



赵远洋,舒梅,吴国平,等.沙门氏菌烈性噬菌体JN-S202001的分离、鉴定及其应用于即食鸭脖的抑菌效果[J].江西农业大学学报,2022,44(6):1520-1528.

ZHAO Y Y,SHU M,WU G P,et al.A virulent bacteriophage against *Salmonella*:isolation,characterization and application as A bio-control agent in ready-to-eat duck neck[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis,2022,44(6):1520-1528.

# 沙门氏菌烈性噬菌体 JN-S202001 的分离、鉴定及其应用于即食鸭脖的抑菌效果

赵远洋,舒梅,吴国平\*,毕妍,潘红,钟婵

(江西农业大学 食品科学与工程学院,江西 南昌 330045)

**摘要:**【目的】沙门氏菌是一种常见的食源性致病菌,研究其天然杀菌剂——烈性噬菌体对于防控沙门氏菌污染食品安全风险具有理论意义和实践应用价值。【方法】研究以食品中分离的沙门氏菌作为宿主菌,采用双层平板噬菌斑法,从生活污水中分离、纯化烈性噬菌体,鉴定其生物学特性和全基因组序列,评估该噬菌体在沙门氏菌模拟污染即食鸭脖中的抑菌效果。【结果】分离纯化了一株沙门氏菌的烈性噬菌体,命名为JN-S202001(GenBank 登录号:OL502173.1)。该噬菌体最佳感染复数(MOI)为0.01,潜伏期和裂解期分别为5 min和80 min,裂解量67 PFU/cell。成斑效率法显示,JN-S202001对42株沙门氏菌中的9株具有裂解活性。该噬菌体在30~60 °C和pH 2~11内保持较高的活性稳定性。JN-S202001基因组为111 256 bp双链DNA,G+C含量约40%,编码184个开放阅读框(ORF),不含已知编码毒力、抗生素耐药性和溶源性的基因。透射电镜和系统发育分析表明,JN-S202001属于有尾噬菌体目长尾噬菌体科。模拟沙门氏菌污染即食鸭脖4 °C条件下放置48 h,经添加JN-S202001处理样品中沙门氏菌从起始的4.1 Log<sub>10</sub> CFU/g降低至2.07 Log<sub>10</sub> CFU/g,这相比未添加噬菌体的对照组减少了1.3 Log<sub>10</sub> CFU/g沙门氏菌,显示该噬菌体可极显著降低即食鸭肉中污染沙门氏菌活菌数量( $P<0.01$ )。【结论】研究新分离、鉴定的一株烈性噬菌体JN-S202001,具有优良的沙门氏菌杀菌功能,有望作为一种天然杀菌剂用于沙门氏菌防控,以提高食品卫生安全。

**关键词:**沙门氏菌;烈性噬菌体;生物学特性;即食鸭脖;生物抑菌剂

中图分类号:TS207.4;Q939.48 文献标志码:A 文章编号:1000-2286(2022)06-1520-09

## A Virulent Bacteriophage Against *Salmonella*: Isolation, Characterization and Application as a Biocontrol Agent in Ready-to-eat Duck Neck

ZHAO Yuanyang, SHU Mei, WU Guoping\*, BI Yan, PAN Hong, ZHONG Chan

(College of Food Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

**Abstract:** [Objective] *Salmonella* is a common foodborne pathogen. Studying its natural fungicide-virulent phage has both theoretical significance and practical application value for preventing and controlling the

收稿日期:2022-04-14 修回日期:2022-06-30

基金项目:国家自然科学基金地区项目(32160608)

Project supported by the National Natural Science Foundation of China(32160608)

作者简介:赵远洋,博士研究生,orcid.org/0000-0001-6445-9740,1242994683@qq.com;\*通信作者:吴国平,教授,博士,博士生导师,主要从事食品微生物检测及安全控制研究,orcid.org/0000-0001-7797-7627,jdwgp@163.com。

food safety risk of *Salmonella* contamination. **[Method]** In this study, *Salmonella* strains isolated from food was used as host bacteria, a phage was isolated and purified from domestic sewage by double-layer plate plaque method, and its biological characteristics and full genome sequence were identified. Finally, the inhibition of *Salmonella* by the phage was evaluated in ready-to-eat duck neck. **[Results]** A lytic phage against *Salmonella*, named JN-S202001, was isolated and characterized. The biological characteristics of JN-S202001 showed that the optimal multiplicity of infection (MOI) was 0.01. The latent period and lysis period of JN-S202001 was 5 min and 80 min, respectively, and the burst size was 67 PFU/cell. JN-S202001 was relatively stable under the range of temperatures (30–60 °C) and pH (2–11). It exhibited lytic activities against 9 out of 42 *Salmonella* strains. The JN-S202001 genome had 111, 256-bp double-stranded DNA molecules, with a total of 184 open reading frames (ORFs) and 40% of G+C content. No known virulence-associated, antibiotic and lysogeny-related genes were identified in JN-S202001. The morphological and phylogenetic analyses indicated that JN-S202001 belong to the family *Siphoviridae* in the order *Caudovirales*. The number of *Salmonella* simulated contaminated in JN-S202001-treated ready-to-eat duck meat reduced from the initial 4.1 Log<sub>10</sub> CFU/g to 2.07 Log<sub>10</sub> CFU/g after storage 48 h at 4 °C, which was 1.3 Log<sub>10</sub> CFU/g *Salmonella* less than that in the control group without JN-S202001. The results indicated that JN-S202001 could significantly reduce the number of live *Salmonella* in food ( $P < 0.01$ ). **[Conclusion]** A virulent phage JN-S202001, newly isolated and identified in this study, had excellent bactericidal effect on *Salmonella*, which can be used as a potential natural bactericide for the control of *Salmonella* in food.

