



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106497888 A

(43)申请公布日 2017.03.15

(21)申请号 201610924016.0

A23K 10/18(2016.01)

(22)申请日 2016.10.29

A61K 35/76(2015.01)

A61P 31/04(2006.01)

(83)生物保藏信息

CCTCC NO:M 2016472 2016.09.09

CCTCC NO:M 2016473 2016.09.09

(71)申请人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市南湖狮子山街1号

(72)发明人 李锦铨 黄晨曦 王小红 董星星

周洋 牛晓娜 陈福生 石健春

(74)专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001

代理人 龚莹莹

(51)Int.Cl.

C12N 7/00(2006.01)

A23L 33/135(2016.01)

权利要求书1页 说明书14页 附图7页

(54)发明名称

沙门氏菌噬菌体和噬菌体抗菌组合物及其应用

(57)摘要

本发明公开了沙门氏菌噬菌体和噬菌体抗菌组合物及其应用,本发明提供的噬菌体为肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE1和鼠伤寒沙门氏菌噬菌体LPST10,无论是噬菌体LPSE1还是LPST10,均可对沙门氏菌具有良好的抑制作用,同时其对pH和温度的耐受性均较好,在食品体系中的应用实例也证实,当其用做于抑菌剂时具备良好的效果。将该两种噬菌体混合后,发现噬菌体之间存在协同作用,较之于单个噬菌体具有更有益的抑制作用。

1. 一种沙门氏菌噬菌体,所述的沙门氏菌噬菌体为肠炎沙门氏菌噬菌体(*Salmonella enteritidis* bacteriophage)LPSE1,保藏编号为:CCTCC NO:M 2016472。

2. 一种沙门氏菌噬菌体,所述的沙门氏菌噬菌体为鼠伤寒沙门氏菌噬菌体(*Salmonella typhimurium* bacteriophage)LPST10,保藏编号为:CCTCC NO:M 2016473。

3. 一种沙门氏菌噬菌体混合物,该混合物包括权利要求1所述的肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE1和鼠伤寒沙门氏菌噬菌体LPST10。

4. 根据权利要求3所述的噬菌体混合物,所述的混合物中肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE1和鼠伤寒沙门氏菌噬菌体LPST10的个数比为1:1。

5. 权利要求1所述沙门氏菌噬菌体或权利要求2所述的噬菌体或权利要求3所述的噬菌体混合物在制备食品抑菌剂中的应用。

6. 权利要求1所述沙门氏菌噬菌体或权利要求2所述的噬菌体或权利要求3所述的噬菌体混合物在制备沙门氏菌抑制剂中的应用。

沙门氏菌噬菌体和噬菌体抗菌组合物及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及食品安全领域,具体涉及沙门氏菌噬菌体和噬菌体抗菌组合物及其应用。

背景技术

[0002] 根据我国的食源性疾病检测体系数据显示,由食源性微生物引起的食品安全问题所占构成比达43%。而其中由沙门氏菌引起的食源性疾病爆发数量占70%-80%。近十年(2004-2015)美国食源性疾病监测网各地区食源性疾病暴发报告显示,全球沙门氏菌引起食源性疾病暴发率逐年上升,暴发位列第一。而世界卫生组织(WHO)则将沙门氏菌列入具有严重危害和中等危害的食物传播性病原菌并已组建全球沙门氏菌监测网(WHO-GSS),加强了对沙门氏菌污染的监控。沙门氏菌分布广泛,血清型多达2500余种,以鼠伤寒沙门氏菌和肠炎沙门氏菌这2种对人和动物均有致病性的沙门氏菌引发沙门氏菌病的病例最多,多发于夏秋季。可通过肠道上皮细胞进入血液引发败血症,并产生内毒素,引发急性肠胃炎,食物中毒等疾病。肉与肉制品,蛋制品,乳制品,水产品及速冻食品是食源性沙门氏菌在食品体系中污染的主要来源。此外,由以上原材料或制品可能在食品运输、储藏和加工操作过程给其他产品如果蔬带来交叉污染,增加病原扩散和引起感染的风险。

[0003] 目前对于食源性病原的控制,可以大致在两个阶段进行控制:对于“收获前”阶段,也就是对于生产肉禽制品,乳制品的动物,主要采用化学药物(抗生素和抑菌化合物)、疫苗免疫,或剔除隔离病原阳性畜禽的方法来起到预防和控制病原的作用;对于“收获后”阶段的产品,也就是食品原材料和制品,主要通过化学方法(如:消毒剂、抗生素和抑菌物质)和物理方法(如:加热、射线和低温)来消除或控制病原。

[0004] 添加化合物进行抑菌的化学方法目前在全世界范围内已经收到极大的质疑和甚至禁止。如,2006年,欧盟全面禁用抗生素和生长促进剂在畜禽饲料中使用。物理方法中通过射线进行杀菌的方法的安全性一直存在争议,同时需要特殊设备,其应用也遭受质疑。最常用的热杀菌方法在某些食品原料、半成品或者制品中却无法应用,例如需要保持生鲜的原料畜禽肉、生鲜果蔬,以及生鲜鸡蛋和液蛋,他们在送达消费者和加工地之前不合适通过热处理杀菌。通过保持低温处理以上食品原料或成品的方法仅仅只能一定程度上抑制病原生长增殖,却不能杀灭病原,在合适的条件下,他们依然具有感染和导致交叉污染的风险。

[0005] 目前国际上开始尝试使用噬菌体来预防和控制食源性病原菌。例如,2006年,美国食品药品监督管理局(FDA)批准ListShield™噬菌体产品可作为食品添加剂,用于即食食品和禽肉制品中控制单核细胞增生李斯特菌污染。噬菌体是一类能特异性感染细菌且增殖速度快的病毒。其中烈性噬菌体通过特异性识别宿主菌细菌,在宿主菌体内大量繁殖并最终裂解释放大量子代噬菌体起到抑菌的效果。

[0006] 本研究小组研发了一种利用噬菌体防控的方法来预防和控制沙门氏菌。噬菌体具有以下优点,使得其能够在预防沙门氏菌传播过程中发挥作用:

[0007] (1) 其特异性强,不影响机体正常菌群;

[0008] (2) 绿色环保,噬菌体是由蛋白质及核酸组成的小分子,对人或动物来讲并非异物,其进入人或动物体内的代谢过程可被视为自然过程,对环境无污染;

[0009] (3) 一次使用可实现多次预防,噬菌体可以实现自我繁殖,无论在动物还是在产品上均可实现一次使用可以实现多次预防;

[0010] (4) 可携带性强。制备成制剂之后,不需要依赖特殊仪器设备和条件,不需要特殊保存环境。

[0011] (5) 应用范围广,不受应用对象和场所限制。可应用于畜禽养殖过程和场所、畜禽屠宰加工设备和场所、食品原材料运输设备、食品加工设备、食品原材料、半成品和成品。

发明内容

[0012] 本发明的目的在于提供了一种沙门氏菌噬菌体LPSE1,所述的沙门氏菌噬菌体已送至中国典型培养物保藏中心保藏,分类命名:肠炎沙门氏菌噬菌体(*Salmonella enteritidis bacteriophage*) LPSE1,保藏编号为:CCTCC NO:M 2016472,保藏日期为2016年9月9日,地址:中国 武汉 武汉大学。

[0013] 本发明的目的在于提供了一种沙门氏菌噬菌体LPST10,所述的沙门氏菌噬菌体已送至中国典型培养物保藏中心保藏,分类命名:鼠伤寒沙门氏菌噬菌体(*Salmonella typhimurium bacteriophage*) LPST10,保藏编号为:CCTCC NO:M 2016473,保藏日期为2016年9月9日,地址:中国 武汉 武汉大学。

[0014] 本发明还有一个目的在于提供了一种沙门氏菌噬菌体混合物,该混合物包括沙门氏菌噬菌体LPSE1和LPST10,该组合物的两种噬菌体之间存在协同作用,对沙门氏菌有良好的抑制作用。

[0015] 本发明还有一个目的在于提供了一种沙门氏菌噬菌体LPSE1的应用,包括将该噬菌体用于抑制食品中沙门氏菌的污染,或制备用于抑制沙门氏菌的药物。

[0016] 本发明还有一个目的在于提供了一种沙门氏菌噬菌体LPST10的应用;包括将该噬菌体用于抑制食品中沙门氏菌的污染,或制备用于抑制沙门氏菌的药物。

[0017] 本发明最后一个目的在于提供了一种沙门氏菌噬菌体混合物的应用,包括将该噬菌体用于抑制食品中沙门氏菌的污染,或制备用于抑制沙门氏菌的药物。

[0018] 为了达到上述目的,本发明采取以下技术措施:

