

噬菌体 RZ III-3 的生物学特性分析 及对鸡大肠杆菌的疗效

王 杰^{1,2}, 李璐璐¹, 张 庆^{1*}

(1. 山东省农业科学院畜牧兽医研究所, 济南 250100; 2. 山东大学生命科学学院, 济南 250100)

摘要: 为了解目前严重的抗生素耐药性, 寻找抗生素的替代品, 作者探究了大肠杆菌噬菌体 RZ III-3 的基本生物学特性及其对致病性大肠杆菌 1019 的治疗效果。大肠杆菌噬菌体 RZ III-3 的生物学特性分析显示其效价可达到 10^9 pfu · mL⁻¹, 透射电镜结果显示该噬菌体属于有尾目 T4 噬菌体。热稳定性较好, 在 60 °C 保温 1 h 后噬菌体效价仍可达到 10^7 pfu · mL⁻¹ 以上。对 pH 值的适应范围较宽, 在 pH4~10 内仍能保持较高的裂解活性; 该噬菌体的最适 pH 在 7.0 左右。最佳感染复数(MOI)为 0.1, 感染宿主菌的潜伏期 20 min, 爆发期 70 min。大肠杆菌噬菌体 RZ III-3 对大肠杆菌 1019 有较强的裂解能力, 可使 SPF 鸡肠道内大肠杆菌 1019 的数量降低 96.5%。该大肠杆菌噬菌体 RZ III-3 在治疗特定的大肠杆菌感染中具有较大的应用潜能。

关键词: 大肠杆菌; 噬菌体; 生物学特性; 治疗

中图分类号: Q939.48

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)11-2166-07

Biological Characteristics Analysis of Phage RZ III-3 to *Escherichia coli* and the Therapeutic Effect on Chicken

WANG Jie^{1,2}, LI Lu-lu¹, ZHANG Qing^{1*}

(1. Animal Husbandry and Veterinary Institute, Shandong Academy of Agricultural Science, Jinan 250100, China;

2. School of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract: To solve the antibiotic resistance and find substitution of antibiotics, this study explored the basic biological characteristics of *Escherichia coli* phage RZ III-3 and its therapeutic effect on SPF chicken colibacillosis. The biological characteristics of *Escherichia coli* phage RZ III-3 showed that the titer was 10^9 pfu · mL⁻¹, high stability to heat, the bacteriophage titer can reach more than 10^7 pfu · mL⁻¹ after incubation at 60 °C for 1 h. It had a wide adaptive range of pH, and maintained a high cleavage activity at pH 4-10. The optimum pH of the phage was about 7.0, its optimal multiplicity of infection (MOI) was 0.1, and the incubation period of infected host bacteria was about 20 min. The results of transmission electron microscopy showed that the phage belonged to the T4 phage. *Escherichia coli* phage RZ III-3 on *Escherichia coli* 1019 had a strong ability to crack, The number of *Escherichia coli* 1019 in SPF chickens can be reduced by 96.5%. This indicated that the *Escherichia coli* phage RZ III-3 has a greater potential for the treatment of specific *Escherichia coli* infection.

Key words: *Escherichia coli*; phage; biological characteristics; therapy

收稿日期: 2017-05-04

基金项目: 国家自然科学基金(81271886); 山东省农业重大应用技术创新项目(SDAIT-11-09); 山东省自然科学基金(ZR2014CP021)

作者简介: 王 杰(1990-), 女, 山东济宁人, 硕士, 主要从事噬菌体基本性质和裂解机制研究, Tel: 0531-88962860, E-mail: wangjier1020@163.com

* 通信作者: 张 庆, E-mail: zhangqingchina@163.com

禽大肠杆菌病是由致病性大肠杆菌引起的禽类急慢性传染病^[1],在鸡群中一般发病率为 11%~69%,死亡率为 3.8%~72.9%。目前针对大肠杆菌病多采用抗生素治疗和预防,而抗药性日益加剧的大肠杆菌给养禽业带来了严重损失,并对公共卫生、食品安全构成了严重威胁^[2-3]。

