

# 一株裂解性低温假单胞菌噬菌体的分离及特性研究

孙 策,赵 龙,魏云林,林连兵,张 琦,季秀玲\*

(昆明理工大学 生命科学与技术学院,中国云南 昆明 650500)

**摘 要:**从明永冰川低温土壤中分离、纯化获得一株低温假单胞菌噬菌体 PFV1,并对其生物学特性(噬菌体基因组限制性酶切片段长度多态性、衣壳蛋白组分分析及生理特征)进行了初步研究。基于 16S rRNA 基因测序分析结果,将宿主菌初步鉴定为荧光假单胞菌菌株。噬菌体 PFV1 为球形,直径约 50 nm。PFV1 在 4 °C 时具有感染活性,4-25 °C 范围内均可形成噬菌斑。对氯仿具有一定的敏感性,具有热不稳定性,基因组为双链 DNA,大小约 38 kb。

**关键词:**荧光假单胞菌;低温噬菌体;分离;特性

中图分类号: Q93

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2014)03-0222-05

## Isolation and Characterization of a Lytic Cold-active Bacteriophage of *Pseudomonas fluorescens*

SUN Ce, ZHAO Long, WEI Yun-lin, LIN Lian-bing, ZHANG Qi, JI Xiu-ling\*

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

**Abstract:** A lytic cold-active bacteriophage, designated as PFV1, was isolated from soil sample of Mingyong glacier. Restriction fragment length polymorphism analysis of genomic DNA, constituent proteins and physiological analysis of PFV1 were further carried out to characterize the phage. Based on the 16S rRNA gene sequence, the host strain was identified as a member of *Pseudomonas fluorescens*. The morphology of the isolated phage was observed by electron microscope. The bacteriophage is spherical, about 50 nm in diameter. Physiological analysis results showed that PFV1 had infection activity at 4 °C, and plaques were formed between 4 and 25 °C. It was sensitive to chloroform, and showed thermolability. Furthermore, the genome of PFV1 consists of double-stranded DNA and is approximately 38 kb.

**Key words:** *Pseudomonas fluorescens*; cold-active bacteriophage; isolation; characterization

(*Life Science Research*, 2014, 18(3): 222~226)

低温噬菌体通常是指可以在小于或等于 4 °C 的温度下能够感染并进行增殖的噬菌体<sup>[1]</sup>。尽管约 80% 地球表面积处于 ≤4 °C 的环境,而且这些环境中存在着大量的噬菌体,但对冰雪、永久冰冻地带和冰川地区的噬菌体系统的调查研究才刚刚开始<sup>[2]</sup>。目前对于低温噬菌体的研究还停留在环境调查阶段,主要是通过一些非培养的方法研究环境中噬菌体的种类和数量。此外对于低温噬菌

体来说,上述方法也不能证明哪些噬菌体属于低温噬菌体,而对于噬菌体的开发利用也要求分离得到噬菌体资源。

目前分离到的低温噬菌体主要是从污水、冰箱、表层海水与海底沉积物、海冰等环境中分离出来的<sup>[3-5]</sup>。明永冰川位于我国生物多样性丰富的三江并流地区,属于梅里雪山山系,是全球罕见的低纬度、低海拔、季风海洋性冰川<sup>[6]</sup>。本文从明永冰

收稿日期: 2013-10-09; 修回日期: 2013-12-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31160121); 云南省教育厅基金资助项目(2013Z138); 中国科学院微生物研究所微生物资源前期开发国家重点实验室开放课题(SKLMR-20110606); 云南省中青年科学与技术带头人后备人才项目(2009CI027)

作者简介: 孙策(1987-),男,河北衡水人,硕士研究生,主要从事低温微生物学研究, E-mail: 865627391@qq.com; \* 通讯作者: 季秀玲(1980-),女,内蒙古赤峰人,讲师,主要从事微生物研究, E-mail: jixiuling1023@126.com, Tel: 0871-65920148。

川土壤样品中分离、纯化获得一株低温假单胞菌的噬菌体,并对其生物学特性进行了初步研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

