



## 研究报告

## 一株福氏志贺氏菌噬菌体的分离鉴定及其生物学特性

何秀<sup>1,2</sup> 邓征宇<sup>1,2</sup> 王峰<sup>1,2</sup> 张麒麟<sup>1,2</sup> 林连兵<sup>\*1,2</sup> 邓先余<sup>\*1,2</sup>

1 昆明理工大学生命科学与技术学院 云南 昆明 650500

2 云南省高校饲用抗生素替代技术工程研究中心 云南 昆明 650500

**摘要:**【背景】志贺氏菌是一类能引起人和动物腹泻的致病菌,由于抗生素滥用导致其耐药问题日益严重,寻找新的抗菌药物和治疗方法成为目前亟待解决的问题。【目的】检测志贺氏菌对肉鸡的致病性,分离纯化出一株可裂解强致病性志贺氏菌的噬菌体,并对其生物学特性进行研究。【方法】从病鸡肠道黏膜分离志贺氏菌;以健康肉鸡为动物模型进行攻毒,测定强致病性菌株的耐药性;并以此为主菌分离噬菌体,聚乙二醇(Polyethylene Glycol, PEG)沉淀法纯化浓缩噬菌体后,用透射电子显微镜观察其形态特征。利用双层平板法测定噬菌体的宿主谱、最佳感染复数、一步生长曲线、pH和热稳定性对噬菌体活性的影响。【结果】分离得到26株志贺氏菌,分别命名为BDS1–BDS26,其中BDS8致病性最强,经鉴定属于福氏志贺氏菌,而且存在多重耐药性,灌喂后的肉鸡出现严重腹泻和血便;解剖病症主要表现为心脏肥大、肠系膜出血明显等。以BDS8为主菌,分离得到噬菌体ΦDS8。透射电镜结果显示噬菌体ΦDS8的头部呈二十面体形状,直径 $61\pm 2$  nm,尾长 $165\pm 2$  nm,属长尾噬菌体科。噬菌体ΦDS8在pH 4.0–10.0、50 °C以下范围内能保持较高活性,感染周期约为120 min,其中包括75 min的潜伏期和45 min的暴发期,暴发量为52 PFU/cell。【结论】噬菌体ΦDS8具有宿主特异性,在常规环境下具有较好的耐受能力,为噬菌体治疗福氏志贺氏菌病提供理论依据。

**关键词:** 福氏志贺氏菌, 噬菌体, 分离鉴定, 生物学特性

Isolation and biological characterization of a bacteriophage infecting *Shigella flexneri*HE Xiu<sup>1,2</sup> DENG Zhengyu<sup>1,2</sup> WANG Feng<sup>1,2</sup> ZHANG Qilin<sup>1,2</sup> LIN Lianbing<sup>\*1,2</sup> DENG Xianyu<sup>\*1,2</sup>

1 Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650500, China

2 Engineering Research Center for Replacement Technology of Feed Antibiotics of Yunnan College, Kunming, Yunnan 650500, China

**Abstract:** [Background] *Shigella* is a class of pathogenic bacteria that can cause diarrhea in humans and animals. As the problem of drug resistance is becoming more and more serious due to the abuse of antibiotics, alternative antimicrobial agents and treatment methods have become an urgent need.

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (31760042)

**\*Corresponding authors:** E-mail: LIN Lianbing: linlb@kmust.edu.cn; DENG Xianyu: dengxy1008@126.com

**Received:** 23-12-2020; **Accepted:** 02-02-2021; **Published online:** 23-03-2021

**基金项目:** 国家自然科学基金(31760042)

**\*通信作者:** E-mail: 林连兵: linlb@kmust.edu.cn; 邓先余: dengxy1008@126.com

**收稿日期:** 2020-12-23; **接受日期:** 2021-02-02; **网络首发日期:** 2021-03-23

**[Objective]** To detect the pathogenicity of *Shigella* to broiler chickens, isolate and purify a bacteriophage (phage) that can lyse the strongly pathogenic *Shigella*, and study its biological characteristics. **[Methods]** *Shigella* was isolated from intestinal mucosa of diseased chickens. Healthy broiler chickens were used as animal models to test the drug resistance of highly pathogenic strains. The phage was isolated by using the host bacterium, and concentrated phage was purified by polyethylene glycol (PEG) precipitation. The morphological characteristics of the phage were observed by transmission electron microscopy (TEM). The double-layer plate method was used to determine the host spectrum, multiplicity of infection, one-step growth curve, pH, and thermal stability of the phage. **[Results]** This study has isolated 26 *Shigella* species, designated BDS1–BDS26. Among, BDS8 was the most pathogenic with multiple drug resistance and was identified as *Shigella flexneri*. Severe diarrhea and bloody stools were observed in the broiler chickens after feeding BDS8. Anatomical symptoms were mainly manifested as cardiac hypertrophy and obvious mesenteric haemorrhage, etc. Furthermore, the phage  $\Phi$ DS8 was isolated from BDS8. TEM results showed that the head of  $\Phi$ DS8 was icosahedral, with a diameter of  $61 \pm 2$  nm and a tail length of  $165 \pm 2$  nm.  $\Phi$ DS8 belongs to the family of Siphoviridae.  $\Phi$ DS8 could maintain high activity in the range of pH 4.0–10.0 and below 50 °C. The infection cycle of  $\Phi$ DS8 was about 120 min, including an incubation period of 75 min and an outbreak period of 45 min. The outbreak volume was 52 PFU/cell. **[Conclusion]** The phage  $\Phi$ DS8 has host specificity and a better tolerance to general environments. This study provides a theoretical basis for phage therapy of shigellosis flexneri.

**Keywords:** *Shigella flexneri*, bacteriophage, isolation and identification, biological characterization

志贺氏菌(*Shigella*)是一类能引起人和动物腹泻的革兰氏阴性杆菌,广泛分布于奶制品、鸡肉、水果和面包等食物中,是常见的食源性致病菌<sup>[1]</sup>,世界卫生组织已将其列入重点病原菌行列<sup>[2]</sup>。志贺氏菌引起的疾病多发于发展中国家,每年出现约 2.5 亿病例<sup>[3]</sup>,其中福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)致病率最高<sup>[4]</sup>,也是我国的主要流行菌株<sup>[5-6]</sup>。目前,治疗志贺氏菌病最常用的药物为氟喹诺酮类抗生素,因不合理的使用,导致志贺氏菌对氟喹诺酮类药物的耐药性逐渐上升<sup>[7]</sup>,也加剧了志贺氏菌耐药菌株的出现及高频率的耐药性突变<sup>[8]</sup>。研究表明,大多数志贺氏菌都出现了明显的耐药性,Ahmed 等<sup>[9]</sup>对食物样本中分离出的志贺氏菌进行耐药性检测,发现 89% 的菌株具有多重耐药性;代永联等<sup>[10]</sup>研究表明从病鸡中分离的宋内氏志贺氏菌 LB2-1 对氨苄西林、复方新诺明和链霉素等抗生素产生了耐药性。目前,耐药性志贺氏菌威胁着人类的公共健康,其治疗手段仍然有限。

