

鸡源大肠杆菌噬菌体 vB_EcoM-E33 的分离鉴定和基因组特征及其治疗效果评价

王馨锐, 李继桐, 韩丽丽, 任慧英, 刘文华, 张灿*

青岛农业大学动物医学院, 山东 青岛 266109

王馨锐, 李继桐, 韩丽丽, 任慧英, 刘文华, 张灿. 鸡源大肠杆菌噬菌体 vB_EcoM-E33 的分离鉴定和基因组特征及其治疗效果评价[J]. 微生物学通报, 2022, 49(12): 5009-5021

Wang Xinrui, Li Jitong, Han Lili, Ren Huiying, Liu Wenhua, Zhang Can. Chicken-derived coliphage vB_EcoM-E33: isolation, identification, genomic characterization, and evaluation of its therapeutic effect on colibacillosis[J]. Microbiology China, 2022, 49(12): 5009-5021

摘要:【背景】大肠杆菌是导致规模化养殖家禽死亡的重要病原体, 噬菌体防治耐药性细菌感染具有广阔的应用前景。【目的】从鸡场环境样本中分离出噬菌体, 研究其生物学活性特征及其对白羽肉鸡大肠杆菌病的治疗效果。【方法】采用双层平板法分离纯化噬菌体 vB_EcoM-E33 (E33); 利用透射电镜观察其形态特征; 克隆噬菌体 E33 基因组序列并分析其基因组特征; 通过裂解谱、最佳感染复数、理化因子耐受性和一步生长曲线确定噬菌体 E33 的生物学活性; 构建白羽肉鸡大肠杆菌感染模型, 检测噬菌体 E33 的治疗效果。【结果】从鸡场粪便样本中分离到一株 Straboviridae 科噬菌体 E33, 其宿主谱为 35.4% (34/96), 基因组全长为 170 625 bp, 包含 271 个开放阅读框和 2 个 tRNA, 无毒力基因和耐药基因。以 *Escherichia coli* E32 为宿主菌增殖, 噬菌体 E33 的潜伏期为 10 min, 暴发量为 60 PFU/cell; 当感染复数为 0.001 时, 噬菌体 E33 效价最高, 达到 1.93×10^9 PFU/mL; 在 50 °C 以下和 pH 3.0–11.0 范围内活性稳定; 对紫外线敏感。口服 10^8 CFU/mL 的致病性 *E. coli* O78 构建白羽肉鸡感染模型, 肌肉注射 10^8 PFU/mL 噬菌体 E33 具有良好的治疗效果。【结论】噬菌体 E33 具有宿主谱宽、裂解性能高、理化因子耐受性强、不携带有害基因等优点, 具有较好的开发价值, 有望作为抗生素替代品用于鸡场致病性大肠杆菌病的防控。

关键词: 噬菌体; 白羽肉鸡; 生物学特性

基金项目: 山东省自然科学基金面上项目(ZR2021MC053); 山东省现代农业产业技术体系家禽创新团队建设项目(SDAIT-11-03); 青岛农业大学研究生创新计划(QNYCX22005)

Supported by: General Project of Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2021MC053); Modern Agricultural Industrial Technology System Poultry Innovation Team Construction Project of Shandong Province (SDAIT-11-03); Postgraduate Innovation Program of Qingdao Agricultural University (QNYCX22005)

*Corresponding author: E-mail: cleverflame@163.com

Received: 2022-08-04; Accepted: 2022-09-07; Published online: 2022-10-09

Chicken-derived coliphage ν B_EcoM-E33: isolation, identification, genomic characterization, and evaluation of its therapeutic effect on colibacillosis

WANG Xinrui, LI Jitong, HAN Lili, REN Huiying, LIU Wenhua, ZHANG Can*

College of Veterinary Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong, China

Abstract: [Background] Drug-resistant *Escherichia coli* is a major pathogen that causes the death of poultry in large-scale breeding. Virulent phages have broad application prospects in preventing and treating drug-resistant bacterial infections. [Objective] To isolate a phage from the environmental samples of chicken farms, identify the biological characteristics, and evaluate its therapeutic effect on colibacillosis in white feather broilers. [Methods] Phage ν B_EcoM-E33 (E33) was isolated via double-layer plate method. Its morphological characteristics were observed under a transmission electron microscope. After cloning of the genome sequence, the genomic features of the phage were analyzed. The host range, multiplicity of infection (MOI), stability, and one-step growth curve of phage E33 were determined by double-layer plate method. The colibacillosis model was established with white feather broilers to test the therapeutic effect of phage E33. [Results] A bacteriophage E33 of the family Straboviridae was isolated from a chicken feces sample, with a host range of 35.4% (34/96). The full-length genome of phage E33 was 170 625 bp, including 271 open reading frames (ORFs), two tRNAs, and no virulence or resistance gene. *E. coli* E32 was used as the host strain for the proliferation of E33, which showed an incubation period of 10 min and a burst size of 60 PFU/cell. When the MOI was 0.001, phage E33 had the highest titer of 1.93×10^9 PFU/mL. Phage E33 kept stable below 50 °C and within the range of pH 3.0–11.0, while it was sensitive to ultraviolet light. The colibacillosis model of white feather broilers was established by oral administration with 10^8 CFU/mL *E. coli* O78, and intramuscular injection of 10^8 PFU/mL phage E33 demonstrated good therapeutic effect on the model. [Conclusion] Phage E33 has a broad host range, high lysis ability, and good tolerance to physical and chemical factors and does not carry harmful genes. It demonstrates a good development value and is expected to be used as an antibiotic alternative for the prevention and control of colibacillosis in chicken farms.

Keywords: phage; white feather broiler; biological characteristics

我国禽类养殖业规模庞大,其中以蛋鸡和肉鸡的养殖为主^[1-2]。在规模化、集约化、高密度的养殖模式下,极易引起细菌性疫病的发生,其中由致病性大肠杆菌引起的疾病是危害养禽业最严重的细菌性疾病之一。该病一年四季均可发生,而且常与病毒病、寄生虫病等混合感染或继发感染,从而加重病情,鸡群发病率和

死亡率高,防治难度大,严重影响养鸡行业的发展^[3-4]。抗生素应用是防控鸡群细菌病的主要措施,但近年来随着抗生素的大量使用,严重耐药、多重耐药的致病菌迅速发展;同时,新型抗生素研发工作近乎停滞,亟须研发安全、有效的新型抗菌制剂用于耐药菌的防控^[5-6]。

噬菌体是一种特异性感染和裂解细菌的病

毒, 在自然界中广泛存在^[7]。与抗生索的作用机制不同, 噬菌体通过识别细菌表面受体侵染细菌, 因而不受细菌耐药性的限制; 裂解宿主菌具有种属特异性, 使用噬菌体制剂不会影响动物机体正常的菌群构成; 同时噬菌体还具有生产成本低、无药物残留等优点, 逐渐成为新型抗菌制剂研发的热点^[8-9]。近 30 年来大量研究证实, 噬菌体作为抑菌剂在多途径给药中能有效保护动物免受细菌感染且不影响动物的生长, 作为消毒剂能有效抑制环境、生产设备及食品表面细菌的数量等^[10]。目前已有多种噬菌体制剂开发为商业化产品, 广泛应用于动物养殖、净化环境、食品保鲜、耐药菌感染等领域^[11-12]。

