DOI:10.16016/j.2097-0927.202209112

铜绿假单胞菌噬菌体 vB_PaS_IME307 的生物学特性研究及全基因组分析

王 灿[1],刘慧莹[2],高明明[3],米丽媛[3],喻鑫婷[2],米志强[3],柏长青[4] 236000 安徽 阜阳,安徽医科大学附属阜阳医院呼吸内科[1];100071 北京,解放军总医院第五医学中心呼吸与危重症医学科[2];100071 北京,军事科学院军事医学研究院微生物流行病研究所,病原微生物生物安全国家重点实验室[3];518000 广东 深圳,深圳大学总医院呼吸与危重症医学科[4]

[**摘要**] **目的** 以实验室保存菌株 Pa175 为宿主菌,从医院污水中分离得到 1 株铜绿假单胞菌噬菌体,研究其生物学特性及全基因组学特征。**方法** 利用双层平板法、噬斑法分离并鉴定噬菌体;PEG8000 浓缩 NaCl 沉淀法纯化噬菌体;蔗糖梯度离心进一步纯化噬菌体,经磷钨酸负染染色后,使用透射电子显微镜观察其形态;蛋白酶 K/SDS 法提取噬菌体 DNA,对提取的核酸进行全基因组测序和生物信息学分析。**结果** 得到 1 株裂解性铜绿假单胞菌噬菌体 vB_PaS_IME307,该噬菌体可以形成透明且有晕环的噬菌斑,全基因组大小为 51 545 bp。透射电镜结果显示 vB_PaS_IME307 的头部呈正二十面体形状,直径(66±2)nm,尾长(116±2)nm;进化树分析发现该噬菌体为 *Mccleskeyvirinae* 病毒属,长尾噬菌体科(*Siphoviridae*)。生物学特性研究发现:vB_PaS_IME307 在 pH= 4.0~11.0、60 ℃以下能够保持较高活性,感染周期约为 60 min,其中包括 10 min 潜伏期和 50 min 暴发期,其暴发量为 150 PFU/cell。**结论** 噬菌体 vB_PaS_IME307 具有宿主特异性,对温度和 pH 具有较好的耐受能力,具有防治铜绿假单胞菌细菌感染的潜力。

[**关键词**] 铜绿假单胞菌;噬菌体;生物学特性;基因组学分析
[**中图法分类号**] Q393.48;R378.991;R394.2 [**文献标志码**] A

Biological characteristics and whole genome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* phage vB_PaS_IME307

WANG Can[1], LIU Huiying[2], GAO Mingming[3], MI Liyuan[3], YU Xinting[2], MI Zhiqiang[3], BAI Changqing[4]
[1]Department of Respiratory Medicine, Fuyang Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Fuyang, Anhui Province, 236000; [2]Department of Respiratory and Critical Care Diseases, Fifth Medical Centre, Chinese PLA General Hospital, Beijing, 100071; [3]State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing, 100071; [4]Department of Respiratory and Critical Care Diseases, General Hospital of Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong Province, 518000, China

[**Abstract**] **Objective** To determine the biological properties and whole genome characteristics of a phage against *P. aeruginosa* isolated from sewage samples as the host strain Pa175. **Methods** Double-layer agar plate and plaque method were used for phage isolation and identification. The obtained phage was purified through PEG 8000 concentration and NaCl precipitation. The phage was further purified with sucrose gradient centrifugation, stained by phosphotungstic acid negative staining. Transmission electron microscopy was employed to observe its morphology. After its DNA was extracted by using proteinase K/SDS, whole genome sequencing was performed and the results were analyzed by bioinformatics. **Results** A lytic *P. aeruginosa*

[**基金项目**] 安徽省自然科学基金青年项目(2108085QH310);安徽省卫生健康委科研项目(AHWJ2021b057);安徽医科大学校科研基金项目(2020xkj060)

[**通信作者**] 柏长青,E-mail:mlp1604@sina.com

2097-0927/Copyright © 2023, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

phage was obtained and then named as vB_PaS_IME307, which can form transparent plaque with halo, with a whole genome size of 51 545 bp. Transmission electron microscopy showed that the head of vB_ PaS_ IME307 was icosahedral shape, with a diameter of 66±2 nm and a tail length of 116±2 nm. Phylogenetic tree analysis revealed that IME307 was belonged to Mccleskeyvirinae virus genus, Siphoviridae family. The phage was maintained of high activity at pH value from 4.0 to 11.0 and temperature below 60 ℃. The infection cycle was about 60 min, including 10 min incubation period and 50 min outbreak period. The outbreak was 150 PFU/cell. **Conclusion** vB_ PaS_ IME307 is of host specificity, good tolerance to temperature and pH valule, and has the potential to prevent and treat *P. aeruginosa* infection.

[**Key words**] *Pseudomonas aeruginosa*; phage; biological characteristics; genomic analysis

Supported by the Natural Science Foundation for Young Scholars of Anhui Province (2108085QH310), the Scientific Research Project of Anhui Provincial Health Commission (AHWJ2021b057), and the Scientific Research Fund of Anhui Medical University (2020xkj060). Corresponding author: BAI Changqing, E-mail: mlp1604@sina.com

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa*)是一种机会致病性人类病原体,广泛分布于各种环境中。铜绿假单胞菌可在住院患者中引起慢性感染或急性危及生命的感染;患有囊性纤维化、中耳炎、角膜炎和严重烧伤以及免疫功能低下的人群[1-2]较易引发铜绿假单胞菌的感染。铜绿假单胞菌是一种适应性强的细菌,在长期抗生素治疗的情况下,铜绿假单胞菌是具耐药性的微生物种之一。随着全世界铜绿假单胞菌菌株的耐药性持续增加及新药研发的短缺,迫切需要探索抗菌药物替代疗法,噬菌体疗法被证明是控制铜绿假单胞菌感染的理想方法[3-5]。

有研究显示噬菌体具有治疗铜绿假单胞菌感染的潜力,尤其是多重耐药菌引起的感染[6-7]。噬菌体疗法的有效性在小鼠感染多重耐药性铜绿假单胞菌模型和体外肺囊性纤维化模型中得到证实[8-9]。铜绿假单胞菌噬菌体对感染性角膜炎、烧伤伤口感染、肠源性脓毒症和慢性中耳炎均具有治疗作用[10-16]。一般而言使用针对不同宿主的噬菌体混合物(鸡尾酒)会降低噬菌体疗法的疗效;因为在相对狭窄的裂解谱范围内细菌会出现耐受性[17]。然而也有研究人员发现使用6种裂解性噬菌体混合物对治疗铜绿假单胞菌引起的临床中耳感染具有很好的疗效。

据估计,在全球范围内,噬菌体(10^{31} 个)远比细菌数量要多[18]。截至2022年9月,来自NCBI的数据库中有2 111个噬菌体基因组序列已被公布。然而,仅有其中一部分噬菌体可以在体外或动物感染模型中具有抗菌活性。在2 111个噬菌体中,有152个是铜绿假单胞菌噬菌体,在过去的几年里有20多种针对铜绿假单胞菌的噬菌体通过动物模型测试具有很好的抗菌活性[19-20]。与地球上大量的噬菌体相比,现有分离的噬菌体数量仍然相对有限。因此,迫切需要从环境中分离裂解性较强的噬菌体治疗由多重耐药菌引起的感染。在本研究中,以实验室保存的铜绿假单胞菌Pa175为宿主菌从医院污水中分离裂解性噬菌体,对其生物学特性、全基因组序列及进化树进行研究,为噬菌体作为抗生素替代治疗耐药菌感染奠定基础。分离新型铜绿假单胞菌噬菌体,分析其基因组和裂解谱,将有助于更全面地了解铜绿假单胞菌噬菌体的抗菌潜力。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 样品来源 本研究所用铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌和金黄色葡萄球菌均由解放军总医院第五医学中心各临床科室通过痰液、肺泡灌洗液、血液、脑脊液及分泌物等分离得到,并利用本院检验科微生物室VITEK 2.0全自动微生物分析系统进行菌种鉴定和药敏试验。研究所用细菌保存至军事科学院军事医学研究院微生物流行病研究所未知病原分析室-80 ℃冰箱。

