

研究报告

一株产 L-天冬氨酸酶大肠埃希氏菌的噬菌体分离和生物学特性

徐友强^{1,2} 姜增妍² 姚粟¹ 马玉岳² 裴疆森^{1,2} 程池^{1*}

(1. 中国食品发酵工业研究院 北京 100015)

(2. 山东省富马酸生物转化工程技术研究中心 山东 烟台 265709)

摘要:【目的】从大肠埃希氏菌 CICC 11021S 发酵液中分离一株噬菌体, 对其生物学特性进行研究。【方法】采用双层平板法分离噬菌体 CICC 80003; 利用透射电镜观察噬菌体形态; 提取噬菌体基因组, 核酸内切酶处理并进行凝胶电泳; 分析噬菌体最佳感染复数、一步生长曲线、pH 和温度稳定性、宿主谱。考察 CICC 80003 对 CICC 11021S 生长和 L-天冬氨酸酶活力的影响。【结果】CICC 80003 噬菌斑圆形透明, 有明显晕环; 头部规则, 直径约 50–60 nm, 尾部长约 120–130 nm; 基因组能被核酸内切酶 *Bam*H I 和 *Mlu* I 切开; 最佳感染复数 0.1, 潜伏期 5 min, 裂解期 25 min, 平均裂解量约 86 个; 最适 pH 值 8.0; 90 °C 温育 15 min, 噬菌体全部失活; 能裂解大肠埃希氏菌和沙门氏菌的部分菌株。发生噬菌体污染时, CICC 11021S 无法正常生长, 基本检测不到 L-天冬氨酸酶活力。【结论】CICC 80003 属于长尾噬菌体科 dsDNA 噬菌体, 液体环境中能够彻底裂解大肠埃希氏菌 CICC 11021S。

关键词: L-天冬氨酸, 大肠埃希氏菌, 噬菌体, 生物学特性

Isolation and characterization of a phage against an *Escherichia coli* strain producing L-aspartaseXU You-Qiang^{1,2} JIANG Zeng-Yan² YAO Su¹ MA Yu-Yue²
PEI Jiang-Sen^{1,2} CHENG Chi^{1*}

(1. China National Research Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing 100015, China)

(2. Engineering Technology Research Center of Fumaric Acid Biotransformation in Shandong Province, Yantai, Shandong 265709, China)

Abstract: [Objective] A phage was isolated from *Escherichia coli* CICC 11021S fermentation media, and its biological characterization was studied. [Methods] A phage designated CICC 80003 was

Foundation item: Yantaishi Science and Technology Development Project (No. 2014SF151); Scientific and Technological Development Project of China National Research Institute of Food and Fermentation Industries (Doctoral Project) (No. 2015KJFZ-BS-03)

*Corresponding author: Tel: 86-10-53218306; E-mail: cheng100027@163.com

Received: July 31, 2015; **Accepted:** November 13, 2015; **Published online** (www.cnki.net): December 04, 2015

基金项目: 烟台市科技发展计划项目(No. 2014SF151); 中国食品发酵工业研究院 2015 年科技发展基金(博士专项)项目(No. 2015KJFZ-BS-03)

*通讯作者: Tel: 86-10-53218306; E-mail: cheng100027@163.com

收稿日期: 2015-07-31; **接受日期:** 2015-11-13; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-12-04

isolated using the double-layer agar culture method. Phage morphology was observed by transmission electron microscopy. Gel electrophoresis of phage genome was carried out after genome extraction and treatment by endonucleases. We investigated the optimal multiplicity of infection, one-step growth curve, pH and temperature stability, and host range. Additionally, we analyzed the effects of CICC 80003 on cell growth and L-aspartase activity of CICC 11021S. **[Results]** The phage plaque was round and transparent, and showed clear aureole. The phage had a regular head of 50–60 nm in diameter and a long tail with 120–130 nm in length. The phage genome could be cut by endonucleases *Bam*H I and *Mlu* I. The optimal multiplicity of infection was 0.1. The one-step growth curve showed a latent period of 5 min and a rise period of 25 min. The average burst size was about 86 phage particles per infected cell. The optimal pH was 8.0. The phage was completely inactivated when incubated at 90 °C for 15 min. Some of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. strains could be split by CICC 80003. No cell growth and L-aspartase activity was detected when phage contamination occurred. **[Conclusion]** CICC 80003 was a dsDNA phage and belonged to the family Siphoviridae, which could completely split *E. coli* CICC 11021S in broth.

