

一株粘质沙雷氏菌烈性噬菌体污水分离及特性

于龙, 温占波, 杨文慧, 李娜, 王洁, 鹿建春, 李劲松*

(军事医学科学院微生物流行病研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室,
国家生物防护装备工程技术研究中心, 北京 100071)

摘要:【目的】以粘质沙雷氏菌(8039)为宿主菌从医院污水中分离噬菌体并对其基本生物学特点进行研究。【方法】四步法污水分离噬菌体; 单、双层平板噬菌斑实验筛选烈性噬菌体并观察噬菌斑形态; 纯化后 2% 磷钨酸染色电镜观察; 手工法提取噬菌体核酸酶切后琼脂糖凝胶电泳分析; 利用双层平板噬菌斑实验测定最佳感染复数和完成一步生长实验。【结果】从医院污水中成功分离出粘质沙雷氏菌烈性噬菌体一株(SM701), 该噬菌体有一个正多面体立体对称的头部, 头径约 64nm, 无囊膜, 有一长尾, 无收缩尾鞘, 尾长约 143nm; 基因组核酸能被双链 DNA 内切酶 *BamH* 及 *Hind* 切开, 大小约 57kb; 噬菌斑圆形透明, 直径 1mm 左右(培养 12h), 边界清楚; 当感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 10 时, 子代噬菌体滴度较高; 按照一步生长实验结果绘制出一步生长曲线, 可知感染宿主菌的潜伏期是约为 30min, 爆发期约 100min, 平均爆发量约为 63。【结论】按照国际病毒分类委员会分类标准, 该噬菌体属于长尾噬菌体科(*siphoviridae*)烈性噬菌体, 按照 Bradley 和 Ackermann 形态分类法属于 B1 亚群; 噬菌斑与周围红色细菌生长区, 颜色差异明显, 非常便于观察和计数; 噬菌体头部大小和形态与呼吸道病毒中的呼肠病毒和腺病毒最为接近; 国内尚未见粘质沙雷氏菌噬菌体相关报道。

关键词: 粘质沙雷氏菌; 噬菌体; 分离; 生物学; 形态学

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 04-0498-05

粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)广泛存在于水、土壤和食品中^[1], 它是细菌中最小的, 为短杆菌, 菌体长度约 0.9 μ m~2.0 μ m, 直径约 0.5 μ m~0.8 μ m, 周身鞭毛可帮助其运动, 无芽孢, 常用于检查滤菌器的除菌效果^[2]; 部分菌株可产生血样色素—灵菌红素(prodigiosin)便于追踪, 因此, 一直作为空气微生物学研究的模式菌。噬菌体是以细菌为宿主的一类病毒, 所以又称细菌病毒, 具有病毒的共同特性, 有严格的宿主特异性, 但对人类和动物不具有感染性。其广泛存在于自然界中, 有人估计, 自然界中细菌的种类大约为 10^{30} , 假设每种细菌有 10 种相应的噬菌体, 那么噬菌体种类将达到

10^{31} 之多^[3]。由于具有病毒的共性, 但其培养、计数方法远比病毒经济省时, 不会造成试验人员感染, 试验程序上的简便性、可操作性和安全性都较强。因此, 选用噬菌体模拟病毒进行相关研究较为研究人员所关注^[4-6]。为此, 我们对微生物学研究中常用指示微生物——粘质沙雷氏菌进行噬菌体的分离和生物学特性研究, 为今后开发和利用该噬菌体气溶胶模拟病毒气溶胶开展相关研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: LB 培养液配方(胰蛋白胨、

基金项目: 国家科技攻关课题(2004BA719A15)

