

多粘芽孢杆菌噬菌体的分离及其特性的研究*

余茂勋 贾鑫兴 徐 星 靳传富**

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从全国 18 个省、市、自治区的不同类型土壤和污水采集样品 193 号, 在 134 号样品中分离到多粘芽孢杆菌噬菌体。对其中侵染多粘芽孢杆菌 28 的 23 株噬菌体进行了血清学的研究, 可区分为四种血清型。对这四种血清型的代表株除测定血清中和反应外, 还进行了寄主范围、吸附速度常数和一级生长曲线的测定。同时进行了电子显微镜观察。发现代表株之间存在着显著的差异。

从生产方面考虑, 我们进行了不同 pH 对噬菌体的存活影响, 以及它们对温度稳定性的研究, 可为防治噬菌体的感染提供依据。

关于多粘芽孢杆菌 (*Bacillus polymyxa*) 的噬菌体曾有一些报道^[1-5]。在 2,3-丁二醇^[8,10]和多粘菌素^[1,2]的生产中都发生过噬菌体的侵染。从土壤、污水、肥料以及发酵液中都曾分离到多粘芽孢杆菌噬菌体。Francis 和 Rippon 按噬菌体的寄主范围分为四种类型, 但根据血清学分析, 实质上只是两种类型^[3]。

我们从国内十八省、市、自治区采集了土壤和污水, 进行了多粘芽孢杆菌噬菌体的分离, 通过血清学方法区分为四种血清型, 并择其代表类型进行一系列生物学特性的研究。为防治此类生产菌感染噬菌体方面提供依据。

材料和方法

一、菌株和培养条件

分离中采用的多粘芽孢杆菌共 15 株: AS 1.152, AS 1.180, AS 1.441, AS 1.442, AS 1.443 (均系本所保藏), B843 (本所原五室赠), 10a, 29, 40 (本所原七室赠), P1001, 10410 (中国科学院科学院抗菌素研究所赠), 28, 115 (华北农业大学植物保护系赠), 63512 (*Bacillus polymyxa* var. *Rossovskaya*, 北京药品生物制品检定所赠),

24/25 (中国人民解放军第二军医大学赠)***。

细菌培养温度为 37℃。旋转式摇床每分钟 200 次。

二、培养基

每升培养基中含有牛肉膏 3 克, 蛋白胨 5 克, 葡萄糖 10 克, 氯化钠 5 克。200 毫升三角瓶装液 20 毫升。制作底层培养基时, 其中加琼脂 15 克。作上层培养基时, 加入 7 克琼脂。用 NaOH 调至 pH 7.0。

三、样品和分离方法

从国内采集 193 号样品。按土壤种类包括褐土、棕钙土、灰钙土、黑钙土、荒漠土、黑色石灰土、黄壤、红壤等, 均系取自土表 10 至 15 厘米以下的土壤。水样为城市污水。

取土样 10—20 克, 浸泡在稀释 10 倍的培养基中, 在 37℃ 静置过夜, 将浸出液与等量细菌悬液混合, 于 37℃ 培养过夜, 以促使噬菌体富集; 污水样品则直接取等量污水和菌悬液相混合, 置于 37℃ 培养过夜。上述培养过的混合液经 3000—4000 转/分离心沉降 20 分钟, 经适当稀释后, 按双层琼脂法测定。一般经 10—18 小时即可出

* 承中国科学院生物物理研究所电镜组协助进行噬菌体观察, 特此致谢。

** 现在中国科学院生物物理研究所。

*** 作者谨向提供菌种各单位致谢。

本文 1973 年 12 月 7 日收到。

现噬菌斑，经单斑连续传代重复挑取三次以上，待斑的形态和大小基本一致，可以认为材料纯一。

四、抗血清制备和血清中和反应试验

噬菌体抗血清的制备按通常方法^[6]进行，制备的抗血清需经 56℃ 处理 30 分钟。血清中和反应试验按 Adams 方法^[3]进行。

五、寄主范围测定

除多粘芽孢杆菌以外，其它菌株采取琼脂平板点滴法^[7]测定：分别取一系列不同效价（10⁸，10⁷，10⁶ 单位/毫升）的噬菌体液各 0.01 毫升，点滴在每皿混合有 0.2 毫升被测菌悬液并经 3 小时生长的平皿上，经培养后观察溶菌现象。对于多粘芽孢杆菌不同菌株的寄主范围的测定，采取双层琼脂法，加入 0.1 毫升的噬菌体，其效价为 10³ 单位/毫升。若初测未发现噬菌斑者，将噬菌体效价增高至 10⁴—10⁵ 单位/毫升复测。

