

DOI:10.13350/j.cjpb.230906

• 论著 •

嗜麦芽窄食单胞菌裂解性噬菌体 TS-10 的特性及其对细菌生物膜作用研究

田爽^{1,2}, 赵树川¹, 赵雪利¹, 赵春燕¹, 黄红兰^{1*}

(1. 吉林大学基础医学院病原生物学系, 吉林长春 130021; 2. 黑龙江省科学院微生物研究所)

【摘要】 **目的** 从湖水中分离特异性针对嗜麦芽窄食单胞菌的噬菌体, 分析其生物学特性, 并检测其对细菌生物膜的裂解作用。 **方法** 通过双层琼脂平板法对噬菌体进行分离并纯化, 用透射电镜观察其形态, 并测定其最佳感染复数、一步生长曲线、温度及酸碱稳定性。提取基因组 DNA 进行测序分析, 采用生物膜形成抑制试验和裂解试验观察噬菌体对嗜麦芽窄食单胞菌生物膜的影响。 **结果** 嗜麦芽窄食单胞菌噬菌体 TS-10 呈现出典型的蝌蚪状外形, 头部为正二十面体结构, TS-10 头部直径为 110~115 nm, 尾部长 120~125 nm。TS-10 最佳感染复数为 0.01, 潜伏期为 15 min, 裂解期为 65 min。TS-10 可在 60 °C、pH 4~11 的环境中存活。TS-10 属有尾噬菌体目、肌尾噬菌体科, 其基因组大小为 4 2391 bp, 含 53 个开放阅读框, 与窄食单胞菌属噬菌体亲缘关系较近。生物膜形成抑制和裂解试验显示, TS-10 能抑制嗜麦芽窄食单胞菌生物膜的形成且有一定的裂解作用, 其中抑制试验菌液 A 值较对照组减少 88.5%, 裂解试验菌液 A 值较对照组减少 35% ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。 **结论** 噬菌体 TS-10 裂解性强、特异性高且稳定, 可望用于多重耐药嗜麦芽窄食单胞菌感染的治疗。

【关键词】 嗜麦芽窄食单胞菌; 噬菌体; 生物学特性; 生物膜

【中图分类号】 R378

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)09-1023-05

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Sep;18(9):1023-1027.]

Characterizations of *Stenotrophomonas maltophilia* lytic phage TS-10 and its effect on bacterial biofilm

TIAN Shuang^{1,2}, ZHAO Shuchuan¹, ZHAO Xueli¹, ZHAO Chunyan¹, HUANG Honglan¹ (1. Department of Pathogenbiology, College of Basic Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Institute of Applied Microbiology, Heilongjiang Academy of Sciences) *

【Abstract】 **Objective** Isolation of phage specifically targeting *S. maltophilia* from lake water, analyzing its biological characteristics, and examining its lytic activity against bacterial biofilms. **Methods** The phages were isolated and purified using the double-layer agar plate method. The morphology of the phages was observed under transmission electron microscopy, and their optimal infective titer, one-step growth curve, temperature dependence, and pH stability were determined. Genomic DNA was extracted for sequencing analysis. The inhibitory assay for biofilm formation and the lytic assay were conducted to observe the impact of the bacteriophages on *S. maltophilia* biofilm. **Results** The *S. maltophilia* phage TS-10 exhibits a typical tadpole-shaped appearance, with a head that exhibits a regular icosahedral structure. The diameter of the TS-10 head ranges from 110 to 115 nm, while the tail measures 120 to 125 nm in length. The optimal infective titer of TS-10 is 0.01, with a latent period of 15 minutes and a burst period of 65 minutes. TS-10 demonstrates survival capabilities within a temperature range of 60 °C and pH levels ranging from 4 to 11. TS-10 belongs to the Caudovirales order and Myoviridae family, with a genome size of 4 2391 bp that contains 53 open reading frames. It shows a close phylogenetic relationship with bacteriophages of the narrow-feeding monococcus genus. In biofilm inhibition and lytic assays, TS-10 is capable of inhibiting biofilm formation in maltophilic monococcus and exhibits significant lytic activity. The biofilm inhibition assay shows a reduction of 88.5% in value for test group A compared to the control group, while the lytic assay shows a decrease of 35% in value for test group A compared to the control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$).