噬菌体治疗细菌感染性疾病的历史由来已久^[4],20 世纪 30 年代就有了噬菌体成功治疗霍乱报道^[5]。然而抗生素的出现与大量使用阻碍着噬菌体治疗的研究与发展。但是,随着抗生素滥用产生的畜禽产品药物残留问题与耐药菌株的大量出现^[6],以及新抗生素研发难度的增加,使噬菌体作为一种新兴的生物治疗制剂又重新受到了研究人员的关注^[7]。噬菌体特异性强,治疗细菌感染时只针对相应的致病菌,而不会干扰机体正常的菌群平衡,且可以在细菌感染部位快速增殖使得噬菌体剂量得以放大,进而快速达到增强疗效的作用。噬菌体有很强的宿主依赖性^[8],会随着宿主菌的清除而死亡^[9],另外机体内本身就存在着种类繁多的噬菌体^[10],所以噬菌体几乎没有任何毒副作用。

本试验测定了大肠杆菌噬菌体 RZⅢ-3 的基本生物学特性,并给 SPF 鸡口服大肠杆菌噬菌体 RZⅢ-3 及其特异宿主菌致病性大肠杆菌 1019,观测粪便中宿主菌数量的变化,评估大肠杆菌噬菌体 RZⅢ-3 的裂解疗效。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 培养基和试剂 固体 LB 培养基、半固体 LB 培养基、液体 LB 培养基、麦康凯固体培养基、MHB 液体培养基、SM 缓冲液(20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 10 mmol·L⁻¹ MgSO₄, 10 mmol·L⁻¹ CaCl₂, 100 mmol·L⁻¹ NaCl, pH7.5)、OMEGA Bacterial DNA Kit (50)、Eric-PCR 引物、PCR 酶、琼脂糖粉、PEG8000、分光光度计等。

1.1.2 抗菌药物 氟苯尼考、氨苄西林、头孢噻肟、头孢曲松、左氧氟沙星、环丙沙星、多西环素、庆大霉素、丁胺卡那霉素、硫酸黏菌素、恩诺沙星、头孢噻唑和新霉素,购自中国兽医药品监察所。

1.1.3 菌株和噬菌体 大肠杆菌 1019,分离自青岛病死鸡体;大肠杆菌噬菌体 RZⅢ-3,分离自青岛病死鸡肠道;禽源致病性大肠杆菌(95 株)、沙门菌(27 株)、铜绿假单胞菌(38 株)、耐甲氧西林金黄

色葡萄球菌(47 株)、金黄色葡萄球菌(42 株),均为实验室保存。

1.1.4 实验动物 健康的 145 日龄 SPF 鸡 12 只,购自山东省农业科学院家禽研究所 SPF 鸡场。

1.2 噬菌体 RZⅢ-3 的基本生物学特性

1.2.1 双层琼脂平板法测定噬菌体效价(滴度)

参照文献^[11]中的方法富集噬菌体 RZⅢ-3,利用双层平板法测定效价。

1.2.2 噬菌体 RZⅢ-3 的电镜形态 参照文献^[12]中的方法,纯化得到噬菌体颗粒后进行透射电镜观察。

1.2.3 采用点滴法分析噬菌体的裂解谱 测定噬菌体 RZⅢ-3 对实验室保存的禽源致病性大肠杆菌(95 株)、沙门菌(27 株)、铜绿假单胞菌(38 株)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(47 株)、金黄色葡萄球菌(42 株)的裂解能力。取 100 μL 过夜培养的待测菌液加入到 0.6% 半固体 LB 培养基中混匀,倒平板。取噬菌体悬液滴加到平皿的不同位置上,37 °C 培养 4~6 h,观察有无噬菌斑。

1.2.4 噬菌体 RZⅢ-3 的最佳感染复数(optimal multiplicity of infection, MOI) 将处于对数生长期的宿主菌用 LB 液体培养液洗涤,然后将细菌的浓度调整为 1.0×10⁸ cfu·mL⁻¹。MOI 分别为 0.001、0.01、0.1、1、10,将相应数量的噬菌体液加入到已准备好的菌液中(二者体积分别为 500 μL),混匀,37 °C 160 r·min⁻¹ 振荡培养 5 h。混合培养物 10 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,得到裂解液,测噬菌体效价。最高效价的感染复数即为最佳感染复数。

