志贺氏菌噬菌体空间杀菌效力的研究

张辉，王冉，包红朵

（江苏省农业科学院农业部食品安全监控重点开放实验室，江苏省畜禽产品安全性研究重点实验室，江苏南京 210014）

摘要：将福氏志贺氏菌噬菌体 SF-2A、痢疾志贺氏菌噬菌体 SD-11 及宋氏志贺氏菌噬菌体 SS-92 以等比例混合后进行气雾喷洒分析其在空间的杀菌效力，以期在食品生产和加工中控制食源性志贺氏菌的污染。首先在空间分析不同噬菌体气雾喷洒后的杀菌活性和最佳作用浓度，其次将福氏、痢疾及宋氏志贺氏菌以等量进行混合，以 3×10^5 cfu/mL 的终浓度进行人工喷洒污染，并以 3×10^8 cfu/mL 的噬菌体混合物进行气雾喷洒，分别在喷洒后 1 h，2 h 和 3 h 检测宿主菌的数量。结果显示，噬菌体 SF-2A、SD-11 及 SS-92 均能在空间有效灭活其相应宿主菌，其混合溶液作用 3 h 后已检测不到志贺氏菌。由此可见，混合噬菌体能够有效控制志贺氏菌的污染，这为食品生产及加工中环境中的病原菌的污染控制提供了新途径。

关键词：志贺氏菌；噬菌体；空间杀菌

文章篇号：1673-9078(2012)1-1-4

Evaluation of Inactivation Efficiency of *Shigella* bacteriophage by Aerosol Spray

ZHANG Hui, WANG Ran, BAO Hong-duo

(Key Lab of Agro-Food Safety and Quality Ministry of Agriculture, Key Lab of Animal-derived Food Safety of Jiangsu Province, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: The efficiency of *shigella* phages mixture to inhibit pathogenic *Shigella* spp. by aerosol spray was investigated. Concentration of phages after aerosol spray was determined. Then, the host of *Shigella flexneri* 2a, *Shigella dysenteriae* and *Shigella sonnei* were sprayed with a total concentration of 3×10^5 cfu/mL. Phage cocktail were added thereafter (3×10^8 pfu/mL) immediately, and the number of *Shigella* spp. were counted 1 h, 2 h and 3 h respectively after spraying. The results showed that *Shigella* phages SF-2A、SD-11 and SS-92 could effectively inactivate their host strain, the host strain couldn't be detected after spraying phages 3 h later. Therefore, the results suggest that phage cocktail, such as the phage of *S. flexneri*, *S. dysenteriae* and *S. sonnei*, could effectively reduce potential contamination of *Shigella* spp. in food production and processing.

Key words: aerosol spray; phage cocktail; *Shigella*

志贺氏菌也称痢疾杆菌，误食该菌污染的食物可引起细菌性痢疾。志贺氏菌的生化群包括 A 群痢疾志氏贺菌(*S.dysenteriae*)、B 群福氏志贺氏菌(*S. flexneri*)、C 群鲍氏志贺氏菌(*S. boydii*)和 D 群宋氏志氏贺菌(*S. sonnei*)，在发展中国家以福氏志贺菌、宋内氏志贺菌多见[1]。2010 年在广西证实一起由志贺氏菌 X 变种感染所致的食源传播的细菌性痢疾暴发[2]，此外在瑞典[3]、奥地利[4]及丹麦[5]等地都也先后报道了志贺氏菌的暴发事例。