噬菌体(Bacteriophage, Phage)作为细菌病毒,利用宿主菌自我复制产生大量子代噬菌体从中裂

解细菌而达到杀灭效果,其裂解能力不受细菌耐药性及生存环境的影响<sup>[11]</sup>,也不会对正常菌群及周围环境造成破坏。无论是单独使用或是与抗生素联用,在体外实验中都卓有成效<sup>[12]</sup>。D'Herelle<sup>[13]</sup>首次用噬菌体治愈了细菌性痢疾患者,噬菌体治疗逐渐成为了研究热点。相比于抗生素治疗,噬菌体具有显著优势,例如路建彪等<sup>[14]</sup>分离的噬菌体 Bp1805 能裂解致病性大肠杆菌,作用效果优于恩诺沙星和硫酸庆大霉素等抗生素;张辉等<sup>[15]</sup>分离的噬菌体 SF-A2 能够有效防控福氏志贺氏菌在食品中的污染。此外,噬菌体在禽畜疾病的预防和治疗中也具有显著效果,Cha 等<sup>[16]</sup>用噬菌体 CJ12 治疗感染肠毒性大肠杆菌(Enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC)的猪后发现,粪便中的 ETEC 数量减少了约 60%;Lau 等<sup>[17]</sup>用噬菌体 EC1 治疗感染大肠杆菌的肉鸡,死亡率从 83.3%下降至 13.3%;袁玉玉<sup>[18]</sup>用噬菌体 YSP2 治疗鸡白痢病,治愈率高达 80%。可见,噬菌体在替代抗生素治疗细菌性疾病方面具有显著效果和广阔的应用前景。

因抗生素的滥用,导致耐药菌株不断出现,

药物的可用范围也逐渐缩小<sup>[19]</sup>, 寻找新的抗菌药物和治疗方案成为亟待解决的问题。本研究从病鸡肠道黏膜分离出 26 株志贺氏菌, 以肉鸡为动物模型进行致病性检测, 对其中致病性最强的菌株(BDS8)进行耐药性测定; 为志贺氏菌在畜牧行业的防控提供指导建议。以志贺氏菌 BDS8 为宿主从健康的鸡粪便中分离噬菌体, 对其生物学特性进行研究, 以期为耐药性志贺氏菌的噬菌体治疗提供理论依据, 也为研究噬菌体替代抗生素治疗的应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

分离志贺氏菌选用的病鸡和实验动物模型的 130 只 30 日龄的健康肉鸡, 源自广西壮族自治区南宁市某鸡场。大肠杆菌 CMCC(B)44102、沙门氏菌 CMCC(B)50094、肠炎沙门氏菌 CMCC(B)50335、肠炎沙门氏菌亚种 ATCC14028、猪霍乱沙门氏菌 ATCC13312、金黄色葡萄球菌 ATCC6538、大肠杆菌 K88 和大肠杆菌 K99 均为昆明理工大学生命科学与技术学院噬菌体与肠道微生物课题组保藏菌种。

### 1.2 主要试剂和仪器

细菌基因组提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 志贺氏菌选择琼脂培养基(SS 培养基), 广东环凯微生物科技有限公司; 16 种抗生素药敏纸片(氨苄西林、头孢噻肟、头孢曲松、头孢他啶、氨曲南、庆大霉素、阿米卡星、链霉素、四环素、环丙沙星、磺胺甲恶唑、氯霉素、阿莫西林、复方磺胺甲恶唑、萘啶酸、复方新诺明), 比克曼生物科技有限公司; 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜, 天津市津腾实验设备有限公司; DNase I、RNase I, 上海翊圣生物科技有限公司; PEG8000, BioFroxx 公司。电热恒温培养箱、恒温摇床, 上海一恒科学仪器有限公司; 冷冻高速离心机, Heruse 公司; 透射电子显微镜, 上海铸金分析仪器有限公司。

### 1.3 培养基及溶液配制

LB 液体培养基参考文献[20], 固体培养基加 1.5%的琼脂; 半固体培养基加 0.7%的琼脂。

PBS 缓冲液: 称取磷酸二氢钠 31.2 g, 定容至 1 L, 为 A 液; 称取磷酸氢二钠 71.63 g, 定容至 1 L, 为 B 液; 取 A 液 28 mL 和 B 液 72 mL, 稀释 1 倍后用盐酸调至 pH 为 7.4。

SM 缓冲液: 氯化钠 5.8 g, 硫酸镁 2.0 g, 1 mol/L Tris-HCl (pH 7.5) 50 mL, 2%明胶 5 mL, 加蒸馏水至 1 L,  $1.0 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min, 4 °C 条件下保存备用。

### 1.4 志贺氏菌的分离鉴定

刮取病鸡肠道黏膜物溶于无菌水中漩涡振荡, 静置 1 h, 取上清液涂布于 SS 固体培养基上, 倒置于 37 °C 恒温培养箱中培养过夜。次日, 挑取不同大小及形态的单菌落分别接种于 LB 液体培养基中, 37 °C、150 r/min 振荡培养 24 h, 蘸取菌液于 LB 固体培养基上划线, 在 37 °C 恒温培养箱中培养。重复上述步骤 3-5 次得到纯化的细菌。

将纯化后的细菌培养至对数期  $OD_{600}$  约为 0.8 后, 用细菌基因组提取试剂盒提取细菌的 DNA。使用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGG CTCAG-3')和 1492R (5'-GGYTAC-CTTGTTACGA CTT-3')对分离株进行 16S rRNA 基因扩增。PCR 反应体系(20  $\mu\text{L}$ ):  $2 \times \text{Taq}$  Master Mix 缓冲液 10  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 1  $\mu\text{L}$ ,  $\text{ddH}_2\text{O}$  7  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 94 °C 1 min; 94 °C 50 s, 56 °C 45 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 保存<sup>[21]</sup>。取 PCR 产物 5  $\mu\text{L}$ , 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。将检测后 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测定基因序列, 测序结果在 GenBank 中进行 BLAST 比对分析。

