

阪崎克罗诺杆菌噬菌体 JC01 的筛选和特性

刘丹丹^{#1}, 兰冠达^{#1}, 蒋洁², 李菁华¹, 黄红兰¹, 赵春燕^{*1}

1 吉林大学基础医学院病原生物学系, 吉林 长春 130021

2 广西壮族自治区人民医院(广西医学科学院)检验科, 广西 南宁 530021

刘丹丹, 兰冠达, 蒋洁, 李菁华, 黄红兰, 赵春燕. 阪崎克罗诺杆菌噬菌体 JC01 的筛选和特性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(12): 5475-5486.

LIU Dandan, LAN Guanda, JIANG Jie, LI Jinghua, HUANG Honglan, ZHAO Chunyan. Isolation and characterization of bacteriophage JC01 against *Cronobacter sakazakii*[J]. Microbiology China, 2023, 50(12): 5475-5486.

摘要:【背景】阪崎克罗诺杆菌是一种食源性病原体, 摄入受污染的婴儿配方奶粉(powdered infant formula, PIF)常引起新生儿坏死性小肠结肠炎和脑膜炎, 对早产儿和免疫功能低下的婴儿健康甚至生命产生严重威胁。噬菌体具有特异性杀菌性, 可成为一种新型生物防控制剂预防阪崎克罗诺杆菌和其他食源性致病菌的污染。【目的】从污水中分离出感染阪崎克罗诺杆菌噬菌体, 评价其生物学特性、基因组生物信息及在婴儿配方奶粉中杀菌作用。【方法】采用双层琼脂法分离鉴定噬菌体, 并测定其酸碱稳定性、温度稳定性、宿主范围和一步生长曲线, 透射电镜观察形态, 对其基因组进行二代测序和裂解功效测定。【结果】从污水中分离到一株新的能裂解阪崎克罗诺杆菌的噬菌体 JC01, 具有二十面立体对称头部和非收缩的长尾, 噬菌体 JC01 基因组为双链 DNA, 由 61 736 bp 组成, 预测有 76 个开放阅读框(open reading frame, ORF), 不含有 tRNA, 基因组中不含有耐药基因和毒力基因。系统发育分析及基因比对分析显示噬菌体 JC01 是全新的噬菌体, 归类于有尾噬菌体纲(Caudoviricetes) 卡金斯病毒科(Casjensviridae)雅昆病毒属(Jacunavirus), 被命名为 Jacunavirus 01。噬菌体 JC01 在不同温度(-20–40 °C)和 pH 5.0–9.0 范围内稳定, 且对婴儿配方奶粉污染的阪崎克罗诺杆菌具有良好的杀菌效果。【结论】JC01 噬菌体是裂解阪崎克罗诺杆菌的新噬菌体, 作为生物安全防控制剂在食品生产和加工方面具有很大潜力。

关键词: 阪崎克罗诺杆菌; 噬菌体; 基因组分析; 食品安全

资助项目: 吉林省科技厅国际合作项目(20210402023GH)

[#]对本文贡献相同

This work was supported by the International Cooperation Project from Jilin Provincial Science and Technology Department (20210402023GH).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: zhaocy@jlu.edu.cn

Received: 2023-04-14; Accepted: 2023-08-04; Published online: 2023-09-05

Isolation and characterization of bacteriophage JC01 against *Cronobacter sakazakii*

LIU Dandan^{#1}, LAN Guanda^{#1}, JIANG Jie², LI Jinghua¹, HUANG Honglan¹, ZHAO Chunyan^{*1}

1 Department of Pathogen Biology, College of Basic Medical Science, Jilin University, Changchun 130021, Jilin, China

2 Department of Laboratory Medicine, The People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region (Guangxi Academy of Medical Sciences), Nanning 530021, Guangxi, China

Abstract: [Background] *Cronobacter sakazakii* is an emerging food-borne pathogen. The powdered infant formula (PIF) contaminated by this pathogen may cause necrotizing enterocolitis and meningitis in infants, threatening the life of premature or immunocompromised infants. Bacteriophages are well recognized for their antibacterial properties and may be novel biocontrol agents for *C. sakazakii* and other food-borne pathogenic bacteria. [Objective] To characterize a novel *C. sakazakii* bacteriophage isolated from sewage and evaluate its antibacterial effects in PIF. [Methods] The double-layer agar method was used to isolate phages, and then the pH stability, thermal stability, host range, one-step growth curve of the isolate were determined. The phage morphology was observed by transmission electron microscopy. Next-generation sequencing was performed for the genome of the phage, and the lysis efficiency was evaluated. [Results] A novel bacteriophage JC01 against *C. sakazakii* was isolated from sewage. The phage had an icosahedral head and a long non-contractile tail. The genome of JC01 was 61 736 bp in length, containing 76 the open reading frames (ORF) and no drug-resistance gene, virulence gene or tRNA. The phylogenetic analysis and genome comparison indicated that JC01 was a novel phage belonging to the genus Jacunavirus, the class Casjensviridae of the order Caudoviricetes, and its was named as Jacunavirus JC01. The phage was stable at -20 to 40 °C and pH 5.0-9.0 and capable of lysing *C. sakazakii* in the contaminated PIF. [Conclusion] JC01 appears to be a novel phage against *C. sakazakii*, and it might be an alternative biocontrol agent for *C. sakazakii* contamination in food processing and production environments.

Keywords: *Cronobacter sakazakii*; bacteriophages; genome analysis; food safety

阪崎克罗诺杆菌(*Cronobacter sakazakii*)以前被称为阪崎肠杆菌,于1980年首次分离^[1],是肠杆菌科的机会致病菌^[2],广泛存在于居住环境、植物(包括蔬菜、水果、谷物、小麦和草药等)、饮用水及土壤等自然环境中,婴儿配方奶粉、谷物食品污染中最常见^[3]。新生儿感染阪崎克罗诺杆菌主要通过摄入污染的奶粉引起,临床表现为脑膜炎、败血症和坏死性小肠结肠炎,死亡率高达40%-80%,并可造成神经发育障碍、脑积水和永久性神经损

伤等并发症^[4]。2011年,墨西哥克雷塔罗州的一家医院报告了新生儿食用阪崎克罗诺杆菌污染的婴儿配方奶粉后出现出血性腹泻^[5]。在美国,每10万名婴儿中就有1名感染阪崎克罗诺杆菌,每10万名低体重新生儿中有8.7名感染^[6],每10660名极低体重新生儿中有1名阪崎克罗诺杆菌感染^[7]。美国、法国和荷兰等国家都曾发生因婴儿配方奶粉受阪崎克罗诺杆菌污染被召回事件^[8-9]。我国曾在甘肃省和广州、成都婴幼儿配方奶粉中检出阪

