

# 小肠结肠炎耶尔森氏菌噬菌体的分离鉴定 及在鲜切蔬菜中的靶向抑菌作用

张羽嘉, 薛宇, 高璐, 欧阳敏, 肖丽霞, 杨振泉\*

(扬州大学食品科学与工程学院, 江苏扬州 225127)

**摘要:** 为研发食品中小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Y. enterocolitica*, Ye)的生物抑菌剂,对从动物粪便样品中分离纯化的1株Ye噬菌体Yep-YZU 01进行生物学特性、pH、热稳定性分析,并探究Yep-YZU 01在鲜切蔬菜模型中的靶向抑菌效果。透射电镜结果表明:Yep-YZU 01头部呈现正六面体结构,具有带尾鞘的尾巴,形态归属于肌尾噬菌体科;Yep-YZU 01具有跨种裂解特性,能同时裂解Ye及福氏志贺氏菌;一步生长曲线测定结果显示Yep-YZU 01潜伏期约为10 min,爆发期约为120 min;在pH为7~10条件下Yep-YZU 01存活率较高,最适温度在40℃以下。应用培养基及鲜切蔬菜作为模型测定Yep-YZU 01靶向抑菌效果,结果能使鲜切莴苣中Ye总数下降2.10 lg CFU/g。获得的噬菌体Yep-YZU 01具有广谱高效的裂解特性,在鲜切蔬菜中Ye的生物控制中具有良好的应用前景。

**关键词:** 小肠结肠炎耶尔森氏菌;噬菌体;鲜切蔬菜;抑菌;生物控制;烹饪卫生

**中图分类号:** TS 972.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 2095-8730(2019)02-0043-05

小肠结肠炎耶尔森氏菌(Ye)是一种重要的人兽共患病原菌,具有嗜冷性,通常在冷藏、冷冻食品中检出。食用Ye污染的食品常会引起急性肠炎、发热、淋巴结肠炎和血性腹泻等食物中毒症状。<sup>[1]</sup>

近年来,生吃蔬菜已成为餐饮消费的潮流,主要加工方式为凉拌或是制成沙拉,生食蔬菜产品既能够保持蔬菜爽脆的口感,也能避免营养素的流失。<sup>[2]</sup>由于Ye广泛存在于污水、肥料之中,导致蔬菜在栽培、采收过程中极易受到污染。另一方面,由于Ye的嗜冷性,在冷藏鲜切蔬菜中仍会繁殖生长,<sup>[3]</sup>导致产品贮藏过程中Ye载量增加。因此,在鲜切蔬菜原料处理、加工、包装以及贮藏运输过程中采取有效的Ye抑菌措施,对于保证鲜切蔬菜的卫生安全,防止食源性疾病的爆发具有极为重要的意义。

针对蔬菜产品的物理杀菌方法易于破坏蔬菜的新鲜感,导致营养素流失,而化学杀菌易导致有害物残留。噬菌体是一类能感染细菌、真菌、放线菌或螺旋体的病毒,普遍认为对人体无害。目前

部分噬菌体制剂已被美国FDA认定GRAS级产品,用于食品中李斯特菌和沙门氏菌的控制,<sup>[4]</sup>但在国内尚无类似的产品。本研究采用双层平板法对环境中的Ye的裂解性噬菌体进行分离纯化,并应用莴苣作为蔬菜模型研究Ye噬菌体分离株在蔬菜中的抑菌效果,旨在为进一步开发鲜切蔬菜专用Ye靶向生物控制剂奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

菌株 *Yersinia enterocolitica* CICC 21669、*Vibrio parahaemolyticus* CICC 21617、*Staphylococcus aureus* CICC 21600、*Escherichia coli* EPEC CICC 10664、*Salmonella enterica* subsp. *Enterica* CICC 21513、*Shigella flexneri* CICC 21534、*Bacillus cereus* CICC 21261 均购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。

### 1.2 菌株培养

取100 μL Ye菌株CICC 21669保藏液,接种5 mL LB液体培养基后混匀,37℃振荡培养过夜;

收稿日期:2019-04-05 \*通信作者

基金项目:江苏省人兽共患病重点实验室开放课题(R1508);扬州大学2016年科技创新团队培养对象资助项目(2016-05)

