM缓冲液作10倍梯度稀释后,取适宜梯度稀释液1 mL,向其中加入300 μL对数期VAHN1菌液(OD<sub>600</sub>=0.6)并混合均匀,采用双层平板法<sup>[23]</sup>测定噬菌体滤液效价,于30 °C倒置培养6~8 h后对噬菌斑进行计数。每个处理3个重复。

噬菌体效价 (PFU/mL)=平均噬菌斑数×稀释倍数

**溶藻弧菌噬菌体电镜观察** 取纯化后效价达  $10^{10}$  PFU/mL 的噬菌体滤液 20  $\mu$ L 滴于铜网上沉淀吸附 30 min, 加 1 滴 2% 磷钨酸 (PTA) 于铜网上负染<sup>[15]</sup> 10 min, 干燥后使用 JEOL JEM-1200EX 透射电镜进行观察。

**溶藻弧菌噬菌体核酸提取及基因序列分析** 参照“溶藻弧菌噬菌体增殖液的制备”中的方法制备 100 mL 噬菌体增殖液 ( $>1 \times 10^9$  PFU/mL), 向其中加入终浓度为 10% 的固体 PEG 8000 (质量体积分数), 充分溶解后 4  $^{\circ}$ C 静置 12 h。于 4  $^{\circ}$ C 下 12 000 $\times$ g 离心 10 min, 弃上清液, 以 10 mL SM 缓冲液重悬沉淀并经 0.22  $\mu$ m 滤膜除菌, 获得噬菌体颗粒浓缩液<sup>[25]</sup>。采用  $\lambda$  噬菌体基因组 DNA 试剂盒提取噬菌体核酸, 将核酸溶液送至北京化工大学生命科学与技术学院进行测序, 并将所获全基因组序列上传至 NCBI 数据库。

使用 ORF Finder 软件处理分析获得的溶藻弧菌全基因组序列, 选取其门脉蛋白基因<sup>[26]</sup>、尾丝蛋白基因与衣壳蛋白基因序列<sup>[25]</sup> 分别在 NCBI 中与已发表的噬菌体基因进行 BLAST 比对, 并利用 MEGA 4.0 软件构建系统发育树 (bootstrap=1 000)。

**溶藻弧菌噬菌体核酸的酶切鉴定** 取溶藻弧菌噬菌体核酸溶液, 分别与核酸内切酶 DNase I、RNase A 及限制性内切酶 *EcoRI* 于 37  $^{\circ}$ C 下酶切 2 h, 以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 (100 V) 50 min 进行检测。使用培清 JS-680D 全自动凝胶成像分析仪观察酶切结果。

### 1.5 溶藻弧菌噬菌体感染特征测定

**溶藻弧菌噬菌体裂解谱的测定** 采用点滴法<sup>[27]</sup> 分别测定供试噬菌体对 165 株溶藻弧菌及 55 株其他种属细菌的裂解能力: 取各供试菌株对数期菌液 ( $OD_{600}=0.6$ ) 300  $\mu$ L 与 4 mL TSB 半固体培养基 (0.75% 琼脂) 混合铺于 TSA 平板上, 分别取 10  $\mu$ L 供试噬菌体滤液 ( $1 \times 10^8$  PFU/mL) 及噬菌体混合制剂液 (体积比为 1:1,  $1 \times 10^8$  PFU/mL) 滴于平板的标记位置上。待自然风干后置于各供试细菌相应生长温度下培养 6~8 h, 观察噬菌斑形态并计算噬菌体裂解率 (%)。

裂解率=(可裂解菌株数/测试菌株总数) $\times$ 100%

**最佳感染复数测定** 感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 即噬菌体数量与细菌数量

的比值。将 VAHN1 菌液 ( $1 \times 10^7$  CFU/mL) 与各株供试噬菌体滤液分别以 MOI 为 0.001、0.01、0.1、1、10、100 和 1 000 的比例各取 100  $\mu$ L 混合, 加入 10 mL TSB 培养基中, 30  $^{\circ}$ C 下 150 r/min 振荡培养 12 h。将培养液 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤除菌并测定滤液中噬菌体效价, 测定方法同“溶藻弧菌噬菌体效价测定”。各处理组中效价最高的感染复数即为最佳感染复数。

### 1.6 溶藻弧菌噬菌体稳定性测定

**噬菌体 pH 稳定性的测定** 将 100  $\mu$ L 供试噬菌体滤液 ( $>1 \times 10^9$  PFU/mL) 分别加入 900  $\mu$ L pH=1~12 的 TSB 培养基中, 充分混匀后室温下静置, 分别于 1、4、8、24 及 96 h 取样测定各处理中噬菌体效价, 计算噬菌体存活率 (%)。噬菌体效价测定方法同“溶藻弧菌噬菌体效价测定”。

噬菌体存活率=(处理后噬菌体效价/原始噬菌体效价) $\times$ 100%

**噬菌体热稳定性的测定** 取供试噬菌体滤液 ( $>1 \times 10^9$  PFU/mL) 1 mL 于无菌微量离心管中, 将其分别于 25(对照)、50、60 和 70  $^{\circ}$ C 水浴中处理, 每 15 min 取样测定效价直至 2 h。处理结束后将其取出冷却至室温, 测定各处理中噬菌体效价并计算存活率。噬菌体效价测定方法同“溶藻弧菌噬菌体效价测定”; 噬菌体存活率计算方法同“噬菌体 pH 稳定性的测定”。

**噬菌体对过氧乙酸耐受性的测定** 将过氧乙酸用 TSB 稀释后分别制成浓度为 30 与 6 mg/L 的过氧乙酸溶液<sup>[28]</sup>, 取 100  $\mu$ L 供试噬菌体滤液 ( $>1 \times 10^9$  PFU/mL) 分别加入 900  $\mu$ L 上述浓度的过氧乙酸溶液中, 同时取 100  $\mu$ L 供试噬菌体滤液 ( $>1 \times 10^9$  PFU/mL) 加入 900  $\mu$ L SM 液中作为对照, 将上述处理充分混匀后室温静置。每 0.5 h 取样测定各处理中噬菌体效价, 直至 6 h, 计算噬菌体存活率。噬菌体效价测定方法见“溶藻弧菌噬菌体效价测定”; 噬菌体存活率计算方法同“噬菌体 pH 稳定性的测定”。

**噬菌体对氯仿与乙醚敏感性的测定** 向 950  $\mu$ L 供试噬菌体滤液 ( $>1 \times 10^9$  PFU/mL) 中分别加入 50  $\mu$ L 氯仿与乙醚并充分混匀, 使氯仿或乙醚的终浓度为 5%; 同时将 50  $\mu$ L SM 液加入 950  $\mu$ L 供试噬菌体滤液 ( $>1 \times 10^9$  PFU/mL) 中作为对照。将



氯仿处理及其对照于 30 °C 下静置 1 h<sup>[29]</sup>; 将乙醚处理及其对照于 4 °C 下静置 24 h 后, 于 3 000 r/min 离心 15 min<sup>[30-31]</sup>。分别取上述各处理上层液体测定噬菌体效价, 噬菌体效价测定方法见“溶藻弧菌噬菌体效价测定”。

**噬菌体对紫外线耐受性的测定** 分别取供试噬菌体滤液 ( $>1 \times 10^9$  PFU/mL) 1 mL 分装至各直径为 3 mm 的平皿中, 置于紫外灯 (20 W, 30 cm,  $50 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) 下照射 30 min, 期间每 3 min 取样并将其置于暗处 30 min 后测定噬菌体效价, 计算噬菌体存活率。噬菌体效价测定方法同“溶藻弧菌噬菌体效价测定”; 噬菌体存活率计算方法同“噬菌体 pH 稳定性的测定”。

### 1.7 噬菌体体外抑菌动态效果的测定

取 1 mL VAHN1 对数期菌液 ( $\text{OD}_{600}=0.6$ ) 分别接入各 100 mL TSB 培养基中, 使其终浓度为  $1 \times 10^7$  CFU/mL, 向其中分别加入终浓度为  $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^7$  和  $1 \times 10^6$  PFU/mL 的单株噬菌体滤液及各株噬菌体等体积混合制剂, 同时以不加噬菌体的处理作为对照。30 °C 下 150 r/min 振荡培养, 每 30 min 取样测定培养液  $\text{OD}_{600}$  值, 观测噬菌体对 VAHN1 生长的影响。

### 1.8 数据分析

本实验数据使用 Microsoft Excel 2003 软件等进行统计分析。

## 2 结果

### 2.1 溶藻弧菌噬菌体的分离与鉴定

溶藻弧菌噬菌体的分离纯化及噬菌斑形态实验以溶藻弧菌 VAHN1 为宿主菌, 通过双层平板法, 自福建海产品样本中共分离获得 2 株溶藻弧菌噬菌体, 其编号分别为 VAP9 与 VAP21。溶藻弧菌噬菌体 VAP9 与 VAP21 在其宿主菌苔上生长 6 h 即可形成形态大小均一的圆形噬菌斑。2 株噬菌体的噬菌斑直径均为 1.5~2.0 mm, 噬菌斑清晰透亮, 形态接近, 无晕圈产生 (图 1)。噬菌体 VAP9 与 VAP21 的噬菌斑均具烈性噬菌体特征<sup>[31]</sup>。

