

1株多重耐药副溶血弧菌噬菌体vB_VpP_3的生物学特性及全基因组分析

刘青青, 张明, 杨雯静, 刘可, 李凡, 李学鹏, 励建荣, 张德福*

(渤海大学食品科学与工程学院, 渤海大学海洋研究院, 生鲜农产品贮藏加工及安全控制国家地方联合工程研究中心, 辽宁省食品安全重点实验室, 辽宁 锦州 121013)

摘要: 目的: 分离对多重耐药副溶血性弧菌具有较强裂解能力的噬菌体。方法: 以副溶血性弧菌为宿主菌, 从海产品中分离、纯化噬菌体, 对分离到的噬菌体进行生物学特性和全基因组分析。结果: 从螃蟹中分离到1株噬菌体, 命名为vB_VpP_3。该噬菌体裂解谱较窄, 宿主特异性强, 其最佳感染复数为0.1, 吸附率最高为93%。一步生长曲线显示, 该噬菌体的潜伏期为15 min, 平均裂解量为110 PFU, 且对环境有较强的耐受性。噬菌体vB_VpP_3头部为正二十面体, 直径约60 nm, 有长约20 nm的不可收缩尾部, 属于有尾噬菌体目(Caudovirales)的短尾噬菌体科(Podoviridae)。其基因组为双链线性DNA, 全长42 459 bp, 总GC含量46.87%, 未携带毒力及耐药基因。结论: 噬菌体vB_VpP_3具有较高的安全性, 可以用于多重耐药副溶血性弧菌的生物防治。

关键词: 副溶血性弧菌; 噬菌体; 生物防治; 生物学特性; 基因组学分析

Biological Characteristics and Whole Genome Analysis of vB_VpP_3, a Bacteriophage against Multi-drug Resistant *Vibrio parahaemolyticus*

LIU Qingqing, ZHANG Ming, YANG Wenjing, LIU Ke, LI Fan, LI Xuepeng, LI Jianrong, ZHANG Defu*

(Institute of Ocean, National and Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, Food Safety Key Lab of Liaoning Province, College of Food Science and Engineering, Bohai University, Jinzhou 121013, China)

Abstract: Objective: To isolate bacteriophages with strong lytic activity against multi-drug resistant *Vibrio parahaemolyticus*. Methods: Using *V. parahaemolyticus* as host bacteria, bacteriophages were isolated and purified from seafood, and their biological characteristics and whole genome were analyzed. Results: Phage vB_VpP_3, which was isolated from crab, had a narrow host range and high host specificity with an optimal multiplicity of infection 0.1 and a maximum adsorption rate of 93%. The one-step growth curve showed that the latent period of the phage was 15 min, the average burst size was 110 PFU, and it was highly tolerant to the environment. Phage vB_VpP_3 belonged to the order Caudovirales of the family Podoviridae with a regular icosahedral head about 60 nm in diameter and a non-contractile tail about 20 nm in length. Its genome was double-stranded linear DNA with a total length of 42 459 bp and a total GC content of 46.87% without any virulence or drug resistance genes. Conclusion: Bacteriophage vB_VpP_3 was highly safe and could be used for biological control of multi-drug resistant *V. parahaemolyticus*.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*; bacteriophage; biocontrol; biological characteristics; genome analysis

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240621-147

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2024)24-0108-09

引文格式:

刘青青, 张明, 杨雯静, 等. 1株多重耐药副溶血弧菌噬菌体vB_VpP_3的生物学特性及全基因组分析[J]. 食品科学, 2024, 45(24): 108-116. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240621-147. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2024-06-21

基金项目: 渤海大学海洋研究院开放课题项目(BDHYYJY2024003)

第一作者简介: 刘青青(2000—)(ORCID: 0009-0003-8072-5617), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品营养与安全。

E-mail: 2632505286@qq.com

*通信作者简介: 张德福(1983—)(ORCID: 0000-0002-8625-5738), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品营养与健康。

E-mail: zhangdefu@qymail.bhu.edu.cn

LIU Qingqing, ZHANG Ming, YANG Wenjing, et al. Biological characteristics and whole genome analysis of vB_VpP_3, a bacteriophage against multi-drug resistant *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Food Science, 2024, 45(24): 108-116. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240621-147. <http://www.spkx.net.cn>

副溶血性弧菌是一种广泛存在于热带、温带海洋及沿海水域的革兰氏阴性嗜盐菌^[1]。1950年,日本首次报道了该菌并于1960年正式命名为“副溶血性弧菌”^[2]。历史上,副溶血性弧菌引起的疾病多发于热带和亚热带地区,但由于近年来全球气候变暖,海水温度升高,相关疾病逐渐在全世界流行,成为全球公共卫生问题^[3]。食用未煮熟或受到副溶血性弧菌污染的海产品(主要为甲壳类动物、软体动物)是造成该菌感染的主要原因^[4-5]。人体感染副溶血性弧菌后,常引起伴有水样腹泻、恶心和腹部绞痛等特征的胃肠道疾病以及伤口感染、败血症等^[6]。美国疾病控制和预防中心估计,副溶血性弧菌导致美国每年发生超过45 000例急性胃肠炎病例^[7]。副溶血性弧菌也是水产养殖中常见的病原菌之一,能引起水生动物炎症、溃疡及死亡等^[8],给水产养殖业造成了严重的经济损失。副溶血性弧菌引起的对虾急性肝胰腺坏死综合症已成为威胁全球对虾养殖产业的重要疾病之一^[9]。

近年来,随着人们在临床、水产养殖以及农业等领域过量使用和滥用抗菌药物,导致包括副溶血性弧菌在内的许多细菌出现耐药性。抗生素耐药性已成为引起人类死亡的主要原因,仅在2019年就直接夺走127万人的生命,并导致495万人死于与抗生素耐药性感染有关的疾病^[10]。而副溶血性弧菌的耐药性也日益严重。据报道,从海产品中分离出来的副溶血性弧菌对青霉素类、喹诺酮类、氨基糖苷类、四环素类等抗菌药物具有很强的耐药性^[11-13]。另外,研究人员纵向监测了1951—2021年分离自1 540株副溶血性弧菌的抗生素耐药基因,发现抗生素耐药性基因明显增加,对副溶血性弧菌感染的预防和治疗逐渐困难,寻找能够替代抗菌药物的物质成为人们的迫切需求^[10]。

裂解性噬菌体是一种具有裂解细菌能力的病毒^[14],因其能特异性识别、裂解靶细菌而不影响其他微生物,逐渐代替抗菌药物对耐药性细菌进行防控。与一般的抗菌药物不同,噬菌体疗法价格低廉、更环保,并且不会引起微生物耐药性,因此噬菌体逐渐成为临床、养殖等领域的研究热点^[15-16]。目前,美国食品药品监督管理局已允许在与食品接触的表面和食品加工设施中使用一些商业噬菌体^[17]。如美国Intralix公司推出的噬菌体制剂EcoShield™、EcolicidePX™、SalmoFresh™、PhageGuard S™等,分别用于控制蔬菜、肉类及食品加工器械表面的大肠杆菌O157:H7以及鸡肉、牛肉等食品中的沙门氏菌^[18]。噬菌体也被认为是食源性病原体的天然生物防治剂^[19]。越来越多的研究人员将噬菌体应用到食品中,Pan Hong等^[20]的研究表明裂解性噬菌体及其混合