收稿日期：2011-09-09

基金项目：国家自然科学基金（31101291）；江苏省自主创新项目（cx(11)4068）

作者简介：张辉，女，博士，副研究员，主要从事食源性病原菌的监测及生物防控研究

目前，在动物性食品的生产及加工中，通常都是用化学消毒剂来控制致病菌的污染和传播的。然而，志贺氏菌耐药毒力株的不断出现，给食品中志贺氏菌的污染控制带来困难。噬菌体作为新型生物杀菌制剂源已受到广泛关注，期间已有诸多成功应用的报道，如用空肠弯曲菌（*Campylobacter jejuni*）噬菌体灭活鸡体表的空肠弯曲菌[6]；噬菌体PHL4 用于控制沙门氏菌在生禽中的污染[7]等等。2006 年，美国FDA已批准噬菌体作为食品添加剂用于杀灭食品中的李斯特菌（www.cfsan.fda.gov），而荷兰已在生产商品化噬菌体产品LISTEX^{TM} P100 用于控制食品中李斯特菌的污染[8]。由此可见，噬菌体在食品生物防控中已显现出其潜在的应用价值。通过先前的福氏志贺氏菌SF-2A在牛奶中成功应用的事例[9]，本研究将致泻的主要病原

福氏志贺氏菌、痢疾志贺氏菌及宋氏志贺氏菌特异的噬菌体进行混合，模拟食品加工环境并进行空间喷洒杀菌，明确噬菌体混合后的杀菌效力，为噬菌体杀喷淋制剂的开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

福氏志贺氏菌（CMCC 51572）购自广州微生物研究所菌种保藏中心；痢疾志贺氏菌 SD-07 及宋氏志贺氏菌 SS-02 由本室分离并保存（以下均简称为宿主菌）。福氏志贺氏菌噬菌体 SF-2A[9]、痢疾志贺氏菌噬菌体 SD-11 及宋氏志贺氏菌噬菌体 SS-92 均由本室分离自肉品加工环境污水并保存（分离及鉴定方法参考文献 9）。

1.1.2 主要试剂

营养肉汤、LB 培养基等试剂均购自青岛高科园海博生物技术有限公司。NaCl、Tris、氯仿以及 $CaCl_2$ 等生化试剂均购自汕头市西陇化工厂有限公司。

1.1.3 噬菌体扩增及纯化

将过夜培养的宿主菌分别以 1:10 接种新鲜 LB 液体培养基，并以 MOI=0.1 分别接种噬菌体 SF-2A、SD-11 及 SS-92 相应宿主菌中，加入 $CaCl_2$ 母液（250 mM）至终浓度为 1.25 mM，混匀并在室温下作用 30 min 后再置于 37 ℃培养箱中培养 10~14 h。次日，14000 r/min，4 ℃，离心 20 min，取上清，无菌过滤(0.22 μm)，并通过 PEG/NaCl[10]方法沉淀噬菌体悬液，最终以 SM [1L：NaCl 100 mM、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 mM、Tris-HCl (pH 7.5) 0.05 M]溶解沉淀，即纯化的噬菌体，测定噬菌体效价以备后续实验。

1.1.4 噬菌体抑菌效果分析

将 3 株宿主菌过夜培养物以 1:100 转接至 20 mL LB 液体培养基中，放置于 37 ℃，150 r/min，振摇培养至其对数早期（约 3 h），并测定其起始 OD600 值；分别加入 0.1 mL 噬菌体 SF-2A，SD-11 及 SS-92 于相应宿主菌中，37 ℃，静置培养 6 h，每隔 30 min 取 0.1 mL 培养物测定 OD600 值。

1.1.5 噬菌体空间抑菌效率分析

分别用 PBS 制备 3 株宿主菌菌悬液 5 mL，每株均设立 3 个浓度，分别为 10^5 cfu/mL，10^6 cfu/mL，10^7 cfu/mL；分别用 SM 制备 10^8 pfu/mL 噬菌体 SF-2A，SD-11 及 SS-92 稀释液各 5 mL。对照组仅喷洒 5mL 不同浓度宿主菌至灭菌三角瓶（500 mL 容积），实验组先喷洒 5 mL 宿主菌，5 min 后再喷洒 5 mL 噬菌体稀释液，每组各 3 个重复组，作用 3 h 后分别加入 1 mL SM 于三角瓶中，充分振荡后取瓶中悬液稀释后检测宿主菌数量。

