

文章编号:2095-6134(2015)04-0512-08

# 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<sup>\*</sup>

易鑫, 刘新春<sup>†</sup>, 黄京, 刘红辉, 李娟  
(中国科学院大学资源与环境学院, 北京 100049)  
(2014 年 10 月 9 日收稿; 2015 年 1 月 27 日收修改稿)

Yi X, Liu X C, Huang J, et al. Identification and biological property study of an enterohemorrhagic *E. coli* O157 phage isolated from sewage treatment plant aeration tank[J]. Journal of University of Chinese Academy of Sciences, 2015,32(4):512-519.

**摘要** 采用双层平板法从污水处理厂曝气池中分离出一株肠出血性大肠杆菌 O157 强裂解性噬菌体,命名为 PO157-Z。通过透射电镜、基因组酶切以及最佳感染复数、裂解曲线和酸碱耐受性等生物学特性测定分析发现:噬菌体 PO157-Z 头部呈正六面体的立体对称结构,直径约 70 nm,尾部较短,长和宽均约 10 nm。EcoR I 酶切表明,其核酸类型为 dsDNA。该噬菌体的最佳感染复数为 0.01,其对酸碱耐受性较好,且耐受范围较宽。此外,对宿主菌的裂解曲线进一步表明,其对大肠杆菌 O157 具有高效快速的裂解作用。因此,PO157-Z 作为一株肠出血性大肠杆菌 O157 强裂解性噬菌体,属 dsDNA 短尾科噬菌体,其对宿主菌的高效裂解性以及强酸碱耐受性等特点,为污水处理系统中大肠杆菌 O157 的生物防控,提供了新思路和技术支持。

**关键词** 噬菌体; 肠出血性大肠杆菌 O157; 污水处理系统; 生物防治

中图分类号:X703 文献标志码:A doi:10.7523/j.issn.2095-6134.2015.04.013

## Identification and biological property study of an enterohemorrhagic *E. coli* O157 phage isolated from sewage treatment plant aeration tank

YI Xin, LIU Xinchun, HUANG Jing, LIU Honghui, LI Juan  
(College of Resources and Environment, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract** The purpose of this work was to isolate the lytic phages of *Escherichia coli* O157 from an aeration tank sample and to investigate the biological characteristics of the isolated phage. The titer of purified bacteriophage was  $8.7 \times 10^{11}$  pfu/mL. The electron microscope showed the phage had a hexahedron cubic-symmetric head with 70 nm in diameter and a short tail (about 10 nm in length and about 10 nm in width). The restriction enzyme fragments suggested that it was dsDNA. The optimal MOI (multiplicity of infection) value was 0.01. Phage PO157-Z showed wide range of acid-alkali tolerance. In addition, the curves of bacteria lysed by phage showed that PO157-Z had a high

<sup>\*</sup> 国家自然科学基金(50978250,51378485)和中国科学院资环局专项(Y225018EA2)资助  
<sup>†</sup> 通信作者, E-mail: xcliu@ucas.ac.cn

lytic activity on *E. coli* O157. Thus, PO157-Z is a strain of lytic phage against enterohemorrhagic *E. coli* O157 and belongs to tailed families Podoviridae with dsDNA. These characteristics of phage PO157-Z would be useful in various applications as a novel biocontrol agent against *E. coli* O157.

**Key words** bacteriophage; *Escherichia coli* O157; wastewater treatment system; biocontrol

近年来,由于水体受到病原菌的污染,常常引起水媒型传染性疾病的爆发<sup>[1-2]</sup>. 而仅由水媒型传染病导致的死亡数已达全世界总死亡人数的4%<sup>[3]</sup>. 其中,肠出血性大肠杆菌(EHEC)因其具有高致病性,严重危害人类健康,已成危害公共健康安全的世界性问题. 自2011年5月中旬,德国爆发肠出血性大肠杆菌感染到2011年6月15日,仅仅一月,已引起3 343人感染,37人死亡<sup>[4]</sup>. 另有研究<sup>[5]</sup>发现,所有肠出血性大肠杆菌血清型中以O157的致病性最强,其在所有肠出血性大肠杆菌引起的患病例中占有率高达50%~80%,是引起严重感染的最主要病菌. 此外,研究者对在美国1971—2000年间,因用水爆发的感染性疾病统计研究发现,有6%是由肠出血性大肠杆菌引起的<sup>[6]</sup>,而引起此疾病传播的重要原因便是污水处理厂的污水排放. 可见,严控污水处理厂中肠出血性大肠杆菌向环境中的排放具有十分重要的现实意义.