### 1.5 志贺氏菌致病性测定

选 30 日龄的肉鸡, 每组各 5 只, 实验前 1 天断水断料处理。将志贺氏菌分离株均培养至约

$1 \times 10^8$  CFU/mL, 对每只肉鸡分别灌喂 1 mL 后正常饲养, 24 h 内跟踪观察其发病情况。在灌喂后 7 d 和 15 d 时, 将染病最严重的肉鸡进行解剖并观察其病理特征。

### 1.6 志贺氏菌耐药性测定

将致病性最强的菌株接种于 LB 液体培养基中,  $37^\circ\text{C}$ , 150 r/min 培养至对数期( $OD_{600}$  约为 0.8)。取细菌培养液 100  $\mu\text{L}$  与 5 mL 的 LB 半固体培养基混匀倒入 LB 平板上, 夹取药敏纸片贴于培养基表面, 于  $37^\circ\text{C}$  恒温培养箱中培养 24 h, 观察药敏纸片周围有无抑菌圈, 并测量抑菌圈直径( $d$ )大小。按照美国临床实验室标准化研究所(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)的标准判定为敏感(S)、中敏(I)或耐药(R)<sup>[22]</sup>。

### 1.7 噬菌体的分离纯化

以福氏志贺氏菌 BDS8 为宿主, 在 300 mL LB 液体培养基中加入 50 g 健康的肉鸡粪便和 10 mL 宿主菌悬液,  $37^\circ\text{C}$ 、150 r/min 振荡培养 48 h。培养液经  $4^\circ\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 10 min, 用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤上清后得到噬菌体液, 用蒸馏水梯度稀释至  $10^{-6}$  后, 取  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  的噬菌体液 100  $\mu\text{L}$  与同体积的宿主菌铺双层平板, 于  $37^\circ\text{C}$  培养至长出透亮的单个噬菌斑。挑取噬菌斑接种于培养至对数期的宿主菌液中增殖噬菌体。将噬菌体培养液再次离心, 按上述步骤重复 3–5 次得到纯化的噬菌体。

### 1.8 噬菌体形态观察

#### 1.8.1 噬菌体的浓缩

将培养好的噬菌体液于  $4^\circ\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液加入 DNase I 和 RNase I 至终浓度为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 于  $37^\circ\text{C}$  恒温培养箱中温育 3 h 后, 加入 NaCl 至终浓度为 1 mol/L, 快速搅拌溶解后冰浴 2 h。经  $4^\circ\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 10 min 取上清, 加入 10% 的 PEG8000 搅拌溶解, 冰浴 12 h, 相同条件下离心 10 min, 弃上清。将噬菌体沉淀重悬于 SM 缓冲液中, 继续浸泡 1 h。然后

加入 SM 等体积的氯仿溶液抽提悬液中的 PEG 和细胞碎片, 振荡 30 s, 于  $4^\circ\text{C}$ 、4 000 r/min 离心 15 min, 分离有机相和亲水相, 收集亲水相, 用双层平板法测定浓缩噬菌体液的效价。

#### 1.8.2 透射电镜观察

取 20  $\mu\text{L}$  噬菌体浓缩液滴加到复膜铜网上, 室温下自然沉淀 15 min。待样品未完全干燥时, 滴加 2% 磷钨酸染色 2 min, 用滤纸吸取多余的染液, 室温放置 2 min 后用透射电子显微镜观察。

### 1.9 噬菌体的生物学特性研究

#### 1.9.1 宿主谱筛选

用 34 株细菌(26 株志贺氏菌分离株 BSD1–BDS26 与其余 8 株标准菌株)进行宿主谱测定。受试菌于  $37^\circ\text{C}$ 、150 r/min 培养过夜, 取 100  $\mu\text{L}$  受试菌铺双层平板, 随后将 5  $\mu\text{L}$  噬菌体浓缩液滴于双层平板上; 待噬菌体浓缩液被吸收后, 倒置于  $37^\circ\text{C}$  恒温箱中培养, 观察噬菌体对受试菌株的裂解情况, 每个受试菌做 3 个平行。

#### 1.9.2 最佳感染复数(Multiplicity of Infection, MOI)

将宿主菌培养至  $1 \times 10^8$  CFU/mL。按照感染复数 100、10、1、0.1、0.01、0.001 的比例, 加入噬菌体液和宿主菌, 于  $37^\circ\text{C}$ 、150 r/min 振荡培养 4 h 后 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 测定噬菌体效价。每组重复 3 次, 计算平均值。

#### 1.9.3 一步生长曲线

将宿主菌接种于 LB 液体培养基中, 在  $37^\circ\text{C}$ 、150 r/min 振荡培养至  $1 \times 10^8$  CFU/mL。按最佳的感染复数比例加入噬菌体,  $37^\circ\text{C}$  吸附 15 min 后于 12 000 r/min 离心 1 min 弃上清, 用 LB 液体培养基洗涤 2 次, 去除未被吸附的噬菌体颗粒。沉淀中加入 30 mL 的 LB 液体培养基, 迅速置于  $37^\circ\text{C}$ 、150 r/min 振荡培养, 同时开始计时, 从 0 时刻开始取样, 每 15 min 一次, 用双层平板法测定每个时间点的噬菌体效价。每组重复 3 次, 取平均值。

1.9.4 pH 和热稳定性

取噬菌体液( $10^8$  PFU/mL)按 1:9 的体积比分别加入到不同 pH (2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0、13.0)的 SM 缓冲液中, 37 °C 孵育 2 h 后, 用双层平板法测定效价。对于热稳定性, 取 1 mL 噬菌体液( $1\times 10^8$  PFU/mL)在不同温度(4、20、30、40、50、60、70、80 °C)下处理 30 min 后, 用双层平板法测定其效价。每组均重复 3 次, 取平均值。

2 结果与分析

2.1 志贺氏菌的分离鉴定

在 GenBank 数据库中利用 BLAST 对细菌的 16S rRNA 基因序列进行相似性比对, 结果如表 1 所示, BDS1–BDS8、BDS12–BDS26 为福氏志贺氏菌, BDS9 和 BDS10 为宋内氏志贺氏菌, BDS11 为鲍迪氏志贺氏菌; 其中福氏志贺氏菌的占比高达 88%。将分离到的 26 株志贺氏菌分别命名为 BDS1–BDS26。

2.2 志贺氏菌的致病性测定

26 株志贺氏菌的致病性评估如表 2 所示。结果显示, 灌喂 BDS8 后的肉鸡 2 h 出现腹泻, 12 h 有排便便, 24 h 未见好转(图 1)。灌喂其他志贺氏菌分离株的肉鸡, 24 h 内只出现轻微腹泻或不出现腹泻。感染 BDS8 菌株的肉鸡 6 h 后主要表现为精神萎靡、进食量少、缩头闭眼等症状(图 2A)。解剖后与未感染致病菌的肉鸡相比, 被 BDS8 感染 7 d 的肉鸡, 心脏肥大且不光泽; 感染 15 d 的肉

