



PH826 噬菌体与抗生素联用有效抑制多重耐药铜绿假单胞菌生物被膜的形成

胡紫萌^{1,2}, 陈伟叶^{1,2}, 陈欣仪^{1,2}, 李培^{1,2}, 李敏^{1,2}, 周璐³, 杜鸿⁴, 刘玉庆⁵, 张炜^{1,2*}, 谈忠鸣^{3*}

- 1 南京农业大学动物医学院 农业部动物细菌学重点实验室, 江苏 南京 210095
- 2 南京农业大学三亚研究所, 海南 三亚 572024
- 3 江苏省疾病预防控制中心急性传染病防制所, 江苏 南京 210009
- 4 苏州大学第二附属医院临床检验科, 江苏 苏州 215004
- 5 山东省农业科学院畜牧兽医研究所, 山东 济南 250100

胡紫萌, 陈伟叶, 陈欣仪, 李培, 李敏, 周璐, 杜鸿, 刘玉庆, 张炜, 谈忠鸣. PH826 噬菌体与抗生素联用有效抑制多重耐药铜绿假单胞菌生物被膜的形成[J]. 微生物学报, 2024, 64(2): 473-488.

HU Zimeng, CHEN Weiye, CHEN Xinyi, LI Pei, LI Min, ZHOU Lu, DU Hong, LIU Yuqing, ZHANG Wei, TAN Zhongming. Combination of phage PH826 and antibiotics inhibits biofilm formation of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(2): 473-488.

摘要:【目的】铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是一种重要的革兰氏阴性病原体, 可以加重囊性纤维化患者的肺部感染, 最终会导致患者的死亡。然而由于多重耐药(multi-drug resistant, MDR)和泛耐药(pan-drug resistant, PDR)铜绿假单胞菌菌株的出现, 使其防控变得更为严峻。【方法】从养殖场污水中分离能有效裂解多重耐药铜绿假单胞菌的噬菌体, 研究其形态特征、生物学特性、宿主谱范围、基因组特征和体外抑菌能力等, 并采用噬菌体和抗生素联用的方法进行生物被膜的抑制试验。【结果】透射电子显微镜的形态分析和基因组分析结合表明, 该噬菌体属于 Nankokuvirus 病毒属。生物学特性试验表明, PH826 具有广泛的温度稳定性(4–60 °C)和 pH 稳定性(3.0–11.0)。宿主谱测试显示, PH826 可以裂解 13 株铜绿假单胞菌(包括人源和动物源), 体外抑菌试验显示, PH826

资助项目: 海南省重点研发计划(ZDYF2022XDNY236); 山东省重大科技创新项目(2019JZZY010719); 江苏省卫健委重点科研项目(ZDB2020014, ZD2021037); 苏州市卫健委重点病种项目(LCZX202106)

This work was supported by the Key Research and Development Project of Hainan Province (ZDYF2022XDNY236), the Major Scientific and Technological Innovation Project in Shandong Province (2019JZZY010719), the Science Foundation of Jiangsu Province Health Department (ZDB2020014, ZD2021037), and the Science Foundation of Suzhou Health Department (LCZX202106).

*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Wei, vszw@njau.edu.cn; TAN Zhongming, jstzm@jscdc.cn

Received: 2023-06-23; Accepted: 2023-09-06; Published online: 2023-12-20

在感染复数(multiplicity of infection, MOI)分别为 10、1、0.1 时对铜绿假单胞菌均有强烈的裂解作用。根据基因组分析, PH826 噬菌体的基因组大小为 87 956 bp, G+C 含量为 54.70%, 编码 165 个开放阅读框(open reading frames, ORFs), 并预测携带有裂解酶。值得注意的是, 在 24 h 和 48 h 内, PH826 和环丙沙星联用在 1×、2×、4×最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)的条件下都减少了 80%以上的生物被膜的形成; PH826 和美罗培南联用在 24 h 和 48 h 内, 在 2×MIC 和 4×MIC 的条件下也减少了 80%以上的生物被膜的形成。【结论】PH826 可能是一种潜在的消毒剂和治疗剂, 可以单独使用或与抗生素联合使用, 用于预防和治疗致病性铜绿假单胞菌。

关键词: 噬菌体; 铜绿假单胞菌; 生物被膜; 多重耐药性; 抗生素

Combination of phage PH826 and antibiotics inhibits biofilm formation of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

HU Zimeng^{1,2}, CHEN Weiye^{1,2}, CHEN Xinyi^{1,2}, LI Pei^{1,2}, LI Min^{1,2}, ZHOU Lu³, DU Hong⁴, LIU Yuqing⁵, ZHANG Wei^{1,2*}, TAN Zhongming^{3*}

1 Key Laboratory of Animal Bacteriology, Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

2 Sanya Institute of Nanjing Agricultural University, Sanya 572024, Hainan, China

3 Department of Acute Infectious Disease Prevention and Control, Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210009, Jiangsu, China

4 Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, Jiangsu, China

5 Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, Shandong, China

Abstract: [Objective] *Pseudomonas aeruginosa* is a major Gram-negative pathogen that can exacerbate lung infections in the patients with cystic fibrosis, which can ultimately lead to death. The emerging multi-drug resistant and pan-drug resistant strains pose challenges to the prevention and control of *P. aeruginosa* infection. **[Methods]** A phage capable of lysing multi-drug resistant *P. aeruginosa* was isolated from farm sewage. The morphological characteristics, biological characteristics, host range, genomic features, and *in vitro* inhibitory ability of the isolate were studied. The biofilm inhibition test was conducted with both the phage and antibiotics. **[Results]** The phage PH826 was identified to be a member of the genus Nankokuvirus and it can keep stability within a wide temperature range from 4 °C to 60 °C and pH range (pH 3.0–11.0). The host range test showed that PH826 could lyse 13 *P. aeruginosa* strains from human and animals. The antibacterial test *in vitro* showed that PH826 was strongly lytic against *P. aeruginosa* at multiplicity of infection (MOI) of 10, 1, and 0.1. The genome of PH826 was 87 956 bp in length, with the G+C content of 54.70%, encoding 165 open reading frames (ORFs) including an endolysin gene. The combination of PH826 at 1×MIC (minimum inhibitory concentration, MIC), 2×MIC, or 4×MIC and ciprofloxacin reduced biofilm formation by more than 80% at the time points of 24 h and 48 h. The combination of PH826 at 2×MIC or 4×MIC and meropenem reduced

biofilm formation by more than 80% at the time points of 24 h and 48 h. **[Conclusion]** PH826 may be a potential disinfectant and therapeutic agent that can be used alone or in combination with antibiotics for the prevention and treatment of pathogenic *P. aeruginosa*.

Keywords: bacteriophage; *Pseudomonas aeruginosa*; biofilm; multi-drug resistance; antibiotics

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是一种革兰氏阴性机会病原体, 是引起医院感染最常见的病原体之一^[1-2]。铜绿假单胞菌严重影响免疫功能低下的患者, 是造成接受化疗的中性粒细胞减少性癌症患者菌血症和败血症的主要原因, 在各种皮肤感染中包括糖尿病性溃疡、烧伤伤口、角膜溃疡中也经常出现^[3-4]。此外, 患有囊性纤维化(cystic fibrosis)的患者通常会慢性感染铜绿假单胞菌, 导致这些患者因肺功能衰竭而死亡^[5]。

铜绿假单胞菌属于“ESKAPE”病原体, 耐药机制通常分为固有性耐药(intrinsic resistance)和获得性耐药(acquired resistance)。铜绿假单胞菌的固有性耐药机制使其对多种抗生素产生耐药性, 而获得性耐药机制则包括生物膜和多重耐药滞留菌的形成^[6-7]。铜绿假单胞菌是研究生物被膜的模式生物, 其生物膜基质主要包括多糖、细胞外 DNA (extracellular DNA, eDNA)、蛋白质和脂质, 占生物膜总量的 90%以上, 用以抵抗抗生素以及宿主的免疫反应^[8-10]。生物被膜的产生增加了对抗生素、消毒剂、各种放射处理、环境和免疫系统的抗性, 使铜绿假单胞菌的防控变得更加不利^[11-13]。由于抗生素无法渗透到生物被膜的复杂多糖基质(糖复合物)中, 使生物被膜对抗生素的抵抗力大约是浮游细胞的 10-1 000 倍^[14]。

噬菌体是专门感染细菌的病毒, 是抗生素的替代治疗策略。与使用广谱抗生素相比, 噬菌体疗法具有明显的优势, 它对目标细菌病原体具有高度的特异性, 不会对宿主及其微生物

