



李刚,董雨豪,黄昊,等.沙门菌噬菌体 YT90 的分离鉴定及生物学特性分析[J].南京农业大学学报,2024,47(2):306-314.

LI Gang, DONG Yuhao, HUANG Hao, et al. Isolation, identification and biological characteristics of *Salmonella* phage YT90 [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2024, 47(2): 306-314.

沙门菌噬菌体 YT90 的分离鉴定及生物学特性分析

李刚,董雨豪,黄昊,孙千惠,刘永杰*

(南京农业大学动物医学院,江苏南京 210095)

摘要: [目的] 本文旨在分离针对肠炎沙门菌的烈性噬菌体并研究其生物学特性。 [方法] 从山东烟台某鸭场采集 58 份粪便样品,以鸭源肠炎沙门菌 sdc-11 为宿主分离噬菌体,并对噬菌体分离株进行形态学观察,对其温度和 pH 值稳定性、感染复数(MOI)、一步生长曲线进行测定和分析,测试其对 71 株不同血清型沙门菌的裂解谱,以及对沙门菌 sdc-11 生物被膜形成的抑制和对成熟生物被膜的清除作用,最后进行基因组测序分析。 [结果] 分离获得 1 株长尾噬菌体,命名为 YT90。该噬菌体在 30~60 °C 和 pH 值 4~10 的条件下,均表现出较好的增殖能力,最佳 MOI 值为 10^{-5} ,潜伏期 10 min,裂解期 90 min,裂解量为每细胞 278 PFU;可裂解 66.7% (14/21) 肠炎沙门菌、66.7% (28/42) 鼠伤寒沙门菌和 75.0% (3/4) 鸡白痢沙门菌;在 96 孔细胞板上, YT90 具有抑制沙门菌 sdc-11 生物被膜形成的潜力,并能有效清除成熟生物被膜;全基因组测序发现, YT90 的基因组全长 121 240 bp,不含已知的毒力因子和耐药相关基因,不编码整合酶;基于末端酶大亚基构建的进化树分析表明, YT90 与沙门菌噬菌体 GRNsp50 关系最近,属于根西病毒亚科 (Guernseyvirinae) 新泽西病毒属 (*Jerseyvirus*)。 [结论] 从鸭场粪便样品中分离获得 1 株烈性噬菌体 YT90,可裂解多种血清型沙门菌,耐受性强、潜伏期短、裂解量大,在防治沙门菌感染方面有较好的临床应用潜力。

关键词: 沙门菌;噬菌体;生物被膜;生物学特性

中图分类号: S852.6

文献标志码: A

文章编号: 1000-2030(2024)02-0306-09

Isolation, identification and biological characteristics of *Salmonella* phage YT90

LI Gang, DONG Yuhao, HUANG Hao, SUN Qianhui, LIU Yongjie*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: [Objectives] The aim of this study was to isolate a bacteriophage with a broad host range targeting multidrug-resistant *Salmonella* Enteritidis and to investigate its biological characteristics. [Methods] Fifty-eight fecal samples were collected from a duck farm in Yantai, Shandong Province, and used for isolation of bacteriophages with *S. Enteritidis* of duck origin, sdc-11, as the host. Morphological feature, temperature and pH stability, optimal multiplicity of infection (MOI) and one-step growth curve of the bacteriophage were analyzed. Its lysis spectrum against 71 *Salmonella* strains of different serotypes, and its effects on the inhibition of biofilm formation and the removal of mature biofilm of *Salmonella* sdc-11 were tested. Also, the genome sequencing analysis was performed. [Results] A phage with a long tail was isolated and named YT90. The phage showed a good proliferation ability in the temperature range of 30 to 60 °C and within the pH value range of 4 to 10, the optimal MOI was 10^{-5} , the latent period was 10 min, the lysis period was 90 min, and the burst size was 278 PFU per infected cell. And 66.7% (14/21) of *S. Enteritidis*, 66.7% (28/42) of *S. Typhimurium* and 75.0% (3/4) of *S. Pullorum* could be lysed by YT90. In 96-well cell plates, the YT90 showed considerable potential in preventing the biofilm formation and clearing the mature biofilm of *Salmonella* sdc-11. Whole genome analysis showed that the total length of the YT90 genome was 121 240 bp, which did not contain the known virulence factors and drug-resistance related genes, and did not encode integrase. The phylogenetic tree based on the terminase family protein showed that YT90 was closely related to the *Salmonella* phage GRNsp50 and belonged to the genus *Jerseyvirus* in the Guernseyvirinae subfamily. [Conclusions] A lytic phage YT90 was isolated from fecal samples of duck, which could lyse different serotypes of *Salmonella* with strong tolerance, short latent period and large burst size. This phage exhibits excellent application potential in the prevention and treatment of *Salmonella* infection.

Keywords: *Salmonella*; phage; biofilm; biological characteristics

收稿日期: 2023-03-06

基金项目: 江苏省重点研发计划(现代农业)项目(BE2022329); 国家自然科学基金项目(32102709); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(22)3027]

* 通信作者: 刘永杰, 教授, 博导, 主要从事兽医微生物学研究, E-mail: liuyongjie@njau.edu.cn.