噬菌体生物防治技术,因其具有增殖快,高度特异性及其他一些物理、化学防治技术无法比拟的优点<sup>[7]</sup>,得到广泛的重视和研究. 截至目前,利用噬菌体防治肠出血性大肠杆菌的研究工作<sup>[8-14]</sup>已大量展开,但其防治研究重点主要集中于食品和动物的感染上,而鲜有针对污水处理系统中病原菌的防治研究工作. 其中,国内目前对于噬菌体在污水处理系统中的研究主要集中在以下两方面:1)将噬菌体作为致病菌污染检查的指示生物<sup>[15]</sup>;2)将污水处理系统作为噬菌体的主要分离源,并对所分离的黄色葡萄球菌噬菌体<sup>[16]</sup>、鲍曼不动杆菌噬菌体<sup>[17]</sup>、肺炎克雷伯杆菌噬菌体<sup>[18]</sup>、霍乱弧菌噬菌体<sup>[19]</sup>和沙门氏菌噬菌体<sup>[20]</sup>,开展对宿主菌裂解的实验性研究,其研究重点仍主要集中在对所分离噬菌体菌株的分类鉴定和生物学特性的检测方面. 其中,Wei等<sup>[19]</sup>对霍乱弧菌噬菌体和Zhang等<sup>[20]</sup>对沙门氏菌噬菌体的研究,均是通过与国外合作完成,进一步比较分析了单一噬菌体和2种或2种以上混合噬菌体制剂对相应病原菌的防治效果差异,研究发现,2种或多种噬

菌体混合使用,对病原菌的防治效果更佳. 而目前国内对于利用噬菌体防治污水处理系统中肠出血性大肠杆菌O157的研究仍未见报道.

本研究以污水处理系统曝气池中分离筛选出的一株肠出血性大肠杆菌O157噬菌体为研究对象,通过对其形态、核酸类型及其生物学特性进行鉴定分析,研究其裂解特性,为未来污水处理系统出水 and 剩余污泥中肠出血性大肠杆菌O157的生物防治提供技术支持.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 主要试剂和仪器

LB培养液、培养基按文献[21]配制;PEG8000(Amresco公司);DNase、RNaseA(Sigma公司);蛋白酶K(Amresco公司);*EcoR* I(TAKARA公司);0.22 μm微孔滤膜(上海市新亚净化器件厂);氯仿、平衡饱和酚(北京鼎国生物技术有限公司);高压灭菌锅;离心机.

#### 1.1.2 实验用菌种和水样

肠出血性大肠杆菌O157(EHEC O157)为本室分离保存. 供分离噬菌体的水样为2013年1月在北京某城市污水处理厂曝气池中采集所得.

#### 1.1.3 EHEC O157 菌悬液的制备

挑取EHEC O157单菌落接种到盛有50 mL LB培养液的锥形瓶中,37℃摇床160 rpm振荡培养过夜,得到宿主菌悬液.

### 1.2 噬菌体的分离鉴定

依据文献[22],稍作调整,取水样500 mL,加入固体CaCl<sub>2</sub>至终浓度1 mmol/L,3 000 g离心10 min,去除较大杂质,并用0.22 μm微孔滤膜过滤除菌. 取300 mL滤液、300 mL 2×LB培养液和宿主菌悬液15 mL一并加入高压灭菌后的三角烧瓶内,37℃、120 rpm振荡培养10 h后,4℃下3 000 g离心10 min,取上清液100 mL,加入100 mL LB培养液和5 mL宿主菌悬液,在摇床37℃、120 rpm条件下振荡培养12 h后,4℃、5 000 g离心10 min,上清液再经微孔滤膜(0.22 μm)过滤,滤液

即为可能含有 O157 噬菌体的原液. 并采用双层平板<sup>[23]</sup> 鉴定滤液中是否存有噬菌体, 上述原液经 10 倍梯度适当稀释后, 取 0.1 mL 稀释液与 0.1 mL 宿主菌液混匀, 并 37 °C 静置 15 min. 随后, 加入 4 mL 已冷却至 47 °C 的 0.7% LB 半固体培养基, 迅速混匀倒入 LB 固体培养基上, 待其凝固约 5 min 后, 放入 37 °C 培养箱培养 6~8 h, 观察是否有噬菌斑出现. 若有噬菌斑, 则表明分离出相应噬菌体; 反之, 则表明未分离出相应噬菌体, 需重新采样分离.

### 1.3 噬菌体的纯化

首次分离的噬菌斑, 形态大小常各不相同, 有待进一步纯化. 参照文献[21], 在有噬菌斑的双层平板上挑取单个独立、清晰透明、形态均匀的噬菌斑, 浸置于 1 mL SM 液的无菌 EP 管中, 室温放置 1 h 后 4 °C 放置过夜, 次日取 0.1 mL 经适当稀释后的上述溶液, 与 0.2 mL 宿主菌悬液做双层平板. 重复此步骤 6~7 次, 待双层平板中各噬菌斑的形状大小基本保持一致时, 即可得到纯化的噬菌体.