**Keywords:** *Salmonella*; lytic phage; biological characterization; ready-to-eat; duck neck; biological control agent

**【研究意义】**近年来食源性病原菌引起的感染事件逐年增加,是全球公共卫生关注的焦点问题<sup>[1]</sup>。全球每年约 15 亿腹泻病人,其中 70% 是由污染食源性致病菌食品引起。我国仅 2021 年 5 月就有食物中毒事件 28 起,共 963 例,其中微生物性食物中毒事件 9 起,共 593 例,分别占 32.14% 和 61.58%<sup>[2]</sup>。沙门氏菌(*Salmonella*)在自然界中血清型众多,人和温血动物的肠道是其主要栖息环境,并可通过其排泄物污染环境甚至进入食品链,造成食源性疾病的传播<sup>[3]</sup>。15~20 CFU 低剂量沙门氏菌(*Salmonella*)就可能引起腹痛、腹泻、呕吐等症状,严重者可能造成死亡。大多数由沙门氏菌引起的感染归因于食用了被污染的禽畜肉、鸡蛋、牛奶、生菜等食品<sup>[4]</sup>。王赞等<sup>[5]</sup>抽检 2018 年 6–10 月河北省部分地区市售猪肉馅及冷鲜鸡食品,共检测出沙门氏菌阳性样品 144 份,阳性检出率高达 63%。2019 年 10 月一起食用肠炎沙门氏菌污染糕点引起 596 个病例<sup>[6]</sup>。随着抗生素的滥用,大量抗生素通过禽畜粪便和食物链释放到环境中,导致抗生素耐药细菌及其耐药基因的选择和传播<sup>[7]</sup>。因此亟须开发防控食源性致病菌的新型抗菌剂。**【前人研究进展】**噬菌体(phage)是一类专门感染细菌的病毒,1915 年和 1917 年由 TWORT 和 d' Herelle 发现,由于其具有自我复制、特异性高、环境中含量丰富等优点,可被用于治疗细菌感染<sup>[8–9]</sup>。此外,口服噬菌体鸡尾酒对健康人体受试者无副作用,未观察到荨麻疹或过敏症状,与口服安慰剂的对照组相比,试验组的血液理化指标和肠道菌群结构无显著差异,显示噬菌体对人体具有良好的安全性<sup>[10]</sup>。有研究表明,烈性噬菌体可以有效降低食品中受污染的沙门氏菌含量<sup>[11–12]</sup>。Atterbury 等<sup>[13]</sup>从屠宰场、家禽养殖场废水中分离 3 株沙门氏菌噬菌体,其应用可在 24 h 内使盲肠内容物中肠炎沙门氏菌降低约 2.19~4.2 Log<sub>10</sub> CFU/g。Duc 等<sup>[14]</sup>从鸡皮、鸡胃中分离得到的 5 株噬菌体组成鸡尾酒,处理鼠伤寒沙门氏菌模拟污染肠炎鸡肉样品,8 °C 和 25 °C 条件下放置,沙门氏菌分别降低 1.86 Log<sub>10</sub> CFU/块和 2.21 Log<sub>10</sub> CFU/块。烈性噬菌体也可用于控制多重抗生素耐药细菌的生长。Zhao 等<sup>[15]</sup>研究表明,利用 4 种噬菌体处理胡萝卜种植土壤中耐四环素大肠杆菌和耐氯霉素铜绿假单胞菌,显著降低了该系统中原病原菌和相应抗生素抗性基因的丰度。**【本研究切入点】**即食性卤制鸭脖具有独特的风味和口感,深受消费者喜爱,但由于其加工、流通环节多,且不再加热而直接食用,增加致病菌污染引起的食品安全风

险<sup>[16-17]</sup>。沈托等<sup>[18]</sup>在2011—2019年调查发现,熟肉制品中沙门氏菌的污染率为3.91%,路边摊点食品沙门氏菌阳性检出率更高(7.84%)。因此,开发噬菌体抑菌剂有望用于食品中沙门氏菌污染防控,对提高食品卫生安全具有理论参考价值和实践应用前景。【拟解决的关键问题】利用本研究室从食品中分离的沙门氏菌作为宿主,从生活污水中分离纯化沙门氏菌烈性噬菌体,对噬菌体进行生物学鉴定、全基因组测序,并初步测定其用于即食鸭脖污染沙门氏菌的抑菌效果,以期新型天然噬菌体抑菌剂的研制开发提供依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

沙门氏菌菌株:本研究室2018—2019年分离来自南昌市农贸市场的鸡肉和猪肉等食品,经理化和分子生物学鉴定,但未鉴定血清型;沙门氏菌(ATCC BAA-708)及大肠杆菌O157:H7(9490)菌株由美国麻省大学食品科学系Robert E. Levin教授馈赠;沙门氏菌(BNCC185946、BNCC336875)购自北纳生物有限公司;以上菌株均保存于本研究室-80℃冰箱。污水样品为江西农业大学菜市场附近的生活污水池塘。即食卤制鸭脖为市售新鲜食品。

LB营养肉汤培养基(北京陆桥技术有限责任公司);PEG 8000、3%磷钨酸负染色液(北京索莱宝科技有限公司);DNase I, RNase A(日本TaKaRa公司);柱式DNA核酸提取试剂盒(哈尔滨元亨生物药业有限公司);镁盐(saline magnesium, SM)缓冲液。

### 1.2 仪器与设备

HFsafe-1200LC生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司);UV 6100A紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公司);pHS-3E pH计(上海佑科仪器仪表有限公司);TS-2102C恒温摇床(上海天呈实验仪器制造有限公司);SHP-160型生化培养箱(上海三发科学仪器有限公司);GL-21M高速冷冻离心机(湖南湘仪仪器开发有限公司)。

### 1.3 试验方法

**1.3.1 细菌培养** 参考何学文等<sup>[19]</sup>方法,将活化后的沙门氏菌于37℃、180 r/min条件下培养过夜后,以3%的比例转接至10 mL LB培养液中,37℃、180 r/min培养至指数期( $OD_{600nm} \approx 0.5$ ),取1 mL菌液,4℃、12 000 r/min离心10 min,沉淀重悬于1 mL灭菌生理盐水备用。

**1.3.2 噬菌体的分离、纯化** 参考文献[11]的分离方法,2020年11月采自江西农业大学菜市场附近生活污水500 mL,加氯化钙至终浓度1 mmol/L,充分混匀后室温静置2 h。4℃、3 000 r/min离心10 min,上清经0.22 μm滤膜过滤。取滤液50 mL,加等体积2×LB液体培养基,再加指数期沙门氏菌3 mL,37℃、180 r/min培养过夜。将培养液4℃、5 000 r/min,离心10 min。上清液经0.22 μm滤膜过滤后,滤液即为噬菌体原液。

