

李陇平, 杨吉, 白蹉蹉, 等. 一株绒山羊源大肠杆菌噬菌体 ϕ PTK的分离鉴定及生物学特性分析[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(4): 847-853.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.04.019

一株绒山羊源大肠杆菌噬菌体 ϕ PTK的分离鉴定及生物学特性分析

李陇平, 杨吉, 白蹉蹉, 杨悦, 屈雷

(榆林学院陕西省陕北绒山羊工程技术研究中心, 陕西榆林 719000)

摘要: 以从患羔羊痢疾的羔羊粪便中分离的 1 株大肠杆菌为宿主菌, 从污水中分离纯化 1 株烈性大肠杆菌特异性噬菌体 ϕ PTK, 并对其生物学特性进行研究, 为研制一种替代抗生素的有效生物防治方法提供资源。双层琼脂平板培养后, 噬菌斑呈现清晰透明、边缘光滑的圆形, 直径 2~3 mm。噬菌体 ϕ PTK生物学特性试验结果表明: ϕ PTK对大肠杆菌的最佳感染复数为0.000 1; ϕ PTK吸附和感染宿主菌的潜伏期为 15 min, 裂解期约 195 min, 裂解量 93; 噬菌体浓缩液经 SDS-PAGE 分析可以观察到至少 6 条蛋白质条带, 相对分子质量为 $2.5 \times 10^4 \sim 1.8 \times 10^5$, 说明其蛋白质外壳至少含有 6 个结构蛋白; 在 30~90 °C 范围内 ϕ PTK的裂解活性均较强, 30~40 °C 时活性最高, 90 °C 处理 90 min 后仍然具有较强的活性; 对酸碱的耐受力较强, pH 值在 5 至 9 范围内均有较强的裂解活性, 当 pH 值超过 9 后活性较低; 对紫外线的耐受能力较强, 经紫外线照射 8 h 后仍然具有较强的裂解能力。这株烈性大肠杆菌特异性噬菌体 ϕ PTK最佳感染复数较小, 吸附和感染宿主菌的潜伏期短, 裂解能力强, 杀菌效果好, 有较强的环境适应能力, 具有研发成为有效防治羔羊大肠杆菌病的生物杀菌制剂的潜力。

关键词: 绒山羊; 羔羊痢疾; 大肠杆菌; 噬菌体; 生物学特性

中图分类号: S858.27 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2018)04-0847-07

Isolation, identification and biological properties of a lytic phage against goat (*Capra hircus*)-associated *Escherichia coli*

LI Long-ping, YANG Ji, BAI Cuo-cuo, YANG Yue, QU Lei

(Shaanxi Provincial Engineering and Technology Research Center of Cashmere Goats, Yulin University, Yulin 719000, China)

Abstract: In order to provide an alternative antibiotics for the prevention of lamb dysentery, a lamb-associated *Escherichia coli* virulent specific bacteriophage, named ϕ PTK, was isolated and purified from sewage, and its biological characteristics were determined. The plaque of the phage ϕ PTK showed circular, clear and transparent with smooth edge, showing 2-3 mm of diameter, using the double-layer agar plate method. The analysis results of its biological properties showed that the optimal multiplicity of infection (*MOI*) was 0.000 1. The determination of one-step growth kinetics showed a short latency period of about 15 min and a burst phase time of 195 min and a relatively larger burst size was 93. The structural proteome of phage ϕ PTK was analyzed by SDS-PAGE, at least six protein bands could be observed with a relative molecular mass of $2.5 \times 10^4 \sim 1.8 \times 10^5$, indicating that the phage ϕ PTK had at least six structural proteins. In the range of 30-90 °C,

ϕ PTK had a strong lytic activity, and the activity was highest at 30-40 °C. After treated 90 minutes at 90 °C, it still had a strong activity. Phage ϕ PTK was quite stable in a wide range of pH values (pH 5-9). Moreover, phage ϕ PTK was resistant to ultraviolet ray treatment, and the titer was still remained a high level after ultraviolet irradiation.

收稿日期: 2017-12-27

基金项目: 陕西省高校科协青年人才托举计划项目(20160236); 榆林学院高层次人才科研启动基金项目(16GK21)

作者简介: 李陇平(1985-), 男, 陕西陇县人, 博士, 讲师, 主要从事畜牧微生物研究。(E-mail)llp_315@163.com

tion for eight hours. In the present study, an *E. coli*-specific virulent phage was isolated, the phage ϕ PTK had a short latency period, strong lytic activity and ability of sterilization. It has the potential to be developed as a new approach to control the lamb-associated *E. coli* disease.

