

肠出血性大肠埃希菌 O157:H7 噬菌体 FEC14 和 FEC19 特性及污染牛肉杀菌潜在应用探究

李兆雪¹, 兰冠达¹, 范聪聪¹, 许翠婷¹, 龚云伟², 崔薇², 赵春燕^{*1}

1 吉林大学基础医学院病原生物学系, 吉林 长春 130021

2 长春市疾病预防控制中心微生物检验科, 吉林 长春 130033

李兆雪, 兰冠达, 范聪聪, 许翠婷, 龚云伟, 崔薇, 赵春燕. 肠出血性大肠埃希菌 O157:H7 噬菌体 FEC14 和 FEC19 特性及污染牛肉杀菌潜在应用探究[J]. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2741-2752

Li Zhaoxue, Lan Guanda, Fan Congcong, Xu Cuiting, Gong Yunwei, Cui Wei, Zhao Chunyan. Characterization of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 phages FEC14 and FEC19 and their potential use in contaminated beef[J]. Microbiology China, 2022, 49(7): 2741-2752

摘要: 【背景】肠出血性大肠埃希菌 O157:H7 是重要的食源性致病菌之一, 并且其耐药性越来越严重, 寻找裂解性强噬菌体用于防治大肠埃希菌感染具有广阔的应用前景。【目的】从环境中分离鉴定能特异裂解大肠埃希菌 O157:H7 的噬菌体, 通过对生物学特性及裂解细菌功效的探究, 为在食品安全防控中提供理论依据和研究基础。【方法】通过双层平板法分离并纯化噬菌体, 透射电镜观察噬菌体形态, 测定最佳感染复数、一步生长曲线、pH 稳定性、温度稳定性, 对噬菌体进行全基因组测序及噬菌体裂解细菌功效。【结果】2 株大肠埃希菌 O157:H7 噬菌体 FEC14 和 FEC19 的头部皆呈二十面体立体对称, FEC14 头部直径约 80 nm, 尾丝呈星形, FEC19 头部直径约 58 nm, 尾丝呈针形; 噬菌体 FEC14 的最佳感染复数为 0.001, 潜伏期为 15 min, 裂解期为 65 min, 平均暴发量为 156 PFU/cell, FEC19 的最佳感染复数为 0.1, 潜伏期为 10 min, 裂解期为 80 min, 平均暴发量为 800 PFU/cell; 噬菌体 FEC14 能在 60 °C、pH 4.0–11.0 条件下存活, 噬菌体 FEC19 在 70 °C、pH 5.0–9.0 条件下存活; FEC14 归类于有尾目(Caudovirales) Ackermannviridae 科 Kuttervirus 属, FEC19 归类于有尾目(Caudovirales)肌尾科(Myoviridae) Wifcevirus 属; 单一噬菌体或混合鸡尾酒法均能降低染菌牛肉中的细菌数量, 并且未发现已知毒力基因和耐药基因, 能控制大肠埃希菌 O157:H7 的污染。【结论】2 株大肠杆菌 O157:H7 噬菌体 FEC14 和 FEC19 特异性高、稳定性强、裂解效率高, 在控制食品中大肠埃希菌 O157:H7 污染的应用中具有很大潜力, 将来可以开发为食品防控制剂用于食品加工各个领域。

基金项目: 吉林省卫生健康技术创新项目(2020J032)

Supported by: Innovation Project from Health Commission of Jilin Province (2020J032)

*Corresponding author: E-mail: zhaocy@jlu.edu.cn

Received: 2021-11-17; Accepted: 2022-01-04; Published online: 2022-04-14

关键词：大肠埃希菌 O157；噬菌体；生物防控；鸡尾酒法

Characterization of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 phages FEC14 and FEC19 and their potential use in contaminated beef

LI Zhaoxue¹, LAN Guanda¹, FAN Congcong¹, XU Cuiting¹, GONG Yunwei², CUI Wei², ZHAO Chunyan^{*1}

¹ Department of Pathogenobiology, College of Basic Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, Jilin, China

² Department of Microbiology, Changchun Center for Disease Control and Prevention, Changchun 130033, Jilin, China

Abstract: **[Background]** *Escherichia coli* O157:H7 is one of the most important foodborne pathogens. The accelerated drug resistance of *E. coli* O157:H7 invokes the selection of phages with strong lytic properties to achieve the purpose of disease prevention and treatment with broad application prospects. **[Objective]** To isolate and identify lytic phages against *E. coli* O157:H7 and analyze their biological characteristics and bacteria-killing efficiency, which may provide insights into the research and application of phages. **[Methods]** Phages were isolated and purified using double-layer plate method, and their morphology was observed by transmission electron microscope (TEM). The optimal multiplicity of infection (MOI), one-step growth curve, pH and temperature stability were determined, and the whole genome of phages was sequenced. Lysis efficiency was determined by a single phage or cocktail method in contaminated beef. **[Results]** Two strains of lytic *E. coli* O157:H7 phages FEC14 and FEC19 were isolated and purified. According to TEM results, the heads of the two phages were both icosahedral, and FEC14 presented a head diameter of about 80 nm and star-shaped tail filaments, while FEC19 had a head diameter of about 58 nm and needle-shaped tail filaments. Moreover, FEC14 showed an optimal MOI of 0.001, the latent period of 15 min and the lysis period of 65 min with an average burst size of 156 PFU/cell, and FEC19 displayed an optimal MOI of 0.1, the latent period of 10 min and the lysis period of 80 min with an average burst size of 800 PFU/cell. FEC14 stabilized at 60 °C and pH 4.0–11.0, while FEC19 survived at 70 °C and pH 5.0–9.0. FEC14 belongs to the genus Kuttervirus, family Ackermannviridae, order Caudovirales, and FEC19 falls into the genus Wifcevirus, family Myoviridae, and order Caudovirales. The single phage or phage cocktail effectively inhibited the growth of host bacteria in the contaminated beef, and the two phages had no known virulence genes and drug resistance genes, showing great potential efficacy in the control of *E. coli* O157:H7 contamination. **[Conclusion]** Two strains of lytic *E. coli* O157:H7 phages FEC14 and FEC19 with high specificity, stability and lysis efficiency reveal their potential to be an alternative antimicrobial agent for food safety in the future.

