

噬菌体在食品安全中的应用和潜在风险

刘心妍

(天津开发区职业技术学院 天津 300457)

摘要: 近年来, 经食品传播的感染性疾病时有发生, 有的国家甚至有增多趋势。噬菌体在早期被用来治疗细菌性疾病, 现在人们已经意识到噬菌体在食品工业上的应用前景也非常广阔。已经有人提出把它作为食品添加剂使用以杀灭食源性致病菌。而噬菌体本身的特性也确实说明, 噬菌体是保障食品安全的理想工具。因为噬菌体不仅安全可靠, 而且有严格的宿主特异性, 在杀灭食源性致病菌的同时不会杀死生产中的发酵菌株。噬菌体可以用在食品生产中的各个环节以杀灭或抑制病原菌, 比如原料采集、生产、储藏等环节。探讨噬菌体杀灭食源性致病菌的应用前景和潜在风险。

关键词: 噬菌体, 食源性致病菌, 食品安全, 储藏

The application and potential risks of bacteriophages for the food safety

LIU Xin-Yan

(Tianjin Economic-Technological Development Area Polytechnic, Tianjin 300457, China)

Abstract: In recent years, foodborne disease often occurred, even increased in some countries. Bacteriophages were originally used to treat bacterial diseases. Now people have realized that the application prospects of bacteriophages in the food industry are very wide. Bacteriophages have been used as the food additive to control food pathogens. The characteristics of bacteriophages illustrate that bacteriophages are the ideal tool to ensure food safety, because bacteriophages not only are safe and reliable, but also have strict host specificity which means bacteriophages don't kill the fermentation strains in the process of controlling foodborne pathogens. Bacteriophages can be used in all aspects of food production to kill or inhibit pathogenic bacteria, such as raw materials collection, production, storage and others. In this review, we discuss the prospects and potential risks of bacteriophages in controlling foodborne pathogens.

Keywords: Bacteriophage, Foodborne pathogen, Food safety, Storage

在当今食品工业中, 杀灭食品中病原菌的技术并不完全可靠, 接连不断增加的由病原菌引起的食源性疾病证实了这点^[1]。1996年, 日本大肠埃希氏菌大规模流行, 食物中毒者达9 451人, 死亡12人。2010年8月, 美国食物中毒人数超过1 000人, 经调查发现是由于食用的鸡蛋被沙门氏菌污染所致。这些都要求人们更加关注由食源性致病菌引起的食品安全问题。

食品生产中, 控制食源性致病菌的方法分为物理方法和化学方法。这些方法并不尽如人意, 例如在物理方法处理后(蒸汽、干热及紫外线照射), 食品的感官品质会受到影响; 而对于化学方法(杀菌剂、防腐剂)处理过的食品, 随着消费者对自身健康的逐步重视, 开始追求绿色食品, 往往对其产生排斥心理。另外, 一些抑制食源性致病菌的方法不能直接用于新鲜水果蔬菜及即食食品中。所以需要人们研究新的方法来杀灭或抑制食源性致病菌, 从而保证食品安全。近年来的研究表明, 噬菌体可以作为食品中的天然抗菌剂来抑制有害细菌^[2-4]。本综述意在探讨噬菌体控制食源性致病菌的应用前景及潜在风险。

1 噬菌体的抗菌活性

噬菌体(Bacteriophage, phage)是能够感染细菌、放线菌或螺旋体等微生物的病毒的总称。它不能感染哺乳动物的细胞, 仅能侵染特异的宿主菌。噬菌体有严格的宿主特异性, 即一种噬菌体往往只能感染和裂解某种细菌, 甚至只裂解种内的某些菌株^[2]。从生活周期上讲, 噬菌体可分为烈性噬菌体和温和噬菌体两种类型。烈性噬菌体侵入宿主菌后, 随即可以引起宿主菌的裂解。温和噬菌体感染宿主菌后, 将其基因组整合到宿主染色体上, 并随宿主DNA的复制而进行同步复制, 因而一般不引起宿主细胞裂解^[5]。

