

一株新型烈性噬菌体vB_YenP_WW1的分离鉴定及在食品中的应用

王梓萌¹, 王涓^{1*}, 丁郁², 吴清平², 徐天翔¹, 刘鸣², 张菊梅²

(1. 华南农业大学食品学院, 广东省食品质量安全重点实验室, 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, 国家卫健委微生物食品营养与安全科技创新平台, 广东广州 510070)

摘要: 该研究以1株高毒力持留基因型(Hypervirulent Persistent Genotypes, HVPG)小肠结肠炎耶尔森氏菌Y2844为宿主菌,从广州市污水样本中分离纯化一株新型小肠结肠炎耶尔森氏菌烈性噬菌体vB_YenP_WW1(WW1)。WW1的全基因组序列长度为39 589 bp,同噬菌体*Escherichia* phage P483的核苷酸序列相似性最高(92.77%)。耐受性实验结果表明,WW1能耐受较宽的温度(4~50℃)和pH值(5~11);消杀实验结果表明,WW1在28℃,8 h内显著抑制LB肉汤中小肠结肠炎耶尔森氏菌的生长。在4℃下作用24 h后,WW1可将猪肉表面小肠结肠炎耶尔森氏菌的数量由3.82 lg CFU/mL降低至2.67 lg CFU/mL,将牛奶中小肠结肠炎耶尔森氏菌的数量由5.41 lg CFU/mL降低至检测限以下。同时,WW1还可有效抑制小肠结肠炎耶尔森氏菌在聚乙烯及不锈钢表面形成的生物膜。综上所述,该研究分离的噬菌体WW1耐受性强,对小肠结肠炎耶尔森氏菌的生长及生物膜均具有显著的抑制作用,有望成为一种抑菌制剂用于防控食品及食品加工车间中污染的小肠结肠炎耶尔森氏菌。

关键词: 小肠结肠炎耶尔森氏菌;噬菌体;生物学特性;生物防控

文章编号: 1673-9078(2025)06-95-108

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.6.0517

Isolation, Identification, and Characterization of A Novel Lytic Bacteriophage vB_YenP_WW1 and Its Application in Food Safety

WANG Zimeng¹, WANG Juan^{1*}, DING Yu², WU Qingping², XU Tianxiang¹, LIU Ming², ZHANG Jumei²

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Food Quality and Safety, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China) (2. National Health Commission Science and Technology Innovation Platform for Nutrition and Safety of Microbial Food, 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)

引文格式:

王梓萌,王涓,丁郁,等.一株新型烈性噬菌体vB_YenP_WW1的分离鉴定及在食品中的应用[J].现代食品科技,2025,41(6):95-108.

WANG Zimeng, WANG Juan, DING Yu, et al. Isolation, identification, and characterization of a novel lytic bacteriophage vB_YenP_WW1 and its application in food safety [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(6): 95-108.

收稿日期: 2024-04-19

基金项目: 国家重点研发计划项目(2023YFD1801000); 广东省基础与应用基础重大项目(2020B0301030005); 广东特支计划(2021TQ06N119)

作者简介: 王梓萌(1997-),女,硕士研究生,研究方向:食品营养与安全,E-mail:wangzimeng305@outlook.com

通讯作者: 王涓(1986-),女,博士,研究员,研究方向:食品微生物安全与健康,E-mail:wangjuan@scau.edu.cn

Abstract: A hypervirulent persistent genotype (HVPG) *Yersinia enterocolitica* strain Y2844 was selected as the host for the isolation of a novel lytic *Y. enterocolitica* bacteriophage, vB_YenP_WW1 (WW1), from sewage samples collected from Guangzhou, China. Genome sequencing revealed that phage WW1 possesses a complete genome of 39,589 bp and shares the highest nucleotide sequence similarity (92.77%) with Escherichia phage P483. Phage WW1 exhibited tolerance to a broad range of temperatures (4~50 °C) and pH values (5~11). Bactericidal assays revealed that WW1 effectively inhibited *Y. enterocolitica* growth in LB broth at 28 °C for up to 8 h. Following 24 h of phage treatment at 4 °C, WW1 reduced viable *Y. enterocolitica* counts on raw pork surfaces from 3.82 log CFU/mL to 2.67 log CFU/mL and decreased viable *Y. enterocolitica* counts in milk from 5.41 log CFU/mL to below the detection limit. Furthermore, phage WW1 significantly inhibited biofilm formation by *Y. enterocolitica* on polyethylene and stainless steel surfaces. These findings suggest that phage WW1 possesses strong environmental tolerance and considerable potential as an antimicrobial agent for controlling *Y. enterocolitica* contamination in food matrices and food processing factories.

Key words: *Yersinia enterocolitica*; bacteriophage; biological characteristics; biological control

小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*, *Y. enterocolitica*) 是一种重要的食源性致病菌, 由该菌所引发的疾病被称为“耶尔森氏病”^[1]。在美国, 每年有超过 117 000 例确诊病例 (<http://www.cdc.gov/yersinia>), 其感染的原因主要是食用生的或未完全煮熟的肉制品, 具体感染症状包括自限性腹泻、发烧、呕吐, 严重者可引起肠系膜淋巴结炎和败血症^[1,2]。本课题组前期的研究显示, 我国零售食品中小肠结肠炎耶尔森氏菌污染率为 14.77%, 且以携带高毒力基因、具有强生物膜形成能力的高毒力持留型 (Hypervirulent Persistent Genotypes, HVPG) 菌株为主^[3]。HVPG 菌株具有强持留性和潜在危害性, 其形成的生物膜可保护内部细菌免受紫外线、抗生素及其他极端环境 (如缺水、高盐、金属毒性) 的影响^[4]。传统防控方式虽然在一定程度上能够抑制细菌生长和生物膜形成, 但往往伴随着化学残留、设备腐蚀和环境污染等不良影响^[5], 同时其化学残留还可能影响食品的品质。因此, 开发高效、安全且环保的防控手段, 对于防控小肠结肠炎耶尔森氏菌 HVPG 菌株的污染具有重要意义。其中, 噬菌体因其天然、高度特异性、无毒无害的特点而备受关注。

噬菌体最早发现于 1915 年^[6], 是一类具有高度特异性的“细菌杀手”。噬菌体主要分为裂解性噬菌体和溶原性噬菌体, 其中, 裂解性噬菌体通过附着到宿主细胞、注入噬菌体 DNA、DNA 复制、组装蛋白质、用头部和尾部蛋白质包装核酸, 裂解宿主细胞以释放新的噬菌体来进行复制。目前, 噬菌体的应用已经涉及农业^[7]、水产养殖^[8]、食品安全^[9]等领域。研究表明, 烈性噬菌体对铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、单核细胞增生

李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*)、沙门氏菌 (*Salmonella enterica*) 等致病菌的生长及其生物膜形成均具有良好的防控效果^[10-12]。但目前关于耶尔森氏菌噬菌体的相关研究数量较少, 现有研究大多聚焦于噬菌体对细菌生长的防控, 而忽略了噬菌体对生物膜的作用, 因此急需挖掘具有生物安全性的高效烈性耶尔森噬菌体, 为实际应用提供充足的菌种资源。

本研究从中国广州市污水中分离出一株新型小肠结肠炎耶尔森氏菌噬菌体 vB_YenP_WW1, 其基因序列以 GenBank 登录号 OP161218 保存于美国国家生物信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI), 并进一步探究了该噬菌体对小肠结肠炎耶尔森氏菌的生长及生物膜的防控效果。实验结果表明, 噬菌体 vB_YenP_WW1 是一株新型裂解性噬菌体, 具有抑制小肠结肠炎耶尔森氏菌生长及生物膜形成的能力, 为小肠结肠炎耶尔森氏菌的有效防控提供了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株及样品来源

本研究中使用的所有小肠结肠炎耶尔森菌株均由本实验室前期分离^[3]。所有菌株均保存于体积分数为 25% 的甘油中, 并储存于 -80 °C 冰箱; 污水样品取自广州市荔湾区菜市场。

1.1.2 主要试剂

Luria-Bertani (LB) 肉汤、LB 琼脂、技术性琼脂粉、胰酪蛋白胨液体培养基 (Trypticase Soy

Broth, TSB)、牛肉膏提取物、改良 Y 琼脂培养基和一次性培养皿, 均购自广东环凯微生物科技有限公司; 聚乙二醇 8000、SM buffer, 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 甲醇(分析级)、无水乙醇(分析级)、甲醇(色谱级), 购自广州诺德生化科技有限公司; 结晶紫和乙酸(分析纯), 购自广州化学试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化

取小肠结肠炎耶尔森氏菌保种液 30 μL , 接种于 3 mL LB 肉汤培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 培养 8~10 h 后备用。

