

## 研究报告



## 路德维希肠杆菌噬菌体的分离及生物学特性

龚梦馨<sup>1</sup> 孙庆惠<sup>1,2</sup> 张茜茜<sup>1</sup> 黄志伟<sup>1</sup> 杨洪江<sup>\*1</sup>

1 工业发酵微生物教育部重点实验室 天津市工业微生物重点实验室 天津科技大学生物工程学院 天津 300457

2 海南医学院 海南 海口 570102

**摘要:**【背景】噬菌体能够特异性杀死宿主细菌,特别是耐药性细菌,可以作为新型杀菌剂,而关于路德维希肠杆菌噬菌体的研究尚属空白。【目的】分离路德维希肠杆菌噬菌体,并对其生物学特性进行研究。【方法】通过双层平板法分离、纯化、鉴定噬菌体;通过 SDS-PAGE 电泳分析结构蛋白;通过透射电子显微镜分析噬菌体的形态;通过结晶紫染色法和刚果红平板法分析生物被膜。【结果】以路德维希肠杆菌 X20 为指示菌从环境样品中分离获得了噬菌体 GM20,噬菌斑透明且有较小晕环,直径大小平均为 0.47 mm。透射电镜观察显示,噬菌体 GM20 具有可伸缩尾部,属于肌尾噬菌体科(Myoviridae)。GM20 的滴度为  $7.65 \times 10^9$  PFU/mL,为烈性噬菌体。一步生长曲线结果显示,噬菌体的潜伏期约为 15 min,释放量约为 164.3 PFU/infection center。进一步分析显示,GM20 具有较好的抑菌效果,耐噬菌体菌株突变株平均突变率为  $1.06 \times 10^{-5}$ 。【结论】烈性噬菌体 GM20 能够杀死路德维希肠杆菌 X20,有可能应用于路德维希肠杆菌感染的预防与控制。

**关键词:** 路德维希肠杆菌,噬菌体 GM20,生物学特性

Isolation and characterization of an *Enterobacter ludwigii* phage, GM20GONG Meng-Xin<sup>1</sup> SUN Qing-Hui<sup>1,2</sup> ZHANG Xi-Xi<sup>1</sup> HUANG Zhi-Wei<sup>1</sup>  
YANG Hong-Jiang<sup>\*1</sup>

1 Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology of Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

2 Hainan Medical College, Haikou, Hainan 570102, China

**Abstract:** [Background] Phage can specifically kill host bacteria especially the strains resistant to antibiotics. Phage can be a new antimicrobial agents alternative to conventional drugs. [Objective] No *Enterobacter ludwigii* phage has been reported until now. The purpose of this work is to isolate and characterize *E. ludwigii* phage. [Methods] The double-layer plate method was used for isolation, purification, and quantification of phage; SDS-PAGE was used for viral structural protein analysis;

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (31370205)

**\*Corresponding author:** E-mail: hongjiangyang@tust.edu.cn

**Received:** 03-01-2019; **Accepted:** 07-05-2019; **Published online:** 16-07-2019

**基金项目:** 国家自然科学基金(31370205)

**\*通信作者:** E-mail: hongjiangyang@tust.edu.cn

**收稿日期:** 2019-01-03; **接受日期:** 2019-05-07; **网络首发日期:** 2019-07-16

transmission electron microscopy (TEM) was used for phage morphology analysis; and the Crystal Violet staining and Congo Red agar methods were used for biofilm analysis. **[Results]** The phage GM20 was isolated from the environmental samples with the strain *E. ludwigii* GM20 as indicator. The plaques were transparent with the average diameter about 0.47 mm. TEM showed that GM20 has a contractile tail, and it was classified as a member of the *Myoviridae* family. The titer of phage is  $7.65 \times 10^9$  PFU/mL, suggesting that it is a virulent phage. The one-step growth curve showed that GM20 had a latent period of 15 min and a burst size of 164.3 PFU/infection center. Further experiments showed that GM20 could inhibit bacteria growth effectively, and the average mutation frequency of phage-resistant mutants was about  $1.06 \times 10^{-5}$ . **[Conclusion]** The virulent phage GM20 can effectively kill the host strain *E. ludwigii* X20 and may be used in the prevention and control of *E. ludwigii* infection.

**Keywords:** *Enterobacter ludwigii*, Phage GM20, Basic properties

噬菌体是细菌病毒,可以杀死宿主细菌,包括耐药性细菌。噬菌体数量庞大,地球上约有  $10^{32}$  个,是细菌数量的 10 倍,能够感染约  $10^8$  种细菌<sup>[1]</sup>。不同噬菌体对细菌的裂解作用保持了生物圈中细菌数量和种类平衡,同时推动了噬菌体和细菌的共同进化<sup>[2-3]</sup>。在后基因组时代,新型抗菌素的发现处于停滞状态,由耐药性细菌引起的感染可能危及生命,从而激发了人们以噬菌体作为治疗手段的兴趣<sup>[4-5]</sup>。近年来,噬菌体作为一种替代抗菌素或补充治疗方法,取得了巨大的进展<sup>[6]</sup>。