Key words: cashmere goat; diarrhoea; *Escherichia coli*; bacteriophage; biological properties

陕北白绒山羊是以陕北黑山羊为母本、辽宁绒山羊为父本历经 25 年培育而成,是农业部 2003 年审定的绒肉兼用型绒山羊新品种,以陕北绒山羊为主的羊产业已经成为陕北地区(榆林、延安)以及周边地区(山西部分县区)农业发展和农牧民增收的主导产业,在区域经济发展、农牧民增收和维持社会稳定方面具有不可替代的重要作用^[1]。然而,一到冬春季节或者气温多变时期,大肠杆菌病肆虐,导致羔羊腹泻、败血症,甚至死亡,给养羊户带来巨大的经济损失。目前,对于细菌病的治疗手段是使用抗生素,虽然有些抗生素(土霉素、磺胺类药物等)能治疗这种疾病,但是不能解决根本问题。由于对抗生素的过度依赖,耐药菌株不断出现,甚至出现一些超级耐药细菌,滥用抗生素还会导致抗生素在动物体内残留,从而威胁人类健康^[2]。因此,抗生素使用问题已成为影响畜禽健康养殖发展的一个制约因素,寻找替代抗生素的生物防治方法或者探索无抗生素养殖的新途径是未来畜牧业发展的一个趋势。噬菌体是一类细菌病毒,能够感染并裂解细菌,利用噬菌体治疗鸡伤寒和人杆菌性痢疾,都取得了比较理想的效果^[3]。特别是噬菌体本身没有毒性、特异性强以及不破坏正常微生物群落的安全性,是替代抗生素的首选生物杀菌制剂^[4]。一直以来,对于噬菌体的研究大多针对牛^[5-6]、绵羊^[7]和鸡^[8-9]等,对于山羊的相关研究还比较匮乏。Raya 等报道,利用大肠杆菌 O157:H7 特异性噬菌体 CEV1 和 CEV2 能够显著减少绵羊肠道(盲肠、直肠)病菌数量,并且没有出现任何副作用^[10]。Callaway 等报道联合 8 种不同噬菌体能够显著减少牛胃肠道及粪便中病菌 O157:H7 数量^[11]。另外,很多研究证实,噬菌体也能够显著降低反刍动物瘤胃中 O157:H7 数量^[10, 12-13]。很多研究试验和临床应用结果表明,噬菌体可以替代抗生素,作为治疗细菌性疾病的一种比较理想的潜在选择^[14-16]。尽管国外对于绵羊致病性大肠杆菌特异性噬菌体的研究较多,但是对于绒山羊源大肠杆菌的噬菌体研究还未见报道,而且至今也没有研制出合适的生物制剂。国内对于绒山羊羔羊大肠杆菌特异性噬菌体的研究很少。所以,本研究从患羔

羊痢疾的羔羊粪便中分离的 1 株大肠杆菌为宿主菌,从污水中分离纯化大肠杆菌特异性噬菌体,对其生物学特性进行研究,为进一步研究噬菌体及其编码蛋白(裂解酶、穿孔素)作为生物防治制剂提供基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株和污水 致病性大肠杆菌菌株分离自患痢疾的陕北白绒山羊羔羊粪便,本实验室保存。从榆林市榆阳区污水处理厂采集污水样品。

1.1.2 主要试剂 LB 液体培养基(100 ml):1.0 g 蛋白胨、0.5 g 酵母浸粉、1.0 g 氯化钠,121 °C 高压灭菌 20 min;LB 固体培养基;LB 液体培养基中加入 1.5% 的琼脂粉;LB 半固体培养基;LB 液体培养基中加入 0.5% 琼脂粉。其他试剂有 SM 缓冲液(NaCl 5.8 g, MgSO₄·7H₂O 2.0 g, 1 mol/L Tris-HCl (pH7.5) 50 ml, 2% 明胶 5 ml, ddH₂O 补足至 1 000 ml)、聚乙二醇(PEG)8000、丙烯酰胺(Acr)、亚甲双丙烯酰胺(Bis)、1.5 mol/L Tris-HCl (pH8.8)、1.0 mol/L Tris-HCl (pH6.8)、10% SDS、10% 过硫酸铵(AP)、5×SDS 电泳上样缓冲液、考马斯亮兰 R-250 染色液、脱色液、DL 15 000 DNA Marker (TaKaRa) 和 PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, 26616)。