Conclusion Bacteriophage TS-10 exhibits strong lytic activity, high specificity, and stability, making it a promising candidate for the treatment of multi-drug resistant infections caused by *S. maltophilia*.

【Key words】 *Stenotrophomonas maltophilia*; phage; biological characteristics; biofilm

* **【通讯作者】** 黄红兰, E-mail: hhl@jlu.edu.cn

【作者简介】 田爽(1997-), 女, 黑龙江绥化人, 硕士研究生, 主要从事病毒学研究。E-mail: 861676435@qq.com
田爽和赵树川为共同第一作者。

嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*, SM)在自然界分布广泛,也可在人的口腔、咽部、粪便中检出,是引起医院感染的病原体之一^[1-2]。免疫功能受损和衰弱者易发生 SM 感染^[3],引起呼吸道症状、胆源性脓毒症、菌血症、脑膜炎,也可发生尿路和软组织感染等^[4-5]。临床上治疗 SM 感染的常用药物为复方磺胺甲噁唑和左氧氟沙星,但耐药性逐渐增强,其中左氧氟沙星的耐药率达 11.7%,复方磺胺甲噁唑耐药率在 1.4%~8.7%之间^[4]。

由于 SM 耐药问题日趋严重,增加了 SM 感染治疗的难度,急需新的治疗手段^[6]。噬菌体是可以感染细菌、真菌或放线菌等微生物的病毒,在自然界分布广泛^[7]。由于具有易于获得、特异性高以及不会出现耐药性等特点,噬菌体疗法可作为治疗细菌感染的一种手段^[8]。本研究拟从污水中筛选出针对 SM 的裂解性噬菌体,观察其生物学特性,检测其裂解细菌生物膜的效率,为 SM 感染的生物治疗提供参考。

材料与方法

1 材料

1.1 菌株与污水样品 嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*, SM)菌株由吉林大学基础医学院病原生物学系保存。污水样品取于吉林省长春市朝阳区湖水。

1.2 主要试剂与仪器 NB 肉汤培养基和 NA 营养琼脂培养基购于青岛海博公司;SM 缓冲液购于武汉卡诺斯公司;草酸铵结晶紫染色液购于 Sigma(上海)公司;E. Z. N. A. M13 Miniprep Kit 为美国 OMEGA 公司产品。电热恒温培养箱购于上海实验仪器厂。

2 方法

2.1 噬菌体 TS-10 的筛选、纯化及滴度测定 取 10 株 SM 分别接种于 NB 肉汤培养基中进行培养增菌。将培养后的 SM 菌液一并倒入 100 mL 湖水样品中,再向其中加入等体积的 NB 肉汤培养基,37 °C 培养 12 h,离心半径为 8 cm,6 000 r/min,离心 10 min,取上清,用 0.22 μm 滤器过滤,收集滤液,即为噬菌体液。利用双层琼脂平板法,将 1×10^8 CFU/ml 的 SM 菌液与倍比稀释的噬菌体液混匀,向其中加入半固体培养基,倾倒入固体平板,37 °C 过夜培养。次日,挑取单个噬菌斑加入到含有 10 ml NB 培养基的锥形瓶内,再向其中加入 100 μL SM 菌液(1×10^8 CFU/mL),37 °C、160 r/min 培养 12 h。吸取 5 mL 混合液,用 0.22 μm 滤膜过滤,收集滤液。重复上述步骤,继续挑取单个噬菌斑进行扩增,经过 5 次纯化至噬菌斑大小均一。最后一次扩增噬菌体后计算噬菌体滴度(PFU/mL)。噬菌体滴度(PFU/mL)=噬菌体稀释倍数×噬菌斑个数

×10。

2.2 电镜观察噬菌体 TS-10 的形态 取 20 μL 0.5%戊二醛与 20 μL 噬菌体液混匀,于铜网上静置 15 min,再用 2%磷钨酸负染色 1 min 左右,在 80 kv 透射电子显微镜下观察噬菌体形态。

