

枯草杆菌 *Bacillus subtilis* 溶源菌株 Bs47 的分离 及某些特性的观察*

陈 慎 陆德如

(中国科学院微生物研究所, 北京)

把保藏的 144 株枯草杆菌分成 6 个试验菌株组, 用分羣混合双层法, 从 6 个菌株组内分离到 4 株带噬菌体的菌株。选择其中一株, 其所带的噬菌体对 Ki-2 菌株能转导的 Bs47 菌株, 对其溶源性作了初步的观察。根据单菌落传代孢子加热以消除游离噬菌体后, 仍继续释放噬菌体, 以及 Bs47 菌株对其本身所释放的噬菌体表现免疫性等这些特点, 从而确定 Bs47 是溶源性菌株。应用丝裂霉素 C 或紫外线进行产生噬菌体诱导试验, 结果都有诱导效应。增加噬菌体产生量, 前者达 1,000 倍, 后者在 10 倍以上。

枯草杆菌 *Bacillus subtilis* 噬菌体的研究早有报导^[1]。由于枯草杆菌在工业上的应用^[2,3]和近年来遗传研究的进展^[4,5], 逐渐引起人们对其噬菌体的注意。在 Romig^[6]等报导它的分离方法及其初步特性观察以后, 相继已有不少有关温和噬菌体和转导的报导^[7-10], 但所用的噬菌体都分自土壤中。

在研究枯草杆菌溶源性问题, Romig 与 Brodetsky 认为溶源性不稳定, 容易失去。Takahashi 除有类似的发现以外, 还作了紫外线诱导实验而没有得到结果。Ivanovics 等用紫外线处理溶源菌, 没有获得比自发释放量更高的噬菌体效价。而最近 Bott 与 Strauss 研究转导噬菌体 Sp 10 的溶源性, 同前述作者一样, 也获得与真溶源性不同的结果。

在研究枯草杆菌噬菌体诱导方面 Seaman 等^[12]用丝裂霉素 C (Mitomycin C) 诱导, 而 Barbander 曾想用胸腺嘧啶缺陷型进行诱导研究^[13], 但因没有获得适当的溶源性菌株而没有结果。

我们要获得温和噬菌体进行转导试验, 除从土壤中分离噬菌体外, 还从保藏菌株分离噬菌体。在转导试验中, 观察到 Bs47 菌株所释放的噬菌体, 能对某些菌株进行转导, 因而对其溶源性作了初步的观察, 兹将结果报告如下:

材料与方法

1. 菌株 本所保存的与遗传研究所搜集的共 144 株枯草杆菌菌株。

2. 培养基 采用鉴定链霉素效价的牛肉汁培养基, 其中有些成分稍作了一些修改, 主要用作菌株的培养和繁殖以及噬菌体效价的测定, 其成分: 牛肉膏 3 克; 蛋白胨 6 克; 酵母膏 3 克; 氯化钠 10 克; 蒸馏水加至 1,000 毫升; pH 7.4; 用作固体培养基时, 加入琼脂 15—18 克, 作上层半固体培养基时加入 8 克。采用普通马铃薯葡萄糖琼脂培养基, 作为生孢子之用, 其成分: 马铃薯汁(2%) 1,000 毫升; 葡萄糖 20 克; 琼脂 15 克; pH 7.0。

* 本工作是在相望年先生指导下进行的, 王清海同志参加实验工作, 谨此一并志谢。

本文 1965 年 10 月 6 日收到。

3. 噬菌体增殖与定量 按 Adams^[14] 所述的方法进行。

其他有关从菌株中分离噬菌体, 溶源菌株确认方法, 以及噬菌体诱导效应等试验方法与步骤, 为叙述方便起见, 将分别在有关实验结果中叙述。

实验结果

(一) 溶源菌株的分离

分离溶源菌株, 一般先需测知带噬菌体的菌株。测定带噬菌体菌株的方法一般用点滴法^[15,16], 即把带噬菌体菌株的培养液除去细菌细胞, 然后滴于指示菌菌层上, 经过培养观察有无溶菌而确定是否为带噬菌体菌株。在放线菌中有采用分群混合点滴法^[17]。我们根据实验室的条件和枯草杆菌各菌株间存在着拮抗作用的特点, 采用分群混合双层法, 方法分两步进行:

1. 带噬菌体菌株与指示菌株的初测 把待试的菌株分别接种于牛肉汁培养液中, 37℃ 震荡培养 16 小时后, 即用 3,500 转/分离心沉淀 10 分钟, 取其上清液, 在一次试验采用的菌株数内, 取 6 株菌株为一群, 把上清液等量混合, 然后以各菌株为指示菌, 在牛肉汁固体培养基上应用一般的双层法进行测定。一般随机取出 24 株作为一次试验采用的菌株数, 亦即被试验的菌株组。在菌株组内各菌株互为指示菌。

