

副溶血弧菌噬菌体 Vpas_PP24 的分离鉴定及生物学特性

吴春光^{1,3}, 付静芸¹, 李映¹, 何增国^{*1,2,3}

1 中国海洋大学医药学院, 山东 青岛 266003

2 青岛海洋生物医药研究院, 山东 青岛 266100

3 青岛百奥安泰生物科技有限公司, 山东 青岛 266100

吴春光, 付静芸, 李映, 何增国. 副溶血弧菌噬菌体 Vpas_PP24 的分离鉴定及生物学特性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(11): 4644-4658

Wu Chunguang, Fu Jingyun, Li Ying, He Zengguo. Isolation, identification, and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* phage Vpas_PP24[J]. Microbiology China, 2022, 49(11): 4644-4658

摘要:【背景】副溶血弧菌是南美白对虾养殖中常见的致病菌, 传统的抗生素防治办法不仅低效, 而且越来越难以满足食品安全和绿色环保及可持续发展的要求。副溶血弧菌的生物防治是南美白对虾养殖业可持续发展的必由之路。噬菌体是天然安全的活体抗菌剂, 因其对特定细菌的专一性感染和高效性裂解而备受关注。【目的】分离一株能高效裂解副溶血弧菌的烈性噬菌体, 为探索副溶血弧菌的噬菌体防治方法提供基础研究。【方法】以 28 株病虾来源的副溶血弧菌为宿主菌, 用双层琼脂平板法从海鲜市场污水中分离副溶血弧菌噬菌体; 点斑法测定噬菌体的裂解谱, 并对筛选到的宽裂解谱噬菌体进行透射电镜(transmission electron microscopy, TEM)观察、生物学特性测定和全基因组序列分析。【结果】分离筛选到一株副溶血弧菌烈性噬菌体, 命名为 Vpas_PP24。透射电镜观察显示该噬菌体头部为二十面体, 有一长尾, 头部长约 92 nm, 宽约 46 nm, 尾部长约 147 nm, 属于有尾噬菌体目长尾噬菌体科。其基因组全长 83 482 bp, 预测有 118 个开放阅读框(open reading frames, ORFs), 具有已知功能的有 13 个, 不含非编码 RNA、毒力基因及抗生素抗性基因。基因组一致性对比显示噬菌体 Vpas_PP24 可能为弧菌噬菌体的一个新种。Vpas_PP24 对 28 株副溶血弧菌的裂解率为 54%, 对其他种属的 116 株弧菌的总裂解率为 16%; 最佳感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 0.000 1, 效价可达 3.0×10^{10} PFU/mL。一步生长曲线显示 Vpas_PP24 的潜伏期为 10 min, 暴发期为 150 min, 暴发量为 30 PFU/cell。该噬菌体在温度 $50\text{ }^\circ\text{C}$、pH 4.0–11.0 范围内活性稳定, 对糜蛋白酶、木瓜蛋白酶和对虾肝胰腺酶提取液的水解作用不敏感, 但蛋白酶 K 可快速使其失活, 紫外辐照也能使 Vpas_PP24 失活。宿主菌对该噬菌体的不敏感突变频率为 2×10^{-5} 。【结论】分离筛选到一株裂解谱较宽、基因型较新、生物学性质较稳定的副溶血弧菌噬菌体, 该噬菌

基金项目: 广东省重点领域科技计划(2020B0202010001); 青岛海洋生物医药研究院大健康项目(HYJK2021009)

Supported by: Science and Technology Project in Key Areas of Guangdong (2020B0202010001); Big Health Project of Marine Biomedicine Research Institute of Qingdao (HYJK2021009)

*Corresponding author: E-mail: bioantai88@vip.163.com

Received: 2022-03-31; Accepted: 2022-05-25; Published online: 2022-06-10

体具有进一步开发成为新型副溶血弧菌抗菌剂的潜力。

关键词: 副溶血弧菌噬菌体; 生物学特性; 全基因组分析

Isolation, identification, and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* phage Vpas_PP24

WU Chunguang^{1,3}, FU Jingyun¹, LI Ying¹, HE Zengguo^{*1,2,3}

1 School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong, China

2 Marine Biomedical Research Institute of Qingdao, Qingdao 266100, Shandong, China

3 Qingdao Bioantai Biotechnology Limited Company, Qingdao 266100, Shandong, China

Abstract: [Background] *Vibrio parahaemolyticus* is a major pathogen of *Penaeus vannamei*. Posing a threat to food safety, environment, and sustainable development, conventional antibiotic therapy is no longer effective. Biocontrol of this bacteria seems to inevitable for the sustainable development of *P. vannamei* aquaculture. Phage, a natural safe antibacterial, is highly specific and typically only infects or kills an individual species of bacteria with high efficiency. **[Objective]** To identify virulent phage that can efficiently lyse *V. parahaemolyticus* so that the set of methodology was established to explore the phage agents for the control of *V. parahaemolyticus*. **[Methods]** Double-layer agar technique was used to enrich phages from sewage samples of seafood market with 28 strains of *V. parahaemolyticus* derived from diseased shrimps. The lytic spectra of phages were determined through spot test. The one with broad spectrum was characterized by transmission electron microscopy, biological characterization, and whole-genome sequencing. **[Results]** Vpas_PP24, a virulent phage against *V. parahaemolyticus* was screened out. It had an icosahedral head with about 92 nm in length and around 46 nm in width and a long tail of about 147 nm in length, which was thus identified as a member of *Siphoviridae* in *Caudovirales*. The full-length genome of Vpas_PP24 was 83 482 bp, and it harbored 118 open reading frames (ORFs), with 13 known protein-coding genes, and no non-coding RNA, virulence genes, or resistance genes. Genome alignment suggested that Vpas_PP24 may be a new phage species against *Vibrio*. The phage could lyse 15 (54%) of the 28 *V. parahaemolyticus* strains and 18 (16%) of 116 other *Vibrio* species. The optimal multiplicity of infection (MOI) of Vpas_PP24 was 0.000 1 and titer was 3.0×10^{10} PFU/mL. One-step growth curve indicated that it had a latent period of 10 min, rise period of 150 min, and burst size of 30 PFU/cell. The optimal temperature and pH for the phage growth were < 50 °C and pH 4.0–11.0, respectively. The phage was tolerant to chymotrypsin, papain, and shrimp hepatopancreas extract but sensitive to proteinase K. Vpas_PP24 was also sensitive to ultraviolet radiation. The emergence frequency of Vpas_PP24-insensitive mutants was 2×10^{-5} . **[Conclusion]** A virulent phage Vpas_PP24 with new genotype was screened out. It has the potential to be further developed into novel anti-*V. parahaemolyticus* agent, thanks to its broad lytic spectrum, biological properties, as well as its promising stability.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus* phage; biological characterization; whole-genome analysis

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种革兰氏阴性细菌,广泛存在于海水和水产养殖动物中,是一种典型的人鱼共患致病菌^[1]。在公共卫生方面,副溶血弧菌是我国引起食物中毒的最主要病原菌之一^[2]。在水产养殖特别是南美白对虾的养殖中,副溶血弧菌则是造成养殖失败的最主要因素之一。2009年以来,肆虐我国及东南亚南美白对虾主产国的对虾急性肝胰腺坏死病(acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)造成对虾大量死亡,给对虾养殖业带来了巨大的经济损失,其最主要病原菌就是副溶血弧菌^[3-4]。

