

耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌的新型噬菌体 vB_Pae_HLL23的鉴定

黄承德, 凌 敏*

广西医科大学基础医学院, 广西 南宁

收稿日期: 2025年4月25日; 录用日期: 2025年6月4日; 发布日期: 2025年6月16日

摘 要

铜绿假单胞菌是临床常见的机会致病菌。近年来, 噬菌体治疗已成为对抗铜绿假单胞菌感染的一种有希望的策略, 特别是在抗生素过度使用导致耐药性增加的情况下。本研究从医院污水中分离出一种新型噬菌体vB_Pae_HLL23, 对耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, CRPA)具有显著的裂解作用。透射电镜显示, vB_Pae_HLL23属于肌病毒科。生物学特性表明, HLL23噬菌体潜伏期为10 min, 裂解周期为80 min, 每个细胞爆发大小为195 PFU, 对温度和pH变化的耐受性增强。我们的研究结果表明, HLL23生物学特性稳定, 对耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌具有杀伤能力, 具有制备成耐药性铜绿假单胞菌的抗菌剂的潜力。

关键词

耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌, 抗菌剂, 病毒, 噬菌体HLL23

Identification and Genomic Analysis of vB_Pae_HLL23, a Novel Phage of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Chengde Huang, Min Ling*

School of Basic Medical Sciences, Guangxi Medical University, Nanning Guangxi

Received: Apr. 25th, 2025; accepted: Jun. 4th, 2025; published: Jun. 16th, 2025

*通讯作者。

文章引用: 黄承德, 凌敏. 耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌的新型噬菌体 vB_Pae_HLL23 的鉴定[J]. 微生物前沿, 2025, 14(2): 75-81. DOI: 10.12677/amb.2025.142010

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is a common clinical opportunistic pathogen. In recent years, phage therapy has emerged as a promising strategy against *P. aeruginosa* infections, especially in the context of increased resistance due to antibiotic overuse. In this study, a novel phage, vB_Pae_HLL23, was isolated from hospital wastewater and showed significant lysis against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (CRPA). Transmission electron microscopy showed that vB_Pae_HLL23 belongs to the *Myoviridae* family. Biological characterization showed that the HLL23 phage had a latency of 10 min, a lysis cycle of 80 min, a burst size of 195 PFU per cell, and enhanced tolerance to temperature and pH changes. Our results suggest that HLL23 has stable biological properties and killing ability against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, and has the potential to be prepared as an antimicrobial agent for drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*.

Keywords

Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*, Antibacterial Agent, Virus, Phage vB_Pae_HLL23

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

铜绿假单胞菌是一种自然界常见的革兰氏阴性机会致病菌[1][2],是肺囊性纤维化、烧伤或植入医疗器械患者最常见的感染原因[3]。它可导致严重的院内获得性感染,这对于患者是非常危险的,同时也是许多疾病和死亡的重要原因[4]。

碳青霉烯类药物常用于治疗铜绿假单胞菌感染,近年来随着临床用药量的增加,全球范围内碳青霉烯类耐药(CRPA)检出率呈现显著上升趋势[5][6]。早在2016年世界卫生组织将CRPA列为医疗环境中最危险的病原体之一[7]。在美国医疗机构中发现的铜绿假单胞菌临床分离株中有10%~20%对至少一种碳青霉烯类抗生素具有耐药性[8]。在中国根据细菌耐药性监测网络提供的数据,从2019年9月至2020年9月,铜绿假单胞菌对碳青霉烯类药物的全国平均耐药率为18.3%[9]。因此,开发新的替代疗法来对抗CRPA感染是一个亟待解决的难题。

噬菌体是一种广泛存在于自然环境中的病毒。作为抗生素的潜在替代品,噬菌体可以入侵特定的细菌,随后在菌体中寄生并复制,通过裂解细菌的方式,释放新的病毒[10]。在过往的研究中,不少研究结论认为噬菌体由于其较低的副作用、对特定菌株的靶向裂解能力、对正常菌群无明显影响等特性,更适合作为感染治疗的手段在临床中使用[11]-[13]。

