

大肠杆菌 O157:H7 噬菌体 ESP02 的分离鉴定及其在食品中的初步应用

杜婷婷¹, 冯昕¹, 张思威¹, 孙世彪¹, 董彩文¹, 胡金强¹, 孙新城^{1,2,3,4*}

(1. 郑州轻工业大学食品与生物工程学院, 河南郑州 450001)

(2. 中原食品实验室, 郑州轻工业大学, 河南漯河 462333)

(3. 食品生产安全河南省协同创新中心, 河南郑州 450001)

(4. 河南省冷链食品质量安全控制重点实验室, 河南郑州 450001)

摘要: 大肠杆菌 O157:H7 是一种重要食源性致病菌, 噬菌体作为新型生物防治剂在食品生物防治中前景广阔。为获得高效噬菌体并评估其应用潜力, 以 O157:H7 为宿主, 采用双层平板法分离到一株有尾噬菌体 ESP02 (头部 54 nm×60 nm, 尾部 72 nm)。该噬菌体在 4~60 °C 和 pH 3~11 范围内耐受性良好; 最佳感染复数(MOI)为 0.1, 潜伏期 20 min, 爆发期 20~70 min, 爆发量 88.75 PFU/cell。基因组全长 48.3 kb, 编码 76 个 CDS, GC 含量 53.27%, 不含抗性与毒力基因。在 4 °C 和 25 °C 下, MOI=1 000~10 000 处理 24 h 对宿主菌抑制率达 99% 以上。综上, 烈性噬菌体 ESP02 具备良好的生物学特性和安全性, 在常温和冷藏条件下对多种食品基质的有效抑菌潜力。为开发靶向大肠杆菌 O157:H7 的噬菌体制剂及其在食品生物安全防控中的应用奠定了基础。

关键词: 大肠杆菌 O157:H7; 噬菌体; 生物学特性; 全基因组; 抑菌效果

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.5.0382

Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 Phage ESP02 and Its Preliminary Application in Food

DU Tingting¹, FENG Xin¹, ZHANG Siwei¹, SUN Shibiao¹, DONG Caiwen¹, HU Jinqiang¹, SUN Xincheng^{1,2,3,4*}

(1.College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China)

(2.Zhengzhou University of Light Industry, Food Laboratory of Zhong Yuan, Luohe 462333, China)

(3.Henan Collaborative Innovation Centre of Food Production Safety, Zhengzhou 450001, China)

(4.Henan Key Laboratory of Cold Chain Food Quality and Safety Control, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: *Escherichia coli* O157:H7 is an important foodborne pathogen. Phages, as novel biological control agents, have broad prospects in food biological control. To obtain highly efficient phages and evaluate their application potential, a tailed phage ESP02 (head 54 nm×60 nm, tail 72 nm) was isolated from O157:H7 as the host by the double-layer plate method. This phage has good tolerance within the range of 4~60 °C and pH 3~11; the optimal multiplicity of infection (MOI) is 0.1, with a latent period of 20 min, a burst period of 20~70 min, and a burst size of 88.75 PFU/cell. The genome is 48.3 kb in length, encoding 76 CDSs, with a GC content of 53.27%, and does not contain resistance or virulence genes. At 4 °C and 25 °C, the inhibition rate of the host bacteria reached over 99% after treatment with MOI=1 000~10 000 for 24 h. In conclusion, the virulent phage ESP02 has good biological characteristics and safety, and has effective antibacterial potential for various food matrices under normal and refrigerated conditions. This lays a foundation for the development of phage preparations targeting *E. coli* O157:H7 and their application in food biological safety control.

Keywords: *Escherichia coli* O157:H7; phage; biological characteristics; whole genome; antibacterial effect

食源性致病菌对全球公共卫生造成严重威胁, 其主要通过受污染的食品或水源进行传播, 广泛存在于自然环

收稿日期: 2026-03-12; 修回日期: 2026-05-16; 接受日期: 2026-05-18

基金项目: 河南省科技攻关项目 (24210211104)

作者简介: 杜婷婷 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品微生物, E-mail: 1207638135@qq.com

通讯作者: 孙新城 (1976-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品微生物, E-mail: biosxc@126.com

境中^[1]。据统计,全球每年约有6亿例因食源性致病菌引发的相关疾病,并导致42万人死亡^[2]。感染后常表现为呕吐、发热、腹泻等急性症状,严重时可引发为败血症、神经系统永久性损伤、肾衰竭甚至死亡,其中婴幼儿、老年人、孕妇及免疫缺陷人群的尤为突出^[3]。除对人体健康造成危害外,食源性疾病也对社会经济造成重大损失^[4]。大肠杆菌 O157:H7 是一种重要的食源性致病菌,在食品加工、储藏与运输等环节中广泛存在,可通过污染牲畜、家禽的饲料与水源引发大规模疫情,对食品安全和公众健康构成显著风险^[5-7]。目前食品工业常用的热杀菌技术(巴氏杀菌、商业灭菌及 UHT 超高温瞬时灭菌等)虽可对其有效灭活,但高温易导致食品色泽、风味改变及营养损失;冷杀菌技术(紫外杀菌、高压杀菌、臭氧杀菌等)虽能较好保持食品品质,却存在再污染的风险^[8,9]。化学处理手段(例如:杀菌剂与防腐剂)虽可适配不同加工流程,但易造成化学残留^[10]。因此,开发兼具成本效益与良好感官保持性的新型抗菌技术,对保障食品安全具有重要意义。

噬菌体是特异性感染并裂解细菌的病毒,在自然界中分布广泛^[11]。因其具有生产成本低、天然丰度高、杀菌效率高以及对人体安全等优点^[12,13]。近年来,噬菌体作为代替传统抗菌手段的生物制剂受到广泛关注,大量研究证实其在食品行业具有良好的应用潜力^[14,15]。HouFP 等在模拟细菌污染的 RTE (即食食品, Ready-to-Eat Food) 鸡爪中添加噬菌体 SF02,试验表明噬菌体 SF02 对 RTE 鸡爪中大肠杆菌 O157:H7 (初始浓度 2.55 Log CFU/g) 的抑制效果显著,25 °C 处理 2 h 后菌量降至检测限以下 (<10 CFU/g),且 4 °C 冷藏条件下抑菌效果可持续 7 d^[16]。多个国外监管机构(如美国 FDA、欧洲 EFSA)已批准商业噬菌体制剂在食品中的使用,进一步证实了其安全性^[17]。作为一种天然、绿色的生物抗菌剂,噬菌体对宿主菌具有高度特异性,且干扰食品中其他微生物群落^[18,19]。因此,噬菌体有望成为一种新型绿色安全的食品生物防护剂。基于此,本研究选用大肠杆菌 O157:H7 ATCC 43895 作为宿主菌,该菌株为国际通用的 O157:H7 标准参考菌株,携带 *stx1*、*stx2* 等典型毒力基因,广泛用于噬菌体分离及食品安全评价研究。从污水中分离纯化出一株针对大肠杆菌 O157:H7 ATCC 43895 的噬菌体 ESP02,系统评估了其耐温度、pH 的耐受性。测定了最佳感染复数,绘制了一步生长曲线,并通过透射电镜观察其形态特征。此外,对 ESP02 进行了全基因组测序与系统发育分析,并在乳制品、蔬菜及肉制品中评估其抑菌效果。为噬菌体防治食品中大肠杆菌 O157:H7 的污染提供了理论基础与实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大肠杆菌 O157:H7 (ATCC 43895),由实验室保存;污水,取自山东某污水处理厂;牛奶、生菜、牛肉,购于河南省郑州市高新区某超市;琼脂粉、琼脂糖、PBS 缓冲液,青岛海博生物科技有限公司;HCl、NaCl、甘油,天津市鼎盛鑫化工有限公司;氯仿,山东卓轩新材料有限公司。

