



EAEC 噬菌体 PNJ1809-11 和 PNJ1809-13 作为环境消毒剂的杀菌效果评估

钱新杰, 李一昊, 曾颀, 殷晗杰, 王瑜欣, 黄豪圣, 巩倩雯, 李德志, 薛峰, 汤芳*, 戴建君

南京农业大学动物医学院, 农业部动物细菌学重点实验室, 江苏 南京 210095

摘要:【目的】分析 2 株肠聚集性大肠杆菌(EAEC) CVCC232 噬菌体 PNJ1809-11、PNJ1809-13 的生物学特性, 并对其作为环境消毒剂的杀菌效果进行评估。【方法】透射电镜下观察 PNJ1809-11、PNJ1809-13 的形态; 通过宿主谱、最佳感染复数(MOI)、一步生长曲线、对 pH 和温度耐受性的测定分析 PNJ1809-11、PNJ1809-13 的生物学特性; 比较 2 株噬菌体的体外杀菌效果和喷雾、雾化处理后的杀菌效果; 检测噬菌体在模拟养殖环境下的耐受性, 及喷雾处理的噬菌体制剂在模拟养殖环境下的杀菌效果和对宿主菌生物被膜的清除效果; 分析宿主菌的抗性突变率。【结果】电镜下观察 PNJ1809-11、PNJ1809-13 均为肌尾病毒科噬菌体; PNJ1809-11 可裂解 155 株大肠杆菌, PNJ1809-13 可裂解 46 株大肠杆菌; 噬菌体 PNJ1809-11、PNJ1809-13 的最佳感染复数(MOI)均为 10, 最适 pH 均为 7; 与 PNJ1809-13 相比, PNJ1809-11 具有较好的热稳定性; 在模拟的封闭装置中, 将两株噬菌体分别经喷雾、雾化处理后, 二者对宿主菌的杀灭效果均可达 99% 以上; 对人工污染的粪便表面细菌的杀灭效果均达到 99% 以上。噬菌体 PNJ1809-11、PNJ1809-13 及两者的混合制剂(噬菌体鸡尾酒)对宿主菌 CVCC232 形成的生物被膜的裂解效率分别为 78%、30%和 83%。噬菌体 PNJ1809-11 在养殖温度、粪便 pH 以及阳光照射下, 其耐受性均强于 PNJ1809-13。宿主菌对 PNJ1809-11、PNJ1809-13 的抗性突变率分别为 2.5×10^{-3} 和 1.0×10^{-3} 。【结论】综上, 噬菌体 PNJ1809-11 的环境耐受力更强, 噬菌体鸡尾酒对生物被膜的裂解效果更好, 提示噬菌体 PNJ1809-13 或噬菌体鸡尾酒经喷雾处理后具有作为环境杀菌剂的潜力。

关键词: 噬菌体, 噬菌体鸡尾酒, 消毒剂, 耐受性, 生物被膜

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFC1605400); 江苏省自然科学基金优秀青年基金(BK20180075)

*通信作者。Fax: +86-25-84396517; E-mail: tfalice@126.com

收稿日期: 2020-07-23; 修回日期: 2020-09-27; 网络出版日期: 2020-12-02

常见的致泻型大肠杆菌分为以下 6 种类型: 肠致病性大肠杆菌(EPEC)、产肠毒素性大肠杆菌(ETEC)、肠出血性大肠杆菌(EHEC)、肠侵袭性大肠杆菌(EIEC)、弥散黏附性大肠杆菌(DAEC)和肠聚集性大肠杆菌(EAEC)^[1]。其中 EAEC 可通过粪口传播引起炎症性腹泻, 以特有的“聚集样”或“砖堆样”的方式黏附于上皮细胞株 HEp-2^[2-3]。EAEC 多引起发展中国家和工业化国家断奶幼儿和旅行者的急性或持续性腹泻和溶血性尿毒症, 而常见的养殖动物如鸡、猪、牛、羊也是其重要宿主, 其中牛的带菌率可高达 16%^[4]。环境中残留的细菌对现代养殖企业的效益产生重要影响, 企业多使用化学制剂通过熏蒸或喷洒的方式对环境进行消毒, 如过硫酸氢钾、戊二醛和二氧化氯等, 但这些消毒剂在使用过程中产生的药物残留会对工作人员的健康造成一定伤害, 或被动物误吸误食之后对动物的健康造成威胁^[5-6]。

1921 年, Bruynoghe 和 Maisin 首次将噬菌体应用于葡萄球菌感染的治疗^[7], 此后, 由于噬菌体在自然界的丰度及其较好的宿主特异性, 特别是噬菌体在杀菌过程中的安全性以及对多重耐药菌的杀灭效果, 使噬菌体在“生物防治”方面具有较大的发展潜力。

本试验对实验室保存的 2 株 EAEC 噬菌体 PNJ180911、PNJ180913 进行生物学特性分析, 研究其对宿主菌 CVCC232 生物被膜的裂解效果, 并探索了噬菌体在模拟密闭空间、养殖温度、粪便 pH 和阳光直射等环境中对宿主菌的杀灭效果, 为研制新型杀菌剂奠定了基础, 对 EAEC 的防控具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 培养基与试剂

琼脂粉、胰蛋白胨、酵母提取物、氯化钠、

HCl、NaOH、甲醇、冰醋酸、草酸结晶紫、SM 缓冲液(NaCl, 5.5 g; MgSO₄·7H₂O, 2 g; 1 mol/L pH 7.5 Tris-HCl, 50 mL; 明胶, 0.1 g, ddH₂O 定容至 1000 mL)。

1.2 菌株与培养条件

肠聚集性大肠杆菌 CVCC232 购自中国兽药监察所菌种保藏中心, 分离自上海某猪场腹泻仔猪。大肠杆菌在液体 Luria-Bertain(LB)培养基或固体 LB 平板上培养。噬菌体 PNJ180911、PNJ180913 均由本实验室分离并保存。

1.3 噬菌体形态的观察

将 10 μL 噬菌体悬液滴于铜网上, 静置 10 min, 用滤纸吸去边缘多余的液体, 滴加 10 μL 2%磷钨酸, 复染 2 min, 自然风干后, 用透射电镜(TEM)观察噬菌体的形态。

1.4 噬菌体宿主谱的测定

用平板点样法测定噬菌体的宿主谱, 选取本实验室保存的 167 株不同动物源的大肠杆菌测定 2 株噬菌体的宿主谱, 观察平板上噬菌斑的形成情况。

1.5 噬菌体最佳感染复数(MOI)的测定

将 CVCC232 培养至对数期, 浓度为 1×10^8 CFU/mL。按照感染复数为 0.001、0.01、0.1、1、10 和 100 的比例分别将噬菌体与细菌等量混合, 静置 15 min, 10000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 沉淀用 5 mL 液体 LB 重悬, 37 °C 摇床培养 5 h 后 10000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 双层琼脂平板法测效价, 以产生最高效价的比例为最佳感染复数。

1.6 噬菌体一步生长曲线的测定

将噬菌体与宿主菌 CVCC232 以最佳感染复

数均匀混合, 37 °C 静置 15 min, 10000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 将沉淀用 37 °C 预热的 5 mL 液体 LB 重悬, 取 200 μ L, 12000 r/min 离心 30 s, 取上清测效价, 以此时间计为零时, 置于 37 °C 摇床培养, 前 20 min 每 5 min 取样测效价, 20 min 后每 10 min 取样并测效价, 共持续 120 min。

