

鲜切苦菊、生菜和紫甘蓝上假单胞菌的分离鉴定及其噬菌体的初步筛选

杨园平, 潘旬, 雷智栋, 石慧*

(西南大学食品科学学院, 重庆 400715)

摘要: 鲜切蔬菜是人类摄取矿物质和维生素的重要来源, 假单胞菌是鲜切蔬菜上的主要腐败菌。为了控制鲜切蔬菜中假单胞菌的污染, 该研究采用假单胞菌培养基和 16S rRNA 基因序列分析, 对鲜切苦菊、生菜和紫甘蓝中的假单胞菌进行分离鉴定, 筛选得到 2 株铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*), 1 株荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 和 1 株湖南假单胞菌 (*Pseudomonas hunanensis*)。将铜绿假单胞菌和荧光假单胞菌这两种腐败菌分别回接到三种鲜切蔬菜中, 证实了铜绿假单胞菌致病能力更强, 并发现同种假单胞菌影响下的鲜切蔬菜腐败速度从快到慢为: 苦菊、生菜、紫甘蓝。利用双层琼脂平板法, 分别以铜绿假单胞菌和荧光假单胞菌为宿主筛选分离得到了噬菌体 vB_Pae_503-1 和 vB_Pfl_503-2, 经抑菌实验证明噬菌体能有效抑制假单胞菌的生长。

关键词: 鲜切蔬菜; 假单胞菌; 分离鉴定; 16S rRNA 基因序列; 噬菌体

文章篇号: 1673-9078(2022)01-126-133

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.1.1407

Isolation and Identification of *Pseudomonas* spp. from Fresh-cut Chrysanthemum, Lettuce, and Purple Cabbage and Preliminary Screening of Their Phages

YANG Yuanping, PAN Xun, LEI Zhidong, SHI Hui*

(School of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Fresh-cut vegetables are an important source of minerals and vitamins for human beings; *Pseudomonas* spp. are mainly responsible for spoilage of fresh-cut vegetables. To control *Pseudomonas* spp. contamination of fresh-cut vegetables, *Pseudomonas* spp. culture media and 16S rRNA gene sequence analysis were used to isolate and identify *Pseudomonas* spp. in fresh-cut bitter chrysanthemum, lettuce, and purple cabbage. Two strains of *Pseudomonas aeruginosa*, one strain of *Pseudomonas fluorescens*, and one strain of *Pseudomonas hunanensis* were screened. *P. aeruginosa* and *P. fluorescens* were re-inoculated into the three types of fresh-cut vegetables respectively, and results confirmed that *P. aeruginosa* had stronger spoilage ability. Spoilage rate under the influence of the same *Pseudomonas* spp. decreased in the following order: bitter chrysanthemum > lettuce > purple cabbage. The phages vB_Pae_503-1 and vB_Pfl_503-2 were screened and isolated by the double-layer agar plate method when *P. aeruginosa* and *P. fluorescens* were respectively used as the hosts. Results of bacteriostatic experiments indicate that phages can effectively inhibit the growth of *Pseudomonas* spp..

Key words: fresh cut vegetables; *Pseudomonas*; isolation and identification; 16S rRNA gene sequence; phage

引文格式:

杨园平,潘旬,雷智栋,等.鲜切苦菊、生菜和紫甘蓝上假单胞菌的分离鉴定及其噬菌体的初步筛选[J].现代食品科技,2022,38(1): 126-133

YANG Yuanping, PAN Xun, LEI Zhidong, et al. Isolation and identification of *Pseudomonas* spp. from fresh cut chrysanthemum, lettuce and purple cabbage and preliminary screening of phages [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(1): 126-133

收稿日期: 2021-12-14

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32072322)

作者简介: 杨园平 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品微生物安全, E-mail: induetime0912@163.com

通讯作者: 石慧 (1986-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品微生物安全, E-mail: swuhui2017@163.com

鲜切蔬菜是经清洗、切割、包装等加工过程制成的即食产品,是人类饮食的重要组成部分^[1],是人类摄取矿物质和维生素的重要来源,其高含量的维生素、纤维、矿物质和抗氧化物质是有益人体健康的重要因素^[2],既保留鲜切蔬菜原有的物理、化学、感官和营养特性,可利用度高(100%可食用)^[3],又满足消费者对于天然、营养、新鲜、方便的生活方式的需求。随着人们生活节奏的加快以及对轻食健康生活方式的追求,人们对鲜切苦菊、生菜和紫甘蓝的关注度越来越高,其凭借新鲜、方便、环保及健康的特点已成为国内外蔬菜加工的主流。苦菊嫩叶中氨基酸种类齐全,蛋白质、膳食纤维含量较高;生菜富含维生素、纤维素、矿物质等多种营养物质;紫甘蓝富含多酚、花色苷及硫代葡萄糖苷等营养成分。然而,水果蔬菜是属于易腐败易变质的农产品^[4],巨量的果蔬浪费是全球面临难题^[5]。

鲜切果蔬在从收获、加工、包装、运输,最后到销售的过程中都会发生微生物的污染,导致鲜切果蔬上的微生物种群发生改变^[6,7]。在加工过程中,鲜切果蔬因为本身高水分的特性,再加上鲜切生菜加工过程中的物理损伤导致的伤口暴露,汁液流出,提供给微生物有益的生存环境和营养物质,使微生物大量繁殖,导致鲜切果蔬加快腐败变质。因此,鉴定出果蔬中常见优势腐败菌,从而针对性加以控制,以期更好地延长其保质期就尤为重要。