崎克罗诺杆菌, 检出率为 4.41%–6.31% 不等^[10-12]。张强等^[13]对陕西省 366 份市售婴儿配方乳粉和米粉等食品进行检测, 发现阪崎克罗诺杆菌检出率为 23.8%, 以上调查表明我国婴儿配方奶粉存在食品安全隐患。联合国粮食及农业组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) 和世界卫生组织(World Health Organization, WHO) 于 2004 年经过风险性评估, 将阪崎克罗诺杆菌列为婴儿配方奶粉的 A 类致病菌之一。

噬菌体早期研究曾用于临床治疗并取得了积极的成果, 但随着抗生素的问世, 噬菌体应用的研究很快被摒弃, 直到近些年来, 由于抗生素滥用导致“超级细菌”的出现, 农业的灭菌方法也急需升级换代, 噬菌体又重新受到关注, 人们又一次开始把研究工作放在了噬菌体应用上, 包括缓解临床上日趋严重的耐药问题^[14]、工业上清理净化废弃污水^[15]、农业上作为农作物杀菌制剂和食品安全防控制剂等^[16]。抗生素和消毒剂的应用虽然可以有效地杀死微生物, 但用于食品、肉类加工的消毒同样会造成安全问题。2006 年, 美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration, FDA) 批准使用纯化的噬菌体 ListShieldet 用于控制即食食品和家禽产品中产单核细胞李斯特菌的噬菌体制剂^[17]。由于噬菌体是一种以细菌为宿主并选择性裂解靶细菌的病毒, 所以噬菌体在食品安全防控方面具有很大的应用潜力^[18]。

本研究从污水中分离出感染阪崎克罗诺杆菌的噬菌体, 对噬菌体生物学及基因组生物信息学进行分析, 并检测在婴儿配方奶粉中的杀菌作用, 以期噬菌体可作为生物防控剂用于食品加工生产控制阪崎克罗诺杆菌的污染提供依据。

1 材料与方法

1.1 宿主菌来源及保藏

阪崎克罗诺杆菌 CZ-1801、CZ-1802、

CZ-1803 和 CZ-1804 从奶粉中分离^[19], 由吉林大学基础医学院病原生物学系保存, 作为宿主菌用于噬菌体的筛选。污水样品来自吉林大学第一医院和吉林大学第三医院的污水处理中心。用于测定宿主范围的肠炎沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌由吉林大学基础医学院病原生物学系保存^[20]。

1.2 培养基和主要试剂、仪器

LB 液体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 5.0, 氯化钠 10.0; LB 半固体培养基: LB 液体培养基, 琼脂粉 5 g/L; LB 营养琼脂培养基: LB 液体培养基, 琼脂粉 15 g/L^[21], 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。PEG800, 北京康为世纪生物科技有限公司; SM 缓冲液(sodium chloride-magnesium sulfate buffer) (50 mmol/L pH 7.5 Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L MgSO₄), 北京雷根生物技术有限公司。离心机, 无锡市瑞江分析仪器有限公司; 细菌恒温培养箱, 力晨科技有限公司; 透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM), 日本电子株式会社; pH 仪和电子天平, 上海仪电科学仪器股份有限公司; 超净工作台, 上海博讯实业有限公司。

1.3 噬菌体的分离和鉴定

将 100 mL 污水和 100 mL LB 液体培养基与处于对数生长期(OD_{600} 约为 0.2) 的 4 株阪崎克罗诺杆菌菌悬液混合, 37 °C、160 r/min 培养过夜, 次日用 0.22 μ m 一次性过滤器过滤, 所得溶液为噬菌体初提液。再取 100 μ L 噬菌体初提液与 300 μ L 对数生长期宿主菌液(OD_{600} 约为 0.2) 混合, 37 °C、160 r/min 培养 5 min 后加入到 5 mL LB 半固体培养基中, 采用双层平板法倾注在固体培养基表面, 37 °C 培养过夜, 次日观察噬菌斑形成情况。通过 3 次连续单个噬斑分离得到纯化的噬菌体。

1.4 噬菌体颗粒电镜形态观察

采用负染法处理纯化的噬菌体颗粒, 使用透射

电子显微镜 80 kV 电压观察形态。在 20 μL 噬菌体颗粒中滴入 1 滴 2% 磷钨酸染色 1 min。在成像视野中选取 5 个独立的噬菌体计算噬菌体的大小。

1.5 宿主范围测定

采用空斑试验确定所分离噬菌体的宿主范围。将 21 株不同的宿主菌包括阪崎克罗诺杆菌、肠炎沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌分别与 50 $^{\circ}\text{C}$ LB 半固体培养基混合制成双层平板。采用悬滴法滴入 5 μL 噬菌体液并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜，观察裂解区的状态。噬菌体的裂解活性分为裂解(+)和不裂解(-)。

1.6 测定一步生长曲线

将 5 mL 对数生长期(OD_{600} 约为 0.2)宿主菌 10 000 r/min 离心 1 min，用 5 mL LB 培养基重悬沉淀。将噬菌体溶液以感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 0.01 加入菌悬浮液中。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育，每间隔 10 min 直至 90 min 取样测定溶液中的噬菌体浓度，该试验重复 3 次。暴发量=暴发末期噬菌体滴度/反应初期细菌浓度，单位为 PFU/cell。

1.7 测定噬菌体对温度和酸碱的稳定性

将 1 mL 噬菌体悬液(10^8 PFU/mL)分别置于 -20、4、25、37、40、50、60、70 和 80 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h，分别收集 100 μL 噬菌体悬液，10 倍比稀释测定噬菌体滴度。为了测定不同 pH 值水平下的稳定性，将 LB 培养基的 pH 值调整到 3.0-12.0。取 100 μL 噬菌体悬液(10^8 PFU/mL)分别接种到 1 mL 不同 pH 值的 LB 培养基中，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后 10 倍比稀释测定噬菌体滴度。从而得出不同时间和不同 pH 孵育 1 h 噬菌体的存活率，噬菌体存活率=1 h 后噬菌体滴度/噬菌体初滴度^[22]。试验重复 3 次。