采样地点位于云南省明永冰川冰舌地区(N28°27',E98°48')。取冰舌地区不同地点冰泥样品3份,用密封袋密封好,样品在被运回实验室后置于4~8℃保存。

### 1.2 培养基

LB培养基,pH 7.0。固体培养基的琼脂浓度为2%,半固体培养基的琼脂浓度为0.6%。

### 1.3 低温宿主菌及其噬菌体的分离

低温宿主菌的分离采用稀释涂布平板法,取不同采样点土壤样品2g于100mL无菌水中震荡,土壤悬浮液梯度稀释涂布LB固体平板,置于15℃恒温培养箱培养3~4d,划线纯化获得纯菌株作为噬菌体分离的宿主菌。

低温噬菌体采用双层平板法分离<sup>[7]</sup>,将大约10g土壤样品加入100mL液体LB培养基中,4~8℃静止放置2周富集噬菌体。富集液于6000r/min离心10min,经0.45μm滤膜过滤。将200μL噬菌体滤液与300μL培养至对数生长期的宿主菌混合,15℃静置10min,然后加入3mL加热融化并冷却至约35℃的半固体培养基,混匀,倾倒在LB固体平板上,形成双层平板。15℃培养2~3d,观察噬菌斑产生情况。用牙签挑取单个噬菌斑于液体LB培养基中,经适当稀释重复噬菌斑实验,直至噬菌斑的大小和形态特征保持均匀一致,即认为噬菌斑已分纯。

### 1.4 宿主菌的16S rRNA基因扩增及测序

采用细菌通用引物f1:5'-AGAGTTTGATC-CTGGCTCAG-3'和r2:5'-ACGGCTACCTTGTTAC-GACTT-3'扩增宿主16S rRNA基因。PCR产物经胶回收后,与pMD18-T载体连接,连接产物经化学法转化*E. coli* DH5α感受态细胞;以M13(RV/M<sub>13</sub>)作为引物利用PCR检测重组子,挑取阳性克隆,由上海生物工程技术有限公司完成测序。

### 1.5 噬菌体的形态观察

取效价达到10<sup>10</sup> pfu/mL的噬菌体液20μL,用2%磷钨酸(PTA)染色后用日立H-7500型电子显微镜观察噬菌体形态。

### 1.6 宿主菌生长温度范围及一步生长曲线测定

将15℃生长的宿主菌PF1用接种环在LB

培养基中划线接种,分别放置于4、15、28、37℃培养2~3d,观察宿主菌的生长状况。

宿主菌于LB培养液15℃培养12h左右,以1/100比例接入新鲜LB培养基中。测定OD<sub>600</sub>值即为生长曲线中的零时读数,每隔2h取样并测定OD<sub>600</sub>吸光度值。以培养时间为横坐标,OD<sub>600</sub>的吸光度值为纵坐标,绘制宿主菌PF1的生长曲线。

### 1.7 低温噬菌体特性研究

#### 1.7.1 噬菌斑形成温度范围实验

把适量噬菌体与宿主菌混合,于15℃吸附10min,倒双层平板,分别放置在4、15、25、28、37℃培养,3d后观察噬菌斑形成情况。

#### 1.7.2 噬菌体一步生长曲线

噬菌体一步生长曲线测定采用Lu<sup>[8]</sup>的方法。

#### 1.7.3 最佳感染复数的测定

最佳感染复数的测定参照Lu<sup>[8]</sup>等的方法。按照感染复数分别为0.001、0.01、0.1、1和10的比例分别将噬菌体纯培养液加入到含对数期宿主菌的试管中,15℃,170r/min培养3.5h,10000g离心10min,收集上清作连续梯度稀释,测定噬菌体滴度,作双份取平均值;同时以不加噬菌体的宿主菌和不加宿主菌的噬菌体作为对照。

