



专论与综述

噬菌体在食品工业中的应用与危害防控

秦秀娟^{1,2} 雍彬¹ 马沁沁^{*1}

1 四川师范大学生命科学学院 四川 成都 610101

2 中国科学院深圳先进技术研究院 深圳合成生物学创新研究院 中国科学院定量工程生物学重点实验室
广东 深圳 518055

摘要: 近年来,噬菌体由于其特异性侵染细菌的特性,在食品加工及保藏过程中有害微生物的控制和检测方面展现出良好的应用前景。例如在食品表面喷洒噬菌体或将噬菌体与食品包装材料结合,对食源性致病菌及腐败菌加以控制,以及利用基因工程手段构建报告噬菌体对食源性致病菌进行快速检测等。然而,噬菌体也是危害食品发酵的重要因素之一,轻则减产,重则引起整个发酵过程失败,造成巨大的经济损失。目前主要通过噬菌体消毒及灭活、发酵菌种变换等方式防止噬菌体污染。本文综述了食品工业中噬菌体应用及危害的研究现状,以期拓宽噬菌体在食品工业中的应用途径及开发噬菌体污染防治的新技术提供理论依据。

关键词: 噬菌体, 食源性致病菌, 生物控制, 污染

The application and control of bacteriophage in food industry

QIN Xiujuan^{1,2} YONG Bin¹ MA Qinqin^{*1}

1 College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu, Sichuan 610101, China

2 Key Laboratory of Quantitative Engineering Biology, Chinese Academy of Sciences; Shenzhen Institute of Synthetic Biology, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen, Guangdong 518055, China

Abstract: In recent years, phages have shown promising applications in the control and detection of harmful microorganisms in food processing and preservation due to their specificity in infecting bacteria. For example, phages can be sprayed on food surfaces or combined with food packaging materials to control food-borne pathogenic bacteria and spoilage bacteria, and genetic engineering can be used to construct reporter phages for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. However, phage is also one of the most important detrimental factors in food fermentation. Phage contamination often leads to the failure of the whole fermentation process, causing huge economic loss. At present, phage contamination is mainly prevented by the methods of disinfection and inactivation, fermentation bacterial strain change, etc. This paper reviews the current research status of phage application and hazards in food industry to provide

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31800158); Science and Technology Project of Sichuan Province (2020YJ0380); Open Foundation of Key Laboratory of Antibiotic Research and Reevaluation of Sichuan Province (ARRLKF20-08)

***Corresponding author:** Tel: 86-28-84480656; E-mail: qqma@sicnu.edu.cn

Received: 31-05-2021; **Accepted:** 19-07-2021; **Published online:** 09-08-2021

基金项目: 国家自然科学基金(31800158); 四川省科技计划项目(2020YJ0380); 抗生素研究与再评价四川省重点实验室开放课题(ARRLKF20-08)

***通信作者:** Tel: 028-84480656; E-mail: qqma@sicnu.edu.cn

收稿日期: 2021-05-31; **接受日期:** 2021-07-19; **网络首发日期:** 2021-08-09

theoretical basis for broadening the application of phage in food industry and developing new technologies for phage contamination prevention.

Keywords: bacteriophages, foodborne pathogen, biocontrol, contamination

噬菌体又称为细菌病毒, 是专性感染细菌的一类病毒, 广泛存在于所有生态系统当中, 是地球上最多样且丰富的病毒实体, 据估计, 其数量达到 10^{31} [1]。一般来说, 只要有细菌存在的地方, 往往都能找到与之相对应的噬菌体。噬菌体的结构较为简单, 主要由核酸和蛋白质外壳组成, 噬菌体颗粒长度变化范围通常在 24–200 nm 之间 [2]。

噬菌体能特异性地侵染宿主细菌, 吸附在宿主细菌的不同位置上进行识别, 然后通过溶解基因编码的特异性蛋白溶解宿主菌, 注入自己的 DNA 或者 RNA, 并在细菌中利用细菌自身机制进行遗传物质的复制和遗传信息的表达。烈性噬菌体以裂解的形式使宿主死亡释放出子代噬菌体达到快速繁衍的目的, 产生传播和感染其他细胞的噬菌体子代的数量取决于噬菌体的类型 [3]。温和噬菌体能在侵染细菌之后将自身的遗传物质整合到宿主细菌基因组中, 从而使自身的遗传物质随着细菌的繁殖实现共同复制, 直到被诱导进入裂解周期 [4]。

近年来, 细菌耐药性问题日趋严重, 作为耐药菌的最后一道防线——噬菌体在细菌感染治疗领域独辟蹊径, 获得重要进展, 引起了科学家们的广泛关注。食品加工过程中有多个环节均存在着细菌的污染, 因此噬菌体也被用于食品工业的各个领域, 例如食品加工、食品检测及食品保藏等。然而发酵过程中的噬菌体污染常导致发酵失败、发酵产物产量降低, 造成巨大的经济损失。本文就噬菌体对食品工业的影响进行综述。

1 噬菌体在食品工业中的应用

食源性疾病是人体摄入致病微生物、毒素或化学物质污染的食品而引起感染性或中毒性症状的疾病。大量的食源性疾病都由致病性微生物引起, 其临床表现为恶心、呕吐、痉挛、腹痛和腹泻等。

一直以来, 由食源性病原菌引起的食品安全问题是与整个世界息息相关的公共卫生问题。常见的食源性致病菌有沙门氏菌(*Salmonella* spp.)、空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)、单核增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、大肠杆菌 O157:H7 (*Escherichia coli* O157:H7)、志贺氏菌(*Shigella* spp.) 和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等 [2,5]。尽管现代食品安全控制技术和食品加工技术已经发展到了相当的水平, 但食品污染和食源性疾病在发达国家和发展中国家仍旧普遍存在, 由病原菌引起的食品安全事件频频发生 [6]。

国家食品安全风险评估中心“食源性疾病监测报告系统”数据显示, 武汉市在 2017–2019 年共报告食源性疾病病例 1 884 例, 其中致泻性大肠杆菌检出率最高(3.90%), 其次为副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, 3.51%)和沙门氏菌(2.44%) [7]。南宁市 2014 年 1 月–2019 年 12 月的食源性疾病监测中的数据表明, 这段时间共引起食源性疾病 21 636 例, 年均发病率为 0.047%。引起疾病的主要食品为水果及其制品(15.91%), 其次为肉及肉制品(15.88%), 其中沙门氏菌是主要的致病菌 [8]。2015 年美国多州曾暴发单核增生李斯特菌疫情, 患者因食用美国知名冰淇淋品牌“蓝钟”(BlueBell)相关产品而感染上该菌 [9]。