路德维希肠杆菌(*Enterobacter ludwigii*)为革兰氏阴性菌,属于肠杆菌属(*Enterobacter*)。该细菌与其它 5 种肠杆菌染色体 DNA 相似性较高,约在 61%–67%之间,同属于阴沟肠杆菌群(*Enterobacter cloacae* complex),该群包括阿氏肠杆菌(*Enterobacter asburiae*)、霍氏肠杆菌(*Enterobacter hormaechei*)、阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)、神户肠杆菌(*Enterobacter kobei*)和超压肠杆菌(*Enterobacter nimipressuralis*),普遍存在于土壤、污水、水和肠道等环境中<sup>[7]</sup>。近年来,不断有研究发现路德维希肠杆菌可导致腹部、泌尿道、脑膜和外科部位感染。路德维希肠杆菌对第一代头孢菌素具有内在的抗性,并具有 AmpC 类  $\beta$  内酰胺酶,能够耐受第三代头孢菌素和窄谱  $\beta$  内酰胺等抗菌素;路德维希肠杆菌细胞膜孔道蛋白突变能够导致对碳青霉烯类抗菌素耐受,从而限制了治疗过程中抗菌素的选择。另外,路德维希肠杆菌能够合成生物

被膜,作为物理屏障来抵御多种抗生素的攻击<sup>[8-9]</sup>。更令人担忧的是,在过去 10 年中发现了多株临床菌株获得携带多个外源的抗菌素抗性基因,从而对多种抗菌素产生抗性<sup>[10-11]</sup>。

本研究以实验室保存的路德维希肠杆菌 X20 为指示菌,从环境样品中分离了一株噬菌体 GM20,并进一步分析了该噬菌体的结构蛋白,以及耐噬菌体突变株的自发突变率、释放量和抑菌效率等。目前关于路德维希肠杆菌噬菌体的研究处于空白,本研究分离鉴定的路德维希肠杆菌噬菌体可以应用于路德维希肠杆菌感染的预防和控制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 环境样品及菌株

样品采集自天津科技大学校园河道淤泥,用于分离噬菌体。本实验室分离保存的菌株 X20 经分析 16S rRNA 基因的序列鉴定为路德维希肠杆菌(*Enterobacter ludwigii*),相关序列上传至 NCBI 的 GenBank,获得登录号为 MG254540.1。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器及培养基

蛋白胨,酵母浸粉,琼脂粉, Oxoid 公司; PEG6000、蛋白酶 K,北京鼎国生物技术有限责任公司; Premixed Protein Marker (Low), 宝生物有限公司。

全自动凝胶成像仪,北京原平皓生物技术有限公司; 酶标仪, Broadcom Corporation 公司。

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, 氯

化钠 10.0, pH 7.0–7.2; 半固体琼脂培养基: 琼脂粉 5 g/L, 加热溶解; 刚果红固体 LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, 氯化钠 10.0, 胰蛋白胨 10.0, 刚果红 40.0, 考马斯亮蓝 0.02, pH 7.0–7.2。所有培养基均  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min 使用。

### 1.2 噬菌体的分离纯化与保存

将路德维希杆菌 X20 于 30 °C、160 r/min 振荡培养过夜后, 以 2% 接种量转接于 100 mL 液体 LB 培养基中, 30 °C、160 r/min 振荡培养至  $OD_{600}$  为 0.6, 向对数期的指示菌液中加入 3 mL 处理好的样品, 继续振荡培养 48 h。

吸取富集液 1 mL, 12 000 r/min 离心 10 min, 上清使用直径为 0.22  $\mu$ m 的滤膜过滤除菌, 再将滤液用液体 LB 以 10 倍比梯度稀释, 将 200  $\mu$ L 路德维希杆菌的菌液分别和 100  $\mu$ L 噬菌体富集液混合并侵染, 10 min 后结束侵染, 将混合物加入到 3 mL 已经融化好的软琼脂中, 混匀后将软琼脂倾倒入 LB 平板培养基上, 待软琼脂凝固后, 将平板倒置于 30 °C 培养箱内培养。

通过噬菌体的纯化实验, 将大小、形态均一的噬菌体扩增培养和过滤除菌。取 600  $\mu$ L 裂解液(已除菌)与 600  $\mu$ L 60% 无菌甘油混匀, 于 -80 °C 保存。

### 1.3 噬菌体颗粒 SDS-PAGE 分析

吸取 1 mL 噬菌体裂解液加入培养至对数期的 300 mL 路德维希杆菌 X20 培养液中, 30 °C、160 r/min 振荡培养 4 h。在裂解液中加入 DNase I 及 RNase A 至终浓度各为 5  $\mu$ g/mL, 37 °C 作用 1 h。按每 100 mL 液体加入 0.5 g NaCl 的比例加入 NaCl, 混匀溶解, 冰浴 1 h, 10 000 r/min 离心 20 min。收集上清, 加入固体 PEG6000 至终浓度 10% (质量体积比), 充分振荡溶解, 4 °C 静置过夜。10 000 r/min 离心 20 min, 弃上清, 收集沉淀。用 500  $\mu$ L TM 溶液重悬沉淀, 加入与重悬液等体积的氯仿/异戊醇 (24:1, 体积比), 在振荡器上振荡 1 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 收集上层水相, 重复 3 次, 彻底将 PEG6000 去除, 直至中间层再无白色蛋白膜。加入