### 1.4 噬菌体效价测定

将纯化后的噬菌体 SM 液做 10 倍梯度稀释并取最后 3 个稀释度的噬菌体稀释液各 0.1 mL 分别与宿主菌液 0.2 mL 混合均匀, 做双层平板, 测定其效价. 并且每个稀释度均需做 3 个平行样, 取 3 者平均值计数. 噬菌体效价 (pfu/mL) = 平均噬菌斑数 × 稀释倍数 / 0.1.

### 1.5 噬菌体形态观察

取噬菌体悬液 20 μL 滴于铜网上, 待其自然沉淀 10 min 后, 用干燥滤纸从侧面吸干, 晾置约 1 min 后在铜网上加 1 滴 1% 醋酸双氧铀, 染色 2 min, 然后小心使用干燥滤纸从侧面将多余染剂吸干, 避光自然晾置 30 min 后, 用透射电子显微镜观察.

### 1.6 噬菌体基因组分析鉴定

参照文献[21], 向经扩增后的噬菌体悬液加入 DNaseI 和 RNaseA, 并在水浴锅中 37 °C 温育 30 min 后, 加入蛋白酶 K 及 SDS, 混匀, 并 56 °C 温育 60 min, 然后向消化液中加 NaCl 溶液, 混匀后, 再加入等体积的苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1), 反复轻柔抽提 2 次, 收集上清液, 用经 -20 °C 冷冻后无水乙醇沉淀核酸 30 min, 所得沉淀依次分别用 4 °C 冷藏后的 70% 乙醇和无水乙醇洗涤一

次, 最后用 TE 溶解沉淀, -20 °C 保存备用.

首先利用细菌通用引物 338f (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 534r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') 进行 16S rRNA 基因扩增检测所提取的核酸中是否混有包括宿主菌及其他细菌的基因组, 以确定噬菌体核酸纯度, 其中分别设肠出血性大肠杆菌 O157 基因组阴性对照和不含噬菌体基因组的阳性对照, 并均设置平行样. 并用限制性核酸内切酶 *EcoR* I 酶切鉴定该噬菌体核酸类型. 以上基因组分析鉴定均在电压 90 V, 1% 琼脂糖凝胶电泳 90 min 下进行.

### 1.7 噬菌体生物学特性测定

#### 1.7.1 最佳感染复数

感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 是指初始感染时加入的噬菌体量与宿主菌量的比值, 又称感染倍数. 将经过夜培养的菌悬液以 1:100 比例转接到 10 mL LB 培养液, 37 °C, 170 rpm 振荡培养至对数前期,  $OD_{600} = 0.5$ , 并依据菌落平板计数检测宿主菌浓度为  $2.84 \times 10^9$  cfu/mL. 分别依照感染复数 0.000 1, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 和 100 的比例加入噬菌体溶液和宿主菌, 混合均匀, 并利用 LB 培养基补足, 使各管总体积相同. 在 37 °C 摇床中 170 rpm 振荡培养 4 h, 随后经 10 000 g 离心 10 min, 收集上清液以测定噬菌体效价. 每样均设平行, 结果取平均值, 最终以最高噬菌体效价下对应的 MOI 值为最佳感染复数. 实验重复 3 次, 并增设无噬菌体的宿主菌和无宿主菌的噬菌体, 作为 2 组对照.

#### 1.7.2 噬菌体对宿主菌裂解曲线

在肠出血性大肠杆菌 O157 菌液中加入噬菌体, 由于噬菌体对宿主菌的裂解效用, 导致菌液  $OD_{600}$  值的变化. 因而, 通过测定  $OD_{600}$  值的变化, 可得到噬菌体对细菌的裂解效果曲线. 将经过夜培养的 O157 菌悬液以 1:100 的比例转接到装有 400 mL LB 培养基的无菌锥形瓶中, 37 °C 160 rpm 振荡培养 1.5 h ( $OD_{600}$  约 0.2, 约  $7.01 \times 10^8$  cfu/mL), 随后将菌液平均分装到 4 个灭菌的 250 mL 锥形瓶中, 依据最佳感染复数, 向其中 3 个锥形瓶 (平行样) 分别加入噬菌体悬液  $7 \times 10^8$  pfu, 另 1 个锥形瓶 (空白对照) 加入相同体积但无噬菌体的 LB 培养液. 随即置于 37 °C, 160 rpm 摇床中振荡培养, 每隔 20 min 取样, 测定  $OD_{600}$  值, 最终结果以 3 个锥形瓶 (平行样) 均值计算.



