

葛展霞, 钟希娜, 朱炳海, 等. NDM-5 阳性大肠杆菌裂解性噬菌体的生物学特性[J]. 江苏农业学报, 2018, 34( 3 ): 699-705.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2018.03.032

## NDM-5 阳性大肠杆菌裂解性噬菌体的生物学特性

葛展霞<sup>1</sup>, 钟希娜<sup>1</sup>, 朱炳海<sup>2</sup>, 何涛<sup>1</sup>, 魏瑞成<sup>1</sup>, 王冉<sup>1</sup>

(1.江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所/省部共建重点实验室——食品质量安全实验室/江苏省肉类生产与加工质量安全控制协同创新中心, 江苏 南京 210014; 2.山东省阳信县动物卫生监督所, 山东 滨州 251800)

**摘要:** NDM-5 基因是在动物源细菌尤其是鸡源大肠杆菌中主要流行的碳青霉烯类耐药基因, 携带该基因的菌株呈现多重耐药性, 传播能力强, 被称为“超级细菌”。本研究以携带 NDM-5 基因的鸡源大肠杆菌 SQ-C-E5 为宿主菌, 从污水中分离了对该细菌具有裂解作用的噬菌体, 命名为 vB\_EcoM\_Bp5。通过透射电镜观察, 最佳感染复数测定, 一步生长曲线绘制, 杀菌试验, 热稳定性及酸碱稳定性测定等试验分析该噬菌体的生物学特性。结果表明, 该噬菌体为肌尾病毒科, 其噬菌斑透亮, 无晕圈, 最佳感染复数为 10, 潜伏期为 5 min, 爆发期为 65 min, 该噬菌体在温度为 30~60 ℃ 和 pH 为 5~10 时较稳定, 并且噬菌体 vB\_EcoM\_Bp5 的裂解谱较广, 对多株 NDM-5 阳性和阴性大肠杆菌都具有裂解作用。因此, 噬菌体 vB\_EcoM\_Bp5 在防治携带 NDM-5 基因的大肠杆菌方面具有潜在应用价值。

**关键词:** NDM-5 阳性大肠杆菌; 噬菌体; 生物学特性

**中图分类号:** S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2018)03-0699-07

## The biological characteristics of a bacteriophage against NDM-5 positive *Escherichia coli*

GE Zhan-xia<sup>1</sup>, ZHONG Xi-na<sup>1</sup>, ZHU Bing-hai<sup>2</sup>, HE Tao<sup>1</sup>, WEI Rui-cheng<sup>1</sup>, WANG Ran<sup>1</sup>

(1. Institute of Food Safety and Nutrition, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/State Key Laboratory Cultivation Base of MOST-Jiangsu Key Laboratory of Food Quality and Safety/Jiangsu Collaborative Innovation Center of Meat Production and Processing, Quality and Safety Control, Nanjing 210014, China; 2. Institute of Animal Health Supervision in Yangxin of Shandong Province, Binzhou 251800, China)

**Abstract:** NDM-5 gene is the most prevalent carbapenem resistance gene in bacteria of animal origin, especially *Escherichia coli* from chicken. The strains carrying the NDM-5 gene showed multidrug resistance and were easy to be spread, which were known as “superbug”. In this study, the *E. coli* SQ-C-E5 carrying NDM-5 from chicken was used as the host strain to isolate the lytic phage from the sewerage. The phage was designated vB\_EcoM\_Bp5 and its biological characteristics were analyzed by a series of test including transmission electron microscope, multiplicity of infection (MOI), one-step growth curve, bactericidal test, thermal tolerance and pH tolerance test. The results showed that the phage belonged to Myoviridae family and could form transparent plaque. The optimal multiplicity of infection (MOI) was 10, the latent period and burst period were 5 min and 65 min, respectively. The phage was stable when the temperature ranged from 30 ℃ to 60 ℃ and pH ranged from 5 to 10. Phage vB\_EcoM\_Bp5 had a wide host range and could lyse many NDM-5-positive *E. coli* isolates. Therefore, phage vB\_EcoM\_Bp5 has potential application value in the control of *E. coli* carrying NDM-5 gene.

