

畜禽肠道致病菌噬菌体的生物学特性研究*

李 灏 谢慧君 孔 健 马桂荣

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘要: 以致病性大肠杆菌为宿主菌, 从发病鸡场土壤、鸡粪中分离出 10 余株噬菌体, 并从中筛选出噬菌斑大且裂解快的 3 株, 对其生物学特性进行了研究。结果表明: 3 株噬菌体在 50℃ 处理 60 min 或在 60℃ 处理 20 min 后仍具较高活性, 且耐受 pH 范围广泛; 培养基中加入 Mg^{2+} 或 Ca^{2+} 可促进噬菌体的裂解, 但培养基中加入柠檬酸钠则可明显抑制噬菌斑的形成。

关键词: 致病性大肠杆菌, 噬菌体, 生物学特性

中图分类号: Q939.48 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 02-0010-04

BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF FOWL INTESTINAL BACTERIOPHAGE

Li Hao XIE Hui-Jun KONG Jian MA Gui-Rong

(State Key Lab of Microbial Technology of Shandong Univ., Jinan 250100)

Abstract: More than ten bacteriophage of *E. coli* were isolated from the soil and the dung of the fowl-run, then three of named bacteriophage A, C, D which lysis *E. coli* virulently were selected to investigate biological characterizations. The results showed that high activities were obtained after the phages incubated at 50℃ for 1 h or 60℃ for 30 min. The phages could be alive at the range of pH from 4 to 12, Ca^{2+} or Mg^{2+} added to the medium could stimulate the lysis of phages. However, the formation of the plaque could be inhibited obviously by adding sodium citrate to the medium.

Key words: Virulent *Escheria coli*, Bacteriophage, Biological characterization

近年来由于细菌抗药性的扩散, 噬菌体治疗日益引起人们的兴趣。动物实验及临床研究表明, 噬菌体可有效防治细菌感染。国外已先后报道了利用病原菌噬菌体控制牛、羊、鱼等动物病原菌危害^[1-3]。致病性大肠杆菌易引发大规模的家禽肠道病, 成为困扰畜禽养殖的主要因素之一。目前对付雏鸡腹泻的主要药物是抗生素, 但长期大量使用抗生素有抗药性扩散及抗生素药物残留等弊端。因此, 分离并研究致病性大肠杆菌的噬菌体, 可为家禽肠道病噬菌体治疗提供理论基础。本研究中我们从发病鸡场中筛选出了 3 株性状稳定的噬菌体, 对其生物学特性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 菌株及噬菌体来源

致病性大肠杆菌系分离自发病鸡肠道; 其噬菌体分离自发病鸡场土壤、鸡粪。

1.2 培养基

EMB 培养基的配制见文献[4], 用作分离致病性大肠杆菌。

下层培养基: LB 培养基 + 2% 琼脂。

上层培养基: LB 培养基 + 0.7% 琼脂。除特殊指出外上层培养基中加入 4 mmol/L

* 山东省科委资助项目 (No.012100104)

收稿日期: 2003-01-07, 修回日期: 2003-03-05

Mg²⁺，于37℃下培养成斑。

1.3 噬菌体效价的测定

按 Adams 双层平板法^[5]将分离的致病性大肠杆菌在 LB 液体培养基中培养 12h，取 200 μL 对数生长期的 *E. coli* 与适当稀释的 100 μL 噬菌体溶液混合于 4 mL 上层培养基中，利用双层平板法测定所形成的噬菌斑数。

1.4 噬菌体的热稳定性测定

将噬菌体原液稀释至 10⁷ pfu/mL，分别于 50℃、60℃、70℃、80℃ 保温 1h，每隔 5 min 取样，样品立即置入冰浴中冷却，经适当稀释后，测定噬菌体效价。

1.5 噬菌体的 pH 稳定性测定

分别取不同 pH 的 1% 蛋白胨液 4.5 mL 加入到内径为 12 mm 的试管中，置于 25℃ 的恒温水浴中，待温度平衡后加入 0.5 mL 10⁷ pfu/mL 的噬菌体溶液，恒温保存 1h 后，将蛋白胨液进行适当稀释，测定噬菌体效价。