物可以控制生菜和牛奶中的沙门氏菌污染。Zhou Chenlu等^[21]验证了噬菌体vB-LmoM-SH3-3对三文鱼肉和橙汁中的单核细胞增生李斯特菌有较强的抑制作用。此外,已有研究将副溶血性弧菌噬菌体应用到贻贝、牡蛎、大西洋鲑鱼体内,结果表明此类噬菌体具有抑制副溶血性弧菌的潜力^[22]。这说明噬菌体可以代替抗菌药物作为生物防治剂进行应用。但目前我国的噬菌体治疗仍处于研究者发起的临床研究(IIT)阶段,尚未出台针对性法律法规,也没有批准任何噬菌体药物^[23]。

本实验以实验室前期保存的副溶血性弧菌为宿主菌,筛选得到1株噬菌体vB_VpP_3并对其生物学特性和基因组特征进行研究、分析,以期利用噬菌体治疗副溶血性弧菌造成的水产养殖动物疾病及食品原料安全控制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

分离噬菌体所用的副溶血性弧菌耐药株由实验室前期分离、鉴定、保存。

2216E培养基 青岛海博生物科技有限公司;氯化钠、氯化钙、冰醋酸、无水乙醇 天津市福晨化学试剂厂;硫酸镁 天津博迪化工股份有限公司;Tris-HCl、1%结晶紫溶液 北京索莱宝生物科技有限公司;甘油 天津市恒兴化学试剂制造有限公司;氯仿、明胶 国药集团化学试剂有限公司;以上试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

SW-CJ-2F超级洁净工作台 苏州安泰空气技术有限公司;JEM1200EX透射电子显微镜 日本JEOL公司;GI54DS自动压力蒸汽灭菌器 致微(厦门)仪器有限公司;5840R高速冷冻离心机 德国Eppendorf公司;HZQ-X300C恒温振荡器 上海一恒科学仪器有限公司;SPX-25生化培养箱 宁波海曙赛福实验仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 噬菌体的分离纯化

宿主菌:将实验室保存于-80℃的副溶血性弧菌于2216E固体培养基上划线接种,30℃过夜培养,挑取单菌落接种到2216E液体培养基中,振荡培养至对数期。

样品处理:将螃蟹去除外壳后,用生理盐水浸没均质,加入CaCl₂溶液至终浓度为1 mmol/L后静置过夜,然后4℃、8 000 r/min离心10 min,取上清液过0.22 μm滤膜备用。

噬菌体分离：取样品滤液10 mL与2×2216E液体培养基等体积混合，加入2 mL OD_{595 nm}≈0.6的副溶血性弧菌菌液，30℃振荡培养12 h，8 000 r/min离心10 min，上清液用0.22 μm针孔过滤器过滤，滤液即为噬菌体增殖液。用SM缓冲液将噬菌体增殖液进行10倍梯度稀释，取200 μL不同浓度梯度增殖液与宿主菌等体积混合，30℃孵育10 min，制成双层琼脂平板^[24]，30℃培养过夜，观察是否有噬菌斑产生。

噬菌体纯化：挑取单个清晰透亮的噬菌斑置于SM缓冲液中，4℃静置8 h后8 000 r/min离心10 min，上清液通过0.22 μm针孔过滤器，10倍梯度稀释后与宿主菌通过双层平板法培养，重复此步骤至噬菌斑的形态一致。

1.3.2 噬菌体的形态观察

采用负染色法^[25]对样品进行染色。将10 μL噬菌体增殖液滴于封口膜上，铜网倒扣静置1 min，用滤纸吸干多余的噬菌体增殖液，再滴加磷钨酸染色液进行染色，通过透射电子显微镜观察噬菌体形态。

1.3.3 效价及常规稀释度测定

取200 μL不同梯度增殖液与菌液等体积混匀，30℃吸附15 min，通过双层平板法测定噬菌体效价^[26]。选取噬菌斑数量处于30~300区间的平板进行计数，实验重复3次。按式（1）计算噬菌体增殖液效价：

$$\text{噬菌体增殖液效价} / (\text{PFU/mL}) = \text{噬菌斑数} \times \text{稀释倍数} \times 5 \quad (1)$$

噬菌体常规稀释度是指细菌培养基上滴加噬菌体样本的部分能够刚好出现或刚刚不能出现完全融合性裂解所需要的噬菌体稀释度。取50 μL噬菌体增殖液滴加至涂布了副溶血性弧菌的固体培养基上，干燥后放于30℃恒温培养箱倒置培养10 h，观察裂解情况。

1.3.4 噬菌体最佳感染复数（multiplicity of infection, MOI）测定

MOI是噬菌体数量与细菌数量的比值。将噬菌体和副溶血性弧菌按照MOI=0.000 1、0.001、0.001、0.01、0.1、1、10、100混合，对噬菌体效价进行测定。效价最高的MOI为噬菌体的最佳MOI。

1.3.5 噬菌体裂解谱的测定

使用点斑法^[27]测定噬菌体的裂解谱。将宿主菌培养至OD_{595 nm}≈0.6，取200 μL菌液涂布于2216E固体平板，待其干燥后，滴加10 μL噬菌体增殖液于平板上，过夜倒置培养，观察是否有噬菌斑产生。

1.3.6 噬菌体吸附率的测定

参考Le Shuai等^[28]的方法并稍加改进。将处于对数生长期的菌液与噬菌体增殖液按最佳MOI混合，30℃孵育，分别于0、1、2、3、4、5、7、10、15、20、25、30 min取100 μL混合液至900 μL SM缓冲液中，在4℃、8 000 r/min条件下离心10 min，上清液过0.22 μm滤膜，采用双层平板法测定未吸附的噬菌体效价。按式（2）计算噬菌体吸附率：

$$\text{噬菌体吸附率} / \% = \frac{\text{噬菌体初始效价} - \text{未吸附噬菌体效价}}{\text{噬菌体初始效价}} \times 100 \quad (2)$$

1.3.7 噬菌体一步生长曲线的测定

参考Li Chun等^[29]的方法并略加改进。取对数生长期的副溶血性弧菌菌液与噬菌体增殖液按最佳MOI混合，30℃培养5 min后，4℃、8 000 r/min离心10 min。用2216E液体培养基重悬沉淀，洗涤3次后重悬液分装至液体培养基中，30℃振荡培养，30 min前每隔5 min取样，之后每隔10 min取样一次并分别测定其效价。

1.3.8 噬菌体的pH值稳定性和热稳定性分析

将效价为10⁸ PFU/mL的噬菌体在40、50、60、70、80℃条件下分别孵育1 h，冷却至室温用双层平板法测定效价。

将2216E液体培养基的pH值分别调至2~13，分别取100 μL噬菌体加入到900 μL不同pH值的液体培养基中，30℃孵育1 h，用双层平板法测定噬菌体效价。