1.2 试验方法

1.2.1 污水预处理 用多层纱布对采集的污水进行初过滤,4 °C、12 000 g 离心 15 min,用 0.22 μm 的一次性滤器过滤上清液得到噬菌体滤液。

1.2.2 噬菌体增殖 将大肠杆菌划线纯化后,挑取单菌落接种到 100 ml LB 液体培养基,37 °C、220 r/min 过夜培养后备用。取 2 ml 宿主菌(对数生长期)与 200 ml 噬菌体滤液混合后同时加入到 200 ml LB 液体培养基中,37 °C、220 r/min 培养过夜,4 °C、12 000 g 离心 15 min,用 0.22 μm 的一次性滤器过滤上清液得到噬菌体增殖液。

1.2.3 噬斑试验(Spot test) 新鲜培养的宿主菌均匀涂布到 LB 固体培养基平板。待菌液晾干后,将

噬菌体增殖液滴加到 LB 固体培养基平板上,平均每滴 1 μ l 左右,待增殖液完全被培养基吸收后,37 $^{\circ}$ C 倒置培养 6 h,培养期间每隔 1 h 观察形成的透明空斑情况。

1.2.4 噬菌体的纯化 挑取培养皿中形成的透明空斑,放入到预先加入 200 μ l 对数生长期宿主菌的 10 ml LB 液体培养基中,室温静置 20 min,37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 6 h,4 $^{\circ}$ C、12 000 g 离心 15 min,上清液用 0.22 μ m 一次性滤器过滤,双层琼脂培养法培养噬菌体。如此重复 3 次以上,直至双层琼脂平板上形成形状和大小均一的透明噬菌斑为止。

1.2.5 噬菌体效价测定 用双层琼脂平板培养法测定噬菌体效价^[5]。稀释后的噬菌体(100 μ l)与培养至对数生长期的宿主菌(200 μ l)充分混匀,静置 20 min 之后,与保温至 55 $^{\circ}$ C 左右的 LB 半固体琼脂糖培养基(3 ml)迅速混匀后平铺到底层琼脂上,作为上层,待凝固后倒置培养 6 h,计数噬菌斑。每个稀释度的噬菌体重复测定 3 次,选择噬菌斑数量在 30 至 300 之间的平板进行计数,取平均值作为噬菌体的效价。噬菌体效价(PFU/ml)的计算公式为:噬菌体效价=噬菌斑数量 \times 稀释倍数 \times 10。

1.2.6 噬菌体最佳感染复数测定 用灭菌水分别对噬菌体(1×10^{11} PFU/ml)和宿主菌(1×10^{13} CFU/ml)进行不同程度的稀释,然后按照噬菌体:细菌的比值为 0.000 01、0.000 10、0.001 00、0.010 00、0.100 00、1.000 00、10.000 00和100.000 00将噬菌体与宿主菌菌液混匀,室温静置 20 min,转接到 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 8 h,培养液 4 $^{\circ}$ C、12 000 g 离心 15 min,0.22 μ m 滤器过滤后,用双层平板法测定滤液的效价,获得最高滴度的噬菌体/细菌比值即为最佳感染复数。

1.2.7 一步生长曲线测定 采用 Casey 等^[17]的方法测定噬菌体的一步生长曲线。方法有所改动:将培养至对数生长期的宿主菌与噬菌体按照最佳感染复数(MOI)的比例混匀,静置 20 min,4 $^{\circ}$ C、10 000 g 离心 20 min,去除没有吸附的噬菌体颗粒,沉淀用新鲜 LB 液体培养基(预热到 37 $^{\circ}$ C)悬浮,于 37 $^{\circ}$ C 振荡培养,该时间记为 T_0 。前 15 min 每隔 5 min 取 1 次样品(100 μ l),之后每隔 15 min 取 1 次样品(100 μ l),分别用双层平板培养法计算噬菌体滴度,共测定 345 min,绘制噬菌体感染宿主菌的一步生长曲线。根据一步生长曲线计算噬菌体感染细菌过程中

的潜伏期(从噬菌体吸附细菌开始到子代噬菌体颗粒释放的这段时间)、爆发期(细菌被裂解,子代噬菌体颗粒大量形成并释放)和裂解量[裂解量=(开始爆发后噬菌体效价- T_0 时的效价)/(吸附之前噬菌体效价- T_0 时的效价)]。其中,爆发后时间为 225 min,吸附之前噬菌体效价为 9.68×10^9 PFU/ml。

