

噬菌体防治皱纹盘鲍脓疱病的研究*

李太武 相建海 刘瑞玉 丁明进[†] 史萍[†] 王世宏[†]

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

[†](大连水产养殖公司 大连 116023)

提要 于1993年6月在大连太平洋海珍品养殖公司的12个采集点分离到河流弧菌II的噬菌体,依据过量噬菌体可以全部裂解其宿主菌河流弧菌II的特性,用噬菌体对皱纹盘鲍脓疱病进行了生物防治研究。结果表明,使用一定浓度的噬菌体可以有效地治疗或推迟脓疱病引起的鲍死亡,可将鲍的成活率提高50%以上。探讨了在噬菌体生物防治中遇到的难题及解决办法、噬菌体分离规律等问题。

关键词 皱纹盘鲍 脓疱病 噬菌体 生物防治

学科分类号 S944.3

1992年以来,大连地区养殖的皱纹盘鲍稚鲍、2龄鲍和成鲍(包括亲鲍)出现大批死亡,给国家和养殖单位造成了巨大的经济损失。至1993年下半年,已确定死亡原因为脓疱病(聂丽平等,1995),并就该病的防治进行了多方面的研究(李太武等,1996,1997a,b,c,d)。研究表明,使用抗生素防治脓疱病虽然见效快、效果明显,但如果经常使用某种单一的抗生素,会使病原菌产生抗药性,而且会造成海水污染。本文报告利用噬菌体对脓疱病进行生物防治的研究结果。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用的皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)于1993年6月由大连水产养殖公司和太平洋海珍品养殖公司提供。河流弧菌II(*Vibrio fluvialis*-II)的D株分离自大连水产养殖公司,由中国科学院微生物研究所制成冷冻干品,N株分离自大连市金州区新港海珍品养殖公司(鲶鱼湾),T株分离自大连太平洋海珍品养殖公司。

1.2 方法

1.2.1 噬菌体的分离实验 方法参照余茂劬(1991)、张颖悟等(1990)、贾盘兴等(1986)、陶涛等(1991)、Sharp等(1986)。

培养基 液体:牛肉膏(浓度为原配方的3倍)、蛋白胨;固体:牛肉膏、蛋白胨、琼脂(1.4%);上层固体:牛肉膏、蛋白胨、琼脂(0.6%)。

* 大连市科学技术委员会资助项目,[1995]42号。李太武,男,出生于1955年12月,博士后,教授,现在辽宁师范大学生物系,地址:大连市黄河路850号,邮编:116029,E-mail: twli55@pub.dl.lnpta.net.cn

收稿日期:1997-02-20,收修改稿日期:1998-07-27

分离方法 从养鲍场选取 15 个样点采取水样,取 200ml 水样加 100ml 液体培养基(浓度为原配方的 3 倍),然后加入 5ml 左右对数生长期的脓疱病病原菌,37℃ 培养 12—24h。在室温下离心(8 000r/min, 10min),取上清液,用滤菌器过滤,37℃ 过夜,证明无菌后,于 4℃ 保存备用。挑选单菌落病原菌,接种于 1ml 液体培养基(原配方浓度)中,37℃ 过夜,将这 1ml 菌液接种于 50ml 液体培养基培养至对数生长期(约 6h),室温下离心(4 500r/min, 5min),用 $MgSO_4$ 稀释成 $OD_{600} = 2$ 的菌液,备用。在琼脂平板上涂一层菌液(约 0.1ml),然后滴上一滴上述处理的水样,37℃ 过夜,如有噬菌体则可在滴加处见到明显的噬斑。

1.2.2 噬菌体的纯化实验 取规格为 5ml 的离心管,加入 0.1ml 病原菌液、0.1ml SM 液[包括 5.8g NaCl、2g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、50ml 1mol/L Tris-HCl (pH = 7.5)、5ml 2% 明胶,加蒸馏水至 100ml],挑取一小块带有噬斑的琼脂,保温 20min。加入 3—4ml 47℃ 的上层琼脂培养基,混匀后倒在固体培养基平板上。凝固后倒置平板,过夜,就会出现许多清晰的噬斑。反复进行几次上述实验(挑单斑),可得到纯化和增殖的噬菌体。在每个纯化噬菌体平板上加入 5ml SM 液,4℃ 下放置数小时,不时地轻轻摇动平板,用吸管将该液体吸入 5ml 离心管中,加入 0.1ml 氯仿,混匀后,于 4℃ 离心(4 000r/min, 10min),取上清液,加入 0.1ml 氯仿,置 4℃ 保存备用(蒋如璋等,1990)。

