

## 研究报告

## 一株沙门氏菌裂解性噬菌体的分离鉴定及生物学特性

江艳华 李凤铃 王联珠 翟毓秀 姚琳\*

(中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业部水产品质量安全检测与评价重点实验室 山东 青岛 266071)

**摘要:**【目的】从贝类样品中分离到一株沙门氏菌裂解性噬菌体 SLMP1, 对其进行鉴定及生物学特性分析。【方法】采用双层平板法从贝类样品中分离沙门氏菌噬菌体 SLMP1, 观察噬菌斑特征, 分析 SLMP1 的宿主范围; 利用聚乙二醇 8000 沉淀浓缩 SLMP1 颗粒, 用氯化铯等密度梯度离心纯化; 采用透射电子显微镜观察纯化的 SLMP1 颗粒; 采用酚-氯仿法提取 SLMP1 核酸, 通过核酸酶处理分析核酸类型; 分析 SLMP1 的热稳定性、pH 稳定性、最佳感染复数、一步生长曲线及裂菌效果。【结果】SLMP1 噬菌斑直径约 2–3 mm, 圆形透明、边缘清晰; SLMP1 能裂解肠沙门氏菌肠亚种和鼠伤寒沙门氏菌; SLMP1 头部呈二十面体, 直径约 62 nm, 含非收缩性尾部, 尾长约 110 nm, 属于长尾病毒科; SLMP1 核酸为双链 DNA; SLMP1 在 30–60 °C 稳定, 在 pH 4.0–11.0 稳定, 最佳感染复数为 0.001, 感染宿主菌潜伏期为 10 min、裂解期为 120 min、裂解量为 51; SLMP1 在液体环境中具有良好的裂菌效果。【结论】SLMP1 属 dsDNA 长尾科裂解性噬菌体, 具有沙门氏菌生物抑菌剂的应用潜力。

**关键词:** 沙门氏菌噬菌体, 裂解性噬菌体, 分离鉴定, 生物学特性

## Isolation, identification and biological properties of a lytic phage against *Salmonella*

JIANG Yan-Hua LI Feng-Ling WANG Lian-Zhu ZHAI Yu-Xiu YAO Lin\*

(Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China)

**Abstract:** [Objective] A lytic phage SLMP1 against *Salmonella* was isolated from the shellfish samples and identified, and its biological properties were assayed as well. [Methods] The lytic phage SLMP1 was isolated by the double-layer agar culture method. The phage plaque was observed and its host range was analyzed. Phage particles of SLMP1 were concentrated by precipitation with PEG8000 and purified by CsCl gradient centrifugation. The morphology of SLMP1 was observed by transmission electron microscopy. The genome of SLMP1 was extracted by phenol-chloroform method and the type of nucleic acid was identified with enzyme digestion analysis. The biological parameters including the thermal stability, pH stability, optimal multiplicity of infection (MOI) and the inactivation effects on the growth of *Salmonella* were assayed. [Results] The plaques of SLMP1 were round and transparent and

基金项目: 科技部科技基础性工作专项(No. 2013FY113300); 黄海水产研究所级基本科研业务费(No. 20603022015008)

\*通讯作者: Tel: 86-532-85821813; 信箱: yaolin@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-06-17; 接受日期: 2014-08-15; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-08-19

their sizes were about 2–3  $\mu\text{m}$  in diameter. SLMP1 can lyse *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* and *Salmonella typhimurium*. SLMP1 had an icosahedral head approximately 62 nm in diameter and a long noncontractile tail with 110 nm in length. SLMP1 belongs to family Siphoviridae and is a dsDNA virus. SLMP1 was stable over a wide range of temperature (30–60  $^{\circ}\text{C}$ ) and pH (4.0–11.0). The optimal MOI of SLMP1 was 0.001. One-step growth experiment showed that the latent time and burst time were 10 min and 120 min, respectively, and the burst size was 51. SLMP1 showed a good inactivation effects on the growth of *Salmonella* in broth. **[Conclusion]** SLMP1 is a dsDNA virulent phage and belongs to family Siphoviridae. The results indicated SLMP1 can serve as a promising biocontrol agent against *Salmonella*.

**Keywords:** *Salmonella* phages, Lytic phages, Isolation and identification, Biological properties

沙门氏菌(*Salmonella*)是一类寄生于人类和动物肠道内、生化反应和抗原构造相似的革兰氏阴性杆菌,至今已发现该属细菌有 2 000 多种血清型。部分沙门氏菌如鼠伤寒沙门氏菌、肠沙门氏菌肠炎亚种(又称为猪霍乱沙门氏菌)、肠炎沙门氏菌等是重要的人畜共患病原菌,能引起人类食物中毒,导致肠胃炎,出现恶心、呕吐、腹泻、腹痛、发热等症状。沙门氏菌在环境中广泛存在,家禽、蛋、肉类、水产等是沙门氏菌的主要传播媒介,无论在发达国家还是发展中国家,由沙门氏菌引起的食源性疾病报道频繁。据美国疾病预防控制中心报道,美国平均每年有 42 000 例因感染沙门氏菌中毒的病例<sup>[1]</sup>。而在中国,由沙门氏菌引起的微生物暴发事件仅次于副溶血性弧菌,位居第二,但导致的发病人数最多<sup>[2]</sup>。