1.3.9 氯仿敏感性测定

取噬菌体增殖液与氯仿按100:1（V/V）混合，振荡混匀后静置30 min，取上层液体用SM缓冲液梯度稀释，使用双层平板法测定噬菌体效价。

1.3.10 噬菌体体外生物防治能力测定

按照Lyu等^[30]的方法并加以改进。利用96孔板法测定噬菌体vB_VpP_3对宿主菌的清除能力。每孔加入100 μL处于对数生长期的副溶血性弧菌菌液，加入等体积不同稀释度的噬菌体增殖液，使MOI分别为1、0.1、0.01，空白组只加入菌液和SM缓冲液，30℃恒温培养，每隔1 h通过酶标仪测定595 nm波长处的OD值。

1.3.11 噬菌体的生物被膜清除能力测定

参考Kabwe等^[31]的方法并略加改进，利用96孔板法测定噬菌体对副溶血性弧菌生物被膜的抑制作用。按最佳MOI向96孔板中加入菌液和噬菌体增殖液，分别以等体积的2216E液体培养基和接种菌液的培养基作为空白组和对照组，30℃培养12 h，弃除孔中的培养液，用无菌生理盐水缓慢冲洗至洗涤液澄清，弃去残留液体，室温静置干燥，向孔中加入200 μL质量分数为1%的结晶紫染色液染色，静置20 min，弃去结晶紫溶液并使用无菌生理盐水缓慢冲洗至洗涤液澄清，分别向每个孔中加入200 μL体积分数为33%的冰乙酸溶液以破碎黏附在壁上的生物被膜，振荡后使用酶标仪检测595 nm波长处的OD值。按式（3）计算生物被膜抑制率：

$$\text{生物被膜抑制率} / \% = \frac{\text{对照组OD}_{595 \text{ nm}} - \text{处理组OD}_{595 \text{ nm}}}{\text{对照组OD}_{595 \text{ nm}}} \times 100 \quad (3)$$

1.3.12 噬菌体基因组的提取及测序

参考Imam等^[32]的方法使用氯仿抽提法提取噬菌体的基因组，送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序。使用二代Illumina测序技术对噬菌体全基因组进行序列测定^[33-34]。使用SPAdes软件进行基因组组装^[35]。序列已提交至GenBank数据库，登录号为PP834370。

1.3.13 噬菌体全基因组的功能分析和注释

通过PHASTER、RAST等数据库对噬菌体基因组开放阅读框（open reading frame, ORF）和功能进行预测和注释，将数据上传至VFDB数据库（<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>）和ARDB数据库（<http://ardb.cccb.umd.edu/>）预测噬菌体是否携带毒力基因和抗性基因。利用CGview和SnapGene软件将数据进行可视化。

1.3.14 噬菌体基因组的对比与系统进化分析

根据基因组注释结果，利用BLAST在线工具（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>）对噬菌体的全基因组进行比对，选取NCBI数据库内基因序列完整、具有保守性和进化标志性的末端酶大亚基、衣壳蛋白序列进行系统进化分析。通过GenBank数据库和MAFFT工具进行多重序列比对，利用MEGA 11.0软件中的邻位相连法构建系统发育树，使用Easyfig软件对基因组进行比较分析。

1.4 数据处理与分析

噬菌体全基因组测序由生工生物工程（上海）股份有限公司完成，利用Excel、SPSS 23和Origin 2024 Pro软件进行数据处理及绘图等（ $P<0.05$ ，差异显著）。全基因组分析通过PHASTER、RAST等数据库进行注释，利用CGview、SnapGene、MEGA 11.0、Easyfig软件作图。

2 结果与分析

2.1 噬菌体vB_VpP_3的分离纯化

从螃蟹中分离出1株裂解性噬菌体，按照Adriaenssens等^[36]建议的规则命名为vB_VpP_3。该噬菌体可在双层琼脂平板上产生直径约0.6 mm、中心相对清晰透明、边缘整齐圆滑的噬菌斑，继续培养8 h后无晕圈产生（图1）。



图1 噬菌体vB_VpP_3的噬菌斑
Fig. 1 Plaques of phage vB_VpP_3

2.2 噬菌体的微观形态观察

图2为噬菌体vB_VpP_3负染后的透射电镜图。vB_VpP_3头部为正二十面体，直径约60 nm，连接短的、不可伸缩约20 nm的尾部。参考国际病毒分类委员会最新制定的分类标准，初步推测噬菌体vB_VpP_3属于有尾噬菌体目（Caudovirales）中的短尾噬菌体科（Podoviridae）。

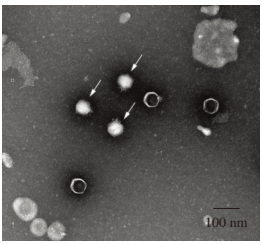


图2 噬菌体vB_VpP_3的透射电镜图
Fig. 2 Transmission electron micrograph of vB_VpP_3

2.3 噬菌体的效价及常规稀释度

通过双层平板法对噬菌体的效价进行测定，噬菌体vB_VpP_3的效价为 3.55×10^8 PFU/mL，活性较高，其常规稀释度为 10^{-6} 。

2.4 副溶血性弧菌噬菌体的最佳MOI

最佳MOI可以用于确定抑制一定浓度细菌生长所需要的最少噬菌体数量。如表1所示，通过双层平板法测定噬菌体vB_VpP_3的最佳MOI为0.1，效价最高可达到 3.55×10^8 PFU/mL。

表1 噬菌体vB_VpP_3最佳MOI Table 1 Optimal MOI for vB_VpP_3							
最佳MOI	100	10	1	0.1	0.01	0.001	0.000 1
vB_VpP_3效价/ (PFU/mL)	1.45×10^7	1.05×10^8	2.10×10^8	3.55×10^8	1.35×10^8	2.40×10^7	8.55×10^6

2.5 副溶血性弧菌噬菌体的裂解谱分析

使用本实验室保存的11株耐药性副溶血性弧菌、2株副溶血性弧菌标准株及1株溶藻弧菌Va2001作为宿主菌测试噬菌体裂解谱。如表2所示，噬菌体vB_VpP_3的裂解谱相对较窄，宿主特异性较强，成斑率略低，对受试菌株中的3株敏感（1株标准株、2株来源于养殖污水）。

表2 噬菌体vB_VpP_3的裂解谱 Table 2 Host range analysis of phage vB_VpP_3		
菌株	细菌耐药性	斑点实验结果
Vp1	AMP-TZP-IPM-CN-C	—
Vp2	IPM-CIP-AK-CN-C	—
Vp3	CAZ-OFLX-AK	—
Vp4	CAZ-CIP-CN	—
Vp5	AMP-CAZ-IPM-CIP-C	—
Vp6	IPM	+
Vp7	AMP-TZP-CAZ	—
Vp17802	AMP	—
Vp33847	AMP	+
Vp599	AMP-IPM-C	—
Vp375	C-AK-CN-SXT-CAZ	—
Vpp	CIP-CN	+
Vp2210633	AMP-IPM-C-CN	—
Va2001	AMP-IPM-C-CAZ	—

