

论著 • Article

## 信都三黄鸡致病性大肠杆菌噬菌体的分离纯化

余雁均 何媛媛 陆军伯 吕金凤 邓年方

(贺州学院 食品与生物工程学院 广西 贺州 542899)

**摘要** 该研究从广西贺州信都三黄鸡样本中分离大肠杆菌,筛选致病性较强且耐药情况较严重的菌株,以此作为宿主菌分离与其相应的裂解性噬菌体。通过划线法分离出大肠杆菌菌株42株,用PCR分子法鉴定出34株阳性菌株,通过毒力基因PCR分子检测法,检测出5株致病性大肠杆菌。用K-B纸片法进行耐药性检测,检测出2株强耐药性的致病性大肠杆,以此作为宿主菌,分离纯化出2株噬菌体P1和P2。该研究为后续对噬菌体进行生物学特性以及噬菌体制剂的研究开发打下了基础。

**关键词** 噬菌体; 大肠杆菌; PCR鉴定; 药敏试验

**文章编号** 019-2025-3461

## Isolation and Purification of Pathogenic Escherichia Coli Bacteriophages from Xindu Sanhuang Chicken

Yu Yangjun, He Yuanyuan, Lu Junbo, Lv Jinfeng, Deng Nianfang

( College of Food and Biotechnology, Hezhou University, Hezhou 542899, China )

**Abstract** This study isolated Escherichia coli from Xindu Sanhuang chicken samples, screened strains with strong pathogenicity and severe drug resistance, and used them as host bacteria to isolate corresponding lytic bacteriophages. 42 strains of Escherichia coli were isolated by streaking method, and 34 positive strains were identified by PCR molecular method. By using virulence gene PCR molecular detection method, 5 strains were identified as pathogenic Escherichia coli. Using K-B paper method to detect drug resistance of these 5 pathogenic Escherichia coli strains, 2 highly resistant pathogenic Escherichia coli strains were obtained. Using these two drug-resistant pathogenic Escherichia coli strains as host bacteria, two bacteriophages(P1 and P2) were isolated and purified. This study laid the foundation for further research on the biological characteristics of bacteriophages and bacteriophage preparations .

**Keywords** Bacteriophage; Escherichia coli; PCR identification; Drug sensitivity test

收稿日期: 2025-11-28 录用日期: 2025-12-27

通讯作者: 邓年方, 单位: 贺州学院 食品与生物工程学院 广西 贺州

基金项目: 广西大学生创新创业训练计划项目(编号:S202311838118)

大肠杆菌为革兰氏阴性菌，致病性大肠杆菌通过获得毒力因子（毒素、黏附素等）进化而来，其致病性与毒力基因数量正相关，是导致禽类大肠杆菌病的主要病原。各类抗生素的研制为动物细菌性疾病的防治带来了很大的帮助，很多细菌性疾病得到了有效控制甚至消灭，这其中就包括禽大肠杆菌病<sup>[1]</sup>。但是近年来，我国多地养殖场分离的鸡源致病性大肠杆菌呈现出严重的耐药性问题。冯晓东<sup>[2]</sup>、贾春玲<sup>[3]</sup>、徐亚亚<sup>[4]</sup>、王欣宇<sup>[5]</sup>等分离鸡源致病性大肠杆菌，对其耐药情况进行调查，发现这些菌株对抗生素产生耐药的情况已经很普遍。在大肠杆菌耐药情况十分严峻的情况下，筛选预防和治疗鸡大肠杆菌病的替抗产品显得尤为重要。噬菌体是细菌的病毒，经人类发现之时，就已经与抗细菌感染紧密联系在了一起。张鉴明<sup>[6]</sup>等人在文昌鸡育雏期实施复合噬菌体制剂干预方案，验证了噬菌体疗法替代传统抗生素的可行性；赵梦诗<sup>[7]</sup>等人分离并筛选了 100 株 CRKp 专性噬菌体，设计出杀菌效果最优的噬菌体鸡尾酒组合；赵以恒<sup>[8]</sup>等人在 2023 年对 100 株鸭源 *E.coli* 进行了耐药性分析，为耐药性 *E.coli* 感染的防控提供了理论基础和实验支持。