1.8 噬菌体的全基因组测序及分析

将 DNA 样本送至上海欧易生物医学科技有

限公司进行 Illumina HiSeq 测序，对生成的数据进行处理及质控，使用 SOAP denovo 进行基因组组装拼接。使用在线网站 GLIMMER 和 GenmarkS 进行开放阅读框架(open reading frame, ORF)预测，使用 BLAST 对噬菌体预测基因进行检索，注释其功能；用 Proksee 绘制噬菌体基因组注释图谱。运用 CARD 数据库(comprehensive antibiotic resistance database, <https://card.mcmaster.ca/>)检测是否有耐药基因，运用 VFDB 数据库(virulence factor database)检测是否有毒力基因。利用 CoreGenes 3.5 和 Easyfig 2.2.3 在蛋白水平、DNA 水平对噬菌体 JC01 与其他噬菌体进行比较分析。

1.9 噬菌体进化分析

基于噬菌体保守蛋白末端酶大亚基氨基酸序列，使用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树，进行种属进化关系分析。

1.10 噬菌体在婴儿重组配方奶粉中杀菌效力的测定

按照婴儿配方奶粉说明书用无菌水制备 4 份相同浓度的液态牛奶，分别在每份液体奶中加入对数生长期宿主菌悬液(OD_{600} 约为 0.2)至终浓度为 1×10^4 CFU/mL，再在其中 2 份中加入 1×10^8 PFU/mL 噬菌体 100 μL 作为试验组，另外 2 份加等量无菌水作为对照^[23]。将试验组、对照组分别置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 和 25 $^{\circ}\text{C}$ ，每 2 h 分别测宿主菌的存活数量(CFU/mL)。试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 形态分析

从污水中分离到一株能特异裂解阪崎克罗诺杆菌 CZ-1801 的噬菌体 JC01，噬斑清晰，透亮，圆形，无晕环，直径约为 1-2 mm (图 1)。用透射电子显微镜检测纯化后的噬菌体形态，结果显示头部为二十面体对称，直径为(56 \pm 4) nm，非收缩尾长度为(219 \pm 7) nm (图 2)。



图 1 噬菌体 JC01 形成的噬斑

Figure 1 Phage plaque formed by bacteriophage JC01.

2.2 宿主谱范围

21 株宿主菌由 4 株阪崎克罗诺杆菌、4 株肠炎沙门菌、4 株鼠伤寒沙门菌、4 株肺炎克雷伯菌、4 株大肠埃希菌和 1 株金黄色葡萄球菌组成。结果如表 1 显示, JC01 裂解阪崎克罗诺杆菌 cz-1801 和 cz-1804, 对其他菌株均无裂解性。

表 1 噬菌体 JC01 宿主菌范围

Table 1 The host range of bacteriophage JC01

编号 No.	菌株名称 Strain name	噬菌体 JC01 裂解性 Bacteriophage JC01 lytic ability
1	<i>Cronobacter Sakazakii</i> cz-1801	+
2	<i>Cronobacter Sakazakii</i> cz-1802	-
3	<i>Cronobacter Sakazakii</i> cz-1803	-
4	<i>Cronobacter Sakazakii</i> cz-1804	+
5	<i>Salmonella enteritidis</i> 21	-
6	<i>Salmonella enteritidis</i> 54	-
7	<i>Salmonella enteritidis</i> 57	-
8	<i>Salmonella enteritidis</i> 98	-
9	<i>Salmonella typhimurium</i> 121	-
10	<i>Salmonella typhimurium</i> 242	-
11	<i>Salmonella typhimurium</i> 251	-
12	<i>Salmonella typhimurium</i> 338	-
13	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 128	-
14	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 129	-
15	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 138	-
16	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 142	-
17	<i>Escherichia coli</i> ATCC23716	-
18	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	-
19	<i>Escherichia coli</i> O26:H11	-
20	<i>Escherichia coli</i> O46:H38	-
21	<i>Staphylococcus aureus</i>	-

+: 裂解; -: 不裂解

+: Lysis; -: No lysis.

2.3 噬菌体 JC01 的一步生长曲线

将计时取的样品进行 10 倍比稀释, 采用双层琼脂法对噬斑进行计数并绘制一步生长曲线。从图 3 可知, 噬菌体 JC01 的潜伏期较短, 为 20 min, 暴发期为 40 min, 平均暴发量为 333 PFU/cell。

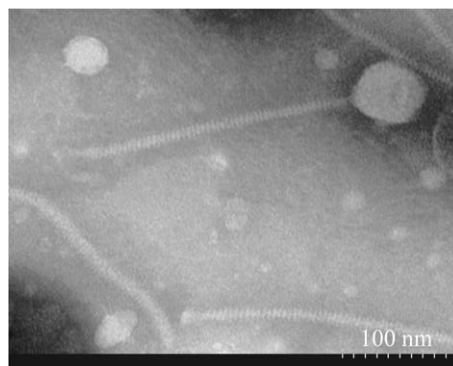


图 2 噬菌体 JC01 透射电镜形态图

Figure 2 Transmission electron microscopy images of bacteriophage JC01.

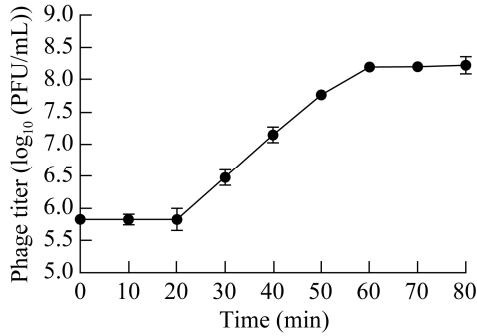


图3 噬菌体 JC01 的一步生长曲线

Figure 3 One-step growth curve of bacteriophage JC01.