1.7.3 噬菌体酸碱耐受性测定

噬菌体酸碱耐受性测定依照文献[24]进行,取12个无菌EP管分别加入不同pH(1~12)的LB培养基900 μL,然后将上述12组无菌EP管浸置于37℃恒温水浴锅中,等温度平衡后加入0.1 mL噬菌体纯培养液( $8.63 \times 10^{11}$  pfu/mL),37℃恒温作用16 h,作用结束后,立即将各样品取出冰浴至室温并做适当稀释后测定各pH下噬菌体效价,实验重复3次。

2 结果

2.1 噬菌体噬菌斑特征及效价

本研究中分离纯化出的1株肠出血性大肠杆菌O157噬菌体噬菌斑形态如图1所示,噬菌斑为规则圆形,形状大小均一,直径约4~6 mm,且清晰透亮,边缘整齐,表现出明显的裂解性噬菌体特征,且该噬菌体效价较高,单个噬菌斑经6次反

复纯化后,平均效价可高达 $8.7 \times 10^{11}$  pfu/mL(见表1)。暂且将该噬菌体命名为PO157-Z。纯化后噬菌体菌液一部分于4℃冰箱保存使用,另一部分存于40%甘油中并-70℃冷冻保存。

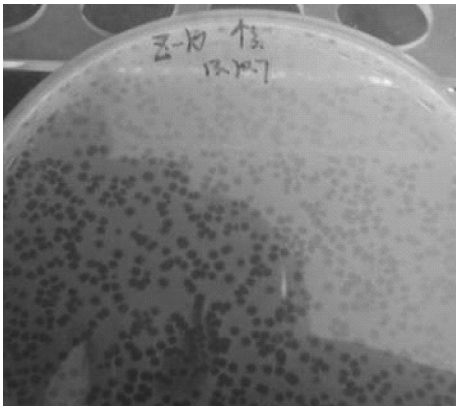


图1 噬菌体 PO157-Z 噬菌斑  
Fig.1 Plaques of EHEC O157 phage PO157-Z

表1 PO157-Z 噬菌体效价测定(纯化6次)

Table 1 Titer of phage PO157-Z purified after repeating plaque assay six times

稀释倍数	效价/(pfu/mL)		平均效价/(pfu/mL)		平行样间方差
$10^{-10}$	1.10E+12	8.00E+11	7.00E+11	8.67E+11	1.20E+11
$10^{-9}$	8.40E+11	1.04E+12	9.30E+11	9.37E+11	5.78E+10
$10^{-8}$	8.48E+11	9.28E+11	6.40E+11	8.05E+11	8.58E+10

2.2 噬菌体透射电镜观察

利用透射电子显微镜对纯化后的噬菌体PO157-Z进行形态观察,由图2透射电镜照片可见,噬菌体PO157-Z的头部呈现正六面体的立体对称形状,头部直径约70 nm,其尾部较短,长约10 nm,直径约10 nm,据国际病毒分类学组织(ICTV)病毒分类第8次报告[25],可初步将PO157-Z噬菌体归类为短尾噬菌体科。

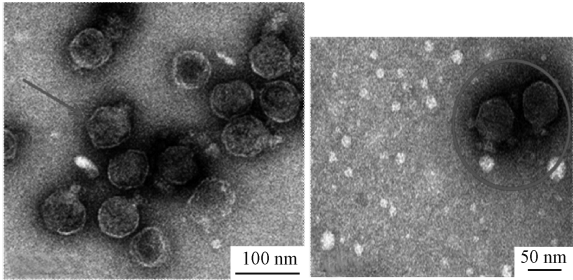


图2 噬菌体 PO157-Z 电镜照片  
Fig.2 Electronic microscope of phage PO157-Z

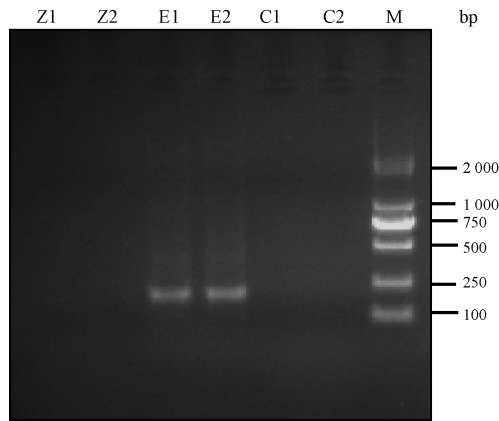
2.3 噬菌体核酸纯度分析及酶切鉴定

对所提取的噬菌体基因组中细菌(宿主菌及

混入的其他杂菌)基因进行PCR扩增检测时发现:噬菌体基因组2平行样(Z1/Z2)均未出现亮条带,而阴性对照宿主菌*E. coli* O157基因(E1/E2)正常显示出亮条带,阳性空白对照(C1/C2)未显现出2条带(图3)。可见,所提取的噬菌体基因组中不含有宿主菌及其他细菌基因,纯度高。随后,利用DNA限制性内切酶*EcoR* I酶切鉴定噬菌体PO157-Z基因组的核酸类型。结果如图4所示,未经*EcoR* I酶切的噬菌体基因组(Z)始终保持单一条带,而从E1、E2和E3这3组平行样的条带来看,*EcoR* I可将噬菌体PO157-Z基因组酶切成5条不同大小的基因片段,从各条带大小可推测PO157-Z基因组约40 Kb,同时由于*EcoR* I为DNA双链内切酶,则表明该噬菌体基因组应为双链DNA,且存有多多个*EcoR* I酶切位点。