广西贺州信都三黄鸡多为林下养殖，保证了三黄鸡的“生态、健康、优质”，但林下养殖在提高肉质的基础上，也为三黄鸡提供了相对开放的环境，容易滋生疫病。由致病性大肠杆菌引起的鸡大肠杆菌病近几年在贺州有明显上升趋势，大肠杆菌感染已成为威胁贺州养鸡业的主要细菌疫病之一，并且耐药检测发现耐药菌在贺州养殖场中普遍存在。解决上述问题最有效的方法之一就是筛选预防和治疗鸡大肠杆菌病的替抗产品。本研究拟从贺州信都鸡的致病性大肠杆菌菌株中筛选致病性较强且耐药情况较严重的菌株，以此作为宿主菌，分离与其

相应的裂解性噬菌体，为后续对噬菌体进行生物学特性以及噬菌体制剂的研究开发打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验试剂

LB 培养基、麦康凯培养基、伊红美蓝培养基、技术琼脂粉（均购自广东环凯微生物科技有限公司）；2×Taq Master Mix（购自康为世纪公司）；药敏纸片（含 9 种抗生素药物，分别为氨苄西林、克林霉素、四环素、链霉素、阿莫西林、氯霉素、头孢唑啉、复方新诺明、诺氟沙星，购自常德比克曼生物科技有限公司）；所用引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

Phahe buffer：将 1.7532 g NaCl、1.2114 g Tris、0.406 g  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 、0.04 g 无水  $CaCl_2$  溶于 200 mL 蒸馏水中，灭菌备用。

污水样本：广西贺州农贝贝农牧科技有限公司提供的信都三黄鸡鸡场污水。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 大肠杆菌的分离纯化

（1）取样：取 5 mL 粪便污水样品加入到 200 mL LB 液体培养基的锥形瓶内，轻轻摇晃，封口。

（2）分离纯化：用无菌接种环将样品于麦康凯琼脂培养基上进行三区划线，随后置于 37℃ 恒温培养箱中培养 24 小时，观察并记录平板上形成的菌落情况。选取疑似目标菌落转接至伊红美蓝琼脂平板，置于 37℃ 继续恒温培养 24 小时。随后再次挑取特征性菌落接种至新鲜麦康凯琼脂平板。上述分离纯化步骤重复进行 5 至 7 次，最终获得纯培养的大肠杆菌菌株。

#### 1.2.2 大肠杆菌的 PCR 鉴定

将纯化好的大肠杆菌菌株，接种于 LB 液体培养基中，于 37℃，200 r/min 摇床中恒温

培养 16-18 h 后, 通过 PCR 方法进行大肠杆菌的鉴定。引物 16SrDNA 序列见表 1。PCR 反应体系为上下游引物各 1 uL, 2×Taq Master Mix 12.5 uL, DNA 模板 1 uL, dd H<sub>2</sub>O 补足至 25 μL; 反应程序为: 预变性 94℃ 5 min; 变性 94℃ 30 s; 退火 58℃ 30 s; 延伸 72℃ 60 s; 终延伸 72℃ 5 min; 30 次循环。

### 1.2.3 大肠杆菌的毒力基因鉴定

采用毒力基因 PCR 分子检测法分别扩增 6 种相关毒力基因, 所采用的体系及反应程序依据 1.2.2 的进行, 毒力基因引物序列如表 2。

### 1.2.4 大肠杆菌的耐药性检测

采用 K-B 纸片法进行药敏试验。将大肠杆菌单菌落接种于 LB 液体培养基中, 37℃ 振荡培养至适宜浓度并稀释至菌量约为 108 CFU/mL (OD 值约为 0.533) 取适量菌悬液均匀涂