因此,将噬菌体作为治疗耐药性病原菌的一种手段,具有十分广阔的研究前景。本研究从医院废水中分离出一株CRPA噬菌体,并通过对其宿主谱、最佳感染复数、温度与pH稳定性等方式,对其生物学特性展开进一步研究,为研究治疗CRPA的噬菌体药物提供有价值的理论依据。

2. 材料和方法

2.1. 细菌菌株的生长条件

实验所用的宿主菌是耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌的临床菌株(以下简称宿主菌),由广西医科大学第

一附属医院检验科赠送。该铜绿假单胞菌菌株保存于 25% (v/v) 甘油溶液中, 置于 -80℃ 超低温环境储存。实验前, 将菌株接种于 LB 培养基, 于 37℃ 恒温条件下进行培养。

2.2. 噬菌体的分离纯化

以临床分离的铜绿假单胞菌为宿主菌, 从广西医科大学第一附属医院污水样品中分离噬菌体 vB_Pae_HLL23。在污水样本中加入 CaCl₂ 至终浓度 1 mmol/L, 以 4000 g 离心 10 min, 随后使用 0.22 μm 孔径滤膜进行过滤。将 50 mL 滤液与对数生长期的铜绿假单胞菌临床分离株培养液混合, 置于 37℃、200 rpm 摇床中培养 24 h。培养结束后再次离心, 并通过滤膜进行除菌处理[14]。

采用双层琼脂平板法从上述液体中分离噬菌体[15]。通过多次重复分离纯化单噬菌斑, 直至获得形态均一的噬菌斑。随后使用聚乙二醇(PEG)-NaCl 沉淀法对噬菌体颗粒进行浓缩和纯化[16]。最终获得的噬菌体经增殖后保存于 4℃ 环境中。

2.3. 噬菌体形态观察

采用透射电子显微镜(Bio-TEM)观察噬菌体 HLL23 的形态特征。取 30 μl 纯化后的噬菌体溶液, 滴加于铜网上静置 15 min 进行吸附; 随后使用 2% 醋酸铀溶液负染色 10 min; 最后在加速电压 100 kV 条件下, 通过 JEM-1200 EX 型透射电子显微镜(JEOL, Tokyo, Japan)进行观察。

2.4. 噬菌体最佳感染复数测定(MOI)

采用双层琼脂平板法测定噬菌体初始效价后, 将噬菌体与 CRPA 菌液(~10⁸ CFU/mL)按不同感染复数(100、10、1、0.1、0.01 及 0.001)进行混合, 置于 37℃、200 rpm/min 摇床培养至培养液澄清。随后将混合培养物于 4℃ 条件下以 4000 rpm 离心 15 min, 用 0.22 μm 孔径注射器滤膜过滤后, 通过双层琼脂平板法测定噬菌体效价, 选择获得最高效价对应的感染复数作为 MOI 值。所有实验均设置三个重复。

$$\text{噬菌体效价(PFU/ml)} = \text{噬菌斑数} \times \text{稀释倍数} \times 100 (\text{取样折算数})$$

2.5. 一步生长曲线测定

将 CRPA 菌液(~10⁸ CFU/mL)与噬菌体按 MOI 比例混合后, 静置 37℃ 培养 15 min, 确保噬菌体充分吸附细菌。随后于 4℃ 条件下 12000 × g 离心 15 min 弃去上清, 加入 LB 液体培养基重悬菌体后进行二次离心。再次弃去上清后, 加入 10 mL LB 液体培养基重悬菌体, 置于 37℃、200 rpm 摇床培养 120 min。从 0 min 开始, 每 10 min 取培养液进行一次双琼脂平板法涂板, 检测噬菌体效价, 每组实验重复三次。通过一步生长曲线实验, 鉴定噬菌体的潜伏期、裂解期、平稳期及裂解量等特征参数[17]。

$$\text{噬菌体裂解量} = \frac{\text{感染末期噬菌体效价}}{\text{感染初期细菌浓度}}$$

2.6. 噬菌体温度和 pH 稳定性

为探究温度对噬菌体 HLL23 稳定性的影响, 取 100 μL 噬菌体原液(~10⁸ PFU/mL)与 900 μL LB 液体培养基混合, 分别置于 20、30、40、50、60 及 70℃ 条件下静置 1 h。取出再与宿主菌共孵育, 采用双层琼脂平板法测定不同温度处理后噬菌体的效价。

