

新型裂解性副溶血弧菌噬菌体 vB_VpS_BA27 的特性及基因组研究

张 悦^{1,2}, 赖晓芳¹, 刘 畅², 刘广锋², 江丽玲², 张洪赛², 李梦瑶², 王 杏², 姜敬哲²

1. 江苏海洋大学 海洋科学与水产学院, 江苏 连云港 222005

2. 中国水产科学研究院南海水产研究所/农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300

摘要: 噬菌体作为一种特异性感染并裂解细菌的病毒, 在细菌性疾病防控和环境微生物治理领域具有重要应用价值。副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 是水产养殖中的常见致病菌, 常导致水生动物病害并引发人类食源性疾病。从湛江东海岛方斑东风螺 (*Babylonia areolata*) 养殖厂的病螺池水样中分离出 1 株副溶血弧菌噬菌体 (vB_VpS_BA27), 并对其生物学特性和基因组特征进行了系统研究。结果显示, vB_VpS_BA27 在较宽的 pH 范围 (3~11) 内保持活性, 且在低温环境 (4~37 °C) 下生存能力较强。vB_VpS_BA27 表现出显著的抑菌活性, 其爆发量可达 285.67 PFU·细胞⁻¹。基因组测序分析证实 vB_VpS_BA27 为裂解性噬菌体, 基因组中未检测到耐药基因和毒力因子。系统发育分析显示, 在有尾噬菌体纲 (Caudoviricetes) 中, vB_VpS_BA27 与 *Delephqintavirus* 的亲缘关系较近, 并与若干相关噬菌体共同形成了一个新的类别。研究表明, vB_VpS_BA27 噬菌体在方斑东风螺弧菌性疾病的防控方面具有良好的应用潜力, 为水产养殖病害的生物防控提供了新思路。

关键词: 副溶血弧菌噬菌体; 生物学特性; 基因组分析; 方斑东风螺

中图分类号: S 944.4⁺9

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Characterization and genomic study of a novel lytic phage of *Vibrio parahaemolyticus* vB_VpS_BA27

ZHANG Yue^{1,2}, LAI Xiaofang¹, LIU Chang², LIU Guangfeng², JIANG Liling², ZHANG Hong sai², LI Mengyao², WANG Xing², JIANG Jingzhe²

1. School of Marine Sciences and Fisheries, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China

2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences/Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation&Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510300, China

Abstract: Phages, which specifically infect and lyse bacteria, are of significant value in the prevention and treatment of bacterial infections, as well as in the management of environmental microbiota. *Vibrio parahaemolyticus*, a prevalent pathogen in aquaculture, causes diseases in aquatic animals and frequently leads to foodborne illnesses in humans. In this study, we isolated a phage specific to *V. parahaemolyticus* (vB_VpS_BA27) from water samples collected from a diseased snail pond in a *Babylonia areolata* aquaculture facility on Donghai Island, Zhanjiang. Then we systematically analyzed the biological characteristics and genomic features of vB_VpS_BA27. The results show that vB_VpS_BA27 remained active across a broad pH range (3–11) and exhibited robust survival capabilities under low-temperature conditions (4–37 °C). It demonstrated significant antibacterial

收稿日期: 2025-02-28; 修回日期: 2025-03-21

基金项目: 海南省自然科学基金项目 (324CXTD435); 中国水产科学研究院南海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助 (2023TD44)

作者简介: 张 悦 (2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向为贝类病害。E-mail: 2060701706@qq.com

通信作者: 姜敬哲 (1980—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为渔业生物病害防治。E-mail: jingzhejiang@scsfri.ac.cn

activity with a burst size of 285.67 PFU·cell⁻¹. Genomic sequencing confirms that vB_VpS_BA27 was a lytic phage, with no detected antibiotic resistance or virulence genes. Phylogenetic analysis indicates that within the class *Caudoviricetes*, vB_VpS_BA27 was closely clustered with members of the genus *Delephquintavirus* and that, together with other related phages, they formed a new clade within this class. The study demonstrates that vB_VpS_BA27 exhibits the potential in controlling vibriosis in *B. areolata*, providing a novel approach for the biological control of diseases in *B. areolata* aquaculture.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus* phage; Biological characteristics; Genomic analysis; *Babylonia areolata*

副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 是一种广泛分布于海洋和淡水环境中的革兰氏阴性菌^[1], 因其对水产养殖和人类健康的双重威胁而备受关注。作为水产养殖业中的重要病原体, 副溶血弧菌能够感染多种经济水产动物, 导致大规模养殖损失, 例如引发凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 的急性肝胰腺坏死病 (AHPND), 造成巨大经济损失^[2]。此外, 该菌还通过污染贝类^[3]、甲壳动物^[4]、鱼类^[5]等水产品进入人类食物链, 成为全球常见的食源性病原体。副溶血弧菌感染可引发急性胃肠炎, 症状包括腹泻、呕吐和腹痛, 严重时甚至导致败血症。流行病学数据显示, 副溶血弧菌感染在亚洲、北美和欧洲等地区的水产品相关食源性疾病中占有重要比例^[6-9], 尤其在夏季高温季节, 发病率显著上升^[10]。

长期以来, 抗生素是控制副溶血弧菌感染的主要手段。然而, 随着抗生素的广泛使用, 副溶血弧菌的耐药性问题日益严峻。研究表明, 副溶血弧菌已对多种常用抗生素 (如四环素、氟喹诺酮类和磺胺类药物) 产生了耐药性^[11]。耐药性的出现不仅削弱了传统抗生素的治疗效果, 还可能导致多重耐药菌株的出现, 进一步加剧了防控难度^[12]。更为严重的是, 抗生素的滥用还对水环境和生态系统造成了潜在的污染, 增加了环境中耐药基因的传播风险^[13]。因此, 开发新型、安全且有效的防控策略已成为当前研究的迫切需求。

噬菌体作为一种天然的病毒, 能够特异性感染并裂解细菌, 具有高度的宿主特异性和环境友好性, 被认为是替代抗生素的潜在治疗方法^[14]。近年来, 针对副溶血弧菌噬菌体的研究逐渐增多, 这些研究在噬菌体的分离鉴定^[15]、生物学特性^[16]以及在食品安全^[17]和水产养殖中的应用方面取得了显著进展。例如, 有研究表明, 噬菌体在食品加工过程中可有效控制副溶血弧菌的污染, 显著降低食源性疾病的发生率^[18]。此外, 噬菌体在水产养殖中的应用也显示出良好的前景, 能够有效防控弧菌