抗生素类药物曾经是水产养殖中防治副溶血弧菌感染的首选药物,但抗生素的长期过量使用及滥用不仅造成耐药性细菌蔓延、药物残留和环境污染等一系列恶果,而且最终导致南美白对虾养殖陷于不可持续的窘境。南美白对虾高产稳产与国民日益增长的对绿色、健康、环保食品的需求之间的矛盾日益突出,因此亟须更加安全、有效、环保的方法来防治水产养殖中由副溶血弧菌引发的弧菌性疾病。

噬菌体(bacteriophage, phage)即原核生物的病毒^[5],在自然界中伴随细菌而存在,是细菌的天然制衡者,对维持自然界的生态系统平衡和物质循环至关重要^[6]。噬菌体分为烈性噬菌体(virulent phage)和温和噬菌体(temperate phage),烈性噬菌体侵染宿主后能快速将其裂解,同时自身获得几十至几百倍的增殖。由于噬菌体的天然性、专一性和安全性,早在抗生素发现应用之前,其就被用于细菌性疾病的治疗研究^[7]。目前,寻求抗生素之外的病原菌防治策略不仅是人类医学的课题,更是水产和畜禽养殖产业的紧迫需求,而噬菌体这一古老而现代的抗菌剂重新受到养殖界的广泛关注。本研究以实验室前期从南美白对虾病虾及养殖环境中分离的28株副溶血弧菌为宿主菌,采用双层琼

脂平板法从海鲜市场污水中分离效价高、裂解率高的噬菌体,并对其生物学性质进行研究,以期为后续噬菌体的开发及应用奠定理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 副溶血弧菌和其他弧菌

副溶血弧菌:28株分离株,本实验室保藏,分离自山东、江苏、浙江、福建、广东、广西等地区的南美白对虾病虾及养殖环境。

其他弧菌:116株,分离自上述各地南美白对虾病虾及养殖环境。

1.1.2 噬菌体分离样品

分离样品采集自青岛市内的城阳海鲜市场、南山海鲜市场等11个海鲜市场,以及广西壮族自治区南宁市7个海鲜市场的下水道污水。

1.1.3 培养基

2216E液体培养基和TCBS琼脂培养基购自青岛高科园海博生物技术有限公司;3×2216E液体培养基:2216E液体培养基112.30g,蒸馏水1000mL;2216E半固体培养基:2216E液体培养基37.43g,琼脂粉7.00g,蒸馏水1000mL;2216E固体培养基:2216E液体培养基37.43g,琼脂15.00g,蒸馏水1000mL。各培养基分别按对应商品培养基的建议条件进行灭菌。

1.1.4 主要试剂和仪器

PBS缓冲液参考丁同燕等^[8]方法配制,磷酸盐单独灭菌冷却后加入;噬菌体基因组提取试剂盒,上海源叶生物科技有限公司。生化培养箱,上海申贤恒温设备厂;洁净工作台,江苏安泰空气技术有限公司;恒温振荡器,苏州培英实验设备有限公司;台式离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 噬菌体的分离、纯化和增殖

噬菌体的分离、纯化和增殖参考丁同燕

等^[8]的方法。分别取污水样品 50 mL, 加入 50 mL 3×2216E 液体培养基, 再分别接种 28 株副溶血弧菌各 2 mL, 37 °C、180 r/min 振荡培养 12 h 进行噬菌体富集。富集液 8 000×g 离心 5 min, 取上清过 0.22 μm 滤膜备用。

分别取对数生长期(37 °C、180 r/min 培养 4 h, OD_{600} 约 0.6)的副溶血弧菌 100 μL 加入 5 mL 灭菌后 50 °C 保温的 2216E 半固体培养基中, 迅速混匀并倾注在 2216E 固体培养基平板上。待上层琼脂凝固后分别取富集液 5 μL 点种在各平板上。待富集液吸收后倒置平板于生化培养箱, 37 °C 培养 6–12 h, 检查各平板是否出现噬菌斑, 出现噬菌斑对应的副溶血弧菌即确定为宿主菌。

挑取噬菌斑上层琼脂于 1 mL 磷酸缓冲盐(phosphate-buffered saline, PBS)缓冲液中 40 °C 水浴浸提 30 min, 室温 8 000×g 离心 5 min, 上清液过 0.22 μm 无菌滤膜, 再用 PBS 缓冲液 10 倍比梯度稀释到适当浓度。分别取各梯度稀释液 100 μL 与 100 μL 对数期宿主菌悬液混匀, 37 °C 孵育 5 min 后加至 5 mL 50 °C 保温的 2216E 半固体培养基中, 迅速混匀并倾注在 2216E 固体培养基平板上, 37 °C 培养 6–12 h, 挑取单个噬菌斑纯化 3–5 次, 直至同一个平板上的噬菌斑大小、形态一致, 纯化即完成。

挑取纯化的单个噬菌斑同上浸提、离心、过滤除菌, 取滤液 100 μL 接种至 5 mL 2216E 液体培养基管中, 再接种对数期宿主菌液 100 μL, 37 °C、180 r/min 恒温振荡培养约 2–5 h, 直至试管中培养液变澄清并出现絮状沉淀时收获噬菌体增殖液。噬菌体增殖液同上离心、过滤除菌后, 于 4 °C 保存备用。

1.2.2 高裂解率噬菌体的筛选

各副溶血弧菌菌株培养至对数生长期(OD_{600} 约 0.6), 依次制作双层平板: 取菌液 100 μL

加入灭菌后 50 °C 保温的 5 mL 2216E 半固体培养基中, 混匀后倾注在 2216E 固体培养基平板上。待上层琼脂凝固后, 分别吸取噬菌体增殖液 5 μL 点在各平板上。置于生化培养箱 37 °C 培养 6–12 h, 观察点滴处是否出现噬菌斑。选取裂解副溶血弧菌数量最多的噬菌体进行后续研究^[9]。

1.2.3 噬菌体的透射电镜观察

将效价 $\geq 10^9$ PFU/mL 的噬菌体除菌增殖液送至青岛大学松山医院进行磷钨酸负染色法^[10]透射电镜(transmission electron microscopy, TEM)观察。

1.2.4 噬菌体裂解谱的测定

依 1.2.2 的方法测定噬菌体对实验室保藏的所有弧菌的裂解性, 重复 3 次, 统计得到噬菌体的裂解谱。

1.2.5 最佳感染复数的测定

2216E 液体培养基试管中依次接种噬菌体(1.0×10^8 PFU/mL)和对数期宿主菌(1.0×10^8 CFU/mL), 使感染复数(multiplicity of infection, MOI), 即噬菌体数/宿主菌数分别为 10、1、0.1、0.01、0.001、0.000 1、0.000 01, 37 °C、180 r/min 恒温振荡培养 12 h 后测定各组效价, 效价最高组所对应的感染复数即为最佳感染复数^[11]。采用双层琼脂法测定噬菌体效价: 噬菌体样品 10 倍比梯度稀释, 选取适当梯度的稀释液铺双层琼脂平板, 具体步骤同噬菌体的纯化; 选取噬菌斑数量在 30–300 之间的平板作为有效平板计算效价; 噬菌体效价(PFU/mL)=PFU×稀释倍数 $\times 10$ /mL^[12]。