1.2.5 噬菌体 RZⅢ-3 的一步生长曲线 噬菌体液与宿主菌液各 500 μL 以 MOI 的比例混合,37 °C 孵育 15 min。10 000 r·min⁻¹ 离心 1 min,弃上清,LB 液体洗涤 3 次。加入 10 mL 37 °C 预热的 LB 液体培养基,充分混匀,迅速置于 37 °C 摇床中振荡培养。每隔 10 min 取样一次,测噬菌体的效价。

1.2.6 噬菌体 RZⅢ-3 最适生长温度 20、30、37、40、50 °C,各取 100 μL 噬菌体稀释液与 100 μL 宿主菌,利用双层琼脂平板法计数噬菌斑。

1.2.7 噬菌体 RZⅢ-3 的热稳定性 将噬菌体悬液放于 30、40、50、60、70、80 °C 水浴锅中,持续 30 和 60 min 后,各取 100 μL 噬菌体液与 100 μL 宿主菌混合,利用双层琼脂平板法计数噬菌斑。

1.2.8 噬菌体 RZⅢ-3 的最适 pH 调整 LB 液体培养基的 pH 分别为 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12,

每个 pH 均取 100 μL , 加入 100 μL 的 10^8 pfu \cdot mL $^{-1}$ 的噬菌体液混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 2 h, 双层平板法计数噬菌斑。

1.3 噬菌体 RZⅢ-3 裂解大肠杆菌 1019 的体外试验

1.3.1 SPF 鸡粪中大肠杆菌与高抗性大肠杆菌 1019 的 MIC 测定 参照 CLSI 标准, 微量肉汤稀释法测定 SPF 鸡粪中的大肠杆菌以及大肠杆菌 1019 对 13 种药物的 MIC 值。

1.3.2 在 SPF 鸡肠道噬菌体 RZⅢ-3 裂解大肠杆菌 1019 的试验 根据药敏结果选取新霉素药物制备麦康凯药板, 配制麦康凯药板, 质量浓度为 128 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (大肠杆菌 1019 MIC 的一半, 此浓度可以区分大肠杆菌 1019 和 SPF 鸡肠道原有的大肠杆菌)。

取 5 g SPF 鸡粪于 200 mL 液体 LB 培养基中, 同时加入大肠杆菌噬菌体 RZⅢ-3 和大肠杆菌 1019 各 100 μL 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜培养。培养的菌液 10 倍梯度稀释涂布麦康凯药板, 平板计数菌落; 单菌落于液体 LB 中 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜培养, 提取 DNA, 与原大肠杆菌 1019 的 DNA 同时作 Eric-PCR, 比对基因条

带判定噬菌体作用前后大肠杆菌有无变化。

1.4 SPF 鸡口服噬菌体 RZⅢ-3 治疗大肠杆菌 1019 感染的效果

口服攻毒, 大肠杆菌 1019 浓度 10^9 cfu \cdot mL $^{-1}$, 剂量为 2 mL。试验组分 3 小组, 即为只攻菌组、只攻噬菌体组、菌与噬菌体组, 每小组 3 只鸡, 口服噬菌体 2 mL \times 10^9 pfu \cdot mL $^{-1}$, 从 0 h 开始每隔 2 h 取粪样, 直到第 10 小时。每个粪样取 2 g 溶于 2 mL 生理盐水中混匀, 10 倍梯度稀释, 取稀释 10^3 、 10^4 和 10^5 倍的样品浓度涂布 256 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的新霉素麦康凯药板, 每个药板上加菌样 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养, 菌落计数, 统计经噬菌体治疗与未经噬菌体治疗的 SPF 鸡粪样中大肠杆菌 1019 数量。

2 结果

2.1 RZⅢ-3 的效价

图 1 为噬菌体 RZⅢ-3 的生长情况。大肠杆菌噬菌体 RZⅢ-3 的效价测定结果如下: 噬菌体 RZⅢ-3 双层板平均为 210 个噬菌斑, 计算出噬菌体富集液的效价为 2.1×10^9 pfu \cdot mL $^{-1}$ 。