注：+，噬菌斑清晰透明；—，噬菌斑浑浊或无噬菌斑。AMP.氨苄西林（ampicillin）；TZP.哌拉西林（piperacillin）；CAZ.头孢他啶（ceftazidime）；IPM.亚胺培南（imipenem）；CIP.环丙沙星（ciprofloxacin）；OFLX.氧氟沙星（ofloxacin）；AK.阿米卡星（amikacin）；CN.庆大霉素（gentamicin）；C.氯霉素（chloramphenicol）；SXT.复方新诺明（compound sulfamethoxazole tablets）；CT.多黏菌素（colistin）；TE.四环素（tetracycline）。

2.6 噬菌体吸附率分析

如图3所示,噬菌体vB_VpP_3的吸附曲线显示出两个阶段,迅速吸附阶段集中在0~5 min,吸附速率较快。5 min后噬菌体进入吸附速率缓慢期,在20 min时噬菌体吸附率达到峰值,为93%,20 min后出现轻微下降。

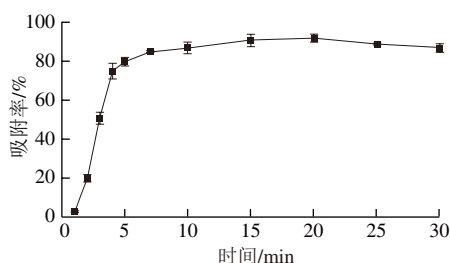


图3 噬菌体vB_VpP_3的吸附率
Fig. 3 Adsorption capacity of vB_VpP_3

2.7 噬菌体的一步生长曲线

由图4可知,噬菌体vB_VpP_3的潜伏期约15 min,爆发时间持续85 min,细菌裂解释放大量噬菌体,导致噬菌体效价快速上升,100~140 min为平缓期。全裂解周期约持续120 min,平均裂解量为110 PFU。

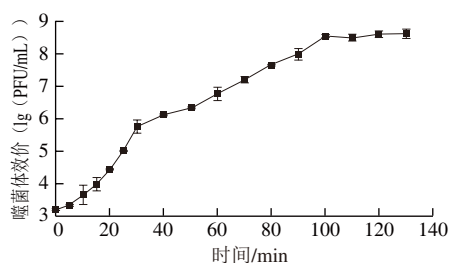


图4 噬菌体vB_VpP_3的一步生长曲线
Fig. 4 One-step growth curve of vB_VpP_3

2.8 噬菌体pH值稳定性和热稳定性分析

如图5a所示,噬菌体vB_VpP_3在40~50 ℃区间活性没有明显变化,在60~70 ℃环境下处理1 h后噬菌体效价下降严重,在80 ℃条件下处理1 h后噬菌体完全失活。这可能是高温破坏了蛋白质的空间结构,使噬菌体的受体结合蛋白丧失结合能力而无法裂解细菌所致。

如图5b所示,噬菌体vB_VpP_3在pH 5~10时活性最高,效价可达约 10^8 PFU/mL;当pH≤2或pH≥13时噬菌体vB_VpP_3完全失活。强酸及强碱环境会影响噬菌体的活性,但对碱性环境的整体耐受性强于酸性环境。

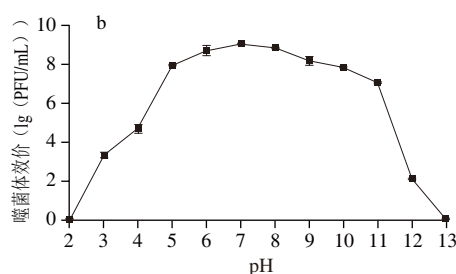
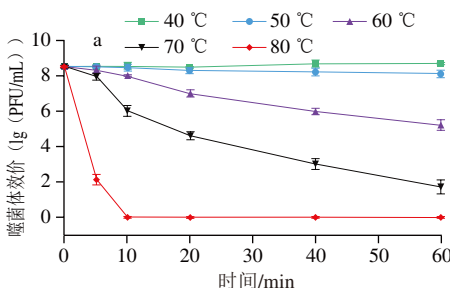


图5 噬菌体vB_VpP_3的热稳定性(a)及pH值稳定性(b)
Fig. 5 Stability of vB_VpP_3 at various temperatures (a) and pHs (b)

2.9 噬菌体对氯仿的敏感性分析

噬菌体vB_VpP_3经过氯仿处理后效价由8.91 (lg (PFU/mL))下降至8.11 (lg (PFU/mL)),但变化幅度较小,结果表明噬菌体对氯仿不敏感,说明衣壳蛋白中不存在脂溶性物质,可用氯仿在应用前进行除菌而不影响噬菌体的活性,也可使用氯仿作为后续基因组抽提等实验的辅助试剂。

2.10 噬菌体的体外生物防治能力分析

如图6所示,随着时间的延长,各组细菌不断繁殖,混合液的OD_{595 nm}不断升高,其中空白对照组增长速率最快。不同MOI噬菌体对宿主菌均有不同程度的抑制作用,培养4 h后空白对照组的OD_{595 nm}持续上升,当处理组MOI=0.1时,0~4 h内其OD_{595 nm}保持在0.2以下,4 h后逐渐上升,但仍然低于空白对照组的上升速率,表明在最佳MOI条件下,噬菌体vB_VpP_3对副溶血性弧菌有明显的抑制作用。

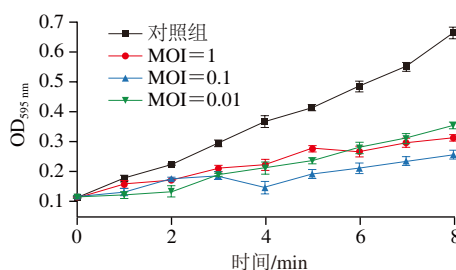
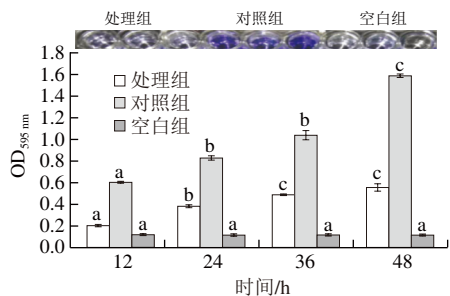


图6 噬菌体vB_VpP_3的抑菌效果
Fig. 6 Antibacterial effect of phage vB_VpP_3

2.11 噬菌体vB_VpP_3的生物被膜清除能力分析

如图7所示,随着时间的延长,对照组的OD_{595 nm}逐渐升高,而空白组的OD_{595 nm}始终在0.1左右,表明副溶血性弧菌具有形成生物被膜的能力。在不同时间点实验组的OD_{595 nm}都显著低于对照组,说明该噬菌体对副溶血性弧菌生物被膜具有显著的抑制作用,抑制率约为60%~66%。