2.4 噬菌体 JC01 对温度和酸碱度的稳定性

从图4可见,噬菌体 JC01 在-20、4、25、37和40 °C 保持活性,维持在起始水平,在50 °C 时其感染性稍微下降,在60 °C 时活性持续下降,70 °C 及以上温度噬菌体失活。从图5可知,在不同 pH 环境下作用1 h 后噬菌体 JC01 活力具有不同的变化,在 pH 5.0-9.0 条件下仍保持较高的存活率,在 pH 4.0 或 pH 10.0 时噬菌体存活率明显下降,在 pH 11.0 时虽然仍可检测到,但噬菌体存活率极低,而在 pH < 4.0 或 pH > 11.0 时噬菌体存活率为0,几乎检测不到存活的噬菌体。

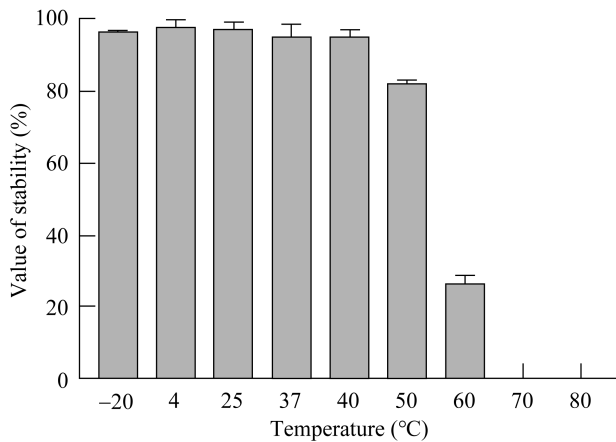


图4 噬菌体 JC01 热稳定性测定

Figure 4 Thermal stability of bacteriophage JC01.

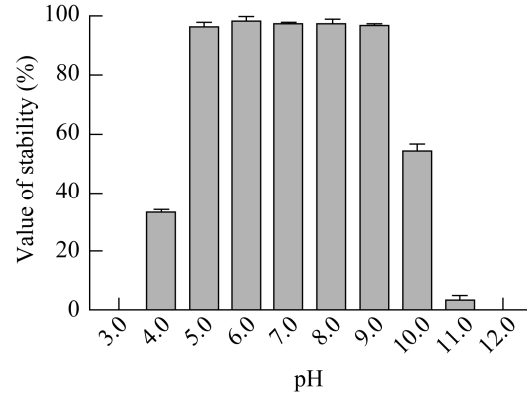


图5 噬菌体 JC01 酸碱稳定性测定

Figure 5 pH stability of bacteriophage JC01.

2.5 基因预测及功能注释

噬菌体 JC01 的全基因组序列已上传 GenBank 数据库(登录号为 MT330372)。噬菌体 JC01 基因组全长 61 736 bp, GC 含量为 58.9%, 预测编码 76 个 ORF, 无 tRNA。在 76 个 ORF 中有 26 个为功能蛋白, 其余均推定为假定蛋白。76 个 ORF 中 74 个以 ATG 作为起始密码子, 仅 2 个以 GTG 作为起始密码子。噬菌体 JC01 的编码蛋白功能分为五类: DNA 代谢蛋白、包装蛋白、结构蛋白、宿主裂解模块及其他(假定蛋白)模块, 具体见图 6。基因组中未发现耐药基因和毒力基因, 也未见整合酶, 进一步确定噬菌体 JC01 为裂解性噬菌体。

2.6 系统发育分析

为了深入了解 JC01 的分类, 使用 MEGA 7.0 对保守蛋白末端酶大亚基氨基酸序列绘制系统发育树。图 7 进化关系表明, 噬菌体 JC01 是一个独立分支, 根据国际病毒命名委员会 (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) 分类规则, 噬菌体 JC01 属于有尾噬菌体纲 (Caudoviricetes) 卡金斯病毒科 (Casjensviridae) 雅昆病毒属 (Jacunavirus), 2023 年被命名为 *Jacunavirus 01* (<https://ictv.global/taxonomy>), 而且是该属唯一噬菌体。

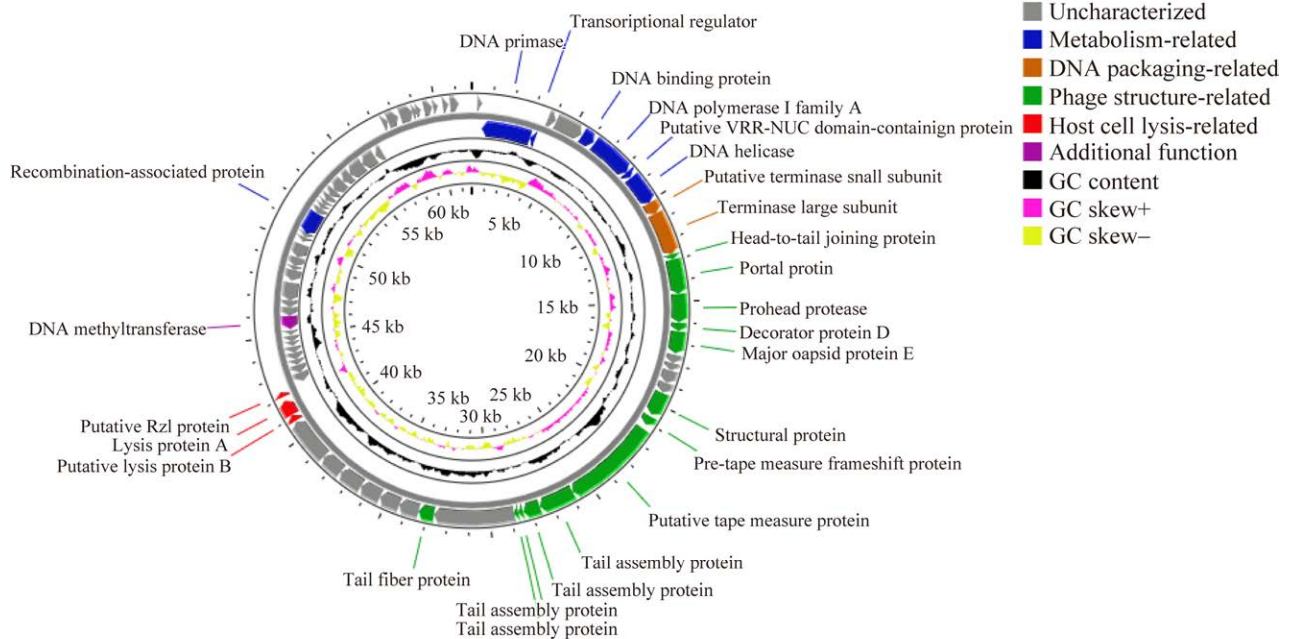


图 6 噬菌体 JC01 基因组注释图谱

Figure 6 Genome annotation map of bacteriophage JC01.

