

F-RNA 噬菌体 YM1 肠道宿主分析

赵海霞¹, 杨明树⁴, 喻勇新^{*1,2}, 王永杰^{*1,2,3}

1 上海海洋大学食品学院, 上海 201306

2 农业农村部水产品质量安全贮藏保鲜风险评估实验室(上海), 上海 201306

3 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东 青岛 266237

4 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266237

赵海霞, 杨明树, 喻勇新, 王永杰. F-RNA 噬菌体 YM1 肠道宿主分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(6): 2363-2377.

ZHAO Haixia, YANG Mingshu, YU Yongxin, WANG Yongjie. Intestinal host analysis of F-specific RNA bacteriophage YM1[J]. Microbiology China, 2023, 50(6): 2363-2377.

摘要:【背景】F-RNA 噬菌体近年来常被作为水环境中诺如病毒污染的指示物。本课题组前期以大肠杆菌 ATCC700891^T 为宿主, 从人便样中筛选出一株 F-RNA 噬菌体 YM1, 其与大肠杆菌噬菌体 MS2 亲缘关系最近, MS2 宿主通常为含有性菌毛的雄性大肠杆菌。【目的】探索 F-RNA 噬菌体与其肠道宿主及诺如病毒之间的互作关系, 筛选 YM1 的肠道宿主。【方法】采用选择性培养基筛选 YM1 阳性便样中的大肠杆菌并进行 YM1 侵染验证, 结合 16S rRNA 基因扩增子测序分析 YM1 接种前后便样中的差异性菌群种类, 对 YM1 阳性便样中潜在的 YM1 肠道宿主进行分析。【结果】筛选到 351 个大肠杆菌菌株, YM1 侵染结果表明这些大肠杆菌均不是 YM1 的宿主; 16S rRNA 基因扩增子测序分析差异性菌种显示, *Enterobacter* sp. (OTU144) 和 *Enterobacter* sp. (OTU11) 这 2 株杆菌属细菌的相对丰度在 YM1 感染后发生显著性的降低, 表明该 2 种细菌可能为 YM1 的潜在肠道宿主。【结论】YM1 具有严格的宿主特异性, 便样中大肠杆菌并非 YM1 的肠道宿主, 同时发现了 2 种 YM1 的潜在宿主, 为进一步筛选分离 YM1 的肠道宿主提供了方向和依据。

关键词: F-RNA 噬菌体; 肠道宿主; 便样; 大肠杆菌

资助项目: 国家自然科学基金(31601570); 上海市科学技术委员会项目(22N31900700); 徐州市重点研发计划(社会发展)(KC21296)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31601570), the Shanghai Science and Technology Commission Project (22N31900700), and the Xuzhou Key Research and Development Program (Social Development) (KC21296).

*Corresponding authors. E-mail: YU Yongxin, yxyu@shou.edu.cn; WANG Yongjie, yjwang@shou.edu.cn

Received: 2022-08-31; Accepted: 2022-10-16; Published online: 2022-12-07

Intestinal host analysis of F-specific RNA bacteriophage YM1

ZHAO Haixia¹, YANG Mingshu⁴, YU Yongxin^{*1,2}, WANG Yongjie^{*1,2,3}

1 College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2 Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Aquatic Products on Storage and Preservation (Shanghai), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China

3 Marine Biology and Biotechnology Laboratory, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, Shandong, China

4 Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266237, Shandong, China

Abstract: [Background] In recent years, F-specific RNA bacteriophages have been recognized as indicators of human norovirus contamination in aquatic environments. Recently, using *Escherichia coli* ATCC700891^T as host, our group isolated an F-specific RNA bacteriophage YM1 from human stool sample. This bacteriophage has the closest relationship to *E. coli* bacteriophage MS2. The hosts of MS2 are usually the male *E. coli* containing pili. **[Objective]** To explore the interaction of F-specific RNA bacteriophage with its host and norovirus living in the intestine, this study aimed to screen out the intestinal hosts of YM1. **[Methods]** Selective medium was used to screen out the *E. coli* strains in YM1-positive stool sample, and YM1 infection was verified. In addition, the 16S rRNA gene amplicon sequencing was employed to analyze the differences of bacterial community in stool samples before and after YM1 inoculation, and the potential intestinal hosts of YM1 in the YM1-positive stool sample were analyzed. **[Results]** A total of 351 *E. coli* strains were isolated from YM1-positive stool sample. However, YM1 infection results showed that none of them were the hosts of YM1 bacteriophage. The 16S rRNA gene amplicon sequencing showed that the relative abundance of *Enterobacter* sp. (OTU144) and *Enterobacter* sp. (OTU11) in stool samples were significantly decreased after being infected with YM1, which indicated that these two kinds of bacteria might be the potential hosts of YM1. **[Conclusion]** YM1 targets to certain host in an extremely specific manner. *E. coli* is not the intestinal host of YM1 in stool sample. At the same time, two potential hosts of YM1 have been identified, which provided directions and references for the isolation and screening of the intestinal hosts of YM1.

Keywords: F-specific RNA bacteriophage; intestinal host; stool; *Escherichia coli*

F-RNA噬菌体(F-specific RNA bacteriophages)是属于轻小噬菌体科(Leviviridae)的单股正链RNA (single-stranded positive-sense RNA, ssRNA)病毒,能够特异性地吸附在宿主菌的性菌毛上,性菌毛蛋白由宿主菌携带的大质粒上的F因子(fertility factor)基因编码^[1-2]。根据基因型(genotype)的不同,F-RNA噬菌体可分为GI-GIV这4类,其中GI型和GII型属于轻小噬菌体属

(Levivirus),通常分离自动物粪便,而GIII型和GIV型属于异轻小噬菌体属(Allolevivirus),多分离自人类粪便^[3-4]。由于其在物理结构、化学特性等方面与诺如病毒(Norovirus, NoV)等肠道病毒类似,以及普遍存在于被粪便污染的水环境中等因素,近年来常被作为肠道病毒的指示生物^[5-6]。

本课题组前期以大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC700891^T为宿主,从人粪便样品中分离出

一株 F-RNA 噬菌体 YM1, 其与大肠杆菌噬菌体 MS2 亲缘关系很近^[7]。MS2 噬菌体属于轻小噬菌体科轻小噬菌体属的第一类群, 为烈性噬菌体, 其宿主具有严格的特异性, 通常为含有性菌毛的雄性大肠杆菌^[8], 如 *E. coli* HS(pFamp)R^[5,9]。与 MS2 类似, YM1 仅感染受试的 2 株大肠杆菌(*E. coli* ATCC700891^T 与 *E. coli* ATCC15597^T)^[7]。

诺如病毒是引起世界范围内病毒性胃肠炎的主要病原体之一, 属于杯状病毒科(Caliciviridae)诺如病毒属(Norovirus)的无包膜单股正链 RNA 病毒^[10-12]。目前, NoV 被分为 10 个基因类群(genogroup), 其中 GI、GII 和 GIV 为感染人类的主要类群^[13]。牡蛎等海产贝类通过滤食将进入海水环境的诺如病毒富集于体内, 成为诺如病毒在环境中传播的主要载体^[14]。研究发现 GII 型 F-RNA 噬菌体与贝类中富集的诺如病毒在数量上呈现正相关关系, 但是 GI 型 F-RNA 噬菌体的感染性颗粒检出率比 GII 型 F-RNA 噬菌体更高^[15]。有研究表明, 人肠道菌群与诺如病毒之间存在互作关系, 某些肠道细菌能够通过自身或者分泌辅助因子调控肠道中诺如病毒的侵染^[16-18], 但是目前关于两者之间的具体作用机制仍缺乏深入的研究。

综上所述, 我们猜想诺如病毒可能与 YM1 的肠道宿主存在某种相互作用机制, 进而影响诺如病毒在环境中的流行与传播。因此, 本研究从 YM1 阳性人粪便样品中分离其肠道宿主, 以期为后续研究提供重要材料, 为进一步探究“诺如病毒、肠道细菌、F-RNA 噬菌体”三者间相互作用的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