鸡体内有大量的黄色结节、心脏更加肥大且被黄色心包膜包被(图 2B)、肠系膜出血明显(图 2C), 表明福氏志贺氏菌 BDS8 对肉鸡具有较强的致病性。

2.3 志贺氏菌耐药性测定

如表 3 所示, 氨苄西林、头孢噻肟、头孢曲松、头孢他啶、氨基曲南、环丙沙星、阿莫西林、萘啶酸抑制福氏志贺氏菌 BDS8 的直径大于 18 mm; 庆大霉素、阿米卡星、链霉素、四环素、氯霉素抑制福氏志贺氏菌 BDS8 的直径为 7–13 mm; 磺胺甲恶唑、复方磺胺甲恶唑和复方新诺明对福氏志贺氏菌 BDS8 没有抑菌作用。以上结果证实了福氏志贺氏菌 BDS8 具有多重耐药性。

2.4 噬菌体的形态特征

噬菌体负染样品通过透射电镜照片显示噬菌体  $\Phi$ DS8 的头部是二十面体形状, 直径为  $61\pm 2$  nm, 有一条长尾为  $165\pm 2$  nm (图 3)。根据噬菌体最新分类与命名<sup>[23]</sup>, 属于长尾噬菌体科。

2.5 噬菌体的生物学特性分析

2.5.1 噬菌体  $\Phi$ DS8 宿主谱筛选

如表 4 所示, 在被检测的 34 株细菌中, 噬菌体  $\Phi$ DS8 对福氏志贺氏菌 BDS3、BDS8、BDS13、BDS21、BDS26 有裂解作用, 均出现清晰透明的噬菌斑; 而对宋内氏志贺氏菌、鲍迪氏志贺氏菌以及其他属大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌等均无裂解作用。表明噬菌体  $\Phi$ DS8 对福氏志贺氏菌具有宿主特异性。

表 1 26 株志贺氏菌分离株鉴定  
Table 1 Identification of 26 *Shigella* isolates

菌株 Strains	分子鉴定 Molecular identification	相似性 Similarity (%)	GenBank 登录号 GenBank accession No.
BDS1–BDS8, BDS12–BDS26	福氏志贺氏菌 <i>Shigella flexneri</i>	99	NR026331
BDS9, BDS10	宋内氏志贺氏菌 <i>Shigella sonnei</i>	99	NR104826
BDS11	鲍迪氏志贺氏菌 <i>Shigella boydii</i>	99	NR104901

表 2 志贺氏菌分离株致病性评估

Table 2 Pathogenicity evaluation of *Shigella* isolates

菌株 Strains	致病性 Pathogenicity	菌株 Strains	致病性 Pathogenicity
BDS1	++	BDS14	++
BDS2	++	BDS15	++
BDS3	++	BDS16	++
BDS4	++	BDS17	+
BDS5	++	BDS18	++
BDS6	++	BDS19	++
BDS7	++	BDS20	++
BDS8	+++	BDS21	++
BDS9	++	BDS22	+
BDS10	++	BDS23	++
BDS11	++	BDS24	++
BDS12	++	BDS25	++
BDS13	+	BDS26	++

注: +++: 肉鸡出现严重腹泻, 精神萎靡, 排便便, 在 24 h 内不会自愈; ++: 肉鸡出现轻微腹泻, 在 24 h 内会基本自愈; +: 肉鸡基本不出现腹泻症状

Note: +++: Broiler chickens presented severe diarrhea, apathetic, bloody stools, and did not self-healing within 24 h; ++: Broiler chickens presented mild diarrhea and could self-healing within 24 h; +: Broiler chickens presented almost no diarrheal symptoms

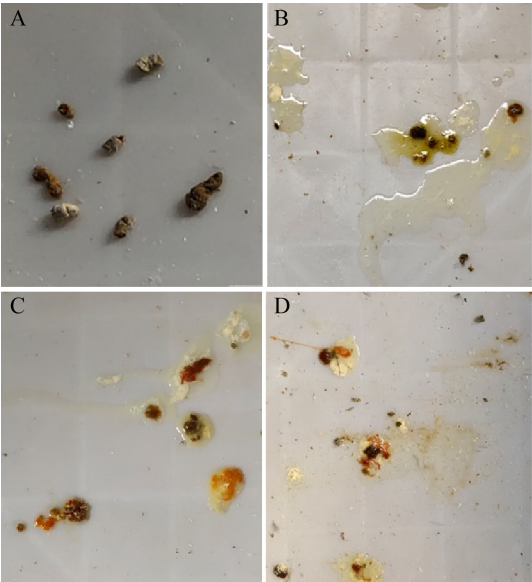


图 1 感染福氏志贺氏菌 BDS8 的肉鸡粪便图

Figure 1 Feces of broiler chickens infected with *Shigella flexneri* BDS8

注: A: 感染前; B: 感染 2 h; C: 感染 12 h; D: 感染 24 h  
Note: A: Before infection; B: Infection for 2 h; C: Infection for 12 h; D: Infection for 24 h

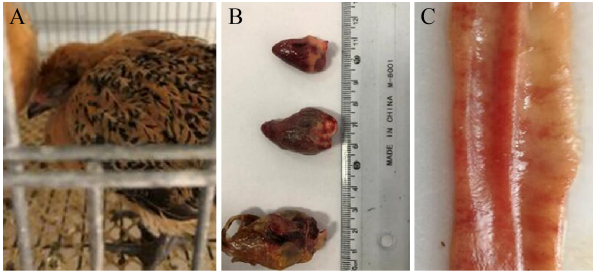


图 2 感染福氏志贺氏菌 BDS8 的肉鸡精神状态及病理特征图

Figure 2 Diagram of mental state and pathological features of broiler chickens infected with *Shigella flexneri* BDS8

注: A: 感染 6 h 后肉鸡精神状态图; B: 感染后肉鸡心脏变化图(0、7、15 d); C: 感染 15 d 后肉鸡肠道解剖图

Note: A: Mental state of broiler chickens after 6 hours of infection; B: Heart changes of broiler chickens after infection (0, 7, 15 d); C: Intestinal anatomy of broiler chickens after 15 d of infection