等体积纯氯仿抽提 2 次, 得到粗提的噬菌体颗粒, 用分子量为 100 kD 的超滤膜浓缩噬菌体。

### 1.4 噬菌体透射电镜观察

浓缩的噬菌体颗粒用 0.1 mmol/L 的醋酸铵溶液(pH 7.0)洗涤 3 次, 去除宿主的可溶性生物小分子片段。噬菌体溶液直接用 2% 的磷钨酸钠(pH 6.7)进行负染色, 利用 HT7700 透射电子显微镜在 100 kV 电压下观察<sup>[12]</sup>。

### 1.5 一步生长曲线

按照文献[13]中方法, 将指示菌路德维希杆菌 X20 过夜培养物以 2% 的接种量转接至 100 mL 液体 LB 培养基中, 培养至对数生长期( $OD_{600}$  为 0.6), 4 000 r/min 离心 7 min 富集菌体。将菌体用 500  $\mu$ L 无菌液体 LB 重悬后移至 1.5 mL 无菌离心管中, 加入 500  $\mu$ L 噬菌体裂解液(滴度为  $10^4$  PFU/mL, 保证 MOI<0.1), 室温静置吸附 1 min 后, 立即 13 000 r/min 离心 30 s 弃去上清, 去除游离的噬菌体颗粒。将沉淀用 1 mL 液体 LB 重悬后倒入 100 mL 菌液中, 30 °C、160 r/min 培养并开始计时, 每隔 5 min 取样 100  $\mu$ L, 进行系列稀释后测滴度。

### 1.6 耐噬菌体突变株的自发突变率

采用终点滴定-反浊法<sup>[14]</sup>, 对耐噬菌体菌株的自发突变率进行测定。具体方法为: 将路德维希杆菌 X20 培养至  $OD_{600}$  为 0.6 左右, 涂板计数为  $4.29 \times 10^9$  CFU/mL。10 倍比稀释细菌终浓度分别为  $4.29 \times 10^1$ 、 $4.29 \times 10^2$ 、 $4.29 \times 10^3$ 、 $4.29 \times 10^4$ 、 $4.29 \times 10^5$ 、 $4.29 \times 10^6$ 、 $4.29 \times 10^7$  CFU/mL 后, 分别加入 10  $\mu$ L 滴度为  $7.65 \times 10^9$  PFU/mL 的噬菌体 GM20 原液混匀, 终浓度为  $7.65 \times 10^7$  PFU/mL。另外, 取 10  $\mu$ L 噬菌体 GM20 原液加入到 1 mL 液体 LB 中作为对照, 30 °C、160 r/min 振荡培养 24 h, 做 10 个平行。

### 1.7 噬菌体杀菌效力

噬菌体对宿主菌的抑菌曲线按照文献[15]中方法测定。在 96 孔板中每个孔加入 4  $\mu$ L 培养至  $OD_{600}$  为 0.6 左右的路德维希杆菌 X20 和 4  $\mu$ L 噬菌体 (MOI=0、0.000 01、0.000 1、0.001、0.01、0.1、

1、10), 然后补加 192  $\mu\text{L}$  液体 LB 培养基。30  $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 振荡培养, 每隔 30 min 用酶标仪测定培养物的  $OD_{600}$ , 测 270 min, 做 6 个平行。

### 1.8 噬菌体对生物被膜形成的抑制

将指示菌路德维希杆菌 X20 过夜培养物和噬菌体裂解液分别按 2% 的比例接种于 200  $\mu\text{L}$  LB 液体培养基的 96 孔板中, 感染复数分别为 0、0.000 01、0.000 1、0.001、0.01、0.1 和 1 加入噬菌体, 30  $^{\circ}\text{C}$  静置培养 48 h。倒掉孔径中的培养物, 清水洗 2 次, 用滤纸吸干; 加入 280  $\mu\text{L}$  结晶紫染色 20 min 后倒掉, 清水洗 2 次, 用滤纸吸干; 加入 280  $\mu\text{L}$  无水乙醇, 静置 20 min, 用酶标仪测定  $OD_{600}$  的吸光度<sup>[16]</sup>。

### 1.9 噬菌体对宿主细菌菌落的影响

取 5  $\mu\text{L}$  培养至对数期的路德维希杆菌 X20 与 5  $\mu\text{L}$  无菌噬菌体 GM20, 分别以感染复数为 0、0.000 01、0.000 1、0.001、0.01、0.1 和 1 混合均匀, 将混合物点在加入刚果红的固体 LB 培养基上, 30  $^{\circ}\text{C}$  静置培养 48 h 后观察并拍照记录菌落形态<sup>[17]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 噬菌体的分离纯化

