

# 高效噬菌体防控食品源单增李斯特菌的研究进展

梁馨文<sup>1,2</sup>, 刘振杰<sup>2</sup>, 张菊梅<sup>2</sup>, 陈谋通<sup>2\*</sup>, 吴清平<sup>2\*</sup>

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 广东省科学院微生物研究所, 华南应用微生物国家重点实验室, 广东省微生物安全与健康重点实验室, 农业农村部农业微生物组学与精准应用重点实验室, 广东广州 510070)

**摘要:** 单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, 简称单增李斯特菌) 是一种重要的食源性致病菌, 因其具有耐高盐度、宽 pH 值和宽温度等特点, 对食品安全构成了重大威胁。近年来, 由于细菌的耐药进化速度惊人, 检测与控制食品中的单增李斯特菌是食品行业和公共卫生部门面临的一项重要挑战。而噬菌体 (Bacteriophage, Phage) 因其特异性强、安全性好、繁殖速度快等特点, 在食品有害微生物防控应用中显示出巨大的潜力。大量的研究报道表明噬菌体作为一种天然、绿色的杀菌剂, 在不同种类食品致病微生物防控中具有很好的前景。尽管噬菌体生物防治仍存在宿主谱窄及宿主易产生抗性菌等挑战, 但其作为一种安全有效的方法, 将在防控食品中的单增李斯特菌发挥重要作用。该文综述了食品中单增李斯特菌噬菌体分离、快速检测与高效防控方面的研究现状, 为开发基于噬菌体的高效防控新技术提供参考。

**关键词:** 单增李斯特菌; 噬菌体; 食品安全; 防控; 检测

文章编号: 1673-9078(2024)01-304-311

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.1.0318

## Research Advances in the Efficient Prevention and Control of Foodborne *Listeria monocytogenes* by Bacteriophages

LIANG Xinwen<sup>1,2</sup>, LIU Zhenjie<sup>2</sup>, ZHANG Jumei<sup>2</sup>, CHEN Moutong<sup>2\*</sup>, WU Qingping<sup>2\*</sup>

(1. College of Food Science, South China Agricultural of University, Guangzhou 510642, China)

(2. Key Laboratory of Agricultural Microbiomics and Precision Application, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, China)

**Abstract:** *Listeria monocytogenes* is an important foodborne pathogen that poses a major threat to food safety owing to its resistance to high salinity and tolerance to a wide range of pHs and temperatures. Owing to the rapid emergence of antibiotic-resistant bacteria, efficient control of *L. monocytogenes* in food is an important challenge for the food industry and

引文格式:

梁馨文,刘振杰,张菊梅,等.高效噬菌体防控食品源单增李斯特菌的研究进展[J].现代食品科技,2024,40(1):304-311.

LIANG Xinwen, LIU Zhenjie, ZHANG Jumei, et al. Research advances in the efficient prevention and control of foodborne *Listeria monocytogenes* by bacteriophages [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(1): 304-311.

收稿日期: 2023-03-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32222068; 32072326); 广东省基础与应用基础研究基金杰出青年项目 (2022B1515020068); 广东省科学院创新驱动发展能力建设专项资金项目 (2021GDASYL-20210103012)

作者简介: 梁馨文 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养与安全, E-mail: 1048680459@qq.com; 共同第一作者: 刘振杰 (1975-), 男, 硕士, 研究方向: 食品安全检测与控制技术应用, E-mail: 478430148@qq.com

通讯作者: 陈谋通 (1984-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 食源性致病菌危害形成与靶向控制, E-mail: cmt00n@hotmail.com; 共同通讯作者: 吴清平 (1962-), 男, 博士, 研究员, 中国工程院院士, 研究方向: 微生物安全与健康 E-mail: wuqp203@163.com

public health agencies. Bacteriophages have shown great potential in preventing and controlling foodborne pathogens owing to their strong host specificity, good safety profile, and fast reproduction rate. Several studies have shown bacteriophages to be natural, green bactericides with promising prospects for preventing and controlling pathogenic microorganisms in different types of food products. Although the application of bacteriophage-based biocontrol continues to face challenges, such as a narrow host range and the potential of resistance development, this approach will play a crucial role as a safe and effective method for preventing and controlling *L. monocytogenes* in food. In this article, recent research advances in the isolation and rapid detection of *L. monocytogenes*-specific phages in food as well as the use of bacteriophages for the efficient prevention and control of this bacterial pathogen are reviewed. This review paper provides a reference for the development of new and efficient bacteriophage-based prevention and control techniques.

