

噬菌体培养与鉴定方法研究进展

郭文琼¹ 卢家辉² 潘伍亮² 乐率^{3,*}

(1 成都医学院护理学院, 成都 610500; 2 成都医学院临床医学院, 成都 610500;

3 陆军军医大学基础医学院微生物学教研室, 重庆 400038)

摘要: 噬菌体是地球上数量最多的生命体, 不仅广泛存在于自然界, 也大量存在于人体之中。但是, 目前分离、鉴定的噬菌体数量却仅有数万个。虽然宏基因组技术的出现为探究噬菌体提供了高通量的方法, 但是宏基因组测序结果中, 大量噬菌体序列功能未知, 也不知道其来源于何宿主菌, 是一个亟须研究的“黑匣子”。微生物的分离培养是研究微生物的起点, 噬菌体的研究亦是如此。本文首先对噬菌体分离、培养与鉴定研究进行总结, 然后对裂解性和溶原性噬菌体分离方法进行归纳和分析, 为分离新的噬菌体提供较为全面的方法学综述。

关键词: 噬菌体分离鉴定; 微生物组; 噬菌体组; 溶原性噬菌体

中图分类号: R978 **文献标志码:** A

The new methods to isolate bacteriophages

Guo Wen-qiong¹, Lu Jia-hui², Pan Wu-liang², and Le Shuai³

(1 School of Nursing, Chengdu Medical College, Chengdu 610500; 2 School of Medicine, Chengdu Medical College, Chengdu 610500;

3 Department of Microbiology, Army Medical University, Chongqing 400038)

Abstract Bacteriophages are considered to be the most abundant biological entities on earth. With the research progress on the Microbiome, a large number of phages were discovered in Nature or in the human body. However, isolated phages are quite limited compared with the estimated phage numbers. Although the emergence of metagenomic technology provides a high-throughput method for exploring phages, functions of more than 80% of the sequence are unknown, nor did we know the host bacteria of the phages. It is a “dark matter” that needs to be studied urgently. The isolation and culture of microorganisms are the starting point for the study of a microorganism. Thus, this review summarizes the phage isolation methods, so as to provide a more comprehensive methodological review for the identification of phages.

Key words Bacteriophage isolation; Microbiome; Virome; Lysogenic phages

噬菌体广泛存在于自然环境和人体, 被认为是地球上数量最多的生命体, 数量被估算为 10^{31} 左右, 但是被分离、鉴定和测序的噬菌体只有几万株^[1]。噬菌体也是生命科学研究的热门对象, 基于噬菌体的研究发现了限制修饰酶、CRISPR-Cas系统等分子生

物学工具^[2-3]。新型噬菌体的分离、鉴定, 有望拓展新的研究领域, 发现新的生物学规律, 是进一步开拓噬菌体研究的基石。本文就噬菌体分离鉴定的前沿需求、裂解性和溶原性噬菌体分离鉴定方法进展进行综述, 为噬菌体分离鉴定提出方法学的总结,

收稿日期: 2022-03-07

基金项目: 国家自然科学基金(No. 31870167)

作者简介: 郭文琼, 女, 生于1982年, 硕士, 讲师, 主要从事医学教学和科研工作, E-mail: 29980872@qq.com

*通讯作者, E-mail: leshuai2004@tmmu.edu.cn

并对未来研究进行展望,为开拓噬菌体研究新领域提供参考。

1 新型噬菌体培养与鉴定的研究意义

近年来,噬菌体的基础和应用研究都在快速发展,新的研究领域催生了噬菌体分离鉴定的新需求^[3],尤其是以下几个方面的研究亟需以大量新型噬菌体分离鉴定为基础。

1.1 人体噬菌体组学研究

人体拥有巨大的微生物群落,称为微生物组,微生物组中包括的大量病毒被统称为“病毒组”^[4-5]。近年来,使用宏基因组测序和其他方法对人类病毒组的研究已经阐明了不同身体部位人类病毒组的多样性,病毒组主要由噬菌体组成,且与健康、疾病的关系被逐渐揭示。例如,炎症肠病患者的肠道病毒组会出现有尾噬菌体数量增加而微小噬菌体减少的情况,这一变化可能是由于细菌种群生态失调所导致的^[5]。尽管关注度越来越高,但典型的病毒组研究中的大多数序列数据仍未被识别,这些未被探索的噬菌体“暗物质”对微生物组及其对人体的影响还不清楚,是当前研究的热门领域。不仅如此,噬菌体还可用于调控肠道微生物组,调节肠道代谢组,提示噬菌体捕食对哺乳动物宿主的影响,说明噬菌体在治疗肠道疾病中具有潜在价值^[6-7]。