1.1.2 主要试剂和仪器 0.22 μm微孔过滤器购自美国Pall Corporation公司;DNase Ⅰ、蛋白酶K、RNase Ⅰ购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;PEG8000购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;酚∶氯仿∶异戊醇液(25∶24∶1)、DNA平衡酚购自北京索莱宝科技有限公司;电热恒温培养箱、恒温摇床购自上海一恒科学仪器有限公司;低温高速离心机购自美国贝克曼库尔特有限公司;透射电子显微镜购自飞利浦电子公司。

2×Trans Taq® High Fidelity(Hi Fi) PCR Super Mix(北京全式金生物技术有限公司);二代测序建库用试剂盒E7645 NEBNext® Ultra™ Ⅱ DNA Library Prep Kit for Illumina®(美国,纽英伦生物技术有限公司);二代测序仪(美国,亿明达高通量测序仪);本实验室提供的SGI4700高性能计算机服务器;CLC

Genomics Workbench 12.0 高通量测序分析软件(德国,QIAGEN)。

1.1.3 培养基及溶液配制 LB 液体培养基(1%胰化蛋白胨,0.5%酵母提取物,1% NaCl);LB 固体培养基(在 LB 液体培养基中添加 1.5%琼脂粉);PBS 缓冲液[0.2 mol/L Na_2HPO_4,0.2 mol/L NaH_2PO_4,pH=7.4];10×TEN 缓冲液[0.1 mol/L Tris-Cl(pH=8.0)],0.01 mol/L EDTA(pH=8.0),1 mol/L NaCl];SM Buffer[NaCl 5.8 g,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.0 g,1 mol/L Tris·HCl(pH=7.5)50 mL,2%明胶 5 mL,加蒸馏水至 1 L,1×10^5 Pa 灭菌 20 min]。

1.2 *方法*

1.2.1 细菌培养及鉴定 使用接种环蘸取库存 Pa175 甘油菌液,通过分区划线法接种至 LB 固体培养基上,37 ℃恒温培养箱过夜培养;用无菌枪头挑取形态单一菌落接种至 LB 液体培养基中,37 ℃、180 r/min 恒温摇床振荡培养至对数期[$D(600)=0.6\sim0.8$],PCR 反应模板备用。使用细菌通用引物 27F(5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′)和 1492R(5′-GGYTACCTTGTTACGACTT-3′)[21]对铜绿假单胞菌(Pa175、Pa13、Pa135、Pa140、Pa175、Pa1473 和 Pa2526)进行 16S rRNA 基因扩增。PCR 反应体系(50 μL):2×Taq Master Mix 25 μL,Pa175 菌液模板 1 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 2 μL,RNase-Free ddH_2O 20.0 μL。PCR 反应条件:PCR 反应设置退火温度为 60 ℃,其余条件参照产品使用说明书,共设置 30 个循环。取 PCR 产物 10 μL,用含 1.5%琼脂糖凝胶行电泳检测。取 40 μL 检测成功的 PCR 产物送至北京诺赛基因组研究中心有限公司行一代测序,测序结果在 GenBank 中进行 BLAST 比对分析确定菌种。

1.2.2 噬菌体的分离与纯化 取 1 L 中国人民解放军总医院第五医学中心南院区污水站未经过任何处理的污水,4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min,去沉淀留上清,用 0.22 μm 微孔过滤器过滤,收集滤液备用;取 100 μL 对数期铜绿假单胞菌 Pa175[$D(600)=0.6\sim0.8$]加至 4 mL 污水滤液和 2 mL 的 3×LB 液体培养基中,混匀后室温静置 1 h,置于 37 ℃恒温摇床继续培养 6 h,待混合液体由浑浊变澄清后,4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,用 0.22 μm 微孔滤器过滤,所得滤过液即为噬菌体原液备用。

取 100 μL 上一步骤滤过液与 500 μL 对数期上述菌液[$D(600)=0.6\sim0.8$]混合均匀,倒入半固体琼脂平板中央,铺双层琼脂平板;用上述方法梯度稀释滤过液,在合适的稀释梯度下铺设双层平板并查看噬菌斑及记录数目;用带滤芯的移液器吸头吸取铺设 LB 固体平板上形态规则的单个噬菌斑液,反复吹吸至对数期 Pa175[$D(600)=0.8$]菌液中,37 ℃、180 r/min 恒温摇床震荡培养,直至澄清。取 1.5 mL,置于新的 Eppendorf 管中,4 ℃、12 000 r/min 离心 3 min,用注射器吸取上清,用 0.22 μm 滤器过滤再次收集滤液;以此滤液为基础铺双层平板法观察噬菌斑形态,重复 3 次,直至噬菌斑形态均一为止,最终将滤过液储存于 4 ℃保存。

1.2.3 噬菌体的超离纯化及电镜下形态观察 取噬菌体原液 35 mL 加至 50 mL 超速离心管(Beckman 公司)中,用 10 mL 带针头的灭菌注射器从超速离心管底层缓缓注入 10 mL 30%(质量体积比)蔗糖溶液,配平后(注意要完全配平,精确到 0.001 g),4 ℃、30 000 r/min 离心 3 h;倒出离心管中所有液体并将管口倒置于桌面上直至底层蔗糖完全流出为止,在用断枪头吸取 200 μL 1×TEN 缓冲液缓慢注入离心管底部,4 ℃过夜。

取 50 μL 超速离心纯化的噬菌体原液滴在含碳膜的铜网上吸附过夜,用 2%的磷钨酸(PTA)负染 5 min,使用 Philips TECNAI-10 型透射电子显微镜观察噬菌体形状,并正式命名为 IME307。

1.2.4 噬菌体裂解谱测定 随机从库存中选取 31 株铜绿假单胞菌、5 株肺炎克雷伯菌、6 株鲍曼不动杆菌及 3 株金黄色葡萄球菌,采用双层平板法和点板稀释法鉴定噬菌体裂解谱,观察有无噬菌斑,每次实验重复 3 次。

1.2.5 噬菌体最佳感染复数(MOI)的测定 参照 WANG 等[22]的方法略有改动。为了确定最佳 MOI,将 IME307 与 Pa175 宿主菌液分别按照 MOI 为 10、1、0.1、0.01、0.001 混合对数期宿主细菌和噬菌体悬液,加入新鲜的 LB 培养基补足至 10 mL,37 ℃,220 r/min 振荡培养 90 min 后,4 000 r/min 离心 10 min,除去底层细菌沉淀、收集上清液,使用 0.22 μm 的微孔过滤器过滤,通过双层平板法测定噬菌体的滴度。每次独立实验重复 3 次。

1.2.6 噬菌体一步生长曲线的测定 参照 WANG 等[22]的方法略有改动,具体如下。取 1 mL 培养至对数期菌液 Pa175[$D(600)=0.8$],4 ℃、8 000 r/min,离心 1 min,取 1 mL 的 PBS 重悬沉淀,再用 PBS 倍比梯度稀释菌液后涂板,计算菌落数目,确定在对数期[$D(600)=0.8$]1 mL 菌液所含细菌数目。

将 Pa175 接种至 5 mL 新鲜 LB 液体培养基中,培养至对数期[$D(600)=0.8$]后,4 ℃、5 000 r/min,离心 2 min,去上清,沉淀重悬于 5 mL 的 LB 培养基,使 Pa175 绝对数达到上一步骤中对数期细菌数目。取

100 μL 噬菌体 IME307(本实验所用 MOI=0.01)加至上述混合液中;37 ℃恒温箱放置 2 min,使噬菌体能够充分吸附到细菌表面,室温下 5 000 r/min 离心 2 min,去除未能吸附的噬菌体上清,用 5 mL 的 LB 液体培养基洗 2 遍沉淀,去除清洗液再加入 5 mL 新鲜的 LB 培养基,用移液枪轻轻吹吸混匀沉淀,置于 37 ℃恒温摇床 220 r/min 震荡培养;自加入噬菌体开始时间为 0 min,分别在 0、10、20、30、40、50、60、80 和 90 min 等各个时间点取样品,并测定噬菌体在每个时间点下的滴度;以时间为横坐标,以取样下每个时间点噬菌体滴度的对数值为纵坐标绘制生长曲线。