以路德维希杆菌 X20 为指示菌, 用双层平板法从淤泥样品中分离出一株路德维希杆菌 X20 噬菌体, 命名为 GM20。噬菌斑边缘有晕环, 经游

标卡尺测得噬菌斑直径平均为 0.47 mm。加入 500  $\mu\text{L}$  噬菌体到 300 mL 指示菌培养物中, 培养 8 h 后裂解液中噬菌体滴度达到  $7.65 \times 10^9$  PFU/mL, 显示 GM20 为烈性噬菌体(图 1)。

### 2.2 噬菌体 GM20 的结构蛋白

将纯化的噬菌体 GM20 颗粒进行 SDS-PAGE 电泳, 并用考马斯亮蓝 G250 染色和脱色后获得蛋白质组图谱。在凝胶上观察到 1 个主要结构蛋白和 12 个次要的结构蛋白, 分子量位于 44.3 kD 和 60.0 kD 之间, 主要结构蛋白大小为 53.8 kD 左右(图 2)。

### 2.3 噬菌体 GM20 的电镜观察

噬菌体电镜观察结果如图 3 所示, 噬菌体 GM20 头部为 20 面体结构, 尾部由一个可伸缩的外层尾鞘和一个内部尾管组成。头部直径约为 80.0 nm, 尾部结构长 106.7 nm。电镜照片显示, 噬菌体 GM20 属于有尾噬菌体目(Caudovirales)的肌尾噬菌体科(Myoviridae)。

### 2.4 噬菌体 GM20 一步生长曲线

噬菌体 GM20 的一步生长曲线如图 4 所示, GM20 感染宿主菌在 15 min 内的滴度没有显著改变, 表明其潜伏期约为 15 min; 从 15 min 后滴度开始上升, 20 min 后效价趋于稳定。经过比较平台期(P)与潜伏期(L)的滴度, 计算出释放量为 164.3 PFU/infection center。结果显示, 该噬菌体在宿主菌 X20 中具有较强的繁殖能力。

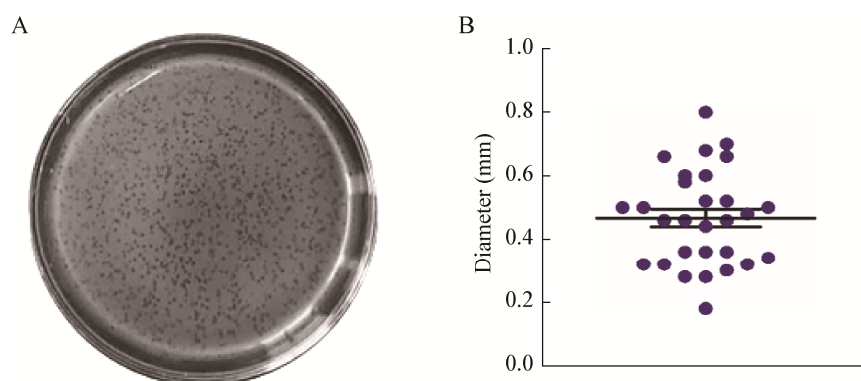


图 1 噬菌体 GM20 的噬菌斑(A)和直径(B)

Figure 1 Plaques (A) and diameter (B) of phage GM20

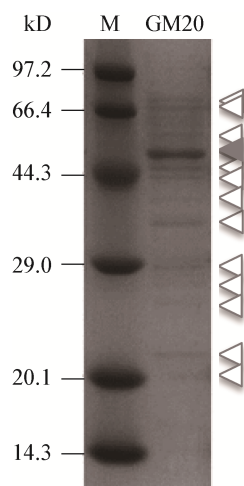


图2 噬菌体 GM20 的结构蛋白

Figure 2 Structure protein of phage GM20

注: M: 混合标记蛋白(Low); ◀表示数量多的蛋白质条带; ▶表示数量少的蛋白质条带.

Note: M: Premixed protein marker (Low); ▶ Solid arrows indicate major protein bands; ▶ Blank arrows show minor protein bands.

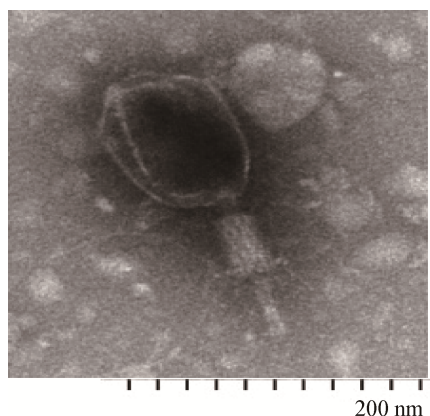


图3 噬菌体 GM20 透射电镜照片

Figure 3 Transmission electron micrograph of phage GM20

## 2.5 耐噬菌体 GM20 突变株的自发突变率

将指示菌培养物和噬菌体 GM20 振荡培养 24 h, 观察试管中培养物的反浊情况, 能返浊的最低浓度管中所含细菌数的倒数即为耐受突变的频率。结果如图 5 所示, 突变频率范围为  $2.33 \times 10^{-7}$ – $2.1 \times 10^{-5}$  (最后一个返浊的试管中, 存在 1–9 个对噬菌体耐受的突变细胞), 平均突变频率为  $1.06 \times 10^{-5}$ 。

