

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480036371.X

[51] Int. Cl.

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 7/02 (2006.01)

A61K 35/76 (2006.01)

[43] 公开日 2007年1月3日

[11] 公开号 CN 1890366A

[22] 申请日 2004.11.6

[21] 申请号 200480036371.X

[30] 优先权

[32] 2003.11.19 [33] EP [31] 03026432.9

[86] 国际申请 PCT/EP2004/012585 2004.11.6

[87] 国际公布 WO2005/049813 英 2005.6.2

[85] 进入国家阶段日期 2006.6.7

[71] 申请人 雀巢技术公司

地址 瑞士沃韦

[72] 发明人 P·布卢维尔

C·布瓦森-德拉波特 H·约斯腾

A·拉尔多

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 刘金辉

权利要求书4页 说明书17页 附图3页

[54] 发明名称

分离的噬菌体和它们作为食品中消毒剂或用于工厂环境卫生的用途

[57] 摘要

本发明涉及对阪崎肠杆菌菌株具有强裂解活性的噬菌体分离物和它们作为食品，特别是婴儿配方中和用于工厂环境卫生的抗微生物剂的用途。本发明还涉及用其制备的食品组合物和抗微生物剂。

1. 噬菌体分离物，其对阪崎肠杆菌具有实质裂解潜力。

2. 根据权利要求1的噬菌体分离物，所述噬菌体分离物：

i) 在固体培养基上使用斑点测定试验的试验中具有感染选自 FSM-16、FSM-33、FSM-261、FSM-265、FSM-266、FSM-269、FSM-270、FSM-271、FSM-272、FSM-273、FSM-274、FSM-280、FSM-281、FSM-284、FSM-286、FSM-288、FSM-290、FSM-292、FSM-297、FSM-298、FSM-300、FSM-303、FSM-305、FSM-308、FSM-309、FSM-311、FSM-313、FSM-314、FSM-316、FSM-318、FSM-322、FSM-323、FSM-1360、FSM-1387-2NL、FSM-MC7、FSM-MC8、FSM-MC9、FSM-MM10 和 FSM-MM11 的阪崎肠杆菌的至少 9 种细菌菌株和，

ii) 在液体培养基中具有感染选自 FSM-16、FSM-33、FSM-261、FSM-265、FSM-266、FSM-269、FSM-270、FSM-271、FSM-272、FSM-273、FSM-274、FSM-280、FSM-281、FSM-284、FSM-286、FSM-288、FSM-290、FSM-292、FSM-297、FSM-298、FSM-300、FSM-303、FSM-305、FSM-308、FSM-309、FSM-311、FSM-313、FSM-314、FSM-316、FSM-318、FSM-322、FSM-323、FSM-1360、FSM-1387-2NL、FSM-MC7、FSM-MC8、FSM-MC9、FSM-MM10 和 FSM-MM11 的阪崎肠杆菌的至少 9 种细菌菌株的能力。

3. 根据权利要求1或2的噬菌体分离物，其以保藏号 CNCM I-3127 保藏。

4. 根据权利要求1或2的噬菌体分离物，其以保藏号 CNCM I-3128 保藏。

5. 根据权利要求1或2的噬菌体分离物，其以保藏号 CNCM I-3129 保藏。

6. 根据权利要求1或2的噬菌体分离物，其以保藏号 CNCM I-3130 保藏。

7. 根据权利要求1或2的噬菌体分离物，其以保藏号 CNCM I-3131 保

藏。

8. 根据权利要求1或2的噬菌体分离物, 其以保藏号 CNCMI-3132 保藏。

9. 根据权利要求1或2的噬菌体分离物, 其以保藏号 CNCMI-3133 保藏。

10. 噬菌体混合物, 其含有根据权利要求1至9之一的至少一种噬菌体分离物, 所述噬菌体分离物感染来自 FSM-16、FSM-33、FSM-261、FSM-265、FSM-266、FSM-269、FSM-270、FSM-271、FSM-272、FSM-273、FSM-274、FSM-280、FSM-281、FSM-284、FSM-286、FSM-288、FSM-290、FSM-292、FSM-297、FSM-298、FSM-300、FSM-303、FSM-305、FSM-308、FSM-309、FSM-311、FSM-313、FSM-314、FSM-316、FSM-318、FSM-322、FSM-323、FSM-1360、FSM-1387-2NL、FSM-MC7、FSM-MC8、FSM-MC9、FSM-MM10 和 FSM-MM11 的阪崎肠杆菌菌株的至少 80%。

11. 食品, 其含有对阪崎肠杆菌具有实质裂解潜力的至少一种噬菌体分离物或混合物。

12. 根据权利要求11的食品, 其中噬菌体分离物或混合物为根据权利要求1至10的噬菌体分离物或混合物。

13. 根据权利要求11或12的食品, 所述食品是基于乳的产品、营养组合物、宠物食品、饮食添加剂或处于受到阪崎肠杆菌污染危险中的任意食品的形式。

14. 根据权利要求13的食品, 其中所述基于乳的产品为发酵乳、酸乳酪、凝乳、乳酪、新鲜乳酪、发酵产品、凝乳(renneted milk)、饮料、基于乳的粉剂、婴儿配方或干粉状婴儿配方。

15. 根据权利要求11至14之一的食品, 其中噬菌体分离物或混合物为有效防止所述产品中阪崎肠杆菌污染和过度生长的量。

16. 根据权利要求15的食品, 其中噬菌体分离物以至少每 ml 食品  $1 \times 10^4$  pfu 或如果是固体, 每克食品  $1 \times 10^4$  pfu 的量存在。

17. 通过防止阪崎肠杆菌污染和过度生长用于食品净化和工厂环境

卫生的活性剂,所述活性剂包含有效量的根据权利要求 1 至 10 中一项的至少一种噬菌体分离物或混合物。

18. 根据权利要求 17 的活性剂,其中噬菌体分离物以至少每 ml  $1 \times 10^4$  pfu 或如果是固体,每克  $1 \times 10^4$  pfu 的量存在。

19. 根据权利要求 17 或 18 的活性剂,其中食品为基于乳的产品,诸如发酵乳、酸乳酪、凝乳、乳酪、新鲜乳酪、基于乳的发酵产品、凝乳(renneted milk)、饮料、基于乳的粉剂、婴儿配方、干粉状婴儿配方;非乳发酵产品;基于大豆的产品、营养配方、乳产品、冷冻或耐贮存的饮料、水、汤、食品添加剂、膳食替代物、营养条或甜食、宠物食品、糖或甜饮料、冰淇淋、甜食条、早餐谷片或早餐谷条或用于临床营养的营养添加剂或处于阪崎肠杆菌污染危险中的任意食物。