噬菌体(Bacteriophage)作为细菌的一种病毒,能够专一性地裂解目标菌。将噬菌体用于致病菌的控制早在噬菌体被发现不久后就开始被提出和应用<sup>[3]</sup>,最近十几年其应用才扩展到食品安全领域。研究表明,噬菌体对动物和人体是安全的<sup>[4-5]</sup>。噬菌体在临床或食品加工过程致病菌的控制方面具有优于抗生素及其他化学保鲜剂的良好应用前景。随着沙门氏菌感染事件的不断增加,对沙门氏菌的控制技术也成为当前的研究热点。噬菌体具有特异性、高效性、安全性及成本低廉等特点,可用于沙门氏菌的抑制和消除。本实验室从贝类样品中筛选到一株裂解性沙门氏菌噬菌体,能裂解肠沙门氏菌肠炎亚种和鼠伤寒沙门氏菌,对其生物学特性进行分

析,为进一步的应用研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

宿主菌为沙门氏菌(*Salmonella enterica* subsp. *enterica*) 1.1859,购自中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC)。其他标准菌株见表 1,分别购自 CGMCC、中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC)、美国典型微生物菌种保藏中心(ATCC)和中国医学微生物菌种保藏管理中心(CMCC)。所有涉及以上宿主菌的相关实验均在生物安全二级实验室中进行。

### 1.2 培养基与试剂

营养肉汤(NB)、营养琼脂(NA)固体培养基,为北京陆桥生物技术有限公司生产;营养琼脂半固体培养基,为 NB 中添加 0.75%琼脂配制而成。

SM 缓冲液:氯化钠 5.8 g,硫酸镁 2.0 g, 1 mol/L Tris-HCl (pH 7.5) 50 mL, 2%明胶 5 mL,加水至 1 L,  $1 \times 10^5$  Pa 高压灭菌 20 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.3 噬菌体的分离纯化

采用双层平板法进行噬菌体的分离纯化。将活化好的宿主菌接种于 NB 培养基中, 36  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养约 4 h 至对数生长早期。从青岛农贸市场采集贝类样品,匀浆后取 10 g 样品加入 90 mL NB 培养基中,同时加入 5 mL 宿主菌悬液, 36  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜,将培养液离心,收集上清液过 0.22  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜,即得到噬菌体原液。

用 SM 缓冲液对噬菌体原液进行适当稀释,取适宜稀释度各 100  $\mu\text{L}$  与 200  $\mu\text{L}$  培养至对数生长期

表 1 噬菌体 SLMP1 的宿主范围 Table 1 Host range of phage SLMP1			
菌株名称 Name of strain	菌株编号 Number of strain	菌株来源 Source of strain	裂解性 Lytic ability
肠沙门氏菌肠亚种 <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	1.1859	CGMCC	++++
肠沙门氏菌肠亚种 <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	10467	CICC	+
鼠伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella typhimurium</i>	10420	CICC	++
鼠伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella typhimurium</i>	50115	CMCC	++++
肠炎沙门氏菌 <i>Salmonella enteritidis</i>	21482	CICC	-
甲型副伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella paratyphi</i> A	21501	CICC	-
乙型副伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella paratyphi</i> B	50094	CMCC	-
大肠埃希氏菌 <i>Escherichia coli</i>	25922	ATCC	-
	21675	CICC	-
	35150	ATCC	-
大肠埃希氏菌 O157 <i>Escherichia coli</i> O157	21530	CICC	-
	25923	ATCC	-
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	1.1861	CGMCC	-
单核细胞增生李斯特氏菌 <i>Listeria monocytogenes</i>	19116	ATCC	-
	51772	ATCC	-
痢疾志贺氏菌 <i>Shigella dysenteriae</i>	1.1869	CGMCC	-
福氏志贺氏菌 <i>Shigella flexneri</i>	1.1868	CGMCC	-
副溶血性弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1.1615	CGMCC	-
	1.1616	CGMCC	-
	1.1997	CGMCC	-

注：++++：极强裂解性；++：弱裂解性；+：极弱裂解性；-：不裂解。  
Note: ++++: Very strong lytic ability; ++: Weak lytic ability; +: Very weak lytic ability; -: No lytic ability.