粪便样品来自上海市浦东新区某小学学

生, YM1 病毒由本实验分离保存^[7], 大肠杆菌(*E. coli* ATCC700891^T)由石家庄市疾病预防控制中心提供。

1.1.2 培养基

LB 琼脂培养基、LB 液体培养基, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 大肠杆菌和大肠菌群显色培养基(*E. coli* and coliform chromogenic agar, ECCA), 北京陆桥技术股份有限公司。

1.1.3 主要试剂和仪器

PCR 试剂盒 Premix TaqTM (TaKaRa TaqTM version 2.0 plus dye), TaKaRa 公司; 粪便基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 动物组织 RNA 提取试剂盒, 上海捷瑞生物工程有限公司; RT-qPCR 定量试剂盒 HiScript II One Step RT-qPCR SYBR Green Kit, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 菌落 PCR 引物、定量引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 仪、荧光定量 PCR 仪, Bio-Rad 公司; Illumina MiSeq PE300 测序仪, 上海美吉生物医药科技有限公司。

1.2 粪便样品中大肠杆菌的筛选

取 1 g YM1 阳性便样^[7]加入 9 mL 0.89% 生理盐水充分振荡混匀, 作为便样 10 倍稀释悬液, 依次以 10 倍梯度稀释至 10⁻⁵。分别吸取 10⁻³、10⁻⁴ 和 10⁻⁵ 这 3 个梯度的稀释液 200 μ L 涂布于大肠杆菌和大肠菌群显色培养基(ECCA)上, 每个梯度设置 3 个平行, 于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱倒置培养 18–24 h。根据菌落颜色进行判断, 即大肠杆菌显色为蓝绿色菌落, 大肠菌群(除大肠杆菌)显色为紫红色菌落。

1.3 大肠杆菌 16S RNA 基因扩增及系统发育分析

从以上每个梯度挑选蓝绿色单菌落利用细菌 16S rRNA 基因进行菌落 PCR 验证, 上游引物

为 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 下游引物为 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTAC GACTT-3')^[19]。PCR 反应体系(50 μ L): Premix *Taq* 25 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 2 μ L, ddH₂O 20 μ L, 用枪头取微量菌落作为模板。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。反应结束后用 1% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检验, 将条带大小正确的产物送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行 Sanger 测序, 将测序结果进行拼接后与 YM1 的 2 株已知宿主 *E. coli* ATCC700891^T 和 *E. coli* ATCC15597^T 的 16S rRNA 基因序列进行比对, 分析样品中是否存在与 YM1 已知宿主序列相同的菌株。同时, 将拼接序列在 NCBI 在线网站 (<https://ncbi.org/>) 进行 BLASTn 比对分析。下载结果中与所测大肠杆菌相似性较高的序列在 Geneious Prime (V.2022.1.1) 中用 MUSCLE Alignment 进行多序列比对, 比对后的文件导入 FastTree 2.11 中构建系统发育树; 最后将系统发育树导入 ITOL 网站 (<https://itol.embl.de/tree/>) 进行编辑。

1.4 双层平板斑点法侵染验证

挑取平板中所有蓝绿色单菌落, 分别接种于 5 mL 的 LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C、250 r/min 培养至对数期(OD_{600} 为 0.6–0.8)。用双层平板斑点法^[20]在六孔板上进行侵染验证。每个孔用 1.5 mL LB 固体培养基作为底层培养基, 将液体培养后的菌悬液用 PBS 缓冲液稀释 10 倍, 取 100 μ L 菌悬液与 1.5 mL LB 半固体培养基混合后倒入凝固的底层培养基中, 待凝固后取 YM1 噬菌体液 10 μ L 滴于双层平板中间, 同时以 *E. coli* ATCC700891^T 为阳性对照, 待液体吸收晾干后倒置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 10–12 h, 观察培养基表面是否有噬菌斑形成。

1.5 便样接种

取 1 g 粪便样品于 9 mL 的 0.89% 生理盐水中, 振荡混匀, 感染组取 0.2 mL 粪便悬液加入 1.8 mL YM1 (10^8 PFU/mL) 噬菌体液中, 充分混匀; 对照组取 0.2 mL 粪便悬液加入 1.8 mL 0.89% 生理盐水中, 充分混匀。感染组和对照组各 2 份置于 37 $^{\circ}$ C、250 r/min 恒温摇床中分别孵育 12 h 和 24 h。

1.6 YM1 噬菌体的检测

参照动物组织 RNA 提取试剂盒说明步骤分别提取感染组和对照组总 RNA。提取后的 RNA 用 RT-qPCR 法进行相对定量分析, 以 SYBR-Green 为染料, YM1 定量上游引物为 YM1-F (5'-TCAGTGGTCCATACCTTAGATGC-3'), 下游引物为 YM1-R (5'-ACCCCGTTAGCGAAG TTAGCT-3')^[21]。PCR 反应体系(20 μ L): 2 \times One Step SYBR Green Mix 10 μ L, One Step SYBR Green Enzyme Mix 1 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L) 各 0.4 μ L, RNase-free ddH₂O 6.2 μ L, 模板 RNA 2 μ L。反应条件: 50 $^{\circ}$ C 15 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环; 添加溶解曲线, 采集程序使用仪器默认。

1.7 16S rRNA 基因扩增子测序与序列分析

对上述 4 个处理组样品及原始粪便样品 N0 分别用粪便基因组 DNA 提取试剂盒进行总 DNA 的提取, 提取步骤参照试剂盒说明书进行, 提取后的 DNA 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测是否合格。

扩增 16S rRNA 基因的 V3–V4 区域。PCR 引物由上海美吉生物医药科技有限公司合成, 上、下游引物分别添加不同的 barcode 用于上机测序识别, 上游引物为 338F (5'-ACTCCTACGG GAGGCAGCAG-3'), 下游引物为 806R (5'-GGA CTACHVGGGTWTCTAAT-3')^[22]。PCR 反应体系(50 μ L): Premix *Taq* 25 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 2 μ L, ddH₂O 20 μ L, 模板 DNA

1 μL 。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

PCR 扩增产物经上海美吉生物医药科技有限公司 Illumina MiSeq PE300 测序仪进行扩增子测序。测序得到的原始数据首先过滤 reads 尾部质量值 20 以下的碱基, 然后根据 overlap 关系将对 reads 拼接成一条序列, 同时对拼接序列质量进行质控, 允许的最大错配比率为 0.2, 筛选不符合序列, 根据序列首尾两端的 barcode 和引物区分样品, 并调整序列方向。按照序列相似度为 97% 的水平用 QIIME (V1.9.1) 分析工具将测序获得的有效序列聚类成为操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU), 采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 OTU 代表序列进行分类学分析, 分类数据库为 Silva128/16S bacteria 数据库, 最后生成各分类学水平的丰度表。然后将得到的优化数据按照最小样本序列数进行抽平, 使所有样本的序列抽取至统一数据量, 最后再进行各项分析。

1.8 统计分析

根据物种群落丰度数据, 运用费舍尔精确检验 (Fisher's exact test) 对 2 个样本间的物种丰度差异进行分析, 设置置信区间为 0.95, 采用双尾检验, 用 FDR 方法对 P 值进行多重检验校正, 显著性水平为 0.05^[23], $P < 0.05$ 表示差异显著, 将 $0.01 < P \leq 0.05$ 标记为*, $0.001 < P \leq 0.01$ 标记为**, $P \leq 0.001$ 标记为***。

2 结果与分析

2.1 选择性培养基筛选结果

将稀释后的粪便样品悬液涂布于大肠杆菌与大肠菌群显色培养基 (ECCA) 上, 培养 17 h 后, 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 这 3 个梯度的平板上均长出蓝绿色菌落和紫红色菌落, 图 1 所示为 10^{-3} 梯度下的

菌落生长平板图片, A 为蓝绿色代表菌落, B 为紫红色代表菌落。其中 10^{-3} 平板上的蓝绿色和紫红色菌落较小且密集, 均匀分布于平板中, 10^{-4} 和 10^{-5} 平板上菌落数量成梯度下降, 菌落较分散。

