

文章编号: 1000-0615(2019)05-1378-19

DOI: 10.11964/jfc.20180711345

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

乔欢, 徐旭凌*, 费文斌, 黄杰, 陈海, 胡怿林, 丛郁

(菲吉乐科(南京)生物科技有限公司, 江苏南京 210000)

摘要: 为分离获得AHPND致病型副溶血性弧菌烈性噬菌体, 并鉴定及研究其生物学特性, 本研究以AHPND致病型副溶血性弧菌为宿主菌, 采用双层平板法分别从中国福建及墨西哥海水样本中对其噬菌体进行分离; 通过噬菌斑形态、限制性内切酶、全基因组测序构建系统发育树及透射电镜观察对所获噬菌体进行分类鉴定; 同时对供试噬菌体裂解谱及其生物学特性进行测定, 包括最佳感染复数(MOI)、pH稳定性、热稳定性、过氧乙酸稳定性及不同储存温度下的存活稳定性等。结果显示, 本研究分离获得3株AHPND致病型副溶血性弧菌烈性噬菌体P46、P48及VP7, 3株噬菌体的噬菌斑均呈透亮圆形, P46噬菌斑直径4~5 mm, P48与VP7噬菌斑直径5~6 mm。3株噬菌体核酸均为双链DNA, 电镜下观察其头部均呈二十面立体结构, 直径约60 nm, 尾部宽约8 nm, 长约18~20 nm, 属于短尾噬菌体科。3株供试噬菌体对AHPND型副溶血性弧菌裂解率达91.5%, 对非AHPND型副溶血性弧菌裂解率为92.3%, 且无法识别除副溶血性弧菌外其他种属的细菌; 噬菌体P46、P48及VP7感染AHPND致病型副溶血性弧菌的最佳MOI分别为0.001、0.1及0.001; P46与VP7最适pH为6~8, P48最适pH为6~9; 3株噬菌体对60 °C的温度耐受力较强, 在4 °C条件下存放50周后仍具有较高的存活率; 对通用杀菌浓度的过氧乙酸具有一定耐受性。将噬菌体P46、P48及VP7保守蛋白序列在NCBI数据库中比对后发现, 3株供试噬菌体与其他噬菌体同源性较低, 因此, 噬菌体P48与P46及VP7很可能为3株新发现的短尾科噬菌体, 这是中国首次报道AHPND致病型副溶血性弧菌短尾科噬菌体。本研究丰富了AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体的菌种资源, 并为其应用于噬菌体生物防治剂的开发奠定了理论基础。

关键词: AHPND致病型副溶血性弧菌; AHPND致病型副溶血性弧菌烈性噬菌体; 分离鉴定; 生物学特性

中图分类号: S 942.3

文献标志码: A

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种嗜盐革兰氏阴性细菌, 广泛分布于世界各地温暖的海洋中, 是近年来全球凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)急性肝胰腺坏死病(acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)的主要病原菌^[1-4]。AHPND最早发生于2009年, 该病由美国亚利桑那大学Lightner教授于2012年首次报道^[2]。有研究发现AHPND病原为一种罕见的携带*PirA*、*PirB*基

因的副溶血性弧菌^[5-7], 即AHPND致病型副溶血性弧菌(VP_{AHPND})^[8], 该菌可侵染凡纳滨对虾的整个生命周期。目前东南亚大多数对虾养殖国均受到AHPND的侵染, 养殖户损失惨重^[9-11]。

目前, 对虾养殖中主要通过施用抗生素、消毒剂等药物对AHPND进行防治, 但抗生素的滥用不仅造成对虾体内抗生素残留, 还使得大量副溶血性弧菌出现耐药性, 甚至是多重耐药

收稿日期: 2018-07-03 修回日期: 2018-10-24

通信作者: 徐旭凌, E-mail: xuxl@phagelux.com

性,且已有研究发现副溶血性弧菌的耐药谱在不断扩展^[12-15]。水产养殖中抗生素的滥用已成为当前渔业细菌性疾病防控的突出问题。

噬菌体是专门裂解细菌的一类病毒,主要化学成分由蛋白质和核酸组成,具备快速的杀菌能力及较强的宿主专一性,同时具有较高的安全性^[16-17]。噬菌体作为一种新兴的抗细菌感染制剂,可大量减少抗菌药物的施用,在水产养殖方面具有较大潜力^[18-26],故可将其作为生物防治的主要手段。目前虽有学者^[18, 23-24]获得AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体,但该类报道较少,且相关噬菌体库及AHPND致病型副溶血性弧菌菌株库也较小,同时在中国鲜见报道。因此,寻找并丰富针对AHPND病原菌的强裂解性广谱噬菌体是目前急需解决的问题。本研究通过大量采集国内外各地海水及发病凡纳滨对虾样本,从中筛选获得AHPND致病型副溶血性弧菌菌株,以此菌株为宿主分离获得AHPND致病型副溶血性弧菌烈性噬菌体,并对其生理生化特性进行初步测定,为噬菌体代替抗生素作为养殖中的抑菌剂提供理论基础。

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; λ -Hind III DNA Marker、Marker 2000、E_{Taq} PCR Master Mix、限制性内切酶 λ -Hind III、EcoR I、Dra I和Nde I购自宝日生物技术(北京)有限公司(TaKaRa, 中国); λ 噬菌体基因组DNA试剂盒购自MP生物医疗公司(MP Biomedicals, 中国)。

1.2 SM缓冲液

NaCl 5.8 g, MgSO₄·7H₂O 2 g, 1 mol/L Tris-HCl 50 mL (pH=7.5), 以蒸馏水定容至1 000 mL, 121 °C灭菌20 min, 置于室温下备用。

1.3 实验菌株

本研究中分离噬菌体所用AHPND致病型副溶血性弧菌宿主菌为本实验室前期(2014—2015年)自中国南部(表1)AHPND病虾样本中分离获得,

分离及鉴定方法参照Sirikharin等^[8, 27]和Jun等^[28]。该菌株已保藏于中国工业微生物菌种保藏管理中心,保藏编号为CICC 24174。

测定噬菌体裂解能力所用AHPND致病型副溶血性弧菌与非AHPND致病型细菌为本实验室2014—2017年自中国、越南及墨西哥样本中随机挑取部分菌落分离获得(表1),其中AHPND致病型副溶血性弧菌71株,非AHPND致病型副溶血性弧菌13株,其他种属细菌66株。

1.4 AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体的分离

本实验于2014—2015年分别采集福建海产品样本及墨西哥海水样本,参照文献^[21, 29]对其中噬菌体进行分离,具体步骤:分别取各样本40 mL加入50 mL离心管中,以5 000 r/min离心10 min后取20 mL上清液过0.22 μ m微孔滤膜除菌。随后将各样本滤液与20 mL 2倍浓度TSB培养基及2 mL对数期CICC 24174菌液(OD₆₀₀=0.6)分别均匀混合,37 °C下150 r/min摇培12 h后,将培养液5 000 r/min离心10 min,过0.22 μ m微孔滤膜除菌后即获得噬菌体富集液,4 °C下保存备用。

以无菌SM缓冲液对噬菌体富集液进行适当稀释,取1 mL稀释液与300 μ L对数期CICC 24174菌液(OD₆₀₀=0.6)均匀混合,室温静置15 min使噬菌体与细菌表面的受体充分结合。将上述混合液加入4 mL琼脂含量为0.75%的TSB半固体培养基中,混匀后立即倒入已凝固的TSA培养基上制成双层平板,待凝固后于37 °C倒置培养6~8 h,观察噬菌斑生长情况。

1.5 AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体的纯化

采用双层平板法^[29-32]对噬菌体进行纯化,具体步骤:用无菌枪头在形成噬菌斑的双层平板上挑取透亮的单个噬菌斑置于1 mL SM缓冲液中,25 °C下150 r/min摇培5 h后将其过0.22 μ m的微孔滤膜除菌获得噬菌体滤液。将噬菌体滤液以无菌SM缓冲液进行适当稀释,取1 mL稀释液与300 μ L对数期CICC 24174菌液(OD₆₀₀=0.6)均匀混合,室温静置15 min后将其加入4 mL TSB半固体培养基中,混匀后立即倒入已凝固的TSA培养基上制成双层平板,待凝固后于37 °C倒置培养6~8 h。重复双层平板纯化操作5次后获得纯的噬菌体株系。

表 1 细菌分离统计

Tab. 1 Isolation statistics of bacteria

采样时间 time	样本来源 source	样本数量 number of samples	分离所获细菌致病型类别及数量			其他种属细菌种类及数量 species and number of other species bacteria
			AHPND致病型副溶血性弧菌数量 number of VP _{AHPND}	非AHPND致病型副溶血性弧菌数量 number of non-VP _{AHPND}	type and number of pathogens	
2014.10	海南文昌虾塘	20	5	5	河流弧菌 <i>V. fluvialis</i> 1	
2014.11	海南海口海水	16	3	2	霍乱弧菌 <i>V. cholerae</i> 2	
2015.5	墨西哥海水	10	3	0	0	
2015.6	福建漳州虾塘	17	2	1	溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i> 2, 河流弧菌 <i>V. fluvialis</i> 1	
2015.8	广西钦州虾塘	11	2	1	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i> 2	
2015.10	广东湛江虾塘及海水	13	8	1	嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i> 3, 河流弧菌 <i>V. fluvialis</i> 2	
2016.4	越南海水	30	10	2	霍乱弧菌 <i>V. cholerae</i> 2, 溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i> 2	
2016.4	越南芹苴大学赠与 received from Can Tho University, Vietnam	10	10	0	0	
2016.4	江苏南京海产品市场污水	5	0	0	溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i> 3	
2016.5	河南驻马店猪粪猪粪样本	10	0	0	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> 5, 大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i> 5	
2016.8	江苏南京土壤样本	3	0	0	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> 3	
2016.9	海南虾塘水样及病虾	21	7	0	0	
2016.10	山东海水	10	3	0	0	
2016.10	安徽生姜种植田土样	6	0	0	茄科雷尔氏菌 <i>Ralstonia solanacearum</i> 4	
2017.5	越南海水	27	9	0	0	
2017.5	黑龙江大庆奶牛养殖场牛奶样本	8	0	0	无乳链球菌 <i>Streptococcus agalactiae</i> 5, 铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4	
2017.6	广西防城港虾塘水样及病虾	15	5	1	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i> 2, 哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i> 3	
2017.9	海南东方虾塘水样及病虾	13	4	0	0	
2017.11	四川乐山蛋鸡养殖场鸡粪样本	10	0	0	大肠杆菌 <i>E. coli</i> 2, 鸡白痢沙门氏菌 <i>Salmonella pullorum</i> 6	
2017.12	江苏南京农贸市场污水	5	0	0	鲍曼不动杆菌 <i>Acinetobacter baumannii</i> 3, 金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i> 1, 李斯特菌 <i>Listeria monocytogenes</i> 3	