的宿主菌混合，加入 5 mL NA 半固体琼脂培养基，混匀后倒入预先制备好的 NA 固体琼脂平板上，待凝固后 36 ℃ 培养。观察平板上噬菌斑情况，挑取直径大、生长均匀的单斑于 SM 缓冲液中，适当稀释后按以上分离操作进行纯化，重复 4 次后即得到纯化的噬菌体，命名为 SLMP1。

1.4 噬菌体的宿主范围测定

取 200 μL 培养至对数早期的标准菌株加入营养琼脂半固体培养基中，混匀后倒入预先制备好的 NA 固体琼脂平板上，待凝固且表面干燥后，取

20 μL 增殖至约 10<sup>9</sup> PFU/mL 的噬菌体 SLMP1 滴加至平板表面，待菌液吸收后置 36 ℃ 培养过夜，观察噬菌体对标准菌株的裂解情况。

1.5 噬菌体的分类鉴定

1.5.1 噬菌体颗粒的浓缩：参考萨姆布鲁克《分子克隆实验指南》第 3 版的提取方法<sup>[6]</sup>。以最佳感染复数加入噬菌体液，培养至细菌完全裂解。加 DNase I 和 RNase A 至终浓度为 1 mg/L，室温温育 30 min。按 5.84 g/100 mL 加入 NaCl (终浓度为 1 mol/L)，搅拌使其溶解，冰浴 1 h。4 ℃、8 000 r/min 离心 15 min

去除残留的细菌碎片,收集上清,量取上清体积,加入固体聚乙二醇(PEG 8000)至 10% (质量体积比),慢慢搅拌溶解,冰浴 1 h 以上,使噬菌体沉淀。4 °C、8 000 r/min 离心 30 min,弃尽上清,水分晾干后将沉淀悬于 4 mL SM 溶液中。加入等体积的氯仿抽提噬菌体悬浮液中的 PEG8000 和细胞碎片,温和振荡 30 s,4 °C、5 000×g 离心 15 min 以分离有机相和亲水相,回收含噬菌体颗粒的亲水相。采用 CsCl 平衡梯度等密度离心,收集纯化的噬菌体颗粒透析后备用。

**1.5.2 噬菌体的电镜观察:**取铜网浸入纯化噬菌体悬液中,待其作用 5 min,用滤纸吸去多余的液体,用 2%的磷钨酸染色 5 min,自然干燥后采用透射电镜(JEM-1200EX,日本 JEOL 公司)在 100 kV 下观察。

**1.5.3 噬菌体核酸的提取及鉴定:**参考萨姆布鲁克《分子克隆实验指南》第 3 版的提取方法<sup>[6]</sup>。在纯化的噬菌体颗粒中加入 DNase I 至终浓度为 10 mg/L, RNase A 至终浓度为 5 mg/L,37 °C 温育 1 h,以降解残留的宿主菌来源的 DNA 及 RNA。加入 EDTA (pH 8.0)至终浓度 20 mol/L,灭活 DNase I。加蛋白酶 K 至终浓度 50 mg/L,SDS 至终浓度 0.5%,混匀,56 °C 温育 1 h,然后冷却至室温。用等量平衡酚抽提,离心收集水相,用等量平衡酚:氯仿:异戊醇(25:24:1,体积比)抽提 1 次,收集水相,再用氯仿:异戊醇(24:1,体积比)抽提 1 次,取上层水相用 2 倍体积的无水乙醇沉淀噬菌体核酸,再用 70%乙醇洗涤沉淀 2 次。用 TE 溶解核酸沉淀,-20 °C 保存备用。核酸用 DNase I、RNase A、Mung Bean Nuclease 以及 Hind III 和 Sal I 核酸内切酶进行常规消化,消化产物于 0.8%琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

## 1.6 噬菌体的生物学特性分析

**1.6.1 热稳定性实验:**取效价约  $10^8$  PFU/mL 的噬菌体液 1.0 mL 于无菌 EP 管中,分别于 30、40、50、60、70、80 °C 的水浴中作用 1 h,待作用时间结束后取出并立即置于冰浴中冷却,经过适当稀释后测

定噬菌体的效价。对于效价变化较快的温度,测定该温度下每作用 10 min 后噬菌体的效价。

**1.6.2 pH 稳定性实验:**取效价约  $10^9$  PFU/mL 的噬菌体液 0.1 mL 于无菌 EP 管中,分别加入 0.9 mL pH 不同的液体培养基,36 °C 水浴作用 1 h,取出后进行适当稀释,测定噬菌体的效价。

**1.6.3 最佳感染复数(Multiplicity of infection, MOI)的测定:**MOI 是指初始感染时加入噬菌体的数量与宿主菌数量的比值,也称感染倍数。参考张琳等<sup>[7]</sup>的方法,将宿主菌培养至对数生长前期,调菌液麦氏浓度为 0.5,相当于  $1 \times 10^8$  CFU/mL。按照感染复数分别为 10、1、0.1、0.01、0.001、0.000 1 的比例,加入噬菌体纯培养液和宿主菌,在 36 °C 摇床中 150 r/min 培养 3.5 h 后,12 000 r/min 离心 10 min 收集上清液,测定噬菌体的效价。以产生最高噬菌体效价的 MOI 为最佳感染复数。