2.2 菌落 PCR 结果及系统发育分析

从各梯度平板挑选蓝绿色单菌落进行菌落 PCR 验证, 对 1% 琼脂糖凝胶上显示条带单一正确的 PCR 产物进行测序, 得到的序列在 NCBI 网站中进行 BLASTn 比对, 结果显示与送测菌株具有最高相似性 (identity) 的菌株均为大肠杆菌, 且相似性均在 99% 以上, 表明选择性培养基的选择性较好 (筛选的阳性菌落测序后均确认为大肠杆菌)。YM1 的已知宿主 *E. coli* ATCC700891^T 与 *E. coli* ATCC15597^T 的 16S rRNA 全长基因之间的一致性为 99.6%, 宿主 *E. coli* ATCC700891^T 与从便样中分离的大肠杆菌 16S rRNA 全长基因的一致性在 96.2%–98.6% 之间, 宿主 *E. coli* ATCC15597^T 与其一致性在 96.5%–98.5% 之间, 表明便样中筛选得到的大肠杆菌中与 YM1 已知宿主相同的菌株, YM1 具有严格的宿主特异性。

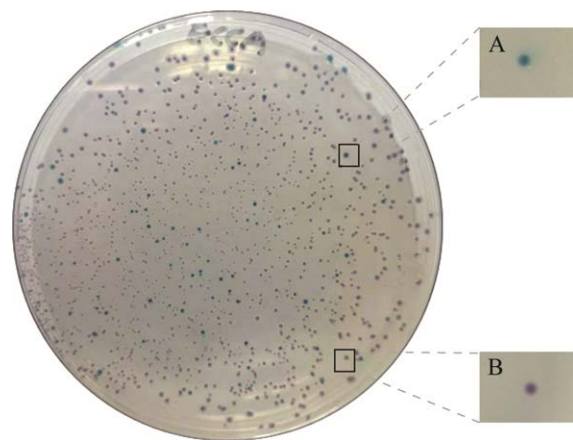


图 1 选择性培养基筛选结果 A: 蓝绿色大肠杆菌菌落. B: 紫红色大肠菌群 (除大肠杆菌) 菌落
Figure 1 Results of selective medium screening. A: The blue-green *E. coli* colony. B: The purple-red coliform (except *E. coli*) colony.

选择代表菌株构建系统发育树,如图 2 所示,所有分离株均与参考大肠杆菌聚为一支,且与宿主菌聚在不同的支,表明所有分离株均属于大肠杆菌,分离株 1-3 和分离株 4-8 也分别聚在不同的支,说明分离株之间的亲缘关系也不同,且所有分离株均与宿主菌不同。

2.3 侵染实验

共挑选各梯度平板上的所有蓝绿色单菌落

351 个,液体培养至对数期(OD_{600} 为 0.6-0.8)后用双层平板斑点法进行侵染验证,结果显示所有菌落平板均无噬菌斑形成(图 3A、3B、3D、3E、3F),而阳性对照 *E. coli* ATCC700891^T 的平板滴有噬菌体 YM1 处无菌生长且形成边缘整齐的透明圈,噬菌斑明显(图 3C)。表明大肠杆菌选择性培养基筛选出的大肠杆菌均未被 YM1 裂解,均不是 YM1 的宿主。

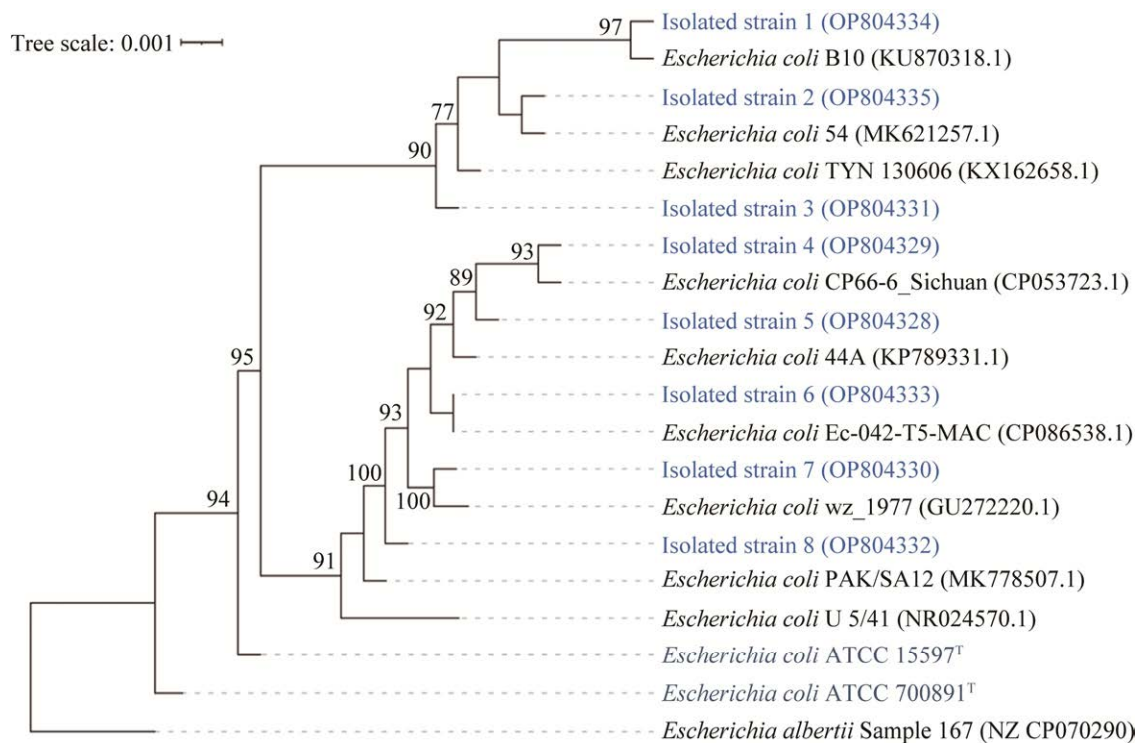


图 2 大肠杆菌分离株 16S rRNA 基因系统发育分析 建树方法为 FastTree, isolated strains 1-8 代表测序后获得的大肠杆菌序列, *Escherichia albertii* Sample 167 为外支, *Escherichia coli* ATCC 700891^T 和 *Escherichia coli* ATCC 15597^T 为 YM1 的已知宿主, *Escherichia coli* U 5/41 为参考菌株; 括号中为菌株的序列登录号; 分支点上的数值表示自展值大小, 小于 70 的未显示; 标尺表示遗传距离

Figure 2 Phylogenetic tree of isolated *Escherichia coli* strains based on their 16S rRNA gene sequences. The tree-building method is FastTree, isolated strains 1-8 represent the *Escherichia coli* sequence obtained after sequencing, and *Escherichia albertii* Sample 167 is used as the out-group, *Escherichia coli* ATCC 700891^T and *Escherichia coli* ATCC 15597^T are known hosts of YM1 and *Escherichia coli* U 5/41 is the reference strain; Sequence accession numbers of the strains are in parentheses; The value at the branch indicates the bootstrap value and less than 70 are not showed; The scale indicates the genetic distance.

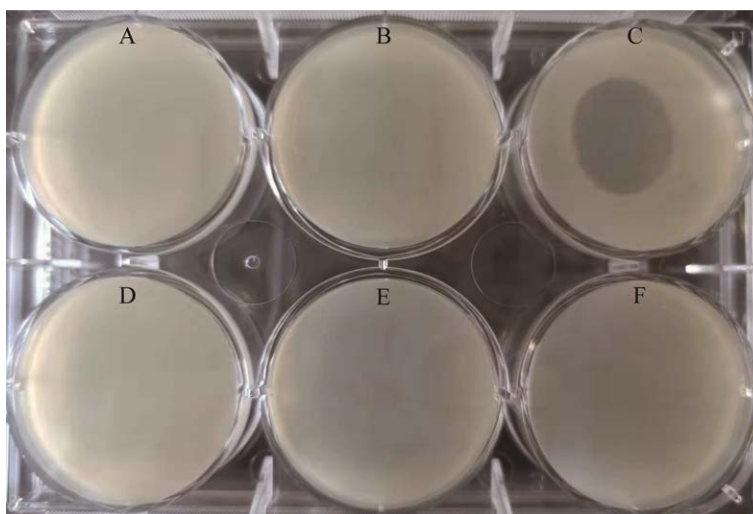


图3 YM1 侵染受试菌株的验证结果 平板(C)上层菌液为 *Escherichia coli* ATCC 700891^T; 平板(A、B、D、E 和 F)为 5 种不同的蓝绿色菌落; 其余蓝绿色菌落平板未展示, 噬菌斑结果均为阴性

Figure 3 The infection results of candidate hosts by YM1. The bacteria in the plate (C) is *Escherichia coli* ATCC 700891^T; The leaves plates (A, B, D, E and F) are 5 different blue-green colonies; The rest of the blue-green colonies are not shown, and the plaque results are all negative.