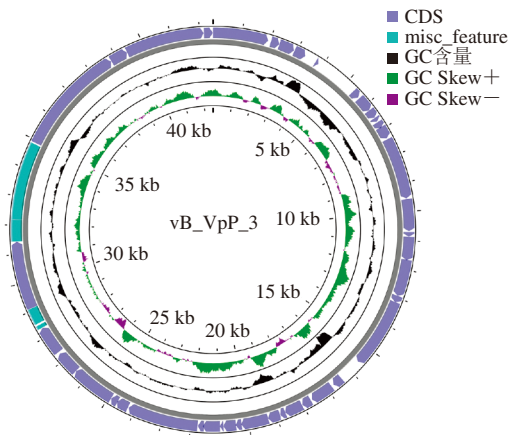
不同字母表示同一处理组不同培养时间差异显著 ($P<0.05$)。

图7 噬菌体vB_VpP_3对生物被膜的抑制效果

Fig. 7 Inhibitory effect of bacteriophage vB_VpP_3 on biofilms

2.12 噬菌体全基因组的基本生物学信息分析

噬菌体vB_VpP_3为双链线性DNA，基因组全长42 459 bp，序列中GC含量为46.87%，无重复区域，相对较为保守，其基因组图谱如图8所示。经预测，vB_VpP_3不具备编码tRNA的基因，在侵染完成后需要借助宿主菌的tRNA完成蛋白合成，且不携带已知毒力基因与耐药基因，不存在水平传播的风险。全基因组共包含45个ORFs（表3），编码蛋白的基因占据全基因组长度的88.91%，结构相对紧密，编码蛋白的最长基因长度为3 855 bp，平均长度860 bp。通过GenBank数据库比对发现较多相似度较高的全基因序列，多数为有尾的弧菌属噬菌体。



图谱由外向内分布：最外圈蓝色为噬菌体所编码的蛋白质编码区；第2圈黑色指示对应基因GC含量与总量的对比，峰口向外表示GC含量低于平均值，向内表示高于平均值；第3圈为对应基因的GC偏嗜性，绿色表示偏移值>0，紫色表示偏移值<0。

图8 噬菌体vB_VpP_3的基因组图谱

Fig. 8 Genomic map of phage vB_VpP_3

表3 噬菌体vB_VpP_3 ORF功能预测

Table 3 ORF function prediction of vB_VpP_3

序号	起始位点	结束位点	基因长度/bp	蛋白预测功能
1	1	1 920	1 920	末端酶大亚基
2	2 025	2 324	300	噬菌体蛋白
3	2 333	2 890	558	假想蛋白
4	2 912	3 325	414	噬菌体蛋白
5	3 732	3 851	120	假想蛋白

续表3

序号	起始位点	结束位点	基因长度/bp	蛋白预测功能
6	6 226	5 638	264	噬菌体蛋白
7	5 687	6 537	537	噬菌体蛋白
8	6 226	7 251	312	噬菌体蛋白
9	6 547	6 696	150	引物酶
10	6 722	6 955	234	假想蛋白
11	6 927	7 358	432	噬菌体蛋白
12	7 399	9 540	2 142	假想蛋白
13	9 566	10 669	1 104	假想蛋白
14	10 695	10 859	165	噬菌体蛋白
15	10 859	11 671	813	引物酶
16	11 653	12 933	1 281	DNA解旋酶
17	12 933	13 166	234	噬菌体蛋白
18	13 159	15 594	2 436	DNA聚合酶
19	16 396	16 743	348	假想蛋白
20	16 832	17 647	816	噬菌体蛋白p21
21	17 694	18 026	333	噬菌体蛋白
22	18 038	18 667	630	DNA连接蛋白
23	18 667	18 870	204	噬菌体蛋白
24	18 880	19 305	426	噬菌体蛋白
25	19 308	20 258	951	DNA解旋酶
26	20 245	20 451	207	假想蛋白
27	20 438	20 878	441	内切酶
28	20 878	20 997	120	穿孔素
29	20 994	21 578	585	甲基转移酶
30	21 545	21 751	207	假想蛋白
31	21 764	24 214	2 451	RNA聚合酶
32	24 246	24 665	420	假想蛋白
33	24 652	24 897	246	噬菌体蛋白
34	24 906	26 438	1 533	头尾连接蛋白Gp8
35	26 438	27 253	816	DNA腺嘌呤甲基转移酶
36	27 318	28 316	999	主要衣壳蛋白
37	28 328	28 456	129	假想蛋白
38	28 522	29 082	561	尾部纤维蛋白
39	29 092	31 434	2 343	尾管蛋白Gp12
40	31 444	32 184	741	噬菌体蛋白
41	32 194	34 863	2 670	喷射蛋白
42	34 913	38 767	3 855	DNA射出体Gp16
43	38 788	39 399	612	尾部纤维蛋白
44	39 408	42 140	2 733	糖苷酶
45	42 150	42 449	300	末端酶小亚基

2.13 噬菌体全基因组功能注释及蛋白图谱分析

噬菌体vB_VpP_3所包含的45个ORFs经多种数据库对比后确认了34个ORFs的基因功能，其余11个ORFs被认为是假想蛋白（图9），大部分ORFs比对相似性较高，处于90%以上。该噬菌体没有毒力基因、耐药基因，预测的蛋白可按照功能划分为4个模块：DNA代谢相关蛋白、噬菌体结构和组装蛋白、裂解细菌的相关蛋白以及其他功能蛋白。DNA代谢相关蛋白包括DNA解旋酶（ORF16、ORF25）、DNA聚合酶（ORF18）、DNA结合蛋白ORF22）、核酸内切酶（ORF27）、RNA聚合酶（ORF31）。其中RNA聚合酶是短尾噬菌体科的重要标志，DNA聚合酶、核酸外切酶及内切酶与噬菌体MGD1相似度高达98%。噬菌体结构与组装蛋白包括颈部连接蛋白（ORF34）、衣壳蛋白（ORF36）、尾纤维蛋白（ORF38、ORF43）、尾管蛋白（ORF39）。其中，衣壳蛋白序列较为保守，与弧菌噬菌体vB_VpaP_KF2衣壳蛋白

相似度为99%，负责特异性识别的尾管蛋白及尾纤维蛋白相似性较低。其他功能蛋白包括甲基转移酶（ORF29）、腺嘌呤甲基转移酶（ORF35）等。穿孔素（ORF28）是在噬菌体中起裂解作用的膜蛋白，能够调节裂解周期，通过在细胞膜上形成跨膜孔而介入细菌裂解过程。

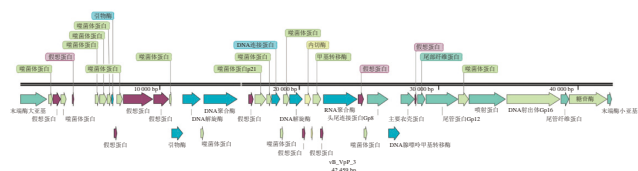


图9 噬菌体vB_VpP_3的蛋白功能图谱

Fig. 9 Protein functional map of vB_VpP_3

2.14 噬菌体进化关系与比较分析

了解噬菌体vB_VpP_3与其他噬菌体之间的进化关系，通过从GenBank数据库上寻找到33株相似性达到90%以上的噬菌体全基因组构建系统发育树（图10）。它们均以副溶血性弧菌为宿主菌，且大多数来源于亚洲。结果显示vB_VpP_3与来源于中国的弧菌噬菌体vB_VpP_DE10（MZ516827.1）最相似，相似性达到96%。