1.2 仪器与设备

SW-CJ-1D 超净工作台,天津盛泰瑞有限公司;LH-50HG 全自动高压灭菌锅,青岛精诚仪器有限公司;GL-25M 冷冻高速离心机,上海卢湘仪仪器有限公司;BDY-2102 多功能摇床,力辰仪器科技有限公司;CTAH-150 恒温培养箱,上海喆图科学仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 大肠杆菌 O157:H7 ATCC 43895 菌种活化

取实验室-80 °C 冰箱保藏的大肠杆菌 O157:H7 ATCC 43895 于 LB 培养基上划线,37 °C 倒置培养 24 h,挑取单菌落接种于液体 LB 培养基中 37 °C、180 r min⁻¹ 培养 6~12 h。

1.3.2 噬菌体的富集

参照方法^[20],10 mL 污水于 10 000 r min⁻¹ 条件下离心 10 min,0.22 μm 滤膜过滤上清液,将过滤后的污水样品与 50 mL 液体 LB 培养基和 1 mL 大肠杆菌 O157:H7 菌液混合,于 37 °C 恒温摇床中培养 24 h,获得富集液,10 000 r min⁻¹ 离心 15 min,取上清液过滤,得到噬菌体溶液。

1.3.3 噬菌体的分离纯化

挑取培养皿中透亮,形状均匀的单一噬菌斑,于 500 μL PBS 缓冲液中浸泡,涡旋混合 1 min 后,室温放置

4~6 h, 10 000 r min⁻¹ 离心 10 min, 去除杂质, PBS 十倍系列梯度稀释; 各梯度稀释液与菌液 1:1 混匀后, 倒入 8 mL、40 ℃ 左右半固体 LB 培养基 (0.7% 琼脂), 混匀后于 LB 固体培养基 (1.5% 琼脂) 平板上平铺, 静置凝固后, 培养箱中 37 ℃ 倒置培养 12 h。重复该步骤 3~5 次, 直至噬菌斑的大小均匀, 即获得纯噬菌体^[21]。

1.3.4 噬菌体的形态观察

扩增超滤后的噬菌体滤液样品置于铜网格上, 静置吸附 1 min。随后滴入质量分数 1.5% 的磷钨酸 (PTA) 进行负染色, 使其在干燥前再静置 1 min。使用 JEOL JEM-2100F 透射电子显微镜 (日本电子株式会社) 对样品进行观察^[22]。

1.3.5 噬菌体温度和 pH 值稳定性测定

分别于 4、25、37、50、60、70、80 ℃ 条件下, 对 1 mL 噬菌体滤液进行水浴处理。水浴 20、40 及 60 min 取样, 样品冷却后, 十倍系列梯度稀释测效价, 评估其在不同温度下的稳定性^[23,24]。

将 PBS 缓冲液分别调节至 pH 值 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12, 分装于无菌试管中。将所有试管置于 37 ℃ 水浴中平衡温度, 待温度稳定后, pH 值缓冲液与噬菌体按 9:1 体积混合, 于 37 ℃ 水浴孵育 1 h。孵育结束后, 立即测定各 pH 值处理组中噬菌体的存活效价^[25]。

1.3.6 最佳感染复数 (MOI) 测定

将宿主菌 37 ℃ 振荡培养至对数期 ($OD_{600}=0.6$)。采用十倍梯度稀释法设置不同 MOI 条件 (0.000 1、0.001、0.01、0.1、1、10、100), 在每个实验组中, 将相应稀释度的噬菌体液与宿主菌悬液 (细菌浓度保持恒定) 1:1 混合, 室温静置 10 min 以促进吸附。倒入 10 mL 液体 LB 培养基, 37 ℃、180 r min⁻¹ 振荡培养 6 h, 测定各组噬菌体效价 (PFU mL⁻¹)。通过比较不同 MOI 条件下的噬菌体效价, 选择效价最高的 MOI 值作为最佳感染复数^[26]。

1.3.7 一步生长曲线测定

将宿主菌培养物与噬菌体按最佳 MOI 的比例混合, 室温静置吸附 15 min。随后, 将混合液以 10 000 r min⁻¹ 离心 10 min, 弃上清, 收集的沉淀重悬。将重悬液于 37 ℃ 下孵育 30 min。自 0 min 起, 在 120 min 内每间隔 10 min 取样一次。每个样品经 12 000 r min⁻¹ 离心 10 min 取上清过滤后, 测定噬菌体效价^[27]。并计算裂解量。

$$A = \frac{B}{C} \quad (1)$$

式中:

A——噬菌体裂解量, PFU/cell;

B——裂解末期噬菌体效价, PFU/mL;

C——感染初期宿主菌的菌液浓度, CFU/mL。

1.3.8 噬菌谱的测定

采用点斑法测定噬菌体的宿主范围, 以实验室保存的 11 株细菌作为测试菌株。取 500 μL 待测对数生长期菌液 (OD₆₀₀=0.6) 与 10 mL LB 固体培养基于一次性培养皿中, 轻轻晃动混合均匀, 静置凝固。分别滴加 20 μL 噬菌体液 (5.8×10⁹ PFU/mL) 于平板上, 静置吸附 10 min, 37 ℃ 培养箱中培养 12 h。若出现清晰噬菌斑, 则判定该噬菌体能够裂解对应菌株^[28]。

1.3.9 全基因组分析

噬菌体基因组 DNA 的提取参照试剂盒 Norgen Phage DNA Isolation Kit (货号: NGB-46800) 说明书进行, 主要步骤如下:

1. 在无菌离心管中, 依次加入 300 μL 噬菌体悬液、500 μL 裂解缓冲液 (Buffer VL V2) 和 20 μL 蛋白酶 K, 充分涡旋混匀 15~30 s。室温静置孵育 5 min, 以确保病毒衣壳完全裂解, 核酸充分释放。

2. 将上述裂解液全部转移至套放在收集管中的 DNA 纯化柱内, 12 000 r min⁻¹ 离心 1 min, 使核酸特异性吸附于柱膜的硅胶基质上, 弃去滤过液。

3. 向纯化柱中加入 700 μL 清洗液 VW1 Plus, 12 000 r min⁻¹ 离心 30 s, 弃液。再加入 700 μL 清洗液 VW2 Plus (含乙醇), 以相同条件离心清洗。为彻底去除残留乙醇, 将空柱于 12 000 r min⁻¹ 空离 2 min。

4. 将纯化柱转移至新的 1.5 mL 无菌离心管中, 向柱膜中央悬空滴加 30 μL 无核酸酶洗脱液 (RNase-free ddH₂O), 室温静置浸润 1 min, 随后 12 000 r min⁻¹ 离心 1 min 以洗脱基因组 DNA。