六、吸附速度常数和一级生长曲线的测定

按 Adams^[6] 方法进行。

七、pH 稳定性测定

处理介质为 1% 蛋白胨液，pH 用 NaOH 或 HCl 调节，以雷磁 24 型酸度计测定。将不同 pH 值蛋白胨液 4.5 毫升加入到内径为 9 毫米的试管内，置于温度为 25±0.3℃ 的水浴中，待温度平衡后加入噬菌体液，起始效价为 10⁷ 单位/毫升，经 1 小时处理后以 pH 7.0 的蛋白胨液进行适当稀释，按双层琼脂法计数。

八、热失活测定

同 pH 稳定性测定的条件。取 pH 7.0 的 1% 蛋白胨液为介质，按一定时间间隔取样，样品立即放入冰水中降温，经适当稀释后，利用双层琼脂法计数。

九、电子显微镜观察

取净化后效价达到 10¹⁰—11 单位/毫升的噬菌体液，以 pH 7.0 的 2% 磷酸进行负染 5—10 分钟，悬滴在附有火棉胶薄膜的铜网上，日立 HU-11A 型电子显微镜观察。

结果和讨论

一、分离和血清中和反应试验

从各地收集的样品中，69% 可以分离

到多粘芽孢杆菌噬菌体。一般以较为肥沃种植蔬菜的土壤中为多。由于多粘芽孢杆菌 28 的噬菌体分离的较多，故选择作为本报告的研究材料。

由于血清特性的差异反映噬菌体之间蛋白质外壳结构的不同，因而可以作为分类依据之一^[4]。利用血清中和反应将 23 株噬菌体分成四类，各类代表株按其分离样品号编为 BP52、BP142、BP153 和 BP190，属于 BP52 型的有 19 株，属于 BP142 型的 2 株，属于 BP153 和 BP190 型的各 1 株。

表 1 指出四株噬菌体的抗血清交叉中和反应结果，说明它们在血清学上是不相关的。表中数字表示每个平皿噬菌斑的平均数目。

表 1 四株噬菌体的抗血清交叉中和反应

噬菌体 抗血清 (稀释度 1:1000)	BP52	BP142	BP153	BP190
BP52 K=3000	0	226	236	163
BP142 K=3400	253	0	249	160
BP153 K=2100	244	222	0	154
BP190 K=3300	242	234	257	0
对照 1% 蛋白胨液	252	205	253	163

二、寄主范围

寄主范围的测定结果说明，除多粘芽孢杆菌外，都不被这四株噬菌体侵染，所测定的菌株为：

Alcaligenes faecalis AS 1.488; *Bacillus alvei* AS 1.435; *B. anthracoides* AS 1.194; AS 1.196, *B. cereus* AS 1.126, AS 1.229, AS 1.291, AS 1.458, AS 1.461, AS 1.462; *B. cereus* var. *mycoides* AS 1.261; *B. licheniformis* AS 1.519, AS 1.520, AS

表 2 种 内 寄 主 范 围 的 测 定

噬 菌 体 株	31	52	56	84	91	93	101	102	116	118	119	120	122	131	139	140	141	142	148	149	153	159	190
多粘芽孢杆菌 (<i>Bacillus polymyxa</i>) 28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
” 10a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
” 29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
” 29-3a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
” 29-3b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
” 29-3c	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
” 29-5a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
” 29-5b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
” 40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
” 115	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
” AS 1.152	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
” AS 1.180	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
” AS 1.441	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
” AS 1.442	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
” AS 1.443	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
” 24/25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
” B 843	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
” 10410	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
” P. 1001	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
多粘芽孢杆菌 (<i>B. polymyxa</i> var. <i>Kosrovskaya</i>) 63512	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