1.6 Ca²⁺、Mg²⁺ 离子浓度对噬菌体效价的影响

调节软琼脂层中 Ca²⁺ 或 Mg²⁺ 的不同浓度，取适当稀释度的噬菌体溶液，测定噬菌体效价。

1.7 柠檬酸钠浓度对噬菌体效价的影响

将不同浓度的柠檬酸钠混合于下层培养基中，取适当稀释度的噬菌体溶液，测定不同浓度柠檬酸钠琼脂平板上形成的噬菌斑数。

2 结果

2.1 噬菌体的效价及噬菌斑特征

将一定量的土壤、鸡粪溶于 LB 培养基中，37℃ 富集培养 12h 后，与分离的致病性大肠杆菌 3-2 为寄主，在双层平板上形成大小不同的噬菌斑。用牙签分别挑取大小不同的噬菌斑，置于无菌水中，4℃ 放置 2 h，适当稀释后在测定噬菌斑，使之形成单个噬菌斑。重复上述步骤，直至得到的噬菌斑大小一致，为一纯噬菌体。经过大量的筛选和纯化，共得到噬菌体 10 余株，其中噬菌体 A、C、D 所形成的噬菌斑较大，直径分别为 5.0 mm、6.5 mm、4.5 mm，前两者的噬菌斑大且透明，而后者的噬菌斑大而模糊，培养后溶液中的噬菌体效价可达 10⁸ pfu/mL。

2.2 噬菌体的热稳定性试验

将 10⁷ pfu/mL 噬菌体 A、C、D 溶液分别于 50℃、60℃、70℃、80℃ 保温 20 min，存活率皆以不保温时为 100% 计，其结果如图 1 所示。

由图 1 看出，噬菌体 C、D 在 50℃ 和 60℃ 保温 20 min 后，仍能保持较高的活性，约为原噬菌体效价的 80%，噬菌体 A 活性丧失较快，60℃ 作用 20 min 后，活性丧失约 75%，70℃ 作用 1 h 后，3 种噬菌体活性基本完全丧失。

为进一步检测噬菌体的温度敏感性，将 3 种噬菌体于 60℃ 保温不同时间，结果如图 2 所示。在 60℃ 作用 15 min，噬菌体 C、D 活性几乎没有丧失，而噬菌体 A 则丧失了 70% 活性，随着时间的延长，3 种噬菌体的活性皆逐渐丧失。从图 1、图 2 中可以看出，3 种噬菌体中以噬菌体 D 的温度耐受性最好，C 次之，噬菌体 A 对温度最敏感。

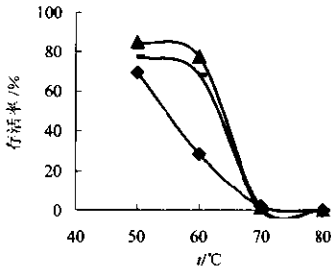


图1 3株噬菌体在不同温度下保温20min后的存活率/%

◆噬菌体 A, ■噬菌体 B, ▲噬菌体 C

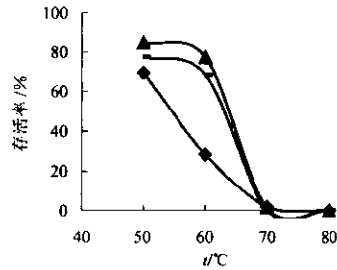


图2 3株噬菌体在60°C水浴中的存活率/%

◆噬菌体 A, ■噬菌体 C, ▲噬菌体 D

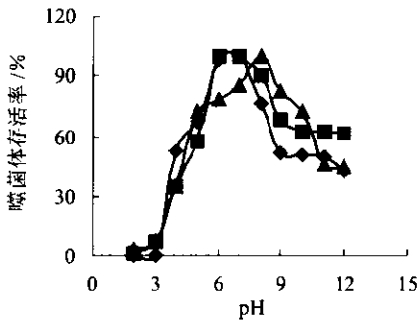


图3 不同pH值对噬菌体效价的影响

◆噬菌体 A, ■噬菌体 B, ▲噬菌体 C

2.3 噬菌体的 pH 稳定性试验

将3株噬菌体在不同 pH 溶液中 25°C 保温 1 h, 测定噬菌体效价, 结果见图 3。由图 3 可看出, 3 株噬菌体对 pH 的适应范围较广, 在 pH 4.0~12.0 范围内仍保持较高活性, 尤其在 pH 6.0~8.0 范围内, 噬菌体活性保持 90% 以上。在碱性条件下, 更利于噬菌体存活; 在 pH 12.0 时, 仍具有近 50% 的活性, pH 低于 4.0 时, 活性很快丧失。

2.4 Ca²⁺、Mg²⁺ 离子浓度对噬菌体效价的影响

将不同浓度的 Ca²⁺、Mg²⁺ 加入培养基中, 对 3 株噬菌体的活性均产生较大影响, 结果见表 1。

表 1 不同 Mg²⁺、Ca²⁺ 浓度对噬菌体效价的影响

噬菌体存活率 (%)	Mg ²⁺ (mmol/L)					Ca ²⁺ (mol/L)				
	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8
A	28.6	55.6	75.7	100	95.7	28.6	48.1	58.6	36.6	30.1
C	68.3	73.6	76.4	100	93.9	68.3	70.3	73.6	93.9	89.2
D	45.2	81.7	95.9	100	115.1	45.2	66.6	78.6	114.3	81.7