2. 带噬菌体菌株的确定与噬菌体的纯化 在出现溶菌斑或类溶菌斑的菌株群内, 采用原指示菌, 把该群内各菌株的上清液, 分别进行双层法试验, 初步确定带噬菌体的菌株, 最后, 把初步确定带噬菌体的菌株的上清液用细菌漏斗过滤, 再行双层法试验以确定带噬菌体的菌株; 至于噬菌体则用挑单溶菌斑的方法, 连续 3 次, 进行纯化, 然后放入 1% 蛋白胨液中并在 4℃ 冰箱中保存。

把 144 株菌株分成 6 个试验的菌株

组, 在菌株组内各菌株互为指示菌, 进行多次测定¹⁾, 兹将部分结果列于表 1。

表 1 枯草杆菌(*B. subtilis*) 带噬菌体菌株与其指示菌株

带噬菌体菌株	指示菌株
Bs 47	1.418
1.315B	1.280B
1.416	1.415
1.280A	1.262

(二) 溶源菌株 Bs47 的确认

1. 单菌落传代 把菌株 Bs 47, 用生理盐水稀释使细胞浓度为 5×10^2 /毫升左右, 吸取 0.1 毫升在牛肉汁固体平面培养基上, 用玻璃刮子均匀涂布, 37℃ 培养 24 小时, 挑取孤立菌落, 再用生理盐水稀释并再涂布于牛肉汁固体培养基上, 如此反复 6 次, 最后把前后所得的孤立菌落和其原始的菌落, 分别接种于牛肉汁培养液中, 37℃ 震荡培养 16 小时后, 取其上清液并用 1% 蛋白胨液稀释, 用双层法测定溶菌斑数, 结果如表 2。

表 2 枯草杆菌 (*B. subtilis*) Bs47 菌株单菌落后代培养物中每毫升的溶菌斑数

原始菌落	单菌落后代(代号)				
	1	2	3	4	5
8×10^3	5.3×10^3	5.0×10^3	1.25×10^4	3.5×10^3	7.0×10^3

从表 2 看到, 单菌落后代都释放噬菌体, 所释放的数量基本上也是一致的, 说明溶源菌株 Bs47 经过单菌落连续 6 次的传代以去除游离噬菌体, 经过培养仍产生噬菌体。

2. 孢子加热处理 取 Bs47 菌株, 接种于马铃薯葡萄糖培养基上, 37℃ 培养 5—7 天, 镜检大部分已形成孢子后, 就用无菌生理盐水悬浮, 连续洗涤 2—3 次以减少游离噬菌体, 然后在 80℃ 加热 30 分钟, 以灭活

1) 在菌株组间, 以各菌株互为指示菌, 尚未进行测定。

游离噬菌体，最后把经处理过的芽孢接种在牛肉汁培养液中，37℃ 震荡培养 10—12 小时，离心取其上清液，用双层法测定溶菌斑数，结果如表 3。

表 3 枯草杆菌 (*B. subtilis*) Bs47 菌株芽孢悬液用热处理前后及培养后噬菌体的变化

处 理 前	处 理 后	培 养 后
1×10 ³	0	3×10 ³

从表 3 的结果看出，经过热处理后，孢子悬液中没有游离的噬菌体，但经过培养后，继续产生噬菌体，说明溶源菌株 Bs47 用热处理除去游离噬菌体后，存活的孢子经过培养，继续产生噬菌体。

3. 免疫性 把 Bs47 菌株用为指示菌，并用其本身所释放的噬菌体 (4.0 × 10⁶/毫升) 进行感染，以其原来的敏感菌 1.418 为对照，用双层法进行测定，结果如表 4。另外又在同一培养皿上，把 Bs47、1.418 菌株进行划线，然后滴上噬菌体悬液，结果如图 1。

表 4 枯草杆菌 (*B. subtilis*) Bs47 菌株对其自身所释放的噬菌体的免疫性*

指 示 菌	噬菌体稀释倍数				蛋白胨液
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁵	
1.418	+++	+++	407	3	0
Bs 47	0	0	0	0	0

“+++”表示培养皿上溶菌斑很多，难以计数；
* 表中数字系代表 0.1 毫升中的溶菌斑数。

从表 4 和图 1 都可看出，只有在指示菌 1.418 上才能看到溶菌，而在 Bs47 菌株上，却不能看到溶菌，说明溶源菌株 Bs47 对其自身所释放的噬菌体表现免疫性。