本研究从肉鸡养殖场采集的粪便样品中分离得到一株噬菌体 vB_EcoM-E33 (E33), 对其进行基因组特征分析和生物学活性测定, 构建白羽肉鸡的致病性大肠杆菌感染模型, 评价噬菌体 E33 的治疗效果, 以期开发噬菌体制剂应用于临床耐药大肠杆菌的感染提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

粪便样本于 2021 年采集自山东潍坊市肉鸡养殖场。按照青岛农业大学动物医学院动物伦理委员会的指导方针进行(编号: [2020]001), 一周龄品系为哈伯德肉鸡(hubbard breeders chicks)的白羽肉鸡 99 只, 由新希望六和股份有限公司提供。96 株大肠杆菌临床分离株为本实验室分离保存, 用于噬菌体宿主谱的测定; *Escherichia coli* E32 为本实验室分离保存, 用于噬菌体生物学活性测定; 致病性 *E. coli* O78 为本实验室分离鉴定, 用于动物试验。LB 肉汤、琼脂粉、营养琼脂、SS 琼脂、大肠杆菌显色培养基, 青岛海博生物有限公司。恒温振荡培养箱, 上海旻泉仪器有限公司; 台式离心机, 上

海安亭科学仪器厂。

1.2 噬菌体分离

以 *E. coli* E32 作为宿主菌, 参考已报道的方法^[13]进行噬菌体的富集和分离。5 g 粪便样品中加入 100 mL *E. coli* E32 增殖液, 37 °C 培养过夜, 富集噬菌体。混合物在室温下 12 000 r/min 离心 30 min, 取上清液过滤除菌。取 100 μL 滤液加入等量 *E. coli* E32 菌液(10^9 CFU/mL), 双层平板法分离噬菌体。选取单个噬菌斑用生理盐水浸出, 浸出液以 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 按照上述流程双层平板法纯化 3-4 代, 获得纯化的噬菌体, 命名为 vB_EcoM-E33 (E33), 保存于 30% 的甘油中, 于 -80 °C 冻存备用。

1.3 噬菌体宿主谱的测定

选择 96 株大肠杆菌临床分离株, 用双层平板法测定噬菌体 E33 的宿主谱。取 100 μL 对数期宿主菌(1×10^8 CFU/mL)与等体积适宜浓度(10^2 - 10^3 PFU/mL)的噬菌体增殖液混匀, 孵育 5 min, 加入 3 mL 预热到 50 °C 的上层琼脂培养基, 充分混匀后铺到琼脂平板, 将平板倒置于 37 °C 温箱中培养 5 h, 观察噬菌斑出现情况, 确定噬菌体的宿主谱。

1.4 噬菌体电镜形态观察

取 10 μL 噬菌体增殖液(10^9 PFU/mL)滴加到铜网上, 静置 15 min, 用滤纸吸去多余液体, 滴加 10 μL 的 2% 磷钨酸染色 5 min, 晾干, 在透射电镜下观察噬菌体的形态特征。

1.5 噬菌体的生物学活性测定

1.5.1 噬菌体的最佳感染复数测定

取 100 μL 的噬菌体增殖液(10^6 PFU/mL)分别与 100 μL 不同稀释度的宿主菌 *E. coli* E32 菌液(10^5 - 10^{10} CFU/mL)按照感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 10、1、0.1、0.01、0.001、0.000 1 的比例混匀, 加入 5 mL 的 LB 肉汤, 37 °C、220 r/min 振荡培养 3 h。将培养液 12 000 r/min

离心 5 min, 取上清抽滤, 获得噬菌体增殖液, 双层平板法测定不同 MOI 条件下的噬菌体效价, 设 3 个平行, 确定噬菌体的最佳感染复数。

1.5.2 噬菌体的一步生长曲线测定

取 100 μL 宿主菌 *E. coli* E32 菌液(10^7 CFU/mL) 与 100 μL 噬菌体增殖液(10^6 PFU/mL)混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 5 min, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃上清。用 7 mL LB 肉汤重悬沉淀, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 220 r/min 振荡培养, 定时取 200 μL 增殖液(第 1 小时间隔 5 min, 第 2 小时间隔 20 min, 第 3 小时间隔 30 min), 12 000 r/min 离心 1 min, 取上清稀释到适宜的浓度(10^2 – 10^3 PFU/mL), 双层平板法测定噬菌体效价, 设 3 个平行, 确定噬菌体的一步生长曲线。

1.5.3 噬菌体的热稳定性测定

取 2 mL 噬菌体增殖液(10^8 PFU/mL)分别置于 30、40、50、60 和 70 $^{\circ}\text{C}$ 条件下水浴, 每 20 min 取样 300 μL , 设 3 个平行, 双层平板法测定噬菌体的效价, 确定噬菌体在不同温度下的稳定性。

1.5.4 噬菌体的 pH 耐受性测定

取 2 mL 噬菌体增殖液(10^8 PFU/mL)分别置于 pH 为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 和 12.0 的 LB 肉汤中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下静置孵育, 每小时取样 300 μL , 设 3 个平行, 双层平板法测定噬菌体效价, 评价噬菌体在不同 pH 条件下的稳定性。

1.5.5 噬菌体的紫外线敏感性测定

取 2 mL 噬菌体增殖液(10^8 PFU/mL)倒入无菌平板(直径 60 mm)中, 将平板开盖置于紫外灯下 50 cm 处连续照射。每 10 min 取样 300 μL , 设 3 个平行, 双层平板法测定噬菌体效价, 确定噬菌体对紫外线照射的敏感性。

1.6 噬菌体基因组测序和分析

取噬菌体 E33 增殖液样品, 送深圳市惠通生物科技有限公司, 以 Illumina HiSeq 平台进行

全基因组测序, 用 SPAdes 软件进行序列组装, 用 GeneMarkS 软件进行编码基因预测, 并将预测的开放阅读框(open reading frame, ORF)分别与 Nr、COG、eggNOG、KEGG、SwissProt 和 GO 数据库进行 BLAST 比对, 完成基因组的注释。通过 tRNAscan-SE (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>)查找基因组中的 tRNA。通过抗生素耐药基因数据库(<https://card.mcmaster.ca/>)查找基因组中潜在的抗性基因。通过毒力因子数据库(<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>)查找基因组中潜在的毒力基因。将噬菌体 E33 的全基因组序列和末端酶大亚基分别在 GenBank 数据库中进行相似性比对, 选择 10 株相似性较高的噬菌体, 在 MEGA 11.0 软件中用 neighbor-joining 方法(默认参数)分别绘制进化树。