沙门菌病是由沙门菌属 (*Salmonella*) 细菌感染引起的人畜共患的细菌性疾病,导致严重的胃肠炎和腹泻。沙门菌属分为肠道沙门菌 (*S. enterica*)、邦戈尔沙门菌 (*S. bongori*) 和地下沙门菌 (*S. subterranea*) 3 个种,血清型共有 2 600 种以上,其中肠道沙门菌肠道亚种肠炎血清型 (*S. enterica* ssp. *enterica* serovar *Enteritidis*),简称肠炎沙门菌 (*Salmonella* *Enteritidis*),最为常见^[1]。在禽生产中,沙门菌既可水平传播也可垂直传播,水平传播主要通过受污染的饲料、粪便、水和设备等传播,而垂直传播主要是因为种禽带菌,禽蛋在种禽体内形成过程中可能被沙门菌所感染^[2]。抗生素是目前治疗沙门菌病最常见的治疗方法,然而随着抗生素的大量使用,多重耐药的沙门菌菌株在临床中越来越多^[3]。因此,迫切需要寻找新的抗菌手段来补充或替代抗生素。

近年来研究发现,噬菌体是最有希望控制沙门菌病的抗生素替代品之一。与抗生素不同,噬菌体是专门感染细菌的一类病毒,有严格的宿主特异性,且安全性较好。在有效性方面,噬菌体可以在相对较短的时间内进行自我复制,只要有敏感菌存在,就能持续保持活性^[4]。因此,开发高效广谱的噬菌体制剂已成为临床上控制多重耐药沙门菌感染的重要途径之一。本研究以鸭源肠炎沙门菌为宿主菌,拟从鸭场粪便样品中分离沙门菌裂解性噬菌体,测定其生物学特性和裂解谱,为开发治疗沙门菌感染的噬菌体制剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 粪样

2021 年在山东烟台某养鸭场采集 58 份粪便样品,冰上保存并带回实验室,用于噬菌体分离。

1.2 菌株

用于噬菌体分离的宿主菌肠炎沙门菌 sdc-11,分离自山东菏泽某养鸭场的耐多药肠炎沙门菌。用于噬菌体裂解谱分析的 71 株不同血清型沙门菌,包括 21 株肠炎沙门菌 (*Salmonella* *Enteritidis*)、42 株鼠伤寒沙门菌 (*Salmonella* *Typhimurium*)、4 株鸡白痢沙门菌 (*Salmonella* *Pullorum*)、1 株甲型副伤寒沙门菌 (*Salmonella* *Paratyphi* A)、1 株坦斯利 (*Salmonella* *Tansley*)、1 株科特布斯沙门菌 (*Salmonella* *Kottbus*) 和 1 株汤普逊沙门菌 (*Salmonella* *Thompson*),均为南京农业大学兽医微生物学实验室分离鉴定并保存,具体信息见表 1。

表 1 用于宿主谱测定的沙门菌来源及血清型

Table 1 Sources and serotypes of the *Salmonella* strains used for host profiling

菌株(编号) Strain(No.)	动物来源/血清型 Animal origin/ Serotype	菌株数 Number of strains	菌株(编号) Strain(No)	动物来源/血清型 Animal origin/ Serotype	菌株数 Number of strains
sdQd(2,3,4)	鸭/肠炎 Duck/Enteritidis	3	ZWSA (079,080,081,138,185,281)	猪/鼠伤寒 Pig/Typhimurium	6
sdQ(11,13,36,38,42,43,44,45)	鸭/肠炎 Duck/Enteritidis	8	ZWSA282	鸭/鼠伤寒 Duck/Typhimurium	1
S-(06,07,12,14,15)	鸡/肠炎 Chicken/Enteritidis	5	CVCC542	参考株/鼠伤寒 Standard strain/Typhimurium	1
S-(16,17,19,43,45)	鸭/肠炎 Duck/Enteritidis	5	S-(21,28,29,40)	鸡/鸡白痢 Chicken/Pullorum	4
sdQ(14,15,37)	鸭/鼠伤寒 Duck/Typhimurium	3	S-31	鸡/甲型副伤寒 Chicken/Paratyphi A	1
S-(02,03,04,05,08,09,S-10,13, 23,25,26,35,36,37,38,39)	鸡/鼠伤寒 Chicken/Typhimurium	16	S-01	番鸭/坦斯利 Muscovy duck/Tansley	1
S-(18,22,27,32,34)	鹅/鼠伤寒 Goose/Typhimurium	5	S-11	番鸭/科特布斯 Muscovy duck/Kottbus	1
S-(33,42,44)	鸭/鼠伤寒 Duck/Typhimurium	3	S-24	鸡/汤普逊 Chicken/Thompson	1
JS-S-(1,2,8,9,12,16,23)	鹅/鼠伤寒 Goose/Typhimurium	7			

1.3 噬菌体的分离鉴定和纯化保存

样品的采集与处理:使用粪便采集管采集粪便样品。在实验室用 SM 缓冲液将粪便样品充分混匀,静置 4 h 后将上层液体 5 000 g 离心 10 min,收集上清液,用 0.22 μm 的滤器过滤,采用双层平板法分离噬菌体^[5]。取上述过滤液 100 μL 与处于对数期宿主菌液 100 μL 混合,将混合液加入至 55 °C 液体状态的 LB

半固体培养基中,充分混匀后倒入 LB 固体培养基。凝固后 37 °C 培养 6~8 h,观察有无噬菌斑。从有噬菌斑的培养基上挑取单个噬菌斑进一步纯化培养 4~5 次,直到噬菌斑形态大小一致,表明获得纯化的噬菌体。

在处于对数期的菌液中,按 1:100 的体积比加入纯化好的噬菌体培养液,放入 37 °C、180 r·min⁻¹ 振荡培养 6~8 h。培养物用 0.22 μm 的滤器过滤,收集滤液,分装后 4 °C 保存或将噬菌体纯培养液与 50% 的甘油等体积混匀后,-80 °C 保存。

1.4 噬菌体形态观察

将 100 μL 新鲜宿主菌液均匀涂布在 LB 固体培养基上,待干燥后,取 5~10 μL 噬菌体纯培养液滴在琼脂上,37 °C 静置培养过夜。用 SM 缓冲液将噬菌体重悬,用磷钨酸溶液(PTA)染色,利用 HT7800 透射电子显微镜(HITACHI)进行观察并拍照。

1.5 噬菌体温度稳定性测定

将 5 mL 效价为 1×10⁷ PFU·mL⁻¹ 的噬菌体放置于 30~60 °C 水浴锅中作用 100 min。每隔 20 min 取出 100 μL 进行 10 倍梯度稀释,取合适的梯度采用双层平板法测定效价。每次试验设 3 个平行样,试验重复 3 次。

