

## 一株副溶血弧菌噬菌体生物学特性、全基因组特征及其在食品中的应用

张俊鹏, 刘文婷, 石甜, 王华娟, 王宏勋, 周敏

### Biological Characteristics, Genome-wide Characteristics of A Bacteriophage of *Vibrio parahaemolyticus* and Its Application in Food

ZHANG Junpeng, LIU Wenting, SHI Tian, WANG Huajuan, WANG Hongxun, and ZHOU Min

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023020018>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

#### 溶藻弧菌噬菌体Va2001的分离鉴定及其应用

Isolation and Identification of a *Vibrio alginolyticus* Bacteriophage Va2001 and Its Application

食品工业科技. 2021, 42(23): 102-109 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021020103>

#### 一株广域pH耐受性微小噬菌体 $\alpha\alpha$ 的分离、纯化及生理学特性分析

Isolation, Purification and Physiological Characteristics of *Microviridae* Bacteriophage  $\alpha\alpha$  with a Broad pH Resistance

食品工业科技. 2018, 39(15): 77-82,95 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.15.015>

#### 重组大肠杆菌制备副溶血弧菌噬菌体内溶素Lys qdvp001 CHAP域及诱导条件初步优化

Preparation of recombinant endolysin from *Vibrio parahaemolyticus*-infecting bacteriophage Lys qdvp001 CHAP domain protein in *Escherichia coli* and preliminary optimization of inducing conditions

食品工业科技. 2018, 39(6): 86-91 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.06.016>

#### 副溶血弧菌耐药及其机制的研究进展

Research progress of the drug-resistance and its mechanism of *Vibrio parahaemolyticus*

食品工业科技. 2018, 39(9): 311-317,324 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.09.055>

#### 弱后酸化保加利亚乳杆菌KLDS1.1011的筛选及其全基因组注释研究

Screening of a Weakly Post-acidified *Lactobacillus bulgaricus* KLDS1.1011 and Its Genome-wide Annotation

食品工业科技. 2021, 42(6): 103-110 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019090296>

#### 副溶血性弧菌外膜蛋白VP1008和弧菌铁蛋白受体的重组表达及抗体交叉反应

Recombinant Expression and Antibody Cross-reaction of the Outer Membrane Protein VP1008 and Ferric Vibrioferrin Receptor of *Vibrio parahaemolyticus*

食品工业科技. 2021, 42(19): 144-151 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021030061>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

张俊鹏, 刘文婷, 石甜, 等. 一株副溶血弧菌噬菌体生物学特性、全基因组特征及其在食品中的应用 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(1): 137-144. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020018

ZHANG Junpeng, LIU Wenting, SHI Tian, et al. Biological Characteristics, Genome-wide Characteristics of A Bacteriophage of *Vibrio parahaemolyticus* and Its Application in Food[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(1): 137-144. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020018

· 生物工程 ·

# 一株副溶血弧菌噬菌体生物学特性、全基因组特征及其在食品中的应用

张俊鹏<sup>1</sup>, 刘文婷<sup>1</sup>, 石甜<sup>1</sup>, 王华娟<sup>1</sup>, 王宏勋<sup>2</sup>, 周敏<sup>1\*</sup>

(1. 武汉轻工大学食品科学与工程学院, 湖北武汉 430000;

2. 武汉轻工大学生命科学与技术学院, 湖北武汉 430000)

**摘要:**目的: 分析 1 株副溶血性弧菌噬菌体 474x1 的生物学特性、全基因组及在食品中的抑菌效果。方法: 以副溶血性弧菌 474 菌株为宿主菌, 从海鲜市场基围虾分离噬菌体 474x1, 利用透射电镜观察其形态, 并绘制一步生长曲线, 分析 474x1 对温度及 pH 的敏感性。分析 474x1 全基因组序列, 根据 474x1 末端酶大亚基构建系统进化树。通过测定菌落总数评价噬菌体对虾肉中副溶血弧菌的抑制效果。结果: 分离到 1 株新型的副溶血弧菌噬菌体, 命名为 474x1, 该噬菌体能够裂解 23 株副溶血弧菌中的 19 株 (19/23=82.61%)。电镜观察 474x1 具有典型的短尾病毒科病毒形态特征。最佳感染复数 (MOI) 为 0.01, 一步生长曲线显示 474x1 的潜伏期为 10 min, 裂解量为 115 PFU/cell。该噬菌体能够在较大的温度范围 (30~60 °C) 和 pH (4~11) 范围内维持活性。474x1 全基因组长 47830 bp, 包含 69 个开放阅读框 (open reading frames, ORFs), 其中 14 个具有特定功能的基因。比较基因组学分析 474x1 与短尾噬菌体科弧菌属噬菌体 Vp41s3 基因组具有较高同源性, 进化分析表明 474x1 与副溶血弧菌噬菌体 Vp41s3 亲缘性最高。在应用实验中, 在 4 °C 下 MOI=1000 的实验组在第 3 h 相较对照组菌量下降了 0.39 lgCFU/mL。MOI=10000 的实验组在第 12 h 相较对照组菌量下降了 0.92 lgCFU/mL, 在 25 °C 下 MOI=1000, MOI=10000 的实验组相较对照组在第 6 h 时菌量分别下降 1.04、1.82 lgCFU/mL, 表明噬菌体 474x1 能够显著抑制虾肉中宿主菌的生长。结论: 从基围虾中分离鉴定 1 株新的副溶血性弧菌噬菌体, 该噬菌体裂解量大, 潜伏期短, 在 60 °C 以下表现出较好的稳定性, pH 耐受范围宽, 在食品中也有良好的抑菌效果, 为防控水产品副溶血性弧菌的致病株奠定了基础。

**关键词:** 副溶血弧菌噬菌体, 分离与纯化, 最佳感染复数 (MOI), 一步生长曲线, 基因组, 抑菌试验

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)01-0137-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020018

本文网刊:



## Biological Characteristics, Genome-wide Characteristics of A Bacteriophage of *Vibrio parahaemolyticus* and Its Application in Food

ZHANG Junpeng<sup>1</sup>, LIU Wenting<sup>1</sup>, SHI Tian<sup>1</sup>, WANG Huajuan<sup>1</sup>, WANG Hongxun<sup>2</sup>, ZHOU Min<sup>1\*</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430000, China;

2. College of Life Sciences and Technology, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430000, China)

**Abstract:** Objective: The purpose of this study was to investigate the biological characteristics, whole genome, and antibacterial effect of *V. parahaemolyticus* phage 474x1 in food. Methods: The phage 474x1 was isolated from shrimp

收稿日期: 2023-02-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31471660); 十三五国家重点研发专项 (2017YFC1600100); 武汉轻工大学校级科研项目 (2021Y02); 湖北省教育厅科学技术研究项目 (Q20211606)。