病, 减少养殖损失^[19]。然而, 现有研究在噬菌体资源开发和分类体系方面存在显著局限。一方面, 噬菌体资源开发主要集中在对虾和牡蛎等常见宿主上, 而对于底栖腹足类 [如方斑东风螺 (*Babylonia areolata*)] 养殖环境的噬菌体多样性研究仍处于起步阶段。另一方面, 多数研究聚焦于噬菌体的分离鉴定及宿主范围探索, 对基因组功能注释、系统发育解析等深度分析不足, 导致噬菌体分类体系碎片化, 仅 33.88% 的已知噬菌体具有完整分类地位^[20]。此外, 噬菌体在极端环境中的稳定性和裂解宿主能力方面也存在不足, 这限制了噬菌体在水产养殖、食品安全和临床治疗中的广泛应用。鉴于此, 本研究旨在从方斑东风螺养殖环境中分离和鉴定副溶血弧菌噬菌体, 并对其生物学特性和基因组特征进行系统分析。通过全基因组分析, 明确噬菌体的分类地位, 为解决噬菌体分类学争议提供分子层面的证据。同时, 通过研究其在极端环境下的稳定性和裂解宿主的能力, 为其在水产养殖、食品安全和临床治疗中的潜在应用奠定理论基础, 以拓展复杂微环境中噬菌体资源的开发, 填补底栖腹足类养殖环境中噬菌体多样性研究的空白。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器

脑心浸出液肉汤管 (BHI) (广东环凯微生物科技有限公司); TCBS 琼脂培养基 (青岛海博生物技术有限公司); 琼脂粉 (兰杰柯科技有限公司); SM 缓冲液 (上海源叶生物科技有限公司); NaCl (国药集团化学试剂有限公司)。

3-18KS 型高速冷冻离心机 [Sigma-aldrich 西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司]; LRH 系列生化培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司); HRLM-80 立式自动高压蒸汽灭菌器 (青岛海尔生物医疗股份有限公司); 酶标仪及洗板机 [美谷分子仪器 (上海) 有限公司]。紫外可见光分光光度计 (上海仪电分析

仪器有限公司); MQT-60R 台式振荡培养箱 (上海旻泉仪器有限公司); SYG-4 数显恒温水浴锅 (常州郎越仪器制造有限公司); 超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司)。

1.1.2 实验菌株

实验菌株分离自广东省湛江市东海岛某方斑东风螺养殖厂的病螺池水样 (含泥沙), 通过分离纯化, 获得了 1 株副溶血弧菌 (BA27)。

1.2 方法

1.2.1 宿主菌菌液的准备

将 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存保藏的宿主菌接种于脑心浸液 (Brain heart infusion, BHI) 液体培养基中, 在 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下过夜培养, 按 1% (φ) 的比例将上述菌液转接于新鲜 BHI 液体培养基中并培养至对数期, 置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 噬菌体的分离、纯化与增殖

将 1.1.2 中采集到的方斑东风螺病螺池水样作为样本悬液备用。取 $200\text{ }\mu\text{L}$ 对数期宿主菌液加入 5 mL 含 2% (w) NaCl 的 BHI 液体培养基中, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养至指数增长期, 再取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 样本悬液加入至上述菌液中, 继续培养过夜。培养液经 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $8\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 去除细菌后, 用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤, 将获得的噬菌体滤液于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。参考丁同燕等^[21] 的双层平板法, 制备含有宿主菌的双层琼脂板, 取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 噬菌体滤液滴定到凝固后的双层板上, 置于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中过夜培养, 可清晰观察到噬菌斑。之后, 使用双层平板法对噬菌体进行纯化, 取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 梯度稀释的噬菌体滤液与 1 mL 对数期宿主菌液混合, 凝固后置于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中, 培养 12 h 后挑取单个噬菌斑, 混于 1 mL SM buffer 中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 24 h 。随后在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $8\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下离心 5 min , 取上清液进行梯度稀释后铺双层平板, 挑取单个噬菌斑, 混于新的 1 mL SM buffer 中。重复上述过程 3~5 次, 直至双层平板上出现形态大小一致的噬菌斑。

取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 纯化噬菌体液加入 30 mL 对数期宿主菌液中, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜, 获得扩培液。将扩培液在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的条件下离心 5 min 后取上清液, 经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤, 得到噬菌体增殖液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。采用双层平板法对增殖液中的侵染性噬菌体颗粒进行计数。

1.2.3 最佳感染复数测定

将 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存保藏的宿主菌接种于含 2% (w)

NaCl 的 BHI 液体培养基中, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡培养至对数期 ($\text{OD}_{600}\approx 0.4$)。按 10 倍梯度设置感染复数 (Multiplicity of infection, MOI) 比例。根据设定的 MOI 比例, 各取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 噬菌体和宿主菌混合 (改变噬菌体浓度, 细菌浓度不变), 静置 10 min 后, 加入 1 mL 的新鲜 BHI 液体培养基, 并在 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的条件下振荡培养 6 h 。通过双层平板法测定噬菌体的效价 ($\text{PFU}\cdot\text{mL}^{-1}$)。通过比较不同 MOI 条件下的噬菌体效价, 选取效价最高的 MOI 值作为最佳 MOI。

1.2.4 一步生长曲线测定

按照最佳 MOI 比例, 将噬菌体扩培液与对数期宿主菌液 ($\text{OD}_{600}\approx 0.4$) 各 1 mL 混合, 在 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床中共培养 15 min 。将混合液 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $10\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 min , 弃上清, 用 1 mL 含 2% (w) NaCl 的 BHI 液体培养基重悬沉淀。加入 1 mL 菌液后, 置于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床继续培养。每隔一定时间取样测定噬菌体滴度, 并绘制一步生长曲线。爆发量 ($\text{PFU}\cdot\text{细胞}^{-1}$) = (裂解末期噬菌体效价 - 裂解初期噬菌体效价) / (感染初期宿主菌浓度)。

1.2.5 噬菌体 pH 和温度稳定性测定

设置 pH 梯度 ($\text{pH}=1\sim 13$), 将 $100\text{ }\mu\text{L}$ 噬菌体液与 $900\text{ }\mu\text{L}$ 相应 pH 缓冲液混匀, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置孵育 1 h 。采用双层平板法测定不同 pH 处理下的噬菌体效价 ($\text{PFU}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

取 $500\text{ }\mu\text{L}$ 噬菌体液, 分别在 4 、 37 、 50 、 65 、 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下处理 30 、 60 、 90 min 。采用双层平板法测定不同 pH 处理下的噬菌体效价 ($\text{PFU}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

1.2.6 抑菌曲线

将宿主菌培养至对数早期 ($\text{OD}_{600}\approx 0.4$), 与噬菌体扩培液按不同 MOI 比例混合 (宿主菌液浓度固定, 调整噬菌体液浓度)。在 96 孔板中, 每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 宿主菌液与 $100\text{ }\mu\text{L}$ 噬菌体液混合物, 同时设置空白对照 ($100\text{ }\mu\text{L}$ BHI 培养液 + $100\text{ }\mu\text{L}$ BHI 培养液) 和阴性对照 ($100\text{ }\mu\text{L}$ 宿主菌液 + $100\text{ }\mu\text{L}$ BHI 培养液), 每组设置 3 个平行。将 96 孔板置于酶标仪中, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h , 每隔 1 h 测定 1 次 OD_{600} 值, 观察宿主菌生长情况。