2.4 YM1 的定量检测

上述侵染实验和 16S rRNA 基因测序结果均表明, 样品中筛选出的大肠杆菌均不是 YM1 的肠道宿主。为了验证 YM1 肠道宿主是否存在于样品中, YM1 能否在样品中发生增殖, 采用 RT-qPCR 法相对定量的方式检测了 YM1 在各样品中的数量变化情况。结果显示溶解曲线(图

4A)呈现单一峰值, 且峰线窄而尖, 说明引物特异性好, 扩增产物单一。随着 PCR 反应的进行, 扩增产物不断积累, 荧光信号强度不断增加, 得到扩增曲线如图 4B 所示。接种 YM1 后, 24 h 感染组的 C_t 值为 18.4, 小于 12 h 的 22.7。这表示感染 24 h 后, 便样中 YM1 的数量高于 12 h 组。说明随着时间的推移, YM1 裂

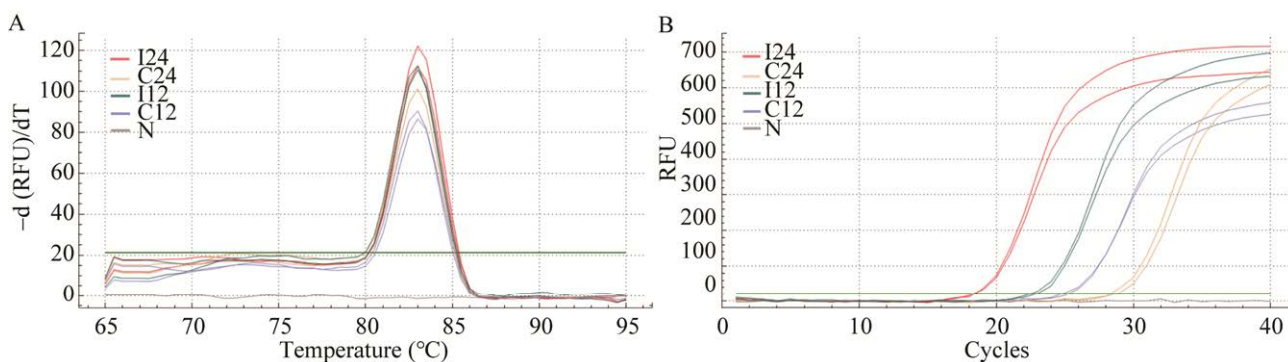


图4 YM1 定量的溶解曲线(A)和扩增曲线(B) RFU 表示相对荧光单位(relative fluorescence units); I24 和 I12 代表感染组(infection group), C24 和 C12 代表对照组(control group), N 代表体系空白对照

Figure 4 Quantitative melt curve (A) and amplification curve (B) of YM1. RFU represents relative fluorescence units; I24 and I12 represent the infection group, C24 and C12 represent the control group and N stands for blank control.

解宿主获得了增殖,使其数量增加,表明 YM1 的肠道宿主仍存在于样品中;而对照组中 24 h 的 C_i 值为 28.5,大于 12 h 的 25.0。

2.5 物种差异分析

将 5 个样本测序后抽平得到的数据进行分析,共获得优化序列 301 943 条,平均序列长度为 423 bp。按照序列相似度为 97%的水平将测

序获得的有效序列聚类共得到 183 个 OTU,将在所有样品中相对丰度均小于 1%的物种归为 others。OTU 代表序列在各分类水平(门、科、属、种)上的物种组成情况如表 1 所示,主要列举了在各组中丰度占比大于 1%的 OTU。

在 OTU 水平上各样本的物种丰度分布情况如图 5 所示,OTU38 (*Escherichia coli*)在原始便

表 1 相对丰度变化显著的 OTU 序列物种分类

Table 1 Species classification of OTU sequences with significant changes in relative abundance

OTU	门 Phylum	科 Family	属 Genus	种 Species	感染组丰度 Abundance of infection group	
					12 h	24 h
38	<i>Proteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia-Shigella</i>	<i>Escherichia coli</i>	↑	↑
144	<i>Proteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter</i>	Unclassified	↓	↓
11	<i>Proteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter</i>	Unclassified	↓	↑
141	<i>Actinobacteriota</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	↓	↓
75	<i>Firmicutes</i>	<i>Planococcace</i>	<i>Lysinibacillus</i>	<i>Lysinibacillus</i> sp.	↓	↓
28	<i>Bacteroidota</i>	<i>Tannerellaceae</i>	<i>Parabacteroides</i>	<i>Parabacteroides merdae</i>	/	↑

最后两列分别表示,与对照组相比,感染组在 12 h 和 24 h 中对应 OTU 的丰度变化情况:↑表示相对丰度增加;↓表示相对丰度降低;/表示未检测到该 OTU

The last two columns represent the changes in the abundance of the corresponding OTUs in the infection group at 12 h and 24 h, respectively, compared with the control group; ↑ indicates an increase in relative abundance; ↓ indicates a decrease in relative abundance; / indicates the OTU was not detected.

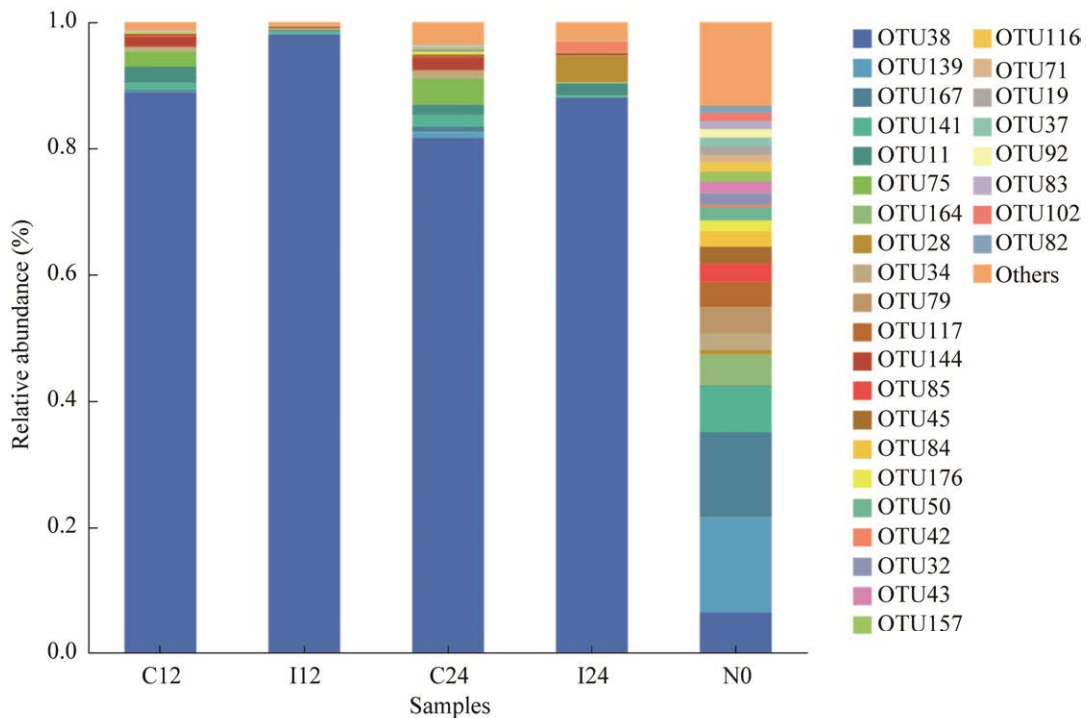


图 5 OTU 水平上各样本的相对丰度组成

Figure 5 Relative abundance composition of each sample on OTUs level.