十 感染, 噬数与菌株 28 上相近。 - 不感染。 土 提高效价时发生感染。 ++ 感染, 噬数超过在菌株 28 的 2—9 倍。

1.521; *B. macerans* AS 1.64, AS 1.65; *B. megaterium* AS 1.127, AS 1.217, AS 1.223, AS 1.432, AS 1.459; *B. pumilus* AS 1.271, AS 1.445, AS 1.446; *B. sphaericus* AS 1.468, AS 1.469, AS 1.470, AS 1.471; *B. subtilis* AS 1.74, AS 1.88, AS 1.107, AS 1.199, AS 1.265, AS 1.280, AS 1.313, Ki 2; *B. subtilis* var. *atermus* AS 1.439, AS 1.440; *B. subtilis* var. *niger* AS 1.433; *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* AS 1.5; *B. vermiculosus* AS 1.518; *Erwinia aroideae* AS 1.141; *Escherichia coli* K12, 1485 F⁺ AS 1.359; *E. coli* B; *E. coli* C (以上菌株均取自本所保藏组)。

对 20 株多粘芽孢杆菌的测定(表 2), 发现在多粘芽孢杆菌 29 的测定中, 较多地出现噬菌斑数增加的现象。菌株 29-3a、29-3b、29-3c、29-5a 和 29-5b 均系菌株 29 的变异株, 但均未出现上述现象, 对此尚需进一步研究。23 株噬菌体可以全部感染的菌株有 28、10a、40、B843、AS 1.441 和 AS 1.443。考虑到有些菌株是多粘菌素的生产菌, 因此在生产中对噬菌体的预防应予以充分的注意。

三、吸附速度常数

噬菌体的吸附速度常数 K 值(表 3)表明互相之间的差异, BP 153 的 K 值小于其它三株的 K 值。

表 3 噬菌体的吸附速度常数

噬 菌 体	K 值(毫升·分 ⁻¹)
BP52	1.3×10^{-9}
BP142	3.8×10^{-9}
BP153	6.8×10^{-10}
BP190	2.2×10^{-9}

四、一级生长曲线

噬菌体的一级生长曲线试验指出潜伏期在 73—100 分钟之间(表 4), 较以往所

表 4 一级生长曲线试验结果

噬 菌 体	潜 伏 期 (分)		裂 解 量
	最 小 值	平 均 值	
BP52	70	74	284
BP142	95	100	141
BP153	70	73	167
BP190	97	99	152

记载的 150 分钟^[3]和 300 分钟^[2]或 360 分钟^[7]为短, 测得的裂解量为 141—284, 与过去报道的 128—256^[3]数值接近。图 1 表示一级生长中数量变化的动态。根据图 1 和表 4 的比较, BP 142 和 BP 190 的潜伏期及裂解量极为相似, BP 52 和 BP 153 的潜伏期基本上是一致的, 但是 BP 52 的裂解量较大。

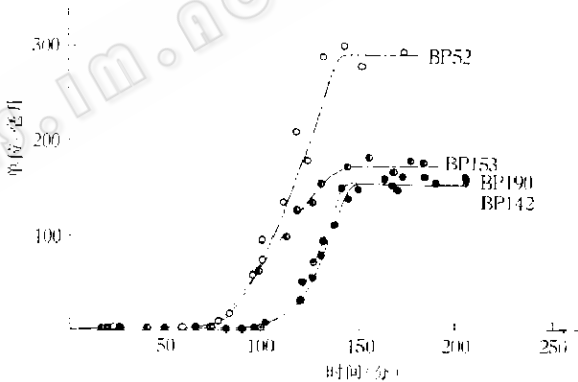


图 1 一级生长曲线

五、pH 值

pH 值对于噬菌体的稳定性具有显著的影响。四株噬菌体在 pH 6.0—10.0 范围内较为稳定, 一般在 pH 偏高时较偏低时为稳定。表 5 指出 BP 52 和 BP 153 在 pH 4.0 时失活显著, 而 BP 190 表现较为稳定, 仍有 66% 存活。噬菌体在不同 pH 时的存活, 与其寄主菌对 pH 的要求基本上是趋向一致的。如巨大芽孢杆菌和大肠杆菌噬菌体分别在 pH 5—9^[13]和 pH 6—8^[10]时稳定; 大多数放线菌噬菌体在 pH 7—9 时稳定^[11], 而在 pH 5.0 时就难以分离到^[12]; 有

表 5 不同 pH 值处理下噬菌体的存活百分率*

噬 菌 体	pH							
	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	
BP52	0.4	48	88	100	94	95	94	
BP142	—	32	85	100	94	89	74	
BP153	13	21	87	100	95	97	88	
BP190	66	89	90	100	100	95	82	

