



论著 • Article

信都三黄鸡致病性大肠杆菌噬菌体生物学特性研究

何媛媛 陈业浩 李美萍 李林珍 邓年方

(贺州学院 食品与生物工程学院 广西 贺州 542899)

摘要 探究信都三黄鸡源性噬菌体,明确其生物学特性,为后续噬菌体应用研究做铺垫。本研究从鸡养殖场排泄的污水中分离大肠杆菌,以分离出的大肠杆菌为宿主菌,对养殖场污水中进行噬菌体的初步增殖,采用双层琼脂平板法分离纯化能特异性裂解大肠杆菌的噬菌体,测定其效价后,进一步对其最佳感染复数(MOI)、一步生长曲线、热稳定性和酸碱稳定性等生物学特性进行研究;通过平板菌落计数法测定噬菌体体外抑菌效果。从鸡养殖场污水中分离到21株耐药性大肠杆菌,命名为E1到E2。通过混合平板培养法观察到透明清晰的噬菌斑,分离得到大肠杆菌E13的特异性裂解宿主菌的噬菌体,命名为P1,结果得出P1的最佳感染复数为0.01,一步生长曲线体现为潜伏期40min爆发期50min,温度在40到50℃能保持效价稳定,pH4~11之间存活,且pH为6~7时均保持很高的效价,体外抑菌检测中对宿主菌的生长抑制在前5个小时效果显著,而稳定期的杀菌效果在感染复数为0.001时效果最好。本研究对该噬菌体进行生物学特性及体外抑菌效果评价,为信都三黄鸡致病性大肠杆菌病的防治提供理论依据。

关键词 噬菌体; 大肠杆菌; 效价; 噬菌斑

文章编号 019-2

Study on the Biological Characteristics of Pathogenic Escherichia Coli Phages in Xindu Sanhuang Chickens

He Yuanyuan, Chen Yehao, Li Meiping, Li Linzhen, Deng Nianfang

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

Abstract Investigating avian phages from Xindu Sanhuang chickens to elucidate their biological characteristics, laying the groundwork for subsequent phage application research. This study isolated Escherichia coli from wastewater discharged by chicken farms. Using the isolated E. coli as the host bacterium, phages were preliminarily propagated in the farm wastewater. The double-layer agar plate method was employed to isolate and purify phages capable of specifically lysing E. coli. Following titer determination, further investigations were conducted on biological characteristics including

收稿日期: 2025-12-30 录用日期: 2026-01-22

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: 信都三黄鸡致病性大肠杆菌噬菌体生物学特性研究 (编号: 202411838131)

optimal multiplicity of infection (MOI), one-step growth curves, thermal stability, and acid-base stability. In vitro bacteriostatic effects were assessed via plate colony counting. Twenty-one drug-resistant *E. coli* strains were isolated from poultry farm wastewater, designated E1 to E2. Transparent, well-defined plaques were observed using the mixed-plate culture method. A phage specific to lysing *E. coli* E13 was isolated and designated P1. Results indicated an optimal multiplicity of infection (MOI) of 0.01 for P1. Its one-step growth curve exhibited a 40-minute latent period and a 50-minute burst phase. The potency remained stable at temperatures between 40 and 50 °C, It survived across pH 4–11, maintaining high potency at pH 6–7. In vitro antibacterial assays demonstrated significant growth inhibition of the host bacterium within the first five hours, with optimal lethal effects during the stationary phase at an infection titer of 0.001. This study evaluates the biological characteristics and in vitro antibacterial efficacy of this bacteriophage, providing a theoretical basis for the prevention and control of pathogenic *Escherichia coli* disease in Xindu Sanhuang chickens.

Keywords Bacteriophage; *Escherichia coli*; Potency; Bacteriophage plaque

大肠杆菌病是危害养鸡业常见的细菌性传染病之一，在鸡群中感染率高，致病率高。信都三黄鸡是广西贺州著名的地方鸡种，以其肉质香鲜、风味佳而闻名广西，致病性大肠杆菌引起的大肠杆菌病已成为威胁信都三黄鸡的主要细菌疫病之一。临床上预防和治疗鸡大肠杆菌感染主要依赖抗生素，由于抗生素大量、不规范使用，导致出现耐药菌株，造成药物残留问题，危害公共卫生安全。

