

深圳赤潮中霍乱弧菌噬菌体的分离筛选及生物学特性分析

蔡俊鹏* 孙丽滢

(华南理工大学轻工与食品学院 广东 广州 510640)

摘要: 本文以从鲍鱼肠道中分离出的霍乱弧菌 SWBC-a 为宿主菌, 采用双层平板法从 2004 年夏季深圳大梅沙海域赤潮海水样品中分离得到 10 株噬菌体。通过对分离出的噬菌体效价、RTD 值的测定、形态特征的观察及对属内外细菌的交叉裂解谱的研究, 筛选出 3 株裂解谱较宽的强效噬菌体。选取其中 2 株高效裂解噬菌体 PsaA 和 PsaH 做生物学特性分析, 证明除镁离子有利于噬菌体裂解外, 温度、pH 值、紫外照射、柠檬酸钠对噬菌体裂解都有不同程度的抑制。本研究结果为进一步利用噬菌体研发用于消除霍乱弧菌的微生态制剂和诊断食源性霍乱弧菌提供了理论基础。

关键词: 噬菌体, 霍乱弧菌, 生物学特性, 理化因素

Isolation and Characterization of Bacteriophages of *Vibrio cholera* from the Red Tide Waters in Shenzhen

CAI Jun-Peng* SUN Li-Ying

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510640, China)

Abstract: Using *Vibrio cholerae* separated from the intestines of abalones as host, ten bacteriophages of *Vibrio cholera* were isolated by double-layer plate method from sea water sample from the Red tide at Dameisha of Shenzhen in 2004. Three broad lysis spectrum strains were found by detecting microbiological assay, RTD, the character of plaque morphology under electron microscope and the lysis spectrum. PsaA and PsaH were selected among all the strains as the representation to study the biological characteristics. The results proved that heat inactivation, pH, ultraviolet rays and sodium citrate restrict the ability of lysis to some degree, additionally, magnesium perhaps have advantage on lysing. Furthermore, this study provide us further theory of researching on microbial ecological agents for eliminating *Vibrio cholerae* and diagnosing on food borne *Vibrio cholerae* using bacteriophage.

Keywords: Bacteriophage, *Vibrio cholerae*, Biological characteristics, Physical and chemical factors

霍乱是我国《传染病防治法》规定的甲类传染病, 也是目前 3 种国际检疫传染病中危害最严重的

疾病。由霍乱弧菌引起的霍乱是许多发展中国家的公共卫生问题, 可以通过污染的水或食物而感染,

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 40776091); 广东省海洋渔业科技推广专项项目(No. A200899H02)

* 通讯作者: Tel: 86-20-87113024; 邮箱: febjpcai@scut.edu.cn

收稿日期: 2009-07-07; 接受日期: 2009-09-15

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

许多食物包括米饭、蔬菜、粟米粥和各类海鲜都与霍乱爆发有关。如何防治和快速检测由霍乱弧菌所引发的食物中毒,是食品卫生人员急需解决的问题。

噬菌体作为生物抗生素具有针对性强、抗细菌耐药性、无残留等优点^[1]。基于动物模型的实验表明噬菌体可以有效控制动物感染各种各样的有害菌^[2]。一般认为温和型噬菌体不适合根除有害细菌;而烈性噬菌体一旦感染细菌就必然会使宿主死亡,且通常具有广谱的宿主性^[3]。因此,烈性噬菌体是监测和生物防治食源性疾病的较好选择。目前已经证明噬菌体可有效消除单增李斯特菌对西瓜和苹果的污染^[4]、以及其他一些食物表面或内部存在的食源性细菌如:沙门氏菌、空肠弯曲菌^[5]等。

本研究以 2004 年夏季深圳大梅沙海域赤潮海水为研究对象,分离筛选出针对霍乱弧菌的具有高效强裂解、宽裂解谱的噬菌体,并对筛选到的宽裂解性的噬菌体进行理化和生物学特性的研究,以此为利用噬菌体快速诊断和鉴定食源性病原菌以及利用宽裂解谱的噬菌体控制、消除由食源性致病菌引起的食品污染提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集: 2004 年 9 月进行采样,采集深圳大梅沙海域赤潮污染海水。