* 按 pH 7.0 时为 100% 存活计。

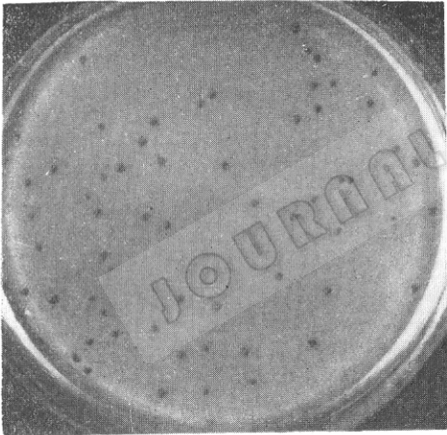
的噬菌体在 pH 4.0 以下即失活^[13]。

六、热失活

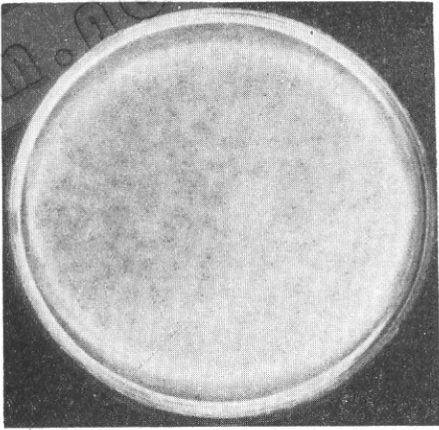
BP 52 和 BP 190 在 50°—60℃ 的热失活试验中的存活率，与时间的函数呈现指数关系。BP 142 在 60°—65℃ 时的存活曲线说明具有两种组份的特点，而在 70℃ 时表现不明显。这种现象在噬菌体 μ_2 于

70°—75℃ 时也存在^[13]，对热失活过程进行热力学的分析，有助于对这种现象进一步的了解^[14,13]。由于噬菌体外壳蛋白质对它所包含的核酸具有保护作用，而两者对热失活不同，蛋白质亚基结构和它的组成的差别，因之也反映在噬菌体的存活上^[16]。此外，也应考虑到在培养噬菌体群体之间存在着一定的差异。

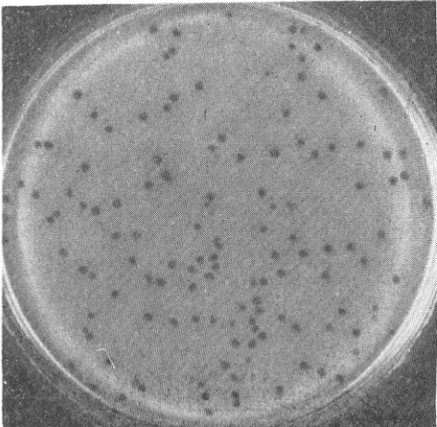
BP 142 在 60℃ 经过不同 pH 处理不同的时间，可以发现存活率显著地下降。pH 6 处理 1 小时后，存活率只有 2—3% (图 4)，与表 3 中在常温 (25℃) 下 pH 影响的结果比较，差异显著。这提示 pH 值的变更和适当改变温度相结合，有可能在生产上作为控制噬菌体的一种简易手段。