1.7 噬菌体对 pH 和温度的耐受性检测

噬菌体对 pH 的耐受性检测: 用 HCl、NaOH 溶液将 SM 缓冲液调节至 pH 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12, 以不同 pH 的 SM 缓冲液稀释噬菌体, 37 °C 水浴锅温育, 分别于 0.5 h、1 h 后取样, 双层琼脂平板法测定其效价。

噬菌体对温度的耐受性检测: 将噬菌体分别放置于 40、50、60、70、80 °C 水浴锅中温育, 分别于 0.5、1 h 后取样, 双层琼脂平板法测效价。

1.8 噬菌体体外杀菌效果的测定

将新鲜菌液(1×10^8 CFU/mL)与噬菌体分别以 MOI=0.1、1、10、100 的比例均匀混合后加入 96 孔板中, 阳性对照孔加入 200 μ L 浓度为 1×10^7 CFU/mL 的菌液, 设 3 个复孔。将 96 孔板置于酶标仪中

37 °C 振荡培养, 每小时测量 OD_{600} 处的吸光值, 共测量 16 h。

1.9 模拟养殖环境中噬菌体制剂的杀菌效果

1.9.1 模拟封闭装置中噬菌体制剂的杀菌效果:

在已灭菌的透明密封箱底部放置若干无盖的固体 LB 平板, 使用无菌喷壶将 5 mL CVCC232 (5×10^5 CFU/mL)均匀喷洒在箱子内部, 室温静置, 使细菌自然沉降到箱子底部(图 1)。

将噬菌体 PNJ1809-11、PNJ1809-13 和噬菌体鸡尾酒经雾化和喷雾处理后, 测定其对宿主菌的杀灭效果。

(1) 雾化法: 将 30 mL 噬菌体悬液(10^9 PFU/mL)装至超声雾化器中, 连接箱体, 使噬菌体雾化液充满整个箱体。

(2) 喷雾法: 将 5 mL 噬菌体悬液装入喷壶中, 均匀喷洒至箱体。

雾化或喷雾结束后, 分别于 30 min、1 h、2 h 后各取出 3 块平板, 倒置, 37 °C 孵育 14 h, 对照组使用无菌 SM 缓冲液雾化或喷雾, 然后进行菌落计数。

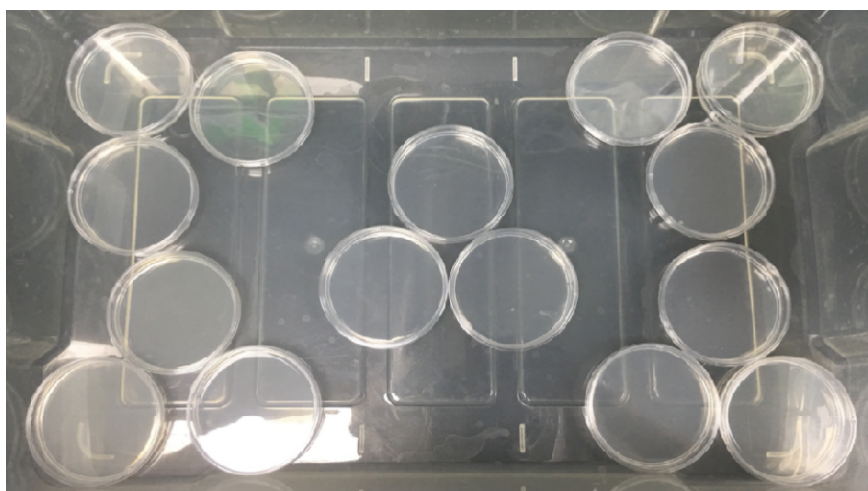


图 1. 模拟封闭空间装置
Figure 1. Simulated closed space.

1.9.2 噬菌体喷雾对地面的杀菌效果: 使用切割后的水泥地板(15 cm×15 cm)模拟水泥地面。使用喷壶喷洒 2.5 mL 菌液(5×10^5 CFU/mL)至水泥板完全浸湿, 10 min 后喷洒等量的噬菌体或者 SM 液, 2 h 后用无菌脱脂棉球蘸取 PBS 缓冲液擦拭水泥板, 然后将棉球浸入 5 mL PBS 中, 4 °C 静置 24 h, 平板计数法测菌落数。

1.9.3 噬菌体喷雾对粪便的杀菌效果: 将 20 g 高压灭菌后的猪粪与 10 mL CVCC232 均匀混合后倒入无菌平皿(直径 90 mm、高 12 mm)中, 使其充满整个平皿, 24 h 后喷洒 5.0 mL 噬菌体制剂, 每日 2 次, 共喷洒 2 d, 对照组喷洒 SM 缓冲液。最后一次喷洒 2 h 后, 分别称取表面和距表面 0.5 cm 处的粪便各 1 g, 分别加入 5 mL PBS, 平板计数法测菌落数。

1.10 噬菌体对细菌生物被膜的裂解作用

参考欧阳凤菊的方法^[8], 采用微孔板法对 CVCC232 生物被膜形成能力进行检测, 判定 CVCC232 形成被膜的最佳时长。在 96 微孔板中培养出生物被膜态的细菌, 弃培养液, 每孔加入 200 μ L 噬菌体悬液, 对照组加入等量 SM 缓冲液, 37 °C 培养, 24 h 后观察被膜裂解情况。

1.11 噬菌体在养殖环境中的耐受性测定

1.11.1 养殖温度对噬菌体活性的影响: 某鸡场全年测温数据显示, 鸡场内最高温度不超过 30 °C, 动物俯卧休息的地方与体温相近, 约为 37 °C, 而养殖场的温度一般控制在 26 °C^[9-10]。本试验探索了 26 °C 和 37 °C 条件下噬菌体效价在 7 d 内的变化。将噬菌体悬浮液分别放入 26 °C 和 37 °C 恒温培养箱内连续培养 7 d, 每天于相同时间点取样测效价。

1.11.2 粪便 pH 对噬菌体活性的影响: 畜禽粪便的 pH 范围是 6.0–8.5^[11-12], 故将噬菌体悬液 pH 分别调为 6.0 和 8.5, 置于 4 °C, 于每天相同时间点取样测效价, 共测量 7 d。

1.11.3 阳光直射对噬菌体活性的影响: 噬菌体作为环境杀菌剂在白天使用时, 阳光中紫外线可影响噬菌体的活性。本试验直接采用阳光照射的方法测定其对噬菌体效价的影响。将噬菌体装入透明试管内置于阳光下照射 6 h, 每 2 h 测一次效价。

1.12 宿主菌抗性突变率的检测

将 CVCC232 培养至对数期, 以最佳感染复数将噬菌体和菌液混合, 用平板计数法检测该体系中 CVCC232 的原始菌落数, 37 °C 摇床培养 5 h 至澄清(此时即认定所有非抗性菌株已被噬菌体裂解), 8000 r/min、10 min 离心混合液, 弃上清, 沉淀用 PBS 重悬, 用平板计数法测定抗性菌落数。菌株的抗性突变率=抗性菌落数/原始菌落数^[13]。

1.13 数据及分析

本研究中所有实验数据均为 3 个独立重复实验的平均值 \pm 标准偏差(mean \pm SD)。采用 GraphPad Prism version 5.0 软件进行数据分析和图表制作。

2 结果和分析

2.1 噬菌体的形态

噬菌体 PNJ1809-11 在双层琼脂板上形成的噬菌斑直径约为 3 mm, 有晕环, 噬菌斑边缘透亮、整齐(图 2-A); PNJ1809-13 在双层琼脂平板上形成的噬菌斑直径约为 1 mm, 无晕环, 噬菌斑边缘透亮、整齐(图 2-B)。