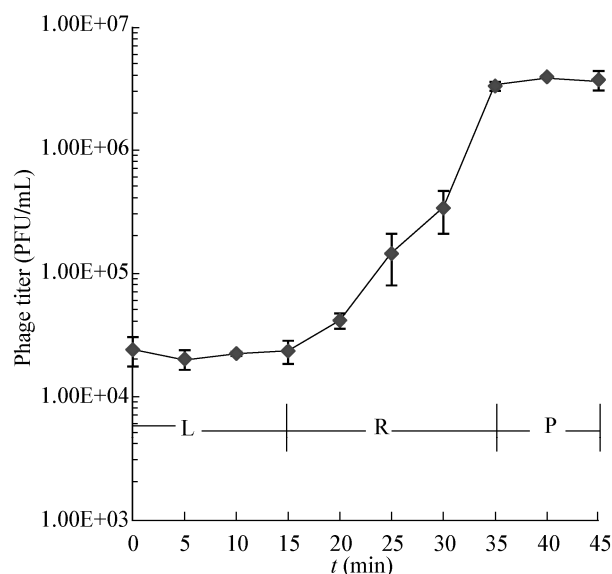


图4 噬菌体 GM20 的一步生长曲线

Figure 4 One-step growth curve of phage GM20

注: L: 潜伏期; R: 暴发期; P: 稳定期.

Note: L: Incubation period; R: Burst period; P: Stable period.

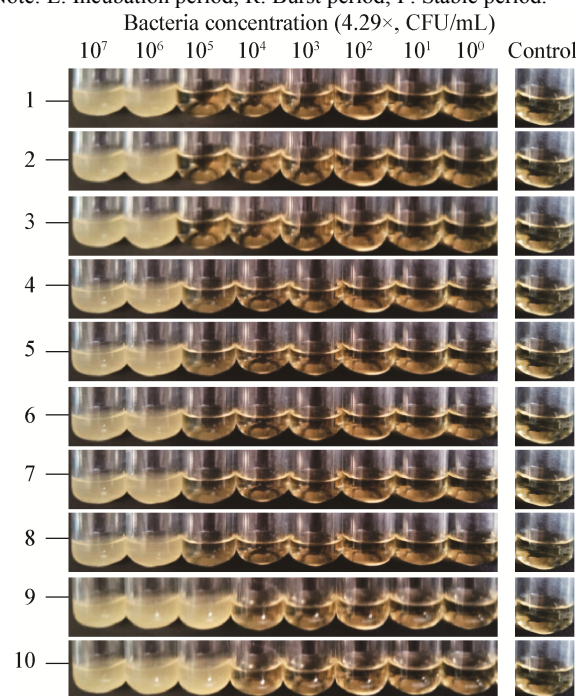


图5 耐噬菌体 GM20 突变株的自发突变率

Figure 5 Spontaneous mutation frequency of the mutants resistant to phage GM20

注: 实验组路德维希杆菌 X20 的浓度为  $4.29 \times 10^0$ – $4.29 \times 10^7$  CFU/mL, 对照(Control)不加指示菌。所有试管的噬菌体 GM20 滴度为  $7.65 \times 10^7$  PFU/mL.

Note: In the experiment group, the bacteria concentrations were  $4.29 \times 10^0$ – $4.29 \times 10^7$  CFU/mL and no indicator cells were added in the control. Phage titer was  $7.65 \times 10^7$  PFU/mL in all test tubes.



## 2.6 噬菌体 GM20 对路德维希杆菌的裂解作用

在不同 MOI 下测定噬菌体 GM20 对宿主菌 X20 的裂解曲线, 结果如图 6 所示, 随着 MOI 的升高, 噬菌体的抑制效果越明显。当 MOI=10 时, 宿主菌几乎不生长; 当 MOI=0.000 01 和 0.000 1 时, 宿主菌一直呈缓慢增长状态; 当 MOI 逐渐增大, 宿主菌增长越缓慢, 说明噬菌体的数量越多, 对宿主菌的降解效果越明显。另外, MOI=0.000 01–1 时仍有宿主菌生长, 可能在噬菌体的自然选择下, 宿主菌自发突变产生耐受菌。因此从应用出发, 能够最佳抑制宿主菌生长的 MOI 为 10。

## 2.7 噬菌体 GM20 对宿主菌生物被膜形成的抑制效率

细菌在物体表面能够形成生物被膜, 很难控制。生物被膜已被认为是难治性肺部感染及生物材料相关性感染的重要原因<sup>[18]</sup>。为了研究噬菌体抑制生物被膜形成的作用, 以路德维希杆菌菌株