5. 洗脱得到的基因组 DNA 立即置于 -20 ℃ 保存备用。

DNA 样品提取后,利用 Illumina 平台进行文库构建与测序。获得的原始数据首先通过 FastQC 进行质量评估,再使用 Trimmomatic 进行过滤与修剪,得到高质量洁净序列。随后采用 SPAdes 进行基因组从头组装或参考基因组引导的组装,获得 contig 序列;利用 GapFiller 进行序列间隙填补,并通过 PrInSeS-G 校正碱基错误及小片段插入缺失。使用 pharokka 1.7.5 对 prokka 预测结果进行重新注释,该软件整合了 phrog, CARD, VFDB 数据库进行基因预测,并绘制基因圈图。使用 VITAP 对两株噬菌体进行物种分类预测,该软件按照 ICTV VMR_MSL40.v1.20250307 病毒分类水平进行分类。依照 VITAP 的分类结果下载相近分类水平的噬菌体并使用 VICTOR 对噬菌体进行全基因组建树。使用 lovis4u 0.1.6 对两株噬菌体及相近噬菌体进行共线性分析。

1.3.10 噬菌体 ESP01 对不同食品基质中大肠杆菌 O157:H7 的抑制效果

将牛奶经 115 °C 高压蒸汽灭菌 15 min 后备用。PBS 缓冲液调整培养至对数期的菌液为 1×10^4 CFU/mL,取 100 μ L 加入 9.8 mL 无菌脱脂牛奶中,室温静置 30 min。实验组分别加入 100 μ L 噬菌体 (1×10^7 、 1×10^8 PFU/mL) 悬液,使 MOI 分别为 1 000 和 10 000;对照组加入等体积 PBS。每组样品分别置于 4 °C 与 25 °C 条件下静置培养,每个温度设 3 组 (2 处理组、1 未处理组),每组三组平行。分别于 0、3、6、12、24 h 取样,经 10 倍梯度稀释后涂布计数^[29]。

生菜叶片经体积分数 75%乙醇擦拭表面 (2 cm²/片) 后,紫外灭菌 1 h。使用无菌 PBS 将对数期菌液稀释至 1×10^4 CFU/mL,取 100 μ L 均匀涂布于叶片表面,室温静置 30 min。实验组分别加入 100 μ L 噬菌体悬液 (1×10^7 、 1×10^8 PFU/mL),使 MOI 分别为 1 000 与 10 000;对照组加入等体积 PBS。样品分别置于 4 °C 与 25 °C 条件下静置培养,每个温度设 3 组 (2 处理组、1 未处理组),每组三组平行。分别于 0、3、6、12、24 h 取样,经 10 倍梯度稀释后涂布计数^[30]。

将牛肉切成约 1 g 小块,经体积分数 75%乙醇浸泡 5 min 后,紫外灭菌 1 h。使用无菌 PBS 将对数期菌液调节至 1×10^4 CFU/mL,取 100 μ L 均匀涂抹于牛肉表面,室温静置 30 min。实验组分别加入 100 μ L 噬菌体 (1×10^7 、 1×10^8 PFU/mL) 悬液,使 MOI 分别为 1 000 与 10 000;对照组加入等体积 PBS。样品分别于 4 °C 与 25 °C 条件下静置培养,每个温度设 3 组 (2 处理组、1 未处理组),每组三组平行。分别于 0、3、6、12、24 h 取样,经 10 倍梯度稀释后涂布计数^[31]。

噬菌体杀菌率计算公式

$$D = \frac{N_0 - N_t}{N_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

D ——杀菌率, %;

N_0 ——组内处理前宿主菌数量, CFU/mL;

N_t ——组内处理后宿主菌数量, CFU/mL。

1.4 数据处理

实验数据采用 SPSS 27.0.0.0 软件进行分析,利用 Origin 2021 绘图软件对数据进行制图。

2 结果与讨论

2.1 噬菌体形态特征

从污水中分离到以一株大肠杆菌 O157:H7 为宿主菌的噬菌体,通过双层琼脂平板法纯化 5 次后,命名为 ESP02。如图 1a 所示,ESP02 在 37 °C 孵育约 12 h 后,可观察到直径约 2 mm 的噬菌斑,其形态特征表现为中央透明,边缘整齐清晰。透射电镜图 1b 显示,ESP02 属有尾噬菌体,头部为典型的正二十面体,长约 54 nm×60 nm,尾部长约 72 nm。

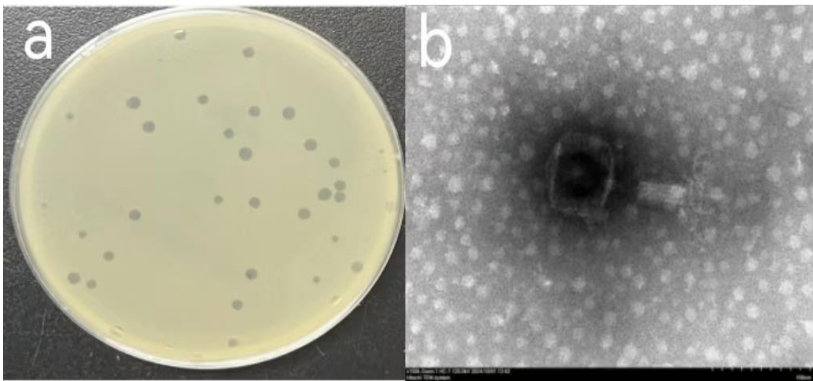


图 1 ESP02 噬菌斑形态与透射电子显微镜图

Fig.1 The morphology of the ESP02 plaque and the transmission electron microscope image

注：a 为噬菌斑图；b 为噬菌体电镜图。

2.2 噬菌体温度与 pH 值稳定性

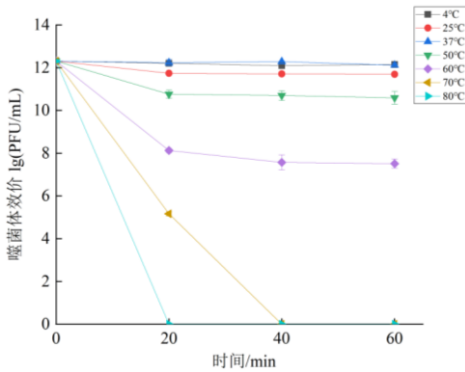


图 2 ESP02 温度稳定性

Fig.2 Temperature Stability of ESP02

注：纵轴为存活率（处理组效价/初始效价×100%），横轴为处理时间。

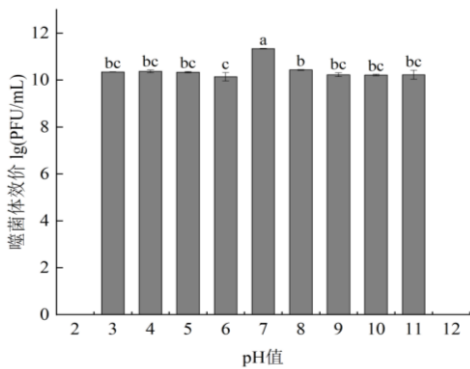


图 3 ESP02 pH 稳定性

Fig.3 Stability of ESP02 pH

注：纵轴为存活率（%），横轴为 pH 值。不同字母表示不同 pH 组之间存在显著差异，含相同字母代表两组间无显著性差异。

噬菌体的温度和 pH 稳定性对于在食品中有效抑菌至关重要,图 2 可知,ESP02 初始效价为 1.68×10^{12} PFU/mL,水浴处理 1 h 后,4~50 ℃活性保持恒定,60 ℃水浴 20 min 后活性迅速下降,但在后 40 min 内趋于稳定,处理 60 min 后的活性保留率约为 20.4%,活性虽有所下降,但仍保留初始水平的五分之一,70 ℃与 80 ℃分别在 40 min 与 20 min 时完全失活,说明 ESP02 在 4~60 ℃范围内有良好的稳定性。图 3 可知,ESP02 初始效价为