2 噬菌体在食品安全中的应用

食源性致病菌是影响食品安全性的重要因素, 它们可能存在于原辅料采集、生产、加工、储藏等

环节, 从而对食品造成污染, 引起食品腐败变质, 或可通过食品传播疾病, 最终影响食品安全性。噬菌体作为一种抗菌剂, 可以通过杀灭食源性致病菌来保证食品安全, 具体应用在以下几个方面。

2.1 原料采集环节杀灭病原菌

宰杀动物时, 为了防止有害细菌随着血液、粪便的流出污染尸体, 可以在屠宰后用噬菌体对动物尸体进行消毒, 从而减少致病菌污染动物尸体的情况发生; 也可以在原料采集(挤奶或屠宰)前, 给动物口服噬菌体以杀灭其体内病原菌。比如 *Escherichia coli* O157:H7 一直持续威胁着公共健康, 毒力很强。Raya 等人给羊口服噬菌体 CEV1 后, 2 d 内羊肠内 *E. coli* O157:H7 的数量明显减少^[6]。

2.2 生产或加工环节对设备等进行消毒

噬菌体可以用来净化生产环境, 消毒工作表面, 清洁地面、墙壁、加工设备等。例如被阪崎肠杆菌污染的不锈钢盘表面在用噬菌体混合物处理后, 没有再发现该菌, 而未被处理的对照组仍有该菌存活甚至可轻微生长^[7]。又如用噬菌体混合物 BEC8 处理 3 种不同材质工作表面上的 *E. coli* O157:H7, 室温 1 h 内噬菌体就能起到有效的杀菌效果^[8]。

2.3 延长食品储藏期

噬菌体作为天然防腐剂可以延长食品的保质期。阪崎肠杆菌能引起严重的新生儿脑膜炎, 婴儿配方奶粉是其主要感染渠道。这主要是由于生产婴儿配方奶粉时不能做到完全无菌, 所以当该奶粉没有被及时食用并在室温存放时, 少量的致病菌就会大量繁殖, 从而对婴幼儿健康构成潜在危险。为了可以安全储存婴儿配方奶粉, 雀巢技术公司开发了对阪崎肠杆菌具有实质裂解潜力的无毒噬菌体^[7], 以有效防止阪崎肠杆菌污染。

2.4 消毒新鲜的水果蔬菜

噬菌体作为抗菌剂还可以对新鲜的水果蔬菜进行消毒。比如沙门氏菌是引起食物中毒的主要原因。在实验中用噬菌体混合物对已感染沙门氏菌的哈密瓜和苹果进行消毒, 噬菌体处理后, 哈密瓜上的沙门氏菌明显减少。然而, 苹果片上的沙门氏菌似乎未受噬菌体影响, 这可能是苹果片上 pH 较低导致

噬菌体数量快速减少造成的^[9]。

2.5 检测食源性致病菌

噬菌体有严格的宿主特异性,因此是用来检测宿主微生物的理想工具。在食品安全中,可用于检测食源性致病菌,例如噬菌体扩增法检测技术。该方法是在待检测食品中加入某种噬菌体,若有其宿主致病菌存在,则噬菌体会迅速感染该菌。之后用高度特异的杀病毒剂清除所有未感染的噬菌体,进入宿主细胞的噬菌体则继续扩增,进而裂解细胞,释放噬菌体。所释放的噬菌体会感染随即添加的敏感细胞,最终在培养皿中出现噬菌斑。噬菌斑的出现表明食品中存在食源性致病菌。其他检测食源性致病菌的方法还有荧光染料标记法、检测报告基因法等^[10]。

3 抵抗食源性致病菌的噬菌体

已经有公司研制生产噬菌体产品。EBI 食品安全公司就开发出一种专门对付李斯特菌的噬菌体制剂 Listex_P100, 可用来有效地避免肉类及奶酪类产品中的李斯特菌污染^[11]。Listex_P100 也是世界上第一个通过美国食品药品监督管理局(FDA)的 GRAS (Generally regarded as safe, 安全可靠)认证的噬菌体产品。更多有效抵抗食源性致病菌的噬菌体见表 1。