在很多研究中都证明假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.)是鲜切蔬菜叶面上的主要腐败菌^[8-10],通过产生水解酶(果胶酶),致使蔬菜软腐烂。保持低温是常用的抑制腐败菌生长繁殖的手段,但某些假单胞菌是嗜冷菌,因此在冷藏保存的鲜切蔬菜上,它们可以正常繁殖^[11]。常见的假单胞菌有铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)^[12]。其中铜绿假单胞菌是条件致病菌^[13],可引起人严重感染,包括败血症、肺炎、心内膜炎、中耳炎和角膜炎等^[14];荧光假单胞菌在4℃时繁殖速度很快,是低温状态下常见腐败菌,人感染了会引起败血症、感染性休克、血管内凝血等后果^[15]。

噬菌体是专门攻击细菌,并在其细胞内繁殖的一类病毒,对其他类型的细胞没有影响^[16]。噬菌体在自然界中广泛分布^[17],且其具有高度特异性,一种噬菌体只针对某一种细菌,通常在单独属或种内有特异性,因此它不会影响其他非目标细菌^[18],这也使得噬菌体可被应用于鲜切蔬菜中针对性地杀灭假单胞腐败菌。利用噬菌体控制铜绿假单胞菌的感染在医疗方面被广

泛应用,许多研究表明铜绿假单胞菌噬菌体可有效控制由其引起的呼吸道感染^[19]、肺部感染^[20]等,荧光假单胞菌主要引起食物腐败,Nascimento等人^[21]分离得到一株荧光假单胞菌噬菌体并进行抑菌应用,结果表明噬菌体对变质乳中的荧光假单胞菌具有跟大抑菌潜力。Zhang等人^[22]利用沙门氏菌噬菌体的内溶酶成功对液体样品和固体样品中的铜绿假单胞菌和恶臭假单胞菌进行了有效控制,并对他们在各种固体表面形成的生物膜进行了抑菌研究,但关于利用噬菌体控制鲜切蔬菜上的假单胞菌鲜有研究。

本研究以鲜切苦菊、生菜和紫甘蓝为研究对象,从中筛选分离得到4株假单胞菌并对其鉴定,以鉴定出的两株假单胞菌为宿主菌筛选分离得到噬菌体。再将这两株假单胞菌回接至灭菌的三种鲜切蔬菜中,鉴定其致腐能力。对于进一步了解鲜切蔬菜中的假单胞菌至关重要,以便有针对性地对鲜切蔬菜中的假单胞菌加以控制,为鲜切蔬菜的保鲜提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 原料

1.1.1 实验样品

鲜切生菜,鲜切苦菊,鲜切紫甘蓝均购于北碚区永辉超市、天生菜市场及渝北区新世纪超市,共9个样品;噬菌体实验所用的水样源于重庆市北碚区龙凤溪与嘉陵江。

1.1.2 实验试剂

假单胞菌(CFC)培养基、LB肉汤、PALCAM琼脂、胰酪胨大豆琼脂培养基(TSA),青岛高科园海博生物技术有限公司;agar琼脂,上海源叶生物科技有限公司;全式金试剂盒,北京三药科技开发公司;二甲亚砜,上海生工生物工程有限公司;次氯酸钠、乙醇(95%)、丙三醇、盐酸,重庆川东化工有限公司;氯化钙(分析纯)、氯化钠(分析纯),上海泰坦科技股份有限公司;MgSO₄·7H₂O(分析纯),成都市科龙化工试剂厂;Tris(分析纯),索莱宝生物技术有限公司;SM缓冲液(由NaCl、MgSO₄·7H₂O、Tris-HCl和蒸馏水按一定比例配制)。

1.1.3 主要仪器设备

SQP电子天平,Sartorius;DHP-9272恒温培养箱、MX-F微型涡旋混合仪、DK-98-II万用电炉,上海沪西分析仪器有限公司;BHC-1300IIA/B3生物安全柜,苏州净化设备有限公司;LDZF-30KB立式压力蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械有限公司;10-1000μL移液器,上海泰坦科技股份有限公司;DZF-6021鼓风干燥

箱, 上海一恒科学仪器有限公司; BCD-649W 普通冰箱, 青岛海尔集团; SW-CJ-FD 超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; VeritiTM2720 PCR 热循环仪, 赛默飞世尔中国; Mill-Q 纯水系统, Merck Millipore; U410 超低温冰箱, NEW BRUNSWICK Premium; THZ-D 恒温摇床, 江苏太仓市实验设备厂; 5810R 冷冻高速离心机, Eppendorf; ZF-90 多功能暗箱紫外透射仪, 上海宝山顾村电光仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 假单胞菌的分离与鉴定

剪取 5 g 腐败样品于 50 mL 锥形瓶, 加入 45 mL 0.85%生理盐水, 振荡, 静置, 制成菌液。吸取 50 μ L 菌液, 涂布于假单胞菌(CFC)选择培养基, 放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱, 培养 48 h。挑取培养基上形态不同的菌落, 在假单胞菌(CFC)培养基上进行平板划线, 放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱, 培养 48 h。重复平板划线, 直至获得大小、形态相同的菌落。

