



王培,陈麒百,孔祥宇,庞申雨,周博鑫,高东阳,李鹤,宋军. 功能化负载噬菌体磁靶向递送系统构建及对污水中耐药菌高效靶向去除作用[J]. 中国农业大学学报, 2026, 31(01): 136-145.

WANG Pei, CHEN Qibai, KONG Xiangyu, PANG Shenyu, ZHOU Boxin, GAO Dongyang, LI He, SONG Jun. Construction of functionalized loaded phage magnetic targeted delivery system and its efficient targeted removal of drug-resistant bacteria in wastewater[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2026, 31(01): 136-145.

DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2026.01.12

功能化负载噬菌体磁靶向递送系统构建及对污水中耐药菌 高效靶向去除作用

王培 陈麒百 孔祥宇 庞申雨 周博鑫 高东阳 李鹤 宋军*

(黑龙江八一农垦大学 动物科技学院/农业农村部东北寒区牛病防治重点实验室(部省共建)/

黑龙江省牛病防制重点实验室,黑龙江 大庆 163319)

摘要 为构建一种基于表面活性素(Surfactin)功能化修饰的负载噬菌体磁性纳米 Fe_3O_4 颗粒递送系统,用于污水处理的环境友好型纳米-微生物复合材料,本研究以水热合成法制备磁性纳米 Fe_3O_4 (MNs),通过1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐活化得到活化的MNs(AMNs),经Surfactin功能化修饰获得功能化的MNs(FMNs),再与不同噬菌体共同孵育形成复合体系(MNs-P、AMNs-P、FMNs-P);通过透射电子显微镜(TEM)观察纳米颗粒的形态与粒径分布;通过磁吸附试验评估FMNs的磁性;通过双层平板法测定噬菌体负载量并绘制吸附曲线;通过平板计数法评估不同修饰纳米颗粒的抗菌活性;通过结晶紫染色法检测其抑制生物被膜形成能力;通过回收试验评估其循环使用能力。结果表明:1)成功制备了平均粒径为 (11.52 ± 3.31) nm的MNs和 (9.37 ± 3.52) nm的FMNs,TEM和磁吸附试验结果显示,纳米粒子呈现分散-团聚的微观形貌。FMNs较MNs分散性显著改善,粒径略有减小,且具备优异的磁响应性。2)噬菌体负载结果显示,FMNs可负载多种宿主菌属(如大肠杆菌、沙门菌)及不同形态(肌尾、长尾)的噬菌体,其中GEP101噬菌体负载量达 2.44×10^8 PFU/mL,负载率达85.12%。3)吸附曲线表明FMNs在0~2 h内负载噬菌体效率最高。4)抗菌试验和抑制生物被膜形成能力试验显示,FMNs-P(GEP101)在3 h内对大肠杆菌的杀菌率达96.82%,并且能够显著抑制生物被膜的形成。5)材料回收试验证明,经过3次循环使用后,FMNs-P仍然保持92.67%回收率和70.35%噬菌体负载率,显示出良好循环稳定性。综上,Surfactin显著提升了 Fe_3O_4 的分散性与噬菌体负载能力,FMNs-P兼具靶向清除耐药菌并抑制生物被膜和磁性回收能力,能有效减少试剂使用与二次污染风险。本研究为解决畜禽养殖场污水中的耐药菌污染问题提供了创新方案,有望推动纳米-微生物材料在环境修复领域的实际应用。

关键词 噬菌体; Fe_3O_4 ; 表面活性素; 污水; 耐药菌

中图分类号 S851.2+4

文章编号 1007-4333(2026)01-0136-10

文献标志码 A

Construction of functionalized loaded phage magnetic targeted delivery system and its efficient targeted removal of drug-resistant bacteria in wastewater

WANG Pei, CHEN Qibai, KONG Xiangyu, PANG Shenyu, ZHOU Boxin,
GAO Dongyang, LI He, SONG Jun*

收稿日期: 2025-07-24;接受日期: 2025-10-11

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31802226);黑龙江省自然科学基金资助项目(LH2022C072);黑龙江省生态环境保护科研项目(HST2024S018);黑龙江八一农垦大学研究生创新科研项目(YJSCX2024-Y21)

第一作者: 王培(ORCID:0009-0001-8278-1749),硕士研究生,E-mail: wongpui@163.com

通讯作者: 宋军(ORCID:0000-0002-4524-5947),副教授,主要从事噬菌体防控细菌性疾病研究,E-mail: songjun_2005@126.com

(College of Animal Science and Veterinary Medicine/Key Laboratory of Bovine Disease Control in Northeast Cold Regions, Ministry of Agriculture and Rural Affairs (Co-construction of Ministry and Province)/Key Laboratory of Prevention and Control of Bovine Diseases of Heilongjiang Province, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract The study was to construct a Surfactin-functionalized magnetic Fe_3O_4 nanoparticles loaded phage delivery system, as an environmentally friendly nano-microbial composite material for wastewater treatment. In this study, magnetic nano- Fe_3O_4 (MNs) was prepared by hydrothermal synthesis. Activated MNs (AMNs) were obtained by activation of 1-ethyl-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, and functionalized MNs (FMNs) were obtained by Surfactin functional modification. Then, they were incubated with different phages to form composite systems (MNs-P, AMNs-P, FMNs-P). The morphology and particle size distribution of nanoparticles were observed by transmission electron microscopy (TEM). The magnetism of FMNs was evaluated by magnetic adsorption. The phage load was determined by double-layer plate method and the adsorption curve was drawn. The antibacterial activity of different modified nanoparticles was evaluated by plate counting method. The ability to inhibit biofilm formation was detected by crystal violet staining. The recycling ability was evaluated by recycling test. The results showed that: 1) MNs and FMNs with an average nanoscale diameter of (11.52 ± 3.31) nm and (9.37 ± 3.52) nm were successfully prepared, and TEM and magnetic adsorption test results showed that the nanoparticles exhibited a dispersed-agglomerated micro-morphology. A comparison of FMNs with MNs revealed that the dispersion of FMNs was significantly enhanced, the particle size was marginally reduced, and FMNs possessed exhibited strong magnetic responsiveness. 2) Phage loading results showed that FMNs can load phages of various host genera (such as *Escherichia coli* and *Salmonella*) and different morphologies (*Myoviridae* and *Siphoviridae*). Among them, the loading amount of phage GEP101 reached 2.44×10^8 PFU/mL, with a loading rate of 85.12%. 3) The adsorption curve indicated that FMNs exhibited the optimal phage loading efficiency within the initial 2 h. 4) Antibacterial test and inhibition of biofilm formation ability test showed that FMNs-P (GEP101) had a bactericidal rate of 96.82% against *E. coli* within 3 h and could significantly inhibit the formation of biofilm. 5) The material recovery test showed that FMNs-P still maintained a 92.67% recovery rate and a 70.35% phage loading rate after three cycles of use, demonstrating good cycle stability. In conclusion, Surfactin significantly improved the dispersibility of Fe_3O_4 and the loading capacity of phages. FMNs-P had the ability to target the removal of drug-resistant bacteria and inhibit biofilm and magnetic recovery, which could effectively reduce the risk of reagent use and secondary pollution. It provided an innovative solution to the problem of drug-resistant bacteria contamination in wastewater from livestock and poultry farms.

