

溶藻弧菌噬菌体的分离

林业杰 陈亢川 陈拱立 胡海林

(福建省流行病防治研究所, 福州 350001)

从海产品中检出 29 株溶藻弧菌噬菌体, 从中选出 4 株进行鉴定。据噬菌斑特征可分为两类: 一类是透明, 一类是不透明。但大小各有差异, 直径均在 0.5—3.0mm。电镜可见形态也可分成两种类型: 即头部呈长轴六角形, 尾部细长, 结构简单; 另一类头部呈等轴六角形, 但棱角不甚明显, 尾部很短。这些噬菌体的增殖效价均可达 10^8-9 pfu/ml, 对溶藻弧菌的综合裂解率为 72.22%, 单株平均裂解率在 9.72—44.4%。4 株噬菌体的特异性高, 原液与 612 株属外常见菌作交叉裂解试验, 均未出现交叉裂解现象; 与 697 株属内弧菌测试, 也仅对副溶血弧菌有 39.0% 的交叉裂解, 但将原液稀释至 10RTD 时, 大部分交叉现象消失, 表明两菌间有明显的亲缘关系。

关键词 溶藻弧菌; 噬菌体

溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*) 是 Miyamoto 1961 年订名的一种新致病性弧菌。该菌广泛存在于世界各地海水和海产品中, 其数量居海类弧菌之首。早在 70 年代初 Biake^[1] 就提出该菌对人类有致病作用。近年来, 世界各地均陆续报道从急性胃肠炎患者粪便中检出溶藻弧菌^[2-4]。但是, 有关该菌噬菌体研究, 迄今国内外未见报道。作者于 1990 年夏秋从海产品中成功地分离出溶藻弧菌噬菌体, 现将初步分离鉴定结果报告如下。

材料与 方 法

(一) 菌株来源

1. 宿主菌: 系从腹泻患者粪便及海产品中分离, 经测试非溶原性溶藻弧菌 6 株。其中人源菌 4 株, 海产品源菌 2 株。

2. 其他试验菌株: 系本实验室保存的检自福建地区人和动物, 外环境等各类菌株 1381 株。其中包括溶藻弧菌 72 株、副溶血弧菌 218 株、埃尔托弧菌 100 株、河弧菌 224 株、非 01 群弧菌 155 株(易北河弧菌 14 株); 气单胞菌属 316 株; 肠杆菌科菌 296 株(沙门氏菌属 40 株、志贺氏菌属 66 株、EIEC51 株、ETEC43 株、绿脓假单胞菌 56 株、耶氏菌 25 株、变形杆菌 15 株)。

(二) 培养基^[5]

液体培养基系采用 pH 7.6—7.8 牛肉汤(含 1%NaCl); 固体培养基系以液体培养基为基础, 加入不同量琼脂(2%、1.5%、0.8%) 制成平板。

(三) 噬菌体参考株

本文于 1991 年 12 月 29 日收到。

承福建省卫生防疫站刘书峰医师协助电镜观察, 谨此致谢。

福建省福安县卫生防疫站郭秀珠、龙海县卫生防疫站高慧恋、林国华、许惠珍等同志参加部分工作。

埃尔托弧菌分型噬菌体 V_{p4} 。系中国预防医学科学院流行病学和微生物学研究所提供。

(四) 分离方法

从农贸市场采集各类海产品标本, 每 5—10g 左右为 1 份, 捣碎后加入 20—30ml 碱性肉汤, 置 37 °C 培养过夜, 次日分别取各培养液 3—5ml 至另一支灭菌小试管内, 加入氯仿至 3%, 充分振摇 2—3 分钟, 室温静止 1—2 小时, 3000r/min 离心 30 分钟, 取上清液分别与 6 株宿主菌, 用斑点法测定有否噬菌体存在, 如有出现噬菌斑, 再挑取噬菌斑或斑块于小管肉汤内, 除菌后 (56 °C 水浴 30 分钟) 加入相应宿主菌作传代增殖, 凡能传代增殖者判为阳性。