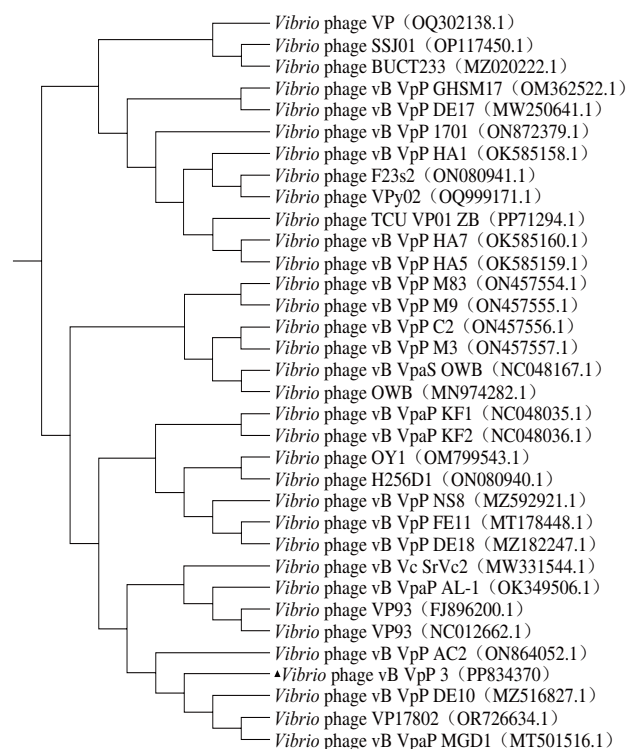


图10 噬菌体vB_VpP_3系统发育进化树

Fig. 10 Phylogenetic tree of vB_VpP_3

末端酶大亚基在噬菌体驱动DNA包装和易位中起关键作用，基于末端酶大亚基的系统发育树显示，噬菌体vB_VpP_3与来源于美国的弧菌噬菌体vB_VpaP_KF2（NC_048036.1）具有极高的相似性（图11a）。衣壳蛋白与噬菌体组装、分类密不可分，而基于衣壳蛋白的系

统发育树显示，噬菌体vB_VpP_3与弧菌噬菌体vB_VpP_DE10属于同一进化分支（图11b）。综合对比可确定弧菌噬菌体vB_VpP_3是1株典型的短尾噬菌体。

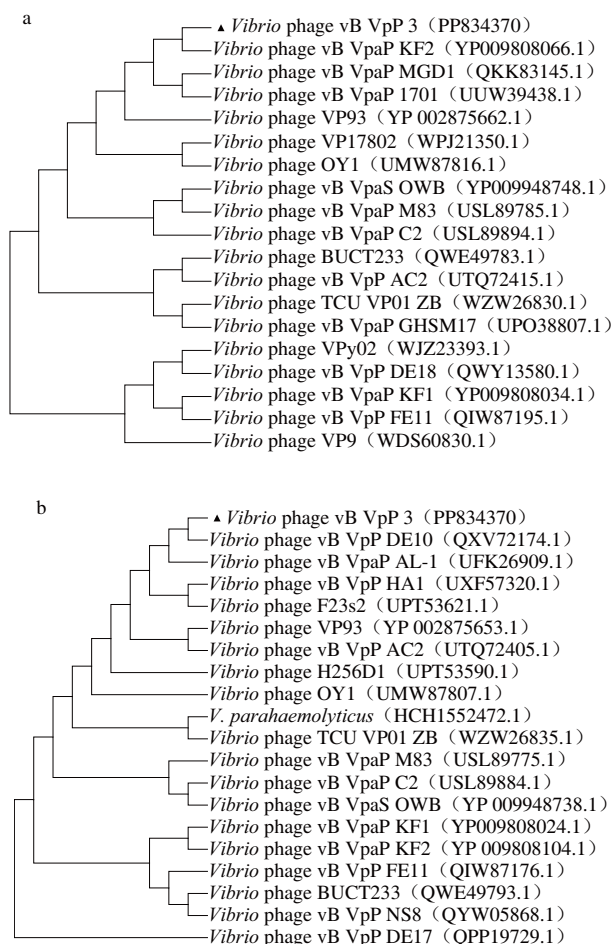


图11 噬菌体vB_VpP_3基于末端酶（a）、衣壳蛋白（b）的进化树

Fig. 11 Phylogenetic trees of vB_VpP_3 based on terminase large subunit (a) and capsid protein (b)

选取相似性最高的2株弧菌噬菌体vB_VpaP_KF2和vB_VpP_DE10与vB_VpP_3进行线性比较，结果如图12所示，3株噬菌体的全基因组相似性达到78%以上。其中，结构与包装蛋白、其他蛋白模块相似性最高，差异主要集中在15~20 kb之间，这是因为噬菌体基因发生了插入等现象。

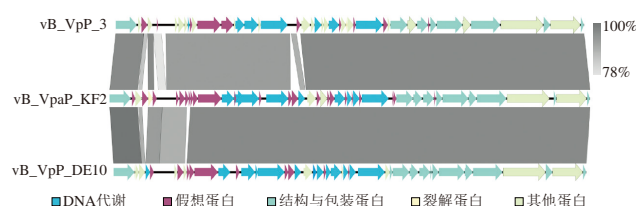


图12 噬菌体vB_VpP_3基因组比较分析

Fig. 12 Genomic comparative analysis of vB_VpaP_KF2, vB_VpP_3 and vB_VpP_DE10

3 讨论与结论

由于全球变暖和水产养殖业的集约化发展,导致弧菌感染率逐渐增加^[37],而多重耐药菌更是成为了治疗细菌感染的主要障碍。英国政府的报告指出,如果无法有效解决细菌耐药性问题,预计到2050年全球将导致1 000多万人死亡以及产生高达100万亿美元的经济损失^[38]。因此寻找解决细菌耐药性的新疗法至关重要,基于噬菌体低耐药性的特点,利用其控制副溶血性弧菌感染的方法逐渐受到研究人员的青睐^[39]。NCBI数据库记录了超过6万条噬菌体基因信息,但目前关于副溶血性弧菌噬菌体仅有2 700条,所以丰富其基因信息尤为重要。

噬菌体能否作为抗生素替代药物的关键在于其生物学特性。与其他副溶血性弧菌噬菌体相比,噬菌体vB_VpP_3对宿主表现出较强的特异性、较短的吸附时间(5 min)和较大的裂解量,意味着该噬菌体在治疗过程中具有保护宿主局部微生物群的优势以及易于纯化、增殖和工业化制备^[17,39-40]。噬菌体的环境稳定性也是其作为生物制剂的先决条件,噬菌体vB_VpP_3比噬菌体BP14在pH值和温度方面有更强的耐受性^[41],vB_VpP_3在70℃条件下仍有存活,在pH 3或pH 12环境下也具有活性,能够更好地适应各个加工环节。在噬菌体制剂快速发展的背景下,未来将有更多的噬菌体被分离出来,对噬菌体进行明确的分类也非常重要。透射电子显微镜观察结果显示噬菌体vB_VpP_3有短的不可收缩的尾部,根据形态分类法,将其归类于Podoviridae。