群产生不利影响^[15]。许多文章报道了铜绿假单胞菌、噬菌体和抗生素联合使用可以有效抑制细菌生长和生物被膜的形成^[16-19]。例如, de Cássia Oliveira 等发现, 铜绿假单胞菌与噬菌体共同培养 24 h 后, 与对照组相比, 所有的噬菌体可以在生物被膜生长的早期阶段有效降低生物被膜的生长速度。然而, 共同培养 24 h 后, 对照组和噬菌体处理组的生物被膜的形成无显著差异^[20]。

因此, 采用噬菌体尝试治疗由多重耐药铜绿假单胞菌引起的慢性感染和清除其生物被膜是至关重要的。本研究对铜绿假单胞菌进行噬菌体分离, 并对其生物学特性、全基因组学进行分析、在体外进行噬菌体抑菌试验和生物被膜生成抑制试验, 探讨其可能的应用价值。

1 材料与方法

1.1 细菌菌株和生长条件

共选择 39 株细菌, 包括 33 株铜绿假单胞菌(人源和动物源)、2 株鲍曼不动杆菌、2 株大肠杆菌和 2 株肺炎克雷伯菌作为噬菌体 PH826 宿主谱测定的受试菌。所有菌株在 LB 液体培养基(g/L, 胰蛋白酶 10、酵母提取物 5 和 NaCl 10)、LB 固体培养基(LB 液体培养基+15 g/L 琼脂)或 LB 半固体培养基(LB 液体培养基+5 g/L 琼脂)中生长。

1.2 噬菌体的分离和纯化

噬菌体 PH826 是以铜绿假单胞菌 PA003 为宿主菌, 从养殖场污水中分离出来的。采用双层琼脂平板法对噬菌体 PH826 进行增殖和计数^[21]。

磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS) (80 g/L NaCl、2 g/L KCl、35.8 g/L Na₂HPO₄ 和 2.7 g/L KH₂PO₄)用于稀释噬菌体。噬菌体液体在 4 °C、5 000×g 条件下离心 10 min, 上清液通过 0.22 μm 的过滤器(Merck Millipore)过滤并储存在 LB 冻存液中^[22]。

1.3 透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)下的噬菌体形态分析

取 20 μL 噬菌体 PH826 的原液涂在铜网上。用磷钨酸(phosphotungstic acid, PTA, 2%质量体积分数)干燥后, 使用透射电子显微镜(TEM)观察噬菌体形态后拍摄电子显微图片。

1.4 噬菌体的裂解宿主谱的测定

采用点滴法对 33 株铜绿假单胞菌、2 株鲍曼不动杆菌、2 株大肠杆菌和 2 株肺炎克雷伯菌进行宿主谱的测定^[23]。将 10 μL 纯化的噬菌体液体(10⁹ PFU/mL)点滴在新接种的细菌菌苔上, 待其干燥后在 37 °C 下培养 12 h^[24]。通过观察裂解斑的形成确定是否为宿主细菌。

1.5 一步生长曲线

将噬菌体以 0.1 的感染复数(multiplicity of infection, MOI)比例添加到 PA003 菌液(*OD*₆₀₀ 为 0.4)中, 然后将混合物 37 °C、180 r/min 振荡 10 min。将未吸附的噬菌体用 PBS 洗涤, 4 °C、5 000×g 离心后弃去上清, 用 10 mL 新鲜 LB 培养液重悬沉淀, 在 37 °C 摇床中以 180 r/min 的转速培养。共培养总时长为 120 min, 每间隔 10 min 取样后, 立即用双层琼脂法测定噬菌体滴度。所有试验均重复 3 次。

1.6 最佳感染复数(MOI)

以铜绿假单胞菌菌株 PA003 作为 PH826 的宿主细菌。将 PA003 培养至对数期(*OD*₆₀₀ 为 0.4), 终浓度约为 1.5×10⁸ CFU/mL。将噬菌体和细菌以不同的 MOI (噬菌体/细菌=10、1、0.1、0.01、0.001)混合, 并在 37 °C 下孵育 10 h。将

混合物以 5 000×g 离心 10 min 后并稀释上清液, 计数噬菌斑用于确定噬菌体的效价。在 10 h 内产生最高噬菌体滴度的 MOI 被认为是最佳 MOI。所有试验均重复 3 次。

1.7 温度和 pH 稳定性

PH826 的热稳定性和 pH 稳定性测试是根据先前的方法稍作修改后进行的^[25]。热稳定性试验测定过程如下: 在不同温度(4、25、37、50、60 和 70 °C)下, 将 100 μL 噬菌体悬浮液在 900 μL PBS 缓冲液中孵育 1 h。采用双层琼脂平板法计数测定噬菌体的存活率。pH 稳定性试验测定过程如下: 将 100 μL 噬菌体悬浮在 900 μL SM 缓冲液, pH 为 1.0–12.0, 在 37 °C 的条件下培养 1 h。采用双层琼脂平板法测定噬菌体的存活率。所有试验均重复 3 次。

1.8 噬菌体 PH826 的体外抗菌活性

将噬菌体 PH826 与细菌 PA003 (*OD*₆₀₀ 为 2×10⁸ CFU/mL)在细菌对数生长期以 MOI 分别为 10、1、0.1 的比例混合, 然后在 37 °C 的条件下在 180 r/min 摇床上孵育。PBS 用作对照组。每 10 min 测量一次细菌的 *OD*₆₀₀ 值, 总时长持续 2 h。所有试验均重复 3 次。

1.9 噬菌体 PH826 和抗生素的联合抑菌作用

使用多黏菌素 B、美罗培南、环丙沙星、阿米卡星、链霉素、氨苄青霉素、庆大霉素和磷霉素测定 PA003 (PH826 的宿主菌)的 MIC; 同时加入 PH826 (终浓度为 1×10⁸ PFU/mL), 测定加入噬菌体后 PA003 的 MIC。以临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, 2019)为标准, 所有试验均重复 3 次。

1.10 使用 PH826 和/或抗生素用于抑制生物膜(biofilm)

取 *OD*₆₀₀ 为 0.4 的 PA003 100 μL, 以加 100 μL 的 PBS 为对照组, 加 100 μL 的 PA003+100 μL 的抗生素(环丙沙星终浓度为 0.5 μg/mL、阿米卡星

终浓度为 16 $\mu\text{g/mL}$ 、美罗培南终浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$, 1 \times MIC; 分别添加)为抗生素组。100 μL 的 PA003 (含噬菌体 PH826, 终浓度为 1×10^8 PFU/mL)+100 μL 的抗生素(环丙沙星终浓度 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、阿米卡星终浓度为 16 $\mu\text{g/mL}$ 、美罗培南终浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$, 1 \times MIC; 分别添加); 100 μL 的 PA003 (含噬菌体 PH826, 终浓度为 1×10^8 PFU/mL)+100 μL 的抗生素(环丙沙星终浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 、阿米卡星终浓度为 32 $\mu\text{g/mL}$ 、美罗培南终浓度为 4 $\mu\text{g/mL}$, 2 \times MIC; 分别添加); 100 μL 的 PA003 (含噬菌体 PH826, 终浓度为 1×10^8 PFU/mL)+100 μL 的抗生素(环丙沙星终浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 、阿米卡星终浓度为 64 $\mu\text{g/mL}$ 、美罗培南终浓度为 8 $\mu\text{g/mL}$, 4 \times MIC; 分别添加), 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中分别作用 24 h 和 48 h。

1.10.1 结晶紫染色法判断生物被膜的抑制情况

将上述培养液吸出, 每孔加入 200 μL 的 PBS 清洗 3 次, 清洗时避免破坏黏附在孔壁的生物被膜; 每孔加入 100 μL 甲醇固定 15 min, 然后吸出甲醇, 自然风干; 在每孔加入 100 μL 1% 的结晶紫, 在室温下染色 10 min; 吸取孔中的结晶紫后, 用流水将剩余的结晶紫溶液冲洗干净, 室温或 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中晾干或烘干; 在每孔加入 100 μL 的 33% 冰乙酸, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中作用 30 min 以溶解孔中的结晶紫; 将培养板置于酶标仪中, 测定溶液在 595 nm 处的吸光值; 每孔做 3 个重复, 并取平均值, 以未接种菌液的培养液作为阴性对照, 阴性值作为界限值 (OD_c)。结果判定的方法为: $OD < OD_c$ 为没有生物被膜生成力; $OD_c < OD < 2OD_c$ 为弱生物被膜生成力; $2OD_c < OD < 4OD_c$ 为中等生物被膜生成力; $4OD_c < OD$ 为强生物被膜生成力。