1.2 超级细菌的噬菌体治疗

随着抗生素的大量使用,越来越多的泛耐药、甚至全耐药细菌不断涌现,给临床治疗带来巨大挑战。噬菌体是治疗“超级细菌”感染的重要武器,近年来,欧美和我国都相继开展了噬菌体治疗临床试验,利用敏感的噬菌体治疗“超级细菌”感染,取得重要进展^[8-10]。但是,由于噬菌体的特异性太高,因此每次治疗前都需要针对患者的病原体,分离能够特异性识别该细菌的噬菌体,而这一过程繁琐且耗费大量人力物力。因此,亟需一种快速、高效分离噬菌体的方法。

1.3 环境噬菌体研究

自然环境中存在大量的噬菌体,如,海洋、沉积物和土壤等^[11-13]。噬菌体的多样性研究才刚刚开始,目前的噬菌体研究的采样是局限的,许多环境仍然是未知的,因此,全球噬菌体多样性远远超过培养分离株所代表的多样性。而这些自然界存在的噬菌体的研究,将有助于人们更好地了解生态系统和进化规律。宏基因组学研究为自然环境的噬菌体研究提供了高通量的手段,一项研究分析了来自

3042个地理上不同的样本,获得超过5 Tb的病毒宏基因组序列数据,发现了超过12.5万个DNA病毒基因组,包括迄今为止确定的最大噬菌体,结果突出了广泛的全球病毒多样性,但是,其中大多数基因功能还是未知,大量的噬菌体也未被分离鉴定^[11]。

1.4 农牧食品行业的噬菌体研究

噬菌体在种植业、养殖业和食品加工业中有重要的应用价值。如,畜牧养殖业中抗生素的添加会带来细菌耐药性的严峻问题,而噬菌体可用于控制细菌感染,代替或减少抗生素的使用。噬菌体对叶际病原菌也有防控潜力,美国已批准用噬菌体控制丁香假单胞菌引起的番茄和胡椒的叶片黑斑病。

2 裂解性噬菌体分离鉴定的经典方法及其局限性

大量噬菌体的前沿领域都需要以新噬菌体分离鉴定为基石,噬菌体的分离鉴定是噬菌体研究的起点。噬菌体的发现是基于噬斑实验:噬菌体裂解细菌后在平板上形成肉眼可见的空斑。其操作非常简单:将宿主菌与噬菌体混合后,加入半固体培养基,然后倒在固体平板上,培养一段时间后,噬菌体裂解细菌并形成肉眼可见的噬斑,详细的步骤可参考相关文献^[14]。

这一方法引领了噬菌体研究100余年,简单易行,被写入全球各地的教科书,导致形成思维定式,研究人员总想用噬斑实验来分离所有噬菌体。但在科研实践中,经常无法用噬斑实验分离到特定细菌的噬菌体。因此,需要从噬菌体感染的过程来分析噬菌体的生活周期、噬斑形成机制,最后提出新的方法或对策,来分离、鉴定新的噬菌体。

噬菌体的生活周期,包括吸附、注入基因组、生物合成和裂解释放等几个部分。而噬菌体能否感染一个特定细菌,取决于能否吸附、能否利用细菌的分子机器进行生物合成、是否会被细菌的抵抗系统清除^[1]。因此,需要从采样样本、细菌、培养条件、鉴定方法等不同层面来思考噬菌体分离鉴定的方法(表1)。

3 培养与鉴定新型裂解性噬菌体的策略

3.1 增加噬菌体分离的样本来源

噬菌体不能脱离细菌而繁殖,因此,分离特定细菌的噬菌体,首先需要选择该细菌比较富集的样本,这种环境中存在相应噬菌体的概率也较大。如,铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌等细菌是医院常见的病原体,在医院环境中广泛存在^[15-16]。在医院人员和患者洗手和打扫卫生后,这些细菌都最终汇集

