

苏芸金杆菌六种噬菌体*

何能波 陈见璋 林彩婵

(广东省微生物研究所, 广州)

从我省生产苏芸金杆菌类工厂及本所试验车间采集 62 号噬菌体进行了寄主范围测定, 噬菌斑形状比较和电子显微镜的形态观察, 可区分为六种不同的噬菌体。同时还进行了不同 pH 和温度处理以及紫外线照射对噬菌体存活影响的试验。可为生产上防治噬菌体的感染提供依据。

苏芸金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 在国内外的生产中都发现有噬菌体的感染, 并且对这类噬菌体的研究也有一些报道^[1-10]。近年来, 在本省生产苏芸金杆菌类农药厂和本所实验车间进行试验和生产中, 均遭到噬菌体的感染, 造成菌数下降, 甚至倒罐, 严重影响了这种微生物农药的生产。掌握噬菌体的特性, 可为生产上防治噬菌体提供依据。本试验对我省各地出现的苏芸金杆菌噬菌体的种类及其某些特性进行了研究。

材料和方 法

(一) 菌株和噬菌体

标准血清型苏芸金杆菌共 10 株: 009、021、A1、016、023、087、010、096、012、013。均为武汉大学生物系供给。

噬菌体: 一部分由本所黄仿英等同志提供, 另一部分从本省有关生产单位分离, 共 62 号噬菌体。

(二) 培养基

每升培养基中含有蛋白胨 30 克、牛肉膏 5 克、葡萄糖 1 克、氯化钠 5 克。上层培养基中加入琼脂 10 克。下层和斜面培养基中加入琼脂 20 克, 灭菌前 pH7.2。

(三) 噬菌体的分离及纯化

将所采集样品按一般方法^[11]进行。

(四) 寄主范围测定

按照沙槎云等^[9]方法进行。

(五) pH 稳定性测定

按照余茂劭等^[11]的方法进行。

(六) 紫外线照射失活试验

参考 Adams 的方法, 取 1% 蛋白胨液稀释的噬菌体浓度为 10^6 单位/毫升的稀释液 5 毫升置于直径为 9 厘米的培养皿中, 液体深度在 1 毫米以内, 置于 30 瓦的紫外线灯下距离 30 厘米处, 在搅拌下分别照射 10、20、30、60 秒和 2 分钟后, 在红灯下作成双层琼脂平板, 在黑暗条件下培养 24 小时后, 比较其存活率。

(七) 热稳定性测定

参考 Colasito 等^[6]的方法, 取 10^{4-5} 单位/毫升噬菌体 5 毫升, 以 60°C 水浴恒温处理 5、10、15、20 分钟, 又将同样噬菌体液分别以 60、70、80、90、100°C 水浴恒温处理 20 分钟, 用冰水迅速冷却, 分别取 0.5 毫升作成双层琼脂平板, 观察其失活情况。

(八) 电子显微镜下形态观察

挑取已纯化的新鲜噬菌斑于蒸馏水中, 打碎后静置 2 小时, 取其上清液一滴加上一滴 2% pH 7.0 的磷钨酸作负染色约 20 分钟, 将附有支持膜的铜网覆于混合液上, 片刻, 轻轻取下, 空气干燥, 在日立 HS-7S 型电子显微镜下约 30,000 倍观察其形态。

本文于 1977 年 10 月 9 日收到。

* 本工作得到中国科学院微生物研究所余茂劭同志的鼓励和帮助, 还得到本所农业微生物研究室黄仿英、康亚男、张云武等同志的支持和帮助, 本所彭林城同志曾参加部分工作。

结果和讨论

(一) 寄主范围

寄主范围测定结果(表 1)说明, 血清型 H₅ 和 H₆ 的细菌对这些噬菌体是比较敏

感的。而血清型 H₁、H₃ 和 H₇ 的细菌对这些噬菌体则全是不敏感的。血清型 H₂、H₄ 和 H₈ 的细菌对这些噬菌体大多数也是不敏感的。

(二) 噬菌斑形状

表 1 噬菌体寄主范围测定*

苏 芸 金 杆 菌			六 种 噬 菌 体 及 溶 菌 情 况					
菌种编号	变种名称	血清型	TP1	TP21	TP33	TP35	TP51	TP52
009	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i>	H ₁	-	-	-	-	-	-
021	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>finitimus</i>	H ₂	-	-	+	-	-	-
Al.	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>alesti</i>	H ₃	-	-	-	-	-	-
Q16	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>satto</i>	H ₄	-	-	-	-	-	-
023	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>dendrolimus</i>		-	+	+	-	-	-
087	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>galleriae</i>	H ₅	+	+	+	+	-	+
010	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>entomocidus</i>	H ₆	-	-	+	+	+	+
096	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>arzawai</i>	H ₇	-	-	-	-	-	-
012	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>morrison</i>	H ₈	-	-	+	-	-	-
013	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>tolworth</i>	H ₈	-	-	-	+	-	-