*通讯作者。Tel/Fax: +86-10-63865693; E-mail: Lij-s@163.com

作者简介: 于龙(1980-), 男, 宁夏人, 博士研究生, 主要从事军事预防医学和微生物学研究。E-mail: hasless@163.com

收稿日期: 2007-09-14; 修回日期: 2007-12-29

酵母提取物、氯化钠, OXOID 公司产品), 琼脂(JAPAN 分装), 上层 LB 培养基(含 0.7% 琼脂), 下层 LB 培养基(含 1.5% 琼脂), 普通营养肉汤(广东环凯产品), 普通营养琼脂培养基(广东环凯产品), DNase (Roche 产品), RNase(北京欣经科生物技术有限公司), Proteinase K(Merck), DNA 内切酶 *Bam* H 和 *Hind* (TaKaRa), DNA Marker(TaKaRa), 酚: 氯仿: 异戊醇液(25: 24: 1) 和饱和平衡酚溶液(BioFlux 公司产品), PEG-8000(JAPAN 分装), 全温振荡培养箱(HZQ-F 哈尔滨市东联), 隔水式恒温电热培养箱(上海), 高压灭菌锅(SAKURA ASV-3023), 生物安全柜(Telstar Bio- - A), SIGMA 3-18K 低温离心机, SIGMA 2K15 低温离心机等。

1.1.2 实验用菌种: 粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)8039 和大肠杆菌(*Escherichia coli*)8099 (军事医学科学院微生物流行病学研究所菌种中心购买)、大肠杆菌 285(军事医学科学院四所赠)。

1.2 噬菌体的分离

1.2.1 污水预处理: 取某医院污水处理站消毒前污水加入氯化钙母液振荡使充分混匀(终浓度约为 1mmol/L), 用微孔滤膜(孔径 0.2 μ m)过滤除菌, 将滤液接入高压灭菌过的三角烧瓶内。

1.2.2 初次培养: 向含 50mL 滤液三角烧瓶中加入 20mL LB 培养液并加入粘质沙雷氏菌 8039 菌液 2.0mL, 摇匀后置于 35 温箱内静置培养 12h。

1.2.3 二次增值培养: 将初次增值液于 4 下 8000 \times g 离心 30min, 取上清液 9mL 加入 10mL 营养肉汤及相应宿主菌液 0.3mL, 室温下放置 1h, 35 120 r/min 振荡培养 3.5h。

1.2.4 离心收获原液: 将上述培养液 4 下 12000 \times g 离心 30min, 上清液即为拟含有相应宿主菌噬菌体的原液。

1.3 噬菌体原液单层平板验证实验

用记号笔将普通营养琼脂平板分为 3 个扇形区, 吸取宿主菌液 0.15mL 滴于普通营养琼脂平板正中央, 用灭菌“L 棒”将菌液均匀地涂开, 待其自然晾干后, 任意选取一个扇形区域, 上滴宿主菌噬菌体原液 0.05mL, 然后用灭菌“L 棒”将噬菌体液涂匀, 界限以不超出该扇形区域为准, 待自然晾干后, 置于 35 温箱培养 12h, 平板于室温下放置 2h 后

进行观察。

1.4 噬菌体双层平板噬菌斑实验

取 10^2 、 10^4 、 10^6 倍稀释噬菌体原液各 0.1mL 与宿主菌液 0.3mL 混匀, 室温放置 15min 后, 加入 50 上层 LB 培养基约 5mL, 将该混合液迅速倾倒入下层 LB 培养基平板上, 摇匀平置 5min, 35 温箱培养 12h 后观察噬菌斑形成情况。

1.5 单一性噬菌体筛选

在有噬菌斑形成的双层平板上挑取形态大小一致、单个独立典型噬菌斑, 用火焰灭菌后接种针刺穿刺目的噬菌斑, 将穿刺后接种针伸入 3~5mL 营养肉汤中, 轻轻搅拌, 重复 2~3 次后, 加入噬菌体宿主菌液 0.1~0.2mL, 摇匀, 室温放置 1h 后, 35 培养 12h, 4 下 12000 \times g 离心 30min, 取上清液 4 保存。

1.6 噬菌体的形态学

参照分子克隆实验指南(第二版)^[7]中噬菌体纯化方法纯化噬菌体 SM701, 取少许滴于覆有 Formvar 膜的铜网上, 以 2% 磷钨酸(PTA)(PH7.0)染色 5~10min, 将铜网放于干燥滤纸上, 自然干燥后用 Philips Tecnai 10 透射式电镜观察。