到医院污水中。因此,消毒前的医院污水富含这些耐药性较强的“超级细菌”的同时,也往往含有大量的对应的噬菌体。从医院污水中比较容易分离出铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌等“超级细菌”的噬菌体^[17]。但是,一个医院或一个地区的细菌有一定的特异性,因此,噬菌体也具有较强的特异性。因此,一个医院的污水中并不能分离到可以感染所有铜绿假单胞菌菌株的噬菌体。此时,可以去不同医院或不同城市的医院取污水进行噬菌体分离^[18]。例如,上海噬菌体与耐药研究所进行噬菌体治疗时,偶尔也会遇到患者的细菌不能被已有噬菌体裂解的问题,且在上海几家医院污水中无法分离到噬菌体,而在深圳医院污水中则分离到了该患者细菌的噬菌体^[10]。此外,河水、海水中通常没有这些“超级细菌”,在这些自然水样中,分离到铜绿假单胞菌噬菌体的概率较低。因此,需要选择目标细菌最可能广泛存在的样本进行噬菌体分离。例如,Hryckowian等^[19]从美国和孟加拉国的4个污水处理厂的未处理污水中,成功分离到27株不同的拟杆菌属细菌*Bacteroides thetaiotaomicron*的噬菌体。

古细菌(Archaea)是一类特殊的原核生物,在自然界中广泛存在,包括一些极端的生态环境中。因此,从极端环境样本中可分离到古菌的噬菌体^[20-21]。其分离方法与细菌噬菌体的分离类似,如研究人员先采集盐矿的盐水和盐晶体,溶解滤过后与盐古菌混合,再进行噬斑实验,最后分离到大量盐古菌的噬菌体,并揭示了盐古菌噬菌体的多样性^[21]。

3.2 扩大筛选的菌株数量

噬菌体是有极强的特异性的,这种特异性通常是菌株水平的特异性,也就是一个噬菌体通常只能感染一种细菌中的部分菌株。这种特异性的机制是非常复杂的,总的来说,取决于两大机制:首先是噬菌体对细菌的吸附能力,其具有很强特异性。其次,是细菌含有大量的抵抗噬菌体的机制,这将导致噬菌体无法繁殖形成噬斑^[22]。因此,在分离特定细菌的噬菌体时,应该先尽量多地收集目标菌株,用不同的菌株进行分离,如不同血清型的菌株,这将增加分离到的概率。

Goller等^[18]首先收集了117株不同的葡萄球菌菌株,然后从大量污水环境中分离了94种新型葡萄球菌噬菌体。发现大多数噬菌体只有一个分离宿主,即裂解谱很窄,只能用特殊的菌株进行分离鉴定,而部分噬菌体则表现为广宿主谱,可以跨种感染不

同细菌,这种广谱噬菌体对基因水平转移和生态学都有一定的影响。

此外,还可以选择缺乏抵抗噬菌体机制的宿主来进行分离,则分离到的噬菌体概率会增加。Maffei等^[23]将大肠埃希菌的O抗原、所有的噬菌体抵抗系统(限制修饰系统、流产感染系统)都敲除后,用该细菌K-12 MG1655 Δ RM为宿主,从不同环境中分离到61个新噬菌体。用O抗原缺失的细菌可避免筛选到以O抗原为受体的噬菌体。因此,此次分离的新噬菌体的受体均为不同的细菌表面蛋白,且研究人员回补一种限制修饰系统后,细菌将对部分噬菌体产生抵抗,导致噬斑无法形成。该研究说明,细菌携带的各种抵抗机制会限制分离到噬菌体的概率,而用缺乏该系统的菌株则有望分离到新的噬菌体。

宏基因组学研究发现ssDNA噬菌体大量存在于肠道等环境中,但是分离鉴定的ssDNA噬菌体相对较少。少数裂解性的ssDNA噬菌体可利用噬斑实验进行分离鉴定^[24]。但部分ssDNA噬菌体为溶原性噬菌体,且携带有超感染排斥机制(superinfection exclusion),这些噬菌体整合在细菌基因组中,导致这些细菌对其他ssDNA噬菌体形成抵抗,难以形成噬斑。因此,ssDNA噬菌体有时难以用噬斑实验分离^[25]。

3.3 模拟噬菌体培养的新条件

细菌-噬菌体相互作用非常复杂,需要特定的培养条件,因此根据实验需要,尽量模拟原始生态环境中的条件,更容易在实验室创造适合目标噬菌体繁殖的环境。如,肠道细菌大多为厌氧和微需氧细菌,且大部分肠道细菌难以培养。因此,Santiago-Rodriguez等^[26]建立了粪便恒温培养系统,利用改进的Infors Multifors系统模拟人类远端结肠环境以支持病毒组的复制,在24 d的5个不同时间点检查了培养的噬菌体群落,发现它们具有高度的个体特异性,且与原始粪便样本中的噬菌体群落高度相似,说明该方法可以用于支持噬菌体群落的繁殖。