将纯化后的菌株提取 DNA, 用全式金 DNA 提取试剂盒依据说明书提取 DNA, 提取的 DNA 产物于 -20 $^{\circ}$ C 保存。称取 2.5 g 琼脂糖置于 25 mL TAE 电泳缓冲液中, 称重, 加热融化, 然后用 TAE 配平, 趁热加入染料, 待温度降至 60 $^{\circ}$ C 左右时, 均匀铺板, 制成 1%的琼脂糖凝胶。PCR 反应结束后, 加样 (DNA 示踪剂染色), 以 200 V, 120 mA 进行琼脂糖凝胶电泳。电泳结束后, 用凝胶成像仪观察记录结果。

表 1 PCR 试剂及用量

Table 1 PCR reagents and dosage

试剂	使用量 (30 μ L 体系)
模板 DNA	1 μ L
Taq 酶 (5 U/ μ L)	0.15 μ L
10 \times Taq Buffer (Mg ²⁺)	3 μ L
dNTPs (各 2.5 mmol/L)	2.4 μ L
引物 F (1 μ mol/L)	1 μ L
引物 R (1 μ mol/L)	1 μ L
去离子水	剩余体积用水补足

PCR 扩增, 将提取的 DNA 进行 PCR 扩增, 正向引物为 27 F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 反向引物为 1492 R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')^[23], 总体积为 30 μ L, 其中各种试剂及用量见表 1。PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物测序, 由上海生物工程公司测序, 生物工程 (上海) 公司完成, 测序结果在 NCBI 网站, BLAST 数据库中进行同源性搜

索, 选取同源性较高的序列, 用软件 MAGE-X 中的 Neighbor-Joining 构建系统发育进化树。

1.2.2 假单胞菌致病能力鉴定

在超净灭菌台中, 挑取单菌落于 30 mL LB 培养液, 摇床培养 16 h, 制成菌悬液。将鲜切菜样本纯水冲洗, 洗去表面泥土, 摘去外层叶片和不健康的叶片, 用灭菌后的剪刀分成大小均一的组织片, 再用 200 mg/kg 次氯酸钠溶液浸泡 10 min, 再用无菌纯水冲洗, 晾干。在超净灭菌台中, 将处理过的鲜切菜组织片, 分别浸泡 0.85%生理盐水 (作为对照) 和稀释 10 倍后的菌悬液, 装入灭菌后的保险密封袋, 室温保存, 每天对蔬菜进行感官评定分析^[24], 观察记录鲜切蔬菜的组织结构、颜色与气味, 进而评价鲜切蔬菜的腐败程度。

1.2.3 噬菌体的分离与纯化

从重庆市北碚区龙凤溪水与嘉陵江采集水样, 水样通过滤纸过滤, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 CaCl₂^[25], 在 8000 \times g 离心 4 min, 取上清液用无菌 0.22 μ m 滤膜过滤到无菌容器。将纯化后的假单胞菌挑取单菌落接种到 LB 培养基中并过夜培养。将处理后的水样与过夜培养的宿主菌混匀加入 2 \times LB 培养基中过夜培养。培养液离心后收集上清液, 上清液通过 0.22 μ m 滤膜过滤。取 10 μ L 滤液滴在含有宿主菌的双层板中并观察噬菌斑^[26]。

利用双层平板法纯化噬菌体。用无菌牙签挑取双层板上的噬菌斑加入 1 mL 的 SM 缓冲液震荡混匀后静置 20 min, 离心后取上清液到无菌容器中。将上清液 10 倍稀释后, 取稀释液与等体积的假单胞菌菌液混合均匀, 并在室温下静置 15 min。将混合物全部加入 5 mL LB soft agar 中混匀, 倾倒在 TSA 板上。待上层软琼脂凝固后, 倒置放于 37 $^{\circ}$ C 培养 16 h, 挑取大且透亮的单斑加入 1 mL 的 SM 缓冲液中, 重复上述的步骤 5~6 次, 直到得到大小、形态相同的单斑为止。将纯化后的噬菌体加入 10%二甲亚砜溶液混合均匀后于 -80 $^{\circ}$ C 保藏。

1.2.4 噬菌体对假单胞菌生长的抑制作用

挑取假单胞菌的单菌落于 37 $^{\circ}$ C、120 r/min 下培养至对数初期, OD_{600 nm} 为 0.2。取 4 mL 对数初期菌液与 1 mL 噬菌体上清液加入 10 mL LB 培养基中, 对照组加入 1 mL LB 培养液, 放置于 37 $^{\circ}$ C 摇床内培养, 每隔 1 h 取出测 OD_{600 nm}, 共 8 h, 实验进行三组重复。

1.2.5 数据统计分析

实验进行三组重复。本研究所得数据在 Excel 2016 中统计, 采用 SPSS (version 22.0) 软件对数据进行统计分析, $p < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。使

用 GraphPad Prism 8.0 对数据进行作图, 运用 ANOVA 进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 鲜切蔬菜中假单胞菌的分离与鉴定

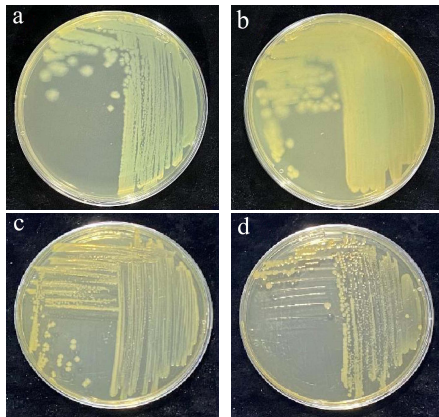


图1 未知菌株 A (a)、B (b)、C (c) 和 D (d)