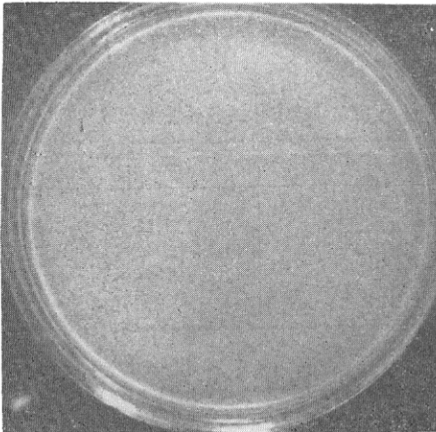
BP 52



BP 142



BP 153



BP 190

图 2 四株噬菌体的噬菌斑

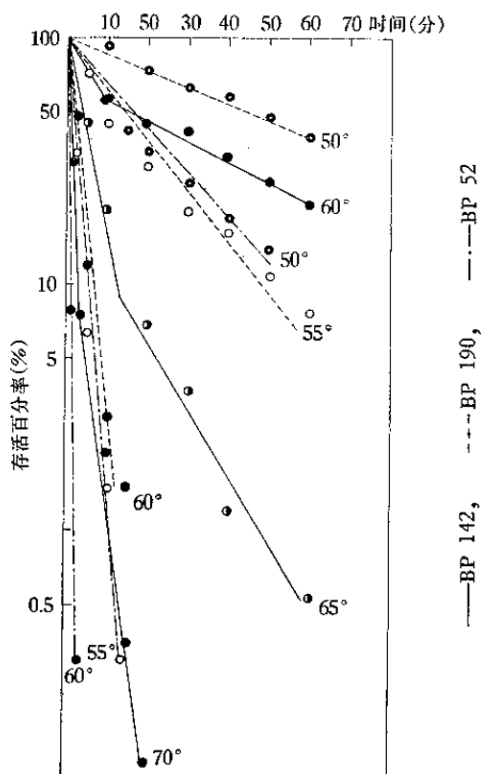


图3 噬菌体的热失活

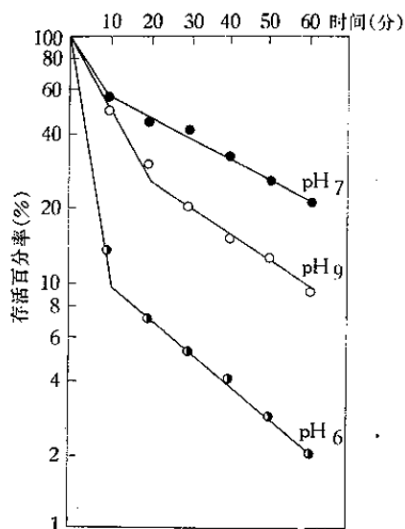
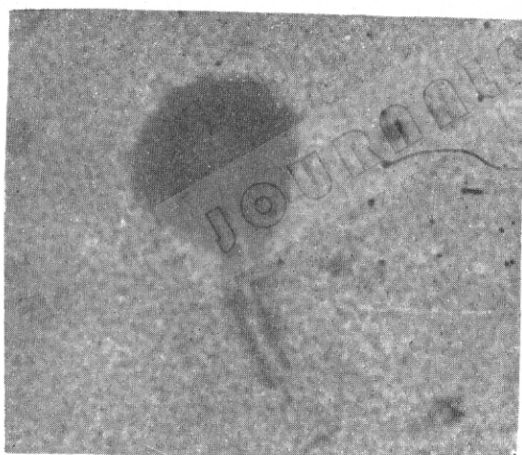


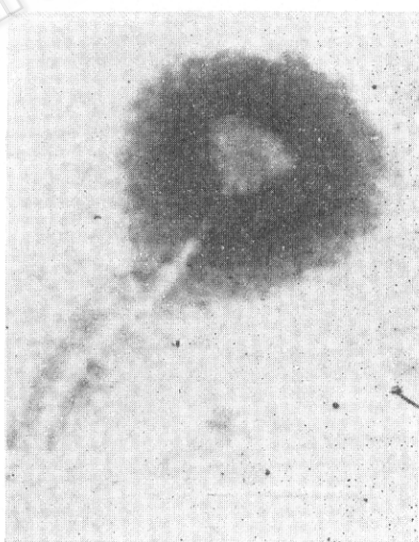
图4 在60°C不同pH时BP 142的失活

七、电镜观察

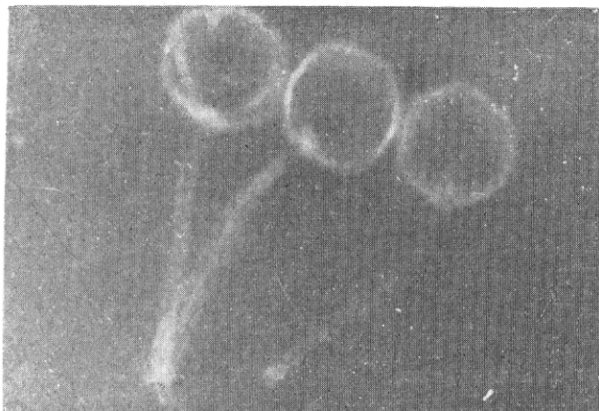
从电子显微镜下观察,三株噬菌体的形态(图5)之间存在着显著的差异。BP52和BP 142都具有较长的尾部,而BP 153