在 pH 稳定性实验中, 使用 HCl 或 NaOH 溶液调节 LB 液体培养基 pH 值(2~12), 加入噬菌体(~10⁸ PFU/mL)后, 于 37℃ 静置 1 小时, 随后与宿主菌孵育, 再测定噬菌体效价。所有实验均设置三个独立重复。

3. 实验结果

3.1. 噬菌体 HLL23 的分离及形态特征

我们以 CRPA 为宿主菌, 从医院污水样本中分离获得一株噬菌体。该噬菌体形成的噬菌斑形态均一, 具有透光性好、边缘清晰、中心透亮等特征(图 1(a))。单个噬菌斑直径约 1 mm, 呈现典型裂解性噬菌体特征。TEM 结果显示, 该噬菌体头部呈多面体结构, 顶端直径 47~52 nm, 具有非收缩性尾部结构, 尾部长度 115 nm(图 1(b))。根据噬菌体尾部形态特征, 判定该病毒属于肌尾噬菌体科(Myoviridae)。依据国际病毒分类委员会(ICTV)的命名规范[18], 我们将该噬菌体命名为 vB_Pae_HLL23。

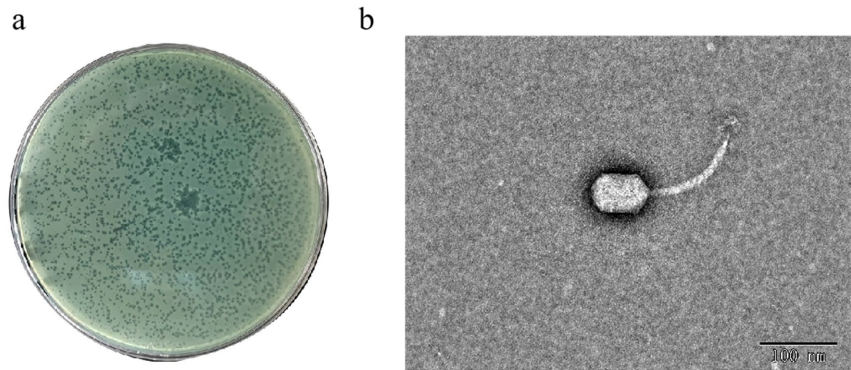


Figure 1. Morphological characteristics of phage HLL23. (a) Phage plaque picture; (b) Bacteriophage transmission electron microscopy

图 1. 噬菌体 HLL23 的形态特征。(a) 噬菌斑形貌; (b) 透射电镜观察噬菌体形貌

3.2. 最佳感染复数和一步生长曲线

实验结果表明, 不同的感染复数对噬菌体 HLL23 的效价没有显著影响。当 MOI 为 1 时噬菌体效价达到最高(图 2(a)), 因此我们选择 MOI=1 进行一步生长曲线测定。结果显示, HLL23 噬菌体的潜伏期约为 10 分钟, 裂解期约 80 分钟, 平均裂解量为每个宿主细胞产生约 195 个噬斑形成单位(PFU), 在裂解 90 分钟后, 噬菌体增殖进入平稳期(图 2(b))。

