

研究报告

大肠杆菌 K99 噬菌体的分离鉴定及在小鼠上的防治效果

赵影^{1*} 刘秀侠¹ 李金敏¹ 徐海燕¹ 谷魏¹ 刘元香¹ 陈梅楠²

(1. 山东宝来利来生物工程股份有限公司 山东 泰安 271000)

(2. 山东省泰安市植物保护站 山东 泰安 271000)

摘要:【背景】产肠毒素大肠杆菌 K99 是引起仔猪腹泻的主要致病菌之一, 目前对该病的治疗主要依赖于抗生素, 但大量抗生素的长期使用造成了病原菌耐药性的增强, 亟待寻求一种新的产品来解决这一问题。【目的】以一株产肠毒素大肠杆菌 K99 为宿主菌, 从畜禽粪水中分离噬菌体并对其基本生物学特性进行研究, 同时在小鼠上检验噬菌体对小鼠大肠杆菌感染的防治效果。【方法】双层平板法分离筛选烈性噬菌体并观察噬菌斑形态; 纯化后进行电镜观察、核酸类型鉴定; 测定噬菌体热稳定性、pH 稳定性、最佳感染复数及一步生长曲线; 通过小鼠体内实验检测噬菌体对小鼠大肠杆菌感染的防治效果。【结果】从畜禽粪水中分离出 1 株产肠毒素大肠杆菌 K99 强裂解性噬菌体, 命名为 Φ K99-1, 经电镜观察及核酸类型鉴定, 应属于肌尾噬菌体科(Myoviridae)。噬菌体能耐受 50 °C 左右的高温, 在 pH 3.0–10.0 范围内效价稳定。最佳感染复数为 0.000 01, 爆发量为 108 333 PFU/cell; 运用噬菌体 Φ K99-1 预防和治疗小鼠产肠毒素大肠杆菌 K99 感染, 结果显示小鼠发病症状较阳性对照组明显减轻, 小鼠血液内大肠杆菌 K99 含量也显著低于阳性对照组, 通过病理切片观察显示脏器发病情况也较阳性对照组减轻。【结论】 Φ K99-1 是一株在不同温度、不同酸碱性环境中具有较强适应能力, 且在小鼠大肠杆菌感染上表现出良好防治效果的裂解性肌尾科大肠杆菌噬菌体。

关键词: 产肠毒素大肠杆菌 K99, 裂解性噬菌体, 生物学特性, 防治效果

Isolation and identification of a phage against Enterotoxigenic *Escherichia coli* K99 and its function verification in mice

ZHAO Ying^{1*} LIU Xiu-Xia¹ LI Jin-Min¹ XU Hai-Yan¹ GU Wei¹
LIU Yuan-Xiang¹ CHEN Mei-Nan²

(1. Shandong Baolai-Leelai Bioengineering Co. Ltd., Tai'an, Shandong 271000, China)

(2. Tai'an City Plant Protection Station of Shandong Province, Tai'an, Shandong 271000, China)

Abstract: [Background] Enterotoxigenic *Escherichia coli* K99 is one of the main pathogens causing diarrhea in piglets. So far the treatment of this disease mainly depends on antibiotics, but the long-term

Foundation item: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (2013AA102800)

*Corresponding author: Tel: 86-538-8068017; E-mail: zy198709050025@163.com

Received: July 19, 2017; Accepted: February 27, 2018; Published online (www.cnki.net): March 16, 2018

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划) (2013AA102800)

*通信作者: Tel: 86-538-8068017; E-mail: zy198709050025@163.com

收稿日期: 2017-07-19; 接受日期: 2018-02-27; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-03-16

use of antibiotics has caused the increase of drug resistance, therefore, new product is urgently needed to solve this problem. **[Objective]** A lytic phage against Enterotoxigenic *Escherichia coli* K99 was isolated from the manure of livestock and identified, and its biological properties were assayed as well. The preventive and therapeutic effects of the bacteriophage on Enterotoxigenic *Escherichia coli* K99 infection were examined in mice. **[Methods]** The lytic phage was isolated by the double-layer agar culture method and the phage plaque was checked. Morphology of the phage was observed by transmission electron microscopy and the type of nucleic acids was also identified after the phage purification. The biological parameters including the thermal stability, pH stability and optimal multiplicity of infection (MOI) were assayed separately. The inhibitory effects of the bacteriophage on *Escherichia coli* infection in mice was tested by *in vivo* experiments with mice. **[Results]** A lytic phage (designated as ΦK99-1) against Enterotoxigenic *Escherichia coli* K99 was successfully isolated from livestock manure. ΦK99-1 belongs to family Myoviridae according to the electron microscopy and type identification of nucleic acid. The phage could withstand the temperature up to 50 °C and maintain stable titer under pH 3.0–10.0. The optimal MOI of ΦK99-1 was 0.000 01, and the burst size was 108 333 PFU/cell. Application of ΦK99-1 in mice which were infected with Enterotoxigenic *Escherichia coli* K99 could alleviate the related symptoms and viscera lesions. **[Conclusion]** The isolated phage, ΦK99-1, belongs to lytic phage of Myoviridae, which shows strong adapting capacity to various temperature and acid-base environments. At the same time the isolated phage shows inhibitory effect on *E. coli* infection in mice.