作者简介:张羽嘉(1997-),女,江苏苏州人,扬州大学食品科学与工程学院本科生,从事食品质量与安全控制研究;

杨振泉(1975-),男,江苏南通人,扬州大学食品科学与工程学院教授,博士,从事食品微生物检测与控制研究。

培养物运用平板稀释涂布法测定细菌浓度(CFU/mL),备用。

### 1.3 噬菌体分离及纯化

新鲜动物粪便样品采集自扬州市农贸市场和养殖场,冰盒保存,3 h内运送至实验室用于分析。将5 mL样品滤过液及100  $\mu$ L菌株CICC 21669过夜培养物加入5 mL LB液体培养基中,37  $^{\circ}$ C摇床过夜;8 000 r/min离心10 min,上清液过无菌微孔滤膜(0.22  $\mu$ m)获得噬菌体原液,于4  $^{\circ}$ C保存备用。参照相关文献纯化噬菌体并测定效价。<sup>[5]</sup>

### 1.4 噬菌体生物学特征分析

#### 1.4.1 噬菌体的形态观察

将20  $\mu$ L噬菌体液滴于微孔铜片上,吸附15 min,室温干燥。2%磷钨酸(PTA)染色10 min,室温干燥后用透射电镜观察。<sup>[6]</sup>

#### 1.4.2 噬菌体裂解性测定

滴加10  $\mu$ L噬菌体稀释液在细菌培养物双层平板的标注位置上,观察裂解圈的形成情况。若能够形成裂解圈,采用双层平板法测定PFU/mL并计算成斑效率(Efficiency of Plating, EOP)。测试菌株的EOP, EOP(成斑效率) = 测试菌株噬菌斑形成单位(PFU/mL) / 宿主菌Ye CICC 21669噬菌斑形成单位(PFU/mL)  $\times$  100%。

#### 1.4.3 噬菌体一步生长曲线测定

参照文献方法,<sup>[5]</sup>将噬菌体与宿主菌液以MOI大于10的比例混合,置于恒温培养箱中25  $^{\circ}$ C,150 r/min培养。以10~15 min间隔取样并测定效价,绘制一步生长曲线。

### 1.5 噬菌体pH及热稳定性分析

取900  $\mu$ L不同pH(3.0~11.0) LB培养基与100  $\mu$ L的噬菌体纯培养液混匀,37  $^{\circ}$ C水浴1 h,测定效价。热稳定性测定方法如下:取500  $\mu$ L噬菌体液于4、20、30、40、50、60、70  $^{\circ}$ C水浴处理1 h,结束后取样立即置于4  $^{\circ}$ C冷却,测定效价。

噬菌体热稳定性计算公式如下:噬菌体热稳定性 = (试验组噬菌体效价/对照组噬菌体效价)  $\times$  100%。

### 1.6 噬菌体Yep-YZU 01对Ye的抑制作用

#### 1.6.1 噬菌体Yep-YZU 01在培养基中的抑菌效应分析

按照MOI = 10及MOI = 100加入200  $\mu$ L宿主菌和200  $\mu$ L噬菌体悬液(试验组)于10 mL LB

液体培养基中;设置对照组为200  $\mu$ L宿主菌和200  $\mu$ L LB培养基,于37  $^{\circ}$ C恒温培养,每隔8 h取样,测定。 $OD_{600\text{ nm}} \text{抑制率} = (OD_{600\text{ nm}} \text{对照组} - OD_{600\text{ nm}} \text{实验组}) / OD_{600\text{ nm}} \text{对照组} \times 100\%$ 。

#### 1.6.2 噬菌体Yep-YZU01在鲜切蔬菜模型中的抑菌效应

新鲜茼蒿购自扬州农贸市场,去皮后切成厚度为2 mm茼蒿片,参照文献运用100 mg/L次氯酸钠浸泡5 min除菌,无菌水漂洗5次,在无菌超净工作台中自然吹干,每10 g样品作为一组,分装至灭菌聚乙烯薄膜袋中备用。<sup>[7]</sup>