1.10.2 活菌落计数法判断生物被膜抑制情况

分别在作用 24 h 和 48 h 后的噬菌体和细菌

培养液中, 取 20 μL 液体用 PBS 稀释后进行滴板计数。

1.11 噬菌体基因组提取和测序

噬菌体 PH826 的基因组按照文献[26]的描述提取。噬菌体 PH826 的全基因组测序采用 Illumina HiSeq 系统(Illumina, San Diego)进行。采用 bowtie2 和 samtools 进行宿主基因组的去除后, 使用 Unicycler (version 0.4.8)进行重新组装[27]。

1.12 基因组的注释

采用 NCBI 的 BLASTp 和 RAST 进行噬菌体基因组的比较和注释[28]。与 PH826 相似度较高的噬菌体使用 NCBI 数据库的在线 BLASTn 进行检查。噬菌体 PH826 的全基因组序列已存入 GenBank 数据库, 登录号为 ON653033。采用 Prophage Hunter (<http://pro-hunter.genomics.cn>)预测宿主细菌中的前噬菌体[29]。采用 PhageAI (<https://app.phage.ai/>)预测噬菌体的生活状态。使用 Mauve 2.3.0 对 PH826 和其他与 PH826 具有高度同源性的噬菌体的基因组进行多重比对[30]。采用 Proksee (<https://proksee.ca/>)和 InKscape 进行基因组的可视化。采用 Phyre 2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>)对预测的可能编码的功能蛋白进行结构预测分析[31]。采用 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)进行保守域的预测[32]。

1.13 系统发育和泛基因组分析

采用 Muscle 对末端终止酶大亚基(terminal terminating enzyme large subunits, TerL) (一种保守的噬菌体蛋白)氨基酸序列进行比对。基于比对序列, 在 MEGA X 中构建邻接(neighbor-joining, NJ)系统发育树[33]。通过系统发育分析确定 PH826 噬菌体的属, 并通过 NCBI 的在线 BLASTn 搜索所有同属的噬菌体序列后进行泛基因组分析。采用 Prokka (<https://github.com/tseemann/prokka>)对基因组数据注释, 注释后收集 gff 格式的文件[34]。

采用 Roary (3.13.0) (<https://github.com/deminu/Roary>)进行同源聚类分析^[35]。

1.14 统计分析

统计分析采用 GraphPad Prism 7 软件包完成。测试组和对照组通过学生 *t* 检验进行比较。 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 噬菌体的分离和形态学

从养殖污水中分离出一株编号为 PH826 的噬菌体。噬菌体 PH826 可以形成大的、清晰的圆形裂解斑。衣壳的直径估计为 (62 ± 1) nm, 尾部长度估计为 (108 ± 1) nm (图 1)。

2.2 噬菌体 PH826 的宿主谱

选择了 39 株细菌(包括铜绿假单胞菌 33 株、鲍曼不动杆菌 2 株、大肠杆菌 2 株和肺炎克雷伯菌 2 株)用于测定噬菌体 PH826 的宿主谱。其中, 13 株铜绿假单胞菌(包括人源和动物源)可被 PH826 裂解, 形成浑浊至透明的裂解斑(表 1)。

2.3 噬菌体的一步生长曲线

一步生长曲线试验表明, PH826 的潜伏时

间为 10 min, 上升阶段为 40 min, 暴发量约为 52.86 个噬菌体/细菌(图 2)。

2.4 最佳感染复数(MOI)

当 MOI 为 0.001 时 PH826 的效价最高。考虑到噬菌体的投入产出比, 低 MOI (0.001)被认为是最佳 MOI (表 2)。

2.5 噬菌体的温度和 pH 稳定性

在 1 h 内, PH826 在 4、25、37 °C 的条件下的存活率较高(存活率 > 93%), 在 50 °C 的条件下下降至 53.21%。暴露于 60 °C 时, 存活率骤降至 3.67%, 在 70 °C 时噬菌体全部死亡。PH826 可在 pH 3.0–10.0 的区间内保持高活性(存活率 > 81%)。当 pH 值为 11.0 时, 存活率下降到 52.19%。在 pH < 3.0 或 pH > 11.0 的条件下, PH826 的存活率为 0 (图 3)。

2.6 噬菌体 PH826 的体外抑菌试验结果

体外抑菌试验结果表明, 2 h 内噬菌体 PH826 在 MOI 为 10、1、0.1 时均能有效抑制 PA003 的生长, 在不同 MOI 时噬菌体的抑菌效果差异不大。在孵育 120 min 后, 所有 3 个噬菌体处理组的 OD_{600} 值均低于对照组(图 4)。

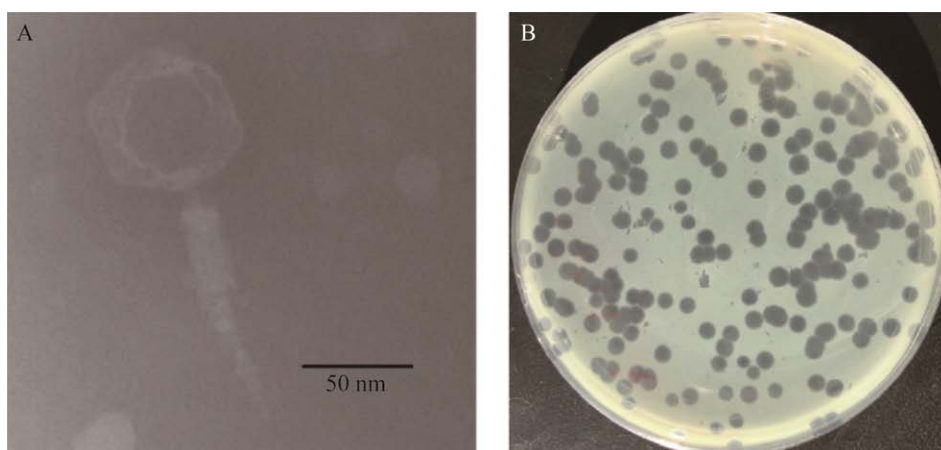


图 1 PH826 的形态图片

Figure 1 Morphological images of PH826. A: Transmission electron micrograph of phage PH826. B: PH826 phage plaques on double plate.

表 1 噬菌体 PH826 的宿主谱

Table 1 Information of phage host range evaluation of PH826

Bacteria	Species	Source	Sample	Isolated years	Plaques
PA002	<i>P. aeruginosa</i>	Human	Phlegm	NA	-
PA003	<i>P. aeruginosa</i>	Human	NA	NA	++
PA004	<i>P. aeruginosa</i>	Human	Phlegm	2017	-
PA005	<i>P. aeruginosa</i>	Human	Airway secretion	2017	++
PA006	<i>P. aeruginosa</i>	Human	Phlegm	2017	++
PA007	<i>P. aeruginosa</i>	Human	Phlegm	2017	-
PA011	<i>P. aeruginosa</i>	Human	Airway secretion	2016	-
PA012	<i>P. aeruginosa</i>	Human	Phlegm	2016	++
PA013	<i>P. aeruginosa</i>	Human	Airway secretion	2016	++
PA021	<i>P. aeruginosa</i>	Human	NA	2019	++
PA022	<i>P. aeruginosa</i>	Human	NA	2020	-
PA023	<i>P. aeruginosa</i>	Human	NA	2020	+
PA024	<i>P. aeruginosa</i>	Human	NA	2020	++
PA034	<i>P. aeruginosa</i>	Marten	Phlegm	2013.7	+
PA035	<i>P. aeruginosa</i>	Marten	NA	2013.7	-
PA036	<i>P. aeruginosa</i>	Marten	Lung	2013.7	-
PA037	<i>P. aeruginosa</i>	Marten	Fodder	NA	-
PA038	<i>P. aeruginosa</i>	Marten	Internal organs	2013.7	-
PA039	<i>P. aeruginosa</i>	Human	Internal organs	2011.4	++
PA040	<i>P. aeruginosa</i>	Human	Phlegm	2011.4	++
PA041	<i>P. aeruginosa</i>	Human	Phlegm	2011.4	-
PA042	<i>P. aeruginosa</i>	Duck	Phlegm	2019.7	-
PA043	<i>P. aeruginosa</i>	Bovine	NA	2021.7	-
PA044	<i>P. aeruginosa</i>	Bovine	NA	2022.6	++
PA045	<i>P. aeruginosa</i>	Bovine	NA	2020.8	-
PA046	<i>P. aeruginosa</i>	Bovine	NA	2020.8	-
PA048	<i>P. aeruginosa</i>	Bovine	NA	2020.9	++
PA049	<i>P. aeruginosa</i>	Bovine	NA	2020.9	-
PA91	<i>P. aeruginosa</i>	Human	Airway secretion	2019.1	-
PA92	<i>P. aeruginosa</i>	Human	Airway secretion	2019.2	-
PA93	<i>P. aeruginosa</i>	Human	Airway secretion	2019.2	-
PA94	<i>P. aeruginosa</i>	Human	Blood	2019.2	-
PA95	<i>P. aeruginosa</i>	Human	Phlegm	2019.2	-
AB4	<i>A. baumannii</i>	Human	Blood	2020.12	-
AB6	<i>A. baumannii</i>	Human	Phlegm	2021	-
EC918	<i>E. coli</i>	Human	NA	2021.10	-
EC920	<i>E. coli</i>	Human	NA	2021.10	-
KP55	<i>K. pneumoniae</i>	Human	NA	NA	-
KP66	<i>K. pneumoniae</i>	Human	NA	NA	-