1.2.7 噬菌体全基因组测序及分析

将 30 mL 宿主菌培养至指数增长期, 加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 噬菌体悬液过夜培养后, 送至广东美格基因科技有限公司进行样本前处理及测序, 测序平台为 Illumina Novaseq 6000。数据处理流程包括: 使

用 Soapnuke (v2.0.5) 和 BWA (v0.7.17) 进行质量评估和低质量数据过滤; 利用 Megahit (v1.1.2) 进行 *denovo* 组装以获得 contigs 序列; 通过 CheckV (v1.0) 比对病毒数据库获取病毒序列, 并结合 BWA 和 Samtools 计算测序深度; 最后使用 ccfind (v1.4.5) 判断病毒 contigs 是否为环状基因组 (双端重叠部分 >50 bp, identity >94%)。完整的基因组序列已提交至 GenBank 数据库, 登录号为 PV335312。

将全基因组序列上传至 PhageScope 噬菌体分析网站 (<https://phagescope.deepomics.org>), 采用 Prodigal (v2.6.3, meta 模式) 预测噬菌体基因组中的开放阅读框 (ORF), 并使用 Eggno-mapper v2.1.10 进行直系同源群注释。对于未注释的蛋白质, 采用 mmseqs 在 PHROG 数据库中进行同源性搜索 [e 值 (Expect threshold) < 1×10^{-5} , 敏感模式], 并根据功能类别对蛋白质进行分类。通过 mmseqs 在 VFDB (毒力因子数据库) 和 CARD (抗菌抗性基因数据库) 中进行同源性搜索, 鉴定毒力因子和抗菌抗性基因。对于噬菌体生活方式的预测, 使用 Graphage 工具区分烈性噬菌体和温和噬菌体。

使用 NCBI Blastp 将保守蛋白序列 [末端大亚基 (TerL)、门户蛋白 (Portal)] 与非冗余蛋白质序列数据库 (NR) 比对, e 值截止设置为 1×10^{-5} , 并在 Organism 中排除 bacteria (taxid: 2) 的比对结果。基于保守蛋白的比对结果, 下载得分值 (Max Score) 排名前十条序列中的保守蛋白。下载国际病毒分类委员会 (ICTV, MSL39.v4) 中已明确分类的该纲/科中可查询到的所有核酸序列, 使用 Prodigal (v2.6.3) 预测 ORF, 将预测出的 ORF 建立成 ICTV 蛋白质, 通过 Diamond 比对噬菌体保守蛋白序列和 ICTV 蛋白库, 将比对得到的序列与 NR 库中 Blastp 比对得到的噬菌体保守蛋白以及外群序列共同建树。使用 Muscle 算法进行多次比对, 随后使用 MEGA 7 生成邻接系统发育树, 利用 1 000 个 bootstrap 重复^[22], 并使用 ChiPlot^[23] (<https://www.chip-lot.online/>) 美化系统发育树。

2 结果

2.1 噬菌体 vB_VpS_BA27 的生物学特性

观察 vB_VpS_BA27 的噬菌斑, 发现其形态较小且透明, 中心直径不足 1 mm, 形似针眼 (图 1-a)。设置不同 MOI 梯度 (10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3} 、 10^{-2} 、 10^{-1} 、1、10) 发现, MOI=1 时噬菌体效价最高, 因此, 噬菌体的最佳 MOI 为 1 (图 1-b)。在最佳

MOI 的条件下, 进行一步生长实验, 结果显示 vB_VpS_BA27 噬菌体的潜伏期为 0~20 min, 120 min 之后进入平台期, 爆发量为 $285.67 \text{ PFU} \cdot \text{细胞}^{-1}$ (图 1-c)。这些结果表明 vB_VpS_BA27 噬菌体具有较短的潜伏期和较高的爆发量, 可能具有较高的裂解效率。这一特性使其在实际应用中具有潜在优势, 能够快速有效地裂解宿主菌。在 pH 稳定性实验中, vB_VpS_BA27 在 pH 3~11 的范围内均保持良好活性, 且在中/碱性环境下的活性优于酸性环境, 但在 pH 1 和 13 时完全失活 (图 1-d)。这说明 vB_VpS_BA27 噬菌体可能更适应于中性和碱性环境。这种广泛的 pH 耐受性使其在不同的环境条件下具有潜在的应用价值。温度稳定性实验表明, vB_VpS_BA27 在 4~28 °C 范围内保持稳定, 超过 37 °C 后效价开始缓慢下降, 并在 65 °C 时完全失活, 表明其对温度具有一定的耐受性, 但对高温较为敏感 (图 1-e)。这种特性表明 vB_VpS_BA27 噬菌体在温和的环境条件下具有较好的稳定性, 但在高温条件下可能需要采取保护措施以维持其活性。此外, vB_VpS_BA27 在不同 MOI 条件下对宿主菌的体外抑菌能力测试结果显示, 即使在较低的 MOI 值 (如 10、1、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3}) 下, vB_VpS_BA27 仍能有效抑制细菌生长 (图 1-f)。噬菌体的抑菌效果与其 MOI 呈正相关, 表明随着 MOI 的增加, 抑菌效果显著增强。以上结果表明, vB_VpS_BA27 具有作为潜在抗菌剂的应用潜力, 能够在不同的感染条件下有效抑制宿主菌的生长。

2.2 噬菌体 vB_VpS_BA27 全基因组分析

2.2.1 测序深度分析

在对 vB_VpS_BA27 噬菌体进行全基因组测序的过程中, 对其测序深度进行了详细分析。结果显示, vB_VpS_BA27 噬菌体的测序深度在大部分区域呈现 50~150 的波动范围 (图 2)。这一范围内的测序深度表明, 所采用的测序技术成功且高效地覆盖了整个噬菌体基因组。尽管在某些区域存在一定的波动, 但整体测序深度较高, 这验证了测序方法的可靠性。高质量的测序数据是后续基因组分析的基础, 因此这一结果为 vB_VpS_BA27 噬菌体的基因组注释、功能预测以及进化分析提供了坚实的数据支持。