20. 根据权利要求 1 至 10 中一项的至少一种噬菌体分离物或混合物的用途,用于食品的净化和工厂环境的卫生。

21. 根据权利要求 20 的用途,其中食品为基于乳的产品,诸如发酵乳、酸乳酪、凝乳、乳酪、新鲜乳酪、基于乳的发酵产品、凝乳(renneted milk)、饮料、基于乳的粉剂、婴儿配方、干粉状婴儿配方;非乳发酵产品;基于大豆的产品、营养配方、乳产品、冷冻或耐贮存的饮料、水、汤、食品添加剂、膳食替代物、营养条或甜食、宠物食品、糖或甜饮料、冰淇淋、甜食条、早餐谷片或早餐谷条或用于临床营养的营养添加剂或处于阪崎肠杆菌污染危险中的任意食物。

22. 根据权利要求 1 至 10 中一项的至少一种噬菌体分离物的用途,用于制备用以防止或治疗人或动物中阪崎肠杆菌引起的感染的组合物。

23. 根据权利要求 20 至 22 中一项的用途,其中噬菌体分离物以有效防止阪崎肠杆菌污染和过度生长的量存在。

24. 根据权利要求 20 至 23 中一项的用途,其中噬菌体分离物或混合物以每 ml 至少  $1 \times 10^4$  pfu 的量使用。

25. 用于食品净化或工厂环境卫生的方法,其包括使用对阪崎肠杆菌具有实质裂解潜力的至少一种噬菌体分离物或混合物。

26. 根据权利要求 25 的方法，其中噬菌体分离物是根据权利要求 1 至 10 的一项的噬菌体分离物。

27. 选择对阪崎肠杆菌具有实质裂解潜力的噬菌体分离物的方法，其由筛选：

i) 在固体培养基上使用斑点测定试验的试验中具有感染选自 FSM-16、FSM-33、FSM-261、FSM-265、FSM-266、FSM-269、FSM-270、FSM-271、FSM-272、FSM-273、FSM-274、FSM-280、FSM-281、FSM-284、FSM-286、FSM-288、FSM-290、FSM-292、FSM-297、FSM-298、FSM-300、FSM-303、FSM-305、FSM-308、FSM-309、FSM-311、FSM-313、FSM-314、FSM-316、FSM-318、FSM-322、FSM-323、FSM-1360、FSM-1387-2NL、FSM-MC7、FSM-MC8、FSM-MC9、FSM-MM10 和 FSM-MM11 的阪崎肠杆菌的至少 9 种细菌菌株和，

ii) 在液体培养基中具有感染选自 FSM-16、FSM-33、FSM-261、FSM-265、FSM-266、FSM-269、FSM-270、FSM-271、FSM-272、FSM-273、FSM-274、FSM-280、FSM-281、FSM-284、FSM-286、FSM-288、FSM-290、FSM-292、FSM-297、FSM-298、FSM-300、FSM-303、FSM-305、FSM-308、FSM-309、FSM-311、FSM-313、FSM-314、FSM-316、FSM-318、FSM-322、FSM-323、FSM-1360、FSM-1387-2NL、FSM-MC7、FSM-MC8、FSM-MC9、FSM-MM10 和 FSM-MM11 的阪崎肠杆菌的至少 9 种细菌菌株的能力的噬菌体分离物组成。

## 分离的噬菌体和它们作为食品中消毒剂 或用于工厂环境卫生的用途

### 发明领域

本发明涉及对阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*)菌株具有强裂解活性的噬菌体分离物和它们作为抗微生物剂在食品，特别是婴儿配方和用于工厂环境卫生的用途。

### 发明背景

肠杆菌代表从巴氏灭菌乳制备的乳产品的“再污染菌群”的主要部分。它们的存在常常表明卫生处理不充分和/或加工设备建设有缺点。在干燥产品诸如奶粉中常常发现肠杆菌属的成员。

在肠杆菌中，阪崎肠杆菌可以引起严重感染，特别是在非常幼小的儿童中引起严重感染。在新生儿和婴儿中它牵涉稀少但非常严重形式的新生儿脑膜炎，干燥婴儿配方为所涉及的传播方式。

由于生产成本太高，无菌生产干燥婴儿配方是不可行的。因此，在加工期间生产商依赖于使用消毒剂和特定卫生工作区以提供安全产品。然而，当重构的婴儿配方没有快速消费并在室温存放时，少量的细菌可以生长到相当大的数量。这可使该产品对消费该产品的婴儿具有潜在危险。

考虑到现有技术的缺陷，本发明的问题在于提供食物，特别是基于乳的产品，诸如婴儿配方，其甚至在有利于阪崎肠杆菌生长的条件下保存后也可以是安全的。而且，本发明的目的是开发可以在任意食品中用于阪崎肠杆菌的去污和用于工厂环境卫生的安全活性剂。

通过提供对阪崎肠杆菌具有实质裂解潜力的安全并且无毒的噬菌体制剂解决了此问题。

## 发明概述

本发明的一个目的是开发新的并且有用的对阪崎肠杆菌具有实质裂解潜力的噬菌体分离物，所述噬菌体分离物可以单独使用或混合使用以防止或处理食品特别是婴儿配方和工厂环境来免于或者消除阪崎肠杆菌引起的污染。

因此本发明的另一目的是提供含有选择性裂解阪崎肠杆菌的噬菌体分离物的食品，特别是基于乳的配方、营养组合物、宠物食品、饮食添加剂或处于阪崎肠杆菌污染危险的食物。

本发明的又一目的是提供用于净化食品和工厂环境卫生的活性剂，所述活性剂包含有效量的如以上描述的至少一种噬菌体分离物或混合物。

本发明的另一实施方案涉及如以上描述的至少一种噬菌体分离物或混合物的用途，用于净化食品和工厂环境卫生或制备用于防止或治疗人或动物中阪崎肠杆菌引起的感染的组合物。

本发明的另一目的是提供消毒食品或工厂环境卫生的方法，所述方法包括使用如以上描述的对阪崎肠杆菌具有实质裂解潜力的至少一种噬菌体制剂。

还涉及用于选择如以上描述的对阪崎肠杆菌具有实质裂解潜力的噬菌体分离物的方法。

本发明的主要优点是它提供了对阪崎肠杆菌具有高度特异性的净化剂。它可以防止任意食品中阪崎肠杆菌的污染和过度生长，特别用于基于乳的产品，诸如婴儿配方。它对于治疗或预防人或动物中阪崎肠杆菌引起的感染也是有效的。