(五) 噬菌体的纯化与增殖

初分离的噬菌体经肉汤稀释成一定比例, 用双层琼脂法作单斑培养, 观察噬菌斑特征, 再用接种针沾取单个噬菌斑于另一支小管肉汤内作少量增殖。经同样方法连续单斑化 3 次, 取纯株为噬菌体母液供增殖用, 根据测试, 选择最佳比例进行增殖。常用的增殖方法为液体增殖法和半固体平板增殖法, 以后者的增殖效果最佳 [6]。

(六) 增殖液的效价测定

每株噬菌体增殖后均分别进行 pfu/ml 和 RTD 测定, 方法按文献 [6] 进行。

(七) 电镜形态观察

取效价在 10^8-9 /ml 的噬菌体原液制片 (铜网) 后, 用 pH6.8 磷钨酸负染, 在日本 JEM-1200EX 型电镜下观察噬菌体形态和拍片。

(八) 对同种菌的裂解力测定及判定标准

被检菌纯化后转种碱性肉汤, 37 °C 培养 3 小时, 用斑点法分别取各培养物涂布于 1.5% 琼脂平板上, 晾干后用 $4\frac{1}{2}$ 号针头注射器吸取噬菌体液于各琼脂平板上滴一滴, 待吸收干后置 37 °C 温箱培养 5—6 小时, 观察初步结果, 再继续培养至 10—12 小时, 观察最后结果。判定标准: 在滴有噬菌体部位出现裂解彻底, 呈透明的融合斑 (CL) 为 “++++”; 斑点透明, 中间有少数再生菌落生长为 “+++”; 斑点透明, 但裂解不彻底, 有明显的再生菌落生长为 “++”; 仅有少数单个噬斑或不透明斑块为 “+”; 不出现噬斑者为 “—”。

(九) 噬菌体的特异性测定

4 株噬菌体分别与 1309 株属内外常见菌作交叉裂解试验, 方法同上。

结 果

(一) 溶藻弧菌噬菌体的检出

共检查培养各类海产品标本 111 份, 检出溶藻弧菌噬菌体 29 株, 检出率为 26.13%。

(二) 噬菌体特征

此次从海产品中检出的 29 株噬菌体经初步测试, 多数噬菌体的性状相似, 裂解面较狭窄。本试验中选出 4 株裂解力较强的噬菌体进行鉴定。编号暂用 V_{ap1} 、 V_{ap2} 、 V_{ap3} 、 V_{ap4} 。

1. 噬菌斑特征: 4 株噬菌体的噬菌斑除 V_{ap3} 较不透明外, 其它均为透明, 圆整, 边缘清楚, 无晕环。但 V_{ap1} 的噬菌斑较小, 直径为 0.5—1.2mm; V_{ap2} 的噬菌斑较大, 直径为

1.5—3.0mm; V_{ap3} 的噬菌斑直径约 0.5—1.5mm; V_{ap4} 的噬菌斑直径 1.0—2.0mm。

2. 电镜观察结果: 电镜观察 4 株噬菌体的形态可分为两种类型: V_{ap1} 和 V_{ap3} 的头部呈长轴六角形, 大小为 $85 \times 45\text{nm}$, 尾部细长, 结构简单, 尾长 125—130nm; V_{ap2} 和 V_{ap4} 的头部呈等轴六角形, 但棱角不明显, 类似球状体, 体积为 $45 \times 45\text{nm}$, 尾部很短, 10—15nm。

3. 增殖液效价: 4 株噬菌体的增殖液经分别测定效价均较高。 V_{ap1} 为 1.4×10^9 pfu/ml 和 10^4RTD ; V_{ap2} 为 3.5×10^9 pfu/ml 和 10^4RTD ; V_{ap3} 为 4.0×10^8 pfu/ml 和 10^4RTD ; V_{ap4} 为 2.5×10^8 pfu/ml 和 10^4RTD 。

4. 对同种菌的裂解结果: 4 株噬菌体的增殖液效价均达 10^{8-9} pfu/ml。因此, 对溶藻弧菌的裂解力较强。采用斑点法, 分别与 72 株同种菌作试验, 结果有 52 株菌能被裂解, 总裂解率为 72.22%(表 1), 单株噬菌体的裂解率见表 2。