#### 1.7.4 热稳定性测定

将滴度稀释至为1×10<sup>7</sup> pfu/mL的噬菌体悬液1mL置于40、50、60、70℃水浴锅中,每隔5min取样,测定噬菌体滴度变化。

#### 1.7.5 有机溶剂耐受性

分别将10、20、40、80μL氯仿加入到1×10<sup>7</sup> pfu/mL噬菌体原液中(1mL),同时以不加氯仿为对照,15℃放置1h,6000r/min离心5min,测定噬菌体滴度变化。

### 1.8 噬菌体DNA的提取及限制性酶切片段分析<sup>[9]</sup>

将100mL噬菌体富集液培养至效价为10<sup>10</sup> pfu/mL,利用Beckman离心机固定角转头JA-10于6000g离心15min,去除培养液中的菌体及细胞碎片,收集上清并加入DNase I和RNase A(终浓度为1μg/mL),室温消化30min,利用Beckman离心机固定角转头JA-10于6000g离心1h,沉淀用无菌水重悬,离心后的上清液即为含噬菌体颗粒的噬菌体悬液。

在1mL制备好的噬菌体悬液中加入EDTA(pH 8.0)至终浓度20mmol/L,加入蛋白酶K至终浓度50μg/mL,加SDS为终浓度至0.5%,56℃温浴1h,利用酚/氯仿法抽提噬菌体DNA,利用乙

醇沉淀法获得 DNA, 所得样品分别用 *Hind* III、*Eco*R I、*Bam*H I 和 *Pst* I 进行酶切分析。

### 1.9 噬菌体蛋白组成分析<sup>[9]</sup>

将 1 L 效价达到  $10^{10}$  pfu/mL 噬菌体富集液于 4 °C, 11000 g 离心 15 min, 收集上清并加入 DNase I 和 RNase A (终浓度为 1 μg/mL), 室温消化 30 min, 加入 NaCl 至终浓度为 1 mol/L, 冰浴 1 h。4 °C, 11 000 g 离心 10 min, 以去除细菌碎片, 收集上清并加入 PEG 8 000 至终浓度为 10%, 冰浴 1 h。4 °C, 11 000 g 离心 10 min, 收集噬菌体沉淀, 用 13 mL SM 缓冲液溶解, 等体积的氯仿抽提, 11 000 g 离心 10 min 收集水相。水相中加入 0.5 g/mL CsCl, 溶解后利用 Beckman 离心机 SW41 于 100 000 g 离心 24 h, 收集噬菌体, 在 SM 缓冲液中透析, 样品用于 SDS-PAGE 分析以确定噬菌体蛋白组分。

## 2 结果

### 2.1 低温菌及其裂解性噬菌体的分离

从低温的冰川样品中分离到约 100 株细菌, 且大部分为假单胞菌, 这与以前在同一取样点分离的结果相似<sup>[10]</sup>, 分离、纯化获得一株低温噬菌体。噬菌斑透明、边缘清晰、圆形, 直径约 5 mm, 出斑时间约 10 h, 表现为明显的裂解性噬菌体噬斑特征。