食用化学防腐剂具有潜在的危害, 并且耐药菌不断出现, 采用更加安全、高效的灭菌手段消除食物中的病原菌迫在眉睫。噬菌体来自大自然, 作为食品灭菌的手段具有快速高效、安全、特异性强、不影响食物风味等优点 [10], 噬菌体不会长期存留在没有宿主的环境中, 而化学防腐剂会长久存在于土壤环境中, 进一步增加了细菌耐药性的风险。因此, 在食品工业中, 以噬菌体作为“生物防治”方法来控制食品中的食源性病原菌污染具有很大的应用潜力。

1.1 噬菌体对有害微生物的控制

1.1.1 噬菌体对食源性致病菌的控制

噬菌体对主要食源性致病菌控制的研究进展总结如表 1 所示。

(1) 沙门氏菌

沙门氏菌是不发达国家的主要食源性病原体 and 公共卫生问题之一，每年造成 9 380 万食源性疾病病例和 155 000 人死亡^[18]。食品的生产、加工、运输、储存均可能存在沙门氏菌感染，因此，在食品烹饪前的任何一个阶段都应做好抗沙门氏菌的措施。Islam 等^[11]发现 3 株宽宿主谱的沙门氏菌噬菌体 LPSTLL、LPST94 和 LPST153，其中 LPSTLL、LPST94 能够裂解 100% 的受试菌株(分属 11 种血清

型)，LPST153 能够裂解 9 种血清型中 50%–100% 的沙门氏菌菌株；以这 3 种噬菌体建立了噬菌体鸡尾酒处理接种了 10³ CFU/mL 鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 的牛奶样品，感染复数 (Multiplicity of Infection, MOI) 为 10 000 时，4 °C 下仅 3 h，样品中的鼠伤寒沙门氏菌就已低于检测限(<10¹ CFU/mL)；在 25 °C 下作用 6 h 后就完全检测不到鼠伤寒沙门氏菌。这些结果证明噬菌体可作为生物消毒剂防控食品加工过程中沙门氏菌的感染。

醋酸纤维素是由纤维素乙酰化而成的可生物降解化合物，是抗菌包装的重要材料。Gouvêa 等^[19]利用醋酸纤维素膜并固定噬菌体 BFSE16、BFSE18、PaDTA1、PaDTA9、PaDTA10 以及

表 1 噬菌体对食源性致病菌的防控效果

Table 1 Prevention and control effect of phage on food-borne pathogenic bacteria

菌株 Strains	噬菌体 Bacteriophage	处理样品 Sample	MOI	细菌接种量 Bacteria inoculum	处理温度 Temperature (°C)	处理时间 Processing time	减菌数量 Reduce the amounts of bacteria	参考文献 References
<i>S. typhimurium</i>	LPSTLL	Milk	10 000	10 ³ CFU/mL	4	3 h	10 ² CFU/mL	[11]
<i>S. enteritidis</i>	LPST94				25	6 h	10 ³ CFU/mL	
mixture	LPST153							
<i>C. jejuni</i>	12673	Chicken skin	100	10 ⁴ CFU/cm ²	4	24 h	9.5×10 ² CFU/mL	[12]
	F356	Chicken skin	1 000	10 ⁴ CFU/mL	5	24 h	10 CFU/mL	[13]
	F357							
	mixture							
<i>L. monocytogenes</i>	ListShield™	Spanish	10 000	10 ³ CFU/cm ²	4	14 d	10 ³ CFU/cm ²	[14]
		dry-cured ham			12	14 d	10 ³ CFU/cm ²	
			10 000	10 ⁵ CFU/cm ²	4	14 d	10 ⁵ CFU/cm ²	
					12	14 d	10 ⁵ CFU/cm ²	
<i>E. coli</i> O157:H7	BPECO19	Pork	10 000	10 ⁵ CFU/cm ²	4	72 h	10 ⁵ CFU/cm ²	[15]
		Beef	10 000	10 ⁵ CFU/cm ²	4	48 h	>80 CFU/mL	
<i>S. flexneri</i> Sh.f-26	vB_SflS-ISF001	Chicken	10 000	10 ⁴ CFU/cm ²	4	48 h	>5×10 ³ CFU/g	[16]
<i>S. aureus</i>	vB_SauM_	Milk	10	10 ⁸ CFU/mL	25	6 h	10 ⁸ CFU/mL	[17]
	ME126				37	6 h	10 ⁸ CFU/mL	
	vB_SauM_		10	10 ⁸ CFU/mL	25	6 h	10 ⁸ CFU/mL	
	ME18				37	6 h	10 ⁸ CFU/mL	

PaDTA11,将添加了噬菌体的醋酸纤维素膜置于接种了沙门氏菌(10^4 CFU/mL)的培养基表面,置于 35 ± 2 °C 条件下培养 24 h,结果发现覆盖含有噬菌体的醋酸纤维素膜能强烈地抑制培养基中沙门氏菌的生长。噬菌体与包装材料的结合开拓了食源性致病菌生物防治的新途径,在减轻食物污染方面具有很大的潜力。

(2) 空肠弯曲杆菌

禽类作为空肠弯曲杆菌的主要宿主,接触、食用这类被寄生的家禽成为人类感染该菌的主要途径^[20]。近年来,空肠弯曲杆菌的发病率不断提高,已成为细菌性食源性疾病的常见原因。Goode 等^[12]在鸡皮上接种 10^4 CFU/cm² 的空肠弯曲杆菌 C222,并将空肠弯曲杆菌噬菌体 12673 以 MOI=100 密度接种于鸡皮上,在 4 °C 条件下培养 24 h 后,鸡皮表面的空肠弯曲杆菌数量减少了 95%。Zampara 等^[13]利用筛选的 2 株抑菌效果较好的噬菌体 F356 和 F357 混合制成抑菌剂,以 MOI=1 000 的接种量处理已接种空肠弯曲杆菌(10^4 CFU/mL)的鸡皮,结果发现在 5 °C 贮藏温度下 24 h 后可降低约 10 CFU/mL 的空肠弯曲杆菌。

(3) 单核增生李斯特菌

单核增生李斯特菌是人类主要的食源性病原体,海鲜、奶酪、未经巴氏消毒的牛奶和肉酱等被视为李斯特菌污染的中度至高风险食品^[5]。Gutiérrez 等^[14]在西班牙干火腿中分别接种 10^5 、 10^4 和 10^3 CFU/cm² 的李斯特菌,再分别接种噬菌体 ListShield™ (MOI=100、MOI=1 000、MOI=10 000)、Listex™P100 (MOI=10 000、MOI=100 000、MOI=1000 000),置于 4 °C 和 12 °C 培养 14 d,定时取样检测李斯特菌的数量;Listex™P100 能在 12 °C 以下的 14 d 储存期内保持单核增生李斯特菌处于检测下限($<10^1$ CFU/cm²),而低浓度的 ListShield™ (MOI=10 000)在 4 °C 时同样能保持单核增生李斯特菌处于检测下限。因此这 2 种噬菌体