1.6 AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体增殖液的制备

采用固体增殖法^[33],于目标稀释度的具噬菌体双层琼脂平板中加入10 mL SM缓冲液,轻微摇晃后于4 °C下静置6 h。将静置液6 000 r/min离心10 min,收集上清液并过0.22 μm微孔滤膜,即获得噬菌体增殖液,4 °C下存放备用。

1.7 AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体效价测定

将噬菌体滤液用SM缓冲液作10倍连续稀释后,每个稀释梯度取1 mL稀释液,向其中加入300 μL对数期CICC 24174菌液(OD₆₀₀=0.6)并均匀混合,室温下静置15 min,采用双层平板法^[29]测定噬菌体滤液效价,之后于37 °C倒置培养6~8 h。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

1.8 AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体电镜观察

采用磷钨酸负染法^[34]:取纯化后效价达10¹⁰ PFU/mL的噬菌体滤液20 μL滴于铜网上,待其自然沉淀2~3 min,用滤纸从侧面吸去多余液体,加1滴2%磷钨酸(PTA)于铜网上,染色10 min,用滤纸从侧面吸去染液,干燥后使用JEOL JEM-1200 EX透射电镜进行观察。

1.9 AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体核酸提取

参照分子克隆实验指南等方法^[35-36]制备噬菌体颗粒浓缩液,具体步骤:制备效价不低于1×10⁹ PFU/mL的噬菌体增殖液100 mL,制备方法同“AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体增殖液的制备”。向噬菌体增殖液中加入终浓度为10%的固体聚乙二醇(PEG) 8 000(W/V),待其充分溶解后4 °C静置12 h,充分沉淀噬菌体颗粒。于4 °C下12 000×g离心10 min,弃上清液,向其中加入10 mL SM缓冲液重悬沉淀并过0.22 μm微孔滤膜,获得噬菌体颗粒浓缩液。采用λ噬菌体基因组DNA试剂盒提取噬菌体核酸并于-20 °C保存,以1.5%琼脂糖凝胶电泳进行检测(100 V, 50 min)。于培清JS-680D全自动凝胶成像分析仪中观察核酸提取结果。将纯化的噬菌体核酸溶液送往中国人民解放军军事医学科学院进行测序,并将得到的全基因组序列上传至NCBI数据库。

1.10 AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体序列分析

使用ORF Finder软件处理得到的全基因组序列,分析其开放阅读框和功能技能注释,选取其尾丝蛋白基因与衣壳蛋白基因序列^[37]分别在NCBI数据库中与已发表的噬菌体基因进行BLAST比对,并利用软件MEGA 4.0构建系统发育树(Bootstrap=1 000)。

1.11 AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体核酸的酶切鉴定

取供试噬菌体核酸溶液,分别与限制性内切酶λ-Hind III、EcoR I、Dra I和Nde I于37 °C下酶切1 h,以1.5%琼脂糖凝胶电泳进行检测(100 V, 50 min),于培清JS-680D全自动凝胶成像分析仪中观察酶切结果。

1.12 AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体裂解谱的测定

采用点滴法^[28, 38]测定噬菌体对71株AHPND致病型副溶血性弧菌(表1)的裂解能力:分别取效价为1×10⁸ PFU/mL的AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体液体,并将各株噬菌体等体积均匀混合后制成副溶血性弧菌噬菌体混合制剂(10⁸ PFU/mL)。挑取各供试菌株的单菌落分别接种于TSB培养基中,37 °C下150 r/min培养,获得各菌株对数期菌液(OD₆₀₀=0.6)。取各供试菌株300 μL菌液与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 μL噬菌体滤液及噬菌体混合制剂液滴于平板的标记位置上,待自然风干后置于37 °C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/菌株总数)×100%

1.13 AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体对非致病性细菌裂解能力的测定

采用点滴法^[28, 38]测定噬菌体对13株非AHPND致病型副溶血性弧菌及66株其他种属细菌的裂解能力(表1)。测定方法同“AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体裂解谱的测定”。

1.14 最佳感染复数测定(MOI)

将100 μL CICC 24174菌液(1×10⁷ CFU/mL)以感染复数(MOI=噬菌体数量/细菌数量)分别为

0.001、0.01、0.1、1、10、100和1 000的比例与各株供试噬菌体滤液等体积混合,随后加入10 mL TSB培养基中,在37 °C恒温振荡培养箱中以150 r/min转速培养12 h,随后以5 000 r/min离心10 min,取上清液用0.22 μm微孔滤膜过滤除菌,采用双层平板法测定噬菌体效价,测定方法同“AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体效价测定”。各实验组中效价最高的感染复数即为最佳感染复数。

1.15 噬菌体pH稳定性的测定

取900 μL pH为1~12的TSB培养基分别加入各无菌EP管中,并将上述EP管置于25 °C的恒温水浴中,待温度平衡后分别向其中加入各噬菌体滤液(>1×10⁹ PFU/mL) 100 μL并混匀,室温下分别静置1、4、8、24和96 h。待反应时间结束后采用双层平板法测定各处理组中噬菌体效价,计算存活率。噬菌体效价测定方法同“AHPND致病型副溶血性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)×100%

1.16 噬菌体热稳定性的测定

分别取各噬菌体滤液(>1×10⁹ PFU/mL) 1 mL于无菌EP管中,将其分别置于25(对照)、50、60和70 °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并采用双层平板法测定各处理组中噬菌体效价,计算存活率。噬菌体效价测定方法同“AHPND致病型副溶血性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”。

1.17 噬菌体对过氧乙酸耐受性的测定

将过氧乙酸用TSB进行稀释,制成质量浓度分别为30与6 mg/L的过氧乙酸溶液,随后取上述浓度的过氧乙酸溶液各900 μL置于无菌EP管中,分别向其中加入各噬菌体滤液(>1×10⁹ PFU/mL) 100 μL;取SM液900 μL置于无菌EP管中,分别向其中加入各噬菌体滤液(>1×10⁹ PFU/mL) 100 μL作为对照,将上述各处理组充分混匀后室温静置。每0.5 h取样测定各处理组中噬菌体效价,直至6 h,并计算存活率。噬菌体效价测定方法同“AHPND致病型副溶血性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”。

1.18 噬菌体不同储存温度下存活稳定性的测定

各取3株供试噬菌体滤液20 mL (>1×10⁹ PFU/

mL)分装于无菌试管中,分别放置于4、25和30 °C条件下,每2周取样后测定噬菌体效价,直至50周,计算存活率。噬菌体效价测定方法同“AHPND致病型副溶血性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”。

2 结果

2.1 AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体的分离、纯化及噬菌斑形态

本研究以AHPND致病型副溶血性弧菌CICC 24174为宿主菌,通过双层平板法,自福建海产品样本中共分离得到2株AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体,其编号分别为P46、P48;同时自墨西哥海水样本中分离得到1株AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体,其编号为VP7。

AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体P46、P48和VP7均在其宿主菌CICC 24174菌苔上迅速生长,37 °C条件下生长6 h即可产生形态单一的噬菌斑。3株噬菌体的噬菌斑均呈透亮圆形,其形态相近;P46噬菌斑直径为4~5 mm, P48与VP7噬菌斑直径为5~6 mm(图1)。3株噬菌体的噬菌斑均呈现出烈性噬菌体的特征^[39]。

2.2 AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体核酸提取及酶切鉴定

分别将P46、P48和VP7 3株AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体纯化液浓缩后提取核酸,核酸提取物琼脂糖凝胶电泳结果显示,3株噬菌体核酸纯度较高且条带完整(图2)。

将3株噬菌体核酸提取物分别以双链DNA限制性内切酶λ-Hind III、EcoR I、Dra I和Nde I进行酶切,酶切结果显示,3株噬菌体被4种限制性内切酶分别酶切成大小不同的片段,说明上述3株噬菌体的核酸均为双链DNA;同时3株噬菌体被4种限制性内切酶酶切后的条带图谱各不相同,说明供试噬菌体为3株不同的噬菌体(图3)。

2.3 AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体DNA同源性分析

3株噬菌体核酸提取物测序结果显示, P46全基因组大小为43 121 bp (No. KX371614), P48全基因组大小为43 289 bp (No. KX371615), VP7全基因组大小为43 577 bp (No. KX371613)。