1.1.2 培养基和试剂: 2216E 培养基;海水胰蛋白胨培养基;其中双层平皿底层和上层半固体琼脂含量分别为 1.5% 和 0.7%,普通平皿培养基内琼脂含量为 1.5%;PBS 缓冲液;SM 缓冲液;Tris 缓冲液。

1.1.3 菌株: 见表 1,其他实验菌株均为本实验室保存的检自汕尾遮浪镇鲍鱼养殖环境的菌株。

1.2 噬菌体的分离

霍乱噬菌体的分离使用海水胰蛋白胨培养基,以鲍鱼肠道中分离出的霍乱弧菌为宿主菌,采用双层平板分离法^[6]分离裂解性噬菌体。噬菌体出斑后挑斑用液体海水胰蛋白胨培养,重复以上过程直至纯化。

1.3 噬菌体的电镜观察

采用磷钨酸负染法^[7]。为了获得背景清晰的图片,应浓缩和净化噬菌体浓缩液。通常采用超速离

表 1 实验用菌株
Table 1 Strains used in the study

菌株名称 Strain name	编号 No.	菌株来源 Sources
霍乱弧菌 <i>Vibrio cholerae</i>	sh10	中科院南海所惠赠
霍乱弧菌 <i>Vibrio cholerae</i>	swbc-a, swbc-b	分离自汕尾遮浪粤顺鲍鱼场
副溶血弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	11-114, 10-211, 11-20	由中科院南海所惠赠
副溶血弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 33846	购自中科院微生物研究所
副溶血弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17749	购自中科院微生物研究所

心的方法沉降噬菌体颗粒。将增殖液经过 4℃、8000 r/min 离心 30 min,取上清液然后再通过 10000 × g 的离心力超速离心使噬菌体颗粒沉降。用适量的 PBS 缓冲液洗涤沉淀。

1.4 高效裂解性噬菌体的筛选

1.4.1 噬菌体的效价测定: 采用双层平板法,培养 24–48 h 后作噬斑计数。滴度(PFU/mL) = 噬斑数 × 稀释倍数 × 取样量折算数。

1.4.2 噬菌体的常规稀释度(RTD)测定: 将噬菌体原液进行一系列 10 倍的梯度稀释,再将稀释后的噬菌体液滴在表面铺有宿主菌的琼脂平板上,以刚好不能引起融汇裂解,但接近融汇裂解的为最高稀释度。该稀释度即为该噬菌体液的 RTD 值^[8]。

1.4.3 强裂解性噬菌体的筛选: 用双层平板法,将稀释的噬菌体与大肠杆菌混合后铺平板,选择形成 10–300 个噬斑的平板观察噬斑形态,噬斑直径大、噬斑中无再生菌、边缘清晰的为强裂解性噬菌体。

1.4.4 广谱噬菌体的筛选: 将细菌悬液涂布在海水胰蛋白胨底层琼脂平板上,28℃ 培养 4 h,晾干后用微量移液器吸取按 RTD 值稀释到相应浓度的噬菌体液到各琼脂平板上滴 1 滴,待吸干后置于 28℃ 恒温培养箱培养 12 h,观察初步结果,再继续培养至 24–48 h,观察结果,根据裂解的效果判定噬菌谱^[9]。判定标准:在滴有噬菌体部位出现噬菌彻底,透明的融合斑为“CL”;斑点透明,中间有少数再生菌落生长的为“SL”;斑点透明,但裂解不彻底,有明显的再生菌落生长的为“OL”;仅有少量单个噬斑或不透明斑块的为“S”;不出现裂解的为“—”。