Fig.1 Unknown strains A (a), B (b), C (c) and D (d)

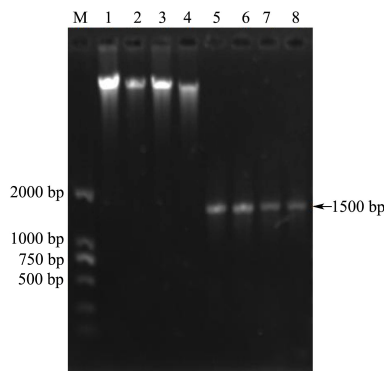


图2 鲜切蔬菜中假单胞菌的基因组 DNA 和 16S rRNA PCR 扩增产物电泳图

Fig.2 Electrophoretic map of PCR amplification products of genomic DNA and 16S rRNA of *Pseudomonas* in fresh cut vegetables

注: M: 2000 bp DNA Marker; 泳道 1、2、3 和 4 分别为 A、B、C 和 D 的基因组 DNA; 泳道 5、6、7 和 8 分别为 A、B、C 和 D 的 16S rRNA PCR 扩增产物。

将 9 份鲜切蔬菜样本稀释涂布于假单胞菌(CFC)培养基上进行菌落培养, 共培养出四种菌落形态明显不同的菌株, 分别为菌株 A、菌株 B、菌株 C 和菌株 D。观察其菌落和形态特征, 在 CFC 选择培养基上 37 °C 培养 48 h, 菌株 A 的菌落颜色为绿色, 菌落表面有光泽, 菌落形状为扁平湿润, 不透明, 边缘轻微波状 (图 1a); 菌株 B 的菌落颜色为黄绿色, 菌落表面有光泽, 菌落形状为粘稠湿润, 不透明, 边缘不完整 (图 1b); 菌株 C 的菌落颜色为黄色, 菌落表面有光泽, 菌落形状为圆形, 半透明, 稍凸起, 边缘完整

光滑 (图 1c); 菌株 D 的菌落颜色为黄色, 菌落形状为圆形, 较透明, 中心稍隆起, 边缘轻微波状 (图 1d)。

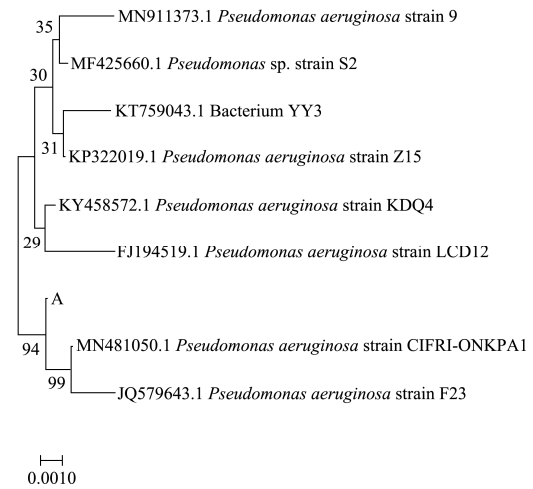


图3 未知菌株 A 系统发育进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of unknown strain A

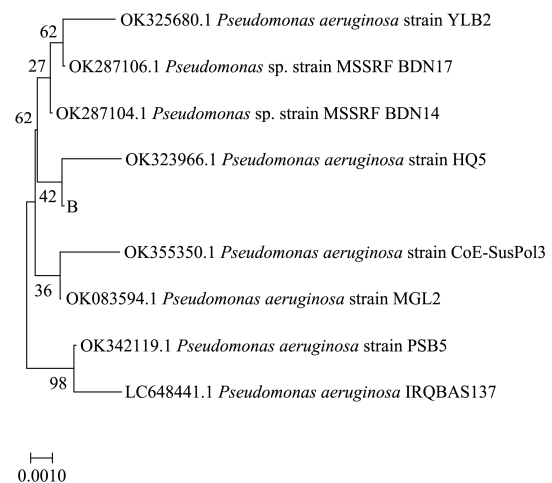


图4 未知菌株 B 系统发育进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of unknown strain B

