



研究报告

PB1 样铜绿假单胞菌噬菌体 PHW2 的生物学特性

吴芷莹^{Δ1} 金泽源^{Δ1} 李万霞¹ 曾飞¹ 朱明卓¹ 陈少贤¹ 彭文仪¹ 徐艳萍¹
童贻刚^{2,3} 柏琴琴^{*1}

1 南华大学衡阳医学院公共卫生学院卫生检验与检疫系 湖南 衡阳 421001

2 北京化工大学生命科学与技术学院 北京 100029

3 军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室 北京 100071

摘要:【背景】铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是一种引起医院感染、急性感染和慢性感染的常见条件致病菌。多重耐药铜绿假单胞菌仍然是引起严重医院感染的常见病菌,其临床治疗面临严峻挑战。噬菌体具有特异性杀菌的能力,在防治铜绿假单胞菌耐药菌方面具有应用前景。【目的】分离能裂解碳青霉烯类耐药的铜绿假单胞菌的噬菌体,分析其生物学特性和基因组特征,为噬菌体治疗储备资源。【方法】采集环境水样,用双层琼脂平板法分离噬菌体,对其形态、一步生长曲线、感染复数等生物学特性进行研究;使用 Illumina MiSeq 平台测定噬菌体的全基因组序列,利用 Newbler 3.0、GeneMarkS、BLASTp、Mauve 2.4.0 等生物信息软件进行拼接、注释和比较基因组学分析。【结果】分离到一株噬菌体 PHW2,该噬菌体属肌尾病毒科成员,可裂解 7 株碳青霉烯类耐药的铜绿假单胞菌;其最佳感染复数为 0.1。一步生长曲线结果显示,其感染宿主菌 PA001 的潜伏期为 100 min,裂解期为 360 min,裂解量为 25 PFU/cell;噬菌体 PHW2 在温度 25–50 °C 和 pH 6.0–8.0 范围内稳定;紫外照射 7 min 后 PHW2 活性明显下降;5%氯仿处理 100 min 内,PHW2 仍保持较高的活性。噬菌体 PHW2 的基因组长 65 984 bp,GC 含量为 55.69%,编码 92 个 ORFs,不含 tRNA。基因组比对结果显示 PHW2 与 PB1 样噬菌体高度相似。体外生物被膜抑制试验和清除试验结果显示,噬菌体 PHW2 能显著抑制宿主菌 PA001 形成的生物被膜并破坏 24 h 内形成的生物被膜。【结论】分离鉴定了一株新的 PB1 样噬菌体 PHW2,对碳青霉烯类耐药的铜绿假单胞菌裂解能力强。生物学特性、基因组特征、体外生物被膜抑制试验和清除试验结果表明该噬菌体具有治疗铜绿假单胞菌耐药菌的潜力。

关键词: 铜绿假单胞菌, PB1 样噬菌体, 生物学特性, 全基因组分析

Foundation items: Natural Science Foundation of Hunan Province (2019JJ50494); Scientific Research Fund of Hunan Provincial Education Department (16C1390); Project of Key Laboratory of Hunan Province (2019TP1027)

^ΔThese authors equally contributed to this work

***Corresponding author:** E-mail: baiqinqin1213@126.com

Received: 01-03-2021; **Accepted:** 06-07-2021; **Published online:** 30-07-2021

基金项目: 湖南省自然科学基金(2019JJ50494); 湖南省教育厅科学研究项目(16C1390); 湖南省重点实验室资助项目(2019TP1027)

^Δ对本文贡献相同

***通信作者:** E-mail: baiqinqin1213@126.com

收稿日期: 2021-03-01; **接受日期:** 2021-07-06; **网络首发日期:** 2021-07-30

Characterization of a PB1-like phage PHW2 infecting *Pseudomonas aeruginosa*

WU Zhiying^{Δ1} JIN Zeyuan^{Δ1} LI Wanxia¹ ZENG Fei¹ ZHU Mingzhuo¹
CHEN Shaoxian¹ PENG Wenyi¹ XU Yanping¹ TONG Yigang^{2,3} BAI Qinqin^{*1}

¹ Department of Public Health Laboratory Science, School of Public Health, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China

² College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

³ State Key Laboratory of Pathogenic Microbiology Safety, Institute of Microbiological Epidemiology, Institute of Military Medicine, Academy of Military Sciences, Beijing 100071, China

Abstract: [Background] *Pseudomonas aeruginosa* is one of the main opportunistic pathogen that has an important role in nosocomial, acute, and chronic infections. The multidrug resistant (MDR) *P. aeruginosa* remains a common cause of severe nosocomial infection. Phages are viruses that infect and can kill bacteria, and phage therapy is an alternative treatment to eradicate MDR *P. aeruginosa* infection. [Objective] To isolate virulent phages that infect carbapenem-resistant *P. aeruginosa* and characterize its biological and genomic properties of phages for future development as phage therapy. [Methods] Environmental water samples were collected, and phages were isolated using double agar overlay plaque assay. The morphology, one-step growth curve, optimal multiplicity of infection and other biological characteristics of phages were studied. Phage genome was sequenced using the Illumina MiSeq sequencing platform. Newbler 3.0, GeneMarkS, BLASTp, and Mauve 2.4.0 were used for genome annotation, comparative genomics and evolutionary analyses. [Results] A new phage, PHW2, which is a member of Myoviridae, was isolated from pond water. It is able to lyse seven carbapenem-resistant *P. aeruginosa* clinical isolates. The optimal multiplicity of infection (MOI) is 0.1. In addition, one step growth curve showed that the latent period and rise period of PHW2 was 100 min and 360 min, respectively. The burst size was about 25 PFU/cell. The phage PHW2 was stable in the temperature of 25–50 °C and pH 6.0–8.0. The activity of PHW2 decreased significantly after UV irradiation for 7 min. Moreover, it was shown that the activity of PHW2 is unaffected after treatment with 5% chloroform for 100 min. The genome of PHW2 is 65 984 bp, with GC content of 55.69% and comprises of 92 ORFs. tRNAscan-SE analysis indicated that phage PHW2 does not possess tRNAs. The genome of PHW2 had high similarity with other PB1-like phages. Phage PHW2 inhibited the biofilm formation of *P. aeruginosa* PA001 within 24 h. [Conclusion] We isolated PHW2, a new PB1-like phage that shows potent lytic effect against several carbapenem-resistant *P. aeruginosa* clinical isolates. Biological characteristics and the *in vitro* biofilm test indicated that the phage has the potential to be used as a biological agent to control nosocomial multidrug resistant *P. aeruginosa* infections.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, PB1-like phage, biological characteristics, genomic analysis

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是专性需氧非发酵革兰氏阴性杆菌,常引起医院感染,可致呼吸机相关肺炎局部化脓性炎症、角膜炎和中耳炎等疾病,其感染病灶可通过血行传播引发菌血症和败血症等^[1]。根据2018年全国细菌耐药监测报告显示,尽管多重耐药铜绿假单胞菌(Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa*, MDRPA)的分离率总体呈下降趋势,但依然是引

起严重医院感染的常见病因,世界卫生组织将碳青霉烯类耐药的铜绿假单胞菌列为急需研发新型抗菌药物的细菌之一^[2-3]。因此,针对碳青霉烯类耐药的铜绿假单胞菌研发新型抗菌制剂成为目前的研究热点。