作者简介: 张俊鹏 (1998-), 男, 硕士, 研究方向: 食品安全与微生物, E-mail: 513103229@qq.com。

\* 通信作者: 周敏 (1977-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全, E-mail: mzhou268@163.com。

purchased from seafood market with *V. parahaemolyticus* strain 474 as host strain. The morphology of phage 474x1 was observed by transmission electron microscopy. One-step growth curve was determined, and its sensitivity to temperature and pH was assessed. The whole genome sequence of 474x1 was analyzed, and a phylogenetic tree was constructed based on the sequence of large subunit of phage terminase. The inhibitory effect of the phage on *V. parahaemolyticus* in shrimp meat was evaluated using the total colony count method. Results: A lytic phage against *V. parahaemolyticus* was isolated which named 474x1, and it could lyse 19 out of 23 strains of *V. parahaemolyticus* (82.61%). The phage had typical characteristics of a tailed bacteriophage in Myoviridae. The optimal multiplicity of infection (MOI) was 0.01, and the one-step growth curve showed that the latent period of 474x1 was 10 min, and the burst size was 115 PFU/cell. The phage was active over a wide range of temperature (30~60 °C) and pH (4~11). The whole genome of 474x1 was 47830 bp long, and 69 open reading frames were predicted and annotated, including 14 genes with specific functions. Comparative genomics analysis showed that 474x1 had high homology with *Vibrio* phage Vp41s3, and phylogenetic analysis also indicated that 474x1 was most closely related to the phage Vp41s3. In the application experiment, the number of bacteria in the experimental group with MOI=1000 at 4 °C decreased by 0.39 lgCFU/mL compared to the control group at 3 h, while the experimental group with MOI=10000 at 4 °C decreased by 0.92 lgCFU/mL compared to the control group at 12 h. At 25 °C, the number of bacteria in the MOI=1000 and MOI=10000 groups decreased by 1.04 lgCFU/mL and 1.82 lgCFU/mL at 6 h, respectively. The results indicated that phage 474x1 could significantly inhibit the growth of host bacteria in shrimp meat. Conclusion: A new *V. parahaemolyticus* phage was isolated from shrimp, which had large burst size, short latent period, and showed good stability below 60 °C and tolerated a wide range of pH. In addition, the phage had good bacteriostatic effect in food, laying a foundation for the prevention and control of pathogenic strains of *V. parahaemolyticus*.

**Key words:** *V. parahaemolyticus* phage; separation and purification; optimal infection complex (MOI); one-step growth curve; genome; bacteriostatic test

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, Vp)是一种常见于河口和海洋环境的革兰氏阴性嗜盐细菌。食用未加工成熟的海产品是人类感染副溶血性弧菌的主要原因<sup>[1]</sup>。近年来海鲜类食品在市场广泛流通,导致该菌由沿海向内陆传播蔓延,甚至超过沙门氏菌和志贺氏菌,成为腹泻的首要病原菌<sup>[2]</sup>。在过去的几十年里,由于抗生素的过度使用,副溶血性弧菌中出现了抗生素耐药性<sup>[3]</sup>。因此,迫切需要既安全又对消费者友好的新的控制方法。

噬菌体是细菌病毒,在自然界中广泛存在,目前噬菌体在副溶血弧菌控制方面已有多篇报道。袁琳等<sup>[4]</sup>研究了噬菌体 SHOU24 对即食对虾中副溶血性弧菌的抑制效果,结果表明,经噬菌体处理的副溶血性弧菌的生长延滞期增长了 4.04 h,噬菌体在常温条件下能使即食对虾中副溶血性弧菌的浓度下降 1 个数量级,噬菌体 SHOU24 可显著降低即食对虾中的副溶血性弧菌数量。郑小双等<sup>[5]</sup>评价了副溶血性弧菌噬菌体 VppMIX 的抑菌效果,结果显示在 25 °C 恒温保藏 12 h 后,不同剂量噬菌体 VppMIX 处理的黄鱼样品中副溶血性弧菌数量比对照组降低了 1.41~4.98 lgCFU/g。可见噬菌体十分适合用于海产品等易腐败食品中主要病原菌的控制。

目前,已报道的副溶血性弧菌裂解性噬菌体数量有限,为了丰富该致病菌的噬菌体库,本研究以 10 株实验室保存的副溶血弧菌为宿主菌,从湖北省武汉不同地点采集的样品中分离烈性噬菌体,分析其形态、裂解谱、一步生长曲线、pH 及温度稳定性等生物学特征,进行基因组比较,并以人工污染的基围虾作为模型,研究噬菌体在贮藏温度下对模拟污染虾肉的抑菌效果,为开发噬菌体抑制剂提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

23 株副溶血弧菌分离株 武汉轻工大学微生物实验室,其中 ATCC17802 为食品源标准菌株,F6、F7、F22、F23 来源于食品,Vp27、Vp33、Vp41、Vp44、460、461、469、470、474、475、485、486、O56、O514 来源于病人,H128、H256、H512 为抗生素诱导株。选取其中 10 株细菌用于分离副溶血弧菌噬菌体;虾肉样品 武汉常青花园武商量贩、常青花园菜市场、盒马鲜生(武汉太和里店);TCBS 琼脂 青岛海博生物技术有限公司;Agar 琼脂粉 飞扬生物技术有限公司;酵母提取素、胰蛋白酶 北京瑞达恒辉公司;氯化钠、无水乙醇 上海国药集团化学试剂有限公司;96 孔微量培养板 美国康宁公司;0.22 μL 针头过滤器 天津津腾公司;一次性注射器 金塔有限公司;DNase I、RNase A、蛋白酶 K Takara 公司。

DRP-9062 型电热恒温培养箱 上海森信实验仪器有限公司;SW-CJ-2FD 型双人单面净化工作台 苏州净化设备有限公司;DHG-9053A 电热鼓风干燥箱 上海一恒科学仪器有限公司;PHS-25 pH 计、CP214 型电子天平 奥豪斯仪器公司;S4OPL201 超纯水机 上海乐枫科技有限公司;Mini 15K 离心机 杭州奥盛仪器有限公司;DB150L 高压灭菌锅 北京亚欧德鹏科技有限公司;CMBR 全自动生长曲线分析系统 芬兰 Bio screen。

### 1.2 实验方法

1.2.1 噬菌体的分离与纯化 取虾肉样品 25 g 加入 225 mL 生理盐水,均质 2 min,混合液以 5000 r/min 离心 10 min,取 5 mL 上清液加入 5 mL LB 液体培



培养基中,同时分别加入 100  $\mu\text{L}$  处于对数生长期的 10 株副溶血弧菌,37  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养 8 h 后 5000 r/min 离心 10 min,取上清液过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜,滤液经 10 倍梯度稀释后与宿主菌混合,使用双层平板法<sup>[6]</sup>,37  $^{\circ}\text{C}$  培养 6~8 h 检测噬菌斑。挑取单个空斑至 1 mL SM 缓冲液中,4  $^{\circ}\text{C}$  过夜,用 SM 缓冲液稀释噬菌体液,取适宜梯度加入宿主菌制成双层平板,37  $^{\circ}\text{C}$  培养 6~8 h,重复培养 5 次,得到纯化噬菌体。