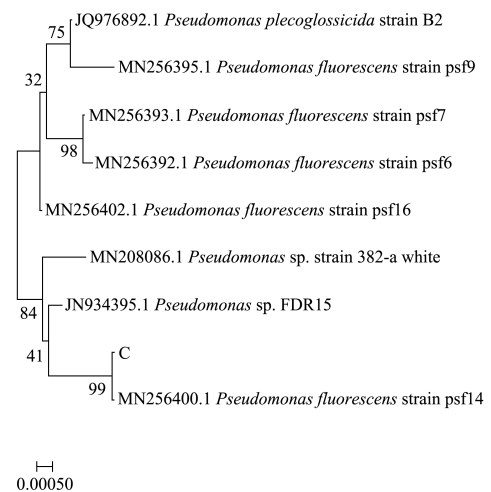


图5 未知菌株 C 系统发育进化树

Fig.5 Phylogenetic tree of unknown strain B

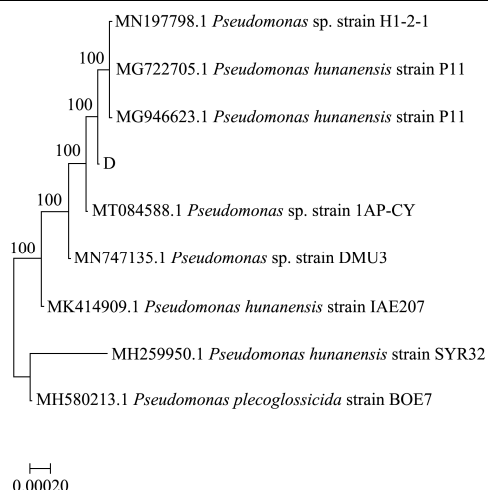


图6 未知菌株D系统发育进化树

Fig.6 Phylogenetic tree of unknown strain B

利用平板划线法对鲜切蔬菜中的四种未知菌株进行分离纯化,采用16S rRNA的PCR扩增和基因序列分析方法^[27]将筛选得到的四种未知菌株以总DNA为模板PCR扩增后经电泳检测,电泳凝胶上显示出明显的条带,假单胞菌DNA均大于2000 bp,其PCR扩增产物均为1500 bp(图2)。PCR产物由上海生物工程公司测序,测得它们的16S rRNA序列后用SnapGene数据库进行序列比对。图3~6为四种未知菌株的16S rRNA基因序列比对结果在NCBI网站上进行BLAST同源匹配的菌株,并用软件MEGA-X中的Neighbor-Joining构建系统发育进化树。

由系统发育进化树结合菌落及形态特征可得:未知菌株A与铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的DNA匹配率最高,BLAST同源率为99%。未知菌株B与铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)DNA匹配率最高,BLAST同源率为99%。未知菌株C与荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)DNA匹配率较高,BLAST同源率为99%。未知菌株D与湖南假单胞菌(*Pseudomonas hunanensis*)DNA匹配率最高,BLAST同源率为100%。

结果表明,在检测的9份样品中,共筛选得到2株铜绿假单胞菌、1株荧光假单胞菌和1株湖南假单胞菌。其中来自永辉超市和天生菜市场的三种鲜切蔬菜样品中含有一种具有相同菌落形态和颜色的假单胞菌,来自新世纪超市的三种鲜切蔬菜样本中均含有两种不同菌落形态和颜色的假单胞菌,说明不同来源的鲜切蔬菜上的假单胞菌具有多样性。

2.2 铜绿假单胞菌和荧光假单胞菌致病能力鉴定

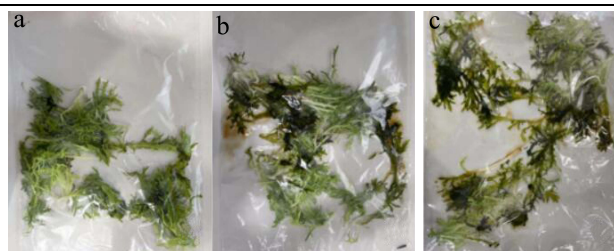


图7 苦菊回接第3 d的结果

Fig.7 Bitter chrysanthemum loopback the results of the third day

注:a:0.85%生理盐水处理3 d后的苦菊(对照);b:荧光假单胞菌回接3 d后的苦菊;c:铜绿假单胞菌回接3 d后的苦菊。



图8 生菜回接第4 d的结果

Fig.8 Lettuce loopback the results of the fourth day

注:a:0.85%生理盐水处理4 d后的生菜(对照);b:荧光假单胞菌回接4 d后的生菜;c:铜绿假单胞菌回接4 d后的生菜。

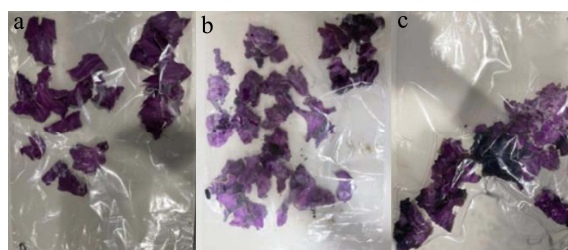


图9 紫甘蓝回接第6 d的结果

Fig.9 Purple cabbage loopback the results of the sixth day

注:a:0.85%生理盐水处理6 d后的紫甘蓝(对照);b:荧光假单胞菌回接6 d后的紫甘蓝;c:铜绿假单胞菌回接6 d后的紫甘蓝。

将铜绿假单胞菌和荧光假单胞菌经纯化后制成菌液,接种至灭菌鲜切蔬菜进行回接实验,对比三种蔬菜组织结构:苦菊最为细软,叶片最薄,分叉最多,水分中等;生菜,叶片厚度中等,水分最多,叶片软脆;紫甘蓝叶片最厚,水分最少,叶片硬脆。苦菊样品在第3 d均出现腐败现象,相同保存时间下,0.85%生理盐水处理后的苦菊样品腐败程度最低,腐败的叶片数量最少,未流出腐败组织液。荧光假单胞菌回接后的苦菊样品腐败程度其次,腐败的叶片数量其次,汁液较少。铜绿假单胞菌回接后的苦菊样品腐败程度最强,腐败叶片数量最多,汁液较多,散发恶臭,致