++: Clear cleavage spot; +: Turbid cleavage spot; -: No cleavage; NA: No cleavage.

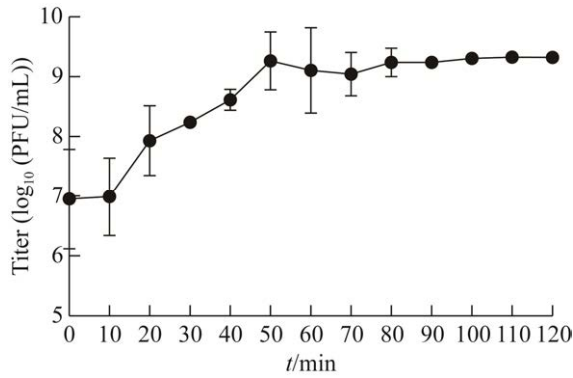


图2 在 MOI 为 0.1 时进行的 PH826 的一步生长曲线测试

Figure 2 One-step growth curve test of PH826 was carried out at MOI of 0.1. Data represent the mean±SEM of three independent replicates.

表2 不同 MOI 下 PH826 浓度的测定

Table 2 Determination of the concentration of PH826 under different MOI

Concentration of host bacterial (CFU/mL)	Concentration of phage (PFU/mL)	MOI	Titers of phage
1.5×10^8	1.5×10^9	10	1.170×10^{10}
1.5×10^8	1.5×10^8	1	1.440×10^{10}
1.5×10^8	1.5×10^7	0.1	1.520×10^{10}
1.5×10^8	1.5×10^6	0.01	1.255×10^{10}
1.5×10^8	1.5×10^5	0.001	1.605×10^{10}

2.7 抗生素和 PH826 噬菌体联用对 PA003 的抑制作用

根据 CLSI 标准, PA003 对美罗培南、环丙沙星和阿米卡星敏感。与单独使用抗生素相比, 抗生素联用噬菌体组中的 8 种抗生素对 PA003 的 MIC 结果都有所下降(表 3)。

2.8 噬菌体-生物被膜的相互作用

根据 PA003 的药敏试验结果, 选择了 3 种对 PA003 敏感的抗生素: 环丙沙星、美罗培南和阿米卡星, 与噬菌体 PH826 联用抑制生物被膜的生长。根据 CLSI 标准, 其 MIC 分别为 0.5、2、16 $\mu\text{g/mL}$ 。

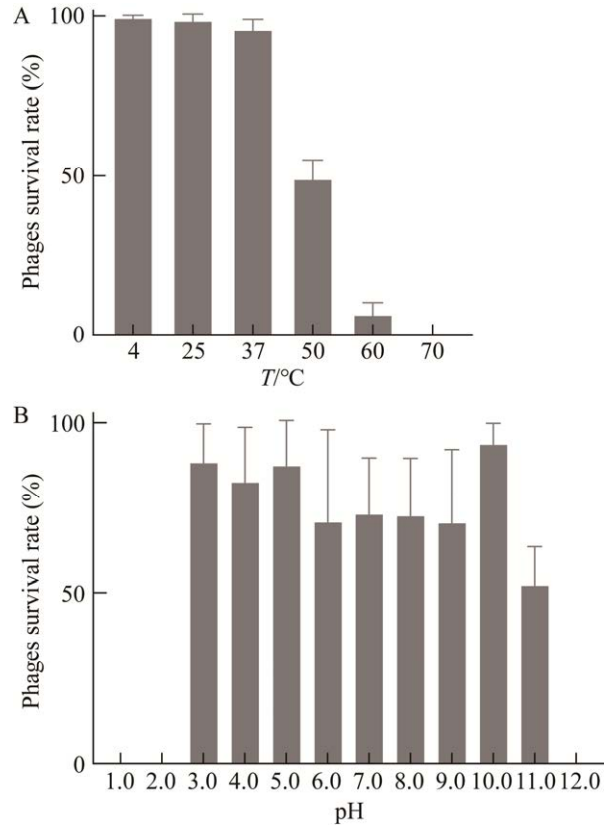


图3 PH826 的稳定性试验

Figure 3 Stability tests of PH826. A: Thermal stability. Phage particles were incubated at various temperatures for 1 h. B: pH stability. Phage particles were incubated under different pH conditions for 1 h. Phage survival rate=titer after incubation/initial titer. Data represent the mean±SEM of three independent replicates.

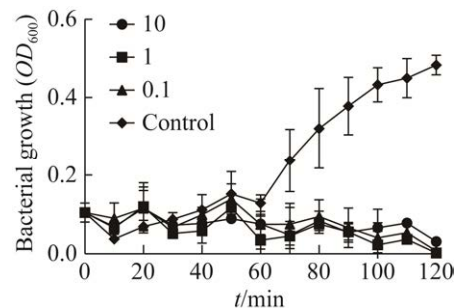


图4 噬菌体 PH826 的抗菌活性

Figure 4 Antibacterial activity of phage PH826 (OD_{600} value of PA003 treated with PH826 at a MOI of 10, 1, and 0.1, respectively). Data represent the mean±SEM of three independent replicates.

表 3 单独使用抗生素及抗生素与 PH826 联合使用的 MIC 结果

Table 3 MIC results of antibiotics alone and antibiotics in combination with PH826

Item	Antibiotic group	Antibiotics combined with phage group
Polymyxin B (μg/mL)	4	1
Meropenem (μg/mL)	1	0.5
Ciprofloxacin (μg/mL)	0	0
Amikacin (μg/mL)	16	2
Streptomycin (μg/mL)	64	32
Ampicillin (μg/mL)	>512	128
Gentamicin (μg/mL)	16	2
Fosfomycin (μg/mL)	>512	16

24 h 的生物被膜抑制试验结果显示, 与对照组相比, PH826+环丙沙星组在 1×MIC、2×MIC、4×MIC 时的 OD_{595} 值分别下降了 87.21%、80.97%、81.35%; PH826+美罗培南组

在 1×MIC、2×MIC、4×MIC 时的 OD_{595} 值分别下降了 58.99%、84.26%、84.88%; PH826+阿米卡星组在 1×MIC、2×MIC、4×MIC 时的 OD_{595} 值与对照组相比分别下降了 34.05%、67.62%、81.16%。然而, 单独使用环丙沙星、美罗培南和阿米卡星的 OD_{595} 值分别下降了 6.49%、28.18%、57.99% (图 5)。48 h 的生物被膜抑制试验结果显示, PH826+环丙沙星组在 1×MIC、2×MIC、4×MIC 下的 OD_{595} 值与对照组相比分别下降了 89.44%、92.79%、91.52%; 与对照组相比, PH826+美罗培南组在 1×MIC、2×MIC、4×MIC 的 OD_{595} 值分别下降了 50.43%、93.25%、92.53%; PH826+阿米卡星组在 1×MIC、2×MIC、4×MIC 的 OD_{595} 值与对照组相比分别下降了 20.88%、78.60%、87.50% (图 5)。