Keywords: L-aspartic acid, *Escherichia coli*, Phage, Biological characteristic

L-天冬氨酸是一种重要的食品、医药和化工原料, 市场需求巨大^[1]。微生物转化法利用高 L-天冬氨酸酶活力的菌种, 转化富马酸和氨水生产 L-天冬氨酸, 具有反应条件温和、转化率高、副产物少的特点, 是目前常用的工业化生产方法^[2]。

微生物工业生产中的噬菌体污染时常发生^[3-4], 在 L-天冬氨酸的生产中也不例外^[5]。微生物被噬菌体污染, 会导致发酵周期延长、产物难以形成, 甚至造成倒罐和停产^[3]。利用大肠埃希氏菌生产 L-天冬氨酸包括两步: 菌体培养和以富马酸和氨水为底物全细胞催化生产 L-天冬氨酸^[6]。其中, 大肠埃希氏菌培养过程易受到噬菌体污染^[5], 影响菌体生长和 L-天冬氨酸酶活力, 严重干扰正常生产。研究噬菌体的生物学特性是认识噬菌体的基本前提, 也对控制噬菌体污染具有参考价值^[7]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和噬菌体: 对噬菌体敏感的 L-天冬氨酸生产菌种大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) CICC 11021S, 保藏于中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC), 宿主谱分析涉及的大肠埃希氏菌、志贺氏菌、沙门氏菌均来源于 CICC。噬菌体 CICC 80003 分离自某工厂污染噬菌体的发酵液。

1.1.2 培养基: 双层平板培养基^[8]; LB 培养基^[9];

发酵培养基(g/L), 富马酸 10.0, 玉米浆干粉 10.0, 硫酸镁 0.2, 磷酸二氢钾 1.0, 氯化钠 1.5, 氨水调节 pH 6.5–7.5, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.1.3 主要试剂: DNA Marker 和 Proteinase K, 天根生化科技(北京)有限公司; 核酸内切酶, 美国 Thermo Scientific 公司; 化学试剂为分析纯或色谱纯。

1.1.4 主要仪器: Eppendorf 低温离心机, 德国 Eppendorf 公司; JEM-1400 透射电子显微镜, 日本电子株式会社; ZF-4 型紫外透射反射分析仪, 上海康禾光电仪器有限公司; Tanon EPS 300 数显稳压稳流电泳仪, 上海天能科技有限公司。

1.2 噬菌体的分离与纯化

参考江艳华等^[8]的方法, 采用双层平板法进行噬菌体分离纯化, 挑取形态大小一致的噬菌斑, 重复分离纯化4次, 得到纯化的噬菌体, 编号 CICC 80003。

1.3 噬菌体形态观察

噬菌体制片采用 0.25%的醋酸双氧铀负染, 待染色的样品晾干后用 JEM-1400 透射电镜观察噬菌体形态。

1.4 噬菌体基因组提取及酶切

参考于子超^[10]的方法, 提取 CICC 80003 基因组, *Bam*H I、*Eco*R I、*Hind* III、*Kpn* I、*Mlu* I、*Not* I、*Pst* I、*Sac* I、*Sma* I、*Spe* I、*Xho* I 分别单酶切处

理,琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 噬菌体最佳感染复数

参考 Lu 等^[11]的方法,将噬菌体与宿主菌以 1、0.1、0.01、0.001、0.000 1 (PFU/CFU)的比例混合,37 °C、200 r/min 温育 1 h,然后梯度稀释,双层平板法测定噬菌体效价。效价最高的噬菌体与宿主比例认定为噬菌体最佳感染复数^[11]。

1.6 噬菌体一步生长曲线

参考 Leuschner 等^[12]和 Pajunen 等^[13]的方法。以噬菌体感染时间为横坐标,效价的对数值为纵坐标,绘制一步生长曲线,计算潜伏期、裂解期和裂解量。

1.7 噬菌体 pH 稳定性

噬菌体纯培养液接于不同 pH (2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0)的 LB 培养基^[9]中,25 °C 恒温水浴 1 h,双层平板法测定效价^[14]。

1.8 噬菌体温度稳定性

噬菌体纯培养液分别置于不同温度(50、60、70、80 和 90 °C)水浴 15、30、45 和 60 min 后,取出立即置于冰浴中冷却,双层平板法测定效价^[14]。

1.9 噬菌体宿主谱

选取 17 株大肠埃希氏菌、3 株志贺氏菌和 3 株沙门氏菌,活化后涂布 LB 平板,滴加噬菌体悬液,37 °C 培养 12 h。对产生噬菌斑的菌株通过双层平板法进一步验证噬菌体是否对宿主菌具有感染性^[11]。