**1.2.2 噬菌体效价测定** 纯化的噬菌体液进行 10 倍稀释,将  $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  及  $10^{-7}$  的噬菌体液 100  $\mu\text{L}$  分别与 100  $\mu\text{L}$  对数期的宿主菌混合,利用双层平板法<sup>[6]</sup> 观察噬菌斑的个数。

噬菌体效价(PFU/mL)=噬菌斑数量 $\times$ 稀释倍数 $\times 10$

**1.2.3 噬菌体透射电镜观察** 参考 Ramirez-Orozco 等<sup>[7]</sup> 方法,采用磷钨酸负染法进行透射电镜观察噬菌体形态,并利用软件 Digital Micrograph Demo 3.9.1 测量噬菌体头部直径和尾长。

**1.2.4 噬菌体宿主谱测定** 使用点斑法测定噬菌体的宿主谱<sup>[8]</sup>,取 3.7 mL LB 半固体培养基加入 0.1 mL 宿主菌( $10^9$  CFU/mL),颠倒混匀后倾倒在固体培养基上,待凝固后,滴加噬菌体悬液( $10^9$  PFU/mL) 10  $\mu\text{L}$ ,置 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养 8~12 h,观察裂解圈的形成。

**1.2.5 噬菌体的最佳感染复数(multiplicity of infection, MOI)** 按照不同的 MOI 值(0.001、0.01、0.1、1、10、100、1000)将噬菌体与宿主菌混合,对不同 MOI 值的噬菌体效价进行测定<sup>[6]</sup>,效价最高的 MOI 值则为噬菌体的最佳感染复数。

**1.2.6 噬菌体的一步生长曲线** 将噬菌体原液与宿主菌以最佳感染复数混合,在 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅中温浴 10 min,使噬菌体尽可能多地吸附到宿主菌上。将混合液 4  $^{\circ}\text{C}$ 、8000 r/min 离心 2 min,弃上清液使用等体积 LB 培养基(3% NaCl)重悬,重悬 2 次,取 1 mL 重悬液加入到 9 mL LB 培养基(3% NaCl)。从 0 min 开始,每隔 10 min 取 500  $\mu\text{L}$  于 4  $^{\circ}\text{C}$ 、8500 r/min 离心 2 min,测定噬菌体效价<sup>[6]</sup>。

**1.2.7 噬菌体的热稳定性** 提前准备不同温度(30、40、50、60、70  $^{\circ}\text{C}$ )的水浴锅,将噬菌体原液稀释到  $10^7$  PFU/mL,取 1 mL 噬菌体原液于 1.5 mL 离心管中,将离心管放入不同温度的水浴锅中温浴。从 0 min 开始,每隔 30 min 测定离心管中噬菌体效价<sup>[6]</sup>。

**1.2.8 噬菌体的 pH 稳定性** 提前准备不同 pH 的 PBS 缓冲液,将 100  $\mu\text{L}$  噬菌体效价为  $10^7$  PFU/mL 的噬菌体原液加入到 900  $\mu\text{L}$  预先准备好的不同 pH 的 PBS 缓冲液中,使得混合后体系的最终 pH 分别为(2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13),于 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅中温浴 2 h。使用双层平板法测定噬菌体效价<sup>[6]</sup>。

**1.2.9 噬菌体全基因组提取和功能基因分析** 噬菌体全基因组提取采用苯酚-氯仿法,具体步骤参考文献 [9]。委托上海泽塔公司对提取的噬菌体 474x1 基因组进行全基因组测序,并对噬菌体基因组进行拼接,得到完整的基因组序列。使用 DNA Statistics ([http://www.geneinfinity.org/sms/sms\\_dnastats.html](http://www.geneinfinity.org/sms/sms_dnastats.html)) 对噬菌体基因组序列进行分析,包括四种碱基的组成比例、GC 平均含量。使用 JSpeciesWS(<https://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/>)对从 NCBI 数据库上下载的 10 株弧菌噬菌体全基因组完整序列进行平均核苷酸同一性(ANI)统计,得到矩阵。使用微生物在线工具 ([http://www.bioinformatics.com.cn/plot\\_basic\\_matrix\\_heatmap\\_064](http://www.bioinformatics.com.cn/plot_basic_matrix_heatmap_064))绘制热图。使用 RAST 在线注释工具(<https://rast.nmpdr.org/>)对全基因序列进行基因预测。使用 tRNAscan-SE(<https://www.swmath.org/software/8005>)在线工具预测全基因组中是否有 tRNA 基因。使用 NCBI 数据库的 BLASTn 对预测的各个基因进行逐个检索分析,推测其基因功能。用 BRIG(0.95)软件绘制基因组圈图。使用 VFDB 数据库 (<https://www.mgc.ac.cn/VFS/>) 预测噬菌体 474x1 基因组中可能存在的毒力基因,使用 CARD 数据库(<https://card.mcmaster.ca/>)预测基因组中可能存在的抗生素抗性基因。使用 MEGA 7.0 软件建立基于末端酶大亚基的进化树,分析噬菌体 474x1 的亲缘性。

**1.2.10 噬菌体对基围虾中副溶血性弧菌的抑制作用** 参考葛强等<sup>[10]</sup> 的实验步骤稍作改进,将购买的新鲜虾去壳,用无菌刀将虾肉切为 1 cm $\times$ 1 cm 的样品,重约 1 g,将肉样煮沸 30 min 后置于无菌平皿中。在样品中接种 100  $\mu\text{L}$   $1.0\times 10^5$  lgCFU/mL 副溶血性弧菌 474,于超净台中风干 10 min 使其吸附后用封口膜封住,作为对照组。实验组应在副溶血性弧菌 474 吸附后另外分别接种 100  $\mu\text{L}$   $1.0\times 10^8$  lgCFU/mL (MOI=1000)和 100  $\mu\text{L}$   $1.0\times 10^9$  lgCFU/mL (MOI=10000)的噬菌体悬液,常温条件下静置 10 min 使其吸附后用封口膜封住。将样品置于 4  $^{\circ}\text{C}$ ,在第 0、3、6、9、12 h 分别取样,将样品放入 10 mL 离心管中,加入 5 mL 生理盐水,3000 r/min 离心 10 min,使虾肉沉淀,取上清液进行适当梯度稀释,取 1 mL 稀释液采用平板计数法检测虾肉中副溶血性弧菌的菌量,从而检测噬菌体的抑菌效果。