1.2.7 噬菌体温度和 pH 敏感性的测定 取 1 mL 噬菌体液 IME307 分别置于 4、40、50、60、70、80、90 和 100 ℃恒温水浴中静置 1 h。采用双层平板法测定 IME307 滴度,实验过程重复 3 次做统计分析。

将噬菌体原液 IME307 以 1∶10 的体积倍比稀释分别置于 pH 为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 和 12.0 的 SM Buffer 中,37 ℃静置 1 h。采用双层平板法测定各试验组噬菌体滴度,设置 3 个重复平行试验。

1.2.8 噬菌体核酸的提取 采用蛋白酶 K/SDS 的方法并结合 WANG 等[22]的方法略有改动,提取纯化的噬菌体核酸,具体方法如下:取 600 μL 噬菌体原液,加入 DNase Ⅰ(0.2 mg/mL)和 RNase A(0.2 mg/mL)各 3 μL 使得各自终浓度为 1 μg/mL,37 ℃过夜消化以去除混合液中宿主菌核酸,80 ℃恒温灭活 DNase Ⅰ和 RNase A 15 min;在向混合液中分别加入 24 μL、0.5 mol/L 的 EDTA(使得终浓度 20 mmol/L),2.5 μL、20 mg/mL 的蛋白酶 K(终浓度 50 μg/mL),30 μL、10%SDS。终浓度 0.5%(质量体积比),56 ℃水浴 1 h;加入上一步骤中等体积平衡酚,温和震荡 1 min,室温下 12 000 r/min 离心 5 min,转移上层亲水相置于新 Eppendorf 管中;加入上一步骤等体积酚-氯仿-异戊醇(25∶24∶1),温和震荡 1 min,室温下 12 000 r/min 离心 5 min,转移上层亲水相于新的 Eppendorf 管中;加入等体积异丙醇,-20 ℃放置 3 h 以上;4 ℃、13 000 r/min 离心 20 min,缓慢倒掉上清;加入 1 mL、75%冰乙醇(-20 ℃提前放置),室温静置 1 min,4 ℃、12 000 r/min 离心 2 min,缓慢倒掉乙醇,室温开盖放置 10 min,使乙醇完全挥发;在 Eppendorf 管的底层加入 30 μL 去离子水溶解 DNA 沉淀,储存于-20 ℃备用。

1.2.9 噬菌体全基因组测序及全基因组序列分析 按照 E7645 NEBNext® Ultra™ Ⅱ DNA Library Prep Kit for Illumina® 试剂盒使用说明书对已提取噬菌体基因组构建文库,通过本实验室 Illumina-MiSeq 测序平台上机测序。测序所得原始数据由本实验室工作人员通过高性能计算机服务器使用 Newbler 2.90 软件拼接序列,得到噬菌体全基因组序列。使用 RAST 在线数据库[22](http://www.rast.nmpdr.org)对开放阅读框(open reading frame,ORF)初步确定,所有的 ORF 使用 NCBI 中氨基酸序列比对工具 BLASTp(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)手动验证。将基因组注释序列提交到 NCBI,获取序列号 MN096267。

1.2.10 比较基因组学及噬菌体进化树的构建 噬菌体末端酶大亚基是一种保守的噬菌体蛋白。因此,基于末端酶大亚基氨基酸序列构建噬菌体 IME307 系统发育树。从 NCBI 中下载与 IME307 末端酶大亚基氨基酸序列相似性最高的 30 余种不同噬菌体,通过 CLC Genomics Workbench 12.0 软件分别提取噬菌体末端酶大亚基氨基酸序列,使用 MEGA 6.0 软件制成基于末端酶大亚基氨基酸序列的进化树。

将 IME307 通过 BlastN(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)全基因组序列比,找出最为相近的几种噬菌体序列,使用 CLC Genomics Workbench 12.0 和 Mauve software 2.3.1 软件进行基因多重比对分析,分析全基因组相似处和差异。

2 结果

2.1 铜绿假单胞菌 Pa175 的鉴定

本研究所用宿主菌 Pa175 分离自解放军总医院第五医学中心呼吸与危重症医学科一诊断为支气管扩张伴感染的痰液样本,根据 GenBank 数据库中 BLAST 对 Pa175 的 16S rRNA 测序基因序列进行相似性比对,结合解放军总医院第五医学中心检验科利用 VITEK 2.0 全自动微生物分析,结果显示 Pa175 为多重耐药性铜绿假单胞菌,其药敏结果如表 1 所示。

2.2 IME307 噬菌体的分离

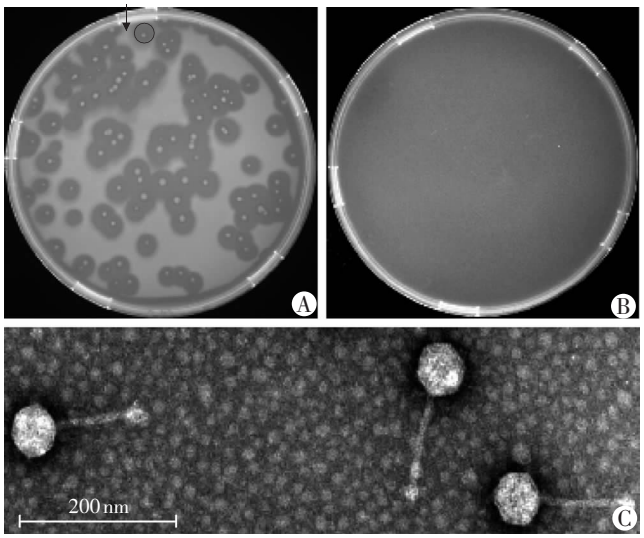
本实验以 Pa175 为研究对象从解放军总医院第五医学中心医院污水中成功分离得到 1 株裂解性噬菌体,命名为 vB_PaS_IME307(以下简称 IME307)。IME307 经过多次单斑纯化后能够在铺有双层 LB 的平板上形成透明的噬菌斑,在噬菌斑的周围可以形成半透明的晕环(图 1A),这种征象的形成可能是噬菌体多糖解聚酶存在的宏观表现。将图 1A 噬菌斑中央白点用灭菌抢头挑选出并重新培养得到新的耐受菌,再次用 IME307 对其进行侵染,通过铺双层平板法在图 1B 中并未发现噬菌斑,这种现象可能是因为 Pa175 能够迅速对 IME307 进行耐受。

表 1 Pa175 药敏结果

抗菌药物	MIC/(μg/mL)	敏感性	抗菌药物	MIC/(μg/mL)	敏感性
环丙沙星 Ciprofloxacin	≥4	R	氨苄西林 Ampicillin	≥32	S
庆大霉素 Gentamicin	≥16	R	氨苄西林舒巴坦钠 Ampicillin sulbactam	≥32	S
亚胺培南 Imipenem	≥16	S	氨曲南 Aztreonam	≥64	R
美罗培南 Meropenem	≥16	S	哌拉西林/他唑巴坦钠 Piperacillin/tazobactam	≥128	S
哌拉西林 Piperacillin	≥128	S	呋喃妥因 Nitrofurantoin	≥512	S
复方新诺明 Cotrimoxazole	≥320	S	头孢哌酮舒巴坦钠 Cefoperazone/sulbactam	≥64	S
左氧氟沙星 Levofloxacin	≥8	S	头孢吡肟 Cefepime	≥64	R
头孢他啶 Ceftazidime	≥64	S	头孢曲松 Ceftriaxone	≥64	R
头孢呋辛酯 Cefuroxime axetil	≥64	R	妥布霉素 Tobramycin	≥16	R
头孢呋辛钠 Cefuroxime sodium	≥64	R	头孢替坦 Cefotetan	≥64	R