在食品保存时期避免被单核增生李斯特菌污染方面具有较高的实用价值。

(4) 大肠杆菌 O157:H7

大肠杆菌 O157:H7 是一种重要的食源性病原体,可引起血性腹泻,偶尔也可引起溶血性尿毒症综合征^[21],而牛肉、牛奶、水以及蔬菜等通常为该病菌传播的媒介^[22]。Seo 等^[15]采用噬菌体 BPECO19 分别应用于人工污染的牛肉、猪肉,接种噬菌体 BPECO19 (MOI=1 000、10 000、100 000)后,在 4 h 时,MOI=100 000 的噬菌体 BPECO19 使大肠杆菌 O157:H7 由 1.23×10^5 CFU/cm² 逐渐降低至 2.3×10^1 CFU/cm² ($P<0.001$),8 h 后大肠杆菌 O157:H7 被完全抑制($P<0.001$);在 MOI=10 000、1 000 条件下,大肠杆菌 O157:H7 从初始污染水平在 48 h 和 8 h 分别降低到 10^3 CFU/cm² ($P<0.001$)和 10^4 CFU/cm² ($P<0.01$)。很明显,通过噬菌体 BPECO19 处理,可以显著降低牛肉中的大肠杆菌 O157:H7。以同样的方式接种于猪肉中的研究发现,噬菌体 BPECO19 在猪肉中对大肠杆菌 O157:H7 的抑制作用更加明显,MOI=10 000 的条件下 72 h 后大肠杆菌 O157:H7 被完全抑制^[15]。

(5) 志贺氏菌

志贺氏菌病(细菌性痢疾)每年仍会剥夺无数人的生命,造成了重大的公共卫生威胁,并且志贺菌多重耐药菌株的不断出现^[23],有必要寻找替代抗生素的抗菌药物。Shahin 等^[16]以福氏志贺菌(*Shigella flexneri*) ptcc1234 为宿主菌从废水中分离到 vB_SflS-ISF001 噬菌体,在生鸡胸肉和熟鸡胸肉中分别接种一定量的福氏梭菌进行生防试验;结果表明,使用该噬菌体可使福氏疟原虫活菌数减少 10^2 CFU/g 以上。

(6) 金黄色葡萄球菌

由金黄色葡萄球菌导致的皮肤感染以及严重的骨骼、关节、心脏、肺和中枢神经系统的深层感染常常使人感到困扰^[24],耐多药金黄色葡萄

球菌已成为社区、医院高发感染菌株^[25]。金黄色葡萄球菌常混入经过巴氏杀菌或超高温处理的牛奶中,产生肠毒素进而引发食用者食物中毒。Ali Gharieb 等^[17]利用 40 种耐多药金黄色葡萄球菌分离出了 2 株噬菌体(vB_SauM_ME18 和 vB_SauM_ME126),将 MOI=1、MOI=10 的 2 种噬菌体分别接种至感染金黄色葡萄球菌的脱脂牛奶中,于 25、37 °C 条件下培养 2–6 h 后,经噬菌体处理的牛奶中金黄色葡萄球菌的数量显著降低,其中 vB_SauM_ME126 (MOI=10)噬菌体高度活跃,能完全清除牛奶中的金黄色葡萄球菌;vB_SauM_ME18 (MOI=10)噬菌体在 37 °C 时,金黄色葡萄球菌也显著减少了 87.2% ($P<0.05$),而在 25 °C 时完全杀灭了牛奶中的金黄色葡萄球菌。

1.1.2 噬菌体对致腐菌的控制

微生物是影响食品品质的重要因素,在食品的加工、运输和贮藏过程中很容易因细菌的污染发生腐败变质,除食物风味受到严重影响外,更重要的是其产生的毒性物质使人类的生命安全受到威胁。而通用的化学防腐剂对人体健康的潜在影响使得噬菌体抑菌成为延长食品可食用期限的另一重要方向。

美国已有多种以噬菌体为基础的抗菌技术获得了美国食品和药品管理局(Food and Drug Administration, FDA)的批准^[26]。在啤酒中,以乳酸菌为主的细菌污染时常发生,Deasy 等^[27]通过噬菌体 SA-C12 的应用,成功地控制了短乳杆菌对啤酒的污染。假单胞菌是肉类、乳制品、蛋类等蛋白质丰富食物的主要致腐菌之一,引起了严重的食品安全问题^[28]。通常以巴氏消毒处理的牛奶,可能仍然存在微量的致腐败微生物如假单胞菌,从而导致在牛奶存放过程中过早发生变质^[29]。Hu 等^[30]利用噬菌体成功降低了原料奶中的假单胞菌生长和腐败活性。

具有抗菌性能的活性包装材料在过去的 10 年中获得了极大的关注。乳清分离蛋白(Whey Protein Isolate, WPI)可食用膜是能够利用基于农产品的生

物材料进行包装应用的活性包装材料^[31]。将农副产品中的多糖材料与酸、盐、酶等结合后能够用以控制食品上微生物的繁殖^[32–34]。然而大多数抗菌活性包装材料都广谱抗菌,并没有针对特定的细菌,而非致病性微生物在一些乳制品的生产中又是必需的。因此,人们开始尝试开发基于噬菌体的特异性抗菌活性包装材料,通过减少与非靶向微生物的相互作用来提高抗菌针对性。Vonasek 等^[35]将 T4 噬菌体包封于 WPI 蛋白膜中,共聚焦成像测量显示经荧光标记的噬菌体均匀分布在 WPI 膜基质中,WPI 膜能够使噬菌体在 22 °C 光照和 4 °C 黑暗条件下稳定存在一个月,并且噬菌体感染性无明显损失;WPI 膜能够在水环境和叶面培养 3 h 内释放大量噬菌体,并使大肠杆菌的数量下降 5 个数量级。

1.2 基于噬菌体的食源性致病菌检测技术

食源性致病菌是影响食品安全的主要因素之一。建立快速、准确的致病菌检测技术对于避免受污染食品流入市场至关重要^[36]。传统的检测方法包括前增菌、选择性富集培养、鉴别性培养、挑选特定表型菌株、生理生化鉴定等多个步骤,其操作步骤烦琐、耗时费力,无法满足致病菌快速检测的要求^[37]。食源性致病菌的检测技术面临着耗时、费力的传统方法向省时、简便的现代检测技术转变的挑战。