1.2.3 噬菌体结构的观察拍照 利用电镜对噬菌体的结构进行观察,按上述方法制备噬斑平板,切取 1 小块含噬斑的上层琼脂培养基,放入 1.5ml 离心管中,加入熔化的 2% 琼脂包埋。凝固后切成 $1mm^3$ 的小块,用 2.5% 戊二醛固定后,按常规方法制成超薄切片,用透射电镜观察拍照(那淑敏等,1990a, b)。

1.2.4 用噬菌体鉴定脓疱病病原菌 按上述方法培养病原菌,然后按噬菌体纯化方法制备平板,培养 12h 后,发现能产生噬斑的病原菌只有河流弧菌 II(*Vibrio fluvialis*-II)。

1.2.5 噬菌体防治脓疱病 设计两个大组,每组又分为 A、B、C 组,其中 A 组和 B 组为实验组,C 组为对照组,每组用 10 只 2 龄健康鲍(壳长为 4—5cm)。为了排除环境的干扰因素,另设 2 个重复实验组。水温保持在 20℃。饵料为海带、石莼或配合饵料。A 组 7d 后正常管理;B 组只注射 1 次后正常管理。

第一大组为足部肌肉注射感染实验组。

A 组:先将健康鲍足部用 70% 酒精消毒后,再按每小组 2 只鲍分为 5 小组,分别标记为 1、2、3、4、5 号,用微量注射器分别注射河流弧菌 II(100 μ l/鲍),注射的菌数分别为:第 1 组 2.0×10^1 ind/鲍,第 2 组 2.0×10^2 ind/鲍,第 3 组 2.0×10^3 ind/鲍,第 4 组 2.0×10^4 ind/鲍,第 5 组 2.0×10^5 ind/鲍。

B 组:注射与 A 组相同的病原菌后,再注射 10 倍于菌数的噬菌体。

C 组:只注射生理盐水。注射后的鲍在空气中放置 5min 后再放入海水中。

第二大组为创伤感染实验组。

A 组:先将健康鲍的足表面消毒后用灭菌的解剖器、尖石块割出深 1mm、长约 3mm 的几个各种形状的伤口,然后放入含菌量为 2.0×10^5 ind/ml 的海水中。

B 组:海水中加入与 A 组等量的菌液后再加入比菌数多 10 倍的噬菌体。

C 组:鲍的处理同 A、B 组,海水中只加入等量的生理盐水。

1.2.6 噬菌体的长期保存 噬菌体的特殊生活方式决定它必须有一个特定的环境才能长期存活。并且,不同的噬菌体其保存方式也不同。河流弧菌 II 噬菌体可按下列方法保存:

(1) 将病原菌同噬菌斑连同琼脂一起放入营养肉汤中,密封,4℃保存。

(2) 用 SM 液、胨水、噬菌体缓冲液 (10mmol/L Tris-HCl, pH = 7.4, 100mmol/L NaCl, 100mmol/L MgSO₄ · 7H₂O) 分别浸泡具有噬斑的平板,4℃,数小时或过夜,其间不时地轻摇。用 5ml 移液器吸出浸泡液,离心 (6 000—8 000r/min, 10min),弃去沉淀,在上清液中按上清液:氯仿 = 20:1 (V/V) 加入氯仿,4℃保存。或用过滤器过滤浸泡液除去弧菌,在过滤液中按过滤液:氯仿 = 200:1 (V/V) 加入氯仿后,4℃保存。