**溶藻弧菌噬菌体的核酸酶切分析** 分别提取 2 株溶藻弧菌噬菌体 VAP9 与 VAP21 的核酸, 并分别以 DNase I、RNase A 及双链 DNA 限制性内切酶 *EcoR* I 进行酶切。结果显示, 2 株噬菌体的核酸可被 DNase I 降解, 但无法被 RNase A 降

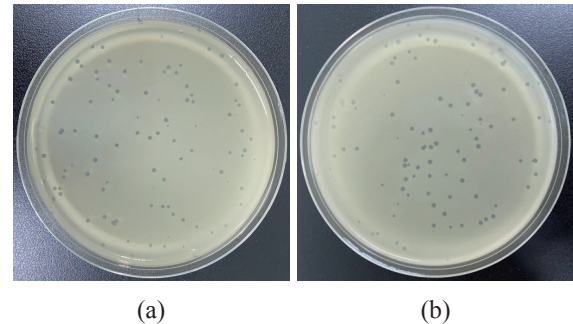


图 1 2 株溶藻弧菌噬菌体噬菌斑形态  
(a) VAP9 噬菌斑; (b) VAP21 噬菌斑

Fig. 1 Bacteriophage plaques of 2 phages against *V. alginolyticus*

(a) plaque of VAP9; (b) plaque of VAP21

解, 说明其核酸为 DNA; 限制性内切酶 *EcoR* I 将 2 株供试噬菌体的核酸分别酶切成大小不同的片段, 且酶切后其相应的条带各不相同。说明噬菌体 VAP9 与 VAP21 为 2 株不同的噬菌体, 其核酸均为双链 DNA (图 2)。

**溶藻弧菌噬菌体结构蛋白同源性分析** 2 株溶藻弧菌噬菌体全基因组测序结果显示, 噬菌体 VAP9 基因组大小为 82 456 bp (GenBank 登录号: MW548656); 噬菌体 VAP21 基因组大小为 52 636 bp (GenBank 登录号: MW548657)。通过分析供试噬菌体的开放阅读框, 本实验选取序列较为保守的 3 种噬菌体蛋白——门脉蛋白<sup>[26]</sup>、尾丝蛋白及衣壳蛋白<sup>[25]</sup>, 分别以其氨基酸序列对噬菌体 VAP9 与 VAP21 的同源性进行分析, 并将其与 GenBank 中的多株噬菌体序列进行比较。结果如图 3 所示, 噬菌体 VAP9 仅门脉蛋白氨基酸序列与弧菌属噬菌体 VP-1 (GenBank 登录号: AWY10149.1) 的同源性较高 (90%), 其尾丝蛋白及衣壳蛋白氨基酸序列与其他噬菌体间的同源性均较低; 噬菌体 VAP21 的 3 种目标蛋白氨基酸序列与其他噬菌体间的同源性也均较低。

**溶藻弧菌噬菌体电镜形态特征及分类** 通过透射电子显微镜对噬菌体 VAP9 与 VAP21 进行观察, 2 株噬菌体头部均等轴对称, 呈正二十面体结构。其中 VAP9 直径约 55 nm, 尾部宽约 15 nm, 长 65~70 nm; VAP21 直径约 65 nm, 尾部宽约 18 nm, 长 75~80 nm (图版)。结合 2 株噬菌体酶切结果及国际病毒分类委员会 (ICTV) 第八次报告的最新分类标准<sup>[32]</sup>, 溶藻弧菌噬菌体 VAP9 与 VAP21 均属于群 I-双股 DNA 病毒中的有尾病毒目 (Caudovirales) 肌尾噬菌体科 (Myoviridae)。

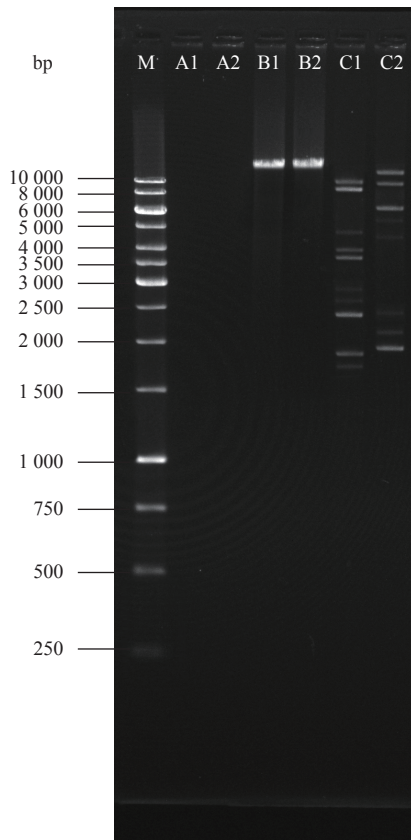


图2 2株溶藻弧菌噬菌体核酸的酶切

M. 1 kb DNA 分子量标准; A1. VAP9 DNase I 酶切; A2. VAP21 DNase I 酶切; B1. VAP9 RNase A 酶切; B2. VAP21 RNase A 酶切; C1. VAP9 *EcoR* I 酶切; C2. VAP21 *EcoR* I 酶切

### Fig. 2 The restriction endonuclease analysis of nucleic acid of 2 phages

M. 1 kb DNA ladder Marker; A1. VAP9 nucleic acid digested by DNase I; A2. VAP21 nucleic acid digested by DNase I; B1. VAP9 nucleic acid digested by RNase A; B2. VAP21 nucleic acid digested by RNase A; C1. VAP9 nucleic acid digested by *EcoR* I; C2. VAP21 nucleic acid digested by *EcoR* I

溶藻弧菌噬菌体 VAP9 与 VAP21 均已保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC, 武汉大学), 保藏编号分别为 VAP9: CCTCC no. M2018766; VAP21: CCTCC no. M2018768。

## 2.2 溶藻弧菌噬菌体的感染特征

**溶藻弧菌噬菌体对溶藻弧菌的裂解能力** 本实验选取 165 株不同地域来源的溶藻弧菌, 采用点滴法对 2 株供试噬菌体及其混合制剂的裂解能力进行测定。噬菌体 VAP9 可识别 151 株溶藻弧菌, 裂解率为 91.5%; VAP21 可识别 152 株溶藻弧菌, 裂解率为 92.1%; 2 株噬菌体的混合制剂 (VAP9 : VAP21=1 : 1, 体积比) 对供试菌株的裂解率则高达 95.2% (157/165) (图 4)。

**溶藻弧菌噬菌体对其他种属细菌的裂解能力** 本实验选取 55 株其他种属细菌为供试菌株, 对 2 株噬菌体 VAP9、VAP21 及其混合制剂的裂解能力进行测定。噬菌体 VAP9 可识别 2 株副溶血性弧菌, VAP21 可识别 1 株副溶血性弧菌, 2 株噬菌体的混合制剂对供试副溶血性弧菌的识别率为 50% (3/6); 2 株噬菌体及其混合制剂均无法识别除副溶血性弧菌外的其他供试种属细菌 (图 5)。

**溶藻弧菌噬菌体最佳感染复数** 溶藻弧菌噬菌体最佳感染复数测定结果如表 1 所示。噬菌体 VAP9 与 VAP21 的效价均随其 MOI 降低而升高, 且 2 株噬菌体效价在其 MOI=0.001 时达到最高: 噬菌体 VAP9 效价为  $2.20 \times 10^{10}$  PFU/mL; 噬菌体 VAP21 效价为  $5.60 \times 10^9$  PFU/mL。因此溶藻弧菌噬菌体 VAP9 与 VAP21 感染溶藻弧菌 VAHN1 的最佳 MOI 均为 0.001。

## 2.3 溶藻弧菌噬菌体的稳定性

**溶藻弧菌噬菌体的 pH 稳定性** 将溶藻弧菌噬菌体 VAP9 与 VAP21 分别置于不同 pH 条件下, 并于指定时间取样测定其效价。处理 1 h 后, 在 pH=1~2 的强酸条件与 pH=13~14 的强碱条件下, VAP9 已丧失活性, 而 VAP21 虽于强酸条件下失活, 但在 pH=13 时 VAP21 仍具  $10^6$  PFU/mL 效价; pH=3 时, 2 株供试噬菌体效价均下降 90% 以上; pH=4~10 时, 噬菌体 VAP9 与 VAP21 效价较原始效价相比均无显著变化, VAP9 于酸性条件下效价略高于碱性条件下的效价, VAP21 则与之相反; pH=11~12 时, 噬菌体 VAP9 效价有所下降, 而噬菌体 VAP21 效价无较大变化 (图 6)。