1.7 噬菌体 SM701 核酸的提取及酶切分析

取经纯化的 SM701 颗粒悬液, 参照分子克隆实验指南(第二版)^[7]中 λ 噬菌体 DNA 提取方法提取核酸, 溶解定量后用限制性内切酶 *Bam*H 或 *Hind* 酶切, 根据酶切图谱鉴定核酸近似大小。

1.8 最佳感染复数的测定

感染复数(multiplicity of infection, MOI)是指初始感染时加入噬菌体的数量与宿主菌数量的比值, 也称感染倍数。参照 Lu 等^[8]的方法, 略有改动。

1.9 一步生长曲线的绘制

参照 Lu 等^[8]的方法, 有改动。

1.10 噬菌体宽噬实验

取 10^2 、 10^4 、 10^6 倍稀释 SM701 噬菌体液各 0.1mL 分别与大肠杆菌 285、大肠杆菌 8099 菌液 0.3mL 混匀, 室温放置 15min 后, 加入 50 上层 LB 培养基约 5mL, 将该混合液迅速倾倒入下层 LB 培养基平板上, 摇匀平置 5min, 37 温箱培养 12h 后观察噬菌斑形成情况。

2 结果

2.1 噬菌体原液单层平板验证实验

如图 1 所示, 涂有宿主菌液和噬菌体原液的下 1/3 扇形区域, 没有红色菌苔出现, 而涂宿主菌液未涂噬菌体原液的上 2/3 扇形区域生长出一层均匀的红色菌苔。由此判断, 噬菌体原液中很可能含有烈性噬菌体, 而且滴度较高以至出现溶菌区域。与以往研究不同的是, 使用单层平板噬菌斑法就可快速判断原液中是否含有该宿主菌烈性噬菌体。



图 1 粘质沙雷氏菌噬菌体原液单层平板噬菌斑实验
Fig. 1 Outcome of original phage solution of *Serratia marcescens* single layer agar medium plate plaque test. As it was illustrated above, the lower 1/3 pie slice of the plate without a bacterial lawn because of phage lysis, whereas the upper 2/3 was grown with a bacterial lawn because of without dripping original phage solution.

2.2 单一性噬菌体筛选

反复进行噬菌斑穿刺液体培养后, 分离出粘质沙雷氏菌噬菌体 SM701, LB 双层平板噬菌斑结果见图 2, 可见该噬菌斑形态为圆形, 直径 1mm 左右(培养 12h), 逆光观察噬菌斑呈透明状, 边界清楚。

2.3 噬菌体的形态大小

电镜下观察粘质沙雷氏菌噬菌体 SM701(图 3), 有一个正多面体立体对称的头部, 头径约 64nm, 无囊膜, 有一长尾, 无收缩尾鞘, 尾长约 143nm。

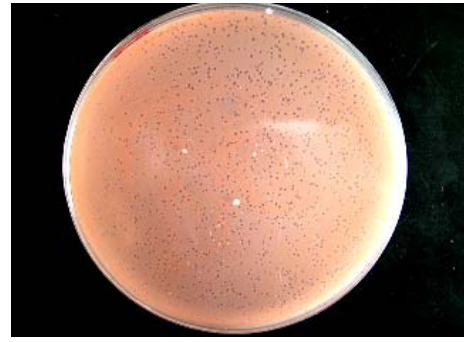


图 2 SM701 噬菌体第八次纯化增值液 10^4 倍稀释后双层琼脂噬菌斑试验结果

Fig. 2 Double layer agar medium plate plaque test of SM701. The plaques were round in shape with diameter about 1mm.



图 3 噬菌体 SM701 形态(65000×)

Fig.3 Electron micrograph of phage SM701 Magnification(TEM×65000).