呕(图7);生菜样品则在第4d有明显腐败现象,0.85%生理盐水处理后的生菜样品腐败程度最低,腐败的叶片数量最少,未流出腐败组织液。荧光假单胞菌回接后的生菜样品腐败程度其次,腐败的叶片数量其次,汁液较少。铜绿假单胞菌回接后的生菜样品腐败程度最强,腐败叶片数量最多,汁液较多,散发恶臭,致呕(图8);紫甘蓝在第6d出现腐败现象,0.85%生理盐水处理后的紫甘蓝样品腐败程度最低,腐败的叶片数量最少,未流出腐败组织液,叶片横截面为白色。荧光假单胞菌回接后的紫甘蓝样品腐败程度其次,腐败的叶片数量其次,紫色汁液较少,叶片横截面为灰色。铜绿假单胞菌回接后的紫甘蓝样品腐败程度最强,腐败叶片数量最多,紫色汁液较多,叶片横截面为黄色,散发恶臭,致呕(图9)。当苦菊大部分腐败的时候,生菜才开始有明显的腐败现象,当生菜大部分腐败的时候,紫甘蓝才开始有轻微腐败现象。由此可知,铜绿假单胞菌的致腐能力比荧光假单胞菌强,且在同种假单胞菌影响下的鲜切蔬菜腐败速度从快到慢为:苦菊、生菜、紫甘蓝。

2.3 噬菌体的筛选分离

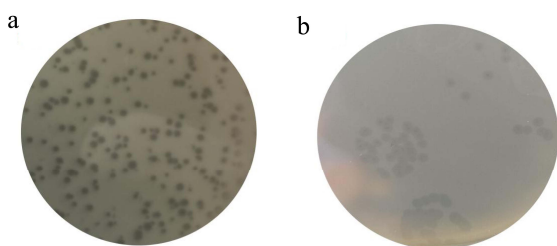


图10 噬菌体的噬菌斑

Fig.10 Plaque of phage

注: a: vB_Pae_503-1的噬菌斑; b: vB_Pfl_503-2的噬菌斑。

噬菌体的富集培养液与铜绿假单胞菌和荧光假单胞菌作双层平板时出现了噬菌斑,说明噬菌体富集培养液中有针对这两株假单胞菌的噬菌体。反复挑单斑纯化,获得两株较纯的噬菌体,分别命名为vB_Pae_503-1和vB_Pfl_503-2。vB_Pae_503-1的噬菌斑边缘整齐、清晰透亮(图10a);噬菌体vB_Pfl_503-2的噬菌斑边缘整齐、中间清晰透亮且周围有晕圈(图10b)。

2.4 噬菌体对铜绿假单胞菌和荧光假单胞菌生长的抑制作用

为了评估噬菌体对宿主菌生长的抑制作用,使用噬菌体 vB_Pae_503-1 和 vB_Pfl_503-2 分别感染铜绿

假单胞菌和荧光假单胞菌,检测两种假单胞菌 OD_{600 nm} 的变化。从5h开始,噬菌体 vB_Pae_503-1 和 vB_Pfl_503-2 对宿主菌的抑制作用都显著增加。噬菌体 vB_Pae_503-1 从2h开始抑制铜绿假单胞菌的生长并持续了6h。铜绿假单胞菌的 OD_{600 nm} 在8h时相比于对照组降低了0.42(图11a)。噬菌体 vB_Pfl_503-2 从1h开始抑制荧光假单胞菌的生长并持续了8h。荧光假单胞菌的 OD_{600 nm} 在8h时相比于对照组降低了0.38(图11b);结果表明,噬菌体 vB_Pae_503-1 和 vB_Pfl_503-2 可以有效地控制铜绿假单胞菌和荧光假单胞菌的生长,显示出良好的抑菌潜力。

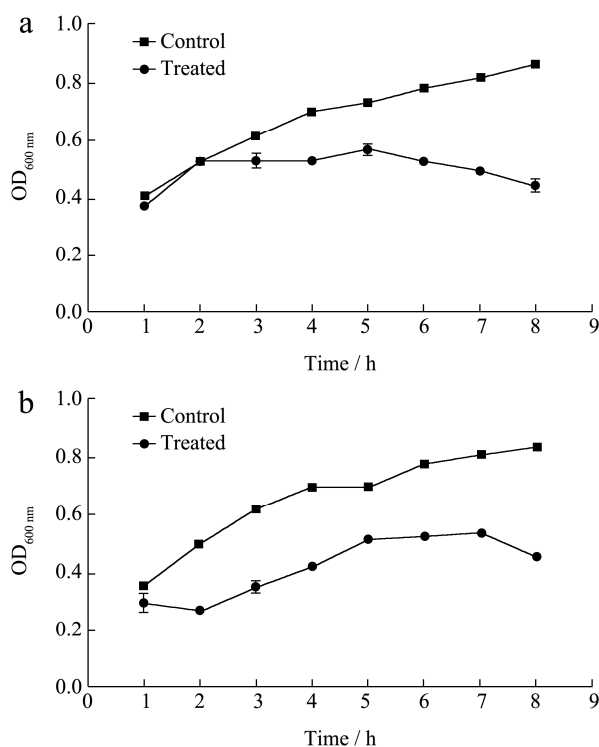


图11 噬菌体对宿主菌生长的抑制作用

Fig.11 Phage on the growth of host bacteria

注: a: vB_Pae_503-1对铜绿假单胞菌生长的抑制作用; b: vB_Pfl_503-2对荧光假单胞菌生长的抑制作用。

3 结论

3.1 本研究对鲜切苦菊、生菜和紫甘蓝中的假单胞菌进行分离鉴定,结合菌落形态、菌体特征观察及16S rRNA基因序列分析方法,筛选得到2株铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、1株荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)和1株湖南假单胞菌(*Pseudomonas hunanensis*)。将铜绿假单胞菌和荧光假单胞菌回接到三种鲜切蔬菜中,证实了铜绿假单胞菌的致腐能力明显比荧光假单胞菌强,并发现不同鲜切蔬菜的腐败速度不一样,腐败速度由快到慢:苦菊、生菜、紫甘蓝。