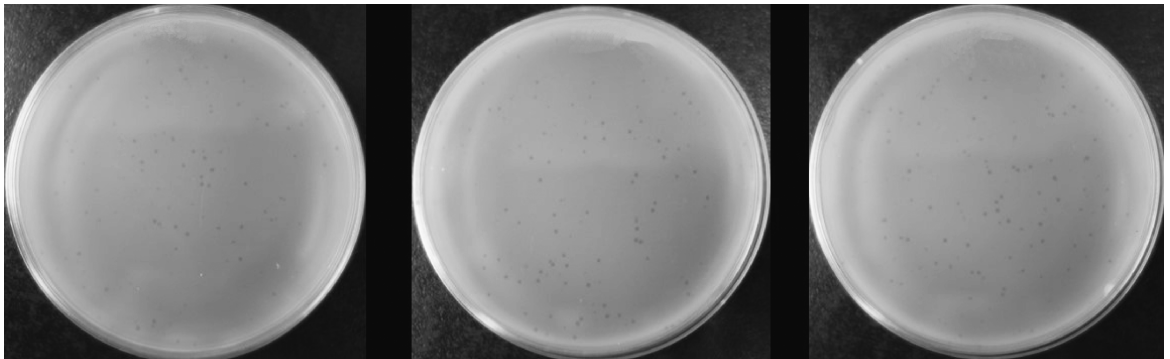


图 1 稀释了 10^6 倍的噬菌斑生长情况

Fig. 1 The growth rate of phage plaque (diluted 10^6 times)

2.2 RZⅢ-3 的电镜形态观察

图 2 为噬菌体 RZⅢ-3 的透射电镜图。结果显示噬菌体 RZⅢ-3 为有尾目噬菌体, 由二十面体头部与尾部组成, 头部直径约为 117 nm, 整个噬菌体长度约 239 nm, 属于 T4 噬菌体类型。

2.3 RZⅢ-3 的裂解谱分析

噬菌体 RZⅢ-3 的裂解谱显示大肠杆菌噬菌体的宿主特异性很强, 几乎不裂解沙门菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌及耐甲氧西林金黄色葡萄球菌, 但是可以裂解 95 株致病性大肠杆菌中的 22 株, 裂

解谱较宽。

2.4 RZⅢ-3 的最佳感染复数

最佳感染复数结果(图 3)显示大肠杆菌噬菌体 RZⅢ-3 的 MOI 为 0.1。

2.5 RZⅢ-3 的一步生长曲线

根据噬菌体 RZⅢ-3 的一步生长曲线(图 4), 噬菌体 RZⅢ-3 感染宿主菌 20 min 内, 噬菌体的量增加不大, 这段时间称为潜伏期; 感染宿主菌后 20 ~ 90 min, 噬菌体的量急速增加, 这段时间称之为爆发期, 即 RZⅢ-3 的爆发期约为 70 min。



图 2 噬菌体 RZⅢ-3 透射电镜图
Fig. 2 The transmission electron microscopy of *E. coli* phage RZⅢ-3