2.4 噬菌体 SM701 核酸酶切分析

SM701 基因组核酸可被限制性内切酶 *Bam*H 和 *Hind* 切开, 前者酶切结果 5 条带, 后者酶切结果 8 条以上带, 分析表明 SM701 基因组大小约为 57kb。

2.5 噬菌体 SM701 最佳感染复数的测定

按下表加入噬菌体和宿主菌培养 3.5 h 后, 计数各测定管中的噬菌体滴度, 结果见表 1。可见感染复数(MOI)分别为 100、10 和 1 时, 产生子代噬菌体数量较多(处于同一数量级), 尤以 MOI=10 时最高, 因此噬菌体 SM701 最佳感染复数为 10。

2.6 噬菌体 SM701 一步生长曲线

由曲线可知(图 4), SM701 感染宿主菌的潜伏期约为 30min, 爆发时间约为 100min。根据裂解量

表 1 噬菌体 SM701 最佳感染复数的测定

Table 1 Determination of optimal multiplicity of infection (MOI)

Tube No.	Number of bacteria	Number of bacteriophages	MOI	Titer at 3.5h/(PFU/mL)
1	2.0×10^6	2.0×10^8	100	30.5×10^8
2	2.0×10^6	2.0×10^7	10	42.3×10^8
3	2.0×10^6	2.0×10^6	1	11.0×10^8
4	2.0×10^6	2.0×10^5	0.1	2.1×10^8
5	2.0×10^6	2.0×10^4	0.01	7.0×10^6
6	2.0×10^6	2.0×10^3	0.001	0.8×10^6

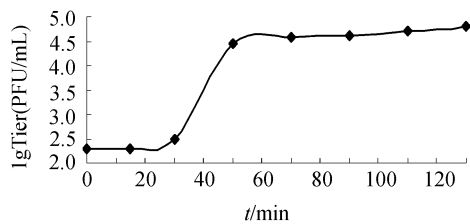


图4 粘质沙雷氏菌噬菌体 SM701 的一步生长曲线
Fig. 4 One-step growth kinetics of phage SM701.

计算公式：裂解量=爆发末期噬菌体滴度÷感染初期宿主菌浓度，则 $6.32 \times 10^4 \div (1.0 \times 10^3) = 63.2$ ，即 SM701 感染宿主菌的裂解量约为 63。

2.7 噬菌体宽噬实验

可见双层平板上层培养基长出均匀的大肠杆菌菌层，但无噬菌斑形成，说明噬菌体 SM701 在自然状态下不裂解大肠杆菌 285 和 8099 形成噬菌斑。

3 讨论

由于产红色色素粘质沙雷氏菌便于观察和具有低危害性，一直作为空气微生物学研究的模式菌种，该菌噬菌体在双层平板上所形成的噬菌斑与周围的红色细菌生长区，颜色差异明显，非常便于观察和计数(见图 2)。噬菌体具有病毒的共性，其培养、计数方法远比病毒经济省时，不会造成试验人员感染，试验程序上的简便性、可操作性和安全性都较强。噬菌体在自然界的分布非常广泛，只要有细菌存在的地方就有相应的噬菌体。因此，我们选定粘质沙雷氏菌进行噬菌体的分离和生物学特性研究，为今后开发和利用该噬菌体开展相关研究奠定基础。

一价和二价阳离子都可促进噬菌体的吸附，T1 噬菌体在 37 时吸附作用的最适盐浓度约为 1mmol/L，离子影响吸附可能因噬菌体与细胞间碰撞引起的附着与碰撞体上静电电荷有关，而环境中的阳离子影响了这些电荷^[9]。本研究在污水预处理时加入氯化钙液(终浓度约为 1mmol/L)，以促进噬菌体吸附到宿主菌。普通营养琼脂单层平板噬菌斑实验在不需要使用 LB 双层平板的情况下就可快速定性噬菌体原液中是否含有目的噬菌体，当原液噬菌体浓度较高时多个噬菌斑会融合成一个大的溶菌区域，与对照区域比较表现为无菌苔的生长(见图 1)。以不同感染复数的噬菌体感染等量的宿主菌，所得子代噬菌体的数量有差异，存在一个最佳用量和最大产出的问题，即最佳感