2.3 噬菌体形态特征

经透射电子显微镜对 IME307 进行形态观察,发现 IME307 拥有一个正二十面体的头部,其直径为(66±2)nm;为长尾噬菌体,长度为(116±2)nm(图 1C)。根据 ICTV 制定的新国际病毒分类方法,该噬菌体被正式命名为 vB_PaS_IME307,IME307 为有尾噬菌体目、长尾噬菌体科(*Siphoviridae*)噬菌体。



A:噬菌体噬菌斑 箭头示晕环,黑色圆圈内为噬菌斑;B:噬菌体耐受性图;C:噬菌体透射电镜结果

图 1 噬菌体 vB_PaS_IME307 的形态特征

2.4 噬菌体的裂解谱

IME307 能够对 31 株中的 2 株铜绿假单胞菌进行裂解,无法裂解金黄色葡萄球菌、鲍曼不动杆菌及肺炎克雷伯菌等(表 2),这表明 IME307 裂解谱相对较窄,具有严格的宿主特异性,仅对个别菌株(Pa175 和 Pa135)具有裂解性。图 2 所示 IME307 对 Pa175 具有较强裂解性,对 Pa135 裂解性较弱,对 Pa1473 和 Pa2526 没能形成透明噬菌斑。

2.5 噬菌体的最佳感染复数及一步生长曲线

据图 3A 所示 IME307 与 Pa175 按一定比例混合,当以 MOI = 0.1 时,噬菌体 IME307 可产生最大滴度(图 3A),这表明 0.1 是 IME307 的最佳 MOI。

据图 3B 所示,噬菌体 IME307 的潜伏期约 10 min,增殖时间在 10~60 min。在 60 min 以后进入稳定期,爆发量=稳定期噬菌体滴度/感染初细菌数目。爆发量代表了单个宿主菌被裂解后平均释放的子代噬菌体数量,IME307 噬菌体的爆发量为 150 PFU/cell。

2.6 噬菌体对温度和 pH 的稳定性

从图 4 中可以看出,IME307 处在 pH = 5~11 时,噬菌体能够保持很好的滴度,当 pH = 12 时噬菌体的滴度明显下降。IME307 在 60 ℃以下噬菌体的滴度相对稳定,当温度上升 10 ℃以后噬菌体滴度明显下降,在 100 ℃时噬菌体全部失活,不具有裂解性。

表 2 噬菌体 vB_PaS_IME307 的裂解谱

细菌	细菌编号	噬菌体敏感性
Pseudomonas aeruginosa	135/175/	+
Pseudomonas aeruginosa	13/140/21/28/80/83/180/769/784/808/825/962/1104/1106/1133/1198/1200/1306/1397/1768/1783/1850/2120/2122/2128/2130/1473/2526	−
Klebsiella pneumoniae	1183/226/2060/2061/409	−
Acinetobacter baumannii	387/333/2040/2/6/406	−
Streptococcus agalactiae	253/331/1323/	−

+:裂解;−:不裂解

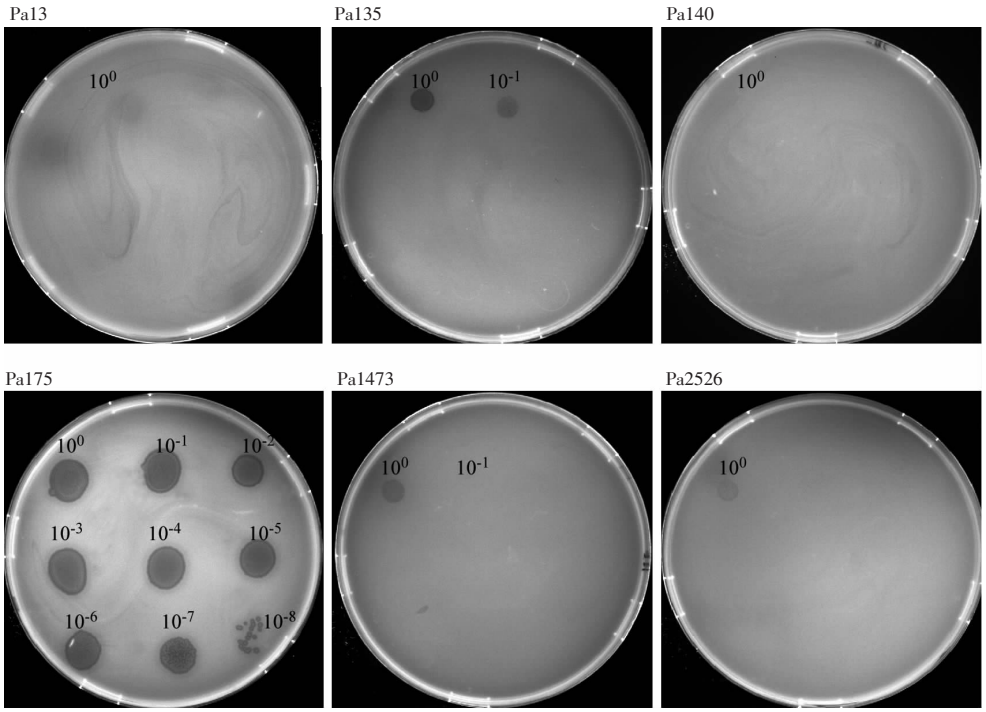
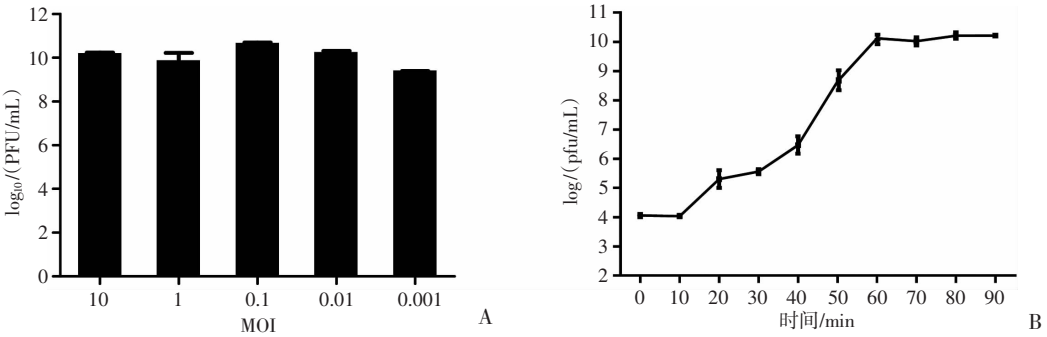
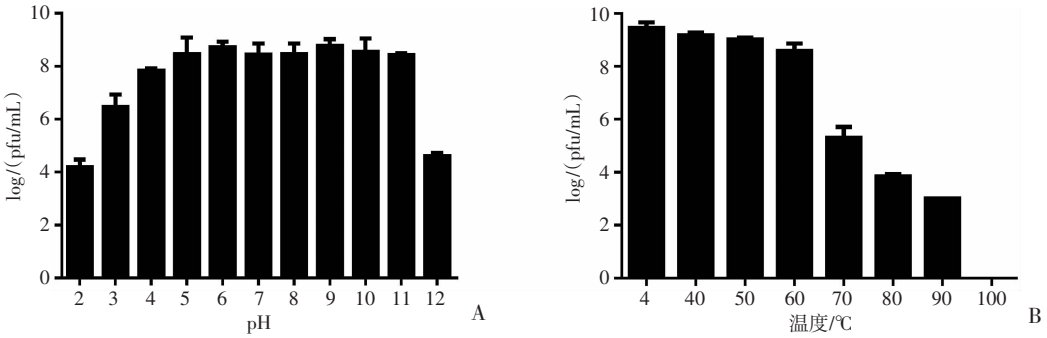