本发明的另一优点是提供了有助于消毒、清洁和净化工厂中工作表面或加工设备以及地面、墙壁等等的活性剂。

本发明的另一优点是提供了环境安全和对人无毒性的活性剂。

## 发明详述

以下描述中，术语“FSM 噬菌体”表示食物安全微生物噬菌体保藏中心 (Food Safety Microbiology bacteriophage collection)(Nestlé Research Centre, Vers-chez-les-Blanc, Lausanne, 瑞士)。

根据第一方面，与用于消毒食物和工厂环境卫生的活性剂有关，所述活性剂包含对阪崎肠杆菌具有实质裂解潜力的至少一种噬菌体分离物。

用斑点测定试验(Pelczar, M. J. , E. C. S. Chan 和 N. R. Krieg. *Microbiology concepts and applications, Chapter 16 Viruses: cultivation methods, pathogenicity* p. 436-452, McGraw-Hill, Inc. New York 1993)或在液体培养物中(H. W. Ackermann 和 M. S. DuBow. *Viruses of Prokaryotes volume 1. Chapter 6. Description and identification of new phages* p. 103-142. CRC Press Inc, Boca Raton, Florida, 美国)通过筛选感染阪崎肠杆菌菌株的候选噬菌体可以获得根据本发明的噬菌体。在实施例 1 中详细描述了用于选择根据本发明的噬菌体的方法。优选地，选择：

i) 在固体培养基上能够感染选自 FSM-16、FSM-33、FSM-261、FSM-265、FSM-266、FSM-269、FSM-270、FSM-271、FSM-272、FSM-273、FSM-274、FSM-280、FSM-281、FSM-284、FSM-286、FSM-288、FSM-290、FSM-292、FSM-297、FSM-298、FSM-300、FSM-303、FSM-305、FSM-308、FSM-309、FSM-311、FSM-313、FSM-314、FSM-316、FSM-318、FSM-322、FSM-323、FSM-1360、FSM-1387-2NL、FSM-MC7、FSM-MC8、FSM-MC9、FSM-MM10 和 FSM-MM11 的阪崎肠杆菌的至少 9 种细菌菌株，和

ii) 在液体培养基中能够感染选自 FSM-16、FSM-33、FSM-261、FSM-265、FSM-266、FSM-269、FSM-270、FSM-271、FSM-272、FSM-273、FSM-274、FSM-280、FSM-281、FSM-284、FSM-286、FSM-288、FSM-290、FSM-292、FSM-297、FSM-298、FSM-300、FSM-303、FSM-305、FSM-308、FSM-309、FSM-311、FSM-313、FSM-314、FSM-316、FSM-318、FSM-322、FSM-323、FSM-1360、FSM-1387-2NL、FSM-MC7、FSM-MC8、FSM-MC9、FSM-MM10 和

### FSM-MM11 的阪崎肠杆菌的至少 9 种细菌菌株的噬菌体分离物。

在优选的实施方案中，噬菌体分离物为 FSM-噬菌体 67/33/1、FSM-噬菌体 F、FSM-噬菌体 9/261、FSM-噬菌体 F/316 和 FSM-噬菌体 73/311/2、FSM-噬菌体 73/261、FSM-噬菌体 33/33/1、FSM-噬菌体 28/145/2 和 FSM-噬菌体 10/261/1。

在最优选的实施方案中，噬菌体 FSM-噬菌体 10/261/1、FSM-噬菌体 73/261、FSM-噬菌体 33/33/1、FSM-噬菌体 67/33/1、FSM-噬菌体 F/316、FSM-噬菌体 9/261 和 FSM-噬菌体 73/311/2 与它们对应的繁殖株一起例如在 2003 年 11 月 14 日保藏在巴斯德研究所(Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, F-75024 Paris CEDEX 15, 法国)，保藏号分别为 CNCM I-3127、CNCM I-3128、CNCM I-3129、CNCM I-3130、CNCM I-3131、CNCM I-3132 和 CNCM I-3133。

有利地，保藏的噬菌体能裂解来自 Nestlé Research Centre 保藏中心的 39 株阪崎肠杆菌的至少 80 %。此保藏中心代表可以在食品，特别是婴儿配方中发现的阪崎肠杆菌。用根据本发明的噬菌体材料，通过用至少两种噬菌体的噬菌体混合物可以获得大约 97% 的覆盖率。优选地，所述噬菌体不能识别不相关的细菌，诸如革兰氏阴性乳酸细菌。

因此，根据又一方面，本发明涉及如以上描述的至少一种噬菌体分离物在任意食品或营养添加剂中的用途，用于防止阪崎肠杆菌的污染和过度生长。食品或药品的实例为乳、酸乳酪、凝乳、乳酪、发酵乳、基于乳的发酵产品、冰淇淋、发酵的基于谷类的产品、基于乳的粉剂、婴儿配方或片剂、液体混悬剂、干的经口添加剂、湿润的经口添加剂、干管食品。用于制备它们的方法是普通知识。

根据本发明的组合物也可以包含常用赋形剂，特别是增甜剂、调味剂或防腐剂。它还可以包含益生微生物。根据本领域公知的许多技术中的任意一种可以配制本发明的组合物。

在另一实施方案中，制备了含有根据本发明的至少一种噬菌体分离物

的食物组合物。此组合物可以是营养完全配方、婴儿配方、乳产品、冷冻或耐贮存饮料、水、汤、食品添加剂、膳食替代物、营养条或甜食。在最优实施方案中，可以将噬菌体加入干粉状婴儿配方中。

在另一实施方案中，普通食品中可以富集根据本发明的至少一种噬菌体分离物。所述食品为例如，发酵乳、酸乳酪、新鲜乳酪、凝乳(renneted milk)、甜食，例如糖或甜饮料、甜食条、早餐谷片或条、饮料、奶粉、基于大豆的产品、非乳发酵产品或用于临床营养的营养添加剂。

一旦根据本发明选择了噬菌体分离物，在如以上谈及的产品中就可以以至少大约  $10^4$  pfu(噬斑形成单位/ml 或克(取决于噬菌体以干燥或湿润状态加入)的量，更优选大约  $10^6$  至大约  $10^{11}$  pfu/ml 或每克的量单独或以噬菌体混合物包括所述噬菌体分离物。用产品，例如婴儿配方奶粉作为支持材料通过喷雾干燥、冷冻干燥或在液体样品容器中可以制备噬菌体分离物。它也可以作为额外包装(例如小袋)前用作与产品混合的添加剂。