无菌处理的茼蒿片样品分为A、B、C 3组接种菌液。A组(试验组):每片茼蒿上滴加Ye菌液(7.0 lg CFU/mL) 100  $\mu$ L,无菌操作台中自然晾干;随后在同一位置滴加200  $\mu$ L噬菌体悬液(7.0 lg PFU/mL)至样品中,覆盖接菌位置。B(对照组):按A组接菌处理后,滴加200  $\mu$ L SM缓冲溶液覆盖接菌位置作为对照。C组(空白组):取100  $\mu$ L生理盐水及200  $\mu$ L SM缓冲溶液滴加至茼蒿片样品上,作为空白对照。每个处理设置3个平行试验,处理后的样品在室温下作用15 min,然后置于26  $^{\circ}$ C恒温培养箱中恒温保藏,分别于0、2、4、6、8、16和24 h取样,测定细菌总数和噬菌体效价,并分析抑菌效果。

## 2 结果与分析

### 2.1 噬菌体分离与纯化

以Ye CICC 21669为宿主菌,应用双层平板法从样品中成功分离获得1株噬菌体,编号为Yep-YZU 01。噬菌斑形态如图1. A所示,直径0.5~1.0 mm,裂解圈透亮。噬菌体纯化3次后,测得噬菌体效价为11.46 lg PFU/mL。将噬菌体进行梯度稀释点斑,不同浓度噬菌体在Ye茼蒿上形成清澈的抑菌斑,结果如图1. B所示,随着噬菌体浓度的降低至7.0 lg PFU/mL,噬菌斑由清亮透明逐渐变成半透明(5号位置),结果表明噬菌体Yep-YZU 01对宿主菌CICC 21669具有良好的裂解能力。

### 2.2 噬菌体微观形态观察结果

图2为噬菌体Yep-YZU 01在透射电镜下的微观形态,该噬菌体头部呈正多面体结构,直径约112.5 nm,尾部长约257.5 nm,带有收缩性的尾鞘。根据ICTV分类标准,Yep-YZU 01归属

于有尾噬菌体目肌尾噬菌体科。

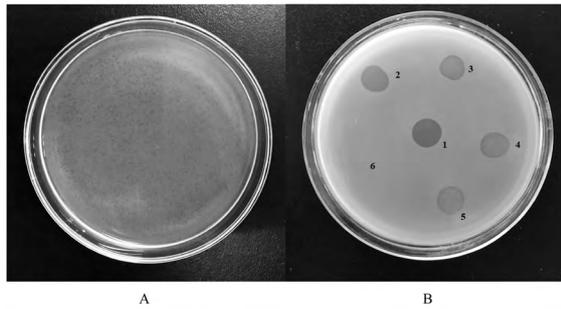


图1 噬菌体 Yep - YZU 01 的噬菌斑形态

注:图 A 为纯化后的噬菌斑形态;图 B 为不同 Yep - YZU 01 稀释液在 Ye CICC 21669 平板上的点斑裂解结果 其中 1 噬菌体浓度为 11.0 lg PFU/mL、2 为 10.0 lg PFU/mL、3 为 9.0 lg PFU/mL、4 为 8.0 lg PFU/mL、5 为 7.0 lg PFU/mL β 为 SM 缓冲液的空白对照组。

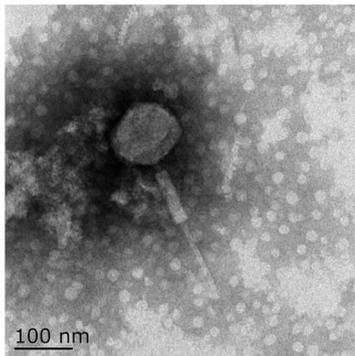


图2 噬菌体 Yep - YZU 01 透射电镜下的形态结构

2.3 噬菌体裂解谱测定结果

表 1 显示噬菌体 Yep - YZU 01 除了可以对宿主菌 CICC 21669 裂解外 还可以裂解福氏志贺氏菌 且形成的噬菌斑清晰透亮、EOP 达到 0.88 ± 0.08 而对沙门氏菌 CICC 21513、副溶血性弧菌 CICC 21617、金黄色葡萄球菌 CICC 21600、肠道致病性大肠杆菌 CICC 10664 则没有裂解作用 说明噬菌体 Yep - YZU 01 具有跨种裂解能力 可以用于 Ye 和福氏志贺氏菌混合污染的生物控制。