图 2 噬菌体 vB_PaS_IME307 的裂解图谱



A:噬菌体最佳 MOI 柱状图;B:IME307 一步生长曲线图

图 3 噬菌体 vB_PaS_IME307 的 MOI 测定及一步生长曲线



A:pH=2~12 时 IME307 的滴度曲线;B:温度 4~100 ℃时 IME307 对温度敏感性滴度曲线

图 4 噬菌体 IME307 对 pH 和热稳定性

2.7 噬菌体的全基因组分析及进化树分析

对 IME307 噬菌体进行高通量测序并对测序数据进行拼接,分析发现该噬菌体为双链 DNA 噬菌体,全基因组大小为 51 545 bp,GC 含量占 56.10%。噬菌体 vB_PaS_IME307 的功能基因呈现多样性,可编码多种噬菌体的结构蛋白基因,其基因组中存在 97 个开放阅

读框(ORF)。运用 NCBI 的序列比对软件 BLASTp 进行噬菌体功能基因的 ORF 注释结果见表 3。其中 45 个 ORF 为假想蛋白(hypothetical protein),33 个 ORF 功能已知。ORF45(穿孔蛋白)是噬菌体裂解相关基因,可导致细胞壁破裂而使细菌溶解。结构蛋白 ORF48 是噬菌体主要衣壳蛋白,与末端酶包装蛋白 ORF46 和 ORF47 邻近。ORF49 编码噬菌体尾部相关蛋白,具有收缩和运动功能,该基因簇在噬菌体感染、吸附宿主菌时发挥重要作用。ORF13(假定噬菌体阻遏物)、ORF26(核酸内切酶)、ORF76(溶原性噬菌体整合酶)、ORF97(核酸外切酶)。经过对比分析并未发现该噬菌体中存在毒力基因,这表明该噬菌体具有较好的生物安全性。

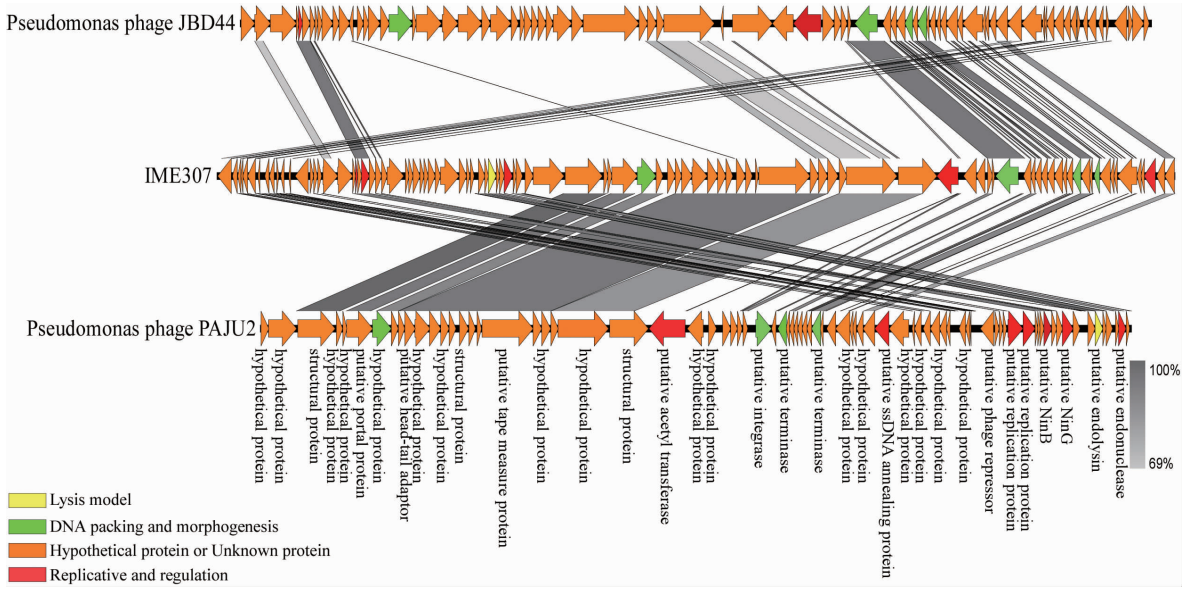
全基因组序列经 BLASTn 比对(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi),以此揭示与 IME307 序列最相近的噬菌体基因组。对比分析后结果显示:IME307 与 *Pseudomonas* phage PAJU2 噬菌体(GenBank:AP009624.1)最为相似,全基因组序列为 41%覆盖率及 94.06% 的序列一致性;与铜绿假单胞菌噬菌体 *Pseudomonas* phage JBD44(GenBank:KU199710.1)10% 全基因组覆盖率和 93.85%的一致性,图 5 显示 IME307 与以上 2 个铜绿假单胞菌噬菌体通过 Easyfig_win_2.1 行全基因组线性比对,结果表明 IME307 序列相对较新颖,与目前 NCBI 中其余噬菌体序列同源性较低。

表 3 噬菌体 vB_PaS_IME307 的 ORF 功能预测

ORF 序列	功能	启始	终止	正负链	GenBank 编号	一致性(%)(aa)	E 值
1	ERF family protein	790	59	−	WP_034080569.1	99.18%	1e−179
2	hypothetical protein	1 110	853	−	QDH93774.1	100%	3e−54
3	hypothetical protein	1 305	1 141	−	MBX5587495.1	100%	2e−29
4	hypothetical protein	1 415	1 302	−	QDH93776.1	100%	5e−16
5	hypothetical protein	1 669	1 412	−	WP_049264142.1	100%	3e−53
6	hypothetical protein D3p071	2 091	1 666	−	NP_061562.1	100%	2e−96
7	hypothetical protein	2 336	2 223	−	QDH93779.1	100%	5e−16
8	hypothetical protein D3p072	2 822	2 595	−	NP_061563.1	100%	5e−47
9	hypothetical protein	3 102	2 839	−	QDH93781.1	100%	7e−57
10	hypothetical protein	3 232	3 345	+	QDH93782.1	100%	3e−17
11	hypothetical protein	3 634	3 452	−	WP_132892723.1	100%	3e−36
12	hypothetical protein	3 989	3 867	−	QDH93784.1	100%	2e−20
13	Putative phage repressor	4 927	4 212	−	WP_053092377.1	100%	1e−172
14	Cro/CI-family transcriptional regulator	5 028	5 207	+	WP_023113651.1	100%	9e−34
15	hypothetical protein	5 221	5 421	+	WP_023125075.1	100%	7e−40
16	hypothetical protein	5 441	5 644	+	WP_023127506.1	100%	9e−39
17	phage replication protein	5 720	6 520	+	WP_124133257.1	100%	0.0
18	ATP−binding protein	6 510	7 325	+	WP_049264146.1	100%	0.0
19	hypothetical protein	7 318	7 470	+	QDH93791.1	100%	2e−27
20	hypothetical protein	7 467	7 586	+	QDH93792.1	100%	3e−19
21	hypothetical protein	7 583	7 798	+	QDH93793.1	100%	2e−44
22	recombination protein NinB	7 791	8 207	+	WP_014603756.1	100%	7e−97
23	Phage chromosome segregation protein	8 204	8 548	+	QDH93795.1	100%	3e−76
24	hypothetical protein	8 545	8 874	+	QDH93796.1	100%	6e−74
25	DUF1364 family protein	8 871	9 173	+	WP_023875435.1	100%	5e−66
26	Phage−associated homing endonuclease	9 170	10 063	+	QDH93798.1	100%	0.0
27	hypothetical protein	10 147	10 341	+	QDH93799.1	100%	6e−39
28	hypothetical protein	10 338	10 565	+	QDH93800.1	100%	2e−48
29	hypothetical protein	10 562	10 939	+	QDH93801.1	100%	3e−85
30	hypothetical protein	10 936	11 151	+	QDH93802.1	100%	2e−43
31	hypothetical protein	11 148	11 378	+	QDH93803.1	100%	2e−48
32	hypothetical protein	11 375	11 758	+	WP_017001698.1	100%	7e−88
33	hypothetical protein	11 758	12 036	+	WP_225001937.1	100%	1e−61
34	hypothetical protein	12 036	13 049	+	WP_049264154.1	100%	0.0
35	antitermination protein Q	13 046	13 444	+	WP_017001695.1	100%	1e−92
36	hypothetical protein	13 444	13 608	+	QDH93808.1	100%	3e−31
37	hypothetical protein	13 643	13 846	+	QDH93809.1	100%	2e−42
38	hypothetical protein	14 076	14 423	+	WP_170954280.1	100%	6e−75
39	hypothetical protein	14 420	14 617	+	QDH93811.1	100%	1e−40
40	Cell wall hydrolyses involved in spore germination	14 617	15 033	+	QDH93812.1	100%	4e−97