处理 4 h 后, 2 株噬菌体的部分处理效价下降显著: pH=3~5 时, VAP9 与 VAP21 的效价较其处理 1 h 时效价相比均下降近 80%; VAP9 效价在 pH=11 时下降 87%, 而 VAP21 效价未发生变化; pH=12 时, VAP21 效价下降 86%, VAP9 则丧失活性。噬菌体 VAP9 与 VAP21 效价在 pH=6~10 处理下均维持稳定。

处理 8 h 后, 2 株噬菌体在 pH=3~5 时效价均持续下降; pH=10~11 时, VAP9 效价出现显著下降, VAP21 效价则未出现显著变化; pH=6~9 时, 2 株噬菌体效价无较大变化。

处理 24~96 h 后, 噬菌体 VAP9 与 VAP21 各处理效价均随处理时间增加而逐渐下降。96 h 时, 2 株噬菌体在 pH=3 时仍具有  $10^5$  PFU/mL 的效价; pH=11 时, VAP9 效价为  $10^4$  PFU/mL; VAP21 在

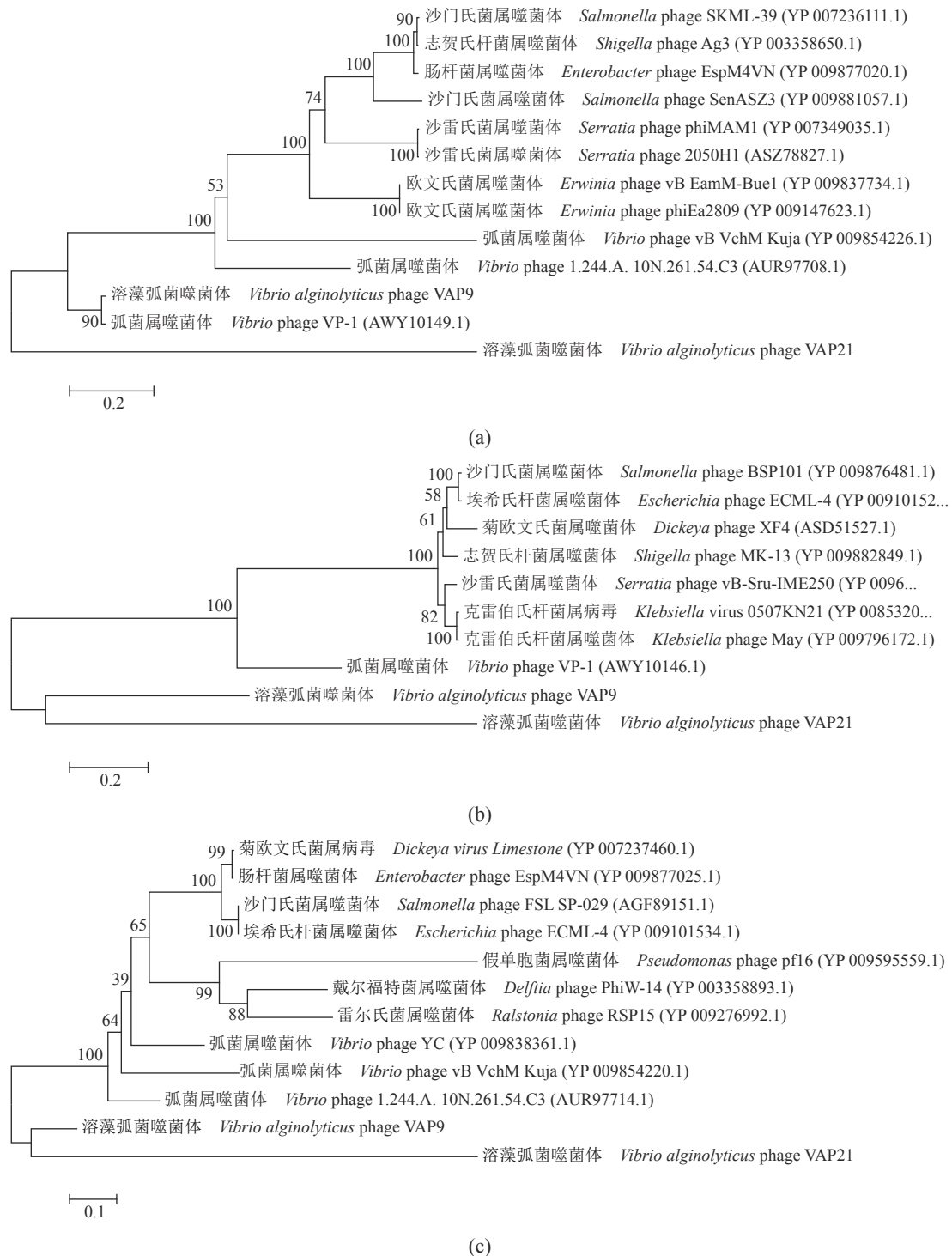
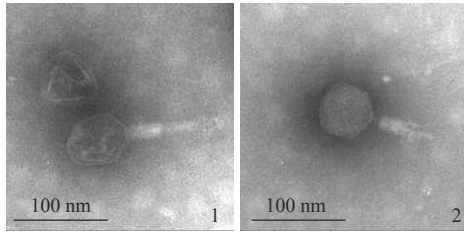


图 3 2 株溶藻弧菌噬菌体门脉蛋白、尾丝蛋白及衣壳蛋白系统发育树

(a) 门脉蛋白系统发育树; (b) 尾丝蛋白系统发育树; (c) 衣壳蛋白系统发育树; 分支处数字代表可信度, 括号内代表 GenBank 中序列接受号, 标尺代表进化距离

**Fig. 3 Phylogenetic tree of 2 phages based on phage portal protein, tail fibers protein and capsid protein**

(a) phylogenetic tree of VAP9 and VAP21 based on phage portal protein; (b) phylogenetic tree of VAP9 and VAP21 based on phage tail fibers protein; (c) phylogenetic tree of VAP9 and VAP21 based on phage capsid protein; the number at the branch is reliability, the serial number in the bracket is GenBank accession number, the scaleplate is evolutionary distance



图版 2 株溶藻弧菌噬菌体的电镜照片(×400 000)

Plate Electron micrograph of 2 phages against *V. alginolyticus* (×400 000)

1. VAP9; 2. VAP21

pH=12 处理下仍具有一定的裂解能力 ( $10^5$  PFU/mL)。VAP9 最适 pH 为 6~8, VAP21 最适 pH 为 7~11。2 株噬菌体均具有一定的耐酸能力, 但其对碱的耐受能力均高于酸。

**溶藻弧菌噬菌体热稳定性** 通过测定 2 株溶藻弧菌噬菌体的热稳定性可知, 噬菌体 VAP9 与 VAP21 的效价均随温度升高与处理时间延长而

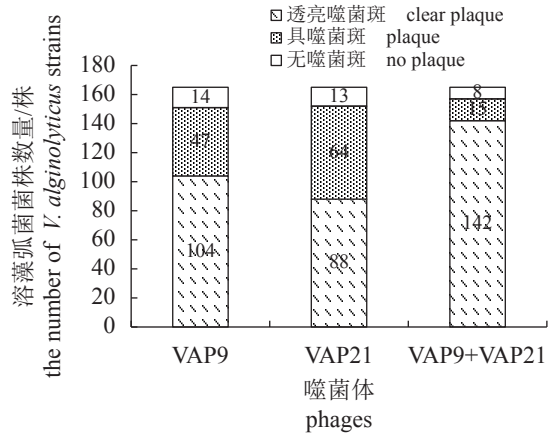


图 4 2 株溶藻弧菌噬菌体及其混合物对溶藻弧菌的裂解能力

Fig. 4 Lytic ability of 2 phages and cocktail against *V. alginolyticus*

降低 (图 7)。同对照 (25 °C) 相比, 2 株噬菌体于 50 °C 下水浴 2 h 后其存活率均在 90% 以上, 接近

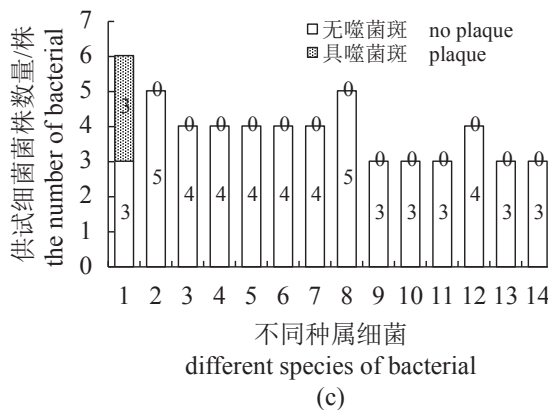
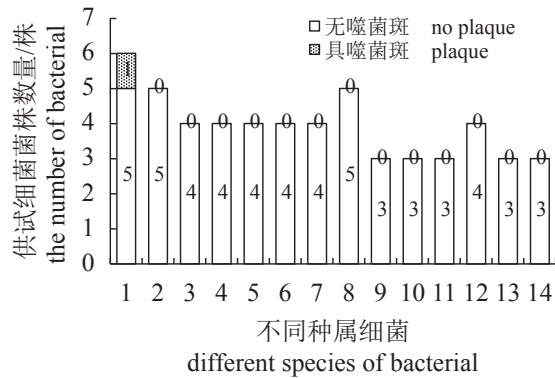
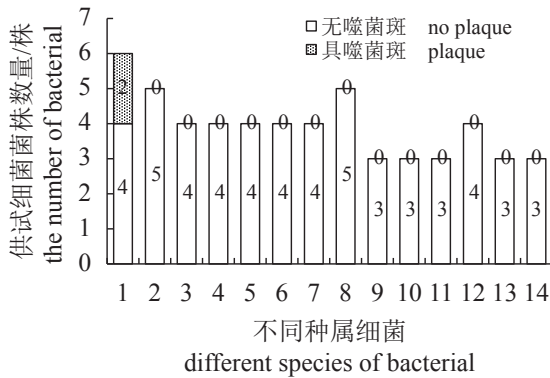