噬菌体主要依据形态标准进行分类,其尾

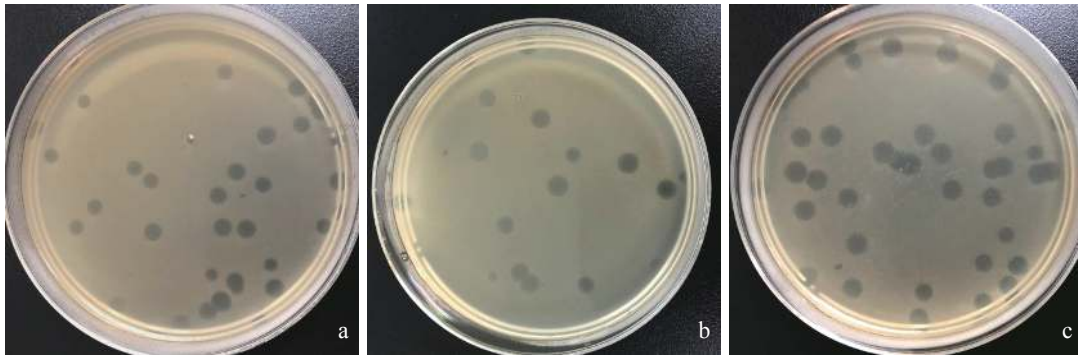


图1 三株AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体噬菌斑形态

(a). P46噬菌斑; (b). P48噬菌斑; (c). VP7噬菌斑

Fig. 1 The bacteriophage plaque of 3 phages against VP_{AHPND}

(a). plaque of P46; (b). plaque of P48; (c). plaque of VP7

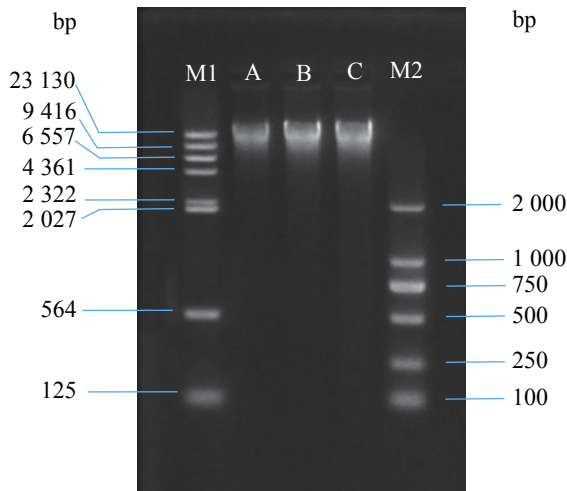


图2 三株AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体核酸

M1. λ -Hind III digest DNA Marker; M2. Marker 2000; A. P46的核酸; B. P48的核酸; C. VP7的核酸

Fig. 2 The nucleic acid of 3 phages against VP_{AHPND}

M1. λ -Hind III digest DNA Marker; M2. Marker 2000; A. P46 nucleic acid; B. P48 nucleic acid; C. VP7 nucleic acid

丝蛋白基因与衣壳蛋白基因为较保守的区域^[37], 因此, 本实验分别采用这2种蛋白基因序列对3株供试噬菌体的同源性进行分析。结果显示, 将供试噬菌体尾丝蛋白基因与GenBank中已发表的多株噬菌体相应序列进行比较, 噬菌体P46与VP7同源性较高; 但P48与P46及VP7间同源性较低; 3株噬菌体与其他噬菌体间同源性均较低(图4)。将供试噬菌体衣壳蛋白基因与GenBank中已发表的多株噬菌体相应序列进行比较, 噬菌体P46与VP7具有一定的同源性(可信度67%), 且均与弧菌属噬菌体vB VpaP KF1(No. AT119030.1)及vB VpaP

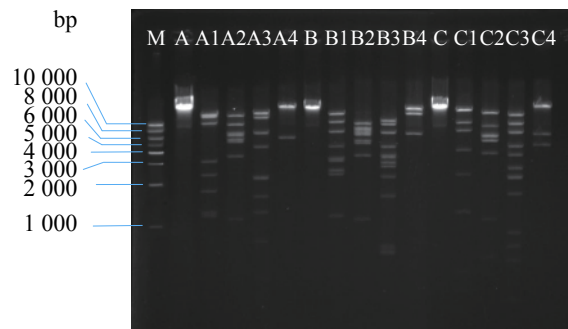


图3 三株AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体核酸的酶切

M. 1kb DNA分子质量标准; A. P46核酸; A1. P46 λ -Hind III酶切; A2. P46 *EcoR* I酶切; A3. P46 *Dra* I酶切; A4. P46 *Nde* I酶切; B. P48核酸; B1. P48 λ -Hind III酶切; B2. P48 *EcoR* I酶切; B3. P48 *Dra* I酶切; B4. P48 *Nde* I酶切; C. VP7核酸; C1. VP7 λ -Hind III酶切; C2. VP7 *EcoR* I酶切; C3. VP7 *Dra* I酶切; C4. VP7 *Nde* I酶切

Fig. 3 Restriction endonuclease analysis of 3 phages nucleic acid

M. 1kb DNA ladder Marker; A. P46 nucleic acid; A1. P46 nucleic acid digested by λ -Hind III; A2. P46 nucleic acid digested by *EcoR* I; A3. P46 nucleic acid digested by *Dra* I; A4. P46 nucleic acid digested by *Nde* I; B. P48 nucleic acid; B1. P48 nucleic acid digested by λ -Hind III; B2. P48 nucleic acid digested by *EcoR* I; B3. P48 nucleic acid digested by *Dra* I; B4. P48 nucleic acid digested by *Nde* I; C. VP7 nucleic acid; C1. VP7 nucleic acid digested by λ -Hind III; C2. VP7 nucleic acid digested by *EcoR* I; C3. VP7 nucleic acid digested by *Dra* I; C4. VP7 nucleic acid digested by *Nde* I

KF2(No. AT119110.1)的同源性较高; 而P48与其他噬菌体同源性均较低(图5)。

2.4 AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体电镜形态特征及分类

通过透射电子显微镜分别对噬菌体P46、P48和

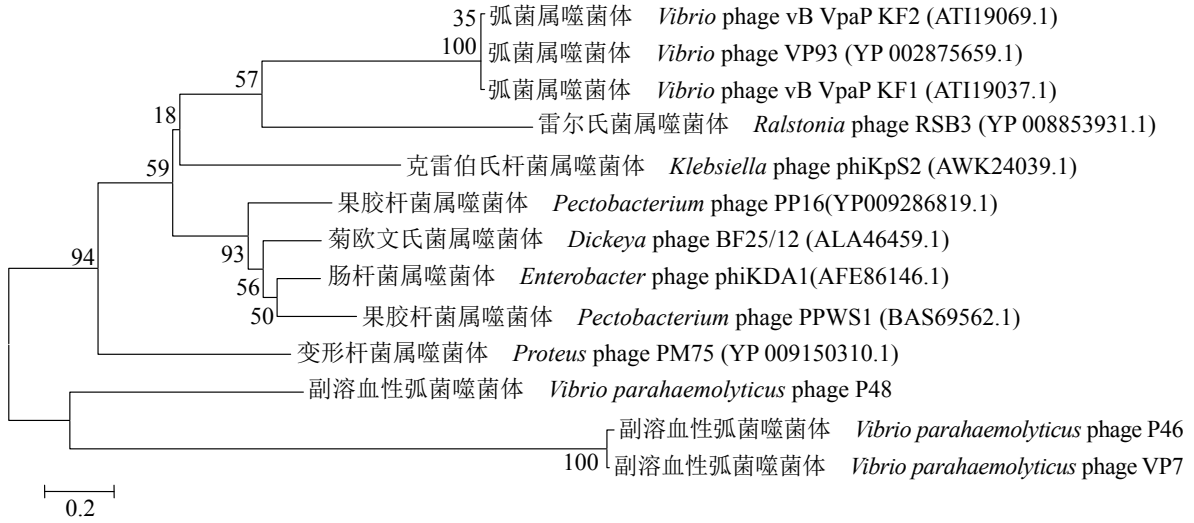


图 4 三株AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体尾丝蛋白基因系统发育树

分支处数字代表可信度；括号内代表GenBank中序列登录号；标尺代表进化距离；下同

Fig. 4 Phylogenetic tree of 3 phages based on phage tail fibers protein

The number at the branch is reliability; the serial number in the bracket is GenBank accession number; the scaleplate is evolutionary distance; the same below

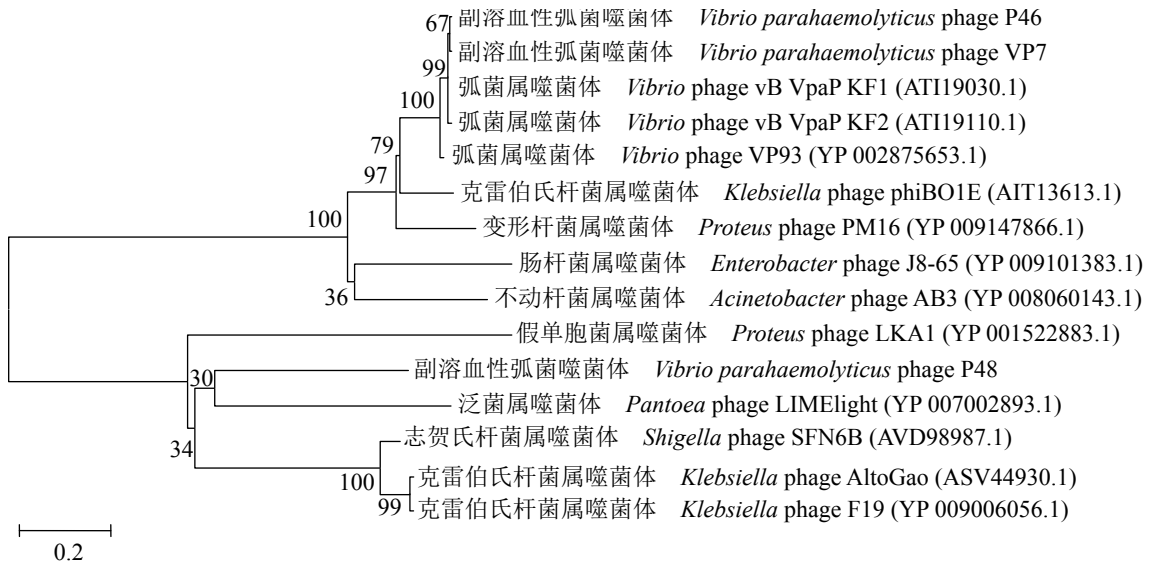


图 5 三株AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体衣壳蛋白基因系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of 3 phages based on phage capsid protein