1.7 噬菌体治疗大肠杆菌感染的效果测定

1.7.1 大肠杆菌感染模型的建立

取 24 只 1 周龄生长状况良好的白羽肉鸡, 随机分 4 组。空白对照组口服 1 mL 生理盐水, 试验组分别口服 1 mL 不同浓度(10^6 、 10^7 和 10^8 CFU/mL)的致病性 *E. coli* O78 (表 1), 每天观察记录鸡只的精神状况及死亡率, 参考改良寇氏法将数据代入 $LD_{50} = \lg^{-1}[Xm - i(\sum P - 0.5)]$ (i 为组距, 即相邻两组剂量对数剂量之差; Xm 为最大剂量对数值; P 为各剂量组死亡率, 用小数表示; $\sum P$ 为各组动物死亡率的总和)算出致病菌半数致死量。剖检死亡鸡只, 与对照组比较, 观察其内脏器官病变特征, 在无菌条件下取肝脏组织, 在 SS 琼脂平板和大肠杆菌显色培养基上进行细菌分离, 确定鸡只的死亡原因。

1.7.2 噬菌体 E33 的治疗效果测定

取 75 只 1 周龄的白羽肉鸡, 随机分成 5 组, 各组鸡只口服 1 mL 致病性 *E. coli* O78 (10^8 CFU/mL), 空白对照组口服等体积的生理盐水。2 h 后, 各试验组肌肉注射 10^6 – 10^8 PFU/mL 的噬菌体

表 1 大肠杆菌的血清型和噬菌体 E33 的宿主谱

Table 1 Serotype of *Escherichia coli* and host spectrum of phage E33

菌株名称 Strain name	血清型 Serotype	vB_EcoM-E33 宿主谱 vB_EcoM-E33 host spectrum	菌株名称 Strain name	血清型 Serotype	vB_EcoM-E33 宿主谱 vB_EcoM-E33 host spectrum
<i>E. coli</i> E1	O78:K80 (B)		<i>E. coli</i> E49	O15	
<i>E. coli</i> E2	O125:K70 (B15)		<i>E. coli</i> E50	O55:K59 (B5)	
<i>E. coli</i> E3	O25:K19 (L)		<i>E. coli</i> E51	O25:K19 (L)	+
<i>E. coli</i> E4	O55:K59 (B5)	+	<i>E. coli</i> E52	O78:K80 (B), O55:K59 (B5)	
<i>E. coli</i> E5	O15	+	<i>E. coli</i> E53	O78:K80 (B)	
<i>E. coli</i> E6	O125:K70 (B15)		<i>E. coli</i> E54	O78:K80 (B)	+
<i>E. coli</i> E7	O78:K80 (B)		<i>E. coli</i> E55	–	
<i>E. coli</i> E8	O114:K90 (B)		<i>E. coli</i> E56	O25:K19 (L)	
<i>E. coli</i> E9	O78:K80 (B)		<i>E. coli</i> E57	O114:K90 (B)	+
<i>E. coli</i> E10	O119:K69 (B14)		<i>E. coli</i> E58	O111:K58 (B4)	
<i>E. coli</i> E11	O14:K90 (B)		<i>E. coli</i> E59	O111:K58 (B4)	
<i>E. coli</i> E12	–		<i>E. coli</i> E60	O7:K1 (L)	
<i>E. coli</i> E13	O8:K40 (A):K47 (A)		<i>E. coli</i> E61	O119:K69 (B14)	
<i>E. coli</i> E14	O127a:K63 (B8)		<i>E. coli</i> E62	O86:K61 (B7)	+
<i>E. coli</i> E15	–		<i>E. coli</i> E63	O15	+
<i>E. coli</i> E16	O25:K19 (L)	+	<i>E. coli</i> E64	O78:K80 (B)	
<i>E. coli</i> E17	O25:K19 (L)		<i>E. coli</i> E65	O55:K59 (B5)	+
<i>E. coli</i> E18	O15		<i>E. coli</i> E66	O111:K58 (B4)	+
<i>E. coli</i> E19	O111:K58 (B4)		<i>E. coli</i> E67	O7:K1 (L)	
<i>E. coli</i> E20	O142:K86 (B)		<i>E. coli</i> E68	O6:K15	+
<i>E. coli</i> E21	O128:K67 (B12)		<i>E. coli</i> E69	O78:K80 (B)	
<i>E. coli</i> E22	O6:K15		<i>E. coli</i> E70	O125:K70 (B15)	+
<i>E. coli</i> E23	O125:K70 (B15)		<i>E. coli</i> E71	O111:K58 (B4)	+
<i>E. coli</i> E24	O125:K70 (B15)	+	<i>E. coli</i> E72	–	+
<i>E. coli</i> E25	O114:K90 (B)	+	<i>E. coli</i> E73	O86:K61 (B7)	+
<i>E. coli</i> E26	O7:K1 (L)	+	<i>E. coli</i> E74	O125:K70 (B15)	+
<i>E. coli</i> E27	O143	+	<i>E. coli</i> E75	O111:K58 (84)	+
<i>E. coli</i> E28	O55:K59 (B5)		<i>E. coli</i> E76	–	+
<i>E. coli</i> E29	O78:K80 (B)		<i>E. coli</i> E77	–	
<i>E. coli</i> E30	O78:K80 (B)		<i>E. coli</i> E78	O78:K80 (B)	
<i>E. coli</i> E31	O29		<i>E. coli</i> E79	–	+
<i>E. coli</i> E32 ^A	O78:K80 (B)	+	<i>E. coli</i> E80	O78:K80 (B)	+
<i>E. coli</i> E33	O78:K80 (B)		<i>E. coli</i> E81	O78:K80 (B)	+
<i>E. coli</i> E34	O20:K17 (L)	+	<i>E. coli</i> E82	O78:K80 (B)	
<i>E. coli</i> E35	–	+	<i>E. coli</i> E83	–	
<i>E. coli</i> E36	–		<i>E. coli</i> E84	O78:K80 (B)	
<i>E. coli</i> E37	O111:K58 (B4)		<i>E. coli</i> E85	–	+
<i>E. coli</i> E38	O128:K67 (B12)		<i>E. coli</i> E86	–	

(待续)

				(续表 1)	
<i>E. coli</i> E39	-			<i>E. coli</i> E87	- +
<i>E. coli</i> E40	O86:K61 (B7)			<i>E. coli</i> E88	O78:K80 (B) +
<i>E. coli</i> E41	O114:K90 (B)			<i>E. coli</i> E89	-
<i>E. coli</i> E42	O136:K78			<i>E. coli</i> E90	-
<i>E. coli</i> E43	O55:K59 (B5)	+		<i>E. coli</i> E91	O78:K80 (B)
<i>E. coli</i> E44	O44:K7 (L)			<i>E. coli</i> E92	- +
<i>E. coli</i> E45	O114:K90 (B)			<i>E. coli</i> E93	-
<i>E. coli</i> E46	O125:K70 (B15)			<i>E. coli</i> E94	-
<i>E. coli</i> E47	O7:K1 (L)			<i>E. coli</i> E95	O4
<i>E. coli</i> E48	O142:K86 (B)			<i>E. coli</i> E96	O78:K80 (B) +

注: ^A: 感染模型使用菌株; -: 未检出血清型; +: 噬菌体能够裂解的细菌

Note: ^A: Strains used in infection models; -: No serotype detected; +: Bacteria that can be lysed by phage.