[0019] 发明人自污水中分离得到两株沙门氏菌噬菌体,分别命名为沙门氏菌噬菌体LPSE1和沙门氏菌噬菌体LPST10。

[0020] 所述的沙门氏菌噬菌体LPSE1已送至中国典型培养物保藏中心保藏,分类命名:肠炎沙门氏菌噬菌体(*Salmonella enteritidis bacteriophage*) LPSE1,保藏编号为:CCTCC NO:M 2016472,保藏日期为2016年9月9日,地址:中国 武汉 武汉大学。

[0021] 所述的沙门氏菌噬菌体LPST10已送至中国典型培养物保藏中心保藏,分类命名:鼠伤寒沙门氏菌噬菌体(*Salmonella typhimurium bacteriophage*) LPST10保藏号为:CCTCC N O:M 2016473,保藏日期为2016年9月9日,地址:中国 武汉 武汉大学。

[0022] 两种噬菌体在固体平板上均可以形成较大透亮空斑,边缘清晰规则。其中噬菌体LPSE1可形成具有2mm噬菌斑,而噬菌体LPST10在固体平板上直径在0.5mm左右。

[0023] 所述的噬菌体LPSE1和LPST10无论是单独使用还是混合使用,均能用于制备食品

抑菌剂或沙门氏菌抑制剂。

[0024] 具体方案详见具体实施方式。

[0025] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0026] (1) 经富集后的噬菌体原液效价高。在本发明中,噬菌体LPSE1和LPST10的效价 $\geq 10^9$ pfu/mL。

[0027] (2) 在不同条件下,裂菌能力强。在本发明中,分别比较了噬菌体LPSE1和LPST10在MOI=10,MOI=1,MOI=0.1,MOI=0.01,MOI=0.001的条件下对肠炎沙门氏菌ATCC13076和鼠伤寒沙门氏菌ATCC14028的抑菌作用,并发现在不同的MOI条件下均具有一定的活性。

[0028] (3) pH范围更广。在本发明中,噬菌体LPST10的pH稳定性范围3-13;噬菌体LPSE1的pH稳定性4-12,无论是LPST10单独使用还是两者联合使具有较宽的pH适用范围。

[0029] (4) 热稳定性好。在本发明中,噬菌体LPST10和LPSE1在30-60℃效价基本不变。

[0030] 综上所述,本生物制剂包含能有效抑制、裂解沙门氏菌的噬菌体,该制剂不仅能在动物处于活体状态的时候使用以预防沙门氏菌,也可以在动物成为食品原料或产品进行应用,还可以应用于养殖、和食品生产加工场地。

附图说明

[0031] 图1:沙门氏菌噬菌体LPSE1双层平板噬菌斑图。

[0032] 图2:沙门氏菌噬菌体LPST10双层平板噬菌斑图。

[0033] 图3:噬菌体LPSE1裂解不同血清型沙门氏菌的宿主谱阳性结果图;

[0034] 其中:图3中A表示ATCC13076,图3中B表示SJTUF10978,图3中C表示SJTUF10984,图3中D表示ATCC14028,图3中E表示ATCC13311,图3中F表示CMCC50094。

[0035] 图4:噬菌体LPST10裂解不同血清型沙门氏菌的宿主谱阳性结果图;

[0036] 其中:图4中A表示ATCC13076,图4中B表示SJTUF10978,图4中C表示SJTUF10984,图4中D表示ATCC14028,图4中E表示ATCC13311,图4中F表示CMCC50094。

[0037] 图5:沙门氏菌噬菌体LPSE1的电镜观察图。

[0038] 图6:沙门氏菌噬菌体LPST10的电镜观察图。

[0039] 图7:沙门氏菌噬菌体LPSE1的生长曲线。

[0040] 图8:沙门氏菌噬菌体LPST10的生长曲线。

[0041] 图9:在MOI值为10条件下,噬菌体LPSE1和LPST10组合物对肠炎沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌裂菌能力结果图。

[0042] 图10:不同pH对噬菌体LPSE1的作用结果图。

[0043] 图11:不同pH对噬菌体LPST10的作用结果图。

[0044] 图12:不同温度对噬菌体LPSE1的作用结果图。

[0045] 图13:不同温度对噬菌体LPST10的作用结果图。

具体实施方式

[0046] 下面结合实施例来进一步说明本发明,但本发明要求保护的范围并不局限于实施例表述的范围。

[0047] 实施例中2×YT培养基的配制方法为:蛋白胨1.6g,酵母浸粉1.0g,NaCl 0.5g,加

蒸馏水至100mL。

[0048] 实施例1:

[0049] 沙门氏菌噬菌体的筛选、纯化及保藏

[0050] 1、沙门氏菌噬菌体的筛选

[0051] 取污水样品10mL,用直径为0.22 μ m的微孔滤器过滤。分别加入至装有20mL 2 \times YT培养基的50mL灭菌三角瓶中,另加入培养至对数期的敏感指示菌菌液5mL。37 $^{\circ}$ C振荡培养12-18h使样品中可能存在的噬菌体达到增殖富集的效果。

[0052] 将上述培养液于50mL离心管中,以4 $^{\circ}$ C下,8000 \times g离心15min,取上清液用0.22 μ L的滤膜过滤。按照上述方法加入灭菌的培养基及对数生长期宿主菌菌液反复富集三次。分别采用点样法,涂布法初步验证:有明显空斑样品进一步采用双层平板法,经梯度稀释,观察噬菌斑形态,最终获得两株噬菌体,分别为噬菌体LPSE1和噬菌体LPST10,结果如图1和图2所示。

[0053] 2、噬菌体原液的无菌检测

[0054] 取噬菌体分离所得原液8000 \times g离心15min,4 $^{\circ}$ C;小心取上清,用0.22 μ m滤膜过滤。取滤液均匀涂布于固体琼脂平板上,于37 $^{\circ}$ C培养12h后观察平板上有无菌落。

[0055] 3、噬菌体的扩增培养和纯化

[0056] 采用固体增殖法,在培养噬菌体原液的双层平板中挑取相对独立、大而边缘光滑的噬菌斑,接种于1mL 2 \times YT液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、200r/min振荡培养8h左右。4 $^{\circ}$ C下,8000 \times g离心15min,0.22 μ m滤膜过滤除菌,将噬菌体原液按照细菌平板划线的方法分离,按从稀释倍数高向稀释倍数低的方向加入混有200 μ L菌液的上层培养基。重复上述步骤3-5次反复纯化噬菌体,直至得到大小较均一的噬菌斑,即为纯化的噬菌体。并利用双层平板法测定所分离噬菌体的效价。

[0057] 4、噬菌体的保藏

[0058] 采用液体增殖法,以MOI值为1的比例分别加入效价为10⁹pfu/mL噬菌体液10 μ L及菌数为10⁸cfu/mL对应培养至对数期的宿主菌100 μ L(对于噬菌体LPSE1于其宿主菌肠炎沙门氏菌*Salmonella enteritidis* ATCC13076中培养;而噬菌体LPST10于其宿主菌鼠伤寒沙门氏菌*Salmonella typhimurium* ATCC14028中培养),接种于5mL 2 \times YT培养基中,37 $^{\circ}$ C充分振荡过夜培养。在4 $^{\circ}$ C条件下,8000 \times g离心15min。小心取上清,用0.22 μ m滤膜过滤后分装至无菌小管。此时两种噬菌体效价均 \geq 10⁹pfu/mL采用-80 $^{\circ}$ C(含18%甘油)保藏。

[0059] 本发明的两个沙门氏菌噬菌体的形态特征:两种噬菌体在固体平板上均可以形成较大透亮空斑,边缘清晰规则。其中噬菌体LPSE1可形成具有2mm噬菌斑,而噬菌体LPST10在固体平板上直径在0.5mm左右。

[0060] 纯化的肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE1已送至中国典型培养物保藏中心保藏,分类命名:肠炎沙门氏菌噬菌体(*Salmonella enteritidis* bacteriophage)LPSE1保藏号为:CCTCC NO:M 2016472,保藏日期为2016年9月9日,地址:中国武汉武汉大学。

[0061] 纯化的鼠伤寒沙门氏菌噬菌体LPST10已送至中国典型培养物保藏中心保藏,分类命名:

[0062] 鼠伤寒沙门氏菌噬菌体(*Salmonella typhimurium* bacteriophage)LPST10保藏编号为:CCTCC NO:M 2016473,保藏日期为2016年9月9日,地址:中国武汉武汉大学。

[0063] 实施例2:

[0064] 宿主谱的测定:

[0065] 试验选择8种沙门氏菌标准菌株和7种其他种属菌株来做噬菌体LPSE1和LPST10的宿主谱分析,具体操作如下:

[0066] 分别培养宿主菌菌株至对数期。取100μL对数期上述菌液。待上层琼脂温度降至46℃左右时,取3mL上层琼脂与菌液混匀,倒入15mL下层琼脂培养基上。静置晾干约10min,待上层培养基凝固后,滴加5μL各噬菌体液,另取5μL生理盐水做对照组,隔夜观察。