3.2 此外,本研究以分离鉴定的铜绿假单胞菌和荧光假单胞菌为宿主,从环境水样中筛选分离了噬菌体 vB_Pae_503-1 和 vB_Pfl_503-2,可以持续控制假单胞菌引起的腐败,其具有开发为生物制剂控制假单胞菌感染的潜力,为控制鲜切蔬菜中的假单胞菌提供了新的策略。需要进一步研究本文分离鉴定的假单胞菌在各种条件下对鲜切蔬菜的致腐能力以及噬菌体 vB_Pae_503-1 和 vB_Pfl_503-2 的生物学特性,从而评估其在假单胞菌腐败防治中的潜在应用。

参考文献

- [1] Baranowski T. Understanding the behavioral linkages needed for designing effective interventions to increase fruit and vegetable intake in diverse populations [J]. *Journal of the American Dietetic Association*, 2011, 111(10): 1472-1475
- [2] Abadias M, Usal J, Anguera M, et al. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 123(1-2): 121-129
- [3] Lamikanra, Olusola. *Fresh-Cut Fruits and Vegetables: Science, Technology, and Market* [M]. CRC Press: 2002
- [4] 金思渊,谢晶.鲜切果蔬致腐菌抑菌技术的研究进展[J].*食品与发酵工业*,2020,46(11):302-306
JIN Siyuan, XIE Jing. Research progress on bacteriostatic technology of fresh cut fruit and vegetable rot causing bacteria [J]. *Food and Fermentation Industry*, 2020, 46(11): 302-306
- [5] 童彤.欧洲:果蔬年均浪费量达 5000 万吨[J].*中国果业信息*, 2018,35(9):36
TONG Tong. Europe: the average annual waste of fruits and vegetables is 50 million tons [J]. *China Fruit Industry Information*, 2018, 35(9): 36
- [6] Verhoeff-Bakkenes L, Jansen H A P M, Veld P H I, et al. Consumption of raw vegetables and fruits: a risk factor for *Campylobacter* infections [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 144(3): 406-412
- [7] Park S, Szonyi B, Gautam R, et al. Risk factors for microbial contamination in fruits and vegetables at the preharvest level: a systematic review [J]. *Journal of Food Protection*, 2012, 75(11): 2055-2081
- [8] Hunter P J, Hand P, Pink D, et al. Both leaf properties and microbe-microbe interactions influence within-species variation in bacterial population diversity and structure in the lettuce (*Lactuca species*) phyllosphere [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(24): 8117-8125
- [9] Antonio A, Gaglio R, Miceli A, et al. Shelf life evaluation of fresh-cut red chicory subjected to different minimal processes [J]. *Food Microbiology*, 2018, 73: 298-304
- [10] 陈湘宁,钟思琼,金文斌,等.膜包装鲜切蔬菜中主要腐败菌的分离与鉴定[J].*中国食品学报*,2012,12(5):154-160
CHEN Xiangning, ZHONG Siqiong, JIN Wenbin, et al. Isolation and identification of main spoilage bacteria in film packaged fresh cut vegetables [J]. *Chinese Journal of Food*, 2012, 12(5): 154-160
- [11] 郭亚辉,郭坚华,李斌.根据 16S rRNA 序列对假单胞菌属分类学的研究进展[J].*微生物学杂志*,2004,24(2):38-41
GUO Yahui, GUO Jianhua, LI Bin. Research progress on taxonomy of *Pseudomonas* according to 16S rRNA sequence [J]. *Journal of Microbiology*, 2004, 24(2): 38-41
- [12] Rey C R, A A Kraft, F C Parrish. Microbiological studies on aging of intact and excised beef muscle 1 [J]. *Journal of Food Protection*, 1978, 41(4): 259-262
- [13] 刘婷,温慧,满都拉,等.应用噬菌体控制假单胞菌的研究进展[J].*中国抗生素杂志*,2019,44(6):661-666
LIU Ting, WEN Hui, MAN dula, et al. Research progress in the control of *Pseudomonas* by phage [J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2019, 44(6): 661-666
- [14] 梁涛波,龙慧,占忠旭,等.两株水源性铜绿假单胞菌的分离与鉴定[J].*现代食品*,2021(17):206-212
LIANG Taobo, LONG Hui, ZHAN Zhongxu, et al. Isolation and identification of two strains of water-borne *Pseudomonas aeruginosa* [J] *Modern Food*, 2021, 17: 206-212
- [15] Bhattacharya D, Dey S, Kadam S, et al. Isolation of NDM-1-producing multidrug-resistant *Pseudomonas fluorescens* from a paediatric case of acute gastroenteritis, India [J]. *New Microbes and New Infections*, 2015, 5: 5-9
- [16] Ssekatawa K, Byarugaba D K, Kato C D, et al. A review of phage mediated antibacterial applications [J]. *Alexandria Journal of Medicine*, 2020, 57(1): 1-20
- [17] 范聪聪.肠出血性大肠埃希菌 O157:H7 噬菌体分离鉴定及初步应用研究[D].长春:吉林大学,2019
FAN Congcong. Isolation and identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 phage and its preliminary application [D]. Changchun: Jilin University, 2019
- [18] Bozdeveci A, Akpınar R, Karaoglus A. Isolation, characterization, and comparative genomic analysis of vB_PlaP_SV21, new phage of *Paenibacillus larvae* [J]. *Virus Research*, 2021, 305: 198571
- [19] Li M, Chang R Y K, Lin Y, et al. Phage cocktail powder for

- Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2021, 596: 120200
- [20] Chang R Y, Wong J, Mathai A, et al. Production of highly stable spray dried phage formulations for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection [J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2017, 121: 1-13
- [21] Nascimento E C D, Sabino M C, Corguinha L D R, et al. Lytic bacteriophages UFJF_PfDIW6 and UFJF_PfSW6 prevent *Pseudomonas fluorescens* growth *in vitro* and the proteolytic-caused spoilage of raw milk during chilled storage [J]. Food Microbiology, 2022, 101: 103892
- [22] Zhang Y, Huang H, Duc H M, et al. Application of endolysin LysSTG2 as a potential biocontrol agent against planktonic and biofilm cells of *Pseudomonas* on various food and food contact surfaces [J]. Food Control, 2022, 131: 108460
- [23] Odeyemi O A, Burke C M, Bolch C C J, et al. Spoilage microbial community profiling by 16S rRNA amplicon sequencing of modified atmosphere packaged live mussels stored at 4°C [J]. Food Research International, 2019, 121: 568-576
- [24] 崔慧玲,陈安均,罗婵,等.鲜切生菜贮藏过程中优势腐败细菌的多样性分析[J].食品与发酵工业,2014,40(7):223-229
- CUI Huiling, CHEN Anjun, LUO Chan, et al. Diversity analysis of dominant spoilage bacteria in fresh cut lettuce during storage [J] Food and Fermentation Industry, 2014, 40(7): 223-229
- [25] Ng R N, Grey L J, Vaitekėnas A, et al. Development and validation of a miniaturized phage host range screening assay against antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Journal of Microbiological Methods, 2021, 190: 106346
- [26] Bozdeveci A, Akpınar R, Karaoğlu ŞA. Isolation, characterization, and comparative genomic analysis of vB_PlaP_SV21, new phage of *Paenibacillus larvae* [J]. Virus Research, 2021, 305: 198571
- [27] 杨梦莹,庞坤容,潘江欣,等.一株可高效降解羽毛的铜绿假单胞菌的分离、鉴定、产酶条件优化及其酶活研究[J/OL].微生物学报:1-17[2021-12-26]
- YANG Mengying, PANG Kunrong, PAN Jiangxin, et al. Isolation, identification, optimization of enzyme production conditions and enzyme activity of a feather degrading *Pseudomonas aeruginosa* [J/OL]. Journal of Microbiology: 1-17 [2021-12-26]

(上接第 223 页)

- [38] Eva Gomez Ordonez, Antonio Jimenez Escrig, Pilar Ruperez. Dietary fibre and physicochemical properties of several edible seaweeds from the northwestern Spanish coast [J]. Food Research International, 2010, 43(9): 2289-2294
- [39] 曾心悦,黄嘉泳,袁显和,等.梅州金柚柚皮膳食纤维的理化性质分析[J].现代食品科技,2020,36(4):73-81
- ZENG Xinyue, HUANG Jiayong, YUAN Xianhe, et al. Physical and chemical properties of dietary fiber of Meizhou golden pomelo peel [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(4): 73-81
- [40] 蔡沙,隋勇,施建斌,等.马铃薯膳食纤维物化特性分析及其对马铃薯热干面品质的影响[J].食品科学,2019,40(4):87-94
- CAI Sha, SUI Yong, SHI Jianbin, et al. Physicochemical properties of potato dietary fiber and its influence on the quality of hot dry noodles made from potato starch [J]. Food Science, 2019, 40(4): 87-94
- [41] Al Sheraji Sadeq Hassan, Ismail Amin, Manap Mohd Yazid, et al. Functional properties and characterization of dietary fiber from *Mangifera pajang* Kort. fruit pulp [J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 2011, 59(8): 3980-3985
- [42] 王庆玲,朱莉,孟春棉,等.番茄皮渣膳食纤维的理化性质及其结构表征[J].现代食品科技,2014,30(11):60-64
- WANG Qingling, ZHU Li, MENG Chunmian, et al. Study on the physicochemical properties and structural characteristics of the dietary fiber in tomato pomace [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(11): 60-64
- [43] Bender Ana Betine Beutinger, Speroni Caroline Seffrin, Moro Karine Inês Bolson, et al. Effects of micronization on dietary fiber composition, physicochemical properties, phenolic compounds, and antioxidant capacity of grape pomace and its dietary fiber concentrate [J]. LWT - Food Science and Technology, 2020, 117: 1-9
- [44] Allaoua Achouri, Lamia L'Hocine, Delphine Martineau Côté, et al. Scale up fractionation of components from novel glabrous brown and yellow canary seeds (*Phalaris canariensis* L.) and techno-functional properties of the resulting protein isolates [J]. Food Research International, 2020, 137: 1-11