1 mL, 各对照组肌肉注射等体积的生理盐水。分组及给药情况见表 2。在注射噬菌体后 1、2、4、8 h 时间点进行翅缘静脉采血, 双层平板法测定血液中噬菌体数量的动态变化。每天观察各组鸡只的精神状况, 统计肉鸡的死亡情况绘制生存曲线。称量各组鸡只攻毒前与攻毒 8 d 后的体重, 比较各组鸡只体重的差异。

2 结果与分析

2.1 噬菌体 E33 的形态学特征

从粪便样本分离得到一株大肠杆菌噬菌体 E33, 能够在 *E. coli* E32 的菌苔上形成透明的噬

斑, 直径 0.4–0.6 mm (图 1A)。透射电镜下, 噬菌体 E33 具有约 100 nm 的正二十面体头部和一个可伸缩的尾部, 长度约 100–120 nm (图 1B)。根据国际病毒分类学委员会的分类规则, 噬菌体 E33 属于 Caudoviricetes 目 Straboviridae 科^[14]。

2.2 噬菌体 E33 的生物学特性

用 96 株大肠杆菌临床分离株测定噬菌体 E33 的裂解谱为 35.4% (34/96) (表 1)。以 *E. coli* E32 作为宿主菌测定噬菌体 E33 的生物学特征。当 MOI 为 0.001 时, 噬菌体 E33 效价最高, 为 1.93×10^9 PFU/mL (表 3)。在 pH 3.0–11.0 和 50 °C

表 2 分组及给药方案

Table 2 Grouping and dosing schedule

实验分组	(0 h)口服	(2 h)肌肉注射
Trial grouping	(0 h) Oral	(2 h) Intramuscular injection
High-dose phage group	1 mL <i>E. coli</i> O78 (10^8 CFU/mL)	1 mL E33 (10^8 PFU/mL)
Medium-dose phage group	1 mL <i>E. coli</i> O78 (10^8 CFU/mL)	1 mL E33 (10^7 PFU/mL)
Low-dose phage group	1 mL <i>E. coli</i> O78 (10^8 CFU/mL)	1 mL E33 (10^6 PFU/mL)
Control group	1 mL <i>E. coli</i> O78 (10^8 CFU/mL)	1 mL normal saline
Blank group	1 mL normal saline	1 mL normal saline

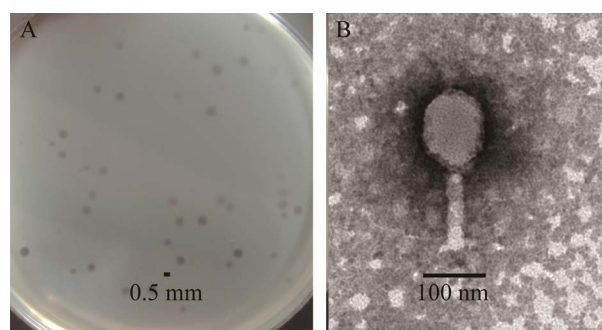


图 1 噬菌体 E33 形态观察结果 A: 噬菌斑形态; B: 透射电镜下噬菌体形态(40 000×)

Figure 1 Morphological observation of phage E33. A: Plaque morphology; B: Phage morphology under transmission electron microscope (40 000×).

表 3 噬菌体 E33 最佳感染复数的测定

Table 3 Determination of optimal multiplicity of infection (MOI) of phage E33

噬菌体效价 Phage titer (PFU/mL)	宿主细菌效价 Host bacterial titer (CFU/mL)	感染复数 MOI	噬菌体增殖效价 Phage proliferative titer (PFU/mL)
1.6×10^6	2.6×10^5	10	1.33×10^5
1.6×10^6	2.6×10^6	1	2.32×10^5
1.6×10^6	2.6×10^7	0.1	2.70×10^5
1.6×10^6	2.6×10^8	0.01	3.90×10^5
1.6×10^6	2.6×10^9	0.001	1.93×10^9
1.6×10^6	2.6×10^{10}	0.000 1	6.23×10^7

以下范围内能保持原有活性(图 2A、2B), 但噬菌体 E33 对紫外线照射敏感, 2 min 内即失活。噬菌体 E33 以 *E. coli* E32 为宿主菌增殖, 其潜伏期为 10 min, 暴发期为 35 min, 暴发量为 60 PFU/cell (图 2C)。

2.3 噬菌体 E33 的基因组特征

基因组已上传至 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 登录号为 OL780484.1。噬菌体 E33 基因组为双链 DNA, 全长为 170 625 bp, GC 含量为 39.6%。共注释 271 个 ORF, 其中 4 个 ORF 在数据库中未发现同源序列, 预测出 2 个 tRNA, 分别为 tRNA-Met (CAT) 和 tRNA-Arg (TCT), 未检测到耐药基因和毒力基因(图 3)。

共有 128 个 ORF 注释为已知功能的基因, 包括 46 个编码结构蛋白的基因, 如编码颈部蛋白、头部外衣壳蛋白和尾鞘蛋白等基因; 79 个 DNA 复制与代谢相关基因, 如编码 DNA 聚合酶、nudix 水解酶和翻译阻遏蛋白等基因, 以及 3 个裂解相关基因内溶素、基板中枢亚基和尾部溶菌酶及穿孔素(图 3)。

利用 MEGA 11 软件基于 11 个同源噬菌体全基因组构建进化树, 选用 neighbor-joining 方法(默认参数)。结果分成两大分支, 对进化树分支距离分析发现噬菌体 E33 与噬菌体 IME540

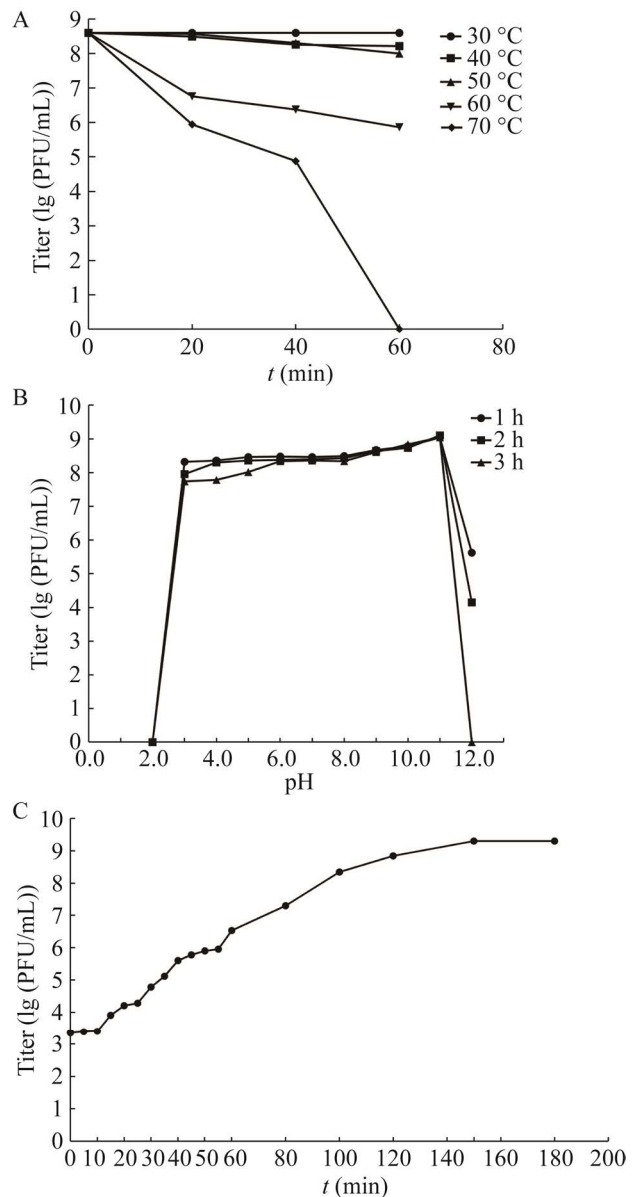


图 2 噬菌体生物学活性测定 A: 噬菌体温度稳定性; B: 噬菌体 pH 稳定性; C: 噬菌体一步生长曲线

Figure 2 Determination of phage biological activity. A: Temperature stability; B: pH stability; C: One-step growth curve.