将噬菌体原液用SM缓冲液按10倍梯度稀释至适当浓度。取稀释液100 μL与等体积的指数期沙门氏菌混匀,静置15 min后与7 mL的LB半固体培养基混匀倒入LB固体培养基上,冷却后37℃倒置培养直至出现噬菌斑。

用无菌枪头挑取大而透明的噬菌斑于1 mL SM缓冲液中,37℃、200 r/min震荡过夜。次日将SM缓冲液4℃、12 000 r/min离心10 min,取上清液100 μL与等体积指数期沙门氏菌混匀后加入5 mL LB液体培养基中,37℃、200 r/min培养至液体澄清。培养液经高速离心,取上清液经0.22 μm滤膜过滤。滤液用SM缓冲液10倍梯度稀释制双层平板,37℃倒置培养过夜后挑取单个噬菌斑。重复上述操作3~5次,直至噬菌斑的形态大小基本一致。双层平板法测定噬菌体效价,每个梯度重复3次。

**1.3.3 噬菌体最佳感染复数(multiplicity of infection, MOI)** 参考Wang等<sup>[20]</sup>的方法,调整沙门氏菌浓度至 $1 \times 10^8$  CFU/mL。用SM缓冲液调节噬菌体效价,使最终噬菌体的感染复数为100~0.000 001。分别取噬菌体液和宿主菌液各500 μL混匀静置15 min后加入LB液体培养基5 mL,37℃、200 r/min培养4 h。双层平板法计算噬菌体效价,每组3个平行,效价最高的为最佳感染复数。

**1.3.4 噬菌体一步生长曲线** 参考高明明等<sup>[21]</sup>的方法,取噬菌体液与指数期沙门氏菌各1 mL按最佳

MOI(MOI=0.01)混匀,静置 10 min 后 12 000 r/min 离心 2 min,沉淀用 LB 液体培养基洗涤 2 次后重悬于 37 °C 的 10 mL LB 液体培养基中。37 °C, 200 r/min 培养 185 min, 在 0, 2, 5 min 时分别取样, 5~15 min 时每隔 5 min 取样 1 次, 15~45 min 时每隔 10 min 取样 1 次, 45~185 min 时每隔 20 min 取样 1 次。样品离心过滤后上清液用双层平板法计算噬菌体效价, 每组重复 3 次。

**1.3.5 噬菌体裂解谱** 采用成斑效率(efficiency of plating, EOP)法测定噬菌体裂解谱。EOP 值表示噬菌体感染不同细菌后产生子代噬菌体的能力。EOP 值越高则噬菌体对该细菌的裂解能力越强: EOP $\geq$ 0.5 为高裂解能力, 0.1 $\leq$ EOP $<$ 0.5 为中等裂解能力, 0.001 $\leq$ EOP $<$ 0.1 为低裂解能力, EOP $\leq$ 0.001 认为无裂解能力<sup>[22]</sup>。

**1.3.6 噬菌体 pH 稳定性和热稳定性** 参考侯志余等<sup>[23]</sup>的方法, 将效价约 10<sup>9</sup> PFU/mL 的噬菌体液分装至 12 个 1.5 mL 无菌离心管中, 每管 300  $\mu$ L, 于 30~80 °C 的水浴锅中水浴 1 h, 随后以双层平板法测定其效价, 每组实验重复 3 次。用 HCl 和 NaOH 调节 SM 缓冲液 pH 至 2~13, 分别取 100  $\mu$ L 噬菌体液加入 900  $\mu$ L 各 pH 值的 SM 缓冲液中, 37 °C 水浴 1 h, 随后以双层平板法测定其效价, 每组实验重复 3 次。

**1.3.7 噬菌体电镜观察** 参考 Li 等<sup>[24]</sup>的方法, 富集后的噬菌体悬液加入 DNase I 和 RNase A 至终浓度为 1  $\mu$ g/mL, 37 °C 水浴 1 h。然后加入终浓度为 1 mol/L 的氯化钠, 混匀后冰浴 2 h, 4 °C, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液加入终浓度为 10% 的 PEG 8 000, 冰浴搅拌过夜, 使噬菌体充分沉淀。次日 4 °C, 15 000 r/min 离心 30 min, 弃上清液, 沉淀用 2 mL SM 缓冲液重悬, 双层平板法测定效价。浓缩后的噬菌体液用无明胶的 SM 缓冲液稀释至 10<sup>9</sup> PFU/mL。铜网在噬菌体液中浸泡 5 min 后取出置于滤纸上干燥 2 min, 再将铜网放入 3% 磷钨酸中浸泡 2 min, 取出干燥 5 min, 在透射电镜下观察。

**1.3.8 噬菌体的核酸提取和基因组测序** 根据柱式 DNA 核酸提取试剂盒说明书提取核酸。将噬菌体核酸样品交由上海翰宇生物科技有限公司进行全基因组测序。用 BLAST-N(NCBI)分析核酸序列。使用 RAST(<https://rast.nmpdr.org/>)预测并注释开放阅读框架(ORF)。噬菌体基因组图谱由 CGviewServer(<http://cgview.ca/>)生成。利用抗生素耐药性基因数据库(<http://arpcard.mcmaster.ca>)和毒力因子数据库(<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>)进行抗生素耐药性和毒力因子相关基因的筛选。使用 MEGA Version 7.0 软件以 2 000 次 bootstrap 重复的 UPGMA 方法构建系统发育树<sup>[24]</sup>。

**1.3.9 噬菌体对即食性鸭脖中沙门氏菌的抑制作用** 参考 Li 等<sup>[24]</sup>的方法, 将 100  $\mu$ L 噬菌体悬液(终浓度为 10<sup>8</sup> PFU/g)接种到 10 g 沙门氏菌阴性的市售新鲜即食卤制鸭脖, 以 SM 缓冲液处理作为对照组。然后分别加入终浓度为 10<sup>2</sup> CFU/g 和 10<sup>4</sup> CFU/g 的沙门氏菌。样品在室温下静置 10 min 晾干表面水分后, 在 4 °C 条件下保存 48 h。每 24 h 采集样品 1 次, 稀释至适当倍数后取 100  $\mu$ L 涂布于 SS 琼脂培养基上, 37 °C 倒置过夜培养后计数沙门氏菌落总数。