Keywords bacteriophage; Fe_3O_4 ; Surfactin; wastewater; resistant bacteria

抗生素常用于畜禽养殖领域,以促进动物生长和预防疾病。但抗生素在动物体内吸收不完全,大部分药物及其代谢产物会随粪尿排出,进而污染土壤和水环境,最终导致环境中耐药菌的产生^[1-2];而动物排泄物也因此成为细菌耐药性传播的重要源头^[3-4]。养殖业中过度使用抗生素还会增加动物群体中耐药细菌的流行,使人类控制耐药菌感染更加复杂化^[5]。研究表明,噬菌体能够有效靶向并杀灭特定的耐药菌,减少对环境有益细菌的影响,在控制细菌种群、改善水质和处理污水等方面具有重要的潜力^[6-7]。Pallavali等^[8]从未处理的污水中成功分离出对多种耐药性细菌具有裂解活性的噬菌体;Lekota等^[9]利用噬菌体特异性裂解 *Klebsiella variicola*,从而减少污水中的细菌负荷,控制水环境中病原菌的传播。尽管噬菌体在污水处

理中展现出显著的应用潜力^[10],但在复杂环境中大量投加噬菌体时,不仅可能导致宿主菌产生抗性,且噬菌体在水中只能通过扩散方式移动,缺乏主动靶向机制,进而降低其与耐药菌的结合及裂解效率^[11-13],因此,仍需更多研究来优化其应用效果,如将噬菌体与其他材料结合使用。赵远超等^[14]将生物炭与噬菌体疗法结合,有效降低了土壤-蔬菜系统中耐四环素大肠杆菌和耐氯霉素铜绿假单胞菌的丰度。磁性纳米 Fe_3O_4 是材料科学、化学和物理学领域的研究热点之一,具有良好的生物相容性、高比表面积、稳定的化学性质、与污染物相互作用的能力强、优异的表面活性及环保特性,这些特性使其成为环境修复的良好候选材料之一^[15-17]。Shi等^[18]利用 Fe_3O_4 与零价铁耦合去除水中的重金属离子及有机污染物;Sharma等^[19]利用绿色合

成的 Fe_3O_4 抑制水体中的有害微生物。然而,裸露的磁性纳米 Fe_3O_4 化学活性高,易氧化、易团聚^[20]。使用不同的化学修饰剂(如聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、表面活性剂等),可改善 Fe_3O_4 的分散性和生物相容性,增强其应用潜力^[21]。表面活性素(Surfactin)是一种由芽孢杆菌属(*Bacillus*)微生物产生的脂肽类生物表面活性物质^[22]。Surfactin因其广泛的生物活性而备受关注,包括抗菌活性、抗病毒活性、抗真菌与抗植物病害等^[23-24]。Rahman等^[25]利用Surfactin包覆银纳米颗粒,其对耐药性铜绿假单胞菌表现出优异的抗菌及抗生物被膜活性。Surfactin能够降低不相容溶液间的表面张力,且经济环保,因此通过其对 Fe_3O_4 进行表面功能化,可以有效增强 Fe_3O_4 的适用性^[26]。因此,本研究旨在制备一种用表面活性素修饰的、简单高效且环境友好的功能化磁性纳米 Fe_3O_4 ,并负载噬菌体,从而构建一种纳米-微生物材料,将噬菌体与 Fe_3O_4 进行联用,以发挥各自优势,靶向去除污水中的耐药菌,为环境友好型纳米-微生物材料在畜禽养殖场污水处理中的应用提供依据和参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

四水氯化亚铁($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$),六水氯化铁($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)购于上海麦克林生化科技股份有限公司;1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDAC),表面活性素(Surfactin)购自上海阿拉丁生化科技有限公司。

LB琼脂培养基(Luria-Bertani Agar),LB肉汤(Luria-Bertani Broth),胰蛋白胨大豆肉汤(Trypticase Soy Broth)均购于青岛海博生物有限公司;污水采集自黑龙江省大庆市周边牧场,采集后于4℃保存。

水热合成反应器(KH-PPL 100 mL)购自西安仪贝尔仪器设备有限公司;钕磁铁($\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$)购自宁波宇烁磁性材料有限公司;酶联免疫分析仪(杭州奥盛仪器有限公司);高速冷冻型微量离心机(湖南可成仪器设备有限公司);透射电子显微镜(TEM) Talos-F200C(赛默飞世尔科技有限公司)。

1.2 菌株培养与噬菌体扩增

本试验所用菌株和噬菌体均保存于黑龙江八一农垦大学动物科技学院兽医公共卫生实验室,其中大肠杆菌 ATCC 35150 和肺炎克雷伯菌 ATCC 700603 购自美国典型微生物菌种保藏中心

(ATCC),其余菌株和噬菌体均由本实验室分离并保藏。参照潘顺圆等^[27]的方法,将实验室保存的大肠杆菌(ATCC 35150)作为宿主菌进行研究。将宿主菌在3 mL LB液体培养基中培养,37℃培养至对数生长期后将噬菌体与对数期宿主菌混合,37℃恒温振荡培养6~8 h,将培养物在12 000 g下离心5 min,经0.22 μm 滤器过滤,得到噬菌体扩增液。连续梯度稀释后,采用双层平板法测定噬菌体效价。宿主菌和噬菌体于4℃保存。

