



研究报告

宿主菌富集空肠弯曲菌噬菌体培养条件的优化

英航宁¹ 李凤鸣² 李洁¹ 唐苑悦^{1,3} 焦新安^{1,3} 黄金林^{*1,3}

1 扬州大学江苏省人兽共患病学重点实验室 江苏 扬州 225009

2 江苏高校动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心 江苏 扬州 225009

3 农业农村部农产品质量安全生物性危害因子(动物源)控制重点实验室 江苏 扬州 225009

摘要:【背景】开发噬菌体产品是一种防控空肠弯曲菌有潜力的策略,但是面临噬菌体分离的挑战。【目的】运用响应面法对宿主菌富集空肠弯曲菌噬菌体的培养条件进行优化。【方法】通过单因素试验分析培养基、培养温度、培养转速、离子添加剂对噬菌体富集效果的影响,以噬菌体回收率为评价指标,采用响应面法优化了空肠弯曲菌噬菌体的富集培养条件。【结果】在37℃条件下进行静置培养时,噬菌体富集培养效果最佳,回收率为354.12%。分离噬菌体的过程包括采样并制备滤液、宿主菌与样品滤液共培养及噬菌体分离与鉴定等环节。应用此方法从鸡粪便中分离空肠弯曲菌噬菌体,与传统的单斑法相比,噬菌体分离率提高了269.23%。【结论】研究优化的宿主菌富集噬菌体培养方法可提高空肠弯曲菌噬菌体的分离效率,为噬菌体的研究提供思路。

关键词: 噬菌体, 空肠弯曲菌, 分离, 富集

Optimization of culture conditions for enrichment of *Campylobacter jejuni* phages by host bacteria

YING Hangning¹ LI Fengming² LI Jie¹ TANG Yuanyue^{1,3} JIAO Xinan^{1,3}
HUANG Jinlin^{*1,3}

1 Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China

2 Jiangsu Co-Innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Disease and Zoonoses, Yangzhou, Jiangsu 225009, China

3 Key Laboratory of Prevention and Control of Biological Hazard Factors (Animal Origin) for Agrifood Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yangzhou, Jiangsu 225009, China

Abstract: [Background] The development of a bacteriophage-based product for the control of *Campylobacter jejuni* is a promising biocontrol strategy. However, bacteriophage isolation is a complicated challenge. [Objective] Response surface methodology was used to optimize the enrichment conditions of *Campylobacter jejuni* phages. [Methods] The effects of culture medium, culture temperature, shaking and ion additive on phage enrichment were analyzed through the single factor test.

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2018YFD0500500); National Natural Science Foundation of China (31872493)

*Corresponding author: Tel: 86-514-87990579; E-mail: jinlin@yzu.edu.cn

Received: 22-04-2021; Accepted: 29-06-2021; Published online: 16-07-2021

基金项目: 国家重点研发项目(2018YFD0500500); 国家自然科学基金(31872493)

*通信作者: Tel: 0514-87990579; E-mail: jinlin@yzu.edu.cn

收稿日期: 2021-04-22; 接受日期: 2021-06-29; 网络首发日期: 2021-07-16

Based on response surface methodology (RSM), the recovery efficiency of phage was selected to evaluate enrichment culture conditions. **[Results]** The optimal culture conditions for enrichment were 37 °C and 0 r/min, recovery efficiency was 354.12%. The main procedures of bacteriophage isolation include sampling and sample preparation, incubation of sample filtrated with indicator strains, bacteriophage isolation and identification. Compared to the single spot method without enrichment, this enrichment method could increase the phage isolation rate by 269.23% from chicken fecal samples. **[Conclusion]** The optimized enrichment conditions of *Campylobacter jejuni* phages could improve the isolation efficiency of phages. It provides a new idea for phage isolation.