噬菌体是抗生素之外的另一可行选择,大量动物实验和部分临床治疗个案都显示了噬菌体治疗多重耐药铜绿假单胞菌的可行性^[4-5]。最近的研

究表明噬菌体能有效破坏铜绿假单胞菌生物膜^[6]。然而,应用噬菌体治疗铜绿假单胞菌还面临着许多问题,例如宿主范围窄、细菌快速产生的噬菌体抗性等^[7]。现有的研究表明噬菌体鸡尾酒疗法是可能的解决方案之一,尤其是利用不同受体的噬菌体的组合,既可以拓宽宿主范围又可以降低细菌耐受噬菌体频率,是当前临床治疗实验中常用的策略^[8]。噬菌体鸡尾酒疗法的顺利开展依赖于已知生物学特性的噬菌体资源库的建立。本研究以碳青霉烯类耐药的铜绿假单胞菌为指示菌,采集环境水样分离烈性噬菌体,研究其生物学特性和基因组特征,并评价其作为生防制剂控制多重耐药铜绿假单胞菌感染的潜力,以期铜绿假单胞菌的噬菌体治疗提供资源储备。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

本实验所用 10 株铜绿假单胞菌、20 株鲍曼不动杆菌和 1 株大肠埃希菌均由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器

LB 培养基,北京索莱宝科技有限公司。

SM 缓冲液: NaCl 5.8 g/L, MgSO₄·7H₂O 2.0 g/L, Tris-HCl (pH 7.5) 50 mmol/L, 明胶 0.1 g/L。

恒温培养箱,TAISETTE 公司;恒温振荡器,上海智诚分析仪器制造有限公司;高速冷冻离心机,安徽中科中佳科学仪器有限公司;VITEK2 Compact 全自动细菌鉴定及药敏分析系统,梅里埃公司;透射电镜,HITACHI 公司。

1.2 宿主菌的准备

将滤纸法保存的菌种分别接种于 LB 液体培养基中,37 °C、180 r/min 振荡培养过夜,进行平板划线并挑单菌落接种于 LB 液体培养基中,37 °C、180 r/min 振荡培养至对数生长期(*OD*₅₉₅ 约为 0.3),4 °C 保存备用。

1.3 药敏试验

采用 VITEK2 Compact 全自动细菌鉴定及药

敏分析系统进行药敏试验,根据美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)的药敏试验标准(2016 年版)判定结果,并依据李春辉等^[9]的多重耐药(Multidrug Resistant, MDR)菌标准定义将结果进行分类。

1.4 噬菌体分离纯化

用无菌带塞玻璃瓶采集水下 10–15 cm 处的水样,50 r/min 振荡混匀 15 min,4 °C、10 000×*g* 离心 10 min。取 50 mL 离心处理后的水样上清加至 50 mL 含 2 mmol/L CaCl₂ 的 2×LB 液体培养基中,再加入 1 mL 培养过夜的混合宿主菌悬液,于 37 °C、150 r/min 振荡培养过夜。4 °C、10 000×*g* 离心 10 min,用 0.22 μm 滤膜过滤以除去细菌,将噬菌体滤液 4 °C 保存待用。参照 Beeton 等^[10]的方法,将样品滤液进行 10 倍梯度稀释,取 100 μL 稀释后的样品铺双层琼脂平板,37 °C 倒置培养过夜,直到长出单个噬菌斑。挑取单个噬菌斑,在 1 mL SM 缓冲液中混匀,4 °C、4 000×*g* 离心 10 min,取 0.1 mL 经过 10 倍梯度稀释后用双层琼脂平板法纯化,重复上述过程 3–5 次。然后取 100 μL 纯化得到的单斑滤液与 100 μL 宿主菌混合铺双层琼脂平板。待平板上的噬菌斑完全融合生长,在平板上加入 5 mL SM 缓冲液,4 °C、50 r/min 摇床振荡 4 h 后,收集液体 4 °C、4 000×*g* 离心 10 min,0.22 μm 滤膜过滤,4 °C 保存,并用双层琼脂平板法测定滴度。

1.5 噬菌体电镜观察及宿主范围测定

取对数生长期(*OD*₅₉₅ 约为 0.3)的铜绿假单胞菌 3 mL,加入 300 μL 浓度为 1×10⁷ PFU/mL 的噬菌体滤液,37 °C、180 r/min 振荡培养 10 h 至液体澄清,将增殖液 4 °C、10 000×*g* 离心 10 min,0.22 μm 滤膜过滤,使用 100 kD 超滤离心管 4 °C、3 000×*g* 超滤离心 10 min,得到噬菌体浓缩液,加入戊二醛使终浓度为 2.5%,4 °C 灭活 2 h 后送至科学指南针实验室(www.shiyanjia.com)进行透射电镜观察,选取多个视野,记录噬菌体病毒粒子的形态结构。

选取 10 株铜绿假单胞菌、20 株鲍曼不动杆菌、1 株大肠埃希菌作为测试菌, 参照 Kutter 等^[11]的方法, 用点滴法测试噬菌体 PHW2 的宿主范围。

1.6 噬菌体最佳感染复数 (Multiplicity of Infection, MOI)、吸附曲线及一步生长曲线

1.6.1 噬菌体最佳感染复数

参照 Hyman 等^[12]的方法, 并略做修改。取对数生长期(OD_{595} 为 0.3)铜绿假单胞菌, 将噬菌体稀释为 1×10^9 、 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 PFU/mL, 以感染复数分别为 10、1、0.1、0.01、0.001、0.000 1、0.000 01 的比例将宿主菌与噬菌体各 200 μ L 混合, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养 8 h, 4 $^{\circ}$ C、10 000 \times g 离心 3 min, 0.22 μ m 滤膜过滤, 双层琼脂平板法测定噬菌体效价, 以培养末期噬菌体效价最高的 MOI 为最佳感染复数。

1.6.2 噬菌体吸附曲线

吸附曲线测定参照 Hyman 等^[12]进行。将宿主菌培养至对数生长期(OD_{595} 为 0.3), 取 9 mL 宿主菌与 1 mL 1×10^5 PFU/mL 的噬菌体混合, 从 0–10 min 每隔 2 min 取样 50 μ L, 用双层琼脂平板法测定上清液中噬菌体效价。以时间为横坐标, 吸附率为纵坐标绘制吸附曲线。

1.6.3 噬菌体一步生长曲线

参照 Hyman 等^[12]测定噬菌体的一步生长曲线。将 9 mL 1×10^8 CFU/mL 细菌悬液与 1 mL 1×10^8 PFU/mL 噬菌体悬液(MOI=0.1)混合, 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min 后于 180 r/min 振荡培养, 从 0 时刻开始每隔 50 min 取样 500 μ L, 立即 4 $^{\circ}$ C、10 000 \times g 离心 2 min, 取上清测定噬菌体的效价。以取样时间为横坐标, 噬菌体效价的对数为纵坐标绘制一步生长曲线, 判断潜伏期、裂解期并计算裂解量。裂解量=裂解末期噬菌体效价/初始宿主菌浓度。

1.7 噬菌体对温度和 pH 的稳定性

1.7.1 噬菌体对温度的稳定性

将 1×10^6 PFU/mL 的噬菌体悬液分别在 25、

37、50、60、70 和 80 $^{\circ}$ C 水浴 20 min, 用双层琼脂平板法测定噬菌体的效价, 绘制噬菌体受温度影响的曲线。

1.7.2 噬菌体对 pH 的稳定性

将 10 μ L 1×10^8 PFU/mL 的噬菌体原液加入至 990 μ L 不同 pH 的 SM 缓冲液中, 4 $^{\circ}$ C 冰箱静置, 分别在 1、3、5 d 时用双层琼脂法测定噬菌体效价, 绘制噬菌体效价在不同保存时间受 pH 影响的曲线。