1.2.2 噬菌体分离纯化

将污水样品以 5 000 $\times g$, 10 min 进行离心。上清液用 0.45 μm 混合纤维素滤膜通过真空泵进行抽滤。向抽滤后的液体加入终浓度为 50 mmol/L 的 MgSO_4 , 使用 0.22 μm 混合纤维素滤膜进行抽滤。将收集的所有滤膜剪碎放入配置好的 50 mL 洗脱液(3 wt.% 牛肉膏、3 wt.% 吐温 80、50 mmol/L NaCl)中。使用超声清洗仪对洗脱液进行超声 10 min, 随后使用一次性注射器和 0.22 μm 滤头进行过滤除菌。

将 100 μL 小肠结肠炎耶尔森氏菌对数期菌液、1 mL 超声过滤后的溶液与 1 mL 2 $\times$ LB 肉汤混合(2 mmol/L CaCl_2), 28 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 过夜培养。取出液体, 通过一次性注射器和 0.22 μm 的滤头进行过滤除菌, 重复扩培步骤 5~8 次。

从点样结果中选取噬菌体进行挑斑纯化。为获得较纯的噬菌体, 后续对噬菌体纯化方式进行改进^[13]。取 LB 琼脂底板, 用接种环蘸取噬菌体清液, 在底板上划线。向 5 mL 质量分数为 0.4% 的 LB 琼脂中加入 100 μL 对数期宿主菌液, 自划线末端向前倾倒, 静置至凝固, 放置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 5 h 左右。待长出噬菌斑后, 挑取单个清晰噬菌斑进行划线, 并重复上述步骤。经过 6 轮纯化后, 向 1 mL LB 肉汤中添加 20 μL 宿主菌液; 用接种环挑取噬菌斑, 在 1 mL LB 肉汤中搅拌几下。该混合液在 28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 8 h 以上, 用 0.22 μm 滤头过滤后, 即为纯化后的噬菌体。纯化后的噬菌体液保存于体积分数为 25% 的甘油中, 并储存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.3 噬菌体形态鉴定

噬菌体的形态学观察参考文献^[14]进行, 并略作修改。取噬菌体扩培液, 8 000 $\times g$, 离心 30 min。取

30 mL 上清液经 0.22 μm 滤膜进行过滤, 加入 6 mL 的聚乙二醇 8 000 和 4 mL 的氯化钠溶液, 用接种环轻轻搅拌使之混匀, 然后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。第二日, 取出进行离心, 12 000 $\times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min, 倒掉上清液, 使用 1 mL SM buffer 重悬, 得到噬菌体浓缩液。收集得到的噬菌体在微孔铜网上用质量分数为 2% 的磷酸进行负染, 图像通过透射电子显微镜来观察。

1.2.4 宿主谱测定

取 100 μL 小肠结肠炎耶尔森氏菌对数期菌液加入到 5 mL 质量分数为 0.4% 的 LB 琼脂中, 混匀倒入 LB 琼脂平板上。待上层琼脂凝固后, 滴加 2 μL 噬菌体原液至软琼脂平板上。将平板放入 28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养, 5 h 左右可观察结果。为排除细菌素的影响, 在挑选出可能宿主菌后, 采用 EOP 法(Efficiency of Plating)进行点样。将噬菌体液稀释至 10^{-4} , 按照上述方式进行点样。若出现噬菌斑随稀释梯度逐渐变小的情况, 即可证明该细菌为该噬菌体的宿主菌。

1.2.5 噬菌体DNA提取

噬菌体 DNA 的提取方法主要参考之前的研究^[15]。取噬菌体扩培液, 经离心后, 吸取 30 mL 上清液经 0.22 μm 滤膜进行过滤, 加入 6 mL 的聚乙二醇 8 000 和 4 mL 的氯化钠溶液, 用接种环轻轻搅拌使之混匀, 然后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。第二日, 取出进行离心, 12 000 $\times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min, 使用 1 mL SM buffer 重悬沉淀, 从而得到噬菌体浓缩液。向浓缩液中加入 DNase I 和 RNase A, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 60 min。随后加入 20 μL 10 wt.% SDS、1 μL 蛋白酶 K、20 μL EDTA, 于 65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 以裂解噬菌体。加入 Tris 饱和酚溶液, 旋涡震荡后离心 5 min, 吸取上层水相于新的离心管中, 随后使用等体积的苯酚-氯仿-异戊醇混合物(25:24:1)提取噬菌体 DNA。

1.2.6 噬菌体基因组分析

噬菌体基因组利用 Illumina 平台进行测序, 测序后得到的 reads 用 SPAdes v.3.13.1 拼接软件对序列进行拼接, 组装后得到的全基因组序列(fasta 文件)通过 NCBI 数据库(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行序列比对。从 NCBI 上下载了同该噬菌体相似度高于 80% 的其他噬菌体全基因组序列, 使用 ANIm 进行分析, 分析结果用 TBtools 绘制热图。通过毒力因子数据库(Virulence Factor Database, VFDB)和抗生素耐药性数据库(Antibiotic Resistance Genes Database, ARDB), 对

噬菌体中的毒力基因及耐药基因进行分析。使用在线软件 prokka 对整个基因组进行鉴定,使用 blastp (Protein-Protein Basic Local Alignment Search Tool) 将噬菌体氨基酸序列与噬菌体蛋白数据库比对,进一步分析注释得到的氨基酸序列。对得到的噬菌体蛋白进行功能预测;使用 MEGA X 对噬菌体进行基于末端酶大亚基的系统发育分析。

1.2.7 噬菌体效价的测定

噬菌体的效价是指每毫升样本中含有多少噬菌体颗粒,也可描述为每毫升噬菌斑形成单位 (Plaque Forming Units, PFU),单位是 PFU/mL。首先,取待测噬菌体液,进行连续十倍梯度稀释。随后,选取一个合适的稀释梯度,取 100 μ L 与等体积对数期宿主菌混合后。将混合液加入到 5 mL 质量分数为 0.4% 的 LB 软琼脂中,混匀后倒入预先准备好的 LB 琼脂平板上,每个稀释度重复 3 次。将平板置于 28 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 5~8 h,随后取出平板进行计数。每块平板上的噬菌斑数量在 30~300 之间属于有效计数,若不满足此范围,则需重新选取稀释度铺板计数。计数完成后,根据公式 (1) 计算效价:

$$B = \frac{D \times E}{S} \quad (1)$$

式中

B ——噬菌体效价;

E ——噬菌体平均噬菌斑数;

D ——噬菌体稀释倍数;

S ——噬菌体铺板体积。

1.2.8 最佳感染复数测定 (Multiplicity of Infection, MOI)

MOI 是指噬菌体颗粒数与宿主菌颗粒数的比值。将菌液浓度稀释至 10^7 CFU/mL,取 100 μ L 接种于 3 mL LB 肉汤中,随后按照 MOI 为 10^2 、 10^1 、 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4} 向 LB 肉汤中分别加入 100 μ L 效价为 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 和 10^3 PFU/mL 的噬菌体,28 $^{\circ}$ C,200 r/min 过夜培养。用 0.22 μ m 滤头进行过滤,随后用双层平板法测效价,实验重复 3 次。其中效价最高的 MOI 为最佳 MOI。

1.2.9 一步生长曲线测定

将宿主菌的菌落数调整为 10^9 CFU/mL,取 1 mL 菌液,12 000 $\times$ g 离心 5 min。弃上清,沉淀以 1 mL SM buffer (2 mmol/L CaCl_2) 重悬。按照 MOI= 10^1 添加噬菌体,混匀后于 28 $^{\circ}$ C 下静置 5 min,

随后 12 000 $\times$ g 离心 5 min。吸取上清备用,沉淀以 1 mL LB 肉汤重悬,取 0.1 mL 上述肉汤,加入 9.9 mL LB 肉汤中 (2 mmol/L CaCl_2),混匀后取 1 mL 于 1.5 mL 离心管中,即为 0 点。随后将上述肉汤以 28 $^{\circ}$ C、200 r/min 的条件进行培养,每 5 min 进行一次取样,直至 90 min。每次取样,都需将液体以 0.22 μ m 滤头进行过滤除菌,随后测定效价。

1.2.10 热稳定性及酸碱稳定性

稳定性实验是根据之前的研究进行了相应的修改^[16,17]。对于热稳定实验,首先将噬菌体的效价调整为 1×10^9 PFU/mL,然后将噬菌体分别放置于 4、20、30、40、50、60 和 70 $^{\circ}$ C 的水浴锅中,孵育 1 h,随后测定效价;对于酸碱稳定性实验,取 200 mL LB 肉汤,分别将其 pH 值调整为 1~13。取不同 pH 值的 LB 肉汤 900 μ L 至 1.5 mL EP 管中,并加入 100 μ L 的噬菌体 (1×10^9 PFU/mL),放入 28 $^{\circ}$ C 培养箱静置 1 h,随后测定效价。