对于难以在实验室条件下培养的细菌,需要先优化培养方法来培养目标细菌。如高通量测序技术证实SAR11是淡水中较为丰富的一种异养细菌,但是一直无法培养。研究人员将水样稀释到每个孔只含有1个细菌,然后在23℃培养30 d后,终于鉴定出了一些SAR11细菌^[27]。其生长非常缓慢,需要12 h才能繁殖一代,因此,较难分离培养。而分离到该细菌之后,研究人员就发现其携带的前噬菌体NP1。进

而发现营养充足时,约2.3%的细菌会被NP1裂解,而在碳源缺乏的培养条件下,30.6%的细菌会被其裂解,揭示了噬菌体在海洋细菌生态学中的重要作用^[28]。

3.4 选择最佳的噬菌体鉴定方法

如果确定某一噬菌体在目标细菌中可以繁殖,但是又无法形成噬斑时,可采用其他手段来鉴定。例如,宏基因组学研究发现肠道中有大量的噬菌体,其中crAss类噬菌体是最知名的肠道噬菌体之一,超过50%的人类肠道中都有该噬菌体,且预测其宿主为拟杆菌。但是,用不同的拟杆菌为宿主分离crAss001,发现均没有噬斑。最后,Colin Hill团队^[29]就用宏基因组测序来检测crAss001是否能在对应细菌样本中进行繁殖。研究人员首先收集利用宏基因组技术鉴定了含有crAss001的样本,然后将其上清与54个肠道主要的细菌菌株分别混合,用宏基因组技术检测混合培养后的上清中是否有crAss001的基因组序列,结果发现*Bacteroidales intestinalis* 919/174菌株可以支持crAss001的复制,进而发现crAss001可以在该菌株中形成噬斑。但是crAss001的宿主特异性非常高,另外14个来自6个不同种的拟杆菌菌株则不能被crAss001感染,无法形成噬斑^[29]。该研究说明,在对未知宿主的噬菌体进行分离时,可先用大量菌株和测序技术,确定该噬菌体能否复制,再去进一步精确寻找其宿主。

随后,Colin Hill团队^[30]则继续尝试使用噬斑实验分离其他crAss类噬菌体,但未成功。于是,对粪便样本进行厌氧培养后,同时加入万古霉素和卡那霉素,抑制革兰阳性和兼性厌氧细菌的生长,并有利于严格厌氧的革兰阴性拟杆菌生长。然后,对培养液进行宏基因组测序,发现crAss类噬菌体的比例在增加。同时,将富含crAss类噬菌体的粪便样品进行培养,根据菌落形态选择了48个菌落,进行16S rRNA基因片段的测序后,发现48个菌落分别属于6个菌种。将富含crAss噬菌体的上清分别加入到48个菌株后,再用qPCR检测单个菌株中crAss类噬菌体是否增加,最终从*B. xylanisolvens* APCS1/XY菌株中鉴定到ΦcrAss002噬菌体的繁殖。但是,ΦcrAss002不会在敏感细菌中形成噬斑,液体培养时也不会导致菌液裂解澄清,说明ΦcrAss002和类杆菌可以在适宜环境中共存,而不会产生剧烈的筛选而导致“此消彼长”^[30]。

此外,还可以采用不同的病毒基因组抽提方法,来鉴定噬菌体的存在。与成千上万的已经完成

测序的双链DNA噬菌体相比,目前只有8个双链RNA噬菌体被测序^[31]。有趣的是,双链RNA病毒在真菌中非常常见,通常具有共生或互惠的生活方式,不导致真菌的死亡^[32]。因此,使用噬斑实验可能无法分离到这种非裂解生活周期的噬菌体。我们应用分离真菌病毒的方法来鉴定细菌中的双链RNA噬菌体,成功地从一株微枝杆菌中分离出一种新的双链RNA噬菌体phiNY^[33]。phiNY的基因组由3个双链RNA片段组成,其基因组序列与任何其他噬菌体都没有核苷酸序列相似性。且感染phiNY的菌株比未感染噬菌体的菌株生长得更快,表现为一种共生寄生的生活方式。因此,这项研究不仅揭示了一种新的互惠寄生双链RNA噬菌体,也提示:其他病毒分离方法对于鉴定具有其他生活方式的噬菌体是有价值的。