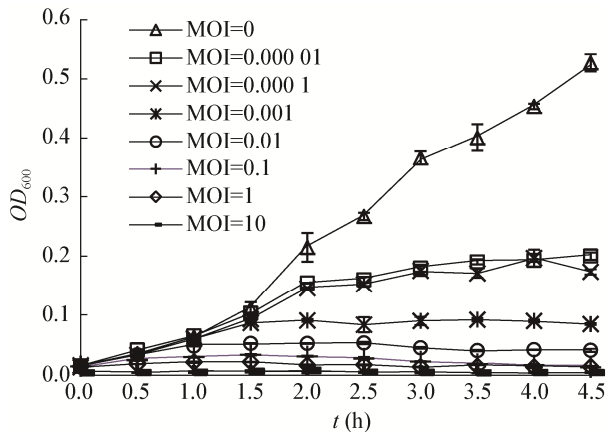


图 6 噬菌体 GM20 裂解细菌的动态曲线  
Figure 6 Lytic kinetics of phage GM20

X20 为指示菌, 分析在噬菌体 GM20 存在情况下生物被膜量的变化, 对照组中不加噬菌体(MOI=0)。结果如图 7 所示, 当 MOI=0.01 时, GM20 可以抑制宿主菌 47%的生物被膜形成, 不同 MOI 的噬菌体对路德维希杆菌 X20 生物被膜的形成都有不同程度的抑制。

## 2.8 刚果红平板观察噬菌体 GM20 对生物被膜形成的抑制效果

刚果红通常用于观察菌落形态, 检测胞外多糖(Exopolysaccharides, EPS)的产量, 胞外多糖(EPS)会影响生物被膜的形成。将噬菌体与菌液按不同 MOI 混匀点在刚果红平板上, 能够直观地看出噬菌体 GM20 对路德维希杆菌 X20 形成生物被膜过程中的抑制作用。当 MOI=0 时, 路德维希杆菌 X20 菌落形态比较平滑, 说明能够形成生物被膜。由图 8

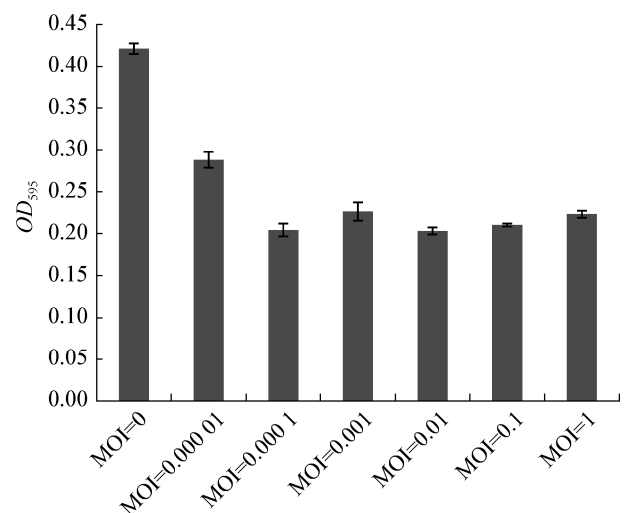


图 7 噬菌体 GM20 对生物被膜的抑制作用  
Figure 7 Inhibitory effect of phage GM20 on the biofilm formation

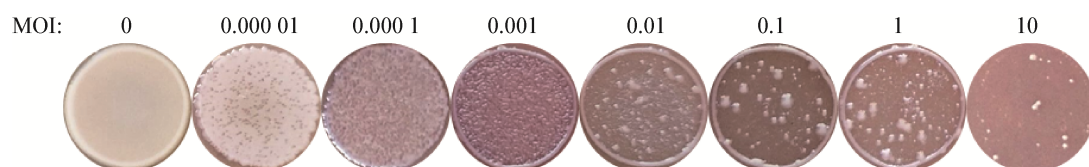


图 8 刚果红平板上菌落形态  
Figure 8 Colony morphology on the Congo Red plate

可以看出,随着噬菌体浓度的增大,噬菌体对生物被膜形成的抑制作用越明显。当 MOI=10 时,几乎没有菌落,噬菌体 GM20 抑菌效果较好。

### 3 讨论与结论

阴沟肠杆菌群成员不断从临床标本中分离出来,与多种疾病密切相关。在美国的重症监护病房,阴沟肠杆菌群细菌造成大约 7% 的院内感染<sup>[19-21]</sup>。路德维希肠杆菌是医院获得性感染的病原菌,临床分离的路德维希肠杆菌菌株一般具有多重耐药性,增加了抗生素治疗失败的风险,临床治疗方案中可以选择的抗菌素非常有限<sup>[22-24]</sup>。