2.2.2 基因组特征分析

vB_VpS_BA27 噬菌体的全基因组分析显示, 其基因组长度为 79 392 bp, GC 含量为 48.20%, 属

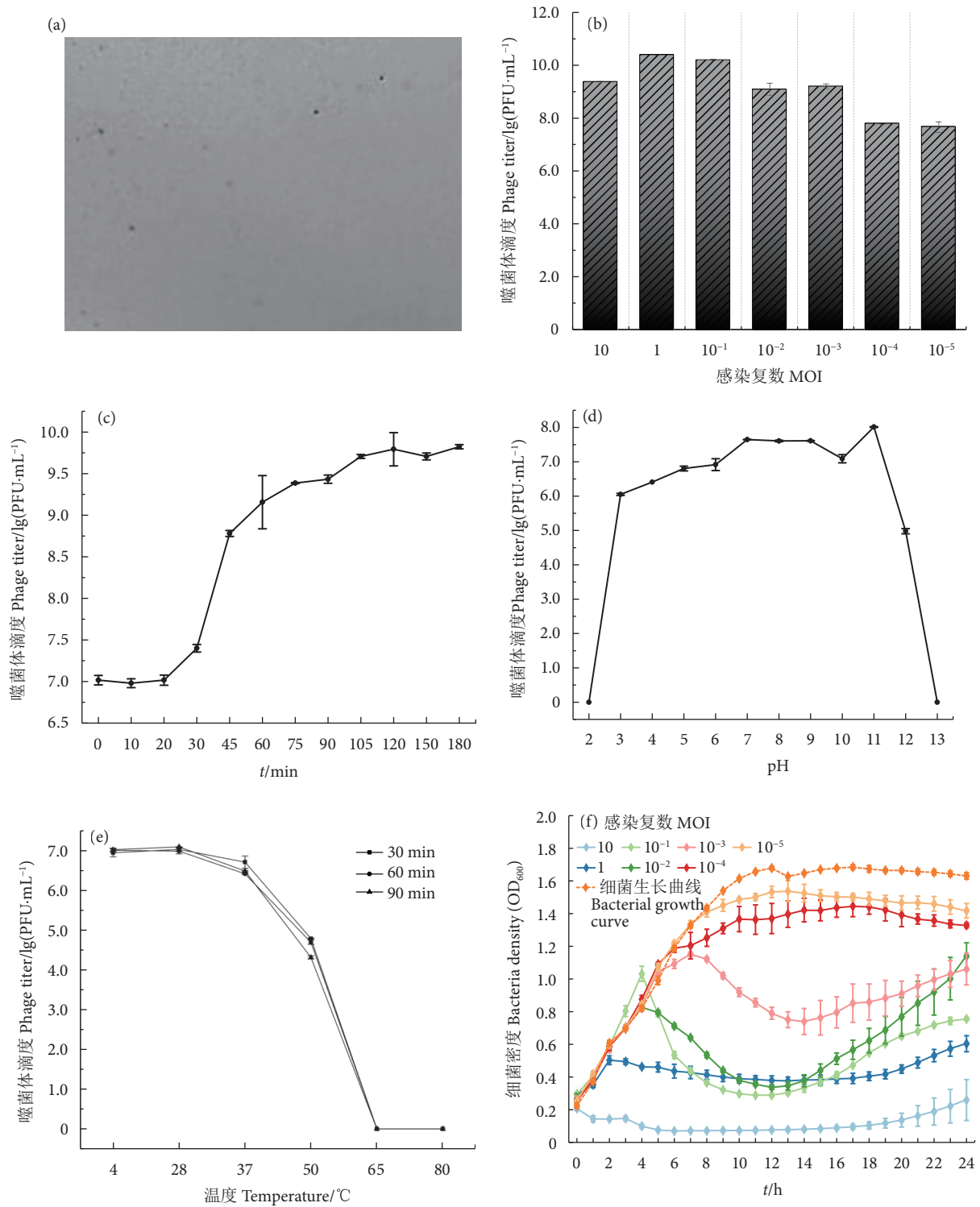


图1 噬菌体 vB_VpS_BA27 的生物学特性

注: a. vB_VpS_BA27 噬菌斑; b. 最佳 MOI 的测定; c. 一步生长曲线; d. pH 敏感性; e. 温度敏感性; f. 抑菌曲线。

Fig. 1 Biological characteristics of phage vB_VpS_BA27

Note: a. vB_VpS_BA27 plaque; b. Determination of the optimal MOI (Multiplicity of infection); c. One-step growth curve; d. pH sensitivity; e. Temperature sensitivity; f. Inhibition curve.

于线性双链 DNA 病毒 (dsDNA)。基因组共包含 112 个 ORF, 其中仅有 20 个 (17.86%) 具有已知功能 (图 3), 这一发现表明 vB_VpS_BA27 噬菌体的基因组具有较高的新颖性, 并可能包含新的或未被

充分研究的基因功能。这些已知功能的 ORF 涉及裂解、组装、复制、感染、包装和免疫等关键生物过程。这些功能模块对于噬菌体的生命周期至关重要, 包括感染宿主细菌、复制基因组以及产生新的

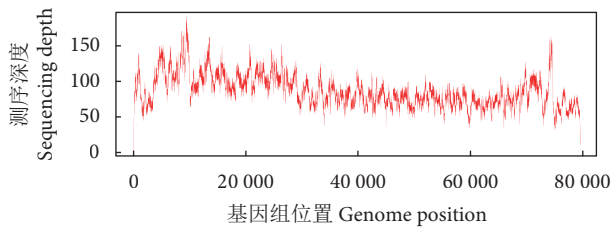


图2 噬菌体 vB_VpS_BA27 的测序深度分析

注：图中高深度区域反映了基因组中重复序列或高覆盖区域，低深度区域则可能指示基因组中的单拷贝区域或测序覆盖不足的区域。

Fig. 2 Sequencing depth analysis of phage vB_VpS_BA27

Note: High-depth regions reflect repetitive sequences or areas of high coverage in the genome, whereas low-depth regions may indicate single-copy regions or areas with insufficient sequencing coverage.

噬菌体颗粒。值得注意的是，在这些已知功能的 ORF 中，发现了肽酶活性基因 (Peptidase activity) 和参与肽聚糖分解过程 (Peptidoglycan catabolic process) 的 2 个关键功能模块，这 2 个模块可能赋予 vB_VpS_BA27 噬菌体潜在的抗菌能力，并增强

其裂解细菌的能力。此外，vB_VpS_BA27 噬菌体基因组中包含 2 个保守蛋白：末端酶大亚基 (Terminase large subunit) 和门户蛋白 (Portal protein)，这 2 个蛋白对噬菌体的 DNA 包装至关重要。末端酶大亚基在噬菌体 DNA 的终止和包装过程中发挥关键作用，而门户蛋白则参与 DNA 的转运和衣壳的组装。这些保守蛋白的存在为 vB_VpS_BA27 噬菌体的分类和进化分析提供了重要的分子标记。此外，vB_VpS_BA27 被预测为裂解性噬菌体，且在基因组中未检测到耐药基因或毒力基因。这类噬菌体在感染周期结束时会裂解宿主细菌，释放新的噬菌体颗粒，这一特性为控制细菌种群和治疗感染提供了潜在应用价值。裂解性噬菌体的这种特性使其在抗菌领域具有重要的应用前景，尤其是在对抗耐药菌方面。缺乏耐药基因和毒力基因意味着 vB_VpS_BA27 噬菌体在应用过程中不太可能促进耐药