染复数。不同噬菌体的最佳感染复数不同，测定一个特定噬菌体的最佳感染复数对噬菌体颗粒的分离纯化，结构蛋白的制备，基因组的提取等研究都有重要的指导意义。本次测得噬菌体 SM701 对其宿主菌的最佳感染复数为 10。一步生长实验所代表的裂解量是一个平均值，潜伏期是噬菌体吸附到宿主菌到菌体裂解的时间，两者都与噬菌体、宿主及环境条件有关，如细菌生理状态(休眠与生长菌)、培养条件(如培养基成分、温度)等，有人总结有尾噬菌体的潜伏期范围从 11 分钟到 40 小时，裂解量范围从 2~2000 个不等^[9]。本研究根据 SM701 的一步生长曲线，测得 SM701 感染宿主菌的潜伏期约为 30min，爆发时间约为 100min，平均每个被感染的宿主菌产生约 63 个子代噬菌体。

从 1959 年至今，研究者至少对 5568 种噬菌体进行了电镜观察，绝大多数(5360 种占总数 96.2%)为有尾噬菌体，分属于 3 个有尾噬菌体科——分别是肌尾噬菌体科(24.5%)，长尾噬菌体科(61.7%)和短尾噬菌体科(13.9%)^[10]。目前已知长尾噬菌体科噬菌体的特征是尾长(64nm~570nm)，无收缩尾鞘，头为正多面体或长多面体或长筒状，双链 DNA^[9]。有关粘质沙雷氏菌噬菌体的形态学研究除 20 世纪六十年代有篇国外文献报道外^[11]，国内至今尚未见报道文章。本次分离的粘质沙雷氏菌噬菌体 SM701，有一长尾(约 143nm)，无收缩尾鞘，有一个正多面体立体对称的头部，头径约 64nm，无囊膜(见图 3)，基因组核酸能被双链 DNA 内切酶 *Bam*H 及 *Hind* 切开，考虑该基因组可能为双链 DNA(目前已知所有有尾噬菌体的核酸类型均为 DNA)，酶切图谱分析表明 SM701 基因组被酶切为 5 段，合计约有 57kb，实际大小及核酸确切类型需待测序结果完成后可知。该噬菌体头径较呼吸道病毒中的流感病毒(球形直径 80nm~120nm)、副粘病毒(直径 150nm~300nm)、冠状病毒(120nm~160nm)都小，与腺病毒(70nm~90nm)、呼肠病毒(60nm~80nm)的大小及形态(二十面体立体对称，无包膜)最为接近，这对于模拟该类病毒气溶胶很有意义。有关该菌种噬菌体的其它研究国外早从 20 世纪 50、60 年代开始，已发展到今天的开发和利用，主要用于临床分离粘质沙雷氏菌的分型和治疗研究^[12,13]、水环境示踪微生物研

究^[14-16]、模拟人类病毒指示微生物用于评价污水净化^[17]、模拟病毒小液滴评价滤膜屏障特性等^[18]研究。但国内外利用粘质沙雷氏菌噬菌体气溶胶模拟病毒气溶胶对生物防护装备进行检测和评价的研究未见报道,我们将对此进行深入研究。