Keywords: *Escherichia coli* O157; bacteriophage; biological control; cocktail method

肠出血性大肠埃希菌 (*enterohemorrhagic Escherichia coli*) O157:H7 是引起食物中毒最重要的细菌之一, 造成患者严重腹痛、腹泻, 甚至导致出血性肠炎、溶血性尿毒症和血栓性血小板减少性紫癜^[1], 严重者会死亡。大肠埃希菌 O157:H7 主要污染肉类食物以及蔬菜水果。从 1982 年分离到大肠埃希菌 O157:H7 之后, 其已在全球引起大量食源性疾病暴发^[2]。1996 年, 在日本超过 9 000 人感染大肠埃希菌 O157:H7, 11 人死亡^[3]。2006 年, 美国发生了多起污染菠菜导致的大肠埃希菌 O157 感染事件, 大约有 200 人被感染, 3 人死亡^[4], 此外, 美国每年大肠埃希菌 O157:H7 感染病例超过 73 000 例, 约 250 人死亡, 导致 4.05 亿美元的财产损失^[5]。1999 年, 我国江苏省和安徽省等地发生由 O157:H7 引起的食物中毒, 2 万多人发病, 177 人死亡^[6]。抗生素的应用虽然可以有效地杀死微生物, 但用于食品、肉类加工的消毒同样会造成安全问题。噬菌体是细菌的天然杀手, 大约有 10^{30-32} 种, 是细菌的 10 倍^[7], 在细菌性感染尤其是多重耐药菌感染的治疗和控制食品污染方面具有一定优势。少量的噬菌体就可以裂解细菌, 副作用小, 特异性高, 可以单独使用杀灭特定的菌型, 减少耐药性的产生, 获取较方便, 价格较低廉, 因此使用噬菌体控制食品潜在病原菌的策略在未来具有广阔的应用前景。

1 材料与方 法

1.1 菌株和污水样品

实验菌株均由吉林大学基础医学院病原生物学系保存^[8]。

污水样品来源于吉林省人民医院、吉林大学第一医院的污水处理中心。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

LB 肉汤培养基、LB 琼脂培养基, 北京陆桥

技术股份有限公司。PEG8000, 无锡市亚泰联合化工有限公司; DNase I 酶、RNase A 酶、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS), 福州飞净生物科技有限公司; 蛋白酶 K, Biosharp 公司; 噬菌体保存液(SM 液), 北京索莱宝科技有限公司。台式高速冷冻离心机, 太仓市华美生化仪器厂; 细菌恒温培养箱, 力辰科技有限公司; 透射电子显微镜, 电子公司; pH 仪, 上海仪电科学仪器股份有限公司; 超净工作台, 上海博讯实业有限公司。

1.3 裂解性噬菌体的初步筛选

将医疗污水用 0.22 μm 滤器过滤, 取 4 mL 滤液分别与 10 mL 处于对数生长期(OD_{600} 约为 0.2)的 14 株大肠埃希菌 O157:H7 菌液混合, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养过夜, 次日 10 000 r/min 离心 10 min, 再将上清液过滤去除残余的宿主菌, 取 100 μL 上清液与 300 μL 的宿主菌菌液混合, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5 min, 然后加入至 50 $^{\circ}\text{C}$ 左右的半固体培养基中再铺在事先制备的 LB 琼脂培养基表面制成双层琼脂平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜; 次日观察平板上是否有噬菌斑形成。

1.4 噬菌体的分离纯化及测定滴度

将单一噬菌斑接种宿主菌液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 4 h, 10 000 r/min 离心 5 min, 再用 0.45 μm 滤器过滤上清液, 得到的滤液即为噬菌体初纯液; 将噬菌体初纯液以 10 倍比稀释, 吸取稀释液与对应宿主菌液 1:1 混合与冷却至 50 $^{\circ}\text{C}$ 半固体培养基混合, 铺在固体琼脂表面而制成双层琼脂平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h; 每次挑取单一噬菌斑大致 3-5 次后, 可分离出纯化的单一噬菌体。计数平板上噬菌斑的数量可以推算出噬菌体的滴度, 用 PFU/mL 表示。

1.5 测定噬菌体宿主范围

将培养至对数生长期(OD_{600} 约为 0.2)的宿主菌, 包括大肠埃希菌、福氏志贺菌、伤寒沙门氏菌及金黄色葡萄球菌与 50 $^{\circ}\text{C}$ 的半固体培

培养基混合, 铺在 LB 固体培养基表面制成双层琼脂平板, 吸取纯化的噬菌体液点滴在不同宿主菌的平板上, 37 °C 培养过夜; 次日观察不同宿主菌平板上是否有噬菌斑产生。

1.6 测定噬菌体最佳感染复数(multiplicity of infection, MOI)

将 100 μL 宿主菌 O157:H7 与 MOI 分别为 0.000 1、0.001、0.01、0.1、1、10 噬菌体液 100 μL 混合, 37 °C、160 r/min 振荡培养 4 h, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液过滤, 测定噬菌体滴度。实验重复 3 次, 同时设置不加噬菌体的宿主菌液为对照组。噬斑滴度最高的感染复数即为噬菌体的最佳 MOI。