表 3 福氏志贺氏菌 BDS8 耐药性试验

Table 3 Drug resistance test of *Shigella flexneri* BDS8

抗生素名称 Antibiotic name	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (mm)	敏感性 Sensitivity
氨苄西林 Ampicillin	20	S
头孢噻肟 Cefepime	31	S
头孢曲松 Ceftriaxone	29	S
头孢他啶 Ceftazidime	26	S
氨曲南 Aztreonam	25	S
庆大霉素 Gentamicin	7	I
阿米卡星 Amikacin	13	I
链霉素 Streptomycin	12	I
四环素 Tetracyclines	9	I
环丙沙星 Ciprofloxacin	24	S
磺胺甲恶唑 Sulfamethoxazole	0	R
氯霉素 Chloroamphenicol	8	I
阿莫西林 Amoxicillin	19	S
复方磺胺甲恶唑	0	R
Compound sulfamethoxazole		
萘啶酸 Nalidixic acid	18	S
复方新诺明 Cotrimoxazole	0	R

注: S: 敏感; I: 中敏; R: 耐药

Note: S: Sensitive; I: Intermediary; R: Resistant

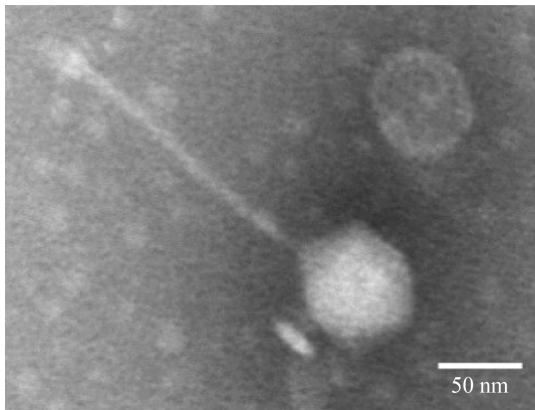


图 3 噬菌体 ΦDS8 透射电镜照片  
Figure 3 TEM of phage ΦDS8

表 4 噬菌体 ΦDS8 的宿主谱测定结果  
Table 4 Host spectrum determination of phage ΦDS8

细菌编号 Strain No.	待测细菌 Bacteria	结果 Results
BDS1–BDS2, BDS4–BDS7, BDS12, BDS14–BDS20, BDS22–BDS25	福氏志贺氏菌分离株 <i>Shigella flexneri</i>	–
BDS3, BDS8, BDS13, BDS21, BDS26	福氏志贺氏菌分离株 <i>Shigella flexneri</i>	+
BDS9, BDS10	宋内氏志贺氏菌分离株 <i>Shigella sonnei</i>	–
BDS11	鲍迪氏志贺氏菌分离株 <i>Shigella boydii</i>	–
CMCC(B)44102	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	–
CMCC(B)50094	沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	–
CMCC(B)50335	肠炎沙门氏菌 <i>Salmonella Enteritidis</i>	–
ATCC14028	肠炎沙门氏菌亚种 <i>Salmonella enterica serovar Enteritidis</i>	–
ATCC13312	霍乱沙门氏菌 <i>Salmonella Cholerae</i>	–
ATCC6538	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	–
K88, K99	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	–

注: +: 裂解; –: 不裂解  
Note: +: Cleavage; –: No cleavage

2.5.2 最佳感染复数

如表 5 所示, 当感染复数为 0.1 时, 噬菌体效价达到最高值  $2.8 \times 10^9$  PFU/mL, 即 0.1 为噬菌体 ΦDS8 的最佳感染复数。

表 5 噬菌体 ΦDS8 最佳感染复数  
Table 5 The optimal multiplicity of infection (MOI) of phage ΦDS8

编号 No.	噬菌体数 Numbers of phages (PFU/mL)	细菌数 Numbers of bacteria (CFU/mL)	感染复数 MOI	噬菌体效价 Phage titers (PFU/mL)
1	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^8$	0.001	$2.4 \times 10^7$
2	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^8$	0.01	$5.2 \times 10^8$
3	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^8$	0.1	$2.8 \times 10^9$
4	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^8$	1	$1.3 \times 10^9$
5	$1 \times 10^9$	$1 \times 10^8$	10	$8.2 \times 10^8$
6	$1 \times 10^{10}$	$1 \times 10^8$	100	$3.4 \times 10^8$

2.5.3 一步生长曲线的测定

由图 4 可知, 噬菌体 ΦDS8 的感染周期约为 120 min, 包括 75 min 的潜伏期和 45 min 的暴发期。暴发量为整个过程中单个被裂解的宿主菌平均释放的子代噬菌体数量<sup>[24]</sup>, 每个感染细胞的暴发量为 52 PFU/cell, 之后噬菌体进入稳定期。

2.5.4 pH 和热稳定性测定

当 pH 为 3.0 时, 噬菌体 ΦDS8 的效价相较于 pH 为 6.0 时降低了 48%; 当 pH 为 2.0 和 12.0 时, 噬菌体基本失活(图 5A), 表明噬菌体 ΦDS8 的最适 pH 为 4.0–10.0。噬菌体 ΦDS8 在 50 °C 以下的温度范围内效价维持在 80% 以上, 约为  $10^8$  PFU/mL; 70 °C 下孵育 1 h 噬菌体的存活率较 40 °C 时下降了 60%, 80 °C 下孵育 1 h 的噬菌体失活(图 5B), 表明噬菌体 ΦDS8 在常规温度下具有较好的耐受能力。