**1.6.4 一步生长曲线的测定:**参考张琳等<sup>[7]</sup>的方法,将宿主菌培养至对数生长前期,加入噬菌体及宿主菌使 MOI 为 10,混合后 36 °C 孵育 15 min,然后 12 000 r/min 离心 30 s,弃上清,用 NB 洗涤沉淀菌体 2 次,然后加入 5 mL 的 36 °C 预热 NB 悬浮沉淀并充分混匀,迅速置于 36 °C 振荡培养,同时开始计时,在 0 时刻和每隔 10 min 取样一次,12 000 r/min 离心 30 s,取上清测定噬菌体每一时间段的效价。以感染时间为横坐标,噬菌体的效价为纵坐标,绘制一步生长曲线。

**1.6.5 裂菌实验:**在 NB 中分别制备低浓度(约 100 CFU/mL)、中浓度(约  $1 \times 10^4$  CFU/mL)和高浓度(约  $1 \times 10^8$  CFU/mL)沙门氏菌菌悬液,加入 1/10 体积的噬菌体液至终浓度为  $1 \times 10^8$  PFU/mL,于 4 °C 放置 8、24、48、72 h,36 °C 放置 1、2、4、6、8、24 h,分别取样涂布 NA 固体平板测定宿主菌数量的变化,以未添加噬菌体的各浓度宿主菌为对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 沙门氏菌噬菌体的分离鉴定

**2.1.1 噬菌体的分离及噬菌斑特征:**将经过处理的贝类样品与沙门氏菌共培养后,分离到噬菌体

SLMP1。SLMP1 在双层平板上形成的噬菌斑明显, 在 36 °C 培养至 24 h 后噬菌斑直径约 2–3 mm, 圆形, 中间透明, 边缘清晰, 呈现出裂解性噬菌体的噬菌斑特征(图 1)。

**2.1.2 噬菌体的宿主范围:** 将噬菌体 SLMP1 和不同种属标准菌株作用, 结果发现, 该噬菌体在肠沙门氏菌肠亚种和鼠伤寒沙门氏菌平板上能形成噬菌斑, 说明该噬菌体可以裂解肠沙门氏菌肠亚种和鼠伤寒沙门氏菌, 其中在菌株 CGMCC1.1859 和 CMCC50115 平板上的噬菌斑极其透亮, 表明 SLMP1 对这两株菌具有极强的裂解作用。SLMP1 不能裂解肠炎沙门氏菌、甲型和乙型副伤寒沙门氏菌及其他属细菌(表 1)。

**2.1.3 噬菌体的电镜观察:** 纯化的噬菌体经负染后, 在透射电镜下的形态如图 2 所示。噬菌体 SLMP1 的头部呈二十面体立体结构, 头部直径约 62 nm, 噬菌体含非收缩性尾部, 宽约 8 nm、长约 110 nm。根据 2005 年国际病毒分类委员会第 8 次报告提出的噬菌体分类与命名标准, 该噬菌体符合长尾病毒科(Siphoviridae)特征<sup>[8]</sup>。

**2.1.4 噬菌体核酸类型鉴定:** 如图 3 所示, 噬菌体 SLMP1 的核酸能被 DNase I 完全降解, 经 RNase A 处理后无明显变化, 说明核酸为 DNA。核酸不能被 Mung Bean Nuclease 降解, 说明核酸为双链 DNA。