1.5 噬菌体生物学特性

1.5.1 pH 稳定性测定: 按照余茂效方法^[10], 分别将效价为 10^{4-5} PFU/mL 的噬菌体悬液 0.5 mL 加入到不同 pH 的蛋白胨水中, 计时处理 1 h 后, 分梯度倒双层, 根据平板上形成的噬菌斑数, 计算出每株噬菌体在不同 pH 下处理后的存活率。

1.5.2 紫外线的对噬菌体的灭活作用: 按照 Adams^[11]方法, 取蛋白胨液稀释的效价为 10^{4-5} 的噬菌体悬液 1 mL 至直径为 3 mm 的平皿中, 分别放在紫外灯(25-37 OA 20 W, 30 cm)下进行照射, 每个样品照射时间为 0、3、6、9、12、15、18、21、24 min, 然后在暗处放置 30 min。取灭活的稀释液用双层平板法培养, 根据平板上形成的噬菌斑数, 计算出每株噬菌体在经紫外灭活处理后的存活率。

1.5.3 Mg^{2+} 浓度对噬菌体效价的影响: 调节上层海水胰蛋白胨琼脂层中 Mg^{2+} 的不同浓度分别为 0、2、4、6 和 8 mmol/L。用双层平板法培养, 根据平板上形成的噬菌斑数, 计算出 2 价离子浓度对噬菌体效价的影响情况^[12]。

1.5.4 柠檬酸钠浓度($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$)对噬菌体效价的影响: 调节上层海水胰蛋白胨琼脂层中柠檬酸钠 $[C_6H_5O_7^{3-}]$ 的不同浓度分别为 0%、0.25%、0.5%、1%和 2%^[13], 根据双层平板法培养后平板上形成的噬菌斑数, 计算出 2 价离子浓度对噬菌体效价的影响情况。

2 结果和分析

2.1 噬菌体分离结果

28℃ 培养 24-48 h 后, 出现噬菌斑, 通过观察噬菌斑的形态和进行单斑分离纯化, 分离得到霍乱

弧菌 Swbc-a 的噬菌体 10 株, 见表 2。其中 PsaA、PsaC 形成的噬斑如图 1、2。

2.2 高效裂解噬菌体的筛选

用以上 10 株噬菌体分别对 23 株海洋弧菌和属外 5 株细菌做交叉裂解, 结果见表 3。

由表 3 的结果表明: Swbc-a 菌株的 10 株噬菌体对属内外的 28 株细菌做交叉裂解性实验中 PsaA、PsaC、PsaH 和 PsaJ 裂解率达到 50%以上, 能够裂解包括属于溶藻弧菌、副溶血弧菌等属内菌株, 但对属外的菌株未出现裂解。



图1 PsaA 形成的噬斑
Fig.1 The plaque formed by PsaA

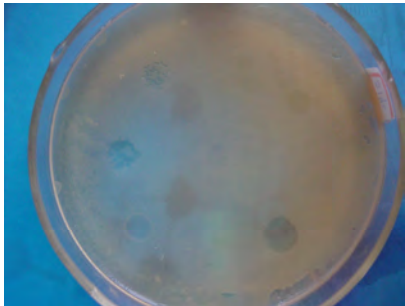


图2 PsaC 形成的噬斑
Fig.2 The plaque formed by PsaC

表 2 所分离噬菌体的噬斑特征
Table 2 Character of bacteriophage plaques isolated

噬菌体名称 Name of bacteriophage	噬菌斑大小 Plaque size(mm)	噬菌斑形态 Character of plaque morphology	效 价 Titer(PFU/mL)	RTD
PsaA	1.6-2	透明, 边缘清晰, 无晕环	5.3×10^8	10^{-4}
PsaB	1.5	透明, 边缘清晰, 有晕环	1.1×10^8	10^{-4}
PsaC	2.0-2.5	透明, 边缘清晰, 无晕环	8.0×10^8	10^{-4}
PsaD	2.0	透明, 边缘模糊, 无晕环	4.0×10^9	10^{-7}
PsaE	2.5-3.0	透明, 边缘清晰, 无晕环	1.6×10^8	10^{-3}
PsaF	2.0	透明, 边缘模糊, 有晕环	3.2×10^6	10^{-4}
PsaG	1.5-1.8	透明, 边缘模糊, 无晕环	1.8×10^7	10^{-4}
PsaH	1.5-2.0	透明, 边缘模糊, 无晕环	4.2×10^8	10^{-4}
PsaI	0.8-1.0	透明, 边缘清晰, 无晕环	5.1×10^7	10^{-3}
PsaJ	0.6	透明, 边缘清晰, 无晕环	1.2×10^8	10^{-4}