以抗原抗体特异性结合为基础的免疫学技术中酶联免疫吸附法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)、免疫荧光技术(Immunofluorescence Assay, IFA)以及胶体金免疫层析技术(Gold Immunochromatography Assay, GICA)是近年来应用比较广泛的微生物快速检测方法,但它们不能区分样品中的微生物死细胞和活细胞,而且仪器、试剂成本昂贵,对操作技术要求也较高。然而噬菌体只会侵染活细菌,并且专一性强、繁殖速度快,因此基于噬菌体的细菌检测技术是上述问题优良的解决方案。这些方法方便、快速、高度特异性、价格低廉,具有很大的应用优势。

基于噬菌体的细菌检测技术主要分为噬菌体裂解法、噬菌体-生物传感器联用技术、噬菌体-生物/化学联用技术、报告噬菌体检测技术。

基于噬菌体的食源性致病菌检测技术研究进展总结如表 2 所示。

1.2.1 噬菌体裂解法

烈性噬菌体具有高度的专一性，能特异性感染并裂解宿主菌，在双层平板上形成肉眼可见的噬菌斑，可凭借噬菌斑的数目、外观特征、形成时间来判断宿主细菌的种类和数目，常用的噬菌体分型法和噬菌体扩增法便是基于此原理形成的。由于噬菌体侵染的特异性，噬菌体分型技术能够快速地区分不同细菌的血清型，其检出准确率高且比常规生化检测速度更快，因此在流行病学中得到了广泛的应用^[45-46]。Stewart 等^[38]发现，在辅助细菌的协助下，侵染 4 h 后噬菌体形成的噬菌斑数量能够准确反映培养 18 h 后检测到的宿主菌菌落数量，利用此方法在 4 h 内成功检测出样品中的 4×10^1 CFU/mL 的铜绿假单胞菌和 6×10^1 CFU/mL 的沙门氏菌噬菌体。这种方法被称为“噬菌体扩增法”。然而当样品中细菌的数目较少时，会影响检测结果的准确性。

1.2.2 噬菌体-生物传感器联用技术

生物传感器是将分析物与生物探针相互作用，通过传感器转换成可测量信号的分析设备，具有较高的特异性和灵敏性^[47]。

将噬菌体沉积在固体基质上作为特异性受体形成传感层，结合适当的传感器可实现对细菌的灵敏性检测。当分析物与磁弹性生物传感器表面上的生物受体特异性结合后，将引起传感器的质量负载发生变化，进而引起传感器共振频率的变化，从而可以对目标分析物进行快速检测。Byeon 等^[39]基于磁弹性生物传感器，利用烈性噬菌体 12600 作为生物识别元件对菠菜表面上 1.76×10^2 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌进行了快速检测。

NH₂MIL-53(Fe)是一种水分散荧光金属有机框架(Metal-Organic Frameworks, MOFs), Bhardwaj 等^[40]利用 NH₂MIL-53(Fe)经交联剂戊二醛靶标特异性噬菌体组成金黄色葡萄球菌生物传感器，经噬菌体特异性捕捉金黄色葡萄球菌后依据发光强度判断金黄色葡萄球菌的浓度，成功测定了 4×10^1 、 4×10^2 、 4×10^3 、 4×10^4 、 4×10^6 、 4×10^8 CFU/mL 这 6 种不同浓度的金黄色葡萄球菌。由于 NH₂MIL-53(Fe)具有结构兼容性，使得该生物传感平台灵敏度高、稳定性强、具有可再生性，并且在检测极限以及线性分析范围方面均十分出色，成功实现了对金黄色葡萄球菌的检测。

1.2.3 噬菌体-生物或化学联用技术

腺苷三磷酸(Adenosine Triphosphoric Acid, ATP)是广泛存在于生物体内的一种能量物质，能够与荧光素酶作用发出荧光。宿主细菌经噬菌体裂

表 2 基于噬菌体的食源性致病菌检测技术检测效果

Table 2 Detection effect of bacteriophage-based food-borne pathogens detection technology

检测技术	菌种	检测时间	检测限	参考文献
Detection Technology	Bacterial strains	Detection time (h)	Detection limit (CFU/mL)	References
噬菌体裂解法	<i>S. typhimurium</i>	4	60	[38]
Phage lysis method	<i>P. aeruginosa</i>	4	40	
噬菌体-生物传感器联用技术	<i>S. aureus</i>	2.5	1.76×10^2	[39]
Phage-biosensor combination technology		<1	40	[40]
噬菌体-生物/化学联用技术	<i>E. coli</i>	<1	10^3	[41]
Phage-Biology/Chemistry Technology	<i>V. parahaemolyticus</i>	4.5	10^8	[42]
	<i>E. coli</i>	7	10	[43]
报告噬菌体	<i>E. coli</i>	24	10	[44]
Report phage				

解后会释放 ATP 于环境中,此时借助荧光素酶与其发生作用产生荧光,再凭借荧光强度判断 ATP 的含量,从而推断出细菌的浓度。同样的原理,经裂解后释放出的腺苷酸激酶(Adenylate Kinase, AK)能够与环境中的腺苷二磷酸(Adenosine Diphosphate, ADP)转化为 ATP,也能通过荧光素酶的作用检测出样品中细菌的含量^[48]。Blasco 等^[41]利用 AK 检测的原理在 1 h 之内检测出了 1×10^3 CFU/mL 的大肠杆菌。

还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide, NADH)是细胞能量代谢不可或缺的辅酶,广泛存在于活细胞中。一般来说,特定代谢时期的微生物细胞中的 NADH 含量是相对稳定的,其含量与食品中微生物的数量具有正相关性,NADH 在细菌死亡之后又会在胞内酶的作用下迅速分解,NADH 在 FMN-NADH 氧化还原酶和荧光素酶作用下能够发出荧光,因此能通过测定荧光强度检测出活菌的数目。NADH 生物发光法具有操作简单、成本低、省时的优点^[49]。Peng 等^[42]利用噬菌体介导的 NADH 生物发光法从牡蛎样品中检测出 10^8 CFU/mL 的副溶血性弧菌,在 4 h 预富集后,牡蛎中检测到单个细菌,整个过程仅花费了 4.5 h,大大缩短了检测的时间。

宿主细菌被噬菌体裂解后会释放很多细胞内容物,对细胞内容物进行检测也能够达到检测相应细菌的目的。例如,大肠杆菌在裂解后会释放 β -半乳糖苷酶, β -半乳糖苷酶在异丙基 β -D-硫代半乳糖吡喃苷(Isopropyl β -D-Thiogalactoside, IPTG)的诱导下能够使氯酚红 β -D-半乳糖苷由黄色变为红色。基于此原理,Chen 等^[43]利用 T7 噬菌体裂解大肠杆菌,检测大肠杆菌释放的 β -半乳糖苷酶,能够检测到浓度为 1×10^1 CFU/mL 的大肠杆菌。