图 5 2 株溶藻弧菌噬菌体及其混合物对其他种属细菌的裂解能力

(a) VAP9; (b) VAP21; (c) VAP9+VAP21; 1. 副溶血性弧菌, 2. 霍乱弧菌, 3. 哈维氏弧菌, 4. 河流弧菌, 5. 嗜水气单胞菌, 6. 枯草芽孢杆菌, 7. 金黄色葡萄球菌, 8. 大肠杆菌, 9. 鸡白痢沙门氏菌, 10. 茄科雷尔氏菌, 11. 无乳链球菌, 12. 铜绿假单胞菌, 13. 鲍曼不动杆菌, 14. 单核细胞增生李斯特氏菌

Fig. 5 Lytic ability of 2 phages and cocktail to other species bacteria

(a) VAP9; (b) VAP21; (c) VAP9+VAP21; 1. *V. parahaemolyticus*, 2. *V. cholerae*, 3. *V. harveyi*, 4. *V. fluvialis*, 5. *Aeromonas hydrophila*, 6. *B. subtilis*, 7. *S. aureus*, 8. *E. coli*, 9. *S. pullorum*, 10. *R. solanacearum*, 11. *S. agalactiae*, 12. *P. aeruginosa*, 13. *Acinetobacter baumannii*, 14. *Listeria monocytogenes*



表 1 2 株溶藻弧菌噬菌体的最佳感染复数

Tab. 1 Optimal MOI of 2 phages against *V. alginolyticus*

感染复数 MOI	噬菌体数/PFU phage titer	细菌数/CFU VAHN1 number	VAP9 效价/(PFU/mL) phage titer of VAP9	VAP21 效价/(PFU/mL) phage titer of VAP21
1000	$1.00 \times 10^4$	$1.00 \times 10^1$	$8.90 \times 10^7$	$2.30 \times 10^7$
100	$1.00 \times 10^4$	$1.00 \times 10^2$	$8.30 \times 10^8$	$5.60 \times 10^7$
10	$1.00 \times 10^4$	$1.00 \times 10^3$	$1.60 \times 10^9$	$7.70 \times 10^7$
1	$1.00 \times 10^4$	$1.00 \times 10^4$	$3.40 \times 10^9$	$5.60 \times 10^8$
0.1	$1.00 \times 10^4$	$1.00 \times 10^5$	$4.20 \times 10^9$	$7.50 \times 10^8$
0.01	$1.00 \times 10^4$	$1.00 \times 10^6$	$7.20 \times 10^9$	$1.30 \times 10^9$
0.001	$1.00 \times 10^4$	$1.00 \times 10^7$	$2.20 \times 10^{10}$	$5.60 \times 10^9$

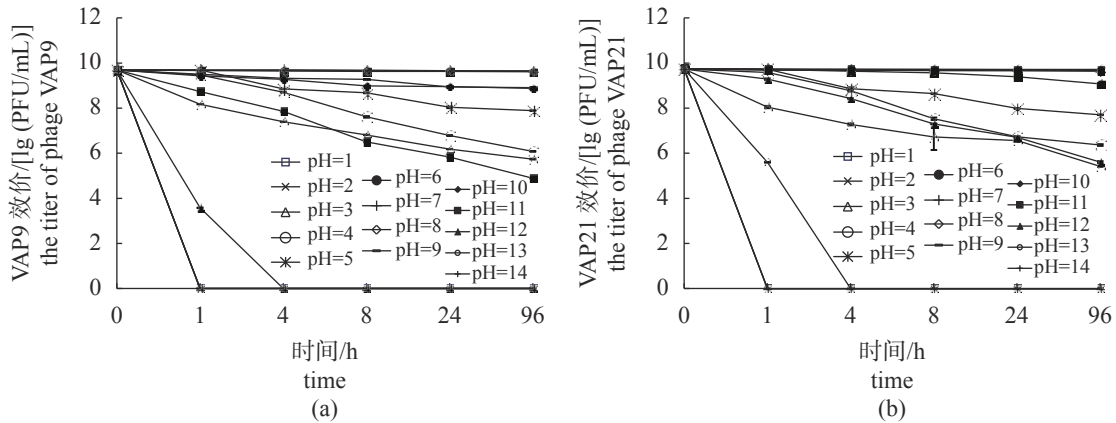


图 6 2 株溶藻弧菌噬菌体 pH 稳定性

(a) VAP9; (b) VAP21, 下同

Fig. 6 pH stability of 2 phages against *V. alginolyticus*

(a) VAP9; (b) VAP21, the same below

同等条件下对照的存活率。60 °C 下 VAP9 与 VAP21 的效价缓慢下降, 处理 2 h 后其存活率分别为 43.3% 与 54.5%。当处理温度升至 70 °C 后, VAP21 的效价于处理 0.25 h 时降至  $10^9$  PFU/mL, 而 VAP9 的效价仍维持在  $10^{10}$  PFU/mL, 之后 2 株噬菌体的效价迅速下降, 70 °C 处理 2 h 后 VAP9 仍具有  $10^5$  PFU/mL 的效价, VAP21 效价为  $10^4$  PFU/mL。

**溶藻弧菌噬菌体对过氧乙酸的耐受性** 参照本实验室前期研究结果<sup>[28]</sup>, 测定 2 株溶藻弧菌噬菌体对不同浓度的过氧乙酸溶液的耐受性。实验结果显示, 在 30 mg/L 过氧乙酸溶液处理下, 噬菌体 VAP21 于处理 0.5 h 后失活, 而 VAP9 在处理 1 h 后仍具活性 (60 PFU/mL); 2 株供试噬菌体在 6 mg/L 过氧乙酸溶液中, 其效价下降缓慢并逐渐趋于平稳, 处理 6 h 后, VAP9 存活率为 60.9%, VAP21 存活率为 55.4% (图 8)。说明 2 株溶藻弧菌噬菌体对 6 mg/L 过氧乙酸溶液具有耐受性。

**溶藻弧菌噬菌体对氯仿与乙醚的敏感性**

噬菌体 VAP9 与 VAP21 在氯仿及乙醚处理下的

效价均与对照效价相近, 未出现显著变化 ( $P > 0.01$ ), 各处理组与对照组差异均无统计学意义 (图 9)。2 株供试噬菌体均对氯仿与乙醚不敏感, 说明其衣壳组分中无脂类物质<sup>[15, 17]</sup>。

**溶藻弧菌噬菌体对紫外线的耐受性** 分别将噬菌体 VAP9 与 VAP21 置于 20 W 紫外灯 ( $50 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) 下进行持续照射后, 发现噬菌体 VAP9 于紫外线下照射 3 min 时效价下降 28%, 照射 12 min 后存活率为 37.5%; VAP21 初始暴露于紫外线下时其效价降低较快, 照射 3 min 时效价下降 40%, 照射 9 min 后 VAP21 效价下降幅度变缓; 紫外线处理 0~15 min VAP21 存活率低于 VAP9, 但处理后期 (15~30 min) VAP21 存活率高于 VAP9; 紫外线照射 30 min 后 VAP21 效价为  $10^4$  PFU/mL, VAP9 效价为  $10^3$  PFU/mL (图 10)。