1.2.6 一步生长曲线的测定

参考 Lu 等^[11]的方法, 将噬菌体增殖液(1×10^9 PFU/mL)与对数期宿主菌(1×10^8 CFU/mL)按照 MOI=10 的比例加入到 2216E 液体培养基中, 37 °C 孵育 10 min, 12 000 r/min 离心 30 s,

用 2216E 液体培养基洗涤沉淀 3 次,最后加入等体积 37 °C 保温的 2216E 液体培养基,37 °C、180 r/min 振荡培养,每隔 10 min 取样测定效价。以时间为横坐标、噬菌体效价的对数值为纵坐标,绘制噬菌体的一步生长曲线。暴发量=裂解末期噬菌体的效价/裂解初期宿主菌的浓度。

1.2.7 噬菌体不敏感突变频率的测定

参考 Gutiérrez 等^[13]的方法测定噬菌体不敏感突变频率(bacteriophage insensitive mutants frequency, BIMF)。分别各取 100 μL 新鲜培养的对数期宿主菌稀释液(1×10^5 CFU/mL)和噬菌体增殖液(1×10^8 PFU/mL)混匀,37 °C 水浴 10 min 后稀释涂布 TCBS 平板。以 PBS 缓冲液代替噬菌体增殖液为对照,同样方法处理后稀释涂布 TCBS 平板。37 °C 培养 12 h,统计 TCBS 平板上的菌落数(假定不敏感菌落数)。挑取平板上的所有菌落分别接种于 2216E 液体培养基,37 °C、180 r/min 培养 6 h,点斑法测定各菌落培养物对噬菌体的敏感性,统计不被裂解的菌落数(确定不敏感菌落数)。BIMF 为确定的不敏感菌落数量与总菌落数(对照平板)的比值。

1.2.8 噬菌体的温度稳定性

噬菌体增殖液分别于 40、50、60 和 70 °C 水浴中处理 20、40 和 60 min 后测定效价。

1.2.9 噬菌体的 pH 稳定性

使用 1 mol/L 盐酸和 1 mol/L 氢氧化钠溶液分别调节噬菌体增殖液的 pH 值至 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 和 12.0,37 °C 保温 1 h 和 24 h 后复调至 7.0 ± 0.5 ,测定效价^[8]。

1.2.10 噬菌体的蛋白酶稳定性

使用 PBS 缓冲液分别配制浓度为 20 mg/mL 的糜蛋白酶、木瓜蛋白酶和蛋白酶 K 溶液。取鲜活南美白对虾肝胰腺,加入 2 倍 PBS 缓冲液研磨匀浆,12 000 r/min 离心 10 min,取中层清

液为对虾肝胰腺蛋白酶粗提液。1:1 混合噬菌体增殖液和 3 种蛋白酶及对虾肝胰腺蛋白酶粗提液,37 °C 水浴 1 h 后测定效价。以 1:1 混合 PBS 缓冲液为对照,计算各组效价得率。

1.2.11 噬菌体的紫外辐照稳定性检测

分别吸取 5 mL 噬菌体增殖液于 90 mm 培养皿中使之形成均匀的薄液层,置超净工作台紫外灯管下方 30 cm 处去盖照射 0、5、10、15、20、25、30、40、50 和 60 min 后立即测定效价。以辐照时间为横坐标、效价为纵坐标绘制活性曲线^[8]。

1.2.12 噬菌体的全基因组测序分析

采用噬菌体基因组提取试剂盒(PEG 沉淀法),依推荐方法进行噬菌体基因组的提取,样品送至南京派森诺基因科技有限公司进行全基因组测序分析。全基因组序列在 NCBI 数据库中用 BLASTn 工具(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行基因组一致性比对;在 VFDB 数据库(<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>)中进行致病细菌毒力因子预测;在 CARD 数据库(<https://card.mcmaster.ca/>)中进行抗生素抗性基因预测;通过 Circoletto 在线工具(<http://tools.bat.infospire.org/circoletto/>)构建基因组序列比对环状图;使用在线工具 JSpeciesWS (<http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/>)对噬菌体全基因组序列进行平均核苷酸相似度(average nucleotide identity, ANI)分析;使用 BLASTp 工具(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对各开放阅读框(open reading frame, ORF)进行功能预测。

2 结果与分析

2.1 噬菌体的分离结果

从海鲜市场污水样品中共分离得到 61 株副溶血弧菌烈性噬菌体,各噬菌体可裂解副溶

血弧菌的数目如表 1 所示。

2.2 高裂解率噬菌体的筛选结果

对 61 株噬菌体和 28 株副溶血弧菌进行交叉裂解, 筛选出一株能裂解 15 株副溶血弧菌的噬菌体, 裂解率为 54%, 参考 Adriaenssens 等^[14]

所述噬菌体命名规则将其命名为 Vpas_PP24。噬菌体 Vpas_PP24 的原始宿主菌为副溶血弧菌 VP8, 是一株含有 *PirA* 基因的 AHPND 致病型副溶血弧菌。该噬菌体在 2216E 双层平板上培养 12 h 形成了直径约 2 mm 的噬菌斑(图 1)。

表 1 噬菌体的分离

Table 1 Phage isolation

噬菌体 Phage	噬菌斑形态 Plaque morphology	噬菌体 Phage	噬菌斑形态 Plaque morphology
Vpas_PP1	透亮小斑 Small and bright	Vpas_PP32	模糊小斑 Small and fuzzy
Vpas_PP2	透亮小斑 Small and bright	Vpas_PP33	透亮小斑 Small and bright
Vpas_PP3	透亮小斑 Small and bright	Vpas_PP34	模糊小斑 Small and fuzzy
Vpas_PP4	模糊大斑 Big and fuzzy	Vpas_PP35	透亮小斑 Small and bright
Vpas_PP5	模糊小斑 Small and fuzzy	Vpas_PP36	模糊小斑 Small and fuzzy
Vpas_PP6	模糊小斑 Small and fuzzy	Vpas_PP37	透亮小斑 Small and fuzzy
Vpas_PP7	模糊小斑 Small and fuzzy	Vpas_PP38	模糊小斑 Small and fuzzy
Vpas_PP8	模糊小斑 Small and fuzzy	Vpas_PP39	模糊小斑 Small and fuzzy
Vpas_PP9	模糊大斑 Big and fuzzy	Vpas_PP40	模糊小斑 Small and fuzzy
Vpas_PP10	透亮大斑, 有晕环 Big and transparent with halo rings	Vpas_PP41	模糊小斑 Small and fuzzy
Vpas_PP11	模糊小斑 Small and fuzzy	Vpas_PP42	透亮小斑 Small and bright
Vpas_PP12	透亮小斑 Small and bright	Vpas_PP43	透亮小斑 Small and bright
Vpas_PP13	透亮小斑 Small and bright	Vpas_PP44	模糊小斑 Small and fuzzy
Vpas_PP14	透亮小斑 Small and bright	Vpas_PP45	模糊小斑 Small and fuzzy
Vpas_PP15	透亮小斑 Small and bright	Vpas_PP46	模糊小斑 Small and fuzzy
Vpas_PP16	透亮小斑 Small and bright	Vpas_PP47	模糊小斑 Small and fuzzy
Vpas_PP17	透亮小斑 Small and bright	Vpas_PP48	模糊小斑 Small and fuzzy
Vpas_PP18	透亮小斑 Small and bright	Vpas_PP49	模糊小斑 Small and fuzzy
Vpas_PP19	透亮小斑 Small and bright	Vpas_PP50	透亮小斑 Small bright spot
Vpas_PP20	模糊大斑 Big and fuzzy	Vpas_PP51	模糊小斑 Small and fuzzy
Vpas_PP21	模糊小斑 Small and fuzzy	Vpas_PP52	模糊小斑 Small and fuzzy
Vpas_PP22	模糊小斑 Small and fuzzy	Vpas_PP53	透亮小斑 Small and bright
Vpas_PP23	模糊小斑 Small and fuzzy	Vpas_PP54	透亮小斑 Small and bright
Vpas_PP24	透亮小斑 Small and bright	Vpas_PP55	透亮小斑 Small and bright
Vpas_PP25	模糊大斑 Big and fuzzy	Vpas_PP56	透亮小斑 Small and bright
Vpas_PP26	透亮大斑, 有晕环 Big and transparent with halo rings	Vpas_PP57	模糊大斑 Big and fuzzy
Vpas_PP27	模糊小斑 Small and fuzzy	Vpas_PP58	模糊大斑 Big and fuzzy
Vpas_PP28	模糊大斑 Big and fuzzy	Vpas_PP59	透亮小斑 Small and bright
Vpas_PP29	透亮小斑 Small and bright	Vpas_PP60	模糊小斑 Small and fuzzy
Vpas_PP30	模糊小斑 Small and fuzzy	Vpas_PP61	模糊小斑 Small and fuzzy
Vpas_PP31	透亮小斑 Small and bright		