Keywords: phage, *Campylobacter jejuni*, isolation, enrichment

噬菌体是侵袭细菌的病毒, 通常分布在充满细菌群落的地方, 具有宿主特异性, 可以有针对性地使用噬菌体消杀细菌^[1]。近年来有关噬菌体的应用研究主要包括研发噬菌体相关生物制剂, 与抗菌制剂联用等策略防控细菌^[2-5]。因此, 分离到具有裂解活性的噬菌体, 是噬菌体实际应用研究、探究噬菌体和细菌的相互作用以及噬菌体改造的前提。

常用的单斑法分离噬菌体主要流程为: (1) 制备细菌双层平板; (2) 采集粪便等样本并获得滤液; (3) 由样本滤液直接分离噬菌体^[6]。此分离技术所需样品滤液体积小, 具有设备简单、试验周期短和易观察的特点^[6-7]。但是, 该方法的缺点是难分离到样本中浓度较低的噬菌体。为了提高噬菌体分离率, 许多研究者在金黄葡萄球菌噬菌体、肺炎克雷伯菌噬菌体和鼠疫噬菌体的分离研究中, 将样品滤液和宿主菌液共培养使噬菌体增殖, 从而实现噬菌体富集^[8-10]。空肠弯曲菌噬菌体的主要来源是家禽的粪便、胴体表面和屠宰场污水^[11-12]。近年, 国际上有研究者应用富集方法分离空肠弯曲菌噬菌体, 由于空肠弯曲菌是微需氧细菌, 培养条件苛刻, 利用其富集噬菌体具有挑战性^[6,13-14]。利用宿主菌富集噬菌体是提高噬菌体分离效率的关键, 富集培养条件直接影响噬菌体富集的效率^[15]。目前系统地优化噬菌体富集培养条件的报道较少, 确定一种适用于空肠弯曲菌噬菌体富集方法, 对于提高噬菌体的分离效率具有重要意义。因此, 本研究以宿主菌富集噬菌

体, 探究培养基、培养温度、培养转速、离子添加剂对噬菌体富集效果的影响, 将培养温度和转速利用响应面法进行优化, 选出最佳培养条件。同时, 采用该富集方法和单斑法从实际样本分离噬菌体并对该方法分离噬菌体的效率进行评价。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株和样本

宿主菌: 空肠弯曲菌 NCTC12662、YZU-01 (75)、YZU-02 (PO-19-9)、YZU-03 (SQXN-5)、YZU-04 (CW0803-3)均由本实验室分离鉴定并保存。噬菌体 CP39 由本实验室从扬州市农贸市场的污水样品分离鉴定并保存。鸡粪便样本采自扬州市活禽市场。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

NZCYM 肉汤, 用于噬菌体的培养, 生工生物工程(上海)股份有限公司; Bolton 肉汤和 CCDA, 用于空肠弯曲菌的培养, OXOID 公司; MH 肉汤和 BHI 肉汤, 用于空肠弯曲菌的培养, BD 公司。Tris-HCl 和琼脂, 北京索莱宝科技有限公司; 明胶, 上海翊圣生物科技有限公司。SM 缓冲液: MgSO₄·7H₂O 2.0 g, NaCl 5.8 g, 1 mol/L Tris-HCl (pH 7.5) 50 mL, 2%明胶 5 mL, 加超纯水至 1 L, 1×10⁵ Pa 灭菌 15 min。

0.22 μm 过滤器, 广州洁特生物过滤股份有限公司; 厌氧罐, MGC 公司; 隔热式恒温培养箱, 上海跃进仪器有限公司; 台式冷冻离心机, Eppendorf 公司。

1.3 方法

1.3.1 噬菌体富集

将 5 mL Bolton 肉汤装于离心管, 分别加入 50 μL 的 5.0×10^3 – 5.0×10^5 PFU/mL 噬菌体 CP39 溶液, 使培养液中的噬菌体浓度为 5.0×10^1 – 5.0×10^3 PFU/mL, 与 50 μL 对数期 NCTC12662 菌液混合^[15]。将离心管于 42 °C 微需氧条件下静置培养 24 h, 取 1 mL 培养物 12 000 r/min 离心 10 min, 用 0.22 μm 滤器过滤上清, 收集滤液, 做 3 组平行。响应面试验中, 接种噬菌体 CP39 终浓度为 5.0×10^1 PFU/mL, 其他条件不变。