2.3 噬菌体 TS-10 最佳感染复数(MOI)测定 吸取 100 μL 浓度为 2×10^8 CFU/mL 的 SM 菌液加入到含有 5 mL NB 培养基的离心管内。将噬菌体液梯度稀释为 2×10^{10} 、 2×10^9 、 2×10^8 、 2×10^7 、 2×10^6 、 2×10^5 、 2×10^4 PFU/mL,然后分别加入到含有菌悬液的离心管内,使噬菌体与 SM 菌的比例分别为 100、10、1、0.1、0.01、0.001、0.0001,混匀后置 37 °C、160 r/min 培养 4 h。用 0.22 μm 滤膜过滤混合液,滤液作倍比稀释。吸取 100 μL 噬菌体液与 100 μL 浓度为 1×10^8 CFU/mL 的 SM 菌液混合,再加入 5 mL 半固体培养基,混匀后倾倒入培养皿,37 °C 培养 12 h,观察噬菌斑数目,确定不同比例下噬菌体的滴度,确认噬菌体与 SM 菌的最佳比例。试验重复 3 次^[8]。

2.4 噬菌体 TS-10 一步生长曲线测定 将噬菌体与 SM 菌液各 500 μL 以最佳感染复数比例混匀,室温静置 10 min,待噬菌体吸附在 SM 菌表面后 10 000 r/min 离心 5 min。用 1 mL NB 肉汤培养基重悬沉淀,将重悬液转移至含有 19 mL NB 培养基的离心管内,37 °C、160 r/min 恒温摇床孵育,前 20 min 每隔 5 min 吸取 1 mL,之后每隔 10 min 吸取 1 mL,共计 100 min。收集液用 0.22 μm 滤器过滤,倍比稀释后采用双层琼脂平板法测定噬菌体滴度。试验重复 3 次。

2.5 噬菌体 TS-10 温度及酸碱稳定性测定 将噬菌体液分别接种到 4 个离心管内,每个离心管接种 9 mL。将 4 个离心管分别放入 50、60、70、80 °C 水浴锅内培养,每隔 10 min 吸取 1 mL,共计 60 min。收集液过滤后作倍比稀释,采用双层琼脂平板法测定噬菌体滴度。试验重复 3 次。利用浓盐酸与氢氧化钠配制 pH 3~12 的 NB 肉汤培养基,取 10 μL 噬菌体液分别加到 990 μL 不同 pH 值的培养基内,37 °C 水浴培养 10 min,吸取 100 μL 噬菌体液,利用双层琼脂平板法测定不同 pH 下噬菌体滴度。试验重复 3 次。

2.6 噬菌体 TS-10 的基因组提取与鉴定 采用 OMEGA DNA 试剂盒提取 TS-10 DNA。提取的 DNA,委托联川生物测序公司进行 Illumina Xten 测序^[9],选用 Spades 对基因进行组装拼接,使用软件 DNASTAR 对噬菌体基因组序列进行一般特性分析,使用 RAST 和 ORFs Finder 预测噬菌体 TS-10 的开放阅读框(ORF),使用 BLAST 对预测的基因进行检索及功能注释。

2.7 噬菌体 TS-10 抑制 SM 生物膜形成试验 向含

有细胞爬片的6孔板内加入100 μL 浓度为 1×10^8 PFU/mL的SM菌液,分为对照组和实验组。实验组同时加入100 μL 最佳感染复数滴度的噬菌体液,并向实验组和对照组各加入1 mL NB肉汤培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h。一部分吸去培养基,用PBS清洗3次。加入600 μL 甲醛溶液固定30 min,吸出后充分晾干。加入600 μL 结晶紫染色10 min,用PBS洗3次,充分晾干。加入400 μL 33%的冰乙酸溶解结晶紫,用酶标仪检测每孔的吸光度A值。另一部分吸去多余培养基,用PBS清洗3次。取出细胞爬片,放入含有5 mL PBS的离心管内,涡旋震荡,吸取100 μL 作倍比稀释,涂布培养板进行培养,计算SM菌浓度。试验重复3次。

2.8 噬菌体 TS-10 裂解 SM 生物膜试验 向含有细胞爬片的6孔板内各加入100 μL 浓度为 1×10^8 PFU/mL的SM菌液,分为对照组和实验组,各加入1 mL NB肉汤培养基后于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h。待生物膜形成后,向实验组加入100 μL 最佳感染复数滴度的噬菌体液,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h,取出后按方法2.7用结晶紫染色,用酶标仪测量对照组与实验组吸光度A值,按方法2.7作平板涂布计算SM菌浓度。试验重复3次。