1.3 制备负载噬菌体的功能化磁性纳米 Fe_3O_4

本研究通过水热合成法制备磁性纳米 Fe_3O_4 (MNs)。参照Peng等^[28]和张彩权^[29]的方法并稍作改动。将 $\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}$ 以摩尔比为2:1进行混合,并加入氨水调节至 $\text{pH} \approx 10.0$,于200℃反应8 h。冷却至室温后,用无水乙醇反复清洗。使用钕磁铁分离产物,并在60℃干燥,得到MNs。

参考Qamar等^[26]的方法对MNs进行修饰。将200 μL EDAC溶液与10 mg Fe_3O_4 混合,低温超声分散,得到活化的磁性纳米 Fe_3O_4 (AMNs)。将AMNs与Surfactin按1:1(mg/μL)的比例混合搅拌1 h,超声处理后,使用无水乙醇和蒸馏水交替洗涤3~5次后烘干,得到功能化的磁性纳米 Fe_3O_4 (FMNs)。

将噬菌体(10^8 PFU/mL)分别加入到AMNs和FMNs中,振荡2 h,形成负载噬菌体的活化磁性纳米 Fe_3O_4 (AMNs-P)和负载噬菌体的功能化的磁性纳米 Fe_3O_4 (FMNs-P)。

1.4 形态及磁性表征

使用TEM观察 Fe_3O_4 形态并进行粒径分析。为确定FMNs的磁性性能,通过记录并比较其在水溶液中自然沉降和外加磁场作用下沉降时间及状态进行评价。

1.5 噬菌体负载量与负载率测定

参照周瑜桥^[30]的方法并稍作改动,通过双层平板法对噬菌体数量进行量化。公式如下:

$$\text{噬菌体负载量}/(\text{PFU}/\text{mL}) = \text{噬菌体原液量}(\text{PFU}/\text{mL}) - \text{游离噬菌体量}(\text{PFU}/\text{mL}) \quad (1)$$

$$\text{噬菌体负载率}/\% = \text{噬菌体负载量}(\text{PFU}/\text{mL}) / \text{噬菌体原液量}(\text{PFU}/\text{mL}) \times 100\% \quad (2)$$

1.6 噬菌体的吸附曲线

将步骤1.2扩增得到的噬菌体按1:1的比例加入FMNs中,于0、0.5、1、2、4、8、16和24 h,取等量上清液。通过双层平板法测定噬菌体效价,并绘制

磁性纳米颗粒的噬菌体吸附曲线。

1.7 抗菌性能测定

参考 Xu 等^[31]的方法并稍作改动,确定负载噬菌体的磁性纳米颗粒的抗菌活性。将 MNs、AMNs、FMNs、MNs-P、AMNs-P 和 FMNs-P 用 PBS 悬浮。将 50 μL 宿主菌($\text{OD}_{600} \approx 0.3$)与 100 μL 悬浮液混合,总体积为 2 mL。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 3 h 后,用 PBS 将菌液稀释 10^3 倍。将稀释后的菌液(100 μL)均匀涂布在琼脂平板上,培养 12 h 并进行菌落计数。

1.8 抑制生物被膜形成能力测定

采用多功能酶标仪测定负载噬菌体的磁性纳米颗粒对生物被膜形成的抑制能力。参照孔祥宇等^[32]的方法,将过夜培养的宿主菌稀释至 10^6 CFU/mL,取 100 μL 稀释后菌液加入到 96 孔培养板中,对照组加入 100 μL 菌液,处理组分别加入 100 μL 噬菌体 GEP101、MNs、AMNs、FMNs、MNs-P、AMNs-P 和 FMNs-P,37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 48 h 后,取出 96 孔板,并去菌液,用 PBS 洗涤 3 次。每孔加入 200 μL 甲醇,固定 15 min 后弃去甲醇,通风干燥 5 min。加入 200 μL 结晶紫,染色 15 min。使用缓水流冲洗 96 孔培养板,以去除结晶紫染料。室温下通风干燥 30 min,每孔加入 200 μL 33% 的冰醋酸,静置 20 min。将处理好的 96 孔板置于酶标仪

中,测定溶液在 595 nm 处的吸光值,每组做 6 个重复,并取平均值。

1.9 回收效率测定

按照 Wei 等^[33]的方法做出相应改动,确定负载噬菌体的磁性纳米颗粒的循环使用能力。将 50 mg FMNs-P 超声处理 10 min,通过磁场对 FMNs-P 进行收集并用蒸馏水和无水乙醇交替洗涤 3 次,得到回收的 FMNs-P。紫外照射 30 min 后进行干燥称重。按上述方法重复 3 次。

1.10 数据统计分析

试验数据应用 GraphPad Prism 9 软件进行单因素方差分析,图形应用 Origin 2024 软件进行绘制,结果用平均值 $\pm$ 标准差表示。 $P < 0.05$ 为有统计学差异, $P < 0.01$ 表示差异显著, $P < 0.001$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 制备与表征

本研究通过水热合成法制备了磁性纳米 Fe_3O_4 颗粒,并使用 EDAC 和 Surfactin 对制备的磁性纳米 Fe_3O_4 颗粒进行表面活化和功能化修饰,制得活化的 Fe_3O_4 (AMNs) 和功能化的 Fe_3O_4 (FMNs)。制备纳米材料的简易模式图如图 1 所示。