宿主菌 16S rRNA 基因序列同源检索分析表明其与荧光假单胞菌同源性最高, 达到 99%, 因此将其初步鉴定为荧光假单胞菌菌株。

### 2.2 低温噬菌体形态观察

噬菌体为球形, 直径约 50 nm, 外壳的中间比较亮, 说明内部是空的, 根据形态初步判断为覆层噬菌体科噬菌体。

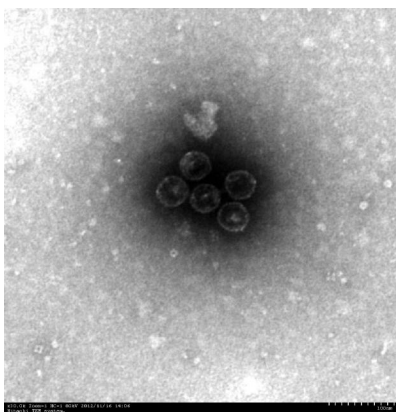


图 1 噬菌体电子显微形态

Fig.1 Transmission electron microscopy of phage

### 2.3 宿主菌生长温度范围及一步生长曲线

宿主菌可在 4~28 °C 生长, 属于耐冷菌, 与典型的荧光假单胞菌性质相似。

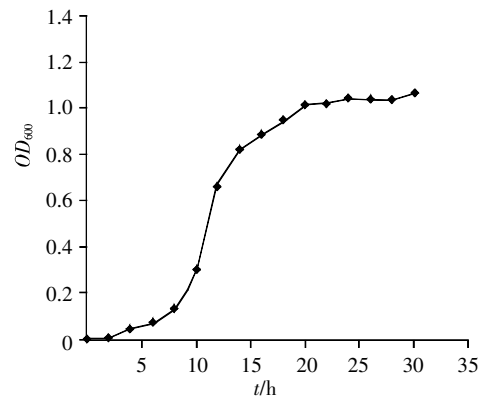


图 2 宿主菌 PF1 的生长曲线

Fig.2 The growth curve of host PF1

从图 2 可以看出宿主菌在第 9 h 开始进入对数期, 对数期一直持续到第 22 h, 菌体浓度到达高峰值, 以后进入稳定期。

### 2.4 低温噬菌体特性研究

#### 2.4.1 噬菌体生长范围实验

噬菌体可在 4、15、25 °C 形成噬菌斑, 在 28 °C 以上不能形成噬菌斑。在 4 °C 能够侵染宿主并增殖, 形成清晰的噬菌斑, 因此属于典型的低温噬菌体。

#### 2.4.2 噬菌体的一步生长曲线

噬菌体吸附宿主菌后进行培养的不同时间取样, 测定上清液中噬菌体滴度(图 3)。

从图 3 可以看出噬菌体的潜伏期约为 60 min, 裂解期大约为 20 min, 噬菌体的潜伏期与噬菌体、宿主菌及环境条件都有关, 不同噬菌体于同一菌株生长, 或相同噬菌体于不同宿主菌生长, 潜伏期都不同。

根据公式: 爆发量 = 爆发末期噬菌体滴度 / 初期被感染宿主菌浓度, 计算得出 PFV1 的爆发量为 10。

#### 2.4.3 噬菌体最佳感染复数

对数期宿主菌浓度为  $9 \times 10^9$  /mL, 噬菌体原液中噬菌体滴度为  $1 \times 10^{10}$  pfu/mL。噬菌体和宿主菌混合培养 3.5 h 后, 宿主菌被充分裂解, 培养液变得澄清, 计数各测定管中噬菌体滴度(表 1)。

根据表 1, 当 MOI=1 时噬菌体感染其宿主产生的子代噬菌体数量最多, 可以达到  $9.8 \times 10^{10}$  pfu/mL, 因此确定噬菌体在以假单胞菌为宿主时的最佳感染复数为 1。

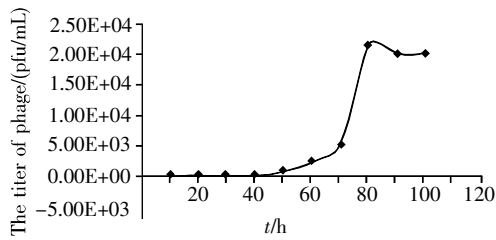


图 3 噬菌体一步生长曲线

Fig.3 One step growth curve of phage

表 1 噬菌体最佳感染复数的测定

Table 1 Determination of optimal multiplicity of infection

Multiplicity of infection	Bacterial count	Phage	Titer after 3.5 h (pfu/mL)
0.001	1.5×10 <sup>9</sup>	1.5×10 <sup>6</sup>	4.1×10 <sup>6</sup>
0.01	1.5×10 <sup>9</sup>	1.5×10 <sup>7</sup>	1.4×10 <sup>8</sup>
0.1	1.5×10 <sup>9</sup>	1.5×10 <sup>8</sup>	1.24×10 <sup>9</sup>
1	1.5×10 <sup>9</sup>	1.5×10 <sup>9</sup>	9.8×10 <sup>10</sup>
10	1.5×10 <sup>9</sup>	1.5×10 <sup>10</sup>	2.8×10 <sup>10</sup>