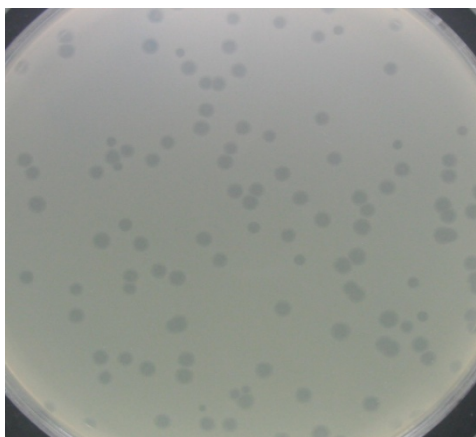


图 1 噬菌体 SLMP1 的噬菌斑形态  
Figure 1 Plaques of phage SLMP1

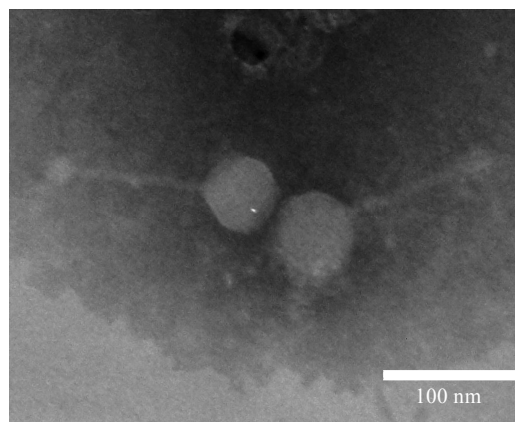


图 2 噬菌体 SLMP1 的电镜照片  
Figure 2 Electron micrograph of phage SLMP1

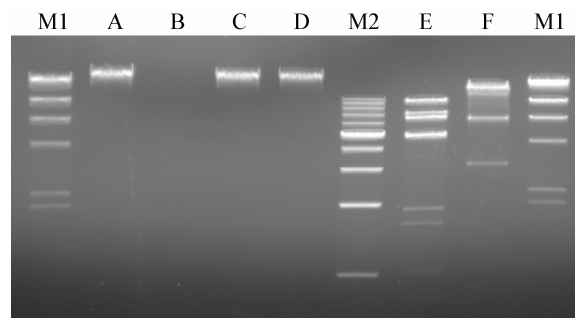


图 3 噬菌体 SLMP1 的核酸类型  
Figure 3 Nucleic acid type of phage SLMP1

M1:  $\lambda$ -Hind III digest 分子量标准; A: 噬菌体核酸; B: 核酸经 DNase I 处理; C: 核酸经 RNase A 处理; D: 核酸经 Mung Bean Nuclease 处理; M2: 1 kb DNA ladder 分子量标准; E: 核酸经 Hind III 内切酶酶切; F: 核酸经 Sal I 内切酶酶切。

Note: M1:  $\lambda$ -Hind III digest DNA marker; A: Nucleic acids of phage; B: Digestion of nucleic acids by DNase I; C: Digestion of nucleic acids by RNase A; D: Digestion of nucleic acids by Mung Bean Nuclease; M2: 1 kb DNA ladder; E: Digestion of nucleic acids by endonuclease Hind III; F: Digestion of nucleic acids by endonuclease Sal I.

噬菌体核酸能被 Hind III 和 Sal I 核酸内切酶酶切, 根据酶切片段大小估算噬菌体的基因组大小约为 34 kb。

## 2.2 沙门氏菌噬菌体生物学特性

**2.2.1 噬菌体的热稳定性:** 如图 4 所示, 噬菌体 SLMP1 在 30–60 °C 作用 1 h 后, 效价基本不变, 表明其活性不受温度影响; 当温度高于 70 °C, 噬菌

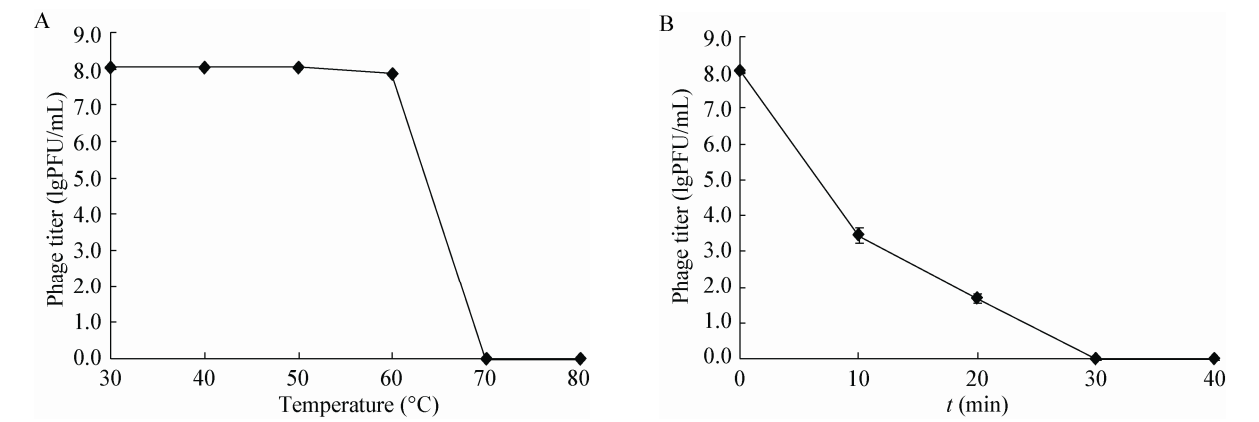


图 4 噬菌体 SLMP1 的热稳定性

Figure 4 Thermal stability of phage SLMP1

注: A: 不同温度下作用 1 h 后噬菌体的效价; B: 70 °C 下噬菌体效价的变化情况。  
Note: A: Phage titer at different temperatures after 1 h; B: Change of phage titer at 70 °C.

体效价迅速下降, 作用 10 min 时, 效价下降 4.5 lgPFU/mL, 作用 30 min 后降至检测水平以下。

**2.2.2 噬菌体的 pH 稳定性:** 如图 5 所示, 噬菌体 SLMP1 在 pH 4.0-11.0 时, 效价与初始效价无显著性差异, 维持良好的裂解活性, 说明该噬菌体对 pH 的适应范围很广; 当 pH 为 3.0 时, 效价降低 4.0 lgPFU/mL, 当 pH 为 12.0 时, 效价降低 5.4 lgPFU/mL; 当 pH≤2.0 和 pH≥13.0 时, 噬菌体基本丧失活性。