1.6 噬菌体 pH 值稳定性测定

取 11 份 100 μL 噬菌体纯化液,用 pH 值 2~12 的无菌 SM 缓冲液按 10 倍梯度稀释至效价为 1×10⁷ PFU·mL⁻¹。在 37 °C 水浴锅中将稀释液孵育 1 h 后立即测定噬菌体效价。每次试验设 3 个平行样,试验重复 3 次。

1.7 噬菌体的感染复数(MOI)测定

将宿主菌新鲜培养至对数期,分别按照 MOI 值为 10⁻⁹~10⁰ (10 倍梯度稀释)加入噬菌体 500 μL 混合,混合液置 37 °C 摇床培养 4 h。将培养后的溶液 10 000 g 离心 1 min,收集上清液,10 倍梯度稀释后利用双层平板法测定效价,确定最佳 MOI,即子代噬菌体释放量最多的噬菌体与宿主菌比例。试验每次设 3 个平行样,重复 3 次。

1.8 噬菌体一步生长曲线测定

将噬菌体以最佳 MOI 比例加入处于对数期的宿主菌中(2×10⁸ CFU·mL⁻¹),在 37 °C 水浴锅中孵育 10 min。将溶液 10 000 g 离心 1 min,弃上清液,用 10 mL 新鲜 LB 液体培养基重悬沉淀,放置于 37 °C 摇床 180 r·min⁻¹ 培养。每 10 min 取出 300 μL,经 0.22 μm 一次性滤器过滤后再进行 10 倍梯度稀释,利用双层平板法测定噬菌体效价。每次试验设 3 个平行样,试验重复 3 次。

1.9 噬菌体的宿主谱测定

宿主谱测定采用斑点法^[6],将所有应用于宿主谱测定的菌株培养至对数期,取 200 μL 宿主菌液均匀涂至 LB 固体培养基上,菌液干燥后取 3.5 μL 噬菌体纯培养液滴在平板上,同时以 SM 缓冲液作为阴性对照,然后 37 °C 恒温培养箱培养 8~10 h。通过观察噬菌斑有无判断该噬菌体能否裂解该细菌。

1.10 噬菌体对沙门菌 sdc-11 生物被膜形成的抑制作用

将 sdc-11 按 1:100 体积比接种于 5 mL LB 培养基中,37 °C 摇床 180 r·min⁻¹ 振荡培养 4 h,调整浓度为 5×10⁶ PFU·mL⁻¹;调整噬菌体浓度为 5×10⁻²~5×10⁸ PFU·mL⁻¹ (10 倍梯度稀释),将菌和各梯度噬菌体各取 300 μL 混合均匀,使 MOI 范围为 10⁻⁷~10²;在 96 孔板中每孔加 160 μL LB 液体培养基,每孔加菌和各梯度噬菌体混和液 40 μL,每个 MOI 设置 12 个重复孔;阳性对照设置同试验组但不加噬菌体,阴性对照组只加 200 μL LB 液体培养基。37 °C 静置培养 48 h。用 PBS 缓冲液清洗 3 次,除去游离细菌,利用结晶紫染色法检测各组生物被膜。操作步骤如下:利用甲醇固定 15 min,弃甲醇后将 96 孔板放通风橱干燥 15 min,用结晶紫染色,静置 10 min。去除结晶紫染料,用蒸馏水清洗至阴性对照孔为无色,室温下干燥 30 min,每孔加入 200 μL 95% 乙醇,静置 25 min。利用酶标仪检测 595 nm 波长的吸光值(A₅₉₅)。每次试验设 12 个平行样,试验重复 3 次。

1.11 生物被膜的清除能力测定

将 sdc-11 按照 1:100 的体积比接种于新鲜 LB 液体培养基中,37 °C 摇床 180 r·min⁻¹ 培养 4 h,调整 D₆₀₀ 值为 1.0,按照 1:1 000 的比例稀释,向 96 孔板每孔加入 200 μL,37 °C 静置培养 48 h。将噬菌体溶液

稀释至效价为 1.0×10^9 PFU \cdot mL $^{-1}$ 后在每孔内加入 200 μ L;并设置阴性对照组,每孔加入 200 μ L SM 缓冲液,37 $^{\circ}$ C 静置培养。加入噬菌体后分别培养 12、24 和 36 h 取出,用 PBS 缓冲液清洗 3 次以除去游离细菌。参照 1.10 节方法,采用结晶紫染色对 sdc-11 形成的生物被膜进行测定。

为测定噬菌体对生物被膜内细菌的影响,将 96 孔板更换为 6 孔板,每孔加入 2 mL 菌液。37 $^{\circ}$ C 静置培养 48 h 到达成熟期,用灭菌 PBS 清洗 3 次,除去游离细菌。将噬菌体效价调整至 1.0×10^9 PFU \cdot mL $^{-1}$,试验组每孔加入 2 mL,对照组加相同体积的 SM 缓冲液。分别在加入噬菌体后的 12、24 和 36 h 测定活菌数。用 PBS 缓冲液清洗 3 次,刮取生物被膜,加入 2 mL PBS 缓冲液,混匀,10 倍梯度稀释后取合适梯度 10 μ L 滴在麦康凯培养基上,使其倾斜向下流淌,37 $^{\circ}$ C 静置培养 24 h 后进行菌落计数。每次试验设 3 个平行样,试验重复 3 次。

为方便电镜观察到噬菌体对成熟生物被膜的清除作用,在培养生物被膜时在 6 孔板中提前加入灭菌的微小载玻片,使 sdc-11 能够在载玻片上形成生物被膜。其余与上述前面步骤相同。将加入噬菌体培养 36 h 的载玻片进行固定,利用 SU8100 扫描电子显微镜(HITACHI)观察生物被膜形成情况。