2.3 宽裂解噬菌体的电镜观察

本实验从分离得到的 10 株噬菌体中的 4 株霍乱弧菌噬菌体, 在 JEM-100CX II 型透射电子显微镜下进行了观察研究^[14-15], 我们发现它们均为无尾噬菌体, 其结构如表 4 和图 3、4 所示。

通过对 4 株噬菌体的电镜形态观察及从交叉裂解谱和微观形态上进一步分析, 我们可以认为 PsaC 和 PsaH 是同一型株噬菌体。PsaA 虽然在裂解情况上与以上两株菌相似, 但在形态上完全不同。

根据以上交叉裂解的情况, 我们选取裂解情况较好具有代表性的噬菌体 PsaA、PsaH 进行进一步生物学特性的研究。

2.4 加热处理对噬菌体存活率的影响

PsaA、PsaH 在不同温度处理条件下, 对热稳定性的测定结果如下图 5、6 所示。

存活率皆以处理前 0 min 时为 100%计, 由图 5、6 可知 PsaA、PsaH 的失活温度在 40℃-50℃ 之间, 70℃ 处理 10 min 之内足以使全部噬菌体失去活性。

表 3 霍乱弧菌 swbc-a 的 10 株噬菌体对病原菌的交叉裂解结果											
Table 3 Results of cross-lysing of 10 species bacteriophages of <i>Vibrio cholera</i> swbc-a to pathogenic bacteria											
细菌编号 No.	菌株类别 Type of strain	噬菌体 Bacteriophages									
		PsaA	PsaB	PsaC	PsaD	PsaE	PsaF	PsaG	PsaH	PsaI	PsaJ
Swbc-a	<i>Vibrio cholerae</i>	CL	OL	OL	OL	S	SL	OL	CL	OL	CL
1	<i>Vibrio alginolyticus</i>	SL	—	OL	—	—	CL	OL	CL	—	S
2	<i>Vibrio alginolyticus</i>	OL	—	OL	OL	—	—	—	SL	—	—
3	<i>Vibrio alginolyticus</i>	OL	OL	OL	OL	—	—	S	OL	—	OL
4	<i>Vibrio alginolyticus</i>	SL	OL	SL	OL	OL	—	—	SL	—	CL
5	<i>Vibrio alginolyticus</i>	—	—	—	—	—	SL	—	—	—	—
6	<i>Vibrio cholerae</i>	—	—	—	—	—	—	—	S	—	—
8	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	S	—	S	—	—	S	—	OL	—	S
9	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	SL	—	CL	—	—	—	OL	OL	—	OL
10	<i>Vibrio alginolyticus</i>	SL	—	SL	SL	—	OL	—	—	OL	OL
11	<i>Vibrio alginolyticus</i>	—	—	SL	—	—	—	—	—	—	—
13	<i>Vibrio alginolyticus</i>	SL	—	OL	—	—	CL	SL	CL	—	SL
16	<i>Vibrio alginolyticus</i>	OL	—	SL	SL	—	OL	—	OL	—	S
21	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
23	<i>Vibrio alginolyticus</i>	SL	—	—	—	—	OL	—	—	—	SL
25	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CL	SL	SL	—	—	—	SL	CL	—	CL
26	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	SL	—	OL	—	—	SL	S	SL	—	S
Sh10	<i>Vibrio cholerae</i>	CL	—	CL	SL	—	CL	OL	CL	—	SL
swbc-b	<i>Vibrio cholerae</i>	SL	OL	SL	CL	—	—	OL	SL	—	OL
1615	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	SL	—	OL	—	—	—	—	SL	—	—
1833	<i>Vibrio alginolyticus</i>	—	—	—	S	S	—	—	—	OL	—
11-441	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	OL	—	—	—	—	OL	SL	OL	—	OL
10-211	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	OL	—	OL	—	—	SL	—	SL	—	SL
11-201	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	—	—	OL	OL	—	—	—	—	—	—
17	<i>Ps. aeruginosa</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
20	<i>Serratia odorifera</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
22	<i>Providencia rettgeri</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
24	<i>Shewan putrafaciens</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
27	<i>Shewan putrafaciens</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