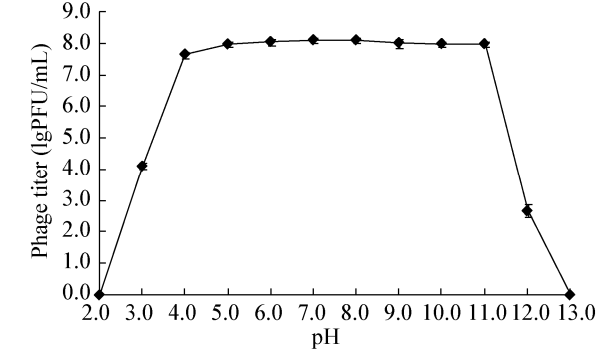


图 5 噬菌体 SLMP1 的最适 pH

Figure 5 Optimal pH of phage SLMP1

表 2 噬菌体 SLMP1 最佳感染复数的测定				
Table 2 Determination of optimal multiplicity of infection (MOI) of phage SLMP1				
序号 Number	细菌数 Number of bacteria	噬菌体数 Number of bacteriophages	感染复数 MOI	噬菌体效价 Phage titers (PFU/mL)
1	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>	10	1.1×10 <sup>10</sup> ±0.2×10 <sup>10</sup>
2	10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>	1	1.7×10 <sup>10</sup> ±0.3×10 <sup>10</sup>
3	10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	0.1	3.2×10 <sup>10</sup> ±0.6×10 <sup>10</sup>
4	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	0.01	3.2×10 <sup>10</sup> ±0.6×10 <sup>10</sup>
5	10 <sup>8</sup>	10 <sup>5</sup>	0.001	5.3×10 <sup>10</sup> ±0.7×10 <sup>10</sup>
6	10 <sup>8</sup>	10 <sup>4</sup>	0.000 1	4.5×10 <sup>10</sup> ±0.3×10 <sup>10</sup>

MOI 为 0.001 时,噬菌体 SLMP1 感染宿主产生子代噬菌体的效价为  $5.3 \times 10^{10}$  PFU/mL,在 6 个感染复数中最高。因此,该噬菌体的最佳感染复数为 0.001。

**2.2.4 噬菌体的一步生长曲线:**如图 6 所示,噬菌体 SLMP1 感染宿主菌后的 10 min 内效价没有明显变化,表明其潜伏期约为 10 min,从 10 min 后效价开始上升,一直持续到第 130 min,之后效价趋于稳定,说明噬菌体裂解期约为 120 min。根据裂解量=裂解末期噬菌体效价/感染初期宿主菌浓度计算得到,噬菌体 SLMP1 的裂解量为  $4.6 \times 10^9 / 9.1 \times 10^7 = 51$ 。

**2.2.5 噬菌体的裂菌效果:**噬菌体在液体培养基中的裂菌效果如图 7、8 所示。在 4 °C 放置一段时间,添加了噬菌体的所有实验组中宿主菌的数量均呈下降趋势,其中低浓度宿主菌在 8 h 完全被裂解;中浓度宿主菌在 8 h 后数量下降了 1.6 lgPFU/mL,

48 h 后完全被裂解;高浓度宿主菌在 72 h 后数量下降了 1.0 lgPFU/mL;所有浓度宿主菌对照组数量没有明显变化。在 36 °C 条件下,低浓度宿主菌在 8 h 完全被噬菌体裂解;中浓度和高浓度宿主菌在 2 h 之内呈下降趋势,在 2 h 时约下降了 2.9 lgPFU/mL,之后逐渐升高,在 6 h 内数量均低于初始值,但 24 h 后数量明显增多,约为对照组的一半。以上结

