

实验技术与方法

一株粪肠球菌噬菌体的分离及生物学特性分析

王金丽,尹红梅,朱成林,蔡自建,陈娟,唐俊妮

(西南民族大学食品科学与技术学院,四川成都 610025)

摘要:目的 从污水中分离出一株新的粪肠球菌噬菌体,对其进行鉴定及生物学特性分析,为食品中粪肠球菌污染防治提供新思路。方法 宿主菌来源于牦牛屠宰加工环节,并经16S rRNA测序鉴定;从环境下水道污水中分离噬菌体,将噬菌体进行分离纯化,采用双层平板法测其效价;通过透射电镜观察噬菌体形态;测定其裂解谱、最佳感染复数、一步生长曲线,以及测定pH、紫外照射、温度、有机溶剂对噬菌体效价的影响;并测定其对宿主菌的裂解效力。结果 宿主菌经16S rRNA测序鉴定为粪肠球菌;从污水中分离出一株能裂解粪肠球菌的噬菌体命名为P45;电镜结果表明此噬菌体为蝌蚪状的长尾噬菌体,头部呈六面体,整体长度约为(200±5)nm;通过裂解谱测定,发现该噬菌体对其中4株粪肠球菌有明显裂解效果;最佳感染复数为0.1、潜伏期为50 min、裂解周期为190 min、裂解量为1 PFU/cell;噬菌体能在pH=2和pH=13存活,效价分别为 1.05×10^2 PFU/mL和 1.85×10^3 PFU/mL;75 °C高温可使该噬菌体完全失活;紫外照射使噬菌体效价下降;噬菌体对有机溶剂不敏感;对宿主菌有较好的裂解效果。结论 粪肠球菌的噬菌体对宿主菌有良好裂解效果,对食品中粪肠球菌的污染防控有一定应用潜力。

关键词:粪肠球菌;噬菌体;生物学特性;裂解效果

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2024)07-0818-09

DOI:10.13590/j.cjfh.2024.07.008

Isolation and biological characteristics analysis of a bacteriophage of *Enterococcus faecalis*

WANG Jinli, YIN Hongmei, ZHU Chenglin, CAI Zijian, CHEN Juan, TANG Junni

(College of Food Sciences and Technology, Southwest Minzu University,

Sichuan Chengdu 610025, China)

Abstract: Objective To isolate and identify a bacteriophage of *Enterococcus faecalis* and to analyze its biological characteristics. **Methods** The host bacteria was isolated from the process of yak slaughtering and identified by 16S rRNA sequencing. The bacteriophage was isolated from the environmental sewage and was purified. The titer of bacteriophages was determined using the double-layer plate method. The morphology of bacteriophage was observed by transmission electron microscopy; the bacteriophage lysis profiles, optimal infection complex, and one-step growth curve were determined; the effects of pH, UV irradiation, temperature, and organic solvents on bacteriophages have been studied. Furthermore, the lytic activity of the bacteriophage against the host bacteria was determined. **Results** The host bacteria were identified as *E. faecalis* by 16S rRNA sequencing. A bacteriophage named P45 was isolated from sewage to lyse *E. faecalis*. Electron microscopy showed that the bacteriophage was a tadpole-shaped long-tailed bacteriophage, which has a hexahedral head and its length is (200±5) nm. The bacteriophage had obvious lysis effect on four strains of *E. faecalis*. Bacteriophage's optimal multiplicity of infection was 0.1. The results of one-step growth curve showed that the incubation period was 50 min, the lysis period was 190 min, and the burst size was 1 PFU/cell. This bacteriophage survived at pH=2 to 3, which titers were 1.05×10^2 PFU/mL and 1.85×10^3 PFU/mL. At 75 °C, this bacteriophage was completely inactivated. Bacteriophage's titer was decreased by UV irradiation, and it was not sensitive to organic solvents. **Conclusion** This bacteriophage has a good lysis effect and has potential application on the prevention or control of *E. faecalis* contamination.

Key words: *Enterococcus faecalis*; bacteriophage; biological characteristics; lytic effect

收稿日期:2023-08-16

基金项目:西南民族大学中央高校基本科研业务费专项资金优秀学生培养工程项目(2023NYXXS068)

作者简介:王金丽 女 硕士研究生 研究方向为畜产品加工与安全 E-mail:1807495790@qq.com

通信作者:唐俊妮 女 教授 研究方向为食品安全与食品微生物 E-mail:392783291@qq.com

粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)是革兰氏阳性需氧或兼性厌氧菌,与屎肠球菌同为乳杆菌目肠球菌属,是一种分布非常广泛的机会致病菌^[1],主要存在于畜、禽养殖场及其加工场所^[2-3]。1930年,肠球菌被认为是链球菌,纳入D群链球菌属,直到1984年,粪肠球菌和屎肠球菌经过DNA杂交和16S rRNA测序发现其序列与链球菌显著不同,同年由Schleifer提出将粪肠球菌与屎肠球菌从链球菌中分离出来,并成为新的肠球菌属^[4]。

粪肠球菌通常栖息在人类和动物的肠道中,通常被认为是无害的人畜共栖菌,但在一定的生理条件下也会出现致病性^[5],可在免疫低下的人群中引起腹泻、腹痛、腹部感染等肠道疾病,以及引起泌尿系统感染^[6]、皮肤软组织感染和腹腔感染、感染性心内膜炎、菌血症等多种疾病^[7-8]。在食品上,粪肠球菌常对动物源食品造成污染。研究表明,在屠宰场,超过90%的动物源性食物样本会被肠球菌污染^[9]。在畜禽肉生产链、植物源性食品甚至婴幼儿食品生产中都会出现肠球菌的污染^[10-12]。