1.3.2 噬菌体回收率测定

制备细菌平板, 宿主菌液与培养基体积比为 1:10, 取 400 μL 菌液与冷却至 45 °C 左右的 4 mL NZCYM 培养基(含 0.6%琼脂)混合均匀, 迅速倒入 NZCYM 平板(含 1.2%琼脂)上, 轻柔摇晃均匀, 静置 15 min 左右待其晾干。取 1.3.1 中制备的样品进行 10 倍梯度稀释, 取 10 μL 样品滤液, 以单斑法在含有宿主的平板上点样, 放置于 42 °C 微需氧环境下培养 18–24 h^[14]。结果用回收率表示, 即处理后噬菌体滴度与接种噬菌体滴度的比值^[15]。

1.3.3 富集噬菌体的单因素试验

根据 1.3.1 制备富集培养液。选取 NZCYM、Bolton 和 BHI 肉汤培养基进行培养, 以噬菌体回收率为指标评价培养基对噬菌体增殖的影响, 确定最佳培养基^[6,13,15]。选取不同转速(0、90、180 r/min)进行培养, 以噬菌体回收率为指标评价培养转速对噬菌体增殖的影响, 确定最佳培养转速。选取不同温度(32、37、42、47 °C)进行培养, 以噬菌体回收率为指标评价培养温度对噬菌体增殖的影响, 确定最佳培养温度。分别加入不同终浓度(0.5、1.0、1.5、2.0 mmol/L)的 CaCl_2 溶液, 以噬菌体回收率为指标评价 CaCl_2 溶液浓度对噬菌体增殖的影响, 确定最佳 CaCl_2 溶液浓度。分别加入不同终浓度(5、10、15、20 mmol/L)的 MgSO_4 溶液, 以噬菌体回收率为指标评价 MgSO_4

溶液浓度对噬菌体增殖的影响, 确定最佳 MgSO_4 溶液浓度。分别加入不同终浓度(10^2 、 10^4 、 10^6 、 10^8 CFU/mL)的 NCTC12662 菌液, 检测宿主菌载量对噬菌体回收率的影响。

1.3.4 响应面试验

运用软件 Design-Expert V8.0 中的 Central Composite 实验设计, 根据单因素试验结果, 选择温度和培养转速为变量, 试验因素与水平见表 1。分别以 A、B 表示温度和转速, 温度 37 °C 和转速 45 r/min 作为 0 水平, 另外 2 组试验水平以 -1 和 1 编码, 以噬菌体回收率为响应值, 获得宿主菌富集空肠弯曲菌噬菌体的最佳培养条件。

1.4 实际样本分离噬菌体

使用棉签采集粪便装于含有 5 mL SM 缓冲液的离心管, 4 h 内返回实验室处理样品^[12]。将样品溶液 12 000 r/min 离心 10 min 除去较大杂质, 通过 0.22 μm 滤器过滤上清, 制成样品原液备用。分别将 5 株宿主菌按照 1.3.2 制备细菌平板。采用单斑法, 取 10 μL 样品滤液, 滴加在细菌平板上, 晾干后将双层平板置于 42 °C 微需氧环境培养 18–24 h, 观察有无透明斑块^[6,11]。同时, 用宿主菌对样品滤液作富集处理, 宿主菌为空肠弯曲菌 YZU-01 (75)、YZU-02 (PO-19-9)、YZU-03 (SQXN-5)、YZU-04 (CW0803-3)和 NCTC12662, 各取 200 μL 对数期菌液混合均匀, 制成混合菌液, 取 50 μL 混合菌液加入 5 mL Bolton 肉汤(1 mmol/L 的 CaCl_2 溶液, 10 mmol/L 的 MgSO_4 溶液), 取 1 mL 样品滤液加入其中, 放置在 37 °C 微需氧条件下, 静置培养 24 h^[6]。取 1 mL 培养液, 12 000 r/min 离心 10 min, 用 0.22 μm 滤器过滤上清, 取 10 μL 滤液滴加在细菌平板上, 晾干后将双层平板置于 42 °C

表 1 试验因素与水平

Table 1 Factorial level of central composite design

因素 Factor	水平 Level		
	-1	0	1
A 温度 Temperature (°C)	32	37	42
B 转速 Shaking (r/min)	0	45	90