**1.3.10 数据计算方法** 噬菌体效价与成斑效率 EOP 计算公式如下:

$$\text{噬菌体效价 (phage titer)} = \text{噬菌斑个数 (PFU)} \times \text{稀释倍数} / 0.1 \text{ mL} \quad (1)$$

$$\text{成斑效率 (EOP)} = \text{噬菌体对被测细菌的效价} / \text{噬菌体对宿主细菌的效价} \quad (2)$$

## 2 结果与分析

### 2.1 噬菌体分离纯化及透射电镜观察

以沙门氏菌 2089b 为宿主菌, 从生活废水中分离到一株烈性沙门氏菌噬菌体, 命名为 JN-S202001。双层平板上形成的噬菌斑形态大小基本一致, 斑块透明且不带晕圈(图 1A)。透射电镜观察结果表明, JN-S202001 具有直径约 73 nm 呈立体对称结构的头部, 长约 233 nm 不收缩且柔韧的尾部, 符合有尾噬菌体目长尾噬菌体科特征(图 1B)。

### 2.2 噬菌体最佳感染复数(MOI)及一步生长曲线测定

不同 MOI 下噬菌体的效价见表 1。MOI 由 100 降至 0.01 时, 噬菌体效价不断升高, 在 MOI=0.01 时达到最大值 7.5 $\times$ 10<sup>10</sup> PFU/mL。表明 JN-S202001 最佳 MOI 为 0.01。

一步生长曲线结果显示, JN-S202001 潜伏期较短, 为 5 min, 爆发期持续时间较长, 共 80 min, 在 85 min 左右达到稳定期, 裂解量为裂解末期噬菌体效价(1.6 $\times$ 10<sup>9</sup> PFU/mL)与感染初期宿主菌量(2.4 $\times$ 10<sup>7</sup> CFU/mL)之比, 约 67 PFU/cell(图 2)。

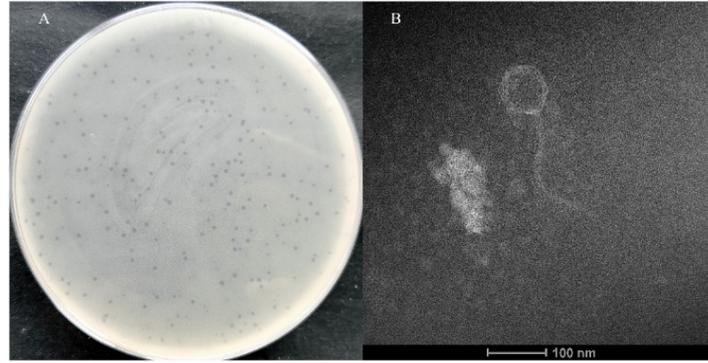


图1 JN-S202001 双层平板噬菌斑(A)和透射电镜下形态(B)  
Fig.1 Plaques in a double-layer agar plate(A)and transmission electron micrographs(B)of JN-S202001

表1 JN-S202001 最佳感染复数测定  
Tab.1 Determination of the optimal MOI of JN-S202001

细菌浓度/(CFU·mL <sup>-1</sup> ) Bacterial concentration	噬菌体浓度/(PFU·mL <sup>-1</sup> ) Phage concentration	感染复数 Multiplicity of infection(MOI)	噬菌体效价/(PFU·mL <sup>-1</sup> ) Phage titer
1×10 <sup>7</sup>	1×10 <sup>9</sup>	100	(2.0±0.13)×10 <sup>8</sup>
1×10 <sup>7</sup>	1×10 <sup>8</sup>	10	(5.0±0.21)×10 <sup>8</sup>
1×10 <sup>7</sup>	1×10 <sup>7</sup>	1	(1.2±0.15)×10 <sup>9</sup>
1×10 <sup>7</sup>	1×10 <sup>6</sup>	0.1	(3.6±0.20)×10 <sup>9</sup>
1×10 <sup>7</sup>	1×10 <sup>5</sup>	0.01	(7.5±0.24)×10 <sup>10</sup>
1×10 <sup>7</sup>	1×10 <sup>4</sup>	0.001	(3.5±0.17)×10 <sup>10</sup>
1×10 <sup>7</sup>	1×10 <sup>3</sup>	0.000 1	(7.5±0.19)×10 <sup>9</sup>
1×10 <sup>7</sup>	1×10 <sup>2</sup>	0.000 01	(2.3±0.13)×10 <sup>9</sup>
1×10 <sup>7</sup>	1×10 <sup>1</sup>	0.000 001	(2.8±0.21)×10 <sup>8</sup>

2.3 噬菌体热稳定性和 pH 稳定性测定

噬菌体在 30 ~50 °C 均可保持较高效价 (>10<sup>8</sup> PFU/mL), 60 °C 时下降约 2.0 log<sub>10</sub> PFU/mL。70 °C 时只有少量噬菌体存活 (1.9 log<sub>10</sub> PFU/mL), 温度达到 80 °C 时噬菌体全部失活 (图 3A)。在 pH 2~11 内噬菌体效价较为稳定, 维持在 10<sup>8</sup> PFU/mL 左右, 当 pH=12 时噬菌体的效价略有下降, 在 pH=1 和 pH=13 的环境中噬菌体全部失活 (图 3B)。

2.4 噬菌体裂解谱测定

JN-S202001 对 42 株沙门氏菌中的 9 株具有裂解能力, 裂解比例为 21.4%。在可裂解的 9 株沙门氏菌中, 7 株为多重抗生素耐药菌株, 4 株对 8 种抗生素具有耐药性, 3 株对 4 种抗生素具有耐药性 (表 2)。该噬菌体对实验室保存的一株大肠杆菌 O157:H7 和金黄色葡萄球菌无裂解能力。结果表明, JN-S202001 能够裂解受试沙门氏菌株, 包括多重抗生素耐药菌株。