VP7进行观察，发现3株噬菌体头部均等轴对称，呈二十面立体结构，直径约60 nm，尾部宽约8 nm，长约18~20 nm (图6)。结合3株噬菌体酶切结果，依国际病毒分类委员会(ICTV)第八次报告的最新分类标准^[40]，AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体P46、P48和VP7均属于群I-双股DNA病毒中的有尾病毒目(Caudovirales)，短尾噬菌体科(Podoviridae)。

AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体P46、P48和VP7均已保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏编号分别为P46：CCTCC NO. M2016290，P48：CCTCC NO. M2016291，VP7：CCTCC NO. M2016289；保藏地址：中国武汉大学。

2.5 噬菌体对AHPND致病型副溶血性弧菌的裂解能力

本实验选取71株AHPND致病型副溶血性弧

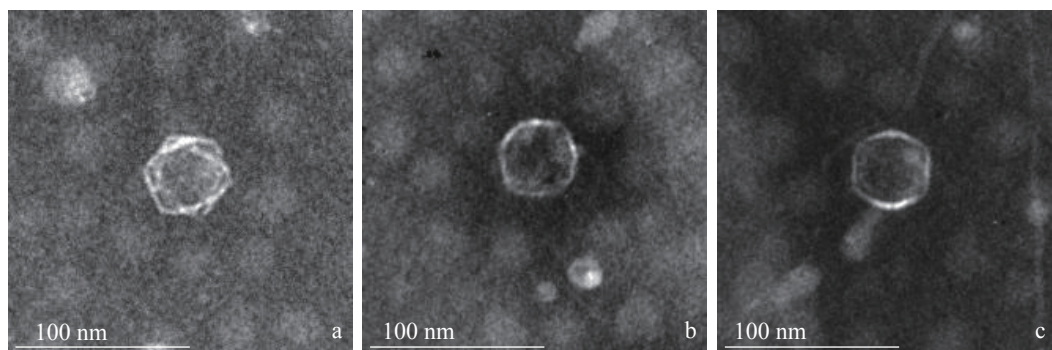


图 6 三株AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体的电镜照片($\times 100\ 000$)

Fig. 6 Electron micrograph of 3 phages against VP_{AHPND}

(a) P46; (b) P48; (c) VP7

菌为供试菌株, 对P46、P48和VP7 3株噬菌体及其混合剂的裂解能力进行测定。结果显示, P46可裂解61株供试菌株, 裂解率为85.9%; P48可裂解62株供试菌株, 裂解率达87.3%; VP7可裂解64株供试菌株, 裂解率为90.1%; 而3株噬菌体的

等体积混合制剂的裂解率则达91.5%(表2)。

2.6 噬菌体对非AHPND致病型细菌的裂解能力

本实验选取13株非AHPND致病型副溶血性弧菌与66株其他种属细菌共79株供试菌株, 对

表 2 噬菌体P46、P48及VP7及其混合物对AHPND致病型副溶血性弧菌的裂解能力

Tab. 2 Lysis ability of 3 phages and their cocktail to VP_{AHPND}

菌株编号 strains	噬菌体编号 phages				菌株编号 strains	噬菌体编号 phages			
	P46	P48	VP7	P46+P48+VP7 (1 : 1 : 1)		P46	P48	VP7	P46+P48+VP7 (1 : 1 : 1)
HN9	++	++	++	++	HN185	++	++	++	++
HN18	+	+	+	++	HN187	++	++	++	++
HN31	++	++	++	++	FJ188	++	++	++	++
HN36	++	++	++	++	FJ189	-	-	++	++
HN48	++	++	++	++	Q1	++	++	++	++
HN64	++	++	++	++	Q3	-	++	++	++
HN65	+	+	+	++	Q4	+	+	+	++
HN68	+	+	++	++	A187	++	++	++	++
HN79	++	++	++	++	A188	++	++	++	++
HN109	++	++	+	++	A189	-	-	+	+
HN174	++	++	++	++	GX190	++	++	++	++
HN176	++	++	++	++	GX191	++	++	++	++
HN179	++	++	++	++	GX192	++	++	++	++
HN180	++	++	++	++	GX193	++	++	++	++
HN181	++	++	++	++	GX194	++	++	++	++
HN182	++	++	++	++	GX195	++	++	++	++
HN184	++	++	++	++	GX196	++	++	++	++

· 续表2 ·

菌株编号 strains	噬菌体编号 phages				菌株编号 strains	噬菌体编号 phages			
	P46	P48	VP7	P46+P48+VP7 (1:1:1)		P46	P48	VP7	P46+P48+VP7 (1:1:1)
GD197	++	++	++	++	VT220	+	+	+	+
GD198	++	++	++	++	VT222	-	-	-	-
GD200	++	++	++	++	VT223	+	+	+	+
GD201	++	++	++	++	VT225	++	++	++	++
GD202	++	++	++	++	VT226	++	++	++	++
GD203	++	++	++	++	VT227	++	++	++	++
GD204	+	+	+	++	VT228	++	++	++	++
GD205	++	++	++	++	VT229	++	+	+	++
VT206	+	+	+	++	VTQQ1	-	-	-	-
VT207	-	-	-	-	VTQQ2	++	++	++	++
VT208	+	+	+	+	VTQQ3	++	++	++	++
VT210	+	+	+	++	VTQQ4	++	++	++	++
VT211	+	+	+	+	VTQQ5	++	++	++	++
VT212	+	+	+	++	VTQQ6	+	+	+	++
VT215	-	-	-	-	VTQQ10	-	-	-	-
VT216	+	+	+	+	VTQQ12	-	-	++	++
VT217	+	+	-	+	VTQQ17	-	-	-	-
VT218	+	+	+	++	VTQQ18	++	++	++	++
VT219	+	+	+	+	合计 total	61	62	64	65

注: ++. 透亮噬菌斑, +. 具噬菌斑, -. 无噬菌斑; 下同
Notes: ++. clear plaque, +. plaque, -. no plaque; the same below

3株噬菌体P46、P48和VP7及其混合制剂的裂解能力进行测定。P46和P48和VP7对13株非AHPND致病型副溶血性弧菌裂解率分别为84.6%、76.9%和84.6%(表3); 3株噬菌体的等体积混合制剂对供试非AHPND致病型副溶血性弧菌的裂解率则为92.3%; 3株噬菌体及其混合制剂对66株其他种属的细菌均无法裂解。

2.7 AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体最佳感染复数(MOI)

MOI在0.001~1 000, 噬菌体P46效价均维持在10⁹ PFU/mL, 且在其MOI为0.001时达到最高(7.80×10⁹ PFU/mL); 噬菌体P48效价于MOI为0.1时达到最高(4.50×10⁹ PFU/mL); 噬菌体VP7效价随其MOI降低而升高, 其效价于MOI为0.001时达到最高(8.00×10⁹ PFU/mL)(表4)。因而可以确定AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体P46、P48和

VP7感染AHPND致病型副溶血性弧菌CICC 24174的最佳MOI分别为0.001、0.1及0.001。

2.8 噬菌体pH稳定性

在不同pH条件下对P46、P48和VP7 3株AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体进行处理后, 分别于1、4、8、24和96 h对其效价进行了测定。结果显示, 处理1 h后, 在强酸(pH为1~3)与强碱(pH为13~14)处理条件下P46与P48均已失活, 但VP7仍具有10³ PFU/mL效价(图7); pH为5~10时, 3株噬菌体效价与原始效价相比均无较大变化, 在碱性条件下效价相对较高, 酸性条件下略有下降; pH为11时3株噬菌体效价均开始下降, 但pH为12时供试噬菌体均仍具有10³ PFU/mL效价。

处理4 h后, 3株噬菌体部分处理效价出现显著下降: pH为3的条件下处理, VP7失活; pH为4的条件下, VP7效价下降近10倍, 但P46与P48效价维持稳定; pH为11的条件下, 3株噬菌体效

表 3 噬菌体P46、P48和VP7及其混合物对非AHPND致病型细菌的裂解能力

Tab. 3 Lysis ability of 3 phages and their cocktail to non-AHPND-causing bacteria

细菌种类 bacterial species	菌株编号 strains	噬菌体编号 phages				细菌种类 bacterial species	菌株编号 strains	噬菌体编号 phages			
		P46	P48	VP7	P46+P48+VP7 (1:1:1)			P46	P48	VP7	P46+P48+VP7 (1:1:1)
副溶血性弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	VPHN1	++	++	++	++	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	AHGD35	-	-	-	-
	VPHN5	++	++	++	++		AHGD39	-	-	-	-
	VPHN8	++	++	++	++		AHGX23	-	-	-	-
	VPHN10	++	++	++	++		AHGX24	-	-	-	-
	VPHN11	++	++	++	++	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	B1	-	-	-	-
	VPHN13	++	-	++	++		B2	-	-	-	-
	VPHN20	-	-	-	-		B3	-	-	-	-
	VPFJ2	++	+	++	++	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	ECHN60	-	-	-	-
	VPGX1	++	++	++	++		ECHN67	-	-	-	-
	VPGX20	++	++	++	++		ECHN72	-	-	-	-
	VPGD6	-	+	++	++		ECHN80	-	-	-	-
	VPVT3	++	-	++	++		ECHN89	-	-	-	-
	VPVT4	++	+	-	++		ECSC41	-	-	-	-
VAFJ1	-	-	-	-	ECSC49		-	-	-	-	
溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	VAFJ2	-	-	-	-	鸡白痢沙门氏菌 <i>S. pullorum</i>	SPSC26	-	-	-	-
	VAVT23	-	-	-	-		SPSC30	-	-	-	-
	VAVT30	-	-	-	-		SPSC50	-	-	-	-
	VAJS15	-	-	-	-		SPSC55	-	-	-	-
	VAJS28	-	-	-	-	SPSC67	-	-	-	-	
	VAJS32	-	-	-	-	SPSC77	-	-	-	-	
	霍乱弧菌 <i>V. cholerae</i>	VCHN1	-	-	-	-	茄科雷尔氏菌 <i>R. solanacearum</i>	RSAH6	-	-	-
VCHN2		-	-	-	-	RSAH36		-	-	-	-
VCVT3		-	-	-	-	RSAH42		-	-	-	-
VCVT4		-	-	-	-	RSAH53		-	-	-	-
哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>		VHGX8	-	-	-	-		无乳链球菌 <i>S. agalactiae</i>	SAHLJ2	-	-
	VHGX13	-	-	-	-	SAHLJ3	-		-	-	-
	VHGX16	-	-	-	-	SAHLJ10	-		-	-	-
	VHGX17	-	-	-	-	SAHLJ13	-		-	-	-
	VHGX18	-	-	-	-						
河流弧菌 <i>V. fluvialis</i>	VFHN1	-	-	-	-						
	VFFJ1	-	-	-	-						
	VFGD2	-	-	-	-						
嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	VFGD3	-	-	-	-						
	AHGD22	-	-	-	-						