1.2.8 噬菌体热稳定性测定 噬菌体纯培养物 100 μ l 分别在 30 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、70 $^{\circ}$ C、80 $^{\circ}$ C、90 $^{\circ}$ C 的 PCR 仪中处理 30 min、60 min 和 90 min,热处理结束后 4 $^{\circ}$ C 放置至少 30 min。用 SM 缓冲液对处理后的噬菌体进行适当稀释,双层琼脂平板培养法测定噬菌体效价。每组重复 3 次。

1.2.9 噬菌体的 pH 稳定性测定 噬菌体纯培养物(100 μ l)分别与 pH 值为 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 的灭菌 LB 液体培养基(900 μ l)混合,37 $^{\circ}$ C 水浴过夜培养。用 SM 缓冲液对样品进行适度稀释,双层琼脂平板培养法测定噬菌体的效价。每组重复 3 次。

1.2.10 噬菌体对紫外线的敏感性测定 噬菌体纯培养物(20 ml)均匀平铺于直径 90 mm 的无菌培养皿中,放到灭菌后的超净工作台(40W,DL-CJ-2ND)上,使培养皿距离紫外灯 20 cm,打开紫外灯后分别在 0 min、10 min、20 min、30 min、40 min、50 min、60 min、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、7 h、8 h 的时候取 100 μ l 噬菌体,室温静置至少 30 min。用 SM 缓冲液适当稀释后,双层平板法测定效价。每组重复 3 次。

1.2.11 噬菌体的扩增与浓缩 宿主菌培养至 OD_{600} 为 0.2,然后将噬菌体按照感染复数为 0.000 1 的比例加入培养的菌液中,继续培养,直至菌液彻底澄清,得到噬菌体增殖液。将噬菌体增殖液于 4 $^{\circ}$ C、12 000 g 离心 20 min,上清液用 0.22 μ m 的滤器过滤,缓慢搅动滤液(含有噬菌体)并加入 NaCl 至终浓度为 1 mol/L,再加入等体积的 20% PEG-8000,混匀后 4 $^{\circ}$ C 放置过夜。8 000 r/min 离心 30 min,弃上清液,收集噬菌体沉淀,用适量 SM 溶液(每 100 ml 液体用 500 μ l SM 溶液)重悬沉淀。

1.2.12 噬菌体蛋白的 SDS-PAGE 分析 根据文献[5]中的方法制备 SDS-PAGE 凝胶,包括 12%分离胶和 5%浓缩胶。100 μ l 噬菌体浓缩液中加入 $5 \times$ SDS 上样缓冲液 20 μ l,100 $^{\circ}$ C 水浴 5 min,12 000 r/min 离心 5 min,取上清 10 μ l 加入胶孔中,并以低分子量蛋白质 Marker 作对照。电泳时,浓缩胶电压 80 V 电泳 20 min,分离胶电压 120 V 电泳 1 h。考马斯亮兰染色

液染色,染色期间加热煮沸2~3次,每次2 min,将凝胶从染色液中取出,放入脱色液中,加热煮沸直至蛋白质条带清晰,其间换水数次,用扫描仪扫描脱色好的凝胶,保存图片,凝胶保存于双蒸水中。

2 结果

2.1 大肠杆菌特异性噬菌体的分离、纯化与命名

从污水中分离培养大肠杆菌特异性噬菌体,并对噬菌体进行增殖,通过噬斑试验检测噬菌体形成的透明空斑(图1)。噬菌体纯化之后形成的噬菌斑大小均一,整齐透明、边缘光滑,圆形,直径2~3 mm(图2)。分离的噬菌体命名为 ϕ PTK。双层琼脂平板法测定的噬菌体效价为 1.19×10^{12} PFU/ml,效价较高。

2.2 噬菌体 ϕ PTK的最佳感染复数

当感染复数从0.000 01到100.000 00以10倍递增时,噬菌斑数目依次减少,效价分别为 5.1×10^6 PFU/ml、 6.2×10^7 PFU/ml、 4.8×10^7 PFU/ml、 2.9×10^7 PFU/ml、 1.6×10^7 PFU/ml、 1.1×10^7 PFU/ml、 6.0×10^6 PFU/ml、 2.0×10^6 PFU/ml。在0.000 1时产生的感染效价最高,故该噬菌体的最佳感染复数为0.000 1(表1)。