临床上常用抗生素治疗粪肠球菌引起的疾病,全球抗生素的滥用导致许多微生物出现了抗生素耐药性。世界卫生组织(World Health Organization, WHO)已将耐万古霉素的屎肠球菌(VREfm)列为全球重要抗生素耐药性细菌中高度优先解决的病原体。粪肠球菌也不例外,对多种常见抗生素存在耐药性,如低浓度氨基糖苷类、头孢菌素类、克林霉素等^[13]。常军帅等^[14]的研究发现,分离自患乳房炎乳样的粪肠球菌耐青霉素G、杆菌肽,含4种耐药性基因。LI等^[15]对屠宰场鸭子的粪肠球菌耐药性的流行情况进行研究,发现耐四环素菌株占95.6%,耐强力霉素占94.3%,耐利奈唑胺占75.8%等。在长期接受抗生素治疗的住院患者中检测出万古霉素耐药肠球菌^[16],万古霉素被认为是针对多重耐药性细菌的最后治疗防线之一^[17]。可见,需要寻找新的治疗手段和方法。

近年来,噬菌体已成为对抗多重耐药性的重要手段。噬菌体在自然界中广泛分布,其个体微小,只具有单一核酸,能够快速准确地侵袭宿主菌,在宿主菌中感染并复制^[18]。噬菌体对细菌生物被膜也具有清除活性^[19],是良好的细菌生物被膜清除剂,是应对微生物污染及抗生素耐药的策略之一,在临床和食品上常被用作抗生素的替代品^[20]。近年来,有关噬菌体裂解细菌的研究增多,TINNEY等^[21]研究了噬菌体Sf22和KRT47与宿主受体外膜蛋白相互作用,使宿主菌外膜蛋白编码提前终止,实现噬菌体治疗的目的。EL-ATREE等^[22]从尿路感

染者分离出粪肠球菌,探究噬菌体对粪肠球菌生物被膜的抑制能力,结果显示,与对照组相比,粪肠球菌噬菌体能使成熟和预形成的生物被膜分别减少到45.7%~71.0%和30.8%~80.0%,证明噬菌体对粪肠球菌生物被膜具有良好的裂解作用。此外,噬菌体在不同食品基质上的应用也得到了研究。JIN等^[23]从鸡的粪便中分离出了能裂解粪肠球菌的噬菌体vB_EfaS_WH1,将其作用于鸡肉表面,24h后,粪肠球菌被根除。YANG等^[24]通过建立蔬菜模型,以测定噬菌体vB_EfaS_PHB08在食品基质中的作用效果,结果表明,在作用24h后,蔬菜中的粪肠球菌含量下降了4.69个数量级。可见噬菌体治疗作为一个新兴研究方向,有其独特的优势。

本研究通过对一株粪肠球菌的噬菌体进行分离纯化,并对其生物学特性进行研究,为噬菌体在食品行业上的应用提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

粪肠球菌(*E. faecalis* w1、w2、w3、w4)分离自成都市某奶牛养殖场,由本实验室保存。噬菌体分离自城市周边环境下水道污水,通过纯化和鉴定确认,其他受试菌株均由本实验室保藏。

细菌基础固体培养基(Luria-Bertani, LB);LB肉汤培养基;SM(SM buffer)缓冲液;生理盐水;胰蛋白胨大豆琼脂(Tryptone soybean agar, TSA)培养基;胰蛋白胨大豆肉汤(Trypticase soy broth, TSB)培养基;TE缓冲液;氨丁三醇-乙二胺四乙酸缓冲液(TrisEDTA buffer solution, TAE);磷酸盐缓冲液(PBS, 组分浓度:137 mmol/L NaCl、2.7 mmol/L KCl、10 mmol/L Na₂HPO₄、2 mmol/L KH₂PO₄, 配量1 L);Phage DNA Isolation Kit 试剂盒(NorgenBiotek 公司);聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)引物(上海生物工程有限公司);Master Mix(预混液,北京擎科新业科技有限公司);REGULARAGAROSEG-10型琼脂糖(BIOWESE 公司);蛋白酶K(20 mg/mL, MERCK 集团);RNase A(10 mg/mL, Solabio LIFE SCIENCES 公司)。

1.2 实验仪器与设备

SW-CJ-2FD 洁净工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司);WD800B 型微波炉(顺德区格兰仕微波炉电器有限公司);HZQ-F160 全温振荡培养箱(江苏省太仓市实验设备厂);MLS-3020 电热自动灭菌锅(日本 SANYO 公司);AKHL-III-24 艾柯超纯水机(台湾艾柯);成都康宁实验专用纯水设备;UV-6100 分光光度计(上海美普达仪器有限公司);

5804R 型 Eppendorf 冷冻离心机[艾本德(上海)国际贸易有限公司];GHP-9080 水式恒温培养箱(上海齐欣科学仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 宿主菌的 16S rRNA 鉴定

将 4 株宿主菌(w1、w2、w3、w4)在液体培养基下 37 °C 培养过夜,进行 DNA 的提取,具体方法参考文献[25],取 1 mL 菌悬液于 1.5 mL 离心管中,4 °C、10 000 r/min 离心 2 min(离心半径:12.3 cm),取适量 PBS 缓冲液洗涤 2~3 次,10 000 r/min 离心 2 min,收集下层沉淀,而后加入 500 μ L TE 缓冲液洗涤两次,离心弃去上清液,再加入 100 μ L TE 缓冲液,放入预热后的微波炉中加热 40~150 s,5 000 r/min 离心 1 min(离心半径:12.3 cm)后收集上清液,为 DNA 模板。

提取后的 DNA 使用通用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增。引物具体序列:上游引物:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';下游引物:5'-GGYTACCTTGTACGACTT-3'^[26]。引物的合成和 DNA 测序由生工生物工程(上海)股份有限公司进行。

1.3.2 噬菌体的分离纯化

参考文献[27-28]中的方法,取未经处理的周边环境下水道污水,用纱布过滤大颗粒杂质,置于转速为 8 000 r/min 冷冻离心机内离心 15 min(离心半径:12.3 cm),经 0.22 μ m 滤器过滤除菌。取 10 mL 处理后的污水、10 mL 2 \times LB 液体培养基(2 倍浓度 LB 液体培养基)和 100 μ L 粪肠球菌于 50 mL 离心管中,在振荡培养箱中 37 °C、160 r/min 培养 10 h。重复操作 3 次,过滤除菌后得到噬菌体原液。取 100 μ L 噬菌体原液加入 10 mL EP 管中,与 100 μ L 粪肠球菌悬液混匀静置 10 min,使噬菌体充分吸附在宿主菌上,倒双层平板,平板培养过夜,观察噬菌斑的生长情况。