#### 2.4 溶藻弧菌噬菌体体外抑菌动态效果

通过测定溶藻弧菌 VAHN1 在不同浓度噬菌体处理下的菌液 OD<sub>600</sub> 值的变化, 判定溶藻弧菌



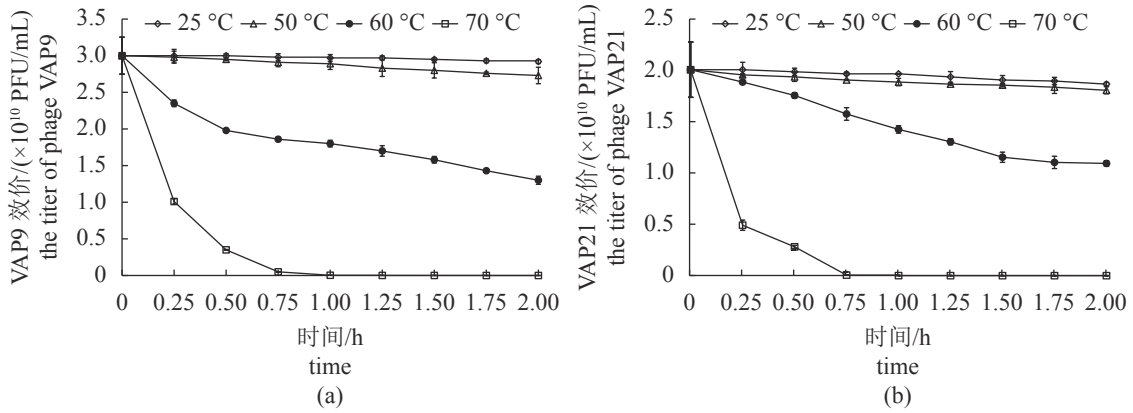


图 7 2 株溶藻弧菌噬菌体热稳定性

Fig. 7 Thermal stability of 2 phages against *V. alginolyticus*

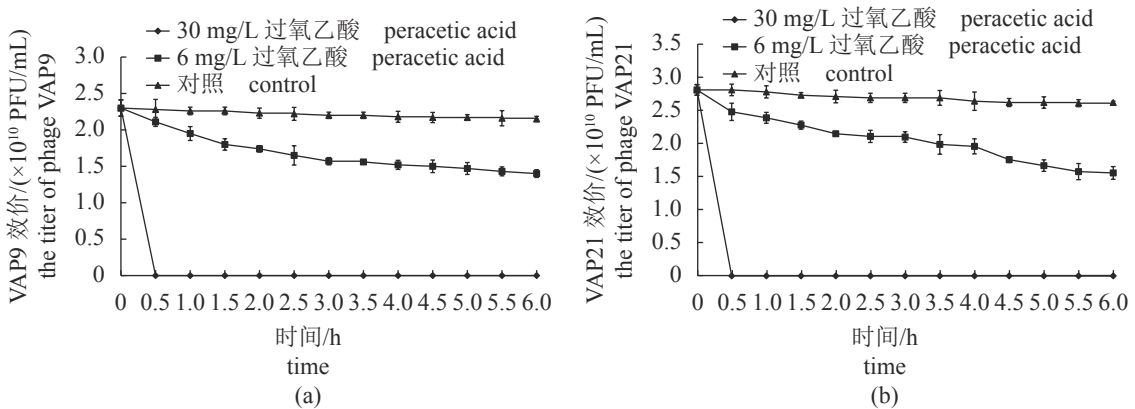


图 8 2 株溶藻弧菌噬菌体对过氧乙酸的耐受性

Fig. 8 Sensitivities of 2 phages to peracetic acid

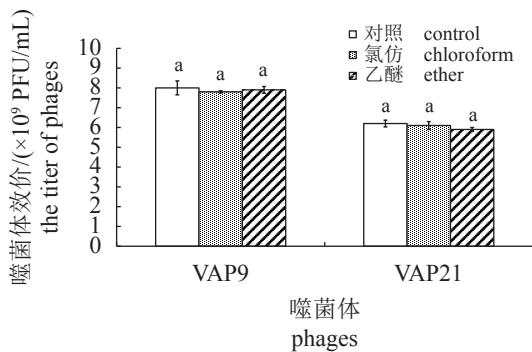


图 9 2 株溶藻弧菌噬菌体对氯仿与乙醚的敏感性

相同小写字母表示组内差异不显著 ( $P > 0.01$ )

Fig. 9 Sensitivities of 2 phages to chloroform and ether

Same small letters mean no significant difference in group ( $P > 0.01$ )

VAHN1 的生长状态, 以此确定 2 株供试噬菌体及其混合制剂在液体环境中对溶藻弧菌 VAHN1 生长的抑制效果 (图 11)。

对照菌液  $OD_{600}$  值自 VAHN1 接入 TSB 培养基中 0.5 h 后开始上升, 接入 1 h 后菌液  $OD_{600}$  值

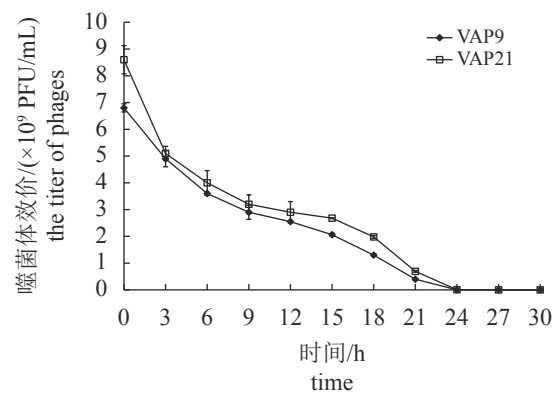


图 10 2 株溶藻弧菌噬菌体对紫外线的耐受性

Fig. 10 Sensitivities of 2 phages to UV

增长迅速, VAHN1 菌体生长进入对数期, 接种 8 h 后菌液  $OD_{600}$  值可升至 1.711。

将终浓度为  $1 \times 10^6$  PFU/mL 的 3 组供试噬菌体与 VAHN1 菌液共同培养时, 培养 2 h 内 3 组噬菌体处理下的菌液  $OD_{600}$  值上升缓慢; 自培养 3 h 起各噬菌体处理组菌液  $OD_{600}$  值迅速上升, 其中

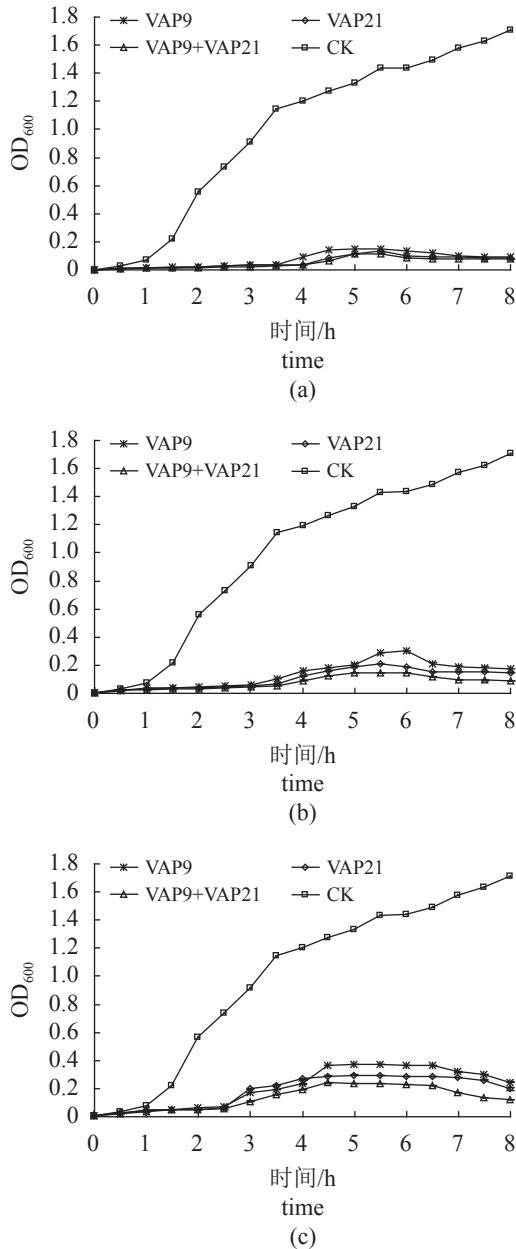


图 11 2株溶藻弧菌噬菌体对溶藻弧菌生长的影响

(a) 处理组噬菌体终浓度为  $1 \times 10^8$  PFU/mL; (b) 处理组噬菌体终浓度为  $1 \times 10^7$  PFU/mL; (c) 处理组噬菌体终浓度为  $1 \times 10^6$  PFU/mL, CK. 对照组

Fig. 11 Effects of 2 phages against the growth of *V. alginolyticus*

(a) final titer of phages were  $1 \times 10^8$  PFU/mL; (b) final titer of phages were  $1 \times 10^7$  PFU/mL; (c) final titer of phages were  $1 \times 10^6$  PFU/mL, CK. control group

VAP9 处理下的菌液 OD<sub>600</sub> 值上升迅速, 且上升趋势大于其他噬菌体处理组; 培养 4 h 后 VAP21 组与混合制剂组的菌液 OD<sub>600</sub> 值上升趋势趋于平缓; 培养 4.5~6.5 h 各噬菌体处理组菌液吸光值无显著变化; 培养 6.5 h 后各噬菌体处理组的菌液 OD<sub>600</sub>