表1 噬菌体 ϕ PTK的最佳感染复数测定

Table 1 Determination of optimal multiplicity of infection (MOI) of phage ϕ PTK

编号	噬菌体数(PFU/ml)	细菌数(CFU/ml)	感染复数	噬菌斑数	效价(PFU/ml)
1	1×10^8	1×10^{13}	0.000 01	51	5.1×10^6
2	1×10^9	1×10^{13}	0.000 10	62	6.2×10^7
3	1×10^{10}	1×10^{13}	0.001 00	48	4.8×10^7
4	1×10^{11}	1×10^{13}	0.010 00	29	2.9×10^7
5	1×10^{11}	1×10^{12}	0.100 00	16	1.6×10^7
6	1×10^{11}	1×10^{11}	1.000 00	11	1.1×10^7
7	1×10^{11}	1×10^{10}	10.000 00	6	6.0×10^6
8	1×10^{11}	1×10^9	100.000 00	2	2.0×10^6

2.3 噬菌体 ϕ PTK的一步生长曲线

在最佳感染复数0.000 1条件下所绘制的噬菌体 ϕ PTK一步生长曲线(图3)显示, ϕ PTK的潜伏期15 min,裂解期200 min,裂解量93。说明该噬菌体的潜伏期短,能够在较短时间内使大量宿主细胞死亡。

2.4 噬菌体 ϕ PTK的热稳定性

噬菌体 ϕ PTK纯培养物(2.856×10^{10} PFU/ml)

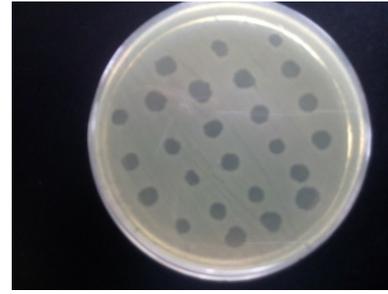


图1 噬菌体形成的透明空斑

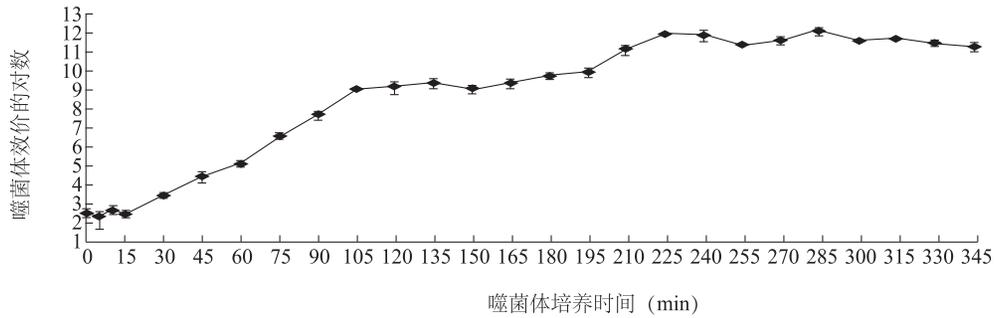
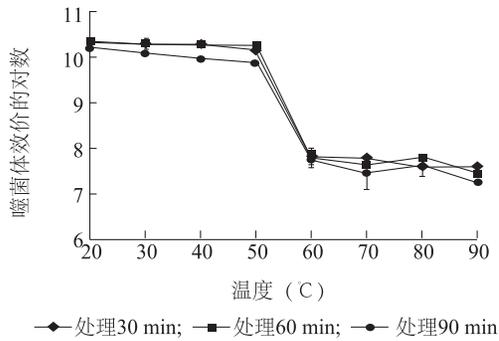
Fig.1 Transparent plaque formed by phage



图2 噬菌体 ϕ PTK纯化后形成的噬菌斑

Fig.2 Plaques formed by purified phage ϕ PTK

在30℃、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、90℃下分别处理30 min、60 min、90 min后,用双层平板法测定噬菌体的效价。结果(图4)表明,噬菌体 ϕ PTK对温度的耐受能力很强,30~40℃噬菌体 ϕ PTK的裂解能力最强,活性也最高;在40℃和50℃处理90 min后,效价仅降低了1个数量级;60℃、70℃、80℃、90℃处理90 min后,仍然具有较强的感染能力,效价达到 1.0×10^7 PFU/ml。