**Key words:** NDM-5 positive *Escherichia coli*; bacteriophages; biological characteristics

收稿日期: 2017-10-27

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目[ CX(16)1060 ]; 江苏省农业科学院基本科研业务专项[ ZX(17)6005 ]; 国家农产品质量安全风险评估项目( GJFP201701203 )

作者简介: 葛展霞(1993-), 女, 江苏盐城人, 本科, 主要从事畜产品安全与健康养殖研究。(E-mail) gezhanxia@126.com

通讯作者: 王冉, (E-mail) wangran2001@126.com

新德里金属  $\beta$ -内酰胺酶(NDM)是 2009 年发现的一种新型金属  $\beta$ -内酰胺酶, 该酶从发现之初就备

受关注。携带有该酶的菌株对包括碳青霉烯类在内的多类抗菌药物同时表现为高度耐药,并且耐药菌可以呈洲际传播,所以被称为“超级细菌”,令全世界为之恐慌<sup>[1]</sup>。*NDM* 基因的主要宿主菌为大肠杆菌和肺炎克雷伯氏菌,包括 *NDM*-1 到 *NDM*-12 几个亚型,其中动物源(如鸡源和奶牛源)大肠杆菌上 *NDM*-5 基因的流行率呈递增趋势<sup>[2-3]</sup>。目前临床上针对 *NDM* 阳性细菌的感染,主要采取的治疗措施仍是抗生素疗法,即选择对该菌敏感的非  $\beta$ -内酰胺类药物进行治疗,但是抗生素长期使用亦可能激发或诱导病原菌的进一步超乎人类想象的变异,产生更为可怕的多重耐药或泛耐药细菌,因此,寻找一种有效的抗生素替代疗法成为摆在全球科学工作者面前的重要科学问题。

噬菌体是一种杀灭细菌的病毒,寄生于细菌并利用细菌来复制繁殖,最后将细菌裂解致死,由于其天然的杀菌特性,被科学家认为是潜在的“超级细菌的有效克星”,而噬菌体因具有对宿主细菌的高特异性,强大的裂解能力以及对人类和动物(产品)没有毒副作用,不会产生药物残留等优势而显示出比抗生素更加广阔的应用前景和价值<sup>[4-5]</sup>。在 2000 年度 Everygreen 噬菌体国际会议上,研究者报道的试验结果表明,噬菌体是有效、安全的病原体治疗和生态环境净化生物制剂<sup>[6]</sup>。本研究拟以 1 株携带 *NDM*-5 基因的鸡源大肠杆菌为宿主菌,从养殖场污水中分离针对该耐药大肠杆菌的裂解性噬菌体,并对其进行生物学特性分析,以期对 *NDM*-5 阳性大肠杆菌的防控提供新的技术手段。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 菌种与污水 试验所用多株 *NDM*-5 阳性大肠

杆菌为江苏宿迁肉鸡养殖场的鸡粪便中分离得到,经 PCR 检测和测序确定其携带 *NDM*-5 基因,选择其中 1 株细菌 SQ-C-E5 作为噬菌体分离用宿主菌。同时采集该养殖场的污水样本用于分离噬菌体。

#### 1.1.2 培养基及试剂

1.1.2.1 LB (Luria broth) 液体培养基(1 L) 蛋白胨 10 g,酵母粉 5 g,NaCl 10 g,加 ddH<sub>2</sub>O 至 1 L,调节 pH 至 7.0,121 °C,20 min 高压灭菌。

1.1.2.2 0.6% LB 半固体培养基(1 L) 蛋白胨 10 g,酵母粉 5 g,NaCl 10 g,琼脂粉 6 g,加 ddH<sub>2</sub>O 至 1 L,调节 pH 至 7.0,121 °C,20 min 高压灭菌。

1.1.2.3 1.2% LB 固体培养基(1 L) 蛋白胨 10 g,酵母粉 5 g,NaCl 10 g,琼脂粉 12 g,加 ddH<sub>2</sub>O 至 1 L,调节 pH 至 7.0,121 °C,20 min 高压灭菌后,冷却至 50 °C,倾倒入平板,冷却凝固后,倒置备用。

1.1.2.4 SM 缓冲液(1 L) 称取 6.055 g Tris-HCl (pH 为 7.5) 定容至 100 ml,加入 5.800 g NaCl,2.000 g MgSO<sub>4</sub>后,加入 ddH<sub>2</sub>O 定容至 1 L。