1.2.11 噬菌体防控小肠结肠炎耶尔森氏菌生物膜

将 100 μ L 的噬菌体液与等量的宿主菌液 (已调整为 1×10^7 CFU/mL) 按照 MOI= 10^2 的比例混合,随后取 200 μ L 于 96 孔板中,每组设置 6 个平行样本以确保实验结果的可靠性。同时,为了进行对照,另一组孔中加入 100 μ L 的 LB 肉汤培养基和 100 μ L 的宿主菌培养液 (同样为 1×10^7 CFU/mL)。所有孔板在 28 $^{\circ}$ C 下进行静置培养,待 6、12、24 h 时取出一块板,使用质量分数为 0.5% 的结晶紫进行生物膜测定。

1.2.12 噬菌体防控小肠结肠炎耶尔森氏菌生长情况

吸取 300 μ L 菌液 (1×10^7 CFU/mL) 至 3 mL LB 肉汤培养基中,再加入 300 mL 噬菌体液 (MOI= 10^2),对照组为只加等量菌液的 LB 液体培养基。涡旋混匀后,28 $^{\circ}$ C,200 r/min,培养 16 h。每隔固定时间后,取 100 μ L 培养液稀释涂布,采用平板计数法探究噬菌体在 28 $^{\circ}$ C 下的消杀效果。

1.2.13 噬菌体防控食品中小肠结肠炎耶尔森氏菌污染

向 5 mL 牛奶中加入 100 μ L 宿主菌液 (1×10^6 CFU/mL),充分混匀,即为对照组;处理组为,在上述混合液中另外分别接种 100 μ L 1×10^9 CFU/mL (MOI= 10^3) 和 100 μ L 1×10^{10} CFU/mL (MOI= 10^4) 的噬菌体液。将以上样本置于 4 $^{\circ}$ C,每 3 h 取样一次,采用平板计数法检测牛奶中小肠结肠炎耶尔森氏菌的菌量,从而测定噬菌体的抑菌效果。

对于猪肉,将猪肉切成2 g的猪肉丁,于体积分数为75%的酒精中浸泡1 h,随后在无菌水中清洗三次,于超净工作台中晾干,随后装于50 mL离心管中。将宿主菌液和噬菌体液按照 $MOI=10^3$ 和 $MOI=10^4$ 的比例混合,随后添加到猪肉表面,对照组为只添加等量宿主菌液的猪肉。将以上样品置于4℃,每3 h取样一次,向离心管中添加10 mL无菌水,充分重悬后,取100 μ L稀释液稀释涂布,采用平板计数法检测生猪肉中残留的小肠结肠炎耶尔森氏菌的菌量,从而测定噬菌体的抑菌效果。

1.2.14 噬菌体对金属上污染的小肠结肠炎耶尔森氏菌及生物膜的抑制效果

由于肉制品在工厂流水线加工过程中,金属加工工具表面常有小肠结肠炎耶尔森氏菌的污染,故进一步评价噬菌体在金属表面的杀菌作用及对金属表面生物膜的抑制作用。具体步骤如下:

取对数期宿主菌菌液,将菌落数调整至 1×10^9 CFU/mL,取10 μ L滴加至灭菌后的金属片上,放于超净台中吹干。随后,将铁片转移至6孔板中。对于control组,向每孔中加入2 mL LB肉汤;对于试验组,向每孔中加入2 mL噬菌体至 $MOI=10^2$ 。将该6孔板放于28℃下培养7 h后,取出金属片,稀释涂布。

对于生物膜实验,取对数期宿主菌菌液,将菌落数调整至 10^7 CFU/mL。取灭菌后的金属片于6孔板中,对于control组,取1 mL宿主菌菌液及1 mL LB肉汤,混匀后加入6孔板中;对于试验组,取1 mL宿主菌菌液及1 mL噬菌体液混匀($MOI=10^2$);空白组仅添加LB肉汤。将该孔板放入28℃培养箱中培养12~20 h,随后使用体积分数为0.5%的结晶紫对金属片上的生物膜进行染色。

1.2.15 数据分析

根据标准对照实验的原则,实验重复3次,数据使用Excel进行数据处理,使用GraphPad Prism 8.0.1进行数据分析和可视化,使用ANOVA进行双因素方差分析, $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 噬菌体分离及表征

本研究以*Y. enterocolitica* HVPG菌株Y2844为宿主,成功从污水中分离到一株烈性小肠结肠炎耶尔森氏菌噬菌体,命名为vB_YenP_WW1(WW1)。透射电镜结果显示(图1),噬菌体WW1具有长度为58.12 nm,宽度为56.84 nm的六边形头部,以及

长度15.58 nm,宽为9.21 nm的非收缩性尾巴。以上数据表明,噬菌体vB_YenP_WW1属于短尾病毒Podovirus。

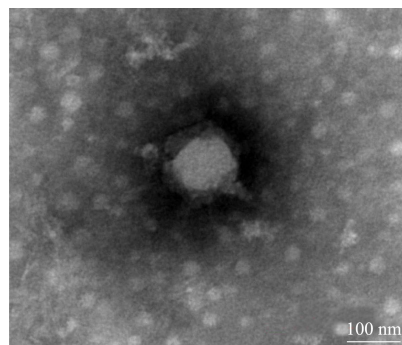


图1 噬菌体vB_YenP_WW1透射电镜图像

Fig.1 Transmission electron microscopy (TEM) image of vB_YenP_WW1

2.2 噬菌体的基因组分析

使用Illumina二代测序平台对噬菌体进行全基因组测序。根据测序结果,噬菌体WW1的遗传物质为双链环状DNA,基因组长度为39 589 bp,GC含量为48.37%。噬菌体基因组经毒力因子数据库及耐药性基因数据库预测后,未发现毒力基因和抗生素耐药基因,且均不含有溶源相关的整合酶,这表明噬菌体WW1是一株烈性噬菌体,且不具有毒力、耐药基因水平转移风险。

病毒种的划分标准是基因组核苷酸序列相似性小于95%^[18]。通过将噬菌体WW1与NCBI核酸序列数据库中已报道的噬菌体进行核酸比对(nucleoside Basic Local Alignment Search Tool, blastn),使用ANIm对相似性>70%的噬菌体的全基因组序列进行相似性计算分析。根据比对结果,噬菌体WW1与已报道噬菌体的核酸序列相似性均低于95%(图2)。同大肠杆菌噬菌体*Escherichia phage* P483^[19]相似度最高,其ANIm值为92.77%,这说明WW1是一株新型小肠结肠炎耶尔森氏菌噬菌体。

由于噬菌体WW1和埃希氏菌噬菌体P483的相似度最高,使用Easyfig对两株噬菌体的基因组进行可视化分析,使用红色、橙色和绿色这三种颜色来区分标记两株噬菌体的关键基因,即内容素、穿孔素及尾丝蛋白,结果如图3所示。根据比对结果,两株噬菌体的内容素在序列上存在较高的相似度,这表明它们在宿主细胞裂解机制上可能具有相似的功能;而尾丝蛋白的相似度较低,这一差异可能直接影响到两株噬菌体在宿主识别与感染过程中的特异性,进而影响其宿主范围。