1.10 噬菌体对菌体生长和酶活力影响

配制发酵培养基,500 mL 三角瓶装液量 50 mL。1%接种量接种 *E. coli* CICC 11021S,平行 6 瓶,其中 3 瓶加入终浓度约 1×10^7 PFU/mL 的噬菌体。37 °C、200 r/min 培养,每 2 h 取样测定细胞密度和 L-天冬氨酸酶活力。

L-天冬氨酸酶活力定义:每分钟催化产生 1 μ mol 的 L-天冬氨酸所需要的酶量定义为 1 个酶活力单位。

L-天冬氨酸酶活力测定方法:取发酵液 2 mL,

加入以氨水调节 pH 8.0 的富马酸(1.5 mol/L)溶液 25 mL,45 °C、200 r/min 培养,每 2 h 取样,PITC 柱前衍生法测定 L-天冬氨酸的浓度。

样品衍生:样品 400 μ L,依次加入 0.5 g/L 正亮氨酸溶液 20 μ L、0.1 mol/L PITC-乙腈溶液 200 μ L、1 mol/L 三乙胺-乙腈溶液 200 μ L,涡旋振荡后室温放置 60 min,加入 800 μ L 正己烷,涡旋振荡 1 min,静置 10 min。用注射器吸取下层溶液,0.22 μ m 滤膜过滤后 HPLC 检测。

检测条件:色谱柱为 ZORBAX SB-C₁₈ (5 μ m, 4.6 mm \times 150 mm),紫外检测器设定波长为 254 nm,柱温 38 °C,流速设定为 0.6 mL/min,进样量为 10 μ L,流动相 A 为 0.1 mol/L pH 6.5 的乙酸铵-乙腈(97:3,体积比)溶液,流动相 B 为乙腈溶液。洗脱:0–8 min 流动相 B 的比例为 18%,8–16 min 流动相 B 的比例由 18%梯度升高到 80%。

2 结果与分析

2.1 噬菌体形态观察

以 *E. coli* CICC 11021S 为宿主菌,双层平板培养 12 h,CICC 80003 噬菌斑直径 4.5 mm–6.5 mm,清晰透明,边缘有明显晕环(图 1A)。噬菌体形态如图 1B 所示,头部规则,直径 50 nm–60 nm,尾部直径 120 nm–130 nm。根据国际病毒分类委员会第 8 次报告提出的噬菌体分类与命名标准,CICC 80003 符合长尾噬菌体科(Siphoviridae)的基本特征^[15]。

2.2 噬菌体基因组核酸内切酶酶切

*Bam*H I 酶切产生 2 条条带,*Mlu* I 酶切产生 5 条条带,噬菌体基因组上不存在其余核酸内切酶酶切位点(图 2)。由于核酸内切酶 *Bam*H I 和 *Mlu* I 均为 dsDNA 酶,表明 CICC 80003 的基因组为 dsDNA。

2.3 噬菌体生物学特性

2.3.1 最佳感染复数:图 3 表明 CICC 80003 的最佳感染复数为 0.1。

2.3.2 一步生长曲线:图 4 表明 CICC 80003 的潜伏期约 5 min,裂解期约 25 min,裂解量 73–100 个,

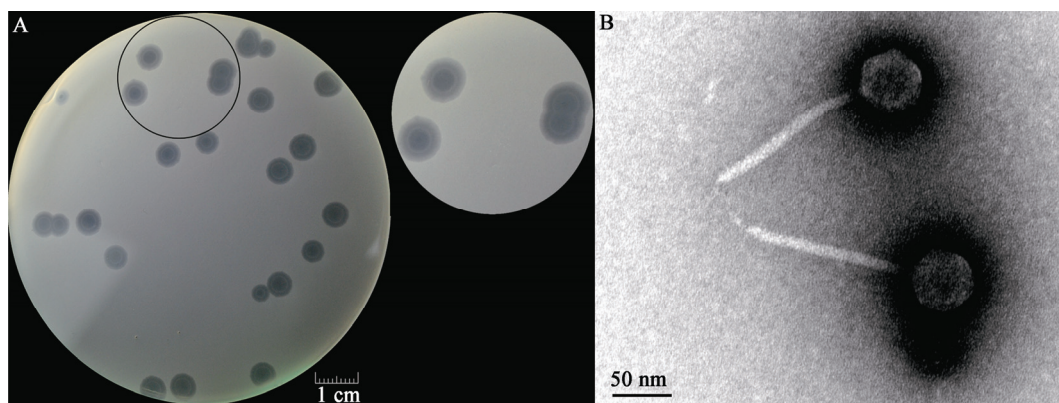


图1 噬菌体 CICC 80003 噬菌斑(A)和微观形态(B)