2.4 最佳感染复数

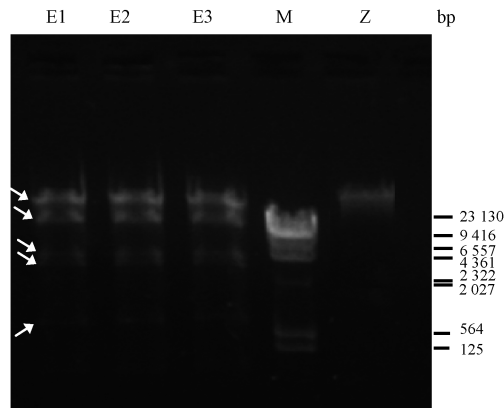
将噬菌体PO157-Z和大肠杆菌O157以不同比例混合培养4 h,大肠杆菌O157被充分裂解,培养液变得澄清后,分别测定各管中噬菌体效价,结



Note: Z1 and Z2: PO157 - Z genome; E1 and E2: EHEC O157 genome; C1 and C2: Blank control; M: DL2000 DNA Marker.

图 3 噬菌体 PO157-Z 基因组中细菌基因 PCR 检测

Fig. 3 PCR detection of bacterial genes in phage PO157-Z genome



E1 /E2/E3: Digestion of Genome with *Eco*RI;  
M:  $\lambda$ HindIII DNA Maker; Z: PO157-Z genome.

图 4 噬菌体 PO157-Z 基因组 *Eco*R I 酶切电泳

Fig. 4 Electrophoresis of phage PO157-Z genome digested with *Eco*R I

果如表 2 所示。当  $MOI = 0.01$  时,噬菌体 PO157-Z 感染宿主菌肠出血性大肠杆菌 O157 产生的子代噬菌体效价为  $9.3 \times 10^{11}$  pfu/ml,为最高感染率。因而,PO157-Z 感染肠出血性大肠杆菌 O157 的最佳感染复数为 0.01。

表 2 噬菌体 PO157-Z 最佳感染复数的测定

Table 2 Determination of optimal multiplicity of infection (MOI) of phage PO157-Z

管号	细菌数/ $10^{10}$ cfu	噬菌体数/ pfu	感染复数 MOI	4h 后效价/ ( $10^{11}$ pfu/mL)
1	3	$3 \times 10^{12}$	100	1.2
2	3	$3 \times 10^{11}$	10	2.1
3	3	$3 \times 10^{10}$	1	3.7
4	3	$3 \times 10^9$	0.1	6.4
5	3	$3 \times 10^8$	0.01	9.3
6	3	$3 \times 10^7$	0.001	7.5
7	3	$3 \times 10^6$	0.000 1	4.2

## 2.5 噬菌体对肠出血性大肠杆菌 O157 的裂解曲线

从噬菌体 PO157-Z 对肠出血性大肠杆菌 O157 的裂解曲线(图 5)来看,自 PO157-Z 噬菌体投加至肠出血性大肠杆菌 O157 菌液,作用约 20 min 后即表现出较明显的裂解效果,再持续作用约 20 min 后  $OD_{600}$  值基本降至最低约 0.05,此时混合菌液最为澄清并保持约 2 h 后,吸光度出现升高趋势,混合菌液逐渐开始变得浑浊,再持续作用 4 h 后,混合菌液浊度变得愈加明显,直至连续作用到 10.5 h 后混合菌液  $OD_{600}$  达到最高约 1.8,与对照组相近。引起以上不同变化的原因可能是:在前 20 min,由于噬菌体投加至菌悬液后仍处于对宿主菌的吸附和侵染阶段,只有少部分噬菌体开始裂解宿主菌,因此,其裂解的宿主菌量远远小于宿主菌增长量,因此, $OD_{600}$  在投加噬菌体后的前 20 min 内依旧保持上升,而伴随噬菌体数量的指数增殖,20 min 后,裂解细菌的量开始大于细菌的增殖速度,所以  $OD_{600}$  值出现下降并正逐渐降至较低水平,混合液表现出澄清透明, $OD_{600}$  值降至最小;然而持续作用约 2 h 后,混合液出现返浊,据其他报道可能是原敏感宿主菌被裂解,被突变的耐受菌所取代的一种“菌群交替”<sup>[26]</sup>,因而主要以抗性菌群存在为主。因此,为获取高效价噬菌体,则应将混合菌液控制在最澄清至刚好出现返浊之前这一段时间范围内,以免影响噬菌体的效价。