布于 LB 固体琼脂平板表面, 静置使菌液充分吸收。随后, 用无菌镊子将药敏纸片等间距地放置在平板上, 划分 6 个分区, 确保分布均匀。将平板倒置, 置于 37℃ 恒温培养箱中孵育 20 h, 每组实验设置 3 个平行重复。培养结束后, 依据各抑菌圈直径判定菌株的药物敏感性。

### 1.2.5 噬菌体的分离纯化

(1) 挑取大肠杆菌单菌落接种至含 15 mL LB 液体培养基的试管中, 置于摇床培养 (37℃, 200 r/min) 16 至 18 小时;

(2) 取 5 mL 污水样本与 10 mL 大肠杆菌菌液混合, 加入至 100 mL LB 液体培养基中, 置于摇床培养 (37℃, 200 r/min) 16 至 18 小时, 获得噬菌体富集液;

(3) 取 1.5 mL 富集液于离心管中, 离心 (5000 g) 10 分钟, 上清液用 0.22 μm 滤膜过

表 1 大肠杆菌 16S rDNA 的鉴定引物

引物名称	引物序列 (5'-3')	产物大小 (bp)
16S rDNA-F	GAAGCTTGCTTCTTTGCT	521bp
16S rDNA-R	GAGCCCGGGGATTTCACAT	

表 2 毒力基因的引物序列

引物名称	引物序列 (5'-3')	目的条带大小 (bp)
tsh	tsh-F	GTCTGTCAGACGTCTGTGTTTC
	tsh-R	ATAGGATGACAGGCTACCGAC
cvaC	cvaC-F	TCCAAGCGGACCCCTTATAG
	CvaC-R	CGCAGCATAGTTCCATGCT
iss	Iss-F	ATCACATAGGATTCTGCCG
	Iss-R	CAGCGGAGTATAGATGCCA
iroN	IroN-F	CCTCCGACGATGATAATGAC
	IroN-R	GATACATTATGCGTAATGCC
iucD	IucD-F	GAAGCATATGACACAATCCTG
	IucD-R	CAGAGTGAAGTCATCACGCAC
irp2	irp2-F	CTGATGAACCTCACTCGCTATCC
	irp2-R	AGCATCTCCTGGCTCTGCTC

滤，获得噬菌体滤液；

(4) 将 500  $\mu\text{L}$  噬菌体缓冲液、500  $\mu\text{L}$  大肠杆菌菌液、5 mL 1% 水琼脂混合均匀后，倒入含 LB 固体培养基的培养皿中。待上层水琼脂凝固后，取 5  $\mu\text{L}$  噬菌体滤液，滴于双层培养基表面，静置直至溶液完全吸收，然后将培养皿放置于 37°C 恒温培养箱中，过夜培养；

(5) 用接种环或接种针取单个噬菌斑，转移至 100  $\mu\text{L}$  噬菌体缓冲液 (phage buffer) 中洗脱。

(6) 将获得的噬菌体进行 10 倍系列稀释，取每个稀释梯度的噬菌体液 10  $\mu\text{L}$ ，混合 500  $\mu\text{L}$  细菌液、500  $\mu\text{L}$  噬菌体缓冲液 (phage buffer) 以及 5 mL 1% 水琼脂，倒入 LB 固体平板中，并在 37°C 条件下过夜培养。此纯化步骤重复进行 3-5 次，获得纯化的噬菌体。

### 1.2.6 效价测定

将纯化的噬菌体液进行 10 倍系列稀释，选取适宜浓度的三个连续稀释梯度，每个梯度取 100  $\mu\text{L}$  稀释液与等体积宿主菌悬液混合，室温孵育 10 分钟后，加入 4 mL 灭菌后冷却至 40°C 的 1% 水琼脂，充分混匀后倾注于已固化的 LB 琼脂平板上。待上层培养基凝固后，37°C 倒置培养 16-18 小时。选择噬斑数在 30-300 个之间的平板进行计数，每个稀释度设置