在上述双层平板中找到形态大小均匀的噬菌斑,用移液枪枪头穿刺挑取,将挑取后的枪头在宿主菌悬液中充分混匀,在 37 °C、160 r/min 的振荡培养箱下培养 4 h。培养结束后取出,于冷冻离心机中 4 °C、8 000 r/min 下离心 10 min(离心半径:12.3 cm),将离心后的液体取上清用 0.22 μ m 滤器过滤,得到不含菌的噬菌体液。将噬菌体液进行倍比稀释,将 100 μ L 处于对数生长期的菌和稀释后的 100 μ L 噬菌体液混匀,静置 10 min,倒双层平板,重复操作 5 次后得到大小、形态均匀分散的噬菌斑。

1.3.3 噬菌体效价的测定

用无菌的移液枪枪头挑取纯化后的噬菌斑,加入 2 mL 处于对数生长期的宿主菌液中,振荡培养箱 37 °C、160 r/min 培养 4 h,离心过滤后进行 10 倍

比稀释 4 个梯度,分别在每个梯度中取 100 μ L 和宿主菌悬液 100 μ L 混合静置,倒双层平板,培养过夜,观察噬菌斑的形成个数。重复操作 3 次,效价取噬菌斑个数的平均值。在计算效价时选取噬菌斑个数在 30~300 个以内的平板。噬菌体效价=噬菌斑数 \times 稀释倍数 \times 10。将纯化好的噬菌体液加甘油至浓度为 20%,于-80 °C 下保存。

1.3.4 噬菌体电镜观察

将噬菌体效价培养至 10⁸ PFU/mL,进行送检观察(成都里来生物科技有限公司)。透射电镜(Transmission electron microscope)的具体步骤为:将噬菌体富集液滴在带有支持膜的铜网上,滴加磷钨酸室温下进行染色 1~2 min 后即可进行电镜观察。

1.3.5 噬菌体裂解谱测定

将 22 株实验室保藏的受试菌培养至 OD_{595nm} 为 0.08~0.10,准备固体 LB 平板,将 100 μ L 的菌液均匀地涂布于平板上,往平板中央滴加 10 μ L 的无菌噬菌体液,室温干燥后放入 37 °C 培养箱中培养过夜,观察是否出现噬菌斑。以不添加噬菌体液为对照组。

1.3.6 噬菌体最佳感染复数测定

按照不同的感染复数(Multiplicity of infection, MOI)比例(0.001、0.010、0.100、1.000、10.000、100.000),将噬菌体接种于对数生长期的宿主菌中,在 37 °C、160 r/min 的培养箱下振荡培养过夜,于转速为 8 000 r/min 的冷冻离心机下离心 10 min,0.22 μ m 滤器过滤后梯度稀释,与宿主菌液混合,倒双层平板,培养过夜后计算噬菌体的效价,做 3 个平行,结果取平均值。

1.3.7 噬菌体一步生长曲线的测定

噬菌体液和宿主菌液按照感染复数 0.1 混合均匀后,于 37 °C 下培养 15 min,再于 8 000 r/min 离心 10 min,用 LB 液体培养基洗涤,加入 5 mL、37 °C 预热过的 LB 液体培养基,快速置于 160 r/min、37 °C 振荡培养箱培养,每间隔 10 min 取一次样,测定噬菌体的效价,3 次重复,结果取平均值。

噬菌体裂解量=裂解末期噬菌体的效价/裂解初期的宿主菌的浓度。

1.3.8 pH 对噬菌体效价的影响

将培养的噬菌体按体积比为 1:9 分别添加到 pH=2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 的 SM 缓冲液中,37 °C 温育 1 h,用双层平板测定效价,重复测定 3 次。

1.3.9 紫外照射对噬菌体效价的影响

取噬菌体液于 30 W 的紫外灯 10 cm 位置处照射,时间为 1 h。每隔 10 min 取样,重复取样 3 次,

并梯度稀释 6 次,倒双层平板,测定其效价。

1.3.10 温度对噬菌体效价的影响

取 1 mL 噬菌体液,于 25、35、45、55、65、75 °C 水浴锅内水浴,分别在 0、20、40、60 min 时取样,梯度稀释 6 次,倒双层平板测定其效价,重复测定 3 次。

1.3.11 有机试剂对噬菌体效价的影响

将 1 mL 75% 乙醇,80% 丙酮,氯仿和 50% DMSO (二甲基亚砷)分别加入到 1 mL 的噬菌体液中,在室温下放置 30 min 后测定噬菌体效价。SM 缓冲液作为对照试验,做 3 次重复。

1.3.12 噬菌体裂解宿主菌的效力测定

将噬菌体液与宿主菌液(选择粪肠球菌 w2 菌株进行试验)按照不同的感染复数(0.1、10、100、1 000、对照)混合均匀,取 200 μ L 混合液于 96 孔板中。LB 肉汤培养基作为空白,对照是不添加噬菌体的细菌培养液。于 37 °C 培养箱内培养,每间隔 1 h 测定其在 600 nm 波长处的吸光度,共测定 10 次。

1.4 数据处理

16S rRNA 测序结果在美国国家生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information, NCBI)进行比对,在 MEGA 7.0 软件进行系统发育树的绘制。噬菌体生理生化数据用 Excel 2016 进行记录和初步分析,在 Origin2020 进行图形的绘制,于 SPSS 26.0 进行最终数据的分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 宿主菌的 16S rRNA 鉴定

宿主菌通过扩增后,进行送检测序,序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对,发现 4 株宿主菌与粪肠球菌同源性高达 99%,使用 MEGA 7.0 进行系统发育树的构建。如图 1 所示,菌株 w1、w2、w3、w4 与粪肠球菌在同一分支上,亲缘关系较近,判断宿主菌为粪肠球菌。