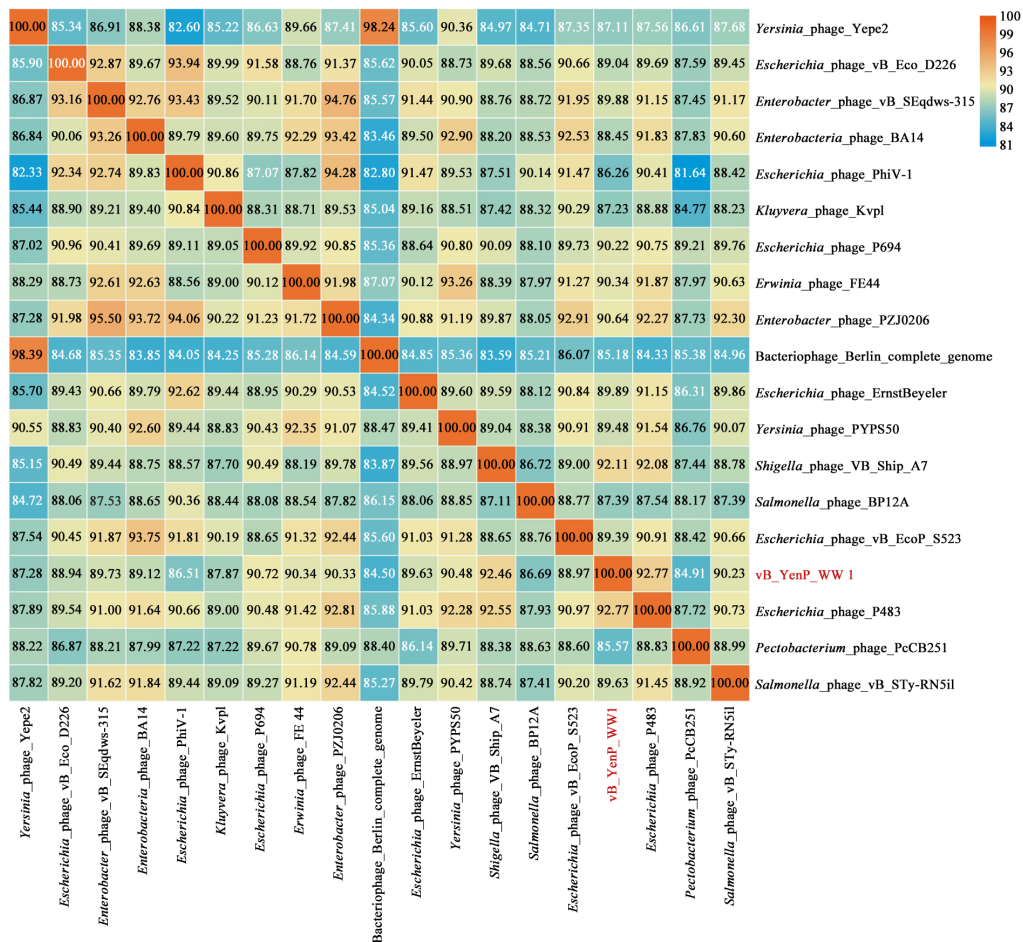


图 2 噬菌体 vB_YenP_WW1 ANI 基因组分析

Fig.2 ANI analysis of the phage vB_YenP_WW1 genome

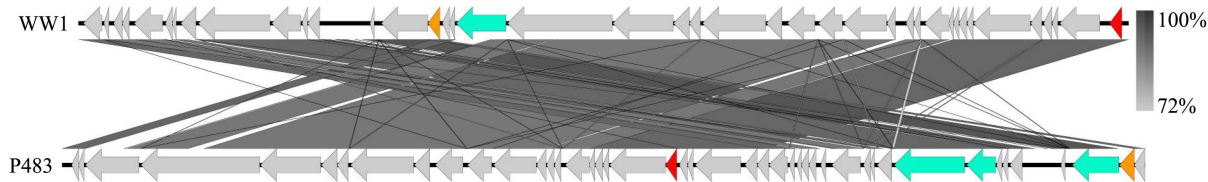


图 3 噬菌体 WW1 和 P483 基因组比较

Fig.3 Genome analysis of phage WW1 and P483

注：绿色表示尾丝蛋白，红色表示内容素，橙色表示穿孔素。相似程度用灰色表示，灰色越深相似度越高。

使用 Proksee (<http://proksee.ca>) 对噬菌体基因组进行可视化，图 4 展示了噬菌体 WW1 的基因组注释结果，其中 $G > C$ 为 GC skew+， $G < C$ 为 GC skew-。

根据注释结果，WW1 基因组中共包含 48 个开放阅读框（Opening Reading Frames, ORFs），其中 28 个 ORFs 是已知功能的蛋白编码基因。这 28 个 ORFs 根据功能可分为结构、裂解、包装、DNA 代谢、DNA 注射和未知功能域，具体信息如表 1 所示。

裂解功能域中的内容素（gp47）和穿孔素（gp22）是噬菌体裂解系统中的功能蛋白，内容素具有裂解细菌的能力，它能够有效降解宿主细胞内部的细菌细胞壁，从而破坏细菌的结构完整性^[20]。穿孔素通过在细胞膜上形成小孔，使内容素能够顺利通过细胞膜进入细菌内部并降解肽聚糖^[21]。目前，这两种功能蛋白被视为新一代抗菌制剂的潜在候选物。包装功能域包含噬菌体末端酶大亚基（gp19）和小亚基（gp21）。其中，末端酶大亚基可特异性结合病毒衣壳顶角处的孔蛋白、金属粒子和 ATP^[22]；小亚基能特异性识别被包装的 DNA，并调节大亚基 ATP 酶与核酸酶的活性，从而调控包装进程^[23]。二者共同构成的末端酶复合物可以与门蛋白组装到一起，形成一个基因组包装马达，在噬菌体包装过程中发挥重要作用^[24]。

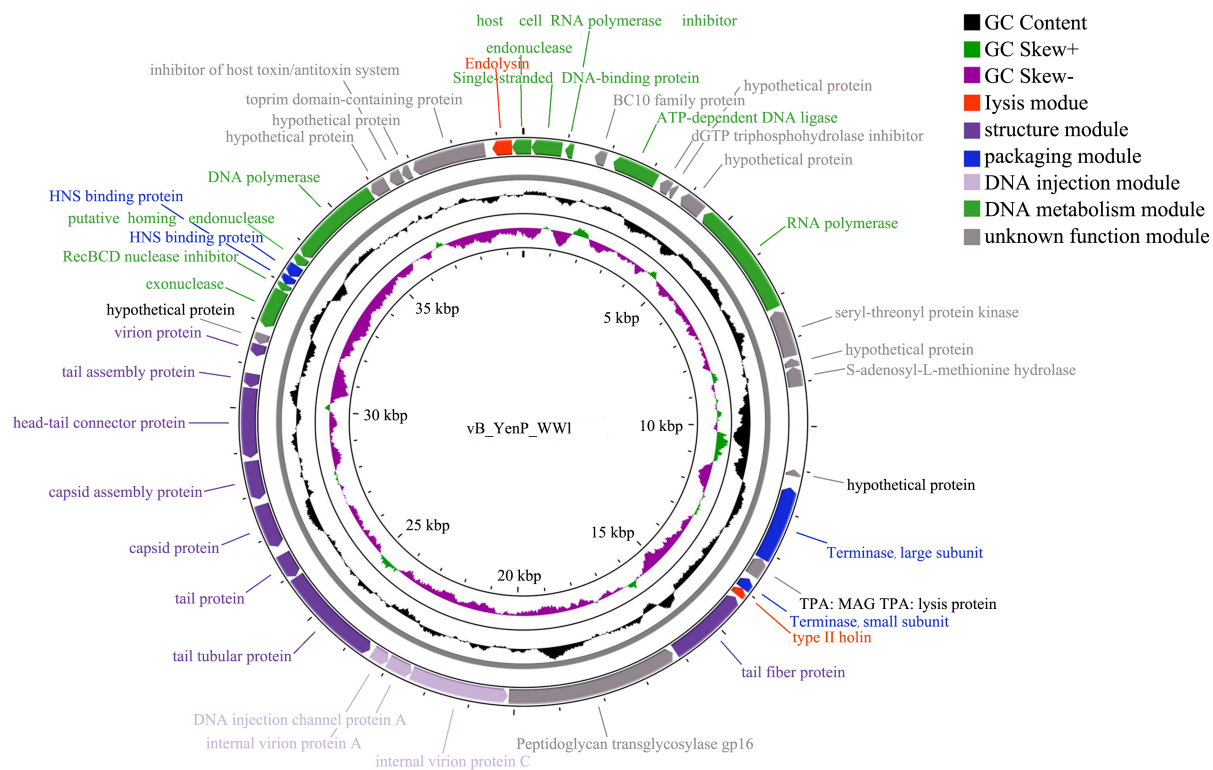


图 4 噬菌体 vB_YenP_WW1 基因组注释结果

Fig.4 The genome annotation of vB_YenP_WW1

表 1 噬菌体WW1基因组注释结果

Table 1 Functional annotation of bacteriophage WW1

编号	产物	功能域
gp22	穿孔素（holin）	裂解功能域
gp47	内容素（endolysin）	裂解功能域
gp25	内部病毒体蛋白 C（internal virion protein C）	DNA 注射功能域
gp26	DNA 注射通道蛋白 A（DNA injection channel protein A）	DNA 注射功能域
gp27	内部病毒体蛋白 A（internal virion protein A）	DNA 注射功能域
gp23	尾部纤维蛋白（tail fiber protein）	结构功能域
gp28	尾管蛋白（tail tubular protein）	结构功能域
gp29	尾部蛋白（tail protein）	结构功能域
gp30	衣壳蛋白（capsid protein）	结构功能域
gp31	衣壳组装蛋白（capsid assembly protein）	结构功能域
gp32	头尾连接蛋白（head-tail connector protein）	结构功能域
gp33	尾部组装蛋白（tail assembly protein）	结构功能域
gp35	病毒蛋白（virion protein）	结构功能域
gp01/48	核酸内切酶（endonuclease）	DNA 代谢功能域
gp02	ssDNA 结合蛋白（ssDNA-binding protein）	DNA 代谢功能域
gp03	宿主细胞 RNA 聚合酶抑制剂（host cell RNA polymerase inhibitor）	DNA 代谢功能域
gp08	ATP 依赖性 DNA 连接酶（ATP-dependent DNA ligase）	DNA 代谢功能域
gp09	dGTP 三磷酸水解酶抑制剂（dGTP triphosphohydrolase inhibitor）	DNA 代谢功能域
gp12	RNA 聚合酶（RNA polymerase）	DNA 代谢功能域