噬菌体作为一种细菌病毒，结构简单，本身不具有活性，只有侵入宿主菌才能进行繁殖。大肠杆菌病在一定的条件下会对禽类产生致病性，给家禽养殖业造成了严重威胁，目前，在养殖端施行限抗、禁抗已成为必然趋势，噬菌体治疗有望成为代替抗生素的一种新方法。噬菌体的作为一种杀菌剂，其特异性强、安全性高、分布广泛，目前主要应用于提高动物产品的安全性能及改善动物和人类肠道健康等方面^[1]。根据噬菌体在宿主菌内的生活周期可将噬菌体分为溶原性噬菌体和烈性噬菌体。烈性噬菌体一个生活周期平均每个可释放 20 到 200 个子代颗粒，具有很强的裂解效率，以及远高于宿主菌的复制效率和繁殖能力^[2]。烈性噬菌体入侵宿主菌并在体内稳定增殖后，一

个噬菌体颗粒可以杀灭数亿个宿主菌。噬菌体不仅能够靶向破坏特异性细菌，而且能够以指数方式复制，产生大量子代，这凸显了它们在治疗细菌性疾病中的潜在作用^[3]。姚澜^[4]等用双层琼脂平板法从鸡场粪便样品中分离纯化禽致病性大肠杆菌噬菌体，对其形态、裂解谱、最佳感染复数 (MOI)、一步生长曲线、pH 和温度稳定性、体外抑菌能力及抑制生物被膜形成能力进行测定，测定结果显示噬菌体 v B_EcoS_AH50 可特异性裂解大肠杆菌，裂解能力强、耐受性高、安全性好，提示其在防治禽大肠杆菌病方面均有潜在应用价值；赵尊福^[5]从四川成都某鸡场污水中，通过双层琼脂平板法从鸡场的污水中分离纯化筛选出 1 株宽裂解谱的大肠杆菌噬菌体 Bp16，通过对其进行生物学特性研究，结果表明，噬菌体 Bp16 具有热稳定性、耐酸碱以及裂解能力强等特性，为后续噬菌体治疗试验奠定了基础，通过攻毒试验，测出噬菌体 Bp16 对大肠杆菌病具有防治作用；郝贺^[6]等从蛋鸡养殖场污水中分离并纯化 1 株沙门菌噬菌体 SJT-90，对其的 MOI、一步生长曲线、热稳定性、酸碱稳定性以及裂菌谱等生物学参数进行了测定，沙门菌噬菌体 SJT-90 具有裂解谱宽、耐酸耐碱耐高温、裂解能力

强、安全等特点；艾梦燕^[7]通过对河南省部分规模化养鸡场采集病死鸡的心、脑、盲肠等，腹泻鸡的肛拭子，环境中的污水、粪便等430份样品，分离得到的噬菌体Bp1具有较好的裂解性，在体外环境下对宿主菌也具有较强的抑制和消灭作用；徐美余^[8]等以养殖场病鸡肠道中分离的志贺氏病原菌为宿主，筛选鉴定噬菌体，聚乙二醇沉淀浓缩噬菌体，测定噬菌体对多重耐药致病性志贺氏菌的裂解效果，结果表明，噬菌体PSF26爆发期短，裂解量高，有较好的酸碱、温度耐受性，对多重耐药性福氏和宋内志贺氏菌有良好的作用效果。吴圆圆等^[9]从鸡场污水中分离纯化得到1株鸡埃希氏菌裂解性噬菌体vB-EcoM-IME540(IME540)，测定其最佳感染复数、耐热稳定性、pH敏感性等生物学特性，可知最佳MOI=0.000 001，潜伏期约为20 min，暴发时长约为130 min，裂解量约为23 PFU/cell；在80℃条件下20 min活性全部丧失；在pH为4.0~13.0内均有很高的活性。说明噬菌体vB-EcoM-IME540也是一株具有一定耐热、耐酸碱能力的肌尾科的大肠埃希氏菌裂解性噬菌体。

1 试验材料

LB肉汤培养基、营养琼脂培养基、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）；

Phahe buffer：将1.7532 g NaCl、1.2114 g Tris、0.406 g MgCl₂·6H₂O、0.04 g 无水CaCl₂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。