2.9 统计学分析 利用SPSS 21.0进行统计学分析。计量资料用均数(标准差($\bar{x} \pm s$))表示,两组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。使用GraphPad Prism 6.0对数据进行可视化。

结果

1 噬菌体 TS-10 的筛选、纯化及滴度测定

经过分离纯化得到1株裂解性噬菌体,其噬斑呈圆形、透明、无晕环,直径约1 mm(图1)。

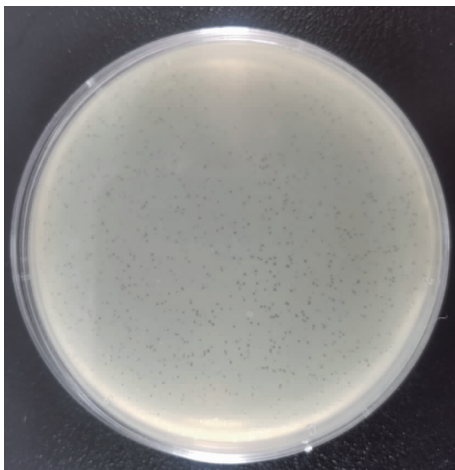


图1 噬菌体 TS-10 的噬斑
Fig. 1 Plaques of TS-10 phage

2 电镜观察噬菌体 TS-10 的形态

如图2所示,噬菌体 TS-10 由正二十面体立体头

部和一条可伸缩的螺旋对称的尾部构成,头部直径110~115 nm,尾部长120~125 nm。依照ICTV分类规则,噬菌体 TS-10 属于有尾噬菌体目(Caudovirales)肌尾噬菌体科(Myoviridae)噬菌体。

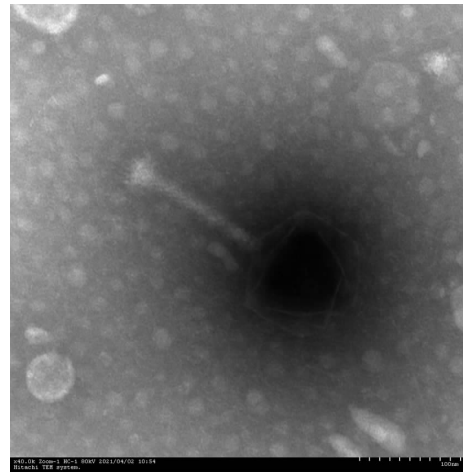


图2 噬菌体 TS-10 的电镜图
Fig. 2 Electron microscope observation of TS-10 phage

3 噬菌体 TS-10 的最佳感染复数

用噬菌体 TS-10 感染 SM,当 MOI 为 0.01 时,产生的子代噬菌体数量最多(图3)。

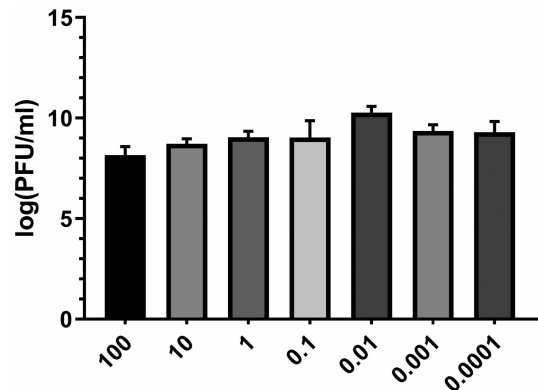


图3 噬菌体 TS-10 MOI 测定
Fig. 3 The MOI of TS-10 phage

4 噬菌体 TS-10 一步生长曲线

噬菌体 TS-10 一步生长曲线如图4。TS-10 的感染过程约为80 min,潜伏期15 min,裂解期65 min,爆发量896 PFU/cell。

5 噬菌体 TS-10 的温度稳定性

噬菌体 TS-10 对于温度的稳定性较高,50、60 $^{\circ}\text{C}$ 时其活性基本不受影响;置于70 $^{\circ}\text{C}$ 中30 min完全失活,80 $^{\circ}\text{C}$ 20 min完全失活(图5)。