## 1.3 数据处理

采用 Excel 2019 计算数据平均数和标准差、Origin 2022 进行折线图绘制和 IBM SPSS Statistics 23 的独立样本 *T* 检验进行显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 副溶血弧菌噬菌体形态学特征

以副溶血弧菌 474 菌株为宿主菌从海鲜市场基围虾样品中成功分离出 1 株裂解性较强副溶血弧菌噬菌体,命名为 474x1。培养后 474x1 可在 474 菌

株的菌苔上形成清晰、透明的噬菌斑,直径 1.5~2 mm (图 1)。电镜下观察噬菌体的头部呈六边形,直径约 70.8 nm,尾长约 18.3 nm。具有典型的有尾噬菌体目短尾病毒科病毒形态特征(图 2)。

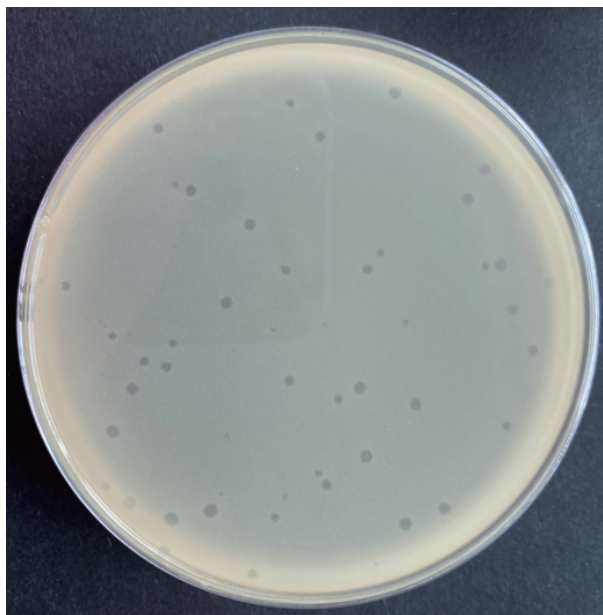


图 1 副溶血弧菌噬菌体 474x1 噬菌斑形态

Fig.1 Plaque morphology of *V. parahaemolyticus* phage 474x1

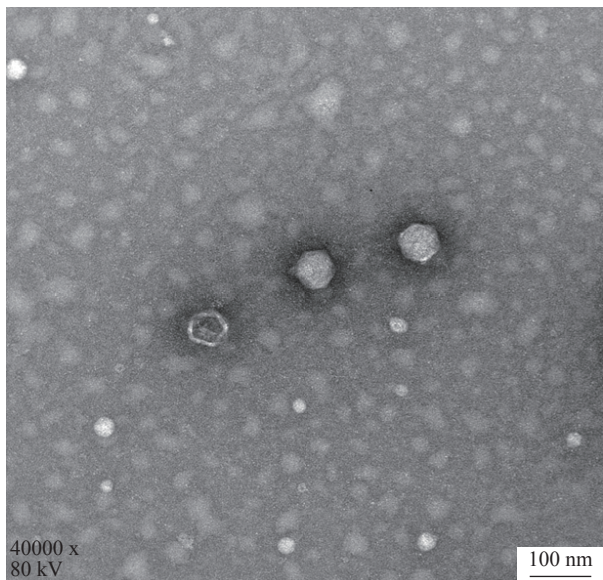


图 2 副溶血弧菌噬菌体 474x1 透射电镜形态

Fig.2 Transmission electron microscope morphology of *V. parahaemolyticus* phage 474x1

## 2.2 副溶血弧菌噬菌体 474x1 宿主谱

副溶血弧菌噬菌体 474x1 宿主谱如表 1。噬菌体 474x1 能够裂解 23 株副溶血弧菌中的 19 株 (19/23=82.61%), 表明噬菌体 474x1 对耐药副溶血弧菌具有良好的裂解能力。

## 2.3 副溶血弧菌噬菌体 474x1 最佳感染复数

表 2 为副溶血弧菌噬菌体 474x1 效价测定结果。当 MOI 为 0.01 时,噬菌体效价达到最大为 9.66 lgPFU/mL, 说明噬菌体 474x1 在感染副溶血弧

表 1 副溶血弧菌噬菌体 474x1 宿主谱

Table 1 Host range of *V. parahaemolyticus* phage 474x1

序号	菌株种类	菌株编号	耐药性	裂解能力
1	副溶血弧菌	ATCC17802	CHL,AMP,AMC	-
2	副溶血弧菌	ATCC33846	CHL,AMP,AMC,CXM	+
3	副溶血弧菌	F6	CHL,AMP,AMC	+
4	副溶血弧菌	F7	CHL,AMP,AMC	+
5	副溶血弧菌	F22	CHL,AMP,AMC	+
6	副溶血弧菌	F23	CHL,AMP,AMC	+
7	副溶血弧菌	Vp27	CHL,AMP,AMC	+
8	副溶血弧菌	Vp33	CHL,AMP,AMC	-
9	副溶血弧菌	Vp41	CHL,AMP,AMC,NAL	+
10	副溶血弧菌	Vp44	CHL,AMP,AMC,CXM	-
11	副溶血弧菌	460	CHL,AMP,AMC,CXM	+
12	副溶血弧菌	461	CHL,AMP,AMC,CXM	+
13	副溶血弧菌	469	CHL,AMP,AMC,KAN	+
14	副溶血弧菌	470	CHL,AMP,AMC	+
15	副溶血弧菌	474	CHL,AMP,AMC	+
16	副溶血弧菌	475	CHL,AMP,AMC	+
17	副溶血弧菌	485	CHL,AMP,AMC	+
18	副溶血弧菌	486	CHL,AMP,AMC	+
19	副溶血弧菌	O56	CHL,AMP,AMC	+
20	副溶血弧菌	O514	CHL,AMP,AMC	-
21	副溶血弧菌	H128	CHL,AMP,AMC,CIP,NAL	+
22	副溶血弧菌	H256	CHL,AMP,AMC,CIP,NAL	+
23	副溶血弧菌	H512	CHL,AMP,AMC,CIP,NAL	+

注: +代表副溶血弧菌噬菌体474x1能够裂解该细菌, -代表副溶血弧菌噬菌体474x1不能够裂解该细菌; CHL(氯霉素); AMP(氨苄西林); AMC(阿莫西林); CXM(头孢辛夫); CZO(头孢唑林); KAN(卡那霉素); NAL(萘啶酸); CIP(环丙沙星)。

表 2 副溶血弧菌噬菌体 474x1 的最佳感染复数

Table 2 Multiplicity of infection of *V. parahaemolyticus* phage 474x1

MOI	初始噬菌体效价 (lgPFU/mL)	初始宿主菌浓度 (lgCFU/mL)	噬菌体最终效价 (lgPFU/mL)
0.001	5	8	8
0.01	5	7	9.66
0.1	5	6	9.61
1	5	5	9.07
10	5	4	8.20
100	5	3	8.07
1000	5	2	7.04