1.77×10¹¹ PFU/mL, 在 pH 3~11 的范围内孵育 60 min 后均能保持较高活性, 表现出宽泛的 pH 耐受性; 在 pH 值<3 或 pH 值>11 时, 噬菌体完全失活。这与已报道的大肠杆菌 O157:H7 噬菌体 ECP2024 相似^[32]。

2.3 最佳感染复数

确定最佳 MOI, 在噬菌体的生产与治疗中至关重要, 当 MOI=0.1 时 (图 4 所示), 产生的子代噬菌体数量最多, 噬菌体的效价最高为 5.8×10⁹ PFU/mL, 在噬菌体感染大肠杆菌 0157:H7 ATCC 43895 时, 此时 ESP02 增殖最快, 抑菌效率最高。

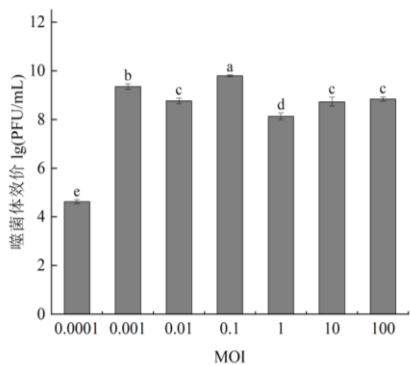


图 4 ESP02 最佳感染复数

Fig.4 Optimal multiplicity of infection of ESP02

注: 纵轴为噬菌体效价 (PFU/mL), 横轴为 MOI 值, 不同字母代表存在显著差异性, 含相同字母代表两组间无显著性差异。

2.4 一步生长曲线

一步生长曲线揭示了噬菌体 ESP02 的裂解动力学特征。如图 5 所示, 噬菌体 ESP02 感染宿主菌后的 0~20 min 内, 效价无明显变化, 处于潜伏期。20 min 后进入暴发期, 效价呈快速上升趋势, 持续至 70 min。70 min 后进入稳定期, 效价增长趋于平缓, ESP02 潜伏期为 20 min, 爆发期为 50 min, 裂解量为 88.75 PFU/cell。结果表明, ESP02 有较强的增殖能力, 能有效裂解宿主菌。

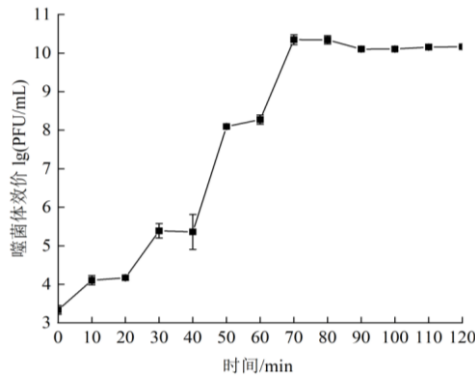


图 5 ESP02 一步生长曲线

Fig.5 One-step growth curve of ESP02

注: 纵轴为噬菌体效价, 横轴为感染时间。

2.5 噬菌谱

用实验室保存的 11 株细菌为测试对象测定噬菌体的宿主谱, 表 1 可知, ESP02 除了能裂解大肠杆菌 O157:H7, 形成透明的噬菌斑, 还可以裂解大肠杆菌 O103-1 与链球菌, 形成的噬菌斑略浑浊, 对于实验室保存其它常见的食源性致病菌株无裂解性, 属于窄宿主谱噬菌体。

表 1 宿主谱
Table 1 Host Range

宿主菌	宿主菌编号	ESP02
大肠杆菌 O157:H7	ATCC43895	+++
大肠杆菌 O103-1	RM13322	-
大肠杆菌 O103-2	RM10744	++
单增李斯特菌	ATCC15313	-
铜绿假单胞菌	ATCC10145	-
副溶血性弧菌	ATCC17802	-
鼠伤寒沙门氏菌	CICC21484	-
金黄色葡萄球菌	ATCC6538	-
志贺氏菌	ATCC12038	-
蜡样芽胞杆菌	BNCC261113	-
链球菌	ATCC49619	++

注：“+++”表示斑块透明半透明，“++”表示斑块略浑浊，“-”表示无斑块。

2.6 噬菌体 ESP02 的全基因组分析

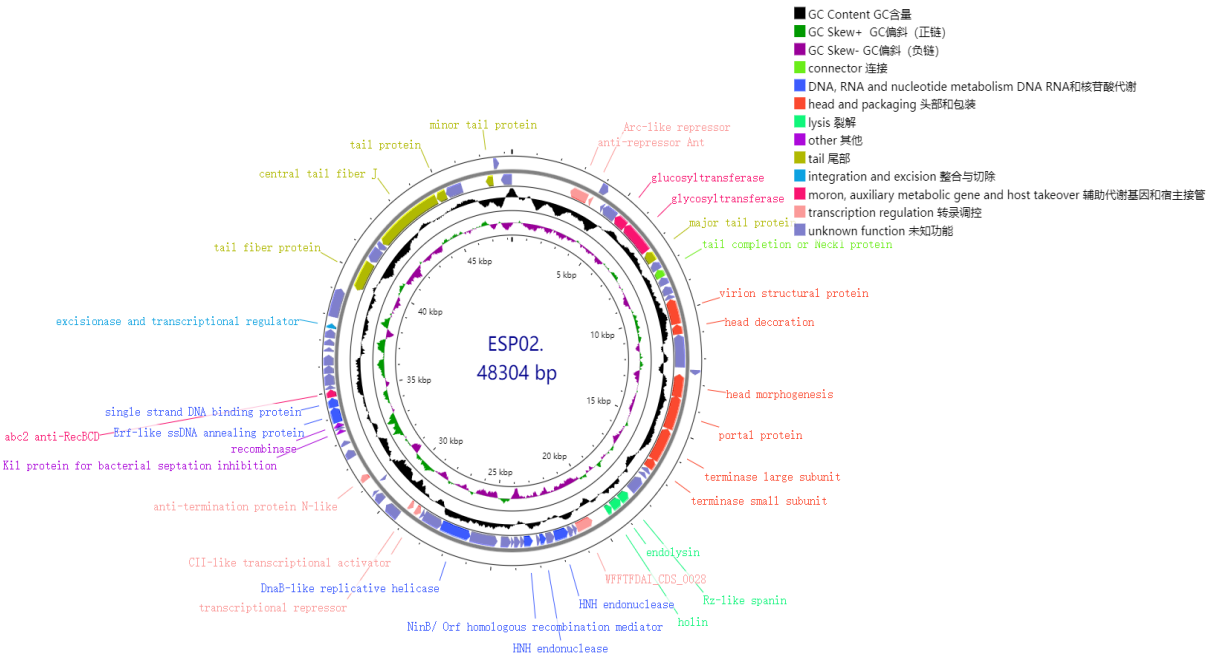


图 6 ESP02 基因注释图

Fig.6 ESP02 Gene Annotation Diagram

注：最外圈为基因组坐标（bp），单位为千碱基（kb）。由外向内：第 1 圈为正向链 CDS（箭头向外），第 2 圈为反向链 CDS（箭头向内），不同颜色代表不同的功能模块（转录、代谢、辅助、尾部、连接、头部/包装、裂解、整合/切除、假定蛋白等，具体见表 2）。第 3 圈为 GC 含量（黑色曲线，向圆心内表示低于平均 GC 含量），第 4 圈为 GC skew（绿色为正，紫色为负）。