2.5 JN-S202001 的基因组序列及系统发育树分析

JN-S202001 的核酸可以被 DNase I 消化, 但不被 RNaseA 消化, 表明其基因组是 DNA 分子。全基因组序列分析表明, JN-S202001 的基因组由 111 256 bp 的双链 DNA 组成, G+C 含量约为 40% (GenBank 登录号: OL502173)。编码 184 个 ORF (正链 138 个, 负链 46 个), 包括 24 个 tRNA 基因和 47 个与已报道的功能基因有显著同源性的编码蛋白基因。氨基酸序列同源性分析表明, JN-S202001 的基因组没有编码毒力和抗生素耐药性的基因, 且未检测到与噬菌体溶原性相关的基因。BLAST-N 分析表明, JN-S202001 基因组与长尾噬菌体科 *Demereviridae* 亚科噬菌体沙门氏菌噬菌体 SP76 同源性最高, 达 99.07%。

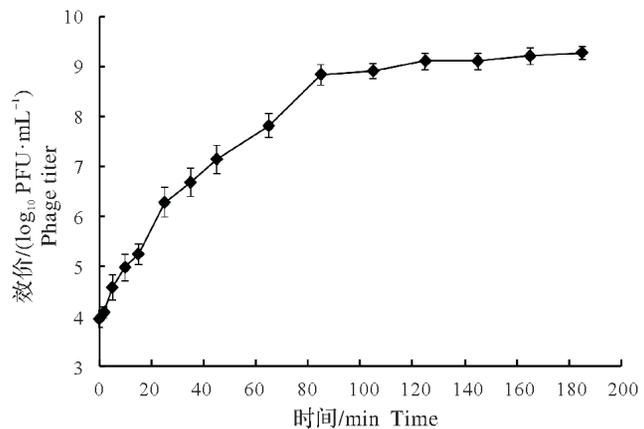


图2 JN-S202001 的一步生长曲线  
Fig.2 One-step growth curve of JN-S202001

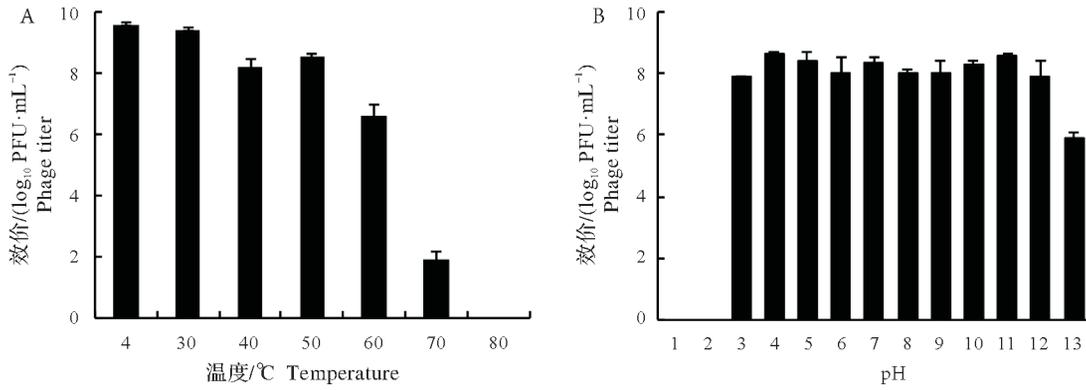


图3 JN-S202001的热稳定性(A)和pH稳定性(B)  
Fig.3 Thermal(A)and pH(B)stability of JN-S202001

表2 JN-S202001裂解谱测定

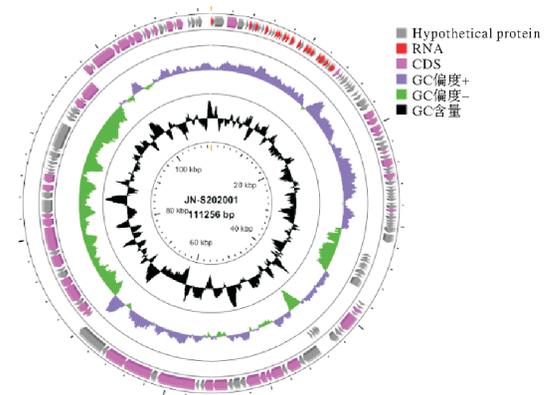
Tab.2 Determination of host ranges of JN-S202001

沙门氏菌株编号 Strains of <i>Salmonella</i>	抗生素耐药性 Antibiotics resistant	成斑效率(EOP) Efficiency of plating	裂解能力 Lytic activity
1093a	TET/FFC/CIP/SXT	1.00	+++
1080a	AMP/TET/GEN/NEO/FFC/CIP/NAL/SXT	1.09	+++
1086	AMP/CTX/TET/FFC	1.00	+++
2016a	AMP/CTX/TET/GEN/FFC/CIP/NAL/SXT	0.52	+++
2042a	AMP/AMC/TET/GEN/FFC/CIP/NAL/SXT	0.50	+++
2015a	AMP/AMC/CTX/TET/GEN/FFC/CIP/NAL	0.30	++
1096	AMP/CTX/TET/FFC	0.02	+
BNCC185946		0.29	++
BNCC336875		2.04	+++

AMP:氨苄西林;AMC:阿莫西林;CTX:头孢噻肟;TET:四环素;GEN:庆大霉素;NEO:新霉素;FFC:氟苯尼考;CIP:环丙沙星;NAL:萘啶酸;SXT:复方新诺明。

+++; EOP≥0.5, ++; 0.1≤EOP<0.5, +; 0.001≤EOP<0.1, -; EOP≤0.001 AMP: Ampicillin; AMC: Amoxicillin; CTX: Cefotaxime; TET: Tetracycline; GEN: Gentamicin; NEO: Neomycin; FFC: Florfenicol; CIP: Ciprofloxacin; NAL: Nalidixic acid; SXT: Sulfamethoxazole.

利用JN-S202001的裂解酶氨基酸序列构建系统发育进化树(图5),结果表明,JN-S202001与沙门氏菌噬菌体100268\_sal2(NCBI登录号:NC\_031902.1)同源性最高。



箭头表示预测的开放阅读框,箭头方向表示转录方向。  
Arrow represents ORFs, the direction of arrow represents direction of transcription.