2 实验方法

2.1 培养基的准备

（1）伊红美蓝琼脂培养基：按照37.5 g/L的配比配制培养基，高温高压灭菌后倒入培养皿凝固后保存；

（2）麦康凯固体培养基：按照55 g/L的配比配制培养基，高温高压灭菌后倒入培养皿凝固后保存；

（3）营养琼脂固体培养基：按照37.5 g/L的配比配制培养基，高温高压灭菌后倒入培养皿凝固后保存；

（4）LB肉汤培养基：按照20 g/L的配比配制培养基导入试管，高温高压灭菌后冷却保存。

2.2 生物学特性研究

2.2.1 最佳感染复数：

将噬菌体溶液与宿主菌液按照MOI值为10, 1, 0.1, 0.01, 0.001等体积混合，振荡混匀后，37℃培养箱孵育10 min，然后8000 r/min离心10 min，除去上清中未吸附的游离噬菌体，将所得沉淀加入到8 mL LB液体培养基中，振荡混匀后放入37℃，180 r/min摇床培养5 h，取1 mL于10000 r/min，10 min离心，过滤取上清液，按照一定比例进行适当稀释后，测定其效价，重复3次，确定其最佳感染复数。

2.2.2 一步生长曲线

将噬菌体溶液与宿主菌以最佳感染复数比等体积加入，振荡混匀，37℃孵育10 min，13000 r/min离心1 min，尽量去除上清液，用LB液肉汤培养基悬浮沉淀，加入LB肉汤培养基补足至4 mL，置于37℃，180 r/min摇床培养，同时开始计时，在0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 120 min时分别取样400 μL，离心13000 r/min，30 s，取上清，稀释后测效价，重复3次。

表 1 最佳感染复数测定准

感染复数	噬菌体数 (pfu/mL)	细菌数 (cfu/mL)	噬菌体效价 (pfu/mL)
10	10^9	10^8	4.5×10^9
1	10^8	10^8	3.4×10^9
0.1	10^7	10^8	9.1×10^{10}
0.01	10^6	10^8	1.3×10^{11}
0.001	10^5	10^8	2.3×10^{10}

2.2.3 热稳定性

在 10 支无菌 EP 管中分别加入 200 μ L 噬菌体溶液，于 40℃、50℃、60℃、70℃、80℃ 水浴锅中孵育 30 min、60 min，取出后立即冰浴冷却，稀释测效价，重复 3 次。

2.2.4 酸碱稳定性

用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 调节 LB 肉汤的 PH 值，然后各取 900 μ L 于离心管中，在 37℃培养箱中放置温度恒定后分别加入 100 μ L 噬菌体液，振荡混匀，37℃培养箱中孵育 2 h，稀释测效价，重复 3 次。

2.3 体外抑菌检测

2.3.1 对所接种宿主菌的生长抑制效果：

取宿主菌 1 mL 分别接种于两个含有 100 mL 的 LB 肉汤培养基的锥形瓶中，混匀，向其中一个锥形瓶中加入最佳感染复数比的噬菌体溶液，另一个不做任何处理，混匀，放置于 37℃，180 r/min 摇床中振荡培养，分别在 0 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、8 h 取样，将样品稀释至适宜梯度，采用平板菌落计数法对宿主菌进行计数。以此用来验证噬菌体对接种宿主菌生长的抑制效果。

2.3.2 对处于稳定期宿主菌的杀菌作用：将稳定期的宿主菌作为对象，将菌液浓度进行调整后 (约为 1.0×10^8 CFU/mL)，按感染复数 (MOI) 为 0.001、0.1 和 10 向处于对数期的宿主菌中接种噬菌体，振荡混匀，37℃，180 r/min 摇床培养，开始计时，于 0 h、5 h 分别取

样，将样品稀释至合适梯度，采用平板菌落计数法对宿主菌进行计数，以此用于评价噬菌体的杀菌效果。

3 结果与分析

3.1 噬菌体生物学特性

3.1.1 噬菌体最佳感染复数

本实验测定了噬菌体 P1 的最佳感染复数结果如下表所示，当 MOI=0.01 时，P1 产生子代噬菌体的数量最多，效价为 1.3×10^{11} 。因此噬菌体 P1 的最佳感染复数为 0.01。(表 1)