细菌生物被膜是能够附着在物体表面的微生物群落,一旦形成就难以根除^[42]。生物被膜的形成会增强细菌的免疫机制,导致细菌耐药性增加。副溶血性弧菌在合适的环境条件下,能在海产品和非生物表面形成生物被膜^[43],其具有的几丁质酶使其在生物被膜形成方面更有优势,因此抑制生物被膜的形成也是控制副溶血性弧菌感染的一个重要措施。噬菌体可以破坏生物被膜基质以抑制其形成。本实验结果表明,噬菌体vB_VpP_3处理12 h后就产生了明显效果,12~48 h抑制了60%~66%生物被膜的形成。这与Yin Yujie等^[44]的研究结果相一致。

噬菌体编码的多糖解聚酶存在标志性特征为噬菌斑周围的晕圈^[45],而基因组分析结果表明噬菌体vB_VpP_3不含多糖解聚酶基因,与噬菌斑结果一致。另外,噬菌体vB_VpP_3具有穿孔素且缺乏溶原功能相关的基因,证明了该噬菌体是1株裂解性噬菌体。穿孔素是一种小分子疏水跨膜蛋白,以寡聚体的形式聚集并在细胞膜上形成跨膜孔使细胞破裂,同时通过质子动力变化使细胞膜去极化,从而控制噬菌体裂解时间^[46]。目前已经有研究将穿孔素用于抑制耐药菌的生长和破坏生物被膜,Lu Han等^[47]重组表达了志贺氏菌属噬菌体的穿孔素,证明穿孔素能显著抑制细菌生长和生物被膜形成,

Xiang Yingying等^[48]体外表达了粪肠球菌噬菌体的穿孔素,与原噬菌体相比,穿孔素具有更高的裂解活性和更宽的宿主谱,同时在清除生物被膜形成方面更有效。穿孔素的特异性、低耐药性使其为食源性致病菌的预防提供了新的思路。

本研究从生物特性和基因组方面进行研究,验证了噬菌体vB_VpP_3是裂解期短、释量大、感染能力强的裂解性噬菌体,具有较强的环境耐受性且不携带抗菌素耐药性决定簇和毒力基因,也没有与噬菌体溶原相关的整合酶基因,表明该噬菌体具有在水产养殖领域的应用潜力。因此噬菌体vB_VpP_3可以作为水产养殖控制副溶血性弧菌感染的候选抗菌剂。

参考文献:

- [1] MARTINEZ-URTAZA J, BAKER-AUSTIN C. *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Trends in Microbiology, 2020, 28(10): 867-868. DOI:10.1016/j.tim.2020.02.008.
- [2] SHINODA S. Sixty years from the discovery of *Vibrio parahaemolyticus* and some recollections[J]. Biocontrol Science, 2011, 16(4): 129-137. DOI:10.4265/bio.16.129.
- [3] SORÉE M, LOZACH S, KÉOMURDJIAN N, et al. Virulence phenotypes differ between toxigenic *Vibrio parahaemolyticus* isolated from western coasts of Europe[J]. Microbiological Research, 2024, 285: 127744. DOI:10.1016/j.micres.2024.127744.
- [4] MATSUDA S, HIYOSHI H, TANDHAVANANT S, et al. Advances on *Vibrio parahaemolyticus* research in the postgenomic era[J]. Microbiology and Immunology, 2020, 64(3): 167-181. DOI:10.1111/1348-0421.12767.
- [5] LOPATEK M, WIECZOREK K, OSEK J. Antimicrobial resistance, virulence factors, and genetic profiles of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(16): e00537-18. DOI:10.1128/AEM.00537-18.
- [6] LI L Z, MENG H M, GU D, et al. Molecular mechanisms of *Vibrio parahaemolyticus* pathogenesis[J]. Microbiological Research, 2019, 222: 43-51. DOI:10.1016/j.micres.2019.03.003.
- [7] CHIMALAPATI S, LAFRANCE A E, CHEN L M, et al. *Vibrio parahaemolyticus*: basic techniques for growth, genetic manipulation, and analysis of virulence factors[J]. Current Protocols in Microbiology, 2020, 59(1): e131. DOI:10.1002/cpmc.131.
- [8] 冯艳琴, 万夕和, 沈辉, 等. 水产动物副溶血性弧菌的拮抗菌研究进展[J]. 微生物学杂志, 2021, 41(1): 99-106. DOI:10.3969/j.issn.1005-7021.2021.01.013.
- [9] CHANDRAN A, PRIYA P S, MEENATCHI R, et al. Insights into molecular aspects of pathogenesis and disease management in acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND): an updated review[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2023, 142: 109138. DOI:10.1016/j.fsi.2023.109138.
- [10] FANG G Y, LIU X Q, MU X J, et al. Distinct increase in antimicrobial resistance genes among *Vibrio parahaemolyticus* in recent decades worldwide[J]. Chemosphere, 2023, 340: 139905. DOI:10.1016/j.chemosphere.2023.139905.
- [11] KITIYODOM S, KHEMTONG S, WONGTAVATCHAI J, et al. Characterization of antibiotic resistance in *Vibrio* spp. isolated from farmed marine shrimps (*Penaeus monodon*)[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2010, 72(2): 219-227. DOI:10.1111/j.1574-6941.2010.00846.x.
- [12] JIANG Y H, CHU Y B, XIE G S, et al. Antimicrobial resistance, virulence and genetic relationship of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood from coasts of Bohai Sea and Yellow Sea, China[J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 290: 116-124. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.005.