1.1.2.5 脑心浸液肉汤培养基(BHI)(1 L) 称取 37 g 脑心浸液肉汤培养基粉末(青岛海博生物技术有限责任公司产品)于 1 000 ml 蒸馏水中,加热煮沸至完全溶解,121 °C 高压灭菌 15 min,冷却备用。

1.1.2.6 伊红美蓝培养基(EMB)(1 L) 称取 37.5 g 伊红美蓝培养基粉末(北京陆桥技术有限责任公司产品)于 1 000 ml 蒸馏水中,加热煮沸至完全溶解,121 °C 高压灭菌 15 min,冷却至 55 °C 左右,混匀后倾注平板备用。

1.1.2.7 DNA 试剂盒 由天根生化科技有限公司生产。

1.1.3 主要仪器 试验中主要用到的试验仪器和设备见表 1。

表 1 试验主要仪器和设备

Table 1 The main instruments and equipments of experiment

仪器名称	仪器型号	生产厂家
高压灭菌锅	HVE-50	日本 Hirayama 公司
超净台	SW-CJ-1F	苏州真田洁净设备有限公司
电热恒温鼓风干燥箱	DHG-9140A	上海精宏实验设备有限公司
海信冰箱	BCD-562WT	海信集团有限公司
电热恒温培养箱	DHP-9052	上海一恒科技有限公司
全温振荡培养箱	HZL-F160	太仓市强乐实验设备有限公司
美的微波炉	MM721NH1-PW	美的集团有限公司
微型漩涡混合仪	WH-2	上海沪西分析仪器厂有限公司

## 1.2 方法

1.2.1 噬菌体的分离及纯化 将污水样 10 000 r/min 离心之后取上清液,在无菌环境下经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤之后,取 10 ml 加入 11 ml 处于对数生长期 ( $1 \times 10^8$  CFU/ml) 的大肠杆菌 SQ-C-E5 菌液中 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 12 h,将共培养液 10 000 r/min 离心 10 min,经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后得到的液体,即噬菌体原液。

采用双层平板法<sup>[7]</sup>进行噬菌体的鉴定,取 0.1 ml 原液于 0.9 ml SM 稀释液中稀释,依次向后作 10 倍梯度稀释,稀释倍数至  $10^5$ 、 $10^6$  后,取 0.1 ml 稀释液于 0.1 ml 细菌中混合,静置 15 min,加入 3.5 ml 约 50  $^{\circ}\text{C}$  的 0.6% LB 半固体培养基,混匀后倒入 1.2% LB 固体培养基中,倒置于恒温培养箱中,37  $^{\circ}\text{C}$  培养 12 h,观察是否有噬菌斑出现。挑选有噬菌斑的平板进行初步纯化,从有噬菌斑的平板中挑取单个形态清晰的噬菌斑,并将其溶解于 0.9 ml SM 稀释液中,振荡均匀后,取 0.1 ml 液体稀释,进行双层平板试验,重复该操作,直至噬菌斑的大小均一,得到较纯的噬菌体液。

1.2.2 噬菌体效价测定 采用双层平板法,每个稀释度 2 个重复,计数时选取噬菌斑个数为 30~300 的平板计数,记录噬菌斑个数,计算噬菌体的效价。噬菌体效价(PFU/ml) = 噬菌斑个数  $\times$  稀释倍数 / 所取样品体积。

1.2.3 噬菌体的电镜形态观察 根据余静丹<sup>[8]</sup>的方法,将处理好的用 SM 稀释液溶解的噬菌体样 20  $\mu\text{l}$  滴于铜网中,自然沉降 15 min 后,用滤纸吸取多余的水分,加 1 滴 2% 的磷钨酸于铜网中染色,待样品干燥后,于透射电子显微镜下观察形态。

1.2.4 噬菌体基因组分析 将纯化后的噬菌体液按 DNA 试剂盒中的方法依次进行操作,用 RNase A 水溶液溶解的液体置于 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中待用。

将提取的核酸用 DNase I、RNase A 和 Mung Bean Nuclease 进行处理和判断噬菌体基因组的类型,用限制性核酸内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切,根据酶切后电泳的 DNA 条带大小进行基因组分子量大小的估算。

1.2.5 最佳感染复数测定 最佳感染复数的定义为噬菌体与宿主菌数量的比值。根据 Lu 等<sup>[9]</sup>的方法,首先,将处于对数生长期 ( $1 \times 10^8$  CFU/ml) 的宿主菌用新鲜的 LB 液体培养液洗涤,然后将细菌数量调整为  $1.0 \times 10^8$  CFU/ml。按照感染复数(MOI)分