通过荧光染料标记噬菌体遗传物质来检测食源性大肠杆菌也是一种良好的方式。将噬菌体核酸进行荧光标记,噬菌体在侵染宿主之后,被荧

光标记的核酸在宿主细菌细胞中累积,便可用荧光显微镜对细菌进行检测。Mosier-Boss 等^[50]利用 SYBR Gold 核酸染料标记沙门氏菌噬菌体 P22,借助荧光显微镜检测到了沙门氏菌 LT2。荧光标记噬菌体技术的检测周期很短,能够精准地对活细胞进行检测,还能同时对多种细菌进行检测,在食品微生物检测中具有广阔的应用前景。

1.2.4 报告噬菌体检测技术

将报告基因插入到噬菌体 DNA 中形成报告噬菌体,噬菌体侵染宿主后报告基因得到表达,可实现目标菌体的快速检测。普遍应用的报告基因有细菌荧光素酶基因(*lux*)、绿色荧光蛋白基因(*gfp*)、冰核蛋白基因(*ina*)、纳米荧光素酶基因(*nanoLuc*)和 β -半乳糖苷酶基因(*lacZ*)等。报告噬菌体在大肠杆菌、李斯特菌的检测中已经得到了较好的应用。

Chen 等^[51]在 T7 噬菌体 DNA 中插入了一段 *lacZ*,在侵染大肠杆菌后表达出的 β -半乳糖苷酶,以 4-甲基伞形酮- β -D-葡萄糖苷酸(4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronide, MUG)为底物进行荧光检测,检测出牛肉绞汁中浓度仅 10^1 CFU/mL 的大肠杆菌。Meile 等^[44]在单核增生李斯特菌噬菌体 A511 的 DNA 中插入了 *Nanoluc* 基因,该报告噬菌体在 24 h 内就检测出牛奶、冷切鸡肉和卷心莴苣等样品中的单个李斯特菌细胞,将检测时间缩短了 72 h。Hinkley 等^[52]在 T7 噬菌体中插入了 *Nanoluc* 的同时插入了能结合纤维素的碳水化合物结合模块(Carbohydrate Binding Module, CBM)基因 *cbm*,以便 *Nanoluc* 荧光素酶在纤维素膜上的附着,能使检测信号更为集中,提高检测灵敏度。其检测结果与 EPA 1603 没有显著性差异,能检测饮用水中 <10 CFU/mL 的大肠杆菌,但却将检测时间从 44 h 缩短到 8 h,大大节约了检测时间。

2 食品工业中噬菌体危害的防控策略

噬菌体作为细菌的天敌,在生态系统中平衡着细菌的总体数量,促进了细菌的不断进化。然而,噬菌体能快速引起细菌的裂解死亡这一特性对依

靠细菌来制造产品的工业无疑是一场巨大的灾难,噬菌体使发酵过程遭受难以控制的破坏,噬菌体污染已成为发酵工业发展的主要制约因素,使得食品、化工、制药、农业以及饲料行业产生了极大的经济利益损失,其中乳制品行业可能是受噬菌体污染影响最大的行业^[53]。

酸奶、奶酪等生产时需要在经过巴氏杀菌后的牛奶中接种一定量的发酵剂,以产生优质的乳制品。发酵剂是精心筛选后的乳酸菌群,这些乳酸菌中很可能存在着对噬菌体较为敏感的细菌,一旦牛奶中出现了噬菌体便会迅速地增殖,引起敏感菌的大量死亡,从而导致发酵延迟或者停止,因此产生低质量的产品甚至造成发酵失败。早在 1935 年,Whitehead 等^[54]首次发现引起乳制品发酵失败的“罪魁祸首”就是噬菌体。随着食品发酵工业的不断扩大,预防噬菌体破坏发酵的进程尤为重要。

噬菌体污染的途径有很多,空气污染、生产设施、预发酵食材等都能检测到一定量的噬菌体^[55],甚至是发酵剂本身也可能携带着原噬菌体。噬菌体多样性和普遍性是噬菌体污染防治的一大难题,完全消除噬菌体几乎不可能实现,只能尽可能地控制噬菌体的数量、阻止噬菌体在生产设施间的传播,以降低噬菌体污染导致发酵失败的风险。

2.1 生产环境的噬菌体消毒

生产车间的合理设计、严格控制的卫生条件、生产设备的定期消杀、适当的空气流通都是减少噬菌体污染不可或缺的工作。对发酵过程中产生的副产物要清理得当,含有微生物的悬浮液必须灭菌处理,否则发酵副产物也会成为噬菌体繁殖的大本营,增加感染的风险^[56]。每一个生产环节都应该保持独立,以防止细菌培养基、发酵副产物以及生产设施之间的交叉感染。对参与生产工作的工作人员应当进行培训,掌握噬菌体控制工作的流程。

对生产车间定期高压喷雾除菌,喷洒过乙酸、次氯酸钠在减少噬菌体方面具有不错的效果。季铵氯化物(3%, pH 10.5)、碱铝(2.5%, pH 12.4)和聚

氧乙烯壬基酚磷酸(0.8%, pH 2.0)等杀菌剂能在短时间内杀灭 99%的噬菌体颗粒^[57-58]。噬菌体的种类繁多,对于不同杀菌剂的敏感性也有差别,因此应当依据噬菌体的种类选择合适的消毒剂。

大部分的噬菌体具有热敏感性,高温会引起噬菌体形态的改变以及 DNA 的释放,因此可以通过沸水对生产设施进行清洗来控制噬菌体的数量^[58]。

2.2 食物基质的噬菌体灭活

食品高温处理是杀灭噬菌体最简单、快捷的方式^[59],而且可以提高食品营养成分的利用率及消化率。乳杆菌噬菌体 PL-1、J-1 均可在 63 °C、30 min 条件下灭活,嗜热链球菌噬菌体也能在 90 °C 条件下被杀灭,但是仍有部分耐高温的噬菌体或是液态发酵产物在加热过程中产生泡沫隔热均会影响灭活效果^[60]。超高压技术能在使噬菌体灭活的同时最大限度地保持食品原有的营养价值和风味;紫外线能使噬菌体 DNA 丧失转化能力而致死,但是由于紫外线的穿透能力较弱,仅在果汁、蔬菜等食品中广泛应用^[61]。

