

# 食源性大肠杆菌噬菌体的分离及其特性分析

唐伟<sup>1,2</sup>, 高璐<sup>2,3</sup>, 施锴云<sup>3</sup>, 张辉<sup>4</sup>, 杨振泉<sup>2,3\*</sup>

(1. 泰州出入境检验检疫局, 泰州 225300; 2. 江苏省人兽共患病重点实验室, 扬州 225127;  
3. 扬州大学食品科学与工程学院, 扬州 225127; 4. 江苏省农业科学院江苏省食品质量安全重点实验室, 南京 210014)

**摘要:** **目的** 从污水样品中分离致病性大肠杆菌的烈性噬菌体, 分析其生物学特性, 为食品中致病性大肠杆菌的控制提供参考。**方法** 以标准菌株 *Escherichia coli* EPEC(CICC10664)为宿主菌, 采用双层平板法, 从扬州市各地污水中分离纯化噬菌体, 通过透射电镜观察其形态、测定最佳感染复数、一步生长曲线、裂解谱及其对宿主菌生物被膜的影响。**结果** 分离到一株肠致病性大肠杆菌烈性噬菌体, 命名为 Ec.P01, 电镜观察其为肌尾噬菌体, 直径约为 80 nm, 最佳感染复数为 0.01, 一步生长曲线显示其噬菌体 Ec.P 01 的平均裂解量为 48 PFU/mL, 潜伏期约为 10 min, 裂解期约为 90 min, 热稳定性较好, 对宿主菌生物被膜的形成有明显的抑制作用。**结论** 本研究分离到一株肠致病性大肠杆菌烈性噬菌体, 为治疗大肠杆菌感染疾病和治理食品及其环境污染提供新的思路与方法。

**关键词:** 大肠杆菌; 噬菌体; 生物学特性; 生物被膜

## Isolation and characterization of foodborne *Escherichia coli* phage

TANG Wei<sup>1,2</sup>, GAO Lu<sup>2,3</sup>, SHI Kai-Yun<sup>3</sup>, ZHANG Hui<sup>4</sup>, YANG Zhen-Quan<sup>2,3\*</sup>

(1. Taizhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Taizhou 225300, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Yangzhou 225127, China; 3. College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China; 4. Jiangsu Key Laboratory of Food Quality and Safety, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**ABSTRACT: Objective** To isolate the *Escherichia coli* EPEC bacteriophage from the sewage samples and analyze its biological characteristics, so as to provide reference for the control of pathogenic *Escherichia coli* in food. **Methods** The phage was isolated and purified from the sewage samples by double-layer agar method. With the host bacterium *Escherichia coli* EPEC(CICC10664) as standard strain, the purified phage was concentrated negatively stained with uranyl acetate and observed by transmission electron microscopy. Meanwhile, the host range, optimal multiplicity of infection (MOI), one-step growth curve, temperature stability and inhibition of biofilm of the phage were investigated. **Results** One strain of phage that lysed *Escherichia coli* EPEC was isolated and named Ec.P01. The electron microscope observation showed that the phage Ec.P01 had an icosahedron head with 80 nm in diameter, and belonged to the family of *Myoviridae*. The MOI of Ec.P01 was 0.01. One-step growth curve shows that Ec.P01 had a burst size of 48 PFU/mL, the incubation period

**基金项目:** 江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(16)1028)、江苏省人兽共患病重点实验室开放课题(R1508)

**Fund:** Supported by Jiangsu Agricultural Science and Technology Independent Innovation Fund (CX(16)1028) and Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis Open Fund (R1508)

\***通讯作者:** 杨振泉, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事食品微生物资源开发与利用研究。E-mail: yangzq@yzu.edu.cn

\***Corresponding author:** YANG Zhen-Quan, Ph.D, Professor, College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China. E-mail: yangzq@yzu.edu.cn

was about 10 min and the cleavage period was about 90 min. The phage could withstand the temperature up to 70 °C, and there was a significant inhibitory effect on the formation of biofilm of the host organism. **Conclusion** The newly isolated phage, which is named Ec.P01, provides new ideas and methods for the treatment of *Escherichia coli* infection and the treatment of food and its environmental pollution.