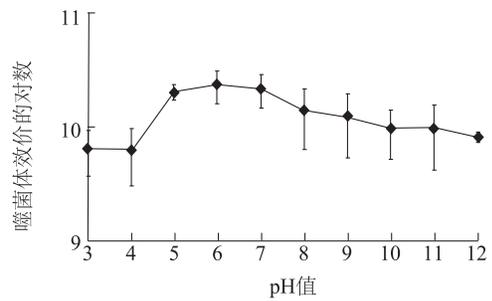
图3 噬菌体 ϕ PTK的一步生长曲线Fig.3 One step growth curve of phage ϕ PTK图4 噬菌体 ϕ PTK的热稳定性Fig.4 Thermal stability of phage ϕ PTK

2.5 噬菌体 ϕ PTK的酸碱敏感性

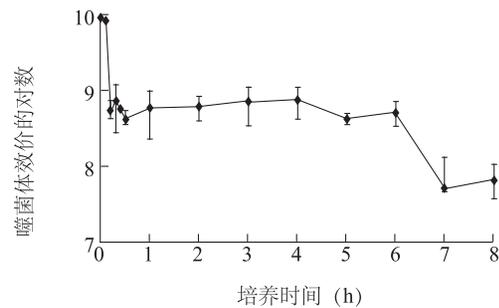
噬菌体 ϕ PTK纯培养物(2.856×10^{10} PFU/ml) 100 μ l 和不同 pH 值的 LB 培养液 900 μ l 混匀后, 37 $^{\circ}$ C 水浴 16 h, 测定噬菌体的效价变化(图 5)。在 pH 3 至 12 的范围内, 噬菌体 ϕ PTK 均具有较强的杀菌能力, 特别是在 pH 5 至 9 范围内, 其效价仍然在 1×10^{10} 数量级, 效价分别为 2.05×10^{10} PFU/ml、 2.34×10^{10} PFU/ml、 2.17×10^{10} PFU/ml、 1.39×10^{10} PFU/ml、 1.24×10^{10} PFU/ml; 在 pH 3 至 4 和 pH 10 至 12 范围内, 噬菌体效价降低了一个数量级, 仍然达到 1×10^9 PFU/ml。

2.6 噬菌体 ϕ PTK对紫外线的敏感性

取噬菌体 ϕ PTK纯培养物(9.68×10^{10} PFU/ml) 20 ml 进行紫外线处理, 前 1 h 每隔 10 min、以后每隔 1 h 取 100 μ l 测定效价。结果(图 6)显示, 噬菌体 ϕ PTK的活性在紫外线处理的前 20 min 内下降了 1 个数量级(从开始的 8.96×10^9 PFU/ml 下降至 6.00×10^8 PFU/ml); 20 min 至 6 h 的范围内, 噬菌体的效价仍然维持在 10^8 数量级; 第 8 h 时, 噬菌体滴

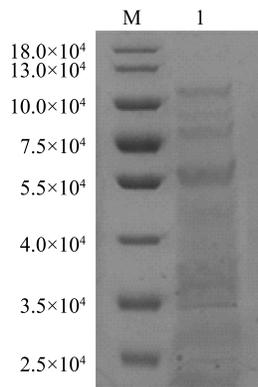
图5 噬菌体 ϕ PTK的 pH 稳定性Fig.5 pH stability of phage ϕ PTK

度为 7.04×10^7 PFU/ml。说明随着紫外线处理的时间延长, 噬菌体效价有所下将, 活力逐渐降低, 但是降低的程度并不大, 紫外线照射后 8 h 噬菌体仍然具有较强的裂菌能力。

图6 噬菌体 ϕ PTK对紫外线的敏感性Fig.6 Ultraviolet rays sensitivity of phage ϕ PTK

2.7 噬菌体 ϕ PTK蛋白质的 SDS-PAGE 分析

采用 SDS-PAGE 方法分析噬菌体 ϕ PTK 所含的蛋白质, 从电泳图片中至少可以观察到 6 条蛋白质条带(图 7), 相对分子质量在 2.5×10^4 至 1.8×10^5 之间。说明 ϕ PTK 的蛋白质外壳至少含有 6 个主要结构蛋白。