3.3. 温度和 pH 稳定性

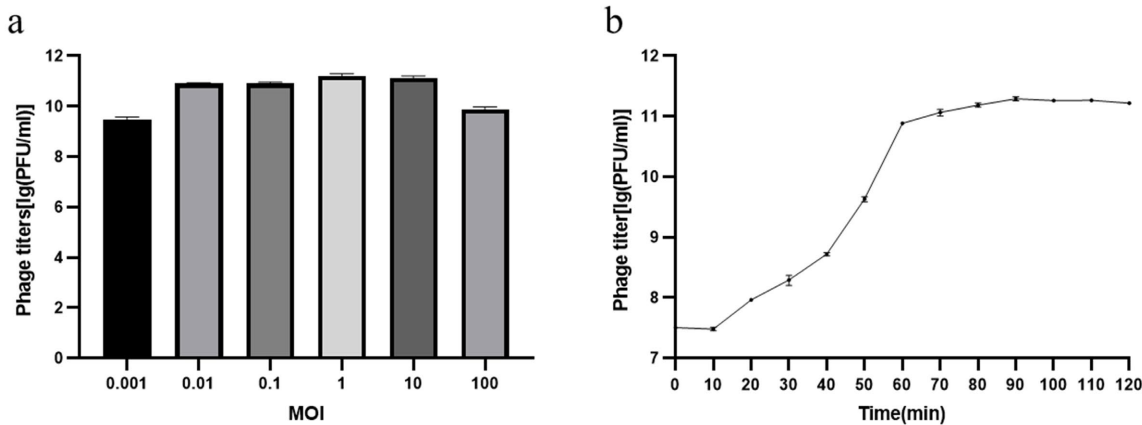


Figure 2. Biological characteristics of phage HLL23. (a) Optimal multiplicity of infection (MOI); (b) One-step growth curve of phage HLL23 at MOI of 1

图 2. 噬菌体 HLL23 的生物学特性。(a) 最佳感染复数(MOI); (b) MOI 为 1 时噬菌体 HLL23 的一步生长曲线

在完成噬菌体生长曲线分析后，我们进一步评估了噬菌体 HLL23 在不同的温度和 pH 环境中的稳定性。温度稳定性实验表明(图 3(a))，在 20~50℃ 范围内，温度变化对噬菌体效价影响较小，其中 40℃ 为噬菌体的最适生长温度。当温度升至 50~70℃ 时，噬菌体效价显著下降。pH 稳定性结果显示(图 3(b))，在 pH 5~10 范围内，噬菌体效价保持稳定，在 pH = 7 时噬菌体增殖数量达到峰值。当 pH 升至 10~11 时效价明显下降，而在 pH 2 或 12 的极端条件下噬菌体完全失活。值得注意的是，HLL23 噬菌体对酸性环境的耐受性优于碱性环境，当 pH 降至 3 时仍保持较高活性，但在 pH 12 时则完全失活。

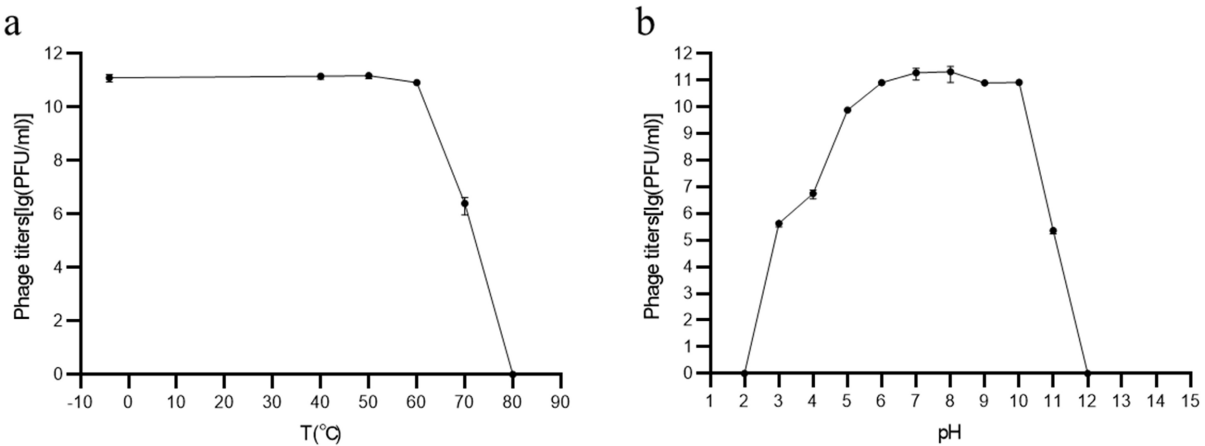


Figure 3. Biological characteristics of phage HLL23. (a) Thermal stability of phage HLL23; (b) pH sensitivity of phage HLL23
图 3. 噬菌体 HLL23 的生物学特性。(a) 噬菌体 HLL23 的温度稳定性；(b) 噬菌体 HLL23 的 pH 稳定性