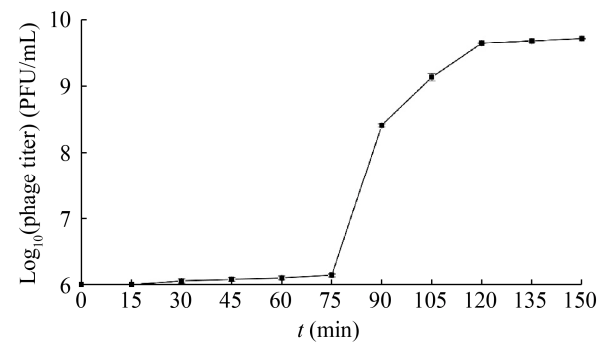


图 4 噬菌体 ΦDS8 的一步生长曲线  
Figure 4 One step growth curve of phage ΦDS8

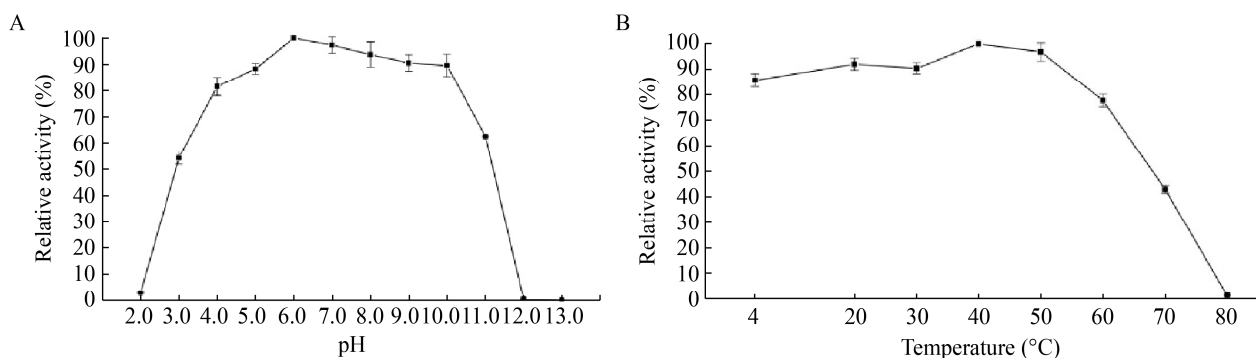


图5 噬菌体  $\Phi$ DS8 的 pH 和热稳定性

Figure 5 pH and thermal stability of phage  $\Phi$ DS8

注: 将 pH 为 6.0 和温度为 40 °C 时的噬菌体效价定为 100%

Note: The phage titer at pH 6.0 and temperature 40 °C was set as 100%

### 3 讨论与结论

志贺氏菌病是一种人畜共患病,可引起严重的肠道炎症反应<sup>[25]</sup>。鸡志贺氏菌病是以鸡腹泻症状为主的传染病。本研究从病鸡肠道中分离得到 26 株志贺氏菌,以 30 日龄的肉鸡为动物模型进行致病性测定;发现灌喂福氏志贺氏菌 BDS8 的肉鸡出现严重腹泻及血便,剖检病变特征为心脏肥大、肠系膜出血明显等,这与许兰菊等<sup>[26]</sup>首次报道的志贺氏菌感染雏鸡后的主要症状相似,表明福氏志贺氏菌 BDS8 具有较强的致病性。在治疗细菌性疾病中,药敏试验具有重要的指导意义,研究结果显示,福氏志贺氏菌 BDS8 对磺胺甲恶唑、复方磺胺甲恶唑和复方新诺明具有耐药性。在此之前,王润锦等<sup>[27]</sup>从藏鸡中分离的福氏志贺氏菌已经对普通青霉素类、四环素类和氨基糖苷类等产生了强耐药性,这可能是因为福氏志贺氏菌的耐药性随着抗生素的滥用逐渐增强。由此可见,耐药菌株若在养殖业中快速传播,不仅会对生物个体产生严重的危害,还会给养殖户造成巨大的经济损失。本研究结果不仅证实了福氏志贺氏菌 BDS8 对肉鸡具有强致病性作用,还分析了其耐药范围,为防控福氏志贺氏菌提供参考价值。

噬菌体作为代替抗生素治疗的抗菌药物,不

仅杀菌能力强,而且开发成本低廉。本研究从鸡粪便中分离到一株福氏志贺氏菌噬菌体  $\Phi$ DS8,经鉴定属于长尾噬菌体。纯化浓缩后得到高效价纯化的噬菌体液( $4 \times 10^{10}$  PFU/mL),高于噬菌体 vB\_KpnP\_IME308 ( $10^9$  PFU/mL)<sup>[28]</sup>和噬菌体 vB\_SauS\_SAP3 ( $10^7$  PFU/mL)<sup>[29]</sup>浓缩后的效价,表明该噬菌体浓缩后具有更高的裂解效果。噬菌体  $\Phi$ DS8 的暴发时间为 45 min,暴发量为 52 PFU/cell,相比于噬菌体 LP31 (暴发时间 90 min,暴发量为 23 PFU/cell)和 SP55 (暴发时间 80 min,暴发量 40 PFU/cell),具有暴发时间短和暴发量高的优势<sup>[30]</sup>。噬菌体  $\Phi$ DS8 具有宿主特异性,对福氏志贺氏菌 BDS8 具有较强的裂解作用,但不能裂解其他种属的细菌;这与张志宏等<sup>[31]</sup>的研究结果一致,均对宿主菌有较高的裂解效率,由此证实了噬菌体的高效特异性和高度专一性。但这种高度专一性在高效、靶向性地杀灭致病菌的同时也会造成噬菌体宿主谱狭窄和应用范围受限,而噬菌体鸡尾酒疗法能有效解决这一问题<sup>[32]</sup>。Ganaie 等研究表明鸡尾酒治疗不仅扩大了宿主的裂解范围,对病原菌的抑制作用也显著提高<sup>[33-34]</sup>。在今后的研究中,我们将继续分离不同类别的志贺氏菌噬菌体,并利用噬菌体鸡尾酒疗法来扩大志贺氏菌的裂解范围。同时,针对不同地方及不同个

体的志贺氏菌流行菌株进行研究, 以达到最佳的应用效果<sup>[35-36]</sup>。

噬菌体耐受能力影响其应用范围。噬菌体 ΦDS8 在 pH 4.0–10.0、50 °C 以下范围内保持较高的活性, 较谭筱醴等<sup>[37]</sup>报道的噬菌体 φRSm2C (pH 6.0–9.0) 有更广的酸碱活性范围; 噬菌体 ΦDS8 在 80 °C 孵育 1 h 后失活, 相比噬菌体 YNP1<sup>[38]</sup> (60 °C 失活) 对温度的耐受能力更强。说明噬菌体 ΦDS8 在实际生产实践和应用中, 能够保持较高的活性和稳定性。此外, 在治疗多重耐药细菌方面, 噬菌体裂解酶的开发与应用也是噬菌体治疗的新途径。何洋等<sup>[39]</sup>研究证实了噬菌体与其表达的裂解酶活性范围相当, 噬菌体裂解酶通过破坏细菌细胞壁裂解宿主菌, 具有更高的高效性和安全性<sup>[40-41]</sup>。因此, 我们将进一步分离噬菌体 ΦDS8 的裂解酶, 研究其杀菌效果, 并应用于后续的噬菌体治疗。本研究分析了福氏志贺氏菌噬菌体 ΦDS8 的生物学特性, 证实了噬菌体 ΦDS8 在治疗耐药性福氏志贺氏菌中具有巨大的应用潜能, 为该噬菌体在今后的鸡尾酒治疗、裂解酶研究和动物治疗实验中提供基础数据。