图4 噬菌体JN-S202001基因组图谱  
Fig.4 Genomic map of phage JN-S202001

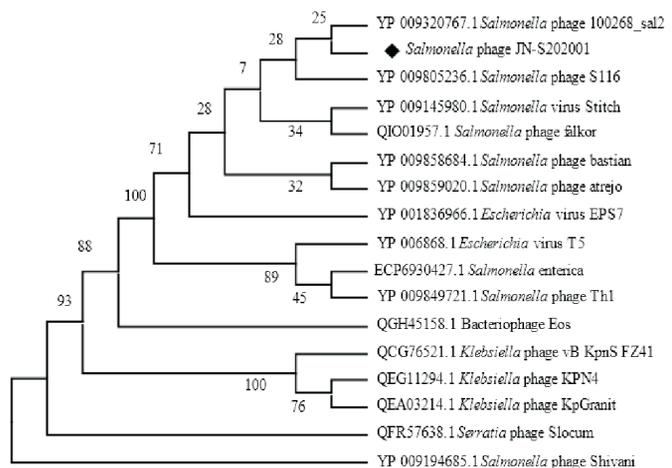


图5 JN-S202001裂解酶蛋白发育进化树  
Fig.5 The phylogenetic tree of JN-S202001 Lysin

## 2.6 JN-S202001对即食鸭脖污染的沙门氏菌抑制效果

未经JN-S202001处理的鸭脖污染终浓度为 $2.0 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ 的沙门氏菌,  $4^\circ\text{C}$ 储存48 h后沙门氏菌浓度降至 $1.3 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ; 而JN-S202001处理组在 $4^\circ\text{C}$ 储存48 h后未检测到沙门氏菌( $P < 0.01, t_{(4)} = 87.64$ ) (图6A)。将终浓度 $4.1 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ 的沙门氏菌接种于鸭脖, 对照组沙门氏菌浓度在 $4^\circ\text{C}$ 储存48 h后降至 $3.3 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ; JN-S202001处理组在储存0 h时沙门氏菌降至 $3.3 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ , 储存48 h后沙门氏菌降至 $2.0 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ , 与对照组相比差异极显著( $P < 0.01, t_{(4)} = 35.03$ ) (图6B)。

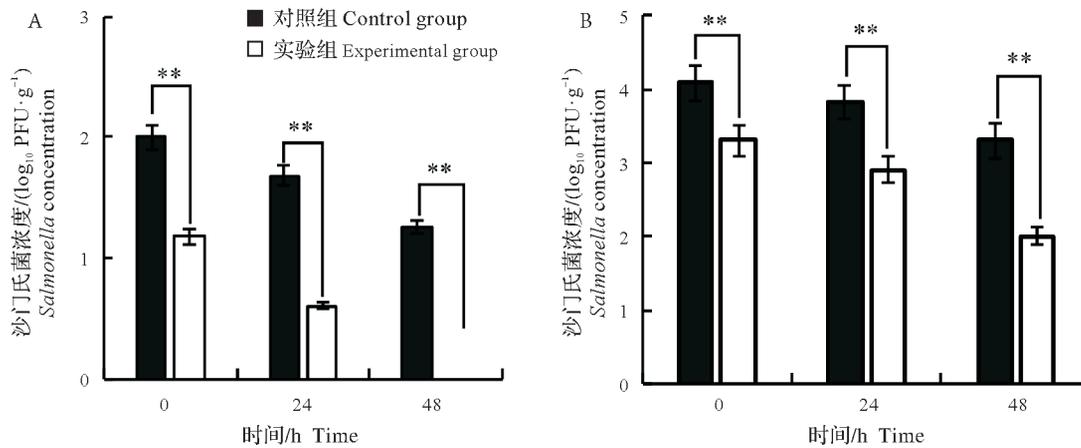


图6 JN-S202001对 $4^\circ\text{C}$ 保存48 h的即食鸭脖污染的沙门氏菌抑菌效果

Fig.6 Antibacterial effect of JN-S202001 in ready-to-eat duck neck at  $4^\circ\text{C}$  for 48 h

## 3 结论与讨论

本研究从生活废水中成功分离和鉴定了一株沙门氏菌的特异性噬菌体JN-S202001。根据其形态特征和基因组序列, 推测JN-S202001属于有尾噬菌体目长尾噬菌体科。一步生长曲线结果表明, JN-S202001的潜伏期和裂解期分别为5 min和80 min, 裂解量约67 PFU/细胞, 与李萌<sup>[25]</sup>和聂若男等<sup>[26]</sup>分离的噬菌体裂解性相似。JN-S202001对7株多重抗生素耐药沙门氏菌均表现出裂解活性, 表明噬菌体可用于抑制多重抗生素耐药细菌。噬菌体成功感染宿主需要首先吸附到宿主的特异性受体上, 革兰氏阴性菌噬菌体常以脂多糖、外膜蛋白、鞭毛、O-抗原等作为受体<sup>[27]</sup>。沙门氏菌O-抗原具有多样性, 是划分沙门氏菌血清型的重要依据, JN-S202001对受试菌株中的沙门氏菌具有感染性, 表明该噬菌体可能以某种O-抗原作为受体, 具体吸附机制有待后续进一步研究。

JN-S202001在较高的温度( $< 60^\circ\text{C}$ )和较宽pH(2~11)内保持活性稳定。李萌<sup>[25]</sup>以鼠伤寒沙门氏菌ATCC14028为宿主分离出一株烈性噬菌体, 在温度为 $40\sim 50^\circ\text{C}$ , pH 4~10内均可保持较高裂解能力( $> 10^9$  PFU/mL)。包细明<sup>[28]</sup>分离的噬菌体BpS在pH 5~10时效价比较稳定, 保持在 $10^9$  PFU/mL以上, 但其温度适应范围较窄, 在温度低于 $50^\circ\text{C}$ 时效价比较稳定, 存活率高于88%, 温度高于 $60^\circ\text{C}$ 时噬菌体存活率仅20%左右。聂若男等<sup>[26]</sup>从污水中分离的一株烈性短尾沙门氏菌噬菌体T139, 在 $30\sim 50^\circ\text{C}$ 和pH 4~12条件下效价相对稳定。JN-S202001对温度和pH具有较宽的适应范围, 在酸性条件下(pH 2~4)仍能保持较高的裂解能力, 显示具有良好的应用潜力。