**Key words:** *Listeria monocytogenes*; bacteriophage; food safety; prevention and control; detection

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, 简称单增李斯特菌) 是一种重要的革兰氏阳性食源性致病菌, 能够感染人类和动物。通过食用被污染的食物而感染人体是其主要致病途径, 易感人群为老年人、免疫缺陷患者、孕妇、新生儿等免疫力低下者, 感染单增李斯特菌可引发从发热性胃肠炎到李斯特菌病, 包括败血症、脑膜脑炎或胎儿感染, 导致自然流产、死产或早产等危害, 致死率高达 20%~30%, 被 WHO 列为四大重要的食源性致病菌之一<sup>[1,2]</sup>。由于单增李斯特菌具有耐高盐度、宽 pH 值和宽温度等特点<sup>[3]</sup>, 且广泛存在于食品中, 特别是加工肉类、家禽、海鲜、乳制品和农产品中, 它对食品安全构成严重威胁<sup>[4]</sup>。笔者所在团队在全国范围内食源性单增李斯特菌的污染调查中发现, 在新鲜蔬菜、生鲜、水产品、肉及肉制品中分别存在 5.49% (23/419)、21.7% (123/567)、7.92% (67/864)、29.9% (362/1212) 的污染率<sup>[5-8]</sup>。另外, 为掌握食用菌生产链中单增李斯特菌的污染特征, 曾针对 3 个工厂进行了为期一年的季节性采样调查, 利用多位点序列分型技术 (Multilocus Sequence Typing, MLST) 发现菇厂的搔菌工艺是单增李斯特菌污染食用菌产品的主要源头, 克隆复合群 (Clonal Complex, CC) 8、CC87 和 CC5 为持续污染食用菌生产过程的持留型菌株, 是导致单增李斯特菌高污染食用菌产品的主要因素<sup>[9]</sup>。因此, 如何高效防控食品及其生产过程中的单增李斯特菌污染是亟需解决的关键难题, 对保障和提升食品微生物安全水平具有非常重要的意义。

近年来, 由于抗生素在人类或动物治疗中的广泛使用, 细菌在适应选择压力的过程中形成耐药菌株甚至是超级细菌。2015 年, 耐多粘菌素基因 *mcr-1* 在革兰氏阴性菌中的传播引起了人们对细菌耐药性的空前关注<sup>[10]</sup>。耐药菌株通过动物产品产业

链从农场到餐桌进行传播, 对公众健康带来威胁, 最终造成严重的公共卫生问题<sup>[11]</sup>。本实验团队在全国各地的食品源单增李斯特菌的耐药情况调查中发现, 362 份 (29.9%) 单增李斯特菌阳性的肉类及肉制品样品的抗生素敏感试验显示, 90% 以上的分离株对 11 种抗生素敏感, 40.0% 对氨苄西林耐药, 11.8% 对四环素耐药, 对环丙沙星的中级耐药和耐药分别为 45.0% 和 4.6%<sup>[12]</sup>。在另一个调查中发现, 约有 21.20% (141/665) 的食用菌样品中单增李斯特菌呈阳性, 药敏试验显示, 95% 以上的单增李斯特菌对青霉素、氨苄西林、唑西林和克林霉素耐药, 90% 以上的菌株对 16 种抗生素敏感, 且耐药机制尚不清楚<sup>[13]</sup>。因此, 食源性单增李斯特菌污染来源广, 耐药性日趋严重, 对公众带来严重健康威胁。单增李斯特菌对常用于治疗人类和动物疾病的抗生素产生耐药性的问题令人担忧, 且细菌的耐药进化速度惊人, 因此亟待开发新型抗生素和抗生素替代品。噬菌体具有专一性强、繁殖快、安全性高等优点, 作为抗生素的替代品逐渐成为研究热点, 是解决细菌耐药性的最佳方法之一。本文综述了食品中单增李斯特菌噬菌体分离、高效防控与快速检测方面的研究现状, 为开发基于噬菌体的高效防控新技术提供参考。

## 1 李斯特菌噬菌体分离与鉴定

噬菌体 (Bacteriophage, Phage) 是一种能够在目标细菌内特异感染和复制的病毒<sup>[14]</sup>, 它们是地球上最丰富的生物, 数量极多, 并发挥着重要的生态作用。噬菌体分布范围广, 在自然界中普遍存在, 一般认为噬菌体的数量是细菌的 10 倍以上, 目前观察到的噬菌体已超过 5 000 种<sup>[15]</sup>。噬菌体主要由遗传物质核酸和蛋白质外壳组成, 噬菌体的长度差异很大, 通常从 24~200 nm<sup>[16]</sup>。根据其生活史, 噬菌体可分为裂解型和温和型。裂解型噬菌体增殖的

生命周期分为五步：吸附、注入、合成、组装、释放。首先，噬菌体利用细菌的特异性受体吸附到宿主细菌表面上，然后把自身的遗传物质注入到宿主细胞内，完成自身的生物合成及组装成新的噬菌体，最后裂解宿主细菌将其释放到环境中<sup>[17]</sup>。而温和型噬菌体所表现出来的生命周期，是将其遗传物质整合到细菌染色体（原噬菌体）中，并随后作为细菌基因组的一部分进行被动复制<sup>[18]</sup>。但温和型噬菌体也可以自发或响应细胞内部/外部的激活而切换到裂解周期<sup>[19]</sup>。噬菌体是天然的抗菌剂，繁殖能力强，具有专一性，能够特异裂解某一种宿主细菌，而不会对人或者其它动物的益生菌产生影响<sup>[20]</sup>。此外，在食品中使用噬菌体不会影响其外观、营养和风味<sup>[21]</sup>。因此，噬菌体在食品加工及保藏过程中对致病微生物的控制表现出良好的应用前景。