续表1

编号	产物	功能域
gp37	核酸内切酶 (endonuclease)	DNA 代谢功能域
gp38	RecBCD 核酸酶抑制剂 (RecBCD nuclease inhibitor)	DNA 代谢功能域
gp39	HNS 结合蛋白 (HNS binding protein)	DNA 代谢功能域
gp40	HNS 结合蛋白 (HNS binding protein)	DNA 代谢功能域
gp41	推定归巢核酸内切酶 (putative homing endonuclease)	DNA 代谢功能域
gp42	DNA 聚合酶 (DNA polymerase)	DNA 代谢功能域
gp19	噬菌体末端酶大亚基 (terminase, large subunit)	包装功能域
gp21	噬菌体末端酶小亚基 (terminase, small subunit)	包装功能域

为了解噬菌体 WW1 基因组的同源性，在 NCBI 网站上对噬菌体末端酶大亚基序列进行 blastp (Protein-Protein Basic Local Alignment Search Tool) 同源性比对，以覆盖度 >90%，相似度 >90% 为筛选标准，获得与其同源性较高的噬菌体。使用 MEGA X 构建系统发育树，结果如图 5 所示。数据显示，以上噬菌体均属于 *Berlinvirus* 属；WW1 与埃希氏菌噬菌体 *Escherichia* phage P694^[19] 在同一个进化分支上，这表明两株噬菌体可能具有相似的包装 DNA 方式。

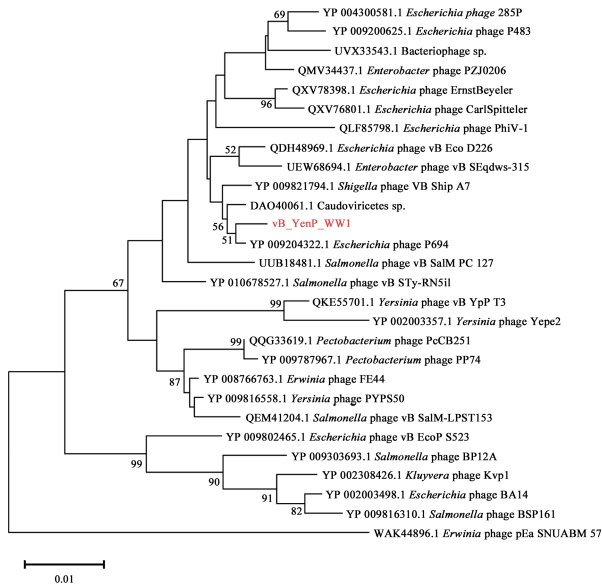


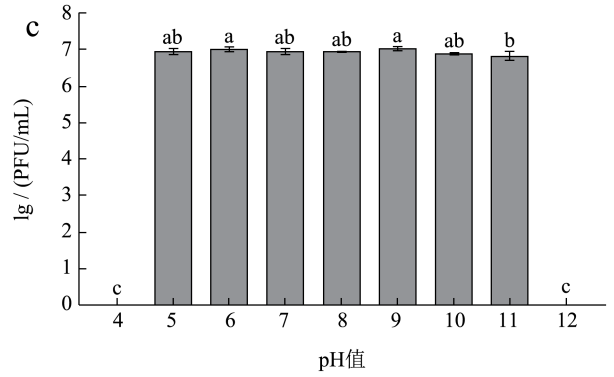
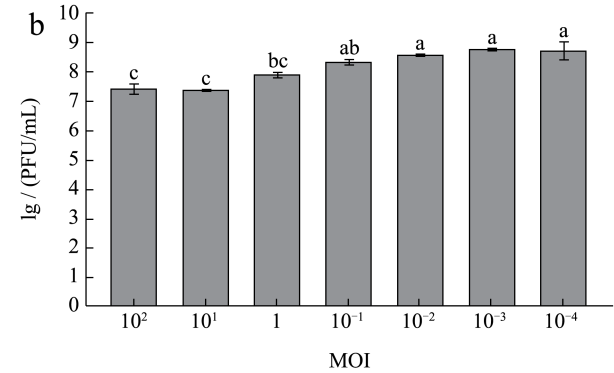
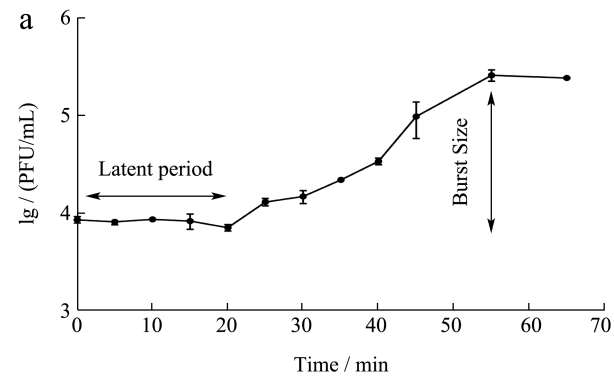
图 5 基于噬菌体末端酶大亚基构建的系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree constructed based on terminal enzyme large subunit

2.3 噬菌体WW1的生物学特性

一步生长曲线测定结果如图 6a 所示。噬菌体 WW1 的潜伏期为 20 min，裂解期为 35 min，裂解量为 37 PFU/cell，表明该噬菌体可快速增长，并快速破坏宿主细胞，这有益于噬菌体疗法用于保护食物或各种材料免于细菌定殖。

确定最佳感染复数可以使子代噬菌体的产生数量达到最大。噬菌体 WW1 最佳感染复数测定结果如图 6b 所示。当 MOI=10²、10¹、1 时，WW1 的效价均低于 10⁸ PFU/mL；而噬菌体的效价随着 MOI 值的降低而逐渐增加，当 MOI 为 10⁻²、10⁻³ 和 10⁻⁴ 时，WW1 效价达到最高，产生的子代噬菌体数量最多。



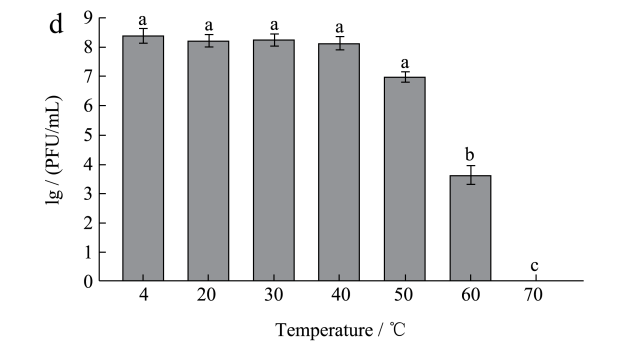


图 6 噬菌体 vB_YenP_WW1 的理化性质

Fig.6 Physiological characteristics of vB_YenP_WW1

注：a：一步生长曲线；b：最佳感染复数；c：pH 值耐受性；d：温度耐受性。图中不同小写字母表示具有显著性差异（ $P<0.5$ ）。

噬菌体 WW1 的酸碱耐受性如图 6c 所示，WW1 在 pH 值为 5~11 之间，其效价保持稳定，在 pH 值为 4 和 12 的条件下孵育 1 h 后，其活性丧失；在温度方面，WW1 在 4~40 ℃下保持稳定，在 50 ℃时，效价发生轻微的下降，在 70 ℃下孵育 1 h 后，噬菌体被全部灭活（图 6d）。