- [13] XIE T F, XU X K, WU Q P, et al. Prevalence, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* from ready-to-eat foods in China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 549. DOI:10.3389/fmicb.2016.00549.
- [14] WALTER N, MIRZAEI M, DENG L, et al. The potential of bacteriophage therapy as an alternative treatment approach for antibiotic-resistant infections[J]. *Medical Principles and Practice*, 2022, 33(1): 1-9. DOI:10.1159/000534717.
- [15] WANG R Z, ZHONG Y F, GU X S, et al. The pathogenesis, detection, and prevention of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 144. DOI:10.3389/fmicb.2015.00144.
- [16] HATFULL G F, DEDRICK R M, SCHOOLEY R T. Phage therapy for antibiotic-resistant bacterial infections[J]. *Annual Review of Medicine*, 2022, 73: 197-211. DOI:10.1146/annurev-med-080219-122208.
- [17] KIM B H, ASHRAFUDOUILLA M, SHAILA S, et al. Isolation, characterization, and application of bacteriophage on *Vibrio parahaemolyticus* biofilm to control seafood contamination[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2024, 64(1): 107194. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2024.107194.
- [18] MOYE Z D, WOOLSTON J, SULAKVELIDZE A. Bacteriophage applications for food production and processing[J]. *Viruses*, 2018, 10(4): 205. DOI:10.3390/v10040205.
- [19] 孙新城, 赵成鑫, 胡旭阳, 等. 噬菌体在食品安全领域中的应用[J]. *中国病原生物学杂志*, 2022, 17(4): 479-482. DOI:10.13350/j.cjpb.220423.
- [20] PAN H, SHU M, LI T J, et al. Isolation and characterization of two lytic phages against multidrug-resistant *Salmonella* and their application as a cocktail for biocontrol in foods[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2023, 185: 115184. DOI:10.1016/j.lwt.2023.115184.
- [21] ZHOU C L, ZHU M Y, WANG Y J, et al. Broad host range phage vB-LmoM-SH3-3 reduces the risk of *Listeria* contamination in two types of ready-to-eat food[J]. *Food Control*, 2020, 108: 106830. DOI:10.1016/j.foodcont.2019.106830.
- [22] YOU H J, LEE J H, OH M, et al. Tackling *Vibrio parahaemolyticus* in ready-to-eat raw fish flesh slices using lytic phage VPT02 isolated from market oyster[J]. *Food Research International*, 2021, 150: 110779. DOI:10.1016/j.foodres.2021.110779.
- [23] 姜昕宇, 吴楠楠, 卢曙光, 等. 噬菌体临床应用监管法规的现状 & 展望[J]. *中国抗生素杂志*, 2024, 49(1): 26-34. DOI:10.13461/j.cnki.cja.007618.
- [24] JURCZAK-KUREK A, GAŚSIOR T, NEJMAN-FALEŃCZYK B, et al. Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 34338. DOI:10.1038/srep34338.
- [25] KIM S G, JUN J W, GIRI S S, et al. Isolation and characterisation of pVa-21, a giant bacteriophage with anti-biofilm potential against *Vibrio alginolyticus*[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 6284. DOI:10.1038/s41598-019-42681-1.
- [26] ADDY H S, AHMAD A A, HUANG Q. Molecular and biological characterization of *Ralstonia* phage RsoM1USA, a new species of *P2virus*, isolated in the United States[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 267. DOI:10.3389/fmicb.2019.00267.
- [27] HOANG M D, HOANG M S, HONJOH K I, et al. Isolation and bio-control of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* contamination in raw chicken meat by using lytic bacteriophages[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2016, 71: 339-346. DOI:10.1016/j.lwt.2016.04.013.
- [28] LE S, HE X S, TAN Y L, et al. Mapping the tail fiber as the receptor binding protein responsible for differential host specificity of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages PaP1 and JG004[J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(7): e68562. DOI:10.1371/journal.pone.0068562.
- [29] LI C, YUAN X M, LI N, et al. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* phage vB_BceP-DLc1 reveals the largest member of the Φ29-like phages[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(11): 1750. DOI:10.3390/microorganisms8111750.
- [30] LYU S J, XIONG F L, QI T P, et al. Isolation and characterization of a novel temperate bacteriophage infecting *Aeromonas hydrophila* isolated from a *Macrobrachium rosenbergii* larvae pond[J]. *Virus Research*, 2024, 339: 199279. DOI:10.1016/j.virusres.2023.199279.
- [31] KABWE M, BROWN T, SPEIRS L, et al. Novel bacteriophages capable of disrupting biofilms from clinical strains of *Aeromonas hydrophila*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 194. DOI:10.3389/fmicb.2020.00194.
- [32] IMAM M, ALRASHID B, PATEL F, et al. VB_PaeM_MIJ3, a novel jumbo phage infecting *Pseudomonas aeruginosa*, possesses unusual genomic features[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2772. DOI:10.3389/fmicb.2019.02772.
- [33] LI R Q, FAN W, TIAN G, et al. The sequence and *de novo* assembly of the giant panda genome[J]. *Nature*, 2010, 463(7279): 311-317. DOI:10.1038/nature08696.
- [34] BOLGER A M, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114-2120. DOI:10.1093/bioinformatics/btu170.
- [35] BANKEVICH A, NURK S, ANTIPOV D, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing[J]. *Journal of Computational Biology*, 2012, 19(5): 455-477. DOI:10.1089/cmb.2012.0021.
- [36] ADRIAENSSENS E, BRISTER J R. How to Name and classify your phage: an informal guide[J]. *Viruses*, 2017, 9(4): 70. DOI:10.3390/v9040070.
- [37] LAVILLA M, DOMINGO-CALAP P, SEVILLA-NAVARRO S, et al. Natural killers: opportunities and challenges for the use of bacteriophages in microbial food safety from the one health perspective[J]. *Foods*, 2023, 12(3): 552. DOI:10.3390/foods12030552.
- [38] LEE J H, OH M, KIM B S. Phage biocontrol of zoonotic food-borne pathogen *Vibrio parahaemolyticus* for seafood safety[J]. *Food Control*, 2023, 144: 109334. DOI:10.1016/j.foodcont.2022.109334.
- [39] YE Y M, CHEN H F, HUANG Q L, et al. Characterization and genomic analysis of novel *Vibrio parahaemolyticus* phage vB_VpaP_DE10[J]. *Viruses*, 2022, 14(8): 1609. DOI:10.3390/v14081609.
- [40] LI Z, REN Y, WANG Z H, et al. Characterization and genomic analysis of the *Vibrio* phage R01 lytic to *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Aquaculture Reports*, 2023, 30: 101628. DOI:10.1016/j.aqrep.2023.101628.
- [41] HSU T K, SHIH H Y, HUANG H J, et al. Isolation and characterization of the novel phage BP14 for lysing *Vibrio parahaemolyticus* and reducing virulence proteins[J]. *Aquaculture*, 2024, 581: 740484. DOI:10.1016/j.aquaculture.2023.740484.
- [42] ELAFIFY M, LIAO X Y, FENG J S, et al. Biofilm formation in food industries: challenges and control strategies for food safety[J]. *Food Research International*, 2024, 190: 114650. DOI:10.1016/j.foodres.2024.114650.
- [43] WANG D, FLINT S H, PALMER J S, et al. Global expansion of *Vibrio parahaemolyticus* threatens the seafood industry: perspective on controlling its biofilm formation[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 158: 113182. DOI:10.1016/j.lwt.2022.113182.
- [44] YIN Y J, NI P E, LIU D L, et al. Bacteriophage potential against *Vibrio parahaemolyticus* biofilms[J]. *Food Control*, 2019, 98: 156-163. DOI:10.1016/j.foodcont.2018.11.034.
- [45] LATKA A, MACIEJEWSKA B, MAJKOWSKA-SKROBEK G, et al. Bacteriophage-encoded virion-associated enzymes to overcome the carbohydrate barriers during the infection process[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(8): 3103-3119. DOI:10.1007/s00253-017-8224-6.
- [46] LI X X, ZHANG C, WEI F C, et al. Bactericidal activity of a holin-endolysin system derived from *Vibrio alginolyticus* phage HH109[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2021, 159: 105135. DOI:10.1016/j.micpath.2021.105135.
- [47] LU H, XIONG W B, LI Z, et al. Activity of the lyases LysSSE1 and HolSSE1 against common pathogenic bacteria and their antimicrobial efficacy in biofilms[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2021, 116: 105322. DOI:10.1016/j.bioorg.2021.105322.
- [48] XIANG Y Y, WANG S P, HUANG H, et al. A novel holin from an *Enterococcus faecalis* phage and application *in vitro* and *in vivo*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2024, 186: 106471. DOI:10.1016/j.micpath.2023.106471.