(MT150133.1)最为相近, 其覆盖率为 90%, 相似度达 97.33%, 具有共同的进化起源, 噬菌体 E33 应属于 Straboviridae 科噬菌体(图 4A)。为进一步明确其亲缘关系, 选取 11 个同源噬菌体

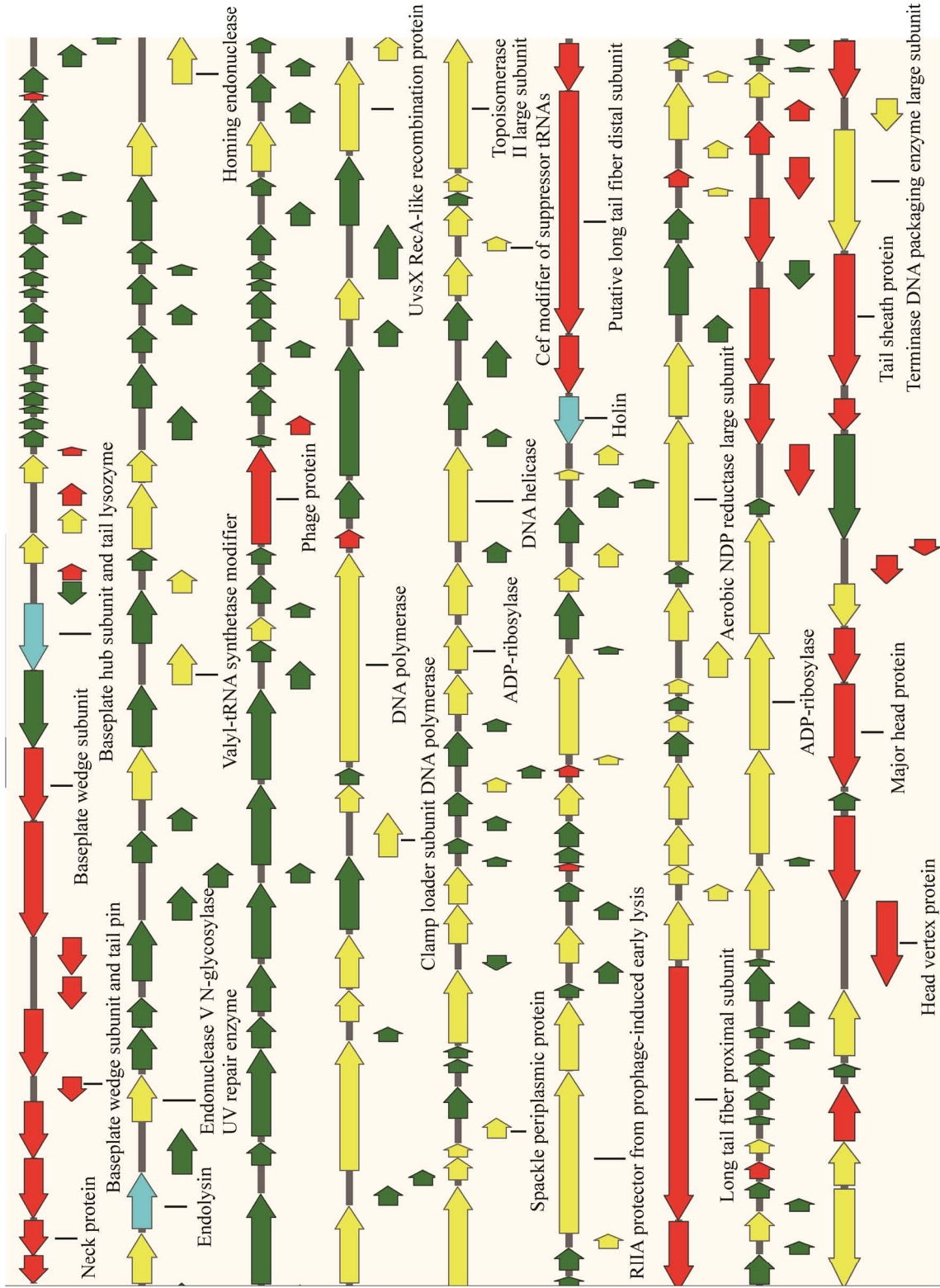


图3 噬菌体 E33 基因组 红色：结构蛋白；绿色：假设蛋白；黄色：DNA 复制与代谢蛋白；蓝色：裂解蛋白
 Figure 3 Phage E33 genome. Red: Structural proteins; Green: Hypothetical proteins; Yellow: DNA replication and metabolism proteins; Blue: Cleavage proteins.