别为 0.01、0.10、1.00、10.00 和 100.00 的比例,将相应数量的噬菌体液加入到已准备好的菌液中,混匀,37  $^{\circ}\text{C}$ ,160 r/min 震荡培养 5 h。将混合培养物 10 000 r/min 离心 1 min,得到裂解液。用双层琼脂平板法测定裂解液中噬菌体的效价,产生最高效价的感染复数即为最佳感染复数(MOI)。同样条件下设置 3 组重复试验,每组 2 个平行。

1.2.6 一步生长曲线绘制 噬菌体液与宿主菌液以最佳感染复数的比例加入到新鲜的 LB 液体培养基中,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min,10 000 r/min 离心 1 min,弃掉上清液,用新鲜的 LB 液体洗涤 2 次。加入等体积 37  $^{\circ}\text{C}$  预热的 LB 液体培养基,充分混匀,迅速置于 37  $^{\circ}\text{C}$  摇床中振荡培养。同时开始计时,在 0 min 和每隔 10 min 取样 1 次,采用双层琼脂平板法测定噬菌体的效价。以感染时间为横坐标,噬菌体效价为纵坐标,绘制噬菌体的一步生长曲线。同样条件下设置 3 组重复试验,每组 2 个平行。

1.2.7 杀菌效力测定 将过夜培养的宿主菌用培养液稀释至  $1 \times 10^7$  CFU/ml,取 18 根试管,宿主对照组中加入 1.5 ml 稀释后的宿主菌和 1.5 ml LB 培养液,其他试验组中加入 1.5 ml 稀释后的宿主菌和 1.5 ml 不同效价的噬菌体,使其 MOI 值依次为 0.01、0.10、1.00、10.00 和 100.00,每个 MOI 值做 3 个平行,每 30 min 测定 1 次  $OD_{600}$ ,测定 10 次。

1.2.8 热稳定性测定 将噬菌体放于 30  $^{\circ}\text{C}$ 、40  $^{\circ}\text{C}$ 、50  $^{\circ}\text{C}$ 、60  $^{\circ}\text{C}$ 、70  $^{\circ}\text{C}$ 、80  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅中,分别持续 30 min 和 60 min 后,利用双层平板法,待平板凝固后放于 37  $^{\circ}\text{C}$  下培养 12 h,观察结果。同样条件下设置 3 组重复试验,每组 2 个平行。

1.2.9 pH 稳定性测定 调整 LB 液体培养基的 pH 值分别为 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12,取不同 pH 值浓度的 LB 液体 100  $\mu\text{l}$ ,加入 100  $\mu\text{l}$  噬菌体液混匀,37  $^{\circ}\text{C}$  作用 2 h。从每管中各取 100  $\mu\text{l}$ ,铺双层琼脂平板,37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜,进行噬菌斑计数,测定噬菌体的效价。同样条件下设置 3 组重复试验,每组 2 个平行。

1.2.10 宿主谱分析 采用点样法,测定噬菌体对不同大肠杆菌菌株的裂解情况。将 30 株来自江苏宿迁 3 个不同鸡养殖场的大肠杆菌培养至对数生长期,其中包括了 13 株 NDM-5 阳性菌株,17 株 NDM-5 阴性菌株,分别取 100  $\mu\text{l}$  涂布至 1.2% 固体 LB 培养基上,晾干后,将 10  $\mu\text{l}$  的噬菌体点样至平板上,

37 ℃ 过夜培养后,观察其对不同菌株的裂解情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 噬菌体的分离及噬菌斑特征

采用双层平板法,多次重复试验步骤,得到纯化后的噬菌斑,最终获得的噬菌斑呈圆形,且噬菌斑透亮,无晕圈(图 1),由噬菌斑可知,该噬菌体为裂解性噬菌体,将其命名为 vB\_EcoM\_Bp5。