1.8 噬菌体对紫外线和氯仿的敏感性

1.8.1 噬菌体对紫外线的敏感性

参照蔡俊鹏等^[13]的方法, 略有改动。取 10 mL 1×10^6 PFU/mL 噬菌体原液于培养皿中, 放入超净工作台中, 距离紫外灯 30 cm, 打开紫外灯照射, 分别于 0、1、2、3、4、5、7 min 取样, 用双层琼脂平板法测定噬菌体效价, 绘制噬菌体效价受紫外线影响的曲线。

1.8.2 噬菌体对氯仿的敏感性

参照 Chen 等^[14]的方法, 略有修改。取 950 μ L 1×10^5 PFU/mL 噬菌体原液与 50 μ L 氯仿混合, 使混合液中氯仿浓度为 5%, 分别在 0、20、40、80、100、120、140 min 时用双层琼脂平板法测定噬菌体的效价, 绘制噬菌体效价受氯仿影响的曲线。

1.9 噬菌体的全基因组测序及生物信息学分析

将噬菌体送军事医学科学院微生物流行病研究所组学与生物信息学研究室构建文库, 采用 Illumina MiSeq 平台进行测序, 利用 Newbler 3.0 拼接序列。用 GeneMarkS (<http://exon.gatech.edu/GeneMark/genemarks.cgi>)^[15]对 ORF 进行预测, 用 BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 在 NCBI 和 UniProt 数据库中逐一比对开放阅读框以核对注释。利用 tRNAscan-SE V2.0 (<http://trna.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) 预测 tRNA^[16]。使用软件 Mauve 2.4.0^[17]进行比较基因组分析, MEGA 6.0 软件以 Neighbor-Joining 法构建进化树。

1.10 噬菌体 PHW2 对铜绿假单胞菌 PA001 生物被膜的影响

1.10.1 噬菌体 PHW2 对铜绿假单胞菌 PA001 生物被膜的抑制作用

取待测菌的菌液 1:100 接种到 LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 培养过夜, 用 LB 液体培养基 1:100 稀释后, 每孔 200 μ L 接种到含有 2 mL LB 液体培养基的 24 孔细胞培养板中, 按照最佳感染复数将噬菌体与指示菌混合, 37 °C 静置培养 12、24、36 及 48 h。加入 SM 缓冲液的孔作为对照。培养结束后, 吸弃上清, 每孔加入 500 μ L 灭菌磷酸盐缓冲溶液(Phosphate Buffered Saline, PBS)反复冲洗, 以洗涤未黏附的浮游态细菌。自然风干后, 每孔加入 200 μ L 0.1% 结晶紫室温染色 30 min。弃去染色液, 再用 200 μ L/孔的灭菌 PBS 溶液洗涤 3 次。室温干燥后, 每孔加入 200 μ L 33% 乙酸处理 30 min, 测量 OD_{595} 。实验重复 3 次。

1.10.2 噬菌体 PHW2 对铜绿假单胞菌 PA001 生物被膜的清除作用

将待测菌液 1:100 稀释后接种于每孔含有 2 mL LB 液体培养基的 24 孔细胞培养板中。分别培养 12 h 和 24 h 后用 500 μ L 灭菌的 0.01 mol/L PBS 反复冲洗细胞培养板, 以最佳感染复数加入噬菌体 PHW2 悬液 200 μ L, 加 SM 缓冲液的孔作为对照。培养结束后, 通过结晶紫染色法检测噬菌体是否清除已形成的生物被膜。实验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 药敏试验

药敏试验结果显示 31 株细菌中, 8 株铜绿假单胞菌、19 株鲍曼不动杆菌和 1 株大肠埃希菌 A002 为多重耐药菌株。10 株铜绿假单胞菌中, 有 8 株对碳青霉烯类药物耐药(表 1)。

2.2 噬菌体形态学特征

在一份水样中分离得到一株噬菌体命名为 PHW2, 感染宿主 PA001 可形成边缘整齐、清晰透亮、周围有晕环的噬菌斑(图 1A)。电镜下, 该噬菌体头部为正二十面体结构, 直径在 74–86 nm 之间,

尾部可伸缩, 其长度为 148–154 nm (图 1B)。形态符合肌尾病毒科噬菌体(Myoviridae)成员的特征。

2.3 噬菌体宿主谱

PHW2 对 9 株铜绿假单胞菌有强裂解作用(9/10, 90%), 包含 7 株碳青霉烯类耐药菌。对 5 株鲍曼不动杆菌也有不同程度的裂解能力(5/20, 25%), 均为碳青霉烯类耐药菌, 不裂解大肠埃希菌 A002 (表 1)。

2.4 最佳感染复数

如表 2 所示, MOI 为 0.1 时, 子代噬菌体浓度最高, 之后随着 MOI 的降低噬菌体浓度降低, 即 PHW2 的最佳感染复数为 0.1。

2.5 吸附曲线和一步生长曲线

噬菌体 PHW2 对宿主菌有较强吸附能力(图 2A), 其在 2 min 内可吸附 70%, 在 6 min 后可吸附 80%, 在 10 min 后可吸附 95%。

MOI=0.1 的一步生长曲线表明(图 2B), 在 100 min 时噬菌体滴度开始上升, 至 460 min 时滴度趋于平稳。噬菌体 PHW2 的潜伏期为 100 min, 裂解期为 360 min。根据公式计算裂解量为 25 PFU/cell。

2.6 噬菌体对温度和 pH 的敏感性

噬菌体 PHW2 在 25–50 °C 较稳定(图 3A), 在 60 °C 处理 20 min 其浓度略有下降, 在 70 °C 处理 20 min 后其浓度低于 1×10^5 PFU/mL。可见 PHW2 对热的耐受能力较好。噬菌体 PHW2 在 pH 6.0–8.0 的范围内显示较高的活性(图 3B), 其中 pH 7.0 活性最高。

2.7 噬菌体对紫外线和氯仿的敏感性

噬菌体 PHW2 对 153.7 nm 的紫外线十分敏感(图 4A), 照射 5 min 后 80% 的噬菌体失活; 照射 6 min 后 PHW2 活性受到显著影响, 滴度下降 4 Log₁₀ (PFU/mL)。噬菌体 PHW2 对 5% 的氯仿不敏感(图 4B), 但在保存超过 100 min 后, 噬菌体滴度会有明显降低。表明在大量制备时, 噬菌体 PHW2 可以应用 5% 的氯仿进行处理, 但作用时间不可过长。