3.1.2 噬菌体一步生长曲线

噬菌体的一步生长曲线如图 1 所示，噬菌体 P1 在前 20 min 效价逐渐上升，20~40min 效

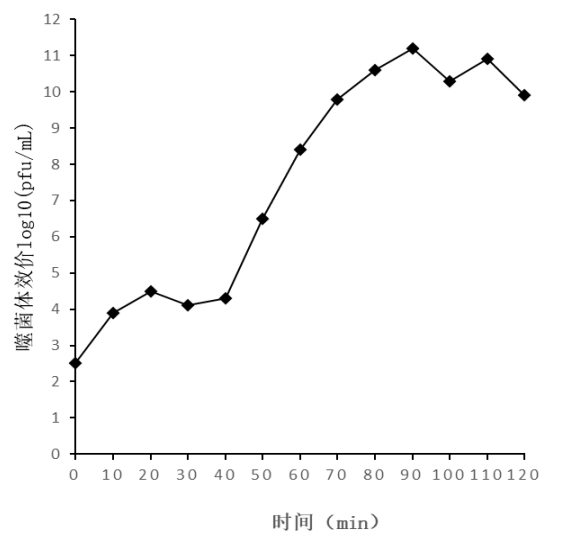


图 1 噬菌体一步生长曲线

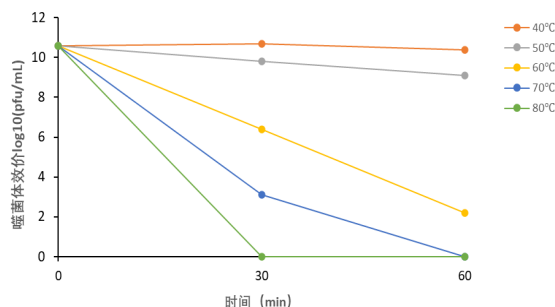


图2 噬菌体热稳定性检测结果

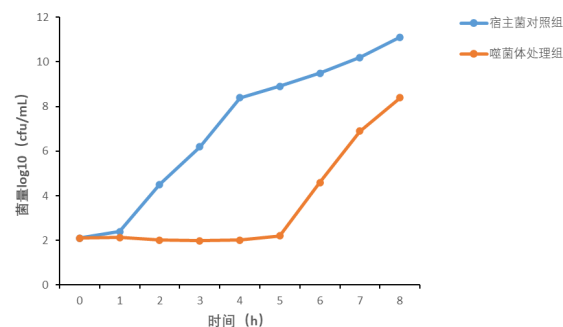


图4 噬菌体酸碱稳定性

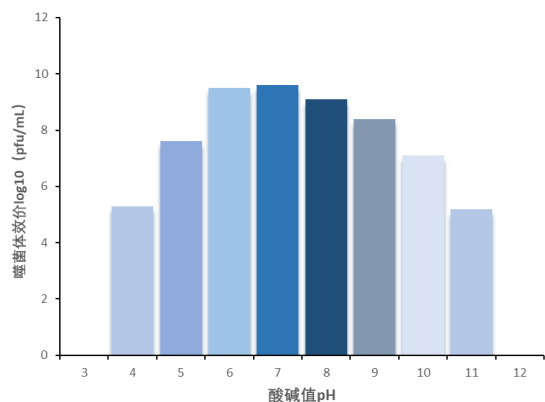


图3 噬菌体酸碱稳定性

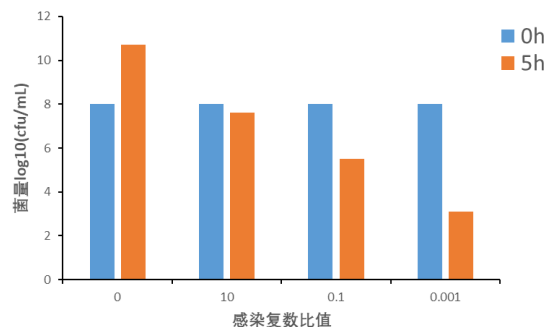


图5 噬菌体 P1 抑菌效果

价趋于平稳, 40~80 min 迅速上升, 到 90min 处到达峰值后缓慢波动下降, 可知该噬菌体潜伏期为 40min, 爆发期为 50 min, 计算裂解量为 10^2 pfu/cell。(图 1)

3.1.3 噬菌体热稳定性

由图 2 所示, 噬菌体 P1 在 40℃~50℃ 实验组效价能保持稳定, 60℃ 处理 0.5 h 效价下降 3 个数量级, 处理 1 h 后效价降低 8 个数量级, 70℃ 处理 0.5 h 效价 6 个数量级, 80℃ 在 30 min 内失活。(图 2)

3.1.4 噬菌体酸碱稳定性

本实验测定了噬菌体 P1 在不同 pH 环境下作用两小时后的效价, 用以评价所选噬菌体在不同 pH 环境中的存活能力。结果图 3 所示, 噬菌体 P1 能在 pH 4~11 之间存活, 且 pH 为

6~7 时均保持很高的效价。(图 3)

3.2 噬菌体的体外抑菌检测

3.2.1 对所接种宿主菌的生长抑制效果评价

结果如图 4 所示, 噬菌体 P1 与宿主菌混合共培养, 噬菌体处理组从 1~5 h, 宿主菌的浓度出现了略微下降的趋势, 但在 5 h 之后, 宿主菌的浓度开始增加, 与对照组相比, 明显的抑制了宿主菌的生长。(图 4)