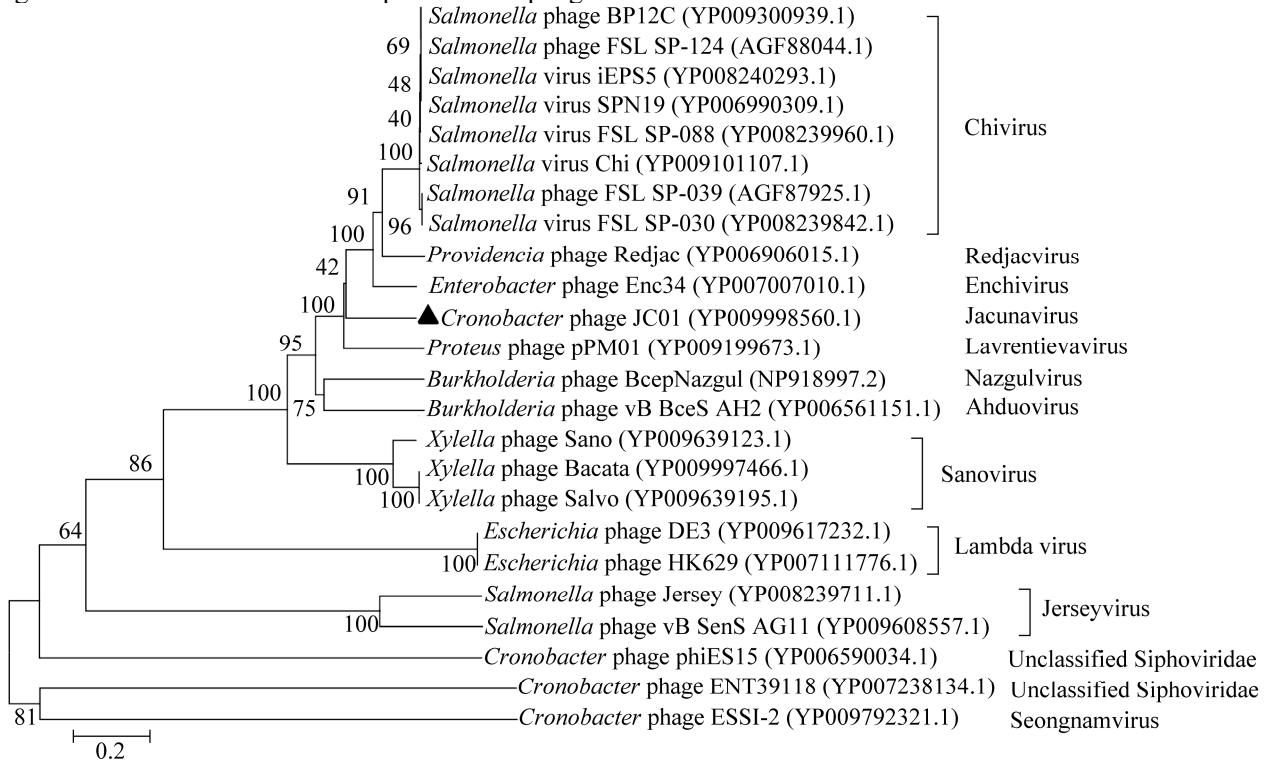


图 7 噬菌体 JC01 和其他噬菌体基于末端酶大亚基氨基酸序列构建的系统发育树 标尺代表由序列差异表现的分支长度; 节点处的数字代表自展值; 括号内的编号是各基因序列的 GenBank 登录号

Figure 7 Phylogenetic tree constructed by the bacteriophage JC01 and other phages based on the amino acid sequence of the terminase large subunit. The scale bar shows the branch length represented by sequence differences; Numbers at the node represent the Bootstrap values; Numbers in parenthesis are the GenBank accession number of each gene sequence.

2.7 噬菌体 JC01 比较基因组学分析

根据 NCBI 核苷酸(nucleotide collection, NT)数据库 BLASTn 测定, 噬菌体 JC01 的基因组与沙门氏菌噬菌体 FSL SP-124 (KC139515.1)、沙门氏菌噬菌体 iEPS5 (KC677662.1)、沙门氏菌噬菌体 SPN19 (JN871591.1)和沙门氏菌噬菌体 FSL SP-088 (KC139512.1)的相似性较高, 达到 73%以上。

在蛋白水平上, 噬菌体 JC01 与沙门氏菌噬菌体 Chi (NC_025442)、肠杆菌噬菌体 Enc34 (NC_019524)具有 49 个同系物, 编码相同功能蛋白>40%, 结构模块中显示了 3 个噬菌体基因组的共线性, 如尾部和衣壳蛋白(图 8)。一些功能蛋白, 如 JC01 的 ORF36 其功能推定为裂解蛋白与沙门氏菌噬菌体 Chi 的 ORF39 和肠杆菌噬菌体 Enc34 的 ORF39 功能相同。

在 JC01 中, 发现 4 种噬菌体尾部组装蛋白 gp24、gp25、gp26、gp27 和一种尾丝蛋白 gp29。gp29 与噬菌体 Chi、噬菌体 Enc34 的相

似性分别为 59.76%、58.87%。此外, 噬菌体 JC01 的 gp24 蛋白与两种噬菌体的相应蛋白相似性在 50%左右, gp25 蛋白与二者相应蛋白序列相似性在 60%左右。总而言之, 噬菌体 JC01 与噬菌体 Chi、噬菌体 Enc34 存在一定的差异性(表 2), 进一步表明噬菌体 JC01 是新的噬菌体。

2.8 噬菌体 JC01 对婴儿配方奶粉中 (powdered infant formula, PIF)污染菌阪崎克罗诺杆菌的杀菌作用

从图 9A 可知, 在 4 °C 条件下, 试验组的阪崎克罗诺杆菌在 6 h 内减少 2.8 log₁₀ (CFU/mL), 在 6–12 h 减少不明显, 对照组细菌增长缓慢。从图 9B 可知, 25 °C 时试验组在 4 h 之内细菌数量明显减少, 最高减少 5.3 log₁₀ (CFU/mL), 对照组在 8 h 内呈现指数级增长, 之后进入平台期, 在细菌生长进入平台期后试验组噬菌体仍有裂解作用。总而言之, 在婴儿配方奶粉中噬菌体 JC01 具有很好的杀菌效果。