样 N0 中丰度为 6.53%，在感染组中丰度显著增加且占比较大，为 87.97%–98.00%；类似于感染组，对照组中 OTU38 也是优势种群，但相对丰度均小于感染组。推测可能是 OTU38 更能适应体外培养条件，逐渐增殖成为优势种属。显然，加入 YM1 后，OTU38 丰度不但未降低，反而显著升高，表明肠道中的大肠杆菌不是 YM1 的宿主。

基于样本中群落丰度数据，如表 2 所示，运用费舍尔精确检验方法对 2 组样本间微生物

群落之间的物种进行假设检验，评估物种丰度差异的显著性水平，获得了样本间显著性差异物种，图 6A、6B 所示为 2 组中样本物种相对丰度均值总和排名在前 15 的 OTU。

由于 OTU38 在 2 组中丰度均在 80% 以上，且在感染组中呈现丰度上升趋势，因此为了精简分析，去除 OTU38，对 12 h 和 24 h 组中其余 OTU 的相对丰度变化情况进行分析，如图 6C、6D 所示，发现 OTU144 (*Enterobacter-unclassified*)、

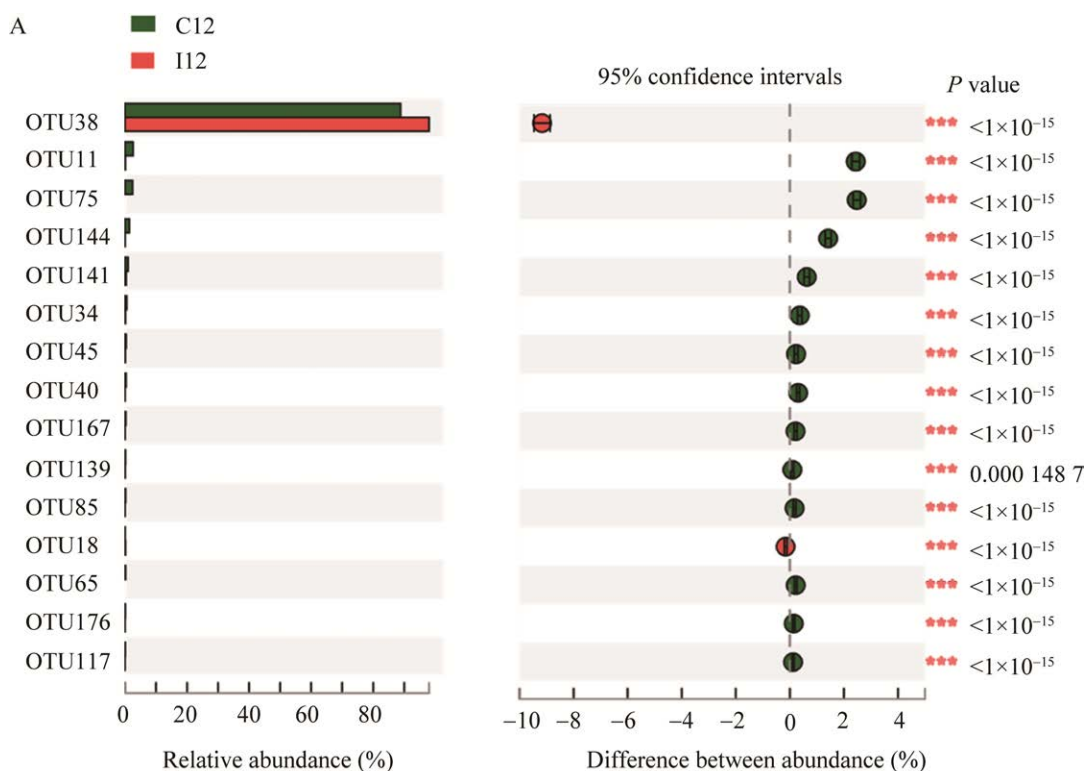
表 2 每个样本中 OTU 的相对丰度信息

Table 2 The OTU relative abundance in each sample

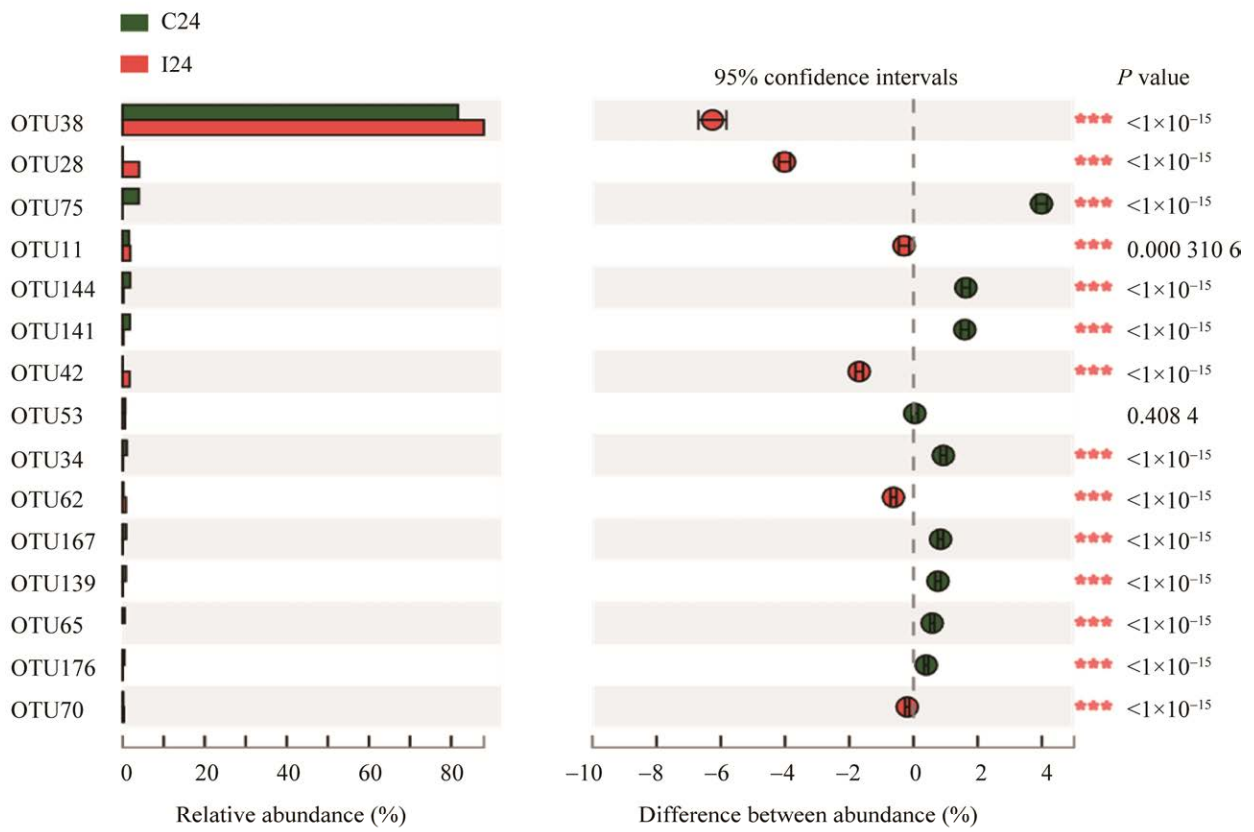
Group	OTU38	OTU144	OTU11	OTU141	OTU75	OTU28
C12	46 492	768	1 371	528	1 296	1
I12	51 289	25	95	200	0	20
C24	42 762	988	840	962	2 096	24
I24	46 037	134	994	125	9	2 125
SUM	186 580	1 915	3 300	1 815	3 401	2 170