1.12 噬菌体基因组提取和测序分析

根据 λ 噬菌体基因组 DNA 提取试剂盒(艾比根,AB1141)操作说明提取噬菌体基因组,经分析合格后送诺禾致源测序公司测序。使用 GeneMarkS(v.4.17)(<http://topaz.gatech.edu/GeneMark/>)软件对基因组进行编码基因预测。通过 tRNAscan-SE 软件(v.1.3.1)对 tRNA 进行预测。在抗生素抗性基因数据库([hops://card.mcmaster.ca/](https://card.mcmaster.ca/))和毒力因子数据库(<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>)中检测噬菌体基因组中是否存在耐药基因和毒力基因。利用 NCBI(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)比较分析噬菌体具有保守性和进化意义的末端酶大亚基氨基酸序列,用 MEGA-7 软件构建邻接系统发育进化树。

1.13 数据的统计与分析

采用 GraphPad Prism 5 软件进行数据处理,采用 *t* 测验进行差异显著性分析。每个试验重复 3 次,结果以平均值 \pm 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 噬菌体的分离纯化

对粪便样品进行处理,以沙门菌 sdc-11 作为宿主菌分离噬菌体,利用双层平板法在 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养 6~8 h,在平板上观察噬菌斑。在初期分离平板上挑选形状较大而透明的噬菌斑,通过 5 次纯化培养,至平板上的噬菌斑形态大小基本一致,分离获得 1 株噬菌体,命名为 YT90。噬菌斑形态如图 1 所示。噬菌斑表现出较高的透明度,规整的圆形。在透射电镜下观察, YT90 头部直径(57.5 ± 0.29) nm,尾长(222 ± 0.58) nm。

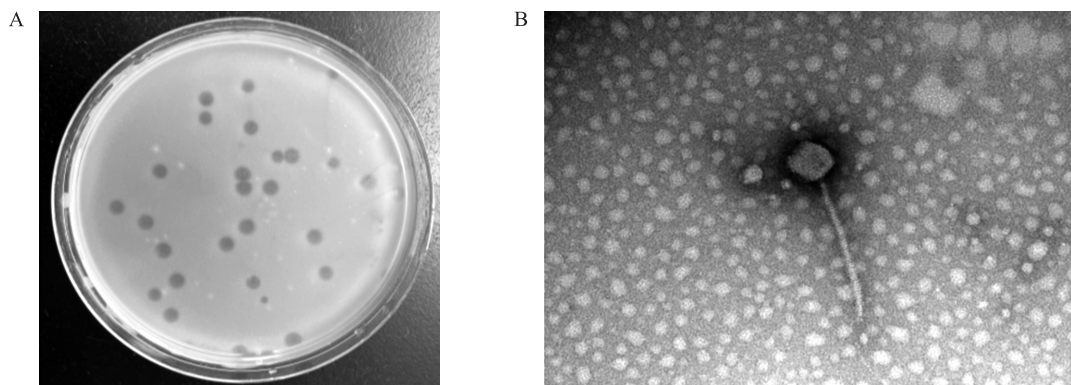


图 1 噬菌体 YT90 的鉴定

Fig. 1 Identification of phage YT90

A. 在沙门菌 sdc-11 菌苔上生长的 YT90 噬菌斑; B. 噬菌体 YT90 电镜下形态。

A. Plaques of YT90 on the lawn of *Salmonella* sdc-11; B. Morphology of phage YT90 under electron microscope.

2.2 噬菌体 YT90 的生物学特性

如图 2-A 所示, YT90 在 30 $^{\circ}$ C 稳定性较好, 100 min 内存活率维持在 96%~100%; 40 $^{\circ}$ C 存活率维持在

87.7%~100%;50和60℃条件下总体存活率前60min保持在91.58%以上,60min后轻微下降,100min时存活率仍然分别为89.30%和87.74%。如图2-B所示:在pH值为4~10的条件下,YT90孵育1h的存活率都在80%以上,pH值为4时YT90存活率是94.75%,pH值为10时YT90存活率是95.98%;然而,处于比较极端的酸碱环境下,例如pH值为2、3和12时,经1h孵育后YT90的存活率仅为1%左右。如图2-C所示:当MOI为 10^{-5} 时YT90效价最高,达到 1.23×10^{11} PFU·mL $^{-1}$,由此可以得出YT90的最佳MOI为 10^{-5} 。通过一步生长曲线,可以将YT90增殖周期划分为潜伏期、裂解期、稳定期3个阶段,从图2-D可知,YT90潜伏期为10min,随后进入裂解期,100min后进入稳定期,裂解量是每细胞278PFU(图2-D)。