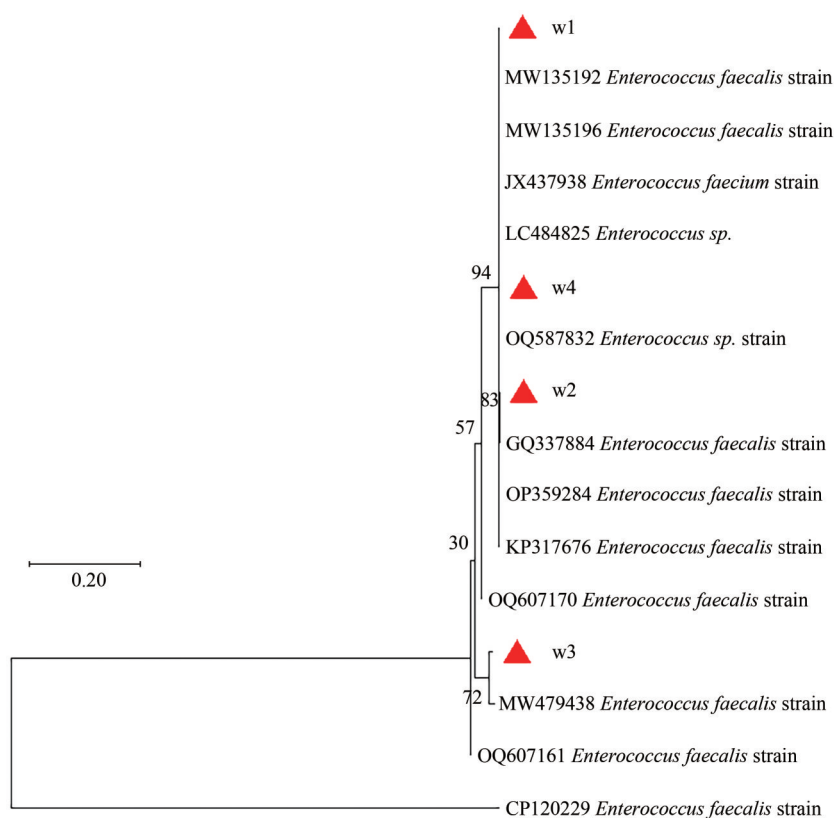


图 1 宿主菌 16S rRNA 系统发育树

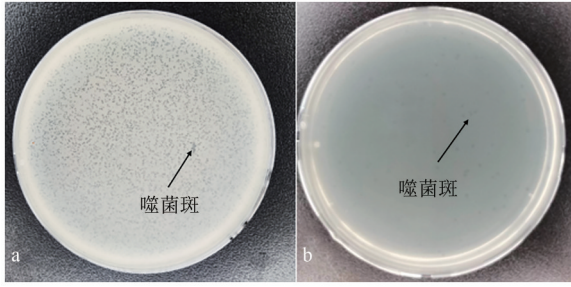
Figure 1 Phylogenetic tree of 16S rRNA for host bacteria

2.2 噬菌体的分离和纯化

通过对噬菌体进行分离纯化,在平板上发现明显的噬菌斑,如图 2a 所示,经过进一步的富集培养,形成了大小、形状、数量均匀的噬菌斑,如图 2b 所示,将此噬菌体命名为 P45。初次分离得到的噬菌体效价为 10^5 PFU/mL,经过纯化富集,其效价达到 10^8 PFU/mL。

2.3 噬菌体的电镜观察

通过电镜观察到分离出来的噬菌体为蝌蚪状,头部呈六面体,直径为 (62.5 ± 5) nm,尾部细长,为 (132 ± 5) nm,有尾丝,整体长度约为 (200 ± 5) nm,如图 3 所示。根据冯焯等^[29]的分类标准,此噬菌体为尾噬菌体目长尾噬菌体科。



注:图 a 为纯化前的噬菌斑形态;图 b 为纯化后的噬菌斑形态

图2 双层平板上的噬菌斑

Figure 2 Plaques on the double-deck plates

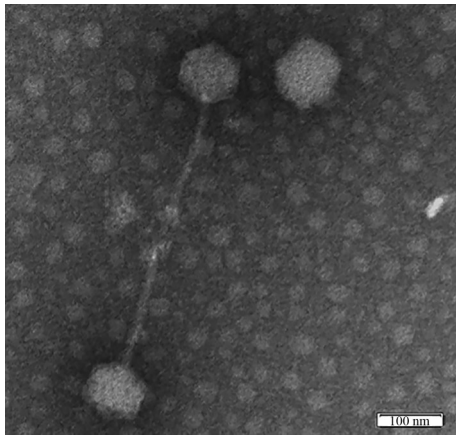


图3 透射电镜下的噬菌体 P45 形态

Figure 3 Morphology of bacteriophage P45 under transmission electron microscope

2.4 噬菌体的裂解谱

将噬菌体接种到 22 种受试菌上,结果如表 1 所示,分离的噬菌体对粪肠球菌 w1, w2, w3, w4 均有裂解效力,对其他受试菌不敏感。

2.5 最佳感染复数的测定

按照不同的接种比例,通过双层平板测定噬菌体的效价,结果如图 4 所示,可得出感染复数为 100 时,其效价最低,为 1.34×10^7 PFU/mL,当感染复数为 $MOI=0.1$ 时,效价最高,为 1.62×10^9 PFU/mL,故 $MOI=0.1$ 为最佳感染复数。

2.6 噬菌体的一步生长曲线

如图 5 所示,噬菌体在 0~50 min 的增殖不明显,在 50~180 min,噬菌体增殖速度加快,在 190 min 时达到最高点,效价为 1.0×10^8 PFU/mL,此后开始下降,240 min 时下降至 2.8×10^7 PFU/mL。由此可知,该噬菌体的潜伏期为 50 min,裂解周期较长,为 190 min,最终根据计算,其裂解量为 1 PFU/cell。