微需氧环境培养 18–24 h, 观察细菌平板, 若滴加样本的区域形成透明斑块, 记为噬菌体阳性, 若点样区无透明斑块, 记为噬菌体阴性。

2 结果与分析

2.1 空肠弯曲菌噬菌体富集培养条件单因素试验

2.1.1 培养基对噬菌体回收率的影响

培养基影响噬菌体回收率的结果如图 1 所示, 噬菌体回收率与噬菌体接种量呈负相关, 噬菌体接种量越低富集效果越显著, 以 Bolton 肉汤为培养基, 噬菌体回收率在 172.73%–375.89%之间。结果显示富集效果最佳的培养基是 Bolton 肉汤, 噬菌体接种量为 10^1 PFU/mL, 噬菌体回收率可达 375.9% ($P<0.05$)。

2.1.2 培养转速对噬菌体回收率的影响

如图 2 所示, 静置培养噬菌体回收率为 172.73%–375.89%。摇床 180 r/min 培养富集噬菌体的效率较低, 噬菌体回收率在 178.92%–209.15%之间。当噬菌体接种量为 10^1 PFU/mL, 静置培养的噬菌体回收率显著高于摇床(90 r/min 和 180 r/min)培养($P<0.05$), 最佳培养转速为 0 r/min。

2.1.3 温度对噬菌体回收率的影响

培养温度是影响噬菌体增殖的重要因素。如图 3 所示, 在 37 °C 和 42 °C 条件下富集噬菌体的效率较高, 37 °C 培养, 噬菌体回收率在 168.20%–350.28%之间; 42 °C 培养, 噬菌体回收

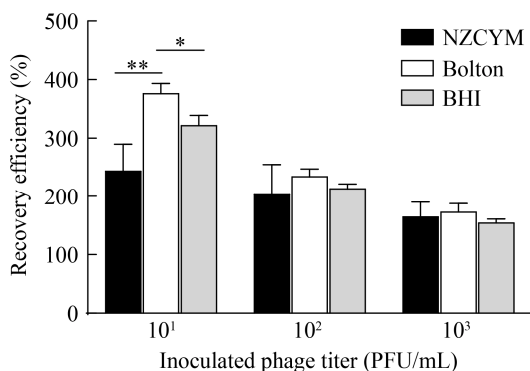


图 1 培养基对噬菌体回收率的影响

Figure 1 Effect of medium on phage recovery efficiency

Note: *: $P<0.05$; **: $P<0.01$

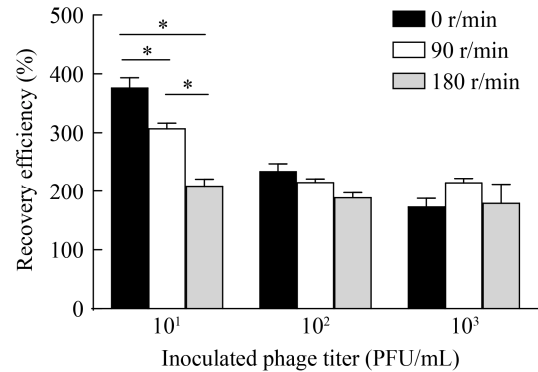


图 2 培养转速对噬菌体回收率的影响

Figure 2 Effect of shaking on phage recovery efficiency

Note: *: $P<0.05$

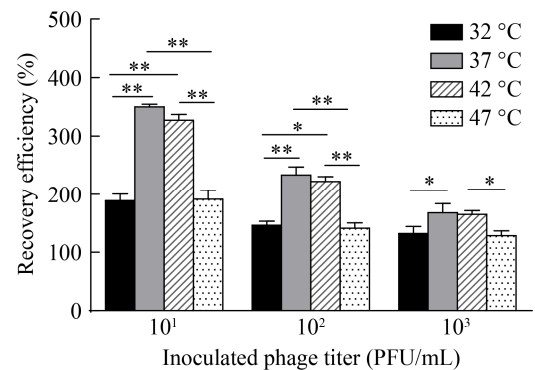


图 3 温度对噬菌体回收率的影响

Figure 3 Effect of temperature on phage recovery efficiency

Note: *: $P<0.05$; **: $P<0.01$

率在 165.10%–327.40%之间。当噬菌体接种量为 10^1 PFU/mL, 37 °C 培养的噬菌体回收率分别比 32 °C 和 47 °C 培养高 161.19%和 158.71% ($P<0.01$), 因此最佳培养温度为 37 °C。