## REFERENCES

- [1] Golan D, Toubi F. Current concepts in immunological tolerance and auto-immunity[J]. Harefuah, 1987, 113(5/6): 121-124
- [2] Shrivastava S, Shrivastava P, Ramasamy J. World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics[J]. Journal of Medical Society, 2018, 32(1): 76-77
- [3] Khalil IA, Troeger C, Blacker BF, Rao PC, Brown A, Atherly DE, Brewer TG, Engmann CM, Hout ER, Kang G, et al. Morbidity and mortality due to shigella and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhoea: the Global Burden of Disease Study 1990-2016[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2018, 18(11): 1229-1240
- [4] Bhattacharya D, Sugunan AP, Bhattacharjee H, Thamizhmani R, Sayi DS, Thanasekaran K, Manimunda SP, Ghosh AR, Bharadwaj AP, Singhanian M, et al. Antimicrobial resistance in *Shigella*-rapid increase & widening of spectrum in Andaman Islands, India[J]. Indian Journal of Medical Research, 2012, 135(3): 365-370
- [5] Von Seidlein L, Kim DR, Ali M, Lee H, Wang XY, Thiem VD, Canh DG, Chaicumpa W, Agtini MD, Hossain A, et al. A multicentre study of *Shigella* diarrhoea in six Asian countries: disease burden, clinical manifestations, and microbiology[J]. PLoS Medicine, 2006, 3(9): e353
- [6] Huang YL, Yang TY. Etiological identification of a bacillary dysentery outbreak caused by *Shigella flexneri* X[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2011, 21(3): 646-647 (in Chinese)  
黄永亮, 杨天佑. 一起福氏志贺菌 X 变种暴发流行的病原学鉴定[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(3): 646-647
- [7] Harrington R. Drug-resistant stomach bug[J]. Scientific American, 2015, 313(2): 88
- [8] Shiferaw B, Solghan S, Palmer A, Joyce K, Barzilay EJ, Krueger A, Cieslak P. Antimicrobial susceptibility patterns of *Shigella* isolates in foodborne diseases active surveillance network (FoodNet) sites, 2000-2010[J]. Clinical Infectious Diseases, 2012, 54(Suppl\_5): S458-S463
- [9] Ahmed AM, Shimamoto T. Molecular characterization of multidrug-resistant *Shigella* spp. of food origin[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 194: 78-82
- [10] Dai YL, Hao XJ, Yi FD, Tan XJ, Feng YS. Isolation, identification and drug resistance analysis of a novel *Shigella sonnei* strain of chicken origin[J]. Animal Science Abroad (Pigs and Poultry), 2020, 40(4): 54-56 (in Chinese)  
代永联, 郝小静, 衣服德, 檀学进, 冯永胜. 一株鸡源宋内氏志贺氏菌的分离鉴定与耐药性分析[J]. 国外畜牧学(猪与禽), 2020, 40(4): 54-56
- [11] Zou XY, Cai DZ. Research progress and development direction of bacteriophage therapy for bacterial infection[J]. Chinese Journal of Infection Control, 2019, 18(9): 888-892 (in Chinese)  
邹秀月, 蔡德周. 噬菌体治疗细菌性疾病的研究进展及发展方向[J]. 中国感染控制杂志, 2019, 18(9): 888-892
- [12] Malik S, Sidhu PK, Rana JS, Nehra K. Managing urinary tract infections through phage therapy: a novel approach[J]. Folia Microbiologica, 2020, 65(2): 217-231
- [13] D'herelle F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysenteriques[J]. Comptes Rendus de l'Academie des Sciences (Paris), 1917, 165: 373-375
- [14] Lu JB, Wang JL, Wu WS, Si ZS, Li YB. Isolation and identification of a strain of chicken coliphage and its treatment effect on avian colibacillosis[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2019, 41(5): 530-533 (in Chinese)  
路建彪, 王俊丽, 吴伟胜, 司振书, 李玉保. 一株鸡大肠杆菌噬菌体的分离鉴定及治疗试验[J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41(5): 530-533
- [15] Zhang H, Wang R, Bao HD. Biological characteristics of lytic SF-A2 phage and its sterilization effect in milk[J].