而且，进行根据本发明的噬菌体的应用或在工厂环境中喷雾或其他应用的目的是抑制靶细菌的生长。通过常规方法可以制备此类组合物。对于此种应用，噬菌体的量优选至少大约  $10^6$  pfu(噬斑形成单位)/ml 或克，更优选大约  $10^6$  至大约  $10^{11}$  pfu/ml 或克。

给出以下实施例仅仅用于阐明并且绝不应理解成限制本申请的主题。实施例之前是附图简述。

图 1 是曲线图，显示了在接种了  $10^8$  pfu/ml 噬菌体混合物(FSMCC-噬菌体 # 67/33/1、F/316、9/261、73/311/2)(●)或无噬菌体混合物(▲)的 BHI 培养液中阪崎肠杆菌菌株混合物(FSMCC# 145、286、290、305、1987/2NL)的生长。

图 2 是曲线图，显示了在接种了  $10^8$  pfu/ml 噬菌体混合物(FSMCC-噬菌体 # 67/33/1、F/316、9/261、73/311/2)(●)或无噬菌体混合物(▲)的重构的婴儿配方中阪崎肠杆菌菌株混合物(FSMCC# 145、286、290、305、1987/2NL)的生长。

图 3 是曲线图，显示了在用噬菌体混合物(FSMCC-噬菌体 # 67/33/1、

F/316、9/261、73/311/2)以  $10^8$  pfu/ml 噬菌体处理(●)或不用噬菌体混合物(▲)处理的不锈钢盘表面阪崎肠杆菌菌株混合物(FSMCC# 145、286、290、305、1987/2NL)的生长。

## 实施例

### 实施例 1: 根据本发明的噬菌体的筛选

用来自 Nestlé Food Safety Microbiology 噬菌体保藏中心的一组 114 种噬菌体分离物对来自食品安全培养物培养物保藏中心(Food Safety Microbiology culture collection )(FSMCC)的 39 种阪崎肠杆菌菌株进行检测。这些菌株分别在表 1 和表 2 中给出。

	来源	FSMCC n°		来源	FSMCC n°
1	工厂环境	9/145/1	58	污水(主要是泥)	64/33/2
2	“	9/145/2	59	“	64/311
3	“	9/145/3	60	污水(湖中的通道排斥)	66/311/1
4	“	9/145/4	61	“	66/311/2
5	“	9/145/5	62	“	67/33/1
6	“	9/261	63	“	67/33/2
7	“	9/261/2	64	“	67/300/1
8	“	10/145/1	65	“	67/300/2
9	“	10/145/2	66	“	67/311/1
10	“	10/145/3	67	“	67/311/2
11	“	10/145/4	68	污水(沙上过滤前水到达)	61/MC9/1
12	“	10/261/1	69	“	61/MC9/2
13	“	10/261/2	70	“	61/MC9/3
14	“	10/261/3	71	污水(主要是泥)	64/MC9/1
15	“	10/261/4	72	“	64/MC9/2
16	“	10/261/5	73	污水(湖中的通道排斥)	66/MC9/1

17	废水	16/145	74	“	66/MC9/2
18	工厂环境	22/145/1	75	“	67/MC9/1
19	“	22/145/2	76	“	67/MC9/2
20	“	22/145/3	77	污水(水入口)	73/33/1
21	“	22/145/4	78	“	73/33/2
22	“	22/145/4	79	“	73/261/1
23	“	23/16	80	“	73/261/2
24	“	23/145/1	81	“	73/300/1
25	“	23/145/2	82	“	73/300/2
26	“	23/145/3	83	“	73/311/1
27	“	23/145/4	84	“	73/311/2
28	“	23/145/5	85	“	73/MC9/1
29	“	23/1387	86	“	73/MC9/2
30	“	28/16	87	污水(水出口)	74/MC9/1
31	“	28/145/1	88	“	74/MC9/2
32	“	28/145/2	89	污水(生物水)	75/311/1
33	“	33/33/1	90	“	75/311/2
34	“	33/33/2	91	“	75/MC9/1
35	“	33/33/3	92	“	75/MC9/2
36	“	33/33/4	93	污水(水入口)	76/33/1
37	“	33/33/5	94	“	76/33/2
38	“	46/MC9/1	95	“	76/311/1
39	“	46/MC9/2	96	“	76/311/2
40	“	58/MC9/1	97	“	76/311/3
41	“	58/MC9/2	98	“	76/311/4
42	“	58/MC9/3	99	“	76/311/5
43	污水	61/33/5	100	“	76/MC9/1
44	“	61/33/6	101	“	76/MC9/2
45	“	61/33/7	102	污水(水出口)	77/33/1
46	“	61/33/8	103	“	77/33/2
47	“	61/300	104	“	77/311/1
48	“	61/300/1	105	“	77/311/2
49	“	61/300/2	106	“	77/MC9/1
50	“	61/311/1	107	“	77/MC9/2
51	“	61/311/2	108	污水(生物水)	78/33/1
52	“	61/311/3	109	“	78/33/2
53	“	61/311/4	110	“	78/311/1
54	“	61/311/5	111	“	78/311/2
55	“	62/300/1	112	“	78/MC9/1
56	“	62/300/2	113	“	78/MC9/2
57	污水(主要是泥)	64/33/1	114	工厂环境	F/316

表 1. 研究的噬菌体分离物

FSM- 编号	来源	FSM- 编号	来源
Mal-16 (16)	成品: 谷类	300	奶工厂环境
33	婴儿配方	303	奶工厂环境
261	Munich University	305	奶工厂环境
265	未知	308	奶工厂环境
266	未知	309	奶工厂环境
269	奶工厂环境	311	奶工厂环境
270	奶工厂环境	313	奶工厂环境
271	奶工厂环境	314	奶工厂环境
272	奶工厂环境	316	奶工厂环境
273	奶工厂环境	318	奶工厂环境
274	奶工厂环境	322	奶工厂环境
280	奶工厂环境	323	奶工厂环境
281	奶工厂环境	1360	奶工厂环境
284	奶工厂环境	1387-2NL	奶工厂环境
286	奶工厂环境	MC7	Wageningen University
288	奶工厂环境	MC8	Wageningen University
290	奶工厂环境	MC9	Wageningen University
292	奶工厂环境	MM10	Wageningen University
297	奶工厂环境	MM11	Wageningen University
298	奶工厂环境		