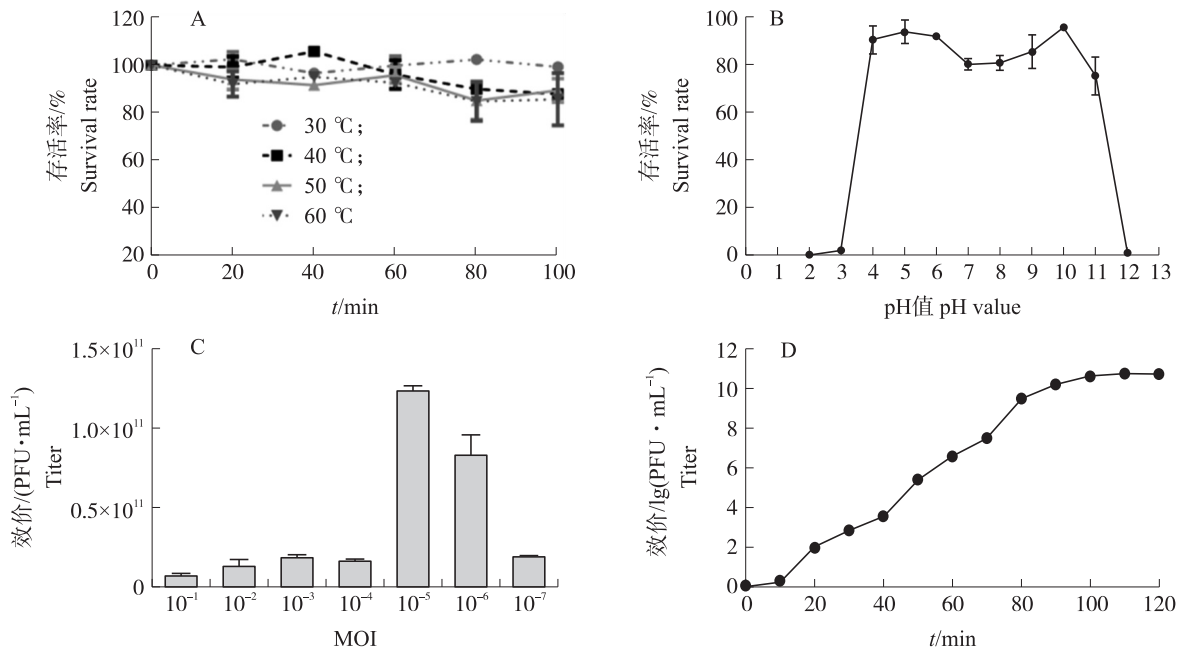


图2 YT90生物学特性

Fig. 2 Biological characteristics of YT90

A. 温度稳定性; B. pH 值稳定性; C. 最佳感染比; D. 一步生长曲线。

A. Temperature stability; B. pH value stability; C. Optimal multiplicity of infection; D. One step growth curve.

MOI: 感染复数 Multiplicity of infection.

2.3 噬菌体 YT90 的宿主谱分析

如图3所示:对于本课题组保存的71株沙门菌,YT90的总体裂解率达67.6%,可裂解66.7%(14/21)肠炎沙门菌、66.7%(28/42)鼠伤寒沙门菌和75.0%(3/4)鸡白痢沙门菌。值得注意的是,YT90也能裂解汤普逊沙门菌、甲型副伤寒沙门菌和科特布斯沙门菌。

2.4 YT90 对生物被膜形成的抑制作用

采用96孔板结晶紫染色试验,检测沙门菌sdc-11的体外生物被膜形成能力。结果显示,体外培养48h,sdc-11的生物被膜形成能力最佳(图4-A)。因此,以48h这一时间点来评估噬菌体YT90对细菌生物被膜形成能力的影响。结果如图4-B所示,当MOI值为 10^{-3} ~ 10^2 时,噬菌体YT90能显著抑制沙门菌sdc-11生物被膜的形成;当MOI小于 10^{-3} 时,YT90无法抑制生物被膜的形成。

2.5 YT90 对沙门菌 sdc-11 成熟生物被膜的清除作用

如图5-A所示,YT90对sdc-11的成熟生物被膜具有较强的清除作用,作用12、24、36h对生物被膜清除结果均呈现显著性差异($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$),特别是作用24h的效果最佳。图5-B显示,YT90处理12~36h,对生物被膜内的沙门菌具有显著杀灭作用,明显减少了sdc-11成熟生物被膜中沙门菌的数量($P < 0.001$),12h后杀菌效果最明显。扫描电镜观察显示:未加噬菌体的对照组细菌表面有丰富的胞外基质(EPS)包裹,表明sdc-11具有较强的生物被膜形成能力(图5-C);而培养48h形成的成熟生物被膜,加入噬菌体YT9036h后,细菌表面EPS明显减少(图5-D),说明YT90对沙门菌成熟生物被膜具有较强的清除作用。

2.6 YT90 全基因组测序结果分析

测序结果显示:YT90基因组是双链DNA,全长121240bp,GC含量是53.06%。预测有140个开放阅

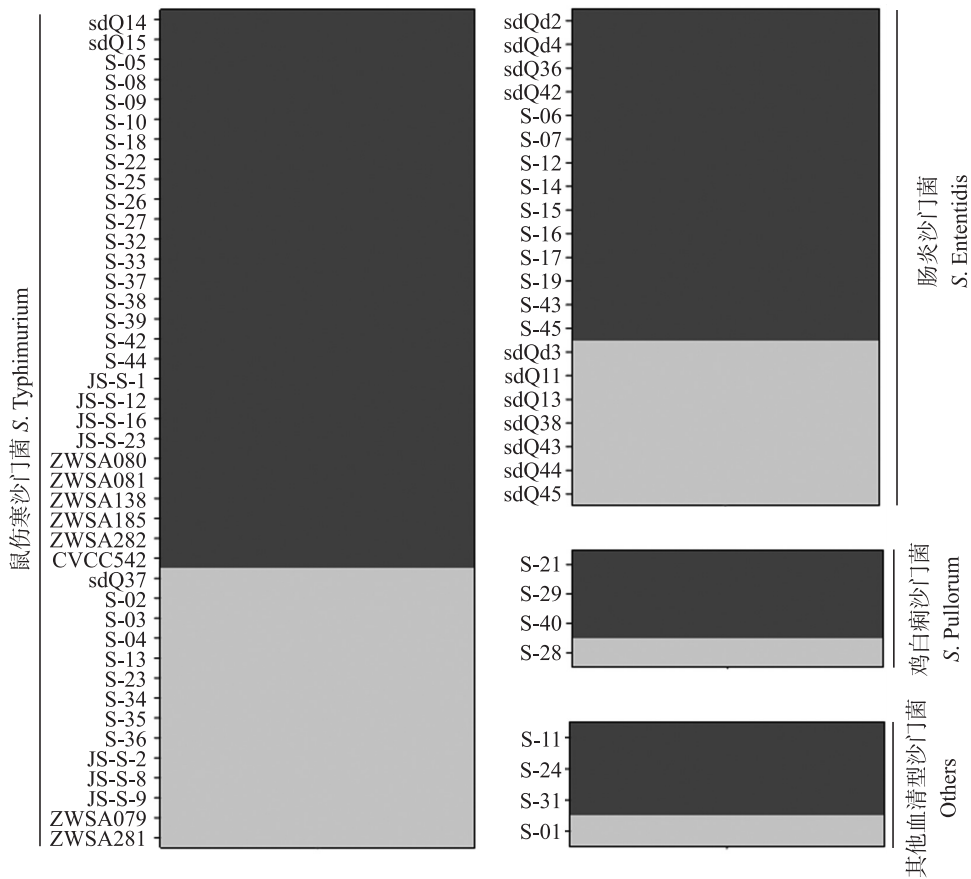


图 3 噬菌体 YT90 对 71 株沙门菌的裂解谱分析

Fig. 3 Lysis spectrum of 71 *Salmonella* strains by phage YT90

黑方块表示可被 YT90 裂解的菌株,灰色方块表示不能裂解的菌株。

The black squares represent the *Salmonella* strains that can be lysed by YT90, while the gray squares represent the *Salmonella* strains that do not be lysed.