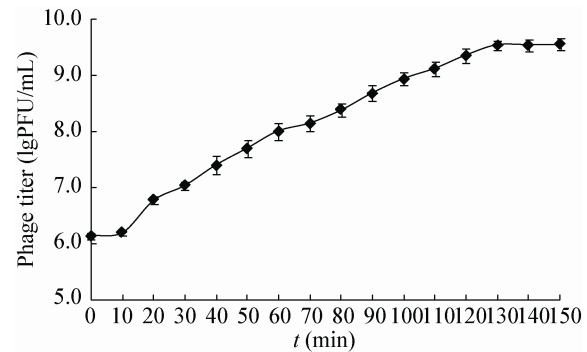


图 6 噬菌体 SLMP1 的一步生长曲线  
Figure 6 One-step growth curve of phage SLMP1

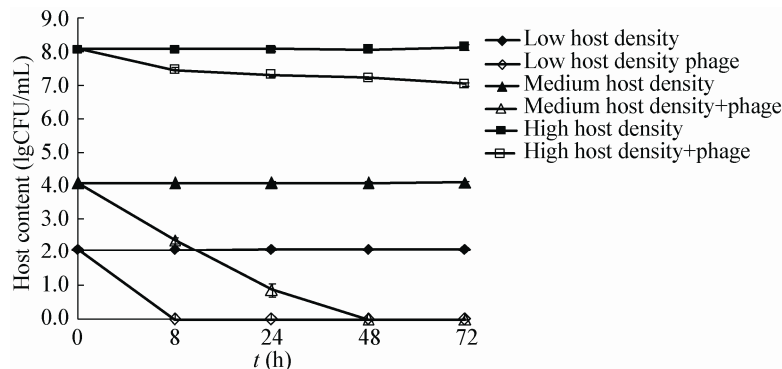


图 7 噬菌体 SLMP1 在 4 °C 下的裂菌效果

Figure 7 Inactivation effects of phage SLMP1 on the growth of Salmonella at 4 °C

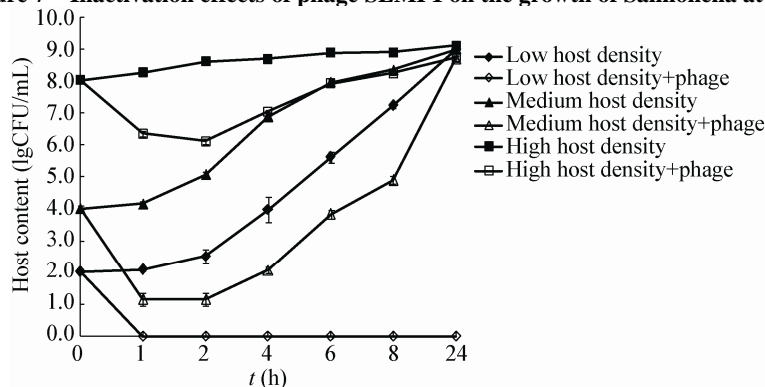


图 8 噬菌体 SLMP1 在 36 °C 下的裂菌效果

Figure 8 Inactivation effects of phage SLMP1 on the growth of Salmonella at 36 °C

果表明,噬菌体 SLMP1 对于低浓度宿主菌有良好的裂解作用,在一定时间内对宿主菌具有抑制作用;当温度越低,宿主菌生长受到抑制时,SLMP1 的裂菌效果越好。

### 3 讨论

噬菌体在自然环境中广泛分布,据估计,噬菌体的丰度约为  $10^{31}$ ,为人类提供了一个丰富的资源库<sup>[9]</sup>。然而,迄今为止,已经被分离和利用的噬菌体十分有限。噬菌体分为温和性噬菌体和裂解性噬菌体,其中温和性噬菌体进入宿主细胞后,其核酸整合在宿主菌染色体上随之同步复制,不引起宿主细胞的裂解;而裂解性噬菌体能够引起宿主菌细胞的裂解而导致细菌死亡。因此,通常将裂解性噬菌体应用于致病菌的防控。本实验从贝类样品中分离到一株沙门氏菌裂解性噬菌体 SLMP1,该噬菌体能裂解肠沙门氏菌肠亚种和鼠伤寒沙门氏菌,不能裂解其他种属细菌。虽然 SLMP1 只能裂解部分种类沙门氏菌,但由于肠沙门氏菌肠亚种和鼠伤寒沙门氏菌是沙门氏菌属中重要的人畜共患病原菌,对这两种致病菌具有杀灭作用,说明该噬菌体具有实际应用价值。

为了将噬菌体 SLMP1 用于沙门氏菌的防控,对该菌株进行了初步鉴定及生物学特性分析。噬菌体 SLMP1 头部呈二十面体立体结构,含非收缩性尾部,核酸为双链 DNA,属于长尾病毒科,与已报道的沙门氏菌噬菌体大小有所不同<sup>[10-13]</sup>。该噬菌体在 60 °C 以下稳定, pH 为 4.0-11.0 时稳定,说明该噬菌体具有较宽的温度和酸碱度适用范围,比李萌等报道的<sup>[11]</sup>沙门氏菌噬菌体(50 °C 以下稳定, pH 5.0-10.0 维持较高活性)、Ahiwale 等<sup>[13]</sup>报道的乙型副伤寒沙门氏菌噬菌体(50 °C 以下、pH 4.0-9.0 稳定)适用范围更广。SLMP1 最佳感染复数为 0.001,潜伏期短,为 10 min,能实现噬菌体对宿主菌的快速感染及裂解;对宿主菌裂解量为 51,高于包红朵等<sup>[10]</sup>报道的肠炎沙门氏菌噬菌体裂解量(22)和李萌等<sup>[11]</sup>报道的沙门氏菌噬菌体裂解量(20)。