1.1.6 噬菌体复配空间抑菌效果

将 3 株宿主菌分别调整至 10^5 cfu/mL，并以等体积混合至终体积为 15 mL；同样将相应噬菌体分别调整为 10^8 pfu/mL，同样以等体积混合至终体积为 15 mL。实验组中先喷洒混合宿主菌 15 mL，5 min 后喷洒混合噬菌体 15 mL，同时分别设立宿主菌对照组。分别在喷洒噬菌体后 1 h、2 h 及 3 h 取瓶中样品 1 mL，检测宿主菌总数，每组设 3 个重复。

1.1.7 复配噬菌体模拟空间杀菌效力鉴定

将容器（体积 860 cm×620 cm×560 cm，透明塑料箱）进行紫外杀菌，用 1.1.6 的方法分别制备相应的宿主菌及噬菌体稀释混合液各 30mL。空间实验设计如图 1 所示，在相应位置分别放置 5 个去盖的 LB 固体平板，编号 a、b、c、d、e，分别喷洒细菌及噬菌体；其中对照组中仅喷洒宿主菌，而实验组先喷洒宿主菌，并于 5 min 后再喷洒混合噬菌体。分别在喷洒结束后 1 h，2 h 及 3 h，加盖取出平板，并置于 37 ℃恒温培养箱过夜培养。

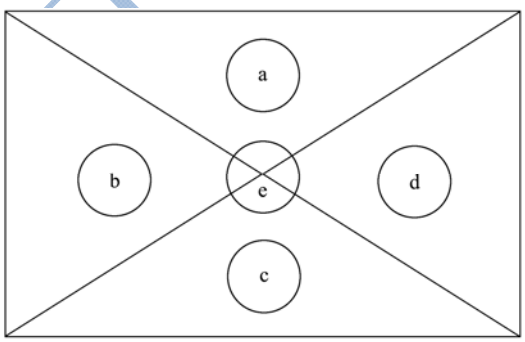


图 1 检测点空间示意图

Fig.1 Diagram of spatial location

2 结果与讨论

2.1 纯化噬菌体效价测定结果

将扩增的噬菌体 SF-2A、SD-11 及 SS-92 沉淀纯化后分别测定效价，结果福氏志贺氏菌 SF-2A 效价达到 1.2×10^{10} pfu/mL，痢疾志贺氏菌噬菌体效价达到 2×10^{10} pfu/mL，宋氏志贺氏菌噬菌体效价为 1.8×10^{10} pfu/mL。

2.2 噬菌体抑菌效果检测结果

明确噬菌体对宿主的抑制活性，分别将 3 株生长至对数生长期的宿主菌进行抑菌试验，结果如图 2a 所示，福氏志贺氏菌噬菌体 SF-A2 能够有效抑制宿主菌的生长，6 h 后，宿主菌完全被抑制，培养基逐渐澄清，其 OD600 值接近零，与对照组呈显著性差异；而痢疾志贺氏菌噬菌体 SD-11 在开始的 3 h 中抑制不完

全，宿主菌仍有较慢生长，但从 3 h 后至 6 h，宿主菌受到高度抑制，5.5 h 时已低于检测水平，OD600 为零，而对照组生长良好（见图 2b）；宋氏志贺氏菌噬菌体 SS-92 抑制效果与 SD-11 相似，作用 5.5h 后，OD600 为零（见图 2c），由此可见，3 株噬菌体均能抑制相应宿主菌的生长。