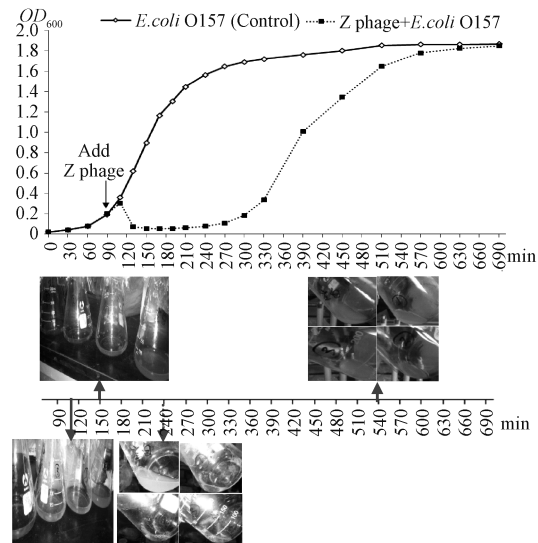


图 5 噬菌体 PO157-Z 肠出血性大肠杆菌 O157 的裂解曲线

Fig. 5 Curves of EHEC O157 lysed by phage PO157-Z

2.6 噬菌体的酸碱耐受性测定

从噬菌体对酸碱的耐受性(图6)来看,噬菌体 PO157-Z 的酸碱耐受性较好,耐受范围较宽,其在 pH 6~10 的效价最高,可在  $10^{10}$  pfu/mL 以上. 整体来看,该噬菌体具有一定的嗜碱性,相比于在酸性环境中,其在碱性条件下,活性更佳,其中 pH 为 8 时,活性最好,效价可达  $6.67 \times 10^{10}$  pfu/mL;而 pH 低于 6 或高于 9 时,噬菌体效价下降明显,但在 pH 为 1~3 的强酸性和 pH 为 11~12 的强碱性环境中,噬菌体仍能存活,且其效价可保持在  $10^6$  pfu/mL 以上,可见其具有一定的强酸和强碱耐受性.

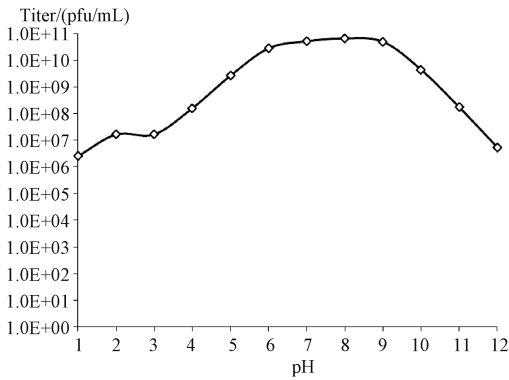


图6 噬菌体 PO157-Z 的酸碱耐受性

Fig. 6 Tolerance of the PO157-Z to acidity and alkalinity

3 讨论

通常裂解性噬菌体裂解宿主菌后,可在双层平板培养基上留下的噬菌斑透明清晰,而温和噬菌体则主要是将其基因整合到宿主菌染色体中而一般不会裂解宿主菌,因而在双层平板培养基上只能形成浑浊半透明状的噬菌斑. 因此,由双层平板培养基上噬菌斑的特点即可初步判断噬菌体的类型. 本研究中,噬菌体 PO157-Z 感染肠出血性大肠杆菌 O157 后形成的噬菌斑为清晰透明的圆形,表现出明显的烈性噬菌体噬菌斑的特征. 有研究表明,一个裂解性噬菌体重感染相应宿主菌 4 个周期后,产生的子代数量已可杀灭高达 10 亿个的宿主菌<sup>[6]</sup>. 此外,通过对噬菌体 PO157-Z 的透射电镜观察及对其基因组作进一步的 DNA 限制性内切酶酶切分析,可初步确定 PO157-Z 为双链 DNA 短尾科噬菌体. 但如果还需将 PO157-Z 噬菌体的分类确定到属,则还需对其全基因组序列进行比对及蛋白功能相似性等进一步的分析后方

可确定<sup>[27]</sup>.

噬菌体感染复数作为衡量噬菌体投入与产出的重要生物指标,其值过高或过低,都会降低噬菌体子代的扩增效率,即存在一个最佳感染复数的问题. 本研究测得噬菌体 PO157-Z 对宿主菌的最佳感染复数为 0.01,即 100 个细菌只需用 1 个噬菌体感染即可获得最佳的产量和侵染效果. 这也与其他研究<sup>[8, 12-13]</sup>结果相一致,表明少量的噬菌体即可高效快速地裂解肠出血性大肠杆菌 O157 并获得指数增殖. 最佳感染复数的确定,对于进一步优化噬菌体的纯化、功能蛋白的制备、核酸提取及噬菌体的生物改造等方面具有重要的研究意义.