菌 474 时,噬菌体与宿主菌的数量的比值为 0.01 时,可增殖最多的噬菌体。

## 2.4 副溶血弧菌噬菌体 474x1 一步生长曲线

以培养时间为横坐标,以反应体系中噬菌体效价的对数为纵坐标绘制噬菌体的一步生长曲线。如图 3 所示,噬菌体 474x1 的潜伏期为 10 min,裂解期为 10~90 min,裂解末期噬菌体效价达到 8.81 lgPFU/mL,裂解量为 115 PFU/cell。

## 2.5 副溶血弧菌噬菌体 474x1 热稳定性和 pH 稳定性

噬菌体对温度的敏感性如图 4 所示,474x1 在 30~50 °C 的范围内活性稳定,70 °C 时其活性迅速下降,30 min 被完全灭活;60 °C 孵育 1 h 后效价可减少 1 个数量级。474x1 的效价在 pH4~11 之间均较

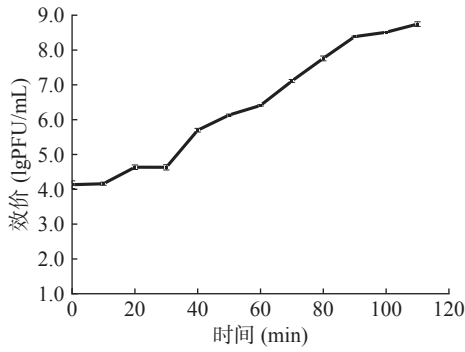


图 3 副溶血弧菌噬菌体 474x1 一步生长曲线

Fig.3 One-step growth curve of *V. parahaemolyticus* phage 474x1

稳定,但 pH>11 和 pH<4 条件下孵育 2 h 后活性丧失(图 5)。

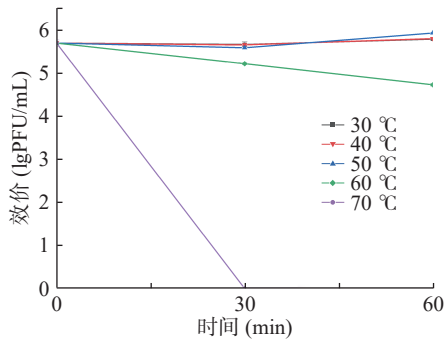


图 4 副溶血弧菌噬菌体 474x1 热稳定性

Fig.4 Thermal stability of *V. parahaemolyticus* phage 474x1

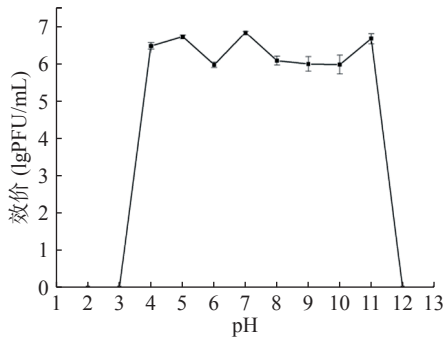


图 5 副溶血弧菌噬菌体 474x1 pH 稳定性

Fig.5 pH stability of *V. parahaemolyticus* phage 474x1

### 2.6 副溶血弧菌噬菌体 474x1 全基因组 DNA 的提取

使用苯酚-氯仿法提取了噬菌体 474x1 全基因组 DNA,用超微量分光光度计测定提取的噬菌体 474x1 DNA 终浓度为 220 ng/mL 且 OD<sub>260/280</sub> 为 1.88,说明提取出的 DNA 浓度适宜且含有的杂质较少,满足测序要求。

噬菌体 474x1 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳结果如图 6 所示,可以发现 DNA 电泳条带单一无其它条带,且 DNA 分子量较大,说明完整地提取出了噬菌体 474x1 的基因组 DNA。

### 2.7 副溶血弧菌噬菌体 474x1 全基因组分析

噬菌体 474x1 的基因组长度为 47830 bp,碱基

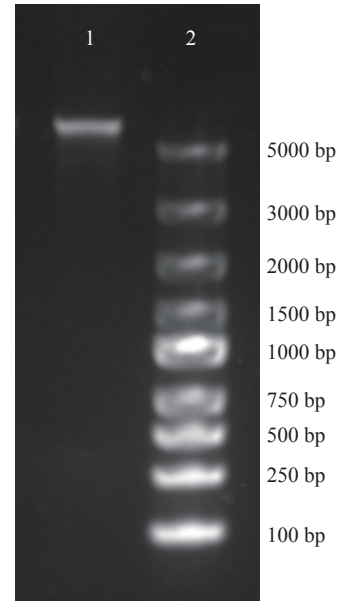


图 6 噬菌体 474x1 的全基因组提取

Fig.6 Extraction of whole genome DNA of *V. parahaemolyticus* phage 474x1

注: 1: 噬菌体 474x1 的全基因组; 2: DNA marker。

分布情况为 A(30.42%)、T(29.16%)、C(20.45%)、G(19.96%),GC 平均含量为 40.41%。噬菌体 474x1 全基因组序列 BLASTn 比较结果显示,噬菌体 474x1 与副溶血弧菌噬菌体 Vp41s3(索引号: MZ073369.1)有较高的同源性,同源性 99.06%,覆盖率为 77%。但与其他弧菌噬菌体同源性均小于 80%,如与霍乱弧菌噬菌体 ICP2(索引号: HQ641345.1)同源性为 78.55%,与创伤弧菌噬菌体 Saratov-15(索引号: MT767883.1)同源性为 78.45%。ANI 热图显示 474x1 与副溶血弧菌噬菌体 Vp41s3 同源性最高(同一性×覆盖率=73%),但与其他噬菌体基因组同源性均小于 50%(图 7)。