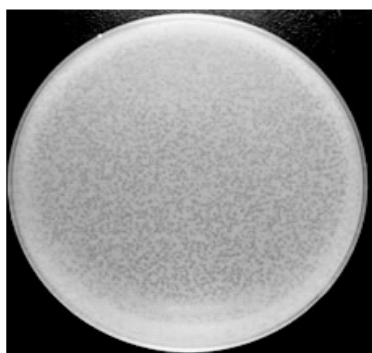


图 1 噬菌体 vB\_EcoM\_Bp5 噬菌斑

Fig.1 Plaques of bacteriophage vB\_EcoM\_Bp5

### 2.2 噬菌体透射电镜形态

噬菌体 vB\_EcoM\_Bp5 经负染后,于电镜下观察后的电镜图见图 2,该噬菌体的头部为多面体,直径约 80 nm,有可伸缩长尾,尾部长约 90 nm,直径约为 20 nm,有少量尾丝清晰可见,按国际病毒分类委员会分类规则<sup>[10]</sup>,将其归为有尾噬菌体目,肌尾病毒科。

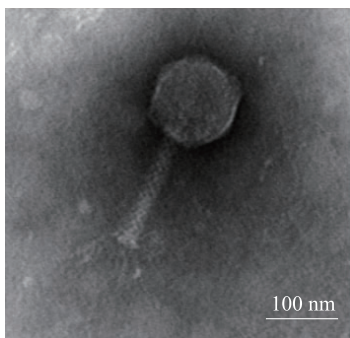


图 2 噬菌体 vB\_EcoM\_Bp5 透射电镜形态

Fig.2 Morphology of bacteriophage vB\_EcoM\_Bp5 in transmission electron microscope

### 2.3 噬菌体基因组分析

泳道 M1 和 M2 分别为 23 kb Marker 和 15 kb Marker,泳道 1 为噬菌体 vB\_EcoM\_Bp5 基因组,泳

道 2 和 3 分别为噬菌体 vB\_EcoM\_Bp5 基因组被 *EcoR* I 和 *Hind* III 消化后的产物。

噬菌体 vB\_EcoM\_Bp5 基因组只可以被 DNase I 消化,而不可以被 RNase A 和 Mung bean nuclease 消化,说明该噬菌体基因组为 dsDNA(双链 DNA)。由图 3 可知,通过对噬菌体基因组进行酶切,根据酶切片段与 DNA marker 的条带比对,噬菌体的基因组分子量大约为 50 kb,其确切的分子量大小还需要通过全基因组测序才能确定。

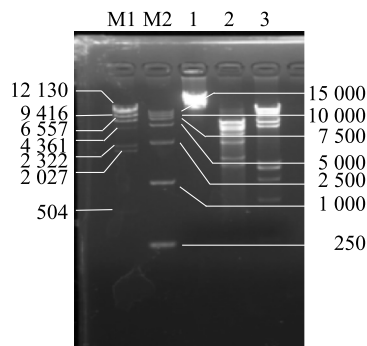


图 3 噬菌体 vB\_EcoM\_Bp5 基因组酶切图谱

Fig.3 Electrophoresis of bacteriophage vB\_EcoM\_Bp5 genome

### 2.4 最佳感染复数

由表 2 可知,当 *MOI* 为 10 时,噬菌体 vB\_EcoM\_Bp5 感染 SQ-C-E5 后的噬菌体效价为  $1.6 \times 10^{11}$  PFU/ml,与其他感染复数作用下的噬菌体效价相比,*MOI* 为 10 时,噬菌体效价最高,因此,噬菌体 vB\_EcoM\_Bp5 的最佳 *MOI* 为 10。

表 2 噬菌体 vB\_EcoM\_Bp5 最佳 *MOI* 的测定

Table 2 Determination of the optimal multiplicity of infection (*MOI*) of phage vB\_EcoM\_Bp5

<i>MOI</i> (PFU/CFU)	效价 (PFU/ml)
1 : 100	$4.2 \times 10^9$
1 : 10	$4.1 \times 10^{10}$
1 : 1	$5.0 \times 10^{10}$
10 : 1	$1.6 \times 10^{11}$
100 : 1	$7.4 \times 10^{10}$

### 2.5 一步生长曲线

由图 4 可知,噬菌体 vB\_EcoM\_Bp5 在感染宿主菌后效价在 5 min 内无明显变化,即潜伏期为 5 min,爆发期大约持续 65 min,在 70 min 后噬菌体数



量趋于平稳。噬菌体的初期数量 $5.0 \times 10^5$  PFU/ml, 裂解末期噬菌体数量平均值为 $6.8 \times 10^7$  PFU/ml, 根据裂解量 = 裂解末期噬菌体平均数量/感染初期细菌数量可知, 噬菌体 vB\_EcoM\_Bp5 的裂解量为 136。