从噬菌体吸附宿主菌到噬菌体子代的裂解释放就是一个爆发过程. 而此爆发过程的长短及爆发量的大小将极大影响病原菌的防治效果. 从本研究中噬菌体 PO157-Z 对肠出血性大肠杆菌 O157 的裂解曲线可以看出,仅作用约 20 min 后即表现出较明显的裂解效果,再持续作用约 20 min 后,宿主菌数量就基本缩减至最低. 可见其爆发过程较短,表明,该噬菌体可在短时间内产生更多的子代噬菌体来吸附和裂解更多的宿主菌,极大地提高了病原菌防治的高效性. 尤其面对病原菌的突然爆发,可迅速高效地利用噬菌体对其进行控制,可见其在肠出血性大肠杆菌 O157 的防治中具有良好的应用前景.

另一方面,噬菌体对宿主菌的裂解效果除与噬菌体和宿主菌自身有关外,还与外界环境有关,如 pH 值的变化,可引起二者表面电荷变化,影响噬菌体的正常吸附,进而改变其与宿主菌的作用关系,最终影响噬菌体的裂解效果. 本研究发现,噬菌体 PO157-Z 的酸碱耐受性较好,其在 pH 6~10 的活性较好,且在 pH 为 1~3 的酸性和 pH 为 11~12 的碱性环境中,噬菌体仍维持有较高活性,可见其在强酸和强碱中仍具有较好的耐受性. 良好的特性将有助于保障噬菌体制剂在经进一步制备和加工中,基本不会因酸碱环境的变化而失活.

但本研究仍发现,已经被噬菌体裂解澄清的液体培养基继续培养一段时间后又逐渐返浊. 究其原因可能是敏感细菌被裂解后,不敏感细菌逐渐繁殖生长成为优势菌株细菌,建立了在其裂解周期中所有阶段抵抗噬菌体破坏的机制,即对噬



菌体产生了耐受性. 鉴于培养基中噬菌体 PO157-Z 对肠出血性大肠杆菌 O157 作用一段时间后, 有产生抗性的情况出现, 则将来在小试污水处理系统中模拟应用噬菌体防治病原菌研究中, 可通过尝试改变噬菌体的投加量、水力停留时间、流速等参数调节, 从而避免出现抗性菌群的大量增殖, 进而保证病原菌的最佳去除效果及持续时间; 另一方面, 相较于在实验室的密闭培养基中, 病原菌在水环境中的含量相对较小, 抗性菌群增殖的数量也相对较少且所需时间更长, 则噬菌体更有可能将病原菌数量控制在更低数量以下, 保证水环境的安全性.

而且, 噬菌体在食品、水产以及畜牧等领域中治疗细菌感染尤其是耐药菌感染的防治效果已在大量动物等临床试验中得到充分肯定, 并积攒有良好的实验和理论基础. 但同时, 我们也看到噬菌体在用于临床等细菌性感染疾病的治疗过程中, 仍面临诸多亟待解决的问题. 可见, 既然现阶段无法直接利用相关医疗技术或噬菌体制剂来治疗病原菌引发的疾病, 那更应该尝试利用噬菌体控制病原菌的进一步传播, 以减小危害的扩大化. 同时, 对噬菌体生物学特性及其基因组信息等分子生物学层面的全面且深入的调查研究更是研发噬菌体生物制剂的首要前提, 因此, 本研究通过分离和鉴定肠出血性大肠杆菌 O157 噬菌体 PO157-Z, 并对其主要生物学特性和基因组类型方面进行了初步的分析研究. 接下来, 将继续对该噬菌体的基因组信息进行深入全面的研究, 为其成为防治污水处理系统中高致病菌肠出血性大肠杆菌 O157 的新型生物制剂提供实验技术及理论指导.

## 4 结论

1) 噬菌体 PO157-Z 头部呈现正六面体的立体对称, 直径约 70 nm, 尾部较短, 长约 10 nm, 宽约 10 nm, 为短尾噬菌体科.

2) 酶切结果表明, PO157-Z 基因组可被 DNA 双链限制性内切酶 *EcoR* I 切成多个片段, 进一步表明, 该噬菌体核酸类型为双链 DNA, 基因组大小约 40 Kb.

3) 生物学基本特性测定发现, 该噬菌体的最佳感染复数为 0.01, 感染效率较高, 且具有良好的酸碱耐受性, pH 耐受范围较宽, 其中 pH 6 ~ 10 的效价最高, 可达  $10^{10}$  pfu/mL 以上, 并且在 1 ~ 3

的强酸性和 11 ~ 12 的强碱性环境中, 噬菌体仍能保持一定的活性, 显示出优良的强酸和强碱耐受性.