续表 3

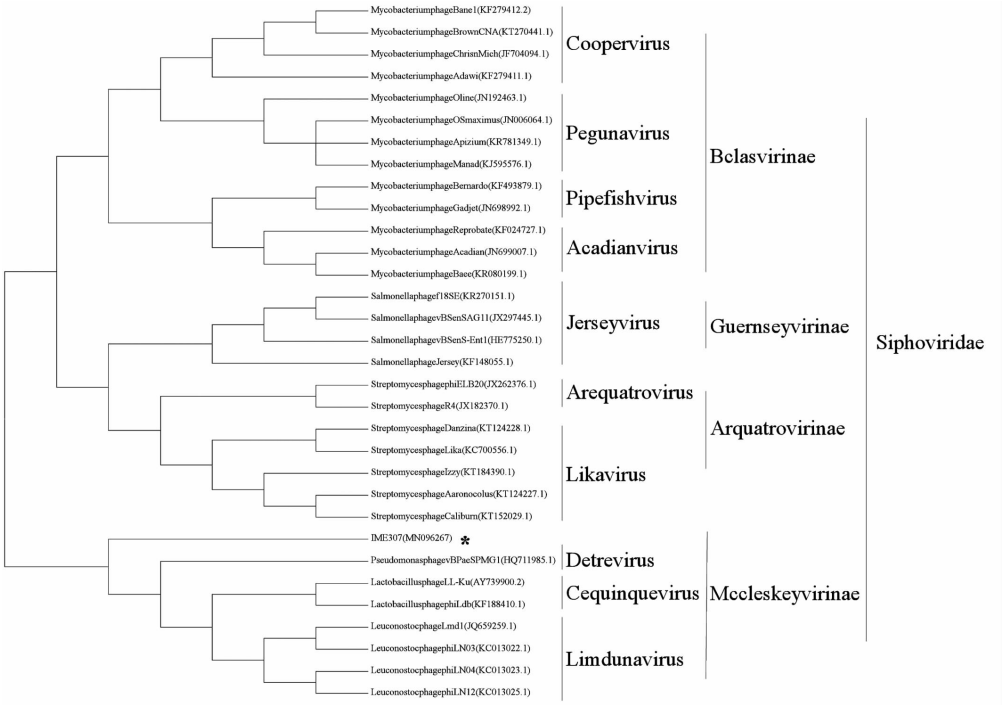
ORF 序列	功能	启始	终止	正负链	GenBank 编号	一致性(%)(aa)	E 值
41	Phage protein	15 033	15 206	+	WP_162962015.1	100%	3e-29
42	hypothetical protein	15 216	15 464	+	WP_023875424.1	100%	2e-54
43	Endopeptidase	15 457	15 912	+	WP_023875424.1	100%	2e-54
44	hypothetical protein	15 942	16 112	+	QDH93816.1	100%	1e-29
45	Phage holin	16 109	16 444	+	QDH93817.1	100%	5e-78
46	Phage terminase, small subunit	16 586	17 026	+	QDH93818.1	100%	5e-97
47	Phage terminase large subunit	17 028	18 689	+	QDH93819.1	100%	0.0
48	Phage capsid and scaffold	18 749	20 752	+	QDH93820.1	100%	0.0
49	Phage tail fibers	20 815	21 036	+	WP_176600165.1	100%	2e-44
50	Phage protein	21 033	21 257	+	QDH93822.1	100%	2e-41
51	Phage portal protein	21 250	22 635	+	QDH93823.1	100%	0.0
52	Phage portal protein	22 628	23 632	+	QDH93824.1	100%	0.0
53	phage gp6-like head-tail connector protein	23 629	24 003	+	MCO3804694.1	100%	6e-84
54	hypothetical protein	24 237	24 668	+	QDH93826.1	100%	5e-98
55	phage head closure protein	24 665	25 006	+	WP_263822137.1	100%	3e-77
56	Phage protein	25 006	25 575	+	MCO3804691.1	100%	1e-138
57	hypothetical protein	25 557	26 384	+	QDH93829.1	100%	0.0
58	methyltransferase domain-containing protein	26 395	26 949	+	WP_034020418.1	100%	2e-134
59	hypothetical protein	26 942	27 388	+	WP_015994276.1	100%	1e-102
60	hypothetical protein	27 388	27 759	+	QDH93832.1	100%	4e-86
61	Phage tail fibers	27 947	28 441	+	WP_015994278.1	100%	9e-117
62	hypothetical protein	28 451	28 813	+	QDH93834.1	100%	3e-81
63	hypothetical protein	28 972	29 127	+	QDH93835.1	100%	2e-29
64	Phage tail length tape-measure protein1	29 158	31 911	+	QDH93836.1	100%	0.0
65	hypothetical protein	31 908	32 372	+	WP_015994282.1	100%	9e-108
66	DUF1833 family protein	32 369	32 857	+	WP_126633578.1	100%	1e-115
67	hypothetical protein	32 862	33 425	+	QDH93839.1	100%	1e-135
68	hypothetical protein	33 480	33 887	+	WP_003158964.1	100%	1e-94
69	Phage tail fiber protein	33 859	36 588	+	QDH93841.1	100%	0.0
70	hypothetical protein	36 649	38 733	+	QDH93842.1	100%	0.0
71	exopolysaccharide production protein	39 884	38 730	-	QDH93843.1	100%	0.0
72	hypothetical protein	40 849	40 163	-	WP_124096903.1	100%	2e-166
73	hypothetical protein	41 328	40 849	-	QDH93845.1	100%	7e-112
74	hypothetical protein	41 461	41 724	+	QDH93846.1	100%	3e-57
75	hypothetical protein	41 708	41 839	+	QDH93847.1	100%	5e-20
76	integrase	43106	41 889	-	QDH93848.1	100%	0.0
77	hypothetical protein	43 787	43 386	-	QDH93849.1	100%	5e-94
78	hypothetical protein	44 014	44 014	-	QDH93850.1	100%	3e-49
79	hypothetical protein	44 346	44 014	-	QDH93851.1	100%	5e-73
80	hypothetical protein	44 678	44 343	-	WP_267736549.1	100%	1e-74
81	hypothetical protein	45 046	44 675	-	WP_267736548.1	100%	2e-83
82	hypothetical protein	45 501	45 043	-	QDH93854.1	100%	1e-104
83	hypothetical protein	45 719	45 498	-	WP_126895028.1	100%	8e-46
84	hypothetical protein	46 036	45 716	-	QDH93856.1	100%	6e-72
85	hypothetical protein	46 472	46 029	-	WP_236079895.1	100%	7e-104
86	dual specificity protein phosphatase family protein	46 960	46 475	-	WP_134260534.1	100%	1e-117
87	hypothetical protein	47 091	46 945	-	WP_208539801.1	97.92%	1e-25
88	hypothetical protein	47 480	47 175	-	WP_267736543.1	100%	1e-67
89	hypothetical protein	47 473	48 060	-	WP_267736542.1	100%	1e-141
90	hypothetical protein	48 263	48 057	-	WP_267736541.1	100%	9e-41
91	hypothetical protein	48 435	48 256	-	QDH93863.1	100%	1e-35
92	hypothetical protein	49 490	48 435	-	QDH93864.1	100%	0.0
93	hypothetical protein	49 711	49 487	-	WP_017001718.1	100%	2e-47
94	hypothetical protein	49 893	49 708	-	KYO84492.1	100%	5e-37
95	hypothetical protein	50 473	49 874	-	QDH93867.1	100%	2e-147
96	single-stranded DNA-binding protein	50 983	50 537	-	MCO3804737.1	100%	4e-105
97	exonuclease	51 510	50 980	-	MCO3804736.1	100%	3e-126