表 1 几种有效抵抗食源性致病菌的噬菌体
Table 1 Several bacteriophages resisting food-borne pathogens efficiently

食源性致病菌 Foodborne pathogens	噬菌体 Bacteriophage	文献 Reference
阪崎肠杆菌 <i>Enterobacter sakazakii</i>	FSM-噬菌体 67/33/1、 FSM-噬菌体 73/261 等	[7]
大肠埃希氏菌 O157:H7 <i>E. coli</i> O157:H7	噬菌体 CEV1	[6]
伤寒沙门菌 <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	噬菌体 P7	[12]
单核细胞增生性李斯特菌 <i>Listeria monocytogenes</i>	Listex_P100	[11,13]
弯曲杆菌 <i>Campylobacter</i>	噬菌体 F2	[14]

4 噬菌体应用在食品安全中的优势

4.1 安全可靠

4.1.1 自然界中广泛存在: 不论在数量还是多样性上,我们的环境中都有丰富的噬菌体。例如,洁净水域中每毫升有 10^9 噬菌体,海水表面每毫升有 10^7 噬菌体,陆地生态系统中有大量的噬菌体^[15]。食品上也有大量的噬菌体。研究人员从泡菜中分离出了 26 种不同的噬菌体^[16]。*E. coli* 噬菌体已经从新鲜的鸡肉、猪肉、牛肉、蘑菇、生蔬菜以及熟食中找到,每克食品中有高达 10^4 的噬菌体存在^[17]。很明显,我们每天都吃进去大量的噬菌体。

4.1.2 对肠道菌群无害: 人们用 *E. coli* 噬菌体做了安全性研究,给小鼠及人类志愿者喂食大剂量该噬菌体,结果显示噬菌体对其没有明显影响^[18-19]。尽管这些噬菌体能够在体外感染 *E. coli* 菌株,但它们好像没有影响到动物或人类志愿者消化道内的微生物菌群。可以推测 *E. coli* 菌群可能生活在噬菌体不容易到达的位置,也有可能是机体的免疫系统能清除体内的噬菌体,使之减少到不能杀灭细菌的水平^[20]。

4.1.3 有长期使用历史: 自从 1919 年 Felix d'Herelle 第一次采用噬菌体完成了对痢疾的治疗后,东欧和前苏联就一直研究和生产用于治疗疾病的噬菌体制剂^[21]。尽管噬菌体的给药途径大部分是口服和表面擦药,但也有肌肉注射、静脉注射甚至是颈动脉注射^[22],并没有关于噬菌体不良副作用的报道。

所以我们是否应该担心吃到以噬菌体作为食品添加剂的食物?通过以上证据我们可以得出明显的答案,噬菌体是“可吃的”。

4.2 宿主特异性

由于噬菌体有严格的宿主特异性,所以它在溶解宿主细菌细胞的同时不会杀死食品生产中的发酵菌株。故在使用噬菌体对生产设备等进行消毒时,无需担心影响发酵生产。另外,噬菌体仅仅侵袭及溶解细菌细胞,不会杀死哺乳类动物细胞。

4.3 增殖能力强

在适当的条件下,一个裂解周期内,每个噬菌

体就会产生 200 个子代噬菌体, 即噬菌体将以 200ⁿ 进行增殖。由于噬菌体能不断地复制增殖, 从而裂解大量的宿主细胞, 所以可以迅速地杀死食源性致病菌。

5 噬菌体的潜在风险

5.1 噬菌体的溶源现象

不是所有的噬菌体都适合用于杀死细菌病原体。因为温和噬菌体并不杀死宿主细菌, 而是把它们的基因组整合到宿主染色体上(溶源现象), 使宿主细菌能抵抗其他噬菌体的溶菌作用^[5]; 另一方面整合的基因组可能改变宿主的表型, 甚至增强宿主的致病性或毒力。比如霍乱弧菌产生的霍乱毒素 CTX, 是由整合的噬菌体 CTX 的 *ctxA* 和 *ctxB* 两个基因所编码的^[23]; 又如由 *E. coli* 产生的志贺样毒素, 是由整合到其基因组中的温和噬菌体基因 *stx1* 和 *stx2* 编码的^[24]。