噬菌体 ESP02 的全基因组序列已上传至 NCBI 数据库，获得登录号 PX705505。基因组图谱如图 6 所示。测序与分析结果显示，ESP02 基因组为双链 DNA，全长为 48 304 bp，G+C 含量为 53.27%。对 ESP02 基因组进行了开放阅读框(ORF)预测，并通过生物信息学分析，注释了 76 个 CDS，其中 24 个(31.6%)位于正向链 52 个(68.4%)位于负向链，43 个 CDS 编码功能未知的假定蛋白（Hypothetical protein），占全部 CDS 的 56.6%；其余 33 个 CDS 可预测出生物学功能。根据功能分类大致分为转录、代谢、辅助、尾部、连接、头部和包装、裂解、其他、整合与切除、假定 10 个模块（表 2），利用 CARD（抗性基因数据库）和 VFDB（毒力因子数据库）对 ESP02 全基因组进行比对分析，未检测到任何已知的抗性基因、毒力相关基因及溶源性基因，进一步证明了 ESP02 的安全性

裂解性。

噬菌体的全基因组发育树（图 7）显示，ESP02 与 Uncultured phage cr127 1、Uncultured phage cr11 1 及 Staphylococcus phage CNP_x 等形成了一个独立分支（Bootstrap 值为 97~100），表明 ESP02 在基因组组成和进化历史上与这些噬菌体的亲缘关系更近，结合 VITAP 的分类结果，ESP02 被分类为 *Caudoviricetes* 纲(有尾噬菌体纲)。