IME175 基因序列与 JBD44 和 PAJU2 噬菌体基因序列相似度不高;颜色灰度代表基因相似性高低噬菌体根据功能不同分为 4 类(裂解相关基因、DNA 组装、复制调节相关基因、假想蛋白)

图 5 噬菌体全基因组比较与序列比对

为进一步分析 IME307 与其他噬菌体的亲缘关系,基于末端酶大亚基氨基酸序列构建进化树(图 6),从图 6 中可看出,IME307 与 Pseudomonas phage VbPaeS PMG1、Lenoonostoo phage phiLN12、Lacttobacillus phage LL-Ku 等噬菌体都位于 *Mccleskeyvirinae* 病毒属。因此,IME307 属于有尾噬菌体目,长尾噬菌体(*Siphoviridae*),*Mccleskeyvirinae* 病毒属。



分支点上的数字代表可信度,数值越接近 100,可信度越强;标尺越短代表亲缘关系越近;括号内代表 GenBank 序列登录号;IME307 属于 *Mccleskeyvirinae* 病毒亚科

图 6 IME-307 系统发育树分析

3 讨论

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*,PA)是一种机会性环境病原体,非发酵型革兰阴性杆菌,广泛分布于自然界,为土壤中最常见的细菌之一,通常在患有囊性纤维化的30%儿童和高达80%的25岁及以上成年人中定植[23],因此可能会导致慢性肺部感染、肺功能下降,甚至死亡。铜绿假单胞菌表面通常具有较厚的荚膜多糖(capsular polysaccharide,CPS),CPS是细菌感染宿主过程中的一个重要毒力因子,长期和反复的使用广谱抗菌药物后,铜绿假单胞菌对抗生素的耐药性会逐渐增强,并导致多重耐药性铜绿假单胞菌菌株的产生。作为细菌的天敌,噬菌体的研究得到了许多研究者的关注。噬菌体裂解细菌会形成噬菌斑,根据之前的一项研究表明,噬菌斑的大小是由噬菌体的一些特性所引起的,如噬菌体吸附速率、爆发量大小、裂解时间、噬菌体的大小和扩散率等[24];这些因素可能会导致噬菌斑形态及大小的差异。在噬菌体复制周期中,其晚期阶段主要是噬菌体裂解宿主菌释放子代噬菌体颗粒的过程,在裂解过程中会合成裂解相关蛋白,解聚酶是一种可以破坏细菌表面荚膜多糖的蛋白;表观上显示噬菌斑的周围被晕环包围,这种现象是因为在形成晕环的过程中,由于解聚酶的过度产生,细菌表面荚膜被破坏并降解为低聚糖重复单元,解聚酶通过琼脂层向外周扩散。有研究表明噬菌体解聚酶较噬菌体本身具有更宽泛的宿主谱,并对小鼠感染细菌具有很好的治疗作用[25],因此噬菌体解聚酶拥有较好的应用潜力。在本研究中IME307噬菌体所形成的噬菌斑周围可以看见透明晕环,晕环面积的大小随着时间的延长不断扩大,因此推断该噬菌体可能具有编码解聚酶相关的基因。在IME307噬菌斑的中央有白色的斑点,这种现象可能是本研究选择的宿主菌Pa175中含有溶原性噬菌体亦或者Pa175迅速对IME307耐受所致;挑选IME307噬菌斑的中央白色斑点通过铺双层板法再次进行噬菌体侵染,并未发现新的噬菌斑,在对IME307全序列基因进行详细注释分析发现,IE307基因中含有整合酶、切离酶、抑制子repressor等与溶原功能相关的基因,因此我们推论IME307为溶原性噬菌体。

本研究从解放军总医院第五医学中心未经处理的污水中成功分离到1株针对铜绿假单胞菌的噬菌体,命名为IME307。该噬菌体对环境具有较好的适应性,能够在较宽的温度和跨度较大的pH范围(5~11)内保持很好的滴度及活性,说明噬菌体IME307能耐受较强的酸碱性及高温环境,具有较强的适应性。不同的铜绿假单胞菌噬菌体其潜伏期、裂解期、裂解量存在较大差异。N4样噬菌体DSS3Φ2和EE36Φ具有更长的潜伏期,其潜伏期分别为3 h和2 h,其爆发裂解量分别为350和1 500[26];LP14具有785个PFU/感染细菌的大爆发量[27],而YH6约100个PFU/感染细菌[28]。在对IME307生物学特性进行研究发现;在MOI=0.1时,IME307具有潜伏期短(少于10 min),增殖到60 min以后达到稳定期,因此IME307具有潜伏期短、爆发量大的特点。进一步通过Illumina MiSeq高通量测序平台对IME307进行全基因组测序,并对测序数据拼接得到全基因组序列,IME307为双链DNA噬菌体,基因组大小为51 545 bp,G+C含量为56.1%。尽管我们通过2代测序对IME307进行全基因组测序,并得到全基因组序列,然而未能对该噬菌体进行末端鉴定,未能找到该噬菌体末端重复序列。结合李莎莎[29]及邢少贞[30]等构建查找末端序列的方法即高频序列就是噬菌体基因组的末端序列;我们将拼接的IME307噬菌体基因组序列与噬菌体下机原始数据通过CLC genomics workbench 12.0进行mapping并在高通量测序的原始数据中查找高频序列,结果未能发现IME307中存在高频序列,然而噬菌体末端仍旧是我们非常值得注意的一个问题,这在以后的噬菌体研究中会特别关注。

噬菌体进化树分析及全基因组序列比对分析,发现IME307噬菌体全基因组与其他铜绿假单胞菌噬菌体具有较大差异,其中与相似性最高的Pseudomonas phage PAJU2噬菌体进行比较,仅41%的全基因组覆盖率,在这41%序列里面,仅有94.06%的相似性。因此推断本研究所涉及的噬菌体具有一定程度的独特性及新颖性。

噬菌体疗法作为一种耐药菌感染的生物治疗方法,目前已引起科学界的重视,但要将其真正应用于临床仍有许多问题要解决,如噬菌体裂解谱较窄、噬菌体具有宿主特异性和噬菌体数量较少等、细菌耐药及进化后快速耐受噬菌体、机体启动免疫反应被快速清除噬菌体、噬菌体制剂安全等问题[19, 31]。因此,需要分离筛选更多的不同裂解谱的宽谱噬菌体、人工进化突变株、噬菌体改造等,构建容量巨大的噬菌体库,以此覆盖噬菌体裂菌谱。在对IME307裂解谱进行研究时发现,IME307对铜绿假单胞菌Pa175具有较强的裂解作用,但裂解谱较窄,仅能裂解31株中的2株铜绿假单胞菌,不能裂解其他种属细菌;这表明IME307具有高效特异性和高度专一性,这与大多数噬菌体具有共

同特性。但这种特异性在高效、靶向性地杀灭致病菌的同时会造成噬菌体裂解谱狭窄及应用范围受限,然而噬菌体“鸡尾酒”疗法有望能有效解决这一问题[32]。在今后的研究中,我们将寻找铜绿假单胞菌分型方法,并针对不同型别的铜绿假单胞菌分离不同类别的噬菌体,利用噬菌体“鸡尾酒”制剂以此扩大铜绿假单胞菌的裂解谱。

参考文献:

[1] CLARK S T, GUTTMAN D S, HWANG D M. Diversification of *Pseudomonas aeruginosa* within the cystic fibrosis lung and its effects on antibiotic resistance[J]. FEMS Microbiol Lett, 2018, 365(6): fny026. DOI: 10.1093/femsle/fny026.

[2] YU X Y, XU Y, GU Y, *et al*. Characterization and genomic study of “phiKMV-like” phage PAXYB1 infecting *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 13068. DOI: 10.1038/s41598-017-13363-7.

[3] PABARY R, SINGH C, MORALES S, *et al*. Antipseudomonal bacteriophage reduces infective burden and inflammatory response in murine lung[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 60(2): 744-751. DOI: 10.1128/AAC.01426-15.