到目前为止，已经确认了有超过 500 种能特异性感染李斯特菌的噬菌体，其中大多数为温和型噬菌体<sup>[22]</sup>。可将李斯特菌噬菌体大致分为三组：第一组由肌尾噬菌体组成，具有约 140 kb 的大基因组和广泛的宿主范围，如 P100、A511 等<sup>[23,24]</sup>；第二组包括长尾噬菌体，基因组大小约为 35~40 kb，如 P35 和 P40 等；最后一类是基因组较大的长尾噬菌体，约 70 kb，如 P70<sup>[25]</sup>。目前，国内对于李斯特菌噬菌体的研究主要集中在溶源性噬菌体的诱导、裂解酶、噬菌体蛋白在快速检测中的应用，而对于裂解性噬菌体的分离鉴定及其临床应用等方面相对较少，但在国外相对较多。如表 1 所示，近几年国外有不少学者对部分李斯特裂解型噬菌体进行了特征鉴定，并在不同种类的食品中进行了生物防控的应用研究<sup>[26]</sup>。

表 1 李斯特菌噬菌体的分离鉴定

Table 1 Isolation and characterizations of *Listeriabacteriophage*

噬菌体	来源	噬菌体形态鉴定	裂解谱	文献
LMP1	家禽养殖场饲养肉鸡的粪便	属于长尾噬菌体，由一个直径约 55 nm 的头部和一个长约 250 nm 的尾部组成。	噬菌体 LMP1 对 ATCC 7644、ATCC 15313、ATCC 19114 和 ATCC 19115 都表现出裂解活性。	[27]
LMF-M61、LMF-M83	120 个屠宰场废水样本	均属于肌尾噬菌体，头部（72~76 nm）、尾长（195~203 nm）和尾宽（18~20 nm）。	两株噬菌体对菌株 19111、N7155、7644、5214、475、476 均有裂解作用。	[28]
Vb_LmoH_P61	农场的草青贮料	属于肌尾噬菌体，衣壳直径为 85.5±2.5 nm，尾长为 218.5±2.7 nm，宽度为 22.4±1.0 nm。	P61 感染了属于 1/2a 和 1/2b 型的 3 株单增李斯特菌，但只感染了 1/2c 和 4b 型中的 1 株和 4 株 4e 型中的 3 株。	[29]
FWLLm1	绵羊粪便	属于肌尾噬菌体，有一个可收缩的尾巴，头部平均直径 88 nm，尾部长 206 nm。	能感染 6 株单增李斯特菌、伊氏和威尔斯李斯特菌，但不能感染英诺克和格氏李斯特菌。	[30]
ΦIZSAM-1	奶酪盐渍区域的地面排水沟	属于长尾噬菌体。	对选用 21 株不同的单增李斯特菌均表现出广泛的宿主活性。	[31]
LMF-M116、LMF-M117、LMF-M119、LMF-M131 和 LMFM135	家禽屠宰场废水	均属于肌尾噬菌体，一种头部等距（68~94 nm），尾长 191~305 nm，尾宽 20~27 nm，另一种头部形态相似，只是尾长较短（150±1 nm），尾宽较厚（30±1 nm）。	LMF-M117、LMF-M119 和 LMF-M135 三个噬菌体分别显示出最宽的裂解谱，当它们组合时，具有很高的裂解所有 92 株单增李斯特菌的潜力。	[32]
LP-018	120 个不同的噬菌体群体	属于长尾噬菌体，尾部无收缩（168.02±9.15 nm）。	LP-018 是唯一发现在 10403S(Rha-) 上形成可见斑块的噬菌体。	[33]
LMPC01、LMPC02、LMPC03	污水、河流和土壤	LMPC01、LMPC02 属于肌尾噬菌体，LMPC03 属于长尾噬菌体，LMPC01 的头径和尾长分别为 85.33±4.7 和 122.46±6.0 nm，LMPC02 的头径和尾长分别为 88.36±1.5 和 130.01±4.6 nm，LMPC03 的头径和尾长分别为 56.84±3.3 和 279.04±3.7 nm。	LMPC01、LMPC02 和 LMPC03 分别能裂解 20 株（80%）、23 株（92%）和 12 株（48%）不同的单增李斯特菌。	[34]
vB-LmoM-SH3-3	某食品加工厂的污水	属于肌尾噬菌体，具有直径 95 nm 的二十面体头和长度 184 nm 的收缩尾。	95%（43/45）的李斯特菌可以被噬菌体 SH3-3 所裂解。	[35]
LP8	屠宰场污水	属于肌尾噬菌体。	LP8 裂解了 18 株单增李斯特菌和 5 株威尔斯李斯特菌。	[36]