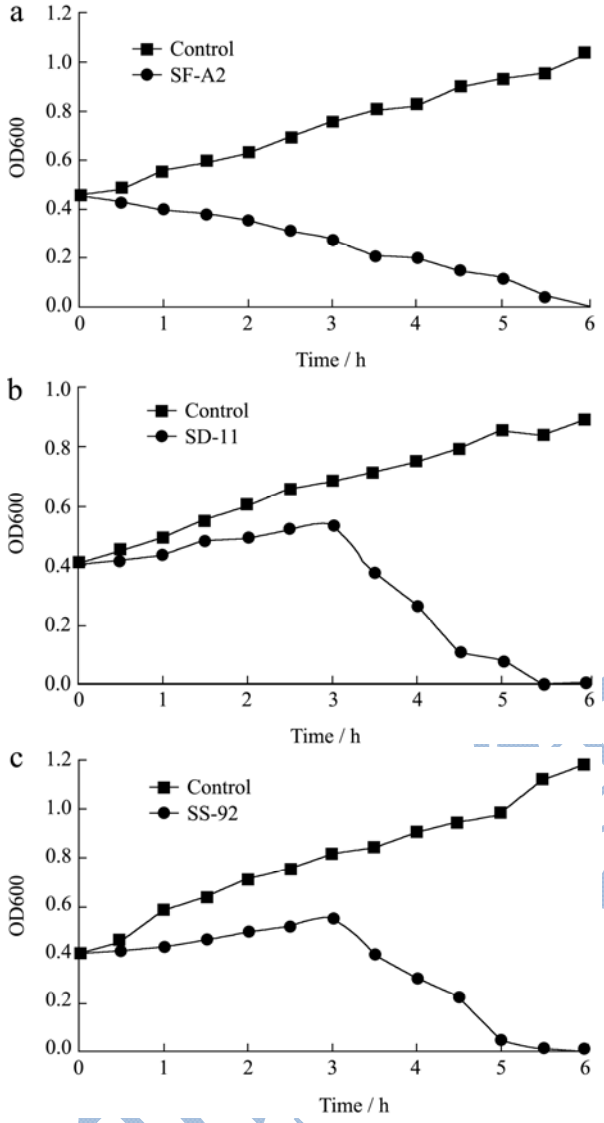


图 2 志贺氏菌噬菌体抑菌效果测定结果

Fig.2 Inhibiting effects of *shigella* phages

注：a-福氏志贺氏菌噬菌体 SF-2A；b-疾痢志贺氏菌噬菌体 SD-11；c-宋氏志贺氏菌噬菌体 SS-92。

2.3 空间抑菌效果分析结果

由表 1 可知，将不同宿主相应的噬菌体进行空间抑菌分析，在喷洒噬菌体作用 3 h 后，10^5 cfu/mL 宿主菌组中细菌数分别降至 9 cfu/mL、4 cfu/mL 及 0 cfu/mL，与相应对照组呈现极显著性差异。同样在 10^6 cfu/mL 宿主菌组中，3 组宿主菌数量均有下降，差异显著；在 10^7 cfu/mL 宿主菌组中，宿主菌数量亦有所下降，但不及 10^5 cfu/mL 组降低显著。

2.4 噬菌体复配空间杀菌效果分析

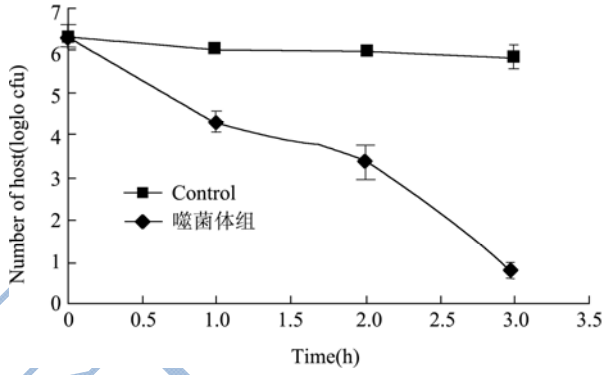


图 3 混合噬菌体空间灭菌时间分析

Fig. 3 Time of spatial inhibiting effects of *Shigella* phage mixture

将 3 株噬菌体进行混合复配后检测其抑制宿主菌的效率，结果如图 3 所示，混合复配喷洒 1 h 后，与对照组相比较，宿主菌总数降低 1.75 log，2 h 后下降了 2.62 log，作用至 3 h，下降了 5.06 log，而此时对照组中宿主菌数量与起始相当，从而表明将噬菌体混合能够有效灭活宿主菌。