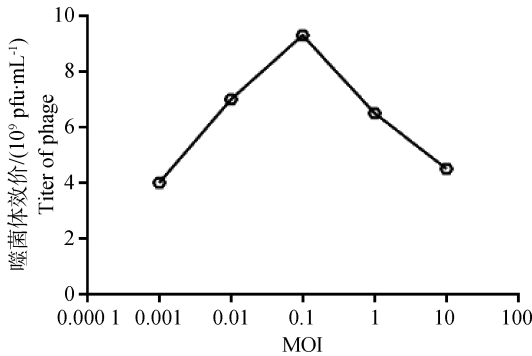


图 3 噬菌体 RZⅢ-3 的 MOI
Fig. 3 The MOI of phage RZⅢ-3

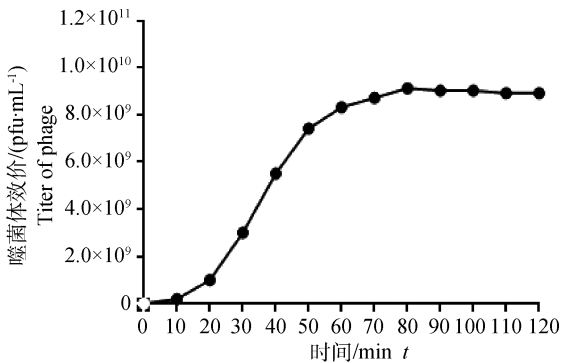


图 4 噬菌体 RZⅢ-3 的一步生长曲线
Fig. 4 One step growth curve of phage RZⅢ-3

2.6 RZⅢ-3 的最适生长温度

最适生长温度测定结果(图 5)显示噬菌体 RZⅢ-3 适合生长的温度在 30~40 °C,最适生长温度为 37 °C。

2.7 RZⅢ-3 的热稳定性

热稳定性测定结果(图 6)显示噬菌体 RZⅢ-3 在 30 和 40 °C 保温 30 min 和 1 h 后基本保持原活性,在 50 °C 保温 1 h 后噬菌体的效价仍可维持在

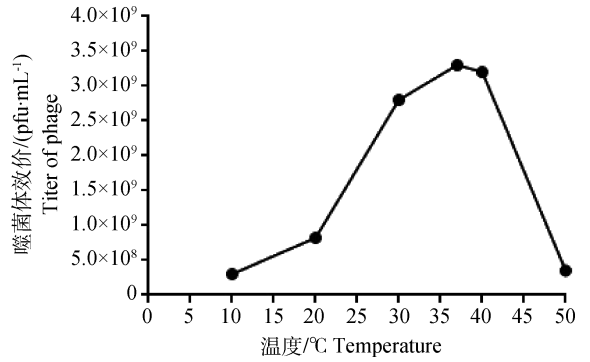


图 5 噬菌体 RZⅢ-3 的最适温度
Fig. 5 Optimal temperature of phage RZⅢ-3

10⁸ pfu · mL⁻¹。在 60 °C 保温 1 h 后效价可在 10⁷ pfu · mL⁻¹ 以上,经 70 °C 保温 1 h 后仍有噬菌体存活,而经 80 °C 作用后噬菌体基本上被灭活(此部分结果因显示条件所限在图 6 中未能体现)。由此可见这株噬菌体的热稳定性较好。

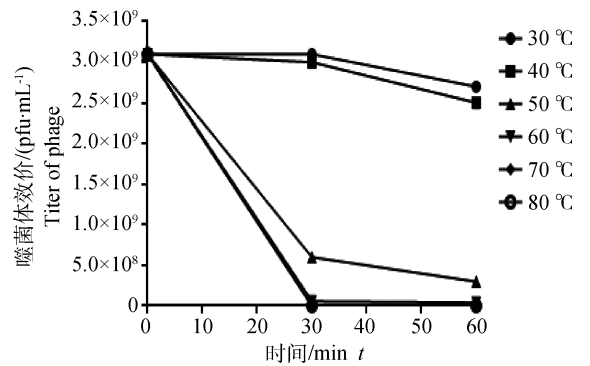


图 6 噬菌体 RZⅢ-3 的热稳定性
Fig. 6 Thermal stability of phage RZⅢ-3

2.8 RZⅢ-3 的最适 pH

大肠杆菌噬菌体 RZⅢ-3 的最适 pH 的测定结果统计分析如图 7 所示。大肠杆菌噬菌体 RZⅢ-3 的最适 pH 在 5~7,同时在 pH 4~10 时仍能保持较高的效价。所以噬菌体 RZⅢ-3 能适应较宽的 pH 范围。