注: CL: 融合性裂解; SL: 半融合性裂解; OL: 斑点裂解; S: 弱裂解; —: 不出现噬菌斑。
Note: CL: Confluent lysis; SL: Semi-confluent lysis; OL: Opaque confluent lysis; S: Slack lysis; —: No lysis.

表 4 噬菌体的大小和分类
Table 4 Size and classification of bacteriophage

噬菌体号 Bacteriophages	形态分类 Morphological classification	形态特征 Morphological characteristics	形态分型 Morphotyping	科属 Phagaceae
PsaA	无尾噬菌体	φ 6 型, 有囊膜, 直径 63 nm	E2 型	囊状噬菌体科
PsaC	无尾噬菌体	短杆状, 直径 30 nm, 长 1.5 μm	F2 型	杆状噬菌体科
PsaJ	无尾噬菌体	短杆状, 直径 25 nm, 长 2.0 μm	F2 型	杆状噬菌体科
PsaH	无尾噬菌体	短杆状, 直径 30 nm, 长 1.1–1.5 μm	F2 型	杆状噬菌体科

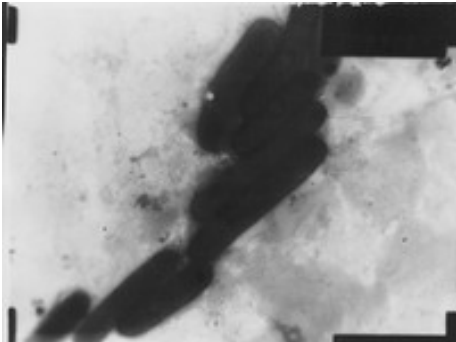


图 3 PsaC 的结构(× 20K)
Fig. 3 The structure of PsaC (× 20K)



图 4 PsaA 的结构(× 40K)
Fig. 4 The structure of PsaA (× 40K)

在 40℃ 保温 30 min, Psh10F 和 PsaH 仍有较高活性。在 50℃ 温度下灭活 30 min, 可以看出噬菌体对热的耐受性 PsaH > PsaA。

2.5 pH 对噬菌体的稳定性影响

噬菌体在不同 pH 溶液处理后, 其活性因噬菌体不同而不同, 结果见图 7。

由结果可以看出, 这 2 种噬菌体存活的最适 pH 都为 pH 8.0, 在 pH 6.0–9.0 范围内这 2 株噬菌体均有 45% 以上的存活率, 随着酸性或碱性程度的增强, 噬菌体的存活率随之降低。其中 PsaH 在最适 pH 7.5–8.5 之外, PsaA 在最适 pH 7.8–8.0 之外, 存活率随 pH 变化明显。在 pH 6.0 以下、pH 10.0 以上, 噬