## 参考文献

- [1] 傅明芬, 吴爱兰, 毛龙飞, 等. 一起致病性大肠杆菌引起感染性腹泻爆发调查 [J]. 浙江预防医学, 2007, 19(10): 24.
- [2] Shannon K, Lee D Y, Trevors J, et al. Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment [J]. Science of the Total Environment, 2007, 382(1): 121-129.
- [3] Prüss A, Kay D, Fewtrell L, et al. Estimating the burden of disease from water, sanitation, and hygiene at a global level [J]. Environmental Health Perspectives, 2002, 110(5): 537-542.
- [4] Giangaspero A, Cirillo R, Lacasella V, et al. *Giardia* and *Cryptosporidium* in inflowing water and harvested shellfish in a lagoon in Southern Italy [J]. Parasitology International, 2009, 58(1): 12-17.
- [5] Meric S, Fatta Kassinos D. Municipal, encyclopedia of microbiology [M]. 3rd ed. Water Treatment, 2009: 587-599.
- [6] 徐焰, 熊鸿燕. 噬菌体溶菌机制研究进展 [J]. 重庆医学, 2003, 32(1): 106-108.
- [7] 刘平, 邹亭亭, 彭丽, 等. 噬菌体疗法治疗大肠埃希菌感染的研究现状及应用前景 [J]. 重庆医学, 2012, 41(16): 1641-1644.
- [8] Sharma M. Lytic bacteriophages: potential interventions against enteric bacterial pathogens on produce [J]. Bacteriophage, 2013, 3(2): e25518.
- [9] Perry N, Cheasty T, Dallman T, et al. Application of multilocus variable number tandem repeat analysis to monitor Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 phage type 8 in England and Wales: emergence of a profile associated with a national outbreak [J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 115(4): 1052-1058.
- [10] Lee Y D, Kim J Y, Park J H. Characteristics of coliphage ECP4 and potential use as a sanitizing agent for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. Food Control, 2013, 34(2): 255-260.
- [11] Hudson J A, Billington C, Cornelius A J, et al. Use of a bacteriophage to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 on beef [J]. Food Microbiology, 2013, 36(1): 14-21.
- [12] Ferguson S, Roberts C, Handy E, et al. Lytic bacteriophages reduce *Escherichia coli* O157: H7 on fresh cut lettuce introduced through cross-contamination [J]. Bacteriophage, 2013, 3(1): e24323.
- [13] Boyacioglu O, Sharma M, Sulakvelidze A, et al. Biocontrol of *Escherichia coli* O157: H7 on fresh-cut leafy greens [J].

- Bacteriophage, 2013, 3(1): e24620.
- [14] Synnott A J, Kuang Y, Kurimoto M, et al. Isolation from sewage influent and characterization of novel *Staphylococcus aureus* bacteriophages with wide host ranges and potent lytic capabilities [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(13): 4 483-4 490.
- [15] 李洁, 余泽英, 赵宗美, 等. 洱海下游肠道致病菌噬菌体分离与鉴定 [J]. 大理学院院报, 2011, 10(12): 97-98.
- [16] 赵晨, 王铭. 噬菌体治疗:旧概念,新阶段 [J]. 微生物学通报, 2011(11): 1 698-1 704.
- [17] Lin N T, Chiou P Y, Chang K C, et al. Isolation and characterization of phi AB2: a novel bacteriophage of *Acinetobacter baumannii* [J]. Research in Microbiology, 2010, 161(4): 308-314.
- [18] Wu L T, Chang S Y, Yen M R, et al. Characterization of extended-host-range pseudo-T-even bacteriophage Kpp95 isolated on *Klebsiella pneumoniae* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(8): 2 532-2 540.
- [19] Wei Y, Kirby A, Levin B R. The population and evolutionary dynamics of *Vibrio cholerae* and its bacteriophage: conditions for maintaining phage-limited communities [J]. The American Naturalist, 2011, 178(6): 715-725.
- [20] Zhang J, Kraft B L, Pan Y, et al. Development of an anti-*Salmonella* phage cocktail with increased host range [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2010, 7(11): 1 415-1 419.
- [21] Green M R, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
- [22] Jamalludeen N, Johnson R P, Friendship R, et al. Isolation and characterization of nine bacteriophages that lyse O149 enterotoxigenic *Escherichia coli* [J]. Veterinary Microbiology, 2007, 124(1): 47-57.
- [23] 乐毅全, 王士芬. 环境微生物学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 19.
- [24] 李灏, 谢慧君, 孔健, 等. 畜禽肠道致病菌噬菌体的生物学特性研究 [J]. 微生物学通报, 2004, 31(2): 10-14.
- [25] Nichol S, Beaty B, Elliott R. Virus Taxonomy [C]. VIIIth report of the international committee on taxonomy of viruses [M]. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005.
- [26] Alisky J, Iczkowski K, Rapoport A, et al. Bacteriophages show promise as antimicrobial agents [J]. Journal of Infection, 1998, 36(1): 5-15.
- [27] Lavigne R, Seto D, Mahadevan P, et al. Unifying classical and molecular taxonomic classification: analysis of the *Podoviridae* using BLASTP-based tools [J]. Research in Microbiology, 2008, 159(5): 406-414.