**KEY WORDS:** *Escherichia coli*; bacteriophage; biological characteristics; biofilm

## 1 引言

大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)是 Escherich 在 1885 年发现的,在很长一段时间内,一直被当作正常肠道菌群的组成部分,认为是非致病菌。直到 20 世纪中叶才发现,部分致病性大肠杆菌感染人和动物肠道和泌尿系统引起腹泻,严重的出现败血症等,其中肠致病性大肠杆菌广泛存在于人类粪便以及生活污水中,与卫生与食品安全有着密切的关系<sup>[1,2]</sup>。噬菌体是感染细菌、真菌、放线菌或螺旋体等微生物的细菌病毒的总称,最早在 20 世纪初被弗雷德里克·特沃特(Frederick W.Twort)发现,后由加拿大科学家命名为噬菌体(bacteriophage, phage)<sup>[3]</sup>。

近年来,随着抗生素的大量使用,超级细菌的出现对人类和自然造成了前所未有的威胁,而噬菌体以它独特的优势现已被应用于细菌性疾病的治疗、动植物及其食品中食源性致病菌的控制、水体的净化等方面,越来越受到人们的关注。Abuladze 等<sup>[4]</sup>、Viazis 等<sup>[5]</sup>采用噬菌体“鸡尾酒疗法”明显地降低了食品(绿叶蔬菜、土豆、花椰菜和牛肉)中大肠杆菌 O157:H7 的量。但噬菌体的特异性又限制了其应用范围,因而筛选耐应激噬菌体和宽谱噬菌体是目前研究的重点<sup>[6]</sup>。

本研究采用双层平板法分离污水中大肠杆菌噬菌体,并通过其生物特性的研究,为治疗大肠杆菌感染的疾病和防治食品及其环境污染提供新的思路与方法。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 宿主菌与样品

菌株 *Escherichia coli* EPEC CICC10664、副溶血性弧菌 CICC 21617、溶藻弧菌 CICC17749、肠沙门氏菌 CICC 21513、金黄色葡萄球菌 CICC21600 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心,其他大肠杆菌分离株均为本实验室保存。污水样品分别来自学校污水沟和农贸市场。

#### 2.1.2 仪器和试剂

SX-500 高压蒸汽灭菌锅(日本 TOMY 公司); DGX-9053B-2 型生化培养箱(上海福玛实验设备有限公司); Heraeus PICO17 台式离心机(美国 Thermo 公司); HR60-IIA2 生物安全柜(Haier 公司)、JEM-1200EX 透射电

镜(日本电子株式会社)。

酵母浸出粉、胰蛋白酶(美国 Sigma 公司); 盐酸、聚乙二醇、甘油、氯化钠、琼脂粉(分析纯,国药集团); 0.22 μm 微孔滤膜(上海半岛实业); 实验室用水为 Milli-Q 超纯水。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 菌株的活化

冻存的大肠杆菌菌液融化后,加入 100 μL 于 5 mL LB 液体培养基中,置于 37 °C 摇床隔夜培养,备用。

#### 2.2.2 噬菌体的分离纯化与效价测定

参照 Jamalludeen、Johnson 等<sup>[7]</sup>的方法,污水样经过 8000 r/min 离心 5 min 后取上清备用。各取 100 μL 污水上清液和大肠杆菌菌液加入 5 mL LB 液体培养基中,37 °C 摇床隔夜培养。8000 r/min 离心 10 min,取上清经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌即得大肠杆菌噬菌体原液。采用双层平板法,进行噬菌斑的观察和噬菌体的纯化,直至获得大小均一的噬菌斑。

将纯化后的噬菌体原液进行 10 倍梯度稀释,取合适梯度的稀释液 100 μL 与 100 μL 宿主菌混合,静置 5 min 倒双层平板,37 °C 培养 6 h 后计算噬菌斑数目。

#### 2.2.3 噬菌体的形态观察

采用磷钨酸负染色法<sup>[8]</sup>,将铜网有膜的一面朝上,取 10 μL 高效价噬菌体液滴于铜网上,吸附 15 min 待自然干燥 2~3 min 后,在铜网上滴一滴 2% 的磷钨酸(phosphotungstic acid, PTA)水溶液进行染色 2 min,干燥后用透射电镜观察、拍照。

#### 2.2.4 噬菌体的最佳感染复数(multiplicity of infection, MOI)

将噬菌体液进行十倍稀释,各稀释度噬菌体液 100 μL 与宿主菌液( $10^8$  CFU/mL) 100 μL 混合,加至 10 mL LB 液体培养基中,37 °C, 150 r/min 培养 10 h 后 5000 r/min 离心 10 min,测定液体中噬菌体的效价,结果中效价最高组即为噬菌体的最佳感染复数组<sup>[9]</sup>。