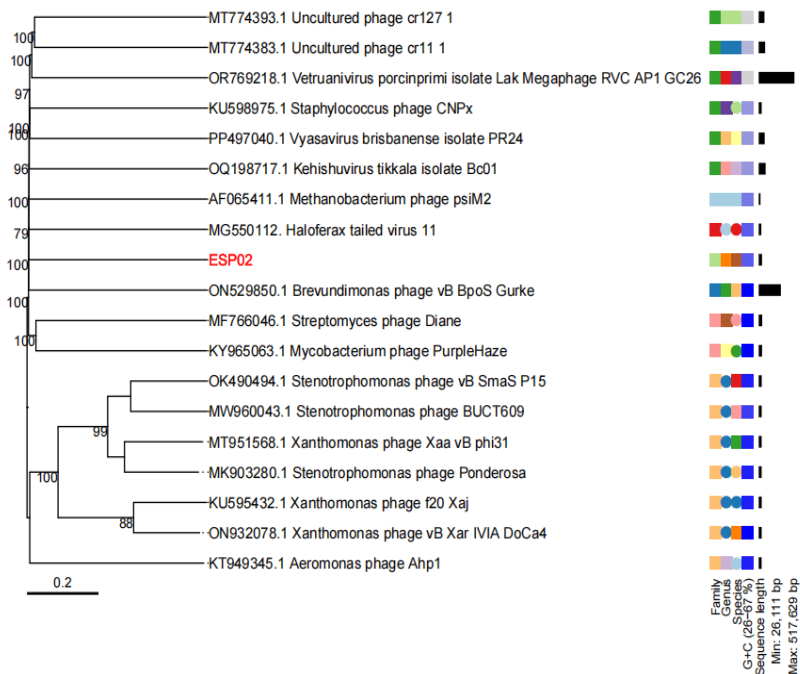


图 7 ESP02 全基因发育树

Fig.7 Complete phylogenetic tree of ESP02

注：使用 VICTOR 软件，以邻接法（NJ）构建，Bootstrap 重复 1 000 次，节点处仅显示≥70%的支持值。标尺表示每个位点的氨基酸替换数。

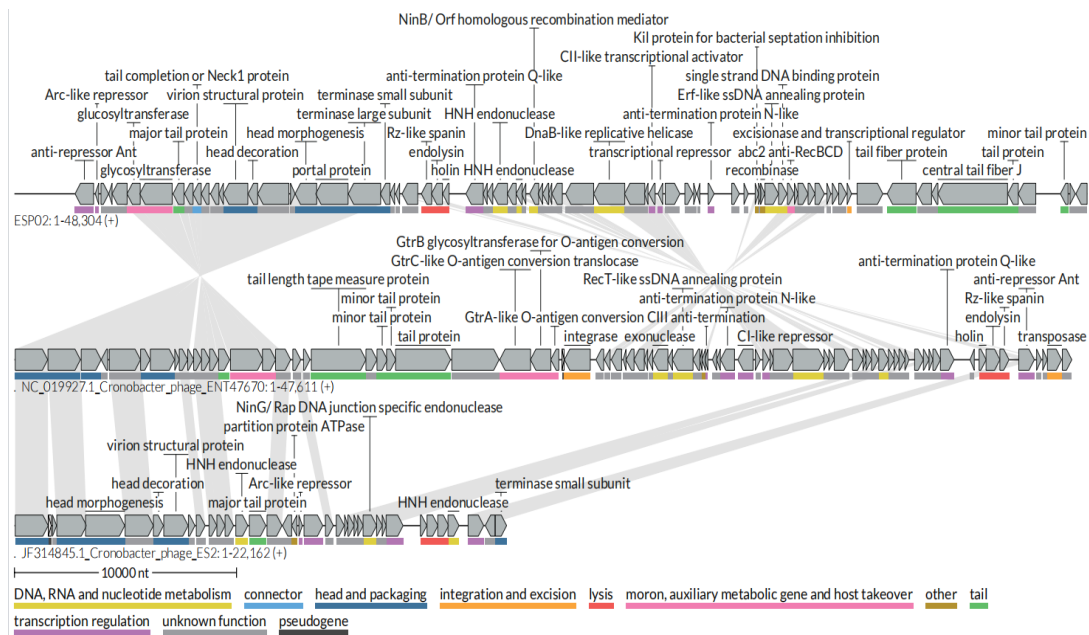


图 8 ESP02 共线性分析

Fig.8 ESP02 Correlation Analysis

注：箭头表示预测的开放阅读框（ORF），箭头方向指示转录方向。箭头之间的颜色渐变表示氨基酸序列相似度。灰色阴影区域表示局部共线性区块。

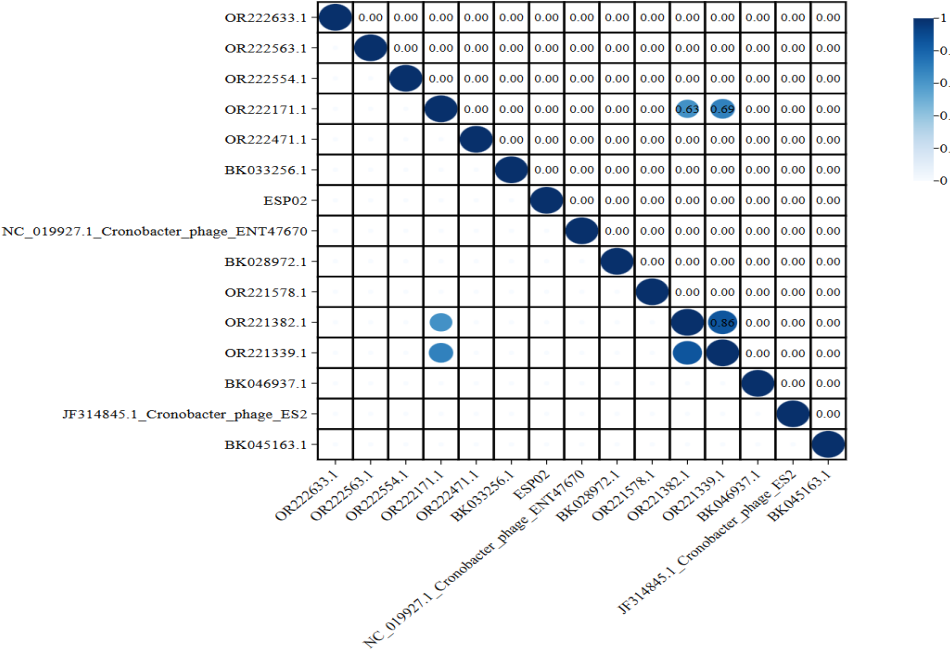


图9 ESP02 ANI 分析

Fig.9 ESP02 ANI Analysis

注：使用 vclust 计算 ANI 值，颜色梯度表示 ANI 百分比（%），深红色代表高一致性（>95%），蓝色代表低一致性（<70%）。在 NCBI 数据库下载与两株噬菌体同源性、覆盖率高的噬菌体基因序列，使用 lovis4u 0.1.6 软件进行共线性分析，预测的 ORF 由箭头表示，箭头方向代表转录方向，噬菌体 ORF 之间比对以颜色深浅表示相似度高低。共线性分析（图 8）显示，ESP02 与同源性较高的两株噬菌体（NC_019927.1、JF314845.1）的基因组存在局部共线性区块，但整体基因排列顺序差异较大，有少量共线。平均氨基酸（AAI）一致性分别为 45.17%和 34.79%。ANI 分析（图 9）显示，使用 NCBI blastn 进行比对，比对到的最相近的噬菌体为 Cronobacter phage ENT47670，E 值为 0，覆盖度为 39%，一致性为 94.19%，其余相近的噬菌体大多为 MAG。使用 vclust 对相近的噬菌体计算 ANI，噬菌体 ESP02 与目前 NCBI 上存在的噬菌体均无法计算 ANI，表明该噬菌体是一株较新的噬菌体。综合分析，ESP02 可能代表了一株未被报道的新型噬菌体，丰富了针对大肠杆菌 O157:H7 的噬菌体资源库。

2.7 在食品中的抑菌效果

2.7.1 牛奶中的抑菌效果

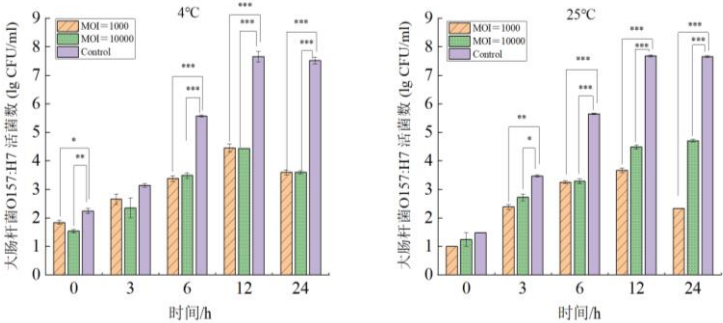


图 10 ESP02 对牛奶中大肠杆菌 O157:H7 的杀菌效果

Fig.10 Bactericidal effect of ESP02 on Escherichia coli O157:H7 in milk

注：纵轴为活菌，横轴为处理时间。*差异显著（ $P<0.05$ ）；**差异非常显著（ $P<0.01$ ）；***差异极其显著（ $P<0.001$ ）。为评估噬菌体 ESP02 对牛奶中大肠杆菌 O157:H7 ATCC 43895 的清除效果，在 4℃ 条件下将其应用于人工染菌的牛奶中，以模拟冷藏储存污染控制。图 10 显示，在 4℃ 条件下，对照组活菌数在 24 h 内持续上升，噬菌体

处理组的活菌数则持续下降, MOI=10 000 的处理组抑菌效果最佳, 作用 6、12、24 h 后, 活菌数较未处理组分别下降 2.18、3.91、3.21 lg CFU/mL; 在 25 °C 条件下将其应用于人工染菌的牛奶中, 以模拟常温储藏污染控制。在 25 °C 条件下, MOI=1 000 的处理组效果最优, 对应时间点活菌数分别下降 2.40、4.10、5.32 lg CFU/mL。上述结果表明, 无论是在冷藏还是常温条件下, 噬菌体 ESP02 均能有效抑制牛奶中的大肠杆菌 O157:H7 ATCC 43895, 且不同温度下的最佳感染复数有所差异。

2.7.2 生菜中的抑菌效果

为模拟冷链储运环境与常温货架储藏条件下, 在 4 °C 与 25 °C 条件下将噬菌体 ESP02 应用人工染菌的生菜表面。以评估噬菌体 ESP02 对生菜表面大肠杆菌 O157:H7 的清除效果, 如图 11 所示, MOI=1 000 时, 4 °C 处理组抑制效果最好, 6、12、24 h 的活菌数较对照组分别降低 0.60、1.55、2.48 lg CFU/mL; MOI=1 000 时, 25 °C 处理组效果最佳, 对应时间点活菌量分别下降 0.51、1.37、3.68 lg CFU/mL。结果表明, 噬菌体 ESP02 在冷藏与常温中均能有效抑制生菜表面大肠杆菌 O157:H7 ATCC 43895 的增殖。