· 续表3 ·

细菌种类 bacterial species	菌株编号 strains	噬菌体编号 phages				细菌种类 bacterial species	菌株编号 strains	噬菌体编号 phages			
		P46	P48	VP7	P46+P48+VP7 (1:1:1)			P46	P48	VP7	P46+P48+VP7 (1:1:1)
铜绿假单胞菌 <i>P. aeruginosa</i>	SAHLJ16	-	-	-	-	李斯特菌 <i>L. monocytogenes</i>	ABJS15	-	-	-	-
	PAHLJ35	-	-	-	-		ABJS21	-	-	-	-
	PAHLJ41	-	-	-	-		LMJS1	-	-	-	-
	PAHLJ60	-	-	-	-		LMJS2	-	-	-	-
	PAHLJ72	-	-	-	-		LMJS4	-	-	-	-
鲍曼不动杆菌 <i>A. baumannii</i>	ABJS3	-	-	-	-	合计 total	11	10	11	12	

表 4 三株AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体的最佳感染复数

Tab. 4 Optimal MOI of 3 phages against VP_{AHPND}

感染复数 MOI	噬菌体数/PFU phage number	细菌数/CFU HN9 number	P46效价/(PFU/mL) phage titer of P46	P48效价/(PFU/mL) phage titer of P48	VP7效价/(PFU/mL) phage titer of VP7
1 000	1.00×10 ⁷	1.00×10 ⁴	2.07×10 ⁹	2.50×10 ⁵	1.00×10 ⁷
100	1.00×10 ⁷	1.00×10 ⁵	2.13×10 ⁹	3.20×10 ⁵	5.00×10 ⁷
10	1.00×10 ⁷	1.00×10 ⁶	2.86×10 ⁹	1.53×10 ⁶	7.00×10 ⁷
1	1.00×10 ⁷	1.00×10 ⁷	2.81×10 ⁹	6.70×10 ⁸	2.00×10 ⁷
0.1	1.00×10 ⁷	1.00×10 ⁸	2.67×10 ⁹	4.50×10 ⁹	4.40×10 ⁹
0.01	1.00×10 ⁷	1.00×10 ⁹	5.33×10 ⁹	8.20×10 ⁸	6.00×10 ⁹
0.001	1.00×10 ⁷	1.00×10 ¹⁰	7.80×10 ⁹	4.16×10 ⁸	8.00×10 ⁹

价均持续下降；P46在pH为12的条件下失去活性，但P48与VP7仍具有少量噬菌体存活。pH为5~10情况下3株噬菌体效价未出现显著下降。

处理8~96 h，3株噬菌体各处理组效价缓慢下降，并趋于稳定。自24 h起P48在pH为12的条件下处理下失去活性。96 h时pH为4处理下，P46效价仅为20 PFU/mL，但P48与VP7仍具有较高效价(10⁷ PFU/mL)；pH为12的条件下，P48也已失活，VP7仍具活性(60 PFU/mL)；pH为5~10条件下3株噬菌体效价下降幅度较小(约50%)，其最终仍具有10⁸ PFU/mL的效价。P46与VP7最适pH为6~8，P48最适pH为6~9。3株噬菌体对碱的耐受程度较高于酸。

2.9 噬菌体热稳定性

3株AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体的热稳定性结果显示，同对照组(25 °C)相比，50 °C水浴1 h后P46具有97.5%存活率，P48具91.9%存活率，VP7存活率为92.3%；之后3株噬菌体效价缓慢下降，50 °C水浴2 h后3株噬菌体仍具76%以上存活率；60 °C水浴2 h后P46仍具有65%存活

率，P48存活率为33.7%，VP7存活率则为56.4%；当温度增加至70 °C后，P46与P48均于1 h时失活，而VP7于70 °C下作用2 h后仍具有10⁶ PFU/mL效价(图8)。

2.10 噬菌体对过氧乙酸的耐受性

过氧乙酸是一种酸性消毒剂，在水产养殖上的通用消毒质量浓度为6 mg/L^[41]。根据前期实验数据，本研究选择质量浓度为30和6 mg/L的过氧乙酸进行噬菌体浸泡实验。结果显示，噬菌体P46、P48和VP7在30 mg/L的过氧乙酸中浸泡0.5 h后均已失活，但3株噬菌体在6 mg/L过氧乙酸中浸泡6 h后仍具有50%以上的存活率(图9)，说明3株供试噬菌体对低浓度过氧乙酸具有一定的耐受性。

2.11 噬菌体于不同储存温度下存活的稳定性

通过测定3株噬菌体在3种不同保存温度下50周的效价变化，结果显示，4 °C条件下存放50周后噬菌体P46仍具有49.3%的存活率，P48存活率为56%，而VP7存活率则达70.1%。25 °C下