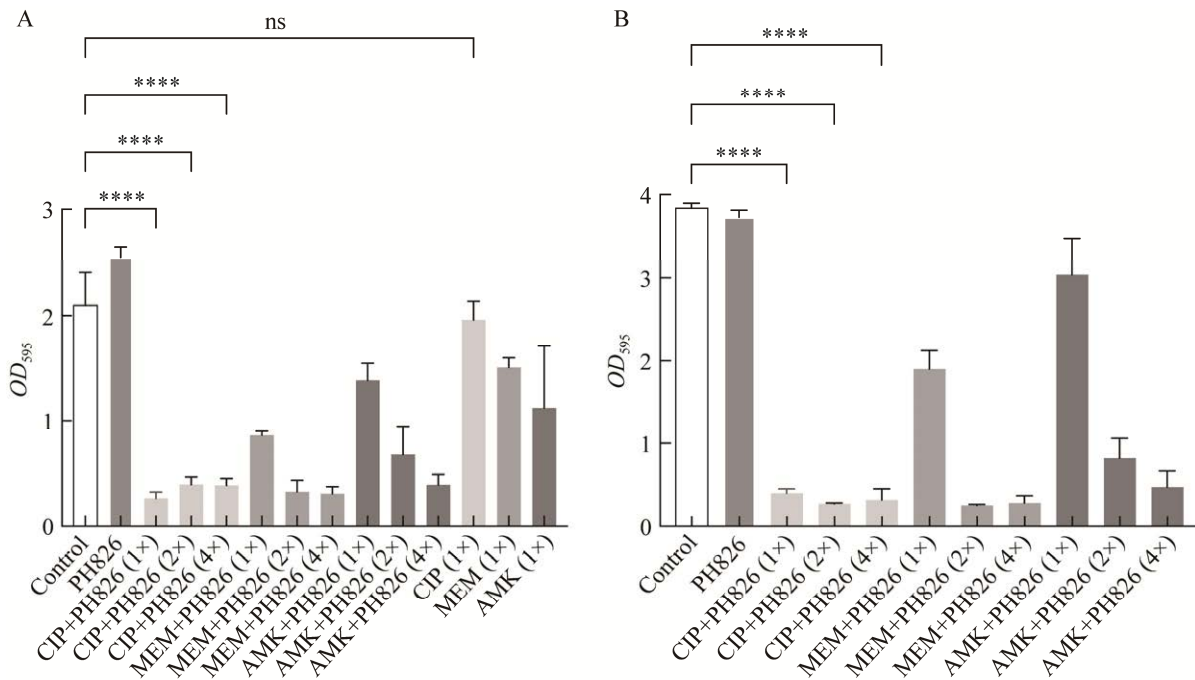


图 5 分光光度法测量生物被膜抑制情况

Figure 5 Spectrophotometric measurement of biological inhibition by membranes. A: Biofilm inhibition test within 24 h. B: Biofilm inhibition test within 48 h (1×, 2×, 4× represent 1×MIC concentration, 2×MIC concentration, and 4×MIC concentration, respectively). Data represent the mean±SEM of three independent replicates. Significant difference (ns: No statistical difference; ****: $P < 0.0001$).

生物被膜抑制试验的活菌落计数结果显示, 24 h 内, 与对照组相比, PH826 组菌落数下降 1 个 log 值, PH826+环丙沙星组、PH826+美罗培南组、PH826+阿米卡星组菌落数分别下降了 12、5、4 个 log 值, 环丙沙星组、美罗培南组、阿米卡星组菌落数分别下降了 5、2、5 个 log 值; 48 h 内, 与对照组相比, PH826 组菌落数下降不足 1 个 log 值, PH826+环丙沙星组、PH826+美罗培南组、PH826+阿米卡星组菌落数分别下降了 12、4、5 个 log 值, 环丙沙星组、美罗培南组、阿米卡星组菌落数没有下降(图 6)。

2.9 PH826 基因组的特点

生物信息学分析表明, PH826 的基因组大小为 87 956 bp, G+C 含量为 54.70%, 共有 165 个开放阅读框(open reading frames, ORFs)。噬菌体 PH826 的全基因组序列已上传至 GenBank 数据

库, 登录号为 ON653033。PH826 被 PhageAI 预测为裂解性噬菌体。对 PH826 基因组序列的在线 BLASTn 分析显示, 它与假单胞菌噬菌体 Epa26 (登录号: MT118300.1) 的相似度较高, 核苷酸一致性为 98.19%。此外, 基因组比较结果表明, PH826 与 Epa17、Epa24 和 Epa26 有很高的同源性(图 7)。

总共预测了 165 个编码序列(coding sequence, CDS)。除了假定蛋白外, 预测到的功能蛋白有: 噬菌体裂解酶(phage endolysin)、噬菌体终止酶大亚基(phage terminase large subunit)、吡啶黄素抗性蛋白(acriflavin resistance protein)和 Ia 类核糖核苷酸还原酶(ribonucleotide reductase of class Ia)。此外, 还预测到了 2 个 tRNAs, 它们分别是 tRNA-Tyr-GTA 和 tRNA-Gln-TTG (图 8A)。其中预测到的噬菌体裂解酶属于木贼酶(muraidase), 对其进行了蛋白的三维结构分析(图 8B)。

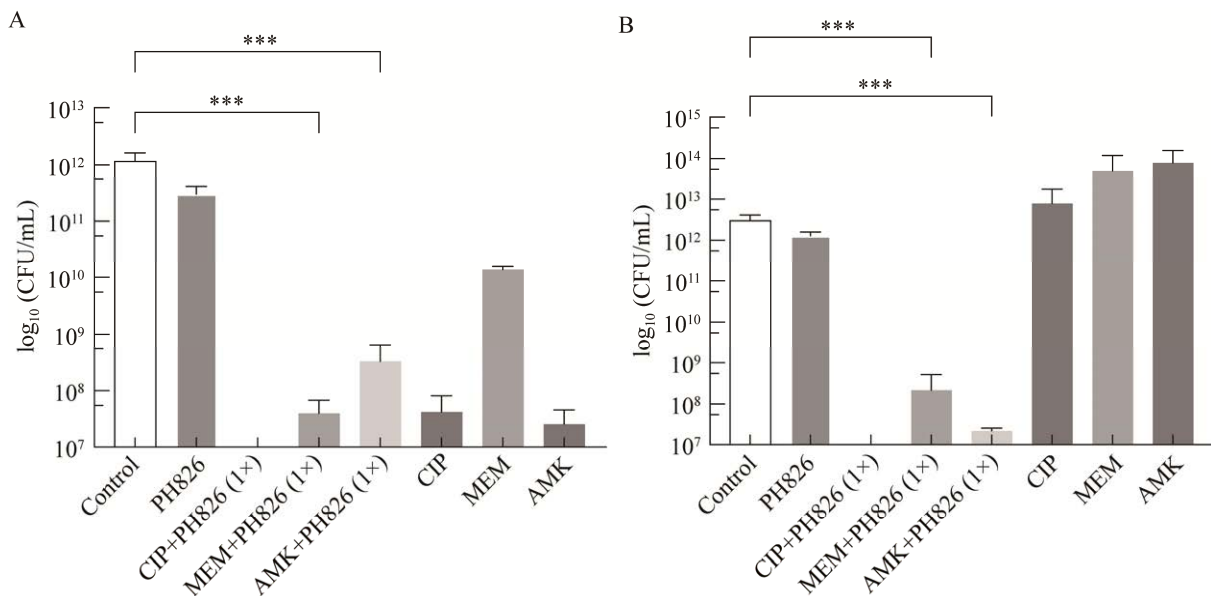


图 6 噬菌体抑制生物被膜后的细菌菌落计数

Figure 6 Bacterial colony counts after phage inhibition of biofilm. A: Biofilm inhibition test within 24 h. B: Biofilm inhibition test within 48 h (1× represents 1×MIC concentration of antibiotic). Data represent the mean±SEM of three independent replicates. Significant difference (***) $P < 0.001$.