4 溶源性噬菌体的鉴定与培养方法

溶源性噬菌体是一类可以整合在细菌基因组中的噬菌体,具有裂解和溶原两种周期^[34]。有些溶源性噬菌体可形成模糊的噬斑,有些溶源性噬菌体则无法形成噬斑。这是由于不同噬菌体进入裂解和溶原周期的调控机制不一,不仅涉及噬菌体自身的调控机制,如抑制蛋白CI对噬菌体的抑制,还涉及群体感应系统、SOS系统、H-NS蛋白等系统对溶原周期的调控^[34-35]。溶源性噬菌体的鉴定方法包括以下3种。

4.1 利用噬斑实验鉴定溶源性噬菌体

部分溶源性噬菌体可以形成模糊噬斑,这是比较理想的研究对象。如部分溶源性噬菌体可在伤寒沙门菌中形成噬斑,可用噬斑实验进行检测^[36]。但是,溶源性噬菌体要形成噬斑,不仅面临裂解性噬菌体所面临的所有问题,还涉及溶原-裂解周期的调控机制^[37]。因此,大部分溶源性噬菌体不能形成噬斑。但是,如果敲除部分抵抗机制相关基因,则可以使得溶源性噬菌体形成噬斑。例如,伤寒沙门菌携带的BstA是一种流产感染系统蛋白,能抵抗溶源性噬菌体的感染。而敲除BstA的菌株则可被部分溶源性噬菌体感染,形成模糊的噬斑,便于观察和研究^[36]。

4.2 诱导溶源性噬菌体进入裂解周期并鉴定

部分溶源性噬菌体很稳定地整合于细菌基因组,不容易进入裂解周期,无法形成噬斑。可用丝裂霉素C、紫外线等方法,诱导前噬菌体进入裂解周期,形成溶源性噬菌体颗粒^[38]。如果诱导成功,可使得菌液变澄清,或者显微镜下观察发现细菌大量裂解,则高度提示有溶源性噬菌体产生。进一步抽提病毒颗粒的基因组,进行测序鉴定,或者进行电

镜观察。

4.3 溶源性噬菌体的生物信息学预测与鉴定

从细菌基因组和宏基因组序列中预测溶源性噬菌体，再有目标地进行分离鉴定，可提高分离鉴定成功率，给溶源性噬菌体的研究提供了极大的便利。溶源性噬菌体是口腔和肠道病毒组的主要成员，溶源性噬菌体在口腔、肠道中的作用受到高度关注^[39]。因此，基于宏基因组技术的噬菌体组学方法可帮助判断所培养的样本中是否存在目标噬菌体。如，MARVEL是基于随机森林机器学习方法来预测宏基因组中的噬菌体序列^[40]。另一项研究对16种宏基因组组装方法在噬菌体组研究中的作用进行了比较^[41]，发现不同软件的组装性能差异很大，SPAdes(meta)软件的表现较好。但是，病毒组数据分析还有很多挑战，如低读取覆盖率、基因组重复导致组装的基因组回收率低、碎片化程度高、阈值设定等，从病毒组数据中得出结论时必须谨慎考虑这些因素。

此外，根据单个细菌的序列可更准确地预测前噬菌体，如Phage_Finder^[42]、PHASTER^[43]和Prophage Hunter^[44]。PHASTER是一个基于网络的服务器，用于快速识别和注释细菌基因组和质粒中的原噬菌体序列^[43]。Prophage Hunter不仅可以系统地定位细菌基因组内的原噬菌体区域，并预测原噬菌体的活性，它还确定了与目标原噬菌体在系统进化上最相关的噬菌体，并在整个噬菌体基因组中注释蛋白质的功能^[44]。根据预测的前噬菌体及其激活后的状态，就可以设计实验，利用PCR或电镜等方式对激活的前噬菌体进行鉴定^[45]。

例如，Cornuault等^[46]先利用PHASTER工具，从15株普氏粪杆菌(*Faecalibacterium prausnitzii*)基因组中预测了18个前噬菌体，用测序的方法发现前噬菌体Lagaffe和Mushu可以被激活，其基因组拷贝数分别为宿主菌A2-165的8倍和16倍，然后用电镜观察到Mushu噬菌体的形态，但是这些噬菌体不会形成噬斑，无法用噬斑实验进行鉴定。