2.5 噬菌体混合复配抑菌效果

人工模拟污染大空间，以 10^8 pfu/mL 噬菌体混合液灭活宿主菌，结果见表 2，作用 3 h 后，对照组中 5 个平板中均有细菌生长，而实验组中喷洒噬菌体后，相应位置细菌数量显著低于对照组。由此可见，以等体积混合 3 种噬菌体能够在空间有效灭活宿主菌。

表 1 噬菌体空间抑菌效果分析结果

Table 1 Spatial inhibiting effects of *Shigella* phages

菌株	10^5 cfu/mL		10^6 cfu/mL		10^7 cfu/mL	
	Control /(cfu/mL)	噬菌体组 /(cfu/mL)	Control /(cfu/mL)	噬菌体组 /(cfu/mL)	Control /(cfu/mL)	噬菌体组 /(cfu/mL)
CMCC51592	5.33×10^4	9**	2.12×10^5	1.90×10^3*	5.51×10^6	3.0×10^4
SD-07	8.36×10^4	4**	1.31×10^6	6.90×10^2*	7.82×10^6	1.90×10^4
SS-02	2.55×10^4	0**	1.44×10^6	2.25×10^3*	9.81×10^6	9.0×10^4

注：*: $P<0.5$, **: $P<0.01$。

表 2 复配噬菌体的空间抑菌效力

Table 2 Inhibiting efficiency of phage cocktail in space

组别	a (cfu)	e (cfu)	c (cfu)	d (cfu)	e (cfu)
噬菌体组	5±2.12**	3.3±2.12**	4±4.95**	2±0.71**	1±0.21**
Control	900±70.71	4100±141.42	4625±176.78	5980±169.71	7025±247.49
空白组	0	0	0	0	0

注：**: $p<0.01$：噬菌体组与对照组比较。

3 结论

志贺氏菌是胃肠疾病感染的主要病原之一，能够导致严重的腹泻，在我国以福氏志贺氏菌为主要流行株，亦伴有宋氏志贺氏菌及痢疾杆菌致病的病例[1,2]。噬菌体是细菌的天敌，在控制细菌性疾病及食源性病原污染中具有重要的应用价值。本研究将分离的不同种的志贺氏菌噬菌体混合后进行空间杀菌分析评价，以期将其应用于食品加工环境中，控制食品中志贺氏菌的污染。

在体外抑菌实验中，3 株噬菌体分别对其相应宿主菌具有良好的裂解活性，在作用 3 h 后均能够有效裂解宿主菌，至 5 h 能够完全抑制宿主菌生长，这为控制病原菌提供了必要前提。先前已有将大肠杆菌噬菌体喷洒于养殖环境用于控制家禽呼吸道疾病的报道[10,11]，同样在本研究中空间喷洒志贺氏菌噬菌体亦能够有效地抑制宿主菌的生长，而且在作用过程中噬菌体与宿主菌之间需以一定比例配合使用，其 MOI 应大于 10^3，即噬菌体与宿主菌比例应为 10^3:1，在相关噬菌体生物防控的研究中亦有报道[12]，这为以噬菌体基础的生物杀菌制剂的研制提供了依据。