Figure 1 The plaques (A) and morphology (B) of phage CICC 80003

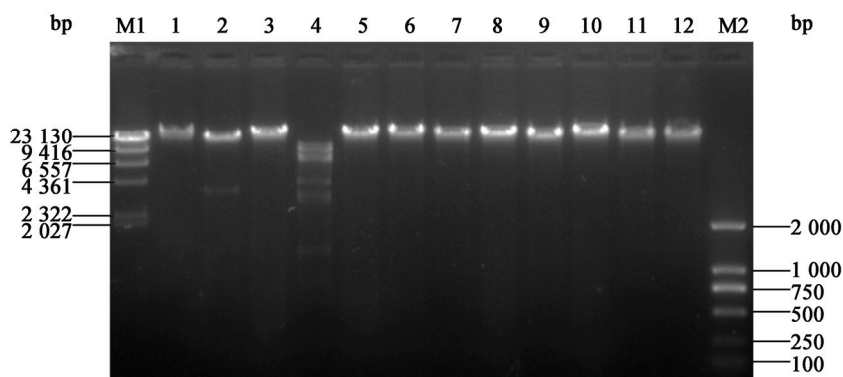


图2 噬菌体 CICC 80003 基因组核酸内切酶酶切电泳分析

Figure 2 Electrophoresis analysis of phage CICC 80003 genome DNA by endonuclease treatment

注: 1: 基因组 DNA; 2: *Bam*H I 酶切处理; 3: *Kpn* I 酶切处理; 4: *Mlu* I 酶切处理; 5: *Not* I 酶切处理; 6: *Pst* I 酶切处理; 7: *Sma* I 酶切处理; 8: *Spe* I 酶切处理; 9: *Eco*R I 酶切处理; 10: *Hind* III 酶切处理; 11: *Xho* I 酶切处理; 12: *Sac* I 酶切处理; M1 和 M2: DNA marker.

Note: 1: Genome DNA; 2: *Bam*H I treatment; 3: *Kpn* I treatment; 4: *Mlu* I treatment; 5: *Not* I treatment; 6: *Pst* I treatment; 7: *Sma* I treatment; 8: *Spe* I treatment; 9: *Eco*R I treatment; 10: *Hind* III treatment; 11: *Xho* I treatment; 12: *Sac* I treatment; M1 and M2: DNA marker.

平均裂解量约 86 个。

2.3.3 pH 稳定性: CICC 80003 的 pH 适应范围较广, 最适 pH 值 8.0, 4.0–11.0 均可以稳定存活, 效价损失不显著(图 5)。

2.3.4 温度稳定性: 图 6 表明 CICC 80003 具有一定的温度稳定性。50 °C 处理 1 h, 基本不失活, 70 °C 处理 1 h, 存活率 47.5%。

2.3.5 宿主谱: CICC 80003 可以感染 17 株大肠埃希氏菌中的 8 株, 包括 K12 和 BL21(DE3)(表 1)。

此外, 选取与大肠埃希氏菌近缘的志贺氏菌 3 株和沙门氏菌 3 株, 进行噬菌体感染。表 1 表明, CICC 80003 可以感染沙门氏菌 CICC 10871, 但是不能感染所选取的志贺氏菌。

2.4 噬菌体对宿主生长和酶活力影响

如图 7 所示, 正常情况下, *E. coli* CICC 11021S 生长 12 h, 菌体密度为 8.33, L-天冬氨酸酶活力 39.8 U/mL。但发生 CICC 80003 污染时, *E. coli* CICC 11021S 无法正常生长, 酶活力几乎检测不到。

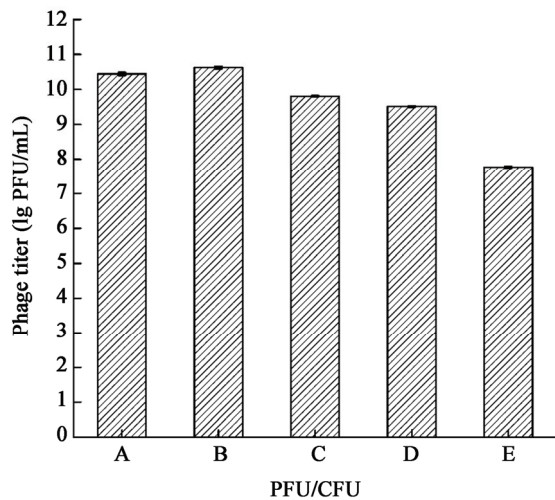


图3 噬菌体 CICC 80003 最佳感染复数

Figure 3 The optimal multiplicity of infection of phage CICC 80003

Note: A: 1; B: 0.1; C: 0.01; D: 0.001; E: 0.000 1.