三个平行重复，最终效价以 PFU/mL 表示，计算公式为：噬斑数  $\times$  稀释倍数  $\times 10$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 大肠杆菌的分离纯化

按 1.2.1 的实验方法，分离得到 42 株疑似大肠杆菌，命名依次为 *EC1*、*EC2*、*EC3*、*EC4*……*EC42*。如图 1 所示，菌株在麦康凯固体培养基上呈粉红色，形态学特征表现为表面光滑湿润、圆形凸起且边缘规则；如图 2 所示，菌株在伊红美蓝培养基上，颜色为黑色，菌落中心隆起，表面光滑，边缘整齐，带有金属光泽。

### 2.2 大肠杆菌的 PCR 鉴定

对已纯化菌株进行 PCR 鉴定，此次分离纯化的 42 株菌株中，有 34 株菌株出现了与阳性菌株一致的目的条带，片段大小约为 521 bp，



图 1 在麦康凯培养基的菌落形态



图 2 在伊红美蓝培养基的菌落形态

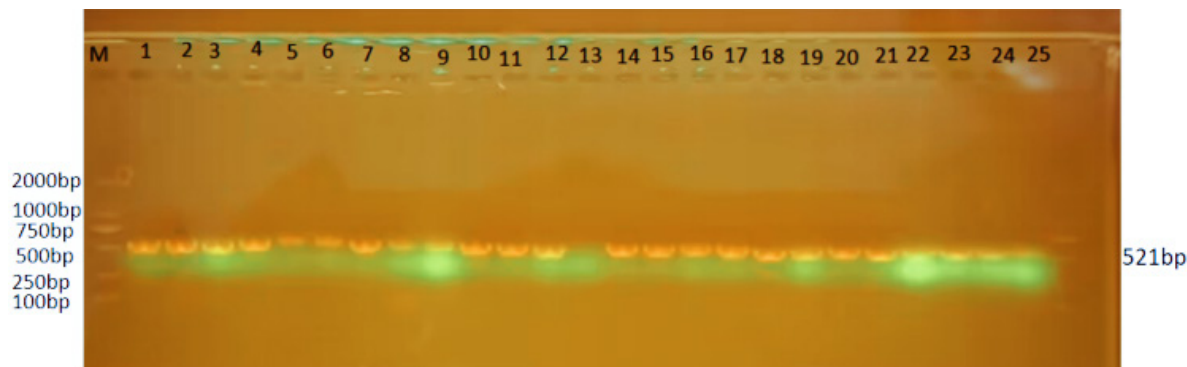


图 3 大肠杆菌鉴定部分 PCR 电泳结果



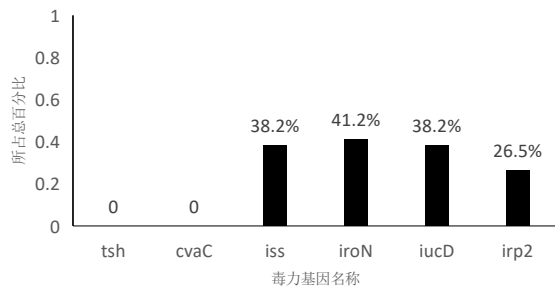


图4 六种大肠杆菌毒力基因分布情况

部分结果如图3所示。

### 2.3 大肠杆菌的毒力基因鉴定

对上述鉴定的34株鸡源大肠杆菌进行了毒力基因检测，结果如图4、5所示。

图4可知，在所检测的6种毒力基因中，*iroN*的阳性检出率最高，为41.20%；*iss*与*iucD*的检出率均为38.20%；而*tsh*与*cavC*则未被检出。由图5可知，在这6种毒力相关基因的检测中，共有2株菌株同时携带4种基因，占总数的6%；另有3株菌携带3种，占比9%；26株菌仅携带1至2种毒力基因，占比达76%；此外，有3株大肠杆菌未检出任何上述毒力基因，占总样本数的9%。依据文献<sup>[17,18]</sup>，当菌株同时携带*tsh*、*cvaC*、*iss*、*iroN*、*iucD*和*irp2*等6种关键的毒力基因中的3种或以上时，即可判定为致病性菌株。