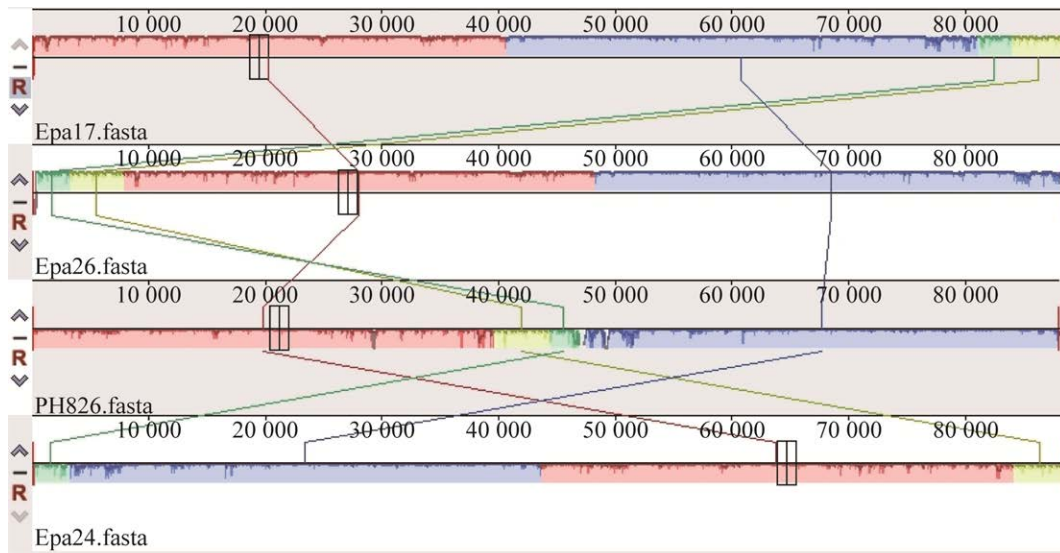


图 7 通过使用 Mauve 2.3.0 比较 PH826 和其他高度同源的铜绿假单胞菌噬菌体的序列
 Figure 7 By using Mauve 2.3.0 to compare the sequence of PH826 and its similar *Pseudomonas aeruginosa* phage.

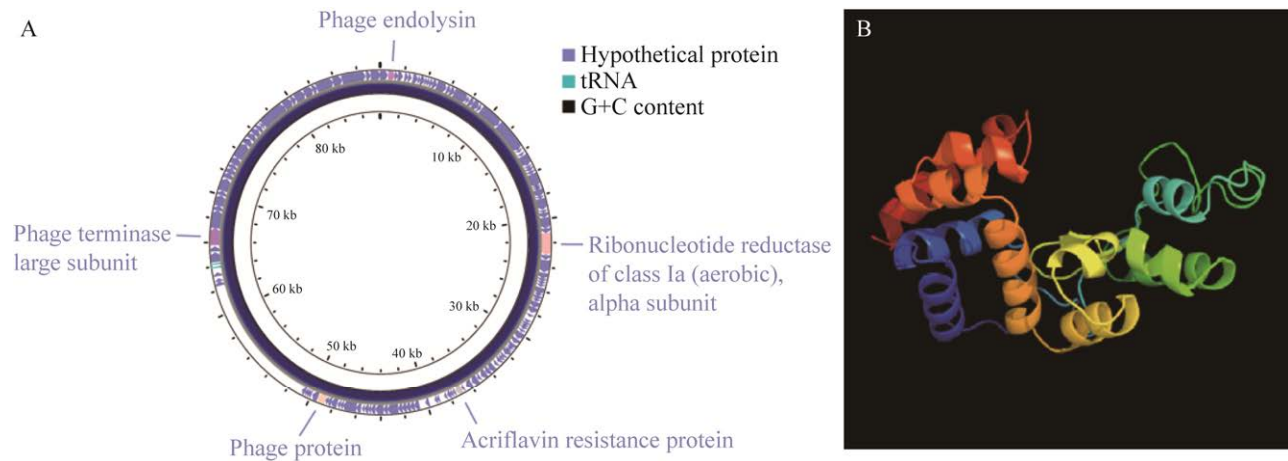


图 8 PH826 的基因组学分析
 Figure 8 Genomic analysis of PH826. A: Genomic circles, functional proteins identified by RAST annotation are marked, the rest are hypothetical proteins. B: PH826-26. Image coloured by rainbow (red to blue) N→C terminus.

2.10 系统发育和泛基因组分析

基于终止酶大亚基的氨基酸序列的系统发育树显示, PH826 噬菌体与 Nankokuvirus 的噬菌体归为一类, 表明 PH826 属于 Duplodnaviria (realm)、Heunggongvirae (kingdom)、Uroviricota

(phylum)、Caudoviricetes (class)、Nankokuvirus (genus) (图 9)。

为了进行泛基因组学分析, 使用 NCBI 上的在线 BLASTn 搜索了其他 25 个属于 Nankokuvirus 属的噬菌体。在这 26 个噬菌体中共有 351 个基

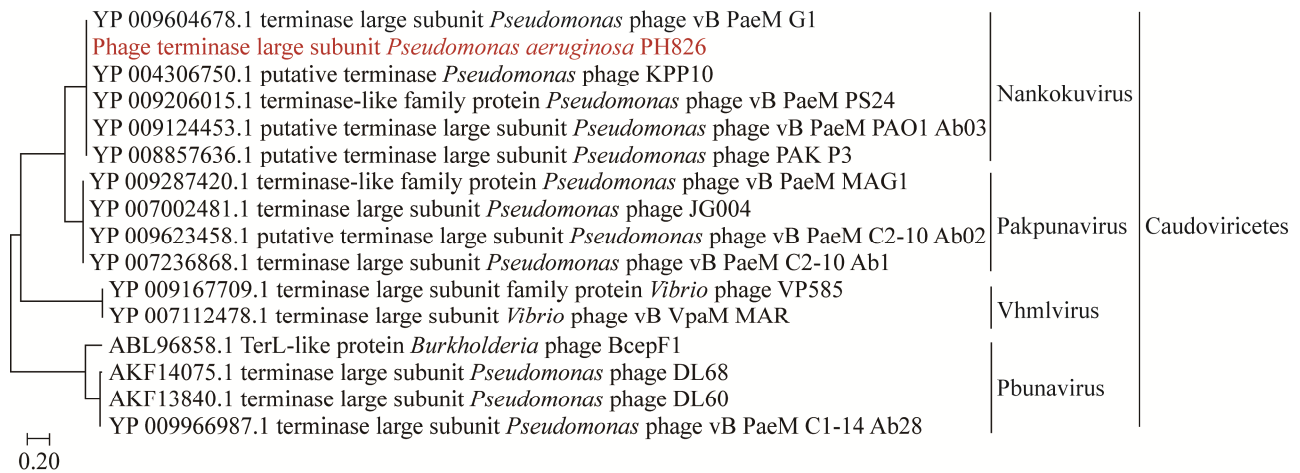


图 9 噬菌体的系统发育分析

Figure 9 Phylogenetic analysis of bacteriophages. A phylogenetic tree was constructed based on the amino acid sequence of the large subunit of the terminase using the neighbor-joining method with 1 000 bootstrap repeats in MEGA X.

因簇(包括 67 个核心基因、2 个软核心基因、166 个壳基因和 116 个云基因)(图 10B)。泛基因组分析表明 PH826 与 Nankokuvirus 属的其他噬菌体整体相似度较高,与同属的其他 25 株噬菌体共有 19.09%的基因组是一致的(图 10C)。

3 讨论与结论

铜绿假单胞菌是最常见的革兰氏阴性病原体之一,引起了医院感染和重要的公共卫生问题。它有许多复杂的耐药机制,并倾向于形成生物被膜,使其更难被控制。在这项研究中,从养殖场污水中分离并鉴定了一株编号为 PH826 的具有强裂解力的铜绿假单胞菌特异性噬菌体。

噬菌体的宿主谱测定试验结果显示,PH826 可以裂解 11 株铜绿假单胞菌,包括人源和动物源。噬菌体的生物学特性包括噬菌体的温度稳定性和 pH 值稳定性,其是决定噬菌体应用和储存的关键因素。无论是应用在环境消毒,还是用作体内治疗,作为有应用价值的噬菌体应该在不同的温度和 pH 值下具有较高的

稳定性。PH826 可以在 4–50 °C 之间保持高活性,并且仍有少量的噬菌体可以在 60 °C 下存活(1 h 内),在 pH 值为 3.0–11.0 环境下的存活率也高达 100% (1 h 内)。此外,PH826 在体外抑菌试验中表现出很强的抑菌能力。在不使用噬菌体的对照组中,2 h 内 PA003 的 OD_{600} 值为 0.48,在 MOI 为 10、1、0.1 时,PA003 的 OD_{600} 值不超过 0.1,这表明 PH826 在治疗和预防铜绿假单胞菌方面具有良好的潜力。PH826 单独使用可在 12 h 内有效抑制铜绿假单胞菌的生长,作用效果与单独使用敏感抗生素无明显差异,其在体外裂解细菌的能力也普遍超于本实验室的其他铜绿假单胞菌噬菌体(未在本文列出)。