值呈缓慢下降趋势; 8 h 培养过程中混合制剂组的菌液 OD<sub>600</sub> 值始终为各处理中最低。

将终浓度为  $1 \times 10^7$  PFU/mL 的 3 组供试噬菌体与 VAHN1 菌液共同培养时, 培养 3.5 h 内 3 组噬菌体处理下的菌液 OD<sub>600</sub> 值均小于 0.1, VAHN1 菌体生长受抑制; 自培养 4 h 起各噬菌体处理组菌液 OD<sub>600</sub> 值上升速率增加, VAP9 处理下的菌液 OD<sub>600</sub> 值于培养 6 h 时达到最高, VAP21 与混合制剂处理下的菌液 OD<sub>600</sub> 值均于培养 5.5 h 时达到最高, 且各噬菌体处理组菌液 OD<sub>600</sub> 值自培养 6 h 起开始下降; 培养 8 h 后, 混合制剂组菌液 OD<sub>600</sub> 值仍小于 0.1, VAP9 组菌液 OD<sub>600</sub> 值较高。

将终浓度为  $1 \times 10^8$  PFU/mL 的 3 组供试噬菌体与 VAHN1 菌液共同培养时, VAP9 处理下的菌液 OD<sub>600</sub> 值于培养 3.5 h 后呈上升趋势, VAP21 与混合制剂处理下的菌液 OD<sub>600</sub> 值则于培养 4 h 后开始缓慢上升; VAP9 与混合制剂处理下的菌液吸光值均于培养 5 h 后达到最高, 其 OD<sub>600</sub> 值分别为 0.152 与 0.113; VAP21 处理下的菌液 OD<sub>600</sub> 值于培养 5.5 h 后达到最高 (0.134); 培养 5.5 h 后各噬菌体处理组的菌液 OD<sub>600</sub> 值呈下降趋势, 培养 8 h 后混合制剂组菌液 OD<sub>600</sub> 值最低, 为 0.078。8 h 内各噬菌体处理组中的 VAHN1 生长均处于低水平抑制状态, 噬菌体 VAP9 与 VAP21 对溶藻弧菌 VAHN1 生长的抑制效果相近。

### 3 讨论

溶藻弧菌是人类及全球经济类水产养殖动物的主要病原菌之一<sup>[4, 33]</sup>。使用抗生素及化学药物等传统的防治方法导致溶藻弧菌出现大量多重耐药株, 进而引发更加严重的渔业病害及食品安全问题<sup>[11]</sup>。噬菌体作为一种新兴的生物抗菌制剂正日益受到学者们的关注, 且已应用于部分弧菌属细菌的防治研究中<sup>[34-36]</sup>。

本研究分离获得 2 株烈性溶藻弧菌肌尾科噬菌体 VAP9 与 VAP21, 分别选取其 3 段保守蛋白氨基酸序列, 于 NCBI 数据库上进行 BLAST 比对应后构建系统发育树。比对发现除噬菌体 VAP9 的门脉蛋白氨基酸序列与弧菌属噬菌体 VP-1 具较高同源性外, 2 株噬菌体各目标蛋白氨基酸序列与其他噬菌体间的同源性均较低; 且 2 株供试噬菌体彼此间同源性也较低。因此噬菌体 VAP9 与 VAP21 很可能为 2 株新发现的肌尾科噬菌体。

噬菌体具有严格的宿主特异性, 部分噬菌体

仅可裂解自身宿主,无法识别其他菌株<sup>[4,20,37]</sup>,因此为扩大噬菌体作为生物防治制剂时的杀菌范围,需要筛选强裂解性广谱噬菌体。本研究分别测定了噬菌体 VAP9 与 VAP21 对分离自越南、海南、广东等 7 个地域的 165 株溶藻弧菌的裂解能力,其裂解率均在 90% 以上,2 株噬菌体可在多数溶藻弧菌菌苔上形成透亮的噬菌斑;同时 2 株溶藻弧菌噬菌体联用后可有效增加对目标细菌的覆盖范围。说明 VAP9 与 VAP21 对不同地域来源的溶藻弧菌均具有良好的识别能力,且溶藻弧菌噬菌体联用后可弥补单一噬菌体对细菌识别的局限性,该结论与林业杰等<sup>[1]</sup>与 Stalin 等<sup>[24]</sup>研究结果相同。Li 等<sup>[22]</sup>发现溶藻弧菌噬菌体 IME271 可裂解 32 株溶藻弧菌中的 12 株。付汉清等<sup>[15]</sup>发现溶藻弧菌噬菌体  $\Phi$ V170 可裂解 15 株溶藻弧菌中的 7 株。林业杰等<sup>[14]</sup>分离出的溶藻弧菌噬菌体对 105 株溶藻弧菌的裂解率为 79.05%。相较以往研究,本实验中选取的溶藻弧菌菌株数量更多,同时供试噬菌体对溶藻弧菌的裂解率更高,因此本研究分离获得的溶藻弧菌噬菌体 VAP9 与 VAP21 均属于较为广谱的强裂解性噬菌体。

一些学者<sup>[1,22]</sup>发现溶藻弧菌噬菌体可特异性跨种识别副溶血性弧菌,其识别机理主要由于溶藻弧菌与副溶血性弧菌之间具有亲缘关系<sup>[1]</sup>,或由于溶藻弧菌噬菌体与副溶血性弧菌噬菌体的基因结构高度相似<sup>[22]</sup>。本研究针对 2 株噬菌体对 55 株其他种属细菌的裂解能力进行了测定,发现噬菌体 VAP9 与 VAP21 仅可交叉识别弧菌属内部分副溶血性弧菌,该实验结果与林业杰等<sup>[1]</sup>与 Li 等<sup>[22]</sup>的结论一致。本实验结果同时说明溶藻弧菌噬菌体对致病弧菌具有较强的识别特异性,为噬菌体疗法的生物安全性提供了理论依据。

最佳感染复数是研究噬菌体裂解效率的重要指标。曾林等<sup>[17]</sup>与 Kim 等<sup>[21]</sup>分离获得的溶藻弧菌噬菌体最佳 MOI 均为 10。Kalatzis 等<sup>[5]</sup>的研究中溶藻弧菌噬菌体  $\Phi$ St2 和  $\Phi$ Gm1 的最佳 MOI 分别为 10 和 100。付汉清等<sup>[15]</sup>报道了溶藻弧菌噬菌体  $\Phi$ V170 最佳 MOI 为 0.01。本研究发现 2 株溶藻弧菌噬菌体效价与其 MOI 值呈负相关关系,噬菌体 VAP9 与 VAP21 的最佳 MOI 均为 0.001,说明 2 株供试噬菌体对宿主菌具有较高的裂解效率,仅需少量噬菌体母液即可增殖出大量子代噬菌体。

本研究分别对噬菌体 VAP9 与 VAP21 的理化稳定性进行了测定。研究发现供试噬菌体的最适

pH 范围均宽于溶藻弧菌生长的最适 pH 范围<sup>[38]</sup>。2 株噬菌体酸碱耐受特性与文献报道相似<sup>[19,21]</sup>,且 VAP21 的酸碱耐受范围较 VAP9 更广。曾林等<sup>[17]</sup>发现溶藻弧菌噬菌体在 pH=12 条件下处理 1h 后,其效价下降 90%;与之相比,VAP21 在同等条件下效价下降较少(64%)。同时本研究延长了处理时间,VAP21 在 pH=11 条件下处理 96 h 后仍具 84% 的存活率,与其他学者<sup>[4,16,28,37]</sup>所报道的弧菌属噬菌体 pH 耐受性相比,VAP21 具有良好的持续耐碱能力。此外,2 株溶藻弧菌噬菌体还对紫外线及通用杀菌浓度的过氧乙酸<sup>[28]</sup>具有持续耐受性,说明供试噬菌体具有与过氧乙酸联用杀菌的潜力。因此,噬菌体 VAP9 与 VAP21 在环境中的生存能力强于溶藻弧菌,其对环境具有较强的耐受性。本研究进一步证实了噬菌体 VAP9 与 VAP21 作为溶藻弧菌病生物防治制剂的可行性。

许多学者发现溶藻弧菌噬菌体对 50 °C 以上的温度较敏感。Sasikala 等<sup>[19]</sup>报道噬菌体 VP01 于 50 °C 下 1 h 后其效价降低 2 个数量级。Kim 等<sup>[21]</sup>与 Li 等<sup>[22]</sup>研究的溶藻弧菌噬菌体于 60 °C 下 1 h 后存活率降低 80% 以上甚至失活。曾林等<sup>[17]</sup>与付汉清等<sup>[15]</sup>均发现溶藻弧菌噬菌体于 65 °C 下处理 30 min 后存活率不足 5%。部分溶藻弧菌噬菌体于 70 °C 下处理 10~45 min 即彻底失活<sup>[16,18-19]</sup>。本研究将噬菌体 VAP9 与 VAP21 分别置于 60 与 70 °C 下处理 2 h,发现其均具有较高的存活率及良好的裂解活性。说明 2 株供试噬菌体的热稳定性良好,同时对高温具有较好的持续耐受性。