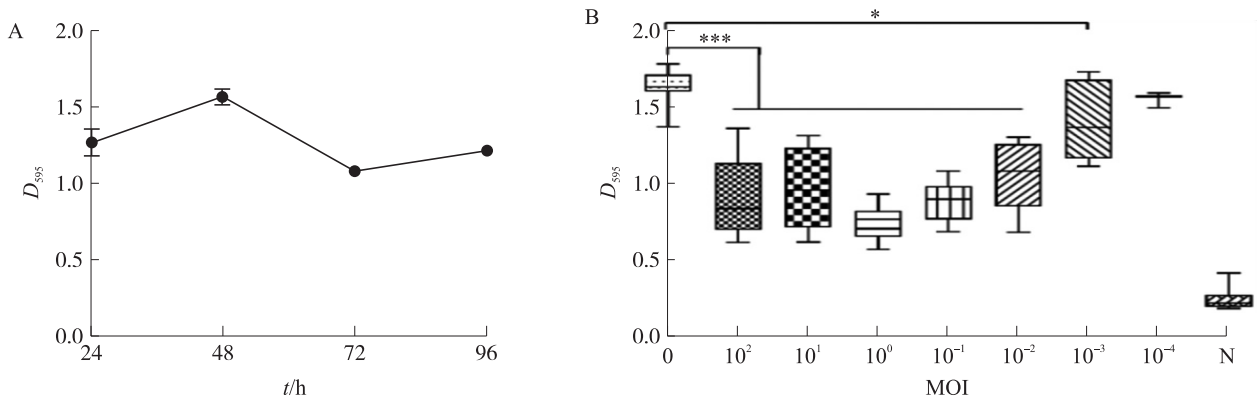


图 4 沙门菌 sdc-11 生物被膜形成(A)及噬菌体 YT90 对其的影响(B)

Fig. 4 Biofilm formation of *Salmonella* sdc-11(A) and effect of phage YT90 on its formation ability(B)

N 为不加细菌的空白对照。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$,下同。

N is the blank control without bacteria. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. The same as follows.

读框(ORF),其中有 10 个 ORF 编码的功能蛋白已注释(表 2)。经 tRNAscan-SE v2.0 软件预测, YT90 全基因组中含 1 个 tRNA 基因。通过抗生素抗性基因数据库和毒力因子数据库比对,未在基因组中发现毒力基因和耐药基因。此外,未鉴定出假定整合酶基因,表明 YT90 是裂解性噬菌体。利用 MEGA-7 基于末端酶大亚基的氨基酸序列构建系统发育进化树,如图 6 所示, YT90 与沙门菌噬菌体 GRNsp50 亲缘关系最近,属于根西病毒亚科(Guernseyvirinae)新泽西病毒属(*Jerseyvirus*)。

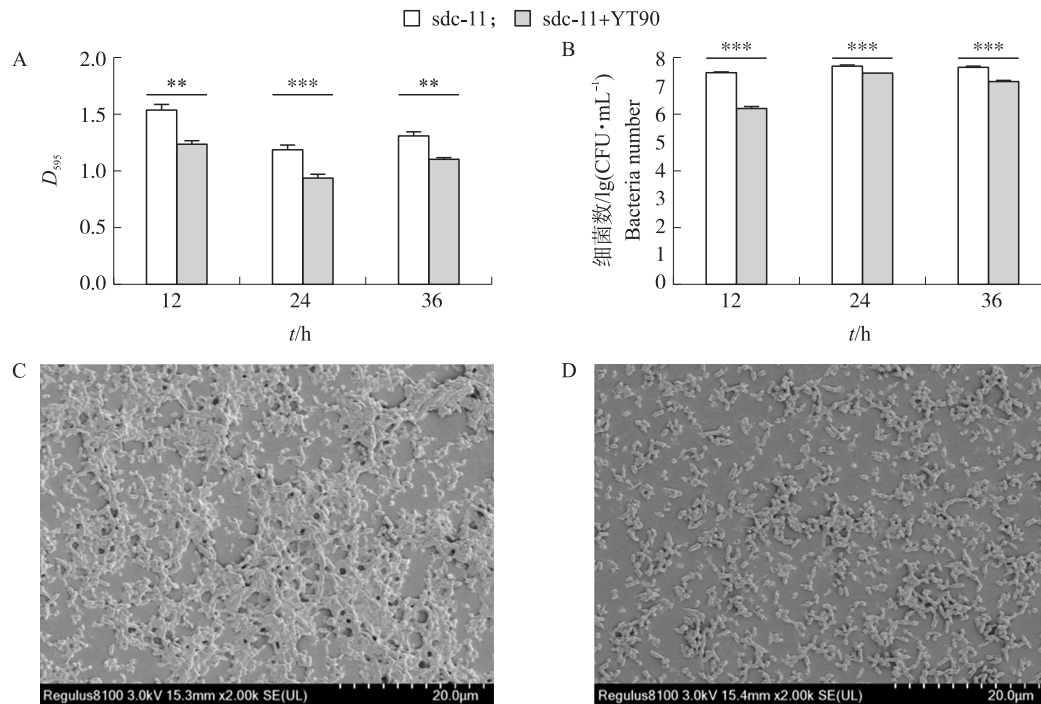


图 5 YT90 对 sdc-11 成熟生物被膜的清除作用

Fig. 5 The clearance effect of YT90 on the mature biofilm of sdc-11

A. YT90 对 sdc-11 生物被膜的清除作用; B. YT90 对生物被膜内 sdc-11 活菌的杀灭作用; C. 扫描电镜观察未经噬菌体处理的 sdc-11 生物被膜; D. 扫描电镜观察 YT90 对 sdc-11 生物被膜的清除 (36 h)。** $P < 0.01$ 。

A. The clearance effect of YT90 on sdc-11 biofilm; B. Removal of live bacteria in sdc-11 biofilm by YT90; C. The biofilm of sdc-11 without YT90 treatment observed by scanning electron microscope; D. The sdc-11 biofilm cleaned by YT90 at 36 h observed by scanning electron microscopy. ** $P < 0.01$.