表 1 4 株噬菌体对不同来源溶藻弧菌的裂解结果

Table 1 The lysis result of 4 bacteriophages to *V. alginolyticus* of differential source

菌株来源 Source of strain	人 Man	海产品 Seafood	食品 Food	合计 Total
试验菌数 No. strain tested	32	32	8	72
裂解株数 No. lysis strain	27	19	6	52
裂解率 (%) lysis rate	84.38	59.37	75.0	72.22

表 2 单株噬菌体的裂解率

Table 2 The lysis of single bacteriophage

菌株来源 Source of strain	试验株数 No. strain tested	噬菌体号 Name of bacteriophage			
		Vap1	Vap2	Vap3	Vap4
人 Man	32	18(56.25)*	14(43.75)	4(43.75)	6(18.75)
海产品 Seafood	32	11(34.38)	10(31.25)	4(12.5)	0
食品 Food	8	3(37.5)	2(25.0)	2(25.0)	1(12.5)
合计 Total	72	32(44.4)	26(36.1)	20(27.78)	7(9.72)

*() 百分率 Percent

5. 噬菌体的特异性: 4 株噬菌体分别与属内外常见菌 1309 株作交叉裂解试验。结果表明, 该组噬菌体的特异性高, 除与属内副溶血弧菌有 39.0% 的交叉裂解外, 对其余菌株均未出现裂解(表 3)。但将噬菌体原液稀释至 10RTD 时, 有 20.6% 的交叉裂解消失, 还有 18.35% 的菌株仍出现交叉裂解。

埃尔托弧菌噬菌体参考株 V_{p4} , 除对 100 株埃尔托弧菌全部裂解外, 对志贺氏菌属也有 3% 的交叉裂解。

表 3 4 株噬菌体的特异性
Table 3 Specificity of bacteriophages tested

试验菌名称 Name of strain tested	埃尔托弧菌 <i>V. cholerae</i> biotype Eltor	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	河弧菌 <i>V. fluvialis</i>	非 O1 群弧菌 <i>V. cholerae</i> non-O1	气单胞菌 <i>Aeromonas</i> spp.	志贺氏菌属 <i>Shigella</i> spp.
试验菌株数 No. strain tested	66	100	218	224	155	316
交叉裂解率 (%) Cross-lysis rate	0	0	39.0	0	0	0
试验菌名称 Name of strain tested	沙门氏菌属 <i>Salmonella</i> spp.	EIEC	ETEC	绿脓假单胞菌 <i>P. aeruginosa</i>	耶氏菌 <i>Yersinia</i> spp.	变形杆菌 <i>Proteus</i> spp.
试验菌株数 No. strain tested	40	51	43	56	25	15
交叉裂解率 (%) Cross-lysis rate	0	0	0	0	0	0

讨 论

《伯杰细菌鉴定手册》第八版 (1974) 将溶藻弧菌列为副血弧菌中的一个生物型, 即副溶血弧菌为生物 I 型, 溶藻弧菌为生物 II 型。到 1984 年《伯杰氏系统细菌学手册》时, 才把溶藻弧菌从副溶血弧菌中划分出来, 独立成为一个种。该菌早在 1973 年 Biake 就证实对人类有致病作用, 主要是引起肠外感染^[1]。但是, 近年来, 国内外已陆续报道从急性胃肠炎患者粪便中检出该菌。李文科等^[7](1990) 报道由溶藻弧菌引起食物中毒, 并从分离菌检出 ST 和 LT 肠毒素。但有关溶藻弧菌噬菌体资料, 至今国内外未见报道。本文报道从 111 份海产品中分离出 29 株溶藻弧菌噬菌体 (26.13%), 检出的噬菌体多数的性状相似, 裂解面较狭窄, 仅从中选出裂解力较强的 4 株噬菌体进行研究。据噬菌斑特征, 除 V_{ap3} 较不透明外, 其余的噬菌斑均为透明, 圆整, 边缘清楚, 无晕环, 但噬菌斑大小各有差异。据电镜观察, 4 株噬菌体的形态大致可分成两种类型, 即 V_{ap1} 和 V_{ap3} 的头部呈长轴六角形, 尾部细长, 结构简单; V_{ap2} 和 V_{ap4} 的头部呈等轴六角型, 但棱角不明显, 类似球状体, 尾部短而不明显。这些噬菌体的增殖效价均可达 $10^{8-9}/\text{ml}$, 对溶藻弧菌的总裂解率为 72.22%, 单株的平均裂解率均为 9.72—44.4%。