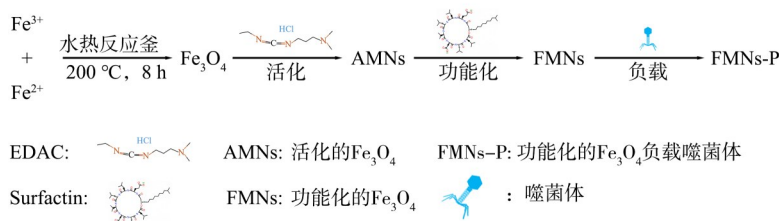


图1 功能化纳米 Fe_3O_4 的制备与噬菌体负载

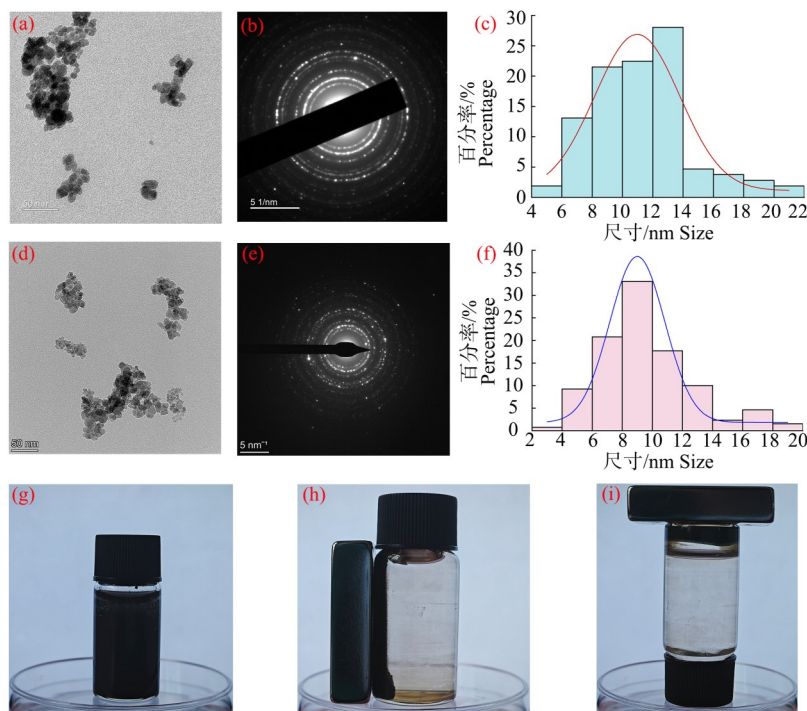
Fig. 1 Preparation of functionalized nano- Fe_3O_4 and phage loading

通过 TEM 对 MNs 和 FMNs 进行表征。结果表明,这些纳米颗粒个体多接近方形,不过存在团聚现象,多个方形颗粒聚集在一起,形成了不规则的簇状、团块状等集合形态,但单个颗粒的基础形状以方形为主。和 MNs(图 2(a))相比,FMNs(图 2(d))分散性较好,团聚性较低,整体呈现出纳米材料典型的分散-团聚混合的微观形貌。通过选区电子衍射(SAED)检测,制备的 MNs 为多晶材料, Surfactin 功能化修饰后(FMNs)并不会改变 MNs 的晶体性质。TEM 检测表明,对(图 2(a))和(图 2

(d))中颗粒大小测量分析得到(图 2(c))和(图 2(f)),制备的 MNs 颗粒直径大小分布在 5~21 nm,其中多数分布于 9~13 nm(图 2(c));FMNs 颗粒直径大小分布在 3~19 nm,其中多数分布于 7~11 nm(图 2(f))。如(图 2(g)~(i))所示,FMNs 在水中的悬浮液呈黑色浑浊,300 s 内仍无法沉降;通过在侧壁和底部放置强磁铁可以缩短沉降时间,提高沉降效果,表明 FMNs 具有良好的磁响应性。

2.2 噬菌体载量测定

本试验所制备的 FMNs 可以负载不同宿主和



(a) MNs的TEM图; (b) MNs的SAED图; (c) MNs的纳米粒子直方图; (d) FMNs的TEM图; (e) FMNs的SAED图; (f) FMNs的纳米粒子直方图; (g)~(i) FMNs的磁性表征图。

(a) TEM images of MNs; (b) SAED images of MNs; (c) Nanoparticle histogram of MNs; (d) TEM images of FMNs; (e) SAED images of FMNs; (f) Nanoparticle histogram of FMNs; (g)~(i) Magnetic characterization of FMNs.

图2 MNs和FMNs的形貌和磁性表征

Fig. 2 The morphology and magnetic characterization of MNs and FMNs

不同形态的噬菌体,如肌尾的大肠杆菌噬菌体GEP101(PQ036202)与GEP191、克雷伯菌噬菌体LAL003(PQ658157)、沙门菌噬菌体pp003和长尾的变形杆菌噬菌体vb_PMC-PL1(PP502408)等。

根据公式(1)计算可得磁性纳米 Fe_3O_4 颗粒的噬菌体负载量,由公式(2)可得负载率。修饰前后磁性纳米 Fe_3O_4 颗粒的噬菌体负载量及负载率如表1所示。结果表明,EDAC和Surfactin活化与功能化修饰均能提高纳米 Fe_3O_4 颗粒的噬菌体负载量与负载率。相比之下,功能化修饰后的 Fe_3O_4 颗粒噬菌体负载量更高,负载率均达到70%以上。

2.3 噬菌体吸附曲线测定

FMNs负载噬菌体时,游离噬菌体效价随时间的变化如图3所示。游离噬菌体效价在0~2 h变化明显,表明FMNs在0~2 h负载噬菌体效率最高,至4 h时,噬菌体负载量达到最高。在4 h之后游离噬菌体效价的整体趋势随时间延长而逐渐降低,表明FMNs负载噬菌体的过程中,噬菌体稳定或少量释放至外界环境。

2.4 抗菌性能测定

如图4所示,FMNs-P(GEP101噬菌体)在3 h内,能够有效清除细菌($P < 0.001$),其中FMNs-P组(图4(e))杀菌效果达到96.82%,抗菌效果明显优于噬菌体组(图4(b))和AMNs-P组(图4(d))($P < 0.001$),证明Surfactin功能化修饰纳米 Fe_3O_4 能够有效地提高 Fe_3O_4 负载GEP101噬菌体后的抗菌活性。

2.5 抑制生物被膜形成能力测定

生物被膜是微生物生长并产生的胞外聚合物,能够为细菌提供物理屏障,使其能在恶劣环境中存活。因此,对不同修饰的 Fe_3O_4 负载噬菌体GEP101前后的抑制生物被膜形成能力进行了测定,结果如图5所示。宿主菌ATCC 35150所形成的生物被膜 OD_{595} 值约为0.359,噬菌体组和FMNs-P组的值约为0.156和0.132,均能显著抑制宿主菌形成生物被膜($P < 0.001$)。其中,未负载噬菌体的处理组也能一定程度上抑制生物被膜的形成。

2.6 回收效率测定

如图6所示,负载GEP101噬菌体的FMNs在

表 1 不同修饰磁性纳米 Fe₃O₄ 颗粒的噬菌体负载量和负载率

Table 1 Bacteriophage load and load rate of different modified magnetic Fe₃O₄ nanoparticles