2.1.4 CaCl₂ 溶液和 MgSO₄ 溶液对噬菌体回收率的影响

在培养基添加不同浓度 CaCl₂ 溶液和 MgSO₄ 溶液对噬菌体富集的效果无显著差异(图 4)。噬菌体接种量为 10^1 PFU/mL, 培养液中分别加入终浓度为 2.0 mmol/L 的 CaCl₂ 溶液和 20 mmol/L 的 MgSO₄ 溶液, 噬菌体回收率最高。结果显示, CaCl₂ 溶液和 MgSO₄ 溶液对噬菌体富集无显著影响。

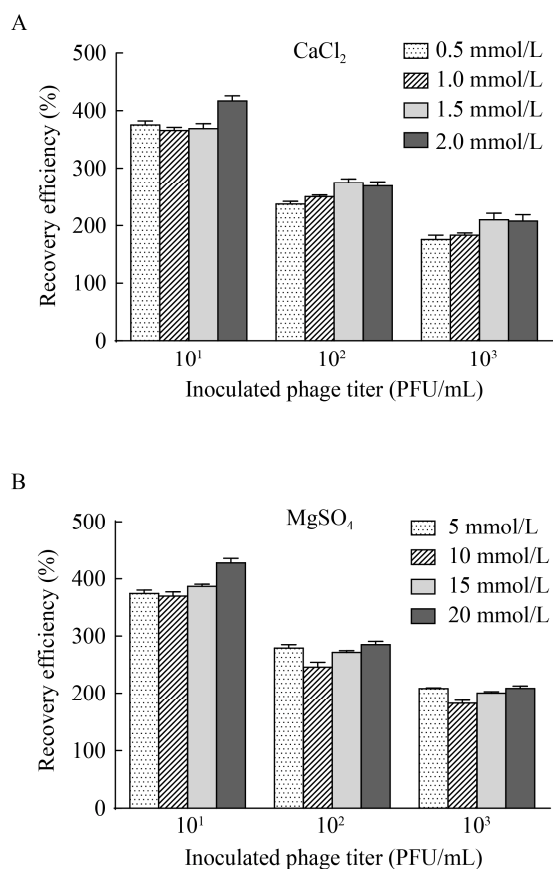


图4 CaCl₂溶液和MgSO₄溶液对噬菌体回收率的影响
Figure 4 Effect of CaCl₂ and MgSO₄ solutions on phage recovery efficiency

2.2 响应面试验结果

2.2.1 回归方程及方差分析

运用软件 Design-Expert V8.0 对响应面试验组数据(表 2)进行回归拟合, 得到二元二次回归模型方程, 进行方差分析, 评价模型的统计学意义。

噬菌体回收率 = $341.07 + 48.32A - 21.28B - 2.09AB - 62.69A^2 - 10.85B^2$ 。

如表 3 所示, 失拟项 $P=0.088$ >0.05 , 无显著

表 2 响应面试验设计及结果

Table 2 Response surface design and experimental results

试验号 Experiment No.	A 温度 Temperature (°C)	B 转速 Shaking (r/min)	回收率 Recovery efficiency (%)
1	37	45	343.31
2	37	45	339.86
3	37	45	318.92
4	32	0	215.47
5	37	45	352.81
6	44	45	274.33
7	30	45	176.58
8	37	45	341.00
9	42	90	301.21
10	32	90	182.48
11	42	0	342.55
12	37	108	295.26
13	37	0	369.63

表 3 响应面方差分析

Table 3 Analysis of variance in RSM

来源 Source	离差平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F value	P 值 P value
Model	48 933.85	5	9 786.77	25.17	0.000 2
A Temperature	18 488.47	1	18 488.47	47.54	0.000 2
B Shaking	2 936.61	1	2 936.61	7.55	0.028 6
AB	17.43	1	17.43	0.05	0.838 4
A ²	26 887.98	1	26 887.98	69.14	<0.000 1
B ²	562.20	1	562.20	1.45	0.268 3
Residual	2 722.10	7	388.87		
Lack of fit	2 105.03	3	701.68	4.55	0.088 7
Pure error	617.08	4	154.27		
Cor total	51 655.95	12			