本次选出的 4 株噬菌体特异性高。分别与 1309 株属内外常见菌作交叉裂解, 仅对副溶血弧菌有 39.0% 的交叉裂解, 其余菌株均未出现裂解。溶藻弧菌噬菌体对副溶血弧菌的交叉裂解率较高, 这表明两菌间具有明显的亲缘关系。鉴于这些噬菌体对人源菌的裂解率高达 84% 以上, 如再继续补充和提高, 有可能发展为诊断和分型用噬菌体, 将在流行病学调查和传染源追溯方面起重要作用。

参 考 文 献

- [1] Biake, P. A. et al.: *Annu. Rev. Microbiol.*, 34:341—346, 1980.
 [2] Assarwal, P. et al.: *J. Diarrhoeal Diseases Research*, 4:30—34, 1986.
 [3] 权太淑等: 中国公共卫生, 4 (5): 15—18, 1985.
 [4] 余铁甫等: 中华流行病学杂志, 11(腹泄病专辑特刊 8):219, 1990.
 [5] 陈亢川等: 中国人兽共患病杂志, 8 (4): 5—8, 1992.
 [6] 何晓青主编: 卫生防疫细菌检验, 第 1 版, 第 650—655 页, 新华出版社, 北京, 1989 年。
 [7] 李文科等: 中华流行病学杂志, 11(腹泄病专辑特刊 8):99—102, 1990.

THE ISOLATION OF *VIBRIO ALGINOLYTICUS* BACTERIOPHAGE

Lin Yejie Chen Kangchuan Chen Gongli Hu Hailin

(Fujian Institute of Epidemiology, Fuzhou 350001)

We identified 4 bacteriophages of *V. alginolyticus* in 29 ones, which were first isolated from seafood. According to their character of the plaques, they were classified into two kinds: one plaque was clear, the other was opaque. The size of these plaques were different and their diameters are 0.5—3.0mm. By electron microscopy observation, they could be classified into two kinds; one has a long axie and hexagemal head, and a thin-long tail, the other has an equal axie hexagenal head and a very short tail, but the edges and corners aren't clear. The multiplication valence of the phages attained to 10^{8-9} pfu/ml. Total lysis rate of 4 bacteriophages was 72.22% to *V. alginolyticus*. However, the lysis rate of single phage was 9.72—44.4%. 4 bacteriophages all had high host specificity. Cross-lysis reaction wasn't found in the test of original solution of bacteriophages to 612 strains of different genus bacteria and 697 strains of genus *Vibrio*, but they only showed 39% cross-lysis rate to *V. parahaemolyticus* and most part of this phenomenon disappeared at 10 RTD of the phages. Thus, the obvious relation of consanguinity was showed between two kinds of bacteria strains.

Key words *Vibrio alginolyticus*; Bacteriophage

图 版 说 明

Explanation of plates

图 版 I

4 株溶藻弧菌噬菌体的噬菌斑形态: 1. V_{ap1} ; 2. V_{ap2} ; 3. V_{ap3} ; 4. V_{ap4} .

图 版 II

4 株溶藻弧菌噬菌体的形态: 1. V_{ap1} ; 2. V_{ap2} ; 3. V_{ap3} ; 4. V_{ap4} (150000 \times) .

Plate I

The morphology of the plaques of 4 strains of *V. alginolyticus* bacteriophages: 1. V_{ap1} ; 2. V_{ap2} ; 3. V_{ap3} ; 4. V_{ap4} .

Plate II

The morphology of 4 strains of *V. alginolyticus* bacteriophages: 1. V_{ap1} ; 2. V_{ap2} ; 3. V_{ap3} ; 4. V_{ap4} .