## 2 基于噬菌体的单增李斯特菌检测技术

食品安全正逐渐成为一个重要的公共卫生问题。快速、准确地检测食源性致病菌是预防和控制人类食源性感染的最有效方法之一。目前单增李斯特菌的常规检测方法主要有三类：(1) 培养鉴定法，包括国标法（GB 4789.30-2016）、显色培养基法等；(2) 免疫分析法，如酶联免疫吸附法和胶体金免疫层析法；(3) 聚合酶链式反应法，如荧光定量 PCR 等，此外，部分质谱技术正逐步应用于单增李斯特菌的检测。但以上方法存在增菌时间长、干扰因素多、样品前处理复杂等问题，难以满足食品在流通、加工环节中现场快速准确检测的需求<sup>[37]</sup>，因此需要新的检测方法。在微生物的进化过程中，噬菌体的表面会形成一种能够专一识别宿主菌的特异性蛋白，噬菌体高度宿主特异性在食源性致病菌的检测中发挥着重要作用，可用于判断有无食源性致病菌、致病菌是否为活细胞。与核酸适配体和抗体等其他生物受体相比，噬菌体在检测病原体方面具有很多优势。首先，噬菌体具有独特的结构，包括有助于它们与细菌宿主结合的尾纤维，具有高度特异性，并且对人体细胞无害。其次，噬菌体能在非常短的时间内反应，而且不受食品成分的干扰<sup>[38]</sup>。此外，噬菌体是最丰富的生物实体，存在于其宿主生物存在的地方，而且它们在各种条件下相对稳定，例如 pH 值、温度和有机/无机溶剂，并且它们可以抵抗蛋白酶。它们的生产成本也比抗体便宜，并且保质期相对较长<sup>[39]</sup>。这些优势均表明噬菌体适合于食源性致病菌的现场快速检测。基于噬菌体的细菌检测技术主要分为噬菌体裂解法、噬菌体与生物传感器联用法、荧光染料标记法、检测报告基因法。

将基因修饰引入噬菌体基因组，使其成为传感和信号产生元件。最直接的方法是结合基因编码荧光蛋白或酶，产生易于检测的产物。一些研究表明，从不同生物体获得不同类型的生物发光可以整合到噬菌体基因组中，以便快速有效地检测食物样品中的病原体。例如，将来自刺胞动物、细菌和甲壳类动物等生物的荧光素酶编码序列整合到李斯特菌噬菌体 A500 的基因中，设计了 NanoLuc 荧光素酶报告噬菌体的发光特征，发现信号比其他报告基因高 100 倍。因此，基于 NanoLuc 荧光素酶的检测方法灵敏，能够直接检测生菜和牛奶样品中低至 3 CFU/100 mL 单增李斯特菌，比常规培养的方法快 72 h<sup>[39]</sup>。朱振华等<sup>[40]</sup>用噬菌体 Listex P100 的 *tsh* 基

因作为靶目标设计引物，用单增李斯特菌阳性、阴性样品进行验证，于 37 °C 经 8 h 振荡增菌后直接进行 PCR 分析，结果表明在 6 例阳性样品和 1 例阴性样品中扩增出特异性条带，而其他 4 例阴性样品未见靶条带。Nguyen 等<sup>[41]</sup>采用 AOAC 性能检测方法验证 PhageDx™ 李斯特菌检测不锈钢和陶瓷表面李斯特菌的有效性。噬菌体 Dx™ 检测是一种基于李斯特菌感染的简便、特异、敏感的检测方法，通过选择噬菌体和由此产生的荧光素酶报告基因的表达，对于不锈钢和陶瓷环境表面，只需 24.5 h 就能产生结果。

噬菌体裂解酶的细胞壁结合区域（Cell Wall Binding Domain, CBD）在快速检测中也有很大的应用价值，大多数的 CBD 通过碳水化合物配体的非共价结合将水解酶附着到细菌细胞壁中的特定底物上。据报道，一个细菌细胞上的 CBD 结合位点数量可达  $10^7$  个甚至更多<sup>[42]</sup>。内溶素中的 CBD 由于具有较高的宿主特异性，被认为是快速检测食源性致病菌的方法之一。荧光标记的 CBD 可以作为各种检测应用的昂贵抗体的替代材料。Kretzer 等<sup>[43]</sup>结合磁分离，利用来自李斯特菌噬菌体的内溶素（CBD-MS）细胞壁结合域，采用 A511::luxAB 生物荧光报告噬菌体检测。此联合检测方法能够在 6 h 内直接检测出每毫升培养物中约 100 个细菌，而对于受污染的食品，该方法仍能在 22 h 内的总检测时间（包括 16 h 的富集时间）持续检测极低数量（0.1~1.0 CFU/g）的李斯特菌活菌。噬菌体裂解酶是噬菌体感染宿主后期表达的可以裂解细菌细胞壁的肽聚糖水解酶类。李琼等<sup>[44]</sup>结合李斯特裂解酶 Ply511-N2，利用生物体内 ATP 作为检测靶标研发了一种新型的李斯特菌检测方法，检测灵敏度可以达到  $10^4\sim 10^5$  CFU/mL。

根据菌体和鞭毛抗原可将单增李斯特菌分为至少 14 个不同的血清型，其中大多数单增李斯特菌感染均由 4b、1/2a 和 1/2b 血清型菌株引起。在参与致病的毒力因子中，内化素 A（InlA）和内化素 B（InlB）是最具特征的毒力因子，在李斯特菌早期感染时对入侵肠道细胞起主要作用<sup>[45]</sup>。由于 InlA 和 InlB 在单增李斯特菌中的独有存在，这些蛋白也被用作该物种的检测目标。Moreira 等<sup>[46]</sup>以大肠杆菌中产生的重组 InlA 和 InlB 为靶标，利用人工天然抗体库 HAL9 和 HAL10，通过噬菌体展示筛选抗体。结果表明，5 种重组抗体均能以 100% 的敏感性（CI 29.24~100.0）和特异性（CI 88.78~100.0）识别单增