[0067] 结果如表1所示,表中“++++”“+++”“++”“+”“-”分别表示完全清澈;澄清但有依稀朦胧的背景;澄清区域大幅混浊;多个独立斑块;无澄清现象,但可能会在枪头接触处由于接触有一个小斑点。

[0068] 结果显示:噬菌体LPSE1和LPST10可裂解多种不同血清型的沙门氏菌,可裂解肠炎沙门氏菌ATCC 13076,肠炎沙门氏菌SJTUF 10978,肠炎沙门氏菌SJTUF 10984,鼠伤寒沙门氏菌ATCC 14028,鼠伤寒沙门氏菌ATCC13311,乙型副伤寒沙门氏菌CMCC 50094,可裂解6种不同的沙门氏菌,表现出广谱性;对所收集的15株细菌中的6株有裂解作用,裂解率为40%。但所有沙门氏菌噬菌体均不能裂解金黄色葡萄球菌,李斯特菌,副溶血弧菌,大肠杆菌,具有种属间特异性。

[0069] 表1噬菌体LPSE1和LPST10宿主谱的测定

[0070]

菌株名称	属	噬菌体 LPSE1	噬菌体 LPST10
ATCC 13076	<i>Salmonella</i> Enteritidis	+++	++
ATCC 14028	<i>Salmonella</i> Typhimurium	+++	+++
CMCC 50094	<i>Salmonella</i> paratyphi B	++++	+++
SJTUF 10978	<i>Salmonella</i> Enteritidis	++++	++++
SJTUF 10984	<i>Salmonella</i> Enteritidis	++++	++++
ATCC 13311	<i>Salmonella</i> Typhimurium	++	++
ATCC 9270	<i>Salmonella</i> anatum	-	-
ATCC 10708	<i>Salmonella</i> choleraesuls	-	-
DH5α	<i>Escherichia coli</i>	-	-

[0071]

BL21	<i>Escherichia coli</i>	-	-
83715	<i>Escherichia coli</i>	-	-
ATCC 19114	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-
ATCC 33846	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-
ATCC 29213	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
ATCC 6538	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-

[0072] 实施例3:

[0073] 噬菌体的电镜观察

[0074] 噬菌体原液经 $50,000 \times g$ 低温超速离心后,于1mL SM缓冲液重悬,冰浴静置1-2小时。分别取50 μ L样品(10^8 - 10^{10} pfu/mL)和50 μ L体积分数2%,pH 7.0的磷钨酸(phosphotungstic acid,PTA)滴加在封口膜上。轻取铜网,置于样品液滴中静置沉淀5-10min,吸去多余液体。取出铜网,静置5min,左右至铜网上的悬浮液将要干燥但未完全干燥之际,用镊子将铜网置于磷钨酸(PTA)染料中染色3min后吸去多余液体,自然晾干至完全干燥,在透射电镜下观察噬菌体形态,并用软件Digital Micrograph Demo 3.9.1测量其大小。

[0075] 结果如图5-6所示,经纯化后的噬菌体LPSE1头部呈二十面体结构,经纯化后的噬菌体LPSE1头部呈二十面体结构,头部直径约70nm,噬菌体含收缩性尾,尾宽16.6nm,尾长116.6nm。

[0076] 噬菌体LPST10头部呈二十面体结构,头部直径约83.26nm,噬菌体含收缩性尾,尾宽10.9nm,尾长144.89nm。噬菌体LPSE1和LPST10均符合肌尾病毒科(Myoviridae)特征。

[0077] 实施例4:

[0078] 噬菌体生长曲线的绘制

[0079] 1、制备对数生长早期的宿主菌菌液:

[0080] 对于噬菌体LPSE1,宿主菌为肠炎沙门氏菌ATCC13076(本发明或简称为13076);对于噬菌体LPST10,宿主菌为鼠伤寒沙门氏菌ATCC14028(本发明或简称为14028);以不含细菌的2 \times YT液为空白调零,测定其OD₆₀₀值为0.4-0.5,计算菌液浓度。

[0081] 2、取上述经稀释的宿主菌菌液1mL,按最佳感染复数(MOI=0.01)的比例加入 10^8 pfu/mL噬菌体10 μ L,混匀,37 $^{\circ}$ C温育15min后4 $^{\circ}$ C下, $7000 \times g$ 离心2min,尽量弃去上清,用1ml 2 \times YT液洗涤2次,弃上清。用2 \times YT培养基等体积重悬,

[0082] 3、取50 μ L重悬液于经37 $^{\circ}$ C预热的50mL 2 \times YT培养基中并充分混匀,迅速置于37 $^{\circ}$ C摇床中160rpm/min振荡培养,同时开始计时,在0时刻和每隔10min取样50 μ L, $13,000 \times g$ 离心30sec,立刻吸取上清液20 μ L于180 μ L 2 \times YT培养基作梯度稀释。按上述操作每间隔10分钟,选择合适的稀释梯度,测定噬菌体效价。

[0083] 结果如图7和图8所示,噬菌体LPSE1在0-30min噬菌体潜伏期约为30min,30~110min处于裂解期,裂解时间约为90min,裂解量为94pfu/cfu。而噬菌体LPST10在0-30min噬菌体潜伏期约为30min,30~60min处于裂解期,裂解时间约为50min,裂解量为101pfu/cfu。

[0084] 实施例5:

[0085] 噬菌体及噬菌体组合物裂菌能力的评价

[0086] 1、测定沙门氏菌菌数与OD₆₀₀值的关系以及测定噬菌体效价。

[0087] 对于噬菌体LPSE1,接种肠炎沙门氏菌ATCC13076;对于噬菌体LPST10,接种鼠伤寒沙门氏菌ATCC14028。培养8小时左右至对数期,取200 μ L测定其OD₆₀₀值,并同时测定其菌数。确定在该OD₆₀₀值条件下,所含菌数的数量级。

[0088] 两种沙门氏菌的混合液以肠炎沙门氏菌ATCC13076 (浓度为10⁸cfu/mL) 和鼠伤寒沙门氏菌ATCC14028 (浓度为10⁸cfu/mL) 按体积比1:1 (v:v) 比例混合所得混合液。

[0089] 测定噬菌体效价:稀释至合适梯度,通过双层平板法测定效价。

[0090] 2、噬菌体裂菌能力曲线的绘制

[0091] 取噬菌体液LPSE1,LPST10梯度稀释至10⁵pfu/mL,分别按照MOI=10,1,0.1,0.01,0.001加入100 μ L经梯度稀释后对应浓度的噬菌体液至实验组,并加入100 μ L对数期沙门氏菌菌液混匀,所述的沙门氏菌菌液的浓度为10⁸cfu/mL。

[0092] 噬菌体组合物以MOI=10添加100 μ L至不同的100 μ L宿主菌液(宿主菌液中的菌浓度为10⁸cfu/mL)中,所述的噬菌体组合物为LPSE1:LPST10=1:1 (pfu/pfu);当宿主菌液为13076和14028的混合物时,13076和14028的比例为1:1 (cfu/cfu)。

[0093] 另设空白组(Blank)加入200 μ L 2 \times YT培养基;

[0094] 对照组(negative control):100 μ L对数期沙门菌菌液(OD₆₀₀为0.4左右)和100 μ L培养基;

[0095] 噬菌体空白组(only contain phages):仅加入噬菌体液(浓度为10⁹pfu/mL)100 μ L和100 μ L 2 \times YT培养基。

[0096] 酶标仪设定: λ =600nm,Settle time:20ms,T=37.0 $^{\circ}$ C,每间隔1h测定OD₆₀₀的变化。在测定过程中,用回旋振荡器(orbital shaker TS-2)于37 $^{\circ}$ C混匀样品,控制转速为160rpm。

[0097] 表2噬菌体LPSE1在不同MOI值下的裂菌能力

[0098]

时间/h	MOI=10	MOI=1	MOI=0.1	MOI=0.01	MOI=0.001	对照组
0	0.030	0.048	0.08	0.043	0.058	0.028
1	0.038	0.054	0.057	0.062	0.061	0.044
2	0.028	0.049	0.092	0.15	0.16	0.12
3	0.034	0.034	0.047	0.078	0.12	0.28
4	0.013	0.026	0.041	0.070	0.091	0.37
5	0.0088	0.013	0.019	0.033	0.070	0.46
6	0.011	0.014	0.018	0.027	0.034	0.54

[0099] 表3噬菌体LPST10在不同MOI值下的裂菌能力

[0100]

时间/h	MOI=10	MOI=1	MOI=0.1	MOI=0.01	MOI=0.001	对照组
0	0.049	0.056	0.054	0.056	0.060	0.054
1	0.050	0.089	0.11	0.13	0.14	0.13
2	0.026	0.054	0.090	0.23	0.29	0.33
3	0.026	0.042	0.050	0.14	0.28	0.36
4	0.043	0.047	0.057	0.076	0.18	0.41
5	0.081	0.057	0.074	0.084	0.13	0.46
6	0.18	0.12	0.11	0.11	0.11	0.52