透射电镜下噬菌体 PNJ1809-11 头部呈狭长的六面体, 直径约 118 nm×73 nm, 有一个可伸缩的

尾部,长约 103 nm,并可见伸展的尾丝(图 2-C);PNJ1809-13 头部呈六面体,直径约 113 nm×65 nm,有一个可收缩的尾部,长约 104 nm,并可见伸展的尾丝,两株噬菌体均为肌尾病毒科噬菌体(图 2-D)。

2.2 噬菌体的裂解谱

噬菌体裂解谱测定结果显示,PNJ1809-11 可裂解 155 株大肠杆菌,裂解率为 92.82%;PNJ1809-

13 可以裂解 46 株大肠杆菌,裂解率为 27.54% (附表 1)。

2.3 最佳感染复数(MOI)

当噬菌体与宿主菌浓度比为 10:1 时,噬菌体 PNJ1809-11 和 PNJ1809-13 均释放出最多子代颗粒,效价分别为 2.1×10^9 PFU/mL 和 1.8×10^9 PFU/mL,因此噬菌体 PNJ1809-11 和 PNJ1809-13 的最佳感染复数(MOI)均为 10 (表 1)。

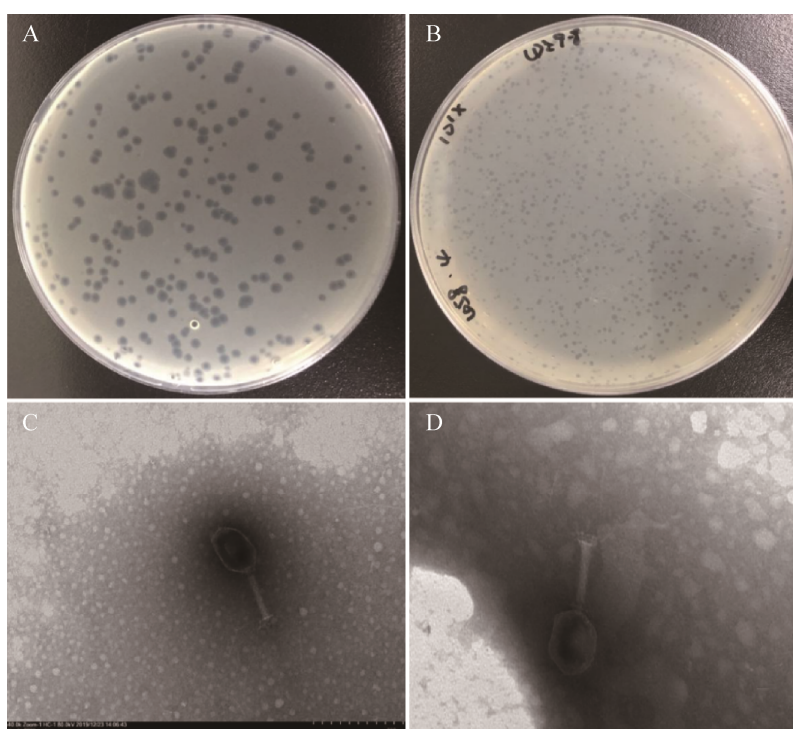


图 2. 噬菌体的形态

Figure 2. Shapes of phages. A: plaque shape of PNJ1809-11; B: plaque shape of PNJ1809-13; C: transmission electron micrograph of PNJ1809-11; D: transmission electron micrograph of PNJ1809-13.

表 1. 最佳感染复数测定

Table 1. Determination of optimal multiplicity of infection of QL01 and QL02

MOI	Phage titer/(PFU/mL)	Bacteria concentration/(CFU/mL)	PNJ1809-11 titer/(PFU/mL)	PNJ1809-13 titer/(PFU/mL)
100	1×10^9	1×10^7	2.6×10^8	1.3×10^9
10	1×10^9	1×10^8	2.1×10^9	1.8×10^9
1	1×10^8	1×10^8	6.4×10^8	9.2×10^8
0.1	1×10^7	1×10^8	1.2×10^9	7.6×10^8
0.01	1×10^6	1×10^8	1.5×10^9	1.7×10^8
0.001	1×10^5	1×10^8	4.4×10^8	1.3×10^8

2.4 一步生长曲线

一步生长曲线结果显示, 噬菌体 PNJ1809-11 的潜伏期为 15 min, 15 min 后进入爆发期, 其效价在 15-80 min 迅速增加, 并于 80 min 达到峰值, 维持在 7.0×10^8 PFU/mL 不再明显改变, 裂解量为 52。噬菌体 PNJ1809-13 的潜伏期为 15 min, 15 min 后进入爆发期, 其效价在 15-50 min 迅速增加, 并于 50 min 达到峰值, 维持在 2.8×10^8 PFU/mL 不再明显改变, 裂解量为 21 (图 3)。

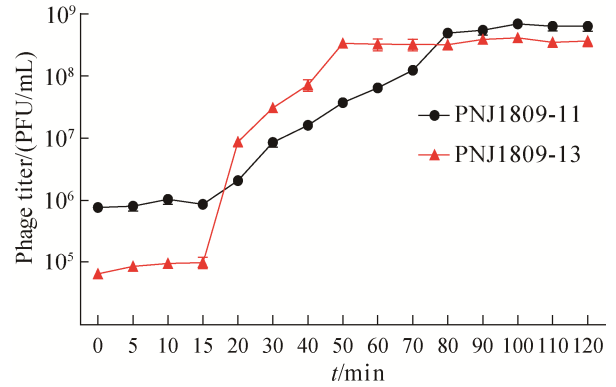


图 3. 一步生长曲线

Figure 3. One-step growth curve. The error bar represents the standard deviation of three parallel samples.

2.5 pH 耐受性

pH 耐受性检测显示, 噬菌体 PNJ1809-11、PNJ1809-13 在 pH 3-11 范围内皆可存活, 在 $\text{pH} \leq 2$ 或 $\text{pH} \geq 12$ 时, 其活性完全丧失, 最适 pH 为 7 (图 4)。

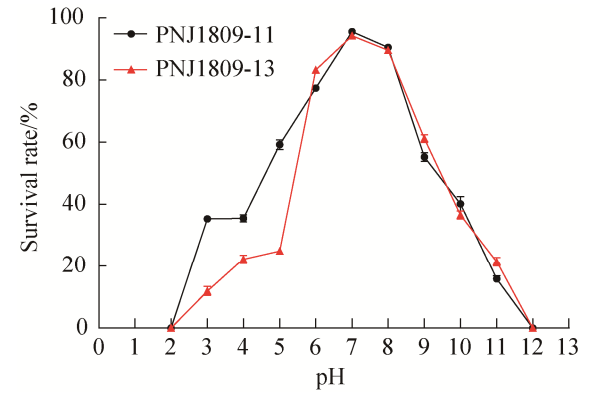


图 4. QL01、QL02 的 pH 耐受性

Figure 4. pH resistance of phage PNJ1809-11 and PNJ1809-13. The error bar represents the standard deviation of three parallel samples.