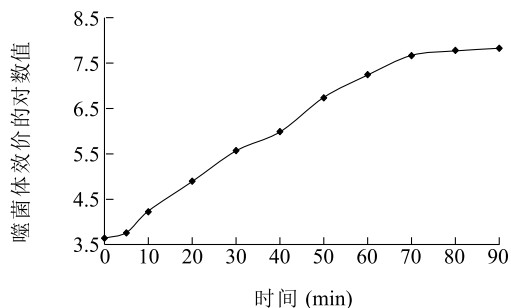


图4 噬菌体 vB\_EcoM\_Bp5 一步生长曲线

Fig.4 One-step growth curve of vB\_EcoM\_Bp5

## 2.6 噬菌体杀菌效力

由图 5 可知, 当噬菌体 vB\_EcoM\_Bp5 与宿主菌感染复数为 0 时, 表示培养液内仅含有细菌, 没有噬菌体, 其在 5 h 内,  $OD_{600}$  呈上升趋势, 而在感染复数为 0.01, 0.10, 1.00, 10.00, 100.00 时,  $OD_{600}$  都有不同程度的下降, 并且无上升的过程, 最后趋于稳定, 表明噬菌体 vB\_EcoM\_Bp5 的杀菌效果明显, 在感染初期, 能有效抑制细菌的生长, 并在后期完全抑制细菌生长, 甚至可以完全清除细菌。在不同的感染复数下, 其下降的幅度是不一样的, 当感染复数达到 10 时, 其对宿主菌的裂解效果最明显。

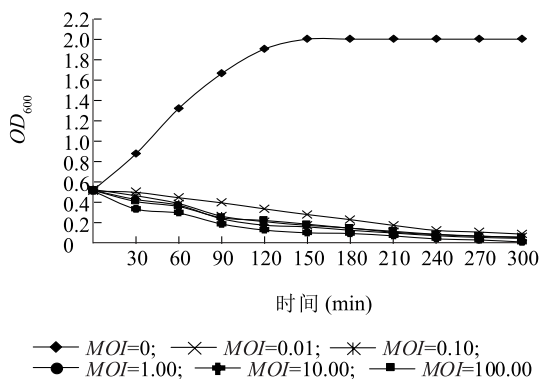


图5 噬菌体 vB\_EcoM\_Bp5 裂解细菌的动态曲线

Fig.5 Lytic kinetics of bacteriophage vB\_EcoM\_Bp5

## 2.7 热稳定性

由图 6 可知, 噬菌体 vB\_EcoM\_Bp5 在温度条件

为 30 ℃、40 ℃、50 ℃ 时, 随时间推移, 其效价并没有发生明显的变化, 而在 60 ℃ 时, 噬菌体效价开始下降, 并且温度越高, 作用时间越长, 活力下降越明显。在 80 ℃ 时, 噬菌体效价为零, 表明在此温度下, 噬菌体的活力受到了严重的破坏。可知, 噬菌体 vB\_EcoM\_Bp5 的最适温度为 30~60 ℃。

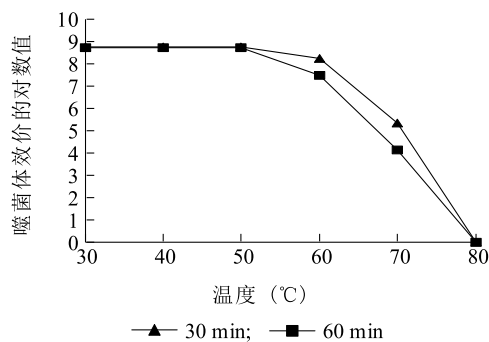


图6 噬菌体 vB\_EcoM\_Bp5 温度耐受能力

Fig.6 Tolerance to temperatures of vB\_EcoM\_Bp5

## 2.8 pH 稳定性

由图 7 可知, 噬菌体 vB\_EcoM\_Bp5 在 pH 为 5~10 时, 噬菌体的活力较稳定, 当 pH 小于 5 或大于 10 时, 噬菌体的活力下降明显, 在 pH ≤ 3 或 ≥ 11 时, 噬菌体处于失活状态, 表明该噬菌体在强酸, 强碱的条件下无法存活。由此可知, 该噬菌体的最适 pH 范围为 5~10。