* “+”为溶菌; “-”为不溶菌。

由各号噬菌体产生的噬菌斑可归纳为六种类型(图版 I):

TP1: 呈同心圆形斑, 中心透明点直径 0.8—1.5 毫米, 边缘不整齐;

TP33: 透明斑, 直径 0.6—1.5 毫米;

TP35: 透明斑, 直径在 1 毫米以下;

TP52: 透明斑, 直径 1.5—2.5 毫米, 边缘模糊;

TP21: 透明斑, 直径 3—4 毫米, 边缘整齐;

TP51: 透明斑, 直径 2.5—3.5 毫米, 边缘不整齐, 斑外有晕圈。

(三) 电子显微镜下的形态观察

从电子显微镜下观察, 六种噬菌体的照片(图版 II—V) 显示出它们的形态之间都存在着显著的差异。

TP1 的头部椭圆形, 也可能是六边形, 短尾, 在头和尾之间有六个小锤形器官, 象衣领一样围在头部下端。

TP33 的头部是一个二十面体, 尾部可弯曲, 是由尾髓和可收缩的尾鞘组成, 未收缩的尾部末端可见到基片和三至五支刺突。

TP35 是一种较大的噬菌体, 头部是

明显的多面体,有一条很易韧曲的长尾,其末端有一梭标状器官。

TP52 头部,根据它的空头壳形状可以判断是六边形,尾可弯曲,靠近末端有一纽结。

TP21 头部椭圆形,尾部可弯曲,收缩时可以明显地见到三支尾丝。

TP51 头部正六边形,有一细弱的尾巴,但不易弯曲。

表 2 六种噬菌体的大小

噬菌体	头部(毫微米)	尾部(毫微米)
TP1	60×37	40×7
TP33	88×88	217×17
TP35	87×80	467×10
TP52	83×47	130×8
TP21	87×55	140×8
TP51	65×62	200×8

表 3 不同 pH 值处理下噬菌体的存活百分率*

噬菌体 \ pH 值	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0	13.0	14.0
TP1	40	43	85	100	42	24	15	—	—	—	—
TP33	0	38	122	100	24	21	16	—	—	—	—
TP35	3.7	21	45	100	311	104	97	—	—	—	—
TP52	0	36	79	100	105	115	120	125	113	108	108
TP21	0	42	71	100	92	64	64	—	—	—	—
TP51	0	50	68	100	81	68	37	—	—	—	—

* 按 pH7.0 为 100% 存活计算。

(四) pH 测定结果

六株噬菌体在不同 pH 值处理时其稳定性相差悬殊。表 3 指出, TP1 和 TP51 只有在 pH7 时稳定, TP33 在 pH6—7 时稳定, TP21 在 pH7—8 时稳定,而 TP35 和 TP52 则在 pH7—10 时稳定。尤其是 TP52 在 pH7—14 都较稳定, pH10—11 时存活率最高,这种情况值得引起注意。在 pH4 时, TP33、TP52、TP21 和 TP51 则全部失活, TP35 的存活率也很低。

(五) 紫外线照射的影响

紫外线照射对于噬菌体具有显著的灭活作用。表 4 指出,不同噬菌体之间差别很大, TP52、TP51 和 TP21 对紫外线最敏感,照射 10 秒钟,其存活率低于 1%。尤其是 TP52,其存活率在万分之一以下。而对于 TP33 和 TP35 的灭活效果则比较差,对

于 TP33,照射 10 秒钟还有 60% 存活,即使照射 2 分钟仍然还有 30% 以上存活。

表 4 噬菌体在紫外线照射下的存活率*

噬菌体 \ 照射时间(秒)	10	20	30	60	120
TP1	1.80	2.00	1.95	1.20	0.97
TP21	0.25	0.25	0.26	0.07	0.05
TP33	60	73	73	42.6	30.9
TP35	15.2	7.7	6.7	5.7	5.2
TP51	0.04	0.017	0.007	0.007	0
TP52	0.007	0.008	0.006	0.003	0.001