(3) 用无菌滤纸条吸附噬菌体,冷冻干燥后,密封,4℃保存。

2 结果

2.1 噬菌体的分离

在太平洋海珍品养殖公司的 15 个采集点中,有 12 个点分离到了噬菌体,结果见表 1。

表 1 噬菌体的分离

Tab.1 The isolation of bacteriophage

水样名称(种类)	分离结果	水样名称(种类)	分离结果
种鲍池内水(I)	++	自然海水	++
1龄死鲍及其池内水	++	室外池排出的脏水	—
室外硅藻和水	+++	室外死稚鲍	—
室内硅藻和水	++	种鲍池内水(II)	++
2龄死鲍(整体)	+	室内种鲍池内排出脏水	+
2龄死鲍及池内水	++	室外水沟	—
养殖厂总出水口	++	病鲍足脓汁、粘液及隔离池内的水	+++
室内采苗水	++		

+++ : 很多; ++ : 较多; + : 多; — : 未分离到

2.2 噬斑的生长

如果所有的宿主菌是纯河流弧菌 II,而且噬菌体与宿主菌的浓度比合适,就会在琼脂平板上产生非常清晰的噬斑。噬斑的大小与平板的新鲜程度也有关系。如果平板超过 7d 以上,表面过于干燥,则噬斑很小。

2.3 噬菌体的结构

对噬菌体进行的透射电镜观察发现,河流弧菌 II 的噬菌体结构简单,分为头、尾两部分,头部近圆形,直径为 150—200nm,尾部细长,粗细均匀,鞘、尾盘和尾丝等结构不清楚。观察发现,这种噬菌体有大小两种类型,反复挑单斑也不能将它们分开(图 1)。