[0101] 结果如表2-3所示,在6h内,与对照组相比,噬菌体LPSE1和LPST10在不同MOI值下均表现出良好的抑菌能力。MOI值越高,OD₆₀₀值下降越快,保持在较低水平,表现出的抑菌作用越明显。对于噬菌体LPSE1,当MOI<1时,在0-2小时内OD₆₀₀值升高,在2小时后,OD₆₀₀值开始下降并保持在低于0.1的水平。而当MOI≥1时,OD₆₀₀值在6小时内一直保持在较低水平,沙门氏菌生长一直受到抑制。

[0102] 对于噬菌体LPST10,当MOI≥1时,在6小时内,实验组沙门氏菌生长一直受到明显抑制。而当MOI<1时,在2小时后,实验组的沙门氏菌数量开始明显减少且明显低于对照组。

[0103] 表4噬菌体及噬菌体组合物对肠炎沙门氏菌ATCC13076的抑菌作用 (MOI=10)

时间/h	LPSE1 (13076)	LPST10 (13076)	LPSE1+LPST10 (13076)	对照组 (13076)
0	0.026	0.035	0.036	0.055
1	0.002	0.032	0.034	0.289
2	-0.015	0.033	0.028	0.367
3	-0.026	0.105	0.001	0.420
4	0.005	0.240	0.016	0.442
5	0.011	0.355	0.022	0.488
6	-0.009	0.321	-0.002	0.523
7	0.125	0.384	0.069	0.560
8	0.279	0.416	0.098	0.596
9	0.308	0.450	0.082	0.622

[0104]

[0105] 表5噬菌体及噬菌体组合物对鼠伤寒沙门氏菌ATCC14028的抑菌作用 (MOI=10)

	时间/h	LPST10	LPSE1	LPSE1+LPST10	对照组
		(14028)	(14028)	(14028)	(14028)
[0106]	0	0.019	0.033	0.046	0.034
	1	0.033	0.030	0.052	0.136
	2	0.014	0.009	0.026	0.222
	3	0.020	-0.009	0.007	0.270
	4	0.094	0.034	0.057	0.355
	5	0.187	0.102	0.100	0.378
	6	0.169	0.171	0.130	0.361
	7	0.244	0.209	0.202	0.433
	8	0.308	0.270	0.268	0.468
	9	0.378	0.308	0.274	0.488

[0107] 结果如上表4-5所示,对于肠炎沙门氏菌ATCC13076,当加入噬菌体LPSE1和LPST10 (1:1) 组合物时,OD₆₀₀值在9小时后为0.082<0.1,低于仅加入噬菌体LPSE1的实验组 (OD₆₀₀值为0.308),和仅加入噬菌体LPST10的实验组 (OD₆₀₀值为0.450),远小于对照组OD₆₀₀值0.622,故当同时加入噬菌体LPSE1和噬菌体LPST10时在9小时内对肠炎沙门氏菌AT CC13076有明显的抑制效果,优于仅加入单一噬菌体LPSE1或者LPST10。

[0108] 而对于鼠伤寒沙门氏菌ATCC14028,当加入噬菌体组合物9小时后,其OD₆₀₀值为0.274,低于仅加入单一噬菌体LPSE1 (OD₆₀₀值为0.378) 或者LPST10 (OD₆₀₀值为0.308) 的实验组,也低于对照组。故当同时加入噬菌体LPSE1和噬菌体LPST10时在9小时内对鼠伤寒沙门氏菌ATCC14028有明显的抑制效果,优于仅加入单一噬菌体LPSE1或者LPST10。

[0109] 表6噬菌体及噬菌体组合物对两种沙门氏菌ATCC13076和ATCC14028的抑菌作用 (MOI=10)

	时间/h	LPSE1	LPST10	LPSE1+LPST10	对照组
		(13076+14028)	(13076+14028)	(13076+14028)	(13076+14028)
[0110]	0	0.038	0.053	0.053	0.073
	1	0.023	0.040	0.009	0.247
	2	0.008	0.038	-0.026	0.285
	3	0.003	0.083	0.010	0.386
	4	0.050	0.191	0.081	0.464
	5	0.103	0.278	0.061	0.468
	6	0.196	0.281	0.046	0.438
	7	0.212	0.306	0.121	0.501
	8	0.274	0.361	0.178	0.547
	9	0.298	0.384	0.227	0.577

[0111] 结果如上表6所示,噬菌体LPSE1和噬菌体LPST10在6小时内OD₆₀₀值分别达到0.20和0.29,低于对照组OD₆₀₀值0.44,故噬菌体LPSE1和噬菌体LPST10均能对两种沙门氏菌(肠炎沙门氏菌ATCC13076和鼠伤寒沙门氏菌ATCC14028)有抑制作用。而当同时加入噬菌体组合物(按1:1比例加入肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE1和鼠伤寒沙门氏菌LPST10),在6小时后OD₆₀₀值为0.046<0.05,远低于对照组0.44,低于仅加入噬菌体LPSE1(OD₆₀₀值为0.20)和噬菌体LPST10(OD₆₀₀值为0.29)的实验组。说明,以两种噬菌体组合物的形式添加能更有效抑制两种沙门氏菌的生长(图9)。

[0112] 实施例6:

[0113] 噬菌体pH稳定性的测定

[0114] 取不同pH(2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13)的缓冲蛋白胨水(BPW)900μL,置于37℃的恒温水浴中预热。待温度平衡后加入100μL噬菌体纯培养液(效价为10⁸pfu/mL),37℃恒温作用2h。待作用时间结束,根据预实验结果将样品做适当稀释后采用双层平板法测定噬菌体效价。

[0115] 结果如图10-11所示,噬菌体LPSE1在pH为4-12之间稳定于10⁸pfu/mL,在pH<3时噬菌体效价降为0,在pH=13时,噬菌体效价为13pfu/mL,效价明显降低,pH为14时降为0。而噬菌体LPST10在pH为3-13之间时,噬菌体的效价稳定于10⁸pfu/mL,噬菌体在pH<3或者pH>13时效价为0。

[0116] 表明噬菌体LPSE1在pH在4-12稳定,噬菌体LPST10在pH在3-13之间稳定,均表现出良好的pH稳定性。

[0117] 实施例7:

[0118] 噬菌体热稳定性的测定

[0119] 用沙门氏菌噬菌体LPSE1和LPST10原液,取100μL效价为10⁷pfu/mL的噬菌体,加入

900 μ L经预热的2 \times YT培养基中;分别于30–80 $^{\circ}$ C,恒温作用30/60min,充分混匀;根据预实验结果,选择合适稀释倍数倒平板,测定不同处理方式下的噬菌体效价。

[0120] 结果如图12–13所示,噬菌体LPSE1在30–60 $^{\circ}$ C效价稳定于 10^7 pfu/mL,70 $^{\circ}$ C时处理30min内效价开始降低至 10^5 pfu/mL,80 $^{\circ}$ C处理60分钟后下降为0。表明噬菌体LPSE1在30–60 $^{\circ}$ C内较为稳定。

[0121] 噬菌体LPST10在30–60 $^{\circ}$ C噬菌体效价维持在 10^7 pfu/mL,在70 $^{\circ}$ C处理30min后噬菌体效价下降4.06log pfu/mL,处理60min后噬菌体效价下降4.17log pfu/mL。与LPSE1相比,噬菌体LPST10在70 $^{\circ}$ C时,下降更快。80 $^{\circ}$ C处理30min内噬菌体效价降为0。

[0122] 表明噬菌体LPSE1和噬菌体LPST10均在30–60 $^{\circ}$ C之间效价均稳定在 10^7 pfu/mL,表现出良好的热稳定性。

[0123] 实施例8:

[0124] 低温4 $^{\circ}$ C及室温28 $^{\circ}$ C条件下,噬菌体以不同MOI值(MOI=1,MOI=100)加入牛奶中的抑菌效果实验

[0125] 实验组分别测定牛奶在4 $^{\circ}$ C和28 $^{\circ}$ C下噬菌体的抑菌效果。先将对照组和实验组的样品分别于置于对应温度条件下静置15min–20min。

[0126] 对于噬菌体LPSE1加入对应宿主菌肠炎沙门氏菌ATCC13076;

[0127] 噬菌体LPST10加入宿主菌鼠伤寒沙门氏菌ATCC14028。

[0128] 在4 $^{\circ}$ C和28 $^{\circ}$ C条件下,再分别将实验组分为2组,分别以MOI=1的比例,取 10^7 cfu/mL菌液10 μ L于1mL灭菌后牛奶中;而另一组以MOI=100的比例,取 10^5 cfu/mL菌液10 μ L于1mL灭菌后牛奶中;