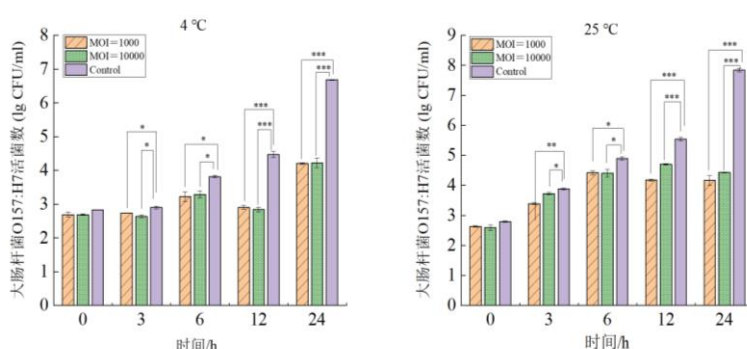


图 11 ESP02 对生菜中大肠杆菌 O157:H7 的杀菌效果

Fig.11 Bactericidal effect of ESP02 on *Escherichia coli* O157:H7 in lettuce

注: 纵轴为活菌, 横轴为处理时间。*差异显著 ($P<0.05$); **差异非常显著 ($P<0.01$); ***差异极其显著 ($P<0.001$)。

2.7.3 牛肉中的抑菌效果

为模拟冷链储运环境, 在 4 °C 条件下将噬菌体 ESP02 应用于人工染菌的牛肉表面, 图 12 显示, MOI=10 000 的处理组抑制效果最佳, 处理 6~24 h 后其菌落数与对照组比分别降低 0.79、1.26、3.35 lg CFU/mL, 而未处理组活菌量持续增长。模拟常温货架 25 °C 条件下, MOI=1 000 的处理组抑制效果最佳, 处理 6~24 h 后其菌落数与对照组比分别降低 1.25、2.42、4.23 lg CFU/mL。结果表明在不同温度下, 经噬菌体处理 24 h, 与未处理组相比均产生显著的抑菌效果。噬菌体 ESP02 能有效抑制牛肉表面大肠杆菌 O157:H7 ATCC 43895 的生长。

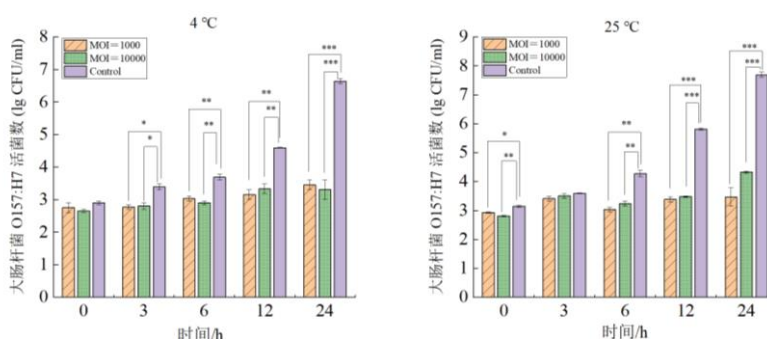


图 12 ESP02 对牛肉中大肠杆菌 O157:H7 的杀菌效果

Fig.12 The bactericidal effect of ESP02 on *Escherichia coli* O157:H7 in beef

注: 纵轴为活菌, 横轴为处理时间。*差异显著 ($P<0.05$); **差异非常显著 ($P<0.01$); ***差异极其显著 ($P<0.001$)。

2.8 讨论

大肠杆菌 O157:H7 是一种致病细菌,有强烈的志贺毒素。常见的污染源主要有未煮熟的牛肉(特别是碎牛肉)、未经巴氏消毒的奶制品、受污染的生鲜蔬果、水源。噬菌体已被用作天然抗菌方法,用于减少食物供应中的大肠杆菌 O157:H7。大肠杆菌 O157:H7 噬菌体制剂 Eco Shield™ 已获美国食品药品监督管理局(FDA)与美国农业部食品安全检验局(FSIS)批准,并允许上市销售。有学者近年来相继分离出 ϕ 241、SF02、JNwz02 等以大肠杆菌 O157:H7 为宿主的烈性噬菌体并应用于食品中,均取得了较好的杀菌效果^[33-35]。基于此,本研究从污水中分离得到一株裂解性噬菌体 ESP02,研究其形态、生物学特性、基因组及在食品基质中的应用效果。噬菌体能否成为有效的生物防制剂,主要取决于其生物学特性,潜伏期短、爆发量大的噬菌体在实际应用中表现更佳。此外,噬菌体对温度和 pH 值的稳定性是筛选其作为生物控制剂的关键指标。研究表明,ESP02 具有高效的裂解能力,温度 4~60 °C 及 pH 值 3~11 的范围内仍保持高稳定性。理化稳定性使其能广泛应用于各类食品(酸/中性)及全产业链环节(加工、冷藏、热处理)。宿主谱较窄,特异性强,可精准清除目标病原体,而不影响其他功能性或共生菌株。基因组分析表明,ESP02 基因组为双链 DNA,全长为 48 304 bp, G+C 含量为 53.27%,属有尾噬菌体纲(Caudoviricetes),未检出毒力、抗性、溶原性相关基因,进一步证明了其裂解性与安全性。基于食品工业常见温度条件,选择 4 °C 和 25 °C,在不同感染复数(MOI)下评估 ESP02 在牛奶、生菜和牛肉中对大肠杆菌 O157:H7 ATCC 43895 的清除效果。结果表明,ESP02 在三种食品基质中 24 h 抑菌率均达到 99%以上,能有效抑制大肠杆菌 O157:H7 ATCC 43895 的增殖。ESP02 在牛奶中的抑菌效果最为突出。可能是牛奶作为液体基质为噬菌体提供了无屏障的扩散环境,能最大化实现吸附与裂解,且牛奶的 pH 值为中性更加适合噬菌体生长。生菜与牛肉作为固体食品,食品基质结构复杂,固体食品内部 pH 值、水分活度等分布不均匀,也会对噬菌体的抑菌效果产生影响,使得噬菌体在固体食品中的抑菌效果弱于液体食品。虽然 ESP02 在不同食品中 24 h 最高抑菌率均 99%以上,但这是在理想状态下获得的结果,验证了噬菌体技术的理论可行性,而在未经处理的实际食品中,往往携带杂菌,这些杂菌会干扰噬菌体的吸附与复制,影响抑菌效果。故未来还需进一步探究噬菌体在真实食品中对大肠杆菌 O157:H7 的清除效果,使其在实际应用中也能发挥出稳定可靠的抑菌效果。ESP02 在 24 h 时抑菌效果最好,说明宿主菌对该噬菌体没有产生抗性,对于对噬菌体产生抗性的一些细菌,后续可针对其分离特异性噬菌体或组合鸡尾酒噬菌体对其进行抑菌效果的分析,以提高清除率。

因此,未来可从以下几方面提升其应用效果,首先针对不同食品类型开发定制化抑菌方案,其次开发鸡尾酒混合噬菌体组合以拓宽宿主谱并延缓抗性产生,最后通过基因工程改造噬菌体,增强其在复杂食品基质中的存活与吸附能力。

3 结论

本研究从污水中分离到一株烈性噬菌体 ESP02 (GenBank 登录号: PX705505), ESP02 为典型的正二十面体结构,属有尾噬菌体科。生物学特性显示,ESP02 特异性强、潜伏期短,爆发量大、稳定性强、耐热性好。未注释到毒力、抗性、tRNA 相关基因,在生物安全性方面具备良好的基础。能显著抑制食品中大肠杆菌 O157:H7 ATCC 43895 的数量。上述结果表明,ESP02 具有显著的抑菌效果和良好的生物安全性,具备作为食品中防控大肠杆菌 O157:H7 ATCC 43895 的新型生物制剂的潜力。