图1 噬菌体 Vpas_PP24 在 2216E 双层平板上的噬菌斑

Figure 1 Plaques of phage Vpas_PP24 on 2216E double layer plate.

2.3 噬菌体 Vpas_PP24 的透射电镜观察

透射电镜观察结果显示(图 2), 噬菌体 Vpas_PP24 头部呈二十面体结构, 长约 92 nm, 宽约 46 nm, 尾部长约 147 nm, 尾部宽约 5 nm。根据《国际病毒分类委员会第 9 次报告》所述噬菌体分类与命名标准^[15], 噬菌体 PP24 的分类符合有尾噬菌体目(Caudovirales)长尾噬菌体科(Siphoviridae)。

表 2 噬菌体 Vpas_PP24 的裂解谱

Table 2 Lysis profile of bacteriophage Vpas_PP24

弧菌种类	数量	Vpas_PP24 裂解数	裂解率
Vibrio species	Amount	The amount that can lysed by Vpas_PP24	The ratio that can be lysed (%)
<i>Vibrio alginolyticus</i>	67	6	9
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	28	15	54
<i>Vibrio neocaledonicus</i>	10	2	20
<i>Vibrio owensii</i>	7	2	29
<i>Vibrio antiquarius</i>	5	3	60
<i>Vibrio mimicus</i>	5	0	0
<i>Vibrio fluvius</i>	4	1	25
<i>Vibrio campbellii</i>	3	1	33
<i>Vibrio vulnificus</i>	3	1	33
<i>Vibrio harveyi</i>	2	1	50
<i>Vibrio hyugaensis</i>	1	1	100
<i>Vibrio chemaguriensis</i>	1	0	0
<i>Vibrio cholerae</i>	1	0	0
<i>Vibrio diabolicus</i>	1	0	0
<i>Vibrio hepatarius</i>	1	0	0
<i>Vibrio injenensis</i>	1	0	0
<i>Vibrio natriegens</i>	1	0	0
<i>Vibrio pelagius</i>	1	0	0
<i>Vibrio plantisponsor</i>	1	0	0
<i>Vibrio tubiashii</i>	1	0	0

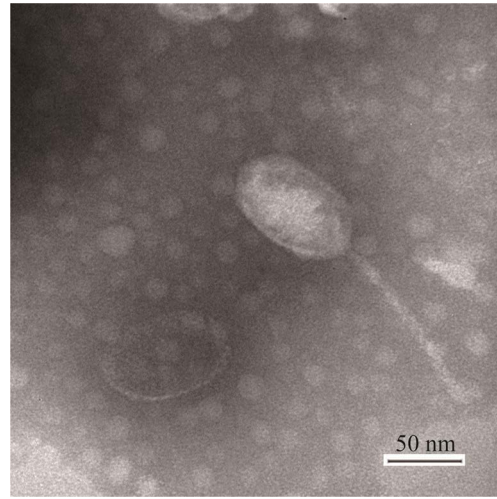


图 2 噬菌体 Vpas_PP24 的透射电镜照片

Figure 2 The transmission electron micrograph of bacteriophage Vpas_PP24.

2.4 噬菌体 Vpas_PP24 的裂解谱

噬菌体 Vpas_PP24 对实验室保藏的 144 株弧菌的裂解性实验结果(表 2)表明, 该噬菌体可裂解 28 株副溶血弧菌中的 15 株, 裂解率为 54%; 可裂解其他种属的 116 株弧菌 18 株, 裂解率为 16%。

2.5 噬菌体 Vpas_PP24 的最佳感染复数

如表 3 所示, 当 MOI=0.000 1 时噬菌体增殖液的效价最高, 为 3.0×10^{10} PFU/mL, 即噬菌体 Vpas_PP24 对宿主菌 VP8 的最佳感染复数为 0.000 1。

2.6 噬菌体 Vpas_PP24 的一步生长曲线

如图 3 所示, 噬菌体 Vpas_PP24 感染宿主后 10 min 内效价变化不明显, 说明潜伏期约为 10 min。10–160 min 效价开始快速上升, 之后趋于稳定, 说明裂解期约为 150 min。根据暴发量=裂解末期噬菌体效价/裂解初期宿主菌浓度, 计算得到 Vpas_PP24 的平均暴发量约为 30 PFU/cell。

2.7 噬菌体 Vpas_PP24 的不敏感突变频率

依 1.2.7 实验方法进行不敏感突变频率的测定, 结果显示浓度为 5.0×10^5 CFU/mL 的宿主菌液中出现 10 个对噬菌体不敏感的突变株。计算可得宿主菌 VP8 对噬菌体 Vpas_PP24 的不敏感突变频率为 2.0×10^{-5} 。

2.8 噬菌体 Vpas_PP24 的温度稳定性

如图 4 所示, 噬菌体 Vpas_PP24 在 40 °C 条件下活性稳定, 50 °C 条件下活性缓慢下降, 60 °C 条件下活性快速下降, 70 °C 处理 20 min 则完全失活。结果说明 Vpas_PP24 的温度稳定性良好。

表 3 噬菌体 Vpas_PP24 最佳感染复数

Table 3 The optimal MOI of bacteriophage Vpas_PP24

噬菌体浓度 Phage (PFU/mL)	宿主菌浓度 Host bacteria (CFU/mL)	感染复数 MOI	效价 Titer (PFU/mL)
1.0×10^8	1.0×10^7	10	5.4×10^9
1.0×10^8	1.0×10^8	1	2.6×10^{10}
1.0×10^7	1.0×10^8	0.1	2.3×10^{10}
1.0×10^6	1.0×10^8	0.01	2.6×10^{10}
1.0×10^5	1.0×10^8	0.001	2.0×10^{10}
1.0×10^4	1.0×10^8	0.000 1	3.0×10^{10}
1.0×10^3	1.0×10^8	0.000 01	2.9×10^{10}

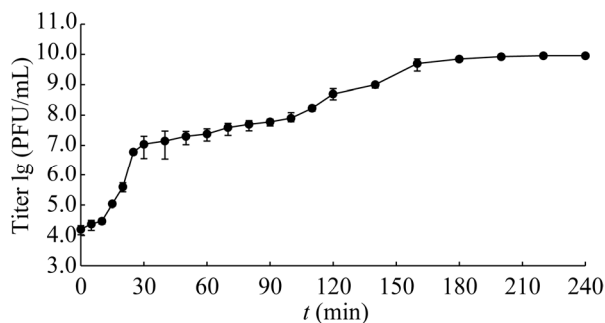


图 3 噬菌体 Vpas_PP24 一步生长曲线

Figure 3 The one-step growth curve of bacteriophage Vpas_PP24.