2.3 发酵菌种变换及优化

噬菌体作为一种专性寄生细菌的病毒,与宿主之间的特异性非常强,同一噬菌体感染多种细菌的可能性很小。因此,适当对发酵菌种进行变换,能够有效避免噬菌体在发酵中持续的增殖^[62]。实行发酵菌种的轮换必须要考虑新菌种的发酵效率及对噬菌体的敏感性,并且在发酵过程中持续进行噬菌体检测,及时发现新型噬菌体的出现,防止噬菌体对发酵系统的破坏。

对于菌种轮换难以实施的工厂,使用实验室选育耐噬菌体工业发酵菌株也是一种不错的选择。一般来说,可以通过自然突变、化学诱变及物理诱变这 3 种方式选育耐噬菌体的菌株,选育的菌株在发酵工业中的应用效果也比较可观。分离自发突变的耐噬菌体菌株是一种简单且应用不受限制的方式,Pujato 等^[63]分离出的 4 种自然突变体,在牛奶发酵过程中和噬菌体存在的冷藏条件下均表现出良好

的性能。

随着分子生物技术的不断发展,基因工程也能在选育抗噬菌体菌株中得到较好的应用,例如反义 RNA 技术、噬菌体触发自杀系统等^[55]。噬菌体作为细菌病毒,需细菌提供其增长繁殖的场所。Lajoie 等^[64]将大肠杆菌 MG1655 的琥珀密码子(UAG)突变为赭石密码子(UAA),并敲除了释放因子 RF1,因此当 MG1655 突变株被 T7 侵染后, T7 噬菌体琥珀密码子无法被识别而导致其翻译被严重干扰,致使其裂解时间延迟 30% ($\pm 2\%$),子代数量也减少了 59% ($\pm 9\%$),表明该大肠杆菌对 T7 产生了明显的抗性。该研究为制造抗噬菌体发酵菌株提供了新的思路。然而该方法操作烦琐、耗时费力,同时应用于食品发酵也存在局限性。

3 展望

噬菌体是细菌的天敌,也是食品工业中的双刃剑。减轻噬菌体的危害、提升其利用价值,对食品工业的发展有深远的意义。

目前噬菌体在食品工业中的应用初露锋芒,如检测和控制食源性致病菌或腐败菌。然而噬菌体也存在不可忽视的问题,例如在环境中生物活性的丧失、环境改变引起的杀菌效果不稳定及宿主的特异性等,都在一定程度上限制了噬菌体制剂的发展。噬菌体脂质体包被已被应用于噬菌体治疗^[65],增加噬菌体的稳定性。有理由相信,噬菌体包被技术应用于食品工业同样可以提高噬菌体在体外的稳定性。对于扩大噬菌体的宿主范围,目前除了噬菌体鸡尾酒以外,主要是利用基因工程手段。基因工程还可以提高噬菌体的吸附及裂解能力、控制宿主噬菌体抗性等,将有效促进噬菌体制剂在食品工业中的推广。传统的基因工程方法效率较低,而 CRISPR/Cas 系统改造噬菌体效率高,重组率大于 99%^[66],CRISPR/Cas 系统将为噬菌体基因改造提供良好的支持,大大提高改造的效率。另外,对于重组噬菌体在食品工业中的应用,还需要相关法律法规的配合。

虽然目前普遍认为噬菌体是专一性侵染细菌的病毒,尚无证据表明噬菌体对人体有害,但是在食品工业中广泛应用噬菌体制剂还需要更多对于其安全性的研究。截至目前,发酵食品生产中噬菌体污染的难题依然未被攻克,开发更加有效的噬菌体防治策略仍然是研究者们努力的方向。

尽管噬菌体在食品工业中的广泛应用还面临许多挑战,但是噬菌体具有特异性强、增殖周期短等无法比拟的优点,具有成为天然、绿色的杀菌剂及防腐剂的巨大潜力。随着现代生物技术日新月异的发展,目前噬菌体制剂所面临的困难终会被克服,基于噬菌体的细菌生物防控策略及技术将会不断更新和完善,作为各种化学杀菌剂、防腐剂的有益补充甚至替代品,保证食品安全,保障公众身体健康。

REFERENCES

- [1] Hendrix RW. Bacteriophages: evolution of the majority[J]. *Theoretical Population Biology*, 2002, 61(4): 471-480
 - [2] García P, Rodríguez L, Rodríguez A, Martínez B. Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2010, 21(8): 373-382
 - [3] Rakhuba DV, Kolomiets EI, Szwajcer DE, Novik GI. Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell[J]. *Polish Journal of Microbiology*, 2010, 59(3): 145-155
 - [4] Batinovic S, Wassef F, Knowler SA, Rice DT, Stanton CR, Rose J, Tucci J, Nittami T, Vinh A, Drummond GR, et al. Bacteriophages in natural and artificial environments[J]. *Pathogens*, 2019, 8(3): 100
 - [5] O'Sullivan L, Bolton D, McAuliffe O, Coffey A. Bacteriophages in food applications: from foe to friend[J]. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2019, 10: 151-172
 - [6] Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H, Opsteegh M, Langelaar M, Threlfall J, Scheutz F, et al. Food-borne diseases — the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 139: S3-S15
 - [7] Zhang XY, Zeng J, Li M, Liang WB, Guo JH. Epidemiological characteristics of foodborne disease in Wuhan from 2017 to 2019[J]. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2021, 31(4): 631-635 (in Chinese)
- 张馨月, 曾敬, 李敏, 梁韡斌, 郭建辉. 2017-2019 年武汉