差异, 说明模型的预测值与实际值拟合度高, 可用此模型进行优化($R^2=0.9473$)。一次项 A ($P<0.001$) 具有显著差异; 一次项 B ($P<0.05$) 具有显著差异; 二次项 A^2 ($P<0.0001$) 具有显著差异; 培养温度和转速在宿主菌富集噬菌体中发挥重要作用。

2.2.2 响应面立体图分析

响应面的结果如图 5 所示, 温度和转速对噬菌体回收率影响的响应面等高线呈椭圆形, 说明其交互作用对噬菌体回收率的影响较显著。响应面向下开口, 有极大值点, 运用软件 Design-Expert V8.0 分析得出最佳培养条件: 温度 $38.95\text{ }^\circ\text{C}$, 转速 9.46 r/min , 此条件下噬菌体回收率预测值为 361.06% 。

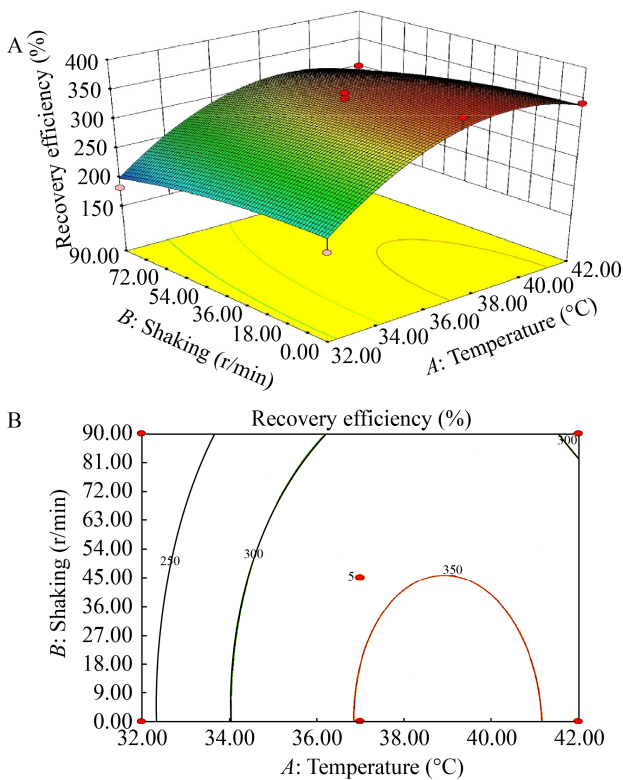


图 5 培养温度和转速对噬菌体回收率的影响
Figure 5 Effect of temperature and shaking on phage recovery efficiency

注: A: 温度和转速对噬菌体回收率影响的响应面图; B: 温度和转速对噬菌体回收率影响的等高线图

Note: A: Response surface graph for the effects of temperature and shaking on phage recovery efficiency; B: Contour map for the effects of temperature and shaking on phage recovery efficiency

2.2.3 验证实验结果

采用上述最佳培养条件进行宿主菌富集空肠弯曲菌噬菌体试验, 考虑到实际操作简便性, 将培养条件调整为温度 $37\text{ }^\circ\text{C}$, 转速 0 r/min , 并检测该培养条件的可行性。实际测得噬菌体回收率为 354.12% , 与预期值相差较小, 噬菌体浓度提高了 5 Log_{10} (PFU/mL)。结果表明, 该模型预测的利用宿主菌富集噬菌体的培养条件具有实用性。

2.3 宿主菌载量对噬菌体回收率的影响

如图 6 所示, 3 种宿主菌载量中(10^4 、 10^6 、 10^8 CFU/mL), 噬菌体回收率差异不显著。在 10^4 、 10^6 、 10^8 CFU/mL 的宿主菌中, 噬菌体回收率在 143.95% – 364.46% 之间。用 10^2 CFU/mL 的宿主菌富集噬菌体时, 噬菌体回收率较低, 回收率在 107.86% – 229.54% 之间。因此, 10^4 – 10^8 CFU/mL 的宿主菌适用于富集噬菌体。