实验结果显示，菌株*EC20*携带3个毒力基因（*iss*、*iroN*、*irp2*）；菌株*EC8*和*EC16*携

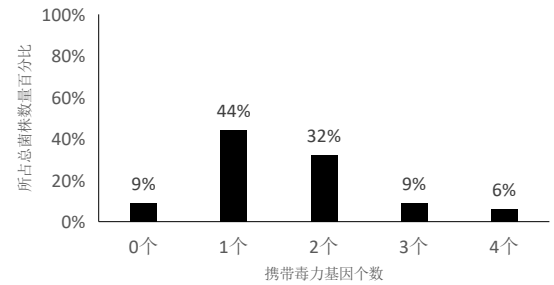


图5 携带毒力基因个数情况

带3个毒力基因（*iss*、*iucD*、*iroN*）；菌株*EC5*和*EC6*携带4个毒力基因（*iss*、*iucD*、*iroN*、*irp2*）。因此，共有5株菌株为致病性大肠杆菌，分别为*EC5*、*EC6*、*EC8*、*EC16*、*EC20*。

### 2.4 大肠杆菌的耐药性检测

对5株致病性大肠杆菌进行了9种药物的耐药性检测。表3的结果表明，这些大肠杆菌对9种抗生素药物均存在不同程度的耐药，其中*EC5*、*EC6*菌株耐抗生素种类高达7种。

图6和图7检测结果显示，菌株*EC5*和

表3 菌株耐药性情况

菌株名称	耐抗生素数量（种）
<i>EC5</i>	7
<i>EC6</i>	7
<i>EC8</i>	3
<i>EC16</i>	1
<i>EC20</i>	5