列举了在各组中大于 1% 的 OTU 丰度(序列数)，其余 OTU 的丰度未列出，SUM 列为所有样本中该物种丰度之和

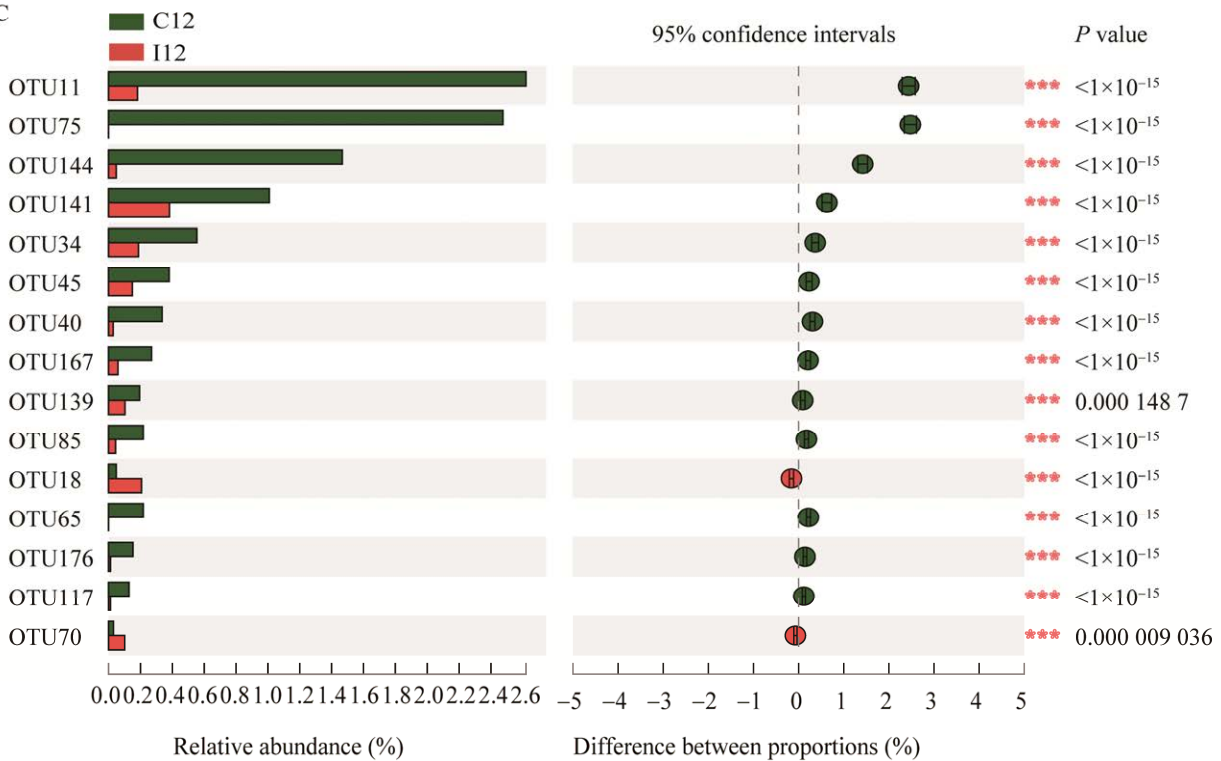
The relative abundance (number of sequences) of OTUs greater than 1% in each group are listed, the abundances of other OTUs are not listed, and the column SUM is the sum of the abundances of the species in all samples.



B



C



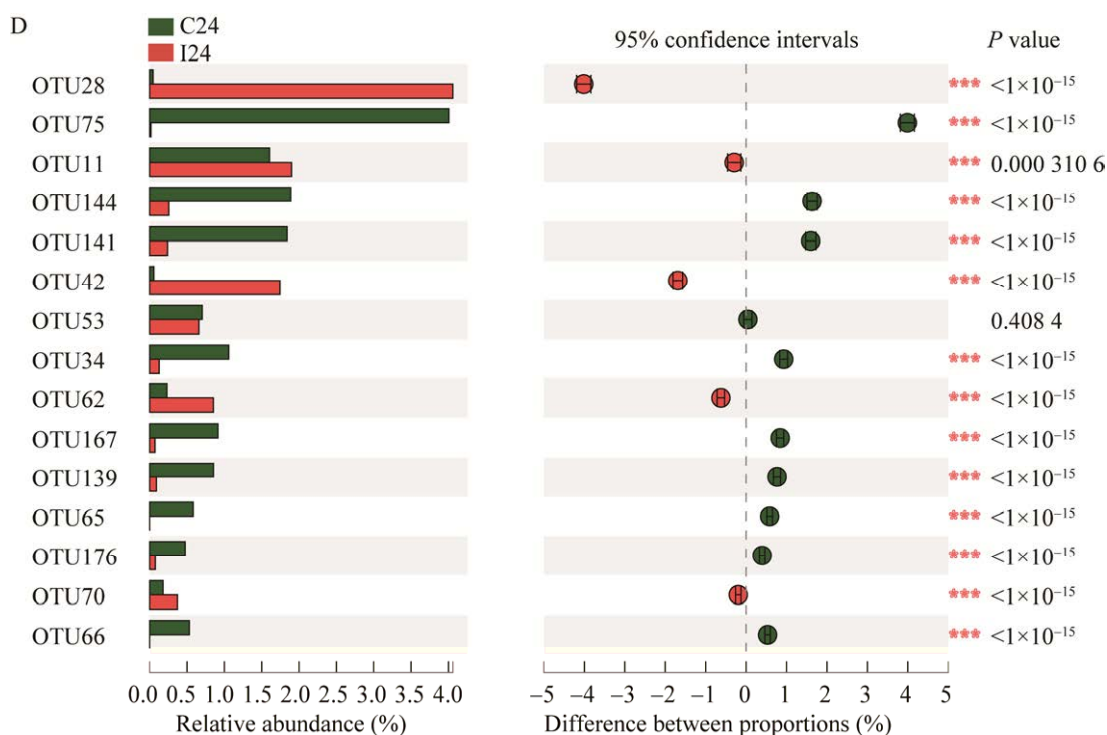


图 6 组间相对丰度差异性变化的 OTU 分布柱形图 A: 12 h 组间显著性差异前 15 的 OTU 分布柱形图. B: 24 h 组间显著性差异前 15 的 OTU 分布柱形图. C: 12 h 组去除 OTU38 后组间显著性差异前 15 的 OTU 分布柱形图. D: 24 h 组去除 OTU38 后组间显著性差异前 15 的 OTU 分布柱形图. 中间区域为所设定的置信区间, 圆点对应的数值表示物种在两样本中相对丰度的差值, 圆点颜色为物种丰度占比较大的颜色, 圆点上的 I 型区间为差值的上、下限值

Figure 6 Histogram of OTU distribution for the significant differences between groups relative abundance. A: Histograms of OTU distribution of the top 15 significant differences between 12 h groups. B: Histograms of OTU distribution of the top 15 significant differences between 24 h groups. C: Histograms of OTU distributions of the top 15 significant differences between 12 h groups after removing OTU38. D: Histograms of OTU distributions of the top 15 significant differences between 24 h groups after removing OTU38. The middle area is the set confidence interval, the value corresponding to the dot represents the difference between the relative abundances of the species in the two samples, the color of the dot is the color with a larger proportion of species abundance, and the I-type interval on the dot is the difference the upper and lower limits of the value.

OTU141 (*Bifidobacterium*)、OTU75 (*Lysinibacillus*) 和 OTU11 (*Enterobacter-unclassified*) 等变化显著。其中, OTU75 (*Lysinibacillus*) 在 12 h 和 24 h 从对照组到感染组的丰度均显著降低, 12 h 组中从 2.48% 降到 0.00%, 24 h 组中从 4.00% 降到 0.02%, 2 组 P 值均小于 0.001, 差异具有显著性; 而 OTU144 (*Enterobacter-unclassified*) 和 OTU141 (*Bifidobacterium*) 在 12 h 和 24 h 组中的

丰度变化情况也与 OTU75 趋同, 且 24 h 对照组丰度较 12 h 对照组的丰度升高; OTU11 在 12 h 组的丰度除 OTU38 外最高, 在 I12 中的占比为 0.18%, 小于在 C12 中的占比 2.62%, $P < 0.001$, 差异具有显著性, 但是在 24 h 组中的丰度变化未延续 12 h 组中的趋势, I24 中的丰度大于 C24, 可能是由于反应时间的延长, 样品中发生了其他更加复杂的变化。