2.4 噬菌体一步生长曲线

噬菌体 Yep - YZU 01 的一步生长曲线如图 3 所示。从图 3 可以看出 潜伏期为 120 min 爆发期 60 min 随后保持稳定 显示噬菌体进入稳定期 裂解量为 10 PFU/cell。

2.5 噬菌体 pH 稳定性

Yep - YZU 01 的 pH 稳定性结果如图 4 所示。在 pH 6.0 ~ 11.0 范围内 噬菌体保持在较高

水平的效价 具有良好和稳定的裂解活性。噬菌体在 pH > 9.0 的条件下仍保持较高的存活率 (84.6% 以上); 当 pH < 6.0 噬菌体活性显著下降; pH 3.0 时几乎完全失活。

表 1 噬菌体 Yep - YZU 01 裂解范围

菌株	编号	裂解性	成斑效率 (EOPs)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	CICC 21669	++	(1.00)
<i>Shigella flexneri</i>	CICC 21534	++	(0.88 ± 0.08)
<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	CICC 21513	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CICC 21617	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	CICC 21600	-	-
<i>Escherichia coli EPEC</i>	CICC 10664	-	-

注: ++ 表示裂解圈清晰; - 表示无裂解圈。

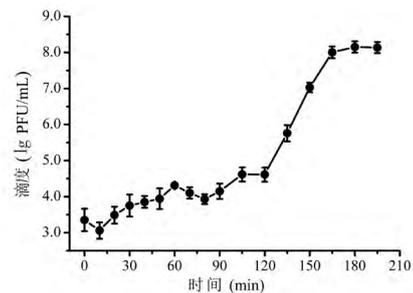


图3 噬菌体 Yep - YZU 01 的一步生长曲线

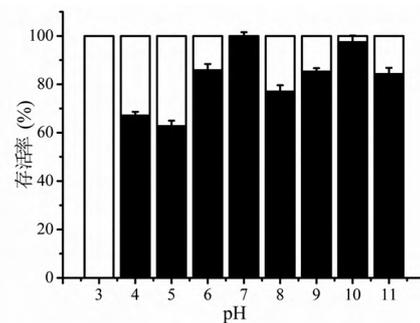


图4 噬菌体 Yep - YZU 01 的 pH 稳定性

2.6 噬菌体热稳定性

噬菌体热稳定性试验结果如图 5 所示。与初始噬菌体相比 4、20、30 °C 处理 60 min 下的噬菌体活性无明显变化; 40 及 50 °C 下作用 60 min 噬菌体存活率下降较明显; 经 60 °C 处理 60 min 后 噬菌体活性显著下降; 而在 70 °C 条件下作用 60 min 噬菌体基本失活。结果表明噬菌体 Yep - YZU 01 不耐高温 但在 50 °C 以下其稳定性较好,

适合在低温环境下用于宿主菌的控制。

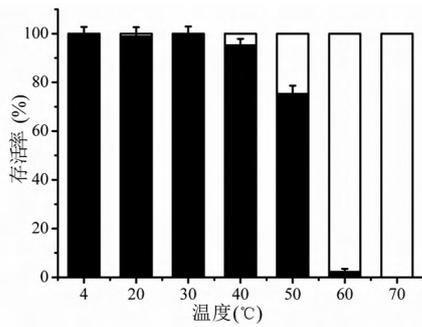


图5 噬菌体 Yep - YZU 01 的热稳定性

### 2.7 Yep - YZU 01 在培养基中对宿主菌的抑菌效果分析

噬菌体 Yep - YZU 01 对宿主菌的抑菌效果如图6所示。在37 °C恒温下,试验组OD值上升缓慢,并且始终低于对照组。在培养8 ~ 16 h阶段,对照组中宿主菌快速繁殖( $OD_{600\text{ nm}} = 0.30$ ),试验组细菌生长始终缓慢( $OD_{600\text{ nm}} = 0.04$ )。结果显示噬菌体在37 °C条件下能显著抑制Ye繁殖。MOI = 10时,噬菌体在16、32、48、72 h的抑制率分别达到81.86%、80.00%、74.27%和57.04%; MOI = 100时,噬菌体抑制率在16、32、48、72 h分别达到93.81%、76.57%、62.90%和52.37%。说明噬菌体 Yep - YZU 01 在培养基中对Ye生长具有良好的抑制作用。