全基因组测序和注释表明, JN-S202001的基因组全长111 256 bp, 编码184个开放阅读框, 不含毒力基因和耐药基因。预测的蛋白质编码序列(CDS)与已报道的全基因组基因的同源性表明, JN-S202001与有尾噬菌体目Demereciviridae亚科噬菌体的沙门氏菌噬菌体SP76相似性最高。基因组注释表明, JN-S202001具有编码宿主裂解蛋白、DNA复制/修饰/调节和包装蛋白、尾部结构蛋白及一些附加功能蛋白的所有基本结构和功能基因。噬菌体感染革兰氏阴性菌的机制通常为宿主内膜(IM)被穿孔素通透形成跨膜孔, 使裂解酶从细胞质中逸出至细胞壁肽聚糖层, 从而降解肽聚糖发挥裂解功能<sup>[29]</sup>。JN-S202001编码的holin(ORF8)、endolysin(ORF9), 推测与裂解活性有关, 其裂解特性与已报道的革兰氏阴性菌噬菌体裂解机制一致。此外, endolysin(ORF9)系统进化树(图5)分析表明, JN-S202001与沙门氏菌噬菌体100268\_sal2同源性最高。

模拟沙门氏菌污染即食鸭脖,与未经 JN-S202001 处理对照组相比,样品在 4 °C 保存 48 h 后, JN-S202001 极显著 ( $P < 0.01$ ) 降低了沙门氏菌含量 ( $> 2.0 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ) (图 6)。Phothaworn 等<sup>[30]</sup>将分离的鼠伤寒沙门氏菌噬菌体 ST-W77 和肠炎沙门氏菌噬菌体 SE-W109 混合添加到污染沙门氏菌的牛奶或鸡肉中,结果表明能够将样品的抑菌效果延长一周。Abhisingha 等<sup>[31]</sup>研究了噬菌体鸡尾酒在低温(4 °C 和 -20 °C)贮藏的鸡肉中对沙门氏菌的抑制效果,结果表明在 4 °C 下贮藏 72 h 后,噬菌体鸡尾酒处理组的沙门氏菌数量发生显著降低( $0.4 \sim 1.0 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/cm}^2$ ,  $P < 0.05$ );在 -20 °C 条件下,0~24 h 内沙门氏菌数量显著降低  $0.4 \sim 0.7 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/cm}^2$  ( $P < 0.05$ )。综上,噬菌体 JN-S202001 有望作为一种潜在的生物抑菌剂用于食品中沙门氏菌污染的防控。

致谢:江西省科学技术支撑项目(20212BBF63027, 20212BAB215018)和江西省现代农业产业技术体系建设专项资金资助(JXARS-12)同时对本研究给予了资助,谨致谢意!

## 参考文献 References:

- [1] FRANZ C M A P, DEN BESTEN H D, BÖHNLEIN C, et al. Reprint of: microbial food safety in the 21st century: emerging challenges and foodborne pathogenic bacteria[J]. Trends in food science & technology, 2019, 84(1): 34-37.
- [2] 牛艳, 涂文校, 宋洋, 等. 2021 年 6 月中国大陆需关注的突发公共卫生事件风险评估[J]. 疾病监测, 2021, 36(6): 517-520. NIU Y, TU W X, SONG Y, et al. Risk assessment of public health emergencies concerned in the mainland of China[J]. Disease surveillance, 2021, 36(6): 517-520.
- [3] 李廷翠, 严红亚, 常志顺, 等. 云南蛋鸡源肠炎沙门氏菌的分离鉴定及生物学特性[J]. 微生物学通报, 2021, 48(1): 82-92. LI T C, YAN H Y, CHANG Z S, et al. Isolation, identification and characterization of *Salmonella enteritidis* from Yunnan laying hens[J]. Microbiology China, 2021, 48(1): 82-92.
- [4] 张天添, 陈鹄, 吴国平, 等. 牛奶中活沙门氏菌 BCAC-EMA-Rti-LAMP 快速检测方法的研究[J]. 江西农业大学学报, 2019, 41(6): 1192-1199. ZHANG T T, CHEN H, WU G P, et al. Development of a BCAC-EMA-Rti-LAMP assay for rapid detection of low viable *Salmonella* in milk without enrichment[J]. Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2019, 41(6): 1192-1199.
- [5] 王赞, 刘亮, 刘雨蒙, 等. 2018 年 6 ~ 10 月河北省市售猪肉馅及冷鲜鸡中沙门氏菌污染情况调查与分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(14): 4714-4718. WANG Z, LIU L, LIU Y M, et al. Investigation and analysis of *Salmonella* contamination in pork stuffing and whole chicken sold in Hebei province from June to October in 2018[J]. Journal of food safety and quality, 2020, 11(14): 4714-4718.
- [6] 程文娟, 薛琳, 周坤, 等. 一起食用糕点引起的肠炎沙门氏菌食物中毒事件的调查分析[J]. 实用预防医学, 2020, 27(11): 1379-1380. CHENG W J, XUE L, ZHOU K, et al. An incident of *Salmonella enteritidis* food poisoning caused by consuming pastries[J]. Practical preventive medicine, 2020, 27(11): 1379-1380.
- [7] RAFFATELLU M. Learning from bacterial competition in the host to develop antimicrobials[J]. Nature medicine, 2018, 24(8): 1097-1103.
- [8] GROSE J H, CASJENS S R. Bacteriophage diversity [M]//BAMFORD D H, ZUCKERMAN M. Encyclopedia of virology- Fourth Edition. Oxford: Academic Press, 2021: 265-275.
- [9] KITTLER S, WITTMANN J, MENGDEN R A L P, et al. The use of bacteriophages as one-health approach to reduce multi-drug-resistant bacteria[J]. Sustainable chemistry and pharmacy, 2017, 5(1): 80-83.
- [10] SHAWNA M. Safety analysis of a Russian phage cocktail: from metagenomic analysis to oral application in healthy human subjects[J]. Virology, 2013, 443(2): 187-196.
- [11] ANJEELA B, ANJILA M, SHREENA S, et al. Isolation of potential phages against multidrug-resistant bacterial isolates: promising agents in the rivers of Kathmandu, Nepal[J]. Biomed research international, 2017(1): 1-10.
- [12] 杨慧轩, 罗欣, 朱立贤, 等. 噬菌体在控制肉源致病菌中的应用研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(9): 293-301. YANG H X, LUO X, ZHU L X, et al. Progress in application of bacteriophages in control of meat borne pathogens[J]. Food science, 2021, 42(9): 293-301.
- [13] ATTERBURY R J, BERGEN M V, ORTIZ F, et al. Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens[J]. Applied & environmental microbiology, 2007, 73(14): 4543-4549.
- [14] DUC H M, SON H M, HONJOH K, et al. Isolation and application of bacteriophages to reduce *Salmonella* contamination in