- 市监测食源性疾病流行特征[J]. 中华医院感染学杂志, 2021, 31(4): 631-635
- [8] Zhang J, Shi XD, Long X, Ma LL, Qin JQ. Analysis of characteristics of 21 636 cases of foodborne diseases in Nanning[J]. Modern Preventive Medicine, 2020, 47(22): 4072-4075, 4079 (in Chinese)
- 张静, 施向东, 龙兮, 马玲玲, 秦剑秋. 21 636 例南宁市食源性疾病特征分析[J]. 现代预防医学, 2020, 47(22): 4072-4075, 4079
- [9] Pouillot R, Klontz KC, Chen Y, Burall LS, Macarasin D, Doyle M, Bally KM, Strain E, Datta AR, Hammack TS, et al. Infectious dose of *Listeria monocytogenes* in outbreak linked to ice cream, United States, 2015[J]. Emerging Infectious Diseases, 2016, 22(12): 2113-2119
- [10] Endersen L, Coffey A. The use of bacteriophages for food safety[J]. Current Opinion in Food Science, 2020, 36: 1-8
- [11] Islam MS, Zhou Y, Liang L, Nime I, Liu K, Yan T, Wang XH, Li JQ. Application of a phage cocktail for control of *Salmonella* in foods and reducing biofilms[J]. Viruses, 2019, 11(9): 841
- [12] Goode D, Allen VM, Barrow PA. Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(8): 5032-5036
- [13] Zampara A, Sørensen MCH, Elsser-Gravesen A, Brøndsted L. Significance of phage-host interactions for biocontrol of *Campylobacter jejuni* in food[J]. Food Control, 2017, 73: 1169-1175
- [14] Gutiérrez D, Rodríguez-Rubio L, Fernández L, Martínez B, Rodríguez A, García P. Applicability of commercial phage-based products against *Listeria monocytogenes* for improvement of food safety in Spanish dry-cured ham and food contact surfaces[J]. Food Control, 2017, 73: 1474-1482
- [15] Seo J, Seo DJ, Oh H, Jeon SB, Oh MH, Choi C. Inhibiting the growth of *Escherichia coli* O157:H7 in beef, pork, and chicken meat using a bacteriophage[J]. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 2016, 36(2): 186-193
- [16] Shahin K, Bouzari M, Wang R, Yazdi M. Prevalence and molecular characterization of multidrug-resistant *Shigella* species of food origins and their inactivation by specific lytic bacteriophages[J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 305: 108252
- [17] Ali Gharieb RM, Saad MF, Mohamed AS, Tartor YH. Characterization of two novel lytic bacteriophages for reducing biofilms of zoonotic multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* and controlling their growth in milk[J]. LWT, 2020, 124: 109145
- [18] Oh JH, Park MK. Recent trends in *Salmonella* outbreaks and emerging technology for biocontrol of *Salmonella* using phages in foods: a review[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 27(12): 2075-2088
- [19] Gouvêa DM, Mendonça RCS, Soto ML, Cruz RS. Acetate cellulose film with bacteriophages for potential antimicrobial use in food packaging[J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 63(1): 85-91
- [20] Ushanov L, Lasareishvili B, Janashia I, Zautner AE. Application of *Campylobacter jejuni* phages: challenges and perspectives[J]. Animals, 2020, 10(2): 279
- [21] Zhao YN, Zeng DX, Yan C, Chen W, Ren JL, Jiang Y, Jiang LY, Xue F, Ji DJ, Tang F, et al. Rapid and accurate detection of *Escherichia coli* O157: H7 in beef using microfluidic wax-printed paper-based ELISA[J]. The Analyst, 2020, 145(8): 3106-3115
- [22] Sharma VK, Akavaram S, Schaut RG, Bayles DO. Comparative genomics reveals structural and functional features specific to the genome of a foodborne *Escherichia coli* O157:H7[J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 196
- [23] Puzari M, Sharma M, Chetia P. Emergence of antibiotic resistant *Shigella* species: a matter of concern[J]. Journal of Infection and Public Health, 2018, 11(4): 451-454
- [24] Abatangelo V, Peressutti Bacci N, Boncompain CA, Amadio AF, Carrasco S, Suárez CA, Morbidoni HR. Broad-range lytic bacteriophages that kill *Staphylococcus aureus* local field strains[J]. PLoS One, 2017, 12(7): e0181671
- [25] Monaco M, Pimentel de Araujo F, Cruciani M, Coccia EM, Pantosti A. Worldwide epidemiology and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus*[J]. Current Topics in Microbiology and Immunology, 2017: 409: 21-56
- [26] Lang LH. FDA approves use of bacteriophages to be added to meat and poultry products[J]. Gastroenterology, 2006, 131(5): 1370
- [27] Deasy T, Mahony J, Neve H, Heller KJ, Van Sinderen D. Isolation of a virulent *Lactobacillus brevis* phage and its application in the control of beer spoilage[J]. Journal of Food Protection, 2011, 74(12): 2157-2161
- [28] Liu T, Wen H, Man DL, Chen ZJ, Sun ZY. Advances in the application of bacteriophages to control *Pseudomonas*[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2019, 44(6): 661-666 (in Chinese)
- 刘婷, 温慧, 满都拉, 陈忠军, 孙子羽. 应用噬菌体控制假单胞菌的研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44(6): 661-666
- [29] Vithanage NR, Yeager TR, Jadhav SR, Palombo EA, Datta N. Comparison of identification systems for psychrotrophic bacteria isolated from raw bovine milk[J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 189: 26-38
- [30] Hu ZY, Meng XC, Liu F. Isolation and characterisation of lytic bacteriophages against *Pseudomonas* spp., a novel biological intervention for preventing spoilage of raw milk[J]. International Dairy Journal, 2016, 55: 72-78
- [31] Valencia-Chamorro SA, Palou L, Del Río MA, Pérez-Gago MB. Antimicrobial edible films and coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables: a review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2011, 51(9): 1085-1100