2.4 噬菌体宿主谱测定

使用空斑法测定噬菌体 WW1 对 10 株小肠结肠炎耶尔森氏菌 HVPG 菌株和 5 株小肠结肠炎耶尔森氏菌非 HVPG 菌株的裂解效果，结果如表 2 所示。

表 2 噬菌体WW1的宿主谱
Table 2 Host range analysis of WW1

序号	菌株编号	菌株种类	毒力基因	生物膜形成能力	WW1
1	Y-1083	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>ymoA-ystB-fes-sat-inv-hrep-fepA</i>	强	+
2	Y-2844	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>inv-ymoA-fes-sat-fepD-hreP</i>	强	+
3	Y-3824-1	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>ymoA-fes-sat-fepD-tccC-fepA-hreP-ystB</i>	强	+
4	Y1367Y1	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>inv-ystB-ymoA-hrep-sat-fepA-fes-fepD-myfA</i>	强	-
5	2844A2-3	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>inv-ymoA-fes-sat-fepD-hreP</i>	强	-
6	256B1	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>inv-ystB-ymoA-hrep-sat-fepA-fes-fepD</i>	强	-
7	C1367C2	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>inv-cysts-ymoA-hrep-sat-fepA-fes-fepD</i>	强	-
8	C918	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>inv-ystB-ymoA-hrep-sat-fepA-fes-fepD</i>	强	-
9	C1083	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>ymoA-ystB-fes-sat-inv-fepA</i>	强	-
10	C61	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>inv-ystB-ymoA-hrep-sat-fepA-fepD</i>	强	-
11	Y473	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>ymoA</i>	弱	-
12	473A2-1	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>ymoA-fepA</i>	弱	-
13	Y3818-1	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>ymoA-fes-fepA</i>	弱	-
14	509A3	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>ymoA-sat-yadA-virF</i>	弱	-
15	Y4237-1	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>ymoA-sat-fepA-hreP</i>	弱	-
16	M267A2	<i>S. typhimurium</i>	—	—	-
17	M267A3	<i>S. typhimurium</i>	—	—	-
18	M268A1	<i>S. typhimurium</i>	—	—	-
19	1974-2	<i>L. monocytogenes</i>	—	—	-
20	1299-1	<i>L. monocytogenes</i>	—	—	-
21	3244-2	<i>L. monocytogenes</i>	—	—	-
22	66-14	<i>S. enterica</i>	—	—	-
23	57-38	<i>S. enterica</i>	—	—	-
24	48-1	<i>S. enterica</i>	—	—	-
25	25922	<i>E. coli</i>	—	—	-
26	553-5	<i>E. coli</i>	—	—	-
27	23781	<i>E. coli</i>	—	—	-

注：“+”表示可以裂解，“-”表示不能裂解，“—”表示毒力基因、生物膜形成能力未知。

实验结果显示,噬菌体 WW1 可以裂解 10 株小肠结肠炎耶尔森氏菌 HVPG 菌株中的 3 株。同时,该研究还测定了该噬菌体对大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*, *S. typhimurium*)、单核细胞增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*, *L. monocytogenes*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) 的裂解效果。结果显示,噬菌体 WW1 对其他种属菌株均无裂解效果,这表明该噬菌体具有极强的特异性。

2.5 体外消杀效果及生物膜抑制效果

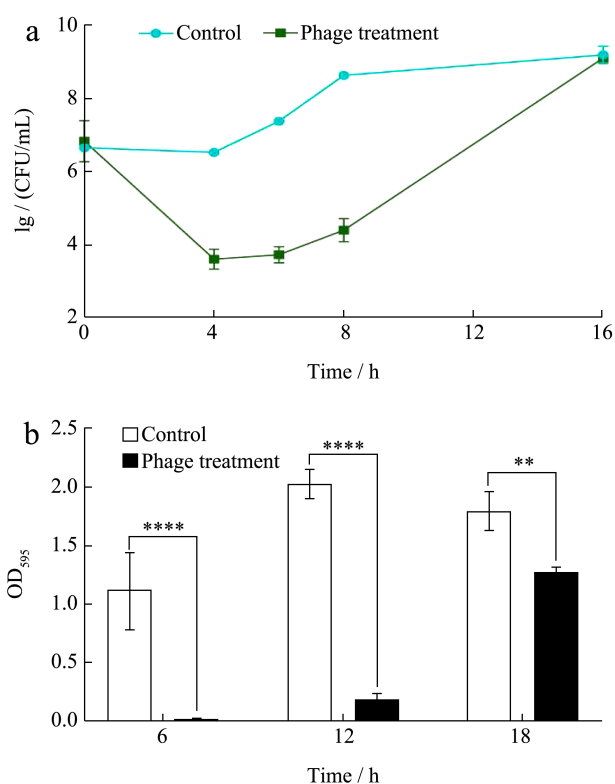


图7 噬菌体 WW1 在 28 °C 对宿主菌生长 (a) 及生物膜 (b) 的抑制效果 (MOI=10²)

Fig.7 The anti-bacterial effect (a) and biofilm-inhibition effect (b) at 28 °C of vB_YenP_WW1 (MOI=10²)

注: ** 表示 $P < 0.01$, **** 表示 $P < 0.0001$ 。

噬菌体对宿主菌生长的抑制情况如图 7a 所示。在 28 °C 下,噬菌体 WW1 在 8 h 内可显著抑制宿主菌的增殖。消杀效果在 8 h 时最为明显,可将 LB 肉汤中宿主菌的含量由 8.63 lg CFU/mL 降低至 4.39 lg CFU/mL。然而,在随后的 8~16 h 中,处理组中的菌落数出现了明显的反弹现象,这表明宿主菌的增殖能力在一定程度上得到了恢复。最终,在 16 h 后,噬菌体 WW1 基本丧失了对宿主菌生长的

抑制效果。图 7b 为 WW1 在 28 °C 下对生物膜的抑制情况。在 6 h 处,和对照组相比,WW1 抑制了 99% 的生物膜形成量,在 6~18 h 内,随着抗性菌的出现,WW1 的抑制效果逐渐减弱,但仍能抑制约 32.4% 的生物膜形成量。这些结果表明,噬菌体 WW1 在控制宿主菌增殖和防控生物膜形成等方面具有潜在的应用价值。

2.6 噬菌体在食品及不锈钢表面的应用

生鲜食品在人类均衡饮食中占据重要地位,摄入适量的生鲜食品有利于平衡膳食、促进健康。由于生鲜食品极易腐败变质,食品加工业通常采取整条供应链始末连续制冷的方式保持其良好的使用品质^[25],但这也为某些耐冷微生物,如沙门氏菌^[26]、单核增生李斯特氏菌^[27]、小肠结肠炎耶尔森氏菌^[28]等食源性致病菌的存活提供了有利条件,而噬菌体可作为一种有效的防控手段。目前关于小肠结肠炎耶尔森氏菌噬菌体应用的相关研究较少,所以该研究进一步探究了噬菌体 WW1 在食品基质中的应用潜力。

由于小肠结肠炎耶尔森氏菌的主要污染食品种类为猪肉和牛奶^[29],该研究选择冷藏猪肉和巴氏牛奶作为研究对象,探究噬菌体 WW1 对实际样本中小肠结肠炎耶尔森氏菌生长的抑制效果,结果如图 8 所示。图 8a 中,在使用噬菌体处理 0.5 h 后,猪肉表面的细菌数量降低由 3.98 lg CFU/mL 降低至 3.44 lg CFU/mL。在处理 24 h 后,MOI=10³ 处理组中的细菌数量相比于对照组 (3.81 lg CFU/mL) 降低了约 0.75 lg CFU/mL,而 MOI=10⁴ 处理组中细菌数量相对于对照组 (3.81 lg CFU/mL) 降低了约 1.18 lg CFU/mL。相比于猪肉,噬菌体 WW1 在牛奶中具有更加显著的防控效果。如图 8b 所示,在处理 3 h 后,WW1 以 MOI=10³ 的比例可将牛奶中的细菌数量降低约 54%,在处理 6 h 后,可完全杀灭牛奶中的宿主菌;相比于 MOI=10³,处理组 MOI=10⁴ 的防控效果更佳,于 3 h 处将牛奶中的细菌数量降低至检测限以下,在 24 h 内未观察到菌落数反弹情况。Jun 等^[30]曾分离到一株烈性小肠结肠炎耶尔森氏菌噬菌体 fHe-Yen9-01,该噬菌体在共孵育 12 h 后可将牛奶中的宿主菌的数量降低至检测限以下 (MOI=10⁵)。相比于 fHe-Yen9-01,WW1 在更短的时间内,以更低的添加量可以达到同样的效果,这说明 WW1 有望成为一种抑菌制剂,用于防控食品中小肠结肠炎耶尔森氏菌的污染。值得一

提的是, WW1 在牛奶和猪肉中表现出不同的抑菌效果, 这说明食品基质是影响噬菌体作用效果的重要因素。WW1 对牛奶中小肠结肠炎耶尔森氏菌的抑制效果较好可能是由于相比于固体, 噬菌体在液体中可以更好的接触宿主菌。未来可尝试将噬菌体 WW1 同某些抗菌肽 (如乳酸链球菌素)^[31] 联用, 以达到更好的抑菌效果。