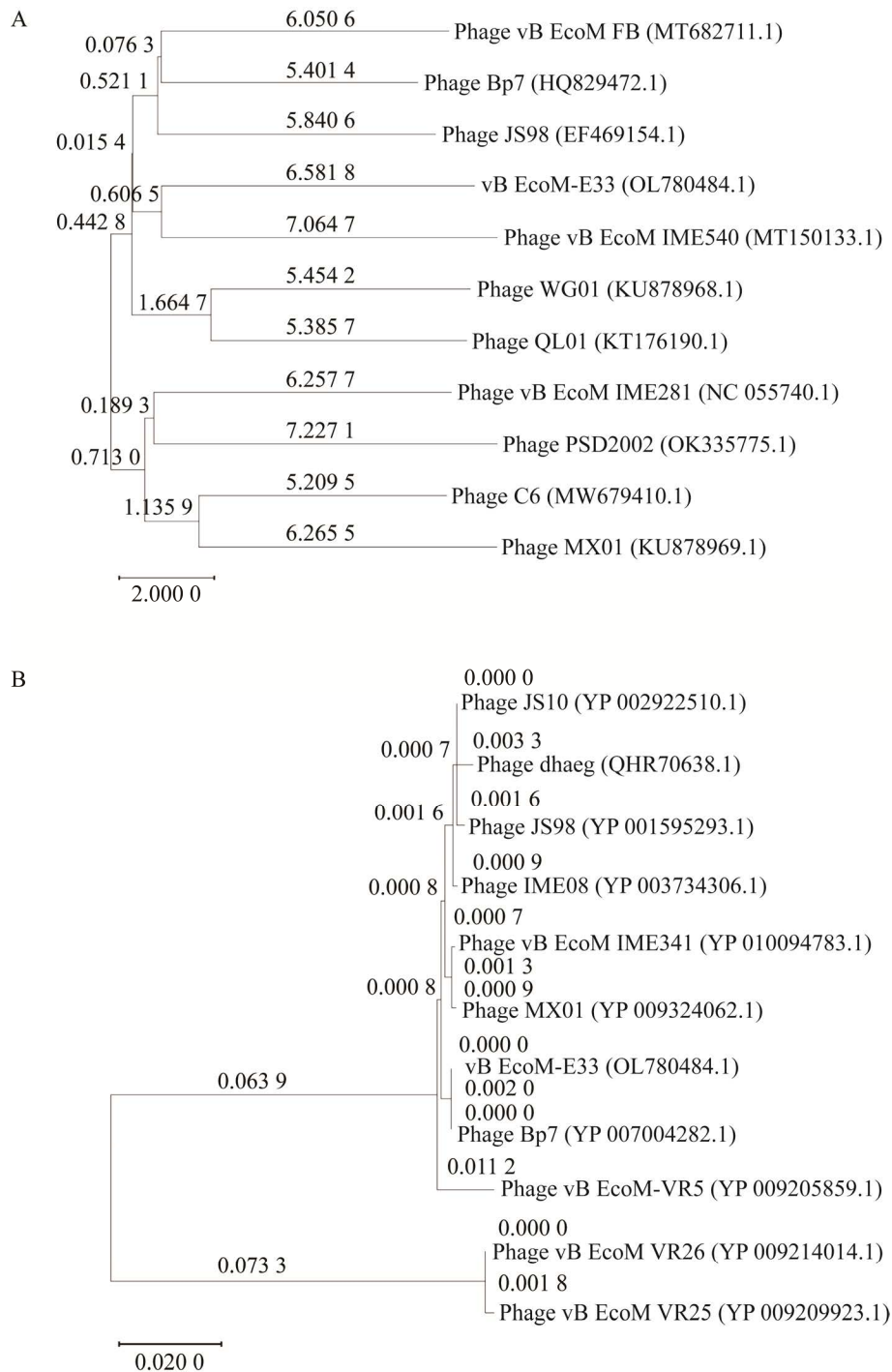


图 4 噬菌体 E33 的进化树 A: 噬菌体基因组序列; B: 末端酶大亚基。标尺: 代表遗传距离; 括号内序号: 噬菌体或蛋白的登录号; 分支点上的数字: 数字代表亲缘关系的远近

Figure 4 Evolutionary tree of phage E33. A: Phage genome sequence; B: Terminase DNA packaging enzyme large subunit. Scale: The genetic distance; In parentheses serial number: The registration number representing the phage or protein; Number on branch point: Numbers indicate proximity of relatives.

的末端大亚基构建进化树,结果分成两大分支,噬菌体 E33 与其中 7 株噬菌体亲缘关系近且均属于 Dhakavirus,而与另外一分支的 2 株噬菌体亲缘关系较远且属于 Gaprivervirus (图 4B),因此噬菌体 E33 更可能属于 Dhakavirus。

2.4 噬菌体治疗大肠杆菌感染的效果

2.4.1 *Escherichia coli* O78 感染模型的建立

白羽肉鸡口服接种致病性 *E. coli* O78, 建立动物感染模型, 半数致死接种剂量为 10^8 CFU/只。解剖死亡的鸡只, 对照组可见肝脏呈暗红色无出血点, 肠道无肿胀(图 5A), 感染组可见肝脏有明显淤血, 肠道有鼓气、出血现象(图 5B)。无菌取肝脏病变组织进行培养, 在 SS 琼脂平板上长出大量表面光滑的粉红色菌落(图 5C), 在大肠杆菌显色培养基上长出大量表面光滑的蓝色菌落(图 5D), 符合大肠杆菌菌落形态及显色特征, 因而判定鸡只死亡原因为大肠杆菌感染, 成功建立大肠杆菌感染动物模型。

2.4.2 噬菌体 E33 的治疗效果测定

试验组鸡只接种致病性大肠杆菌 2 h 后, 肌肉注射不同剂量的噬菌体, 采血检测血液中噬菌体数量的动态变化。高剂量组的鸡只血液

中的噬菌体在 2 h 内数量迅速升高, 随后下降; 而中剂量组和低剂量组噬菌体数量持续下降, 各组血液中噬菌体均在 8 h 内完全清除(图 6)。各组鸡只生存曲线结果表明, 高剂量组接种 10^8 PFU 噬菌体可以完全保护鸡只, 试验过程中未出现死亡情况; 中剂量组和低剂量组均出现死亡, 所有个体均为前 5 天死亡, 死亡率分别为 13.3%和 20.0%(图 7)。

3 讨论

目前, 使用抗生素是鸡场大肠杆菌病的主要防控措施, 但在全球范围内耐药性大肠杆菌迅速发展的背景下, 迫切需求能防控临床耐药菌的新型抑菌制剂^[15]。在养殖业全面限抗的背景下, 噬菌体因其特异性强、不受细菌耐药性影响、对哺乳动物无毒副作用、无药物残留等优势成为关注的热点之一。作为活的生物, 明确噬菌体的基因组及生物学活性特征, 是筛选噬菌体应用于临床的前提。本研究从鸡场的粪样中分离到一株大肠杆菌烈性噬菌体 E33, 并对其基因组及生物学特征展开研究。

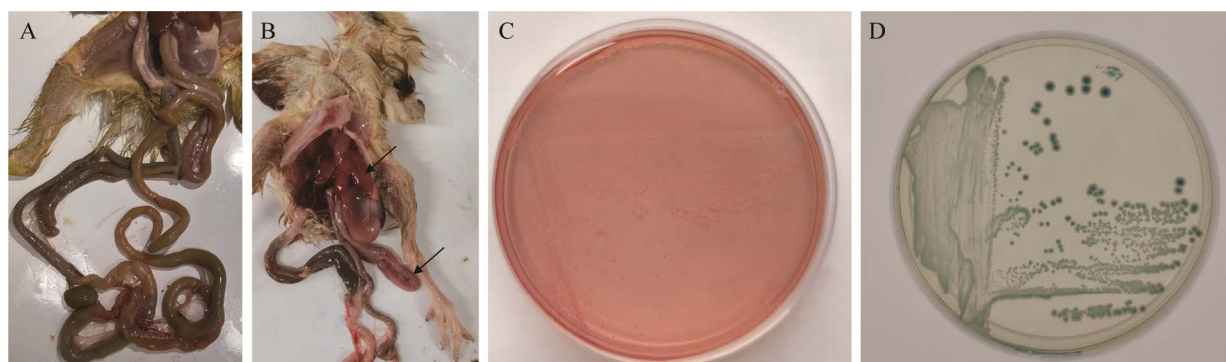


图 5 白羽肉鸡动物感染模型 A: 对照组内脏器官; B: 感染组内脏器官; C: SS 琼脂培养基菌落形态; D: 大肠杆菌显色培养基菌落形态

Figure 5 White feather broiler infection model. A: Internal organs of the control group; B: Infection group internal organs; C: Colony morphology on SS agar medium; D: Colony morphology on chromogenic medium.