以上程序主要依赖已知噬菌体的内置验证数据集进行序列相似性搜索，以识别与噬菌体相关的基因富集区域，预测出的前噬菌体很多是不能进入裂解周期的。最近，王晓雪团队设计了一个预测前噬菌体的软件Prophage Tracer^[47]，该程序是基于单个细菌基因组测序原始数据，来预测是否有溶源性噬菌体的软件，而不是基于噬菌体基因相似性搜索。Prophage Tracer使用重叠拆分技术读取包含细菌和噬菌体的整合序列，代表原噬菌体切除信号的位点。如果前噬菌体被激活，测序时就会出现上述信号，软件可检测到激活的前噬菌体特征，并可预测前噬菌体的精确整合位点(表1)。

5 展望

随着微生物组^[48]、基因编辑工具^[49]和噬菌体治疗^[50-51]等领域的飞速发展，噬菌体研究也进入了复兴时代。但是，目前大多数噬菌体研究对象还比较局限，多为模式细菌、常见病原体以及少数生态环境中的噬菌体，还有大量的新型噬菌体有待分离鉴定，而这些噬菌体中可能蕴含着全新的生物学现象，或存在新的分子生物学工具，是进一步拓展噬菌体研究的基石。

噬菌体是细菌的病毒，而目前自然界还有大量

表1 噬菌体分离鉴定方法总结
Tab. 1 The methods to isolate bacteriophag

鉴定方法		参考文献
裂解性噬菌体的分离鉴定		
传统方法	噬斑实验	[14]
改进方法	扩大噬菌体来源样本	[19]
	扩大筛选的菌株数量	[18]
	模拟噬菌体培养的新条件	[26-27]
	选择最佳的噬菌体检测方法(PCR、荧光染色、宏基因组测序、电镜)	[29-30]
溶源性噬菌体的分离鉴定		
传统方法	噬斑实验	[36]
	丝裂霉素C或紫外线照射诱导前噬菌体进入裂解周期	[38]
生信预测	基于细菌基因组序列的同源性比对预测前噬菌体 (Phage_Finder, PHASTER, Prophage Hunter)	[42-44]
	基于细菌高通量测序数据预测有活性的前噬菌体 (Prophage Tracer)	[47]

的细菌无法分离培养^[52-53], 因此, 噬菌体研究人员也应及时关注细菌分离培养的新方法, 利用新分离的细菌去分离新的噬菌体, 则有望发现全新的生物学规律^[28]。

在无法分离到所需的噬菌体时, 要仔细思考和创新噬菌体的分离方法, 可考虑更换样本、宿主菌和培养方法, 使得噬菌体可在实验室模拟的环境下繁殖, 而噬菌体最终要裂解细菌并释放噬菌体颗粒。因此, 可用噬斑实验、qPCR、荧光染色、宏基因组测序、电镜等多种鉴定手段证实噬菌体的存在, 再进一步对噬菌体进行鉴定, 为开拓新的研究领域奠定基础。