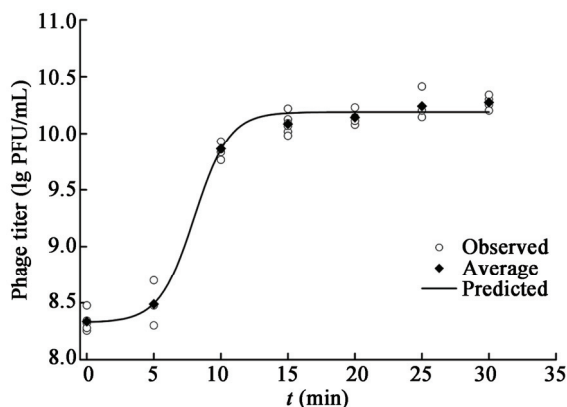


图4 噬菌体 CICC 80003 一步生长曲线

Figure 4 The one step growth curve of phage CICC 80003

3 讨论

微生物生产氨基酸的噬菌体污染已有报道, 如 L-谷氨酸和 L-苯丙氨酸^[16-17]。课题组前期从噬菌体污染样品中分离一株噬菌体 CICC 80001^[5]。对该样品分离的另一株噬菌体 CICC 80003 进行研究, 发现两株噬菌体既有相似之处, 均为有尾噬菌体, 基因组均为 dsDNA; 又有差异之处, CICC 80001 属于短尾噬菌体科, 噬菌斑无晕环, 裂解量约 198 个; 而 CICC 80003 属于长尾噬菌体科, 噬菌斑有明显晕环, 裂解量约 86 个。

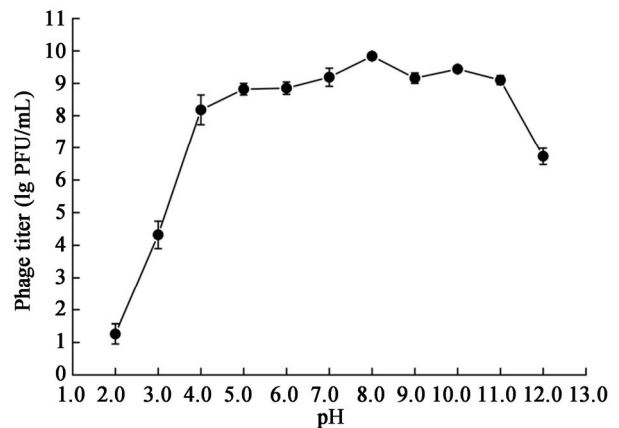


图5 噬菌体 CICC 80003 pH 稳定性

Figure 5 The pH stability of phage CICC 80003

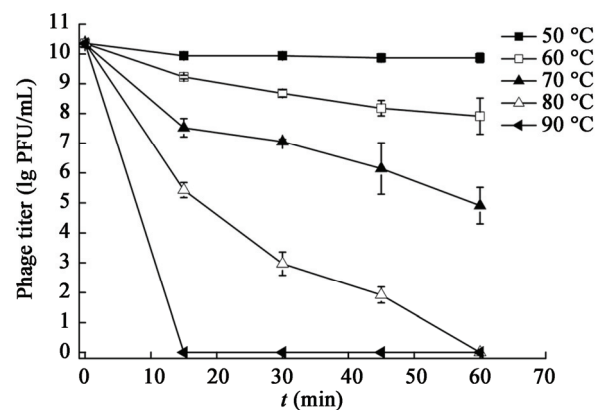


图6 噬菌体 CICC 80003 温度稳定性

Figure 6 The temperature stability of phage CICC 80003

噬菌体感染宿主菌的潜伏期、裂解期以及裂解量与噬菌体、宿主菌、培养基和培养条件均有关^[7]。工业生产中噬菌体的潜伏期、裂解期和裂解量与实验室研究中的差异较大, 这既与感染复数相关, 又与培养基、培养条件和宿主细胞自身所处的生长阶段密切相关。