Keywords: Enterotoxigenic *Escherichia coli* K99, Lytic phages, Biological properties, Control effect

大肠杆菌 K99 作为产肠毒素大肠杆菌的优势血清型,给养殖业带来巨大经济损失^[1]。产肠毒素大肠杆菌 K99 以仔猪最为易感,在规模化猪场发病相当严重,常造成仔猪成批死亡或生长发育不良,给养猪业带来了巨大的经济损失,也成为制约规模化养殖发展最为严重的障碍之一^[2-3]。现阶段对于猪大肠杆菌病的治疗除了采用抗生素之外,尚无其他更为有效的措施。但近些年来,猪大肠杆菌病的泛滥和抗生素的滥用加速了细菌的突变频率,猪大肠杆菌的耐药性问题也越来越严重^[4],其中尤以猪致病性大肠杆菌耐药水平及多重耐药的情况最为严峻,给猪大肠杆菌病的防控带来了巨大的困难和挑战。

噬菌体是一类细菌性病毒,其中裂解性噬菌体在感染宿主菌后能快速复制、增殖,并最终裂解细菌从而达到抗菌效果。早在 1917 年,法裔加拿大微生物学家 Felix d'Herelle 等首次发现噬菌体后,科学界就一直尝试将其用于治疗人或动物的细菌性感染,最近十几年其应用迅速扩展到食品安全领域。2013 年 2 月由美国 Intralytix 公司研发的针对沙门菌的噬菌体制剂 SalmoFreshTM 被美国食品药品监督管理局(FDA)认定为公认安全级产品(GRAS),并

获批准上市。研究表明,噬菌体对动物和人体是安全的^[5-6]。随着经济发展和人们对动物性食品安全问题广泛关注,噬菌体作为一种天然绿色、安全有效的抗生素替代品,具有广阔的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验用菌株

产肠毒素性大肠杆菌 K99 (Enterotoxigenic *Escherichia coli* K99)购自中国兽药监察所菌种保藏中心。

1.1.2 主要试剂和仪器

TSA 培养基、TSB 培养基、SM 缓冲液均购自青岛高科园海博生物科技有限公司;PEG8000 购自长春市天佳生物技术有限公司;氯仿购自重庆川东化工有限公司;DNase I、RNase A、TaKaRa 微量病毒提取试剂盒、限制性核酸内切酶 *EcoR* I、*Hind* III 均购自宝生物工程(大连)有限公司;0.22 μm 水系微孔滤膜购自美国 PALL 公司。

超净工作台、恒温培养箱、恒温摇床,山东博科科学仪器有限公司;Philips Tecna 10 透射式电镜,Philips 公司。

1.2 噬菌体的分离纯化

从养猪场采集 5 g 猪粪样品, 装入 20 mL SM 缓冲液后 4 °C 静置过夜。将样品 4 000 r/min 离心 10 min 去除杂质, 上清液 8 000 r/min 离心 10 min 并以 0.22 μ m 水系微孔滤膜过滤, 得到含噬菌体的过滤液并保存。取 15 mL 过滤液加入 15 mL TSB 培养基中, 再加对数生长期(OD_{600} 约 0.3)大肠杆菌 K99 悬液 1 mL, 混匀 37 °C、180 r/min 振荡培养过夜。次日 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清 1 mL 加 10 mL TSB 培养基及大肠杆菌 K99 悬液 0.3 mL, 室温静置 1 h 后 37 °C、180 r/min 振荡 3 h, 取出后 12 000 r/min 离心 30 min, 将 0.3 mL 上清液和 0.3 mL 大肠杆菌 K99 悬液一并加入 5 mL 45 °C 半固体培养基中, 充分混匀后倾倒入固体琼脂培养基上制成双层平板, 37 °C 温箱中孵育 4–6 h, 观察噬菌斑生长情况。

挑取大且透亮的噬菌斑与大肠杆菌 K99 混合培养过夜, 重复 5 次^[7], 直至噬菌斑大小一致。挑取单一噬菌斑与培养至对数生长期的大肠杆菌 K99 混合, 37 °C、180 r/min 振荡培养过夜; 培养液 8 000 r/min 离心 10 min, 再经 0.22 μ m 水系微孔滤膜过滤后得到噬菌体裂解液。参考文献[8]中的方法进行噬菌体滴度检测。