2.4 噬菌体防治脓疱病的实验

进行两轮实验,每轮 3 个重复,实验的总结果见表 2 和表 3。

2.5 噬菌体的保存

河流弧菌 II 在 4℃ 较难长期保存,至多在 1 个月内要转接一次种。噬菌体的长期保存

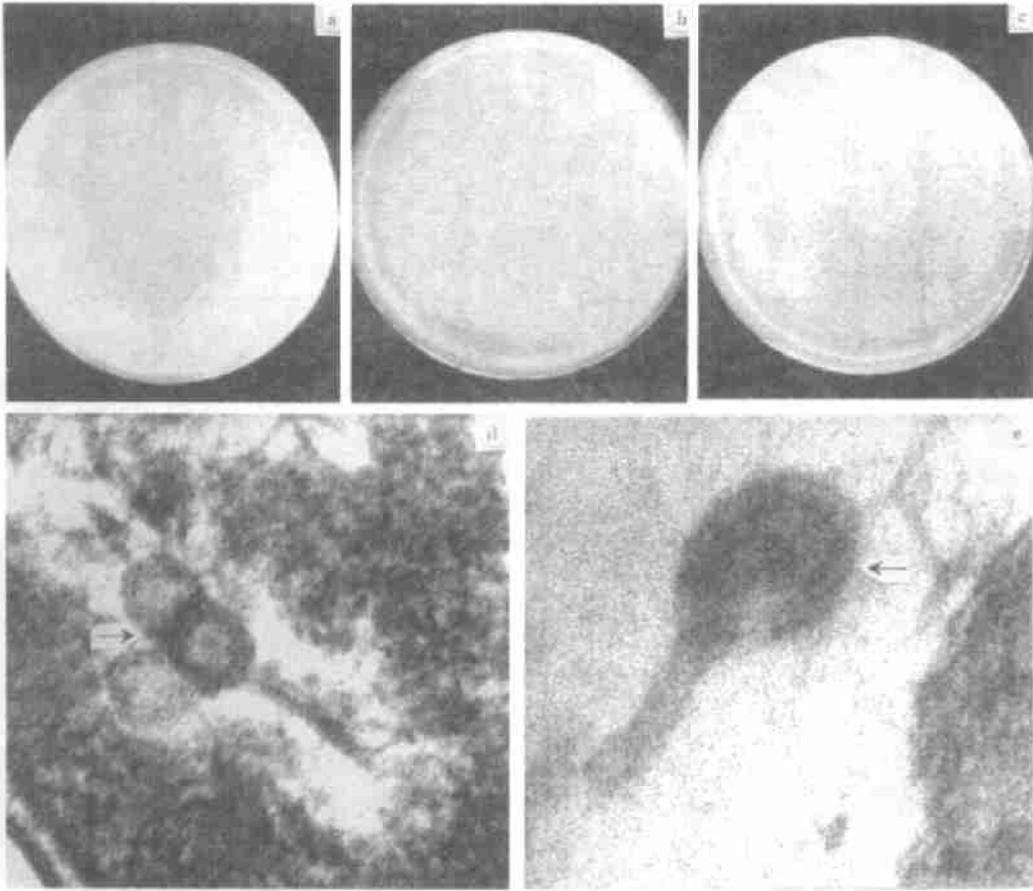


图1 噬菌体的结构

Fig.1 The structure of bacteriophage

a.对照,平板上生长着河流弧菌II; b,c.平板上可见噬斑; d,e.箭头示噬菌体

表2 注射噬菌体防治脓疱病的实验结果

Tab.2 The experimental effect of bacteriophage to control pustule disease of abalone by muscular injection

组别	菌液浓度 (ind/ml)	噬菌体液浓度 (pfu/ml)	实验鲍数 (ind)	水温 ¹⁾ (℃)	死亡情况(ind/d)							死亡率 (%)	
					1	2	3	4	5	6	7		
A组	1号	2.0×10^1	12	20	0	0	0	0	0	0	0	0	70
	2号	2.0×10^2	12	20	0	0	0	0	0	3	3		
	3号	2.0×10^3	12	20	0	0	0	0	1	4	7		
	4号	2.0×10^4	12	20	0	0	0	0	3	5	4		
	5号	2.0×10^5	12	20	0	0	1	1	2	3	5		
B组	1号	2.0×10^1	2.0×10^2	12	20	0	0	0	0	0	0	0	20
	2号	2.0×10^2	2.0×10^3	12	20	0	0	0	0	0	0	0	
	3号	2.0×10^3	2.0×10^4	12	20	0	0	0	0	0	0	0	
	4号	2.0×10^4	2.0×10^5	12	20	0	0	0	0	0	0	5	
	5号	2.0×10^5	2.0×10^6	12	20	0	0	0	0	1	1	5	
C组	2%生理盐水		20	20	0	0	0	0	0	0	0	0	

1) 水温偏差为 $\pm 0.5^\circ\text{C}$,表3同

表3 创伤组噬菌体防治脓疱病的实验结果

Tab.3 The experimental effect of bacteriophage to control pustule disease of abalone by infection on the wound in abalone foot

组别	菌液浓度 (ind/ml)	噬菌体液浓度 (pfu/ml)	实验鲍数 (ind)	水温 (°C)	死亡情况 (ind/d)							死亡率 (%)
					1	2	3	4	5	6	7	
A	2.0×10^5		30	20	0	0	0	0	1	3	5	30
B	2.0×10^5	2.0×10^6	30	20	0	0	0	0	0	0	0	0
C	2%生理盐水		30	20	0	0	0	0	0	0	0	0

也较困难,4个月时测其 pfu(噬斑数或滴度)发现,开始为 109pfu/ml 的保存液,此时只产生 10pfu/ml。在少量氯仿和无菌的条件下,4°C 时最长可保存至半年左右。在脓水中的活性要高于在 SM 液和噬菌体缓冲液中的活性。

3 讨论与结语

3.1 噬菌体生物防治困难较多。用噬菌体防治鲍脓疱病,属国内外首创,没有参考资料。因此在研究过程中遇到很多难题。例如在第一轮实验中, B 组死亡率很高,对照组注射与细菌同样的稀释液 0.01mol/L $MgSO_4$,全部死亡;注射与噬菌体同样的稀释液 SM 液,也先后陆续死亡,说明 B 组的死亡与 $MgSO_4$ 和 SM 液直接相关。于是开始试用 2% 生理盐水来洗脱、稀释细菌和噬菌体,虽然洗脱的噬菌体滴度 (pfu) 比用 SM 液的低 1×10^2 ,但注射生理盐水的对照组死亡率为零。在第二轮实验中 B 组又出现了不正常死亡,究其原因,可能与河流弧菌 II 的残余毒素有关,因为在死鲍体内分离不到任何病原菌(而实验 3d 时 A 组的死鲍血淋巴里含有大量的河流弧菌 II,没有其它杂菌)。B 组的死鲍足部柔软,没有病灶(超微结构观察无病毒等病原体),因此可能是中毒死亡。现正在研究用浓缩或透析的方法除去细菌的胞外毒素。