利用噬菌体控制沙门氏菌已有报道,这些研究结果显示噬菌体可降低禽畜类及其他食品中沙门氏菌的数量<sup>[14-15]</sup>。Bigwood 等<sup>[14]</sup>用沙门氏菌人工污染生的和熟的牛肉,然后将噬菌体 P7 接种于污染的牛肉上,分别于 5 °C 和 24 °C 下培养 24 h 后,沙门氏菌均有一定程度的减少,感染复数越高,细菌的减少量越多。Spricigo 等<sup>[15]</sup>报道的 3 种沙门氏菌噬菌体混合物可以降低猪皮、鸡胸肉、鸡蛋和包装生菜中鼠伤寒沙门氏菌和肠炎沙门氏菌的数量。为将噬菌体 SLMP1 应用于食品中沙门氏菌的防控奠定基础,本论文初步探讨了 SLMP1 在液体培养基中的裂菌作用。结果显示,宿主菌在低温条件下,噬菌体能够逐渐降低宿主菌的数量;而在较高的培养温度下,在一定的培养时间内(2 h),噬菌体能降低宿主菌的数量,之后可能由于残留的宿主菌繁殖速度比噬菌体的裂解速度快,导致数量逐渐升高,但均低于对照组。实验结果表明,宿主菌浓度越低或 MOI 值越高,裂菌效果越好,这也与 Bigwood 等<sup>[14]</sup>的结论一致;当宿主菌在受到抑制的条件下,裂菌效果较好,提示该噬菌体在应用时可以通过调节温度或与其他抑菌剂结合使用,从而达到最佳的杀菌效果。以上结果表明,SLMP1 是一株具有良好应用前景的菌株,可以作为一种生物抑菌剂用于沙门氏菌的防控。

### 参考文献

- [1] CDC. How common is Salmonellosis[N/OL]. <http://www.cdc.gov/salmonella/general/index.html>, 2014
- [2] Mao XD, Hu JF, Liu XM. Estimation on disease burden of foodborne non-typhoid salmonellosis in China using literature review method[J]. Chinese Journal of Disease Control and Prevention, 2011, 15(7): 622-625 (in Chinese)  
毛雪丹, 胡俊峰, 刘秀梅. 用文献综述法估计我国食源性非伤寒沙门氏菌疾病负担[J]. 中华疾病控制杂志, 2011, 15(7): 622-625
- [3] Summers WC. Cholera and plague in India: the bacteriophage inquiry of 1927-1936[J]. Journal of the History of Medicine and Allied Sciences, 1993, 48(3): 275-301
- [4] Carlton RM, Noordman WH, Biswas B, et al. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analysis, oral toxicity study, and application[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2005, 43(3): 301-312
- [5] Bruttin A, Brüssow H. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy[J].

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49(7): 2874-2878
- [6] Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: A Laboratory Manual[M]. Translated by Huang PT, et al. 3rd Edition. Beijing: Science Press, 2002: 185-197  
萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 等译. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002: 185-197
- [7] Zhang L, Le S, Lu SG, et al. Isolation and identification a novel *Pseudomonas aeruginosa* phage PaP4[J]. Microbiology China, 2013, 40(4): 609-616 (in Chinese)  
张琳, 乐率, 卢曙光, 等. 铜绿假单胞菌噬菌体 PaP4的分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2013, 40(4): 609-616
- [8] Feng SZ, Liu J, Sun Y. New classification and nomenclature of bacterial virus—phage[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2007, 27(4): 604-608 (in Chinese)  
冯书章, 刘军, 孙洋. 细菌的病毒——噬菌体最新分类与命名[J]. 中国兽医学报, 2007, 27(4): 604-608
- [9] Wommack KE, Colwell RR. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000, 64(1): 69-114
- [10] Bao HD, Zhang H, Wang R. Biological properties of a *Salmonella enteritidis* lytic phage with wide host range[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2011, 27(5): 1117-1121 (in Chinese)
- 包红朵, 张辉, 王冉. 宽噬菌谱肠炎沙门氏菌噬菌体的生物学特性[J]. 江苏农业学报, 2011, 27(5): 1117-1121
- [11] Li M, Han F, Lin H, et al. Isolation, identification and physiological characterization of lytic phage against bacterium *Salmonella* sp.[J]. Fisheries Science, 2013, 32(9): 531-535  
李萌, 韩峰, 林洪, 等. 一株沙门氏菌烈性噬菌体的分离纯化与生理特性研究[J]. 水产科学, 2013, 32(9): 531-535
- [12] Zou SS, Xu JY, Weng YB, et al. Isolation and biological characteristics of a phage against *Salmonella enteritidis* from sawage water[J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2014, 41(3): 119-123 (in Chinese)  
邹尚书, 许家园, 翁亚彪, 等. 1株肠炎沙门氏菌噬菌体的污水分离及生物学特性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(3): 119-123
- [13] Ahiwale SS, Bankar AV, Tagunde SN, et al. Isolation and characterization of a rare waterborne lytic phage of *Salmonella enteric* serovar Paratyphi B[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2013, 59(5): 318-323
- [14] Bigwood T, Hudson JA, Billington C, et al. Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat[J]. Food Microbiology, 2008, 25(2): 400-406
- [15] Spricigo DA, Bardina C, Cprtés P, et al. Use of a bacteriophage cocktail to control *Salmonella* in food and the food industry[J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 165: 169-174

## 稿件书写规范

### 专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: (1) 我刊要求作者投稿时在正文前写上主要作者的简介, 并指出自己的工作(已发表的文章)在综述中的体现, 同时请在稿件中用不同颜色标出来。(2) 在专论与综述中引用的文献应该主要是近5年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。