李斯特菌。由于李斯特菌病是一种可高度致命的食源性疾病，因此对食品 and 食品生产设施进行适当检测是预防暴发的最好方法之一。基于噬菌体的快速检测可以综合解决目前检测所面临的问题，比如耗时、费力、不能区分微生物的活细胞、仪器及试剂价格昂贵等，展现出一定的应用优势。

### 3 食品源单增李斯特菌的高效噬菌体防控研究

目前，消费者对天然产品日益增长的需求，使噬菌体成为了提高食品安全性的一种有前途的方法。噬菌体生物防控正逐渐被接受为一种天然和绿色的技术，有效地针对各种食品中的细菌病原体。如今，噬菌体产品的开发和商业化是一个全球的新兴行业。

1945年，李斯特噬菌体首次被发现<sup>[47]</sup>。1997年，从德国南部一家奶牛厂的污水样本中分离出来一株裂性噬菌体 P100，它能感染和杀死大多数血清型的单增李斯特菌。通过生物信息学分析显示，P100 没有毒力基因或抗生素抗性基因，且对大鼠进行了重复剂量口服毒性研究，没有产生任何异常的组织学改变，发病率和死亡率<sup>[48]</sup>。因此，P100 可以在食品中广泛应用起来。Axelsson 等<sup>[49]</sup>在发酵鱼产品“rakfish”前将噬菌体 Listex™ P100 引入接种单增李斯特菌的鱼中，整个发酵过程中观察到菌落数减少了 0.9 log。Alberto 等<sup>[50]</sup>发现在人工污染单增李斯特菌的生鳕鱼和鲑鱼的鱼片组织以及烟熏鲑鱼中，使用噬菌体 P100 之后生鱼的单增李斯特菌数量显著减少。Oliveira 等<sup>[51]</sup>评估了噬菌体 Listex™ P100 对单增李斯特菌在 10 °C 贮藏的甜瓜、梨和苹果制品（果汁和切片）上的抑制效果。发现甜瓜片和梨片中的单增李斯特菌分别减少了约 1.5 log 和 1 log，苹果汁中的单增李斯特菌不受噬菌体处理的影响，噬菌体的数量减少到几乎检测不到的程度。这些结果表明，Listex™ P100 在 10 °C 下贮藏时，可以抑制单增李斯特菌在鲜切水果和高 pH 果汁中的生长，而水果的 pH 值和物理形态都会影响噬菌体的效价，可能需要与其他技术相结合来提高噬菌体在高酸度水果上的应用。除了 P100 之外，也有不少学者分离出裂性噬菌体，Zhou 等<sup>[35]</sup>发现噬菌体 SH3-3 对三文鱼肉中的单增李斯特菌有较高的杀灭效果。因此，噬菌体 SH3-3 有可能作为一种天然的生防剂用于减少即食海鲜产品生产过程中的单增李斯特菌的

污染。Bigot 等<sup>[30]</sup>将新分离的噬菌体 FWLLm1 应用在人工污染的即食鸡胸肉卷中，发现病原菌浓度降低 2.5 log CFU/cm<sup>2</sup>。

在单一噬菌体的应用实验中发现，细菌普遍存在噬菌体抗性的问题，抗噬菌体的单增李斯特菌的快速出现，将使得噬菌体在食品的生物防控效果显著降低。在细菌与噬菌体不断进化的过程中，细菌可以通过不同的机制保护自己免受噬菌体感染，从而导致噬菌体应用于抑制细菌的效果并不理想。同时，宿主高度特异性是使用噬菌体进行生物防控的另一个主要障碍，几乎不可能用单一噬菌体针对一个物种中的所有菌株<sup>[52]</sup>。因此，与单一噬菌体制剂相比，应用多种噬菌体鸡尾酒更有优势，不仅可以降低耐药细菌出现的风险，而且还提供了更广泛的裂解谱。ListShield™ 由 6 个单独纯化的噬菌体按等比例组成，这些噬菌体中的每一个都对 108 株特定的单增李斯特菌血清型菌株有效<sup>[53]</sup>。Perera 等<sup>[54]</sup>利用 ListShield™ 处理生菜、奶酪、熏鲑鱼和冷冻食品后，单增李斯特菌的污染率分别降低了 91%、82%、90% 和 99%，ListShield™ 的应用不影响食品的感官质量，在颜色、味道和外观上没有发现显著差异。Diana 等<sup>[55]</sup>在西班牙干腌火腿中评估了噬菌体制剂 ListShield™ 和 Listex™ P100 抑制单增李斯特菌的效果，发现在 4 °C 和 12 °C 下应用 Listex™ P100 可使单增李斯特菌的污染在 24 h 降至检测限以下，在低污染（10<sup>3</sup> CFU/cm<sup>2</sup>）的样品中，经过 8 d 的 ListShield™ 处理后细菌可完全消除。Byun 等<sup>[34]</sup>将新分离到的 3 个裂解噬菌体制成噬菌体鸡尾酒，并将其应用在芹菜和香菇中，经 4 °C 保存 7 d 后，被单增李斯特菌污染的芹菜和香菇菌落总数分别减少了 2.2 log CFU/g 和 1.8 log CFU/g。