4. 结论与讨论

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是医院感染最常见的病原菌之一。该菌具有复杂的耐药机制和生物膜形成能力，这些特性导致其感染难以控制。近年来，随着噬菌体疗法在临床中的持续应用，人们开发出更多治疗耐药病原体的解决方案[19]。然而，目前全球范围内发现的铜绿假单胞菌噬菌体数量有限[20]，且并非所有噬菌体都符合生物抗菌剂的标准，例如温和噬菌体，及无法在不同理化条件下保持稳定的噬菌体[21]。因此，为了提升噬菌体的应用价值，构建更广谱的噬菌体库，烈性噬菌体的分离纯化、生物学鉴定及其基因组分析起到了重要作用[22]。

在本研究中我们从医院废水中分离获得一株新型裂解性噬菌体 HLL23。通过噬菌斑形态学及电镜观察证实其属于肌尾噬菌体科(Myoviridae)。研究发现，HLL23 能快速高效裂解 CRPA 临床分离株，在 CRPA 相关疾病治疗中具有重要应用潜力。HLL23 的最佳 MOI 为 1，潜伏期是 10 min，裂解期是 80 min，裂解量为 195 PFU/cell。通过系统研究该噬菌体在不同温度和 pH 条件下的稳定性，我们发现 HLL23 在 20~50℃ 温度范围和 pH 5~10 区间内保持较高稳定性，其中 40℃ 和 pH 7 时活性最佳。这一特性表明该噬菌体能够适应多种环境条件，在人体适宜的正常生理环境中仍能保持较高活性。本研究为生物抗菌剂研发提供了新思路，为临床上应用新型噬菌体治疗耐药性铜绿假单胞菌感染提供了重要的理论基础。

基金项目

广西自然科学基金项目(2018GXNSFAA281023)。

参考文献

[1] Monson, R., Foulds, I., Foweraker, J., Welch, M. and Salmond, G.P.C. (2011) The *Pseudomonas aeruginosa* Generalized