2.6 热稳定性

热稳定性检测结果显示, 噬菌体 PNJ1809-11、PNJ1809-13 在 40°C 时活性均保持稳定, 60°C 作用 30 min 后活性显著降低, 作用 1h 则完全失活; 噬菌体 PNJ1809-11 在 70°C 作用 30 min 仍有一定活性, PNJ1809-13 在 70°C 条件下作用 30 min 则完全失活。 80°C 试验组 2 株噬菌体均不耐受, 在 30 min 完全失活(图 5)。

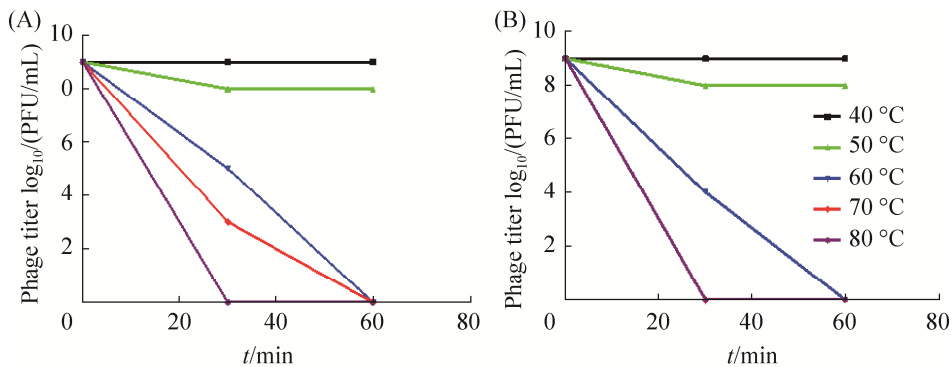


图 5. 噬菌体 PNJ1809-11(A)和 PNJ1809-13(B)的热稳定性

Figure 5. Thermal stability of PNJ1809-11 (A) and PNJ1809-13 (B).

2.7 噬菌体体外抑菌效果

体外杀菌效果显示, 当 MOI=1 时, 噬菌体 PNJ1809-11 在前 3 h 显著抑制宿主菌的生长, 当 MOI=10 和 MOI=100 时, PNJ1809-11 抑制 CVCC232 生长的时间延长至 5 h, OD_{600} 处的吸光值可低至 0.09, 由图可知, 当 MOI=10 时, PNJ1809-11 的体外抑菌效果最为显著(图 6-A)。当 MOI=10 时, 噬菌体 PNJ1809-13 在前 3 h 显著抑制宿主菌的生长, 当 MOI=100 时, PNJ1809-13 抑制 CVCC2323 生长的时间延长至 5 h, 而当 MOI=0.1 和 MOI=1 时, 噬菌体对 CVCC232 的生长则完全没有抑制作用(图 6-B)。

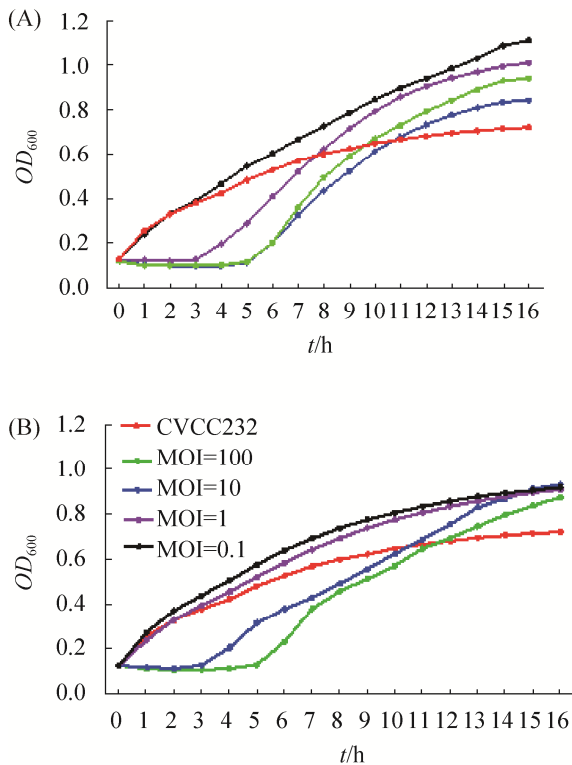


图 6. 不同感染复数下噬菌体 PNJ1809-11(A) 和 PNJ1809-13(B) 对 CVCC232 的抑制作用

Figure 6. Inhibition of PNJ1809-11(A) and PNJ1809-13(B) against of CVCC232 with different MOI.

actamicro@im.ac.cn

2.8 模拟封闭装置中噬菌体制剂对细菌的杀灭效果

2.8.1 经雾化、喷雾处理后噬菌体制剂对宿主菌的杀灭效果: 经雾化处理后噬菌体 PNJ1809-11、PNJ1809-13 及噬菌体鸡尾酒对宿主菌 CVCC232 的杀菌效果均可达到 99% 以上, 其中 PNJ1809-11 的杀菌效果稍强于 PNJ1809-13, 而噬菌体鸡尾酒的杀菌效果则介于二者之间; 经喷雾处理后噬菌体 PNJ1809-11、PNJ1809-13 及其混合制剂的杀菌效果均可达 99% 以上, 与雾化组杀菌效果无显著差异, 但喷雾处理只需 5 mL 噬菌体悬液, 因此后续试验选择喷雾处理方式进行杀菌效果评价(表 2, 表 3)。

2.8.2 噬菌体喷雾对地面的杀菌效果: 喷雾处理的噬菌体对地面细菌的杀灭效果显示, 与对照组相比, 噬菌体 PNJ1809-11 对地面宿主菌处理后, 残留菌落数下降了约 2.5 个数量级, 杀灭效率为 99.32%; 噬菌体 PNJ1809-13 处理后, 菌落数下降了约 1 个数量级, 杀灭效率为 91.23%; 噬菌体

表 2. 雾化处理后噬菌体的杀菌效果

Table 2. Sterilization efficiency after treated with atomized bacteriophage

t/h	PNJ1809-11/%	PNJ1809-13/%	Phage cocktail/%
0.5	99.94	99.66	99.71
1.0	99.93	99.36	99.70
2.0	99.95	99.22	99.67

表 3. 喷雾处理后噬菌体的杀菌效果

Table 3. Sterilization efficiency after treated with sparyed bacteriophage

t/h	PNJ1809-11/%	PNJ1809-13/%	Phage cocktail/%
0.5	99.61	99.35	99.55
1.0	99.58	99.21	99.41
2.0	99.53	99.23	99.51

鸡尾酒的杀菌效率为 95.39%, 杀菌效果介于两者之间(表 4)。

2.8.3 噬菌体喷雾对粪便的杀菌效果: 与空白对照相比, 噬菌体单独处理组与鸡尾酒组对粪便表面细菌的杀灭效果均达到 99.50%以上, 杀菌效果依次为: 鸡尾酒>PNJ1809-11>PNJ1809-13; 而三组噬菌体制剂对粪便内部宿主菌的杀灭率均低于 15.00%, 杀灭效果依次为: 鸡尾酒>PNJ1809-11>PNJ1809-13 (表 4), 表明喷雾处理的噬菌体对粪

便表面细菌的杀灭效果显著强于对内部细菌的杀灭效果。

2.9 噬菌体制剂对大肠杆菌 CVCC232 生物被膜的裂解

CVCC232 形成的生物被膜量在 36 h 时最高, 此时 $OD/OD_c=3.02$, 被膜形成能为中等阳性(表 5)。显微镜下观察 CVCC232 在细胞爬片上生长 36 h 后形成的被膜形态, 可见有大量微菌落连成片状(图 7-A)。

表 4. 噬菌体喷雾对地面、粪便中宿主菌的杀灭效果

Table 4. Sterilization efficiency of phage spray on ground host bacteria or host bacteria infeces

Groups	Ground host bacteria/%	Host bacteria on fecal surface/%	Host bacteria in feces/%
PNJ1809-11	99.32	99.80	13.15
PNJ1809-13	91.23	99.67	10.04
Phage cocktail	95.39	99.84	14.97
SM buffer	0.00	0.00	0.00

表 5. 大肠杆菌 CVCC232 形成生物被膜的能力

Table 5. Biofilm formation ability of *E. coli* CVCC232

t/h	OD_c	OD_{600}	OD/OD_c
24	0.141	0.372	2.64
36	0.182	0.550	3.02
48	0.181	0.322	1.77