表 2 噬菌体 YT90 基因组中部分 ORF 编码的功能蛋白

Table 2 Functional proteins encoded by partial ORF in the phage YT90 genome

起始位点 Initiation site	终止位点 Termination site	长度(aa) Length(amino acid)	注释功能 Annotation feature
7 211	8 284	357	重组相关蛋白 RdgC Recombination-associated protein RdgC
41 702	41 322	126	头部装饰蛋白 Head decoration protein
3 233	5 503	756	DNA 聚合酶 DNA polymerase
11 423	9 417	668	噬菌体尾蛋白 Phage tail protein
29 756	28 713	347	次要衣壳蛋白 Minor capsid protein
33 362	32 091	423	末端酶大亚基 Terminase family protein
36 495	36 007	162	糖苷水解酶家族蛋白 Glycoside hydrolase family protein
3 132	958	724	分子伴侣 HtpG Molecular chaperone HtpG
2 980	404	858	GTP 结合蛋白 GTP-binding protein
1 035	961	24	转运 RNA tRNA

3 讨论

噬菌体因具有易获得、无药残、安全性好、疗效彻底等优点^[7],在临床治疗上具有潜在的优势和价值。本研究从山东烟台某养鸭场粪便中成功分离和鉴定出 1 株沙门菌噬菌体,命名为 YT90。YT90 噬菌斑大且透明,基因组不含整合酶基因,表明其是烈性噬菌体。YT90 基因组中有 1 个编码 tRNA 序列。研究表明,噬菌体基因组中的 tRNA 能弥补宿主菌中缺少的 tRNA,使得噬菌体可以提高翻译裂解酶等蛋白的效率^[8];拥有 tRNA 基因的噬菌体,宿主范围较广,而不是简单地感染一个特定的宿主^[9]。本研究噬菌体裂解谱分析试验表明, YT90 能裂解肠炎、鼠伤寒、甲型副伤寒和汤普逊等多种血清型的沙门菌,也证实了这一结论。

用于生物防治的烈性噬菌体必须遗传背景清楚、杀菌能力强且不携带耐药和毒力基因,否则可能造成耐药和毒力基因在细菌间水平转移^[10]。噬菌体 YT90 未发现携带任何已知的溶源性相关基因,如编码整

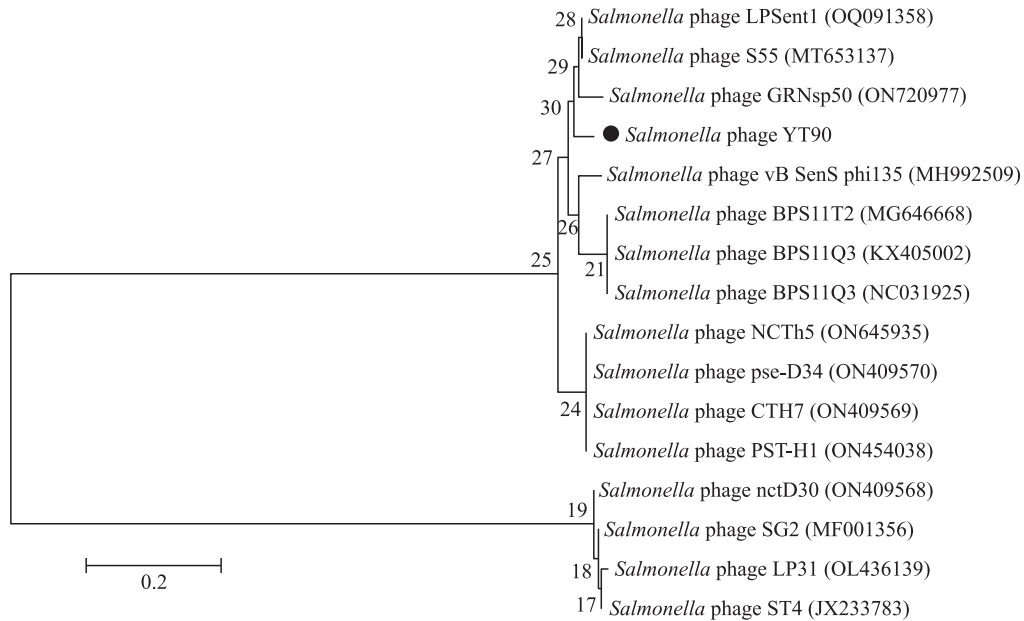


图 6 基于噬菌体 YT90 末端酶大亚基构建的系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree based on the terminase family protein of phage YT90

合酶或阻遏蛋白等的基因,不含毒力基因和抗生素抗性基因,表明该噬菌体在实际应用中具有较好的生物安全性。

YT90 最佳 MOI 值是 10^{-5} ,表明较低浓度的 YT90 就能达到很好的杀菌效果。MOI 是噬菌体重要的投入与产出量效关系指标,MOI 值较小会降低噬菌体应用成本,有利于噬菌体产品的大规模生产和应用^[11]。一步生长曲线结果表明, YT90 的潜伏期是 10 min,暴发量是每细胞 278 PFU,表明 YT90 在短时间内可以产生大量的子代噬菌体,其与沙门菌噬菌体 S55 和 D10 潜伏期相同但暴发量高于 S55 (每细胞 40 PFU)^[12]和 D10 (每细胞 163 PFU)^[13]。YT90 在 pH 值 4~11 和 30~60 °C 条件下的存活率(>80%)比较理想,表明 YT90 对酸性和碱性环境耐受能力均较强,热稳定性好,能在严苛的环境中生存,在环境消毒和体内治疗中具有较大的应用潜力。本研究发现,尽管噬菌体 YT90 宿主谱较宽,但仍有部分沙门菌不能被裂解。有研究表明,不同噬菌体组合不仅可拓宽裂解谱,细菌产生噬菌体不敏感突变体(BIM)的频率也低于单独暴露于某一种噬菌体^[14]。因此,后续将考虑多种噬菌体联用,以扩大裂解谱。