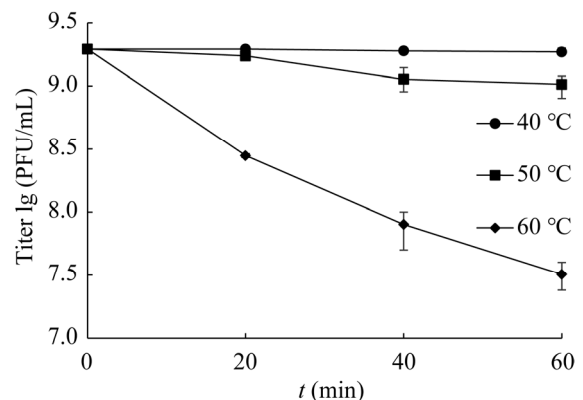


图 4 噬菌体 Vpas_PP24 的温度稳定性

Figure 4 The temperature stability of bacteriophage Vpas_PP24.

2.9 噬菌体 Vpas_PP24 的 pH 稳定性

如图 5 所示, 噬菌体 Vpas_PP24 在 pH 4.0–11.0 的缓冲液中 37 °C 处理 1 h 能够保持活性稳定, 效价 $\geq 3.7 \times 10^7$ PFU/mL, 当 pH ≤ 3.0 时完全失活, 当 pH 值为 12.0 时效价降至 2.7×10^5 PFU/mL。处理时间延长至 24 h, 该噬菌体在 pH 5.0–11.0 范围内活性依然稳定, 效价 $\geq 7.3 \times 10^7$ PFU/mL。结果说明噬菌体 Vpas_PP24 具有较宽的 pH 适应范围。

2.10 噬菌体 Vpas_PP24 的蛋白酶稳定性

对比噬菌体对糜蛋白酶、木瓜蛋白酶、蛋白酶 K 及对虾肝胰腺提取液的稳定性, 结果如图 6 所示, 对虾肝胰腺提取液处理对噬菌体的活性无影响, 糜蛋白酶和木瓜蛋白酶处理后效价小幅下降, 而经过蛋白酶 K 37 °C 处理 1 h 后噬菌体的效价损失达到 92.7%。这说明噬菌体 Vpas_PP24 对蛋白酶 K 较为敏感。

2.11 噬菌体 Vpas_PP24 的紫外辐照稳定性

如图 7 所示, 紫外辐照 15 min 内噬菌体增殖液效价呈指数级下降, 由初始的 3.0×10^8 PFU/mL 快速下降至 4.4×10^6 PFU/mL, 15–60 min 效价

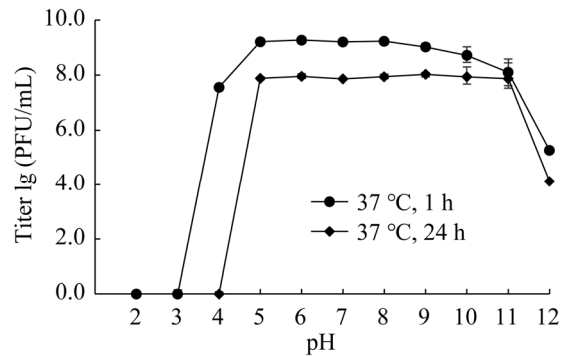


图 5 噬菌体 Vpas_PP24 的 pH 稳定性

Figure 5 The pH stability of bacteriophage Vpas_PP24.

缓慢下降至 1.3×10^5 PFU/mL。说明噬菌体 Vpas_PP24 对紫外辐照的稳定性较差。

2.12 噬菌体 Vpas_PP24 的全基因组测序分析

全基因组测序结果显示, 噬菌体 Vpas_PP24 的核酸类型为双链线型 DNA, 基因组的大小为 83 482 bp, G+C 含量为 45.81%, 预测含有 118 个开放阅读框, 不含非编码 RNA。细菌毒力基因预测和抗生素抗性基因预测结果显示噬菌体 Vpas_PP24 不含毒力基因和抗性基因。噬菌体 Vpas_PP24 的基因组核酸序列 NCBI 登录号为 ON015836。

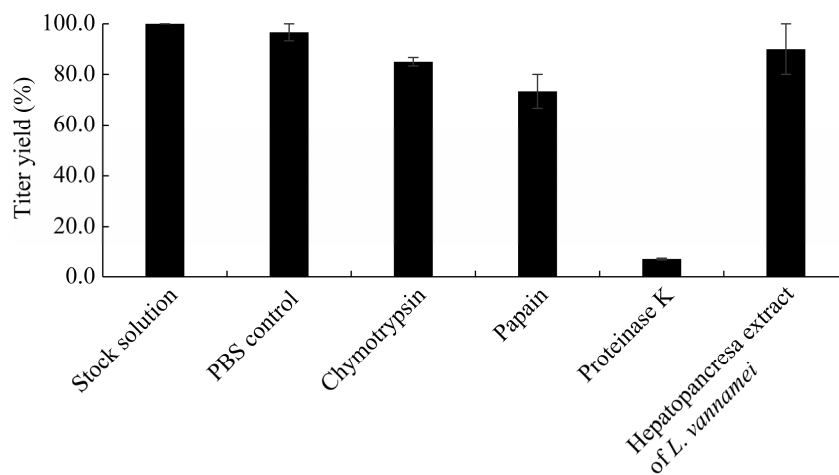


图 6 噬菌体 Vpas_PP24 的蛋白酶稳定性

Figure 6 The protease stability of bacteriophage Vpas_PP24.

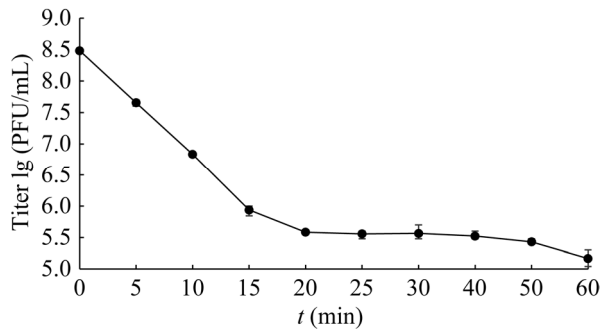


图 7 噬菌体 Vpas_PP24 的紫外辐照稳定性
Figure 7 The UV radiation stability of bacteriophage Vpas_PP24.