6 噬菌体 TS-10 的酸碱稳定性

噬菌体 TS-10 的酸碱稳定性较高,在 pH 4~11 条件下其活性基本不受影响,在 pH 3 和 pH 12 时活性稍下降(图6)。

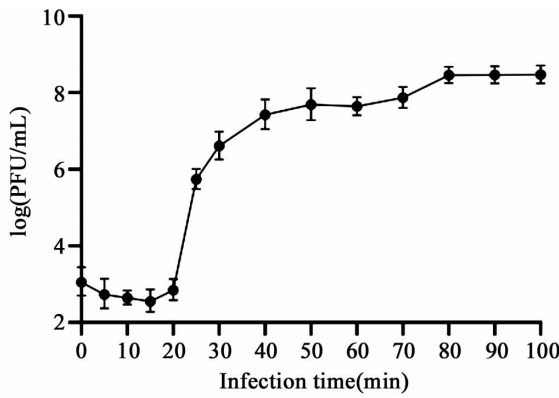


图 4 噬菌体 TS-10 一步生长曲线
Fig. 4 One-step growth curve of TS-10 phage

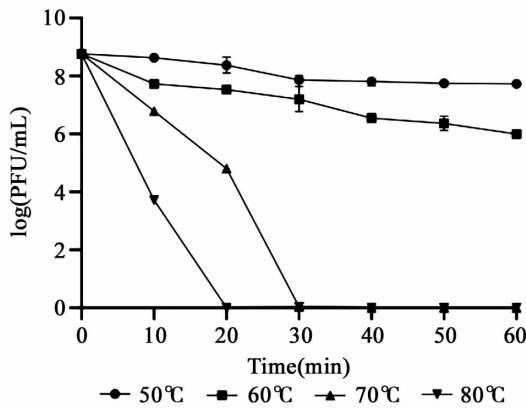


图 5 噬菌体 TS-10 的热稳定性
Fig. 5 Thermal stability of TS-10 phage

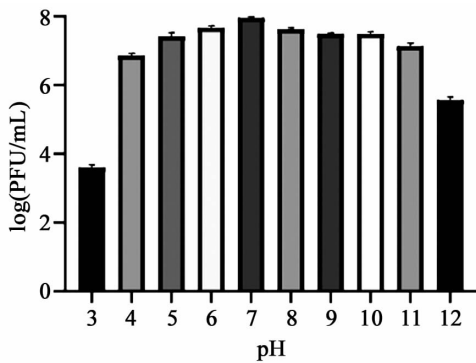
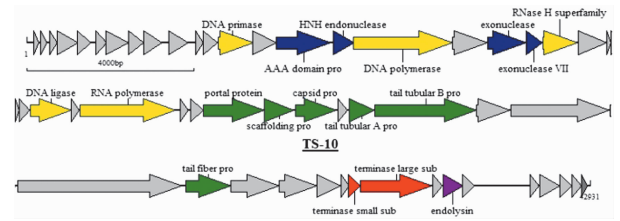


图 6 噬菌体 TS-10 酸碱稳定性
Fig. 6 pH stability of TS-10 phage

7 噬菌体 TS-10 的基因组分析

噬菌体 TS-10 基因组全长 4 2931 bp, GC 含量 59.92%, 不含 tRNA, 且未检测出毒力基因与耐药基因。编码已知功能蛋白的基因有 18 个, 可分为结构蛋白模块、包装蛋白模块、复制/重组蛋白模块、代谢模块和裂解模块。基因组信息上传于 GenBank, 登录号为 OK018136。基因组图谱如图 7。



注:箭头方向即为基因方向。绿色:结构蛋白;红色:包装蛋白;黄色:复制/重组蛋白;蓝色:代谢模块蛋白;紫色:裂解蛋白。

图 7 噬菌体 TS-10 基因组注释图谱

Notes: The arrow direction represents the direction of the gene. In the color code, green represents structural proteins, red represents packaging proteins, yellow represents replication/recombination proteins, blue represents metabolic module proteins, and purple represents lytic proteins.