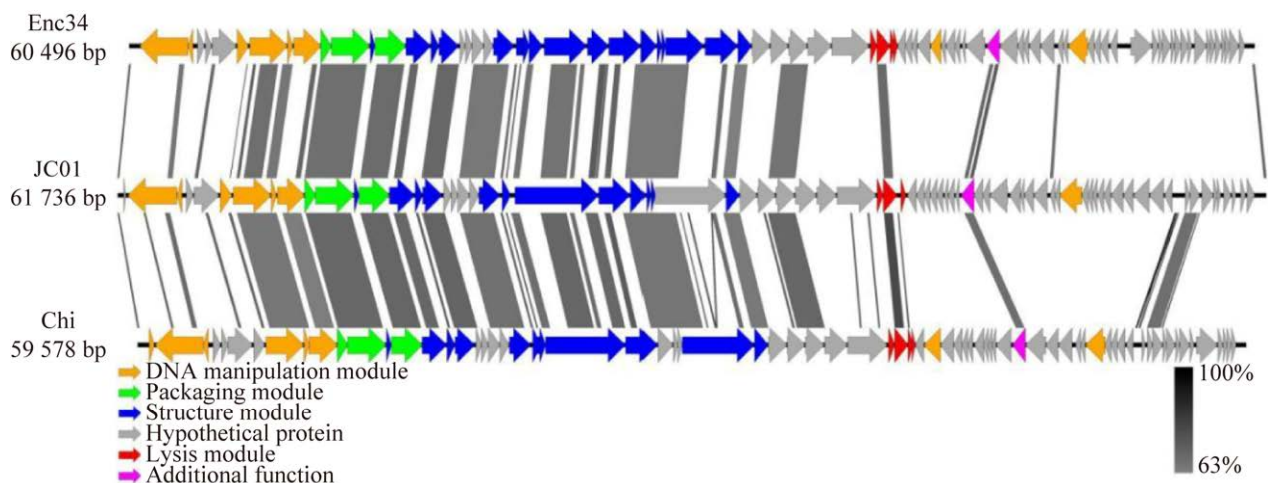


图 8 噬菌体 JC01 和沙门氏菌噬菌体 Chi、肠杆菌噬菌体 Enc34 的基因共线性分析

Figure 8 Gene collinearity analysis of bacteriophage JC01, *Salmonella* phage Chi, and *Enterobacter* phage Enc34.

表 2 噬菌体 JC01 与沙门氏菌噬菌体 Chi、肠杆菌噬菌体 Enc34 尾部组装蛋白、尾丝蛋白相似度
Table 2 Similarity of bacteriophage JC01 compared with *Salmonella* phage Chi and *Enterobacter* phage Enc 34 tail assembly protein and tail filament protein

Bacteriophage JC01		<i>Salmonella</i> phage Chi			<i>Enterobacter</i> phage Enc34				
Accession	Product	Accession	Product	E-value	Identity (%)	Accession	Product	E-value	Identity (%)
QJI52243.1	Tail assembly protein (gp24)	YP_008058183.1	Hypothetical protein	0	49.38	YP_007007025.1	Tail assembly protein	0	50.97
QJI52244.1	Tail assembly protein (gp25)	YP_008058184.1	Tail assembly protein	5.00E-127	63.97	YP_007007026.1	Tail assembly protein	2.00E-128	62.73
QJI52245.1	Tail assembly protein (gp26)	-	-	-	-	YP_007007027.1	Tail assembly protein	5.00E-25	67.65
QJI52246.1	Tail assembly protein (gp27)	-	-	-	-	YP_007007028.1	Tail assembly protein	1.00E-23	60.56
QJI52248.1	Tail fiber protein (gp29)	YP_009101126.1	Tail fiber protein	2.00E-94	59.76	YP_007007031.1	Tail fiber protein	1.00E-91	58.87

-: No data.

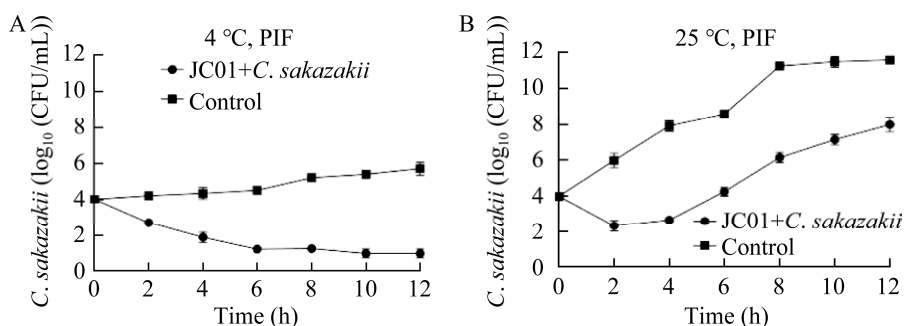


图 9 不同温度条件下噬菌体 JC01 在婴儿配方奶粉中的裂解曲线

Figure 9 Lysis curve of bacteriophage JC01 in infant formula at different temperatures.

3 讨论与结论

婴儿配方奶粉在生产过程中很容易受到阪崎克罗诺杆菌污染,虽然奶粉主要原料牛奶可以通过巴氏消毒达到无菌,但是奶粉中的其他添加剂,特别是来自于谷物的添加剂很容易受阪崎克罗诺杆菌污染。另外,生产奶粉所用的容器、设备并非无菌,也可能造成奶粉的污染。而且,阪崎克罗诺杆菌在自然环境中显示出极强的耐干燥能力、渗透压抗性环境抗性,可以在食品或者多种材料表面形成生物膜,这种生物膜可以抵抗干燥、抗生素及消毒剂等不利条件,进而造

成该菌在生产环境中长期持续性存在,这些特性是该菌在食品加工环节传播并且成为潜在污染源的重要原因^[24]。

热灭活可能是从生物和非生物表面去除阪崎克罗诺杆菌的一种有效方法。高温可用于婴儿配方奶粉生产、制造和制备等相关重要设备表面的灭菌消毒。研究表明要完全灭活阪崎克罗诺杆菌的耐热菌株,需要 70 °C 或更高温度,这种高温可能导致婴儿配方奶粉营养损失及口感发生变化^[25]。噬菌体因其固有的控制食品和食品相关环境中病原体的能力而得到认可,而且在食品生产过程中各个环节,如原料的采集加工、生产

设备容器、生产和贮存环境等都可以使用噬菌体作为杀菌剂^[23],目前有多种噬菌体制剂被批准用于控制食源性致病菌的污染^[26],但尚无控制阪崎克罗诺杆菌的噬菌体制剂。