M: 蛋白质 Marker; 1: ϕ PTK。

图7 噬菌体 ϕ PTK结构蛋白质的SDS-PAGE分析

Fig.7 SDS-PAGE analysis of phage ϕ PTK structural proteins

3 讨论

羔羊大肠杆菌病是致病性大肠杆菌所引起的一种幼羔急性、致死性传染病,可导致腹泻和败血症。舍饲养羊条件下冬春季节2~8日龄至6周龄新生羔羊多发生此病,发病后如不及时治疗4~36h内即可死亡。虽然使用抗生素(土霉素、磺胺类和呋喃类药物)和加强母羊饲养管理能在一定程度上减少疾病的爆发,在一定程度上减少羔羊大肠杆菌病危害引起的损失,但是仍然无法有效控制该疾病的发生,而且抗生素的大量使用造成耐药细菌散播和药物残留,直接危害人类健康^[18]。

噬菌体是一类细菌病毒,在自然界中分布广泛,环境中只要有细菌生存就有相应的噬菌体存在,噬菌体能够特异性、专一地裂解宿主菌,并且能够随着病原菌的清除而离开动物机体,不会在动物体内造成残留^[19]。抗生素在畜禽养殖中的大量使用造成药物残留和对环境的破坏,随着人们环境保护意识的增强,关于噬菌体的研究报道越来越多。例如,噬菌体能够有效裂解小鼠体内的大肠杆菌和治愈犊牛大肠杆菌引起的腹泻^[20]。感染复数是感染过程中噬菌体与细菌的数量比值,即吸附于细菌表面的噬菌体数与细菌数之比,不同的噬菌体其最佳感染复数之间存在差异,即不同噬菌体感染不同细菌的最佳作用剂量不一样。最佳感染复数不仅与噬菌体的种类、结构有关,还与宿主菌有关^[21]。据报道,大多数噬菌体的最佳感染复数在0.01至0.000 01之间,例如肠出血性大肠埃希菌 O157 噬菌体的最佳感染复数为0.01^[22],大肠杆菌 LZZ-17 噬菌体的最

佳感染复数为0.1^[23],副溶血弧菌噬菌体的最佳感染复数为0.000 01^[24]。本研究中分离的绒山羊源大肠杆菌特异性噬菌体的最佳感染复数较高,对宿主菌有较好的裂解能力。

噬菌体对不同温度、pH、紫外线强度的敏感性不同。噬菌体 Bp9B1226 在 pH 值小于 5 或大于 10 时,其效价明显下降^[25];大肠杆菌噬菌体 BpD 在 pH 值7~8 时,活性最高,pH 值小于 5 或大于 9 时,活性下降明显^[26]。噬菌体 Bp6 经 70 °C 处理 30 min 后基本失去活性,80 °C 和 90 °C 处理 30 min 后完全失去活性^[27]。大肠杆菌噬菌体长时间处于 70 °C 以上温度中,其活性下降较大^[25-26]。赵俊杰分离和研究了大肠杆菌噬菌体 LZZ-17,发现其基因组长度为 37 418 bp,没有 tRNA 和任何抗性基因与独立基因,25 °C 或 65 °C 处理 20 min 后噬菌体活性下降较大,偏酸或偏碱时其活力都不高,该噬菌体的潜伏期为 40 min,裂解期 20 min,裂解量只有 60^[23]。奶牛乳腺炎源大肠杆菌噬菌体 vB_EcoM_XJ2 在 60 °C 和 pH5.0~11.0 条件下,具有较好的活性^[28]。与已报道的畜禽大肠杆菌特异性噬菌体相比较,本研究中噬菌体 ϕ PTK对温度、pH 和紫外线的耐受力都非常强,一定程度上反映这株噬菌体对外界不良环境有着较好的适应性,有利于其保存和应用,具有开发成生物制剂用于防治羔羊大肠杆菌病的较大潜力。

参考文献:

- [1] 屈雷,雷安民,闫海龙,等. 陕北白绒山羊种公羊的体细胞克隆[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2012,40(9): 29-40.
- [2] 宋亚雄,王丽丽,李晓宇,等. 噬菌体在畜禽细菌性疾病控制中应用研究进展[J]. 动物学进展,2016,36(3): 91-94.
- [3] 张培东. 大肠杆菌噬菌体的分离鉴定与初步应用[D]. 青岛: 青岛农业大学,2007.
- [4] 姚玉峰. 后抗生素时代的耐药防控对策[J]. 世界科学, 2014 (12):14.
- [5] LI L, ZHANG Z. Isolation and characterization of a virulent bacteriophage SPW specific for *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis of lactating dairy cattle[J]. Molecular Biology Reports, 2014, 41(9):5829-5838.
- [6] COFFEY B, RIVAS L, DUFFY G, et al. Assessment of *Escherichia coli* O157: H7-specific bacteriophages e11/2 and e4/1c in model broth and hide environments[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 147(3):188-194.
- [7] WANG L, QU K, LI X, et al. Use of Bacteriophages to Control *Escherichia coli* O157: H7 in domestic ruminants meat products,