1.3 噬菌体透射电镜观察

利用 PEG8000 制备噬菌体颗粒浓缩液^[9], 然后取 10 μ L 滴于铜网上, 自然沉淀 10 min, 用滤纸从侧面吸干多余的液体, 加 1 滴 2% 磷钨酸到铜网上, 染色 10 min, 待铜网干燥后用透射式电镜观察。

1.4 噬菌体基因组分析

将 1.3 中制备的噬菌体颗粒中加入 DNase I 和 RNase A, 37 °C 温育 30 min。然后用 TaKaRa 微量病毒提取试剂盒提取噬菌体核酸。将提取的核酸用限制性核酸内切酶 *EcoR* I、*Hind* III 酶切, 0.7% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 根据酶切图谱鉴定其核酸类型。

1.5 噬菌体的热稳定性实验

各取 0.5 mL 10^9 PFU/mL 的噬菌体纯培养液于

无菌 EP 管中, 分别于 40、50、60、70、80 °C 的水浴中作用 60 min, 作用结束后取样, 并立即将样品置于水浴中冷却, 经过稀释后测定噬菌体的效价。

1.6 噬菌体 pH 稳定性实验

取无菌 EP 管加入不同 pH 值(1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0)的液体 TSB 900 μ L, 然后将 EP 管置于 37 °C 的水浴中, 待温度平衡后加入 100 μ L 10^9 PFU/mL 的噬菌体纯培养液混匀, 37 °C 作用 2 h。取样测定各管中噬菌体的效价。

1.7 噬菌体最佳感染复数测定

培养大肠杆菌 K99 至对数生长期, 按照感染复数分别为 1:10、1:100、1:1 000、1:10 000、1:100 000、1:1 000 000 的比例, 加噬菌体液和宿主菌至液体 TSB 中, 37 °C 振荡培养 3.5 h, 5 000 r/min 离心 10 min 去除菌体, 测定上清液中噬菌体的滴度, 以产生最高滴度的感染复数为最佳感染复数。

1.8 噬菌体一步生长曲线绘制

取噬菌体 (1.2×10^3 PFU/mL) 和宿主菌 (1.2×10^8 CFU/mL) 各 400 μ L 至 40 mL 液体 TSB 中, 37 °C 孵育 10 min, 迅速置于 37 °C、180 r/min 振荡培养, 同时开始计时, 在 0 时刻和每隔 20 min 取样, 测定噬菌体的滴度。以感染时间为横坐标, 噬菌体滴度为纵坐标, 绘制一步生长曲线。

1.9 噬菌体在小鼠上的安全性试验

选用雌性 BALB/c 小鼠(20–22 g) 20 只, 预饲 2 d 后随机分为 2 组(噬菌体组、对照组), 每组 10 只。噬菌体组采用腹腔注射的方式接种噬菌体 Φ K99-1, 剂量为 1.5×10^{12} PFU/kg; 对照组腹腔注射等量生理盐水; 连续观察 15 d, 分别在处理后第 1–5 天检测小鼠盲肠内噬菌体含量及内脏情况。

1.10 攻毒剂量的确定

选用雌性 BALB/c 小鼠(20–22 g), 每个实验组 10 只小鼠, 共设 4 个实验组。每个实验组分别腹腔注射不同剂量的共同宿主菌产肠毒素大肠杆菌 K99 (6×10^9 、 1.2×10^9 、 6×10^8 、 1.2×10^8 CFU/只), 对照组注射同等剂量的生理盐水。定期观察小鼠的存

活率及发病情况,将导致一组小鼠都出现发病症状的剂量确定为实验的攻毒剂量。

1.11 噬菌体对小鼠产肠毒素大肠杆菌 K99 的预防和治疗效果

选用雌性 BALB/c 小鼠(20–22 g),分为 4 组,每组 10 只,进行 3 次重复。对噬菌体治疗组小鼠右侧腹腔按 1.2×10^8 CFU/只接种产肠毒素大肠杆菌 K99。30 min 后对小鼠左侧腹腔接种噬菌体 Φ K99-1,剂量为 3×10^{10} PFU/只;以右侧腹腔接种 1.2×10^8 CFU/只产肠毒素大肠杆菌 K99,左侧腹腔接种等量生理盐水组作为阳性对照组,噬菌体预防组小鼠左侧腹腔接种噬菌体 Φ K99-1,剂量为 3×10^{10} PFU/只,30 min 后对小鼠右侧腹腔按 1.2×10^8 CFU/只接种产肠毒素大肠杆菌 K99。最后一组接种生理盐水作为空白对照。对小鼠进行全天候监视,观察临床表现,处理后第 3 天各组取肝脏、盲肠组织进行切片观察,并对各组小鼠血液内菌含量的情况进行测定。试验期为攻毒后的 14 d。

小鼠临床健康状态评分标准:

健康状态:身心活跃,正常采食饮水	5 分;
轻度病态:无活力,伴有倒毛现象	4 分;
中度病态:嗜睡,倒毛、弓背	3 分;
严重病态:上述特征+眼睛仅能微睁,眼周有渗出物积聚	2 分;
垂死状态:抽搐,翻白眼	1 分;
死亡:	0 分。

1.12 数据分析

试验数据用 Excel 2007 进行初步处理后,采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)程序进行方差分析,最小显著差数法(LSD 法)进行组间多重比较,结果以“平均值 \pm 标准差”表示, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 噬菌体的分离纯化

采用双层琼脂法分离出 1 株产肠毒素大肠杆菌 K99 噬菌体,命名为 Φ K99-1。噬菌体在双层琼脂平板上形成圆形空斑,周围无晕环,直径为 1 mm–

2 mm (图 1)。单个噬菌斑经 3–5 次反复纯化后,测得噬菌体的滴度为 1×10^{10} PFU/mL。

2.2 噬菌体电镜观察结果

在透射电子显微镜下观察噬菌体颗粒(图 2),该噬菌体呈正多面体的头部结构,头部直径约 99 nm,尾部长约 122 nm,应属于肌尾噬菌体科(Myoviridae)。

2.3 噬菌体基因组分析及酶切鉴定

由图 3 的酶切图谱可以看出,噬菌体 Φ K99-1 核酸可被限制性核酸内切酶切开,证实噬菌体 Φ K99-1 为双链 DNA 噬菌体。根据酶切结果预测

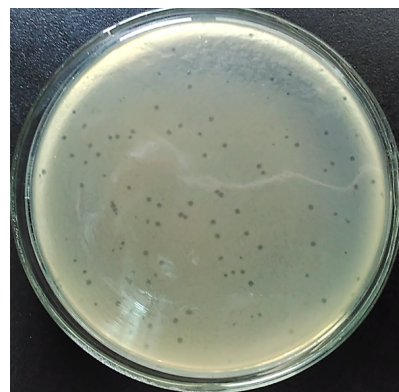


图 1 噬菌体 Φ K99-1 的噬菌斑形态
Figure 1 Plaques of phage Φ K99-1

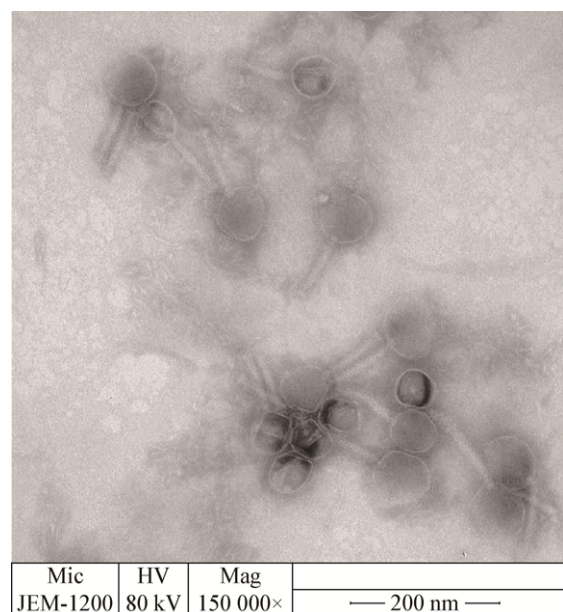


图 2 噬菌体 Φ K99-1 电镜照片
Figure 2 Electron micrograph of phage Φ K99-1

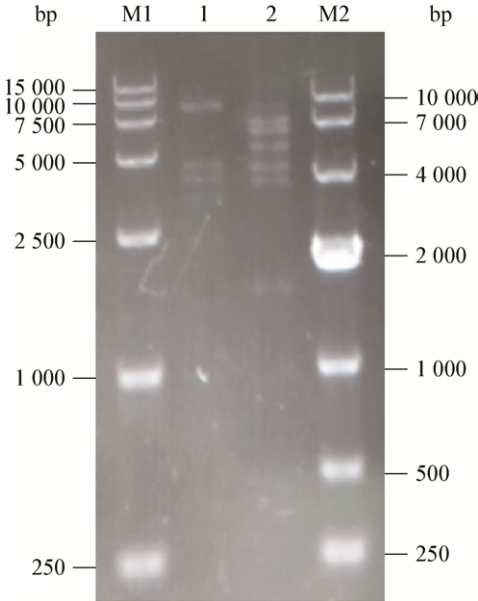


图3 ΦK99-1 基因组限制性内切酶酶切图谱
Figure 3 Electrophoresis of phage genome digested with *EcoR* I and *Hind* III

注：M1：15 kb DNA marker；M2：10 kb DNA marker；1：*EcoR* I 酶切处理；2：*Hind* III 酶切处理。

Note: M1: 15 kb DNA marker; M2: 10 kb DNA marker; 1: *EcoR* I treatment; 2: *Hind* III treatment.