噬菌体在自然界中大约有 10^{30} – 10^{32} 种,是细菌的 10 倍^[27],但近半个世纪以来,共鉴定和分析研究了约 5 100 多个噬菌体,在 NCBI 数据库中仅可以检索到 2 000 多个完整的噬菌体基因组数据^[28-29],所以有必要继续分离鉴定新的噬菌体,并对其基因组进行测序和深入分析,从而扩大对噬菌体多样性和进化关系的认识,为将来噬菌体应用提供大量原材料。

本研究从污水分离到的阪崎克罗诺杆菌噬菌体 JC01,根据其透射电镜形态及进化分析表明是一株新的噬菌体,国际病毒分类委员会归类为有尾噬菌体纲(Caudoviricetes)卡金斯病毒科(Casjensviridae)雅昆病毒属(Jacunavirus),命名为 Jacunavirus 01,而且是一株全新的噬菌体。噬菌体 JC01 宿主谱窄,只能裂解阪崎克罗诺杆菌 CZ-1801、CZ-1804。噬菌体的一步生长曲线可以反映其裂解能力,噬菌体 JC01 属于潜伏期较短(20 min)、暴发期适中(40 min)、暴发量大(333 PFU/cell)的噬菌体,这表明噬菌体 JC01 具有较高的繁殖活性,在短时间内完成裂解过程,且在较短时间内杀灭更多的阪崎克罗诺杆菌,因而可快速地应用于实际生产。噬菌体的活性很容易受到各种理化条件的影响,因此摸索与评估它在体外环境的适应条件(如 pH、温度)是后期生物防治应用的基础^[30]。噬菌体 JC01 在温度 -20 – 40 °C 和 pH 5.0–9.0 范围内保持活性稳定,提示噬菌体 JC01 具有较宽的酸碱度和温度适用范围,能在奶粉生产环境中生存,作为生物防控剂可控制阪崎克罗诺杆菌的污染。

通过基因组对比分析,噬菌体 JC01 在基因组大小、基因结构和 GC 含量方面与沙门氏菌噬

菌体 Chi、肠杆菌噬菌体 Enc34 等噬菌体非常相似,都归属于 Casjensviridae 科,所以它们具有很强的同源性,但是它们的尾部组装蛋白和尾丝蛋白不尽相同,有尾噬菌体通过其尾部特有的结合蛋白与宿主菌表面的受体发生特异性结合,噬菌体这一特殊的吸附机制决定了其宿主的特异性,沙门氏菌噬菌体 Chi 常见的宿主菌表面受体为鞭毛,噬菌体吸附宿主菌鞭毛后,沿鞭毛到达宿主菌体表面,其尾部末端释放溶菌酶消化细胞壁肽聚糖层,然后将头部遗传物质注射到宿主菌胞内,从而利用宿主合成自身核酸和蛋白质^[31],尾丝蛋白和尾部组装蛋白的低相似性可能是引起噬菌体间宿主范围巨大差异的原因。对阪崎克罗诺杆菌污染的婴儿配方奶粉的裂解效果表明,噬菌体 JC01 在 4 °C 和 25 °C 条件下 6 h 内可以有效抑制婴儿配方奶粉中的细菌。Endersen 等^[23]也从环境中分离到 3 株裂解阪崎克罗诺杆菌的噬菌体,用噬菌体鸡尾酒法将 4 种不同品牌奶粉中阪崎克罗诺杆菌在 5 h 内从 3×10^4 CFU/mL 降低到检出限以下(<10 CFU/mL),并能控制生物膜的形成。噬菌体 JC01 基因组中不含有毒力基因和耐药基因,用于奶粉加工预防阪崎克罗诺杆菌污染是安全有效的,因此,作为一种生物防治剂,噬菌体 JC01 在食品加工行业具有很强的应用潜力。

REFERENCES

- [1] FARMER JJ, ASBURY MA, HICKMAN FW, BRENNER DJ, STUDY GROUP TE. *Enterobacter sakazakii*: a new species of “*Enterobacteriaceae*” isolated from clinical specimens[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1981, 31(1): 109.
- [2] OSAILI TM, SHAKER RR, AYYASH MM, AL-NABULSI AA, FORSYTHE SJ. Survival and growth of *Cronobacter* species (*Enterobacter sakazakii*) in wheat-based infant follow-on formulas[J]. Letters in Applied Microbiology, 2009, 48(4): 408-412.
- [3] FORSYTHE SJ. *Enterobacter sakazakii* and other