3.2 噬菌体生物防治特异性强。噬菌体是一类微小生物(与病毒相同),它们体积小、结构简单并且具有严格的寄生性,必须在活的宿主菌细胞(即细菌)内繁殖,达到一定的浓度时,细菌破裂,子一代噬菌体释放出来后,又分别感染别的细菌细胞,从而在平板上产生一个个透明的亮点——噬菌斑。它们对宿主菌有高度的特异性和选择性。故在微生物研究中,可用噬菌体来鉴定某种细菌(它的宿主),甚至可以用来分型(张颖悟等,1990)。作者的实验结果也充分证明了这一点,在接种的过程中如果不慎混有别的杂菌,如在液体培养基表面产生了白膜,而且菌量明显增多,则这样的菌液不能得到噬斑,即该细菌不能被这种噬菌体所裂解(Bruce *et al*, 1985)。

3.3 噬菌体分离有规律。作者选择了 15 个点采样分离噬菌体,其中,除死亡的稚鲍外,只有室外脏水和室外排水沟内没有分离到噬菌体,其它 12 个点都成功地得到了噬菌体。室外水沟和地下水内含有很高的杀菌药物(如高锰酸钾等),使噬菌体的宿主菌河流弧菌 II 难以生存,因此分离不到噬菌体。通过分析比较发现,在河流弧菌 II 浓度高的地方分离到的噬菌体较多,比较典型的例子是在病鲍的脓疱内、室外硅藻及其池水内均分离出大量的噬菌体。

3.4 噬菌体生物防治效果明显。由于噬菌体本身不能运动,它们必须先吸附到宿主细胞上,才能裂解宿主而使自己增殖,吸附是噬菌体生活周期的开始。宿主细胞的生理状态、

周围的环境因子、噬菌体和宿主细胞的数量比例都大大影响吸附率的变化。在用噬菌体防病治病的时候,首先必须解决如何让宿主菌和噬菌体相互接触,创造良好的吸附环境,才能收到真正防病治病的效果。根据作者的研究结果,噬菌体的应用十分广泛。首先,用噬菌体感染河流弧菌 II(或其它宿主菌),到对数期,把感染的细菌离心沉淀出来再扩增,该类菌已失去毒性,再用注射法感染鲍,不会出现死亡和任何异常反应。大量液体培养噬菌体并连同脱毒的菌一起加入水环境中,则可有效抑制致病细菌的增殖,从而达到防治该病的作用。每一种菌有许多型,每型细菌又有多个型的噬菌体,这的确为用噬菌体防治细菌病带来了困难。但同一种菌(同一型菌)的不同型噬菌体可以生存在一起,利用这种“混合”的噬菌体来防病就较为简单了。

另外,根据噬菌体与宿主菌作用具有高度特异性的特点,可以用噬菌体效价增长实验来检测标本中未知菌,从而在早期诊断由其宿主菌引起的疾病。作者研制了诊断试剂盒,目前正在测试中。种鲍中的脓疱病最明显,损失也较大。但种鲍个体大,数量少,可以采用注射噬菌体法防治。

在健康鲍和病鲍体内(消化道、血淋巴等处)也分离到几种其它菌,鉴定后内含副溶血和溶藻弧菌,但至今未发现这两种菌引起的鲍病和病灶,脓疱病只由一种菌即河流弧菌 II 引起,病灶只在足上出现。河流弧菌 II 的最适生长温度为 37℃,估计该菌原为陆地种而次生性进入海洋中。