- Food Science, 2010, 31(23): 214-218 (in Chinese)  
张辉, 王冉, 包红朵. 裂解性福氏志贺氏菌噬菌体 SF-A2 的生物学特性及其在巴氏杀菌牛奶中的灭菌效果[J]. 食品科学, 2010, 31(23): 214-218
- [16] Cha SB, Yoo AN, Lee WJ, Shin MK, Jung MH, Shin SW, Cho YW, Yoo HS. Effect of bacteriophage in enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) infected pigs[J]. The Journal of Veterinary Medical Science, 2012, 74(8): 1037-1039
- [17] Lau GL, Sieo CC, Tan WS, Hair-Bejo M, Jalila A, Ho YW. Efficacy of a bacteriophage isolated from chickens as a therapeutic agent for colibacillosis in broiler chickens[J]. Poultry Science, 2010, 89(12): 2589-2596
- [18] Yuan YY. The isolation and identification of *Salmonella pullorum* bacteriophage and its preliminary application[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin University, 2016 (in Chinese)  
袁玉玉. 鸡白痢沙门菌噬菌体的分离鉴定及其初步应用[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2016
- [19] Rossolini GM, Arena F, Pecile P, Pollini S. Update on the antibiotic resistance crisis[J]. Current Opinion in Pharmacology, 2014, 18: 56-60
- [20] Han CY, Zhang FX, Tong YG. Comparison of different bacteriophage concentration methods[J]. Letters in Biotechnology, 2013, 24(5): 695-697, 721 (in Chinese)  
韩传银, 张飞雄, 童贻刚. 噬菌体浓缩方法的比较[J]. 生物技术通讯, 2013, 24(5): 695-697, 721
- [21] Jiang HC, Xiang X, Gao H, Zheng XH, Duan G, Chang H. Isolation and pathogenicity characteristics of *Shigellas* from bamboo rats[J]. Journal of Natural Science of Hunan Normal University, 2019, 42(2): 42-46, 95 (in Chinese)  
江华超, 项勋, 高辉, 郑小惠, 段纲, 常华. 竹鼠志贺氏菌的分离及致病性研究[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2019, 42(2): 42-46, 95
- [22] Ma XL. Antimicrobial susceptibility testing performing standard interpretation[J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2012, 30(10): 776-778 (in Chinese)  
马筱玲. 抗菌药物敏感性试验执行标准解读[J]. 临床检验杂志, 2012, 30(10): 776-778
- [23] 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
- [24] Merabishvili M, Vandenheuvel D, Kropinski AM, Mast J, De Vos D, Verbeken G, Noben JP, Lavigne R, Vaneechoutte M, Pirnay JP. Characterization of newly isolated lytic bacteriophages active against *Acinetobacter baumannii*[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e104853
- [25] Huang BH, Chen QS, Pang GC. Developing status of fast detection technique and study on *Shigella*[J]. Food Science, 2004, 25(11): 333-336 (in Chinese)  
黄宝华, 陈庆森, 庞广昌. 志贺氏菌研究及其快速检测技术发展现状[J]. 食品科学, 2004, 25(11): 333-336
- [26] Xu LJ, Wang CQ, Hu GZ, Kang XT, Ren J, Zhang CH, Liang J. Discover on shigellosis of flock in China and studies on the pathogeny speciality[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2004, 26(4): 281-286 (in Chinese)  
许兰菊, 王川庆, 胡功政, 康相涛, 任剑, 张春晖, 梁军. 鸡志贺氏菌病在我国的发现及其病原特性研究[J]. 中国预防兽医学报, 2004, 26(4): 281-286
- [27] Wang RJ, Zhang L, Zhu XG, Li YQ. Isolation, identification and susceptibility testing of *Shigella* in Tibetan chickens[J]. China Poultry, 2015, 37(22): 65-67 (in Chinese)  
王润锦, 张林, 朱秀高, 李艳青. 藏鸡志贺氏菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 中国家禽, 2015, 37(22): 65-67
- [28] Gao MM, Wang C, Li PY, Liu HY, Pei GQ, Fan H, Zhang XLL, Mi ZQ, Tong YG, Bai CQ. Biological characteristics and complete genomic analysis of a novel virulent bacteriophage that infects *Klebsiella pneumoniae* capsular type K63[J]. Microbiology China, 2020, 47(1): 210-221 (in Chinese)  
高明明, 王灿, 李璞媛, 刘慧莹, 裴广倩, 范航, 张湘莉, 米志强, 童贻刚, 柏长青. 一株新型裂解 K63 荚膜型肺炎克雷伯菌的噬菌体分离鉴定和生物学特性研究及全基因组分析[J]. 微生物学通报, 2020, 47(1): 210-221
- [29] Ge ZY, Han SY, Cao XA, Zhou JH, Liu TT, Liu YS, Li XR. Isolation and biological characterization of a bacteriophage against *Staphylococcus aureus*[J]. Microbiology China, 2021, 48(4): 1171-1181 (in Chinese)  
葛志毅, 韩生义, 曹小安, 周建华, 刘婷婷, 刘永生, 李学瑞. 一株金黄色葡萄球菌噬菌体的分离鉴定与生物学特性[J]. 微生物学通报, 2021, 48(4): 1171-1181
- [30] Xu YP. The isolation and identification of *Salmonella* bacteriophages and their preliminary application on poultry meats[D]. Yangzhou: Master's Thesis of Yangzhou University, 2018 (in Chinese)  
许燕苹. 沙门菌噬菌体的分离鉴定及在禽肉产品中的初步应用[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2018
- [31] Zhang ZH, Yang J, Zhang HP, Zhong YH, Wang P. Host range and molecular classification of a *Staphylococcus aureus* bacteriophage[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(7): 2043-2052 (in Chinese)  
张志宏, 杨娇, 张海鹏, 钟佑宏, 王鹏. 一株金黄色葡萄球菌噬菌体的裂解谱特异性和分子分类研究[J]. 微生物学报, 2021, 61(7): 2043-2052
- [32] Bach SJ, McAllister TA, Veira DM, Gannon VPJ, Holley RA. Effect of bacteriophage DC22 on *Escherichia coli*

- O157:H7 in an artificial rumen system (Rusitec) and inoculated sheep[J]. *Animal Research*, 2003, 52(2): 89-101
- [33] Ganaie MY, Qureshi S, Kashoo Z, Wani SA, Hussain MI, Kumar R, Maqbool R, Sikander P, Banday MS, Malla WA, et al. Isolation and characterization of two lytic bacteriophages against *Staphylococcus aureus* from India: newer therapeutic agents against bovine mastitis[J]. *Veterinary Research Communications*, 2018, 42(4): 289-295
- [34] Bai J, Jeon B, Ryu S. Effective inhibition of *Salmonella* Typhimurium in fresh produce by a phage cocktail targeting multiple host receptors[J]. *Food Microbiology*, 2019, 77: 52-60
- [35] Sklar IB, Joerger RD. Attempts to utilize bacteriophage to combat *Salmonella enterica* serovar enteritidis infection in chickens[J]. *Journal of Food Safety*, 2001, 21(1): 15-29
- [36] Alemayehu D, Molla B, Muckle A. Prevalence and antimicrobial resistance pattern of *Salmonella* isolates from apparently healthy slaughtered cattle in Ethiopia[J]. *Tropical Animal Health and Production*, 2003, 35(4): 309-319
- [37] Tan XL, Qiao JN, Yang DN, Zhang YY, Li WX, Qiao DR, Cao Y. Isolation, purification and biological characterization of a virulent *Ralstonia* phage  $\phi$ RSm2C[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2020. DOI: 10.19675/j.cnki.1006-687x.2020.07067 (in Chinese)  
谭筱懿, 乔晋楠, 杨丹妮, 张义阳, 李文馨, 乔代蓉, 曹毅. 一株烈性青枯菌噬菌体  $\phi$ RSm2C 的分离纯化及生物学特征[J]. *应用与环境生物学报*, 2020. DOI: 10.19675/j.cnki.1006-687x.2020.07067
- [38] Wu LF, Wang ZF, Wang ZH, Gao C, Chen G, Yan YX, Sun JH. Isolation of a phage effectively lysing multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* and preparation of its lysin[J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2021, 29(3): 1-9 (in Chinese)  
吴丽飞, 王兆飞, 王中华, 高超, 陈冈, 严亚贤, 孙建和. 高效裂解多重耐药金黄色葡萄球菌的噬菌体分离及裂解酶的制备[J]. *中国动物传染病学报*, 2021, 29(3): 1-9
- [39] He Y, Jing ZY, Yang HJ. Characterization and activity determination of Gp2 endolysin from *Plesiomonas shigelloides* phage  $\Phi$ P4-7[J]. *Journal of Tianjin University of Science & Technology*, 2017, 32(3): 16-22 (in Chinese)  
何洋, 荆兆元, 杨洪江. 类志贺邻单胞菌噬菌体  $\Phi$ P4-7 裂解酶 Gp2 的表达及活性测定[J]. *天津科技大学学报*, 2017, 32(3): 16-22
- [40] Trudil D. Phage lytic enzymes: a history[J]. *Virologica Sinica*, 2015, 30(1): 26-32
- [41] Schmelcher M, Donovan DM, Loessner MJ. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials[J]. *Future Microbiology*, 2012, 7(10): 1147-1171