Fig. 7 Schematic diagram of the genome of the TS-10 phage

8 噬菌体 TS-10 的进化关系分析

基于噬菌体 TS-10 全基因组进行 BLAST, 结果如图 8。TS-10 与窄食单胞菌属噬菌体 BUCT598 的进化关系较为相似。

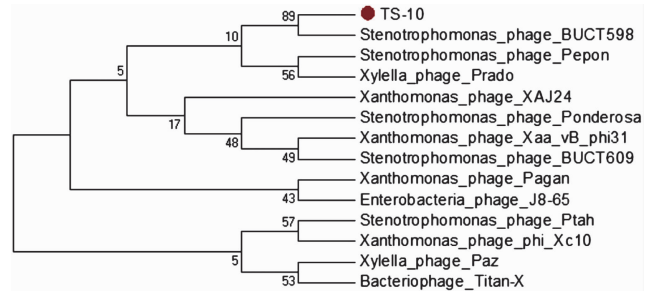
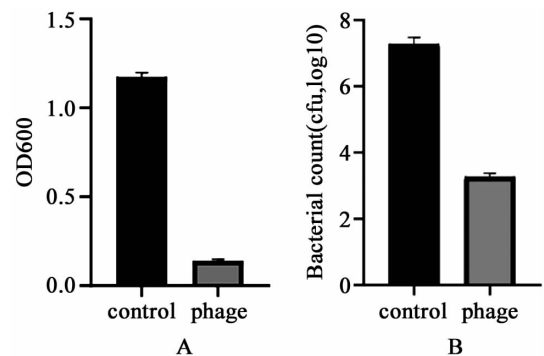


图 8 噬菌体 TS-10 进化关系分析
Fig. 8 Phylogenetic analysis of the TS-10 phage

9 噬菌体 TS-10 对 SM 生物膜形成的抑制作用

噬菌体 TS-10 抑制 SM 生物膜形成试验结果显示, 菌液 A 值较对照组减少 88.5% ($P < 0.01$) (图 9A); 活菌计数结果如图 9B, 以对照组为参照, 细菌生长抑制率为 99% ($P < 0.01$), 表明 TS-10 噬菌体可显著抑制细菌生物膜的形成。



A 结晶紫染色 A_{600} 值 B 活菌计数 注:不同字母表示组间具有显著性差异 ($P < 0.01$)。

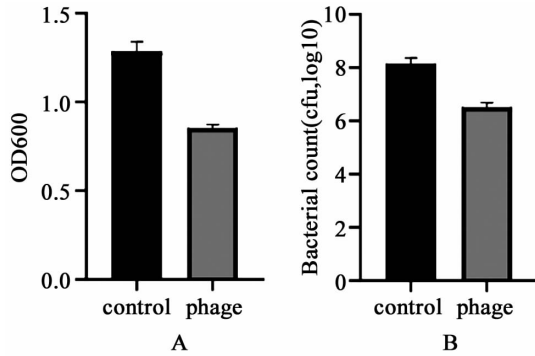
图 9 噬菌体 TS-10 抑制生物膜形成

A Crystalline violet staining A_{600} value B bacterial count

Fig. 9 Phage TS-10 inhibit biofilm formation

10 噬菌体 TS-10 对已形成生物膜的裂解作用

噬菌体 TS-10 裂解已形成 SM 生物膜试验显示, 菌液 A 值较对照组减少 35% ($P < 0.05$) (图 10A); 活菌计数结果如图 10B 所示, 与对照组比较细菌数减少 95% ($P < 0.05$)。表明 TS-10 对已形成的生物膜有一定的裂解作用。



A 结晶紫染色 A_{600} 值 B 活菌计数
注: 不同字母表示组间具有显著性差异 ($P < 0.05$)。
图 10 噬菌体 TS-10 裂解已形成的生物膜
A Crystalline violet staining A_{600} value B bacterial count
Fig. 10 Phage TS-10 lyses the formed biofilm

讨论

细菌耐药性已成为严重的公共卫生问题^[10-11]。近年来, 由于成本和市场盈利能力的压力, 新型抗生素的开发速度放缓, 迫切需要新的抗菌疗法^[12]。一直以来, 人们一直在考虑使用噬菌体治疗细菌感染的可行性, 最近成功的个性化噬菌体鸡尾酒治疗的案例重新让人们噬菌体疗法建立了信心^[13]。噬菌体疗法有可能提高当前的抗生素疗效, 并为应对抗生素完全失效提供最后的手段^[14]。