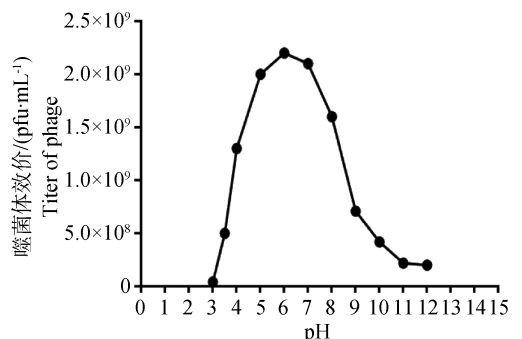


图 7 噬菌体 RZⅢ-3 的最适 pH
Fig. 7 The optimum pH of phage RZⅢ-3

2.9 RZⅢ-3 裂解大肠杆菌 1019 的体外试验

微量肉汤稀释法测定的大肠杆菌 1019 及 SPF 鸡粪中大肠杆菌对 13 种药物的 MIC 值。根据药敏结果统计分析,环丙沙星、多西环素、恩诺沙星、新霉素 4 种药可以有效地区分大肠杆菌 1019 与 SPF 鸡粪中原有的大肠杆菌。选取新霉素做后续耐药菌株的筛选。根据药敏结果大肠杆菌 1019 用 $256 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的新霉素麦康凯药板筛选。

筛选出来的耐药大肠杆菌提取 DNA, Eric-PCR 产物琼脂糖电泳条带如图 8 所示:结果显示 1019 菌株经噬菌体作用前后无变化,可以利用药敏试验的结果对噬菌体作用后的菌株进行筛选。

2.10 SPF 鸡口服 RZⅢ-3 治疗其相应大肠杆菌感染效果

攻毒后利用新霉素麦康凯平板对大肠杆菌 1019 分离计数,加入噬菌体后粪样中的耐药菌数量显著下降,结果见表 1。以 10 h 的统计结果计算,只口服大肠杆菌 1019 的 SPF 鸡每克粪样中大肠杆菌 1019 耐药菌含量为 $2.9 \times 10^7 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$,同时口服大肠杆菌 1019 和噬菌体 RZⅢ-3 的 SPF 鸡每克粪样中大肠杆菌 1019 耐药菌含量为 $1.0 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$,后者比前者降低了 96.5%。所以该大肠杆菌噬菌体可有效裂解致病性大肠杆菌 1019,降低 SPF 鸡的患病风险。

表 1 每克粪样中大肠杆菌 1019 耐药菌含量

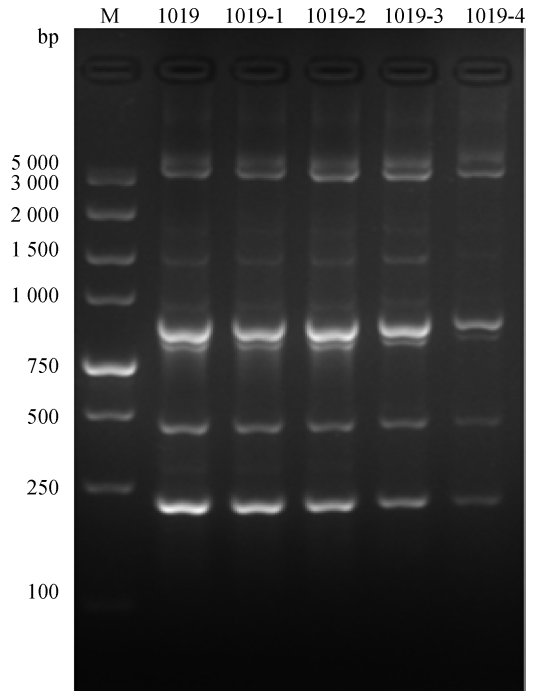
Table 1 The amount of *Escherichia coli* 1019 resistant bacteria per gram of fecal samples

处理 Treatment	取样时间/h Time					
	0	2	4	6	8	10
大肠杆菌 1019 <i>E. coli</i> 1019	0	2.1×10^6	5.0×10^6	2.7×10^7	3.0×10^7	2.9×10^7
大肠杆菌 1019+噬菌体 <i>E. coli</i> 1019+Phage	0	0	1.3×10^6	1.0×10^6	1.0×10^6	1.0×10^6

3 讨论

噬菌体在自然界分布广泛,据统计分析其数量可以达到 10^{31} [13]。大肠杆菌噬菌体更是广泛分布于鸡消化道、鸡场及周边环境[14]。充分利用这些噬菌体可以在一定程度上替代抗生素的使用,降低细菌耐药性,提高养殖企业的经济利益。