#### 2.2.5 噬菌体的一步生长曲线

参考文献<sup>[10]</sup>取噬菌体原液与对数生长期宿主菌按照 MOI 大于 10 的比例加入到 LB 液体培养基中,37 °C 恒温箱培养 10 min,将培养液 12000 r/min 离心 1 min,弃上清,再加入 LB 液体培养基重悬菌体并离心,反复 3 次。再加入等体积预热 LB 液体培养基,混匀后于 37 °C, 150 r/min 恒温振荡培养箱中培养,每 10 min 取样 1 次,测定噬菌体效

价,每个时间点做2个平行。然后以感染时间(min)为横坐标,噬菌体的效价为纵坐标绘制一步生长曲线图。噬菌体裂解量的计算公式为:平均裂解量=裂解末期的噬菌体效价(PFU/mL)/裂解初期宿主菌浓度(CFU/mL)。

### 2.2.6 噬菌体的热稳定性

取噬菌体原液 100  $\mu\text{L}$  于 1.5 mL 离心管,分别放水浴锅 40、50、60、70  $^{\circ}\text{C}$  水浴 20、40、60 min 后测定噬菌体效价<sup>[11]</sup>。

### 2.2.7 噬菌体的裂解谱

取不同来源的大肠杆菌分离株和副溶血性弧菌、溶藻弧菌、金黄色葡萄球菌、肠沙门氏菌标准菌株复苏后倾倒入双层平板,取噬菌体原液 5  $\mu\text{L}$  滴于混有致病菌的平板,于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱过夜观察噬菌斑产生情况。

### 2.2.8 噬菌体对宿主菌生物被膜的抑制作用

取对数生长期的 *Escherichia coli* EPEC(CICC10664) 菌液用 LB 液体培养基稀释至最终浓度为  $1 \times 10^7$  CFU/mL, 在无菌 96 孔板中每孔分别加入稀释菌液( $10^7$  CFU/mL)和噬菌体悬液( $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$  PFU/mL)各 150  $\mu\text{L}$ , 以  $10^7$  CFU/mL 菌液作为阴性对照、营养肉汤为空白对照,37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h, 取出 96 孔板吸出悬浮菌液,用无菌 PBS 清洗 3 次,吹干,充分除去浮游菌体;每孔加入 200  $\mu\text{L}$  0.2% 结晶紫染色液,染色 30 min; 吸出染色液,再用无菌 PBS 彻底清洗至洗出液呈无色,吹干;每孔加入 200  $\mu\text{L}$  的 33% 醋酸脱色剂,振荡充分溶解,于酶标仪测定 600 nm 处的 OD 值,每组平行测定 5 次<sup>[12]</sup>。

## 3 结果与分析

### 3.1 噬菌体分离纯化与效价

以肠致病性大肠埃希氏菌(CICC10664)为宿主菌,采用双层平板法分离噬菌体,纯化 3~5 次后可见噬菌斑形态大小较为均一、分布均匀的圆形噬菌斑,如图 1 所示,命名为 Ec.P 01。

### 3.2 噬菌体 Ec.P 01 的形态

噬菌体 Ec.P 01 经过富集浓缩负染后,在透射电子显



图 1 大肠杆菌噬菌斑  
Fig. 1 *Escherichia coli* plaque Ec.P 01

微镜下可见噬菌体头部呈正六边形,直径约为 80 nm,有头、颈、尾和尾鞘,如图 2 所示。根据 2011 年国际病毒分类委员会第 9 次报告的噬菌体分类与命名标准,该噬菌体属于正二十面体肌尾噬菌体科。

### 3.3 噬菌体 Ec.P 01 的最佳感染复数

采用双层平板法测定 MOI 值,如表 1 所示。当 MOI=0.01 时,经过 6 h 培养后的子代噬菌体数量最多,其滴度为  $3.3 \times 10^7$  PFU/mL,因此,该噬菌体的最佳 MOI 是 0.01,在后续的研究中均以最佳 MOI 扩增。