参考文献

- [1] Dion M B, Oechslin F, Moineau S. Phage diversity, genomics and phylogeny[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2020, 18(3): 125-138.
- [2] Hampton H G, Watson B N J, Fineran P C. The arms race between bacteria and their phage foes[J]. *Nature*, 2020, 577(7790): 327-336.
- [3] Salmond G P C, Fineran P C. A century of the phage: Past, present and future[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13(12): 777-786.
- [4] Liang G X, Bushman F D. The human virome: Assembly, composition and host interactions[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19(8): 514-527.
- [5] Liang G X, Cobian-Guemes A G, Albenberg L, et al. The gut virome in inflammatory bowel diseases[J]. *Curr Opin Virol*, 2021, 51: 190-198.
- [6] Hsu B B, Gibson T E, Yeliseyev V, et al. Dynamic modulation of the gut microbiota and metabolome by bacteriophages in a mouse model[J]. *Cell Host Microbe*, 2019, 25(6): 803-814.
- [7] Duan Y, Young R, Schnabl B. Bacteriophages and their potential for treatment of gastrointestinal diseases[J]. *Nat Rev Gastro Hepat*, 2022, 19(2): 135-144.
- [8] Rohde C, Resch G, Pirnay J P, et al. Expert opinion on three phage therapy related topics: Bacterial phage resistance, phage training and prophages in bacterial production strains[J]. *Viruses*, 2018, 10(4): 178.
- [9] El Haddad L, Harb C P, Gebara M A, et al. A Systematic and critical review of bacteriophage therapy against multidrug-resistant ESKAPE organisms in humans[J]. *Clin Infect Dis*, 2019, 69(1): 167-178.
- [10] Bao J, Wu N, Zeng Y, et al. Non-active antibiotic and bacteriophage synergism to successfully treat recurrent urinary tract infection caused by extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1): 771-774.
- [11] Paez-Espino D, Eloë-Fadrosch E A, Pavlopoulos G A, et al. Uncovering Earth's virome[J]. *Nature*, 2016, 536(7617): 425.
- [12] Guemes A G C, Youle M, Cantu V A, et al. Viruses as winners in the game of life[J]. *Annual Rev Virol*, 2016, 3(1): 197-214.
- [13] Al-Shayeb B, Sachdeva R, Chen L X, et al. Clades of huge phages from across Earth's ecosystems[J]. *Nature*, 2020, 578(7795): 425.
- [14] Nair A, Ghugare G S, Khairnar K. An appraisal of bacteriophage isolation techniques from environment[J]. *Microb Ecol*, 2022 83(3): 519-535.
- [15] Poirel L, Nordmann P, de la Rosa J M O, et al. A phage-based decolonisation strategy against pan-resistant enterobacterial strains[J]. *Lancet Infect Dis*, 2020, 20(5): 525-526.
- [16] Chng K R, Li C H, Bertrand D, et al. Cartography of opportunistic pathogens and antibiotic resistance genes in a tertiary hospital environment[J]. *Nat Med*, 2020, 26(6): 941.
- [17] De Smet J, Hendrix H, Blasdel B G, et al. *Pseudomonas predators*: Understanding and exploiting phage-host interactions[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15(9): 517-530.
- [18] Goller P C, Elsener T, Lorge D, et al. Multi-species host range of staphylococcal phages isolated from wastewater[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 6965.
- [19] Hryckowian A J, Merrill B D, Porter N T, et al. Bacteroides the taiotaomicron-infecting bacteriophage isolates inform sequence-based host range predictions[J]. *Cell Host Microbe*, 2020, 28(3): 371.
- [20] Atanasova N S, Demina T A, Buivydas A, et al. Archaeal viruses multiply: Temporal screening in a solar saltern[J]. *Viruses*, 2015, 7(4): 1902-1926.
- [21] Liu Y, Demina T A, Roux S, et al. Diversity, taxonomy, and evolution of archaeal viruses of the class caudoviricetes[J]. *PLoS Biol*, 2021, 19(11): e3001442.
- [22] Rostol J T, Maraffini L. (Ph)ighting phages: How bacteria resist their parasites[J]. *Cell Host Microbe*, 2019, 25(2): 184-194.
- [23] Maffei E, Shaidullina A, Burkolter M, et al. Systematic exploration of *Escherichia coli* phage-host interactions with the BASEL phage collection[J]. *PLoS Biol*, 2021, 19(11): e3001424.
- [24] Zhan Y, Chen F. The smallest ssDNA phage infecting a marine bacterium[J]. *Environ Microbiol*, 2019, 21(6): 1916-1928.
- [25] Kirchberger P C, Martinez Z A, Luker L J, et al. Defensive hypervariable regions confer superinfection exclusion in microviruses[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(28): e2102786118.
- [26] Santiago-Rodriguez T M, Ly M, Daigneault M C, Brown IHL, et al. Chemostat culture systems support diverse