2.7 pH 对噬菌体效价的影响

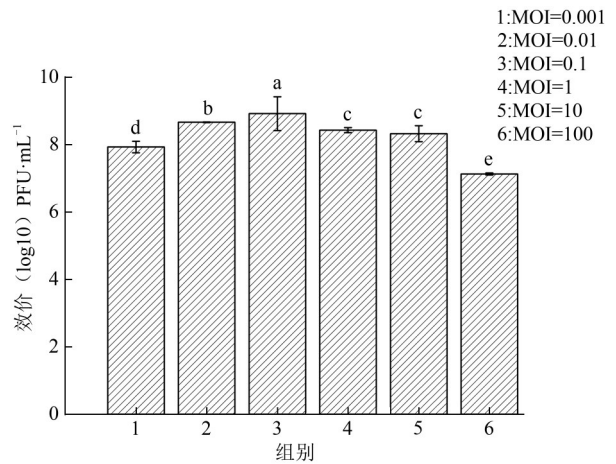
pH 对噬菌体的效价影响如图 6 所示。当 pH=3~12 时,噬菌体仍有较好的裂解活力,效价均在 10^6 PFU/mL 以上,且在 pH 在 7 左右时其效价最高;当 pH=2 或 13 时,噬菌体的裂解活力明显被抑制,此时的

表 1 噬菌体 P45 的裂解谱

Table 1 Lysis profile of bacteriophage P45

菌株	噬菌体的裂解谱
粪肠球菌(<i>E. faecalis</i>)w1	+
粪肠球菌(<i>E. faecalis</i>)w2	+
粪肠球菌(<i>E. faecalis</i>)w3	+
粪肠球菌(<i>E. faecalis</i>)w4	+
变形杆菌(<i>Proteus</i>)2	-
变形杆菌(<i>Proteus</i>)7	-
变形杆菌(<i>Proteus</i>)8	-
变形杆菌(<i>Proteus</i>)12	-
变形杆菌(<i>Proteus</i>)23	-
变形杆菌(<i>Proteus</i>)29	-
变形杆菌(<i>Proteus</i>)30	-
变形杆菌(<i>Proteus</i>)65	-
变形杆菌(<i>Proteus</i>)66	-
单增李斯特氏菌 ATCC 19111 (<i>L. monocytogenes</i>)	-
蜡样芽胞杆菌 CMCC 63303 (<i>B. cereus</i>)	-
大肠杆菌 O157:H7 ATCC 19111 (<i>E. coli</i> O ₁₅₇ :H ₇)	-
金黄色葡萄球菌 6538(<i>S. aureus</i>)	-
阪崎克罗诺杆菌 ATCC29544 (<i>C. sakazakii</i>)	-
大肠杆菌 ATCC25922 (<i>E. coli</i>)	-
志贺氏菌 ATCC 19111 (<i>Shigella</i>)	-
沙门氏菌 ATCC 19111 (<i>Salmonella</i>)	-
耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 43300 (MRSA)	-

注: + 为平板有圆形噬菌斑; - 为平板无噬菌斑出现



注: a、b、c、d、e 代表显著性差异分析,组间字母不同表示差异显著,有统计学意义 ($P < 0.05$),组间字母相同代表差异不显著,无统计学意义 ($P > 0.05$)

图4 噬菌体 P45 的最佳感染复数

Figure 4 Optimal multiplicity of infection for bacteriophage P45

效价分别为 1.05×10^2 PFU/mL 和 1.85×10^3 PFU/mL,说明分离的噬菌体具有很好的耐酸碱性的。

2.8 紫外照射对噬菌体效价的影响

通过不同时间紫外照射处理,噬菌体的效价影响如图 7 所示,随着照射时间的增加,噬菌体的效价逐渐降低,在 0 min 时噬菌体的效价为 1.26×10^8 PFU/mL,经过 60 min 的紫外照射后,效价为 4.06×10^5 PFU/mL,紫外照射对噬菌体的活性有一定的抑制作用,但总体来说,分离的噬菌体具有一定的抗紫外线能力。

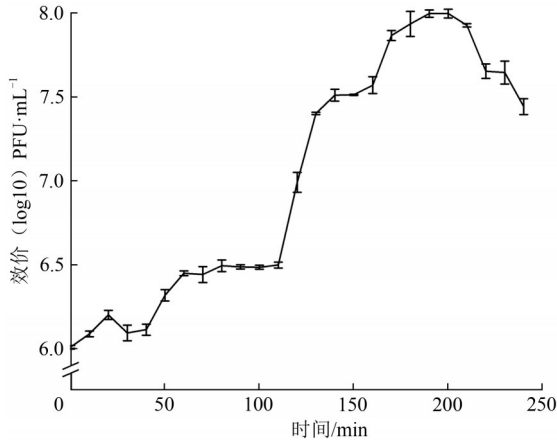
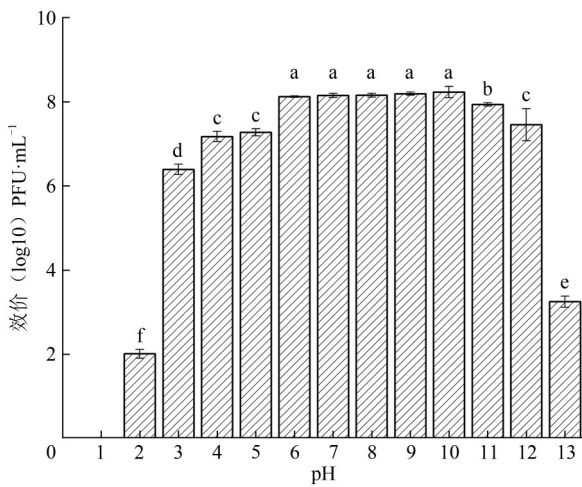


图5 噬菌体 P45 的一步生长曲线

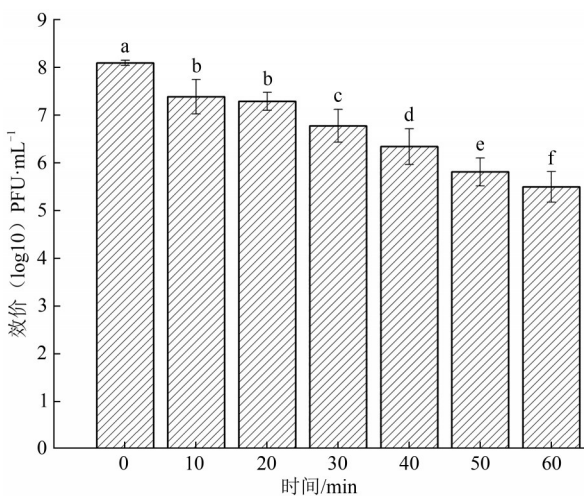
Figure 5 One-step growth curve of bacteriophage P45