菌体存活率很低。这两株噬菌体对 pH 的敏感顺序为 PsaH > PsaA, 这可能与噬菌体样品所生存的海洋环境相关。

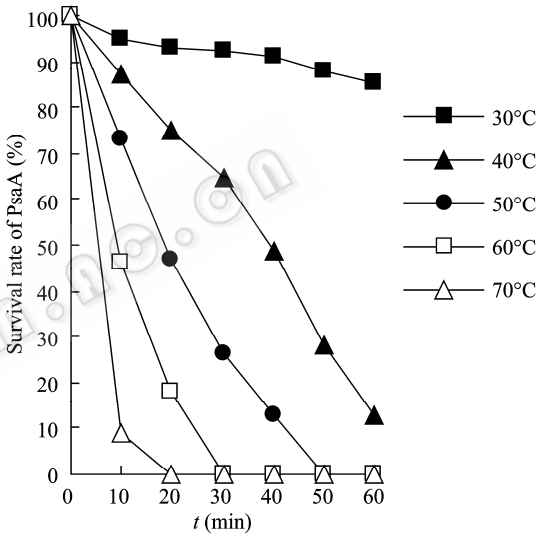


图 5 噬菌体 PsaA 的热稳定性
Fig. 5 Survival of phage PsaA at different temperatures

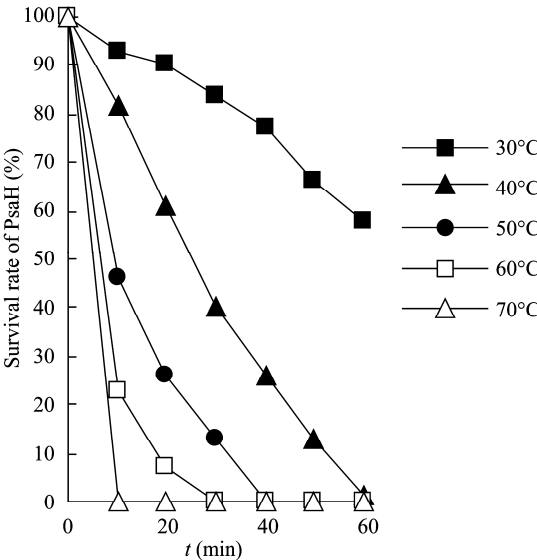


图 6 噬菌体 PsaH 的热稳定性
Fig. 6 Survival of phage PsaH at different temperatures

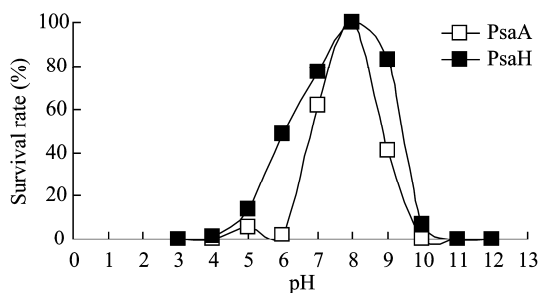


图7 不同 pH 对噬菌体存活率的影响(%)

Fig. 7 Influence of different pH on the survival of phages

2.6 紫外照射对噬菌体存活率的影响

将噬菌体在紫外线下照射不同时间, 测得其存活率见图 8。

存活率皆以处理前 0 min 时为 100% 计。从图 8 可以看出, 霍乱弧菌的 2 株噬菌体对紫外线均较为敏感, 虽然变化趋势不完全相同, 但都随时间的延长而降低其存活率。在照射 24 min 左右存活率均出现大幅度的降低, 其中 PsaA 完全失活, 而 PsaH 耐受性稍微好一些但也低于 10%。因此在使用噬菌体检测细菌或作为益生菌时, 应尽量避免曝晒, 以免噬菌体失活。