除了噬菌体鸡尾酒之外，还可以与其他天然的抗菌素或物理灭菌方法联合使用。Yang 等<sup>[56]</sup>将商业噬菌体（ListShield™）与 UV-C 联合处理来控制鸡胸肉中的单增李斯特菌，结果表明联合处理比单独处理的效果更明显，减少了 2.04 lg 的细菌数，且在颜色、pH 值、TBARS 和感官品质（最高 24 h）方面没有显著差异。Komora<sup>[57]</sup>评价了 HHP（200 和 300 MPa，5 min，10 °C）、Listex™ P100 和细菌素 PA-1 为一种新的非热工艺在牛奶中杀灭单增李斯特菌的效果。对于 10<sup>4</sup> CFU/mL 接种量，HHP 联合 Listex™ P100 在加压后可立即消除单增李斯特菌。当接种量到 10<sup>7</sup> CFU/mL 时，牛奶在 4 °C

的贮藏过程中, Listex™ P100、细菌素 PA-1 和 HHP (300 MPa) 对单增李斯特菌的灭活有协同作用, 噬菌体颗粒在冷藏 7 d 内是稳定的, 而细菌素 PA-1 只在 3 d 内保持稳定。

综上, 噬菌体在单增李斯特菌污染的食品中均表现出显著的抑菌效果。在加工过程中, 噬菌体可以替代普通的化学抑菌制剂, 且更为安全、高效率, 为无残留地减少单增李斯特菌的污染提供了技术支持。

#### 4 结论

随着消费者食品安全意识逐渐提高, 细菌的耐药性问题引起广泛关注, 而噬菌体防控技术作为一种食品安全防控措施正受到越来越多的重视。目前, 虽然噬菌体生物防治具有明显的优势, 但仍然需要克服一些障碍。现阶段研究显示, 宿主高度特异性的噬菌体虽然可以快速有效地裂解细菌, 但也极易造成抗性菌的出现, 从而出现细菌恢复生长的现象。另外, 也存在噬菌体不易保存、存放过程中效价变低、环境改变引起的杀菌效果不稳定等一系列问题, 限制了噬菌体在食品工业中应用的发展。未来我们需要解决的是降低抗性菌的出现、提高噬菌体在体外的稳定性以及改善噬菌体与环境的接触方式等, 才能将其有效地在食品工业中推广应用。而对于噬菌体作为检测探针快速识别目标细菌, 也存在一定的缺陷, 例如: 噬菌体对目标菌的裂解, 导致检测信号不稳定; 食品基质和噬菌体的宿主范围的限制会导致检测灵敏度的降低等。将来基于噬菌体的检测技术可以结合其他技术来进行检测, 如生物传感器等, 这样的方法操作简便、分析速度快, 可以满足食品在流通、加工环节中现场快速准确检测的需求。

尽管噬菌体生物防治仍然存在一些挑战, 但其作为一种安全有效的方法被越来越多地接受, 以消除或显著降低食品中的特定致病菌。目前国内的相关研究方兴未艾, 尚未批准噬菌体用于临床和食品微生物安全控制领域。而国际上针对单增李斯特菌的噬菌体控制研究和应用主要集中在欧美等国家, 市场上已有一些商业使用的噬菌体的产品, 并已通过美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 认证后上市, 即 ListShield™、ListShield™ P100。尽管我国目前尚未有获批的噬菌体生物制剂, 但我国学者在噬菌体高效控制致病菌取得了突破性进展, 其作为一种天然、绿色的杀菌剂在不同种类食品种均取得很好抑