注: 成斑率 (%) 皆以 Mg²⁺ 浓度为 6mmol/L 时记作 100%

由表 1 可看出, 随着 Mg²⁺ 浓度的增加, 噬菌体效价增大, 在 6 mmol/L Mg²⁺ 浓度噬菌体 A、C 效价最高, 分别为不添加时的 3.5 倍、1.5 倍。而噬菌体 D 在 8 mmol/L Mg²⁺ 浓度下, 噬菌体效价最高, 为不添加时的 2.5 倍。

Ca²⁺ 添加对噬菌体效价也有促进作用, 但不及 Mg²⁺。噬菌体 A 在 4 mmol/L Ca²⁺ 浓度下, 噬菌体效价最高, 为 1.5 × 10⁸ pfu/mL。噬菌体 C、D 在 Ca²⁺ 浓度为 6 mmol/L 时, 效价最高, 分别可达 8 × 10⁸ pfu/mL、6 × 10⁸ pfu/mL。

平板结果显示, 在相同的培养条件下, 3 株噬菌体在添加有 Ca²⁺ 或 Mg²⁺ 的培养基上所形成的噬菌斑, 均比未添加 Ca²⁺ 或 Mg²⁺ 的培养基上的更大, 且更透明。由此可见, Mg²⁺、Ca²⁺ 有利于噬菌斑的形成, 而 Mg²⁺ 更优于 Ca²⁺。

2.5 柠檬酸钠浓度对噬菌体效价的影响

向培养基中加入一定量的柠檬酸钠对3株噬菌体的噬菌斑形成均有明显的抑制作用(表2)。随着柠檬酸钠浓度的增加,所形成噬菌斑数降低,在0.5%柠檬酸钠浓度下,即完全抑制了噬菌斑的形成。在相同的培养条件下,3株噬菌体在添加有柠檬酸钠的培养基上所形成的噬菌斑,均比未添加柠檬酸钠培养基上的斑小,且模糊。

表2 不同柠檬酸钠浓度对噬菌体效价的影响

噬菌体存活率(%)	柠檬酸钠浓度(%)					
	0	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0
A	100	17.8	0	0	0	0
C	100	59.9	0	0	0	0
D	100	34.1	0	0	0	0

3 讨论

致病性大肠杆菌的噬菌体广泛分布于鸡场的土壤及周围环境中,对清除病原菌的存在起到了积极的作用。从发病鸡场的土壤、粪便中分离出10余株噬菌体,对其中3株噬菌体A、C、D生物活性测定表明,3株对致病性大肠杆菌有强裂解作用的噬菌体对温度有一定的耐受性,这对噬菌体制剂的研制及加工过程极为有利,不会因温度的升高而失活。3株噬菌体对pH的适应范围较广,尤其在中性或碱性条件下活性丧失较少,酸性条件下活性较低,分析其原因,可能是由于寄主菌大肠杆菌的生长条件为中性或偏碱性,在酸性条件下,寄主菌本身生长受到抑制,由此影响噬菌体的生长、繁殖,从而导致噬菌体效价偏低。在实际应用中,噬菌体感染肠道内寄主菌是非常迅速的,受到肠道环境影响较小。且可考虑在体外即对噬菌体进行包装,进一步减少受酸性环境影响的可能。

有文献报道, Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 的存在,可提高噬菌体的活性,本文结果表明 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 的加入,可使噬菌体效价增加,这与报道一致。柠檬酸钠可强烈抑制噬菌斑的形成,可能是由于柠檬酸钠与培养基中 Mg^{2+} 或 Ca^{2+} ,形成一种络合物,而减少了溶液中的 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} ,从而不利于噬菌体对敏感态细胞的吸附。

参考文献

- [1] Smith H W, Huggins M B. *Journal of General Microbiology*, 1982, **128**: 307~318.
- [2] Smith H W, Huggins M B. *Journal of General Microbiology*, 1983, **129**: 2659~2675.
- [3] Park S C, Shimamura I, Fukunaga M, *et al.* *Applied and environmental microbiology*, 2000, **4**: 1416~1422.
- [4] 陈天寿. 微生物培养基的制造和应用. 北京: 农业出版社, 1995.
- [5] Adams M H. *Bacteriophages Interscience*. Publishers Inc New York, 1959.
- [6] 余茂效, 贾盘兴, 徐星, 等. 微生物学报, 1974, **14** (2): 216~223.
- [7] 李维泉, 姚鹤鸣, 沈美娟, 等. 病毒学报, 1999, **15** (2): 172~179.
- [8] 林业杰, 陈亢川, 胡海林, 等. 海峡预防医学杂志, 1998, **4** (1): 9~11.