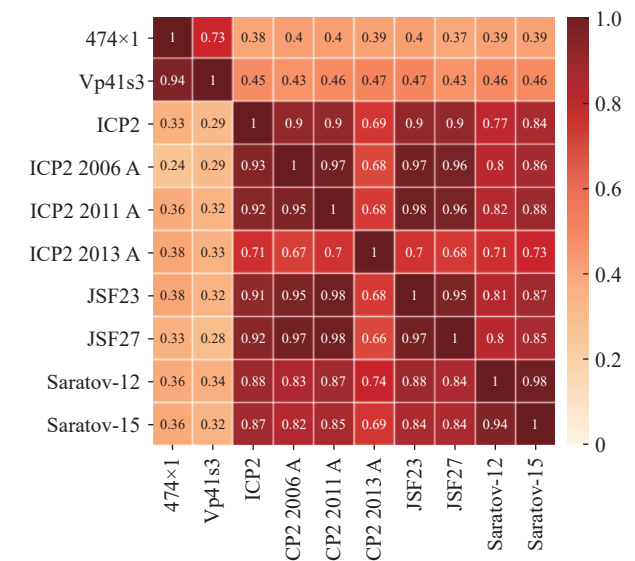


图 7 平均核苷酸同源性热图

Fig.7 Average nucleotide identity heatmap

注: 相同百分比的值范围从 0(0%, 橙色)到 1(100%, 红色)。



### 2.8 副溶血弧菌噬菌体 474x1 基因组功能基因注释

使用 RAST 在线注释工具进行功能基因注释。结果显示,噬菌体 474x1 基因组共有 69 个开放阅读框(open reading frame, ORFs),其中有 24 个 ORFs 位于正链上,45 个 ORFs 位于负链上。基因组长度为 47830 bp,最长的 ORFs 为 4245 bp,最短的仅 126 bp,平均长度 643 bp。ORFs 总长为 44376 bp,占全长的 92.78%。经 BLAST 比对,推测出的 69 个 ORFs 中有 14 个 ORFs 已确定功能。通过这些特征基因功能将其分为 4 个模块,包括 DNA 复制与调控模块(ORF29、ORF35、ORF36、ORF39、ORF45、ORF47、ORF49、ORF51、ORF54、ORF55)、DNA 包装模块(ORF4、ORF5)、结构模块(ORF1)、附加功能模块(ORF32)。除了这 14 个具有特定功能的基因外,其他的 ORFs 都为假定蛋白,约占 79.71%,其基因组图谱如图 8 所示。采用 tRNAscan-SE 筛查全基因组中无 tRNA 基因,表明 474x1 依赖宿主翻译。通过 VFDB 数据库和 CARD 数据库预测噬菌体 474x1 基因组不含毒力基因与抗生素抗性基因。因此,该结果表明噬菌体 474x1 应用于食源性致病菌防控的安全性。

### 2.9 副溶血弧菌噬菌体 474x1 进化树分析

基于噬菌体 474x1 ORF4 末端酶大亚基构建的系统发育进化树如图 9 所示,副溶血弧菌噬菌体 474x1 与副溶血弧菌噬菌体 Vp41s3(短尾噬菌体)在同一个进化分支上,另外与霍乱弧菌噬菌体 ICP2,创伤弧菌噬菌体 Saratov-12、Saratov-15 形成一簇,有着很近的亲缘关系。

### 2.10 噬菌体对基围虾中副溶血性弧菌的抑制作用

虾肉在 4 ℃ 放置 12 h,副溶血弧菌浓度变化如图 10A 所示。在放置期间,接种 5 lgCFU/mL 细菌的对照组菌量没有明显增长,从第 0 h 的 3.73 lgCFU/mL 下降到第 12 h 的 3.55 lgCFU/mL。实验组的菌量相比于对照组在 12 h 内均有明显下降,具有统计

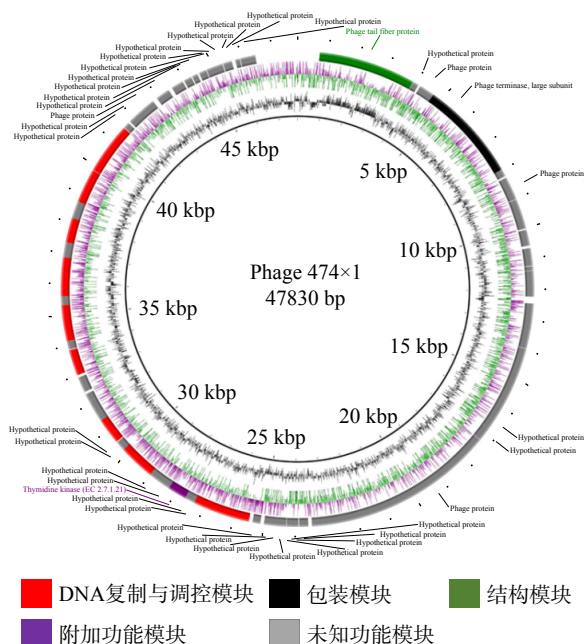


图 8 噬菌体 474x1 的基因组图谱

Fig.8 Genomic map of phage 474x1

注:从内到外每个圆圈代表:基因组长度,GC 含量,GC 偏移(大于零为绿色,小于零为紫色),基因注释。

学差异( $P < 0.05$ ), MOI=1000 实验组在第 3 h 相较于对照组菌量下降了 0.39 lgCFU/mL, MOI=10000 实验组在第 12 h 相较于对照组菌量下降了 0.92 lgCFU/mL,具有极显著性差异( $P < 0.01$ )。

虾肉在 25 ℃ 放置 12 h,副溶血弧菌浓度变化如图 10B 所示。在放置期间,接种 5 lgCFU/mL 细菌的对照组菌量呈稳步增长的趋势,在第 12 h 增长到 5.66 lgCFU/mL。实验组的菌量相比于对照组在 12 h 内均有明显下降,MOI=1000 实验组在第 6 h 相较于对照组菌量下降了 1.04 lgCFU/mL, MOI=10000 在第 6 h 相较于对照组菌量下降了 1.82 lgCFU/mL,具有极显著性差异( $P < 0.01$ )。