在阴沟肠杆菌群中,仅对阴沟肠杆菌噬菌体有少量研究。靳静等<sup>[6]</sup>分离鉴定了阴沟肠杆菌裂解性噬菌体 Pyg1,该噬菌体属于肌尾噬菌体,感染其宿主细菌的潜伏期为 20 min,释放量为 100 PFU/infection center。王丹等<sup>[25]</sup>从污水中分离鉴定了阴沟肠杆菌噬菌体 ΦEc53,该噬菌体属于有尾病毒目管尾病毒科。在对噬菌体 ΦEc53 性质分析的基础上,将该噬菌体应用于控制阴沟肠杆菌所致皮下脓肿感染的研究,结果显示噬菌体对阴沟肠杆菌所致皮下脓肿的治疗是有效的<sup>[26]</sup>。

本文分离鉴定了路德维希肠杆菌噬菌体 GM20,在国内外尚属首次。与大肠杆菌噬菌体 K99<sup>[27]</sup>(潜伏期 200 min)和食源性大肠杆菌噬菌体 Ec.P01<sup>[28]</sup>(潜伏期 90 min)相比,噬菌体 GM20 具有较短的潜伏期(15 min)。同时,噬菌体 GM20 对宿主菌的释放量为 164.3 PFU/infection center。这些结果说明噬菌体 GM20 是裂解能力较强的噬菌体,能够很好地抑制细菌的生长,可以在控制和预防路德维希肠杆菌感染的各种应用中发挥作用,替代或者减少抗菌素的应用。

目前国内关于路德维希肠杆菌的研究较少,主要集中在分析该菌对特定环境污染的修复方面,而关于路德维希肠杆菌的致病性研究尚未见报道,处于空白阶段<sup>[29-31]</sup>,因此尚无法确定噬菌体 GM20 的宿主范围。另一方面,还需要对噬菌体 GM20 的基

因组进行测序和功能注释,分析其基因组是否携带整合酶(Integrase)基因、毒力因子基因、抗菌素抗性基因等遗传标记,以保证噬菌体 GM20 应用的安全性。

### REFERENCES

- [1] Rohwer F. Global phage diversity[J]. Cell, 2003, 113(2): 141
- [2] Hendrix RW, Hatfull GF, Smith MCM. Bacteriophages with tails: chasing their origins and evolution[J]. Research in Microbiology, 2003, 154(4): 253-257
- [3] Paterson S, Vogwill T, Buckling A, et al. Antagonistic coevolution accelerates molecular evolution[J]. Nature, 2010, 464(7286): 275-278
- [4] Davin-Regli A, Pagès JM. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 392
- [5] Dalmasso M, Strain R, Neve H, et al. Three new *Escherichia coli* phages from the human gut show promising potential for phage therapy[J]. PLoS One, 2016, 11(6): e0156773
- [6] Jin J, Wang SW, Huang DH, et al. Characteristics of *Enterobacter cloacae* phage Pyg1 and the antibacterial activity of the complement system[J]. Journal of Pathogen Biology, 2015, 10(4): 307-311 (in Chinese)  
靳静,王书伟,黄德海,等. 阴沟肠杆菌裂解性噬菌体 Pyg1 生物学特性及补体对其杀菌作用的研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2015, 10(4): 307-311
- [7] Wommack KE, Colwell RR. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems[J]. Microbiology & Molecular Biology Reviews, 2000, 64(1): 69-114
- [8] Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix[J]. Nature Reviews Microbiology, 2010, 8(9): 623-633
- [9] Wang WM, Xu ZH. Research advances on regulation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and its therapeutic strategies[J]. Journal of Zhejiang University (Medical Sciences), 2010, 39(1): 103-108 (in Chinese)  
王文敏,徐志豪. 铜绿假单胞菌生物被膜形成的调控及治疗对策研究进展[J]. 浙江大学学报: 医学版, 2010, 39(1): 103-108
- [10] Antonelli A, D'Andrea MM, Di Pilato V, et al. Characterization of a novel putative xer-dependent integrative mobile element carrying the *bla<sub>NMC-A</sub>* carbapenemase gene, inserted into the chromosome of members of the *Enterobacter cloacae* complex[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2015, 59(10): 6620-6624
- [11] Boyd DA, Mataseje LF, Davidson R, et al. *Enterobacter cloacae* complex isolates harboring *bla<sub>NMC-A</sub>* or *bla<sub>IMI-type</sub>* class A carbapenemase genes on novel chromosomal integrative elements and plasmids[J]. Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 2017, 61(5): e02578-16
- [12] Yang HJ, Li L, Lin SX, et al. Isolation and characterization of a virulent bacteriophage AB1 of *Acinetobacter baumannii*[J]. BMC Microbiology, 2010, 10: 131
- [13] Chow JJ, Batt CA, Sinskey AJ. Characterization of