由于生物被膜可以形成物理屏障,能显著降低抗生素对细菌的杀菌效果。本研究采用 8 种抗生素对 PA003 进行了 MIC 的测定,结果表明 PA003 对许多抗生素有抗性,仅对环丙沙星、美罗培南和阿米卡星敏感。因此,选用了这 3 种抗生素与 PH826 联合使用进行生物被膜抑制试验。24 h 和 48 h 的生物被膜抑制试验结果显示,

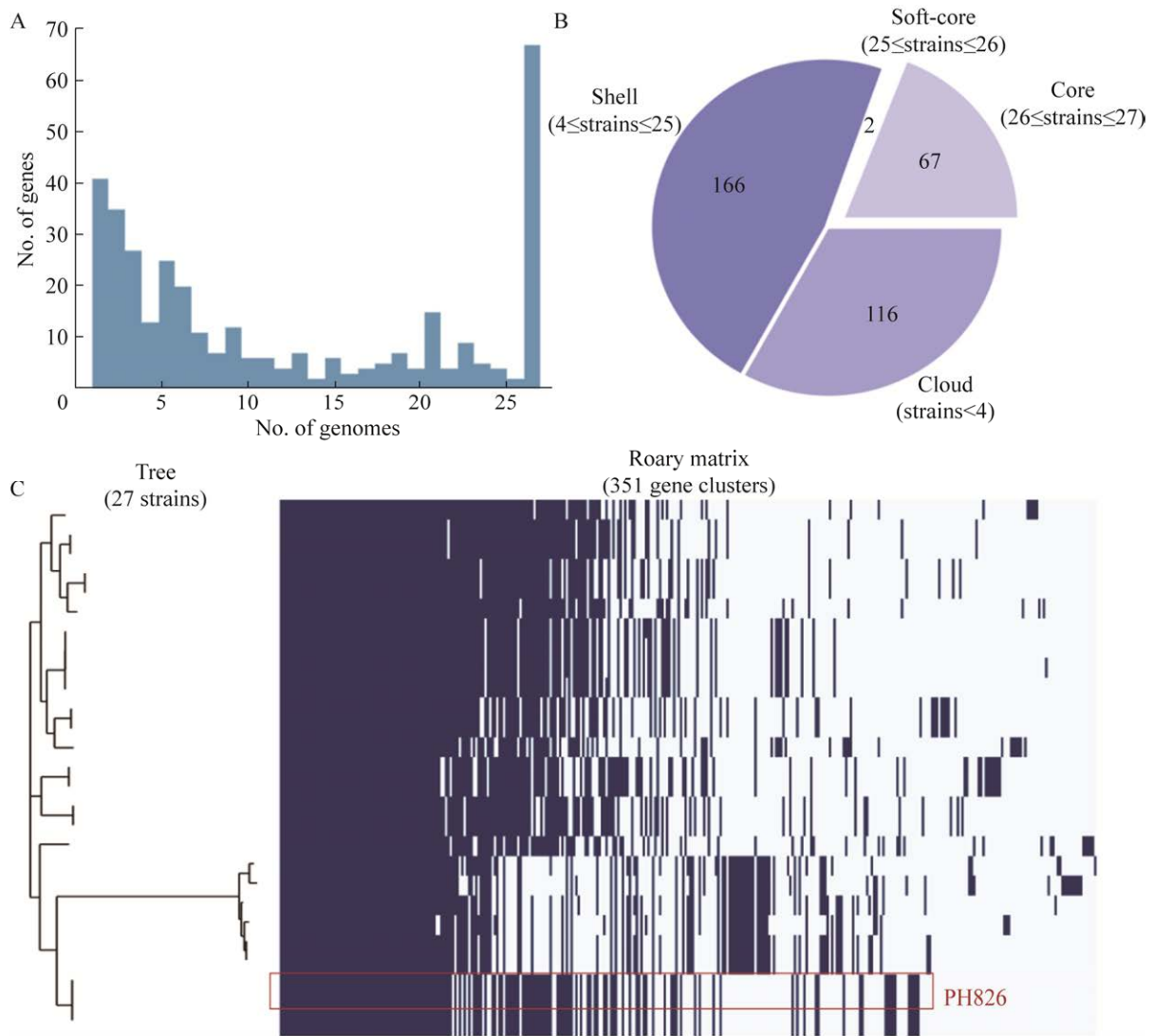


图 10 *Nankokuvirus* 属的泛基因组分析

Figure 10 Pan-genome analysis of *Nankokuvirus* phages. A: Frequency of genes versus the number of genomes. B: Pangenome_pie of the 26 strains of *Nankokuvirus* phages. C: The presence and absence matrix of the 26 strains of *Nankokuvirus* phages.

PH826+环丙沙星组在 1×MIC、2×MIC 和 4×MIC 时都能有效抑制生物被膜的形成(24 h 分别下降了 87.21%、80.97%和 81.35%; 48 h 分别下降了 89.44%、92.79%和 91.52%)。PH826+美罗培南组在 1×MIC 时的效果略差于 PH826+环丙沙星组,但在 2×MIC 和 4×MIC 时有效(24 h 分别下降了 67.62%和 81.16%; 48 h 分别下降了

93.25%和 92.53%)。总体来说,阿米卡星+PH826 组对生物被膜的抑制效果不如环丙沙星和 PH826 联用及美罗培南和 PH826 联用组。然而,单独使用环丙沙星或噬菌体 PH826 对铜绿假单胞菌生物被膜的增长没有表现出明显的抑制能力。

对噬菌体和抗生素联用增强抑菌效果的现

象做出了推测解释,可能是由于抗生素对生物膜内的细菌渗透性低,而生物膜内的细菌由于代谢活性低而表现出较高的抗生素抗性。然而,当噬菌体破坏了细胞外基质的完整性时,生物膜内层的细菌就会暴露出来,导致抗生素和噬菌体联合使用的抗菌效果增强^[36]。事实上,分别对已经生成 24 h 和 48 h 的生物被膜进行了生物被膜清除试验,但是,环丙沙星与 PH826 联合使用或美罗培南与 PH826 联合使用均不能清除已生成的生物被膜。

基因组序列分析和电子显微镜分析联合表明,PH826 噬菌体属于 Nankokuvirus 属。在线 BLASTn 比对结果显示,PH826 与假单胞菌噬菌体 Epa14, Epa17 和 Epa26 的序列相似度很高。此外,PH826 被 PhageAI 预测为裂解性噬菌体,可用于噬菌体治疗。在 PH826 的基因组中发现了 2 个 tRNA。已经有充分的资料表明,tRNA 可以由噬菌体携带。推测出 2 种假设:(1)裂解性噬菌体在宿主 DNA 的降解过程中,在所有噬菌体遗传物质被封装之前捕获细菌 DNA;(2)裂解性噬菌体也可以通过与溶源性噬菌体重组获得 tRNA。Canchaya 等和 Bailly-Bechet 等研究了 193 种噬菌体的基因组,发现其中的 48 种共含有 214 种 tRNA^[37-38]。最近被报道为“huge phages”的噬菌体通常携带更多的 tRNA,每个噬菌体平均有多达 15 个 tRNA 合成酶。一般来说,每个基因组的 tRNA 数量随着基因组的长度而增加^[39]。PH826 含有 2 个对应于密码子 Tyr-GTA 和 Gln-TTG 的 tRNA,也有报道称 AT 碱基通常在 tRNA 的密码子中富集^[40]。此外,发现 PH826 含有 1 个内溶素模块,推测可能具有裂解酶活性,裂解酶的表达工作正在进行中。

总之,在这项研究中,发现了一种具有针对铜绿假单胞菌的强裂解性噬菌体 PH826。研究结果表明,PH826 噬菌体在体外能有效地抑

制细菌生长和生物膜的形成,这表明它在控制由耐多药的铜绿假单胞菌引起的感染方面有潜在的应用价值。

参考文献

- [1] MONSON R, FOULDS I, FOWERAKER J, WELCH M, SALMOND GPC. The *Pseudomonas aeruginosa* generalized transducing phage ϕ PA3 is a new member of the ϕ KZ-like group of ‘jumbo’ phages, and infects model laboratory strains and clinical isolates from cystic fibrosis patients[J]. *Microbiology*, 2011, 157(3): 859-867.
- [2] TRAPNELL BC, CHU CS, PAAKKO PK, BANKS TC, YOSHIMURA K, FERRANS VJ, CHERNICK MS, CRYSTAL RG. Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in the respiratory tract of normal individuals and individuals with cystic fibrosis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88(15): 6565-6569.
- [3] KOCH C. Early infection and progression of cystic fibrosis lung disease[J]. *Pediatric Pulmonology*, 2002, 34(3): 232-236.
- [4] YAMAGUCHI T, YAMADA H. Role of mechanical injury on airway surface in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *American Review of Respiratory Disease*, 1991, 144(5): 1147-1152.
- [5] PARKINS MD, SOMAYAJI R, WATERS VJ. Epidemiology, biology, and impact of clonal *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2018, 31(4): e00018-e00019.
- [6] DRENKARD E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. *Microbes and Infection*, 2003, 5(13): 1213-1219.
- [7] MULCAHY LR, BURNS JL, LORY S, LEWIS K. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis[J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(23): 6191-6199.
- [8] STREMPPEL N, NEIDIG A, NUSSER M, GEFFERS R, VIEILLARD J, LESOUHAITIER O, BRENNER-WEISS G, OVERHAGE J. Human host defense peptide LL-37 stimulates virulence factor production and adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82240.