[0129] 实验组加入100 μ L噬菌体液(效价为 10^6 pfu/mL)。另设置不加噬菌体液,加入等体积(100 μ L)SM缓冲液的对照组。

[0130] 两组分别于对应温度(4 $^{\circ}$ C和28 $^{\circ}$ C)下培养0,1,2,4,6小时后取出,经11,000 \times g离心10分钟,分别取上清,测定噬菌体效价;后用涡旋仪混匀,测定对照组及实验组宿主菌菌数的变化。

[0131] 实验同时以噬菌体效价和菌数减少量为指标。

[0132] 对于噬菌体LPST10组,

[0133] MOI=1时:

[0134] 在4 $^{\circ}$ C条件下,在加入噬菌体LPST10的牛奶中,在6小时后,菌数与初始菌数相比降低0.31log cfu/mL;与对照组相比减少1.07log cfu/mL。

[0135] 在28 $^{\circ}$ C条件下,在加入噬菌体LPST10的实验组菌数与初始加入菌数相比,下降1.09log cfu/mL;相比对照组降低3.95log cfu/mL,杀菌效率达47.9%。

[0136] MOI=100时:

[0137] 在4 $^{\circ}$ C条件下,实验组菌数与初始菌数相比,下降0.84log cfu/mL;相比对照组降低1.22log cfu/mL。

[0138] 在28 $^{\circ}$ C条件下,在加入噬菌体LPST10两小时内,菌数生长受到抑制;而6小时后,菌数明显下降2.05log cfu/mL,与对照组相比,减少5.12log cfu/mL,杀菌效率达80.4%。对于噬菌体LPSE1组,

[0139] MOI=1时:

[0140] 在4℃条件下,噬菌体LPSE1在牛奶中处理6h后实验组比对照组下降0.24log cfu/mL。处理2h,4h,6h后,杀菌效率分别达5.8%,5.4%,4.4%;

[0141] 在28℃时,实验组加入噬菌体LPSE1后,菌数与对照组菌数相比,减少2.02log cfu/mL,杀菌效率达26.37%。

[0142] MOI=100时:

[0143] 在4℃条件下,菌数在6小时后维持在3.31log cfu/mL,与对照组基本一致。

[0144] 在28℃条件下,噬菌体LPSE1在牛奶中加入噬菌体处理6小时后宿主菌菌数与对照组相比减少1.02log cfu/mL,杀菌效率达17.11%。

[0145] 说明这两种噬菌体在MOI=1和100时,均可有效抑制牛奶中肠炎沙门氏菌ATCC13076和鼠伤寒沙门氏菌ATCC14028的污染。

[0146] 实施例9:

[0147] 低温4℃及室温28℃条件下,噬菌体以不同MOI值加入火腿上的抑菌效果实验

[0148] 取火腿于无菌操作台中切成直径为2mm,厚度为1mm大小。分为对照组和实验组两组。置于平板上编号4片/皿,共需8皿。

[0149] 实验组分别测定火腿在4℃和28℃下噬菌体LPSE1和LPST10的抑菌效果。

[0150] 在对应温度(4℃和28℃)下,分别以MOI值为1和100比例加入宿主菌。

[0151] 噬菌体LPSE1加入对应宿主菌肠炎沙门氏菌ATCC13076;

[0152] 噬菌体LPST10加入宿主菌鼠伤寒沙门氏菌ATCC14028。

[0153] 而当以MOI值为1的比例,滴加 10^7 cfu/mL菌液50μL;而当MOI值为100时,滴加 10^5 cfu/mL菌液50μL至火腿表面,静置风干15-20min,;

[0154] 向实验组火腿滴加 10^7 cfu/mL噬菌体液50μL,而对照组则滴加同体积的SM缓冲液。

[0155] 分别在对应温度(4℃和28℃)下培养0,1,2,4,6小时,用无菌镊子取对应平板上火腿于5mL缓冲液中,用超声清洗机在功率为96W的条件下清洗15分钟。取出火腿,将洗液用涡旋仪充分混匀30秒。选择合适的稀释梯度,分别测定噬菌体效价及对照组和实验组菌数的变化。

[0156] 对于噬菌体LPST10组,

[0157] 当MOI=1时:

[0158] 在4℃条件下,4h后,加入噬菌体LPST10的实验组菌数相比于对照组下降2.09log cfu/sample,杀菌效率达29.6%。

[0159] 在28℃条件下,噬菌体LPST10在4h和6h后,菌数下降1.55log pfu/sample和0.98log pfu/sample,杀菌效率达16.7%。

[0160] 当MOI=100时:

[0161] 在4℃条件下,加入噬菌体LPST10的实验组菌数生长明显受到抑制,下降0.46log cfu/sample,从初始加入菌数比较,降低0.23log cfu/sample。

[0162] 在28℃条件下,噬菌体LPST10在火腿中6小时后,与对照组相比下降1.52log cfu/sample,杀菌效率达33.6%;

[0163] 对于噬菌体LPSE1组,

[0164] 当MOI=1时:

[0165] 在4℃条件下,加入噬菌体LPSE1的实验组菌数相比于对照组下降0.6log cfu/

sample, 杀菌效率达10.8%。

[0166] 在28℃条件下噬菌体LPSE1在火腿中6小时后菌数降低1.86log cfu/sample。杀菌效率达28.8%。

[0167] 当MOI=100时:

[0168] 在4℃条件下, 加入噬菌体的实验组, 与对照组相比菌数降低0.35log cfu/sample, 杀菌效率达9.3%。

[0169] 在28℃条件下, 噬菌体LPSE1在火腿中在28℃条件下与对照组相比菌数降低1.74log cfu/sample, 同时噬菌体效价增加0.79log pfu/sample。

[0170] 说明这两种噬菌体在MOI=1和MOI=100时可分别针对肠炎沙门氏菌ATCC13076和鼠伤寒沙门氏菌ATCC14028, 有效抑制火腿中这两种血清型沙门氏菌的污染。

[0171] 实施例10:

[0172] 在室温条件下, 噬菌体以不同MOI值在生菜上的抑菌效果实验

[0173] 生菜的预处理: 用自来水洗干净后, 再用酒精棉擦拭1遍, 得到表面基本无菌的生菜样品, 用灭菌钻孔器在无菌的砧板上将生菜制成直径为1.5cm的圆片, 之后用灭菌的培养皿装好样品, 置于超净台紫外灯下光照20min灭菌处理, 得到无菌生菜样品。

[0174] 将样品置于无菌培养皿中央, 平放好, 平整的试验切面朝上, 用移液枪对于噬菌体LPSE1取 10^5 cfu/mL对应宿主菌肠炎沙门氏菌ATCC13076 10 μ L; 对于噬菌体LPST10, 取 10^5 cfu/mL对应宿主菌鼠伤寒沙门氏菌ATCC14028 10 μ L。随机滴加于生菜样表面, 得到样品上人工污染的宿主菌为 10^4 cfu/Sample, 为了使宿主菌充分吸附到样品表面, 将样品置于超净台中风干60min。同时为了保证生菜叶片在平皿里的相对湿度, 我们在平皿里放一张无菌纸片, 再在纸片上滴加一定的无菌水。

[0175] 人工污染样品后, 用噬菌体对生菜样进行处理, 取10 μ L效价为 10^6 pfu/mL的噬菌体滴加于样品上, 尽量覆盖住滴加宿主菌的位置, 最终得到样品上初始噬菌体为 10^5 pfu/Sample, 对于不加噬菌体的对照组, 滴加10 μ L无菌的2 \times YT培养液。将装有样品的培养皿盖好, 将样品置于恒温箱中进行贮藏, 试验重复3次, 同时设3个平行。

[0176] 分别于0、1、2、3、4、5h取样, 把样品放入装有2ml的无菌PBS缓冲液的5mL的离心管中, 用涡旋仪全速震荡30s, 梯度稀释并计数。

[0177] 结果显示:

[0178] 对于噬菌体LPSE1,

[0179] 在MOI=1条件下, 噬菌体LPSE1对肠炎沙门氏菌ATCC13076的抑菌效果: 噬菌体与沙门氏菌作用前2个小时菌量几乎没有变化, 作用3-5h时, ATCC13076的减少量分别为: 0.6、1.1、2.0log cfu/cm²。

[0180] 在MOI=10条件下, 噬菌体LPSE1对肠炎沙门氏菌ATCC13076的抑菌效果: 从MOI=10的消除效果图可以看出, 噬菌体与沙门氏菌作用前2个小时菌量几乎没有变化, 作用3-5h时, ATCC13076的减少量分别为: 1.2、1.7、1.7log cfu/cm²。

[0181] 在MOI=100条件下, 噬菌体LPSE1对肠炎沙门氏菌ATCC13076的抑菌效果: LPSE1噬菌体与沙门氏菌ATCC13076作用0小时菌量减少0.6log cfu/cm²。