噬菌体 CICC 80003 具有较宽的 pH 适应范围, pH 4.0–11.0 均可以稳定存在; CICC 80003 对温度具有一定的耐受性, 但是随着温度升高, 噬菌体显著失活。这表明对 CICC 80003 污染防治时, 采取改变培养基 pH 来抑制噬菌体是行不通的, 可以通过高温杀菌, 有效灭杀发酵系统中可能存在的噬菌

表 1 噬菌体 CICC 80003 宿主谱
Table 1 Host range of CICC 80003

菌株名称 Name of strain	菌株编号 Number of strain	菌株来源 Source of strain	裂解性 Lytic ability
<i>Escherichia coli</i>	11021S	CICC	+
<i>Escherichia coli</i>	11022S	CICC	+
<i>Escherichia coli</i>	10300	CICC	+
<i>Escherichia coli</i>	10354	CICC	+
<i>Escherichia coli</i>	10899	CICC	+
<i>Escherichia coli</i>	20905	CICC	+
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	23796	CICC	+
<i>Escherichia coli</i> K12	23872	CICC	+
<i>Escherichia coli</i>	10305	CICC	—
<i>Escherichia coli</i> ETEC O78:K80	10413	CICC	—
<i>Escherichia coli</i> EIEC	10661	CICC	—
<i>Escherichia coli</i>	20058	CICC	—
<i>Escherichia coli</i>	20091	CICC	—
<i>Escherichia coli</i>	20234	CICC	—
<i>Escherichia coli</i>	10780G	CICC	—
<i>Escherichia coli</i>	10784G	CICC	—
<i>Escherichia coli</i>	10785G	CICC	—
<i>Shigella sonnei</i>	21535	CICC	—
<i>Shigella dysenteriae</i>	10983	CICC	—
<i>Shigella boydii</i>	21680	CICC	—
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>typhi</i>	10871	CICC	+
<i>Salmonella typhimurium</i>	22956	CICC	—
<i>Salmonella typhimurium</i>	10420	CICC	—

Note: +: Lysis; —: No lytic ability.

体。但是,由于噬菌体的专性寄生性,凡是有细菌的地方就可能存在对应的噬菌体,且噬菌体个体微小,一般过滤装置难以完全除去,所以仅采用高温杀菌,并不能够从根本上解决噬菌体污染问题^[17-18]。工业生产中一般通过综合措施防治噬菌体污染,如生产环境质量控制、化学防治以及菌种轮换^[4]。噬菌体宿主谱具有一定范围,如 CICC 80003 仅能感染部分大肠埃希氏菌和沙门氏菌菌株(表 1)。选育噬菌体抗性菌种,并在生产过程中定期轮换,是控制

噬菌体污染的有效措施之一,并已经在乳品生产中得到应用^[4,19]。

研究发现,大肠埃希氏菌存在多种噬菌体抗性机制,包括噬菌体吸附阻滞^[20]、DNA 注入阻滞^[21]、限制修饰系统^[22]、流产感染系统^[23]、毒素-抗毒素系统^[24]。基于噬菌体抗性机制构建工程菌,是选育抗噬菌体菌种的有效方法,如异源表达限制修饰系统 *cgII*,构建的 L-谷氨酸生产工程菌,表现出较好的噬菌体抗性和工业应用潜力^[16]。下一步应对