与对照组相比, 噬菌体 PNJ1809-11 处理组和噬菌体鸡尾酒处理组孔内的液体明显变清, 表明噬菌体

PNJ1809-11 和噬菌体鸡尾酒可有效裂解 CVCC232 形成的生物被膜(图 7-B)。经固定染色后测量各孔 OD_{600} 处的吸光值, 噬菌体 PNJ1809-13 试验组对 CVCC232 生物被膜的裂解效率为 78%; PNJ1809-13 的裂解效率为 30%; 噬菌体鸡尾酒的裂解效率为 83%, 为试验组中裂解效率最高的一组(表 6)。

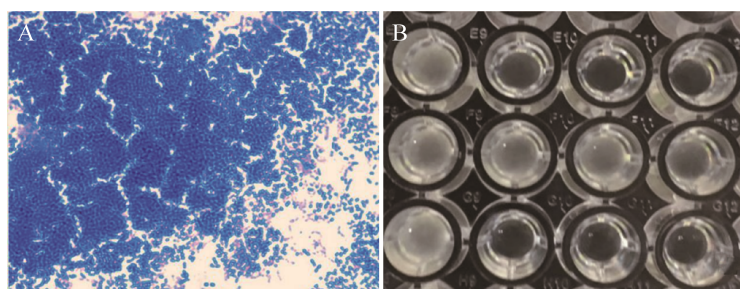


图 7. 显微镜下 CVCC232 的被膜形态(A)及噬菌体对 CVCC232 生物被膜的裂解效果(B)

Figure 7. Morphology of biofilm formed by CVCC232 under microscope(A) and biofilm cleavage of CVCC232 by phage(B). A1-A3 were treated with SM buffer; B1-D1 were treated with PNJ1809-11; B2-D2 were treated with PNJ1809-13; B3-D3 were treated with phage cocktail.

表 6. 不同噬菌体制剂处理后生物被膜的 OD 值Table 6. OD_{600} value of biofilm after treated with phage

Groups	OD_{600}	Cleavage efficiency/%
PNJ1809-11	0.2197	78
PNJ1809-13	0.6951	30
Phage cocktail	0.1649	83
SM buffer	0.9860	0.00

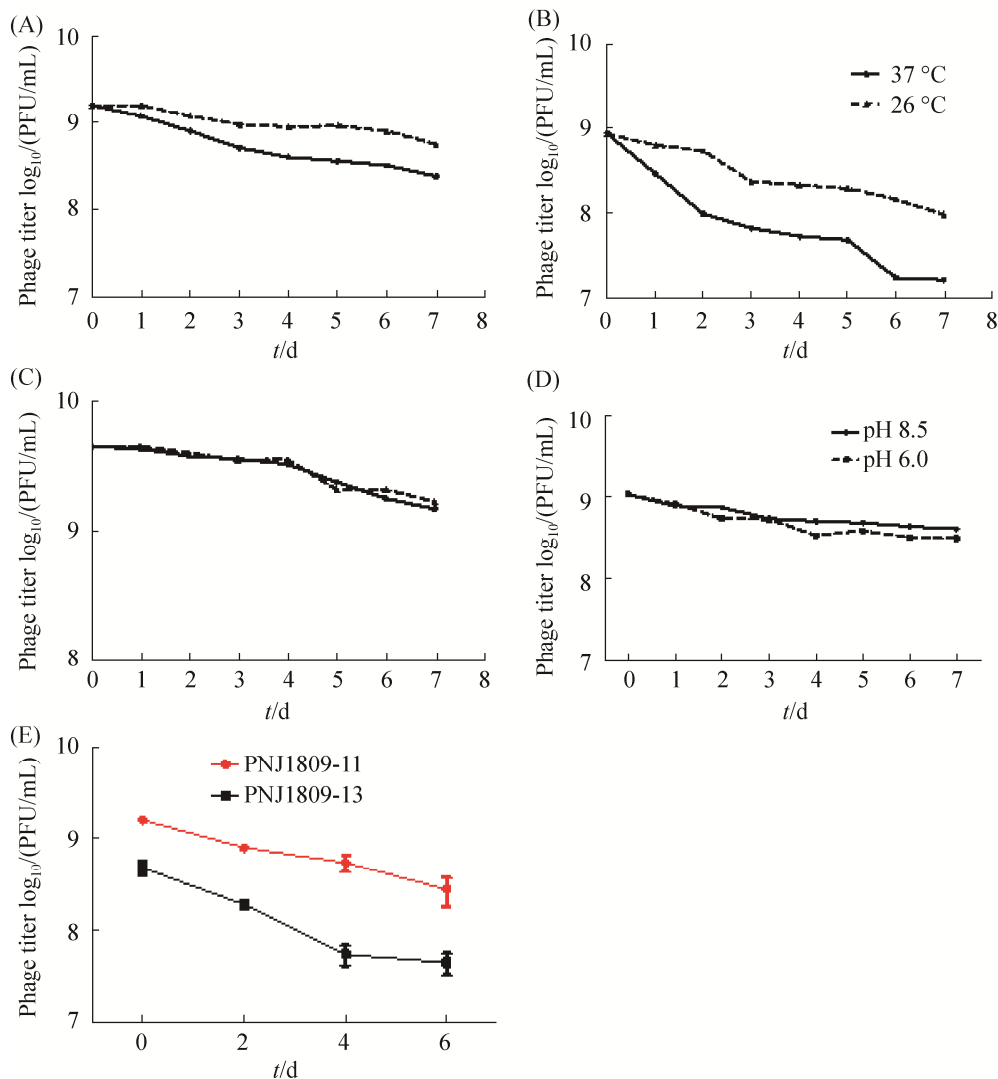
Calculation formula of cleavage efficiency= $[1-(OD_{\text{test}}/OD_{\text{negative}})] \times 100\%$.

图 8. 噬菌体在养殖环境中的耐受性

Figure 8. Tolerance of bacteriophage in culture environment. Titer variation of PNJ1809-11 (A) and PNJ1809-13 (B) at breeding temperature; titer variation of PNJ1809-11 (C) and PNJ1809-13 (D) at fecal pH; the effect of direct sunlight on phages PNJ1809-11 and PNJ1809-13 (E). The error bar represents the standard deviation of three parallel samples.

2.10 噬菌体在养殖环境中的耐受性

2.10.1 噬菌体在养殖温度下的耐受性：

PNJ1809-11 在 26 °C 和 37 °C 下活性变化较小，1 周后效价均下降了约 1 个数量级，但 37 °C 条件下活性变化稍大(图 8-A)；而在 26 °C 条件下，噬菌体 PNJ1809-13 在 7 d 内效价降低了约 1 个数量级，37 °C 条件下则降低了近 2 个数量级，表明噬菌体 PNJ1809-11 在养殖温度下耐受性更强(图 8-B)。

2.10.2 噬菌体在粪便 pH 中的耐受性: 噬菌体 PNJ1809-11 的效价在 0–4 d 内在 pH 6.0 和 pH 8.6 的条件下均较稳定, 5 d 后效价开始缓慢下降, 最终效价变化不超过 1 个数量级(图 8-C); 噬菌体 PNJ1809-13 的效价在 pH 6.0 条件下于第 2 天和第 4 天明显降低, 在 pH 8.5 条件下平缓下降, 对 pH 6.0 弱酸条件下稍敏感(图 8-D)。

2.10.3 阳光直射对噬菌体活性的影响: 经阳光照射 6 h 后, 2 株噬菌体的效价均有不同程度的下降, PNJ1809-11 的滴度由初始的 1.6×10^9 PFU/mL 降至 2.8×10^8 PFU/mL, 约下降 6 倍; PNJ1809-13 的滴度则由初始的 4.8×10^8 PFU/mL 降至 4.5×10^7 PFU/mL, 约下降 1 个数量级。噬菌体 PNJ1809-11 相对于 PNJ1809-13 在阳光照射下较稳定(图 8-E)。