表 1 噬菌体 PHW2 宿主范围

Table 1 Host range of phage PHW2

菌株 Strains	编号 No.	菌株样本来源 Samples of strains isolated	耐药性 Drug resistance	碳青霉烯类耐药 Carbapenem-resistance	裂解性 Lytic ability
<i>P. aeruginosa</i>	PA001	Blood	DR	S	++++
	PAK389	Sputum	MDR	R	++++
	PAK393	Sputum	MDR	R	+++
	PAK399	Sputum	MDR	R	++++
	PAK407	Sputum	MDR	R	++++
	PAK446	Sputum	MDR	S	++++
	PAK452	Sputum	MDR	R	+++
	PAK460	Sputum	MDR	R	+++
	PAK461	Sputum	MDR	R	—
	PAK484	Sputum	DR	R	++++
<i>A. baumannii</i>	Ab1	Sputum	MDR	R	—
	AB10	Sputum	MDR	R	—
	AB12	Blood	MDR	R	—
	AB13	Wound secretion	MDR	R	—
	AB15	Ascites fluid	DR	S	—
	AB93	Urine	MDR	R	—
	AB94	Sputum	MDR	R	—
	AB95	Sputum	MDR	R	+
	AB96	Sputum	MDR	R	—
	ABK0097	Sputum	MDR	R	—
	ABK442	Sputum	MDR	R	+++
	ABK443	Sputum	MDR	R	+
	ABK445	Cerebrospinal fluid	MDR	R	—
	ABK447	Sputum	MDR	R	++
	ABK448	Sputum	MDR	R	—
	ABK450	Sputum	MDR	R	—
	ABK451	Sputum	MDR	R	—
	ABK454	Cerebrospinal fluid	MDR	R	—
	ABK455	Sputum	MDR	R	++
	ABK456	Sputum	MDR	R	—
<i>E. coli</i>	A002	Blood	MDR	S	—

注：—：无噬菌斑，不裂解；+：仅出现少量噬菌斑，极弱裂解性；++：半透明区域中有很多浊度，弱裂解性；+++：整个明亮但有些浊度，强裂解性；++++：完全透明，极强裂解性。S：敏感；R：抗性。DR：耐药；MDR：多重耐药

Note: —: No plaque, no lytic ability; +: Only a few single plaques appear, very weak lytic ability; ++: A lot of turbidity in the translucent area, weak lytic ability; +++: The whole plaques are bright but a little turbidity, strong lytic ability; ++++: Completely translucent, very strong lytic ability. S: Sensitive; R: Resistant. DR: Drug resistance; MDR: Multidrug resistance

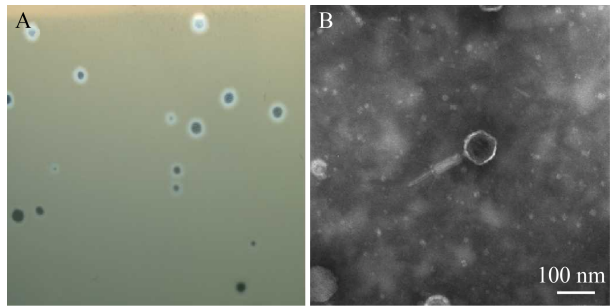


图 1 噬菌体 PHW2 的噬斑(A)及显微形态(B)
Figure 1 The plaque formed by PHW2 (A) and the morphology of phage PHW2 (B)

表 2 噬菌体 PHW2 最佳感染复数

Table 2 The optimal multiplicity of infection of PHW2

噬菌体数 Numbers of phage (PFU/mL)	菌落数 Numbers of bacteria (CFU/mL)	感染复数 Multiplicity of infection (MOI)	噬菌体效价 Phage titer (PFU/mL)
10 ⁹	10 ⁸	10	9.75×10 ⁹
10 ⁸	10 ⁸	1	1.25×10 ¹⁰
10 ⁷	10 ⁸	0.1	1.75×10 ¹⁰
10 ⁶	10 ⁸	0.01	2.25×10 ⁹
10 ⁵	10 ⁸	0.001	8.75×10 ⁸
10 ⁴	10 ⁸	0.000 1	2.50×10 ⁸
10 ³	10 ⁸	0.000 01	2.00×10 ⁸

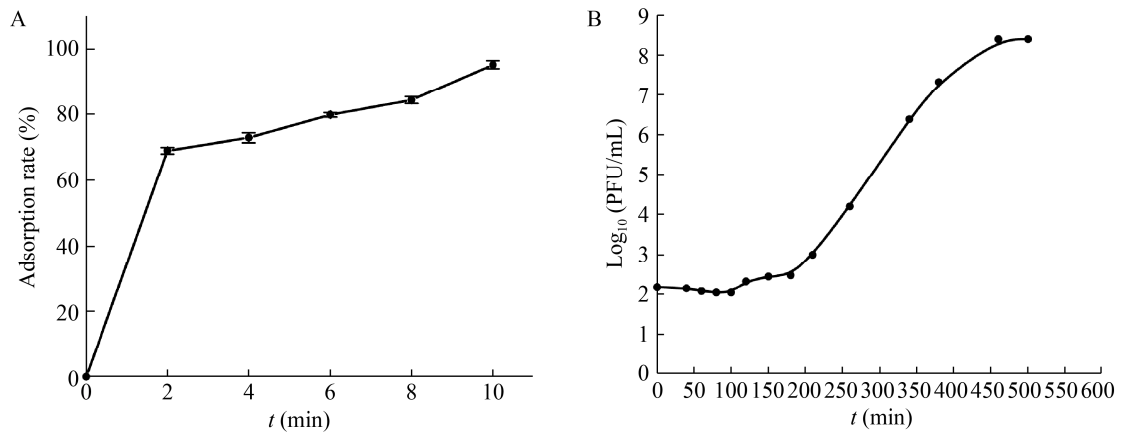


图 2 噬菌体 PHW2 吸附曲线(A)和一步生长曲线(B)