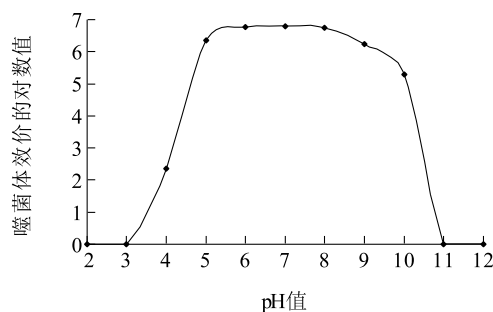


图7 噬菌体 vB\_EcoM\_Bp5 酸碱耐受能力

Fig.7 Tolerance to acidity and alkalinity of vB\_EcoM\_Bp5

## 2.9 噬菌体的裂解谱

选取 30 株鸡源大肠杆菌进行点样, 发现噬菌体 vB\_EcoM\_Bp5 能裂解其中的 17 株大肠杆菌, 裂解率为 56.7%, 其中 12 株为 NDM-5 阳性大肠菌株, 5 株为 NDM-5 阴性大肠菌株, 分别来源于场 I (8 株)、场 II (5 株) 和场 III (4 株) 3 个鸡养殖场。由此可

见,噬菌体 vB\_EcoM\_Bp5 宿主谱较宽,能够有效地裂解多株鸡源 NDM-5 阳性大肠杆菌,同时对 NDM-5 阴性的大肠杆菌也有一定的裂解作用,说明噬菌体 vB\_EcoM\_Bp5 为宽宿主谱的大肠杆菌裂解性噬菌体。

### 3 讨论

#### 3.1 对携带 NDM-5 基因的大肠杆菌具有裂解作用的噬菌体的分离鉴定

大肠杆菌广泛存在于畜禽机体以及养殖环境中,大肠杆菌病是畜牧养殖业常见疾病之一,目前对于大肠杆菌病的治疗主要依赖于抗生素疗法。但是由于抗生素的大量使用,大肠杆菌对抗生素产生了耐药性,尤其是携带 NDM-5 基因的大肠杆菌的出现,可以对几乎所有的  $\beta$ -内酰胺类药物耐药,对动物疾病治疗和食品安全提出了严峻挑战,亟需寻找一种安全、高效的方法来治疗耐药大肠杆菌引起的动物疾病<sup>[11]</sup>。

由于噬菌体能够高效地杀死宿主菌,人们开始关注噬菌体在对抗细菌感染性疾病中的作用<sup>[12]</sup>。噬菌体在自然环境中广泛分布,据估计,噬菌体的丰度约为  $1 \times 10^{31}$ ,为人类提供了一个可以利用的丰富的抗菌资源库<sup>[13]</sup>。

本研究筛选出 1 株对携带 NDM-5 基因的大肠杆菌具有裂解作用的噬菌体 vB\_EcoM\_Bp5,其能够杀灭多株 NDM-5 阳性的大肠杆菌。噬菌体 vB\_EcoM\_Bp5 头部呈现多面体,头部直径约 80 nm,有一个可伸缩长尾,尾部长约 90 nm,直径约 20 nm,属于肌尾病毒科,与吴伟胜<sup>[14]</sup>报道的无明显的尾部,直径为 50 nm 的鸡源大肠杆菌噬菌体 Bp5 和 Bp6 的形态明显不同,与郭秋菊等<sup>[15]</sup>报道的几株大肠杆菌噬菌体的形态也有差异,说明不同地区分离出来的大肠杆菌噬菌体形态不同。

噬菌体 vB\_EcoM\_Bp5 的噬菌斑呈圆形,噬菌斑透亮,无晕圈,说明该噬菌体为裂解性噬菌体,且只可以被 DNase I 消化,说明该噬菌体基因组为双链 DNA。

#### 3.2 噬菌体的生物学特性

噬菌体 vB\_EcoM\_Bp5 在温度 30~60 °C 时稳定,在 pH 5~10 时稳定,与王礼伟等<sup>[16]</sup>报道的大肠杆菌噬菌体 EcP10 相比,本研究中的噬菌体 pH 稳定范围较广,并且稳定性较强,与何觅之<sup>[17]</sup>报道的