参 考 文 献

- [1] 余贺. 医学微生物学. 北京: 人民卫生出版社, 1983.
- [2] 陆德源 主编. 医学微生物学. 第五版. 北京: 人民卫生出版社, 2002, 130.
- [3] Hendrix RW. Bacteriophage genomics. *Curr Opin Microbiol*, 2003, 6(5): 506-511.
- [4] Tseng ChCh, Li ChSh. Collection efficiencies of aerosol samplers for virus-containing aerosols. *J Aerosol Sci*, 2004, 36: 593-607.
- [5] Balazy A, Toivola M, Adhikari A, et al. Do N95 respirators provide 95% protection level against airborne viruses, and how adequate are surgical masks? *Am J Infect Control*, 2006, 34(2): 51-57.
- [6] 帖金凤, 张文福. 几种噬菌体与脊髓灰质炎病毒对三氯异氰尿酸抗力的比较. *中国消毒学杂志(Chinese Journal of Disinfection)*, 2007, 24(3), 208-211.
- [7] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1992.
- [8] Lu Z, Breidt F, Fleming HP, et al. Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, ΦJL-1, from a cucumber fermentation. *Int J Food Microbiol*, 2003, 84(2): 225-235.
- [9] 司稚东, 何晓青. 噬菌体学. 北京: 科学出版社, 1996, 30.
- [10] Ackermann HW. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of virology*, 2007, 152: 227-243.
- [11] Bradley DE. The morphology of some bacteriophages specific to *Serratia marcescens*. *J Appl Bacteriol*, 1965, 28: 271-277.
- [12] Hamilton RL, Brown WJ. Bacteriophage typing of clinically isolated *Serratia marcescens*. *Applied Microbiology*, 1972, 24(6): 899-906.
- [13] Traub WH. Antibiotic susceptibility of clinical isolates of *Serratia marcescens* compared with sensitivity to group A (phage tail) bacteriocins. *Chemotherapy*, 1978, 24: 301-313.
- [14] Frederick GL, Lloyd BJ. Evaluation of *Serratia marcescens* bacteriophage as a tracer and a model for virus removal in waste stabilisation ponds. *Water Science and Technology*, 1995, 31: 291-302.
- [15] Frederick GL, Lloyd BJ. An evaluation of retention time and short-circuiting in waste stabilisation ponds using *Serratia marcescens* bacteriophage as a tracer. *Water Science and Technology*, 1996, 33: 49-56.
- [16] Drury DF, Wheeler DC. Applications of a *Serratia marcescens* bacteriophage as a new microbial tracer of aqueous environments. *J Appl Bacteriol*, 1982, 53: 137-142.
- [17] Carstens EMJ, Coetzee OJ, Malherbe HH, et al. Bacteriophage of *Serratia marcescens* as an index of human virus survival during sewage purification. *Water Pollution Abstracts*, 1968, 41: 129.
- [18] Betts WB, Mould A, Clough G. A note describing a bacteriophage aerosol model of droplet infection to assess the viral barrier properties of filters. *Microbios Letters*, 1990, 45: 57-60.

Isolation and characterization of *Serratia marcescens* phage

Long Yu, Zhanbo Wen, Wenhui Yang, Na Li, Jie Wang, Jianchun Lu, Jingsong Li*

(State Research Center for Bio-protective Equipment & Engineering Technology, State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract: [Objective] To isolate the bacteriophage of *Serratia marcescens*(8039) from sewage, and to study on its biological characteristics. **[Methods]** We used *Serratia marcescens*(8039) as the host to isolate phage from raw sewage from the Sewage Treatment Center of Hospital. Phage SM701 was examined in electron microscope. The genome of SM701 was extracted and the size of its nucleic acid was identified with restriction enzyme analysis. Phage isolated was subjected to plaque forming unit (PFU) assay using double layer agar medium plate method and morphological properties of plaque was observed, and finally optimal MOI multiplicity of infection and one-step growth experiments were carried out. **[Results]** Phage SM701 specific to *Serratia marcescens* (8039) was isolated successfully from the raw sewage. SM701 had an isometric polyhedral head (about 64nm in diameter) and a long noncontractile tail (about 143nm long). The nucleic acid could be cut off by dsDNA restriction enzyme *BamH* or *Hind* and its complete size was about 57kb. The plaque of SM701 was transparent about 1mm in diameter at the 12th hour. When MOI equaled 10, the number of phage offspring was higher. One-step growth kinetics was determined according to the results of one-step growth experiment, which showed that the latent period was about 30 min, the rise period was about 100 min, and the average burst size was about 63 pfu/cell. **[Conclusion]** Phage SM701 belonged to tailed family: *siphoviridae* and lytic bacteriophage. It was quite easy to observe and count the plaques due to existing color differences between lytic and nonlytic zone.

Keywords: *Serratia marcescens*; bacteriophage; isolation; biology and morphology

Supported by the Chinese National Programs for Science and Technology Development(2004BA719A15)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-63865693; E-mail: Lij-s@163.com

Received: 14 September 2007/ Revised: 29 December 2007