Figure 2 Adsorption curve (A) and one-step growth curve (B) of phage PHW2

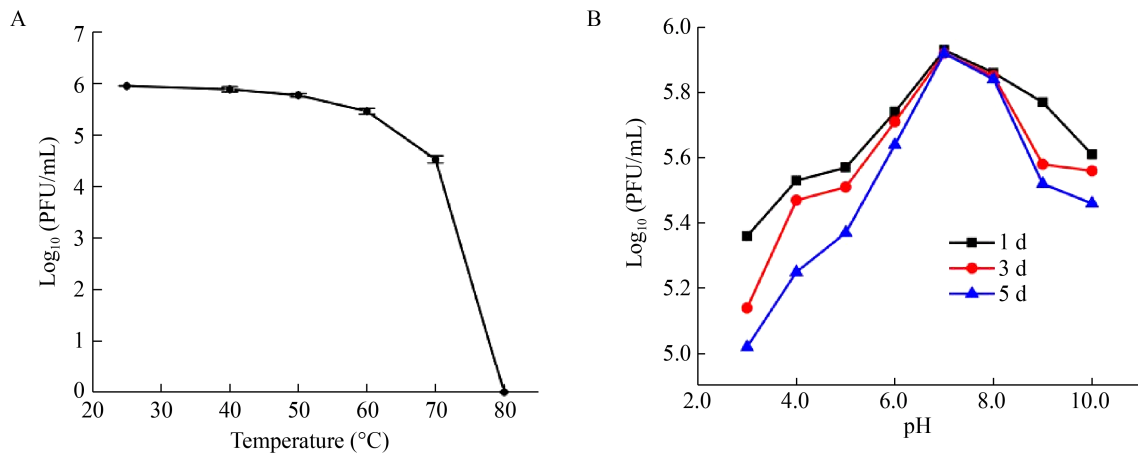


图 3 噬菌体 PHW2 对温度(A)和 pH (B)敏感性

Figure 3 Thermostability (A) and pH (B) stability of phage PHW2

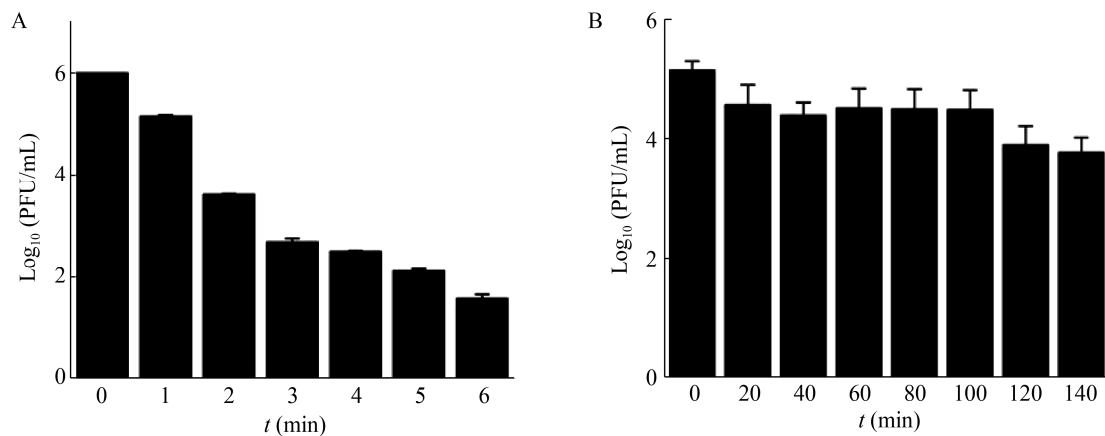


图 4 噬菌体 PHW2 对紫外线(A)和 5%氯仿的敏感性(B)

Figure 4 Sensitivity of PHW2 on ultraviolet ray (A) and 5% chloroform (B)

2.8 噬菌体 PHW2 的全基因组概况

噬菌体 PHW2 的基因组为线状双股 DNA, 长 65 984 bp, GC 含量为 55.69%, 编码 92 个 ORFs, 不含 tRNA。42 个 CDS 在 NCBI 或 UniProt 数据库中有明确的基因功能注释, 分别为噬菌体的结构、DNA 包装、转录调控和裂解基因(图 5)。噬菌体 PHW2 全基因组核酸序列已经提交 GenBank, 登录号为 MT349888.1。基因组比对结果显示 PHW2 与其他 PB1 样噬菌体高度相似(图 6)。gp52 编码裂解酶, 长 220 aa, 含 Glyco_hydro_19 结构域, 属糖苷酶。gp50 为预测的尾丝蛋白。比较不同国家和地区分离的 PB1 样噬菌体的尾丝蛋白序列发现, 各尾丝蛋白的氨基酸序列间相似性达 82.0%–99.7%。进化树分析显示 PB1 样噬菌体的尾丝蛋白形成了 2 个大的进化分支, 其中 gp50 与噬菌体 vB_PaeM_PAO1_Ab27 的尾丝蛋白亲缘关系最近, 虽与噬菌体 PB1 和 KPP22 的尾丝蛋白位于同一个大的进化分支, 但有一定的遗传距离(图 7)。

2.9 PHW2 抑制铜绿假单胞菌生物被膜的形成

将 PA001 单独培养 12、24、36、48 h 可以形成生物被膜, 并且随时间增加生物被膜的数量也在增加。将 PA001 与噬菌体 PHW2 以最佳感染复数混合培养后发现, 噬菌体 PHW2 能够显著抑制 PA001 生物被膜的形成(图 8)。

2.10 PHW2 清除 PA001 已形成的生物被膜

将铜绿假单胞菌 PA001 培养 12 h 和 24 h 后, 以最佳感染复数加入噬菌体 PHW2 后共培养 4 h 和 12 h, 发现噬菌体 PHW2 能够显著清除 PA001 已经形成的生物被膜(图 9), 其中对 12 h 形成的生物被膜的清除效果较强。

3 讨论与结论

本研究从环境水样中分离到噬菌体 PHW2, 属于有尾病毒目(Caudovirales)肌尾噬菌体科(Myoviridae)成员, 其宿主范围较宽, 对 MDRPA 有很强的裂解能力, 而且对部分鲍曼不动杆菌也

有抑菌作用, 在 PHW2 可裂解的 14 株耐药菌中有 12 株菌对碳青霉烯类药物耐药, 提示该噬菌体在防治碳青霉烯类药物耐药的铜绿假单胞菌方面具有潜在应用价值。PHW2 对宿主菌 PA001 有良好的吸附能力, 可在 6 min 后吸附 80%, 10 min 后可达到 95% 吸附。最佳 MOI 为 0.1, 即少量的噬菌体母液就可以产生大量的子代噬菌体, 能够大大提高噬菌体抗菌剂的生产效率。Kalatzis 等^[18]报道了噬菌体 Φ St2 和 Φ Grn1 的最佳 MOI 分别为 10 和 100。曾林等^[19]研究的溶藻弧菌噬菌体最佳 MOI 为 10。本研究中的噬菌体 PHW2 的最佳 MOI 较低, 但是比李明等^[20]报道的噬菌体 PaP1 和张琳等^[21]报道的噬菌体 PaP4 最佳 MOI 较高。宋增福等^[22]报道最佳 MOI 低的噬菌体具有很强的裂解宿主菌的能力, 说明 PHW2 对宿主菌 PA001 的裂解能力较强。PHW2 的吸附速度较快, 10 min 有 95% 的噬菌体可吸附在细菌表面, 强吸附能力可更多更快地裂解宿主菌。

PHW2 的一步生长曲线显示其潜伏期为 100 min、裂解期为 360 min, 裂解量较低。考虑 PHW2 较宽的宿主谱, 其一步生长特征可能取决于宿主菌和生存环境, 李明源等^[23]报道的 3 株黄杆菌低温噬菌体也有类似的现象。PHW2 对 5% 的氯仿耐受能力较强, 提示在大量制备噬菌体的过程中可应用氯仿处理宿主菌。

基因组测序显示 PHW2 不含整合酶、阻遏蛋白等溶源相关基因, 为严格毒性噬菌体。基因组比对结果显示 PHW2 为 PB1 样噬菌体。文献报道 PB1 样噬菌体在控制铜绿假单胞菌感染和生物被膜的形成方面有良好的效果, 并适用于噬菌体治疗, 尤其是噬菌体鸡尾酒疗法^[24]。例如 PB1 样噬菌体 NH-4 与短尾噬菌体 MR299 的混合制剂 6 h 内可将鼠肺中 *P. aeruginosa* 的数量降低 3–4 个数量级^[25]; 单剂量的 PB1 样噬菌体 KPP12 处理小鼠角膜炎可显著改善疾病预后, 保留角膜结构的完整性和透明度, 抑制中性粒细胞浸润, 大大增加