注:a、b、c、d、e代表显著性差异分析,组间字母不同表示差异显著,有统计学意义($P<0.05$),组间字母相同代表差异不显著,无统计学意义($P>0.05$)

图6 pH对噬菌体效价的影响

Figure 6 Effects of pH on bacteriophage titer



注:a、b、c、d、e代表显著性差异分析,组间字母不同表示差异显著,有统计学意义($P<0.05$),组间字母相同代表差异不显著,无统计学意义($P>0.05$)

图7 紫外照射对噬菌体效价的影响

Figure 7 Effects of ultraviolet irradiation on bacteriophage titer

2.9 温度对噬菌体效价的影响

将噬菌体经过不同温度的水浴处理后,在 0、20、40、60 min 取样,得到结果如图 8 所示,25 °C~45 °C 噬菌体的效价变化不明显,55 °C 噬菌体的效价逐渐下降,65 °C 噬菌体的效价受到明显抑制,效价由初始的 9.8×10^8 PFU/mL(0 min)下降到 1.43×10^6 PFU/mL,75 °C 时噬菌体 20 min 完全灭活。

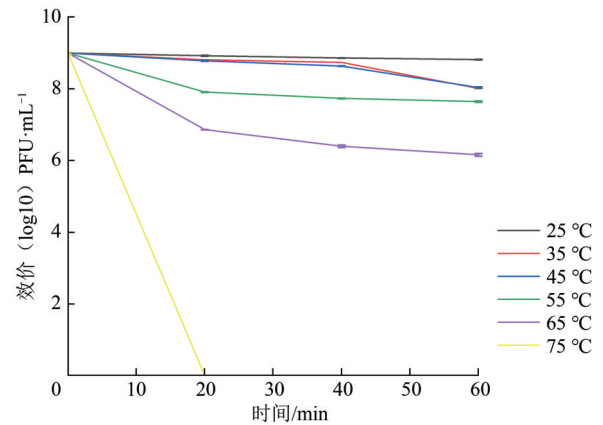
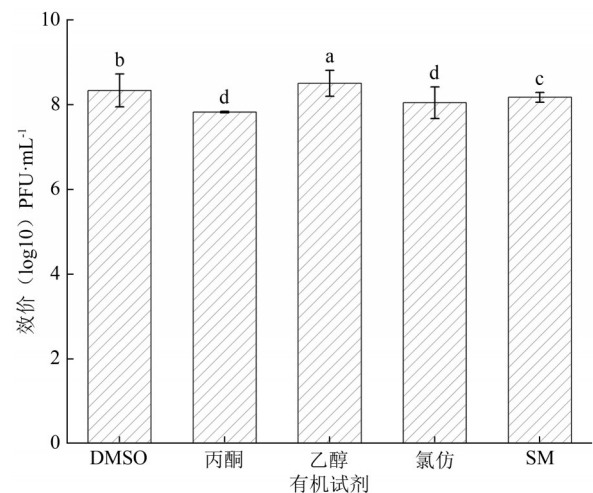


图8 温度对噬菌体效价的影响

Figure 8 Effects of temperature on bacteriophage titer

2.10 有机试剂对噬菌体效价的影响

通过 4 种不同有机溶剂对噬菌体进行作用,其作用效果如图 9 所示,与对照 SM 缓冲液相比,噬菌体对 DMSO、丙酮、乙醇和氯仿的敏感性都不高,说明有机试剂对本研究分离的噬菌体活性基本无影响。



注:a、b、c、d、e代表显著性差异分析,组间字母不同表示差异显著,有统计学意义($P<0.05$),组间字母相同代表差异不显著,无统计学意义($P>0.05$)

图9 有机溶剂对噬菌体效价的影响

Figure 9 Effects of organic solvent on bacteriophage titer

2.11 噬菌体对宿主菌的裂解效力

测定不同感染复数的噬菌体对宿主菌 w2 的裂解效果,如图 10 所示,当 MOI=10、100、1 000 时,在

前5 h由于噬菌体对宿主菌的裂解,培养液的OD值几乎与空白组接近,说明在前5 h噬菌体对宿主菌具有完全的抑制作用,但5 h之后细菌的增长又有所回升。MOI=0.1时,宿主菌的生长在3 h之后开始有所回升。但总体来看,添加不同感染复数的噬菌体培养液的OD值都明显低于对照组。说明分离的噬菌体对宿主菌具有较好的抑制效果。

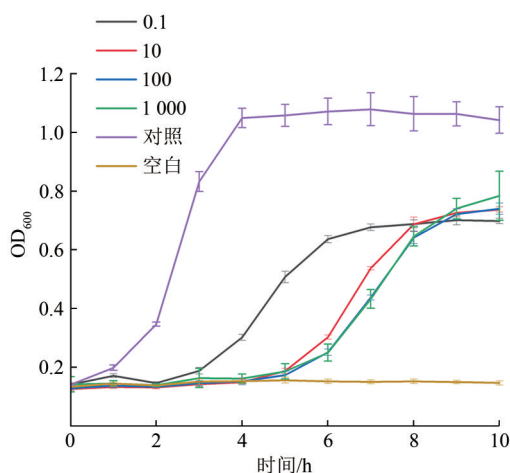


图10 不同感染复数的噬菌体对宿主菌的裂解效力

Figure 10 Lytic efficacy of bacteriophage with different MOI on host bacteria

3 讨论

粪肠球菌容易对食物造成污染,从而危害人体健康。本研究从污水中分离出一株头部呈六面体的蝌蚪状长尾噬菌体P45,初次分离其效价偏低,经富集后效价能达到 10^8 PFU/mL,与JIN等^[23]分离出的粪肠球菌噬菌体相比,头部形状不同,但都属于长尾噬菌体。裂解谱测定结果发现裂解谱相对较窄,后续可以选择更多菌进行实验。本研究噬菌体P45的最佳感染复数为0.1,与常军帅等^[30]分离到的PSL22一致。潜伏期为50 min,裂解周期为190 min,裂解量为1 PFU/mL,与PAZHOUHIA等^[31]分离出的vB_EfaS-SRH2相比,P45的潜伏期、裂解周期相对较长,裂解量与一般噬菌体相比较低,究其原因可能与培养条件、宿主菌株差异等有关,需要进一步验证。

pH和温度是影响噬菌体活性的重要因素,大部分噬菌体在强酸或高温下不能存活,适用于一些非加热或低热食品的表面杀菌。本研究噬菌体pH耐受范围为2~13,在65℃下其效价受到部分抑制,75℃时无存活,与SONG等^[32]分离出的噬菌体性质有些许不同,可能的原因有噬菌体分离环境以及宿主菌不同,导致噬菌体特性存在差异。本研究中,紫外照射会使噬菌体效价下降,但即使照射1 h,噬