1.7 测定噬菌体一步生长曲线及暴发量

将 500 μL 最佳 MOI 的噬菌体与等体积宿主菌(3×10^8 CFU/mL)混合, 37 °C 培养 10 min, 10 000 r/min 离心 30 s, 洗涤沉淀 2 次, 吸取 1 mL 预热的 LB 肉汤培养基重悬沉淀, 再离心弃上清, 再吸取 1 mL LB 肉汤培养基重悬, 加入至 19 mL 肉汤培养基中, 37 °C、160 r/min 恒温振荡培养; 在 30 min 内, 每间隔 5 min 取样 1 mL, 在培养 30–100 min 内, 每间隔 10 min 取样 1 mL, 用 0.45 μm 滤器过滤, 所得噬菌体滤液按 10 倍比稀释测噬菌体滴度, 平行实验重复 3 次; 噬菌体的一步生长曲线以感染时间与噬菌体滴度的对数值[Log_{10} (PFU/mL)]相关性进行绘制。一步生长曲线可以反映噬菌体的潜伏期、暴发期与暴发量。暴发量(PFU/cell)=暴发末期噬菌体滴度/反应初期细菌浓度。

1.8 检测噬菌体的热稳定性和 pH 稳定性

(1) 噬菌体热稳定性

将噬菌体悬液(1×10^9 PFU/mL)分别在 50、60、70 和 80 °C 孵育, 并分别在 10、20、30、40、50 和 60 min 时取样, 测定各取样时间点的噬菌体滴度; 实验重复 3 次。

(2) 噬菌体 pH 稳定性

将噬菌体悬液(1×10^9 PFU/mL)分别接种 pH 1.0–14.0 的酸碱范围内的 LB 肉汤培养基中, 室温放置 1 h 后, 测定噬菌体滴度。实验重复 3 次。

1.9 透射电子显微镜观察噬菌体形态

参考《分子克隆实验指南》^[9]中关于 λ 噬菌体颗粒的 PEG/NaCl 沉淀提取方法进行噬菌体纯化颗粒制备, 噬菌体颗粒溶于 SM 缓冲液中, 4 °C 保存备用^[10]; 采用负染法处理噬菌体颗粒, 取 20 μL 噬菌体颗粒滴在铜网上在暗室吸收 15 min, 再用 2%磷钨酸染色 2 min, 样品干燥后透射电镜 80 kV 电压观察其形态。

1.10 噬菌体基因组的提取和鉴定

噬菌体基因组 DNA 提取方法参照文献[11]方法, 略有改进。纯化噬菌体颗粒首先用 DNase I (0.1 U/mL)和 RNase A (3 mg/mL)处理, 37 °C 水浴 1 h 以降解细菌核酸, 再加入 1 mg/mL 蛋白酶 K, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EDTA (pH 8.0)和 0.05% SDS, 56 °C 水浴 1 h; 加入等体积的 Tris-饱和酚提取; 再加入等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)提取; 最后加入等体积氯仿提取, 最后加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc (pH 7.2)及 2 倍体积的无水乙醇, -20 °C 冰箱过夜; 次日 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 弃上清, 用 1 mL 4 °C 预冷的 70%酒精洗涤离心后的沉淀, 用 TE 缓冲液溶解, 即可获得噬菌体 DNA。

1.11 细菌污染牛肉模型的制备

新鲜牛肉染菌的方法参照文献[11–12], 将牛肉切割为表面积约 2 cm \times 2 cm, 重约 2 g 的样品, PBS 缓冲液冲洗, 紫外线灭菌 60 min, 每隔 5 min 翻动样品, 使其充分灭菌。取 50 μL 的宿主菌液(2×10^5 CFU/mL)涂抹牛肉表面, 在生物安全柜中风干 15 min, 使菌液充分吸收, 用 5 mL PBS 缓冲液冲洗, 冲洗液 8 000 r/min 离心 1 min, 沉淀加入 1 mL PBS 缓冲液重悬, 最终牛肉样品染菌量为 1×10^4 CFU/mL。

1.12 单一噬菌体在 4 °C 和室温条件下对染菌牛肉杀菌效果评价

取 50 μL 噬菌体液均匀涂抹于污染牛肉样品表面, 记录样品上的噬菌体初始浓度, 对照样品涂抹等体积的 SM 缓冲液, 分别在 4 °C 和室温下培养, 平行实验重复 3 次。

每隔 1 h 取样, 取样方法为将处理后的牛肉样品放入 5 mL PBS 缓冲液中, 160 r/min 振荡 10 min, 弃除牛肉样本, 8 000 r/min 离心 1 min, 沉淀中加入 1 mL PBS 缓冲液重悬, 重复 3–5 次, 去除噬菌体。菌悬液倍比稀释进行活菌计数, 计算出经噬菌体杀菌后染菌牛肉存活细菌数量。

1.13 鸡尾酒噬菌体在 4 °C 和室温条件下对染菌牛肉杀菌效果评价

将噬菌体 FEC14 和 FEC19 的宿主菌混合培养, 混合细菌污染的牛肉样品的制备方法同上。在染菌样品表面均匀涂抹 25 μL 的 FEC14、FEC19 鸡尾酒噬菌体液, 同样以等体积的 SM 缓冲液作为对照, 分别在 4 °C 和室温下培养, 按上述步骤计时取样并对宿主菌计数, 评价鸡尾酒噬菌体的杀菌功效, 平行实验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 噬菌体的分离及其滴度测定

分离纯化得到 2 株裂解性噬菌体, 分别命名为 FEC14 和 FEC19。FEC14 形成直径 1–2 mm 圆形、透明、无晕环噬斑, 如图 1A 所示。而噬菌体 FEC19 形成直径 3–5 mm 较大的同样噬斑, 见图 1B。它们的滴度分别为 10^{11} PFU/mL 和 10^{10} PFU/mL。

2.2 噬菌体宿主范围的测定

噬菌体 FEC14 裂解了所有的 14 株大肠埃希菌 O157:H7, 裂解率为 100% (14/14); 而噬菌体 FEC19 裂解率为 78.5% (11/14)。这 2 株噬菌体均不裂解非 O157:H7 大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、伤寒沙门菌和痢疾志贺菌(表 1)。