表 2. 阪崎肠杆菌菌株

在固体培养基上筛选

噬斑的分离和噬菌体扩增

采样:

取污水样品(大约 50 ml)用于噬菌体的研究。用 pH 试纸条测定每个样品的 pH(如果 pH 低于 5, 用 1N NaOH 调节到 7)。

然后将样品进行以下步骤:

1. 2500g 离心 10 分钟(以除去大的残余物)。
2. 用 0.20 $\mu$ m 过滤器过滤上清液(以除去细菌)。
3. 如以下进行检测或 4 $^{\circ}$ C 保存样品最长 1 或 2 天。

对于噬菌体的分离, 将以上预处理的样品进行或不进行预扩增后平行地检测。一旦检测到存在噬菌体, 将它们扩增并保存。

无预扩增的筛选:

### 步骤 1: 细菌培养物的制备

制备在脑心浸液(BHI, Oxoid CM225)中 30℃过夜生长的阪崎肠杆菌培养物, 然后将 0.5 ml 此培养物转移到 4ml 新鲜 BHI 中, 40℃孵育 1 小时。

### 步骤 2: 向细菌中加入样品:

向维持在  $45 \pm 1^\circ\text{C}$  的含有 3ml 软 BHI 琼脂(BHI 培养液+ 0.6%琼脂)的试管中加入 100 $\mu\text{l}$  阪崎肠杆菌培养物(如以上制备)+ 100 $\mu\text{l}$  待检测的处理样品。

### 步骤 3: 接种培养皿

用 Vortex 混合试管内容物( $\pm 2$  秒)。然后将全部试管内容物倒在含有薄层 BHI 琼脂的培养皿表面, 使它在实验台上固化。将培养皿倒置 30℃过夜孵育。

### 步骤 4. 结果的解释

注意每个培养皿上裂解噬斑的存在或不存在。

### 步骤 5: 对照

准备阳性对照(阪崎肠杆菌菌株 n°261+ 浓度为 2-3log pfu/ml 的针对此种菌株的活性噬菌体): 应用步骤 1 至 4。

准备不加入噬菌体的阴性对照: 应用步骤 1 至 4, 不加入噬菌体或待检测样品。

### 预扩增的筛选:

#### 步骤 1-第 1 天: 制备细菌培养物:

制备在脑心浸液(BHI, Oxoid CM225)中 30℃过夜生长的阪崎肠杆菌培养物, 然后将 0.5 ml 此培养物转移到 4ml 新鲜 BHI 中, 40℃孵育 1 小时。

#### 步骤 2-第 1 天: 样品中噬菌体的扩增

在含有 4ml BHI 培养液的试管中, 加入 100 $\mu\text{l}$  阪崎肠杆菌培养物(如步骤 1 中制备)+ 1ml 待检测的处理样品, 在 150-200 转/分钟搅拌下于 30℃孵育 3-5 小时。将它们留在实验台上过夜。

步骤 3-第 2 天: 2500 转/分钟离心 10 分钟

步骤 4-第 2 天: 制备细菌培养物:

制备在脑心浸液(BHI, Oxoid CM225)中 30℃过夜生长的阪崎肠杆菌培养物, 然后将 0.5 ml 此培养物转移到 4ml 新鲜 BHI 中并在 40℃孵育 1 小时。

步骤 5-第 2 天: 向细菌中加入样品

向维持在  $45 \pm 1^\circ\text{C}$  的含有 3ml 软 BHI 琼脂(BHI 培养液+ 0.6%琼脂)的试管中加入 100 $\mu\text{l}$  阪崎肠杆菌培养物(如以上制备)+ 100 $\mu\text{l}$  步骤 3 中获得的样品。

步骤 6-第 2 天: 培养皿的孵育:

用 Vortex 混合试管内容物( $\pm 2$  秒)。然后将全部试管内容物倒在含有薄层 BHI 琼脂的培养皿表面, 使它在实验台上固化。将培养皿倒置 30℃过夜孵育。

步骤 7-第 3 天: 结果解释:

注意每个培养皿上裂解噬斑的存在或不存在。

当检测到存在噬菌体时, 将它们扩增并保存。

### 裂解噬斑的扩增

步骤 1: 细菌培养物的制备:

制备在脑心浸液(BHI, Oxoid CM225)中 30℃过夜生长的阪崎肠杆菌培养物, 然后将 0.5 ml 此培养物转移到 4ml 新鲜 BHI 中, 40℃孵育 1 小时。

步骤 2: pfu 的扩增:

在含有 4ml BHI 培养液的试管中, 加入 100 $\mu\text{l}$  阪崎肠杆菌培养物(如步骤 1 中制备)+ 1 个分离 pfu(自琼脂切下), 在 150-200 转/分钟搅拌下, 30℃孵育 3-5 小时。将试管留在实验台上过夜。

步骤 3: 2500 转/分钟离心 10 分钟。

步骤 4: 用 0.20 $\mu\text{m}$  过滤器过滤上清液(以除去细菌)。

## 噬菌体的计数

### 步骤 5: 细菌培养物的制备:

制备在脑心浸液(BHI, Oxoid CM225)中 30℃过夜生长的阪崎肠杆菌培养物,然后将 0.5 ml 此培养物转移到 4ml 新鲜 BHI 中,40℃孵育 1 小时。

### 步骤 6: 向细菌加入噬菌体

向维持在  $45 \pm 1^\circ\text{C}$  的含有 3ml 软 BHI 琼脂(BHI 培养液+ 0.6%琼脂)的试管中加入 100 $\mu\text{l}$  阪崎肠杆菌培养物(如以上制备)+ 100 $\mu\text{l}$  连续稀释的步骤 4 中获得的样品。

### 步骤 7: 培养皿的接种:

用 Vortex 混合试管内容物( $\pm 2$  秒),并将全部试管内容物倒在含有薄层 BHI 琼脂的培养皿表面。然后让它在实验台上固化。将培养皿倒置 30℃过夜孵育。