菌体没有失活。有机溶剂对噬菌体活性有轻微影响,噬菌体对部分有机溶剂并不敏感。不同感染复数下,噬菌体对宿主菌的杀灭效果明显,证明噬菌体具有很好的抑菌潜力。

目前对粪肠球菌引起的感染仍以抗生素治疗为主^[33],随着抗生素的大量使用,粪肠球菌耐药范围不断扩大,成为感染治疗的障碍。据估计,全球范围内每年估计有70万人死于耐药细菌感染,且在2015年世界卫生组织便把抗微生物药物耐药性列为全球十大健康威胁之一^[34]。抗生素耐药性污染形势日渐严峻。噬菌体在自然界分布十分广泛,易于分离,增殖快,且具有很强的专一性。被广泛应用于食品加工、畜禽养殖、疾病治疗^[35,14]等方面,是性能良好的天然抗菌剂。但对于噬菌体在食品上的应用,如剂量、作用形式、安全等还需系统研究,特别是噬菌体与宿主菌相互作用效果、噬菌体抗性和噬菌体实际投入应用中所面临的挑战等,未来还有很多问题亟待解决。

4 结论

本研究分离得到一株粪肠球菌噬菌体,该噬菌体为有尾噬菌体目长尾噬菌体科,其裂解周期为190 min,最佳感染复数为0.1,耐酸碱性强,具有一定的抗紫外线能力,对有机溶剂表现不敏感,对温度比较敏感,最高耐受的温度低于75℃,分离的噬菌体对宿主菌具有较好的裂解效果。该噬菌体对食品中粪肠球菌的污染防控具有潜在的应用价值。

参考文献

- [1] 蒋伟,黎满香,林荣高,等. 肠球菌研究进展[J]. 动物医学进展, 2011, 32(5): 94-98.
JIANG W, LI M X, LIN R G, et al. Progress on *Enterococcus* [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2011, 32(5): 94-98.
- [2] 李岱霞. 湖南部分养殖场猪、鸡源粪肠球菌毒力基因、耐药性及多位点序列分型研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2019.
LI D X. Study on virulence genes, drug resistance and multi-locus sequence typing of *Enterococcus faecalis* isolated from pigs and chickens of some farms in hunan [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2019.
- [3] 石竞楠,锡林高娃,吴金花,等. 内蒙古地区牛乳腺炎致病性粪肠球菌表面蛋白 esp 基因的克隆、表达及抗原性分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2023, 18(1): 23-29.
SHI J N, XI L, WU J H, et al. Cloning, expression and antigenicity analysis of surface protein esp gene of pathogenic *Enterococcus faecalis* of bovine mastitis in Inner Mongolia [J]. Journal of Pathogen Biology, 2023, 18(1): 23-29.
- [4] 刘虎传,张敏红,姜海龙. 益生肠球菌的研究进展[J]. 动物营养学报, 2011, 23(12): 2090-2096.