4. 诱导效应

(1) 用紫外线诱导 把 Bs47 菌株接入牛肉汁培养液中，37℃ 震荡培养 16 小

时，然后吸 0.5 毫升菌液再接入 7 毫升牛肉汁培养液中，继续在 37℃ 震荡培养约 7 小时。取第二次培养后的菌液，进行离心沉淀，并悬浮于生理盐水中，然后进行稀释使菌浓度达每毫升 10⁶，取此菌液 2.5 毫升放入直径 6 厘米的培养皿中，进行紫外线照射处理，紫外线灯系荷兰 Philips 公司出品，15W，波长 2537 Å，照射距离 30 厘米。



图 1 枯草杆菌 (*B. subtilis*) Bs47 菌株对其自身所释放的噬菌体的免疫性

经过不同时间处理后的菌液用牛肉汁稀释 10 倍，并离心取上清液，用双层法计算各该处理上清液中每毫升中的溶菌斑数，另外还计算经紫外线不同时间处理后的存活细菌数，结果见表 5。

表 5 紫外线对枯草杆菌 (*B. subtilis*) Bs47 菌株产生噬菌体的诱导效应

紫外线处理 时间 (秒)	存 活 菌 数		溶菌斑数 × 10	诱导后增 加的噬菌 体倍数
	× 10 ⁴	%		
0	113	100	17	0
5	83	73	85	5
10	65	58	315	18.5
15	52	46	70	4.1
20	28	25	70	4.1
30	16	14	10	0

从表 5 看出，经过紫外线处理在 5—20 秒间，噬菌体数都比不处理的有增加，其中

处理 10 秒,噬菌体数增加 18.5 倍,由此看来,紫外线对此菌株是有诱导效应的。

(2) 用丝裂霉素 C 诱导 与紫外线诱导相同,把经过 2 次震荡培养后的菌液改用牛肉汁培养液稀释成 $3-5 \times 10^7$ 细胞/毫升的浓度,在 37°C 预热 15—20 分钟,然后加入丝裂霉素 C (日本 Kyowa Hakko Kogyo 公司出品)使其最终浓度为每毫升 3 微克,在 37°C 震荡培养 15 分钟后,弃去上清液,加入等量的牛肉汁培养液,然后每隔一定时间,进行取样测定活菌数及噬菌体数,结果如表 6 和图 2。

表 6 丝裂霉素 C 对枯草杆菌 (*B. subtilis*) Bs47 菌株产生噬菌体的诱导效应

间隔时间 (分钟)	活细菌数	溶菌斑数
0	3.5×10^7	6×10^3
30	5.3×10^5	2.6×10^4
60	5.0×10^5	10^5
90	3.8×10^5	8.0×10^5
120	4.6×10^5	1.4×10^6
150	3.6×10^5	3.7×10^6
180	3.9×10^5	4.0×10^6

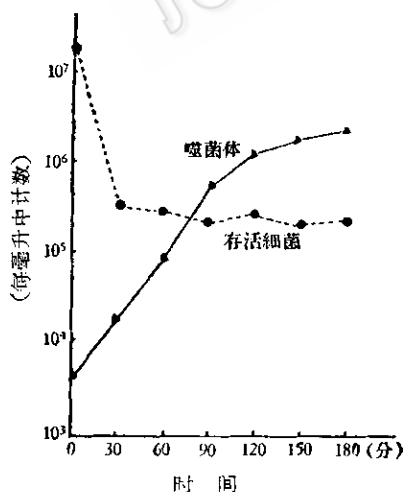


图 2 丝裂霉素 C 对枯草杆菌 (*B. subtilis*) Bs47 菌株产生噬菌体的诱导效应

从表 6 和图 2 看出,经过丝裂霉素 C 诱导处理后,溶菌斑数随着培养时间的增

长而增加,增加数几乎达 1000 倍,而活菌数却减少几乎达 100 倍,从这两个数字增减的过程中可以看出,诱导效果是显著的。

讨论和结论

溶源性菌株具有两个基本特性^[18,19],即(1)在繁殖过程中不断地释放噬菌体。(2)溶源性菌株对它自身所释放的噬菌体具有免疫性。从这两点来看 Bs47 菌株,用单菌落传代以去除游离噬菌体,连续地进行 6 次以后所得的单菌落,经过震荡培养,与未经过单菌落传代的原始菌落一样,继续释放噬菌体。同样用孢子,经过热处理,除去了游离噬菌体,存活的孢子在培养繁殖过程中也仍继续释放噬菌体。但用它本身所释放的噬菌体,进行双层法测定,则不表现溶菌,说明 Bs47 具有免疫性。根据这两点,我们确定 Bs47 是溶源性菌株。