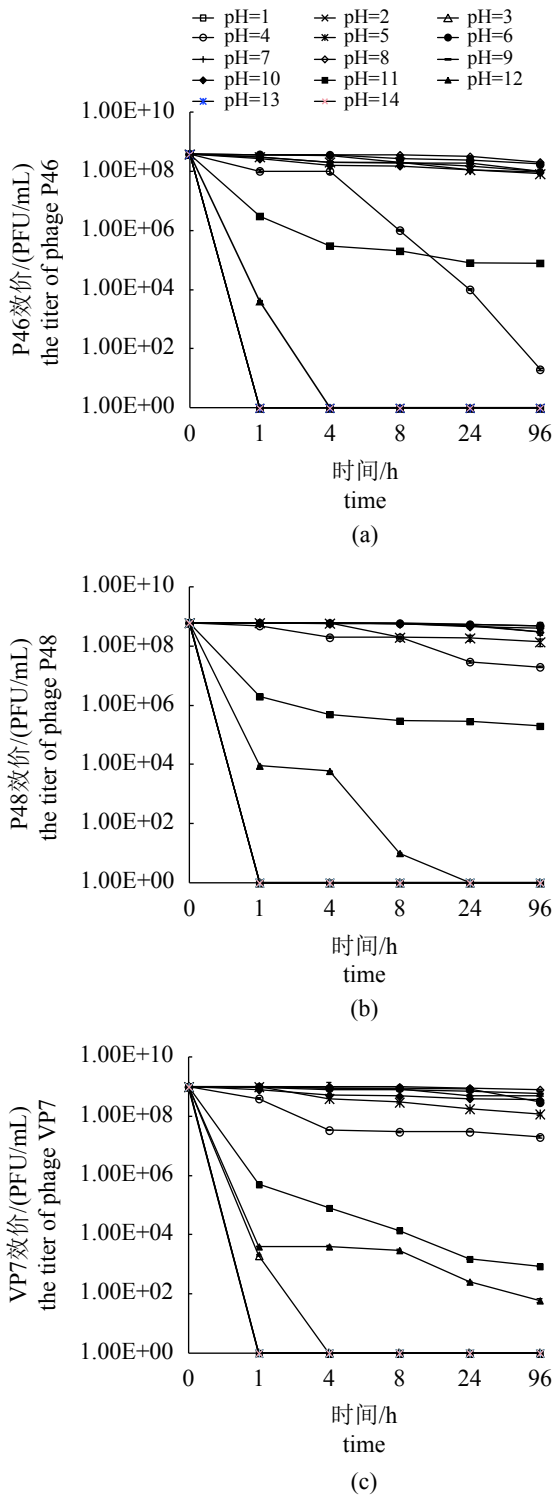


图7 三株AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体 pH稳定性

(a) P46 pH稳定性; (b) P48 pH稳定性; (c) VP7 pH稳定性

Fig. 7 pH stability of 3 phages against VP_{AHPND}

(a) pH stability of P46; (b) pH stability of P48; (c) pH stability of VP7

存放16周后噬菌体P46存活率为6.6%, P48存活率为14.0%, VP7则为15.7%; P46与P48存放至32周

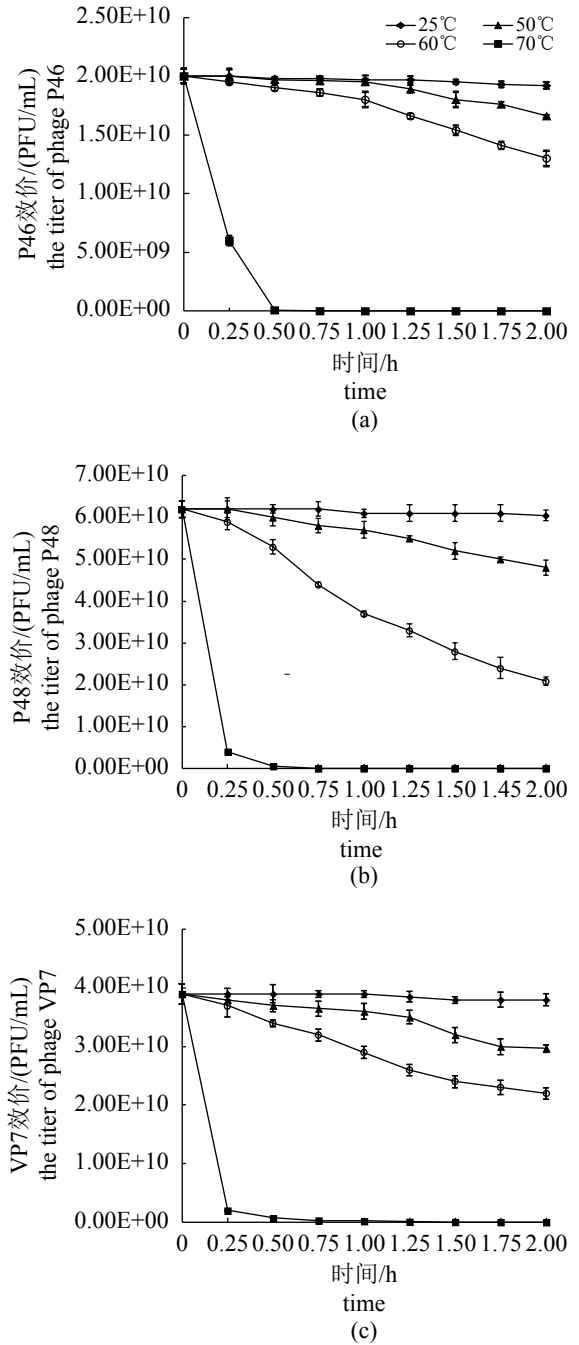


图8 三株AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体热稳定性

(a) P46热稳定性; (b) P48热稳定性; (c) VP7热稳定性

Fig. 8 Thermal stability of 3 phages against VP_{AHPND}

(a) thermal stability of P46; (b) thermal stability of P48; (c) thermal stability of VP7

时丧失活性, VP7存放至34周时丧失活性。30 °C下噬菌体P46、P48和VP7均可在12周内维持10%以上的存活率(图10)。

3 讨论

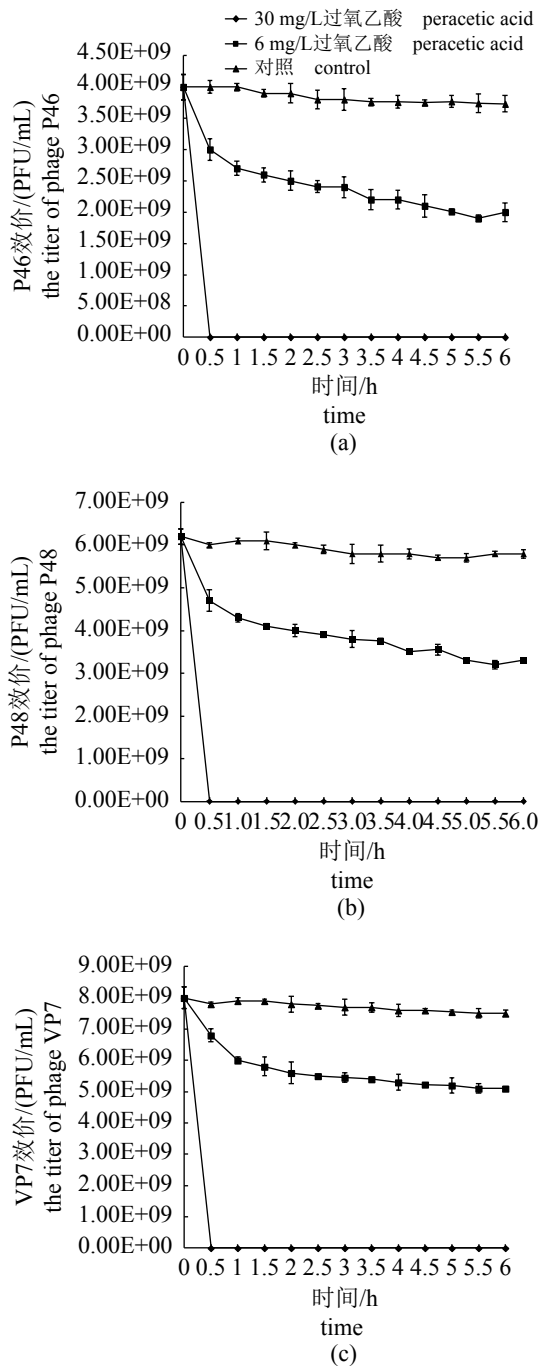


图9 三株AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体对过氧乙酸的耐受性

(a) P46对过氧乙酸耐受性; (b) P48对过氧乙酸耐受性; (c) VP7对过氧乙酸耐受性

Fig. 9 Tolerance of 3 phages to peracetic acid

(a) tolerance of P46 to peracetic acid; (b) tolerance of P48 to peracetic acid; (c) tolerance of VP7 to peracetic acid

近年来,由AHPND致病型副溶血性弧菌引起的全球凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死病对中国对虾养殖业影响愈发严重^[22],噬菌体作为一种新兴的细菌防治制剂日渐受到学者们的重视^[18-19, 42],

目前,世界上关于分离获得AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体的报道极少,包括来自Jun等^[24]获得的1株烈性噬菌体pVp-1与王娜^[23]获得的2株溶原性噬菌体vp1与vp2。

本研究选取AHPND致病型副溶血性弧菌为宿主菌,并分离获得3株AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体:P46、P48和VP7。该3株噬菌体在宿主菌上均可形成透亮的、呈现出典型烈性噬菌体特征^[39]的噬菌斑。本研究同时对3株噬菌体进行了限制性内切酶研究及透射电镜观察,根据噬菌体核酸类型及衣壳形态等特征,证实噬菌体P46、P48和VP7为3株不同的短尾科噬菌体。进一步对3株噬菌体进行全基因组测序并分析其开放阅读框,选取2段保守蛋白序列构建系统发育树,综合比对后发现3株供试噬菌体与其他噬菌体具有一定同源性,但同源性较低。结合3株供试噬菌体的限制性内切酶图谱,并将其与已知副溶血性弧菌噬菌体相比^[22-24, 33, 39, 43-51],未发现与之相同的短尾科噬菌体。因此,噬菌体P46、P48和VP7很可能为3株新发现的短尾科噬菌体。Jun等^[24]所发现的烈性噬菌体pVp-1属于长尾噬菌体科(Siphoviridae);同时王娜^[23]获得的2株噬菌体分别属于肌尾噬菌体科(Myoviridae)与盖噬菌体科(Tectiviridae),且为溶原性噬菌体,故本研究不再与之作比较。因此,这是AHPND致病型副溶血性弧菌短尾科烈性噬菌体在中国的首次报道。

林业杰等^[52]发现噬菌体可对细菌菌株进行分型。本实验分别测定了3株噬菌体对71株AHPND致病型副溶血性弧菌及13株非AHPND型副溶血性弧菌的裂解谱,发现3株噬菌体均对供试副溶血性弧菌菌株具有较强的识别能力,裂解范围较广;且3株噬菌体对相同供试菌株的识别能力不同,说明噬菌体与细菌菌株可作为彼此分型的工具。Stalin等^[21]提出噬菌体混合制剂较单一噬菌体对细菌具有更广更高效的杀灭能力,本实验发现3株噬菌体混合制剂对71株AHPND型致病菌的裂解率高达91.5%,对13株非AHPND型副溶血性弧菌的裂解率为92.3%,均高于3株噬菌体的单独裂解率,该结果与Stalin等^[21]及Quiroz-Guzmán等^[53]结论一致。进一步说明噬菌体混用后可提高其对细菌的识别率,扩大裂解范围。Jun等^[28]曾将AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体pVp-1对22株AHPND致病菌的裂解能力进行测定,发现裂解率为90.9%,与之相比,本研究选