3 讨论与结论

近年来,污水及其再生水中的肠道病毒污染已严重威胁到人类公共卫生安全,因此,进行水体中肠道病毒进行监测和风险评估对预防和控制诸如病毒等肠道病毒的感染尤为重要,目前多项研究建议将 F-RNA 噬菌体用作评估环境中诸如病毒感染的指标^[15,24-25]。YM1 是从人类便样品中首次分离得到的一株 F-RNA 噬菌体^[7],其基因组序列与噬菌体 MS2 的相似性为 92%,为同一属,MS2 宿主多为含有性菌毛的雄性大肠杆菌。我们的研究表明 YM1 仅裂解受试的 2 株大肠杆菌菌株,显示出很高的宿主特异性^[7]。因此,本研究首先采用选择性培养基筛选分离出了 YM1 阳性便样中的大肠杆菌,然后与 YM1 进行侵染实验,结果显示分离得到的所有大肠杆菌均无噬菌斑产生。同时,通过对 YM1 的 2 株已知宿主 16S rRNA 全长基因序列与筛选得到的大肠杆菌 16S rRNA 全长基因序列进行比对分析发现,没有与已知宿主序列 100%匹配的序列,系统发育分析显示,分离株大肠杆菌与宿主菌分别聚类在不同的大支上,表明从便样中分离到的大肠杆菌均不是 YM1 的肠道宿主,YM1 宿主特异性较强。

为确认 YM1 的宿主是否还存在于样本中,随后我们对样本中的 YM1 进行了相对定量分析。发现感染组中 YM1 的浓度随着培养时间的延长而增加,表明 YM1 的宿主仍存在于人便样中。然而,对照组中 YM1 的浓度随着培养时间的延长而降低。Liu 等^[26]报道了 4 株大肠杆菌噬菌体在不同 MOI 下对大肠杆菌的抑菌效果,结果表明,有 3 株噬菌体在高 MOI 下的抑菌效果更强,感染组中高浓度的噬菌体可能对宿主的抑菌活性更好,可以降低抑菌抗性。本研究中对照组原有的噬菌体含量较少,随着时间的延长,宿

主细菌可能通过多种抗噬菌体机制阻断后代噬菌体的增殖^[27],导致 24 h 对照组中 YM1 的含量减少。

为了进一步得到 YM1 的肠道宿主,我们采用 16S rRNA 基因扩增子测序来推测 YM1 的潜在肠道宿主。扩增子测序通常被用来分析群落中微生物的组成及多样性等信息,本研究中用于对已知噬菌体 YM1 肠道宿主的筛选,通过分析感染组与对照组样品中差异性的菌种,从而得到潜在宿主的范围。本研究中一共有 4 个 OTU 相较于对照组发生了显著性降低,分别是 OTU75、OTU141、OTU144 以及 12 h 组中的 OTU11。特别值得指出的是,截至目前所有分离出的 ssRNA 噬菌体都吸附在革兰氏阴性细菌上^[28]。例如,Olsen 等^[29]分离出的噬菌体 PRR1 其宿主包含多种革兰氏阴性细菌,如假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、大肠杆菌(*E. coli*)等;Klovins 等^[30]分离出的噬菌体 AP205 其宿主为不动杆菌属(*Acinetobacter*)的菌株;Olsthoorn 等^[31]分离出的噬菌体 PP7 宿主也为 *Pseudomonas aeruginosa*。不动杆菌属、假单胞菌属和埃希氏菌属都属于变形菌门(*Proteobacteria*)的 γ -变形菌纲(*Gamma proteobacteria*),已被证明其中均含有 ssRNA 噬菌体的宿主^[32]。

OTU75 属于赖氨酸杆菌属,属于革兰氏阳性菌,在两感染组中的丰度较对照组均显著降低;OTU141 为双歧杆菌属,是一种革兰氏阳性、严格厌氧的肠道益生菌,可在人体肠道中定殖^[33-34],在两感染组中的丰度也均小于对照组。但由于目前已报道的 F-RNA 噬菌体的宿主均为革兰氏阴性菌,因此 OTU75 和 OTU141 丰度降低的原因不能归因于 YM1 的作用,具体尚不明确,其为 YM1 潜在肠道宿主的可能性较小。而 OTU144 和 OTU11 与埃希氏菌属同属于 γ -变形菌纲肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*),因此

OTU144 和 OTU11 成为 YM1 潜在宿主的可能性较大,但是具体的结果需要进一步的分离感染实验进行验证。值得注意的是,肠道环境与我们培养细菌的环境不尽相同,最重要的差异是有无氧气;大肠杆菌是一种兼性厌氧型细菌,在有氧无氧环境下均可生存。但如肠道中的双歧杆菌等细菌在有氧条件下无法繁殖,某些 OTU 的变化可能是由于细菌对环境不适应导致的,这会对我们寻找 YM1 的潜在肠道宿主造成干扰。

据报道,含有 F 因子的细菌能够被 F-RNA 噬菌体感染^[35]。F 质粒(具有 F 因子)能够将基因从供体菌定向转移到受体菌,原来的 F⁺菌仍为 F⁺,而 F 受体菌可变成 F⁺菌^[36]。因此,筛选含有 F 质粒的细菌可以作为下一步研究的重点,以及获得肠道中 YM1 宿主的依据。

本研究主要通过选择性培养基筛选 YM1 阳性便样中的大肠杆菌,结合 16S rRNA 基因扩增子测序的方法寻找 YM1 的肠道宿主,结果表明,便样中大肠杆菌不是 YM1 的肠道宿主,同时通过 16S rRNA 基因扩增子测序分析样本中差异性菌种变化推测出 2 种肠杆菌科的细菌为 YM1 的潜在肠道宿主,但仍需通过进一步的筛选分离以及感染实验进行验证,这为后续的实验奠定了基础,同时使用 16S rRNA 基因扩增子测序来分析 YM1 肠道宿主方法为筛选噬菌体宿主的工作提供了新思路。

REFERENCES

- [1] SILVERMAN PM, CLARKE MB. New insights into F-pilus structure, dynamics, and function[J]. Integrative Biology, 2010, 2(1): 25-31.
- [2] 高荣凯. F 菌毛的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2012, 32(4): 69-71.
GAO RK. Advances in F pilus research[J]. Journal of Microbiology, 2012, 32(4): 69-71 (in Chinese).
- [3] OGORZALY L, BERTRAND I, PARIS M, MAUL A, GANTZER C. Occurrence, survival, and persistence of human adenoviruses and F-specific RNA phages in raw groundwater[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(24): 8019-8025.
- [4] BOLLBACK JP, HUELSENBECK JP. Phylogeny, genome evolution, and host specificity of single-stranded RNA bacteriophage (family Leviviridae)[J]. Journal of Molecular Evolution, 2001, 52(2): 117-128.
- [5] 李梅, 胡洪营. F-RNA 噬菌体及其作为水中肠道病毒指示物的研究进展[J]. 生态环境, 2005, 14(4): 585-589.
LI M, HU HY. Review of F-specific RNA bacteriophages as enteroviruses indicators in water[J]. Ecology and Environment, 2005, 14(4): 585-589 (in Chinese).
- [6] SMITH HW, HUGGINS MB. Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics[J]. Journal of General Microbiology, 1982, 128(2): 307-318.
- [7] YANG MS, YU YX, WANG YJ. Characterization of a novel group I F-specific RNA bacteriophage isolated from human stool[J]. Archives of Microbiology, 2021, 203(7): 4065-4072.
- [8] FIERS W, CONTRERAS R, DUERINCK F, HAEGEMAN G, ISERENTANT D, MERREGAERT J, JOU WM, MOLEMANS F, RAEYMAEKERS A, van den BERGHE A, VOLCKAERT G, YSEBAERT M. Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene[J]. Nature, 1976, 260(5551): 500-507.
- [9] DEBARTOLOMEIS J, CABELLI VJ. Evaluation of an *Escherichia coli* host strain for enumeration of F male-specific bacteriophages[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(5): 1301-1305.
- [10] AHMED SM, HALL AJ, ROBINSON AE, VERHOEF L, PREMKUMAR P, PARASHAR UD, KOOPMANS M, LOPMAN BA. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2014, 14(8): 725-730.
- [11] GREEN KY, ANDO T, BALAYAN MS, BERKE T, CLARKE IN, ESTES MK, MATSON DO, NAKATA S, NEILL JD, STUDDERT MJ, THIEL HJ. Taxonomy of the caliciviruses[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2000, 181(Supplement_2): S322-S330.
- [12] LIAO YY, HONG XJ, WU AW, JIANG YT, LIANG YH, GAO JS, XUE L, KOU XX. Global prevalence of norovirus in cases of acute gastroenteritis from 1997 to 2021: an updated systematic review and meta-analysis[J]. Microbial Pathogenesis, 2021, 161(Pt A): 105259.
- [13] CHHABRA P, de GRAAF M, PARRA GI, CHAN MCW,