制效果, 具有巨大的应用潜力。

#### 参考文献

- [1] AL OHALY R, RANGANATH N, SAFFIE M G, et al. *Listeria* spondylodiscitis: an uncommon etiology of a common condition; a case report [J]. BMC Infectious Diseases, 2020, 20(1): 559.
- [2] THAKUR M, ASRANI R K, PATIAL V. Chapter 6-*Listeria monocytogenes*: A Food-Borne Pathogen [M]. Foodborne Diseases, 2018, 157-192.
- [3] KURPAS M, WIECZOREK K, OSEK J. Ready-to-eat meat products as a source of *Listeria monocytogenes* [J]. Journal of Veterinary Research, 2018, 62(1): 49-55.
- [4] DE NOORDHOUT C M, DEVLEESSCHAUWER B, ANGULO F J, et al. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis [J]. Lancet Infectious Diseases, 2014, 14(11): 1073-1082.
- [5] CHEN M, CHENG J, WU Q, et al. Occurrence, antibiotic resistance, and population diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh aquatic products in China [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2215.
- [6] CHEN M, CHEN Y, WU Q, et al. Genetic characteristics and virulence of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh vegetables in China [J]. BMC Microbiology, 2019, 19(1): 119.
- [7] CHEN M, WU Q, ZHANG J, et al. Prevalence, enumeration, and pheno- and genotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from raw foods in South China [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 1026.
- [8] CHEN M, CHENG J, ZHANG J, et al. Isolation, potential virulence, and population diversity of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products in China [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 946.
- [9] SUN Q, CAI S, CHENG J, et al. Distribution, contamination routes, and seasonal influence of persistent *Listeria monocytogenes* in a commercial fresh *Hypsizygus marmoreus* production facility [J]. Food Control, 2021, 127: 108118.
- [10] 刘艺云. 质粒介导的黏菌素耐药基因 *mcr-1* 的发现 [D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- [11] 迟小惠, 冯友军, 郑培文. 耐药菌在人-动物-环境中的传播和遗传机制 [J]. 微生物学通报, 2019, 46(2): 311-318.
- [12] CHEN M, CHENG J, WU Q, et al. Prevalence, potential virulence, and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* Isolates from edible mushrooms in Chinese markets [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1711.
- [13] LASAGABASTER A, JIMÉNEZ E, LEHNHERR T, et al. Bacteriophage biocontrol to fight *Listeria* outbreaks in seafood [J]. Food and Chemical Toxicology, 2020, 145:

- 111682.
- [14] ACKERMANN H W. 5500 Phages examined in the electron microscope [J]. Archives of Virology, 2007, 152(2): 227-243.
- [15] SHARMA S, CHATTERJEE S, DATTA S, et al. Bacteriophages and its applications: an overview [J]. Folia Microbiologica, 2017, 62(1): 17-55.
- [16] 于堃,曹中赞,万明,等.噬菌体在防治畜禽沙门氏菌感染中的应用[J].动物医学进展,2021,42(4):115-119.
- [17] BATINOVIC S, WASSEF F, KNOWLER S A, et al. Bacteriophages in natural and artificial environments [J]. Pathogens (Basel), 2019, 8(3): 100.
- [18] O'SULLIVAN L, BOLTON D, MCAULIFFE O, et al. Bacteriophages in Food applications: from foe to friend [J]. Annual Review of food Science and Technology, 2019, 10(1): 151-172.
- [19] 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 Science and Technology, 2021, 144: 111266.
- [20] HAIYING CUI, LU YUAN, LIN LIN. Novel chitosan film embedded with liposome-encapsulated phage for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7 in beef [J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 177: 156-164.
- [21] KAWACKA I, OLEJNIK-SCHMIDT A, SCHMIDT M, et al. Effectiveness of phage-based inhibition of *Listeria monocytogenes* in food products and food processing environments [J]. Microorganisms (Basel), 2020, 8(11): 1764.
- [22] CARLTON R M, NOORDMAN W H, BISWAS B, et al. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2005, 43(3): 301-312.
- [23] GANEGAMA A G, CRIDGE A G, DIAS-WANIGASEKERA B M, et al. Effectiveness of phages in the decontamination of *Listeria monocytogenes* adhered to clean stainless steel, stainless steel coated with fish protein, and as a biofilm [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2013, 40(10): 1105-1116.
- [24] SCHMUKI M M, ERNE D, LOESSNER M J, et al. Bacteriophage P70: unique morphology and unrelatedness to other *Listeria* bacteriophages [J]. Journal of Virology, 2012, 86(23): 13099-13102.
- [25] KLUMPP J, LOESSNER M J. *Listeria* phages: genomes, evolution, and application [J]. Bacteriophage, 2013, 3(3): e26861.
- [26] LEE S H, LEE H S, HEO S, et al. Isolation and characterization of listeria phages for control of growth of *Listeria monocytogenes* in dairy foods [J]. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 2017, 37(2): 320-328.
- [27] AYAZ N D, ONARAN B, CUFAOGLU G, et al. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* Isolated from beef and sheep carcasses in Turkey with characterization of locally isolated listeria phages as a control measure [J]. Journal of Food Protection, 2018, 81(12): 2045-2053.
- [28] STONE E, LHOMET A, NEVE H, et al. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* phage vB\_LmoH\_P61, a phage with biocontrol potential on different food matrices [J]. Frontiers in Sustainable Food Systems, 2020, 4: 521645.
- [29] BIGOT B, LEE W J, MCINTYRE L, et al. Control of *Listeria monocytogenes* growth in a ready-to-eat poultry product using a bacteriophage [J]. Food Microbiology, 2011, 28(8): 1448-1452.
- [30] SCATTOLINI S, D'ANGELANTONIO D, BONI A, et al. Characterization and *in vitro* efficacy against *Listeria monocytogenes* of a newly isolated bacteriophage, ΦIZSAM-1 [J]. Microorganisms, 2021, 9(4): 731.
- [31] CUFAOGLU G, AYAZ N D. *Listeria monocytogenes* risk associated with chicken at slaughter and biocontrol with three new bacteriophages [J]. Journal of Food Safety, 2019, 39(3): e12621.
- [32] SONG Y, PETERS T L, BRYAN D W, et al. Homburgvirus LP-018 Has a unique ability to infect phage-resistant *Listeria monocytogenes* [J]. Viruses, 2019, 11(12): 1166.
- [33] BYUN K, HAN S H, CHOI M W, et al. Isolation, characterization, and application of bacteriophages to reduce and inhibit *Listeria monocytogenes* in celery and enoki mushroom [J]. Food Control, 2022, 135: 108826.
- [34] ZHOU C, ZHU M, WANG Y, et al. Broad host range phage vB-LmoM-SH3-3 reduces the risk of *Listeria* contamination in two types of ready-to-eat food [J]. Food Control, 2020, 108: 106830.
- [35] LI T, ZHAO X, WANG X, et al. Characterization and preliminary application of phage isolated from *Listeria monocytogenes* [J]. Frontiers in Veterinary Science, 2022, 9: 946814.
- [36] ZHAO X, LIN C, WANG J, et al. Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 24(3): 297-312.
- [37] DENES T, VONGKAMJAN K, ACKERMANN H, et al. Comparative genomic and morphological analyses of *Listeria* phages isolated from farm environments [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(15): 4616-4625.
- [38] ALIAKBAR AHOVAN Z, HASHEMI A, DE PLANO L