2.4 实际样本分离噬菌体

在扬州市活禽市场采集 75 份鸡新鲜粪便, 分别采用单斑法和此方法进行空肠弯曲菌噬菌体的分离, 结果如图 7 所示。采用单斑法, 样本噬菌体阳性率为 13% ($10/75$)。与单斑法相比, 经富集处理的噬菌体阳性率为 48% ($36/75$), 噬菌体分离率提高了 269.23% 。

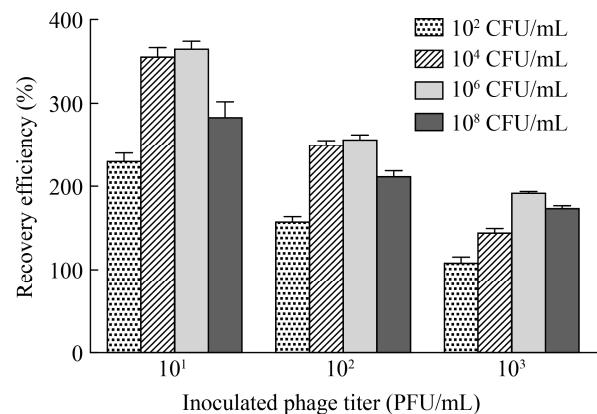


图 6 宿主菌载量对噬菌体回收率的影响
Figure 6 Effect of host bacterial load on phage recovery efficiency

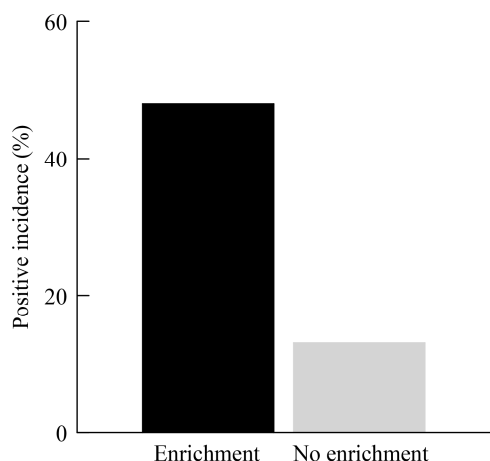


图7 空肠弯曲菌噬菌体分离结果

Figure 7 Results of phage isolation of *Campylobacter jejuni*

3 讨论与结论

在噬菌体分离过程中,可以利用宿主菌与样品滤液共培养的方法提高噬菌体浓度,达到富集的效果,从而提高分离噬菌体的效率。噬菌体回收率是评价噬菌体富集效果的重要指标,而且与噬菌体分离效率密切相关。培养温度和转速是噬菌体富集的重要影响因素。目前系统地优化宿主菌富集空肠弯曲菌噬菌体培养条件的研究较少。本研究采用响应面法优化噬菌体富集培养条件,结果显示最佳培养条件为温度 37 °C, 转速 0 r/min, 噬菌体回收率可达 354.12%, 噬菌体浓度提高了 5 Log₁₀ (PFU/mL)。采用单斑法和噬菌体富集法从实际样本分离噬菌体,比较 2 种方法的噬菌体分离效率,富集法的噬菌体分离率比单斑法的提高了 269.23%。噬菌体的分离受到样本中噬菌体载量影响, Nafarrate 等从鸡肉表皮分离弯曲菌噬菌体,样本中噬菌体浓度为 50 PFU/g,采用宿主菌富集噬菌体,噬菌体回收率在 330%–560%之间^[15]。本研究中噬菌体原始浓度为 50 PFU/mL,经宿主菌富集处理,其浓度提升了 5 Log₁₀ (PFU/mL)。经实际样本验证,采用富集方法显著提高了噬菌体的分离效率。现实样本中噬菌体数量较少时,经过运输和预

处理等环节,可能影响噬菌体的分离效率。此外,噬菌体与细菌的鞭毛或荚膜多糖等细胞受体结合,通过多种途径侵染细菌,需要进一步研究该富集培养条件对空肠弯曲菌噬菌体的适用范围^[16]。本研究对利用宿主菌富集噬菌体的培养条件进行优化,提高了空肠弯曲菌噬菌体的分离效率,为噬菌体研究提供了参考。