3.2.2 对处于稳定期宿主菌的杀菌作用评价

结果如图 5 所示, 以不同感染复数加入噬菌体均对宿主菌产生杀菌作用, 宿主菌的浓度与对照组相比均有不同程度的下降, 在感染复数比为 0.001 时下降梯度最高, 消灭效果最好, 宿主菌的浓度下降了 4 个梯度左右。(图 5)

4 结论

从信都三黄鸡污水中分离出了 21 株大肠杆菌 *E1~E21* 以及专性裂解大肠杆菌 *E13* 的噬菌体 P1, 噬菌体 P1 的最佳感染复数为 0.01, 一步生长曲线白表示潜伏期为 40 min, 爆发期为 50 min, 裂解量为 10^2 pfu/cell, 在 40°C ~50°C 效价能保持稳定, 在 pH 4~11 之间存活, 且 pH 为 6~7 时均保持很高的效价, 在体外抑制检测中, 对宿主菌的生长抑制效果在前 5 个小时效果显著, 而稳定期的杀菌效果在感染复数为 0.001 时效果最好。为后续的信都鸡大肠杆菌病的防护提供理论依据。

利益冲突声明: 本文不存在任何利益冲突。

参考文献

- [1] 何亚丁. 噬菌体的生物学特性及其在畜禽健康中的应用 [J]. 当代畜禽养殖业, 2020(04):6-8. DOI:10.14070/j.cnki.15-1150.2020.04.002.
- [2] 何觅之. 大肠杆菌 K88、K99 广谱噬菌体的分离与生物学特性鉴定 [D]. 华中农业大学, 2013.
- [3] 喻胜猛. 致羊腹泻大肠杆菌噬菌体的分离鉴定及其在环境中的杀菌效果评估 [D]. 西北农林科技大学, 2023. DOI:10.27409/d.cnki.gxbnu.2022.000735.
- [4] 姚澜, 张贝贝, 王芷洋, 等. 禽致病性大肠杆菌噬菌体 vB_EcoS_AH50 的分离鉴定、生物学特性及全基因组分析 [J]. 中国兽医科学, 2022, 52(12):1568-1577. DOI:10.16656/j.issn.1673-4696.2022.0207.
- [5] 赵尊福. 鸡源大肠杆菌噬菌体 Bp16 分离鉴定、生物学特性研究及初步应用 [D]. 西南民族大学, 2022. DOI:10.27417/d.cnki.gxnmc.2021.000045.
- [6] 郝贺, 张永英, 钟翠红, 等. 鸡源沙门菌噬菌体的生物学特性及其对雏鸡肠道结构的影响 [J]. 中国兽医科学, 2022, 52(02):259-268. DOI:10.16656/j.issn.1673-4696.2022.0025.
- [7] 艾梦燕. 鸡源致病性大肠杆菌噬菌体的分离鉴定及生物学特性研究 [D]. 河南农业大学, 2023. DOI:10.27117/d.cnki.ghenu.2022.000335.
- [8] 徐美余, 张瑶, 邓征宇, 等. 一株可裂解动物源性多重耐药志贺氏菌的噬菌体分离鉴定及其生物学特性研究 [J]. 微生物学杂志, 2023, 43(05):91-100.
- [9] 吴圆圆, 屈勇刚, 于会举, 等. 一株鸡大肠埃希氏菌裂解性噬菌体的分离与生物学特性分析 [J]. 动物医学进展, 2021, 42(05):30-35. DOI:10.16437/j.cnki.1007-5038.2021.05.007.
- [10] 王嘉威, 贺永超, 乔元明, 等. 噬菌体特性及应用研究进展 [J]. 山东畜牧兽医, 2024, 45(03):77-80.
- [11] Huff W E, Huff G R, Rath N C, et al. Bacteriophage Treatment of a Severe Escherichia coli Respiratory Infection in Broiler Chickens [J]. Avian Diseases, 2003, 47(4): 1399-1405.
- [12] Oliveira A, Sereno R, Azeredo J. In vivo efficiency evaluation of a phage cocktail in controlling severe colibacillosis in confined conditions and experimental poultry houses [J]. Veterinary Microbiology, 2010, 146(3):303-308.
- [13] 高铎, 王晋宇, 李河谕, 等. 1 株肠炎沙门菌噬菌体 GD01 的分离鉴定及生物学特性分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50(12):5160-5169. DOI:10.16431/j.cnki.1671-7236.2023.12.037.