ΦK99-1 基因组大小约为 31 kb。

2.4 噬菌体热稳定性实验结果

由图 4 可知，噬菌体 ΦK99-1 在 40 °C 和 50 °C 处理 1 h 后效价基本不变，60 °C 处理 1 h 后存活率为 51.5%；70 °C 处理 1 h 后存活率为 1.6%，80 °C 处理 1 h 后基本上全部失去了活性。

2.5 噬菌体 pH 稳定性实验结果

由图 5 可知，噬菌体 ΦK99-1 在 pH 值为 3.0–10.0 的范围内都能 100% 存活，在 pH 值为 2.0 时存活率下降了 1 个数量级，总体上来看噬菌体 ΦK99-1 对 pH 的耐受范围比较宽。

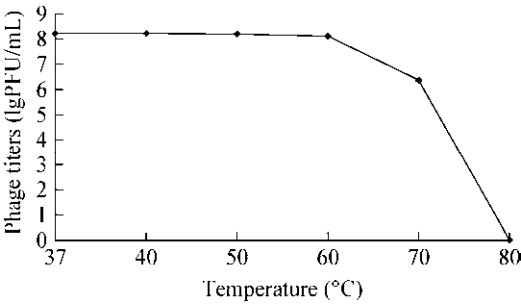


图4 噬菌体 ΦK99-1 热稳定性
Figure 4 Thermal stability of phage ΦK99-1

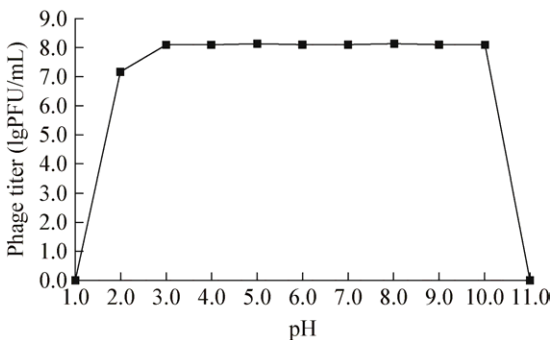


图5 噬菌体 ΦK99-1 pH 稳定性
Figure 5 pH stability of phage ΦK99-1

2.6 噬菌体 ΦK99-1 最佳感染复数试验

噬菌体 ΦK99-1 在感染复数为 0.000 01 时所产生子代噬菌体的滴度最高，为 1.28×10^{11} PFU/mL，表明噬菌体 ΦK99-1 最佳感染复数为 0.000 01 (表 1)。

2.7 噬菌体 ΦK99-1 一步生长曲线绘制

如图 6 所示，噬菌体感染宿主菌的潜伏期为 20 min 左右，暴发时间为 200 min 左右，暴发量为 108 333 PFU/cell。暴发量=暴发末期噬菌体滴度 (1.3×10^{11} PFU/mL)/初期宿主菌浓度 (1.2×10^6 CFU/mL)。

表 1 ΦK99-1 最佳感染复数试验

Table 1 *In vitro* lytic efficacy and multiplicity of infection of phage ΦK99-1

序号 No.	细菌数 Number of bacteria	噬菌体数 Number of bacteriophages	感染复数 MOI	噬菌体效价 Phage titers (PFU/mL)
1	1.2×10^8	1.2×10^7	0.1	1.88×10^{10}
2	1.2×10^8	1.2×10^6	0.01	3.93×10^{10}
3	1.2×10^8	1.2×10^5	0.001	4.17×10^{10}
4	1.2×10^8	1.2×10^4	0.000 1	8.60×10^{10}
5	1.2×10^8	1.2×10^3	0.000 01	1.28×10^{11}
6	1.2×10^8	1.2×10^2	0.000 001	1.13×10^{11}

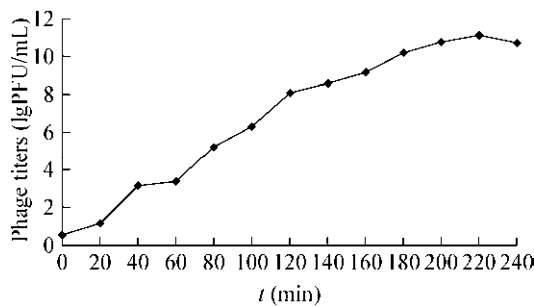


图 6 噬菌体 ΦK99-1 一步生长曲线
Figure 6 One-step growth curve of phage ΦK99-1

2.8 噬菌体在小鼠上的安全性试验

观察结果显示, 1.5×10^{12} PFU/kg 剂量的噬菌体 ΦK99-1 对小鼠日常行为没有影响。处理后第 1 天, 对照组和噬菌体组小鼠盲肠 pH 值分别为 6.4 和 6.5, 相差不大; 各组盲肠噬菌体效价随时间的变化见表 2, 处理后第 1 天噬菌体组盲肠内容物噬菌体效价为 3.2×10^6 PFU/g; 之后小鼠盲肠内噬菌体效价急剧下降, 到处理后第 4 天噬菌体组盲肠内容物已检测不到噬菌体的效价; 说明噬菌体进入小鼠体内后会逐渐被排出体外, 不会引起残留。各组小鼠解剖检查未见异常, 可见噬菌体 ΦK99-1 对小鼠是安全的。