根据已有报导,枯草杆菌溶源性与真溶源性不同^[6,8]。主要表现为不稳定,容易成为敏感菌;紫外线没有诱导作用。而从他们的实验数据中看出,自发释放量均较高。一般在 10^8 /毫升的细菌培养液中,噬菌体约有 10^3-10^9 /毫升。我们获得的溶源菌株 Bs47,紫外线对它有诱导效应,而自发释放量较低,在 10^8 /毫升细菌培养液中,噬菌体只有 10^3-10^4 /毫升。此外由于 Bs47 菌株系从保藏菌株中获得,从单菌落传代实验中,没有发现不释放噬菌体的现象,所以初步认为它是比较稳定的。Bott 等在报告中提到,okubo 分离到一个枯草杆菌噬菌体,紫外线能诱导,自发释放量也低,在 10^8 /毫升细菌中只有 10^5 /毫升的噬菌体,性能与其溶源性近似^[11]。看来,我们的 Bs47 菌株与他的近似。

关于溶源性细菌菌株的分离,一般采用点滴法,我们就枯草杆菌各菌株间存在拮抗作用的特点和实验室的具体情况,改

用了分群混合双层法, 方法涉及多个噬菌体混合的可能性。据过去报导, 噬菌体混合感染时会产生干扰作用或协同作用, 但因我们方法的第二步, 还要单个进行测定菌株是否带有噬菌体, 因而即使在第一步中有干扰作用或协同作用, 在第二步中都可以得到区别或消除。

参 考 文 献

- [1] Cowles, P. B.: *J. Bacteriol.*, 22:119—123, 1931.
- [2] Tsuru, D.: *Protein, Nucleic Acid, Enzyme*, 6(11):86—90, 1961.
- [3] Hosoda, J., Yoshikawa, H. and Yodhida, E. Ko.: *ibid.*, 6(11):79—85, 1961.
- [4] Kohiyama, M.: *Nature*, 184:208—209, 1959.
- [5] Spizizen, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 44:1072—1078, 1959.
- [6] Romig, W. R. and Brodetsky, A. M.: *J. Bacteriol.*, 82:135—141, 1961.
- [7] Ivánovics, G. and Csiszár K.: *Acta Microbiol. Hung.*, 9:209—218, 1962.
- [8] Takahashi, I.: *J. Gen. Microbiol.*, 31:211—217, 1963.
- [9] Thorne, C. B.: *J. Bacteriol.*, 83:106—111, 1962.
- [10] Takagi, J.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 8:214—222, 1962.
- [11] Bott, K. and Strauss, B.: *Virology*, 25:212—225, 1965.
- [12] Seaman, E., Tarmy, E. and Marmur, J.: *Biochemistry*, 3:607—612, 1964.
- [13] Barbander, W. J.: *Dissert. Abstr.*, 26:1795, 1963.
- [14] Adams, M. H.: *Bacteriophages*, Interscience, New York, 1959.
- [15] Garrett, C. M. E. and Crosse, J. E.: *J. Appl. Bacteriol.*, 26:27—34, 1963.
- [16] Morre, H. B. and Pickett, M. J.: *Canad. J. Microbiol.*, 6:43—52, 1960.
- [17] Welsch, M.: *Ann. New York Acad. Sci.*, 81:974—993, 1959.
- [18] Lwoff, A.: *Bacteriol. Rev.*, 17:269—337, 1953.
- [19] Bertani, G.: *Advan. Virus Res.*, 5:151—190, 1958.

ISOLATION AND SOME PROPERTIES OF A LYSOGENIC STRAIN Bs47 OF *BACILLUS SUBTILIS*

CHEN SHEN AND LU DE-RU

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Peking)

Four phage-carrying strains of *Bacillus subtilis* were isolated by group-mixture test method from 144 strains kept in this laboratory. Strain Bs47, owing to the transducing capability of its phage, was selected for further investigation. After serial isolation of single colony or heat treatment of the spores to get rid of the free phage, the bacteria were still capable of releasing phage. The bacteria also showed complete resistance against infection

with the phage released by themselves. Based on these characteristics, *B. subtilis* strain 47 (Bs47) was considered to be a typical lysogenic strain. Treatment with Mitomycin C or irradiated with ultraviolet light resulted in different degrees of increase of phage production, and the effect of mitomycin C induction was about 100 times higher than that of ultraviolet induction, or 1000 times higher than the uninduced.