2.4.4 噬菌体热稳定性测定

分别在 40、50、60、70 °C 条件下处理噬菌体 PFV1。70 °C 处理 5 min 和 60 °C 处理 15 min 后全部失活。即使 40 °C 处理 15 min, 存活率也只有原来的 42%(表 2)。因此, 该噬菌体对温度比较敏感。这与已经分离到的其他低温噬菌体噬菌体性质十分相似<sup>[11,13]</sup>, 而一般高温噬菌体可以耐受到 80~90 °C。

表 2 噬菌体热稳定性

Table 2 Determination of thermolability of phage

Processing temperature/°C	5 min	10 min	15 min
Control(15)	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>
40	7.7×10 <sup>5</sup> (77%)	5.9×10 <sup>5</sup> (59%)	4.2×10 <sup>5</sup> (42%)
50	5.0×10 <sup>5</sup> (50%)	3.0×10 <sup>5</sup> (30%)	1.5×10 <sup>5</sup> (15%)
60	2.6×10 <sup>4</sup> (2.6%)	4.6×10 <sup>3</sup> (0.46%)	0
70	0	0	0

2.4.5 有机溶剂耐受性

荧光假单胞菌噬菌体对氯仿具有一定的敏感性, 氯仿处理后只保留 65% 的滴度, 推断噬菌体病毒粒可能含脂类物质, 因此, 造成了其对氯仿具有一定敏感性。

2.5 限制性酶切片长度多态性分析

分离到的低温噬菌体的基因组为双链 DNA, 可以被 *Hind* III、*Eco*R I、*Bam*H I 和 *Pst* I 切成多条大小不等的片段, 进一步分析表明其基因组 DNA 大小约 38 kb(图 4)。

2.6 噬菌体衣壳蛋白组成分析

噬菌体 PFV1 蛋白组成的 SDS-PAGE 电泳结果如图 5 所示, 根据图谱分析, 噬菌体衣壳蛋白组成

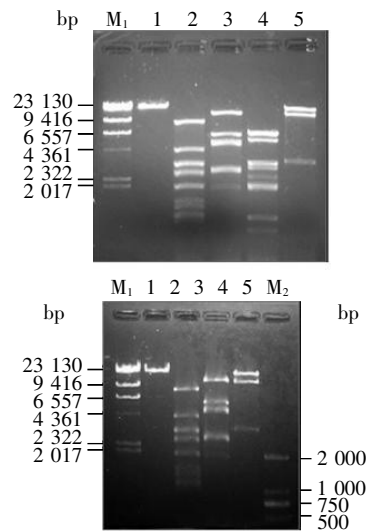


图 4 噬菌体 PFV1 的 DNA 限制性酶切图谱

Fig.4 Restriction endonuclease digestion patterns of PFV1 DNA

M<sub>1</sub>: λDNA/ *Hind* III Marker; 1: genomic PFV1 DNA; 2: DNA digested with *Hind* III; 3: DNA digested with *Eco*R I; 4: DNA digested with *Bam*H I; 5: DNA digested with *Pst* I; M<sub>2</sub>: DL 2 000 Marker.

有 5 条主要条带, 初步估计其大小(由上至下)分别为 65、62、47、44、15 kD, 其中 47 kD 和 44 kD 这两条主条带的含量较高, 推测可能为其重要的结构蛋白。

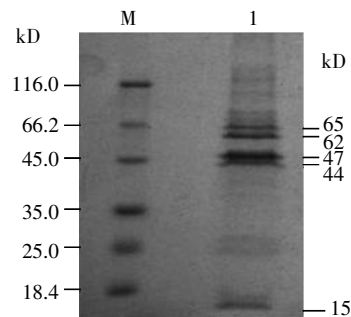


图 5 噬菌体 PFV1 组成蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE analysis of phage PFV1 constituent proteins.

M: protein Marker; 1: purified phage constituent proteins.