- GREEN K, MARTELLA V, WANG QH, WHITE PAJ. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes[J]. *The Journal of General Virology*, 2019, 100(10): 1393-1406.
- [14] CAMPOS CJA, LEES DN. Environmental transmission of human noroviruses in shellfish waters[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(12): 3552-3561.
- [15] HARTARD C, LECLERC M, RIVET R, MAUL A, LOUTREUL J, BANAS S, BOUDAUD N, GANTZER C. F-specific RNA bacteriophages, especially members of subgroup II, should be reconsidered as good indicators of viral pollution of oysters[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 84(1): e01866-e01817.
- [16] 梁耀民, 陆胤波, 曹颖雯, 罗奕熔, 蒋月婷, 寇晓霞. 诺如病毒和肠道菌群的互作关系及机制研究进展[J]. *病毒学报*, 2021, 37(5): 1215-1220.
- LIANG YM, LU YB, CAO YW, LUO YR, JIANG YT, KOU XX. Research progress on the mechanisms of Norovirus interactions with gut flora[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2021, 37(5): 1215-1220 (in Chinese).
- [17] BALDRIDGE MT, NICE TJ, McCUNE BT, YOKOYAMA CC, KAMBAL A, WHEADON M, DIAMOND MS, IVANOVA Y, ARTYOMOV M, VIRGIN HW. Commensal microbes and interferon- λ determine persistence of enteric murine norovirus infection[J]. *Science*, 2015, 347(6219): 266-269.
- [18] JONES MK, WATANABE M, ZHU S, GRAVES CL, KEYES LR, GRAU KR, GONZALEZ-HERNANDEZ MB, IOVINE NM, WOBUS CE, VINJE J, TIBBETTS SA, WALLET SM, KARST SM. Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells[J]. *Science*, 2014, 346(6210): 755-759.
- [19] WEISBURG WG, BARNES SM, PELLETIER DA, LANE DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697-703.
- [20] LUONG T, SALABARRIA AC, EDWARDS RA, ROACH DR. Standardized bacteriophage purification for personalized phage therapy[J]. *Nature Protocols*, 2020, 15(9): 2867-2890.
- [21] OGORZALY L, GANTZER C. Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: application to urban raw wastewater[J]. *Journal of Virological Methods*, 2006, 138(1/2): 131-139.
- [22] MORI H, MARUYAMA F, KATO H, TOYODA A, DOZONO A, OHTSUBO Y, NAGATA Y, FUJIYAMA A, TSUDA M, KUROKAWA K. Design and experimental application of a novel non-degenerate universal primer set that amplifies prokaryotic 16S rRNA genes with a low possibility to amplify eukaryotic rRNA genes[J]. *DNA Research*, 2014, 21(2): 217-227.
- [23] 董婧, 卢少奇, 伍娟丽, 肖宇, 沈志强, 周岳溪. 进水方式对处理分散养猪冲洗废水 ABR 反应器微生物群落结构的影响[J]. *环境工程技术学报*, 2022, 12(3): 744-752.
- DONG J, LU SQ, WU JL, XIAO Y, SHEN ZQ, ZHOU YX. Effects of influent mode on the microbial community structure in anaerobic baffled reactor during the treatment of dispersed swine flushing wastewater[J]. *Journal of Environmental Engineering Technology*, 2022, 12(3): 744-752 (in Chinese).
- [24] GYAWALI P, DEVANE M, SCHOLLES P, HEWITT J. Application of crAssphage, F-RNA phage and pepper mild mottle virus as indicators of human faecal and norovirus contamination in shellfish[J]. *The Science of the Total Environment*, 2021, 783: 146848.
- [25] LOWTHER JA, CROSS L, STAPLETON T, GUSTAR NE, WALKER DI, SILLS M, TREAGUS S, POLLINGTON V, LEES DN. Use of F-specific RNA bacteriophage to estimate infectious Norovirus levels in oysters[J]. *Food and Environmental Virology*, 2019, 11(3): 247-258.
- [26] LIU H, NIU YD, MENG R, WANG J, LI J, JOHNSON RP, McALLISTER TA, STANFORD K. Control of *Escherichia coli* O157 on beef at 37, 22 and 4 C by T5-, T1-, T4-and O1-like bacteriophages[J]. *Food Microbiology*, 2015, 51: 69-73.
- [27] 张明阳, 任彪, 贾燕涛. 细菌与噬菌体相互抵抗机制研究进展[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(9): 3293-3304.
- ZHANG MY, REN B, JIA YT. Research progress on the mutual resistance mechanisms between bacteria and bacteriophages[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(9): 3293-3304 (in Chinese).
- [28] RUOKORANTA TM, GRAHN AM, RAVANTTI JJ, PORANEN MM, BAMFORD DH. Complete genome sequence of the broad host range single-stranded RNA phage PRR1 places it in the Levivirus genus with characteristics shared with Alloviruses[J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(18): 9326-9330.
- [29] OLSEN RH, THOMAS DD. Characteristics and purification of PRR1, an RNA phage specific for the broad host range *Pseudomonas* R1822 drug resistance plasmid[J]. *Journal of Virology*, 1973, 12(6): 1560-1567.
- [30] KLOVINS J, OVERBEEK GP, van den WORM SHE, ACKERMANN HW, van DUIN J. Nucleotide sequence

- of a ssRNA phage from *Acinetobacter*: kinship to coliphages[J]. *The Journal of General Virology*, 2002, 83(Pt 6): 1523-1533.
- [31] OLSTHOORN RC, GARDE G, DAYHUFF T, ATKINS JF, van DUIN J. Nucleotide sequence of a single-stranded RNA phage from *Pseudomonas aeruginosa*: kinship to coliphages and conservation of regulatory RNA structures[J]. *Virology*, 1995, 206(1): 611-625.
- [32] SCHOCH CL, CIUFO S, DOMRACHEV M, HOTTON CL, KANNAN S, KHOVANSKAYA R, LEIPE D, MCVEIGH R, O'NEILL K, ROBBERTSE B, SHARMA S, SOUSSOV V, SULLIVAN JP, SUN L, TURNER S, KARSCH-MIZRACHI I. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools[J]. *Database*, 2020. DOI: 10.1093/database/baaa062
- [33] 关嘉琦, 邱冀, 岳莹雪, 史佳鹭, MASUMUZZAMAN MD, 冷友斌, 李春, 霍贵成, 李柏良. 长双歧杆菌特性及应用研究进展[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(12): 430-438.
- GUAN JQ, QIU J, YUE YX, SHI JL, MASUMUZZAMAN MD, LENG YB, LI C, HUO GC, LI BL. Characteristics and application of *Bifidobacterium longum*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(12): 430-438 (in Chinese).
- [34] TURRONI F, PEANO C, PASS DA, FORONI E, SEVERGNINI M, CLAEISSON MJ, KERR C, HOURIHANE J, MURRAY D, FULIGNI F, GUEIMONDE M, MARGOLLES A, de BELLIS G, O'TOOLE PW, van SINDEREN D, MARCHESI JR, VENTURA M. Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e36957.
- [35] SPANKIE TJ, HAYWOOD AL, DOTTORINI T, BARROW PA, HIRST JD. Interaction of the maturation protein of the bacteriophage MS2 and the sex pilus of the *Escherichia coli* F plasmid[J]. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 2020, 101: 107723.
- [36] 陈峻. 细菌遗传中的性因子: F 质粒[J]. *邵阳高等专科学校学报*, 1989(2): 158-160.
- CHEN J. F plasmid, a sex factor in bacterial inheritance[J]. *Journal of Shaoyang College*, 1989(2): 158-160 (in Chinese).