2.11 宿主菌对噬菌体的抗性突变率

经检测 CVCC232 对噬菌体 PNJ1809-11 产生抗性菌株的概率为 2.5×10^{-3} , 对 PNJ1809-13 产生抗性菌株的概率为 1.0×10^{-3} (表 7)。

3 讨论

本研究评估了 2 株噬菌体 PNJ1809-11、PNJ1809-13 以单一形式和鸡尾酒形式分别经喷雾和雾化处理后对密闭箱中的细菌的杀灭效果。试验结果显示, 不论是雾化组还是喷雾组, 在噬菌体 PNJ1809-11、PNJ1809-13 和噬菌体鸡尾酒 3 组

试验中, 噬菌体 PNJ1809-11 的杀菌效果最好; 与雾化处理相比, 在相似杀菌率的条件下, 喷雾处理组所需的噬菌体量是雾化处理组的 1/6, 若应用于养殖环境中, 出于成本的考虑, 喷雾处理的方式具有一定的优势。不同微生物对雾化的耐受力也不同, 雾化器处理过程中, 超声波也会降低噬菌体的存活量, 雾化时间、雾化量等因素也会影响噬菌体的雾化效果, 超声雾化后噬菌体的生物安全性也需要进一步考量; 而喷雾处理操作简单方便, 噬菌体用量少, 因此后续使用雾化噬菌体作用于模拟养殖环境探讨噬菌体对地面、粪便的杀菌效果。喷雾处理的噬菌体对地面、粪便表面均有较好的杀灭效果, 其中鸡尾酒的灭菌效果最佳, 其次为噬菌体 PNJ1809-11、效果最差的为 PNJ1809-13, 但喷雾处理的噬菌体对粪便内部细菌的杀灭效果并不理想。现实养殖场中粪便表面及内部中均有细菌定殖, 无论是噬菌体喷雾还是其他化学喷雾剂, 在对粪便进行消毒灭菌时主要对粪便表面的细菌起灭活作用, 建议养殖场进行消毒前先清除粪便、饲料、垫料、有机物和污物等, 做好消毒前准备。

生物被膜是细菌黏附的共同体, 将细菌包裹在内使细菌比浮游状态具有更高的代谢能力, 保护细菌免受免疫细胞的攻击, 更是细菌产生抗性、难以被消毒剂杀灭的原因^[14]。抗生素只能清除浮游态细菌却不能清除隐藏在生物被膜内的细菌^[15]。细菌可在饲槽、笼架等表面形成生物被膜, 这就

表 7. 宿主菌对噬菌体产生抗性菌株的突变率

Table 7. Mutation frequency of phage-resistant strains of CVCC232 after exposed to phages

Phages	Bacteria concentration after exposed to phage (CFU/mL)	Bacteria concentration without exposing to phage (CFU/mL)	Mutation frequency
PNJ1809-11	8.7×10^5	3.5×10^8	2.5×10^{-3}
PNJ1809-13	3.5×10^5	3.5×10^8	1.0×10^{-3}

要求养殖场的消毒剂具有清除生物被膜的能力。相关文献表明噬菌体、噬菌体裂解酶都可清除细菌表面的生物被膜^[14]。本试验结果显示, 宿主菌 CVCC232 形成的生物被膜在用噬菌体悬浮液作用 24 h 后可被显著破坏, 但 2 株噬菌体对生物被膜的清除能力有显著差异: 噬菌体 PNJ1809-13 单独作用于被膜时清除率很低, 而 PNJ1809-11 对生物被膜的清除效果显著优于 PNJ1809-13; 然而, 将两株噬菌体以鸡尾酒的形式作用于生物被膜后, 对被膜的裂解效果要好于任意一株。该试验结果表明本实验室分离的两株噬菌体不仅能有效杀灭环境中的细菌, 还可清除养殖环境中宿主菌形成的生物被膜, 且噬菌体鸡尾酒的效果最佳。将来可考虑将噬菌体鸡尾酒运用于肉品、案板和医疗器械等生物被膜的清除, 若与抗生素、钴离子和氯等物质联用效果可能会更好。

喷雾处理的噬菌体在模拟养殖环境的温度、粪便酸碱度、阳光直射下的活性变化试验中, PNJ1809-11 对这些环境条件的耐受性更强, 作为生物消毒剂具有更大优势, 有望将其开发成新型环保、高效的生物消毒剂, 这对养殖场的环境净化及大肠杆菌的防控具有重要意义。但由于试验条件限制, 本试验仅使用密闭箱、水泥板和人工污染粪便等模拟养殖环境, 未能在养殖场现场检测噬菌体的杀菌效果, 且养殖场中的菌种更为复杂, 若后续将噬菌体应用于临床, 需分离更多的噬菌体, 将具有不同裂解谱的噬菌体以鸡尾酒的形式喷洒于养殖环境, 进一步探索噬菌体作为环境消毒剂的可能。

噬菌体与细菌共进化过程中会产生噬菌体抗性菌株。细菌可通过阻断噬菌体的吸附、抑制噬菌体 DNA 的注射、阻止噬菌体 DNA 的复制、CRISPR-Cas 系统和流产感染等机制产生抗噬菌

体突变株^[16-17]。两种及以上具有不同裂解谱的噬菌体混合形成的制剂即为噬菌体鸡尾酒, 使用噬菌体鸡尾酒不仅可以拓宽宿主谱, 增强杀菌能力, 还可以降低噬菌体抗性菌株的产生概率^[17-18]。在国外, 噬菌体鸡尾酒或噬菌体制剂已被应用于肉类、水果、蔬菜中食源性细菌的杀灭^[19]。许多动物实验和临床实验也表明噬菌体鸡尾酒制剂具有非常广泛的裂解谱, 可有效减少细菌的耐药性, 且在动物模型上也有较好的保护力^[20]。通过检测宿主菌 CVCC232 对 2 株噬菌体 PNJ1809-11 和 PNJ1809-13 抗性菌株的突变率, 表明宿主菌产生抗噬菌体菌株的概率较大, 还需分离更多的噬菌体, 以噬菌体鸡尾酒的形式克服这一问题。

参考文献

- [1] Gomes TAT, Elias WP, Scaletsky ICA, Guth BEC, Rodrigues JF, Piazza RMF, Ferreira LCS, Martinez MB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2016, 47(S1): 3–30.
- [2] Nataro JP, Mai V, Johnson J, Blackwelder WC, Heimer R, Tirrell S, Edberg SC, Braden CR, Morris Jr JG, Hirshon JM. Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. *Clinical Infectious Diseases*, 2006, 43(4): 402–407.
- [3] Huang DB, Okhuysen PC, Jiang ZD, DuPont HL. Enteroregative *Escherichia coli*: an emerging enteric pathogen. *American Journal of Gastroenterology*, 2004, 99(2): 383–389.
- [4] Wei YJ, Wang ZT, Xu YC, Xu WT. Current situation analysis and detection techniques of pathogenic *Escherichia coli*. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(11): 80–92. (in Chinese)
卫昱君, 王紫婷, 徐瑗聪, 许文涛. 致病性大肠杆菌现状分析及检测技术研究进展. *生物技术通报*, 2016, 32(11): 80–92.
- [5] Dong WW, Li F, Zhang SD, Wang CL, Ai HX, Li GM. Research progress of commonly used disinfectants and disinfection effect evaluation methods in poultry farms.