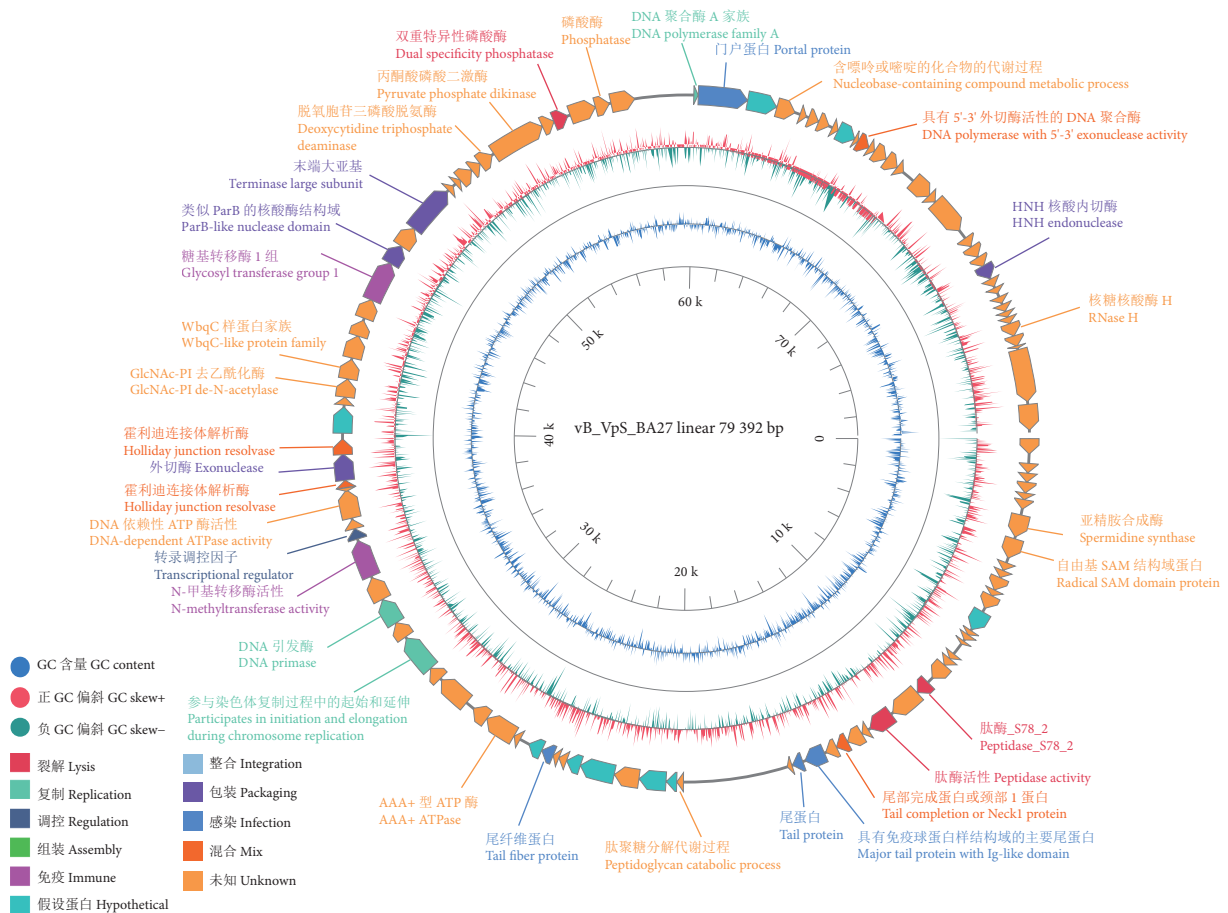


图3 噬菌体 vB_VpS_BA27 的基因组图谱

注：图谱展示了噬菌体 vB_VpS_BA27 的基因组组织结构，不同颜色代表不同功能类别的基因。图谱从内到外依次为：基因组长度、GC 含量偏差、GC 偏斜、顺时针或逆时针方向转录的开放阅读框 (ORF) 和预测的基因特征。

Fig. 3 Genomic map of phage vB_VpS_BA27

Note: The map illustrates the genomic organization of phage vB_VpS_BA27, with different colors representing genes of various functional categories. From the innermost to the outermost layer, the map shows: genome length, GC content deviation, GC skew, open reading frames (ORF) transcribed in the clockwise or counterclockwise direction, and predicted gene features.

性的发展或对宿主产生不利影响。这一特性进一步支持了 vB_VpS_BA27 作为噬菌体治疗候选者的潜在适用性, 为其在实际应用中的安全性提供了保障。

2.2.3 系统发育分析

基于末端酶大亚基 (TerL) 和门户蛋白 (Portal) 构建的系统发育树显示, vB_VpS_BA27 隶属于有尾噬菌体纲 (Caudoviricetes), 与 *Delephquintavirus* 分支相邻, 并与 NR 数据库中的其他噬菌体共同形成了一个明显的新的分支, 这表明它可被归为有尾噬菌体纲内的一个新类别 (图 4-a—4-b)。这一发现

不仅拓展了弧菌噬菌体的多样性, 为 vB_VpS_BA27 的分类学归属提供了分子基础, 而且强调了其在有尾噬菌体纲中的特定进化路径。此外, 系统发育分析的结果还表明, 具有相似宿主背景的噬菌体在进化树上呈现出聚类的趋势。这种现象进一步支持了噬菌体与其宿主之间存在进化相关性的观点, 即噬菌体与其宿主可能经历了共同的进化历程。这种共进化关系意味着噬菌体的遗传多样性可能受到其宿主细菌种类的强烈影响, 宿主细菌的遗传变化可能驱动噬菌体相应地发生适应性进化。