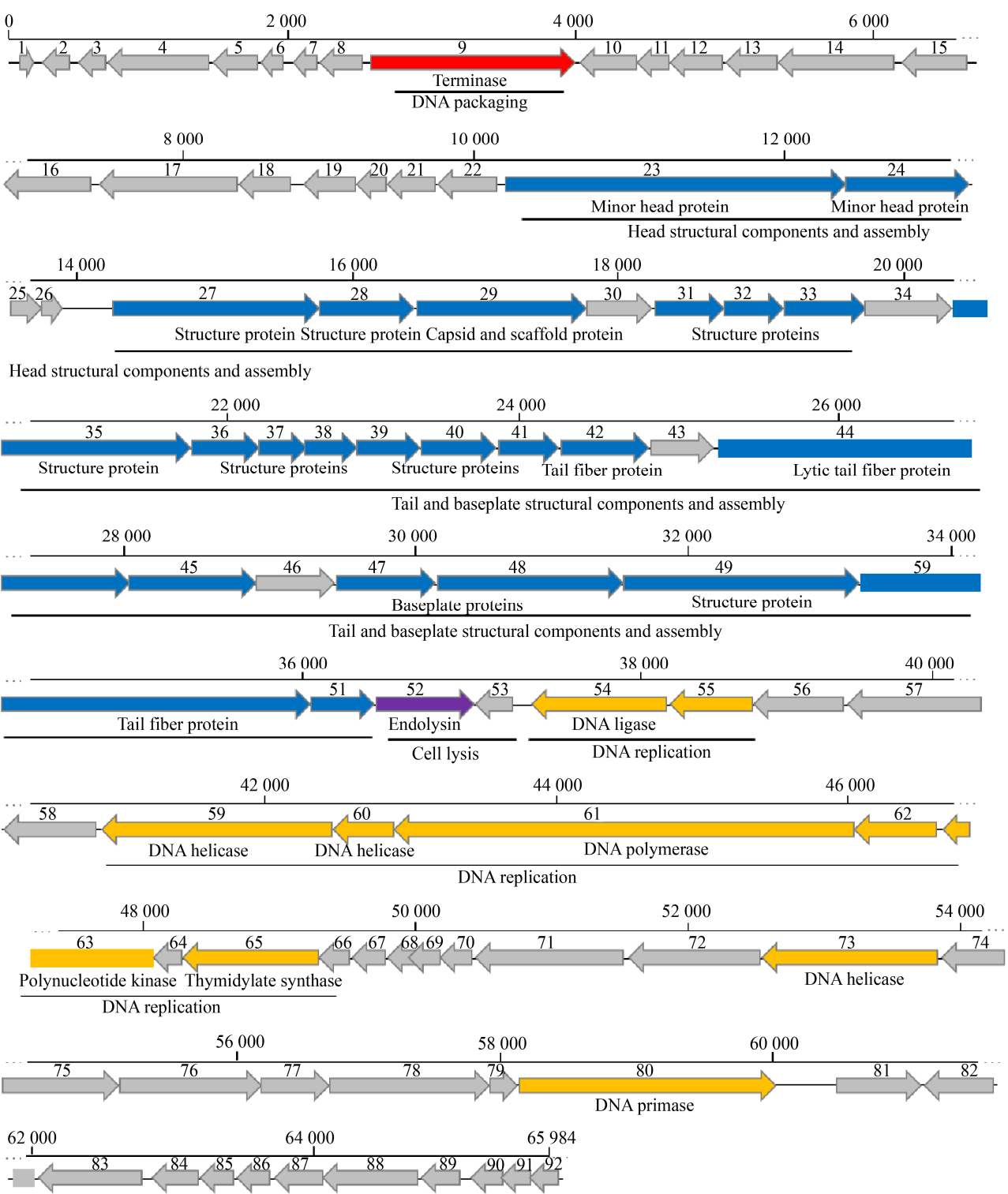


图 5 噬菌体 PHW2 的全基因组图
Figure 5 Genomic map of phage PHW2

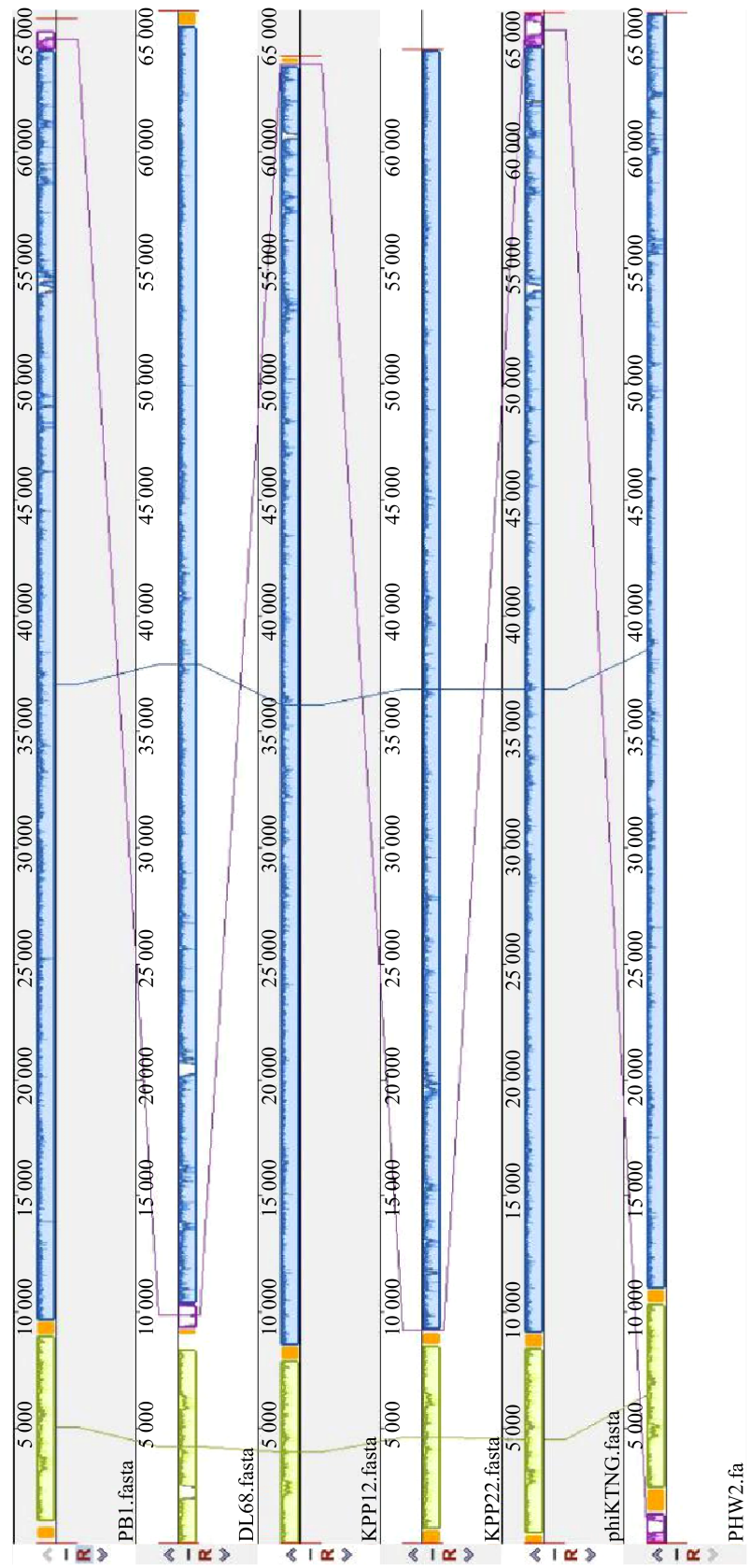


图 6 PHW2 与 PB1 样噬菌体基因组比较
Figure 6 Comparison of PHW2 and PB1-like phages genome

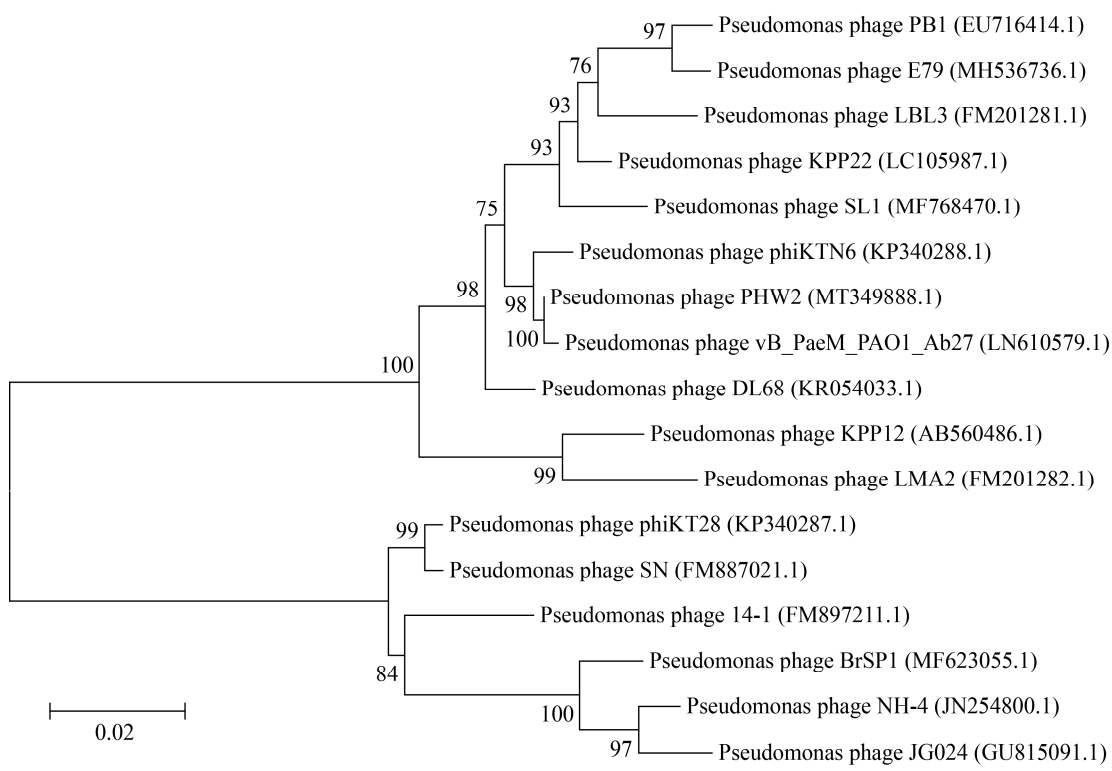


图 7 尾丝蛋白 gp50 的遗传进化分析

Figure 7 Phylogenetic tree constructed based on the tail fiber protein gp50

注：括号中的序号：GenBank 序列号；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：代表遗传距离，标尺越短，亲缘关系越近

Note: The number in bracket: The GenBank accession number; The number at the branch point: The confidence level, the closer to 100 the bootstrap value is, the higher confidence level would be; Scale: The genetic distance, the shorter the scale is, the closer kinship would be

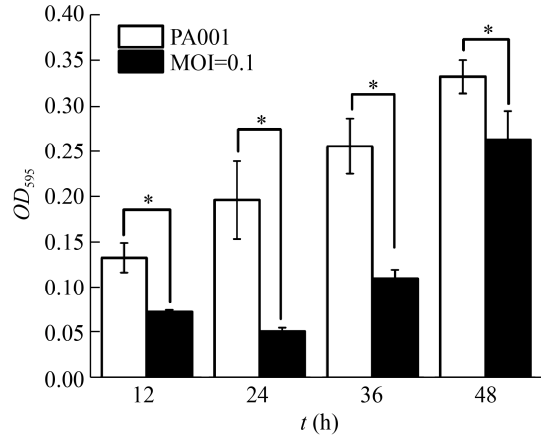


图 8 PHW2 抑制 PA001 生物被膜的形成

Figure 8 The phage PHW2 inhibits the formation of *PA001* biofilm

注：*：显著性差异， $P < 0.05$

Note: *: Significant difference, $P < 0.05$