### 3.4 噬菌体 Ec.P 01 的一步生长曲线

从图 3 可以看出,从感染宿主菌后 10 min 内,噬菌体效价无显著变化,说明该噬菌体的潜伏期为 10 min;噬菌体感染宿主菌后 10~100 min,噬菌体效价迅速增加,为噬菌体 Ec.P 01 的爆发期,约为 90 min;100 min 后,噬菌体效价又趋于稳定,说明该噬菌体在 100 min 后进入稳定期。根据噬菌体裂解量的计算方法,可得噬菌体 Ec.P 01 的平均裂解量为 48 PFU/mL,此噬菌体的增值能力较强。

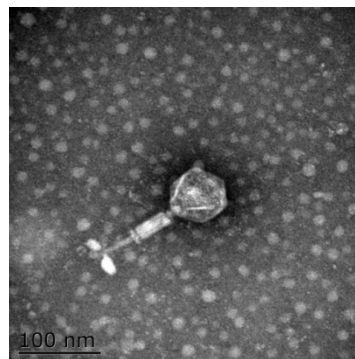


图 2 噬菌体 Ec.P 01 的电镜照片  
Fig. 2 Electron micrograph of phage Ec.P 01

表 1 噬菌体 Ec.P 01 MOI 值  
Table 1 MOI of Ec.P 01 bacteriophage

宿主数 (CFU/mL)	噬菌体数 (PFU/mL)	感染复数	噬菌体效价 (PFU/mL)
$1 \times 10^5$	$1 \times 10^6$	10	$4.0 \times 10^6$
$1 \times 10^5$	$1 \times 10^5$	1	$5.1 \times 10^6$
$1 \times 10^5$	$1 \times 10^4$	0.1	$1.9 \times 10^7$
$1 \times 10^5$	$1 \times 10^3$	0.01	$3.3 \times 10^7$
$1 \times 10^5$	$1 \times 10^2$	0.001	$2.81 \times 10^7$
$1 \times 10^5$	$1 \times 10^1$	0.0001	$9.3 \times 10^6$
$1 \times 10^5$	$1 \times 10^0$	0.00001	$5.4 \times 10^6$
$1 \times 10^5$	$1 \times 10^{-1}$	0.000001	$1.5 \times 10^6$

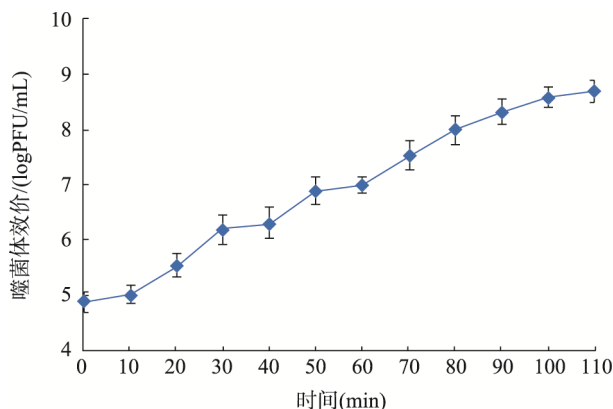


图 3 噬菌体 Ec.P 01 的一步生长曲线(n=3)

Fig. 3 One-step growth curve of Phage Ec.P 01 (n=3)

### 3.5 噬菌体 Ec.P 01 的热稳定性

将噬菌体分别置于 40、50、60、70 °C 处理不同时间后测其效价, 结果如图 4 所示。噬菌体的存活率随着温度的升高和处理时间的延长而逐渐降低。40、50 °C 对噬菌体的活性基本没有影响; 在 60 °C 条件下, 噬菌体活性开始下降, 但不明显, 60 °C 作用 80 min 后其活性开始有明显的降低趋势; 70 °C 作用 60 min 依然有较高的活性, 作用 100 min 后噬菌体才全部失活。由此可见, 噬菌体 Ec.P 01 具有一定的热稳定性。

### 3.6 噬菌体 Ec.P01 的裂解谱

噬菌体 Ec.P01 裂解大肠杆菌等致病菌的裂解谱如表 2, 可裂解 5 株肠致病性大肠杆菌分离株, 而对金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌、副溶血性弧菌等没有裂解能力。

### 3.7 噬菌体 Ec.P01 对宿主菌生物被膜的抑制作用

不同浓度的噬菌体 Ec.P01 与宿主菌混合培养后的生物被膜形成情况如图 5 所示, 加入 10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>7</sup>、10<sup>8</sup> PFU/mL Ec.P01 悬液的试验组(B、C、D、E 组)测的