### 步骤 8: 结果的解释:

计数每个培养皿上的裂解噬斑。

## 扩增后的保存

### 步骤 1: 等分试样的制备:

将大约 1.5ml 过滤的扩增噬菌体溶液(在段落“一个裂解噬斑的扩增”的步骤 4 中获得)分装到冻存管(cryo-tube)中。

### 步骤 2: 加入甘油

在每个试管中加入 15%的无菌甘油,用 Vortex 快速混合。

### 步骤 3: 在液氮中快速冷冻冻存管

### 步骤 4: 将冻存管在冰柜中-20℃保存。

## 液体培养基中的筛选

### 步骤 1, 第 0 天: 细菌培养物的制备

制备在脑心浸液(BHI, Oxoid CM225)中 30℃过夜生长的阪崎肠杆菌培养物。

#### 步骤 2, 第 1 天: 细菌培养物的制备

将 0.1ml 此培养物转移到 4ml 新鲜 BHI 中, 40℃ 孵育 6 小时(细胞的稳定生长期)。用 Tryptone Salt(TS, Oxoid L42)将细胞稀释至 3 log cfu/ml。

#### 步骤 3, 第 1 天: 微量滴定板测定

在微量滴定板测定中研究了噬菌体对阪崎肠杆菌的有效性。具有每种检测微生物的每个板设置如下: 外部孔, 200 $\mu$ l 无菌 BHI(空白对照), 其它孔, 200 $\mu$ l 经稀释的步骤 2 中制备的阪崎肠杆菌。将微量滴定板 4℃ 过夜保存。

#### 步骤 4, 第 2 天: 微量滴定板测定

自冰箱中取出微量滴定板。向阴性对照孔中加入 180 $\mu$ l BHI, 向检测孔中加入 160 $\mu$ l BHI 和 20 $\mu$ l 噬菌体悬浮液(终浓度为 8 log pfu/ml)。通过用微量培养板读数仪 Multiskan MCC340 在 620nm 对微量滴定板的光密度(零时间)读数。然后将板子在周围空气中 37℃ 孵育, 在孵育 6 小时 30 分钟和 8 小时 30 分钟后读出 OD<sub>620nm</sub>。

#### 步骤 5, 第 3 天: 微量滴定板测定

最后读数后, 将板子置于室温中总共持续时间 24 小时。然后最后一次读出 OD<sub>620nm</sub>。

## 结果

在固体培养基上检测后, 选择对选自 FSM-16、33、261、265、266、269、270、271、272、273、274、280、281、284、286、288、290、292、297、298、300、303、305、308、309、311、313、314、316、318、322、323、1360、1387/2NL、MC7、MC8、MC9、MM10 和 MM11 的 39 种阪崎肠杆菌菌株中的至少 9 种有活性的噬菌体分离物。因此, 表 3 中给出了 11 种噬菌体分离物(包括噬菌体 FSM-噬菌体 67/33/1、FSM-噬菌体 F/316、FSM-噬菌体 9/261 和 FSM-噬菌体 73/311/2)。证明一些噬菌体分离物对

## 39种细菌菌株中的至少20种有效。

		噬菌体数(FSM-噬菌体)										
		F/316	73/26 1/1	9/261	28/14 5/2	23/16	10/26 1/1	22/14 5/3	28/16	33/33 1/1	67/33 1/1	73/31 1/2
阪崎肠杆菌菌株数	16	2	2	2	2	2		2	2	0	0	0
	33	2	0	2	2	0	0	0	0	2	2	2
	261	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
	265	2	2	2						2	0	0
	266	2	2	2						2	2	0
	269	2	2	2						0	0	0
	270	2	0	2						0	2	0
	271	2	2	2						2	0	0
	272	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
	273	2	2	2						2	0	0
	274	2	2	2	0	0	2	0	0	0	2	2
	280	2	2	2						2	0	0
	281	2	2	2						2	0	0
	284	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
	286	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0
	288	2	2	2						0	0	0
	290	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0
	292	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
	297	2	2	2						0	0	0
	298		2	0	0	0	0	0	0	2	0	0
	300	2	2	0	0	0	0	0	0	0	2	2
	303	2	2	2	2	2	0	2	2	2	0	0
	305	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0
	308		2	?							2	2
	309		2	2	0	0	0	0	0	0	2	2
	311	2	2	2	0	0	0	0	0	0	2	2
	313	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0
	314	2	2	2						2	2	0
	316	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
	318	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
322	2	2	2						2	2	0	
323	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	
1360	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	2	
1387/2NL	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	2	
MC7	0		0	2	2	0				0	0	
MC8	2		2	2	2	2				0	0	
MC9	2		2	2	2	2				2	2	
MM10	2		2	2	2	2				0	0	
MM11	2		0	2	2	2				2	0	

表3: 根据固体培养基中获得的结果的噬菌体选择

说明: 0无活性; 2有活性。

为了选择根据本发明的噬菌体分离物，还在液体培养基上检测了所述噬菌体。结果在表4中给出。

		噬菌体数(FSM-噬菌体)										
		67/33/1	10/261/ <sub>1</sub>	F/316	9/261	33/33/1	73/311/ <sub>2</sub>	28/145/ <sub>2</sub>	73/261/ <sub>1</sub>	23/16	28/16	22/145/ <sub>3</sub>
阪崎肠杆菌菌株数	16	2	2	2	2	0	0	2	2	2	0	0
	33	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
	261	2	2	2	2	2	2	0	2	0	0	0
	265	2	2	0	0	2	0	2	2	2	0	0
	266	2	2	2	2	2	2	2	0	2	0	2
	269	2	2	2	2	0	2	0	0	0	0	0
	270	2	0	0	2	0	2	0	2	0	0	0
	271	2	2	2	0	2	0	2	0	0	0	0
	272	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
	273	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
	274	2	2	2	0	2	2	?	0	0	2	2
	280	2	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0
	281	2	2	2	2	2	0	2	0	0	0	0
	284	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
	286	2	2	2	2	2	2	2	0	2	0	0
	288	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	290	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
	292	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
	297	2	?	2	2	?	2	0	0	0	0	0
	298	0	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
	300	0	2	2	2	2	2	0	2	0	0	0
	303	2	2	0	0	2	0	2	2	2	0	0
	305	2	2	2	2	0	2	0	0	0	0	0
	308	2	2	?	?	0	2	0	0	0	0	0
	309	2	2	?	?	0	2	0	0	0	0	0
	311	2	2	0	0	0	2	0	0	0	2	0
	313	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
	314	0	?	2	2	?	0	2	0	0	0	0
	316	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0
	318	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
	322	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
	323	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
	1360	0	0	2	2	2	0	0	2	0	0	0
1387/2NL	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2	0	
MC7	2	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0	
MC8	2	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	
MC9	2	2	0	0	0	2	2	0	0	0	0	
MM10	2	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0	
MM11	2	2	2	2	2	2	0	0	0	2	0	