- bacteria in powdered infant milk formula[J]. *Maternal and Child Nutrition*, 2005, 1(1): 44-50.
- [4] FRIEDEMANN M. Epidemiology of invasive neonatal *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) infections[J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2009, 28(11): 1297-1304.
- [5] PARRA-FLORES J, AGUIRRE J, JUNEJA V, JACKSON EE, CRUZ-CÓRDOVA A, SILVA-SANCHEZ J, FORSYTHE S. Virulence and antibiotic resistance profiles of *Cronobacter sakazakii* and *Enterobacter* spp. involved in the diarrheic hemorrhagic outbreak in Mexico[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2206.
- [6] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula: Tennessee[J]. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2001, 51(14): 297-300.
- [7] STOLL B, HANSEN N, FANAROFF A, LEMONS J. *Enterobacter sakazakii* is a rare cause of neonatal septicemia or meningitis in VLBW infants[J]. *The Journal of Pediatrics*, 2004, 144(6): 821-823.
- [8] 李美英, 周博雅, 林亚青, 赵洪静, 张晓娜. 荷兰婴儿配方乳粉阪崎肠杆菌污染事件的警示[J]. *中国乳品工业*, 2018, 46(7): 28-32.
LI MY, ZHOU BY, LIN YQ, ZHAO HJ, ZHANG XN. Thinking on the event of infant formulas from the Netherlands contaminated by *Enterobacter sakazakii*[J]. *China Dairy Industry*, 2018, 46(7): 28-32 (in Chinese).
- [9] 李贞, 杨保伟, 夏效东, 王新, 席美丽. 婴儿配方乳粉中阪崎克罗诺杆菌的研究进展[J]. *中国乳品工业*, 2015, 43(7): 35-41.
LI Z, YANG BW, XIA XD, WANG X, XI ML. Progress on *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula[J]. *China Dairy Industry*, 2015, 43(7): 35-41 (in Chinese).
- [10] 黎明, 黄剑屏, 黄薇. 成都市市售国产婴幼儿配方奶粉中阪崎肠杆菌污染情况调查[J]. *卫生研究*, 2009, 38(2): 158-159.
LI M, HUANG JP, HUANG W. Investigation on contamination of *Enterobacter sakazakii* in domestic infant formula milk powder in Chengdu[J]. *Journal of Health Research*, 2009, 38(2): 158-159 (in Chinese).
- [11] 张欣强, 庞杏林, 刘俊华, 张键, 邓志爱, 李孝权. 广州市售国产婴幼儿配方粉中阪崎肠杆菌污染调查[J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, 20(1): 183-185.
ZHANG XQ, PANG XL, LIU JH, ZHANG J, DENG ZA, LI XQ. Survey on contamination by *Enterobacter sakazakii* in infant formula made in China on Guangzhou market[J]. *China Industrial Economics*, 2010, 20(1): 183-185 (in Chinese).
- [12] 权玉玲, 胡晓宁, 兰光, 申艳琴, 张璟, 苏诚玉. 甘肃省地产婴幼儿配方奶粉阪崎肠杆菌污染调查分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2013, 23(4): 990-991, 993.
QUAN YL, HU XN, LAN G, SHEN YQ, ZHANG J, SU CY. Survey on contamination by *Enterobacter sakazakii* in infant formula milk powder in Gansu[J]. *China Industrial Economics*, 2013, 23(4): 990-991, 993 (in Chinese).
- [13] 张强, 罗勤贵, 赵南昕, 齐雨薇, 张倩, 葛武鹏, 杨保伟. 陕西省市售婴幼儿食品中阪崎克罗诺杆菌流行状况及相关特性研究[J]. *西北农业学报*, 2019, 28(5): 843-852.
ZHANG Q, LUO QG, ZHAO NX, QI YW, ZHANG Q, GE WP, YANG BW. Prevalence and relative characterizations of *Cronobacter sakazakii* in retail infant and baby foods in Shaanxi Province[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2019, 28(5): 843-852 (in Chinese).
- [14] CHATTERJEE M, ANJU CP, BISWAS L, ANIL KUMAR V, GOPI MOHAN C, BISWAS R. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options[J]. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 2016, 306(1): 48-58.
- [15] FU FL, WANG Q. Removal of heavy metal ions from wastewaters: a review[J]. *Journal of Environmental Management*, 2011, 92(3): 407-418.
- [16] JONES JB, VALLAD GE, IRIARTE FB, OBRADOVIĆ A, WERNING MH, JACKSON LE, BALOGH B, HONG JC, MOMOL MT. Considerations for using bacteriophages for plant disease control[J]. *Bacteriophage*, 2012, 2(4): e23857.
- [17] GOODRIDGE LD, BISHA B. Phage-based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods[J]. *Bacteriophage*, 2011, 1(3): 130-137.
- [18] KAZI M, ANNAPURE US. Bacteriophage biocontrol of foodborne pathogens[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2016, 53(3): 1355-1362.
- [19] JIANG J, LAN GD, LI JH, YU J, HUANG HL, SUN YB, XU CT, LIU DD, GONG YW, ZHAO CY. Characterization and genomic analysis of JC01, a novel bacteriophage infecting *Cronobacter sakazakii*[J]. *Archives of virology*, 2022, 168(1): 1.
- [20] 李兆雪. 肠炎沙门氏菌噬菌体 JD01 和 JD02 生物学特性及食品安全生物防控制剂的潜在应用研究[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2022.
LI ZX. Characterization and potential application of food safety biocontrol agents of *Salmonella enteritidis* phage

- JD01 and JD02[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin University, 2022 (in Chinese).
- [21] LUO DD, Li CS, WU QP, DING Y, YANG MY, HU YD, ZENG HY, ZHANG JM. Isolation and characterization of new phage vB_CtuP_A24 and application to control *Cronobacter* spp. in infant milk formula and lettuce[J]. Food research international, 2021, 141: 110109.
- [22] KIM SG, JUN JW, GIRI SS, YUN S, KIM HJ, KIM SW, KANG JW, HAN SJ, JEONG D, PARK SC. Isolation and characterization of pVa-21, a giant bacteriophage with anti-biofilm potential against *Vibrio alginolyticus*[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 6284.
- [23] ENDERSEN L, BUTTIMER C, NEVIN E, COFFEY A, NEVE H, OLIVEIRA H, LAVIGNE R, O'MAHONY J. Investigating the biocontrol and anti-biofilm potential of a three phage cocktail against *Cronobacter sakazakii* in different brands of infant formula[J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 253: 1-11.
- [24] JARADAT ZW, AL MOUSA W, ELBETIEHA A, AL NABULSI A, TALL BD. *Cronobacter* spp.-opportunistic food-borne pathogens. A review of their virulence and environmental-adaptive traits[J]. Journal of Medical Microbiology, 2014, 63(8): 1023-1037.
- [25] EDELSON-MAMMEL SG, BUCHANAN RL. Thermal inactivation of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant formula[J]. Journal of Food Protection, 2004, 67(1): 60-63.
- [26] ENDERSEN L, O'MAHONY J, HILL C, ROSS RP, MCAULIFFE O, COFFEY A. Phage therapy in the food industry[J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2014, 5: 327-349.
- [27] LI S, LU SG, HUANG H, TAN L, NI QS, SHANG WL, YANG Y, HU Z, ZHU JM, LI M, RAO XC, HU FQ, HU XM. Comparative analysis and characterization of *Enterobacteria* phage SSL-2009a and 'HK578likevirus' bacteriophages[J]. Virus Research, 2019, 259: 77-84.
- [28] HARADA LK, SILVA EC, CAMPOS WF, del FIOL FS, VILA M, DĄBROWSKA K, KRYLOV VN, BALCÃO VM. Biotechnological applications of bacteriophages: state of the art[J]. Microbiological Research, 2018, 212/213: 38-58.
- [29] WITTEBOLE X, de ROOCK S, OPAL SM. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens[J]. Virulence, 2014, 5(1): 226-235.
- [30] KOWALSKA JD, KAZIMIERCZAK J, SOWIŃSKA PM, WÓJCIK EA, SIWICKI AK, DASTYCH J. Growing trend of fighting infections in aquaculture environment-opportunities and challenges of phage therapy[J]. Antibiotics, 2020, 9(6): 301-317.
- [31] BERTOZZI SILVA J, STORMS Z, SAUVAGEAU D. Host receptors for bacteriophage adsorption[J]. FEMS Microbiology Letters, 2016, 363(4): fnw002.