2.13 噬菌体 Vpas_PP24 的基因组一致性对比

噬菌体 Vpas_PP24 的全基因组核苷酸序列 BLASTn 结果如表 4 所示, 有 2 株弧菌噬菌体

(*Vibrio* phage vB_VhaS-VHB1 和 *Vibrio* phage SIO-2) 的基因组与其覆盖率和相似度较高, 覆盖率均为 91%, 相似度分别为 85.32% 和 85.29%。Vpas_PP24 与上述 2 株噬菌体的核苷酸序列比对环状图如图 8 所示。参考 Adriaenssens 等^[14]所述全基因组相似性聚类规则, 噬菌体 Vpas_PP24 与 *Vibrio* phage vB_VhaS-VHB1 和 *Vibrio* phage SIO-2 可归为同一属(全基因组核苷酸序列相似度 > 50%), 但不是同一物种(全基因组核苷酸序列相似度 < 95%)。进一步进行 ANI 分析的结果显示, 噬菌体 Vpas_PP24 与 *Vibrio* phage vB_VhaS-VHB1 和 *Vibrio* phage SIO-2 的 ANI 值分别为 85.13% 和 85.12% (图 9), 参考 Jain 等^[16]研究结果可以得出相同结论。以上结果表明噬菌体 Vpas_PP24 可能为弧菌噬菌的一个新种。

表 4 噬菌体 Vpas_PP24 基因组一致性对比

Table 4 The genomic homology comparison of bacteriophage Vpas_PP24

Description	Query cover (%)	E value	Identity (%)	Accession No.
<i>Vibrio</i> phage vB_VhaS-VHB1	91	0	85.32	MT451873.1
<i>Vibrio</i> phage SIO-2	91	0	85.29	HQ316604.1
<i>Vibrio</i> phage vB_VhaS-a	47	0	76.96	KX198615.1
<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_sm030	3	0	75.31	OV032860.1
<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_VP-RY-9	4	0	75.23	MW411580.1
<i>Vibrio</i> phage vB_ValP_VA-RY-4	3	0	74.97	OK483199.1
<i>Vibrio alginolyticus</i> phage vB_ValS_PJ32	5	0	74.69	MT735629.1
<i>Vibrio</i> phage 1	2	9.00E-178	79.14	JF713456.1
<i>Vibrio</i> phage Ares 1	2	1.00E-156	77.67	MG720309.1
<i>Vibrio</i> phage VH2_2019	1	2.00E-74	73.38	MN794238.1
<i>Vibrio</i> phage J14	0	7.00E-60	75.33	KY022433.1
<i>Vibrio</i> phage vB_VcaS_HC	0	2.00E-40	76.99	MK559459.1
<i>Vibrio</i> phage 1.215.B._10N.222.54.F7	0	2.00E-39	76.83	MG592586.1
<i>Vibrio</i> phage 1.215.A._10N.222.54.F7	0	2.00E-39	76.83	MG592585.1

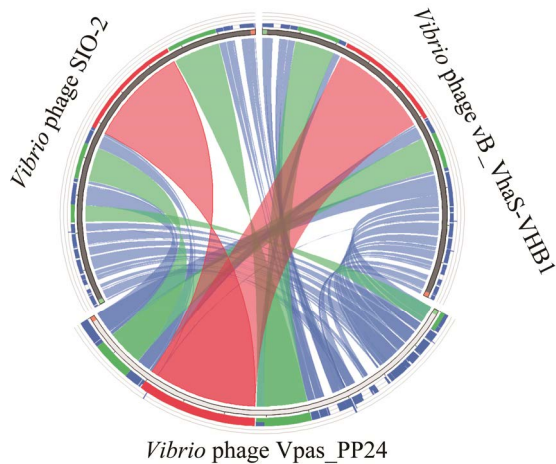


图 8 噬菌体 Vpas_PP24 的全基因组核苷酸序列比对环状图 蓝色、绿色、红色分别代表相似性 $\leq 50\%$, $\leq 75\%$, $\leq 99.999\%$

Figure 8 The circle diagram of whole-genome nucleotide sequence alignment of bacteriophage Vpas_PP24. The colors blue, green, and red represent similarity $\leq 50\%$, $\leq 75\%$, $\leq 99.999\%$, respectively.

2.14 噬菌体 Vpas_PP24 蛋白编码基因功能注释

使用 BLASTp 工具对噬菌体 Vpas_PP24 的 118 个 ORF 进行功能分析,结果显示有 116 个 ORF 能在 NCBI NR 数据库(non-redundant protein sequence database)中找到同源蛋白,其中 13 个为已知功能蛋白(表 5),这些蛋白均为噬菌体结构蛋白和核酸代谢相关蛋白。值得注

意的是该噬菌体 13 个已知功能蛋白中未发现内容素蛋白。

3 讨论与结论

噬菌体在环境中依赖宿主菌而存在,因此,分离副溶血弧菌的理想环境是可能存在副溶血弧菌的南美白对虾等养殖环境或海鲜市场污水。然而,前者可能由于长期使用各种药物进行防治,对水质有所影响,使得分离出的噬菌体的数量较少;而后者中抗菌药物水平相对较低,其中弧菌和噬菌体较前者含量丰富,而且采样方便简单,易分离,因而被广泛采用。本研究采用双层琼脂平板法,以 28 株病虾源副溶血弧菌为潜在宿主菌,对青岛市和南宁市的 18 个海鲜市场污水样品进行交叉筛选,最终分离到 61 株烈性噬菌体,并从中筛选得到一株裂解谱较宽的噬菌体,命名为 *Vibrio phage Vpas_PP24*,证明了分离来源和分离方法的有效性。

噬菌体的分类主要借助于电镜观察和基因型分析。已报道的副溶血弧菌噬菌体主要为有尾噬菌体目,其中包含长尾噬菌体科、肌尾噬菌体科和短尾噬菌体科。本研究筛选的副溶血弧菌噬菌体 Vpas_PP24 鉴定为长尾噬菌体科。基因组功能元件预测显示噬菌体 Vpas_PP24 不含有细菌毒力因子和抗生素抗性因子,说明该噬

ANiB Matrix		ANiB Result by Genome	
Show ANiB values [%] ▾		Download as .csv	
		Legend: Above cutoff (> 95%) Below cutoff (< 95%) Suspicious alignment!	
	Vpas_PP24.fasta	Vibrio phage vB_VhaS-VHB1.fasta	Vibrio phage SIO-2.fasta
Vpas_PP24.fasta	*	85.13	85.12
Vibrio phage vB_VhaS-VHB1.fasta	84.93	*	97.12
Vibrio phage SIO-2.fasta	85.15	97.15	*

图 9 噬菌体 Vpas_PP24 的 ANI 分析结果

Figure 9 The results of ANI analysis of bacteriophage Vpas_PP24.