872-900

- [32] Pintado CMBS, Ferreira MASS, Sousa I. Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin[J]. Food Control, 2010, 21(3): 240-246
- [33] Amarillas L, Lightbourn-Rojas L, Angulo-Gaxiola AK, Heredia JB, González-Robles A, León-Félix J. The antibacterial effect of chitosan-based edible coating incorporated with a lytic bacteriophage against *Escherichia coli* O157:H7 on the surface of tomatoes[J]. Journal of Food Safety, 2018, 38(6): e12571
- [34] Rossi-Márquez G, Han JH, García-Almendárez B, Castaño-Tostado E, Regalado-González C. Effect of temperature, pH and film thickness on nisin release from antimicrobial whey protein isolate edible films[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2009, 89(14): 2492-2497
- [35] Vonasek E, Le P, Nitin N. Encapsulation of bacteriophages in whey protein films for extended storage and release[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 37: 7-13
- [36] Kim SO, Kim SS. Bacterial pathogen detection by conventional culture-based and recent alternative (polymerase chain reaction, isothermal amplification, enzyme linked immunosorbent assay, bacteriophage amplification, and gold nanoparticle aggregation) methods in food samples: a review[J]. Journal of Food Safety, 2021, 41(1): e12870
- [37] Zhao XH, Lin CW, Wang J, Oh DH. Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 24(3): 297-312
- [38] Stewart GS, Jassim SA, Denyer SP, Newby P, Linley K, Dhir VK. The specific and sensitive detection of bacterial pathogens within 4 h using bacteriophage amplification[J]. Journal of Applied Microbiology, 1998, 84(5): 777-783
- [39] Byeon HM, Vodyanoy VJ, Oh JH, Kwon JH, Park MK. Lytic phage-based magnetoelastic biosensors for on-site detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on spinach leaves[J]. Journal of the Electrochemical Society, 2015, 162(8): B230-B235
- [40] Bhardwaj N, Bhardwaj SK, Mehta J, Kim KH, Deep A. MOF-bacteriophage biosensor for highly sensitive and specific detection of *Staphylococcus aureus*[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2017, 9(39): 33589-33598
- [41] Blasco R, Murphy MJ, Sanders MF, Squirrell DJ. Specific assays for bacteria using phage mediated release of adenylate kinase[J]. Journal of Applied Microbiology, 1998, 84(4): 661-666
- [42] Peng Y, Jin YQ, Lin H, Wang JX, Khan MN. Application of the VPp1 bacteriophage combined with a coupled enzyme system in the rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2014, 98: 99-104
- [43] Chen JH, Alcaine SD, Jiang ZW, Rotello VM, Nugen SR. Detection of *Escherichia coli* in drinking water using T7 bacteriophage-conjugated magnetic probe[J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(17): 8977-8984
- [44] Meile S, Sarbach A, Du JM, Schuppler M, Saez C, Loessner MJ, Kilcher S. Engineered reporter phages for rapid bioluminescence-based detection and differentiation of viable *Listeria* cells[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(11): e00442-20
- [45] Hopkins KL, Desai M, Frost JA, Stanley J, Logan MJ. Fluorescent amplified fragment length polymorphism genotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains and its relationship with host specificity, serotyping, and phage typing[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(1): 229-235
- [46] Li CX, Wang P, Li W, Li ZJ. Progress in research of phage molecule typing techniques[J]. Disease Surveillance, 2016, 31(5): 422-426 (in Chinese)
李存香, 王鹏, 李伟, 李振军. 噬菌体分子分型技术研究进展[J]. 疾病监测, 2016, 31(5): 422-426
- [47] Yang T, Huang HF, Zhu F, Lin QL, Zhang L, Liu JW. Recent progresses in nanobiosensing for food safety analysis[J]. Sensors, 2016, 16(7): 1118
- [48] Wu Y, Brovko L, Griffiths MW. Influence of phage population on the phage-mediated bioluminescent adenylate kinase (AK) assay for detection of bacteria[J]. Letters in Applied Microbiology, 2001, 33(4): 311-315
- [49] Li M, Wang JX, Lin H. Research progress of the use of bacteriophage to detect foodborne pathogenic bacteria[J]. Food Science, 2010, 31(23): 439-446 (in Chinese)
李萌, 王静雪, 林洪. 噬菌体检测食源性致病菌的研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(23): 439-446
- [50] Mosier-Boss PA, Lieberman SH, Andrews JM, Rohwer FL, Wegley LE, Breitbart M. Use of fluorescently labeled phage in the detection and identification of bacterial species[J]. Applied Spectroscopy, 2003, 57(9): 1138-1144
- [51] Chen AQ, Wang DH, Nugen SR, Chen JH. An engineered reporter phage for the fluorometric detection of *Escherichia coli* in ground beef[J]. Microorganisms, 2021, 9(2): 436
- [52] Hinkley TC, Garing S, Singh S, Le Ny ALM, Nichols KP, Peters JE, Talbert JN, Nugen SR. Reporter bacteriophage T7_{NLC} utilizes a novel NanoLuc: fusion for the ultrasensitive detection of *Escherichia coli* in water[J]. The Analyst, 2018, 143(17): 4074-4082
- [53] Garneau JE, Moineau S. Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations[J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10(Suppl 1): S20
- [54] Whitehead HR, Cox GA. The occurrence of bacteriophage in cultures of lactic streptococci[EB/OL]. 1935
- [55] Fan MR, Liu Y, Wu WR, Wang ZY, Zhang HP, Chen X. Novel technologies of lactic acid bacteria against bacteriophages[J]. The Food Industry, 2017, 38(2): 225-229 (in Chinese)
范梦茹, 刘颖, 吴文茹, 汪政煜, 张和平, 陈霞. 乳酸菌

- 抗噬菌体新型技术研究[J]. 食品工业, 2017, 38(2): 225-229
- [56] Pujato SA, Quiberoni A, Mercanti DJ. Bacteriophages on dairy foods[J]. Journal of Applied Microbiology, 2019, 126(1): 14-30
- [57] Mercanti DJ, Guglielmotti DM, Patrignani F, Reinheimer JA, Quiberoni A. Resistance of two temperate *Lactobacillus paracasei* bacteriophages to high pressure homogenization, thermal treatments and chemical biocides of industrial application[J]. Food Microbiology, 2012, 29(1): 99-104
- [58] Ebrecht AC, Guglielmotti DM, Tremmel G, Reinheimer JA, Suárez VB. Temperate and virulent *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages: comparison of their thermal and chemical resistance[J]. Food Microbiology, 2010, 27(4): 515-520
- [59] Wagner N, Matzen S, Walte HG, Neve H, Franz CMAP, Heller KJ, Hammer P. Extreme thermal stability of *Lactococcus lactis* bacteriophages: evaluation of phage inactivation in a pilot-plant pasteurizer[J]. LWT, 2018, 92: 412-415
- [60] Chai SY, Guo J, Ma RR, Munguntsetseg, Chen X. Inactivation methods of bacteriophages in food industry[J]. China Dairy Industry, 2019, 47(11): 36-40 (in Chinese)
柴诗语, 郭静, 马瑞瑞, 孟根其其格, 陈霞. 食品工业中噬菌体灭活方法研究进展[J]. 中国乳品工业, 2019, 47(11): 36-40
- [61] Capra ML, Quiberoni A, Reinheimer JA. Thermal and chemical resistance of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* bacteriophages[J]. Letters in Applied Microbiology, 2004, 38(6): 499-504
- [62] Li HT, Wang MH, Zhao YM, Du Y, Zhang GZ, Gong JF. Judgement and prevention of phage pollution in production of yogurt[J]. China Dairy Industry, 2018, 46(3): 13-15 (in Chinese)
李海涛, 王慕华, 赵玉明, 杜盈, 张国柱, 宫俊峰. 酸奶生产中噬菌体污染的判断及防治[J]. 中国乳品工业, 2018, 46(3): 13-15
- [63] Pujato SA, Quiberoni A, Guglielmotti DM. Technological performance of spontaneous phage-resistant derivatives of *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc pseudomesenteroides* during milk fermentation[J]. International Dairy Journal, 2018, 78: 46-52
- [64] Lajoie MJ, Rovner AJ, Goodman DB, Aerni HR, Haimovich AD, Kuznetsov G, Mercer JA, Wang HH, Carr PA, Mosberg JA, et al. Genomically recoded organisms expand biological functions[J]. Science, 2013, 342(6156): 357-360
- [65] Foglizzo V, Marchiò S. Bacteriophages as therapeutic and diagnostic vehicles in cancer[J]. Pharmaceuticals, 2021, 14(2): 161
- [66] Duong MM, Carmody CM, Ma QQ, Peters JE, Nugen SR. Optimization of T4 phage engineering via CRISPR/Cas9[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 18229