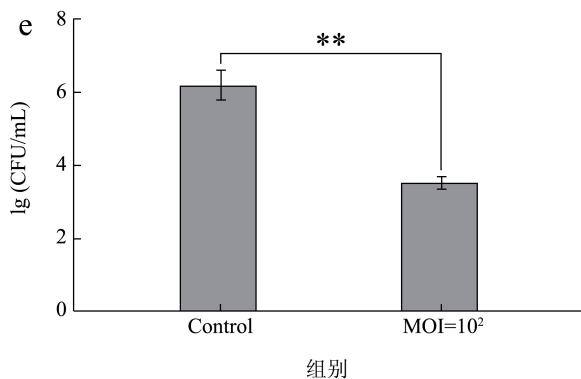
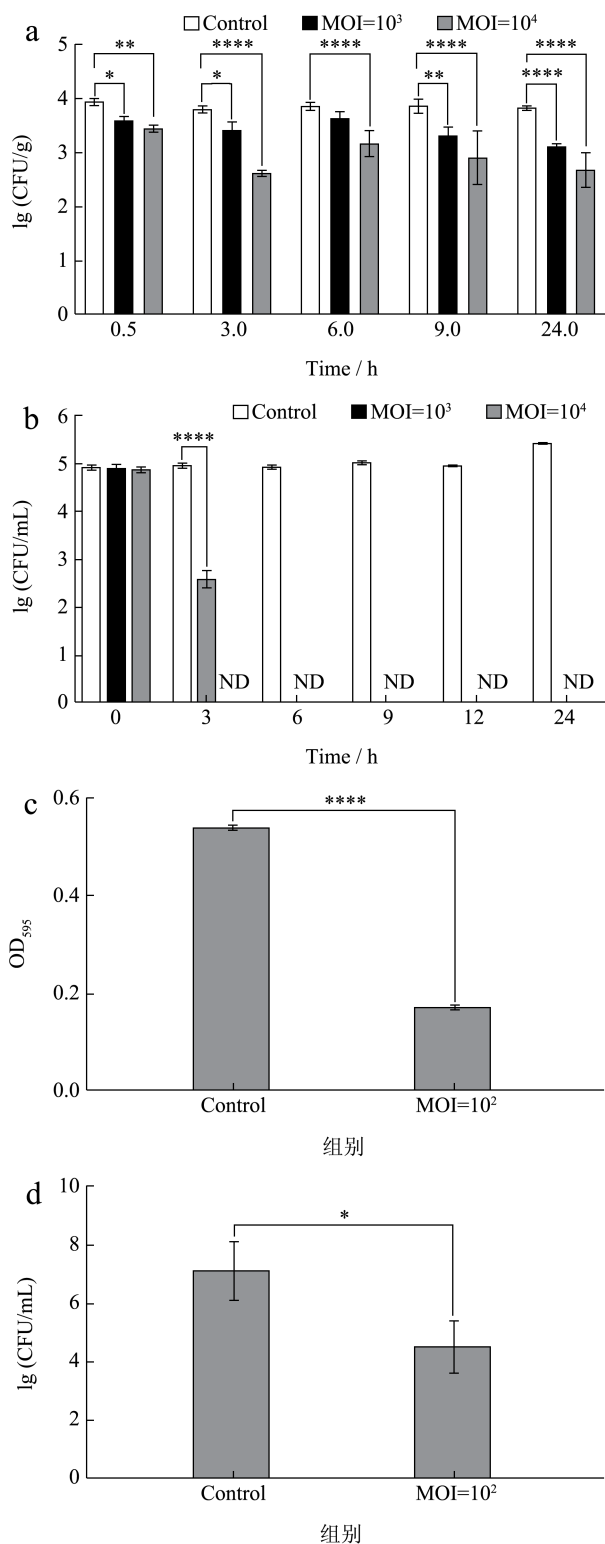


图8 噬菌体 vB_YenP_WW1 的防控效果

Fig.8 Preventive effect of phage vB_YenP_WW1 against *Y. enterocolitica* contamination

注: WW1 在 4 ℃ 下对猪肉中 (a) 和牛奶中 (b) 小肠结肠炎耶尔森氏菌的防控效果; c 为 WW1 对金属上生物膜的抑制效果, d 为 WW1 对生物膜内细胞的抑制效果, e 为 WW1 对金属上污染的小肠结肠炎耶尔森氏菌生长的抑制效果。ND: 未检测到活菌。* 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$, **** 表示 $P < 0.0001$ 。

由于肉制品在工厂流水线加工过程中, 金属加工工具的表面常有小肠结肠炎耶尔森氏菌的污染, 故进一步评价噬菌体在不锈钢表面的杀菌效果及生物膜抑制效果。根据图 8c, 在孵育 12 h 后, WW1 可显著抑制金属表面约 69% 的生物膜形成, 同时, WW1 对生物膜内的细菌数量也具有显著的抑制效果 (图 8d)。由图 8e 可知, 在使用 MOI=10² 的噬菌体处理 7 h 后, 相比于对照组, 处理组中金属表面宿主菌数量降低约 2.77 lg CFU/mL。这表明, 噬菌体 WW1 在食品基质及食品加工车间中均具有良好的应用潜力。

值得注意的是, 在 12 h 处, 虽然处理组中生物膜内细菌数量同对照组 (7.15 lg CFU/mL) 仅相差 2.63 lg CFU/mL, 但 WW1 仍能极显著抑制金属表面的生物膜形成量 ($P < 0.0001$)。这说明, 杀灭细菌不是 WW1 抑制生物膜形成的唯一方式, 其他物质, 如多糖解聚酶等功能蛋白, 也有可能参与到这一过程中。然而, 在噬菌体 WW1 的基因组中未检测到编码这些催化结构域蛋白的相关基因。目前尚未有噬菌体完全清除生物膜的相关报道, 然而, 已有研究表明, 噬菌体和其他抗菌剂 (如利福平) 联用, 可有效清除金黄色葡萄球菌形成的生物膜^[32]。未来可以尝试将噬菌体 WW1 同其他抗生素或消毒剂联用, 以达到更好的生物膜清除效果。

近年来, 由食源性致病菌引起的食品安全问题

日益严峻,创制针对食源性致病菌的防控策略已成为食品科学领域的研究热点。其中,噬菌体作为一种极具潜力的新型生物防控手段,已受到学术界的广泛关注。噬菌体不仅能直接杀灭目标细菌,还能破坏细菌形成的生物膜。因此,将噬菌体用于食品生产和加工过程中,有望有效降低食源性疾病的发生率。在国际上,噬菌体已被批准用于食品加工及销售期间的消毒。由 OmniLytics Inc. 公司生产的 Agriphage™ 是第一个获得美国国家环境保护局批准的噬菌体产品,用于治疗农作物细菌性斑点病^[33],随后,由 Intralytix Inc. 公司生产的 ListShield™、Listex P100、EcoShield™、SalmoFresh™ 陆续获得监管部门的批准并投入使用^[34-36]。由韩国希杰公司研发的 BioTector 产品,首次将动物饲料中的抗生素替换为噬菌体,用于控制由沙门氏菌引起的禽类伤寒^[37]。加拿大麦克斯特大学的研究团队研制出了一种新型噬菌体灭菌喷雾,这种喷雾能在喷洒表面形成一种动态、连锁的灭菌反应,安全且高效^[38]。尽管我国目前还没有获批的噬菌体产品/生物制剂,但国内学者在噬菌体应用于食品安全等领域已经取得了一定的成绩。目前,已有多项研究显示,噬菌体对食品基质中食源性致病菌具有显著的防控效果^[39,40]。此外,还有研究者对噬菌体与不同消毒剂在生鲜蔬菜消毒中联合应用效果进行了评估,结果显示,噬菌体和消毒剂联合使用能显著提升消毒剂对大肠杆菌的抑制作用^[41]。

虽然本研究分离的噬菌体 WW1 具有较高的生物安全性和高效的抑菌能力,但在实际应用前还有很多方面需要考虑:首先,噬菌体的宿主特异性可能限制了噬菌体在复杂食品体系中的应用;其次,细菌对噬菌体产生的耐受性是一个亟待解决的问题;最后,目前我国没有获批的噬菌体产品噬菌体作为一种“病毒”应用于食品中可能会引发公众的担忧和抵触。为了克服这些问题,未来的研究需要关注以下几个方面:可通过噬菌体和抗生素联合使用的方式解决噬菌体的抗性;另外,随着基因编辑技术的飞速发展,可利用 CRISPER/Cas 等基因编辑工具对噬菌体进行改造,从而提升其在生物防控中的应用潜力;为对多种致病菌的高效防控,可将不同类型的噬菌体制成鸡尾酒;为确保噬菌体产品的安全性和有效性,相关部门必须加强对噬菌体的生物安全性评估和监测,并建立规范的生产、质量控制和应用标准,以确保噬菌体产品的安全性