2.3 噬菌体最佳感染复数(MOI)的测定

噬菌体 FEC14 在 MOI 为 0.001 时, 其滴度最大, 产生的子代噬菌体最多; 而 FEC19 在 MOI 为 0.1 时滴度最大, 如图 2 所示。因此, 噬菌体 FEC14 的最佳 MOI 为 0.001, 而噬菌体 FEC19 的最佳 MOI 为 0.1。

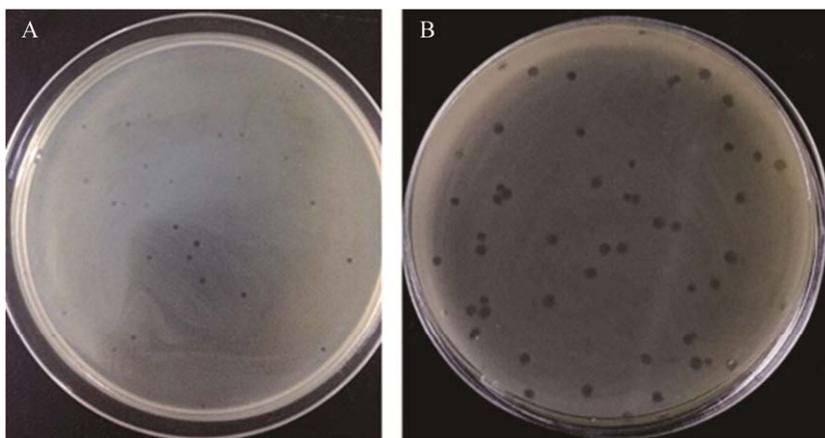


图 1 FEC14 (A)和 FEC19 (B)噬菌体纯化后的噬斑形态

Figure 1 Morphology of plaques after purification of plaques formed by FEC14 (A) and FEC19 phages (B).

表 1 噬菌体 FEC14 和 FEC19 裂解宿主菌范围

Table 1 Lysis range analysis of phage FEC14 and FEC19

菌株名称 Strain name	菌株数量 Strain number	噬菌体 FEC14 裂解菌株数/裂解率(%) Phages FEC14 lysis strain number /lysis rate (%)	噬菌体 FEC19 裂解菌株数/裂解率(%) Phages FEC19 lysis strain number /lysis rate (%)
<i>E. coli</i> ATCC 23716	1	0(0)	0(0)
<i>E. coli</i> O157:H7	14	14(100)	11(78.5)
<i>E. coli</i> O22:H8	1	0(0)	0(0)
<i>E. coli</i> O26:H11	2	0(0)	0(0)
<i>E. coli</i> O46:H38	1	0(0)	0(0)
<i>E. coli</i> O111:NM	1	0(0)	0(0)
<i>E. coli</i> O5:NM	1	0(0)	0(0)
<i>E. coli</i> O113:K75:H21	1	0(0)	0(0)
<i>E. coli</i> *	4	0(0)	0(0)
伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella typhi</i>	1	0(0)	0(0)
痢疾志贺菌 <i>Shigella dysenteriae</i>	1	0(0)	0(0)
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	1	0(0)	0(0)

注: *: 未知血清型

Note: *: Unknown serotype.

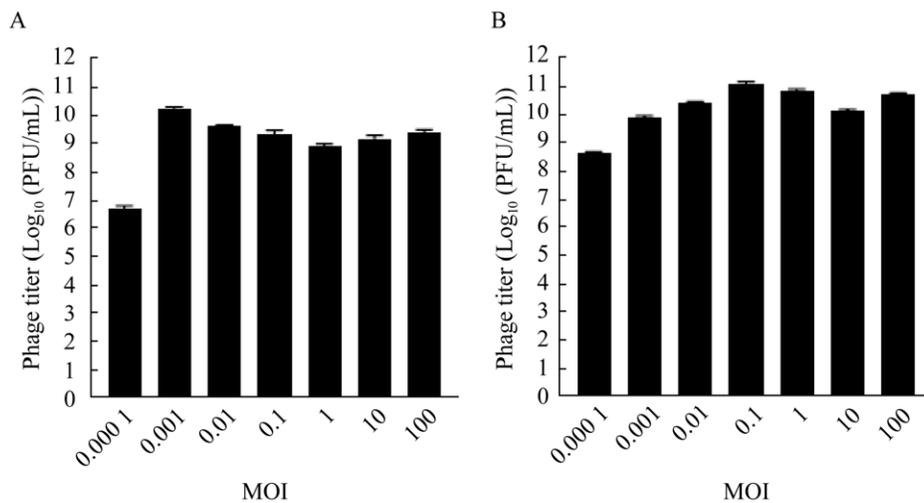


图 2 噬菌体 FEC14 (A)和 FEC19 (B)最佳感染复数测定

Figure 2 The multiplicity of infection of phage FEC14 (A) and FEC19 (B).

2.4 噬菌体一步生长曲线及暴发量的测定

噬菌体一步生长曲线显示(图 3A), 噬菌体 FEC14 感染过程大约为 80 min, 其中潜伏期为 15 min, 裂解期为 65 min, 每个宿主菌平均暴发大约 156 PFU 噬菌体; FEC19 感染

过程需要 90 min, 潜伏期为 10 min, 裂解期为 80 min, 暴发量平均为 800 PFU/cell (图 3B), 因此噬菌体 FEC19 感染宿主菌持续时间、潜伏期、裂解时间和暴发量都优于噬菌体 FEC14。