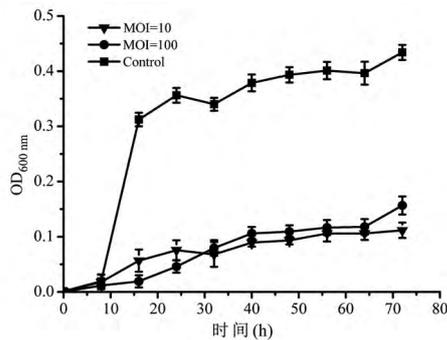


图6 37 °C恒温下噬菌体 Yep - YZU 01 在培养基中的抑菌效果

### 2.8 Yep - YZU 01 在鲜切蔬菜模型中的抑菌效果分析

应用莴苣作为鲜切蔬菜模型评价 Yep - YZU 01 在常温保藏条件下的抑菌效果,结果如图7所示。结果显示对照组(未加噬菌体)中细菌总数呈显著上升趋势,26 °C恒温贮藏32 h,细菌总数由2.2 lg CFU/g上升至7.5 lg CFU/g;试验组(噬菌体处理)细菌总数呈先下降后上升趋势,贮藏

期内细菌总数由2.2 lg CFU/g上升至4.4 lg CFU/g,细菌总数显著低于对照组( $P < 0.01$ )。在贮藏8 h,试验组Ye降至最低值,比初始值减少了1.23 lg CFU/g,比对照组减少了2.10 lg CFU/g。结果表明噬菌体在鲜切莴苣中具有显著抑制Ye的效果。贮藏24 h内的噬菌体效价如图8所示,噬菌体 Yep - YZU 01 在鲜切莴苣中0 ~ 8 h内数量显著上升,后期(8 ~ 24 h)噬菌体数量维持在7.5 lg PFU/g水平,表明在鲜切莴苣中能保持较为稳定的活性。

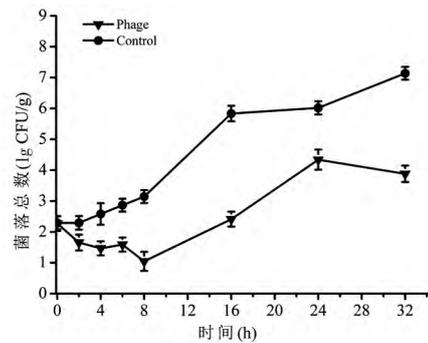


图7 鲜切莴苣26 °C保藏中细菌总数测定结果

注:图中方形数据点表示模拟Ye污染的莴苣样品经过 Yep - YZU 01 处理后细菌总数(Phage),圆形数据点表示模拟污染莴苣样品经过缓冲液处理后测得的细菌总数(control)。

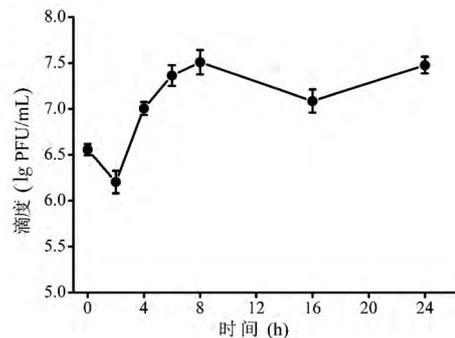


图8 鲜切莴苣26 °C保藏中噬菌体效价测定结果

## 3 讨论

近年来鲜切蔬菜因其新鲜、健康、高营养的品质,方便、快捷的优势,受到广大消费者的青睐,<sup>[8]</sup>鲜切蔬菜的品质和安全问题也日益引起大家重视。本研究获得了1株Ye高效裂解噬菌体 Yep - YZU 01,并且在培养基和鲜切莴苣模型中具有良好抑菌效果,与传统生鲜蔬菜消毒方法比较,抑菌效率与文献结果<sup>[9]</sup>类似,但是安全性更高,