噬菌体 Bacteriophage	磁性载体 Magnetic carrier	噬菌体平均负载量/(PFU/mL) Bacteriophage load	负载率/% Rate of loading
GEP101	MNs	1.03×10^8	36.04
	AMNs	1.43×10^8	50.00
	FMNs	2.44×10^8	85.12
GEP191	MNs	7.50×10^7	28.48
	AMNs	1.30×10^8	49.37
	FMNs	2.17×10^8	82.28
pp003	MNs	4.67×10^7	23.73
	AMNs	8.03×10^7	40.85
	FMNs	1.38×10^8	70.00
LAL003	MNs	5.83×10^7	24.82
	AMNs	1.06×10^8	45.39
	FMNs	1.85×10^8	78.87
vb_PMC-PL1	MNs	6.03×10^7	31.75
	AMNs	9.37×10^7	49.30
	FMNs	1.47×10^8	77.19

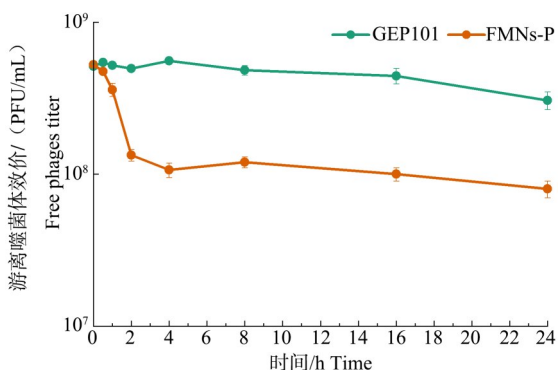


图 3 功能化磁性 Fe₃O₄ 纳米颗粒与 GEP101 噬菌体的吸附曲线

Fig. 3 Adsorption curves of functionalized magnetic Fe₃O₄ nanoparticles and bacteriophage GEP101

重复使用 3 次后回收效率仍约 92.67%，噬菌体 GEP101 负载率仍约 70.35%，证明功能化纳米 Fe₃O₄ 颗粒具有良好的回收效率和循环使用能力。

3 讨论

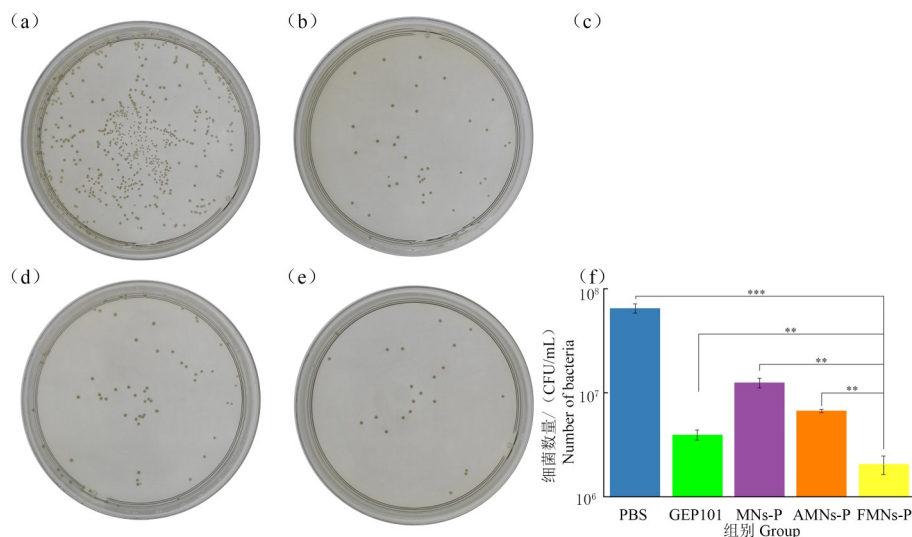
3.1 表征分析

本研究中,通过水热合成法合成的 MNs 平均纳米粒径为(11.52±3.31) nm,小于张彩权^[29]和 Chen 等^[34]通过水热合成法和简单的化学还原法合成的

Fe₃O₄ 粒径,与 Ba-Abbad 等^[35]通过共沉淀法合成的 Fe₃O₄ 平均粒径相近。FMNs 平均纳米粒径为(9.37±3.52) nm,略小于 MNs,同时颗粒聚集现象明显减轻,表明 FMNs 具有更高的分散性,进而具有更强的噬菌体负载能力。Fe₃O₄ 的粒径与比表面积大小成反比^[36],比表面积是决定 Fe₃O₄ 噬菌体负载能力的关键因素。对 Fe₃O₄ 进行表面修饰,不仅可以改善其分散性和稳定性,还能进一步调控其粒径分布^[37]。MNs 在水中静置短时间无法完全沉降,磁吸附能够定向移动和缩短沉降时间,表明制备的 MNs 具有优异的磁响应性能,优异的磁响应性能使其具有导向性和可回收性,通过施加磁场可实现定向移动,提高在特定区域的浓度,还可在使用后迅速地回收进行重复利用。

3.2 性能测定

MNs 通过物理吸附或化学偶联与噬菌体结合。Wang 等^[38]研究表明,噬菌体可以与磁性纳米颗粒共价结合,形成稳定的复合物,不仅保留了噬菌体的特异性识别能力,还增强了磁性分离和富集能力。本研究对不同噬菌体进行了负载能力测定。结果显示,FMNs 能够负载不同宿主菌属和不同形态的噬菌体,噬菌体负载量均达到 10⁸ PFU/mL,其中噬菌体



*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. 下同。

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. The same below.

(a) PBS组; (b)噬菌体组; (c) MNs-P组; (d) AMNs-P组; (e) FMNs-P组, 处理细菌后形成的菌落照片; (f) 不同组别处理后细菌数量的定量评估。

(a) PBS group; (b) Bacteriophage group; (c) MNs-P group; (d) AMNs-P group; (e) FMNs-P group, photographs of colonies formed after bacterial treatment; (f) Quantitative assessment of bacterial counts after treatment in different groups.