表4: 根据液体培养基中获得的结果的噬菌体选择

说明：0 无活性；2 有活性。

如可以自表 4 得到的，一些噬菌体分离物识别 39 种阪崎肠杆菌菌株的 80% 以上。然而，其它分离物甚至识别检测菌株的不到 10%。在液体培养基中还对 39 种阪崎肠杆菌菌株的至少 9 种有活性的噬菌体分离物为可以在本发明中使用的所选择的噬菌体分离物，所述 39 种阪崎肠杆菌菌株为：FSM-16、FSM-33、FSM-261、FSM-265、FSM-266、FSM-269、FSM-270、FSM-271、FSM-272、FSM-273、FSM-274、FSM-280、FSM-281、FSM-284、FSM-286、FSM-288、FSM-290、FSM-292、FSM-297、FSM-298、FSM-300、FSM-303、FSM-305、FSM-308、FSM-309、FSM-311、FSM-313、FSM-314、FSM-316、FSM-318、FSM-322、FSM-323、FSM-1360、FSM-1387-2NL、FSM-MC7、FSM-MC8、FSM-MC9、FSM-MM10 和 FSM-MM11。优选地为以下 8 种噬菌体分离物：FSM-噬菌体 67/33/1 (CNCMI-3130)、FSM-噬菌体 F/316 (CNCMI-3131)、FSM-噬菌体 9/261 (CNCMI-3132) 和 FSM-噬菌体 73/311/2 (CNCMI-3133)、FSM-噬菌体 73/261 (CNCMI-3128)、FMS33/33/1 (CNCMI-3129)、FSM-噬菌体 28/145/2、FSM-噬菌体 10/261/1 (CNCMI-3127)。

应当理解本领域技术人员可以通过将其他噬菌体进行如以上详细描述 of 的固体和液体培养基上的筛选试验来检查和选择根据本发明的其它噬菌体分离物。

**实施例 2: 评估 BHI 和重构的婴儿配方(RIF)中噬菌体混合物对多种阪崎肠杆菌菌株混合物的效力**

为了评估噬菌体混合物对阪崎肠杆菌菌株混合物的效力，进行了以下实验。

使用了如实施例 1 和在 P. Breeuwer 等人，2003, *Journal of Applied Microbiology* 95: 967-973 中描述的阪崎肠杆菌菌株 FSM-145、286、290、305 和 1387/2NL 的混合物。这些菌株的单独过夜培养物(30°C 18 小时)用新鲜 BHI 以 1 :1 稀释并在 30°C 孵育 2 小时。通过混合等量的每种原液进行

这些菌株的混合。然后，用 100 $\mu$ l 阪崎肠杆菌混合物(如以上描述的制备)接种 BHI 培养液或 RIF，使终浓度为大约 10 cfu/ml。

检测含有 FSM\_噬菌体 67/33/1 (CNCM I-3130)、FSM\_噬菌体 F/316 (CNCM I-3131)、FSM\_噬菌体 9/261 (CNCM I-3132) 和 FSM\_噬菌体 73/311/2 (CNCM I-3133)的噬菌体分离物混合物。对于此种噬菌体分离物混合物，将不同量的每种噬菌体加入含有阪崎肠杆菌混合物的试管中以达到终浓度大约 8 log pfu/ml。也包括不加噬菌体(9.9ml BHI 或 RIF + 100 $\mu$ l 阪崎肠杆菌混合物)的阴性对照。

所有接种物在 30 $^{\circ}$ C 孵育，在不同时间间隔：0-2-4-6 小时取样。对于每种样品，通过标准平板计数方法确定培养基中存在的细菌数。

#### 结果:

结果在图 1 和 2 中给出。它表明在最低 6 小时到长达 24 小时期间，不存在噬菌体混合物时细菌混合物将生长到很高数目，而存在噬菌体混合物时没有观察到细菌生长。

总之，这些实验证实向重构的婴儿配方(RIF)中加入根据本发明的针对阪崎肠杆菌的噬菌体制剂将防止阪崎肠杆菌的生长达至少 6 小时。

#### 实施例 3: 噬菌体制剂对环境卫生的作用

为了评估噬菌体混合物对阪崎肠杆菌菌株混合物人工污染的表面的作用，进行了以下实验。

##### 步骤 1: 细菌培养物的制备

使用阪崎肠杆菌菌株混合物(FSM-145、286、290、305 和 1387/2NL(参见实施例 1 和 2))。这些菌株的单独过夜培养物(30 $^{\circ}$ C 18 小时)在 4 $^{\circ}$ C 以 3000 转/分钟离心 10 分钟。收获细胞沉淀物，将其在 BHI 中稀释以达到大约 8 log cfu/ml 的细胞浓度。通过混合等量的每种原液进行这些菌株的混合。

##### 步骤 2: 粘附

将 1 cm<sup>2</sup> 的不锈钢盘投入到如步骤 1 制备的细菌溶液中。在室温温和

摇动 1 小时。

### 步骤 3: 清洗和干燥

为除去未附着的细胞, 取出不锈钢盘, 在磷酸盐缓冲溶液(PBS: pH 7.0, Merck)中清洗 3 次。用 Watman 滤纸吸收过量的液体, 然后将盘在层流下干燥 30 分钟。为确定附着的细胞的水平, 在一些盘上应用步骤 6。

### 步骤 4: 加入噬菌体混合物

将一半不锈钢盘投入 8 log pfu/ml 的噬菌体混合溶液中, 所述噬菌体混合溶液含有以下噬菌体: FSM\_噬菌体 67/33/1 (CNCM I-3130)、FSM\_噬菌体 F/316 (CNCM I-3131)、FSM\_噬菌体 9/261 (CNCM I-3132) 和 FSM\_噬菌体 73/311/2 (CNCM I-3133)。将容器在室温温和摇动 6 小时。在不同间隔取一些盘用于细菌计数。平行地进行不加入噬菌体的对照。

### 步骤 5: 清洗

在确定的时间间隔取出一些盘, 将其在无菌 PBS 中清洗 3 次并在无菌吸水纸上快速干燥。

### 步骤 6: 细胞脱离和计数

步骤 5 后, 将每个盘放入含有 9ml TS 的试管中。然后将试管置于 50KHz 的超声浴(充满水和冰混合物)中 1 分钟; 之后用 Vortex 将试管搅动 10 秒。用标准平板方法进行细胞计数。