Bp9B1226 噬菌体相比,本研究中的噬菌体在 30~60 °C 的温度稳定性较高。同时,噬菌体的潜伏期为 5 min,裂解量为 136,与李振江等<sup>[18]</sup>报道的潜伏期 20 min,裂解期 20 min 的大肠杆菌噬菌体 PD15 相比,本研究中的潜伏期较短,能够在较短时间内释放出裂解性噬菌体,有效快速杀灭大肠杆菌,并且其裂解量较大,明显高于赵俊杰<sup>[19]</sup>报道的裂解量为 60.5 的大肠杆菌噬菌体 LZZ-17。由此可见,该噬菌体的杀菌效果比较迅速和显著,与其他噬菌体相比,可以短时间有效地降低大肠杆菌的数量。由噬菌体 vB\_EcoM\_Bp5 的杀菌效力测定结果可知,本研究中的噬菌体在不同的 MOI 值下,其都能有效地使大肠杆菌的  $OD_{600}$  在较短的时间内快速降低,说明其裂解效果明显,同时,噬菌体 vB\_EcoM\_Bp5 的杀菌谱较广,不仅可以杀灭 NDM-5 阳性的大肠杆菌,对不携带 NDM-5 基因的大肠杆菌也有裂解作用,因此该噬菌体具有较高的应用价值。

在目前细菌耐药性普遍存在,而新型抗菌药物研发滞后的情况下,噬菌体疗法以其独特的优势又重新回到了人们的视野当中。但是噬菌体疗法也有一定的局限性,噬菌体最终应用于临床还有待进一步的研究。噬菌体本身对宿主的特异性高,其应用时存在宿主谱窄的问题,因此如何扩大其宿主谱,以及其进入动物机体后免疫反应如何,都有待进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] 邹大阳. *ndm-1* 耐药菌在中国的流行及特性研究[D]. 北京:中国人民解放军军事医学科学院,2015.
- [2] WANG Y, ZHANG R, LI J. Comprehensive resistome analysis reveals the prevalence of NDM and MCR-1 in Chinese poultry production [J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2: 16260.
- [3] HE T, WEI R, ZHANG L. Characterization of NDM-5-positive extensively resistant *Escherichia coli* isolates from dairy cows [J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 207: 153-158.
- [4] SULAKVELID A, ALAVIDZE Z, MORRIS J G. Bacteriophage therapy [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, 45 (3): 649-659.
- [5] 韩 晗, 李雪敏, 王 爽, 等. 噬菌体作抗菌剂使用的安全性评价研究进展[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(22): 18-23.
- [6] 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.
- [7] SUMMERS W C. Bacteriophage therapy [J]. *Annual Review of Microbiology*, 2001, 55(2): 437-451.
- [8] 余静丹. 鲍曼不动杆菌噬菌体的分离鉴定及生物学特性的研

- 究[D]. 长春:吉林大学,2013.
- [9] LU Z, BREIDT F, FLEMING H P, et al. Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage,  $\Phi$ JL-1 from a cucumber fermentation [J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 84(2): 225-235.
- [10] LEUSCHNER R G K, ARENDT E K, HAMMES W P. Characterization of a virulent *Lactobacillus sake* phage PWH2 [J]. Applied Microbiology Biotechnology, 1993, 39(4/5): 617-621.
- [11] 李 杨, 王 静, 霍 凯, 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, 2014, 41(1): 7-10
- [12] 王 冉, 韩 晗, 张 辉, 等. 大肠杆菌 K88 噬菌体的分离鉴定及其生物学特性[J]. 华北农学报, 2012, 27(4): 163-167.
- [13] WOMMACK K E, COLWELL R R. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000, 64(1): 69-114.
- [14] 吴伟胜. 鸡大肠杆菌噬菌体的分离鉴定及初步应用[D]. 聊城: 聊城大学, 2016.
- [15] 郭秋菊, 滕井华, 许荣均, 等. 大肠杆菌噬菌体的分离、纯化及其特性研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2008, 47(S2): 273-277.
- [16] 王礼伟, 梁 晏, 屈勇刚, 等. 一株鸡源致病性大肠杆菌噬菌体的分离及其生物学特性[J]. 江苏农业学报, 2014, 30(2): 455-457.
- [17] 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.
- [18] 李振江, 张 改, 王书伟, 等. 大肠杆菌噬菌体 PD15 的分离与生物学特性的研究[J]. 河南医学高等专科学校学报, 2016, 28(3): 165-168.
- [19] 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.

(责任编辑: 陈海霞)