图4 不同修饰的 Fe_3O_4 负载噬菌体GEP101的抗菌活性

Fig. 4 Antimicrobial activity of Fe_3O_4 -loaded bacteriophage GEP101 with different modifications

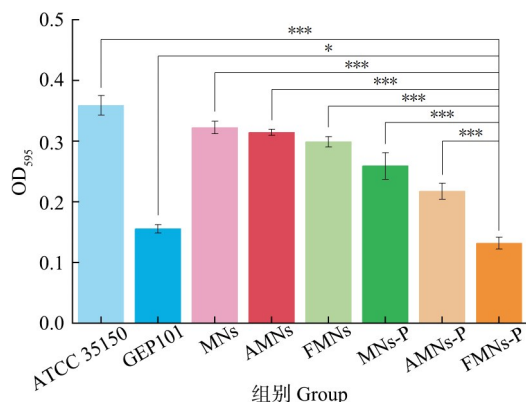


图5 不同修饰的 Fe_3O_4 负载噬菌体GEP101前后的抑制生物被膜形成能力

Fig. 5 Inhibition of biofilm formation by Fe_3O_4 -loaded bacteriophage GEP101 with different modifications before and after treatment

GEP101 负载量为 2.44×10^8 PFU/mL, 负载率为 85.12%。

FMNs-P的应用取决于噬菌体的负载与释放。研究结果表明FMNs能够在2 h内快速高效负载噬菌体。高效的噬菌体负载能够增强对耐药菌的捕获能力,从而提高清除效率。在4 h时,负载量达到最大值。噬菌体的缓慢释放能够提高FMNs-P持续使用能力,避免噬菌体局部大量释放,造成只能

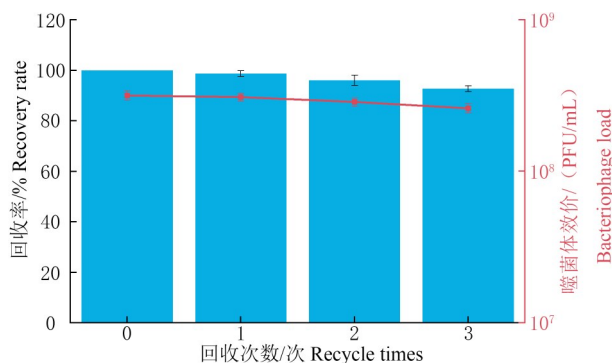


图6 功能化纳米 Fe_3O_4 循环使用能力测定

Fig. 6 Determination of the recycling capacity of functionalized nano- Fe_3O_4

通过扩散作用在受污染水体中发挥作用,无法实现外部磁场控制下的精准噬菌体递送^[39]。本研究制备的FMNs-P的噬菌体效价仅在4 h后略有降低,表明FMNs能够有效减缓噬菌体的释放,使FMNs-P的噬菌体负载量始终保持在较高水平。

噬菌体负载量取决于MNs表面修饰程度。高噬菌体负载量的非修饰 Fe_3O_4 能够捕获更多的细菌(约70%捕获效率),显著高于低负载量^[40]。其中,表面功能化修饰后的FMNs负载量明显高于表面活性化修饰的AMNs,远高于未修饰的MNs,这与Qamar等^[26]的研究结果相同。

通过将 Fe_3O_4 纳米颗粒与噬菌体结合, 可以显著增强其抗菌和抗生物被膜性能。本研究制备的 FMNs-P(GEP101) 对宿主菌表现出显著抗菌活性和抑制生物被膜作用, 效果明显优于 AMNs-P 和 MNs-P。其中, 噬菌体组与 FMNs-P 组相比具有显著差异, 表明纳米颗粒与噬菌体联合应用能够增强抑菌效果, 这与 Xu 等^[31]的研究结果相似。负载噬菌体的磁性纳米颗粒的优势之一是它们能够克服传统抗生素和独立噬菌体疗法的局限性, 实现噬菌体在受污染水域的精准递送; 优势之二是纳米颗粒可以被设计成对特定的环境信号(如 pH 值、温度)做出响应, 从而在最佳的时间和地点实现噬菌体的可控释放; 优势之三是具有特定靶向能力的磁性纳米颗粒可以降低对非目标微生物的损伤, 从而保护了污水生态系统的平衡^[41-43]。因此, FMNs-P 是一种具有广阔应用前景的抗菌策略, 有望成为污水耐药菌的新型处理手段。

Fe_3O_4 优异的磁响应性能使其能够在处理后快速地回收, 从而实现资源的再利用并最大限度减少潜在的环境影响, 在污水处理的实际应用中起着重要作用^[44]。本研究制备的 FMNs 回收效率较高, 重复利用能力与 Wei 等^[33]的研究结果相近, 重复 3 次后的回收效率约为 92.67%, 且噬菌体负载率仍能达到 70.35%, 表现出了良好的稳定性。FMNs 不仅回收简单, 而且可以强化与噬菌体的结合, 增强复杂环境下的使用效率^[26]。相较于传统方式, 这种方式减少了化学试剂的使用, 降低了环境污染的风险。FMNs 重复利用能力和低环境影响展现了其在环境科学中的潜在应用, 通过无毒的合成方法与较高的回收效率, 促进噬菌体的应用和可持续地管理水资源。

4 结 论

本研究通过对 Surfactin 修饰的功能化 Fe_3O_4 纳米颗粒的粒径、噬菌体载量、抗菌活性等性能分析, 证明了 FMNs 能够有效负载多种噬菌体, 并显著抑制生物被膜的形成和清除靶标菌。

参考文献 References

- [1] Abubakar R H, Madoroba E, Adebawale O, Fasanmi O G, Fasina F O. Antimicrobial usage in pig production: Effects on *Escherichia coli* virulence profiles and antimicrobial resistance[J]. *Onderstepoort Journal of Veterinary*