参考文献

- [1] NORTEY A N, AMU H, SENU E, et al. Knowledge, attitude, and food Safety practices among street food vendors at a metropolitan district in Ghana: A Cross-sectional Study [J]. International Journal of Food Science, 2024, 2024(1): 5553942.
- [2] LEE H, YOON Y. Etiological agents implicated in foodborne illness world wide [J]. Food Science of Animal Resources, 2021, 41(1): 1.
- [3] RIVERA-LOPEZ E O, TIRKO N N, DUDLEY E G. Regulatory landscape and the potential of bacteriophage applications in the United States' food industry [J]. Journal of Food Protection, 2025, 88(6): 100510.
- [4] CHOI D, RYU S, KONG M. Phage-derived proteins: Advancing food safety through biocontrol and detection of foodborne pathogens [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2025, 24(2): e70124.
- [5] 李兆雪, 兰冠达, 范聪聪, 等. 肠出血性大肠埃希菌 O157:H7 噬菌体 FEC14 和 FEC19 特性及污染牛肉杀菌潜在应用探究[J]. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2741-2752.
- [6] OLUWARINDE B O, AJOSE D J, ABOLARINWA T O, et al. Safety properties of Escherichia coli O157: H7 specific bacteriophages:

- Recent advances for Food Safety [J]. *Foods*, 2023, 12(21): 3989.
- [7] JEON H, KIM Y G, LEE J H, et al. Antibiofilm activities of halogenated pyrimidines against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2025, 26(3): 1386.
- [8] 任宇,石慧.赤藓红 B 钠盐与噬菌体偶联对大肠杆菌 O157:H7 的光动力灭活及杀菌机制研究[J].*食品与发酵工业*,2025,51(16):10-19.
- [9] ZHOU Z, CHEN R, LI P, et al. Natural borneol improves cellular uptake of curcumin to enhance its photodynamic bactericidal activity against *Escherichia coli* ATCC 8739 [J]. *Food Microbiology*, 2025, 127: 104686.
- [10] ZHAO X, WU Y, LAN W, et al. Multicolor fluorescent sensors based on a mixture of CdTe quantum dots and ionic liquid for the visual detection of sulfur dioxide residues in food [J]. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 2025, 105(13): 7033-7042.
- [11] POTHINENI B K, PROBST R, KIEFER D, et al. Monitoring phage infection and lysis of surface-immobilized bacteria by QCM-D [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2025, 417(10): 2143-2153.
- [12] 杜芸廷,王生民,张文瑄,等.噬菌体在家禽生产中的应用进展[J].*饲料工业*,2025,46(22):25-30.
- [13] KUMAR A, BARBHUIYA N H, NAIR A M, et al. In-situ fabrication of titanium suboxide-laser induced graphene composites: Removal of organic pollutants and MS2 bacteriophage [J]. *Chemosphere*, 2023, 335: 138988.
- [14] SINGH K, BISWAS A, CHAKRABARTI A K, et al. Phage therapy as a protective tool against pathogenic bacteria: How far we are? [J]. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2023, 24(10): 1277-1290.
- [15] LAANTO E. Overcoming bacteriophage resistance in phage therapy [J]. *Bacteriophages: Methods and Protocols*, 2023: 401-410.
- [16] CHONG Q, FAN Z, MA Y, et al. Broad host range phage LPC-1 reduce the risk of *Listeria monocytogenes* contamination in different food matrices [J]. *Archives of Microbiology*, 2025, 207(7): 155.
- [17] NIAZI S K. Bacteriophage therapy: Discovery, development, and FDA approval pathways [J]. *Pharmaceuticals*, 2025, 18(8): 1115.
- [18] NHUNG T T T, VERMA S, PONNE S, et al. Bacteriophage-based strategies for biocontrol and treatment of infectious diseases [J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2025, 27: 2924-2932.
- [19] SABRI M, EL HANDI K, VALENTINI F, et al. Identification and characterization of *Erwinia* phage IT22: A new bacteriophage-based biocontrol against *Erwinia amylovora* [J]. *Viruses*, 2022, 14(11): 2455.
- [20] 王梓萌,王涓,丁郁,等.一株新型烈性噬菌体 vBYenPWW1 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.
- [21] YAN J, GUO Z, XIE J, et al. Isolation and characterization of *Aeromonas salmonicida* phage TSW001 and its application on large yellow croaker [J]. *Foods*, 2025, 14(12): 2082-2082.
- [22] LI P, LI Z, PENG W, et al. Antimicrobial potential of a novel K5-specific phage and its recombinant strains against *Klebsiella pneumoniae* in milk [J]. *Journal of Dairy Science*, 2025, 108(7): 6788-6802.
- [23] YU M, GAO R, LV X, et al. Inactivation of phage phiX174 by UV254 and free chlorine: Structure impairment and function loss [J]. *Journal of Environmental Management*, 2023, 340: 117962.
- [24] SHAFFER M, HUYNH K, COSTANTINI V, et al. Heat inactivation of aqueous viable norovirus and MS2 bacteriophage [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2024, 135(2): 1xae033.
- [25] 周军,黄俊清,杜婷婷,等.1 株沙门氏菌噬菌体的分离鉴定及其抑菌效果研究[J].*轻工学报*,2026,41(1):59-68.
- [26] HUANG Z, YUAN X, ZHU Z, et al. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* bacteriophage DZ1 and its application in foods [J]. *Food Chemistry*, 2024, 431: 137128.
- [27] 刘敏,齐海涛,袁辉,等.厦门希瓦氏菌噬菌体的分离、表征和应用研究[J].*动物医学进展*,2025,46(2):47-53.
- [28] NG R N, GREY L J, VAITEKENAS A, et al. Development and validation of a miniaturized bacteriophage host range screening assay against antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2021, 190: 106346.
- [29] TAN S, CHEN H, HUANG S, et al. Characterization of the novel phage vB_BceP_LY3 and its potential role in controlling *Bacillus cereus* in milk and rice [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2024, 421: 110778.
- [30] LIU T, ZHANG W, LI D, et al. Isolation and characterization of *Salmonella* Typhimurium monophasic variant phage and its application in foods [J]. *Food Research International*, 2025, 203: 115852.
- [31] 潘顺圆,陈麒百,王宏月,等.耐多药奇异变形杆菌噬菌体生物学特性分析及其对鸡胸肉抑菌作用[J].*食品科学*,2025,46(6):89-97.
- [32] 陈坤,王成森,钱淼,等.一株新的防治大肠杆菌 O157:H7 的烈性噬菌体特性及其应用研究[J].*食品科技*,2025,50(9):28-35.
- [33] LU Z. Efficacy of *Escherichia coli* O157:H7 phage Φ241 in model food systems [J]. *Applied Microbiology*, 2025, 5(3): 87-87.

-
- [34] HOU FP, TANG JR, HUANG J, et al. Isolation, characterization and application of a novel polyvalent bacteriophage SF02 for the control of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in foods [J]. LWT, 2024, 203: 116383.
- [35] HUI-ZHEN Z, MEI S, WEN-YU Y, et al. Isolation and characterization of a novel *Salmonella* bacteriophage JNwz02 capable of lysing *Escherichia coli* O157:H7 and its antibacterial application in foods [J]. LWT, 2023, 173: 114251.