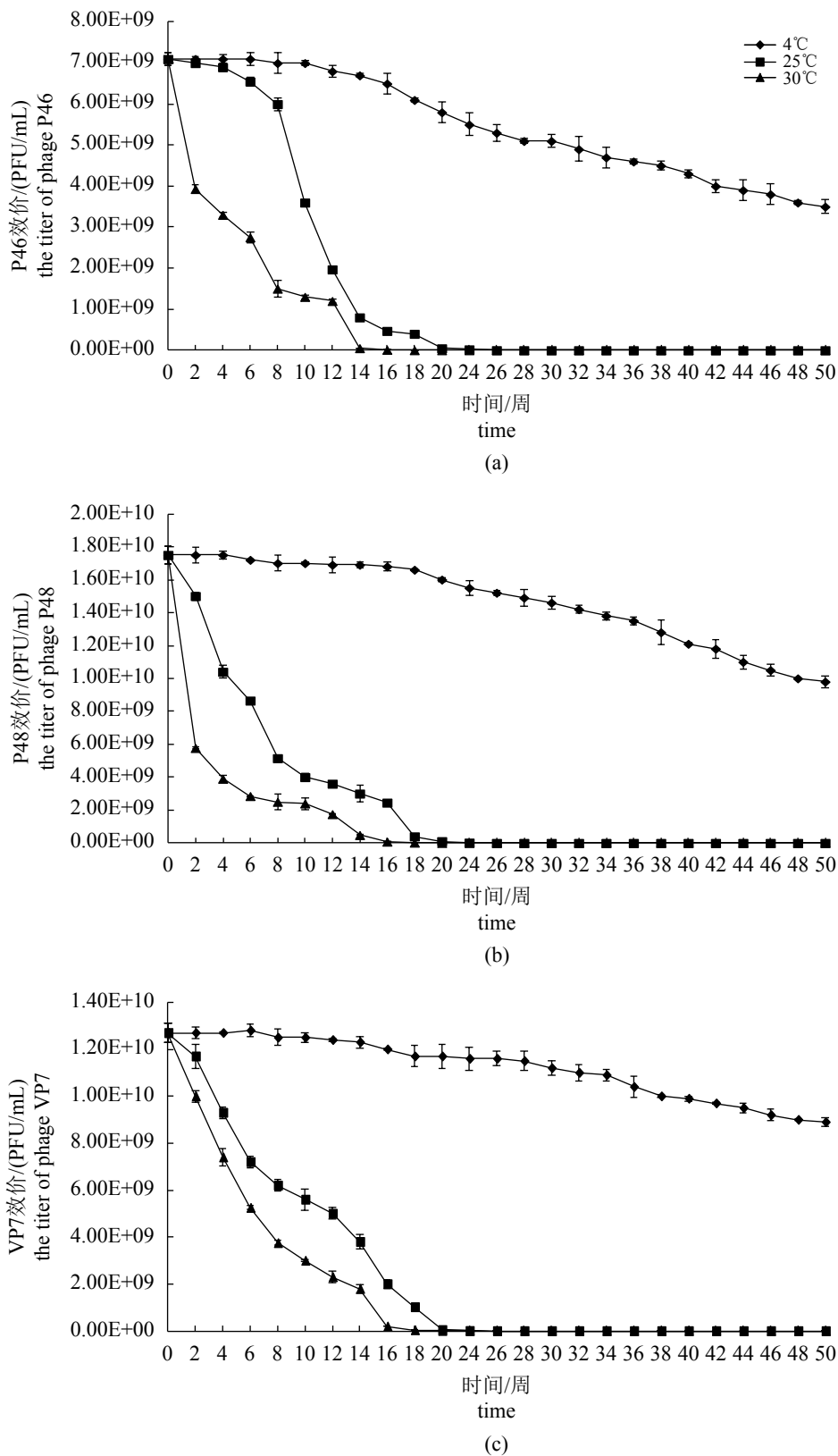


图 10 三株AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体于不同储存温度下存活稳定性

(a) P46存活稳定性; (b) P48存活稳定性; (c) VP7存活稳定性

Fig. 10 Survival stability at different storage temperatures of 3 phages against VP_{AHPND}

(a) survival stability of P46; (b) survival stability of P48; (c) survival stability of VP7

取的供试AHPND致病型菌株数量更多,且3株噬菌体混合制剂对其裂解率更高。同时本实验发现3株噬菌体及其混合制剂对副溶血性弧菌以外的其他种属细菌均无法识别,说明供试噬菌体对副溶血性弧菌具有极强的专一性。因此,供试噬菌体作为细菌防治制剂时不会破坏其他环境微生物菌群,具有较高的生物安全性,可有效减少因化学药物施用而对环境微生态造成的影响,同时在噬菌体治疗及食品防控方面具有极大的应用潜力。

通过测定3株供试噬菌体的生理特性可知,噬菌体P46、P48和VP7均具有良好的热稳定性,3株噬菌体在50℃水浴1h后存活率均在91.9%以上;P46在60℃处理下1h后仍具有90%的存活率;VP7对高温具有良好的耐受性,70℃下2h后仍可存活。丁云娟等^[48]所获的副溶血性弧菌噬菌体qdv001在70℃下处理20min后即失活,在50℃下作用40min后存活率为81.5%。本研究同时发现噬菌体P46、P48和VP7在无添加保护剂的情况下,分别将其于25和30℃下长期存放,3株噬菌体存活率虽然降低,但其对宿主菌的识别能力未随时间推移而减弱;3株供试噬菌体均可于4℃下长期存放。因此,当供试噬菌体作为生防制剂进行生产应用时,其保存条件较易满足。

3株供试噬菌体对酸碱的耐受范围与文献报道一致^[42, 47-48],在pH为5~10时均具有良好的持续酸碱耐受性,其中VP7对酸碱的耐受性强于P46与P48,且对强酸(pH为3)具有一定的耐受性。据报道,副溶血性弧菌在pH小于6的条件下无法生长^[48],而本实验所获3株噬菌体可耐受的酸碱范围均超过副溶血性弧菌所耐受的酸碱范围;同时经过氧乙酸水产养殖通用消毒质量浓度(6mg/L)^[41]处理后,本实验中3株供试噬菌体均可正常生长并高效裂解宿主菌。以上表明,噬菌体P46、P48和VP7除可适应其宿主菌的所有生长环境外,还对消毒剂过氧化乙酸具有良好的耐受性,3株噬菌体具有作为生物防治细菌制剂与过氧化乙酸联用的潜力。该结论为其在食品、水体消毒等方面的应用提供了理论基础。

MOI是研究噬菌体感染细菌与产出噬菌体子代量效关系的重要依据^[54],噬菌体与宿主菌于不同比例下进行增殖,所获得的噬菌体效价不同,因此,为获得噬菌体的最大产出量,需要筛选其最佳感染复数。本实验中噬菌体P46与VP7的

最佳MOI均为0.001,P48的最佳MOI为0.1,说明3株噬菌体对宿主菌的裂解效率较高,少量噬菌体侵染宿主菌后即可增殖获得大量子代噬菌体。该结果为噬菌体的发酵生产奠定了基础。

目前,国内关于副溶血性弧菌噬菌体的研究主要集中于非AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体的分离及特性方面^[22, 33, 42-43, 47-48, 54],尚未发现针对AHPND病原菌烈性噬菌体的报道。本研究筛选获得的3株AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体,不仅丰富了AHPND致病型副溶血性弧菌噬菌体的菌种资源,还为噬菌体与细菌作为彼此鉴定与菌株分类的工具提供了依据,并具有将供试噬菌体开发成为生物防治制剂的潜力。

参考文献:

- [1] Burge C A, Mark Eakin C, Friedman C S, *et al.* Climate change influences on marine infectious diseases: implications for management and society[J]. *Annual Review of Marine Science*, 2014, 6: 249-277.
- [2] Lightner D V, Redman R M, Pantoja C R, *et al.* Early mortality syndrome affects shrimp in Asia[J]. *Global Aquaculture Advocate*, 2012, 15(1): 40.
- [3] Flegel T W. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2012, 110(2): 166-173.
- [4] Leño E M, Mohan C V. Early mortality syndrome threatens Asia's shrimp farms[J]. *Global Aquaculture Advocate*, 2012, 15(7-8): 38-39.
- [5] Tran L, Nunan L, Redman R M, *et al.* Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2013, 105(1): 45-55.
- [6] Nunan L, Lightner D V, Pantoja C, *et al.* Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2014, 111(1): 81-86.
- [7] Lee C T, Chen I T, Yang Y T, *et al.* The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American*, 2015, 112(34): 10798-10803.
- [8] Sirikharin R, Taengchaiyaphum S, Sanguanrut P, *et al.* Characterization and PCR detection of binary, Pir-like

- toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126987.
- [9] NACA. Asia Pacific emergency regional consultation on the emerging shrimp disease: early mortality syndrome (EMS)/acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS)[R]. Bangkok: Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific Bangkok, 2012.
- [10] Soto-Rodriguez S A, Gomez-Gil B, Lozano-Olvera R, *et al.* Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(5): 1689-1699.
- [11] 徐含颖, 张婉蓉, 张学舒, 等. 对虾早期死亡综合症的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2015, 43(6): 166-167, 170. Xu H Y, Zhang W R, Zhang X S, *et al.* Research advances in early mortality syndrome of shrimp[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2015, 43(6): 166-167, 170(in Chinese).
- [12] Neela F A, Nonaka L, Suzuki S. The diversity of multi-drug resistance profiles in tetracycline-resistant *Vibrio* species isolated from coastal sediments and seawater[J]. *Journal of Microbiology*, 2007, 45(1): 64-68.
- [13] 吴蓓蓓, 俞盈, 金培婕, 等. 宁波地区海产品及环境中副溶血弧菌主要毒力及耐药性分析[J]. *中国人兽共患病学报*, 2011, 27(5): 381-385. Wu B B, Yu Y, Jin P J, *et al.* Analysis of major virulence and antibiotics resistance in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from environment and seafood in Ningbo of Zhejiang Province[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2011, 27(5): 381-385(in Chinese).
- [14] 写腊月, 胡琳琳, 房文红, 等. 海水养殖源弧菌耐药性调查与分析[J]. *海洋渔业*, 2011, 33(4): 442-446. Xie L Y, Hu L L, Fang W H, *et al.* Investigation and analysis of drug resistance of *Vibrios* from mariculture source[J]. *Marine Fisheries*, 2011, 33(4): 442-446(in Chinese).
- [15] Han J E, Mohny L L, Tang K F J, *et al.* Plasmid mediated tetracycline resistance of *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimps[J]. *Aquaculture Reports*, 2015, 2: 17-21.
- [16] Carlton R M, Noordman W H, Biswas B, *et al.* Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application[J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2005, 43(3): 301-312.
- [17] Bruttin A, Brüssow H. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 49(7): 2874-2878.
- [18] Jun J W, Kim H J, Yun S K, *et al.* Eating oysters without risk of vibriosis: application of a bacteriophage against *Vibrio parahaemolyticus* in oysters[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 188: 31-35.
- [19] 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.
- [20] Mateus L, Costa L, Silva Y J, *et al.* Efficiency of phage cocktails in the inactivation of *Vibrio* in aquaculture[J]. *Aquaculture*, 2014, 424: 167-173.
- [21] 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.
- [22] Zhang H, Yang Z Q, Zhou Y, *et al.* Application of a phage in decontaminating *Vibrio parahaemolyticus* in oysters[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, 275: 24-31.
- [23] 王娜. 噬菌体与对虾急性肝胰腺坏死病(AHPND)相关性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015. Wang N. Studies on the relationships with phages and acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015(in Chinese).
- [24] Jun J W, Shin T H, Kim J H, *et al.* Bacteriophage therapy of a *Vibrio parahaemolyticus* infection caused by a multiple-antibiotic-resistant O3: K6 pandemic clinical strain[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2014, 210(1): 72-78.
- [25] Lomeli-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.
- [26] Yingkajorn M, Sermwitayawong N, Palittapongarpim P, *et al.* *Vibrio parahaemolyticus* and its specific bacterio-