- Research*, 2019, 86(1): a1743
- [2] Silva A, Silva V, Dapkevicius M D L E, Azevedo M, Cordeiro R, Pereira J E, Valentão P, Falco V, Igrejas G, Caniça M, Poeta P. Unveiling antibiotic resistance, clonal diversity, and biofilm formation in *E. coli* isolated from healthy swine in Portugal[J]. *Pathogens*, 2024, 13(4): 305
- [3] Cheng G M, Cheng H F. Overcoming China's animal waste disposal challenge brought by elevated levels of veterinary antimicrobial residues and antimicrobial resistance[J]. *Environment International*, 2024, 191: 109009
- [4] Zalewska M, Błażejewska A, Czapko A, Popowska M. Antibiotics and antibiotic resistance genes in animal manure - consequences of its application in agriculture[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 610656
- [5] Muteeb G. Nanotechnology: A light of hope for combating antibiotic resistance[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(6): 1489
- [6] Kortright K E, Chan B K, Koff J L, Turner P E. Phage therapy: A renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria[J]. *Cell Host & Microbe*, 2019, 25(2): 219-232
- [7] 李擎天, 郭晓奎. 细菌与噬菌体的相互抵抗作用机制[J]. *微生物与感染*, 2020, 15(5): 265-270
- Li Q T, Guo X K. The phage-resistance mechanisms of bacteria and the corresponding responses in bacteriophages[J]. *Journal of Microbes and Infections*, 2020, 15(5): 265-270 (in Chinese)
- [8] Pallavali R R, Degati V L, Lomada D, Reddy M C, Durbaka V R P. Isolation and in vitro evaluation of bacteriophages against MDR-bacterial isolates from septic wound infections[J]. *PLoS One*, 2017, 12(7): e0179245
- [9] Lekota K E, Mabeo R O, Ramatla T, Van Wyk D A B, Thekisoe O, Molale-Tom L G, Bezuidenhout C C. Genomic insight on *Klebsiella varicola* isolated from wastewater treatment plant has uncovered a novel bacteriophage[J]. *BMC Genomics*, 2024, 25(1): 986
- [10] Withey S, Cartmell E, Avery L M, Stephenson T. Bacteriophages—potential for application in wastewater treatment processes[J]. *Science of The Total Environment*, 2005, 339(1/3): 1-18
- [11] Tang X, Fan C Z, Zeng G M, Zhong L R, Li C, Ren X Y, Song B, Liu X G. Phage-host interactions: The neglected part of biological wastewater treatment[J]. *Water Research*, 2022, 226: 119183
- [12] Hasan M, Ahn J. Evolutionary dynamics between phages and bacteria as a possible approach for designing effective phage therapies against antibiotic-resistant bacteria[J]. *Antibiotics*, 2022, 11(7): 915
- [13] You X, Kallies R, Kühn I, Schmidt M, Harms H, Chatzinotas A, Wick L Y. Phage co-transport with hyphal-riding bacteria fuels bacterial invasion in a water-unsaturated microbial model system[J]. *The ISME Journal*, 2022, 16(5): 1275-1283
- [14] 赵远超, 叶茂, 孙明明, 张忠云, 黄丹, 朱国繁, 郑晓璇, 晁会珍, 冯彦房, 武俊, 胡锋, 蒋新. 生物质炭与噬菌体联用阻控与灭活土壤-生菜体系中抗生素抗性致病细菌[J]. *土壤*, 2019, 51(5): 942-948
- Zhao Y C, Ye M, Sun M M, Zhang Z Y, Huang D, Zhu G F, Zheng X X, Chao H Z, Feng Y F, Wu J, Hu F, Jiang X. Combined biochar and bacteriophage to control and inactivate antibiotic resistance pathogenic bacteria in soil-lettuce system[J]. *Soils*, 2019, 51(5): 942-948 (in Chinese)
- [15] Nguyen M D, Tran H V, Xu S J, Lee T R. Fe_3O_4 nanoparticles: Structures, synthesis, magnetic properties, surface functionalization, and emerging applications[J]. *Applied Sciences*, 2021, 11(23): 11301
- [16] Dong L N, Chen G, Liu G Y, Huang X D, Xu X M, Li L Y, Zhang Y G, Wang J, Jin M J, Xu D H, Abd El-Aty A M. A review on recent advances in the applications of composite Fe_3O_4 magnetic nanoparticles in the food