本研究从湖水中分离出噬菌体 TS-10, 该噬菌体属于肌尾噬菌体科, 潜伏期短且爆发量大, 对极端温度与酸碱度的耐受程度较高, 由此可见噬菌体 TS-10 的裂解效率基本不受环境因素的影响。

噬菌体 TS-10 的基因组属线性双链 DNA, 含有 53 个 ORF, 其中 ORF30 等 8 个 ORF 负责组装噬菌体, ORF13 等 9 个 ORF 与 DNA 代谢有关, ORF47 负责裂解宿主菌, 其余 ORF 编码假定蛋白。对 TS-10 基因组进行分析, 未发现毒力基因与耐药基因, 保证了其在临床应用的安全性。进化分析显示, 噬菌体 TS-10 与窄食单胞菌属噬菌体的亲缘关系相近。

生物膜形成抑制和裂解试验显示, 噬菌体 TS-10 能抑制 SM 生物膜的形成, 亦可裂解已形成的 SM 生物膜。表明噬菌体 TS-10 可望成为消除和控制 SM 生物膜形成的替代方案。

【参考文献】

- [1] 田爽. 嗜麦芽窄食单胞菌噬菌体 TS-10 的分离鉴定及对细菌生物膜作用的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2022.
- [2] Tuncel T, Akalin HS, Payaslioglu M, et al. Healthcare-Associated *Stenotrophomonas maltophilia* bacteraemia: retrospective evaluation of treatment and outcome[J]. *Cureus*, 2021, 13(10): e18916.
- [3] An SQ, Berg G. *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. *Trends Microbiol*, 2018, 26(7): 637-638.
- [4] Paez JI, Tengan FM, Barone AA, et al. Factors associated with mortality in patients with bloodstream infection and pneumonia due to *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2008, 27(10): 901-906.
- [5] 王瑜, 王丽凤, 常悦, 等. 2011-2019 年嗜麦芽窄食单胞菌的临床分布及耐药性分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2021, 42(23): 2910-2913.
- [6] Hu LF, Xu XH, Li HR, et al. Surveillance of antimicrobial susceptibility patterns among *Stenotrophomonas maltophilia* isolated in China during the 10-year period of 2005-2014[J]. *J Chemother*, 2018, 30(1): 25-30.
- [7] Sharma S, Chatterjee S, Datta S, et al. Bacteriophages and its applications: an overview[J]. *Folia Microbiol (Praha)*, 2017, 62(1): 17-55.
- [8] 刘家齐, 于新, 田爽, 等. 多重耐药肺炎克雷伯菌裂解性噬菌体 Kp-8329 的分离鉴定和基因组分析[J]. *中国兽医杂志*, 2021, 57(7): 42-46.
- [9] Xiang Y, Li W, Song F, et al. Biological characteristics and whole-genome analysis of the *Enterococcus faecalis* phage PEf771[J]. *Can J Microbiol*, 2020, 66(9): 505-520.
- [10] Massongo M, Ngando L, Pefura YE, et al. Trends of antibacterial resistance at the national reference laboratory in cameroon: comparison of the situation between 2010 and 2017[J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 9957112.
- [11] Gomez J, Garcia VE, Ruiz GJ. Clinical relevance of bacterial resistance: a historical approach (1982-2007)[J]. *Rev Esp Quimioter*, 2008, 21(2): 115-122.
- [12] Iszatt JJ, Larcombe AN, Chan HK, et al. Phage therapy for multi-drug resistant respiratory tract infections[J]. *Viruses*, 2021, 13(9): 1809.
- [13] Hatfull GF, Dedrick RM, Schooley RT. Phage therapy for antibiotic-resistant bacterial infections[J]. *Annu Rev Med*, 2022, 73: 197-211.
- [14] Uyttendaele S, Chen B, Onsea J, et al. Safety and efficacy of phage therapy in difficult-to-treat infections: a systematic review[J]. *Lancet Infect Dis*, 2022, 22(8): e208-e220.

【收稿日期】 2023-04-06 【修回日期】 2023-06-23