- LIU H C, ZHANG M H, JIANG H L. Research progress in probiotic enterococci[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2011, 23(12): 2090-2096.
- [5] PANKRATOVA G, LEECH D, GORTON L, et al. Extracellular electron transfer by the gram-positive bacterium *Enterococcus faecalis*[J]. Biochemistry, 2018, 57(30): 4597-4603.
- [6] HASHEM Y A, ABDELRAHMAN K A, AZIZ R K. Phenotype-genotype correlations and distribution of key virulence factors in *Enterococcus faecalis* isolated from patients with urinary tract infections[J]. Infection and Drug Resistance, 2021, 14: 1713-1723.
- [7] AYOBAMI O, WILLRICH N, REUSS A, et al. The ongoing challenge of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in Europe: an epidemiological analysis of bloodstream infections[J]. Emerging Microbes and Infections, 2020, 9(1): 1180-1193.
- [8] YANG D, XIANG Y, SONG F, et al. Phage therapy: A renewed approach against oral diseases caused by *Enterococcus faecalis* infections[J]. Microbial Pathogenesis. 2024, 189: 106574.
- [9] TYSON G H, NYIRABAHIZI E, CRAREY E, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of enterococci isolated from retail meats in the United States, 2002 to 2014 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 84(1): e01902-e01917.
- [10] ZHAO J, LIU R, SUN Y, et al. Tracing enterococci persistence along a pork production chain from feed to food in China [J]. Animal Nutrition, 2022, 9: 223-232.
- [11] CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA W, ZARZECKA U, ZADERNOWSKA A. Enterococci isolated from plant-derived food - Analysis of antibiotic resistance and the occurrence of resistance genes[J]. LWT, 2021, 139: 110549.
- [12] WANG Z, LIAO S, HUANG G, et al. Infant food production environments: a potential reservoir for vancomycin-resistant enterococci non-nosocomial infections[J]. International Journal of Food Microbiology, 2023, 389: 110105.
- [13] 欧阳颖, 严海燕, 罗玲. 肠球菌感染现状及其耐药性的变迁 [J]. 中国实用医药, 2012, 7(32): 1-4.
- OUYANG Y, YAN H Y, LUO L. Analysis of status of Enterococcal infections and changes of drug-resistance [J]. China Practical Medicine, 2012, 7(32): 1-4.
- [14] 常军帅, 党瑞莹, 杨盛源, 等. 一株致病性临床型乳房炎粪肠球菌SL22的分离与鉴定[J]. 中国动物传染病学报, 2023, 31(6): 35-44.
- CHANG J S, DANG R Y, YANG S Y, et al. Isolation and Identification of a Pathogenic Clinical Type of *E. Faecalis* SL22 [J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2023, 31(6): 35-44.
- [15] LI J, YANG L, HUANG X, et al. Molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors of *Enterococcus faecalis* from ducks at slaughterhouses[J]. Poultry Science, 2022, 101(4): 101646.
- [16] SOLEIMANI-DELFINA A, BOUZARI M, WANG R. vB_EfaS-DELFI1, a novel Siphoviridae bacteriophage with highly effective lytic activity against vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* [J]. Virus Research, 2021, 298: 198391.
- [17] DADASHI M, SHARIFIAN P, BOSTANSHIRIN N, et al. The global prevalence of daptomycin, tigecycline, and linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains from human clinical samples: a systematic review and meta-analysis[J]. Frontiers in Medicine, 2021, 8: 720647.
- [18] BOLOCAN A S, UPADRASTA A, BETTIO P H A, et al. Evaluation of phage therapy in the context of *Enterococcus faecalis* and its associated diseases[J]. Viruses, 2019, 11(4): 366.
- [19] PIRES D P, MENESES L, BRANDÃO A C, et al. An overview of the current state of phage therapy for the treatment of biofilm-related infections[J]. Current Opinion in Virology, 2022, 53: 101209.
- [20] FATHIMA B, ARCHER A C. Bacteriophage therapy: recent developments and applications of a renaissance weapon [J]. Research in Microbiology, 2021, 172(6): 103863.
- [21] TINNEY K R, DOVER J A, DOORE S M, et al. *Shigella* viruses Sf22 and KRT47 require outer membrane protein C for infection[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2022, 1864(7): 183920.
- [22] EL-ATREES D M, EL-KASED R F, ABBAS A M, et al. Characterization and anti-biofilm activity of bacteriophages against urinary tract *Enterococcus faecalis* isolates [J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 13048.
- [23] JIN X, SUN X, WANG Z, et al. Virulent phage vB_EfaS_WH1 removes *Enterococcus faecalis* biofilm and inhibits its growth on the surface of chicken meat[J]. Viruses, 2023, 15(5): 1208.
- [24] YANG D, CHEN Y, SUN E, et al. Characterization of a lytic bacteriophage vB_EfaS_PHB08 harboring endolysin Lys08 against *Enterococcus faecalis* biofilms [J]. Microorganisms, 2020, 8(9): 1332.
- [25] 周晏阳, 邱莞思, 唐俊妮, 等. 微波加热快速提取芽孢杆菌与乳酸菌DNA[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(10): 2792-2796.
- ZHOU Y Y, QIU W S, TANG J N, et al. Rapid extraction of *Bacillus* and *Lactobacillus* DNA by microwave heating[J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2016, 43(10): 2792-2796.
- [26] 许喜林, 钟舒莹, 周晓莉, 等. 粪肠球菌EF-ZA1107-06的安全性评价及益生特性研究[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2022, 50(11): 52-61.
- XU X L, ZHONG S Y, ZHOU X L, et al. Safety evaluation and probiotic characteristics of *Enterococcus faecalis* EF-ZA1107-06 [J]. Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition), 2022, 50(11): 52-61.
- [27] 王一帆, 吴圆圆, 屈勇刚, 等. 一株奶牛乳房炎源金黄色葡萄球菌短尾噬菌体的分离及其生物学特性分析[J]. 中国动物传染病学报, 2022, 30(4): 104-109.
- WANG Y F, WU Y Y, QU Y G, et al. Isolation and characterization of a Podoviridae infecting *Staphylococcus aureus* of bovine mastitis [J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2022, 30(4): 104-109.
- [28] 侯忠余, 李传友, 朱成林, 等. 1株金黄色葡萄球菌烈性噬菌体的生物学特性及其裂解效果[J]. 食品科学, 2022, 43(8): 113-120.
- HOU Z Y, LI C Y, ZHU C L, et al. Biological characteristics

- and lytic activity of a virulent *Staphylococcus aureus* phage[J]. *Food Science*, 2022, 43(8): 113-120.
- [29] 冯焯, 刘军, 孙洋, 等. 噬菌体最新分类与命名[J]. *中国兽医学报*, 2013, 33(12): 1954-1958.
- FENG Y, LIU J, SUN Y, et al. An introduction to current classification and nomenclature of bacterial viruses[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2013, 33(12): 1954-1958.
- [30] 常军帅, 赵玉, 段付霜, 等. 一株具有多种毒力基因的粪肠球菌噬菌体的研究分析[J]. *中国动物传染病学报*, 2024, 32(1): 182-188.
- CHANG J S, ZHAO Y, DUAN F S, et al. Analysis of *E. Faecalis* with multiple toxicity genes [J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2024, 32(1): 182-188.
- [31] PAZHOUHNI S, BOUZARI M, ARBABZADEH-ZAVAREH F. Isolation, characterization and complete genome analysis of a novel bacteriophage vB_EfaS-SRH2 against *Enterococcus faecalis* isolated from periodontitis patients [J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 13268.
- [32] SONG M, WU D, HU Y, et al. Characterization of an *Enterococcus faecalis* bacteriophage vB_EfaM_LG1 and its synergistic effect with antibiotic[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11: 698807.
- [33] 马红玲. 对1例粪肠球菌、摩根摩根菌导尿管相关泌尿系感染患者的抗感染治疗分析[J]. *医药论坛杂志*, 2022, 43(2): 64-67.
- MA H L. Analysis on anti-infection treatment of a patient with urinary duct-related urinary tract infection of *Enterococcus faecalis* and *Morganella morganii*[J]. *Journal of Medical Forum*, 2022, 43(2): 64-67.
- [34] ANANTHAKRISHNAN A, PAINTER C, TEERAWATTANANON Y. A protocol for a systematic literature review of economic evaluation studies of interventions to address antimicrobial resistance[J]. *Systematic Reviews*, 2021, 10(1): 242.
- [35] KENNEALLY C, MURPHY C P, SLEATOR R D, et al. The urinary microbiome and biological therapeutics: novel therapies for urinary tract infections[J]. *Microbiological Research*, 2022, 259: 127010.