- [9] JACKSON KD, STARKEY M, KREMER S, PARSEK MR, WOZNIAC DJ. Identification of *psl*, a locus encoding a potential exopolysaccharide that is essential for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(14): 4466-4475.
- [10] RYDER C, BYRD M, WOZNIAC DJ. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development[J]. Current Opinion in Microbiology, 2007, 10(6): 644-648.
- [11] MAH TF, PITTS B, PELLOCK B, WALKER GC, STEWART PS, O'TOOLE GA. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance[J]. Nature, 2003, 426(6964): 306-310.
- [12] COSTERTON JW, STEWART PS, GREENBERG EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections[J]. Science, 1999, 284(5418): 1318-1322.
- [13] STEWART PS. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms[J]. International Journal of Medical Microbiology: IJMM, 2002, 292(2): 107-113.
- [14] SPOERING AL, LEWIS K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(23): 6746-6751.
- [15] ALAM SARKER S, BERGER B, DENG Y, KIESER S, FOATA F, MOINE D, DESCOMBES P, SULTANA S, HUQ S, BARDHAN PK, VUILLET V, PRAPLAN F, BRÜSSOW H. Oral application of *Escherichia coli* bacteriophage: safety tests in healthy and diarrheal children from Bangladesh[J]. Environmental Microbiology, 2017, 19(1): 237-250.
- [16] DANIS-WŁODARCZYK KM, CAI A, CHEN AN, GITTRICH MR, SULLIVAN MB, WOZNIAC DJ, ABEDON ST. Friends or foes? Rapid determination of dissimilar colistin and ciprofloxacin antagonism of *Pseudomonas aeruginosa* phages[J]. Pharmaceuticals, 2021, 14(11): 1162.
- [17] OLIVEIRA VC, BIM FL, MONTEIRO RM, MACEDO AP, SANTOS ES, SILVA-LOVATO CH, PARANHOS HFO, MELO LDR, SANTOS SB, WATANABE E. Identification and characterization of new bacteriophages to control multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilm on endotracheal tubes[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 580779.
- [18] WANNASRICHAN W, HTOO HH, SUWANSANG R, POGLIANO J, NONEJUIE P, CHAIKEERATISAK V. Phage-resistant *Pseudomonas aeruginosa* against a novel lytic phage JJ01 exhibits hypersensitivity to colistin and reduces biofilm production[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 1004733.
- [19] CHAUDHRY WN, CONCEPCIÓN-ACEVEDO J, PARK T, ANDLEEB S, BULL JJ, LEVIN BR. Synergy and order effects of antibiotics and phages in killing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0168615.
- [20] de CÁSSIA OLIVEIRA V, STEIXNER S, DO NASCIMENTO C, PAGNANO VO, SILVA-LOVATO CH, de FREITAS OLIVEIRA PARANHOS H, WILFLINGSSEDER D, CORAÇA-HUBER D, WATANABE E. Expression of virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* biofilm after bacteriophage infection[J]. Microbial Pathogenesis, 2021, 154: 104834.
- [21] WIRTH E. Soil and plant analysis, by C. S. PIPER. interscience publishers, inc., New York[J]. Journal of the American Pharmaceutical Association, 1946, 35(6): 192.
- [22] GU JM, XU W, LEI LC, HUANG J, FENG X, SUN CJ, DU CT, ZUO J, LI Y, DU TF, LI LX, HAN WY. LysGH15, a novel bacteriophage lysin, protects a murine bacteremia model efficiently against lethal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2011, 49(1): 111-117.
- [23] CHEN MM, ZHANG L, ABDELGADER SA, YU L, XU JT, YAO HC, LU CP, ZHANG W. Alterations in gp37 expand the host range of a T4-like phage[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(23): AEM.01576-17.
- [24] KUTTER E. Phage host range and efficiency of plating[J]. Methods in Molecular Biology (Clifton, N J), 2009, 501: 141-149.
- [25] LI X, MU X, ZHANG P, ZHAO D, JI J, QUAN J, ZHU Y, YU Y. Detection and characterization of a clinical *Escherichia coli* ST3204 strain coproducing NDM-16 and MCR-1[J]. Infection and Drug Resistance, 2018, 11: 1189-1195.
- [26] SAMBROOK J, RUSSELL DW. Precipitation of bacteriophage λ particles from large-scale lysates[J]. Cold Spring Harbor Protocols, 2006, 2006(1): pdb.prot3966.
- [27] WICK RR, JUDD LM, GORRIE CL, HOLT KE. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads[J]. PLoS Computational Biology, 2017, 13(6): e1005595.
- [28] BRETTIN T, DAVIS JJ, DISZ T, EDWARDS RA,

- GERDES S, OLSEN GJ, OLSON R, OVERBEEK R, PARRELLO B, PUSCH GD, SHUKLA M, THOMASON JA, STEVENS R, VONSTEIN V, WATTAM AR, XIA FF. RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 8365.
- [29] SONG WC, SUN HX, ZHANG C, CHENG L, PENG Y, DENG ZQ, WANG D, WANG Y, HU M, LIU WE, YANG HM, SHEN Y, LI JH, YOU LC, XIAO MF. Prophage Hunter: an integrative hunting tool for active prophages[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(W1): W74-W80.
- [30] DARLING AE, MAU B, PERNA NT. progressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement[J]. *PLoS One*, 2010, 5(6): e11147.
- [31] KELLEY LA, MEZULIS S, YATES CM, WASS MN, STERNBERG MJE. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis[J]. *Nature Protocols*, 2015, 10(6): 845-858.
- [32] LU SN, WANG JY, CHITSAZ F, DERBYSHIRE MK, GEER RC, GONZALES NR, GWADZ M, HURWITZ DI, MARCHLER GH, SONG JS, THANKI N, YAMASHITA RA, YANG MZ, ZHANG DC, ZHENG CJ, LANCZYCKI CJ, MARCHLER-BAUER A. CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(D1): D265-D268.
- [33] KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C, TAMURA K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [34] SEEMANN T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(14): 2068-2069.
- [35] PAGE AJ, CUMMINS CA, HUNT M, WONG VK, REUTER S, HOLDEN MTG, FOOKES M, FALUSH D, KEANE JA, PARKHILL J. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis[J]. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 2015, 31(22): 3691-3693.
- [36] CHEGINI Z, KHOSH BAYAN 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.
- [37] CANCHAYA C, FOURNOUS G, BRÜSSOW H. The impact of prophages on bacterial chromosomes[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 53(1): 9-18.
- [38] BAILLY-BECHET M, VERGASSOLA M, ROCHA E. Causes for the intriguing presence of tRNAs in phages[J]. *Genome Research*, 2007, 17(10): 1486-1495.
- [39] AL-SHAYEB B, SACHDEVA R, CHEN LX, WARD F, MUNK P, DEVOTO A, CASTELLE CJ, OLM MR, BOUMA-GREGSON K, AMANO Y, HE C, MÉHEUST R, BROOKS B, THOMAS A, LAVY A, MATHEUS-CARNEVALI P, SUN C, GOLTSMAN DSA, BORTON MA, SHARRAR A, et al. Clades of huge phages from across earth's ecosystems[J]. *Nature*, 2020, 578(7795): 425-431.
- [40] ENAV H, BÉJÀ O, MANDEL-GUTFREUND Y. Cyanophage tRNAs may have a role in cross-infectivity of oceanic *Prochlorococcus* and *Synechococcus* hosts[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(3): 619-628.