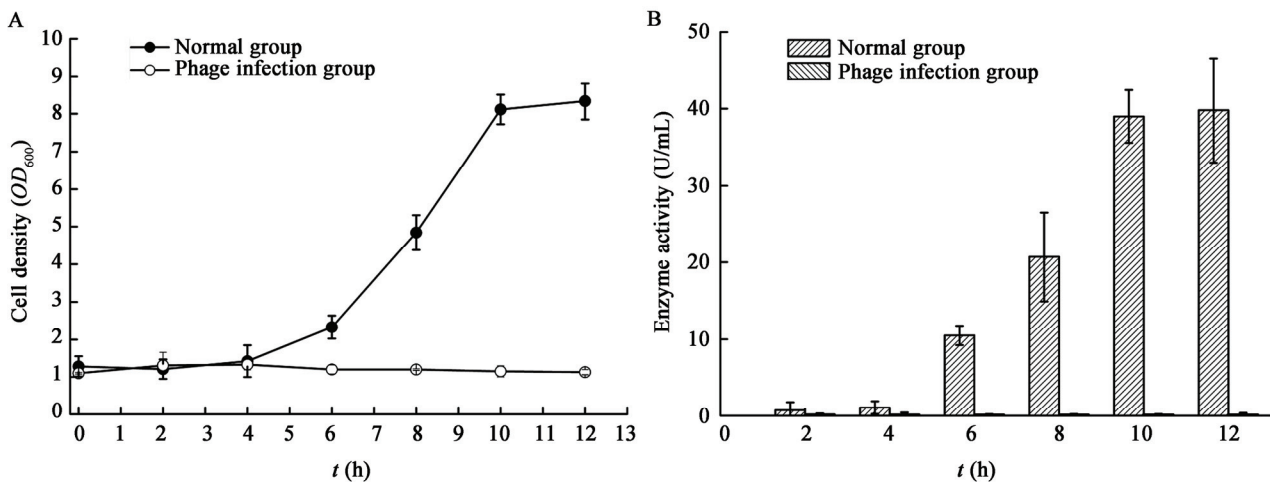


图 7 噬菌体 CICC 80003 对宿主生长(A)和酶活力(B)影响

Figure 7 The effect of CICC 80003 to cell growth (A) and enzyme activity (B) of the host strain

CICC 80003 进行基因组测序和注释, 分析噬菌体的宿主裂解机制, 同时结合现有的噬菌体抗性机制研究, 以 CICC 11021S 为宿主, 构建噬菌体抗性工程菌种, 并检验在实际应用中的效果。

参考文献

- [1] Hu YJ, Liu Y, Cheng C. Production, application and market prospect of L-aspartic acid[J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 39(6): 120-124 (in Chinese)
胡育骄, 刘勇, 程池. L-天冬氨酸生产、应用与市场前景[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(6): 120-124
- [2] Sheng XY, Fu YQ, Li S, et al. Study on a new strategy for the cultivation of L-ASP-producing bacteria utilizing the wasted fumaric acid fermentation broth[J]. Food Science and Technology, 2010, 35(1): 23-26 (in Chinese)
盛晓燕, 付永前, 李霜, 等. 利用富马酸发酵废液培养 L-天冬氨酸转化菌策略的研究[J]. 食品科技, 2010, 35(1): 23-26
- [3] Huffer S, Roche CM, Blanch HW, et al. *Escherichia coli* for biofuel production: bridging the gap from promise to practice[J]. Trends in Biotechnology, 2012, 30(10): 538-545
- [4] Sun WJ, Mo QY, Liu CF, et al. Bacteriophage in fermentation industry: sources, detection and control actions[J]. Food Science and Technology, 2013, 38(8): 323-327 (in Chinese)
孙文敬, 莫秋云, 刘长峰, 等. 发酵工业噬菌体污染的来源、检测与防治[J]. 食品科技, 2013, 38(8): 323-327
- [5] Liu Y, Ma YY, Xu YQ, et al. Isolation and physiological characteristics study of a bacteriophage against an *Escherichia coli* with L-aspartase production[J]. Journal of Microbiology, 2015, 35(5): 43-46 (in Chinese)
刘勇, 马玉岳, 徐友强, 等. 一株产 L-天冬氨酸酶大肠杆菌噬菌体分离和生理特性初步研究[J]. 微生物学杂志, 2015, 35(5): 43-46
- [6] Ma YY, Jiang GZ, Jiang ZY, et al. An *Escherichia coli* strain producing high yield of L-aspartase and its application: China, 201110382584[P]. 2012-07-11 (in Chinese)
马玉岳, 姜国政, 姜增妍, 等. 高产 L-天冬氨酸酶的大肠杆