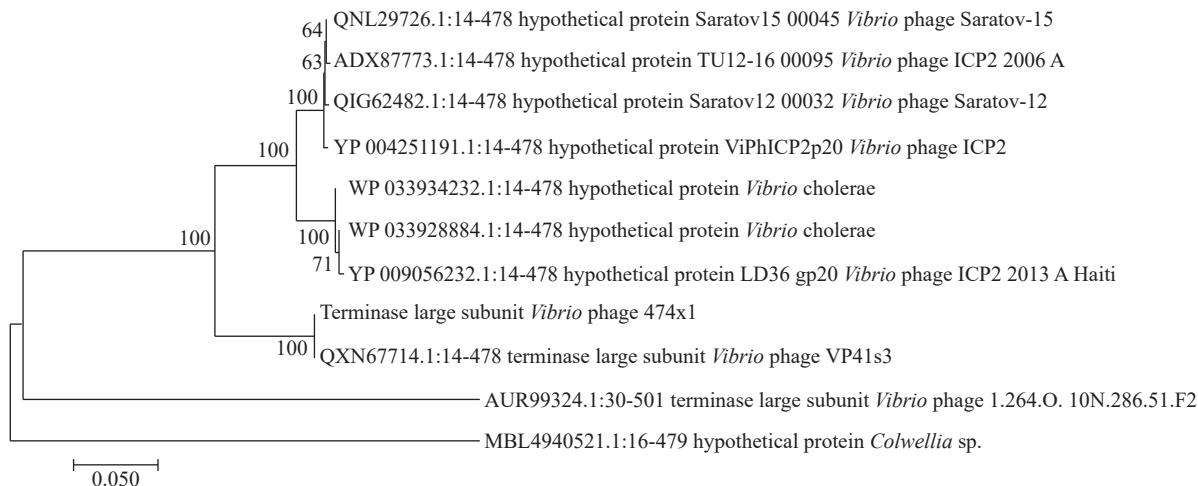


图 9 基于末端酶大亚基构建的系统进化树

Fig.9 Phylogenetic tree constructed based on terminal enzyme large subunit



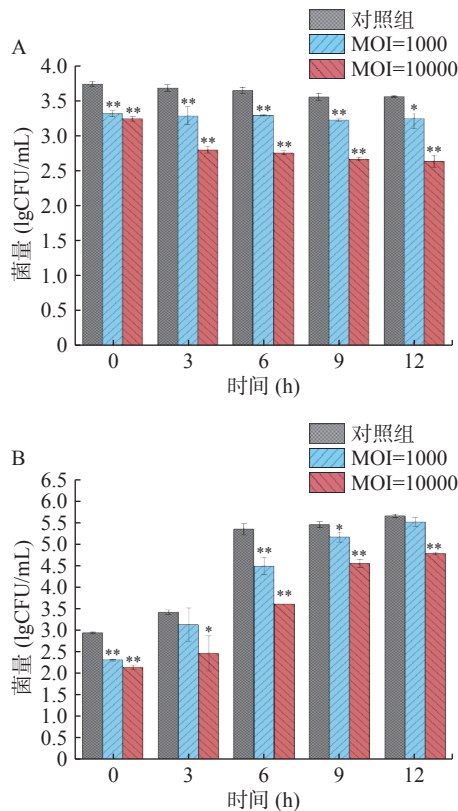


图 10 副溶血弧菌噬菌体 474x1 对虾肉中副溶血弧菌抑菌效果实验

Fig.10 Bacteriostatic effect of phage 474x1 on *V. parahaemolyticus* in prawn meat

注: A、B 分别为 4 °C 和 25 °C 下噬菌体对副溶血弧菌抑菌能力; \* $P < 0.05$  差异显著; \*\* $P < 0.01$  差异极显著。

### 3 讨论与结论

目前,国内已有学者相继分离出副溶血弧菌烈性噬菌体,丁云娟等<sup>[11]</sup>从水产品市场的污水中分离出来一株烈性噬菌体 qdvp001,彭勇等<sup>[12]</sup>从青岛岸边海水中分离出两株副溶血弧菌噬菌体 Vpp2、Vpp3。本实验室周敏等<sup>[13]</sup>从海鲜内脏、污水中分离出一株烈性噬菌体 F23s1。本实验也从基围虾样品中分离出宽谱噬菌体 474x1,对研发生物抑菌剂有重要价值。

本研究中,宿主谱的结果表明 474x1 能够裂解 23 株耐药副溶血弧菌中的 19 株,表现出较宽的裂解谱范围,宿主谱的差异可能是由于细菌细胞表面存在的受体的差异影响了噬菌体的吸附<sup>[14]</sup>。此外,噬菌体吸附具有高度特异性,这也意味着噬菌体对其他细菌是无害的,特别是那些有益的菌群。这也表明,474x1 可以在未来用于防治特定的细菌性疾病,如弧菌病。

MOI 指的是噬菌体与宿主菌的比率。不同的噬菌体感染和杀灭细菌的方式不同,因此具有不同的最佳 MOI。例如两株副溶血性弧菌裂解噬菌体 VB\_VPS\_BA3 和 VB\_VPS\_CA8,最佳 MOI 为 0.1<sup>[15]</sup>。Ibrahim 等<sup>[16]</sup>对一株能够裂解溶藻弧菌、哈维氏弧菌和副溶血弧菌的烈性噬菌体 PhVh6 测定的最佳 MOI 为 1。在本研究中,噬菌体增殖的最佳 MOI 为 0.01,

表明以较低数量噬菌体感染宿主菌时,最终能获得高效价的噬菌体,在生产中可用较低的成本得到大量噬菌体。

研究噬菌体的一步生长曲线可以发现噬菌体的生长规律<sup>[17]</sup>。挑选出潜伏期短裂解量大的噬菌体,对提高工业生产有巨大意义。474x1 的潜伏期与噬菌体 VppYZU92<sup>[5]</sup>相似,后者的潜伏期较短为 10 min,裂解量为 35 PFU/cell。另一株噬菌体 VppYZU64 的潜伏期较长为 35 min,但裂解量为 150 PFU/cell<sup>[5]</sup>。在本研究中,474x1 的潜伏期较短且裂解量偏大,为 10 min 和 115 PFU/cell,十分适合规模化制备。

在各种胁迫条件下对噬菌体效价稳定性的测定结果有助于为噬菌体在细菌控制中的应用提供参考<sup>[18-19]</sup>。在本研究中,测定了噬菌体对温度和 pH 的抵抗力,以确定这些噬菌体对副溶血性弧菌感染的生防效果。温度是影响噬菌体存活的一个重要因素<sup>[20]</sup>。它在噬菌体的附着、穿透和增殖过程中起着重要作用<sup>[21]</sup>。在本研究中,474x1 在 50 °C 下稳定,在 60 °C 孵育 1 h 后效价下降,在 70 °C 以上 30 min 后完全失活,当应用于食品粗加工环境中时,它仍然可以存活。此外,环境的酸碱度会影响噬菌体的稳定性<sup>[19]</sup>。据报道,低 pH 影响噬菌体聚集,降低其在细菌细胞上的吸附能力<sup>[22]</sup>。474x1 在较宽的 pH 范围保持高效价,与 vap04 相似<sup>[23]</sup>。

本实验选择了 2 种贮藏温度,其中,4 °C 代表冷藏温度,25 °C 代表室温。4 °C 下副溶血弧菌菌量均低于 25 °C 下同一时间点菌量,这可能是因为低温会抑制副溶血弧菌的生长。随着贮藏时间的延长,25 °C 下 MOI=1000 和 MOI=10000 实验组中的菌量均明显下降,在第 12 h 时实验组中副溶血性弧菌数量分别比对照组降低 0.18、0.87 lgCFU/mL,说明噬菌体 474x1 能够显著( $P < 0.01$ )抑制宿主菌的生长,但不能完全杀灭副溶血弧菌。高璐<sup>[23]</sup>在噬菌体对鱼汁的抑菌实验中,三株噬菌体 Vmp03、Vpp07、Vap04 在鱼汁分别对其宿主菌均有一定的抑制能力。在 25 °C 条件下,经过 Vmp03 处理后的实验组相较对照组的菌量在第 8 h 下降约 2 lgCFU/mL;经过 Vpp07、Vap04 处理后的实验组相较对照组的菌量在第 6 h 下降约 1 lgCFU/mL。本实验在 25 °C 下 MOI=1000, MOI=10000 的实验组相较对照组在第 6 h 时菌量分别下降 1.04、1.82 lgCFU/mL,抑菌效果和高璐的研究相似。