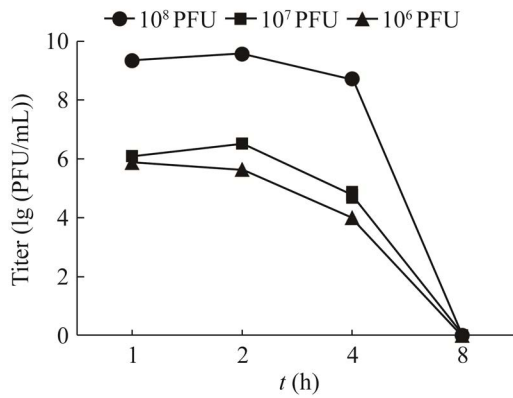


图 6 大肠杆菌噬菌体在血液中的动态代谢
Figure 6 Dynamic metabolism of *Escherichia coli* in blood.

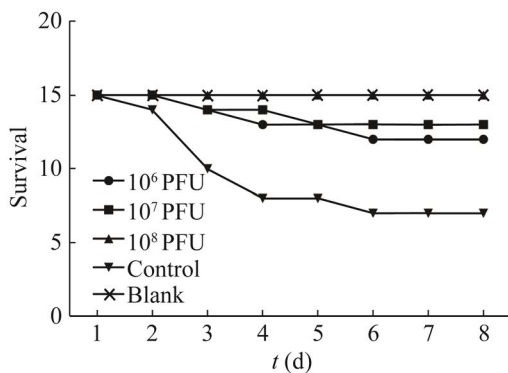


图 7 噬菌体 E33 对不同组鸡治疗的生存曲线
Figure 7 Survival curve of phage E33 in different groups of chickens.

噬菌体作为细菌的天敌, 其裂解细菌的机制与抗生素不同。噬菌体通过吸附细菌表面的脂多糖或膜蛋白等受体完成侵染过程, 通过释放子代噬菌体裂解细菌^[16]。不同噬菌体识别宿主菌的表面受体不同决定了其裂解谱, 大肠杆菌外膜结构复杂, 血清型众多、宽宿主谱的大肠杆菌噬菌体可以大幅提高临床使用过程中的抑菌效率, 具有更高的应用价值^[17]。与报道的噬菌体 BP16、PLCF1 相比, 噬菌体 E33 的裂解谱达到 35.4% (34/96), 表现出宽宿主谱的特征^[18-19]。另外, 噬菌体制剂在临床使用过程中, 还需要

满足增殖效价高、理化因子耐受性好、裂解能力强等特点^[20]。噬菌体 E33 在 pH 3.0–11.0 范围内效价稳定, 比噬菌体 V-EcoM-C1 具有更好的酸碱耐受度, 展现出作为环境消毒剂的应用潜力^[21]。

噬菌体根据其侵染细菌的过程, 可分为溶原性噬菌体和裂解性噬菌体。裂解性噬菌体是临床应用的首选, 而溶原性噬菌体将其基因组整合到细菌基因组上, 随着宿主菌的增殖而增殖, 可将携带的有害基因(耐药或毒力基因等)实现水平转移, 存在潜在的生物安全风险^[22]。因此, 噬菌体制剂在使用之前, 须对其遗传信息有清晰的了解, 以确保噬菌体的有效性和安全性^[23]。噬菌体 E33 的基因组不携带耐药基因、毒力基因或溶原性相关基因, 符合临床噬菌体制剂的要求。

噬菌体随着细菌的增殖而复制, 直至清除宿主菌^[24]。已有报道表明, 动物机体存在复杂的免疫系统, 噬菌体作为外来抗原虽然能引起机体产生免疫应答, 但依旧能够有效地预防和治疗细菌病^[25-26]。对于机体免疫系统对噬菌体制剂的影响也早有报道证明, 在急性感染的治疗中, 噬菌体制剂效果不会被过度抑制, 因为噬菌体的抗菌作用在抗体形成之前就已生效^[27]。噬菌体 E33 在动物试验中也验证了这一点, 注射 10⁸ PFU 的噬菌体能够有效保护动物, 而且并未出现明显副作用, 表明了噬菌体 E33 作为药用抗菌剂的可行性。

4 结论

本研究从鸡场粪便样本中分离得到大肠杆菌噬菌体 E33, 属于 Straboviridae, 具有较宽的裂解谱及良好的增殖效率, 裂解能力强, 对 pH 耐受性好, 不携带耐药基因、毒力基因或溶原性相关基因, 可有效治疗由致病性大肠杆菌感