- Poultry Science*, 2019(9): 53–56. (in Chinese)
- 董雯雯, 李峰, 张世栋, 王春玲, 艾洪新, 李桂明. 家禽养殖场常用消毒剂及消毒效果评价方法研究进展. 家禽科学, 2019(9): 53–56.
- [6] Xu X, Zheng QL, Leng SZ, Liu L, Yin QP, Zhang C. Study on the disinfection effect of chlorine dioxide as a fumigant in farms. *Guangdong Chemical Industry*, 2017, 44(9): 98–99. (in Chinese)
- 许详, 郑庆禄, 冷淑珍, 刘露, 尹曲平, 张超. 二氧化氯型熏蒸剂在养殖场所的现场杀菌效果研究. 广东化工, 2017, 44(9): 98–99.
- [7] Bruynoghe R, Maisin J. Essais de thérapeutique au moyen du bactériophage du Staphylocoque. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales*, 1921(85): 1120–1121.
- [8] 欧阳凤菊. 禽致病大肠杆菌生物被膜检测及形成基因研究. 东北农业大学硕士学位论文, 2010.
- [9] Yan YH, Han XX. Temperature difference of factors affecting livestock and poultry production. *Animals Breeding and Feed*, 2014(7): 20–21. (in Chinese)
- 烟玉华, 韩秀欣. 畜禽生产影响因素之温差. 养殖与饲料, 2014(7): 20–21.
- [10] Huang YK, Liu J, Fan JY, Jiang DF. Correlation analysis between seasonal changes in the environment in chicken coops and mortality rate of chicken flocks. *Chinese Journal of Animal Science*, 2012, 48(6): 57–60, 64. (in Chinese)
- 黄炎坤, 刘健, 范佳英, 姜东风. 鸡舍内环境季节性变化与鸡群死淘率的关联分析. 中国畜牧杂志, 2012, 48(6): 57–60, 64.
- [11] Liang WF. Field measurement of porcine feces pH and its significance. *Guangdong Journal of Animal and Veterinary Science*, 2018, 43(6): 26–28. (in Chinese)
- 梁雯霏. 猪粪便 pH 值现场测定及其意义. 广东畜牧兽医科技, 2018, 43(6): 26–28.
- [12] Wang Y, Liao XD, Wu YB. Effects of ambient temperature and humidity on water content, nitrogen and pH of layer manure. *China Poultry*, 2012, 34(4): 21–24. (in Chinese)
- 王艳, 廖新梯, 吴银宝. 环境温度和湿度对蛋鸡粪便含水率、氮素和 pH 的影响. 中国家禽, 2012, 34(4): 21–24.
- [13] O'Flynn G, Ross RP, Fitzgerald GF, Coffey A. Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(6): 3417–3424.
- [14] Lü YH, Quan XX, Shen MX, Yi QX, Cui ZL. Research progress in biofilm degradation by bacteriophage and its lysin. *Microbiology China*, 2015, 42(3): 568–573. (in Chinese)
- 吕芸辉, 全心馨, 沈梦溪, 易秋雪, 崔泽林. 噬菌体及其裂解酶对细菌生物被膜作用的研究进展. 微生物学通报, 2015, 42(3): 568–573.
- [15] Qu CL, Gao H, Zhao BH, Chen C. Progress on bacterial biofilm and the mechanism of antibiotic resistance. *Progress in Veterinary Medicine*, 2008, 29(3): 86–90. (in Chinese)
- 屈常林, 高洪, 赵宝洪, 陈超. 细菌生物被膜与抗生素耐药机制研究进展. 动物医学进展, 2008, 29(3): 86–90.
- [16] Xu JL, Kan B. Bacterial resistance mechanisms to bacteriophage. *Letters in Biotechnology*, 2013, 24(3): 409–413. (in Chinese)
- 徐嘉良, 阚飙. 细菌的噬菌体感染抗性机制. 生物技术通讯, 2013, 24(3): 409–413.
- [17] Yu L, Wang S, Guo ZM, Liu HT, Sun DG, Yan GM, Hu DL, Du CT, Feng X, Han WY, Gu JM, Sun CJ, Lei LC. A guard-killer phage cocktail effectively lyses the host and inhibits the development of phage-resistant strains of *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(2): 971–983.
- [18] Kelly D, McAuliffe O, Ross RP, O'Mahony J, Coffey A. Development of a broad-host-range phage cocktail for biocontrol. *Bioengineered Bugs*, 2011, 2(1): 31–37.
- [19] Spricigo DA, Bardina C, Cortés P, Llagostera M. Use of a bacteriophage cocktail to control *Salmonella* in food and the food industry. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 165(2): 169–174.
- [20] Chan BK, Abedon ST, Loc-Carrillo C. Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiology*, 2013, 8(6): 769–783.

Evaluation of sterilization efficiency of EAEC phage PNJ1809-11 and PNJ1809-13 as environmental disinfectants

Xinjie Qian, Yihao Li, Hang Zeng, Hanjie Yin, Yuxin Wang, Haosheng Huang, Qianwen Gong, Dezhi Li, Feng Xue, Fang Tang*, Jianjun Dai

Key Laboratory of Animal Bacteriology, College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] Analyzing the biological characteristics of two enteroaggregating *Escherichia coli* (EAEC) CVCC232 phages PNJ1809-11 and PNJ1809-13, and evaluating their bactericidal effects as environmental disinfectants. [Methods] We observed the morphology of PNJ1809-11 and PNJ1809-13 under a transmission electron microscope, analysed their biological characteristics, including the host spectrum, optimal multiplicity of infection, one-step growth curve, and tolerance to pH and temperature, also compared the sterilization efficiency of atomized and sprayed phages. We next determined the bactericidal effect of the sprayed phage in a simulated livestock farm environment as well as the effect of the phages on the biofilm disruption of the host bacteria. At last we tested the tolerance of the two phages to the environment of simulated livestock farm and the mutation frequency of phage-resistant strains. [Results] The results of electron microscope observation showed that phages PNJ1809-11 and PNJ1809-13 both belong to Myoviridae phages. PNJ1809-11 and PNJ1809-13 could lyse 155 and 46 *Escherichia coli* strains, respectively. Biological assays showed that the MOI of the two phages are both 10; the optimal pH of them are both 7; compared with PNJ1809-13, PNJ1809-11 showed better thermal stability. In the simulated closed device, the sterilization efficiency of sprayed and atomized PNJ1809-11 and PNJ1809-13 on the host bacteria was as high as 99%; the sterilization efficiency on the surface of artificially contaminated feces was also higher than 99%. The lysis efficiency of PNJ1809-11, PNJ1809-13 and their mixture (phage cocktail) against biofilm of CVCC232 were 78%, 30% and 83% respectively. Phage PNJ1809-11 had better tolerance than PNJ1809-13 to the temperature, fecal pH and sunlight of simulated livestock farm. The mutation frequency of phage-resistant strains was 2.5×10^{-3} and 1.0×10^{-3} respectively. [Conclusion] In summary, phage PNJ1809-11 was more tolerant to the environment, and the phage cocktail showed higher lysis effect on biofilm, which suggested that sprayed phage PNJ1809-11 or the cocktail of PNJ1809-11 and PNJ1809-13 had the potential as an environmental disinfectant.