2.9 攻毒剂量的确定

用剂量 6×10^9 CFU/只和 1.2×10^9 CFU/只的产肠毒素大肠杆菌 K99 腹腔感染小鼠时可以在 3 d 内使小鼠的死亡率达到 100%, 而当腹腔注射低剂量 (1.2×10^8 CFU/只) 的产肠毒素大肠杆菌 K99 时, 小鼠 3 d 内的死亡率为 20%, 且其余小鼠表现出了嗜睡、弓背、眼周有渗出物等典型的发病症状, 此剂量发病明显而且仅个别小鼠死亡, 为后续预防和治疗提供了可能, 因此选取该剂量 (1.2×10^8 CFU/只) 作为攻毒剂量(表 3)。

表 2 不同时间各组小鼠盲肠内容物噬菌体效价
Table 2 Phage titers of cecal contents of mice in different time groups (PFU/g)

分组 Group	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d
对照组 Control group	0	0	0	0	0	0
噬菌体组 Phage group	3.2×10^6	1.4×10^3	5.0×10^1	0	0	0

表 3 产肠毒素大肠杆菌 K99 攻毒剂量的确定
Table 3 Determination of attack dose of *Escherichia coli* K99

攻毒剂量 Attack dose (CFU/per mouse)	处理 7 d 后死亡率 The mortality after 7 days (%)
6.0×10^9	100
1.2×10^9	100
6.0×10^8	50
1.2×10^8	20

2.10 噬菌体对小鼠产肠毒素大肠杆菌 K99 的预防和治疗效果

如表 4 所示, 处理小鼠 1 d 后阳性对照组小鼠表现出了嗜睡、弓背、眼周有渗出物等典型的发病症状, 而相应预防组和治疗组小鼠的发病症状较阳性对照组轻, 从小鼠健康评分及解剖情况也证实了这一点; 通过小鼠血液内菌含量检测可知, 攻毒 1 d 后阳性对照组小鼠血液内菌含量达到了 10^6 CFU/mL, 而噬菌体预防组和治疗组小鼠血液菌含量是显著低于阳性对照组的 ($P < 0.05$); 攻毒 3 d 时阳性对照组小鼠血液菌含量达到了 10^7 CFU/mL, 而噬菌体预防组和治疗组小鼠血液菌含量维持在 10^2 CFU/mL 左右, 预防组小鼠血液菌含量显著低于治疗组。综合以上结果, 噬菌体在小鼠抵抗大肠杆菌上效果显著, 且预防组的效果是优于治疗组的。

实验小鼠肝脏组织病理学染色切片如图 7A 中 1-4 所示, 空白对照组小鼠肝细胞形态饱满, 细胞核大小均一, 肝索放射状排列脉络清晰。阳性对照组小鼠肝脏组织出现病灶坏死块, 细胞严重水肿, 细胞核核仁弥散。经噬菌体预防和治疗后小鼠肝脏组织切片显示其肝脏损伤较阳性对照组明显好转, 细胞核核仁仍有弥散, 但细胞水肿程度明显减轻。

实验小鼠盲肠组织病理学染色切片如图 7B 中 1-4 所示, 空白对照组小鼠盲肠结构清晰, 肠绒毛完整且较长, 并规则排列, 肠壁较厚。阳性对照组小鼠小肠绒毛萎缩且不完整, 甚至有脱落现象, 肠壁变薄。噬菌体预防组和治疗组小鼠盲肠有明显的改善, 绒毛排列整齐, 肠壁较厚。

表 4 噬菌体对小鼠产肠毒素大肠杆菌 K99 的预防和治疗效果

Table 4 Prevention and treatment effect of bacteriophage against *Escherichia coli* K99 in mice

不同处理		空白对照组	阳性对照组	噬菌体预防组	噬菌体治疗组
Treatment		Control group	Positive control group	Phage prevention group	Phage treatment groups
处理 1 d 后每只小鼠健康评分		5.0	1.9	3.8	3.2
Health score per mouse					
处理 1 d 小鼠内脏形态		各脏器表观正常，腹腔	腹腔有黄色粘液，肠子变	肠细，肝脏色浅	肠有空泡液化，
Visceral morphology of mice		无积液，肠内容物较多	黄，肝脏有血斑色浅		肝脏色浅
小鼠血液内菌含量	1 d	0	6.00±0.17 ^a	4.16±0.08 ^b	4.77±0.20 ^c
Bacterial content in blood	2 d	0	7.48±0.16 ^a	2.79±0.17 ^b	3.10±0.12 ^c
of mice (lgCFU/mL)	3 d	0	7.20±0.06 ^a	2.21±0.22 ^b	2.84±0.14 ^c

注：同列肩表不同小写字母表示差异显著($P<0.05$).
Note: Different lowercase letters in the same shoulder table showed significant difference ($P<0.05$).