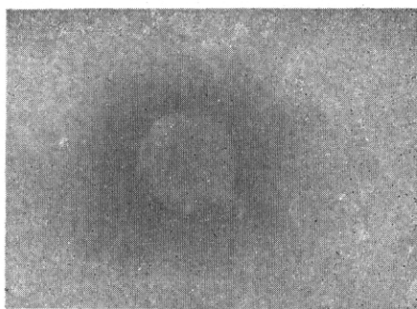
1



2



3



4

图5 噬菌体的形态

1, BP 52, 174,000×; 2, BP 142, 200,000×; 3, BP 142, 空的头部, 200,000×;

4, BP 153, 200,000×; 标E© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

的尾部短小。BP 52 的头部呈现八面体, 与大肠杆菌噬菌体 EI 相似^[6], BP 142 的头部可以清楚地看到有六边形的形状。图 5-3 噬菌体头部的核酸已经外射, 留下的是空头壳。尾部中央可见到尾髓。BP 153 的头部也呈现六边形的多面体。

根据以上血清学、生物学特性、pH 处理和热失活的研究结果, 以及部分形态的观察, 指出四株噬菌体是存在着显著差异, 可区分为四种血清型。

参 考 资 料

- [1] 北京大学制药厂生物化学专业多粘菌素研制组: 微生物学报, **13**:74, 1973。
- [2] 本江元吉、村田晃、绪方靖哉: 发酵与微生物, II: 59—60, 植村定治郎、相田浩编集, 朝仓书店, 1970。
- [3] Francis, A. E., Rippon, J. E.: *J. Gen. Microbiol.*, **3**:425, 1949。
- [4] Katznelson, H.: *Canad. J. Res.*, C **22**:241, 1944。
- [5] Katznelson, H., Lochead, A. G.: *J. Bact.*, **47**:444, 1944。
- [6] Adams, M. H.: *Bacteriophages*, Interscience Publishers, Inc., New York, 1959。
- [7] Feary, T. W., et al.: *J. Bact.*, **87**:196, 1964。
- [8] Adams, M. H., Wade, E.: *J. Bact.*, **68**:320, 1954。
- [9] Friedman, M., Cowler, P. B.: *J. Bact.*, **66**:379, 1953。
- [10] Kerby, G. P. et al.: *J. Immunol.*, **63**:93, 1949。
- [11] Alexander, R. R., McCoy, E.: *J. Bact.*, **72**:378, 1956。
- [12] Хавина, Э. С., Раутенштейн, Я. И.: *Микробиология*, **28**:736, 1959。
- [13] Turri, M. et al.: *Giorn. Microbiol.*, **12**:153, 1964。
- [14] Pollard, E., Woodyatt, S.: *Biophys. J.*, **4**:367, 1964。
- [15] Bradley, D. E.: *Bact. Rev.*, **31**:230, 1967。

ISOLATION OF *BACILLUS POLYMYXA* PHAGES AND THEIR CHARACTERISTICS

YU MAO-XIAO, CHIA PAN-HSING, HSU HSING AND CHIN CHUAN-FU

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Peking*)

A number of *Bacillus polymyxa* phages were isolated from 193 samples of different type of soil and sewages, which were collected from 18 provinces and regions in China. Four serotypes of bacteriophages were identified which were named BP52, BP142, BP153, and BP190. They were further characterized by serological reactions, host-range relationship, rate of adsorption to bacterium and one-step growth experiment. None of the four phages is capable of infecting selected bacterial strains other than *Bacillus polymyxa*. Most of the polymyxin-producing strains are susceptible to all these isolated phages and it is, therefore, necessary during antibiotic production to pay more attention to prevent contamination by these phages. The K values of adsorption rate of BP52, BP142, BP153, and BP190 were determined as 1.3×10^{-9} ,

3.8×10^{-9} , 6.8×10^{-10} , and 2.2×10^{-9} ml · min⁻¹, respectively. Their latent periods were 74, 100, 73, and 99 minutes and burst sizes 284, 141, 167 and 152, respectively.

The stability of the four phages at different pH values was determined. They are more stable at pH 6—10, but BP190 is stable even at pH 4—5. Combined treatment with heat and controlled pH is more effective for phage sterilization. The thermal inactivation kinetics of three phages, namely, BP52, BP142, and BP190, has been studied. The thermal inactivation of bacteriophages BP142 follows a two-component kinetic pattern. Three of these phages were examined by PTA negative stain method under electron microscope and morphological differences were detected.