5.2 噬菌体的转导作用

转导是通过噬菌体为媒介, 把供体细胞的小片段 DNA 携带到受体细胞中, 通过交换与整合, 使后者获得前者部分遗传性状的现象, 这个过程中很有可能把新的基因提供给受体细胞^[25]。如果噬菌体在致病菌(供体细胞)中增殖, 之后该噬菌体包含致病基因, 就很可能把受体细胞转变成致病菌^[26]。所以如果我们不得不使用致病性宿主来繁殖噬菌体, 我们应该用不能转导的噬菌体。研究表明, 在李斯特菌和梭状芽胞杆菌中, 有明确固定基因组末端的噬菌体是不能进行转导的, 而具有末端冗余并有环状排列基因次序的噬菌体是能够进行转导的^[27-28]。

5.3 出现抗噬菌体菌株

由于自发突变, 细菌中会产生抗噬菌体的菌株。例如 Park S. C. 等人在对 *Pseudomonas plecoglossicida* 的研究中就发现了抗噬菌体菌株^[29]。但由于细菌突变率为 10⁻⁶, 这样的突变率不会产生很多抗噬菌体菌株, 对噬菌体杀菌效果不会产生显著的影响。不过, 如果长期多次使用该噬菌体, 由于自然选择的结果, 只有抗噬菌体菌株存活下来并不断增殖, 这时噬菌体就很难对该细菌进行杀灭。

6 总结

人们起初用噬菌体来治疗细菌性疾病, 现在开始把噬菌体应用在食品工业上, 已经筛选出可以用来杀灭阪崎肠杆菌、大肠埃希氏菌 O157:H7、伤寒沙门菌等食源性致病菌的噬菌体。另外, 噬菌体制剂 Listex_P100 成为世界上第一个通过美国食品药品监督管理局 GRAS 认证的产品, 在欧盟, Listex_P100 也被批准作为食品生产中的加工助剂使用。这些都预示着噬菌体在食品安全中的应用前景非常广阔。

但是我们还应注意到噬菌体的潜在风险, 比如噬菌体的溶源现象、转导作用可能会改变宿主的表型, 甚至增强宿主的致病性或毒力。所以在研究及使用噬菌体时, 建议避开温和噬菌体以及能进行转导作用的噬菌体。

对于有些食品, 噬菌体不能对细菌起到完全杀灭或抑制作用^[9], 另外细菌自发突变可能会出现抗噬菌体菌株, 所以建议把噬菌体制剂与其他防腐方法结合使用, 这样才能更有效地抑制病原菌, 从而保障食品的安全性和稳定性。

参考文献

- [1] DuPont HL. The growing threat of foodborne bacterial enteropathogens of animal origin[J]. Clin Infect Dis, 2007, 45(10): 1353-1361.
- [2] Hagens S, Loessner MJ. Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations[J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2010, 11(1): 58-68.
- [3] García P, Martínez B, Obeso JM, et al. Bacteriophages and their application in food safety[J]. Letters in Applied Microbiology, 2008, 47(6): 479-485.
- [4] Atterbury RJ. Bacteriophage biocontrol in animals and meat products[J]. Microbial Biotechnology, 2009, 2(6): 601-612.
- [5] 周德庆. 微生物学教程[M]. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 1993: 75-81.
- [6] Raya RR, Varey P, Oot RA, et al. Isolation and characterization of a new T-even bacteriophage, CEV1, and determination of its potential to reduce *Escherichia coli* O157:H7 levels in sheep[J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(9): 6405-6410.