表 5 噬菌体 Vpas_PP24 的蛋白编码基因的 NR 注释
Table 5 NR annotation of protein-coding genes of Vpas_PP24

ORF	功能 Function	最匹配噬菌体 Best match phage	相似度 Identity (%)	E 值 E value	登录号 GenBank accession No.
51	腺苷琥珀酸合酶 Adenylosuccinate synthase	<i>Vibrio</i> phage vB_VhaS-VHB1	89.26	5.13E-180	QKE60692.1
55	转运结合蛋白 Transport and binding protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VhaS-VHB1	84.04	1.66E-199	QKE60696.1
56	主要衣壳蛋白 Major capsid protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VhaS-VHB1	99.36	6.24E-219	QKE60697.1
63	尾部卷尺测量蛋白 Tail tape measure protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VhaS-VHB1	96.73	0.00E+00	QKE60705.1
74	DNA 结合蛋白 DNA binding protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VhaS-VHB1	94.51	0.00E+00	QKE60716.1
76	DNA 解旋酶 DNA helicase	<i>Vibrio</i> phage vB_VhaS-VHB1	94.61	0.00E+00	QKE60716.1
81	DNA 结合蛋白 DNA binding protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VhaS-VHB1	88.55	2.10E-79	QKE60723.1
83	RecA	<i>Vibrio</i> phage vB_VhaS-VHB1	97.77	5.88E-258	QKE60725.1
86	核糖核酸酶 Ribonuclease	<i>Vibrio</i> phage vB_VhaS-VHB1	95.19	2.02E-129	QKE60728.1
96	丙酮酸磷酸双激酶 Pyruvate phosphate dikinase	<i>Vibrio</i> phage vB_VhaS-VHB1	85.90	0.00E+00	QKE60738.1
101	聚合酶 Polymerase	<i>Vibrio</i> phage SIO-2	98.47	0.00E+00	YP_004957553.1
102	衣壳门户蛋白 Capsid portal protein	<i>Vibrio</i> phage SIO-2	94.52	0.00E+00	YP_004957552.1
103	门户蛋白 Portal protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VhaS-VHB1	95.80	7.53E-244	QKE60745.1

菌体安全性高、对环境友好。NR 注释结果显示 118 个蛋白编码基因中只有 13 个为已知功能蛋白,说明该噬菌体有待进一步研究。基因组一致性分析显示该噬菌体 Vpas_PP24 与 NCBI 数据库中的弧菌噬菌体 *Vibrio* phage vB_VhaS-VHB1 和 *Vibrio* phage SIO-2 相似度最高,为 85.3%,在分类上同属但不同种。其中, *Vibrio* phage vB_VhaS-VHB1 尚无相关文献报道, *Vibrio* phage SIO-2 则为一株长尾科噬菌体,其头部为正二十面体,直径为 (81±4) nm,尾长 (209±16) nm,尾宽(11±2) nm^[17],该形态尺寸与 Vpas_PP24 差异较大。此外, *Vibrio* phage SIO-2 的宿主范围主要为哈维氏弧菌类群^[17] (哈维氏

弧菌、坎贝氏弧菌等), Vpas_PP24 除主要裂解副溶血弧菌外,也可裂解部分哈维氏弧菌类群的弧菌(表 1)。对比 Vpas_PP24 和 *Vibrio* phage SIO-2 的蛋白编码基因功能注释结果,发现二者的差异也较大。这些比对进一步显示了噬菌体 Vpas_PP24 与已知噬菌体的差异性。

噬菌体具有宿主专一性,因此,筛选具有高裂解率的噬菌体是进行后续开发应用的关键。目前已报道的副溶血弧菌噬菌体的裂解率高低不等,如江艳华等^[18]从贝类样品中分离到一株副溶血弧菌噬菌体,对 22 株副溶血弧菌的裂解率为 32%;郑小双等^[19]从污水样品中分离到 5 株噬菌体,对 42 株副溶血弧菌的最高裂解

率为 57%；乔欢等^[20]测定了 3 株噬菌体对 84 株副溶血弧菌的裂解率，最高达 89%。本研究筛选的噬菌体 Vpas_PP24 对 28 株副溶血弧菌的裂解率为 54%，属于中等水平。然而，特别说明的是，在进行噬菌体筛选之前，对实验所用 28 株副溶血弧菌进行了毒力基因筛查，结果发现了 4 株携带对虾肝胰腺坏死病致病基因 *PirA* 的副溶血弧菌；而噬菌体 Vpas_PP24 可裂解其中的 3 株，这或许意味着噬菌体 Vpas_PP24 在实际应用中将会拥有更强的针对性。此外，通过表 1 可以看出，噬菌体 Vpas_PP24 还可裂解多株其他种的对虾致病性弧菌，如 *Vibrio alginolyticus*^[21]、*Vibrio owensii*^[22]、*Vibrio campbellii*^[23]等，具有一定的跨种裂解能力，这一特点或许能增强该噬菌体在水产养殖中的应用潜力。

噬菌体 Vpas_PP24 的最佳感染复数、暴发量、温度稳定性、pH 稳定性等生物学特性与已报道的副溶血弧菌噬菌体相近，能适应噬菌体制剂对稳定性的要求。值得注意的是，在开发噬菌体制剂时，宿主细菌对噬菌体的不敏感突变频率常常是一个考量点。细菌与噬菌体经历了数十亿年的互相进化，不敏感突变是细菌对噬菌体的正常防御机制^[24]，宿主细菌对噬菌体的不敏感突变频率较高时会导致噬菌体在封闭环境中应用效果的持续下降。本研究测得宿主菌 VP8 对噬菌体 Vpas_PP24 的不敏感突变频率为 2×10^{-5} ，与郑小双等^[19]的研究相比属于正常值。在实际应用中为应对宿主菌的不敏感突变，在制取噬菌体产品时经常采用多株噬菌体混配的鸡尾酒疗法^[25]，甚至采取噬菌体与其他抗菌剂协同使用。本研究室目前正在分析 Vpas_PP24 与抗弧菌多肽混配的互作及可行性^[26-27]。

为挖掘在饲料中的应用潜力，对噬菌体 Vpas_PP24 的蛋白酶稳定性进行了试验。研究

结果表明，在南美白对虾养殖中，噬菌体 Vpas_PP24 能耐受虾肝胰腺消化系统酶类的处理，并表现出对糜蛋白酶、木瓜蛋白酶较好的耐受性，但是蛋白酶 K 则会严重影响噬菌体活性，说明该噬菌体不宜与含蛋白酶 K 的酶制剂同时使用。

噬菌体具有增殖能力强、副作用小、不会造成二次污染、不受细菌多重耐药性影响等优势，其研制开发周期短、成本低，是一种潜在的安全有效的生物防治方法。本研究从海鲜市场污水中分离得到一株强裂解性副溶血弧菌噬菌体 Vpas_PP24，并对其生物学特性和全基因组序列进行了系统分析及表征，为分离、研究应用裂解性副溶血弧菌噬菌体研究提供了方法参考。所筛选得到的噬菌体 Vpas_PP24 能有效裂解对虾养殖环境中常见的致病副溶血弧菌，而且表现出一定的抗逆性，有进一步开发成为抗致病副溶血弧菌产品的潜力。

REFERENCES

- [1] 赵怀龙, 付留杰, 唐功臣. 我国主要的食源性致病菌[J]. 医学动物防制, 2012, 28(11): 1212-1216
Zhao HL, Fu LJ, Tang GC. Main foodborn pathogens in our country[J]. Journal of Medical Pest Control, 2012, 28(11): 1212-1216 (in Chinese)
- [2] 李红秋, 郭云昌, 宋壮志, 马永忠, 陆冬磊, 袁秀娟, 郭晚花, 邹晶, 刘继开, 李薇薇, 等. 2019 年中国大陆食源性疾病暴发监测资料分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2021, 33(6): 650-656
Li HQ, Guo YC, Song ZZ, Ma YZ, Lu DL, Yuan XJ, Guo WH, Zou J, Liu JK, Li WW, et al. Analysis of foodborne disease outbreaks in China in 2019[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2021, 33(6): 650-656 (in Chinese)
- [3] Tran L, Nunan LD, Redman RM, Mohny LL, Pantoja CR, Fitzsimmons K, Lightner DV. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2013, 105(1): 45-55
- [4] Joshi J, Srisala J, Truong VH, Chen IT, Nuangsaeng B, Suthienkul O, Lo CF, Flegel TW, Sritunyalucksana K,