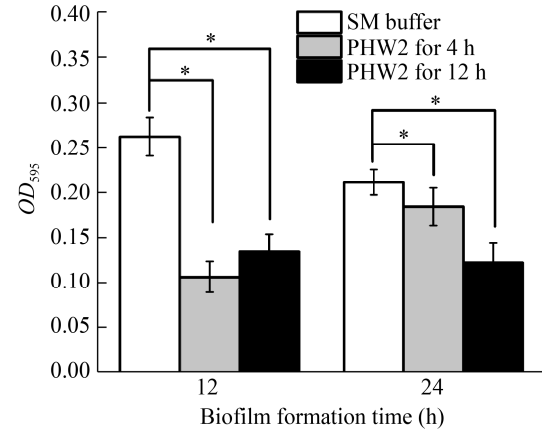


图 9 PHW2 清除 PA001 已形成的生物被膜

Figure 9 The phage PHW2 removes the biofilm formed by *PA001*

注：*：显著性差异， $P < 0.05$

Note: *: Significant difference, $P < 0.05$

角膜中细菌的清除率^[26]；PB1 样噬菌体 KT28 和 KTN6 可使 PAO1 菌株 24–72 h 形成的生物被膜菌的菌落数减少 70%–90%^[27]。这些研究提示本实验分离的 PHW2 具有治疗铜绿假单胞菌的潜力，但仍需开展进一步的体外和体内试验。铜绿假单胞菌广泛分布于医院环境，是医院感染的常见病原菌，其生物被膜是致病因素之一，尤其在慢性感染和抗生素耐药菌引起的感染方面发挥重要作用^[28]。因此本研究初步探讨了 PHW2 对铜绿假单胞菌生物被膜的抑制作用及清除作用。结果表明，噬菌体 PHW2 可以明显抑制铜绿假单胞菌宿主菌 PA001 生物被膜的形成以及破解 PA001 已经形成的生物被膜，但对 24 h 后的生物被膜的破解效果相较 12 h 要弱。噬菌体对生物被膜破坏作用的机理主要有 3 个方面：(1) 编码胞外多糖解聚酶降解生物被膜基质中的胞外多糖；(2) 噬菌体裂解酶破坏细菌细胞壁导致细菌裂解，从而使生物被膜减少；(3) 噬菌体感染生物被膜内的细菌，导致细菌裂解^[29]。本研究中 PHW2 裂解宿主菌 PA001 形成的噬菌斑周围有空晕，而且 ORF44 编码尾部蛋白具有糖苷酶结合域，是可能的解聚酶。因此，我们推测 PHW2 对铜绿假单胞菌 PA001 生物被膜的破坏作用可能与噬菌体对生物被膜菌的裂解及解聚酶对胞外多糖的降解有关。

综上分析，本研究分离鉴定了一株裂解碳青霉烯类耐药的铜绿假单胞菌的噬菌体 PHW2，该噬菌体属于 PB1 样噬菌体，对铜绿假单胞菌的裂解能力强，对温度和 pH 均有较好的耐受能力，对紫外线敏感，对氯仿不敏感，能抑制铜绿假单胞菌 PA001 生物被膜的形成并且能清除已经形成的生物被膜，具有开发为生物制剂控制多重耐药铜绿假单胞菌感染的潜力。