- Lactobacillus bulgaricus* bacteriophage ch2[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, 54(5): 1138-1142
- [14] Zhang J, Luo YA. Isolation and biological characteristics of phages of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Science), 2012, 32(5): 589-593 (in Chinese)  
张劫, 罗永艾. 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌噬菌体的分离鉴定及其生物学特性[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2012, 32(5): 589-593
- [15] Cui XL, You JJ, Sun L, et al. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* phage C11 and identification of host genes required for virion maturation[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 39130
- [16] Stepanović S, Vuković D, Dakić I, et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation[J]. Journal of Microbiological Methods, 2000, 40(2): 175-179
- [17] Ueda A, Wood TK. Connecting quorum sensing, c-di-GMP, Pel polysaccharide, and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through tyrosine phosphatase TpbA (PA3885)[J]. PLoS Pathogens, 2009, 5(6): e1000483
- [18] Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, et al. Survival strategies of infectious biofilms[J]. Trends in Microbiology, 2005, 13(1): 34-40
- [19] Mokracka J, Koczura R, Pawlowski K, et al. Resistance patterns and integron cassette arrays of *Enterobacter cloacae* complex strains of human origin[J]. Journal of Medical Microbiology, 2011, 60(6): 737-743
- [20] Paauw A, Caspers MPM, Schuren FHJ, et al. Genomic diversity within the *Enterobacter cloacae* complex[J]. PLoS One, 2008, 3(8): e3018
- [21] Li GM, Hu ZH, Zeng P, et al. Whole genome sequence of *Enterobacter ludwigii* type strain EN-119T, isolated from clinical specimens[J]. FEMS Microbiology Letters, 2015, 362(7): fnv033
- [22] Harada K, Shimizu T, Mukai Y, et al. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance in *Enterobacter* spp. isolates from companion animals in Japan[J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0174178
- [23] Flores-Carrero A, Labrador I, Paniz-Mondolfi A, et al. Nosocomial outbreak of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacter ludwigii* co-harboring CTX-M-8, SHV-12 and TEM-15 in a neonatal intensive care unit in Venezuela[J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2016, 7: 114-118
- [24] Khajuria A, Prahara AK, Grover N, et al. First report of an *Enterobacter ludwigii* isolate coharboring NDM-1 and OXA-48 carbapenemases[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2013, 57(10): 5189-5190
- [25] Wang D, Shi HY, Yu JD, et al. Isolation and identification of *Enterobacter cloacae* bacteriophages  $\Phi$ Ec53[J]. Journal of Jilin University (Medicine Edition), 2012, 38(6): 1077-1080 (in Chinese)  
王丹, 史红艳, 余静丹, 等. 阴沟肠杆菌噬菌体  $\Phi$ Ec53 的分离及鉴定[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2012, 38(6): 1077-1080
- [26] Wang D, Shi HY, Li JH, et al. Experimental phage therapy against *Enterobacter cloacae* abscesses in rabbit model[J]. Chinese Journal of Microecology, 2014, 26(1): 14-17, 22 (in Chinese)  
王丹, 史红艳, 李菁华, 等. 噬菌体对阴沟肠杆菌所致皮下脓肿的抗感染研究[J]. 中国微生态学杂志, 2014, 26(1): 14-17, 22
- [27] Zhao Y, Liu XX, Li JM, et al. Isolation and identification of a phage against Enterotoxigenic *Escherichia coli* K99 and its function verification in mice[J]. Microbiology China, 2018, 45(5): 1082-1089 (in Chinese)  
赵影, 刘秀侠, 李金敏, 等. 大肠杆菌 K99 噬菌体的分离鉴定及在小鼠上的防治效果[J]. 微生物学通报, 2018, 45(5): 1082-1089
- [28] Tang W, Gao L, Shi KY, et al. Isolation and characterization of foodborne *Escherichia coli* phage[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(4): 712-716 (in Chinese)  
唐伟, 高璐, 施锴云, 等. 食源性大肠杆菌噬菌体的分离及其特性分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(4): 712-716
- [29] Xu SX, Du WT, Wang XY, et al. Bioremediation of the combined pollution of quinclorac and  $\text{Cd}^{2+}$  by *Enterobacter ludwigii* EM1[J]. China Environmental Science, 2017, 37(8): 3159-3165 (in Chinese)  
徐淑霞, 杜文涛, 王晓雅, 等. 路德维希肠杆菌 EM1 对二氯喹啉酸和  $\text{Cd}^{2+}$  复合污染的修复[J]. 中国环境科学, 2017, 37(8): 3159-3165
- [30] Liu B, Tang J, Chen TT, et al. Screening and characterization of a 3-phenoxybenzoic acid degrading *Enterobacter ludwigii*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(5): 830-841 (in Chinese)  
刘波, 唐洁, 陈廷廷, 等. 一株路德维希肠杆菌的筛选及其对 3-苯氧基苯甲酸的降解特性分析[J]. 微生物学报, 2018, 58(5): 830-841
- [31] Xu YY, Zhang JX, Zhu XL, et al. Analysis of treatment of cadmium wastewater using an *Enterobacter ludwigii*[J]. Chemical Engineering, 2015, 43(6): 1-5 (in Chinese)  
徐雅雅, 张建霞, 朱晓丽, 等. 一株路德维希肠杆菌处理含镉废水的效应分析[J]. 化学工程, 2015, 43(6): 1-5