- and fruits and vegetables [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2017, 14(9):483-493.
- [8] HUFF W E, HUFF G R, RATH N C, et al. Prevention of *Escherichia coli* respiratory infection in broiler chickens with bacteriophage (SPR02) [J]. *Poultry Science*, 2002, 81(4):437-441.
- [9] HUFF W E, HUFF G R, RATH N C, et al. Prevention of *Escherichia coli* infection in broiler chickens with a bacteriophage aerosol spray [J]. *Poultry Science*, 2002, 81(10):1486-1491.
- [10] RAYA R R, OOT R A, MOORE-MALRY B, et al. Naturally resident and exogenously applied T4-like and T5-like bacteriophages can reduce *Escherichia coli* O157:H7 levels in sheep guts [J]. *Bacteriophage*, 2011, 1(1):15-24.
- [11] CALLAWAY T R, EDRINGTON T S, BRABBAN A D, et al. Bacteriophage isolated from feedlot cattle can reduce *Escherichia coli* O157:H7 populations in ruminant gastrointestinal tracts [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2008, 5(2):183-191.
- [12] NIU Y D, XU Y, MCALLISTER T A, et al. Comparison of fecal versus rectoanal mucosal swab sampling for detecting *Escherichia coli* O157:H7 in experimentally inoculated cattle used in assessing bacteriophage as a mitigation strategy [J]. *Journal of Food Protection*, 2008, 71(4):691-698.
- [13] STANFORD K, MCALLISTER T A, NIU Y D, et al. Oral delivery systems for encapsulated bacteriophages targeted at *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle [J]. *Journal of Food Protection*, 2010, 73(7):1304-1312.
- [14] KUTAEADZE M, ADAMIA R. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics [J]. *Trends Biotechnol*, 2010, 28(12):591-595.
- [15] BRUSSOW H. Targeting the gut to protect the bladder: Oral Phage therapy approaches against urinary *Escherichia coli* infections? [J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(7):2084-2088.
- [16] BRUSSOW H. Phage therapy: the *Escherichia coli* experience [J]. *Microbiology*, 2005, 151(7):2133-2140.
- [17] CASEY E, MAHONY J, NEVE H, et al. Novel phage group infecting *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, as revealed by genomic and proteomic analysis of bacteriophage Ldl1 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(4):1319-1326.
- [18] 宽太吉. 羔羊大肠杆菌病的诊断及防治措施 [J]. *中兽医学杂志*, 2015(8):30.
- [19] MIEDZYBRODZKI R, FORTUNA W, WEBER-DABROWSKA B, et al. Phage therapy of staphylococcal infections (including MRSA) may be less expensive than antibiotic treatment [J]. *Postepy Hig Med Dosw*, 2007, 61:461-465.
- [20] 吴伟胜,李玉保,王守荣,等. 大肠杆菌噬菌体的研究进展 [J]. *江苏农业科学*, 2015, 43(8):8-11.
- [21] 彭勇,丁云娟,林洪,等. 一株副溶血弧菌噬菌体 VPp1 的分离鉴定及裂解性能 [J]. *海洋科学*, 2013, 37(1):96-101.
- [22] 刘悦,李菁华,史红艳,等. 肠出血性大肠埃希菌 O157 噬菌体的生物学特性 [J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2012, 38(1):79-83.
- [23] 赵俊杰. 大肠杆菌噬菌体 LZZ-17 生化特性及全基因组学研究 [D]. 兰州:甘肃农业大学, 2016.
- [24] 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.
- [25] 何冕之. 大肠杆菌 K88, k99 广谱噬菌体的分离与生物学特性鉴定 [D]. 武汉:华中农业大学, 2012.
- [26] 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.
- [27] 张培东,孙岩,任慧英,等. 大肠杆菌噬菌体的分离及其生物学特性 [J]. *中国兽医杂志*, 2008, 44(4):10-12.
- [28] 张倩,张湘莉,孙耀强,等. 一株裂解性奶牛乳房炎源大肠杆菌噬菌体的分离鉴定及生物学特性分析 [J]. *微生物学通报*, 2017, 44(6):1387-1394.

(责任编辑:张震林)