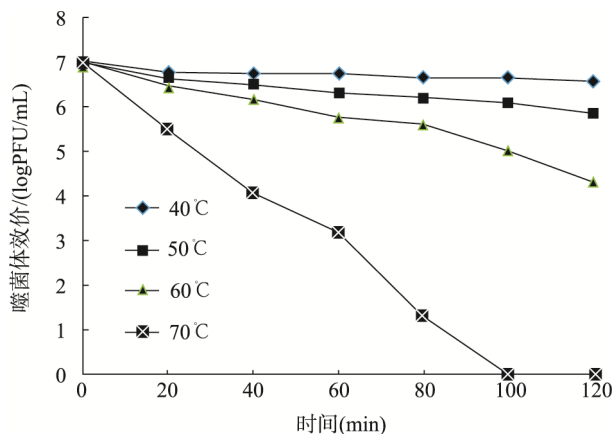


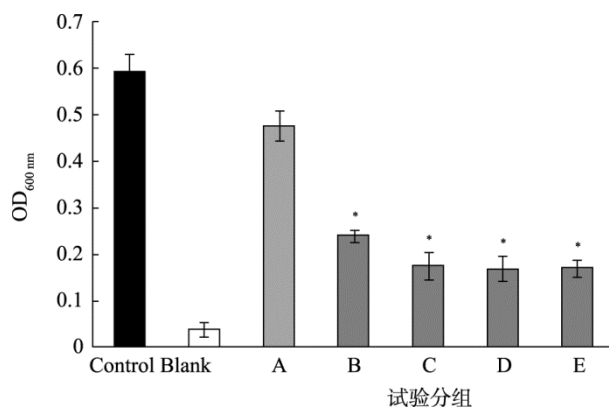
图 4 噬菌体 Ec.P 01 的热稳定性

Fig. 4 Thermal stability of phage Ec.P 01

表 2 噬菌体 Ec.P01 裂解谱  
Table 2 Sensitivity of phage Ec.P01 to 25 strains of Pathogenic

菌株	敏感性	菌株	敏感性
<i>E.coli</i> 01	-	<i>E.coli</i> 12	-
<i>E.coli</i> 02	+	<i>E.coli</i> 13	+
<i>E.coli</i> 03	-	<i>E.coli</i> 14	+
<i>E.coli</i> 04	-	<i>E.coli</i> 15	-
<i>E.coli</i> 05	+	<i>E.coli</i> 16	-
<i>E.coli</i> 06	-	副溶血性弧菌 CICC 21617	-
<i>E.coli</i> 07	-	溶藻弧菌 CICC17749	-
<i>E.coli</i> 08	+	肠炎沙门氏菌 CICC 21513	-
<i>E.coli</i> 09	-	金黄色葡萄球菌 CICC21600	-
<i>E.coli</i> 10	-	<i>E.coli</i> CICC10664	+
<i>E.coli</i> 11	-		

注: “+”表示宿主菌对噬菌体 Ec.P 01 敏感; “-”表示宿主菌对 Ec.P 01 不敏感



注: \*表示与对照组相比具有极显著差异(P<0.01)

图 5 噬菌体 Ec.P 01 对宿主菌生物膜形成的抑制效果(n=5)

Fig. 5 Inhibitory effect on the formation of biofilm of host bacteria (n=5)

OD<sub>600 nm</sub> 显著低于对照组(P<0.01), 表明 Ec.P01 对肠致病性大肠杆菌生物被膜的形成具有明显的抑制作用。

## 4 结 论

噬菌体在自然界分布广泛、资源充足, 本研究分离得到肠致病性大肠杆菌噬菌体 Ec.P 01 属于有尾噬菌体目肌尾噬菌体科的裂解性噬菌体, 具有较好的耐热性能, 且对宿主菌生物被膜的形成有明显地抑制作用, 但此噬菌体只能裂解部分肠致病性大肠杆菌, 而对金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌、副溶血性弧菌等致病菌没有裂解能力。

细菌生物被膜是细菌为适应自然环境有利于生存的一种生命现象, 其广泛存在于各种含水的潮湿表面上, 例

如在食品、加工器具的表面形成生物被膜,被膜内的细菌对常规保鲜剂、抑菌剂的抵抗能力提高数百倍,很难被清除,从而导致持续性污染,给食品的安全性带来严重风险<sup>[13-15]</sup>,因此,本研究发现的噬菌体 Ec.P 01 具有潜在的开发新型抑菌剂的价值。