作者分离到的大肠杆菌噬菌体效价可达到 $10^9 \text{ pfu} \cdot \text{mL}^{-1}$,由 20 面体和尾部组成,属于 T4 类噬菌体。这与许多研究人员从养殖场粪便中、河水



M. 5 000 bp DNA 相对分子质量标准;1019. 原大肠杆菌 1019 DNA;1019-1,1019-2,1019-3,1019-4. 经噬菌体 RZⅢ-3 作用后的大肠杆菌 1019 DNA

M. 5 000 bp DNA marker; 1019. *Escherichia coli* 1019 DNA; 1019-1, 1019-2, 1019-3, 1019-4. *Escherichia coli* 1019 DNA after treatment of phage RZⅢ-3

图 8 大肠杆菌 Eric-PCR 产物琼脂糖电泳条带

Fig. 8 The *E. coli* Eric-PCR product agarose electrophoresis band

中和污水中分离出的噬菌体相似[15-17]。噬菌体 RZⅢ-3 的最佳感染复数为 0.1,感染宿主菌的潜伏期为 20 min,爆发期为 70 min。潜伏期和爆发期短,可以在短时间内杀死宿主菌,有效控制大肠杆菌的生长。噬菌体 RZⅢ-3 的裂解谱分析结果表明,RZⅢ-3 可以裂解 95 株致病性大肠杆菌中的 22 株,裂解谱较宽。

噬菌体 RZⅢ-3 的热稳定性较高,在 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 保温 1 h 后噬菌体效价仍可达到 $10^7 \text{ pfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以上。对 pH 的适应范围较宽,在 pH4~10 内能保持较高

的裂解活性。这些特性一方面可以使其在生产过程中不需要过于严苛的生产环境,可以降低生产成本,有利于大规模的工业生产。另一方面在应用时能适应多种环境,可以在相对复杂的环境中保持一定的裂解能力,有利于扩大该噬菌体的适用范围和应用效果。

在 SPF 鸡肠道中的杀菌试验表明噬菌体 RZⅢ-3 可显著降低其对应大肠杆菌在体内的存活数量。有研究报道^[18],噬菌体经胃酸作用后会失活,但是本试验表明,噬菌体 RZⅢ-3 经胃酸作用后仍能有效杀死宿主菌,这也是该噬菌体的优势之一。

目前抗生素耐药性越来越严重,噬菌体作为杀菌物质具有很大的优势和应用潜力。本研究中分离到的 RZⅢ-3 只是数量庞大的噬菌体中的一株。分离新的噬菌体并对其性质进行深入研究,可以为其成为新的抗菌剂打下基础。同时,还需要对其临床应用过程中的问题进行研究^[19]。相信经过众多科研工作者的努力,噬菌体会在很大程度上弥补抗生素的缺陷,在畜禽细菌病防治中起到越来越重要的作用。

4 结 论

大肠杆菌噬菌体 RZⅢ-3 的效价为 10^9 pfu · mL⁻¹, 属于有尾目 T4 噬菌体。RZⅢ-3 热稳定性好,60 °C 1 h 后效价仍可达到 10^7 pfu · mL⁻¹ 以上;最适 pH 在 7.0 左右,在 pH4~10 内能保持较高的裂解活性;最佳感染复数为 0.1,感染宿主菌的潜伏期 20 min,爆发期 70 min。RZⅢ-3 对大肠杆菌 1019 有较强的裂解能力,可使 SPF 鸡肠道内大肠杆菌 1019 的数量降低 96.5%,可望用于治疗特定的大肠杆菌感染。

参考文献 (References):

[1] GUABIRABA R, SCHOULER C. Avian colibacillosis: Still many black holes [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2015, 362(15): fnv118.

[2] DHAMA K, CHAKRABORTY S, BARATHIDASAN R, et al. *Escherichia coli*, an economically important avian pathogen, its disease manifestations, diagnosis and control, and public health significance: A review[J]. *Res Opin Anim Vet Sci*, 2013, 3(6): 179-194.