- phages as an indicator in cockles (*Anadara granosa*) for the risk of *V. parahaemolyticus* infection in Southern Thailand[J]. *Microbial Ecology*, 2014, 67(4): 849-856.
- [27] Sirikharin R, Taengchaiyaphum S, Sritunyalucksana K, *et al.* A new and improved PCR method for detection of AHPND bacteria[R]. Bangkok, Thailand: Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific (NACA), 2014: 7-9.
- [28] Jun J W, Han J E, Tang K F J, *et al.* Potential application of bacteriophage pVp-1: agent combating *Vibrio parahaemolyticus* strains associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp[J]. *Aquaculture*, 2016, 457: 100-103.
- [29] Clokie M R J, Kropinski A M. Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions[M]. Hertford: Human Press, 2008.
- [30] 余茂劲, 司稷东. 噬菌体实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1991: 5-10.
Yu M X, Si X D. Phage Experimental Technology[M]. Beijing: Science Press, 1991: 5-10(in Chinese).
- [31] Adams M H. Bacteriophages[M]. New York: Interscience Publishers, 1959.
- [32] Koga T, Kawata T. Structure of a novel bacteriophage VP3 for *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Microbiology and Immunology*, 1981, 25(7): 737-740.
- [33] 彭勇, 王静雪, 丁云娟, 等. 两株副溶血弧菌噬菌体的分离鉴定及裂解性能[J]. *水产科学*, 2012, 31(11): 645-650.
Peng Y, Wang J X, Ding Y J, *et al.* Isolation, identification and lysis property of two *Vibrio parahaemolyticus* phages[J]. *Fisheries Science*, 2012, 31(11): 645-650(in Chinese).
- [34] 宁淑香, 聂丽平, 陆敏, 等. VP₁₀—一株海洋噬菌体的分离及特性研究[J]. *水产科学*, 2000, 19(2): 14-16.
Ning S X, Nie L P, Lu M, *et al.* Isolation and characteristics of VP₁₀—a marine bacteriophage[J]. *Fisheries Science*, 2000, 19(2): 14-16(in Chinese).
- [35] 萨姆布鲁, 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 3版. 北京: 科学出版社, 2002: 185-197.
Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. Huang P T, trans. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002: 185-197(in Chinese).
- [36] 张克斌, 陈志谨, 金晓琳, 等. 铜绿假单胞菌噬菌体的分离鉴定及耐噬菌体突变频率测定[J]. *微生物学通报*, 2002, 29(1): 40-45.
Zhang K B, Chen Z J, Jin X L, *et al.* Isolation and identification of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage and determination of phage-resistance mutation frequency[J]. *Microbiology China*, 2002, 29(1): 40-45(in Chinese).
- [37] 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.
- [38] 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).
- [39] 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).
- [40] 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).
- [41] 张帅, 潘连德. 过氧化乙酸在水产养殖中的应用研究进展[J]. *水产养殖*, 2017, 38(1): 7-10.
Zhang S, Pan L D. Research progress of application of peracetic acid in aquaculture[J]. *Journal of Aquaculture*, 2017, 38(1): 7-10(in Chinese).
- [42] Alagappan K, Karupiah V, Deivasigamani B. Protective effect of phages on experimental *Vibrio parahaemolyticus* infection and immune response in shrimp (*Fabricius*, 1798)[J]. *Aquaculture*, 2016, 453: 86-92.
- [43] 林业杰, 陈亢川, 胡海林, 等. 副溶血性弧菌噬菌体的生物学特性研究[J]. *海峡预防医学杂志*, 1998, 4(1): 9-11.
Lin Y J, Chen K C, Hu H L, *et al.* Biological character-

- istics of *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophages[J]. Strait Journal of Preventive Medicine, 1998, 4(1): 9-11(in Chinese).
- [44] Matsuzaki S, Inoue T, Tanaka S, *et al.* Characterization of a novel *Vibrio parahaemolyticus* phage, KVP241, and its relatives frequently isolated from seawater[J]. *Microbiology and Immunology*, 2000, 44(11): 953-956.
- [45] Seguritan V, Feng I W, Rohwer F, *et al.* Genome sequences of two closely related *Vibrio parahaemolyticus* phages, VP16T and VP16C[J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(21): 6434-6447.
- [46] Hardies S C, Comeau A M, Serwer P, *et al.* The complete sequence of marine bacteriophage VpV262 infecting *Vibrio parahaemolyticus* indicates that an ancestral component of a T7 viral supergroup is widespread in the marine environment[J]. *Virology*, 2003, 310(2): 359-371.
- [47] 蔺红苹, 邱德全, 谭龙艳. 一株副溶血弧菌噬菌体的分离与鉴定[J]. *水产科学*, 2010, 29(5): 291-294.
- Lin H P, Qiu D Q, Tan L Y. Isolation and identification of a *Vibrio parahaemolyticus* phage[J]. *Fisheries Science*, 2010, 29(5): 291-294(in Chinese).
- [48] 丁云娟, 彭勇, 林洪, 等. 一株副溶血弧菌噬菌体的分离鉴定及生理特性[J]. *微生物学通报*, 2011, 38(11): 1639-1646.
- Ding Y J, Peng Y, Lin H, *et al.* Isolation, identification and physiological property of lytic phage against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Microbiology China*, 2011, 38(11): 1639-1646(in Chinese).
- [49] 张宝存, 刘飞, 边慧慧, 等. 一株凡纳滨对虾病原菌的分离、鉴定及其致病力分析[J]. *渔业科学进展*, 2012, 33(2): 56-62.
- Zhang B C, Liu F, Bian H H, *et al.* Isolation, identification, and pathogenicity analysis of a *Vibrio parahaemolyticus* strain from *Litopenaeus vannamei*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(2): 56-62(in Chinese).
- [50] Chang H J, Hong J, Lee N, *et al.* Growth inhibitory effect of bacteriophages isolated from western and southern coastal areas of Korea against *Vibrio parahaemolyticus* in Manila clams[J]. *Applied Biological Chemistry*, 2016, 59(3): 359-365.
- [51] Stalin N, Srinivasan P. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* and its specific phage from shrimp pond in Palk Strait, South East coast of India[J]. *Biologicals*, 2016, 44(6): 526-533.
- [52] 林业杰, 陈亢川, 林国华, 等. 试用噬菌体对副溶血性弧菌分型的研究[J]. *海峡预防医学杂志*, 1997, 3(1): 4-6.
- Lin Y J, Chen K C, Lin G H, *et al.* Study on using phages to type *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Strait Journal of Preventive Medicine, 1997, 3(1): 4-6(in Chinese).
- [53] Quiroz-Guzmán E, Peña-Rodríguez A, Vázquez-Juárez R, *et al.* Bacteriophage cocktails as an environmentally-friendly approach to prevent *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* infections in brine shrimp (*Artemia franciscana*) production[J]. *Aquaculture*, 2018, 492: 273-279.
- [54] 荣蓉. 副溶血性弧菌噬菌体VPp1在牡蛎净化中的应用及其规模化制备和保存[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- Rong R. The application in oyster depuration, large-scale preparation and preservation of *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophage VPp1[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014(in Chinese).

Isolation, identification and biological properties of 3 lytic bacteriophages against AHPND-associated *Vibrio parahaemolyticus*

QIAO Huan, XU Xuling*, FEI Wenbin, HUANG Jie, CHEN Hai, HU Yilin, CONG Yu
(Phagelux (Nanjing) Bio-tech Company Limited, Nanjing 210000, China)

Abstract: To isolate and identify lytic bacteriophages against AHPND-associated *Vibrio parahaemolyticus* and analyze their biological properties, lytic bacteriophages were isolated from Fujian and Mexico seawater samples by double-layer agar culture method, and one strain of *V. parahaemolyticus* strain associated with AHPND was used as the host bacterial strain for phage isolation and amplification. The phages were classified and identified by plaque shapes, restriction endonucleases, whole genome sequence, phylogenetic tree building and transmission electron microscopic technique. The lysis range and biological properties including optimal multiplicity of infection (MOI), thermal stability, pH stability, stability to peracetic acid and survival stability at different temperature were determined. The results showed that 3 lytic bacteriophages against AHPND-related *V. parahaemolyticus* were isolated, named P46, P48 and VP7. Their plaques were translucent circle. The plaque diameter of P46 was 4-5 mm. The plaque diameter of P48 and VP7 were 5-6 mm. The nucleotides of 3 bacteriophages were all dsDNA. P46, P48 and VP7 all had an icosahedral head with about 60 nm diameter. Their tails were about 18-20 nm in length and 8 nm in width. 3 phages belonged to the family Podoviridae. The cocktail of P46, P48 and VP7 lysed 91.5% of AHPND-associated *V. parahaemolyticus* strains and non-VP_{AHPND} 92.3% respectively. And they all could not identify non-*V. parahaemolyticus* bacteria. The optimal MOI of P46, P48 and VP7 were 0.001, 0.1 and 0.001 respectively. The optimal pH of P46 and VP7 were 6-8 and P48's was 6-9. Three bacteriophages were stable at 60 °C and had higher survival rate at 4 °C for 50 weeks. P46, P48 and VP7 also tolerated peracetic acid with universal bactericidal concentration. Alignment with the sequences of the conserved protein sequences of NCBI showed that P46, P48 and VP7 had low homology with other bacteriophages. Bacteriophages P46, P48 and VP7 might be 3 novel Podoviridae bacteriophages. This study is the first report of lytic Podoviridae bacteriophages against AHPND-associated *V. parahaemolyticus* in China. The results may enrich the resources of bacteriophages against AHPND-associated *V. parahaemolyticus* and provide potential application of phages as a biocontrol agent.

Key words: AHPND-associated *Vibrio parahaemolyticus*; lytic bacteriophages against AHPND-associated *V. parahaemolyticus*; isolation and identification; biological property

Corresponding author: XU Xuling. E-mail: xuxl@phagelux.com