[4] 吴芷莹, 金泽源, 李万霞, 等. PB1样铜绿假单胞菌噬菌体PHW2的生物学特性[J]. 微生物学通报, 2021, 48(9): 3205-3217.
WU Z Y, JIN Z Y, LI W X, *et al*. Characterization of a PB1-like phage PHW_2 infecting *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microbiol China, 2021, 48(9): 3205-3217.

[5] 张琳, 乐率, 卢曙光, 等. 铜绿假单胞菌噬菌体PaP4的分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2013, 40(4):609-616.
ZHANG L, LE S, LU S G, *et al*. Isolation and identification a novel *Pseudomonas aeruginosa* phage PaP4[J]. Microbiol China, 2013, 40(4):609-616.

[6] HARPER D R, ENRIGHT M C. Bacteriophages for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections[J]. J Appl Microbiol, 2011, 111(1): 1-7. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05003.x.

[7] HORCAJADA J P, MONTERO M, OLIVER A, *et al*. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections[J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32(4): e00031-e00019. DOI: 10.1128/CMR.00031-19.

[8] DEBARBIEUX L, LEDUC D, MAURA D, *et al*. Bacteriophages can treat and Prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections[J]. J Infect Dis, 2010, 201(7): 1096-1104. DOI: 10.1086/651135.

[9] ALEMAYEHU D, CASEY P G, MCAULIFFE O, *et al*. Bacteriophages φMR299-2 and φNH-4 can eliminate *Pseudomonas aeruginosa* in the murine lung and on cystic fibrosis lung airway cells[J]. mBio, 2012, 3(2): e00029-e00012. DOI: 10.1128/mBio.00029-12.

[10] FUKUDA K, ISHIDA W, UCHIYAMA J, *et al*. *Pseudomonas aeruginosa* keratitis in mice: effects of topical bacteriophage KPP12 administration[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e47742. DOI: 10.1371/journal.pone.0047742.

[11] HAGENS S, HABEL A, VON AHSEN U, *et al*. Therapy of experimental pseudomonas infections with a nonreplicating genetically modified phage [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(10): 3817-3822. DOI: 10.1128/AAC.48.10.3817-3822.2004.

[12] WATANABE R, MATSUMOTO T, SANO G, *et al*. Efficacy of bacteriophage therapy against gut-derived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in mice[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(2): 446-452. DOI: 10.1128/AAC.00635-06.

[13] ROSE T, VERBEKEN G, VOS D D, *et al*. Experimental phage therapy of burn wound infection: difficult first steps[J]. Int J Burns Trauma, 2014, 4(2): 66-73.

[14] WRIGHT A, HAWKINS C H, ÄNGGÅRD E E, *et al*. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy[J]. Clin Otolaryngol, 2009, 34(4): 349-357. DOI: 10.1111/j.1749-4486.2009.01973.x.

[15] JAMAL M, BUKHARI S M A U S, ANDLEEB S, *et al*. Bacteriophages: an overview of the control strategies against multiple bacterial infections in different fields[J]. J Basic Microbiol, 2019, 59(2): 123-133. DOI: 10.1002/jobm.201800412.

[16] 陈邬锦, 周静茹, 李瑞, 等. 一株分离自重症肺炎患者痰液标本的铜绿假单胞菌噬菌体生物学特性及基因分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(5): 546-550, 579. DOI: 10.13350/j.cjpb.200510.
CHEN W J, ZHOU J R, LI R, *et al*. Biological characteristics and gene analysis of a *Pseudomonas aeruginosa* phage isolated from sputum samples of patients with severe pneumonia[J]. J Pathog Biol, 2020, 15(5): 546-550, 579. DOI: 10.13350/j.cjpb.200510.

[17] CHAN B K, ABEDON S T, LOC-CARRILLO C. Phage cocktails and the future of phage therapy[J]. Future Microbiol, 2013, 8(6): 769-783. DOI: 10.2217/fmb.13.47.

[18] WEINBAUER M G. Ecology of prokaryotic viruses[J]. FEMS Microbiol Rev, 2004, 28(2): 127-181. DOI: 10.1016/j.femsre.2003.08.001.

[19] PIRES D P, VILAS BOAS D, SILLANKORVA S, *et al*. Phage therapy: a step forward in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections[J]. J Virol, 2015, 89(15): 7449-7456. DOI: 10.1128/JVI.00385-15.

[20] CAO Z H, ZHANG J C, NIU Y D, *et al*. Isolation and characterization of a "phiKMV-like" bacteriophage and its therapeutic effect on mink hemorrhagic pneumonia[J]. PLoS One, 2015, 10(1): e0116571. DOI: 10.1371/journal.pone.0116571.

[21] FREDRIKSSON N J, HERMANSSON M, WILÉN B M. The choice of PCR primers has great impact on assessments of bacterial community diversity and dynamics in a wastewater treatment plant[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e76431. DOI: 10.1371/journal.pone.0076431.

[22] WANG C, LI P Y, NIU W K, *et al*. Protective and therapeutic application of the depolymerase derived from a novel KN_1 genotype of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage in mice[J]. Res Microbiol, 2019, 170(3): 156-164. DOI: 10.1016/j.resmic.2019.01.003.

[23] ROSSI E, LA ROSA R, BARTELL J A, *et al*. *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis[J]. Nat Rev Microbiol, 2021, 19(5): 331-342. DOI: 10.1038/s41579-020-00477-5.

[24] GALLET R, KANNOLY S, WANG I N. Effects of bacteriophage traits on plaque formation[J]. BMC Microbiol, 2011, 11: 181. DOI: 10.1186/1471-2180-11-181.

[25] CHIBEU A, LINGOHR E J, MASSON L, *et al*. Bacteriophages with the ability to degrade uropathogenic *Escherichia coli* biofilms[J]. Viruses, 2012, 4(4): 471-487. DOI: 10.3390/v4040471.

[26] ZHAO Y L, WANG K, JIAO N Z, *et al*. Genome sequences of two novel phages infecting marine roseobacters[J]. Environ Microbiol, 2009, 11(8): 2055-2064. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.01927.x.

[27] SHI X J, ZHAO F Y, SUN H Z, *et al*. Characterization and complete genome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage vB_PaeP_LP14 belonging to genus litunavirus[J]. Curr Microbiol, 2020, 77(9): 2465-2474. DOI: 10.1007/s00284-020-02011-5.

[28] YANG M, DU C T, GONG P J, *et al*. Therapeutic effect of the YH6 phage in a murine hemorrhagic pneumonia model[J]. Res Microbiol, 2015, 166(8): 633-643. DOI: 10.1016/j.resmic.2015.07.008.

[29] 李莎莎, 范航, 安小平, 等. 采用高通量测序技术分析尾病毒目噬菌体基因组末端序列特点[J]. 病毒学报, 2013, 29(1): 39-43.
LI S S, FAN H, AN X P, *et al*. Utility of high throughput sequencing technology in analyzing the terminal sequence of caudovirales bacteriophage genome[J]. Chin J Virol, 2013, 29(1): 39-43.

[30] 邢少贞, 张湘莉兰, 舒鹏, 等. 粪肠球菌噬菌体 vB_E. faecalis_IME196 的生物学特性及其全基因组分析[J]. 微生物学通报, 2016, 43(9):2040-2048.
XING S Z, ZHANGXIANG L L, SHU P, *et al*. Characterization and complete genome sequence analysis of *Enterococcus faecalis* bacteriophage v B_E. faecalis_IME196[J]. Microbiol China, 2016, 43(9):2040-2048.

[31] 杨雨卉, 乐率. 铜绿假单胞菌噬菌体治疗的研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2017, 42(10):814-820.
YANG Y H, LE S. Progress on *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage therapy[J]. Chin J Antibiot, 2017, 42(10): 814-820.

[32] KIFELEW L G, WARNER M S, MORALES S, *et al*. Efficacy of lytic phage cocktails on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in mixed-species planktonic cultures and biofilms[J]. Viruses, 2020, 12(5): 559. DOI: 10.3390/v12050559.

(**收稿**:2022-09-13;**修回**:2023-05-02)

(编辑 邓强庭)