[3] LIU Y Y, WANG Y, WALSH T R, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mecha-

nism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study[J]. *Lancet Infect Dis*, 2016, 16(2): 161-168.

- [4] NOBREGA F L, COSTA A R, KLUSKENS L D, et al. Revisiting phage therapy: New applications for old resources[J]. *Trends Microbiol*, 2015, 23(4): 185-191.
- [5] D'HERELLE F. Bacteriophage as a treatment in acute medical and surgical infections[J]. *Bull N Y Acad Med*, 1931, 7(5): 329-348.
- [6] REARDON S. Phage therapy gets revitalized: The rise of antibiotic resistance rekindles interest in a century-old virus treatment [J]. *Nature*, 2014, 510(7503): 15-16.
- [7] CHAN B K, ABEDON S T, LOC-CARRILLO C. Phage cocktails and the future of phage therapy[J]. *Future Microbiol*, 2013, 8(6): 769-783.
- [8] DERDA R, LOCKETT M R, TANG S K Y, et al. Filter-based assay for *Escherichia coli* in aqueous samples using bacteriophage-based amplification[J]. *Anal Chem*, 2013, 85(15): 7213-7220.
- [9] TAZZYMAN S J, HALL A R. Lytic phages obscure the cost of antibiotic resistance in *Escherichia coli* [J]. *ISME J*, 2015, 9(4): 809-820.
- [10] KEEN E C, ADHYA S L. Phage therapy: Current research and applications[J]. *Clin Infect Dis*, 2015, 61(1): 141-142.
- [11] JAMALLUDEEN N, JOHNSON R P, FRIENDSHIP R, et al. Isolation and characterization of nine bacteriophages that lyse O149 enterotoxigenic *Escherichia coli*[J]. *Vet Microbiol*, 2007, 124(1-2): 47-57.
- [12] 张 倩, 于会举, 孙耀强, 等. 一株裂解性奶牛乳房炎源尿肠球菌噬菌体的分离及其生物学特性分析 [J]. *畜牧兽医学报*, 2017, 48(4): 706-713.
- ZHANG Q, YU H J, SUN Y Q, et al. Isolation and characterization of a lytic phage infecting *Enterococcus faecium* of bovine mastitis[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2017, 48(4): 706-713. (in Chinese)
- [13] HATFULL G F, HENDRIX R W. Bacteriophages and their genomes[J]. *Curr Opin Virol*, 2011, 1(4): 298-303.
- [14] 李 杨, 王 静, 霍 恺, 等. 大肠杆菌噬菌体的分离及生物学特性研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2014, 41(1): 7-10.
- LI Y, WANG J, HUO K, et al. Isolation and characterization of bacteriophage of *E. coli* isolated from

- soil of chicken farm[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2014, 41(1): 7-10. (in Chinese)
- [15] 张培东, 孙 岩, 任慧英, 等. 大肠杆菌噬菌体的分离及其生物学特性[J]. 中国兽医杂志, 2008, 44(4): 10-12.
- ZHANG P D, SUN Y, REN H Y, et al. Isolation and characterization of *E. coli* bacteriophage [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2008, 44(4): 10-12. (in Chinese)
- [16] 王 冉, 韩 晗, 张 辉, 等. 大肠杆菌 K88 噬菌体的分离鉴定及其生物学特性[J]. 华北农学报, 2012, 27(4): 163-167.
- WANG R, HAN H, ZHANG H, et al. Isolation and characterization of a lytic bacteriophage of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2012, 27(4): 163-167. (in Chinese)
- [17] BOURDIN G, SCHMITT B, GUY L M, et al. Amplification and purification of T4-like *Escherichia coli* phages for phage therapy: From laboratory to pilot scale[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(4): 1469-1476.
- [18] 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[J]. 微生物学通报, 2004, 31(2): 10-13.
- LI H, XIE H J, KONG J, et al. Biological characterization of fowl intestinal bacteriophage[J]. *Microbiology*, 2004, 31(2): 10-13. (in Chinese)
- [19] YOUNG R, GILL J J. Phage therapy redux—What is to be done? [J]. *Science*, 2015, 350(6265): 1163-1164.

(编辑 白永平)