[0182] 对于噬菌体LPST10,

[0183] 在MOI=1条件下, 噬菌体LPST10对鼠伤寒沙门氏菌ATCC14028的抑菌效果: 作用3-

5h时, ATCC14028的减少量分别为:0.4、1.4、1.7log cfu/cm²。

[0184] 在MOI=10条件下, 噬菌体LPST10对鼠伤寒沙门氏菌ATCC14028的抑菌效果: 作用3-5h时, ATCC14028的减少量分别为:1.1、1.9、1.7log cfu/cm²。

[0185] 在MOI=100条件下, 噬菌体LPST10对鼠伤寒沙门氏菌ATCC14028的抑菌效果: 噬菌体LPST10与ATCC14028沙门氏菌作用0小时(5min) 菌量减少0.3log cfu/cm², 随着作用时间的延长消除率不断上升。

[0186] 上述的实施例仅为本发明的优选技术方案, 而不应视为对于本发明的限制, 本申请中的实施例及实施例中的特征在不冲突的情况下, 可以相互任意组合。本发明的保护范围应以权利要求记载的技术方案, 包括权利要求记载的技术方案中技术特征的等同替换方案为保护范围。即在此范围内的等同替换改进, 也在本发明的保护范围之内。

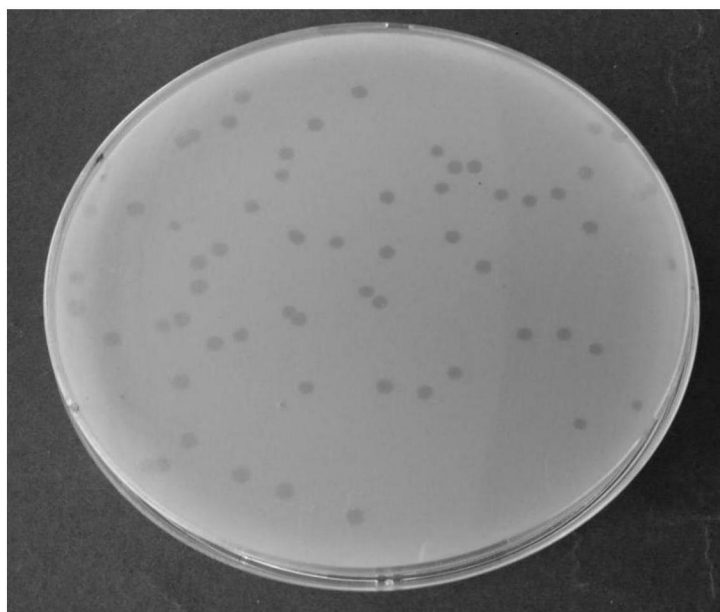


图1



图2

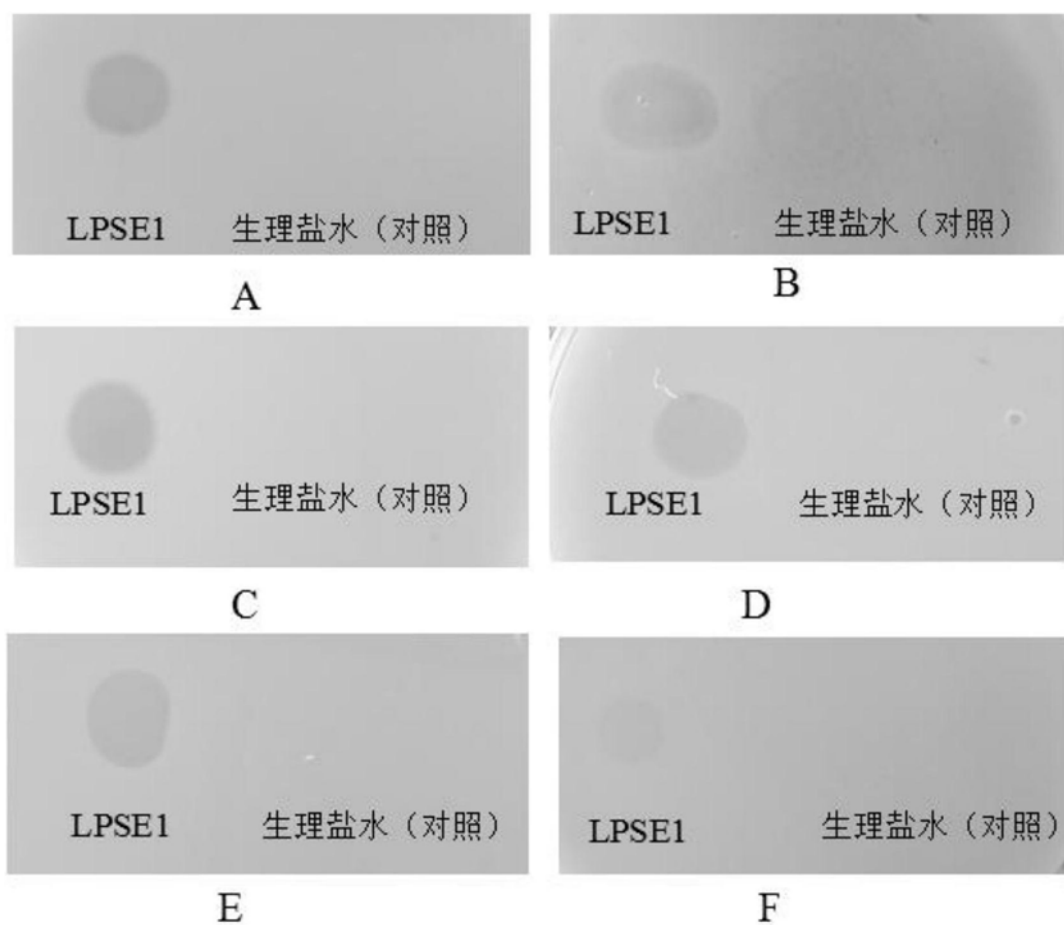


图3

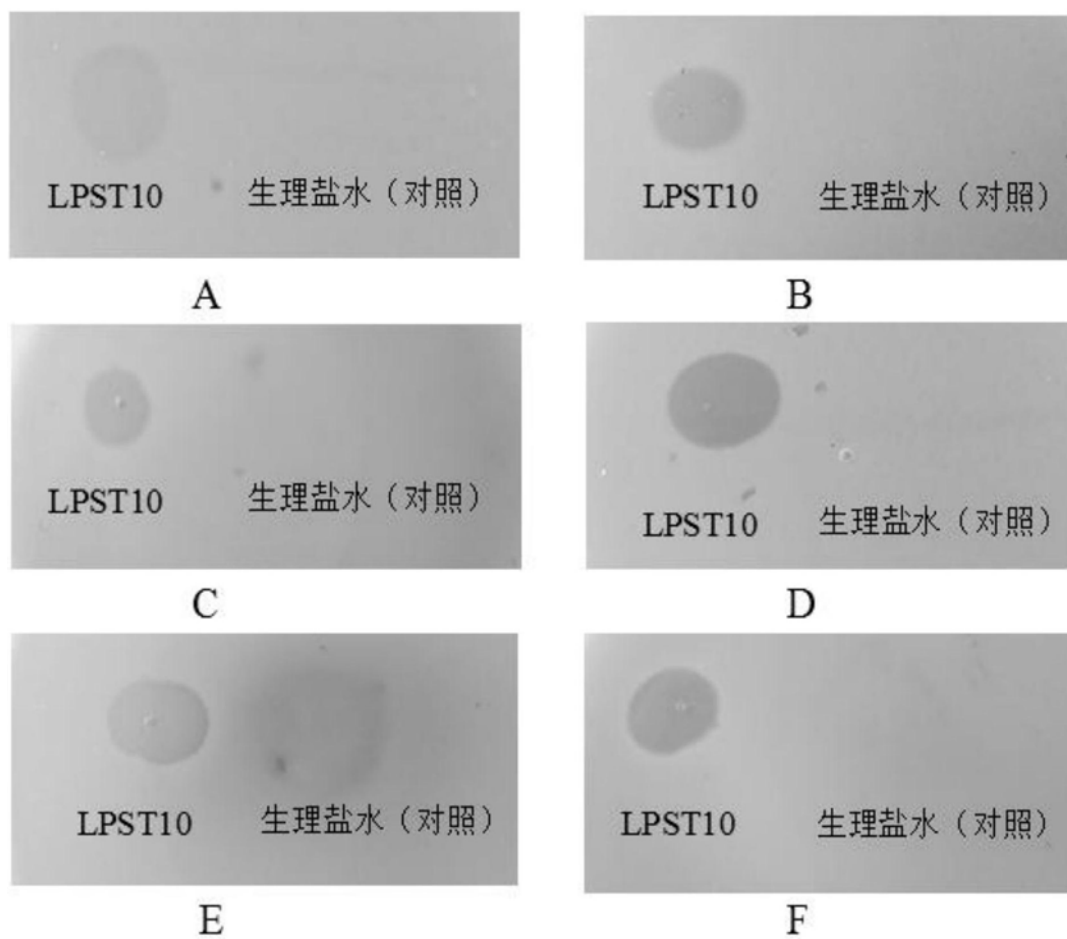


图4

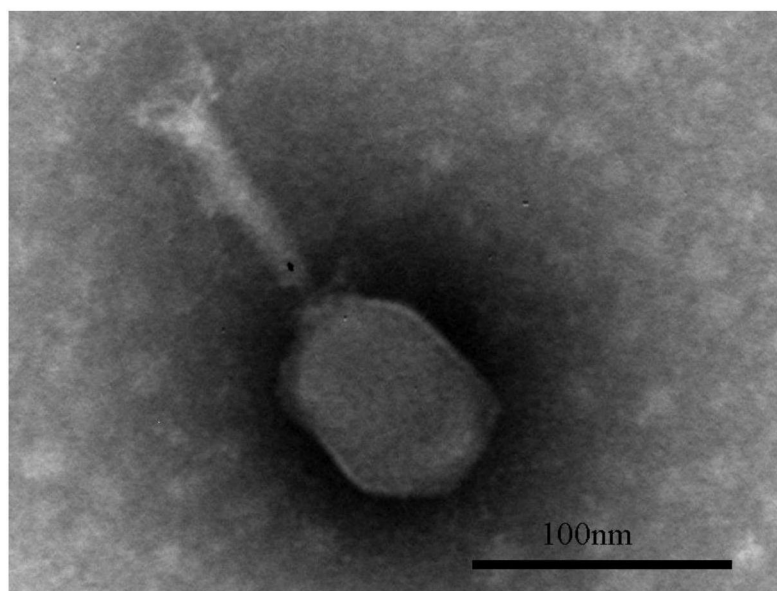


图5