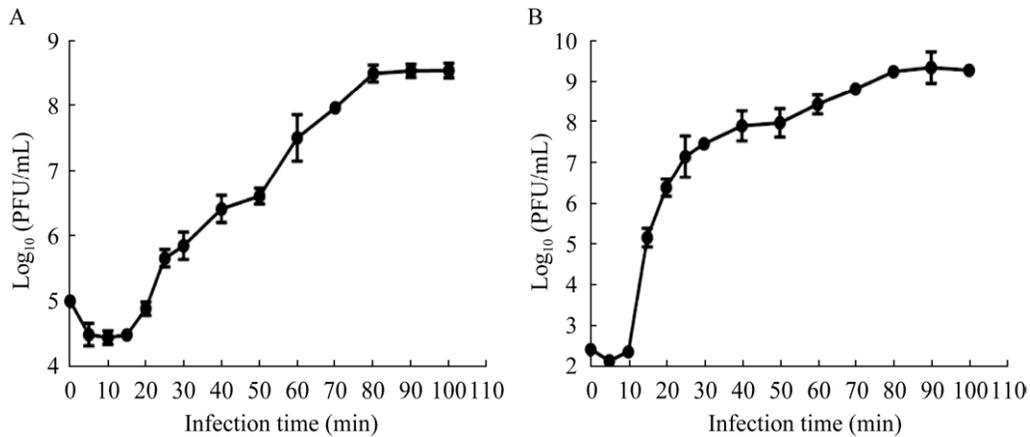


图3 噬菌体 FEC14 (A)和 FEC19 (B)的一步生长曲线

Figure 3 One-step growth curve of phage FEC14 (A) and FEC19 (B).

2.5 噬菌体稳定性的测定

(1) 噬菌体在 50–80 °C 条件下稳定性

2 株噬菌体在 50–80 °C 条件下裂解效率均有较明显的变化, 噬菌体 FEC14 对温度更加敏感, 而 FEC19 相对更稳定。在 50 °C 时 2 个噬菌体裂解效率保持不变, 60 °C 时均下降, 70 °C 时噬菌体 FEC14 在 40 min 内裂解率急剧下降直至失活, 而 FEC19 在 60 min 内裂解效率下降了 40% 左右, 而在 80 °C 时 20 min 内完全失活, 具体结果见图 4。

(2) 噬菌体在不同 pH 下的稳定性

在 pH 1.0–14.0 的环境下, 1 h 之内 2 株噬菌体的裂解率各有不同。噬菌体 FEC14 在 pH 3.0 或 12.0 时噬菌体滴度明显下降, 在 pH 4.0–11.0 条件下仍保持较高的存活率, 而在 pH < 3.0 或 > 12.0 时噬菌体失活。噬菌体 FEC19 对酸碱环境比较敏感, 在 pH 5.0–9.0 条件下保持较高的活力, 在 pH 4.0、10.0 和 11.0 时噬菌体活力下降, 在 pH < 4.0 或 > 11.0 的条件下几乎检测不到存活的噬菌体(图 5)。

2.6 噬菌体形态学观察

从图 6 可见, 噬菌体 FEC14 的头部为二十面体立体对称, 直径大约为 80 nm, 其尾丝为星形放射状, 按照 ICTV 的分类, FEC14 归类于有尾噬菌体目(Caudovirales) Ackermannviridae 科 Kuttavirus 属; 图 7 显示噬菌体 FEC19 头部同样呈二十面体立体对称, 直径约为 58 nm, 而其尾丝呈针形, 其分类归属于有尾噬菌体 Caudovirales 目肌尾科(Myoviridae) Wifcevirus 属。

2.7 噬菌体基因组分析

测序结果显示: 噬菌体 FEC14 基因组为长度 158 639 bp 的双链 DNA, GC 含量为 44.6%。含有 209 个开放阅读框架(open reading frame, ORF), 有 4 种 tRNAs ($tRNA^{Ser}$ 、 $tRNA^{Asn}$ 、 $tRNA^{Ile}$ 和 $tRNA^{other}$)。噬菌体 FEC14 的基因组信息上传至 GenBank, 登录号为 MG383452。

噬菌体 FEC19 基因组长度为 68 472 bp, GC 含量为 46.1%, 经分析编码有已知功能蛋白的基因为 14 个, 不含 tRNA。噬菌体 FEC19 的基因组信息上传至 GenBank, 登录号为 MH816966。

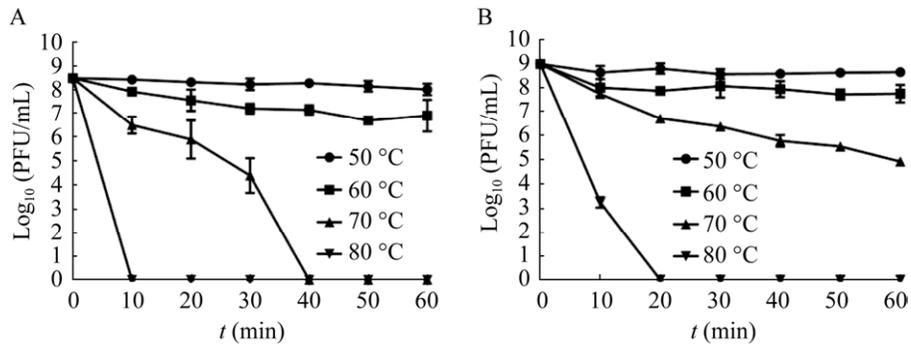


图 4 噬菌体 FEC14 (A)和 FEC19 (B)在 50–80 °C 条件下的稳定性

Figure 4 Stability of phage FEC14 (A) and FEC19 (B) at temperatures ranging from 50–80 °C.