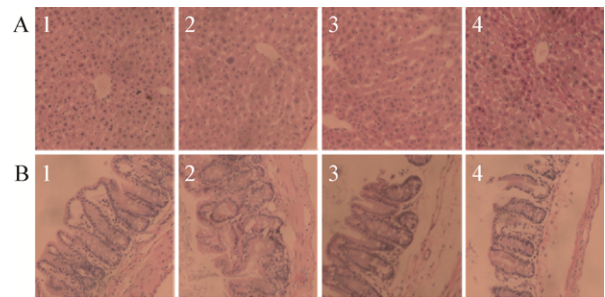


图 7 各组小鼠肝脏、盲肠石蜡切片(100×)

Figure 7 Liver, cecal paraffin sections (100×)

注：A：肝脏切片；B：盲肠切片。1：空白对照组；2：噬菌体预防组；3：噬菌体治疗组；4：阳性对照组。

Note: A: Liver section; B: Cecal section. 1: Control group; 2: Phage prevention group; 3: Phage treatment group; 4: Positive control group.

综合以上结果,噬菌体对小鼠大肠杆菌菌血症引起的肝脏、盲肠损伤具有一定程度的预防和治疗修复作用。

3 讨论与结论

噬菌体在自然界中分布广泛,凡是有微生物存在的地方就有其相应的噬菌体存在,资源极其丰富^[10]。噬菌体特异性极强,研究表明噬菌体仅攻击它们可寄生和杀死的细菌菌株,哺乳动物和植物细胞因缺乏噬菌体感染所需受体,噬菌体对其无害。随着抗生素滥用导致的种种弊端的显现,噬菌体作为新型、绿色安全的防治细菌的手段越来越受到广泛关注^[11-12]。

产肠毒素大肠杆菌 K99 是危害人类和动物的

重要肠道致病菌,其防控研究具有重要的公共卫生意义。为了将噬菌体 ΦK99-1 用于产肠毒素大肠杆菌 K99 的防控,对该菌株进行了初步鉴定及生物学特性分析。噬菌体 ΦK99-1 头部呈正多面体的立体结构,头径直径约 99 nm,尾部长约 122 nm,核酸类型为双链 DNA (基因组大小约 31 kb),按国际病毒分类委员会分类标准,该噬菌体应属于肌尾噬菌体科(Myoviridae)的烈性噬菌体。该噬菌体在 40 °C 和 50 °C 处理 1 h 后效价稳定,pH 为 3.0–10.0 时稳定,酸碱耐受范围远大于邢少贞等^[13]报道的粪肠球菌噬菌体耐受 pH 6.0–8.0,比张倩等^[14]报道的大肠杆菌噬菌体 pH 5.0–11.0 更耐酸,说明该噬菌体具有较宽的温度和酸碱度适用范围,这可能与噬菌体衣壳蛋白表面的一些稳定性物质有关;ΦK99-1 最佳感染复数为 0.000 01,潜伏期短,为 20 min,对宿主菌裂解量为 108 333 PFU/cell,远高于王冉等^[15]报道的大肠杆菌 K88 噬菌体裂解量(40 PFU/cell)和孙荣华等^[16]报道的大肠杆菌噬菌体裂解量(78 PFU/cell),说明噬菌体 ΦK99-1 具有很强的裂菌效力,这可能与细菌表面结合位点较多或产生的裂解酶酶活较高有关。

K99 是仔猪大肠杆菌病的主要病原菌之一,仔猪感染 K99 后肠粘膜上皮细胞遭到破坏从而导致仔猪脱水 and 腹泻,严重的还能引发菌血症。造模实验中小鼠对 K99 的感染也表现出了肠粘膜上皮细胞受损和菌血症的症状。两者同属于哺乳动物,因