### 结果:

图 3 中给出的结果证实在菌株混合物(FSMCC# 145、286、290、305、1987/2NL)中的阪崎肠杆菌细菌不能再从用噬菌体混合物(FSMCC-噬菌体 #67/33/1、F/316、9/261、73/311/2)以  $10^8$  pfu/ml 噬菌体处理的不锈钢盘表面回收, 而没有噬菌体混合物时细菌保持存活并且甚至可以轻微生长。总之, 用每毫升至少  $10^8$  个噬菌体处理不锈钢表面导致杀死阪崎肠杆菌细菌。

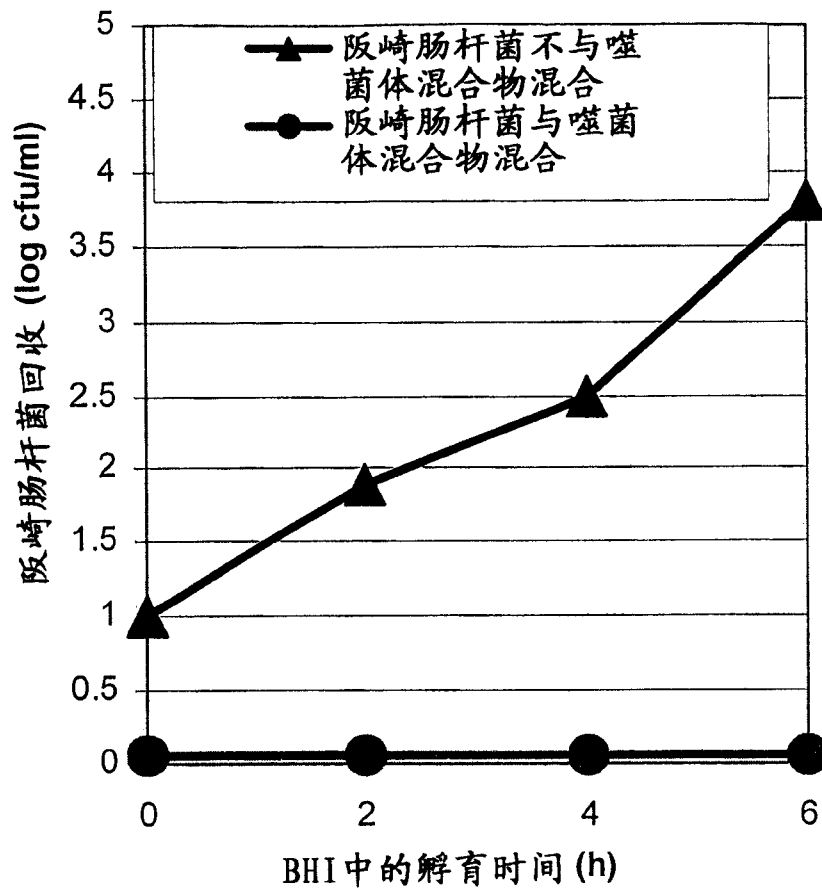


图 1

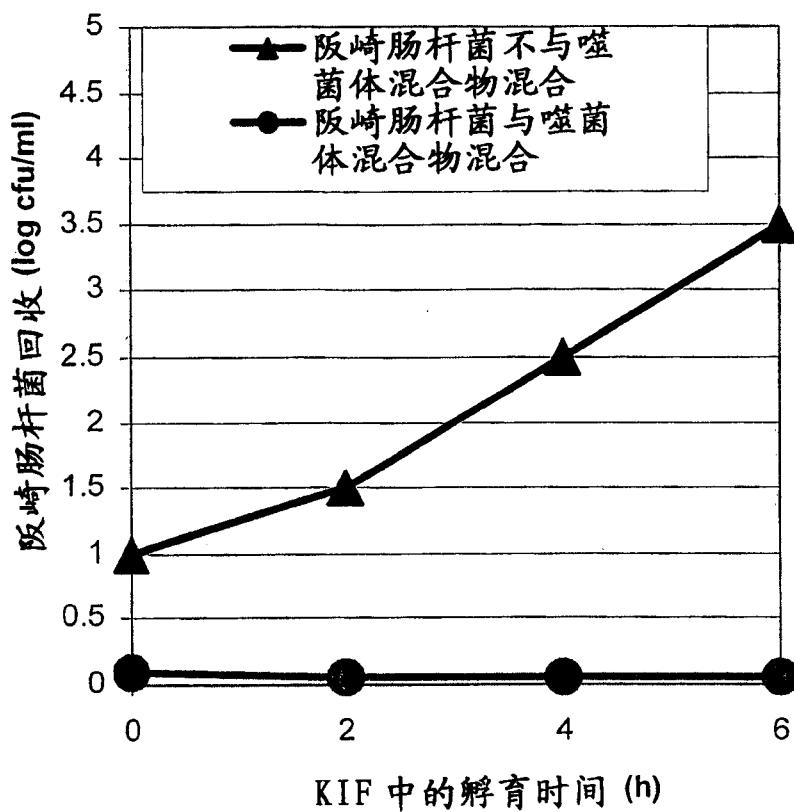


图 2

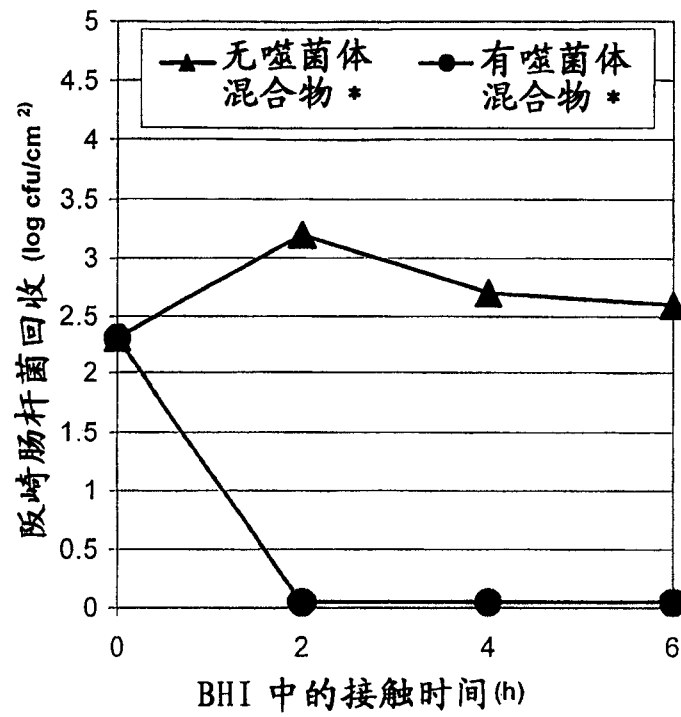


图 3