* 按对照为 100% 计算。

(六) 热失活结果

噬菌体在 60°C 下处理不同时间均有失活,其失活率和处理时间不成正比例,而

不同种类的噬菌体在相同的处理条件下, 其失活率也不相同(图1)。但各种噬菌体经过处理后, 总的趋势是随着处理时间增加, 其失活率也增加。

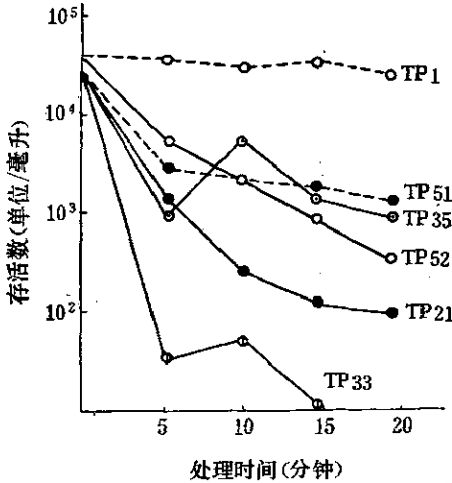


图1 六种噬菌体在60°C时的热稳定性

噬菌体在60、70、80、90和100°C各处理20分钟后, 其中TP1、TP33、TP52和TP21在70°C以上的处理均全部失活, 而TP51则随着处理的温度升高, 其失活率增加, 90°C处理20分钟后, 仍有1%存活, 经100°C处理20分钟后才全部失活。

根据上述各项试验结果, 表明六株噬菌体具有显著的差异, 可区分为六种类型。其中噬菌体TP1相似于Colasito (1969)的噬菌体GV-3和GV-5, 但尾部较细, 其直径约等于它们的三分之二; 噬菌体TP33的形态与Chapman & Norris (1966)的苏芸金杆菌噬菌体III相似; 噬菌体TP51则与

Раутенштейн等(1971)从*Bac. thuringiensis* var. *causicus* 837中分离的一些噬菌体相似。上述三种噬菌体仅是形态上相似, 而个体大小、寄主范围、噬菌斑形状等特性均有明显的差异。噬菌体TP35、TP21和TP52的形态、寄主范围、噬菌斑形状等从目前所了解的还未见到相同或近似的, TP35的尾部末端梭状器官也未见报道过。

参 考 文 献

- [1] Yoder, P. E. and Nelson, E. L.: *J. Insect. Pathol.*, 2: 198, 1960.
- [2] Хачатрян, Л. С. и Раутенштейн, Я. И.: *Микробиология*, 32: 813, 1963.
- [3] Раутенштейн, Я. И., Мисюрена, Н. Г. и Хачатрян, Л. С.: *Микробиология*, 33: 980, 1964.
- [4] Chapman, H. M. and Norris, J. R.: *J. Appl. Bact.*, 29 (3): 529, 1966.
- [5] Слефанов, Я. И., Раутенштейн, Я. И. и Хачатрян, Л. С.: *Микробиология*, 35: 1064, 1966.
- [6] Colasito, D. J. and Rogoff, M. H.: *J. Gen. Virol.*, 5 (2): 267, 1969.
- [7] Colasito, D. J. and Rogoff, M. H.: *J. Gen. Virol.*, 5 (2): 275, 1969.
- [8] Раутенштейн, Я. И. и др.: *Микробиология*, 40 (3): 532, 1971.
- [9] 沙椹云等: *昆虫学报*, 18 (3), 273, 1975.
- [10] Раутенштейн, Я. И. и др.: *Микробиология* 45: 690, 1976.
- [11] 中国科学院微生物研究所噬菌体组: *噬菌体及其防治*, 科学出版社, 1973.
- [12] 余茂勋等: *微生物学报*, 14 (2): 216, 1974.
- [13] Adams, M. H.: *Bacteriophages*. Interscience Publishers, Inc. New York, 1959.

SIX DISTINCT TYPES OF BACTERIOPHAGE ATTACKING *BACILLUS THURINGIENSIS*

He Neng-bo Chen Jian-zhang Lin Cai-chan

(*Institute of Microbiology of Province Guangdong, Guangzhou*)

Out of sixty-two isolates from some factories and our pilot plant producing powder of *Bacillus thuringiensis*, six distinct types of bacteriophage were identified according to the morphology and host-range, and also by electron micros-

copic observation. Their thermal stability and survival under different pH values as well as ultraviolet light irradiation was examined. These data may be useful for the industrail protection against phage-contamination.