由于噬菌体高度特异，我们尝试了将主要病原相应的噬菌体进行混合后来达到高效杀菌的目的。将噬菌体复配后首先明确其在 3 h 内能够有效抑制宿主菌的生长。不同种属噬菌体的混合解决了噬菌体特异的特点，而 FDA 批准的李斯特菌噬菌体添加剂亦为 6 种噬菌体的混合物[8]。为了进一步明确 3 株噬菌体混合在实际环境中是否能够有效杀菌，我们模拟了大空间实验，检测结果表明混合噬菌体在较大空间中仍能有效发挥杀菌活性，在作用 3 h 后有效的抑制了志贺氏菌的污染，从而为噬菌体在食品加工行业的应用奠定了坚实的基础。后续研究将会在食品加工车间及包装环境中进行实地应用，从而逐步证实其潜在的应用价值。此外，志贺氏菌的耐药毒力株不断出现，而噬菌体不仅能高效杀菌且无抗性，的确是疾病控制的首选，其相关衍生物，如裂解酶都正在进入临床实验，相信在不久的将来必定成新型抗菌药物的候选。

综上所述，由于噬菌体的高度特异性，可以将具有不同杀菌活性的噬菌体进行混合后复配而达到高效广谱杀菌的目的。此外，目前亦有广谱噬菌体，如李斯特菌噬菌体[13]能够裂解 3 个种的李斯特菌。由此可见，噬菌体潜在的杀菌应用将会在今后的研究中被逐步揭开，将其作为新型抗菌制剂源指日可待。

参考文献

[1] VON SEIDLEIN L, KIM D R, ALI M, et al. A multicentre study of *Shigella diarrhoea* in six asian countries: disease burden, clinical manifestations, and microbiology [J]. PLoS Med, 2006, 3(9): 1556-1569

[2] 黄永亮,杨天佑.一起福氏志贺菌X变种暴发流行的病原学鉴定[J].中国卫生检验杂志,2011,21(3):646-647

[3] Gaynor K, Park S Y, Kanenaka R, et al. International foodborne outbreak of *Shigella sonnei* infection in airline passengers [J]. Epidemiol. Infect., 2009, 137: 335-41

[4] Lofdahl M, lvarsson S, Andersson S, et al. An outbreak of *Shigella dysenteriae* in Sweden, May-June 2009, with sugar snaps as the suspected source [J]. Euro Surveill. 2009, 14: 483-485

[5] Kuo H W, Kasper S, Jelovcan S, et al. A food-borne outbreak of *Shigella sonnei* gastroenteritis, Austria, 2008 [J]. Wien. Klin. Wochenschr., 2009, 121(3-4): 157-163

[6] Wagenaar J A, Van Bergen M A, Mueller M A, et al. Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers [J]. Vet Microbiol., 2005, 109(3-4): 275-283

[7] Higgins J P, Higgins S E, Guenther K L, et al. Use of a specific bacteriophage treatment to reduce *Salmonella* in poultry products [J]. Poult Sci., 2005, 84(7): 1141-1145

[8] Soni K A, Nannapaneni R, Hagens S. Reduction of *Listeria monocytogenes* on the surface of fresh channel catfish fillets by bacteriophage Listex P100 [J]. Foodborne Pathog Dis. 2010, 7(4): 427-434

[9] 张辉,王冉,包红朵.裂解性福氏志贺氏菌噬菌体 SF-A2 的生物学特性及其在巴氏杀菌牛奶中的灭菌效果研究[J].食品科学,2010,31(23):214-218

[10] Huff W E, Huff G R, Rath N C, et al. Prevention of *Escherichia coli* infection in broiler chickens with a

bacteriophage aerosol spray. Poultry Science. 2002, 81: 1486-1491

[11] Huff W E, Huff G R, Rath N C, et al. Evaluation of aerosol spray and intramuscular injection of bacteriophage to treat an *Escherichia coli* respiratory infection [J]. Poultry Science. 2003, 82: 1108-1112

[12] Bigwood T, Hudson J A, Billington C, et al. Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat [J]. Food Microbiol. 2008, 25(2): 400-406

[13] 张辉,王冉,包红朵.一种宽宿主谱李斯特菌噬菌体及其制备方法和应用[P], CN201010219573.5

现代食品科技