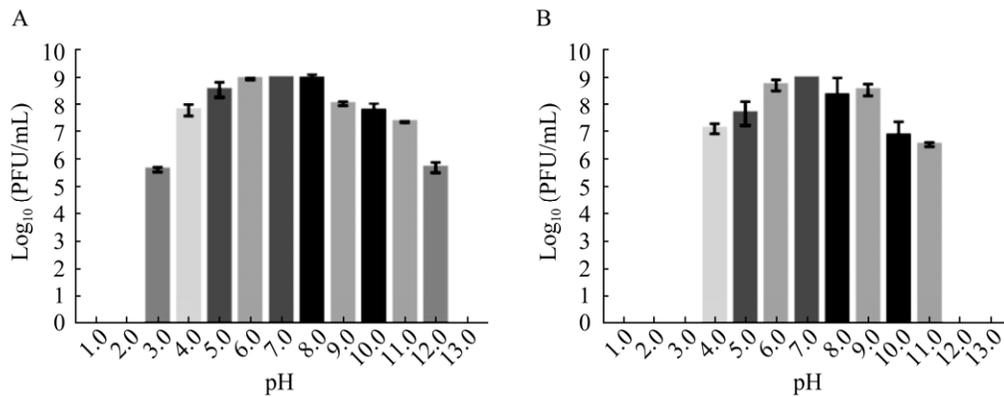


图 5 噬菌体 FEC14 (A)和 FEC19 (B)的酸碱稳定性

Figure 5 Stability of phage FEC14 (A) and FEC19 (B) under different pH conditions.

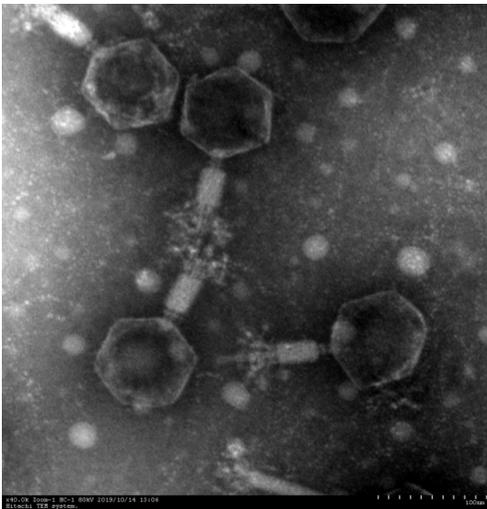


图 6 透射电子显微镜下噬菌体 FEC14 的形态

Figure 6 Transmission electron microscopy of phage FEC14.



图 7 透射电子显微镜下噬菌体 FEC19 的形态

Figure 7 Transmission electron microscopy of phage FEC19.

在 2 个噬菌体基因组中未检索到已知的毒力基因和耐药基因。

2.8 单一噬菌体 FEC14 或 FEC19 在 4 °C 和室温条件下对染菌牛肉杀菌效果评价

分析噬菌体 FEC14 和 FEC19 在室温和 4 °C 条件下单独杀死染菌牛肉中大肠埃希菌 O157:H7 的效果, 结果表明: 在 4 °C 条件下, 噬菌体 FEC14 处理组细菌浓度在 5 h 内减少了约 1.1 Log_{10} (CFU/mL), 噬菌体 FEC19 的处理组细菌浓度减少了约 1.9 Log_{10} (CFU/mL), 而对照组中相对处理组的细菌浓度基本不变(图 8)。

在室温条件下, 噬菌体 FEC14 在最初 1 h 内使牛肉中细菌数量减少了约 1.1 Log_{10} (CFU/mL), 随后细菌浓度逐渐升高, 5 h 时仅上升了 0.8 Log_{10} (CFU/mL), 而对照组中的细菌浓度在 5 h 内不断升高, 上升了约 1.4 Log_{10} (CFU/mL); 噬菌体 FEC19 在 3 h 内使牛肉宿主菌数量减少了大约 1.8 Log_{10} (CFU/mL), 随后细菌数量逐渐升高, 5 h 时相比 1 h 时增加了 1.3 Log_{10} (CFU/mL),

而对照组中的细菌浓度在 5 h 内升高了 1.6 Log_{10} (CFU/mL), 无论 4 °C 还是室温条件下, 噬菌体 FEC19 的杀菌效果比 FEC14 好, 而且由图 8 可知, 2 株噬菌体在 4 °C 条件下的杀菌效果好于室温条件下的杀菌效果。

2.9 鸡尾酒噬菌体在 4 °C 和室温条件下对染菌牛肉杀菌效果评价

鸡尾酒噬菌体 FEC14 和 FEC19 用于杀死牛肉样品中污染的 *E. coli* O157:H7 的效果见图 9。4 °C 时, 使用鸡尾酒噬菌体 1 h 之后牛肉中细菌数量减少了 1.7 Log_{10} (CFU/mL), 之后维持在一定浓度, 对照组细菌浓度在 5 h 内基本保持稳定。室温条件下, 鸡尾酒噬菌体处理 1 h 后细菌浓度减少了 2.0 Log_{10} (CFU/mL), 之后的 4 h 细菌浓度缓慢上升, 在 5 h 时比 1 h 时上升了 0.7 Log_{10} (CFU/mL), 而对照组细菌浓度在 5 h 之内呈明显上升的趋势。综上, 在室温条件下、在一定时间内鸡尾酒噬菌体将细菌控制在较低的浓度, 减缓了细菌繁殖速度。

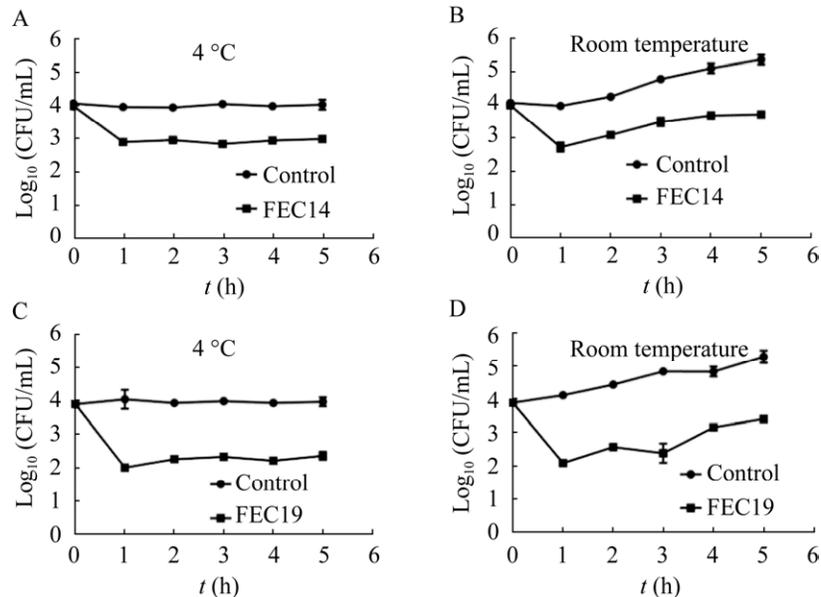


图 8 单一噬菌体 FEC14 (A 和 B) 或 FEC19 (C 和 D) 在 4 °C 和室温条件下对染菌牛肉杀菌效果

Figure 8 Efficiency of single phage FEC14 (A and B) or FEC19 (C and D) on killing *E. coli* O157:H7 artificially contaminated beef at 4 °C and room temperature.