- bacteriophage communities from human feces[J]. *Microbiome*, 2015, 3: 58.
- [27] Henson M W, Lanclos V C, Faircloth B C, *et al.* Cultivation and genomics of the first freshwater SAR11 (LD12) isolate[J]. *Isme J*, 2018, 12(7): 1846-1860.
- [28] Morris R M, Cain K R, Hvorecny K L, *et al.* Lysogenic host-virus interactions in SAR11 marine bacteria[J]. *Nat Microbiol*, 2020, 5(8): 1011.
- [29] Shkoporov A N, Khokhlova E V, Fitzgerald C B, *et al.* Phi CrAss001 represents the most abundant bacteriophage family in the human gut and infects *Bacteroides intestinalis*[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4781.
- [30] Guerin E, Shkoporov A N, Stockdale S R, *et al.* Isolation and characterisation of phi crAss002, a crAss-like phage from the human gut that infects *Bacteroides xylanisolvens*[J]. *Microbiome*, 2021, 9(1): 89.
- [31] Callanan J, Stockdale S R, Shkoporov A, *et al.* RNA phage biology in a metagenomic era[J]. *Viruses*, 2018, 10(7): 386.
- [32] Ghabrial S A, Caston J R, Jiang D H, *et al.* 50-plus years of fungal *Viruses*[J]. *Virology*, 2015, 479: 356-368.
- [33] Cai X Y, Tian F J, Teng L, *et al.* Cultivation of a lytic double-stranded RNA bacteriophage infecting microvirgula aerodenitrificans reveals a mutualistic parasitic lifestyle[J]. *J Virol*, 2021, 95(17): e0039921.
- [34] Feiner R, Argov T, Rabinovich L, *et al.* A new perspective on lysogeny: Prophages as active regulatory switches of bacteria[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13(10): 641-650.
- [35] Howard-Varona C, Hargreaves K R, Abedon S T, *et al.* Lysogeny in nature: Mechanisms, impact and ecology of temperate phages[J]. *Isme J*, 2017, 11(7): 1511-1520.
- [36] Owen S V, Wenner N, Dulberger C L, *et al.* Prophages encode phage-defense systems with cognate self-immunity[J]. *Cell Host Microbe*, 2021, 29(11): 1620-1633.
- [37] Li Y M, Liu X X, Tang K H, *et al.* Excisionase in Pf filamentous prophage controls lysis-lysogeny decision-making in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Mol Microbiol*, 2019, 111(2): 495-513.
- [38] Shen M, Yang Y, Shen W, *et al.* A linear plasmid-like prophage of *Actinomyces odontolyticus* promotes biofilm assembly[J]. *Appl Environ Microb*, 2018, 84(17): e01263-18.
- [39] Baker J L, Bor B, Agnello M, *et al.* Ecology of the oral microbiome: Beyond bacteria[J]. *Trends Microbiol*, 2017, 25(5): 362-374.
- [40] Amgarten D, Braga L P P, da Silva A M, *et al.* MARVEL, a tool for prediction of bacteriophage sequences in metagenomic bins[J]. *Front Genet*, 2018, 9: 304.
- [41] Sutton T D S, Clooney A G, Ryan F J, *et al.* Choice of assembly software has a critical impact on virome characterisation[J]. *Microbiome*, 2019, 7(1): 12.
- [42] Fouts D E. Phage_Finder: Automated identification and classification of prophage regions in complete bacterial genome sequences[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(20): 5839-5851.
- [43] Arndt D, Grant J R, Marcu A, *et al.* PHASTER: A better, faster version of the PHAST phage search tool[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(W1): W16-W21.
- [44] Song W C, Sun H X, Zhang C, *et al.* Prophage Hunter: An integrative hunting tool for active prophages[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W74-W80.
- [45] Li Y M, Liu X X, Tang K H, *et al.* Prophage encoding toxin/antitoxin system PfiT/PfiA inhibits Pf4 production in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Microb Biotechnol*, 2020, 13(4): 1132-1144.
- [46] Cornuault J K, Petit M A, Mariadassou M, *et al.* Phages infecting *Faecalibacterium prausnitzii* belong to novel viral genera that help to decipher intestinal viromes[J]. *Microbiome*, 2018, 6(1): 65.
- [47] Tang K, Wang W, Sun Y, *et al.* Prophage tracer: Precisely tracing prophages in prokaryotic genomes using overlapping split-read alignment[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(22): e128.
- [48] Norman J M, Handley S A, Baldrige M T, *et al.* Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease[J]. *Cell*, 2015, 160(3): 447-460.
- [49] Cox D B T, Platt R J, Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges[J]. *Nat med*, 2015, 21(2): 121-131.
- [50] Maddocks S, Fabijan A P, Ho J, *et al.* Bacteriophage therapy of ventilator-associated pneumonia and empyema caused by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019, 200(9): 1179-1181.
- [51] Schooley R T, Biswas B, Gill J J, *et al.* Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection[J]. *Antimicrob Agents Ch*, 2017, 61(10): 14.
- [52] Pham V H T, Kim J. Cultivation of unculturable soil bacteria[J]. *Trends Biotechnol*, 2012, 30(9): 475-484.
- [53] Stewart E J. Growing unculturable bacteria[J]. *J Bacteriol*, 2012, 194(16): 4151-4160.