综上所述,474x1 是一株新的副溶血性弧菌噬菌体。该噬菌体裂解谱宽、裂解量大、潜伏期短。它在高温下失活,但在 60 °C 以下表现出较好的稳定性,能耐受宽范围的 pH,在食品中也有良好的抑菌效果,由于缺乏抗生素抗性基因和毒力基因,474x1 在不久的将来将会用来防控水产品副溶血性弧菌。

### 参考文献

[1] HAN N, MIZAN M F R, JAHID I K, et al. Biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus* on food and food contact surfaces in-

- creases with rise in temperature[J]. *Food Control*, 2016, 70: 161–166.
- [2] 刘秀梅, 陈艳, 王晓英, 等. 1992~2001年食源性疾病暴发资料分析-国家食源性疾病监测网[J]. *卫生研究*, 2004, 33: 725–727. [LIU Xiumei, CHEN Yan, WANG Xiaoying, et al. Analysis of foodborne disease outbreak data in 1992~2001 National Foodborne Disease Surveillance Network[J]. *Health Research*, 2004, 33: 725–727.]
- [3] LEE L H, AB MUTALIB N S, LAW J W, et al. Discovery on antibiotic resistance patterns of *Vibrio parahaemolyticus* in selangor reveals carbapenemase producing *Vibrio parahaemolyticus* in marine and freshwaterfish[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2513.
- [4] 袁琳, 张昭寰, 崔泽林, 等. 副溶血性弧菌噬菌体的分离及其在即食虾中的应用[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(21): 175–178. [YUAN Lin, ZHANG Zhaohuan, CUI Zelin, et al. Isolation of bacteriophages of *Vibrio parahaemolyticus* and its application in ready-to-eat shrimp[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(21): 175–178.]
- [5] 郑小双, 高璐, 张辉, 等. 副溶血性弧菌广谱裂解性噬菌体的筛选及其在海产品安全控制中的应用[J]. *食品科学*, 2019, 40(10): 141–148. [ZHENG Xiaoshuang, GAO Lu, ZHANG Hui, et al. Screening of broad-spectrum lytic bacteriophages of *Vibrio parahaemolyticus* and its application in seafood safety control[J]. *Food Science*, 2019, 40(10): 141–148.]
- [6] 罗梓丹, 耿尚, 韩光丽, 等. 一株新型牛源肺炎克雷伯菌噬菌体的分离鉴定[J]. *微生物学通报*, 2021, 9: 3184–3193. [LUO Zidan, GENG Shang, HAN Guangli, et al. Isolation and identification of a novel strain of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage[J]. *Microbiology China*, 2021, 9: 3184–3193.]
- [7] RAMIREZ-OROZCO M, SERRANO-PINTO V, OCHOA-ÁLVAREZ N, et al. Genome sequence analysis of the *Vibrio parahaemolyticus* lytic bacteriophage VPMS1[J]. *Archives of Virology*, 2013, 158(11): 2409–2413.
- [8] MINH D H, MINH S H, HONJOH K I, et al. Isolation and biocontrol of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* contamination in raw chicken meat by using lytic bacteriophages[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2016, 71: 339–346.
- [9] 周政, 李敏. 介绍一种高效、简单的DNA沉淀法[J]. *生命的化学*, 1999(1): 32. [ZHOU Zheng, LI Min. Introduction of an efficient and simple DNA precipitation method[J]. *Chemistry of Life*, 1999(1): 32.]
- [10] 葛强. 广西猪源奇异变形杆菌的耐药分析及一株奇异变形杆菌噬菌体的分离鉴定与初步应用[D]. 南宁: 广西大学, 2021. [GE Qiang. Drug resistance analysis of *Proteus mirabilis* of Guangxi pig origin and isolation and identification and preliminary application of a strain of *Proteus mirabilis* bacteriophage[D]. Nanning: Guangxi University, 2021.]
- [11] 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 Yunjuan, PENG Yong, LIN Hong, et al. Isolation and identification and physiological characteristics of a bacteriophage of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Microbiology China*, 2011, 38(11): 1639–1646.]
- [12] 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 Yong, WANG Jingxue, DING Yunjuan, et al. Isolation, identification and lysis performance of two *V. parahaemolytic* bacteriophages[J]. *Fisheries Science*, 2012, 31(11): 645–650.]
- [13] 周敏, 杨后继, 夏海, 等. 一种副溶血弧菌裂解酶、其编码基因及其应用[P]. 湖北省: CN112813058B, 2022-03-08. [ZHOU Min, YANG Houji, XIA Hai, et al. Coding gene and application of a *Vibrio parahaemolyticus* lyase[P]. Hubei Province: CN112813058B, 2022-03-08.]
- [14] RAKHUBA D V, KOLOMIETS E I, SZWAJECER D E Y, et al. Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell[J]. *Microbiol*, 2010, 59(3): 145–155.
- [15] YANG M, LIANG Y, HUANG S, et al. Isolation and characterization of the novel phages vB\_VpS\_BA3 and vB\_VpS\_CA8 for lysing *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 259.
- [16] IBRAHIM W W, AZNAN A S, SAARI N A, et al. *In vitro* characterization of lytic bacteriophage PhVh6 as potential biocontrol agent against pathogenic *Vibrio harveyi*[J]. *Aquacult, Aquar, Conserv Legis*, 2017, 10: 64–76.
- [17] 付汉清. 对虾养殖源弧菌噬菌体的分离、鉴定及其全基因组学研究[D]. 厦门: 集美大学, 2018. [FU Hanqing. Isolation and identification of *Vibrio bacteriophages* from shrimp culture and their whole genome research[D]. Xiamen: Jimei University, 2018.]
- [18] LEE H S, CHOI S, SHIN H, et al. *Vibrio vulnificus* bacteriophage SSP002 as a possible biocontrol agent[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(2): 515.
- [19] KRASOWSKA A, BIEGALSKA A, AUGUSTYNIAK D, et al. Isolation and characterization of phages infecting *Bacillus subtilis*[J]. *Biomed Research International*, 2015, 179597.
- [20] OLSON M R, AXLER E P, HICKS R E. Effect of freezing and storage temperature on MS2 viability[J]. *Journal of Virological Methods*, 2004, 122: 147–152.
- [21] JONCZYK E, KIAK M, MIĘDZYBRODZKI R, et al. The influence of external factors on bacteriophages-review[J]. *Folia Microbiologica*, 2011, 56(3): 191–200.
- [22] LANGLET J, GABORIAUD F, GANTZER C. Effect of pH on plaque forming unit counts and aggregation of MS2 bacteriophage[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103: 1632–1638.
- [23] 高璐. 水产品中弧菌污染、胁迫响应及其噬菌体靶向抑菌研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2019. [GAO Lu. Study on *Vibrio* contamination, stress response and phage targeted bacteriostatic in aquatic products[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2019.]