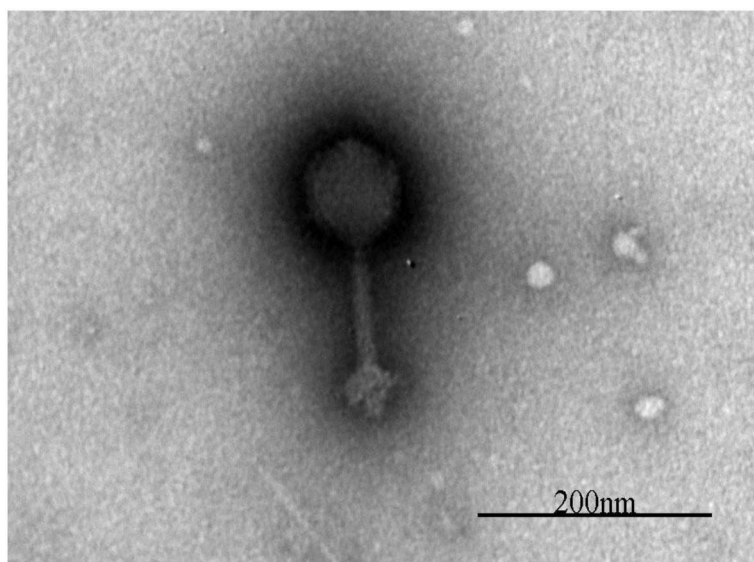


图6

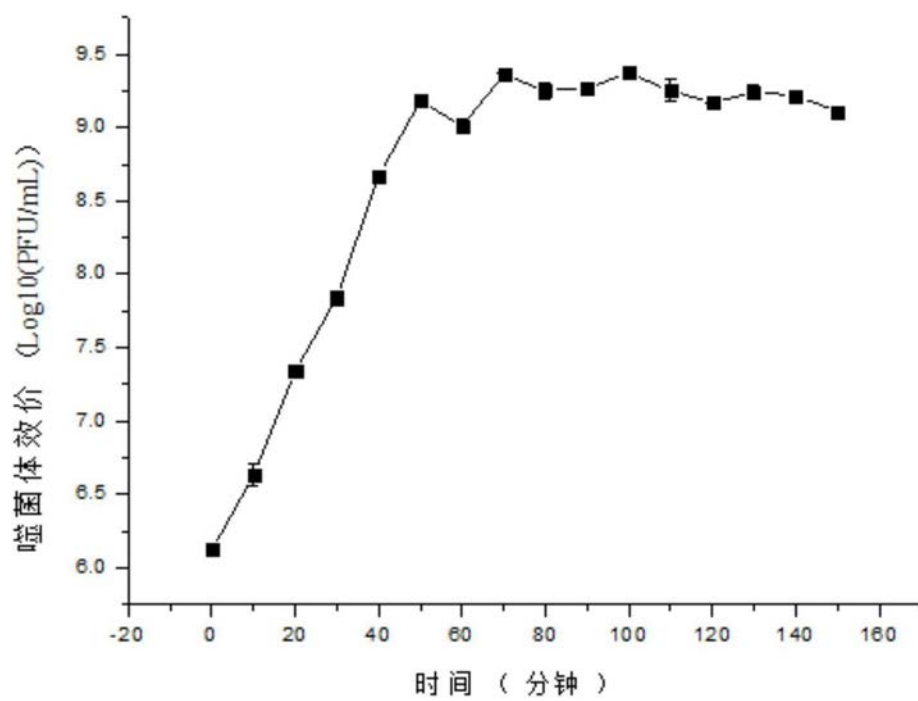


图7

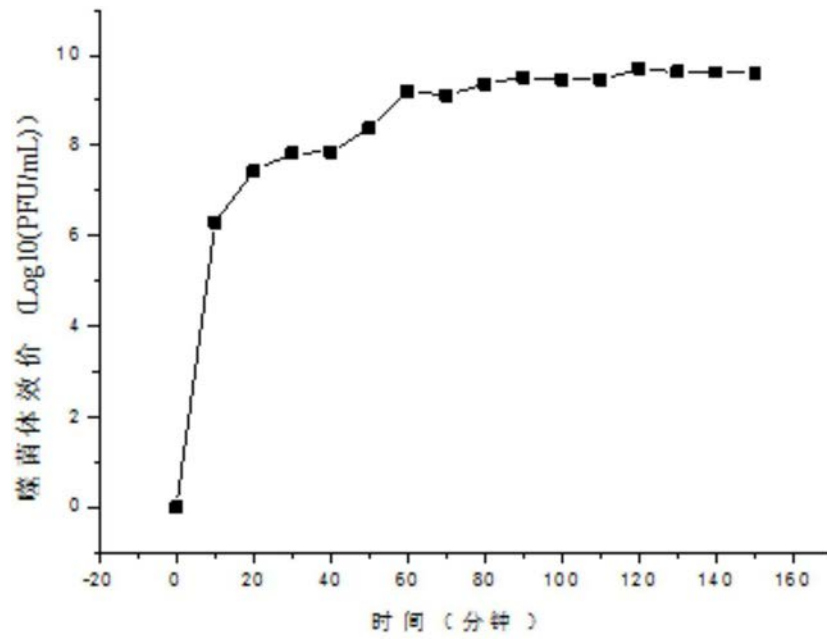


图8

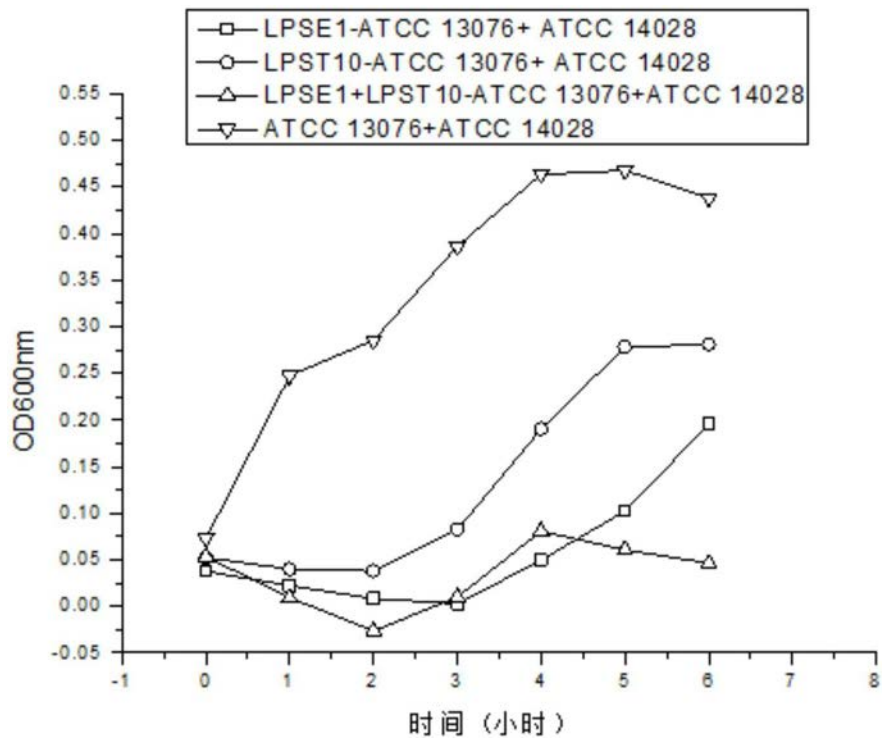


图9

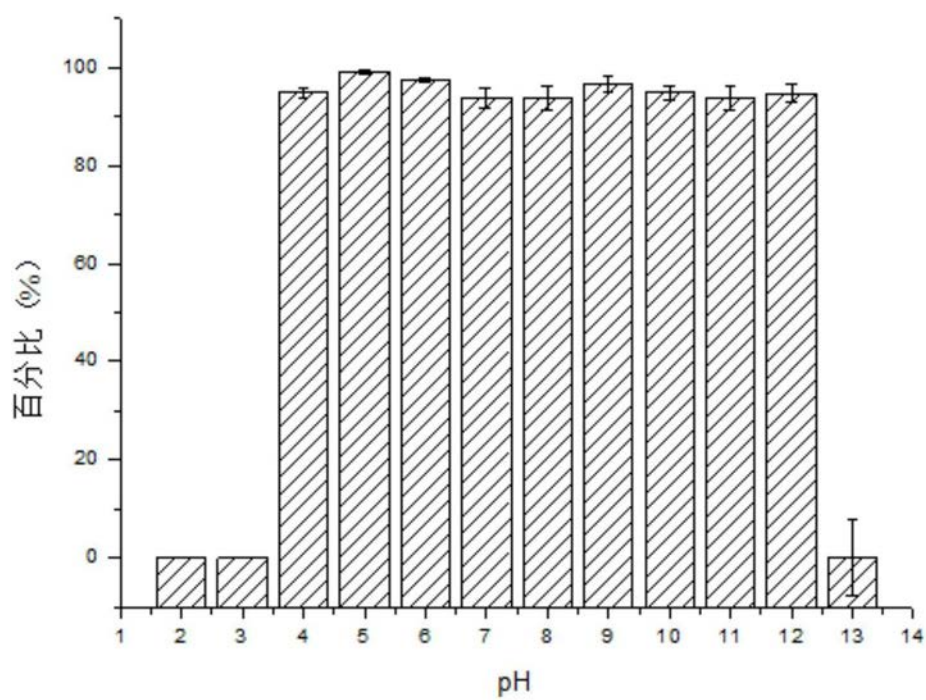


图10

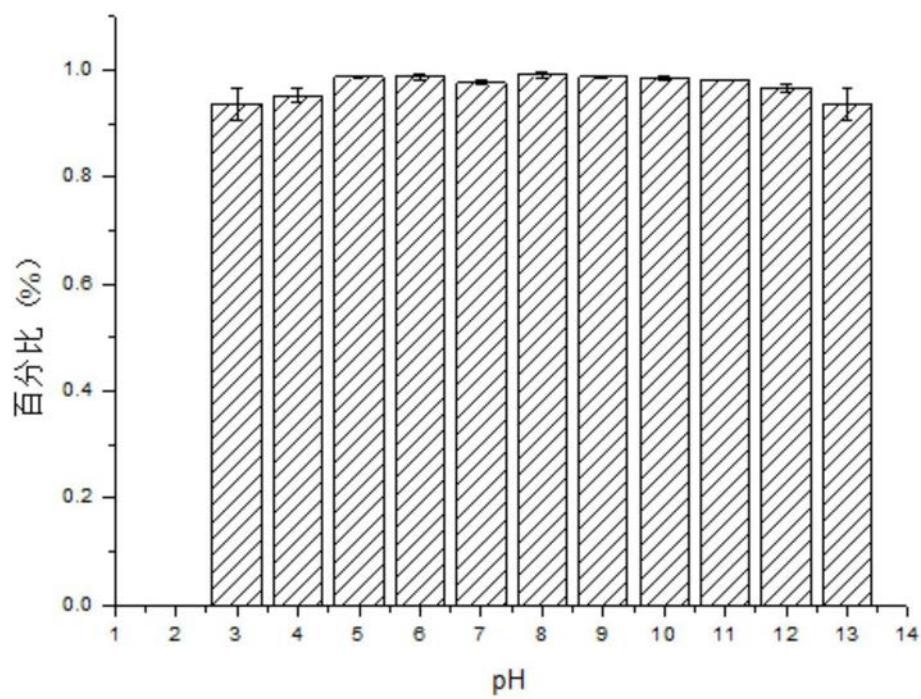


图11

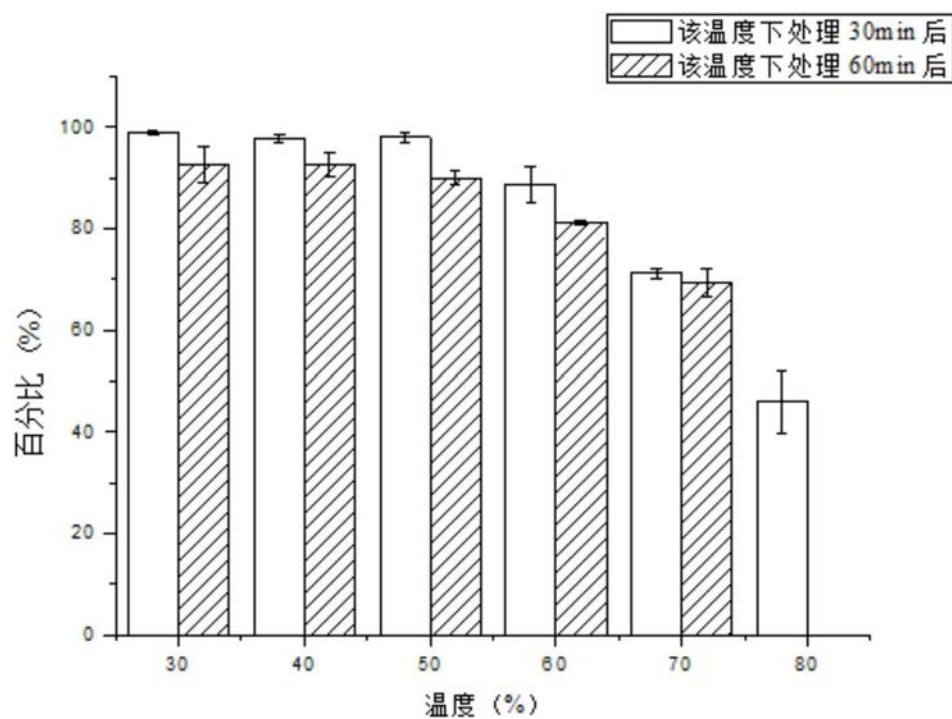


图12

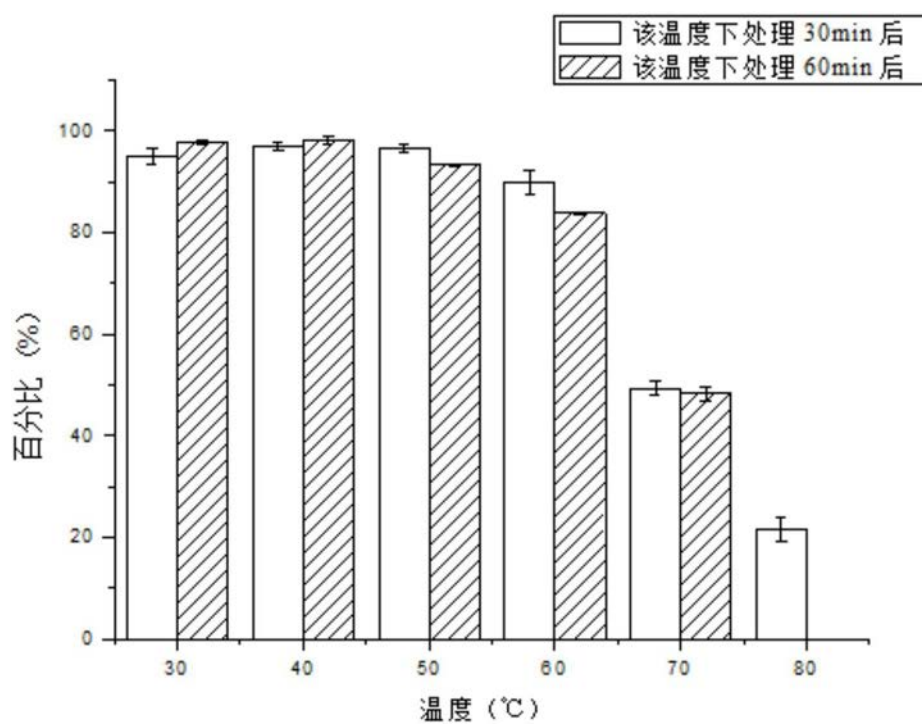


图13