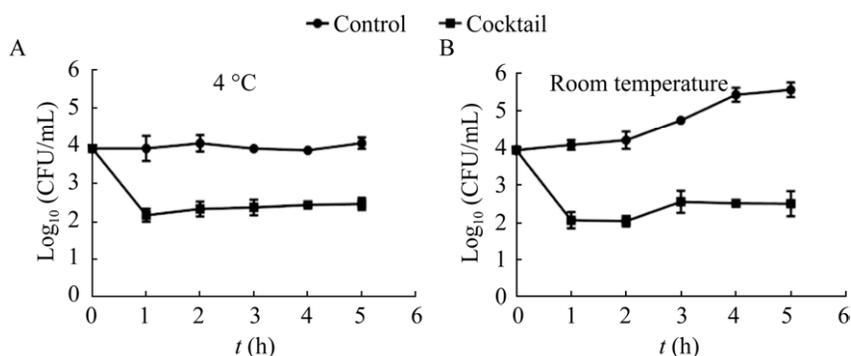


图9 鸡尾酒噬菌体在4 °C (A)和室温条件下(B)对染菌牛肉的杀菌效果

Figure 9 Efficiency of phage cocktail against *E. coli* O157:H7 artificially contaminated beef at 4 °C (A) and room temperature (B).

3 讨论

食源性大肠埃希菌引起的腹泻是全球公共卫生问题,其中肠出血性大肠埃希菌 O157:H7 是引起食物中毒最重要的细菌之一。开发操作简便、绿色环保和高效灭菌的生物制剂是食品安全领域重要的研究方向。噬菌体裂解细菌具有特异性强、裂解效率高、研制周期短和对动植物无害等优点,如果应用在食品处理、加工等环节可预防和减少致病菌对食品的污染和疾病的暴发。美国已开发出3种噬菌体制剂,分别是李斯特菌的噬菌体制剂 ListShield™、大肠埃希菌 O157:H7 的噬菌体制剂 EcoShield™ 和沙门氏菌的噬菌体制剂 SalmoFresh™^[13]。这3种噬菌体制剂都已通过美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)和美国农业部食品安全与检验局(Food Safety and Inspection Service, FSIS)的批准,可以商品化销售。我国作为发展中国家,食品安全愈加受到重视,应积极开展噬菌体产品的开发和研究。

本研究中从医院污水中分离纯化2株特异性裂解大肠埃希菌 O157:H7 的噬菌体 FEC14 和 FEC19。2株噬菌体头部呈二十面体立体对称和有一个可收缩的尾部,噬菌体 FEC14 头部要比

FEC19 的偏大,尾丝呈现星状。根据国际病毒命名委员会 ICTV 最新噬菌体分类标准, FEC14 属于有尾目(Caudovirales) Ackermannviridae 科 Kuttervirus 属; FEC19 归类于有尾目(Caudovirales) 肌尾科(Myoviridae) Wifcevirus 属。2株噬菌体裂解细菌特异性高,均裂解大肠埃希菌 O157:H7,其中 FEC14 裂解率(100%, 14/14)高于 FEC19 的裂解率(78.5%, 11/14),均不裂解非 O157:H7 大肠埃希菌、伤寒沙门菌、痢疾志贺菌和金黄色葡萄球菌。最佳感染复数 MOI 是衡量噬菌体裂解效率的重要指标,对指导噬菌体治疗剂量或食品安全应用剂量具有重要意义。本研究中噬菌体 FEC14 和 FEC19 的 MOI 分别为 0.001 和 0.1, FEC14 裂解宿主菌的能力高于 FEC19。每个噬菌体有其独特生长周期,一步生长曲线能定量测定裂解性噬菌体的生长规律,反映噬菌体潜伏期的长短、裂解量大小等特性,是衡量噬菌体裂解能力的一个重要生物学指标。噬菌体 FEC14 潜伏期为 15 min,裂解期为 65 min,平均暴发量为 156 PFU/cell;噬菌体 FEC19 潜伏期 10 min,裂解期 80 min,平均暴发量为 800 PFU/cell,2个噬菌体均是潜伏期短、裂解期长、暴发量高的噬菌体,都能高效地裂解和控制细菌生长繁殖。了解噬菌体在

不同环境下的生存状况对其应用也是非常必要的。噬菌体 FEC14 在较高温度(如 60 °C)、较大 pH 范围条件下(如 4.0–11.0)仍有较高的活力, 而 FEC19 同样在 70 °C、pH 5.0–9.0 的条件下保持其活力。同样, Lee 等报道分离的大肠埃希菌 O157 噬菌体 BECP2 和 BECP6 在 60 °C 其裂解能力依然很高, 而 70 °C 其活力才下降^[14], 这些特性能够保证它们未来在制备、运输和应用等方面适应各种环境变化, 保持较高的裂解效率。