- Transducing Phage phiPA3 Is a New Member of the phiKZ-Like Group of “Jumbo” Phages, and Infects Model Laboratory Strains and Clinical Isolates from Cystic Fibrosis Patients. *Microbiology*, **157**, 859-867. <https://doi.org/10.1099/mic.0.044701-0>
- [2] Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B.R., Lin, T. and Cheng, Z. (2019) Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and Alternative Therapeutic Strategies. *Biotechnology Advances*, **37**, 177-192. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
 - [3] Parkins, M.D., Somayaji, R. and Waters, V.J. (2018) Epidemiology, Biology, and Impact of Clonal *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Cystic Fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*, **31**. <https://doi.org/10.1128/cmr.00019-18>
 - [4] Shortridge, D., Gales, A.C., Streit, J.M., Huband, M.D., Tsakris, A. and Jones, R.N. (2019) Geographic and Temporal Patterns of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* over 20 Years from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-2016. *Open Forum Infectious Diseases*, **6**, S63-S68. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy343>
 - [5] Breidenstein, E.B.M., de la Fuente-Núñez, C. and Hancock, R.E.W. (2011) *Pseudomonas aeruginosa*: All Roads Lead to Resistance. *Trends in Microbiology*, **19**, 419-426. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005>
 - [6] Mulcahy, L.R., Burns, J.L., Lory, S. and Lewis, K. (2010) Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Producing High Levels of Persister Cells in Patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Bacteriology*, **192**, 6191-6199. <https://doi.org/10.1128/jb.01651-09>
 - [7] Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D.L., et al. (2018) Discovery, Research, and Development of New Antibiotics: The WHO Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria and Tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, **18**, 318-327. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(17)30753-3)
 - [8] Torres-Castillo, L.C., Fandiño, C., Ramos, M., Ramos-Castaneda, J.A., Rioseco, M.L. and Juliet, C. (2023) *In Vitro* Activity of Ceftazidime-Avibactam against Gram-Negative Strains in Chile 2015-2021. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, **35**, 143-148. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2023.09.004>
 - [9] Zhang, H., Xu, Y., Jia, P., Zhu, Y., Zhang, G., Zhang, J., et al. (2020) Global Trends of Antimicrobial Susceptibility to Ceftazidime-Avibactam: A Surveillance Study from the ATLAS Program (2012-2016). *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, **9**, Article No. 166. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00829-z>
 - [10] Sarker, S.A., Berger, B., Deng, Y., Kieser, S., Foata, F., Moine, D., et al. (2016) Oral Application of *Escherichia coli* Bacteriophage: Safety Tests in Healthy and Diarrheal Children from Bangladesh. *Environmental Microbiology*, **19**, 237-250. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13574>
 - [11] Haddad, L.E., Harb, C.P., Gebara, M.A., et al. (2019) A Systematic and Critical Review of Bacteriophage Therapy against Multi-Drug Resistant ESKAPE Organisms in Humans. *Clinical Infectious Diseases*, **69**, 167-178.
 - [12] Amarillas, L., Rubí-Rangel, L., Chaidez, C., González-Robles, A., Lightbourn-Rojas, L. and León-Félix, J. (2017) Isolation and Characterization of phiLLS, a Novel Phage with Potential Biocontrol Agent against Multidrug-Resistant *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, **8**, Article No. 1355. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01355>
 - [13] Lee, H., Ku, H., Lee, D., Kim, Y., Shin, H., Ryu, S., et al. (2016) Characterization and Genomic Study of the Novel Bacteriophage HY01 Infecting Both *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella flexneri*: Potential as a Biocontrol Agent in Food. *PLOS ONE*, **11**, e0168985. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168985>
 - [14] Uchiyama, J., Rashel, M., Takemura, I., Kato, S., Ujihara, T., Muraoka, A., et al. (2012) Genetic Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophage Kpp10. *Archives of Virology*, **157**, 733-738. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1210-x>
 - [15] Morozova, V., Kozlova, Y., Tikunov, A., Babkin, I., Ushakova, T., Bardasheva, A., et al. (2023) Identification, Characterization, and Genome Analysis of Two Novel Temperate *Pseudomonas* Protegens Phages Pseup_222 and Pseup_224. *Microorganisms*, **11**, Article No. 1456. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061456>
 - [16] Jäckel, C., Hammerl, J.A. and Hertwig, S. (2019) Campylobacter Phage Isolation and Characterization: What We Have Learned So Far. *Methods and Protocols*, **2**, Article No. 18. <https://doi.org/10.3390/mps2010018>
 - [17] Manohar, P., Tamhankar, A.J., Lundborg, C.S. and Ramesh, N. (2018) Isolation, Characterization and *in Vivo* Efficacy of *Escherichia* Phage myPSH1131. *PLOS ONE*, **13**, e0206278. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206278>
 - [18] Zerbini, F.M., Siddell, S.G., Lefkowitz, E.J., Mushegian, A.R., Adriaenssens, E.M., Alfenas-Zerbini, P., et al. (2023) Changes to Virus Taxonomy and the ICTV Statutes Ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2023). *Archives of Virology*, **168**, Article No. 175. <https://doi.org/10.1007/s00705-023-05797-4>
 - [19] Nagel, T., Musila, L., Muthoni, M., Nikolich, M., Nakavuma, J.L. and Clokie, M.R. (2022) Phage Banks as Potential Tools to Rapidly and Cost-Effectively Manage Antimicrobial Resistance in the Developing World. *Current Opinion in Virology*, **53**, Article ID: 101208. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2022.101208>
 - [20] Johnson, G., Banerjee, S. and Putonti, C. (2022) Diversity of *Pseudomonas aeruginosa* Temperate Phages. *mSphere*, **7**, e01015-21. <https://doi.org/10.1128/msphere.01015-21>

-
- [21] Endersen, L., O'Mahony, J., Hill, C., Ross, R.P., McAuliffe, O. and Coffey, A. (2014) Phage Therapy in the Food Industry. *Annual Review of Food Science and Technology*, **5**, 327-349. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030713-092415>
- [22] Cahill, J. and Young, R. (2019) Phage Lysis: Multiple Genes for Multiple Barriers. In: *Advances in Virus Research*, Elsevier, 33-70. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.09.003>