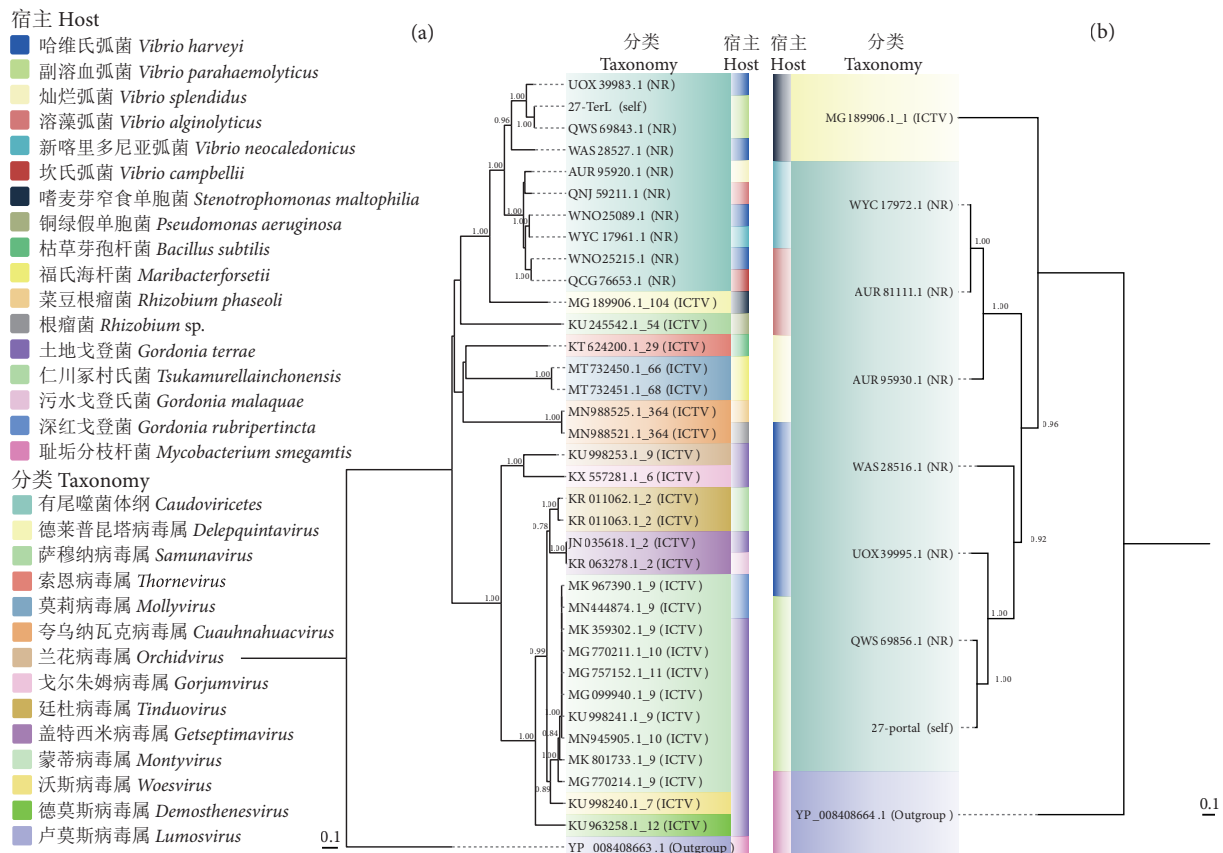


图4 vB_VpS_BA27 噬菌体的系统发育树

注: a. 基于末端大亚基 (TerL) 构建的系统发育树; b. 基于门户蛋白 (Portal) 构建的系统发育树。系统发育树中每条序列旁标注了数据来源, 包括 self (本研究数据)、NR (非冗余蛋白质序列数据库)、ICTV (国际病毒分类委员会) 和 Outgroup (外群)。

系统发育树使用 MEGA 7 软件 (版本 7.0.26) 构建, 采用 1000 次 bootstrap 重复验证, 并通过 ChiPlot 工具进行美化。

Bootstrap 值 > 0.7, 比例尺表示遗传距离, 单位为 0.1。

Fig. 4 Phylogenetic tree of phage vB_VpS_BA27

Note: a. Phylogenetic tree based on the terminase large subunit (TerL); b. Phylogenetic tree based on the portal protein. Each sequence in the phylogenetic tree is labeled with its data source, including self (Data from this study), NR (Non-redundant protein sequence database), ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) and Outgroup. The phylogenetic trees were constructed using MEGA 7 software (Version 7.0.26) with 1000 bootstrap replications and were refined using ChiPlot. The bootstrap values > 0.7 are shown, and the scale bar represents genetic distance with a unit of 0.1.

3 讨论

3.1 vB_VpS_BA27 的分类学贡献与系统发育定位

本研究从方斑东风螺养殖环境中分离并纯化

了 1 种新型噬菌体 vB_VpS_BA27。vB_VpS_BA27 的发现可能代表了 1 个弧菌噬菌体的新类别, 这一新类别与 *Delephquintavirus* 关系密切, 同属于有尾噬菌体纲。有尾噬菌体纲是以双链 DNA 和尾部结

构为特征的噬菌体分类群,也是目前已知最丰富和多样化的病毒群^[24]。尽管国际病毒分类委员会(The International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)已对其分类体系进行了调整,不再使用传统的科级分类(如 *Myoviridae*、*Siphoviridae* 等)^[25],但有尾噬菌体纲下的噬菌体仍被直接归类为属。末端酶大亚基和门户蛋白是双链 DNA 病毒包装过程中的关键功能蛋白,它们通过与门户蛋白结合形成 DNA 包装“马达”,从而将 DNA 装入衣壳中^[26]。基于此,本研究利用末端酶大亚基和门户蛋白构建了系统发育树。结果显示, vB_VpS_BA27 的末端酶大亚基和门户蛋白与有尾噬菌体纲下的 *Delephantavirus* 具有较近的亲缘关系,进一步支持了其分类地位。通过进化树的分析,可以观察到聚在一起噬菌体,其宿主菌也相同,表明它们在进化上具有密切的亲缘关系。这种现象揭示了噬菌体与宿主细菌之间可能存在的共进化关系,表明噬菌体和宿主可能经历了长期的相互作用和适应性进化,从而在系统发育上表现出一定的亲缘关系。这种宿主的趋同性进一步说明了噬菌体与其宿主之间的共同进化关系,这在以往的研究中较少被关注。这些发现对于理解噬菌体与宿主细菌之间的相互作用具有重要意义,为噬菌体疗法的开发和应用提供了新的视角。特别是在抗生素耐药性日益严重的背景下,噬菌体作为一种潜在的替代治疗手段,其特异性和进化适应性可能使其在治疗耐药菌感染方面发挥重要作用。

3.2 极端环境适应性及其应用场景拓展

噬菌体的环境稳定性是其工程化应用的核心参数。本研究发现 vB_VpS_BA27 具有显著的环境耐受优势:在 pH 3~11 范围内维持>73% 活性,在 pH 为 12 时仍有活性,其酸碱稳定性远超前溶血弧菌噬菌体 SSJ01 (pH 5~11)^[27],尤其是在中性至碱性环境中,这使其在碱性水产养殖废水处理或者食品加工环节中更具应用优势。vB_VpS_BA27 在裂解动力学上表现出显著优势,具有较短的潜伏期(0~20 min)和高达 285.67 PFU·细胞⁻¹ 的爆发量,展现出高效的裂解能力。与已报道的前溶血弧菌噬菌体 vB_VpM_R16F (爆发量仅为 13 PFU·细胞⁻¹) 相比, vB_VpS_BA27 的爆发量约为其 22 倍^[28]。此外,在海鲜样品中分离得到的 6 种前溶血弧菌溶菌性噬菌体的爆发量约为 17~51 PFU·细胞⁻¹, vB_VpS_