食品生产加工的卫生条件是保证人们健康的重要因素, 而食源性致病菌通常蓄积在食品加工器皿中、接触食品的物体表面, 甚至餐具洗涤棉中, 因此会导致食源性致病菌的交叉污染。目前, 控制食品中大肠埃希菌 O157:H7 污染主要采用消毒剂或抗生素, 这些方法都会对人类健康有一定危害。然而噬菌体只侵袭特定的细菌, 对环境对人类无危害, 因此在食品加工、储存、销售各个环节都可以使用噬菌体。目前有很多试验证实噬菌体在肉制品、工作台表面或新鲜的蔬菜中都能有效地控制菌株 O157:H7 的生长, 如 O'Flynn 等^[15]将 2×10^2 CFU/mL 大肠埃希菌 O157 点种在肉制品上, 37 °C 培养 1 h 后, 用 2×10^8 CFU/mL 这 4 种噬菌体鸡尾酒法处理肉制品能减少细菌生长, 同样 Hong 等^[16]用 10^7 CFU/mL 大肠埃希菌 O157:H7 使牛肉馅、菠菜和奶酪分别染菌, 再用 MOI=1 的 3 种噬菌体鸡尾酒处理这 3 种食品, 室温 24 h 后, 牛肉馅中细菌量减少 2 Log₁₀ (CFU/mL), 菠菜减少 3 Log₁₀ (CFU/mL), 而奶酪中细菌数量无变化。本实验用 1×10^4 (CFU/mL) 染菌牛肉, 在 4 °C 和室温条件下分别用 FEC14 和 FEC19 单一噬菌体处理牛肉, 其牛肉杀菌效果和鸡尾酒疗法差不多, 但是鸡尾酒疗法可以覆盖更广泛宿主菌范围, 而且在鸡尾酒疗法中每个噬菌体的用量比单一噬

菌体少, 达到事半功倍的效果^[17]。

4 结论

从污水中新分离大肠埃希菌 O157:H7 的 2 株噬菌体 FEC14 和 FEC19, 通过对它们形态、稳定性、生长特性、基因组信息等生物学特性及对染菌牛肉杀菌效果的研究, 未来它们可以作为食品安全防控制剂有效地控制大肠埃希菌 O157:H7 污染。

REFERENCES

- [1] Obata F, Obrug T. Role of shiga/vero toxins in pathogenesis[J]. *Microbiology Spectrum*, 2014, 2(3): 10.1128/microbiolspec.EHEC-10.1128/microbiolspec.0005-2013
- [2] Yang SC, Lin CH, Aljuffali IA, Fang JY. Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development[J]. *Archives of Microbiology*, 2017, 199(6): 811-825
- [3] Iijima Y, Honda T. Characteristics and molecular biology of verotoxin produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli*[J]. *Nihon Rinsho Japanese Journal of Clinical Medicine*, 1997, 55(3): 646-650
- [4] Grant J, Wendelboe AM, Wendel A, Jepson B, Torres P, Smelser C, Rolfs RT. Spinach-associated *Escherichia coli* O157: H7 outbreak, Utah and new Mexico, 2006[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2008, 14(10): 1633-1636
- [5] Lee JH, Kim YG, Cho HS, Ryu SY, Cho MH, Lee J. Coumarins reduce biofilm formation and the virulence of *Escherichia coli* O157:H7[J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(8/9): 1037-1042
- [6] 张平平, 朱叶飞, 朱凤才. 肠出血性大肠埃希菌 O157:H7 感染分子流行病学方法研究进展[J]. *中国病原生物学杂志*, 2009, 4(12): 939-942
Zhang PP, Zhu YF, Zhu FC. Advances in the methods of molecular epidemiology of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157 : H7 infection[J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2009, 4(12): 939-942 (in Chinese)
- [7] Li S, Lu SG, Huang H, Tan L, Ni QS, Shang WL, Yang Y, Hu Z, Zhu JM, Li M, et al. Comparative analysis and characterization of enterobacteria phage SSL-2009a and 'HK578likevirus' bacteriophages[J]. *Virus Research*, 2019, 259: 77-84

- [8] Li F, Zhao CY, Zhang WD, Cui SH, Meng JH, Wu J, Zhang DY. Use of ramification amplification assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other *E. coli* Shiga toxin-producing strains[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(12): 6086-6090
- [9] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002
Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. Huang PT, trans. 3rd ed. Beijing: Science Publishing Press, 2002 (in Chinese)
- [10] Soni KA, Nannapaneni R. Bacteriophage significantly reduces *Listeria monocytogenes* on raw salmon fillet tissue[J]. *Journal of Food Protection*, 2010, 73(1): 32-38
- [11] Bao H, Zhang H, Wang R. Isolation and characterization of bacteriophages of *Salmonella enterica* serovar pullorum[J]. *Poultry Science*, 2011, 90(10): 2370-2377
- [12] Bigwood T, Hudson JA, Billington C, Carey-Smith GV, Heinemann JA. Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat[J]. *Food Microbiology*, 2008, 25(2): 400-406
- [13] Moyer ZD, Woolston J, Sulakvelidze A. Bacteriophage applications for food production and processing[J]. *Viruses*, 2018, 10(4): 205
- [14] Lee YD, Park JH. Characterization and application of phages isolated from sewage for reduction of *Escherichia coli* O157:H7 in biofilm[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2015, 60(1): 571-577
- [15] O'Flynn G, Ross RP, Fitzgerald GF, Coffey A. Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(6): 3417-3424
- [16] Hong Y, Pan Y, Ebner PD. Meat science and muscle biology symposium: development of bacteriophage treatments to reduce *Escherichia coli* O157:H7 contamination of beef products and produce1[J]. *Journal of Animal Science*, 2014, 92(4): 1366-1377
- [17] Carter CD, Parks A, Abuladze T, Li MR, Woolston J, Magnone J, Senecal A, Kropinski AM, Sulakvelidze A. Bacteriophage cocktail significantly reduces *Escherichia coli* O157:H7 contamination of lettuce and beef, but does not protect against recontamination[J]. *Bacteriophage*, 2012, 2(3): 178-185