和有效性;还可通过科普教育和宣传,提高公众对噬菌体的认识和接受度。

3 结论

该研究成功从污水样本中分离纯化了一株新型小肠结肠炎耶尔森氏菌烈性噬菌体 WW1,并对其形态、基因组、裂解谱、生物学特性(包括最佳感染复数、一步生长曲线及稳定性)和实际应用潜力进行探究。实验数据表明,噬菌体 WW1 的基因组中没有编码任何和毒力、耐药相关的基因,这为在生物安全方面的应用提供了余力支持。在生物学特性方面,WW1 的最佳感染复数为 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4} ,其效价可高达约 8.78 lg PFU/mL。此外,WW1 具有适中的潜伏期(25 min)和裂解期(35 min),裂解量为 35 PFU/cell。该噬菌体能够在宽泛的温度范围(4~50 ℃)和 pH 值(5~11)条件下保持活性,表现出卓越的环境耐受性。在实际应用方面,WW1 可在 28 ℃,8 h 内显著抑制 LB 肉汤中小肠结肠炎耶尔森氏菌的生长(MOI=10²)。在 4 ℃ 下作用 24 h 后,WW1 可将猪肉表面小肠结肠炎耶尔森氏菌的数量由 3.82 lg CFU/mL 降低至 2.67 lg CFU/mL,将牛奶中小肠结肠炎耶尔森氏菌的数量由 5.41 lg CFU/mL 降低至检测限以下(MOI=10⁴)。同时,WW1 在作用约 7 h 后,能有效抑制小肠结肠炎耶尔森氏菌在聚乙烯(抑制率约 99%)及不锈钢(抑制率约 69%)表面形成的生物膜(MOI=10²)。同已报道的小肠结肠炎耶尔森氏菌噬菌体相比,WW1 具有更短的潜伏期,且对牛奶中污染的宿主菌具有更为高效的防控效果。综上所述,WW1 具有较高的生物安全性和高效的抑菌能力,有望成为一种防控小肠结肠炎耶尔森氏菌的新型生物制剂。

参考文献

- [1] BOTTONE E J. *Yersinia enterocolitica*: Overview and epidemiologic correlates [J]. Microbes and Infection, 1999, 1(4): 323-333.
- [2] FÀBREGA A, VILA J. *Yersinia enterocolitica*: Pathogenesis, virulence and antimicrobial resistance [J]. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2012, 30(1): 24-32.
- [3] WANG J, LIU M, WANG H X, et al. Occurrence, molecular characterization, and antimicrobial susceptibility of *Yersinia enterocolitica* isolated from retail food samples in China [J]. LWT-Food Science and Technology, 2021,

- 150: 111876.
- [4] YIN W, WANG Y T, LIU L, et al. Biofilms: The microbial “protective clothing” in extreme environments [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(14): 3423.
- [5] MEVO S I U, ASHRAFUDOUILLA M, FURKANUR RAHAMAN MIZAN M, et al. Promising strategies to control persistent enemies: Some new technologies to combat biofilm in the food industry-A review [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 20(6): 5938-5964.
- [6] TWORT F W. An investigation on the nature of ultramicroscopic viruses [J]. The Lancet, 1915, 186(4814): 1241-1243.
- [7] BUTTIMER C, MCAULIFFE O, ROSS R P, et al. Bacteriophages and bacterial plant diseases [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 34.
- [8] RICHARDS G P. Bacteriophage remediation of bacterial pathogens in aquaculture: A review of the technology [J]. Bacteriophage, 2014, 4(4): e975540.
- [9] GUTIÉRREZ D, RODRÍGUEZ-RUBIO L, MARTÍNEZ B, et al. Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry [J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 825.
- [10] PARK H, KIM J, KIM H, et al. Characterization of the lytic phage MSP1 for the inhibition of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovars Thompson and its biofilm [J]. International Journal of Food Microbiology, 2023, 385: 110010.
- [11] BYUN K H, HAN S H, CHOI M W, et al. Biofilm eradication ability of phage cocktail against *Listeria monocytogenes* biofilms formed on food contact materials and effect on virulence-related genes and biofilm structure [J]. Food Research International (Ottawa, Ont), 2022, 157: 111367.
- [12] CHEGINI Z, KHOSHBYAN A, TAATI MOGHADAM M, et al. Bacteriophage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: A review [J]. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 2020, 19(1): 45.
- [13] HUANG Z C, YUAN X M, ZHU Z J, et al. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* bacteriophage DZ1 and its application in foods [J]. Food Chemistry, 2024, 431: 137128.
- [14] 李旋,叶军航,赵尹蕾,等.4株金黄色葡萄球菌噬菌体的分离鉴定、生物学特性及其基因组分析[J].现代食品科技, 2023,39(12):130-141.
- [15] 黄桥栏,刘泽锬,何嘉欣,等.烈性噬菌体vB_VpP_AC2的分离鉴定及生物学特性分析[J].现代食品科技,2023, 39(7):42-52.
- [16] LEON-VELARDE C G, JUN J W, SKURNIK M. *Yersinia* phages and food safety [J]. Viruses, 2019, 11(12): 1105.
- [17] HAMMERL J A, BARAC A, ERBEN P, et al. Properties of two broad host range phages of *Yersinia enterocolitica* isolated from wild animals [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(21): 11381.
- [18] ADRIAENSSENS E, BRISTER J R. How to name and classify your phage: An informal guide [J]. Viruses, 2017, 9(4): 70.
- [19] CHEN M M, XU J T, YAO H C, et al. Isolation, genome sequencing and functional analysis of two T7-like coliphages of avian pathogenic *Escherichia coli* [J]. Gene, 2016, 582(1): 47-58.
- [20] NELSON D C, SCHMELCHER M, RODRIGUEZ-RUBIO L, et al. Endolysins as antimicrobials [J]. Advances in Virus Research, 2012, 83: 299-365.
- [21] YOUNG R. Bacteriophage lysis: Mechanism and regulation [J]. Microbiological Reviews, 1992, 56(3): 430-481.
- [22] DRAPER B, RAO V B. An ATP hydrolysis sensor in the DNA packaging motor from bacteriophage T4 suggests an inchworm-type translocation mechanism [J]. Journal of Molecular Biology, 2007, 369(1): 79-94.
- [23] 宋少云,贾艳华,祝心舟,等.末端酶及其在噬菌体包装中的作用[J].生物技术通报,2013,11:40-45.
- [24] SUN S Y, RAO V B, ROSSMANN M G. Genome packaging in viruses [J]. Current Opinion in Structural Biology, 2010, 20(1): 114-120.
- [25] MERCIER S, VILLENEUVE S, MONDOR M, et al. Time-temperature management along the food cold chain: A review of recent developments [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2017, 16(4): 647-667.
- [26] MATCHES J R, LISTON J. Low temperature growth of *Salmonella* [J]. Journal of Food Science, 1968, 33(6): 641-645.
- [27] GAO X K, LIU H H, WANG T T, et al. Low temperature preservation for perishable ready to eat foods: Not entirely effective for control of *L. monocytogenes* [J]. Trends in Food Science & Technology, 2023, 142: 104228.
- [28] LI C, MURUGAIYAN J, THOMAS C, et al. Isolate specific cold response of *Yersinia enterocolitica* in transcriptional, proteomic, and membrane physiological changes [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 3037.
- [29] ZIŃCZUK J, WOJSKOWICZ P, KIŚLUK J, et al. Mesenteric lymphadenitis caused by *Yersinia enterocolitica* [R]. Poland: Medical University of Białystok, 2015.
- [30] JUN J W, PARK S C, WICKLUND A, et al. Bacteriophages reduce *Yersinia enterocolitica* contamination of food and kitchenware [J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 271: 33-47.
- [31] SONI K, SHEN Q, NANNAPANENI R. Reduction

- of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by bacteriophage P100, nisin and lauric arginate, singly or in combinations [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2014, 49(8): 1918-1924.
- [32] RAHMAN M, KIM S, KIM S M, et al. Characterization of induced *Staphylococcus aureus* bacteriophage SAP-26 and its anti-biofilm activity with rifampicin [J]. Biofouling, 2011, 27(10): 1087-1093.
- [33] EPA. *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria and *Pseudomonas syringae* pv. tomato specific bacteriophages; exemption from the requirement of a tolerance [J]. Federal Register, 2005, 70(248): 16700-16704.
- [34] CHIBEU A, AGIUS L, GAO A, et al. Efficacy of bacteriophage LISTEXTMP100 combined with chemical antimicrobials in reducing *Listeria monocytogenes* in cooked turkey and roast beef [J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 167(2): 208-214.
- [35] PERERA M N, ABULADZE T, LI M R, 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.
- [36] ZHANG X, NIU Y D, NAN Y, et al. SalmoFreshTM effectiveness in controlling *Salmonella* on romaine lettuce, mung bean sprouts and seeds [J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 305: 108250.
- [37] MONK A B, REES C D, BARROW P, et al. Bacteriophage applications: Where are we now? [J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 51(4): 363-369.
- [38] TIAN L, HE L, JACKSON K, et al. Self-assembling nanofibrous bacteriophage microgels as sprayable antimicrobials targeting multidrug-resistant bacteria [J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 7158.
- [39] 蔡天舒,王静雪,林洪,等.金黄色葡萄球菌噬菌体的生物学特性及其在牛奶中的抑菌应用[J].食品科学,2013, 34(11):147-151.
- [40] HUANG C X, VIRK S M, SHI J C, et al. Isolation, characterization, and application of bacteriophage LPSE1 against *Salmonella enterica* in ready to eat (RTE) foods [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1046.
- [41] 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.