- Thitamadee S. Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)[J]. *Aquaculture*, 2014, 428/429: 297-302
- [5] 周德庆. 微生物学教程[M]. 4版. 北京: 高等教育出版社, 2020
Zhou DQ. *Essential Microbiology*[M]. 4th ed. Beijing: Higher Education Press, 2020 (in Chinese)
- [6] Breitbart M, Rohwer F. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus?[J]. *Trends in Microbiology*, 2005, 13(6): 278-284
- [7] Clark JR, March JB. Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials[J]. *Trends in Biotechnology*, 2006, 24(5): 212-218
- [8] 丁同燕, 孙虎芝, 王倩, 付静芸, 邱丽萍, 宋晓娜, 潘强, 张召佐, 任慧英. 副溶血弧菌及其噬菌体 vB_{Vp}S_PG08 的分离鉴定[J]. *中国兽医学报*, 2019, 55(12): 7-11
Ding TY, Sun HZ, Wang Q, Fu JY, Qiu LP, Song XN, Pan Q, Zhang ZZ, Ren HY. Isolation and identification of *Vibrio parahaemolyticus* and its bacteriophage vB_{Vp}S_PG08[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2019, 55(12): 7-11 (in Chinese)
- [9] 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
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)
- [10] 余茂劭, 司释东. 噬菌体实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1991
Yu MX, Si ZD. *Phage Assay Technology*[M]. Beijing: Science Press, 1991 (in Chinese)
- [11] Lu Z, Breidt F Jr, Fleming HP, Altermann E, Klaenhammer TR. Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, ΦJL-1, from a cucumber fermentation[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 84(2): 225-235
- [12] 徐德强, 王英明, 周德庆. 微生物学实验教程[M]. 4版. 北京: 高等教育出版社, 2019
Xu DQ, Wang YM, Zhou DQ. *Microbiology Experiment*[M]. Beijing: Higher Education Press, 2019 (in Chinese)
- [13] Gutiérrez D, Vandenheuvel D, Martínez B, Rodríguez A, Lavigne R, García P. Two phages, phiIPLA-RODI and phiIPLA-C1C, lyse mono- and dual-species staphylococcal biofilms[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(10): 3336-3348
- [14] Adriaenssens E, Brister JR. How to name and classify your phage: an informal guide[J]. *Viruses*, 2017, 9(4): 70
- [15] 冯焯, 刘军, 孙洋, 冯书章. 噬菌体最新分类与命名[J]. *中国兽医学报*, 2013, 33(12): 1954-1958
Feng Y, Liu J, Sun Y, Feng SZ. An introduction to current classification and nomenclature of bacterial viruses[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2013, 33(12): 1954-1958 (in Chinese)
- [16] Jain C, Rodriguez-R LM, Phillippy AM, Konstantinidis KT, Aluru S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 5114
- [17] Baudoux AC, Hendrix RW, Lander GC, Bailly X, Podell S, Paillard C, Johnson JE, Potter CS, Carragher B, Azam F. Genomic and functional analysis of *Vibrio* phage SIO-2 reveals novel insights into ecology and evolution of marine siphoviruses[J]. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(8): 2071-2086
- [18] 江艳华, 王联珠, 李凤铃, 曲梦, 郭莹莹, 翟毓秀, 姚琳. 1株副溶血性弧菌裂解性噬菌体 VpJYP2 的生物学特性及应用[J]. *食品科学*, 2020, 41(14): 146-152
Jiang YH, Wang LZ, Li FL, Qu M, Guo YY, Zhai YX, Yao L. Biological properties and application of a lytic *Vibrio parahaemolyticus* phage[J]. *Food Science*, 2020, 41(14): 146-152 (in Chinese)
- [19] 郑小双, 高璐, 张辉, 饶胜其, 杨振泉. 副溶血性弧菌广谱裂解性噬菌体的筛选及其在海产品安全控制中的应用[J]. *食品科学*, 2019, 40(10): 141-148
Zheng XS, Gao L, Zhang H, Rao SQ, Yang ZQ. Screening for broad-spectrum lytic phage against *Vibrio parahaemolyticus* and its application to marine products[J]. *Food Science*, 2019, 40(10): 141-148 (in Chinese)
- [20] 乔欢, 徐旭凌, 费文斌, 黄杰, 陈海, 胡怿林, 丛郁. 三株 AHPND 致病型副溶血性弧菌烈性噬菌体的分离鉴定及其生物学特性[J]. *水产学报*, 2019, 43(5): 1378-1396
Qiao H, Xu XL, Fei WB, Huang J, Chen H, Hu YL, Cong Y. Isolation, identification and biological properties of 3 lytic bacteriophages against AHPND-associated *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(5): 1378-1396 (in Chinese)
- [21] 陈强, 鄢庆彬, 马牲. 溶藻弧菌致病性研究进展[J]. *海洋科学*, 2006, 30(8): 83-89
Chen Q, Yan QP, Ma S. Progress on pathogenicity

- research of *Vibrio alginolyticus*[J]. Marine Sciences, 2006, 30(8): 83-89 (in Chinese)
- [22] Liang XS, Zhou L, Yan SL, Wang YJ. Complete genome sequence analysis of the *Vibrio owensii* strain SH-14 isolated from shrimp with acute hepatopancreatic necrosis disease[J]. Archives of Microbiology, 2020, 202(5): 1097-1106
- [23] 侯巧利, 王庚申, 谢建军, 施慧, 许文军. 引起舟山地区凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死病原的分离与鉴定[J]. 浙江海洋大学学报(自然科学版), 2021, 40(1): 42-51
Hou QL, Wang GS, Xie JJ, Shi H, Xu WJ. Isolation and identification of bacterial pathogen associated with acute hepatopancreas necrosis diseased in *Litopenaeus vannamei* in Zhoushan[J]. Journal of Zhejiang Ocean University: Natural Science, 2021, 40(1): 42-51 (in Chinese)
- [24] Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms[J]. Nature Reviews Microbiology, 2010, 8(5): 317-327
- [25] 罗巧慧, 兰翠英, 邓继彦, 魏堂鸿, 罗何峰. 噬菌体在畜禽养殖中应用的研究进展[J]. 中国饲料, 2020(21): 57-62
Luo QH, Lan CY, Deng JY, Wei TH, Luo HF. Research progress of application on bacteriophage in livestock and poultry breeding[J]. China Feed, 2020(21): 57-62 (in Chinese)
- [26] Torres-Barceló C, Franzon B, Vasse M, Hochberg ME. Long-term effects of single and combined introductions of antibiotics and bacteriophages on populations of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Evolutionary Applications, 2016, 9(4): 583-595
- [27] Heo S, Kim MG, Kwon M, Lee HS, Kim GB. Inhibition of *Clostridium perfringens* using bacteriophages and bacteriocin producing strains[J]. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 2018, 38(1): 88-98