3 讨论

低温微生物特别是两极地区、深海以及冰川中的微生物由于长期生活在低温、寡营养的极端环境中, 形成了极为独特的基因、遗传背景和代谢机制。20 世纪 90 年代后, 低温微生物及其相关产品(如低温酶类、抗冻蛋白、多聚不饱和脂肪酸以及抗肿瘤药物等)在现代生物工程中的潜在价值逐渐得到广泛认同并引起关注, 成为一个新的研究热点领域。然而低温环境中病毒的分布和含量是非常丰富的, 平均可达到 10<sup>6</sup>~10<sup>8</sup>/mL, 其中

绝大部分为噬菌体<sup>[2,14,16]</sup>,但对低温噬菌体的研究则相对滞后。

假单胞菌是微生物的重要类群,广泛分布于土壤、淡水、海水以及生物体中,是自然界分布最广的微生物之一。噬菌体分布极广,凡是有细菌的场所,就可能有相应噬菌体的存在。国外对低温噬菌体的研究可追溯到 20 世纪 20 年代,1927 年 Elder 和 Tanner 从污水中一株未鉴定的细菌中分离到低温“裂解性噬菌体”,但关于噬菌体-宿主系统未作深入研究<sup>[17]</sup>。而 Olsen 是首次对分离自污水并侵染假单胞菌的低温噬菌体进行了系统研究的微生物学家,结果发现与 25 °C 相比,5 种噬菌体在 3.5 °C 时均具有较长的潜伏周期(6~12 h VS 0.5~1 h)和较少的裂解量(6~25 VS 23~120)<sup>[18]</sup>。

一般低温噬菌体增殖的温度范围为 0~20 °C,少数在低至-6 °C 温度下仍可以增殖。因此噬菌体的富集、分离都要在低温下进行。本研究中宿主菌在 15 °C 时生长较快,而且不影响大多数低温噬菌体的分离,因此选用 15 °C 分离低温噬菌体。由于在较高温度时,噬菌体会发生失活,宿主在较高温度刺激下表型可能发生变化从而影响噬菌体吸附,进而影响到低温噬菌体的分离,因此在选择半固体培养基时要考虑到培养基的凝固温度,凝固温度过高不利于噬菌体分离。0.4 % 的琼脂糖的凝固温度约为 35 °C,对于低温噬菌体和宿主来说条件比较温和,有利于低温噬菌体的分离。

热不稳定性是低温噬菌体最显著的特点之一。常温噬菌体通常可以在 60 °C 耐受 60 min,活性损失很少;而低温噬菌体在 60 °C 或 60 °C 以下的温度耐受 10 min 就有 99% 以上失活<sup>[11]</sup>。低温噬菌体的热稳定性比常温及高温噬菌体差的原因目前尚未确定。但从 DNA 的溶解温度和 G+C 含量来判断,低温噬菌体与常温及高温噬菌体的核酸组成是相似的,热不稳定性可能反映了噬菌体蛋白质的性质。低温酶通过特殊的组成和构象变化使得它有更好的柔性和更高的催化效率,但也造成了它的热不稳定性。噬菌体是包裹着 DNA 的蛋白质颗粒,在一定程度上,可以说噬菌体颗粒就是细胞外的酶分子,因此关于低温酶的结论对低温噬菌体依旧成立。确实,很多噬菌体颗粒含有水解肽聚糖的酶以使噬菌体 DNA 进入细胞<sup>[19]</sup>。与细胞受体正确的结合、改变头尾连接体的定位或与宿主识别和 DNA 注入相关的其他特性都可以增加蛋白质的柔性进而导致噬菌体的热不稳定性<sup>[20]</sup>。

低温嗜菌体的研究不仅可以丰富和发展对生命形式的认识,而且在构建低温菌表达系统的人工载体和开发低温下高活性的工业用酶以及分子生物学工具酶等方面,都有着广泛的应用前景。