- raw chicken meat[J].LWT-food sci technology, 2018, 91(1):353-360.
- [15] ZHAO Y, YE M, ZHANG X, et al. Comparing polyvalent bacteriophage and bacteriophage cocktails for controlling antibiotic-resistant bacteria in soil-plant system[J]. Science of the total environment, 2019, 657(1): 918-925.
- [16] 孙桂芳, 苏华章. 鸭肉熟食生产危害分析与关键控制点[J]. 食品与机械, 2008, 24(3): 109-111.  
SUN G F, SU H Z. Hazard analysis and critical control points on the production of duck delicatessen[J]. Food & machinery, 2008, 24(3): 109-111.
- [17] 章彬, 吴满刚, 卞欢, 等. 苏北地区冷鲜鸡加工及冷藏过程中常见微生物污染调查[J]. 食品工业科技, 2016, 37(20): 49-52.  
ZHANG B, WU M G, BIAN H, et al. Survey of bacterial contamination during processing and refrigerated storage of chilled chicken in northern Jiangsu[J]. Science and technology of food industry, 2016, 37(20): 49-52.
- [18] 沈托, 焦莉萍, 魏惠琴, 等. 2011-2019年陕西省渭南市市售食品中沙门菌污染状况及血清分型调查结果分析[J]. 预防医学情报杂志, 2021, 37(10): 1325-1330.  
SHEN T, JIAO L P, WEI H Q, et al. Analysis on the investigation results of the contamination status and serotype monitoring of *Salmonella* in food sold in Weinan city of Shaanxi province 2011 to 2019[J]. Journal of preventive medicine information, 2021, 37(10): 1325-1330.
- [19] 何学文, 戴雨芸, 李欣越, 等. 肉桂醛体外对鼠伤寒沙门氏菌的抑菌机制[J]. 江西农业大学学报, 2020, 42(1): 150-156.  
HE X W, DAI Y W, LI X Y. Antibacterial mechanism of cinnamaldehyde on *Salmonella typhimurium* in vitro[J]. Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2020, 42(1): 150-156
- [20] WANG C, CHEN Q, ZHANG C, et al. Characterization of a broad host-spectrum virulent *Salmonella* bacteriophage fmb-p1 and its application on duck meat[J]. Virus research, 2017, 236(1): 14-23.
- [21] 高明明, 刘慧莹, 李璞媛, 等. 金黄色葡萄球菌噬菌体 vB\_SauH\_IME522 的分离鉴定及全基因组分析[J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(3): 229-240.  
GAO M M, LIU H Y, LI P Y, et al. Isolation and complete genome analysis of *Staphylococcus aureus* bacteriophage vB\_SauH\_IME522[J]. Journal of army medical university, 2020, 42(3): 229-240.
- [22] 刘坤. 大肠杆菌噬菌体的筛选和食品中的应用研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.  
LIU K. The screening of *Escherichia* phage and the application in food[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019.
- [23] 侯忠余, 李传友, 朱成林, 等. 1株金黄色葡萄球菌烈性噬菌体的生物学特性及其裂解效果[J]. 食品科学, 2022, 43(8): 113-120.  
HOU Z Y, LI C Y, ZHU C L, et al. Biological characteristics and lysis effect of a virulent *Staphylococcus aureus* phage[J]. Food science, 2022, 43(8): 113-120.
- [24] LI Y, CHEN H, SHU M, et al. Isolation, characterization and application of an alkaline resistant virulent bacteriophage JN01 against *Escherichia coli* O157:H7 in milk and beef[J]. LWT-food sci technology, 2021, 144(2): 1-10.
- [25] 李萌. 宽裂解谱沙门氏菌噬菌体的基因组学分析及其重组内溶素抑菌活性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.  
LI M. Genomic analysis of broad-host-range *Salmonella* bacteriophage and lytic activity of the recombinant endolysin [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014.
- [26] 聂若男, 李晚宁, 杨其乐, 等. 1株裂解性短尾沙门氏菌噬菌体 T139 的生物学特性及其对牛奶和牛肉的抑菌作用[J]. 食品科学, 2019, 40(18): 130-136.  
NIE R N, LI W N, YANG Q L, et al. Biological characteristics of a lytic short-tailed *Salmonella* phage T139 and its antibacterial effect in milk and ground beef[J]. Food science, 2019, 40(18): 130-136.
- [27] GENCAY Y E, GAMBINO M, FROM PRÜSSING T, et al. The genera of bacteriophages and their receptors are the major determinants of host range[J]. Environmental microbiology, 2019, 21(6): 2095-2111.
- [28] 包细明. 鸭主要病原菌耐药性分析及噬菌体的分离鉴定[D]. 贵阳: 贵州大学, 2019.  
BAO X M. Analysis of drug resistance of duck main pathogens and isolation and identification of phage [D]. Guiyang: Guizhou University, 2019.
- [29] LU N, SUN Y, WANG Q, et al. Cloning and characterization of endolysin and holin from *Streptomyces avermitilis* bacteriophage phiSASD1 as potential novel antibiotic candidates[J]. International journal of biological macromolecules, 2020, 147(1): 980-989.
- [30] PHOTHAWORN P, SUPOKAIVANICH R, LIM J, et al. Development of a broad-spectrum *Salmonella* phage cocktail containing viunalike and jerseylike viruses isolated from Thailand[J]. Food microbiology, 2020, 92(2): 179-192.
- [31] ABHISINGHA M, DUMNIL J, PITAKSUTHEEPONG C. Efficiency of phage cocktail to reduce *Salmonella typhimurium* on chicken meat during low temperature storage[J]. LWT-food sci technology, 2020, 129(14): 222-230.