BA27 的爆发量约为其 5.6~16.8 倍^[29]。这种高效裂解特性使 vB_VpS_BA27 在方斑东风螺副溶血弧菌防控中具有独特优势。尽管如此,该爆发量在已报道的弧菌噬菌体中仅处于较高水平,并非最高。例如,噬菌体 XM1 的潜伏期为 20 min,爆发量为 398 PFU·细胞⁻¹^[30]。这表明弧菌噬菌体的爆发量存在一定的差异,可能与噬菌体的种类、宿主菌株的特性以及实验条件等因素有关。体外抑菌实验表明, vB_VpS_BA27 能够在短时间内显著降低副溶血弧菌的浓度,表现出强大的抗菌效果,并在 24 h 的实验周期内保持高效的抑菌能力。这些结果表明, vB_VpS_BA27 在体外环境中对副溶血弧菌具有快速清除能力,为其在水产病原菌防控中的实际应用提供了关键实验依据。

3.3 vB_VpS_BA27 在抗菌领域的应用潜力

细菌细胞壁是维持细胞完整性的关键结构,主要由肽聚糖组成。肽聚糖不仅为细胞提供刚性,抵抗内部膨胀压力,还确保细胞与外部环境的隔离^[31],防止渗透性破裂^[32]。噬菌体裂解酶是一类能够水解肽聚糖的细胞壁水解酶,通过破坏肽聚糖结构导致细菌裂解^[33]。肽聚糖由糖苷键和肽键交联而成^[34],裂解酶通过特异性水解这些化学键,破坏细胞壁的完整性,最终引发细菌裂解。本研究在 vB_VpS_BA27 基因组中鉴定了 2 个关键功能模块:肽酶活性基因和参与肽聚糖分解过程的 ORF。肽酶活性能够催化肽键的水解,在细菌细胞壁重塑、细胞分裂以及噬菌体感染过程中发挥重要作用。肽聚糖分解过程涉及到众多酶的参与,其中关键酶为裂解酶,也称为内容素或溶胞壁酶^[33]。这些酶能够特异性水解宿主菌的肽聚糖结构,破坏细胞壁的完整性,从而高效杀灭病原菌^[35],这使得 vB_VpS_BA27 在抑菌上拥有高效性。此外,裂解酶能够特异性识别并水解特定细菌的肽聚糖结构,对目标菌具有高度选择性^[36]。这种特异性使 vB_VpS_BA27 能够精准靶向致病菌,而不影响其他非目标微生物,从而减少对正常菌群的干扰。研究还发现携带裂解酶的噬菌体可显著降低细菌耐药性风险^[37-38]。这些特性使 vB_VpS_BA27 在抗菌领域展现出巨大的应用潜力,特别是在治疗耐药菌感染方面。

3.4 研究局限性与转化应用路径

本研究通过系统解析新型噬菌体 vB_VpS_BA27

的生物学特性与基因组功能, 填补了底栖腹足类(方斑东风螺)复杂养殖环境中噬菌体多样性研究的空白。其高效裂解能力(潜伏期 0~20 min, 爆发量 285.67 PFU·细胞⁻¹)与基因功能模块(肽酶活性及肽聚糖分解过程)为水产弧菌病防控提供了新策略。鉴于 vB_VpS_BA27 的宿主范围尚不明确, 未来的研究应重点关注这一问题。若其被证实为窄谱噬菌体, 可以考虑通过噬菌体鸡尾酒疗法联合广谱噬菌体以扩展抑菌谱^[39], 并通过工程化改造提升宿主适应性^[40]。此外, 尽管实验室数据显示噬菌体在酸碱环境(pH 3~12)下具有极端耐受性, 但底泥-水界面的动态微环境对噬菌体活性的长期影响仍需通过原位实验进行验证。vB_VpS_BA27 在高温条件下容易失活, 可通过纳米涂层封装噬菌体^[41]来提高其在高温环境中的稳定性, 从而拓展其在水产养殖、食品加工和医疗等领域的应用潜力。在此基础上, 依托 vB_VpS_BA27 阻断水产源耐药菌传播的能力, 在“*One Health*”框架下构建生态治理、食品安全和公共卫生的协同干预体系, 以推动噬菌体疗法从机制解析向产业化落地的转化。

4 结论

本研究从方斑东风螺养殖环境中成功分离出 1 株能够特异性裂解副溶血弧菌的噬菌体 vB_VpS_BA27。该噬菌体在较宽的 pH 范围(3~11)内保持活性, 并在低温环境(4~37 °C)中表现出良好的稳定性, 同时具有强大的抑菌能力, 爆发量可达 285.67 PFU·细胞⁻¹。这些特性表明 vB_VpS_BA27 具有作为噬菌体治疗候选者的巨大潜力。基因组分析显示, vB_VpS_BA27 为裂解性噬菌体, 其基因组中未检测到耐药基因或毒力基因, 进一步证实了其作为安全抗菌剂的潜力。系统发育分析表明, vB_VpS_BA27 属于有尾噬菌体纲, 与 *Delepliquintavirus* 聚为一簇。此外, 基因组中鉴定出的肽酶活性相关基因揭示了裂解酶很可能在噬菌体裂解细菌过程中起到关键作用, 为抗菌应用提供了新思路。本研究结果不仅拓展了副溶血弧菌噬菌体的分类学认知, 还为开发针对副溶血弧菌感染的生物防控方法奠定了科学基础, 尤其是在当前全球面临严峻的抗生素耐药性挑战的形势下, 研究成果可为探索替代抗生素的新型抗菌策略提供重要参考依据, 对保障水产养殖业可持续发展具有积极意义。

参考文献:

- [1] ZHANG Y L, OUYANG G F, CHEN X H, et al. Development of closed dumbbell mediated isothermal amplification assay for rapid and on-site detection of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Microchem J*, 2024, 207: 111892.
- [2] NAVANEETH K, BHUVANESWARI T, RAJAN J, et al. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from shrimp farms of southeast coast of India with special reference to Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) status[J]. *Aquaculture*, 2020, 518: 734813.
- [3] SCANES E, SIBONI N, POTTS J, et al. Temporal and spatial co-occurrence of Pacific oyster mortality and increased planktonic *Vibrio* abundance[J]. *iScience*, 2025, 28(2): 111674.
- [4] VIKASH K, KARTIK B, VIET D N, et al. Phloroglucinol-mediated Hsp70 production in crustaceans: protection against *Vibrio parahaemolyticus* in *Artemia franciscana* and *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1091.
- [5] PENG W, SHI Y, LI G F, et al. *Tetraodon nigroviridis*: a model of *Vibrio parahaemolyticus* infection[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2016, 56: 388-396.
- [6] SIRIPHAP A, PRAPASAWAT W, BORTHONG J, et al. Prevalence, virulence characteristics, and antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from raw seafood in a province in Northern Thailand[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2024, 371: 1-9.
- [7] EFSA BIOHAZ Panel, KOUTSOMANIS K, ALLENDE A, et al. Public health aspects of *Vibrio* spp. related to the consumption of seafood in the EU[J]. *EFSA J*, 2024, 22(7): e8896.
- [8] DESCAMPS A, ROBERT-PILLOT A, RAUZIER J, et al. Infections à vibrions non cholériques, 22 ans de surveillance nationale (1995–2017)[J]. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 2019, 49(4): S40.
- [9] XU F, GONZALEZ-ESCALONA N, HAENDIGES J, et al. Sequence type 631 *Vibrio parahaemolyticus*, an emerging foodborne pathogen in North America[J]. *J Clin Microbiol*, 2017, 55(2): 645-648.
- [10] PARK K, MOK J S, RYU A R, et al. Occurrence and virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seawater and bivalve shellfish of the Gyeongnam coast, Korea, in 2004–2016[J]. *Mar Pollut Bull*, 2018, 137: 382-387.
- [11] ZHANG F F, ZHANG J, LIN G W, et al. Antibiotic resistance and genetic profiles of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from farmed Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Ningde regions[J]. *Microorganisms*, 2024, 12(1): 152.
- [12] SUDAN P, TYAGI A, DAR R A, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of food safety related *Vibrio* species in inland saline water shrimp culture farms[J]. *Int Microbiol*, 2023, 26(3): 591-600.
- [13] JUN J W. A concise overview of studies on successful real-world applications of bacteriophages in aquaculture[J]. *Viruses*, 2024, 16(12): 1843.