并且对蔬菜品质没有影响。本研究中 Yep - YZU 01 噬菌体属于尾病毒目肌尾噬菌体科,经 12 h 培养后 效价高达  $11 \lg$  PFU/mL,并具有良好的 pH 稳定性及热稳定性,在未来工业化规模制备中有利于获得高效价的噬菌体制剂。Yep - YZU 01 对 Ye 和福氏志贺氏菌均具裂解效果,具有跨种裂解特性,相比文献报道的噬菌体具有更宽的抑菌谱。噬菌体 Yep - YZU 01 的一步生长曲线表明潜伏期为 120 min 左右,爆发期在 60 min 左右,与文献<sup>[10]</sup>相比, Yep - YZU 01 的潜伏期较长。因此,噬菌体 Yep - YZU 01 在鲜切蔬菜中 Ye 和福氏志贺氏菌混合污染的靶向控制中具有良好的应用前景。

#### 参考文献:

- [1] SIRGHANI K, ZEINALI T, JAMSHIDI A. Detection of *Yersinia enterocolitica* in Retail Chicken Meat, Mashhad, Iran [J]. *Journal of Pathogens*, 2018, 2018(8): 1 - 4.
- [2] RICO D, MART N - DIANA A B, BARAT J M, et al. Extending and measuring the quality of fresh - cut fruit and vegetables: a review [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2007, 18(7): 373 - 386.
- [3] FRANCIS G A, THOMAS C, O' BEIRNE D. The microbiological safety of minimally processed vegetables [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2010, 34(1): 1 - 22.
- [4] GARC A P, MART NEZ B, OBESO J M, et al. Bacteriophages and their application in food safety [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, 47(6): 479 - 485.
- [5] BAO H, ZHANG H, WANG R. Isolation and characterization of bacteriophages of *Salmonella enterica* serovar Pullorum [J]. *Poultry Science*, 2011, 90(10): 2370 - 2377.
- [6] 周祥莹, 张灿, 刘文华, 等. 鸡白痢沙门氏菌及其噬菌体 vB - SpuS - Spp4 的分离鉴定 [J]. *病毒学报*, 2018, 34(2): 239 - 243.
- [7] ADAMS M R, HARTLEY A D, COX L J. Factors affecting the efficacy of washing procedures used in the production of prepared salads [J]. *Food Microbiology*, 1989, 6(2): 69 - 77.
- [8] LIANG M, MIN Z, BHANDARI B, et al. Recent developments in novel shelf life extension technologies of fresh - cut fruits and vegetables [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, 64: 23 - 38.
- [9] 吴思, 程妍, 石健春, 等. 生鲜蔬菜消毒方法的比较 [J]. *湖北农业科学*, 2016, 55(7): 1795 - 1799.
- [10] 刘均洪, 张兴跃. 噬菌体在监测和控制食源性疾病中的应用 [J]. *食品科技*, 2008, 33(7): 243 - 246.

## Isolation and identification of *Yersinia enterocolitica* phage and its antibacterial effect in fresh - cut vegetables

ZHANG Yujia, XUE Yu, GAO Lu, OUYANG Min, XIAO Lixia, YANG Zhenquan\*

( College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225127, China)

**Abstract:** In order to develop biocontrol agents effectively inhibiting *Yersinia enterocolitica* (Ye), the biological characteristics, pH stability, thermal stability of the phage of a strain, Yep - YZU01, isolated and purified from fecal samples and its targeting antibacterial effect were investigated with a fresh - cut vegetable model. The results showed that Yep - YZU01 had a regular hexahedral head and a sheathed tail, belonging to the family of Myoviridae, as observed with transmission microscopy. It could dissociate Ye and shigella simultaneously with the characteristics of cross - species cracking. The one - step growth curve demonstrated that Yep - YZU01 had an incubation period of about 10 min and an explosion period of about 120 min and grew well at pH of 7 - 10 and temperature of below 40 °C. Yep - YZU01 could reduce the total number of Ye in fresh - cut lettuce by  $2.10 \lg$  CFU/g.

**Key words:** *Yersinia enterocolitica*; phage; fresh - cut vegetables; antibacterial effect; biocontrol; culinary hygiene

(责任编辑: 赵 勇)