REFERENCES

- [1] Ofir G, Sorek R. Contemporary phage biology: from classic models to new insights[J]. *Cell*, 2018, 172(6): 1260-1270
- [2] Meunier M, Guyard-Nicodème M, Dory D, Chemaly M. Control strategies against *Campylobacter* at the poultry production level: biosecurity measures, feed additives and vaccination[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2016, 120(5): 1139-1173
- [3] Vikram A, Woolston J, Sulakvelidze A. Phage biocontrol applications in food production and processing[J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2021, 40: 267-302
- [4] Lood R, Winer BY, Pelzek AJ, Diez-Martinez R, Thandar M, Euler CW, Schuch R, Fischetti VA. Novel phage lysin capable of killing the multidrug-resistant Gram-negative bacterium *Acinetobacter baumannii* in a mouse bacteremia model[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015, 59(4): 1983-1991
- [5] Clavijo V, Baquero D, Hernandez S, Farfan JC, Arias J, Arévalo A, Donado-Godoy P, Vives-Flores M. Phage cocktail SalmoFREE[®] reduces *Salmonella* on a commercial broiler farm[J]. *Poultry Science*, 2019, 98(10): 5054-5063
- [6] Carvalho C, Susano M, Fernandes E, Santos S, Gannon B, Nicolau A, Gibbs P, Teixeira P, Azeredo J. Method for bacteriophage isolation against target *Campylobacter* strains[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, 50(2): 192-197
- [7] Mahmoud M, Askora A, Barakat AB, Rabie OEF, Hassan SE. Isolation and characterization of polyvalent bacteriophages infecting multi drug resistant *Salmonella* serovars isolated from broilers in Egypt[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, 266: 8-13
- [8] 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
- [9] Wang JR, Zhao FY, Li ML, Pei GQ, Fan H, Zhang XLL, Mi ZQ, Tong YG. Characterization and genome analysis of a

- novel *Klebsiella pneumoniae* phage[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(12): 3402-3413 (in Chinese)
- 王九儒, 赵飞扬, 李曼莉, 裴广倩, 范航, 张湘莉兰, 米志强, 童贻刚. 一株肺炎克雷伯菌噬菌体的生物学特性及全基因组分析[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(12): 3402-3413
- [10] Li CX, Li W, Wang P, Shen XN, Li ZJ, Qi ZZ. Establishment of a method for isolating *Yersinia pestis* phage from soil samples[J]. *Journal of Medical Pest Control*, 2018, 34(8): 780-782 (in Chinese)
- 李存香, 李伟, 王鹏, 申小娜, 李振军, 祁芝珍. 从土壤样本中分离鼠疫噬菌体方法的建立[J]. *医学动物防制*, 2018, 34(8): 780-782
- [11] Loc Carrillo CM, Connerton PL, Pearson T, Connerton IF. Free-range layer chickens as a source of *Campylobacter* bacteriophage[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2007, 92(3): 275-284
- [12] Owens J, Barton MD, Heuzenroeder MW. The isolation and characterization of *Campylobacter jejuni* bacteriophages from free range and indoor poultry[J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 162(1): 144-150
- [13] Hwang S, Yun J, Kim KP, Heu S, Lee S, Ryu S. Isolation and characterization of bacteriophages specific for *Campylobacter jejuni*[J]. *Microbiology and Immunology*, 2009, 53(10): 559-566
- [14] Jäckel C, Hammerl JA, Hertwig S. *Campylobacter* phage isolation and characterization: what we have learned so far[J]. *Methods and Protocols*, 2019, 2(1): 18
- [15] Nafarrate I, Mateo E, Amárita F, De Marañón IM, Lasagabaster A. Efficient isolation of *Campylobacter* bacteriophages from chicken skin, analysis of several isolation protocols[J]. *Food Microbiology*, 2020, 90: 103486
- [16] Sørensen MCH, Gencay YE, Birk T, Baldvinsson SB, Jäckel C, Hammerl JA, Vegge CS, Neve H, Brøndsted L. Primary isolation strain determines both phage type and receptors recognised by *Campylobacter jejuni* bacteriophages[J]. *PLoS One*, 2015, 10(1): e0116287