染引起的白羽肉鸡大肠杆菌病。本研究为进一步开发噬菌体制剂提供数据支持,为使用噬菌体制剂防控细菌病提供了新的参考。

REFERENCES

- [1] 辛翔飞, 郑麦青, 文杰, 王济民. 2021 年我国肉鸡产业形势分析、未来展望与对策建议[J]. 中国畜牧杂志, 2022, 58(3): 222-226
Xin XF, Zheng MQ, Wen J, Wang JM. Analysis of China's broiler industry situation, future prospects and countermeasures in 2021[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2022, 58(3): 222-226 (in Chinese)
- [2] 李莎莎, 朱宁, 马骥. 我国蛋鸡专业化育成发展的现状、困境及对策建议[J]. 中国家禽, 2018, 40(19): 1-5
Li SS, Zhu N, Ma J. Current situation, dilemma and countermeasures of cultivation specialization of layers in China[J]. China Poultry, 2018, 40(19): 1-5 (in Chinese)
- [3] Badr H, Nabil NM, Tawakol MM. Effects of the prebiotic lactoferrin on multidrug-resistant *Escherichia coli* infections in broiler chickens[J]. Veterinary World, 2021, 14(8): 2197-2205
- [4] Liu HF, Chen LP, Si W, Wang CL, Zhu FN, Li GX, Liu SG. Physiology and pathogenicity of *cpdB* deleted mutant of avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. Research in Veterinary Science, 2017, 111: 21-25
- [5] Laube H, Friese A, von Salviati C, Guerra B, Käsbohrer A, Kreienbrock L, Roesler U. Longitudinal monitoring of extended-spectrum-beta-lactamase/AmpC-producing *Escherichia coli* at German broiler chicken fattening farms[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(16): 4815-4820
- [6] 刘昌孝, 王玉丽, 伊秀林. 后疫情时代抗感染药物的发展[J]. 中国抗生素杂志, 2021, 46(1): 1-10
Liu CX, Wang YL, Yi XL. Development of anti-infective drugs in post-epidemic era of COVID-19[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2021, 46(1): 1-10 (in Chinese)
- [7] Isaev AB, Musharova OS, Severinov KV. Microbial arsenal of antiviral defenses-part II[J]. Biochemistry (Moscow), 2021, 86(4): 449-470
- [8] 陶程琳, 王少辉, 张耀东, 易正飞, 信素华, 王瑶, 李妍, Afayibo Dossêh Jean Apôtre, 朱红, 李涛, 等. 噬菌体疗法预防细菌性感染的研究进展及发展方向[J]. 中国兽医科学, 2020, 50(9): 1167-1175
Tao CL, Wang SH, Zhang YD, Yi ZF, Xin SH, Wang Y, Li Y, Afayibo DJA, Zhu H, Li T, et al. Advances and development direction of bacteriophage therapy for preventing bacterial infection[J]. Chinese Veterinary Science, 2020, 50(9): 1167-1175 (in Chinese)
- [9] 杜新永, 吴赞峰. 噬菌体在白羽肉鸡绿色养殖中的应用[J]. 家禽科学, 2021(5): 32-36
Du XY, Wu ZF. Application of bacteriophage in green breeding of white feather broilers[J]. Poultry Science, 2021(5): 32-36 (in Chinese)
- [10] Żbikowska K, Michalczyk M, Dolka B. The use of bacteriophages in the poultry industry[J]. Animals: an Open Access Journal from MDPI, 2020, 10(5): 872
- [11] Trottereau A, Schouler C. Use of a chicken embryo lethality assay to assess the efficacy of phage therapy[J]. Methods in Molecular Biology, 2019, 1898: 199-205
- [12] Liu Y, Gong QW, Qian XJ, Li DZ, Zeng H, Li YH, Xue F, Ren JL, Ge XZ, Tang F, et al. Prophage phiv205-1 facilitates biofilm formation and pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli* strain DE205B[J]. Veterinary Microbiology, 2020, 247: 108752
- [13] 齐心, 梅纪坤, 张灿. 1 株貂源绿脓杆菌噬菌体的分离与鉴定[J]. 中国兽医杂志, 2019, 55(4): 48-51
Qi X, Mei JK, Zhang C. Isolation and identification of *Pseudomonas aeruginosa* phage from mink feces[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2019, 55(4): 48-51 (in Chinese)
- [14] Lavigne R, Darius P, Summer EJ, Seto D, Mahadevan P, Nilsson AS, Ackermann HW, Kropinski AM. Classification of *Myoviridae* bacteriophages using protein sequence similarity[J]. BMC Microbiology, 2009, 9: 224
- [15] Yang L, Shen YB, Jiang JY, Wang XY, Shao DY, Lam MMC, Holt KE, Shao B, Wu CM, Shen JZ, et al. Distinct increase in antimicrobial resistance genes among *Escherichia coli* during 50 years of antimicrobial use in livestock production in China[J]. Nature Food, 2022, 3(3): 197-205
- [16] Ge HJ, Hu MZ, Zhao G, Du Y, Xu NN, Chen X, Jiao XN. The "fighting wisdom and bravery" of tailed phage and host in the process of adsorption[J]. Microbiological Research, 2020, 230: 126344
- [17] Alemayehu D, Casey PG, McAuliffe O, Guinane CM, Martin JG, Shanahan F, Coffey A, Ross RP, Hill C. Bacteriophages ϕ MR299-2 and ϕ NH-4 can eliminate *Pseudomonas aeruginosa* in the murine lung and on cystic fibrosis lung airway cells[J]. mBio, 2012, 3(2): e00029-12
- [18] 赵尊福, 阳亭亭, 张焕容. 某鸡场大肠杆菌噬菌体的

- 分离鉴定及其生物学特性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(6): 2204-2211
- Zhao ZF, Yang TT, Zhang HR. Isolation, identification and biological characteristics of coliphage from a chicken farm[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2021, 48(6): 2204-2211 (in Chinese)
- [19] 路建彪, 王顺山, 王俊丽, 李玉保, 司振书, 杨文文, 庞喆羽, 徐欣璐, 管玉堂, 孟凡达, 等. 鸡源大肠杆菌噬菌体的分离鉴定及组合应用[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2021(20): 61-65, 69, 154
- Lu JB, Wang SS, Wang JL, Li YB, Si ZS, Yang WW, Pang ZY, Xu XL, Guan YT, Meng FD, et al. Isolation, identification and combined application of phages of *Escherichia coli* from chicken[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2021(20): 61-65, 69, 154 (in Chinese)
- [20] Wang ZF, Zheng PP, Ji WH, Fu Q, Wang HG, Yan YX, Sun JH. SLPW: a virulent bacteriophage targeting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* *in vitro* and *in vivo*[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 934
- [21] 孙利厂, 周艳, 张莉莉, 庞茂达, 何涛, 包红朵, 张辉, 何灵尘, 王冉. 1 株宽噬菌谱肠出血性大肠杆菌噬菌体的分离及生物学特性分析[J]. 中国动物传染病学报, 2018, 26(6): 58-63
- Sun LC, Zhou Y, Zhang LL, Pang MD, He T, Bao HD, Zhang H, He LC, Wang R. Isolation and biological characteristics of lytic enterohemorrhagic *Escherichia coli* bacteriophage[J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2018, 26(6): 58-63 (in Chinese)
- [22] 崔泽林, 郭晓奎, 李莉, 冯婷婷. 噬菌体抗菌治疗安全性评估体系的建立[J]. 微生物学报, 2018, 58(11): 2033-2039
- Cui ZL, Guo XK, Li L, Feng TT. Establishment of safety assessment system of phage therapy[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(11): 2033-2039 (in Chinese)
- [23] Rios AC, Moutinho CG, Pinto FC, Del Fiol FS, Jozala A, Chaud MV, Vila MMDC, Teixeira JA, Balcão VM. Alternatives to overcoming bacterial resistances: state-of-the-art[J]. Microbiological Research, 2016, 191: 51-80
- [24] 梁梅, 郭述良, 张红梅, 刘平, 邬亭亭. 噬菌体 D29 不同途径给入在小鼠体内的代谢分布[J]. 中国新药与临床杂志, 2012, 31(5): 272-276
- Liang M, Guo SL, Zhang HM, Liu P, Wu TT. Metabolic distribution of mycobacteriophage D29 administered by different routes in mice[J]. Chinese Journal of New Drugs and Clinical Remedies, 2012, 31(5): 272-276 (in Chinese)
- [25] 胡乐玉, 宋鹏, 崔嘉琪, 邹玲, 刘文华, 张灿, 韩先杰, 任慧英. 噬菌体防治 ETEC 感染小鼠效果的初步研究[J]. 中国预防兽医学报, 2022, 44(3): 314-319
- Hu LY, Song P, Cui JQ, Zou L, Liu WH, Zhang C, Han XJ, Ren HY. Preliminary study on the prevention and treatment effect of phage against ETEC infection in mice[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2022, 44(3): 314-319 (in Chinese)
- [26] 李敏, 赵尊福, 阳亭亭, 张焕容. 大肠杆菌噬菌体 BP16 对鸡大肠杆菌病的防治效果[J]. 中国畜牧兽医, 2022, 49(2): 776-782
- Li M, Zhao ZF, Yang TT, Zhang HR. Prevention and treatment effect of *Escherichia coli* phage BP16 on chicken colibacillosis[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2022, 49(2): 776-782 (in Chinese)
- [27] Żaczek M, Łusiak-Szelachowska M, Jończyk-Matysiak E, Weber-Dąbrowska B, Międzybrodzki R, Owczarek B, Kopciuch A, Fortuna W, Rogóż P, Górski A. Antibody production in response to staphylococcal MS-1 phage cocktail in patients undergoing phage therapy[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1681