- [14] EROLU A E E, YAŞA İ. Genomic overview of the N4-like TEMp-D1 phage and the efficacy of antibiotic-phage synergy for the biocontrol of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*[J]. *Aquacult Int*, 2025, 33(1): 1-19.
- [15] FU J Y, LI Y, ZHAO L H, et al. Characterization of vB_ValM_PVA8, a broad-host-range bacteriophage infecting *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1105924.
- [16] LIU W T, WU Y M, WANG H J, et al. Isolation and biological characteristics of a novel phage and its application to control *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish meat[J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2024, 21(8): 467-477.
- [17] ZHENG X S, GAO L, YUAN L, et al. Control of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood using the combination of lytic phages and citric acid[J]. *Foods*, 2024, 14(1): 37.
- [18] ZHANG H, YANG Z Q, ZHOU Y, et al. Application of a phage in decontaminating *Vibrio parahaemolyticus* in oysters[J]. *Int J Food Microbiol*, 2018, 275: 24-31.
- [19] REN H Y, LI Z, XU Y P, et al. Protective effectiveness of feeding phage cocktails in controlling *Vibrio parahaemolyticus* infection of sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. *Aquaculture*, 2019, 503: 322-329.
- [20] CHIBANI C M, FARR A, KLAMA S, et al. Classifying the unclassified: a phage classification method[J]. *Viruses*, 2019, 11(2): 195.
- [21] 丁同燕, 孙虎芝, 王倩, 等. 副溶血弧菌及其噬菌体 vBP-SPG08 的分离鉴定[J]. 中国兽医杂志, 2019, 55(12): 7-11.
- [22] SAITOU N, NEI M. The Neighbor-Joining Method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Mol Biol Evol*, 1987, 4(4): 406-425.
- [23] XIE J M, CHEN Y R, CAI G J, et al. Tree visualization by one table (tvBOT): a web application for visualizing, modifying and annotating phylogenetic trees[J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(W1): W587-W592.
- [24] WEINHEIMER A R, HA A D, AYLWARD F O. Towards a unifying phylogenomic framework for tailed phages[J]. *PLoS Genet*, 2025, 21(2): e1011595.
- [25] BARYLSKI J, ENAULT F, DUTILH B E, et al. Analysis of spounaviruses as a case study for the overdue reclassification of tailed phages[J]. *Syst Biol*, 2020, 69(1): 110-123.
- [26] RAO V B, FEISS M. Mechanisms of DNA packaging by large double-stranded DNA viruses[J]. *Annu Rev Virol*, 2015, 2(1): 351-378.
- [27] KANG J G, CHANG Y. Characterization of a *Vibrio parahaemolyticus*-targeting lytic bacteriophage SSJ01 and its application in artificial seawater[J]. *Food Sci Biotechnol*, 2024, 33(6): 1505-1515.
- [28] CHEN Y B, LI W Q, SHI K M, et al. Isolation and characterization of a novel phage belonging to a new genus against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Virol J*, 2023, 20(1): 81.
- [29] TAN C W, RUKAYADI Y, HASAN H, et al. Isolation and characterization of six *Vibrio parahaemolyticus* lytic bacteriophages from seafood samples[J]. *Frontiers Microbiol*, 2021, 12: 616548.
- [30] WEI Z Y, LI X J, AI C X, et al. Characterization and genomic analyses of dsDNA vibriophage vB_VpaM_XM1, representing a new viral family[J]. *Marine Drugs*, 2024, 22(9): 429.
- [31] RAZEY A, SCHWARZ J N, MITKOWSKI P, et al. One fold, many functions: M23 family of peptidoglycan hydrolases[J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 1036964.
- [32] BROGAN A P, RUDNER D Z. Regulation of peptidoglycan hydrolases: localization, abundance, and activity[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2023, 72: 102279.
- [33] 王琰, 陆承平. 噬菌体裂解酶的抗菌特性[J]. 微生物学报, 2009(10): 1277-1281.
- [34] YAO X, YI Z K, XU M, et al. A review on the extraction, structural characterization, function, and applications of peptidoglycan[J]. *Macromol Rapid Commun*, 2025, 46(5): 2400654.
- [35] XU Z H, JIN P, ZHOU X S, et al. Isolation of a virulent *Aeromonas salmonicida* subsp. *masoucida* bacteriophage and its application in phage therapy in turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2021, 87(21): 15.
- [36] KONG M, SIM J, KANG T, et al. A novel and highly specific phage endolysin cell wall binding domain for detection of *Bacillus cereus*[J]. *Eur Biophys J*, 2015, 44(6): 437-446.
- [37] LU H, NI S Q. Review on sterilization techniques, and the application potential of phage lyase and lyase immobilization in fighting drug-resistant bacteria[J]. *J Mater Chem B*, 2024, 12(14): 3317-3335.
- [38] SAHA D, MUKHERJEE R. Ameliorating the antimicrobial resistance crisis: phage therapy[J]. *IUBMB life*, 2019, 71(7): 781-790.
- [39] TEKLEMARIAM A D, AL HINDI R, QADRI I, et al. Phage cocktails: an emerging approach for the control of bacterial infection with major emphasis on foodborne pathogens[J]. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 2024, 40(1): 36-64.
- [40] PENG H, CHEN I A, QIMRON U. Engineering phages to fight multidrug-resistant bacteria[J]. *Chem Rev*, 2024, 125(2): 933-971.
- [41] 王宇栋, 夏海, 王华娟, 等. 生物矿化对噬菌体热稳定性的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(13): 4297-4302.