## 参考文献

- [1] Gould LH, Walsh KA, Vieira AR, *et al.* Surveillance for foodborne disease outbreaks-United States, 1998-2008 [J]. *Mmwr-Morbidity and Mortality*, 2013, 62(2): 1-34.
- [2] 姬华, 张玫, 卢士玲, 等. 食源性大肠杆菌耐药性与毒力特征的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(7): 364-367.  
Ji H, Zhang M, Lu SL, *et al.* Review on drug resistance and virulence characterization of foodborne *Escherichia coli* [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2014, 35(7): 364-367.
- [3] Salehe S, Zargham S, Sahar AR, A minireview on the *in vitro* and *in vivo* experiments with anti-*Escherichia coli* O157: H7 phages as potential biocontrol and phage therapy agents [J]. *Int J Food Microbiol*, 2017, (243): 52-57.
- [4] Abuladze T, Li M, Menetrez MY, *et al.* Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157: H7 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, (74): 6230-6238.
- [5] Viazis S, Akhtar M, Feirtag J, *et al.* Isolation and characterization of lytic bacteriophages against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* [J]. *J Appl Microbiol*, 2011, (110): 1323-1331.
- [6] 曹振辉, 金礼吉, 徐永平, 等. 噬菌体控制主要食源性致病菌的研究进展[J]. *食品科学*, 2013, 34(5): 274-278.  
Cao ZX, Jin LJ, Xu YP, *et al.* Application of bacteriophages in control of foodborne pathogens [J]. *Food Sci*, 2013, 34(5): 274-278.
- [7] Jamalludeen N, Johnson RP, *et al.* Isolation and characterization of nine bacteriophages that lyse O149 enterotoxigenic *Escherichia coli* [J]. *Vet Microbiol*, 2007, 124(1-2): 47-57.
- [8] 刘霄飞, 任慧英, 刘文华, 等. 大肠杆菌噬菌体 Bp7 溶菌周期的电镜观察[J]. *电子显微学报*, 2014, 29(2): 182-184.  
Liu XF, Ren HY, Liu WH, *et al.* Morphological observation on lytic cycle of bacteriophag Bp7 [J]. *J Chin Electr Microsc Soc*, 2014, 29(2): 182-184.
- [9] Duc HM, Son HM, Kenichi H, *et al.* Isolation and bio-control of extended spectrum Beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* contamination in raw chicken meat by using lytic bacteriophages [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2016, 71(2016): 339-346.
- [10] Lu Z, Breidt FJ, Fleming HP. Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage  $\Phi$  JL21 from a cucumber fermentation [J]. *Food Microbiol*, 2003, 84(2): 225-235.
- [11] 易鑫, 刘新春, 黄京, 等. 污水处理系统中肠出血性大肠杆菌 O157 噬菌体的分离及其生物学特性[J]. *中国科学院大学学报*, 2015, 32(4): 513-519.  
Yi X, Liu XC, Huang J, *et al.* Identification and biological property study of an enterohemorrhagic *E. coli* O157 phage isolated from sewage treatment plant aeration tank [J]. *J Univ Chin Acad Sci*, 2015, 32(4): 513-519.
- [12] 孟祥朋. 猪链球菌生物被膜的生物学特性及噬菌体裂解酶对生物被膜的降解作用[D]. 上海: 上海交通大学, 2011.  
Meng XP. Characterization of biofilm formation by a *Streptococcus Suis* and dispersion using bacteriophage lysin [D]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University, 2011.
- [13] Merrill CR, Scholl D, Adhya SL. The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine [J]. *Nature*, 2003, 2(6): 489-497.
- [14] Ryan EM, Gorman SP, Donnelly RF, *et al.* Recent advances in bacteriophage therapy: how delivery routes, formulation, concentration and timing influence the success of phage therapy [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2011(63): 1253-1264.
- [15] 吕芸辉, 全心馨, 沈梦溪, 等. 噬菌体及其裂解酶对细菌生物被膜作用的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(3): 568-573.  
Lv YH, Quan XX, Shen MX, *et al.* Research progress in biofilm degradation by bacteriophage and its lysin [J]. *Microbiol China*, 2015, 42(3): 568-573.

(责任编辑: 姜 珊)

## 作者简介

唐 伟, 博 士, 主要研究方向为动植物病原微生物。

E-mail: tangwei567@126.com

杨振泉, 博 士, 教授, 硕士生导师, 主要从事食品微生物资源开发与利用研究。

E-mail: yangzq@yzu.edu.cn