参 考 文 献

- 那淑敏, 贾盘兴, 余茂勋, 1990a. 两种枯草芽孢杆菌的噬菌体. 微生物学报, 30(2):117—121
- 那淑敏, 贾盘兴, 余茂勋, 1990b. 一些芽孢杆菌的噬菌体的形态和结构. 微生物学报, 30(3):210—215
- 李太武, 丁明进, 宋协民等, 1996. 皱纹盘鲍脓疱病病原菌——河流弧菌 II 的抗药机制的初步研究. 海洋与湖沼, 27(6):637—645
- 李太武, 丁明进, 王世宏等, 1997a. 用同工酶法诊断鲍脓疱病研究. 海洋科学, 2:68—69
- 李太武, 丁明进, 相建海等, 1997b. 皱纹盘鲍对河流弧菌-II 苗免疫的研究. 海洋与湖沼, 28(1):637—645
- 李太武, 张 健, 丁明进等, 1997c. 大连地区皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) 脓疱病的研究. 南海研究与开发, 4:21—27
- 李太武, 张 健, 丁明进等, 1997d. 皱纹盘鲍脓疱病的组织学和超微结构研究. 动物学报, 43(3):238—242
- 余茂勋, 1991. 噬菌体实验技术. 北京: 科学出版社, 1—94
- 张颖悟, 蓝鸿泰, 郑家齐, 1990. 临床微生物(上). 大连: 大连出版社, 49—52
- 聂丽平, 刘金屏, 李太武等, 1995. 皱纹盘鲍脓疱病病原菌——河流弧菌 II 的生物性状研究. 中国微生态学杂志, 7(1):33—37
- 贾盘兴, 徐 星, 李传有等, 1986. 枯草芽孢杆菌 BF7658 噬菌体的研究. 病毒学报, 2(4):360—365
- 陶 涛, 陆志宇, 1991. 嗜碱芽孢杆菌噬菌体的分离及特性. 微生物学报, 31(4):318—320
- 蒋如璋, 樊庭玉, 1990. 短小芽孢杆菌缺陷噬菌体. 微生物学报, 30(5):365—368
- Bruce A W, Alexandeer M, 1985. Minimum bacterial density for bacteriophage replication: implications for significance of bacteriophages in natural ecosystems. Appl Environ Microbiol, 49(1):19—23
- Sharp R J, Ahmad S I, Munster A *et al*, 1986. The isolation and characterization of bacteriophages infecting obligately thermophilic strains of *Bacillus*. J Gen Microbiol, 132: 1723—1728

STUDIES ON BACTERIOPHAGE CONTROL PUSTULE DISEASE OF ABALONE *HALIOTIS DISCUS HANNAI*

LI Tai-wu, XIANG Jian-hai, LIU Rui-yu, DING Ming-jin[†],
SHI Ping[†], WANG Shi-hong[†]

(*Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

[†](*Aquacultural Company of Dalian, Dalian, 116023*)

Abstract The isolation, purification and propagation of bacteriophage of *Vibrio fluvialis*-II were studied. The phage was isolated from 12 different water samples, using the normal isolation procedure. The *Vibrio fluvialis*-II can grow well on STA (seawater, tryptone and agar) medium, which was used as a host and test culture.

The plaques were obtained by the agar bilayer method. Concentrated phage suspensions were obtained from plates by washing them with 2% NaCl solution (e.g. add 4ml 2% NaCl solution into each plate); they were then put into refrigerator at 4℃ overnight. The phage suspensions from the plate were added into a 5ml tube. The host bacteria were removed by centrifugation at 8 000r/min and filter, and were purified and propagated by picking the single plaque repeatedly.

The bacteria *Vibrio fluvialis*-II can be all split using the phage with a high concentration. The effect of bacteriophage control pustule disease of abalone by muscular injection and infection on the wound in abalone foot can raise the survival rate of the abalone by up to 50%.

Electron microscopic examination of the material taken from the plaques of the phage show that they contained simultaneously two forms of phage particles, with large and small heads, while their tails were morphologically identical. Numerous successive passages of the material taken from single plaque did not make it possible to separate small and large phage particles.

Key words *Haliotis discus hannai* Pustule disease Bacteriophage Biological control

Subject classification number S944.3