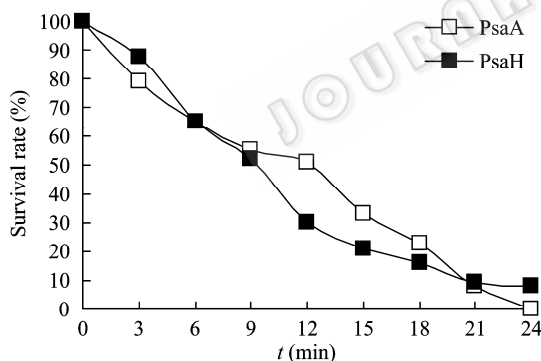


图8 紫外线对噬菌体存活率的影响

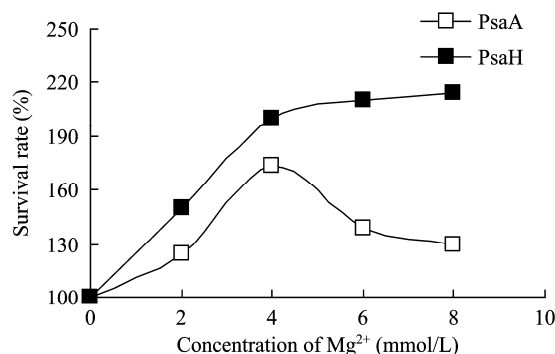
Fig. 8 Effect of UV on the survival of phages

2.7 Mg^{2+} 浓度对噬菌体效价的影响

将不同浓度的 Mg^{2+} 加入培养基中, 对 2 株噬菌体的存活率均产生较大影响, 效价影响率以加入 Mg^{2+} 浓度为 0 mmol/L (即未专门添加 Mg^{2+} 时) 记作 100%, 结果如图 9 所示。

由图 9 可看出, 随着 Mg^{2+} 浓度的增加, 2 株噬菌体的效价逐步增大, 在 4 mmol/L Mg^{2+} 浓度时噬菌体 PsaA 效价最高, 为不添加时的 1.7 倍, 在 8 mmol/L

Mg^{2+} 时噬菌体 PsaH 效价最高, 为不添加时的 2.1 倍。平板结果显示, 相同培养条件下, 添加了 Mg^{2+} 的各株噬菌体效价明显提高, 但针对不同噬菌体, 存在着最适的浓度。

图9 Mg^{2+} 浓度对噬菌体裂解活性的影响Fig. 9 Effect of $[Mg^{2+}]$ on lytic activity of phages

2.8 柠檬酸钠浓度对噬菌体效价的影响

向培养基中加入一定量的柠檬酸钠对 2 株噬菌体的噬菌斑形成均有明显的抑制作用, 如图 10 所示。

效价影响率以未加入柠檬酸钠时记作 100%, 随着 $[C_6H_5O_7^{3-}]$ 的增加, 所形成噬菌斑数降低。在 0.5% 柠檬酸钠浓度下, PsaA 噬菌斑的形成被完全抑制, 在 1% 柠檬酸钠浓度下, 完全抑制了 PsaA 和 PsaH 噬菌斑的形成。在相同的培养条件下, 2 株噬菌体在添加有柠檬酸钠的培养基上所形成的噬菌斑, 均比未添加柠檬酸钠培养基上的斑小且模糊。

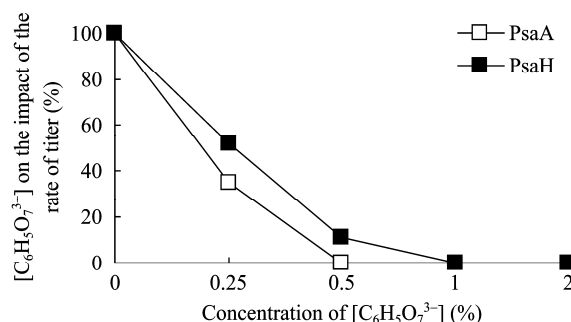


图10 不同浓度的柠檬酸钠对噬菌体裂解活性的影响

Fig. 10 Effect of $[C_6H_5O_7^{3-}]$ on lytic activity of phages

3 讨论

本研究从 2004 年夏季深圳大梅沙海域赤潮海水中分离出以霍乱弧菌为宿主菌的噬菌体。通过其

对 3 株霍乱弧菌、11 株溶藻弧菌、8 株副溶血弧菌的裂解性结果和电镜观察筛选到 PsA、PsC(PsH) 和 PsJ 3 株裂解性较宽的强效噬菌体, 这 3 株噬菌体的裂解率均达到 50% 以上。以此可以证明其在消除食源性致病菌方面的研究价值。