菌及其应用: 中国, 201110382584[P]. 2012-07-11

- [7] Nan N, Cao F, Shen JT, et al. Characterization of a bacteriophage of *Klebsiella pneumoniae* producing 1,3-propanediol[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(9): 943-949 (in Chinese)
南南, 曹放, 沈俊涛, 等. 一株产 1,3-丙二醇的克雷伯氏菌的噬菌体生物学特性[J]. 微生物学报, 2013, 53(9): 943-949
- [8] Jiang YH, Li FL, Wang LZ, et al. Isolation, identification and biological properties of a lytic phage against *Salmonella*[J]. Microbiology China, 2015, 42(3): 534-542 (in Chinese)
江艳华, 李凤铃, 王联珠, 等. 一株沙门氏菌裂解性噬菌体的分离鉴定及生物学特性[J]. 微生物学通报, 2015, 42(3): 534-542
- [9] Bertani G. Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(3): 595-600
- [10] Yu ZC. Study of the adaptation mechanism of marine *Pseudomonas* to sea ice environment and construction of their genetic manipulation system[D]. Ji'nan: Doctoral Dissertation of Shandong University, 2014 (in Chinese)
于子超. 海洋假交替单胞菌适应海冰环境的机制及其遗传操作体系的建立[D]. 济南: 山东大学博士学位论文, 2014
- [11] Lu Z, Breidt F Jr, Fleming HP, et al. Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, ØJL-1, from a cucumber fermentation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 84(2): 225-235
- [12] Leuschner RGK, Arendt EK, Hammes WP. Characterization of a virulent *Lactobacillus sake* phage PWH2[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1993, 39(4/5): 617-621
- [13] Pajunen M, Kiljunen S, Skurnik M. Bacteriophage ϕ YeO3-12, specific for *Yersinia enterocolitica* serotype O:3, is related to coliphages T3 and T7[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(18): 5114-5120
- [14] Sun WJ, Liu CF, Yu L, et al. A novel bacteriophage KSL-1 of 2-Keto-gluconic acid producer *Pseudomonas fluorescens* K1005: isolation, characterization and its remedial action[J]. BMC Microbiology, 2012, 12: 127
- [15] Feng SZ, Liu J, Sun Y. An introduction to the bacterial viruses in 8th report of ICTV[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2007, 27(4): 604-608 (in Chinese)
冯书章, 刘军, 孙洋. 细菌的病毒——噬菌体最新分类与命

- 名[J]. 中国兽医学报, 2007, 27(4): 604-608
- [16] Hu YF, Li TM, Yang ZY, et al. Phage resistance of *Corynebacterium crenatum* conferred by the restriction and modification system *cgII*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2008, 24(5): 760-765 (in Chinese)
胡永飞, 李铁民, 杨智勇, 等. 限制修饰系统 *cgII* 赋予钝齿棒杆菌抗噬菌体功能活性[J]. 生物工程学报, 2008, 24(5): 760-765
- [17] Zhou HY, Liu L, Du GC, et al. Screening of bacteriophage-resistant strain for L-phenylalanine production[J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 39(7): 88-93 (in Chinese)
周海岩, 刘龙, 堵国成, 等. L-苯丙氨酸抗噬菌体生产菌的选育和应用[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(7): 88-93
- [18] Breitbart M, Rohwer F. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus?[J]. Trends in Microbiology, 2005, 13(6): 278-284
- [19] Guglielmotti DM, Binetti AG, Reinheimer JA, et al. *Streptococcus thermophilus* phage monitoring in a cheese factory: phage characteristics and starter sensitivity[J]. International Dairy Journal, 2009, 19(8): 476-480
- [20] Stummeyer K, Schwarzer D, Claus H, et al. Evolution of bacteriophages infecting encapsulated bacteria: lessons from *Escherichia coli* K1-specific phages[J]. Molecular Microbiology, 2006, 60(5): 1123-1135
- [21] Lu MJ, Stierhof YD, Henning U. Location and unusual membrane topology of the immunity protein of the *Escherichia coli* phage T4[J]. Journal of Virology, 1993, 67(8): 4905-4913
- [22] Anton BP, Raleigh EA. Transposon-mediated linker insertion scanning mutagenesis of the *Escherichia coli* McrA endonuclease[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(17): 5699-5707
- [23] Meineke B, Shuman S. Determinants of the cytotoxicity of PrrC anticodon nuclease and its amelioration by tRNA repair[J]. RNA, 2012, 18(1): 145-154
- [24] Hazan R, Engelberg-Kulka H. *Escherichia coli* *mazEF*-mediated cell death as a defense mechanism that inhibits the spread of phage P1[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2004, 272(2): 227-234

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、显微世界、专栏、书讯、会议等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.1 参考文献

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过3人时全部列出, 多于3人时列出前3人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

- [1] Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroyacids as monitored by immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 1991, 12(5): 376-377
- [2] Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. Microbiology China, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)
王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(1): 6-17
- [3] Shen T, Wang JY. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)
沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)
刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

3.2 脚注(正文首页下方)

Foundation item:

*Corresponding author: Tel: ; Fax: ; E-mail:

Received: January 01, 20xx; Accepted: March 01, 20xx; Published online (www.cnki.net): March 31, 20xx

基金项目: 基金项目(No.)

*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-00-00; 接受日期: 20xx-00-00; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 20xx-00-00

(下转 p.1531)