REFERENCES

- [1] Shortridge D, Gales AC, Streit JM, Huband MD, Tsakris A, Jones RN. Geographic and temporal patterns of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* over 20 years from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997–2016[J]. Open Forum Infectious Diseases, 2019, 6(Suppl 1): S63–S68
- [2] 2018 National Bacterial Resistance Surveillance Report[J]. Chinese Journal of Rational Drug Use, 2020, 17(1): 1–10 (in Chinese)
2018 年全国细菌耐药监测报告[J]. 中国合理用药探索, 2020, 17(1): 1–10
- [3] Shrivastava S, Shrivastava P, Ramasamy J. World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics[J]. Journal of Medical Society, 2018, 32(1): 76
- [4] Lin DM, Koskella B, Lin HC. Phage therapy: an alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance[J]. World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics, 2017, 8(3): 162–173
- [5] Yang YH, Le S. Progress on *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage therapy[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2017, 42(10): 814–820 (in Chinese)
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
- [6] Chegini Z, Khoshbayan A, Taati Moghadam M, Farahani I, Jazireian P, Shariati A. Bacteriophage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a review[J]. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 2020, 19(1): 45
- [7] Bao HD, Zhu SJ, Zhang H, Zhou Y, Zhang XH, Pang MD, Sun LC, Li W, Wang R. Screening, identification and pathogenicity of phage-resistant strain of *Salmonella*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(4): 759–768 (in Chinese)
包红朵, 朱树娇, 张辉, 周艳, 张旭晖, 庞茂达, 孙利厂, 李维, 王冉. 沙门菌噬菌体抗性菌的筛选鉴定及致病力研究[J]. 微生物学报, 2020, 60(4): 759–768
- [8] Gordillo Altamirano FL, Barr JJ. Phage therapy in the postantibiotic era[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2019. DOI: 10.1128/cmr.00066-18
- [9] Li CH, Wu AH. Multidrug resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance[J]. Chinese Journal of Infection Control, 2014, 13(1): 62–64 (in Chinese)
李春辉, 吴安华. MDR、XDR、PDR 多重耐药菌暂行标准定义: 国际专家建议[J]. 中国感染控制杂志, 2014, 13(1): 62–64
- [10] Beeton ML, Alves DR, Enright MC, Jenkins ATA. Assessing phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* using a *Galleria mellonella* infection model[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2015, 46(2): 196–200
- [11] Kutter E. Phage host range and efficiency of plating[J]. Methods in Molecular Biology, 2009, 501: 141–149
- [12] Hyman P, Abedon ST. Practical Methods for Determining

- Phage Growth Parameters[M]. Bacteriophages, 2009. DOI: 10.1007/978-1-60327-164-6_18
- [13] Cai JP, Sun LY. Isolation and characterization of bacteriophages of *Vibrio cholera* from the red tide waters in Shenzhen[J]. Microbiology China, 2010, 37(1): 12-18 (in Chinese)
蔡俊鹏, 孙丽滢. 深圳赤潮中霍乱弧菌噬菌体的分离筛选及生物学特性分析[J]. 微生物学通报, 2010, 37(1): 12-18
- [14] Chen LK, Liu YL, Hu AR, Chang KC, Lin NT, Lai MJ, Tseng CC. Potential of bacteriophage Φ AB2 as an environmental biocontrol agent for the control of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. BMC Microbiology, 2013, 13(1): 1-10
- [15] Yang Y, Li X, Zhang YW, Liu JH, Hu XX, Nie TY, Yang XY, Wang XK, Li CR, You XF. Characterization of a hypervirulent multidrug-resistant ST23 *Klebsiella pneumoniae* carrying a blaCTX-M-24 IncFII plasmid and a pK2044-like plasmid[J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2020, 22: 674-679
- [16] Lowe TM, Chan PP. tRNAscan-SE On-line: integrating search and context for analysis of transfer RNA genes[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(W1): W54-W57
- [17] Darling ACE, Mau B, Blattner FR, Perna NT. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements[J]. Genome Research, 2004, 14(7): 1394-1403
- [18] Kalatzis PG, Bastias R, Kokkari C, Katharios P. Isolation and characterization of two lytic bacteriophages, ϕ St2 and ϕ Grn1; phage therapy application for biological control of *Vibrio alginolyticus* in aquaculture live feeds[J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0151101
- [19] Zeng L, Qiu DQ, Xie JH, Yu G. A study of the biochemical characteristics of the *Vibrio alginolyticus* bacteriophage[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2012, 32(1): 24-29 (in Chinese)
曾林, 邱德全, 谢警鸿, 于鸽. 一株溶藻弧菌噬菌体的生理特性研究[J]. 广东海洋大学学报, 2012, 32(1): 24-29
- [20] Li M, Shen XD, Zhou YB, Huang JJ, Hu XM, Rao XC, Hu FQ. Study on biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* phage PaP1[J]. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2005, 27(9): 860-863 (in Chinese)
李明, 申晓冬, 周莹冰, 黄建军, 胡晓梅, 饶贤才, 胡福泉. 铜绿假单胞菌噬菌体 PaP1 生物学特性的研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(9): 860-863
- [21] Zhang L, Le S, Lu SG, Yao XY, Zhao Y, Wang J, Tan YL, Hu FQ, Li M. Isolation and identification a novel *Pseudomonas aeruginosa* phage PaP4[J]. Microbiology China, 2013, 40(4): 609-616 (in Chinese)
张琳, 乐率, 卢曙光, 姚新月, 赵岩, 王竞, 谭银玲, 胡福泉, 李明. 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
- [22] Song ZF, Xu HD, Peng MF, Sun BC, Zhao Z, Zhang Y, Ren JF, Zhang QH. Isolation and identification of two lytic phages against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2017, 41(4): 793-799 (in Chinese)
宋增福, 徐华东, 彭孟凡, 孙博超, 赵政, 张也, 任建峰, 张庆华. 两株副溶血弧菌烈性噬菌体的分离鉴定[J]. 水生生物学报, 2017, 41(4): 793-799
- [23] Li MY, Wang JL, Wei YL, Lu LL, Ji XL. Biological characteristics of three *Flavobacterium* cold-active bacteriophages from mingyong glacier[J]. Life Science Research, 2014, 18(2): 114-120 (in Chinese)
李明源, 王继莲, 魏云林, 卢磊磊, 季秀玲. 明永冰川三株黄杆菌低温噬菌体的生物学特性研究[J]. 生命科学研究, 2014, 18(2): 114-120
- [24] Alves DR, Perez-Esteban P, Kot W, Bean JE, Arnot T, Hansen LH, Enright MC, Jenkins ATA. A novel bacteriophage cocktail reduces and disperses *Pseudomonas aeruginosa* biofilms under static and flow conditions[J]. Microbial Biotechnology, 2016, 9(1): 61-74
- [25] Alemayehu D, Casey PG, McAuliffe O, Guinane CM, Martin JG, Shanahan F, Coffey A, Ross RP, Hill C. Bacteriophages ϕ MR299-2 and ϕ NH-4 can eliminate *Pseudomonas aeruginosa* in the murine lung and on cystic fibrosis lung airway cells[J]. mBio, 2012, 3(2): e00029-12
- [26] Fukuda K, Ishida W, Uchiyama J, Rashel M, Kato SI, Morita T, Muraoka A, Sumi T, Matsuzaki S, Daibata M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* keratitis in mice: effects of topical bacteriophage KPP12 administration[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e47742
- [27] Danis-Wlodarczyk K, Olszak T, Arabski M, Wasik S, Majkowska-Skrobek G, Augustyniak D, Gula G, Briers Y, Jang HB, Vandenheuvel D, et al. Characterization of the newly isolated lytic bacteriophages KTN6 and KT28 and their efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0127603
- [28] Alvi IA, Asif M, Ur Rehman S. A single dose of a virulent bacteriophage vB PaeP-SaPL, rescues bacteremic mice infected with multi drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Virus Research, 2021, 292: 198250
- [29] Liu YN, Tong YG, Mi ZQ, Li PY, Bai CQ. Progress in the research of bacteriophage disrupting biofilms[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2017, 42(10): 821-826 (in Chinese)
刘艳楠, 童贻刚, 米志强, 李璞媛, 柏长青. 噬菌体作用细菌生物被膜的研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2017, 42(10): 821-826