近年来,噬菌体已逐步应用于各类细菌性病害的防治中<sup>[24,35-36]</sup>。为检测 2 株供试噬菌体在液体环境中对溶藻弧菌的防治效果及其有效工作浓度,本研究选取 3 种不同浓度的噬菌体及其混合制剂分别对较高浓度 ( $1 \times 10^7$  CFU/mL) 的溶藻弧菌进行抑菌实验。发现相同浓度噬菌体处理下,VAP9 与 VAP21 对溶藻弧菌 VAHN1 的抑制趋势相同,但 VAP21 的抑菌效果高于 VAP9。各实验组中 2 株噬菌体的混合制剂对溶藻弧菌的抑制效果均优于单株溶藻弧菌噬菌体,该结论与 Li 等<sup>[36]</sup>报道一致。不同浓度噬菌体处理下,高浓度的噬菌体 ( $1 \times 10^8$  PFU/mL) 对溶藻弧菌生长抑制作用明显。张建城<sup>[4]</sup>发现溶藻弧菌噬菌体在静止的液体环境中对溶藻弧菌具有良好的抑制作用。由于实际养殖过程中,养殖水体受外力影响常处于非静止状态,因此本实验亦选取非静止条件,加速细菌生



长速率的同时增大了噬菌体对目标菌的吸附识别难度。本实验结果与张建城<sup>[4]</sup>的研究结果相似, 说明溶藻弧菌噬菌体在静止和流动的液体环境中均具有较好的裂解溶藻弧菌的能力。代保英<sup>[25]</sup>发现大肠杆菌菌液被其噬菌体裂解至后期时菌液 OD<sub>600</sub> 值开始重新升高。本实验后期 (6.5~8 h) 各浓度噬菌体处理组的菌液吸光值均呈缓慢下降趋势, 说明供试溶藻弧菌未产生大量耐受噬菌体的变异菌株<sup>[25]</sup>, 推测试验后期影响菌液吸光值的主要因素为溶藻弧菌的细胞碎片。综上可知, 溶藻弧菌噬菌体 VAP9 与 VAP21 均具备作为生物抗菌剂应用于防治溶藻弧菌病害的潜力, 同时若于发病前较早投放噬菌体混合制剂, 可更好地防治溶藻弧菌。

水产动物弧菌性病害可能由数种弧菌共同作用导致<sup>[4,7]</sup>, 噬菌体作为一种新型抗菌制剂, 在水产领域具有极大的应用潜力<sup>[24,39-40]</sup>。本研究分离获得的溶藻弧菌广谱噬菌体 VAP9 与 VAP21 具有良好的理化耐受性与高效的杀菌能力, 2 株溶藻弧菌噬菌体可与本实验室前期分离获得的副溶血性弧菌噬菌体<sup>[28]</sup>进行联用, 扩大供试噬菌体在水产动物中的应用范围。同时, 将数种不同弧菌噬菌体混合施用可以进一步防止细菌出现噬菌体耐受性, 较好地防治水产动物弧菌性病害<sup>[40]</sup>, 有效提高水产动物的成活率<sup>[35]</sup>。本研究不仅丰富了溶藻弧菌噬菌体的菌种资源, 还为弧菌噬菌体作为微生态抗菌剂的开发应用提供了理论依据。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

## 参考文献 (References):

- [1] 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.  
Lin Y J, Chen K C, Chen G L, *et al.* The isolation of *Vibrio alginolyticus* bacteriophage[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 1993, 33(4): 285-289 (in Chinese).
- [2] 邬长祥. 我国南方养殖海域溶藻弧菌的遗传多样性及部分毒力基因的分布特征研究 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2012.  
Wu C X. The genetic diversity and distribution of virulent genes in *Vibrio alginolyticus* isolated from south China[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2012 (in Chinese).
- [3] 彭喜春, 张宁, 冉艳红, 等. 海产品中溶藻弧菌的筛选及其致病因子的研究[J]. 现代食品科技, 2008, 24(4): 312-315.  
Peng X C, Zhang N, Ran Y H, *et al.* Screening of *Vibrio alginolyticus* in sea foods and their pathogenic factors[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2008, 24(4): 312-315 (in Chinese).
- [4] 张建城. 溶藻弧菌噬菌体特性及其防控刺参感染的研究 [D]. 大连: 大连理工大学, 2017.  
Zhang J C. Study on characterization of bacteriophage for *Vibrio alginolyticus* and its control of infection on sea cucumber (*Apostichopus japonicus*)[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2017 (in Chinese).
- [5] 王俊霖; 招茵; 苏茵茵, 等. 溶藻弧菌 T3SS *exsD* 基因敲除突变株构建及其表型特征 [J]. 广东海洋大学学报, 2021, 41(5): 35-43.  
Wang J L, Zhao Y, Su Y Y, *et al.* Construction and characterization of gene *exsD* knock-out mutant of *Vibrio alginolyticus* type III secretion system[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2021, 41(5): 35-43 (in Chinese).
- [6] 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.  
Luo C X, Huang X X, 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).
- [7] 王国良, 祝璟琳, 金珊. 养殖大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 3 种致病弧菌的分子鉴定及其系统发育学分析 [J]. 海洋与湖沼, 2008, 39(2): 162-167.  
Wang G L, Zhu J L, Jin S. Molecular identification and phylogenetics of pathogenic *Vibrios* in cultured large yellow croaker *Pseudosciaena crocea richardson*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2008, 39(2): 162-167 (in Chinese).
- [8] Prol-García M J, Planas M, Pintado J. Different colonization and residence time of *Listonella anguillarum* and *Vibrio splendidus* in the rotifer *Brachionus plicatilis* determined by real-time PCR and DGGE[J]. *Aquaculture*, 2010, 302(1-2): 26-35.
- [9] Høj L, Bourne D G, Hall M R. Localization, abundance and community structure of bacteria associated with *Artemia*: effects of nauplii enrichment and antimicrobial treatment[J]. *Aquaculture*, 2009, 293(3-4): 278-285.

- [10] Olafsen J A. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture[J]. *Aquaculture*, 2001, 200(1-2): 223-247.
- [11] Sørum H, L'Abée-Lund T M. Antibiotic resistance in food-related bacteria—a result of interfering with the global web of bacterial genetics[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 78(1-2): 43-56.
- [12] Henein A E, Hanlon G W, Cooper C J, *et al.* A partially purified *Acinetobacter baumannii* phage preparation exhibits no cytotoxicity in 3T3 mouse fibroblast cells[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1198.
- [13] Rhoads D D, Wolcott R D, Kuskowski M A, *et al.* Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial[J]. *Journal of Wound Care*, 2009, 18(6): 237-243.
- [14] 林业杰, 欧剑鸣. 噬菌体用于溶藻弧菌的诊断和分型研究[J]. *中国微生物学杂志*, 1997, 9(2): 12-14.  
Lin Y J, Ou J M. Study on diagnose & type of *Vibrio alginolyticus* using bacteriophages[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 1997, 9(2): 12-14 (in Chinese).
- [15] 付汉清, 林茂, 翟少伟, 等. 一株宽谱裂解性溶藻弧菌噬菌体ΦV170的分离鉴定及生物学特性[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(4): 819-828.  
Fu H Q, Lin M, Zhai S W, *et al.* Isolation and characterization of a wide-spectrum bacteriophage ΦV170 lysing *Vibrio alginolyticus*[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(4): 819-828 (in Chinese).
- [16] 于鸽. 溶藻弧菌噬菌体、菌影疫苗及其对对虾免疫保护性的比较研究 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2011.  
Yu G. Comparison on immunoprotective effect of bacteriophages of *Vibrio alginolyticus* and vaccines of bacterial ghost[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2011 (in Chinese).
- [17] 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.  
Zeng L, Qiu D Q, Xie J H, *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).
- [18] Nakamura K, Kakimoto D, Swafford J, *et al.* Studies on the characteristics of the bacteriophages of *Vibrio alginolyticus* strain B-1 isolated from Kinko Bay[J]. *Memoirs of Faculty of Fisheries Kagoshima University*, 1978, 27(1): 59-64.
- [19] 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.
- [20] Kokkari C, Sarropoulou E, Bastias R, *et al.* Isolation and characterization of a novel bacteriophage infecting *Vibrio alginolyticus*[J]. *Archives of Microbiology*, 2018, 200(5): 707-718.
- [21] Kim S G, Jun J W, Giri S S, *et al.* Isolation and characterisation of pVa-21, a giant bacteriophage with anti-biofilm potential against *Vibrio alginolyticus*[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 6284.
- [22] Li F, Xing S Z, Fu K F, *et al.* Genomic and biological characterization of the *Vibrio alginolyticus*-infecting “Podoviridae ” bacteriophage, vB\_ValP\_IME271[J]. *Virus Genes*, 2019, 55(2): 218-226.
- [23] Clokie M R J, Kropinski A M. Bacteriophages: methods and protocols, Volume 1: isolation, characterization, and interactions[M]. Hertford: Human Press, 2008.
- [24] 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.
- [25] 代保英. 大肠杆菌 K88 噬菌体的分离、分类初步鉴定和生物学特性的测定 [D]. 扬州: 扬州大学, 2009.  
Dai B Y. Isolation, identification and biological properties of the bacteriophages for *E. coli* K88[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2009 (in Chinese).
- [26] Zhang J C, Cao Z H, Xu Y P, *et al.* Complete genomic sequence of the *Vibrio alginolyticus* lytic bacteriophage PVA1[J]. *Archives of Virology*, 2014, 159(12): 3447-3451.
- [27] 查涛, 梁俊容, 肖玉春, 等. 噬菌体phiYe-F10的裂解谱的测定以及裂解能力与宿主毒力基因间关系分析[J]. *病毒学报*, 2016, 32(2): 185-189.  
Zha T, Liang J R, Xiao Y C, *et al.* Detection of *Yersinia enterocolitica* bacteriophage PhiYe-F10 lysis spectrum and analysis of the relationship between lysis ability and virulence gene of *Yersinia enterocolitica*[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2016, 32(2): 185-189 (in Chinese).
- [28] 乔欢, 徐旭凌, 费文斌, 等. 三株AHPND致病型副溶血性弧菌烈性噬菌体的分离鉴定及其生物学特性[J]. *水产学报*, 2019, 43(5): 1378-1396.