- M, et al. Bacteriophage based biosensors: trends, outcomes and challenges [J]. *Nanomaterials*, 2020, 10(3): 501.
- [39] 朱振华,王双桂.基于特异性噬菌体引物PCR检测水产品中单增李斯特菌方法的初步研究[J].*检验检疫科学*,2007(S1):34-35.
- [40] NGUYEN MM, GIL J, HAHN W, et al. Validation of the Phage Dx *Listeria* assay for detection of *Listeria* spp. on stainless steel and ceramic environmental surfaces AOAC performance tested method SM 102005 [J]. *Journal of AOAC International*, 2021, 104(6): 1609-1619.
- [41] YU J, ZHANG Y, ZHANG Y, et al. Sensitive and rapid detection of *Staphylococcus aureus* in milk via cell binding domain of lysine [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 77: 366-371.
- [42] KRETZER J W, SCHMELCHER M, LOESSNER M J. Ultrasensitive and fast diagnostics of viable *Listeriace* cells by CBD magnetic separation combined with A511::luxAB detection [J]. *Viruses*, 2018, 10(11): 626.
- [43] 李琼.高效杀灭单增李斯特菌噬菌体裂解酶的改造及其在检测中的应用研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学,2019.
- [44] GUILLET C, JOIN-LAMBERT O, LE MONNIER A, et al. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii* [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2010, 16(1): 136-138.
- [45] MOREIRA G M S G, GRONOW S, DÜBEL S, et al. Phage display-derived monoclonal antibodies against internalins A and B allow specific detection of *Listeria monocytogenes* [J]. *Frontiers in Public Health*, 2022, 10: 712657.
- [46] SCHWARTZ B, HEXTER D, BROOME C V, et al. Investigation of an outbreak of listeriosis: new hypotheses for the etiology of epidemic *Listeria monocytogenes* infections [J]. *J Infect Dis*, 1989, 159(4): 680-685.
- [47] CARLTON R M, NOORDMAN W H, BISWAS B, et al. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application [J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2005, 43(3): 301-312.
- [48] AXELSSON L, BJERKE G A, MCLEOD A, et al. Growth behavior of *Listeria monocytogenes* in a traditional norwegian fermented fish product (rakfisk), and its inhibition through bacteriophage addition [J]. *Foods*, 2020, 9(2): 119.
- [49] BAÑOS A, GARCÍA-LÓPEZ J D, NÚÑEZ C, et al. biocontrol of *Listeria monocytogenes* in fish by enterocin AS-48 and *Listeria* lytic bacteriophage P100 [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2016, 66: 672-677.
- [50] OLIVEIRA M, VIÑAS I, COLÁS P, et al. Effectiveness of a bacteriophage in reducing *Listeria monocytogenes* on fresh-cut fruits and fruit juices [J]. *Food Microbiology*, 2014, 38: 137-142.
- [51] CHEN Y, BATRA H, DONG J, et al. Genetic engineering of bacteriophages against infectious diseases [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 954.
- [52] SUNDARRAM A, BRITTON B C, LIU J, et al. Lytic capacity survey of commercial *Listeria* phage against *Listeria* spp. with varied genotypic and phenotypic characteristics [J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2021, 18(6): 413-418.
- [53] PERERA M N, ABULADZE T, LI M, et al. Bacteriophage cocktail significantly reduces or eliminates *Listeria monocytogenes* contamination on lettuce, apples, cheese, smoked salmon and frozen foods [J]. *Food Microbiology*, 2015, 52: 42-48.
- [54] GUTIÉRREZ D, RODRÍGUEZ-RUBIO L, FERNÁNDEZ L, et al. 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.
- [55] SUNGDAE YANG M S S H. Reduction of *Listeria monocytogenes* on chicken breasts by combined treatment with UV-C light and bacteriophage list shield [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, 86: 193-200.
- [56] KOMORA N, MACIEL C, PINTO C A, et al. Non-thermal approach to *Listeria monocytogenes* inactivation in milk: The combined effect of high pressure, pediocin PA-1 and bacteriophage P100 [J]. *Food Microbiology*, 2020, 86: 103315.