## 参考文献(References):

- [1] WELLS L E, DEMING J W. Characterization of a cold-active bacteriophage on two psychrophilic marine hosts [J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2006, 45(1):15-29.
- [2] SAWSTROM C, GRANIELI W, LAYBOURN-PARRY J, *et al.* High viral infection rates in antarctic and arctic bacterioplankton[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(1):250-255.
- [3] MIDDELBOE M, GLUD R N, WENZHO FER F, *et al.* Spatial distribution and activity of viruses in the deep-sea sediments of SAGAMI Bay, Japan [J]. *Deep Sea Research*, 2006, 53(1): 1-13.
- [4] BETTAREL Y, SIME-NGANDO T, AMBLARD C, *et al.* Viral activity in two contrasting lake ecosystems[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2004, 70(5): 2941-2951.
- [5] DANOVARO R, DELL ANNO A, CORINALDESI C, *et al.* Major viral impact on the functioning of benthic deep-sea ecosystems[J]. *Nature*, 2008, 454(7208): 1084-1087.
- [6] 郑本兴, 赵希涛, 李铁松, 等. 梅里雪山明永冰川的特征与变化[J]. 冰川冻土(ZHENG Ben-xing, ZHAO Xi-tao, LI Tie-song, *et al.* Features and fluctuation of the melang glacier in the Mainri mountain[J]. *Journal of Glaciology and Geocryology*), 1999, 21(2): 145-150.
- [7] MARTHA R J, CLOKIE A M. Bacteriophages: Methods and protocols, Volume I: Isolation, characterization and interaction[M]. USA: Human Press, 2008.
- [8] LU Z, BREIDT F J, FLEMING H P, *et al.* Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, phi-JL-1, from a cucumber fermentation[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 84(2): 225-235.
- [9] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W 著. 分子克隆实验指南(第三版)(上册)[M]. 黄培堂, 王恒稷, 周晓巍, 等(译). 北京: 科学出版社(SAMBROOK J, RUSSELL D W. *Molecular Cloning a Laboratory Manual (Vol.3)*[M]. HUANG Pen-tang, WANG Heng-liang, ZHOU Xiao-wei, *et al.* Beijing: Science Press), 2002. 186-193.
- [10] 魏云林, 周长涛, 林连兵, 等. 明永冰川地区假单胞菌的分离与系统发育分析[J]. 云南大学学报(WEI Yun-lin, ZHOU Chang-tao, LIN Lian-bing, *et al.* Phylogenetic analysis of several *Pseudomonas* strains isolated from Mingyong glacier[J]. *Journal of Yunnan University*), 2007, 29(5): 408-412.
- [11] WELLS L E, DEMING J W. Effects of temperature, salinity and clay particles on inactivation and decay of cold-active marine Bacteriophage 9A[J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2006, 45(1): 31-39.
- [12] MIDDELBOE M, NIELSEN T G, BJORNSEN P K. Virus and bacterial production in the North Water: *In situ* measurements, batch-culture experiments and characterization and distribution of a virus-host system[J]. *Deep-Sea Research II*, 2002, 49(22-23): 5063-5079.
- [13] BORRIS M, HELMKEE, HANSCHKE R, *et al.* Isolation and characterization of marine psychrophilic phage-host systems from Arctic sea ice[J]. *Extremophiles*, 2003, 7(5): 377-384.
- [14] BREITBARTL M, ROHWER F. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus[J]. *Trends in Microbiology*, 2005, 13(6): 278-284.
- [15] ACKERMANN H W. 5500 Phages examined in the electron microscope[J]. *Archives of Virology*, 2007, 152(2): 227-243.
- [16] SIME-NGANDO T, COLOMBET J. Virus and prophages in aquatic ecosystems[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2009, 55(2): 95-109.
- [17] ELDER A L, TANNER F W. Action of bacteriophage on psychrophilic organisms[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 1928, 43: 403-406.
- [18] OLSEN R H, METCALF E S, TODD J K. Characteristics of bacteriophages attacking psychrophilic and mesophilic *Pseudomonads*[J]. *Journal of Virology*, 1968, 2(4): 357-364.
- [19] MOAK M, MOLINEAUX I J. Peptidoglycan hydrolytic activities associated with bacteriophage virions[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 51(4): 1169-1183.
- [20] WELLS L E. Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology-cold-active viruses[M]. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008. 157-173.