- [7] P·布卢维尔, C·布瓦森-德拉波特, H·约斯腾, 等. 分离的噬菌体和它们作为食品中消毒剂或用于工厂环境卫生的用途: 瑞士, CN1890366 [P]. 2007-01-03.
- [8] Viazis S, Akhtar M, Feirtag J, et al. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 viability on hard surfaces by treatment with a bacteriophage mixture[J]. *Int J Food Microbiol*, 2010, 145(1): 37–42.
- [9] Leverentz B, Conway WS, Alavidze Z, et al. Examination of bacteriophage as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: a model study[J]. *J Food Prot*, 2001, 64(8): 1116–1121.
- [10] Rees CED, Dodd CER. Phage for rapid detection and control of bacterial pathogens in food[J]. *Adv Appl Microbiol*, 2006, 59: 159–186.
- [11] Carlton RM, Noordman WH, Biswas B, et al. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application[J]. *Regul Toxicol Pharm*, 2005, 43(3): 301–312.
- [12] Bigwood T, Hudson JA, Billington C, et al. Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat[J]. *Food Microbiol*, 2008, 25(2): 400–406.
- [13] Soni KA, Nannapaneni R. Bacteriophage significantly reduces *Listeria monocytogenes* on raw salmon fillet tissue[J]. *J Food Prot*, 2010, 73(1): 32–38.
- [14] Atterbury RJ, Connerton PL, Dodd CER, et al. Application of host-specific bacteriophages to the surface of chicken skin leads to a reduction in recovery of *Campylobacter jejuni*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(10): 6302–6306.
- [15] Rohwer F, Edwards R. The phage proteomic tree: a genomebased taxonomy for phage[J]. *J Bacteriol*, 2002, 184(6): 4529–4535.
- [16] Lu Z, Breidt F, Plengvidhya V, et al. Bacteriophage ecology in commercial sauerkraut fermentations[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(6): 3192–3202.
- [17] Allwood PB, Malik YS, Maherchandani S, et al. Occurrence of *Escherichia coli*, noroviruses, and F-specific coliphages in fresh market-ready produce[J]. *J Food Prot*, 2004, 67(11): 2387–2390.
- [18] Chibani-Chennoufi S, Sidoti J, Bruttin A, et al. *In vitro* and *in vivo* bacteriolytic activities of *Escherichia coli* phages: implications for phage therapy[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(7): 2558–2569.
- [19] Bruttin A, Brüßow H. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(7): 2874–2878.
- [20] Merrill CR, Biswas B, Cariton R, et al. Long-circulating bacteriophages as antibacterial agents[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(8): 3188–3192.
- [21] Kutter EM, De Vos D, Gvasalia G, et al. Phage therapy in clinical practice: treatment of human infection[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2010, 11(1): 69–86.
- [22] Ackermann HW, DuBow MS. Viruses of Prokaryotes I: General Properties of Bacteriophages, ch. 7. Practical Applications of Bacteriophages[M]. Boca Raton: CRC Press, 1987: 143–172.
- [23] Waldor MK, Mekalanos JJ. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin[J]. *Science*, 1996, 272(5270): 1910–1914.
- [24] O'Brien AD, Newland JW, Miller SF, et al. Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea[J]. *Science*, 1984, 226(4675): 694–696.
- [25] Ikeda H, Tomizawa JI. Transducing fragments in generalized transduction by phage P1: II. Association of DNA and protein in the fragments[J]. *J Mol Biol*, 1965, 14(1): 110–119.
- [26] Cheetham BF, Katz ME. A role for bacteriophages in the evolution and transfer of bacterial virulence determinants[J]. *Mol Microbiol*, 1995, 18(2): 201–208.
- [27] Hodgson DA. Generalized transduction of serotype 1/2 and serotype 4b strains of *Listeria monocytogenes*[J]. *Mol Microbiol*, 2000, 35(2): 312–323.
- [28] Klumpp J, Dorscht J, Lurz R, et al. The terminally redundant, nonpermuted genome of *Listeria bacteriophage* A511: a model for the SPO1-like myoviruses of gram-positive bacteria[J]. *J Bacteriol*, 2008, 190(17): 5753–5765.
- [29] Park SC, Shimamura I, Fukunaga M. Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(4): 1416–1422.