生物被膜是沙门菌的重要环境储存库,易在家禽养殖业中常见的设备元件(如塑料和不锈钢)表面形成^[15]。有研究表明,在实验室条件下,用 10^9 PFU·mL⁻¹的噬菌体处理不锈钢 7 d,可减少沙门菌在不锈钢表面的附着;经噬菌体处理的 96 孔微孔板对生物膜形成的抑制率可达 90%^[16]。沙门菌噬菌体“鸡尾酒”组合处理显著减少了肠炎沙门菌在 96 孔板(32%~69%)和不锈钢表面(52%~98%)上形成的生物被膜^[17]。本研究显示,噬菌体 YT90 能够显著抑制沙门菌 sdc-11 生物被膜的形成,抑制效果与 MOI 有关;另外,对于在 96 孔板上形成的成熟生物被膜, YT90 处理后也能显著清除生物被膜,且其中的沙门菌数量也显著下降。在本试验中,生物被膜清除的最佳时间是 24 h,而对被膜内细菌裂解效果最佳时间是 12 h。这可能是由于噬菌体感染受到生物膜的防御机制影响,如抑制噬菌体的吸附、渗透和通过生物膜结构扩散到临近细菌^[18];另一个原因可能是噬菌体抗性细菌的增殖,它们与噬菌体敏感细菌共存^[19]。未来可考虑将噬菌体与抗生素或者多种噬菌体联用共同清除生物被膜。

综上,本文分离到一株可裂解多种血清型沙门菌的烈性噬菌体,安全性好, pH 稳定性高,耐高温,潜伏期短,暴发量大,最佳 MOI 低,能够抑制肠炎沙门菌生物被膜的形成,能清除成熟的生物被膜及胞外基质和被膜中的沙门菌,具有较大的临床应用潜力。

参考文献 References:

- [1] Fàbrega A, Vila J. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2013, 26(2): 308-341.
- [2] de Reu K, Grijspeerd K, Messens W, et al. Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria,

- including *Salmonella* Enteritidis[J]. International Journal of Food Microbiology,2006,112(3):253–260.
- [3] Threlfall E J. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections [J]. FEMS Microbiology Reviews,2002,26(2):141–148.
- [4] Huang C X, Shi J C, Ma W J, et al. Isolation, characterization, and application of a novel specific *Salmonella* bacteriophage in different food matrices[J]. Food Research International,2018,111:631–641.
- [5] Rogovski P, da Silva R, Cadamuro R D, et al. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis control in poultry litter mediated by lytic bacteriophage isolated from swine manure[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health,2021,18(16):8862.
- [6] Liu J. Isolation and characterization of bacteriophages against virulent *Aeromonas hydrophila*[J]. BioMed Central Microbiology,2020(1):141.
- [7] 钱且奇,陈圳,徐静雯,等. 一株溶藻弧菌噬菌体 HH109 的生物学特征[J]. 畜牧与兽医,2022,54(12):93–97.
- Qian Q Q, Chen Z, Xu J W, et al. Biological characteristics of a bacteriophage HH109 lysing *Vibrio alginolyticus*[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine,2022,54(12):93–97(in Chinese with English abstract).
- [8] Bailly-Bechet M, Vergassola M, Rocha E. Causes for the intriguing presence of tRNAs in phages [J]. Genome Research,2007,17(10):1486–1495.
- [9] Delesalle V A, Tanke N T, Vill A C, et al. Testing hypotheses for the presence of tRNA genes in mycobacteriophage genomes[J]. Bacteriophage,2016,6(3):e1219441.
- [10] Mahony J, McAuliffe O, Ross R P, et al. Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens[J]. Current Opinion in Biotechnology,2011,22(2):157–163.
- [11] Abedon S T. Phage therapy dosing: the problem(s) with multiplicity of infection(MOI)[J]. Bacteriophage,2016,6(3):e1220348.
- [12] Ge H J, Xu Y P, Hu M Z, et al. Isolation, characterization, and application in poultry products of a *Salmonella*-specific bacteriophage, S55[J]. Journal of Food Protection,2021,84(7):1202–1212.
- [13] Li Z W, Li W N, Ma W J, et al. Characterization and application of a lytic phage D10 against multidrug-resistant *Salmonella*[J]. Viruses,2021,13(8):1626.
- [14] Liu S, Hon K, Bouras G S, et al. *Staphylococcus aureus* APTC-C-SA01: a novel bacteriophage cocktail targeting and MRSA biofilms [J]. International Journal of Molecular Sciences,2022,23:6116.
- [15] Gutiérrez D, Rodríguez-Rubio L, Martínez B, et al. Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry[J]. Frontiers in Microbiology,2016,7:825.
- [16] Gong C, Jiang X P. Application of bacteriophages to reduce *Salmonella* attachment and biofilms on hard surfaces[J]. Poultry Science,2017,96(6):1838–1848.
- [17] Korzeniowski P, Śliwka P, Kuczkowski M, et al. Bacteriophage cocktail can effectively control *Salmonella* biofilm in poultry housing [J]. Frontiers in Microbiology,2022,13:901770.
- [18] Chang C, Yu X B, Guo W N, et al. Bacteriophage-mediated control of biofilm: a promising new dawn for the future [J]. Frontiers in Microbiology,2022,13:825828.
- [19] Simmons E L, Bond M C, Koskella B, et al. Biofilm structure promotes coexistence of phage-resistant and phage-susceptible bacteria [J]. mSystems,2020,5(3):819–877.

责任编辑:周广礼