Keywords: bacteriophage, phage cocktail, disinfectant, tolerance, biofilm

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Key R&D Program of China (2019YFC1605400) and by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20180075)

*Corresponding author. Fax: +86-25-84396517; E-mail: tfalice@126.com

Received: 23 July 2020; Revised: 27 September 2020; Published online: 2 December 2020

附表 1. 噬菌体 PNJ1809-11、PNJ1809-13 的裂解谱
Table S1. The host range of phage PNJ1809-11 and PNJ1809-13

Bacteria number	Animal sources	Origin	PNJ1809-11	PNJ1809-13
Q167	goat	Qinghai	+	+
Q159	goat	Haiyan County, Qinghai	+	+
Q155	goat	Tianjun County, Qinghai	+	+
Q152	goat	Huzhu County, Qinghai	+	+
Q151	goat	Huzhu County, Qinghai	+	+
Q150	goat	Huzhu County, Qinghai	+	+
Q149	goat	Huzhu County, Qinghai	+	+
Q148	goat	Huzhu County, Qinghai	+	-
Q147	goat	Huzhu County, Qinghai	+	+
Q145	goat	Huzhu County, Qinghai	+	-
Q143	goat	Huzhu County, Qinghai	+	+
Q129	goat	Haiyan County, Qinghai	+	+
Q122	goat	Tianjun County, Qinghai	+	-
Q121	goat	Tianjun County, Qinghai	+	+
Q113	goat	Huzhu County, Qinghai	+	-
Q110	goat	Tianjun County, Qinghai	+	+
Q107	goat	Tianjun County, Qinghai	+	+
Q106	goat	Tianjun County, Qinghai	+	-
Q100	goat	Tianjun County, Qinghai	+	+
Q099	goat	Tianjun County, Qinghai	+	-
Q098	goat	Tianjun County, Qinghai	-	+
Q096	goat	Tianjun County, Qinghai	-	+
Q095	goat	Tianjun County, Qinghai	+	-
Q094	goat	Tianjun County, Qinghai	-	+
Q091	goat	Tianjun County, Qinghai	+	-
Q089	goat	Tianjun County, Qinghai	-	+
Q088	goat	Tianjun County, Qinghai	-	+
Q085	goat	Tianjun County, Qinghai	+	-
Q084	goat	Tianjun County, Qinghai	-	+
Q075	goat	Tianjun County, Qinghai	+	-
Q069	goat	Tianjun County, Qinghai	+	-
Q063	goat	Tianjun County, Qinghai	+	+
Q038	goat	Hudong Breeding Farm, Qinghai	+	-
Q035	goat	Hudong Breeding Farm, Qinghai	+	-
Q034	goat	Hudong Breeding Farm, Qinghai	+	-
Q017	goat	Hudong Breeding Farm, Qinghai	+	-
Q010	goat	Qinhai	+	-
DE427	duck	Chu County, Chuzhou, Anhui	+	-
DE425	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE420	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-

(待续)

(续附表 1)

DE419	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE414	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE407	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE405	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE382	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE366	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE365	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE363	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE360	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE358	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE355	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE354	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE347	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE344	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE341	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE336	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE332	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE331	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE329	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE328	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE325	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE322	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE321	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE319	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE318	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE317	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE316	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE314	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE313	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE312	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE311	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE310	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE308	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE306	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE305	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE304	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE303	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE301	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE300	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE298	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE297	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE294	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-

(待续)

(续附表 1)

DE290	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE288	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE271	duck	Hanhe Town, Lai'an County, Anhui	+	-
DE270	duck	Hanhe Town, Lai'an County, Anhui	+	-
DE268	duck	Hanhe Town, Lai'an County, Anhui	+	-
DE267	duck	Hanhe Town, Lai'an County, Anhui	+	-
DE258	duck	Hanhe Town, Lai'an County, Anhui	+	-
DE257	duck	Hanhe Town, Lai'an County, Anhui	+	-
DE256	duck	Hanhe Town, Lai'an County, Anhui	+	-
DE255	duck	Hanhe Town, Lai'an County, Anhui	+	-
DE254	duck	Hanhe Town, Lai'an County, Anhui	+	-
DE250	duck	Hanhe Town, Lai'an County, Anhui	+	-
DE249	duck	Hanhe Town, Lai'an County, Anhui	+	-
DE247	duck	Hanhe Town, Lai'an County, Anhui	+	-
DE245	duck	Hanhe Town, Lai'an County, Anhui	+	-
DE218	duck	Tongjing, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE192	duck	Quanjiao County, Anhui	+	-
DE190	duck	Quanjiao County, Anhui	+	-
DE189	duck	Quanjiao County, Anhui	+	-
DE188	duck	Quanjiao County, Anhui	+	+
DE186	duck	Hengxi, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE171	duck	Dongshan, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE169	duck	Dongshan, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE167	duck	Dongshan, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE166	duck	Dongshan, Jiangning, Jiangsu	+	-
DE160	duck	Guannan, Lianyungang, Jiangsu	+	-
DE152	duck	Presented by Huazhong Agricultural University	+	-
DE151	duck	Presented by Huazhong Agricultural University	+	-
DE150	duck	Presented by Huazhong Agricultural University	+	-
DE144	duck	Shandong	+	-
DE143	duck	Shandong	+	-
DE139	duck	Shandong	+	-
DE135	duck	Shandong	+	+
DE134	duck	Shandong	+	+
DE124	duck	He County Anhui	+	-
DE099	duck	Liuhe Nanjing	+	-
DE095	duck	Liuhe Nanjing	+	-
DE089	duck	Liuhe Nanjing	+	-
DE049	duck	Quanjiao County, Anhui	+	-
DE040	duck	He County Anhui	+	-
DE039	duck	He County Anhui	+	-
DE037	duck	He County Anhui	+	-

(待续)

(续附表 1)

DE032	duck	He County Anhui	+	-
DE029	duck	He County Anhui	+	-
DE017	duck	Lishui, Jiangsu	+	-
DE015	duck	Lishui, Jiangsu	+	-
DE013	duck	Lishui, Jiangsu	+	-
DE002	duck	Lishui, Jiangsu	+	-
DE001	duck	Lishui, Jiangsu	+	-
CVCC491	piglets	Beijing	+	+
CVCC249	cow	Beijing	+	-
CVCC247	cow	Beijing	+	-
CVCC245	cow	Beijing	+	-
CVCC244	cow	Sichuan	+	-
CVCC241	cow	Sichuan	+	+
CVCC240	cow	Sichuan	+	-
CVCC221	cow	France	+	-
CVCC215	piglets	Beijing	+	-
CVCC204	piglets	Beijing	+	-
CVCC198	piglets	Beijing	+	-
CVCC196	piglets	Beijing	+	-
CVCC195	piglets	Beijing	+	-
CVCC1591	cow	Lanzhou	+	-
CVCC1553	chicken	Tianjin	+	-
CVCC1549	cow	Sichuan	+	-
CVCC1548	cow	Sichuan	+	-
CVCC1546	milk calf	Sichuan	+	+
CVCC1539	yak rectum	Lanzhou	+	+
CVCC1531	lamb	Inner Mongolia	+	-
CVCC1530	lamb	Inner Mongolia	+	-
CVCC1529	lamb	Inner Mongolia	+	-
CVCC1526	piglets	Gaochun, Zhejiang	+	+
CVCC1522	piglet intestinal mucosa	Shanghai	-	+
CVCC1519	piglets	Beijing	-	+
CVCC1511	piglets	Beijing	-	+
CVCC1509	piglets	Beijing	+	-
CVCC1502	piglets	Shanghai	+	-
CVCC1498	piglets	Guangxi	+	-
CVCC1495	piglets	Guangxi	+	+
CVCC1494	piglet intestinal contents	Beijing	+	-
CVCC1493	piglets	Beijing	+	+
CVCC1491	piglets	Beijing	+	+
CVCC1418	piglets	Shanghai	-	+
CVCC1350	piglets	Shanghai	-	+
CVCC1335	piglets	Shanghai	-	+

+: plaque foremed; -: no plaque formed.