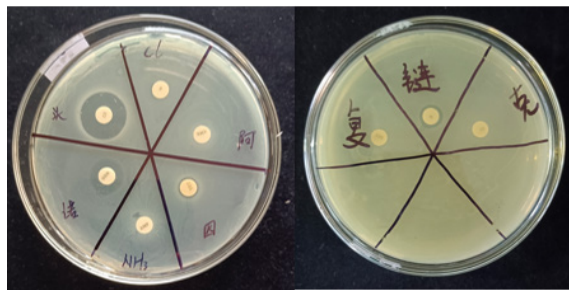


图6 菌株EC5对9种药物的耐药性检测

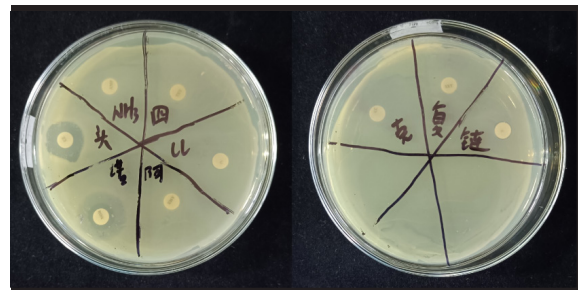


图7 菌株EC6对9种药物的耐药性检测

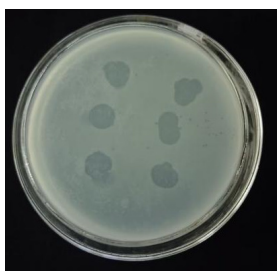


图 8 宿主菌 EC5 上的噬菌斑

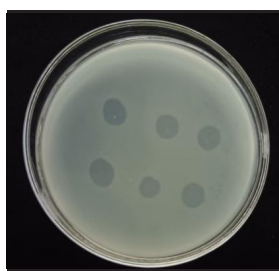


图 9 宿主菌 EC6 上的噬菌斑

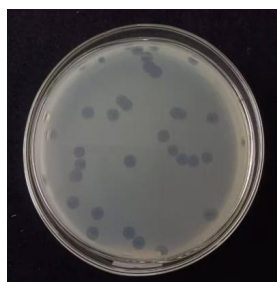


图 10 噬菌体 P1

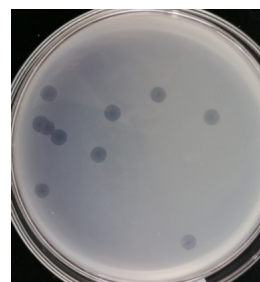


图 11 噬菌体 P2

EC6 仅对诺氟沙星和头孢唑啉敏感, 对其它 7 种抗生素耐药。

### 2.5 噬菌体分离

对所采集样品按照 1.2.5 方法进行噬菌体分离, 结果显示: 只有以大肠杆菌菌株 EC5 和 EC6 为宿主菌的平皿上有噬菌斑的存在 (见图 8、图 9), 其他菌株均未分离出来相应的噬菌体。

### 2.6 噬菌体的纯化

对上述分离得到的噬菌体进行纯化, 以大肠杆菌 EC5 和 EC6 为宿主菌, 各分离得到 1 株噬菌体, 边缘整齐、大小均一、圆形透明, 具有裂解性噬菌体特征 (如图 10、图 11 所示), 将这两株噬菌体分别命名为 P1、P2。

### 2.7 噬菌体的效价测定结果

噬菌体经过纯化增殖后, 用 1.2.6 的方法分别对其进行效价测定, 结果显示噬菌体 P1 的效价为  $2.9 \times 10^9$  PFU/mL, 噬菌体 P2 的效价为  $4.717 \times 10^9$  PFU/mL。效价越高, 噬菌体对大肠杆菌的感染力越强, P2 比 P1 更具感染力。

## 3 结论

对贺州市信都三黄鸡养鸡场提供的污水样本中分离得到 42 株疑似大肠杆菌, 其中 34 株经 PCR 检测为大肠杆菌菌株; 对 34 株大肠杆菌进行毒力基因鉴定, 有 5 株菌株为致病性大肠杆菌; 对 5 株大肠杆菌进行药敏试验, 筛选出 2 株耐药情况较严重的大肠杆菌; 以上述大

肠杆菌为宿主菌, 分离出 2 株裂解性噬菌体。该研究为后续对噬菌体进行生物学特性以及噬菌体制剂的研究开发打下了基础。

**利益冲突声明:** 本文不存在任何利益冲突。

## 参考文献

- [1] 姚澜. 禽致病性大肠杆菌噬菌体分离鉴定及生物学特性分析 [D]. 天津农学院, 2023.000109.
- [2] 冯晓东, 刘风波, 连亮亮. 山西省仔猪黄白痢大肠杆菌耐药性研究 [J]. 国外畜牧学 (猪与禽), 2021, 41(06): 26-30.
- [3] 贾春玲, 林森馨, 李天宇, 等. 中山地区猪源大肠杆菌的耐药性分析 [J]. 广东畜牧兽医科技, 2021, 46(06): 26-27+49.
- [4] 徐亚亚, 袁华根, 孙晨明, 等. 江苏部分地区禽致病性大肠杆菌分离株的生物学特征及耐药性研究 [J]. 畜牧与兽医, 2021, 53(11): 74-79.
- [5] 王欣宇, 吕雪峰, 任锐, 等. 鸡源大肠杆菌的分离鉴定及药敏分析 [J]. 现代畜牧兽医, 2021.04.013.
- [6] 张鉴明, 童菊芸, 薛素强. 噬菌体鸡尾酒疗法在文昌鸡育雏生产中的应用效果评估 [J]. 养禽与禽病防治, 2024, (09): 32-37.
- [7] 赵梦诗. 噬菌体鸡尾酒疗法治疗多重耐药肺炎克雷伯菌感染的研究 [D]. 福建农林大学, 2024.000241.
- [8] 赵以恒. 多重耐药大肠杆菌噬菌体分离鉴定及鸡尾酒疗法研究 [D]. 扬州大学, 2023.000831.