此,在实验室条件下我们选择小鼠进行动物模型建立。安全性试验显示噬菌体 ΦK99-1 对小鼠是安全的,灌胃 1.5×10^{12} PFU/kg 剂量 3 d 后即可全部被排出体外;在实验中我们运用噬菌体预防和治疗小鼠产肠毒素大肠杆菌 K99 感染,结果显示,噬菌体预防组和治疗组小鼠发病症状较阳性对照组明显减轻。从小鼠健康评分及解剖情况也证实了这一点。通过小鼠血液内菌含量检测发现,噬菌体预防组和治疗组小鼠血液菌含量显著低于阳性对照组,通过小鼠肝脏和盲肠病理学切片观察显示,噬菌体预防组和治疗组小鼠的脏器损伤情况也较阳性对照组轻。综合以上结果可知,噬菌体 ΦK99-1 对产肠毒素大肠杆菌 K99 感染具有良好的防治效果。

以上结果表明,ΦK99-1 是一株具有良好应用前景的菌株,可作为一种生物抑菌剂用于产肠毒素大肠杆菌 K99 的防控。

REFERENCES

- [1] Nagy B, Fekete PZ. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2005, 295(6/7): 443-454
- [2] Yang ZS. Animal pathogenic *Escherichia coli* and *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 1987(6): 25-28 (in Chinese)
杨正时. 动物病原性大肠杆菌与大肠杆菌病[J]. 中国兽医科技, 1987(6): 25-28
- [3] Yu ZD, Li NJ, Huang YX, et al. Isolation, identification and immune effect observation of pathogenic bacteria of *Escherichia coli* diarrhea in piglets[J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 1995(2): 23-24 (in Chinese)
余志东, 李乃津, 黄引贤, 等. 仔猪大肠杆菌性腹泻的病原分离鉴定及免疫效果观察[J]. 中国兽医科技, 1995(2): 23-24
- [4] Tang JY, Wang HN, Zhang PJ, et al. Phenotypic and aminoglycosides genotypic antimicrobial resistance characterization of *Escherichia coli* isolated from 95 pig farms[J]. Acta Veterinaria Et Zootechnica Sinica, 2008, 39(4): 472-477 (in Chinese)
汤景元, 王红宁, 张鹏举, 等. 95 个猪场大肠杆菌耐药表型及氨基糖苷类药物耐药基因型调查[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(4): 472-477
- [5] Carlton RM, Noordman WH, 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
- [6] 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
- [7] Karumidze N, Kusradze I, Rigvava S, et al. Isolation and characterisation of lytic bacteriophages of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*[J]. Current Microbiology, 2013, 66(3): 251-258
- [8] Zou SS, Xu JY, Weng YB, et al. Isolation and biological characteristics of a phage against *Salmonella enteritidis* from sawage water[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2014, 41(3): 119-123 (in Chinese)
邹尚书, 许家园, 翁亚彪, 等. 1 株肠炎沙门氏菌噬菌体的污水分离及生物学特性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(3): 119-123
- [9] Mao PJ, Feng J, Hong Y, et al. Isolation and biological characters of bacteriophages of *Salmonella paratyphi* A[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2014, 27(4): 458-462, 466 (in Chinese)
毛普加, 冯金, 洪愉, 等. 甲型副伤寒沙门菌噬菌体的分离及其生物学特性的分析[J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27(4): 458-462, 466
- [10] Wommack KE, Colwell RR. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000, 64(1): 69-114
- [11] Merril CR, Scholl D, Adhya SL. The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2003, 2(6): 489-497
- [12] Song YX, Wang LL, Li XY, et al. Progress on control of bacterial diseases in poultry and Livestock's by using bacteriophages[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2016, 37(3): 91-94 (in Chinese)
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]. 动物医学进展, 2016, 37(3): 91-94
- [13] Xing SZ, Zhang XLL, Pei GQ, et al. Characterization and genome analysis of a novel bacteriophage νB_EfaP_IME195 infecting *Enterococcus faecalis*[J]. Microbiology China, 2017, 44(2): 305-313 (in Chinese)
邢少贞, 张湘莉兰, 裴广倩, 等. 粪肠球菌噬菌体 νB_EfaP_IME195 的生物学特性及其全基因组分析[J]. 微生物学通报, 2017, 44(2): 305-313
- [14] Zhang Q, Zhang XLL, Sun YQ, et al. Isolation and characterization of a lytic phage infecting *Escherichia coli* from bovine mastitis[J]. Microbiology China, 2017, 44(6): 1387-1394 (in Chinese)
张倩, 张湘莉兰, 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
- [15] Wang R, Han H, Zhang H, et al. Isolation and characterization of a lytic bacteriophage of Enterotoxigenic *Escherichia coli* K88[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2012, 27(4): 163-167 (in Chinese)
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
- [16] Sun RH, Li QH, Shi HY, et al. Identification and biological properties of *Escherichia coli* phages isolated from raw sewage[J]. Journal of Pathogen Biology, 2009, 4(2): 88-90 (in Chinese)
孙荣华, 李菁华, 史红艳, 等. 大肠埃希菌噬菌体的分离鉴定及其生物学特性研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2009, 4(2): 88-90