之所以这 3 株噬菌体具有较宽裂解谱的原因需要从其 DNA 序列上进行探索, 猜测可能由于它们属于某个特殊的种型而可以有较宽的裂解谱, 这需要进一步研究证实。从来源上看本文的噬菌体分离自深圳赤潮, 赤潮中具有较多的有益于噬菌体生长的营养物质, 从赤潮中分离出宽裂解谱的噬菌体的机会也就大大增加。

在对噬菌体 PsA、PsH 生物学特性进行研究, 发现理化因素对霍乱弧菌噬菌体的裂解能力有不同程度的影响:

(1) 2 株噬菌体吸附霍乱弧菌的最适 pH 均在 7.8–8.0 之间, 和噬菌体所来自海洋生存的环境有密切关系。

(2) 在 0–37°C 范围内, 温度越高, 噬菌体吸附效率也就越高, 但对不同的噬菌体也存在着一个最适温度。由实验结果可以看出两株菌对热的耐受性顺序为 PsH > PsA。同时参考这 2 种噬菌体的形态结构, 以及实验室从汕尾、舟山等地样品中分离出的霍乱弧菌噬菌体的形态结构(结果另文发表), 我们可以知道短杆状噬菌体相对耐热, 而多边形噬菌体则相对敏感。

(3) 在较短时间内紫外线对噬菌体具有较强的杀灭作用, 柠檬酸钠对其有抑制作用, 而 2 价阳离子则促进噬菌体的裂解。

以上理化性质有可能在生产实践中应用来消除或抑制噬菌体的裂解作用。

整个研究为进一步利用噬菌体诊断食源性霍乱弧菌提供了理论基础, 也为开发噬菌体微生态制剂, 防治由霍乱引起的食源性疾病, 维护食品安全提供了一种新的思路。

参考文献

- [1] 张昕, 蔡俊鹏. 噬菌体在水产养殖中的作用. 粮食与饲料工业, 2004(6): 38–39.
- [2] Oliveira A, Sillankorva S, Quinta R, *et al.* Isolation and characterization of bacteriophages for avian pathogenic *E. coli* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, **106**(6): 1919–1927.
- [3] 刘均洪, 张兴跃. 噬菌体在监测和控制食源性疾病中的应用. 食品科技, 2008(7): 243–246.
- [4] Britta Leverentz, William S Conway, Mary J Camp, *et al.* Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(8): 4519–4526.
- [5] Goode D, Allen VM, Barrow PA. Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(8): 5032–5036.
- [6] 乐毅全, 王士芬. 环境微生物学. 北京: 化学工业出版社, 2005: 19.
- [7] 余茂效. 噬菌体实验技术. 北京: 科学出版社, 1991: 1–94.
- [8] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验. 北京: 科学出版社. 2002: 30–41.
- [9] Antje Wichels, Stefans Biel, Hans R Gelderblom, *et al.* Bacteriophage diversity in the North Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998(11): 4128–4133.
- [10] 余茂效. 多粘芽孢杆菌噬菌体的分离及其特性研究. 微生物学报, 1974, **14**(2): 216–223.
- [11] Adams MH. Bacteriophages. New York: Inter science Publishers, 1959: 1–182.
- [12] 林业杰, 陈亢川, 胡海林, 等. 副溶血性弧菌噬菌体的生物学特性研究. 海峡预防医学杂志, 1998, **4**(1): 9–12.
- [13] 李灏, 谢慧君, 孔健, 等. 畜禽肠道致病菌噬菌体的生物学特性研究. 微生物学通报, 2004, **31**(2): 10–14.
- [14] 贾盘兴. 噬菌体分子生物学. 第一版. 北京: 科学出版社, 2001: 67–95.
- [15] 司樾东, 何晓青. 噬菌体学. 第一版. 北京: 科学出版社, 1996: 5–25.