- Qiao H, Xu X L, Fei W B, *et al.* Isolation, identification and biological properties of 3 lytic bacteriophages against AHPND-associated *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(5): 1378-1396 (in Chinese).
- [29] 陈澄. 4 株海洋噬菌体的分离纯化及其生物学特性的研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2015.
- Chen C. Separation and purification of four marine phages and the biological characteristics research[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2015 (in Chinese).
- [30] 孙佳, 叶德赞, Kochel A, 等. 裂解性弧菌噬菌体的分离及生理特性[J]. *微生物学报*, 2008, 48(6): 780-784.
- Sun J, Ye D Z, Kochel A, *et al.* Isolation and physiological characteristics of lytic bacteriophages of *Vibrio*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(6): 780-784 (in Chinese).
- [31] 江艳华, 王联珠, 李凤铃, 等. 一株副溶血性弧菌裂解性噬菌体的分离、鉴定及其生物学特性[J]. *中国生物制品学杂志*, 2015, 28(11): 1147-1152,1156.
- Jiang Y H, Wang L Z, Li F L, *et al.* Isolation, identification and biological properties of a lytic phage against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2015, 28(11): 1147-1152,1156 (in Chinese).
- [32] 洪健, 周雪平. ICTV第八次报告的最新病毒分类系统[J]. *中国病毒学*, 2006, 21(1): 84-96.
- Hong J, Zhou X P. The universal system of virus taxonomy in the 8th ICTV report[J]. *Virologica Sinica*, 2006, 21(1): 84-96 (in Chinese).
- [33] Li X C, Xiang Z Y, Xu X M, *et al.* Endophthalmitis caused by *Vibrio alginolyticus*[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47(10): 3379-3381.
- [34] Lomelí-Ortega C O, Martínez-Díaz S F. Phage therapy against *Vibrio parahaemolyticus* infection in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae[J]. *Aquaculture*, 2014, 434: 208-211.
- [35] Zhang J C, Cao Z H, Li Z, *et al.* Effect of bacteriophages on *Vibrio alginolyticus* infection in the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenka)[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2015, 46(2): 149-158.
- [36] Li Z, Li X Y, Zhang J C, *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.
- [37] 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, 2016.
- Li N. The separation and identification of bacteriophage of *Vibrio harveyi*, *Vibrio splendidus* and study of the biological characteristic[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2016 (in Chinese).
- [38] 张晓艳, 宁喜斌. 响应面法优化溶藻弧菌的培养条件[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(16): 221-223,245.
- Zhang X Y, Ning X B. Optimization of cultivation conditions of *Vibrio alginolyticus* by response surface methodology[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(16): 221-223,245 (in Chinese).
- [39] Jun J W, Han J E, Giri S S, *et al.* Phage application for the protection from Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in *Penaeus vannamei*[J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2018, 58(1): 114-117.
- [40] 李振. 噬菌体防控苗期刺参弧菌感染的研究 [D]. 大连: 大连理工大学, 2018.
- Li Z. Study on the usage of phage in controlling *Vibrio* infection in the juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2018 (in Chinese).



## Isolation, identification and biological properties of two lytic phages against *Vibrio alginolyticus*

QIAO Huan, CHEN Hai, XU Xuling\*, CONG Yu, LIU Mo,  
HE Silong, FEI Wenbin, HUANG Jie, HU Yilin  
(Phagelux (Nanjing) Bio-tech Co., Ltd., Nanjing 210000, China)

**Abstract:** *Vibrio alginolyticus* is one of the main pathogens that causes mass mortality in aquatic animals and infects humans. To reduce the application of antibiotics, alternative therapies have been proposed. One of the promising possibilities is to control diseases through the use of lytic bacteriophages. As few current bacteriophages against *V. alginolyticus* have been reported, the main objective of this study is to develop effective bacteriophages for controlling pathogenic bacteria. This study describes the isolation and characterization of lytic bacteriophages against a *V. alginolyticus* strain (VAHN1). The bacteriophages were isolated from Hainan shrimp pond and Fujian marine products by double-layer agar culture method, and *V. alginolyticus* VAHN1 was used as the host strain for bacteriophage isolation. The phages were classified and identified by transmission electron microscope (TEM), restriction endonuclease and phylogenetic tree analysis. The physiological and biochemical characteristics of the bacteriophages were determined, including optimal multiplicity of infection (MOI), lysis spectrum detection, pH stability, thermal stability, resistance to UV light, and sensitivity to chloroform and ether. In addition, the effect of bacteriostasis were also measured. The results showed that 2 lytic bacteriophages against *V. alginolyticus* were isolated, named as VAP9 and VAP21. The plaques of VAP9 and VAP21 were neat and transparent, with a diameter of 1.5-2 mm. The nucleotides of the phage VAP9 and VAP21 were all dsDNA, and all their heads were shown as icosahedral shape with about 55 nm and 65 nm diameter respectively under TEM. The tail of the phage VAP9 was approximately 65-70 nm in length and 15 nm in width, while the tail of the phage VAP21 was about 75-80 nm in length and 18 nm in width. The 2 bacteriophages are grouped under the Myoviridae family. The phage VAP9 and VAP21 had good tolerance to different physical and chemical environment. The survival rate of the 2 bacteriophages was greater than 43% at 60 °C for 2 h. The optimal pH of VAP9 was 6-8 and VAP21 was 7-11. The 2 bacteriophages tolerated peracetic acid in universal bactericidal concentration. The phages VAP9 and VAP21 were insensitive to chloroform and ether, with a certain resistance to UV light. The optimal MOIs of both VAP9 and VAP21 were 0.001. The cocktail of VAP9 and VAP21 was able to infect 95.2% (157 strains among 165 strains) of the *V. alginolyticus* strains and 50% (3 strains among 6 strains) of the *V. parahaemolyticus* strains used in this study. And they could not infect other species of tested bacteria except *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus*. The phages VAP9 and VAP21 could effectively inhibit the growth of *V. alginolyticus* VAHN1 and have the same inhibitory trend on VAHN1, but the VAP21 strain had a stronger bacteriostatic effect than that of the VAP9 strain. Moreover, the inhibitory effect involved the cocktail of 2 bacteriophages on *V. alginolyticus* were better than that of a single phage. Alignment with the sequences of the conserved protein amino acid sequences of the phage VAP9 and VAP21 on National Center for Biotechnology Information (NCBI), it was showed that the 2 bacteriophages had low homology with other bacteriophages. Furthermore, phylogenetic and genome analysis revealed that the phages VAP9 and VAP21 have low homology with other bacteriophages and may be 2 novel Myoviridae bacteriophages that infect bacteria related *Vibrio* spp. This study did not only enrich the species resources of bacteriophages against *V. alginolyticus*, but it also laid a theoretical foundation for the development and application of *Vibrio* bacteriophages as microecological antimicrobial agents.

**Key words:** *Vibrio alginolyticus*; bacteriophage; isolation; biological characteristics; antimicrobial agents

**Corresponding author:** XU Xuling. E-mail: xuxuling1985@163.com

**Funding projects:** Phagelux-Research and Application of Bacteriophage Control of *Vibrio* Diseases in *Litopenaeus vannamei*