- industry[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2024, 64(4): 1110-1138
- [17] Ma Z H, Mohapatra J, Wei K C, Liu J P, Sun S H. Magnetic nanoparticles: synthesis, anisotropy, and applications[J]. *Chemical Reviews*, 2023, 123(7): 3904-3943
- [18] Shi J X, Zhang J H, Wang C Z, Liu Y W, Li J X. Research progress on the magnetite nanoparticles in the fields of water pollution control and detection[J]. *Chemosphere*, 2023, 336: 139220
- [19] Sharma R, Garg R, Bali M, Eddy N O. Potential applications of green-synthesized iron oxide NPs for environmental remediation[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2023, 195(11): 1397
- [20] 姜伟, 杨毅, 李凤生. 络合剂DTPA对纳米磁性 Fe_3O_4 粒子的表面改性研究[J]. 微纳电子技术, 2006, 43(12): 577-581
- Jiang W, Yang Y, Li F S. Study on surface modification of magnetic Fe_3O_4 nano-particles by chelator DTPA[J]. *Micronanoelectronic Technology*, 2006, 43(12): 577-581 (in Chinese)
- [21] Ali A, Shah T, Ullah R, Zhou P F, Guo M L, Ovais M, Tan Z Q, Rui Y K. Review on recent progress in magnetic nanoparticles: synthesis, characterization, and diverse applications[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2021, 9: 629054
- [22] Qi X H, Liu W, He X, Du C M. A review on surfactin: Molecular regulation of biosynthesis[J]. *Archives of Microbiology*, 2023, 205(9): 313
- [23] Qiao J Q, Borriss R, Sun K, Zhang R S, Chen X J, Liu Y Z, Liu Y F. Research advances in the identification of regulatory mechanisms of surfactin production by *Bacillus*: A review[J]. *Microbial Cell Factories*, 2024, 23(1): 100
- [24] Seydlová G, Svobodová J. Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications[J]. *Central European Journal of Medicine*, 2008, 3(2): 123-133
- [25] Rahman L, Sarwar Y, Khaliq S, Inayatullah, Abbas W, Mobeen A, Ullah A, Hussain S Z, Khan W S, Kyriazi M E, Hussain I, Kanaras A G, Rehman A. Surfactin-conjugated silver nanoparticles as an antibacterial and antibiofilm agent against *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2023, 15(37): 43321-43331
- [26] Qamar H, Owais M, Hussain T. Nano-microbial based technology employing polyvalent phage conjugate: A next generation weapon for antimicrobial resistance lurking behind wastewater[J]. *Environmental Research*, 2022, 215: 114079
- [27] 潘顺圆, 陈麒百, 王宏月, 孔祥宇, 庞申雨, 高东阳, 宋军. 耐多药奇异变形杆菌噬菌体生物学特性分析及其对鸡胸肉抑菌作用[J]. 食品科学, 2025, 46(6): 89-97
- Pan S Y, Chen Q B, Wang H Y, Kong X Y, Pang S Y, Gao D Y, Song J. Biological characteristics of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* bacteriophage and its antibacterial effect on chicken breast meat [J]. *Food Science*, 2025, 46(6): 89-97 (in Chinese)
- [28] Peng X M, Yang Z H, Zhan P, Chai Y D, Ning Z H, Hu F P, Dai H L. Construction of core-shell Fe_3O_4 @ MoS_2 activates peroxymonosulfate for the degradation of tetracycline: Structure-activity relationship, performance and mechanisms[J]. *Journal of Alloys and Compounds*, 2023, 961: 170991
- [29] 张彩权. 四氧化三铁磁性复合微球的制备及其在全血基因组DNA自动化提取中的应用[D]. 西安: 西北大学, 2010
- Zhang C Q. Preparation of magnetic Fe_3O_4 composite particles and its application in automated purification of genomic DNA in whole blood[D]. Xi'an: Northwest University, 2010 (in Chinese)
- [30] 周瑜桥. 沙门氏菌噬菌体的微囊化及其抑菌效果研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2022
- Zhou Y Q. Microencapsulation of *Salmonella* phage and its antibacterial effect[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2022 (in Chinese)
- [31] Xu Y J, Yang T, Miao Y, Zhang Q L, Yang M Y, Mao C B. Injectable phage-loaded microparticles effectively release phages to kill methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2024, 16(14): 17232-17241
- [32] 孔祥宇, 杨文静, 庞申雨, 苑庆欣, 潘顺圆, 高东阳, 宋军, 王金涛. 肺炎克雷伯菌噬菌体分离鉴定及抑菌效果研究[J]. 中国农业大学学报, 2024, 29(9): 102-111
- Kong X Y, Yang W J, Pang S Y, Yuan Q X, Pan S Y, Gao D Y, Song J, Wang J T. Isolation, identification and antibacterial effect study of *Klebsiella pneumoniae* phage[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2024, 29(9): 102-111 (in Chinese)
- [33] Wei F, Cui X Y, Wang Z, Dong C C, Li J D, Han X J. Recoverable peroxidase-like Fe_3O_4 @ MoS_2 -Ag nanozyme with enhanced antibacterial ability [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2021, 408: 127240
- [34] Chen B Y, Qiu J H, Feng H X. Synthesis and application of bilayer-surfactant-enveloped Fe_3O_4 nanoparticles: Water-based bilayer-surfactant-enveloped ferrofluids[J]. *International Journal of Minerals Metallurgy and Materials*, 2016, 23(2): 234-240
- [35] Ba-Abbad M M, Benamour A, Ewis D, Mohammad A W, Mahmoudi E. Synthesis of Fe_3O_4 nanoparticles with different shapes through a co-precipitation method and their application[J]. *JOM*, 2022, 74(9): 3531-3539
- [36] 蔡和庆, 韩璐, 杨松松, 薛新玉, 张扣, 孙志成, 刘儒平, 胡望, 危岩. 小粒径 Fe_3O_4 -DMSA-PEI磁性纳米颗粒的制备及其基因负载能力研究[J]. 无机材料学报, 2024, 39(5): 517-524
- Cai H Q, Han L, Yang S S, Xue X Y, Zhang K, Sun Z C, Liu R P, Hu K, Wei Y. Fe_3O_4 -DMSA-PEI magnetic nanoparticles with small particle size: preparation and gene loading[J]. *Journal of Inorganic Materials*, 2024, 39(5): 517-524 (in Chinese)
- [37] Ebadi M, Bullo S, Buskara K, Hussein M Z, Fakurazi S, Pastorin G. Release of a liver anticancer drug, sorafenib from its PVA/LDH- and PEG/LDH-coated iron oxide nanoparticles for drug delivery applications[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 21521
- [38] Wang L K, Lin H, Zhang J, Wang J X. Phage long tail fiber protein-immobilized magnetic nanoparticles for rapid and ultrasensitive detection of *Salmonella*[J]. *Talanta*, 2022, 248: 123627
- [39] Li M Y, Wu J F, Lin D J, Yang J, Jiao N D, Wang Y C, Liu L Q. A diatom-based biohybrid microrobot with a high drug-loading capacity and pH-sensitive drug release for target therapy[J]. *Acta Biomaterialia*, 2022, 154: 443-453
- [40] Liana A E, Marquis C P, Gunawan C, Gooding J J, Amal R. T4 bacteriophage conjugated magnetic particles for *E. coli* capturing: Influence of bacteriophage loading, temperature and tryptone[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2017, 151: 47-57
- [41] Ben-Haim A E, Shalev N, Amalraj A J J, Zelinger E, Mani K A, Belausov E, Shoval I, Nativ-Roth E, Maria R, Atkins A, Sadashiva R, Koltai H, Mechrez G. Nanocarriers for cancer-targeted delivery based on pickering emulsions stabilized by casein nanoparticles[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2025, 298: 140822
- [42] Zheltonozhskaya T, Akopova O, Dąbrowska I, Permyakova N, Klepko V & Klymchuk, D. Hybrid nanocarriers with different densities of silver

- nanoparticles formation features and antimicrobial properties[J]. *Scientific Reports*, 2025, 15: 6757
- [43] Yang Y N, Zhang M, Song H, Yu C Z. Silica-based nanoparticles for biomedical applications: From nanocarriers to biomodulators[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2020, 53(8): 1545-1556
- [44] Nie C Y, Hou Y H, Liu F Y, Dong Q Q, Li Z M, Han P, Tong M P. Efficient peroxymonosulfate activation by magnetic $\text{MoS}_2@\text{Fe}_3\text{O}_4$ for rapid degradation of free DNA bases and antibiotic resistance genes[J]. *Water Research*, 2023, 239: 120026

责任编辑: 秦梅



第一作者简介:王培,男,硕士研究生,研究方向为噬菌体防控细菌性疾病研究。2023年9月至今就读于黑龙江八一农垦大学动物科技学院。



通讯作者简介:宋军,博士、副教授、硕士研究生导师,黑龙江省高层次人才。主要从事动物性食品安全及人兽共患细菌性疾病防控相关研究。主持国家自然科学基金青年基金、黑龙江省自然科学基金等国家级、省级科研项目13项,参与国家自然科学基金重点项目、面上项目、黑龙江省农垦总局重点科研项目等8项。以第一/通讯作者在 *International Journal of Biological Macromolecules*、*BMC Microbiology*、《中国农业大学学报》、《畜牧兽医学报》、《食品科学》等期刊发表论文30余篇。获黑龙江省科学技术进步奖二等奖一项。现任中国畜牧兽医学学会高级会员、中国噬菌体研究联盟理事、中国指挥与控制学会医工结合专委会委员、中国生物工程学会会员。任 *Applied Microbiology and Biotechnology*、*BMC Veterinary Research*、*Virus Research*、*Aquaculture*、《中国农业大学学报》、《畜牧兽医学报》、《中国组织工程研究》等期刊审稿人。