

炭疽杆菌噬菌体 AP631 株的分离和鉴定

董树林 张守让 孙建鑫 黄庆声

(兰州生物制品研究所, 兰州)

早在 1898 年, Гамалей^[1] 首先发现炭疽芽孢杆菌有溶菌现象, Pesch^[2] 和 Cowles^[3] 相继对此进行过观察。直到 1951 年, 英国 McCloy^[4] 才自蜡状芽孢杆菌 (*B. cereus*) W 株分离到 α 株和 β 株噬菌体, 并证明对炭疽芽孢杆菌能够裂解。随后, Brown 和 Cherry^[5] 又自 W 株获得 γ 噬菌体, 试验证明, γ 噬菌体较 W_{α} 和 W_{β} 株对炭疽芽孢杆菌特异性为强。1959 年, Stainatin^[6] 自土壤中分离到炭疽杆菌噬菌体 E 株, 经 Ciucă 等 (1959) 用 E 株噬菌体与 W_{α} 及 W_{β} 株噬菌体做比较试验, 证明 E 株噬菌体对炭疽芽孢杆菌裂解特异性更强。后来, Ivánovics 和 Lantós (1958—1962)^[8-12] 也自土壤中分离到多株炭疽杆菌噬菌体, 并在这方面进行了不少研究工作。国内尚未见有关炭疽杆菌噬菌体的分离报道。1963 年, 我们分离到一株炭疽杆菌噬菌体, 编号为 AP631 株, 并对其耐力、宿主范围及裂解特异性, 进行了初步试验。

材料与方 法

(一) 菌种

分离噬菌体用作指示菌的菌种为 A16R 株和 P No. 2 株, 来源于卫生部药品生物制品检定所。

检定噬菌体用的各种菌种共 115 株, 其中炭疽杆菌强毒菌种 94 株, 系本实验室保存的国际强毒菌株和收集到的地方性炭疽杆菌强毒菌株; 炭疽杆菌弱毒菌共 8 株, 其中 5 株为国外常用的菌苗菌种, 3 株为国内选育的弱毒菌株。其他需氧芽孢杆菌共 13 株, 来源于中国科学院微生物研究所和农林部兽医生物药品监察所, 少数菌株为本实验室保存。

(二) 培养基

分离、制备噬菌体和检定试验, 均采用厚金格尔肉汤或厚金格尔琼脂平板培养基。

(三) 效价测定

采用试管法及双层平板法计数噬菌斑。

(四) 耐力试验

1. 超声波处理: 250 型超声波发生器, 应用频率为 3×10^4 赫, 连续处理 6 小时, 每小时取样检查。

2. 紫外线照射: 2537 Å 紫外线灯管, 距离为 100 厘米, 照射 2 小时。于 0.5、1、1.5、2 小时取样检查。

3. 柠檬酸钠作用: 柠檬酸钠含量为 1% (克/毫升), 作用时间为 1 小时。

4. 加温处理: 水浴加温 70°C , 处理 1 小时。

5. 乙醇作用: 75% 乙醇, 作用 1 小时。

以上 (3)、(4)、(5) 项均于 5、15、30、60 分钟取样检查噬菌体裂解能力。

5. 裂解试验:

采用琼脂平板表面涂种新鲜培养物, 滴加噬菌体后置 37°C , 24 小时观察噬菌斑。

结 果

(一) 噬菌体分离

取实验室下水, 经除菌过滤后, 加炭疽杆菌弱毒菌 A16R 株新鲜培养物, 置 37°C 5 分钟, 倾注于平板表面, 复置 37°C 培养 24 小时, 观察菌苔表面有无噬菌斑, 将可见之噬菌斑刮入试管肉汤中, 反复增殖后, 噬菌体效价可达 10^6 单位/毫升, 适应于 P No. 2 菌株后, 效价可达 10^8 单位/毫升。其噬菌斑形态, 因菌株不同而各异, 在有的宿主菌菌苔上, 噬菌斑中央透明, 四周半透明, 噬菌斑直径可达 2—3 毫米; 在有的宿主菌菌苔上, 噬菌斑为完全透明, 但噬菌斑直径只有 1 毫米左右。

本文于 1978 年 3 月 18 日收到。

(二) 噬菌体原液制备

为制备较高效价噬菌体原液,经试验证明,培养 8—10 小时液体清晰。噬菌体与宿主菌芽孢之比例,以 1:24 左右所得效价为高,可达 10^8 单位/毫升。如将裂解物经低频超声波处理,则可提高效价 100 倍以上。

(三) 噬菌体耐力试验

在本试验条件下,AP631 株噬菌体对超声波处理,紫外线照射和柠檬酸钠作用均有耐力。而对加温处理和乙醇作用则较敏感。耐力试验结果见图 1。

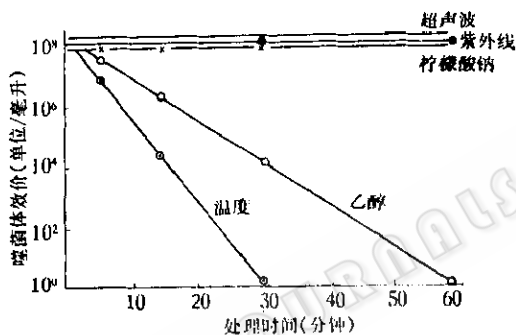


图 1 AP631 株噬菌体耐力试验结果

(四) 宿主范围和特异性

经裂解试验表明,炭疽噬菌体 AP631 株对国外炭疽强毒菌株,国内分离的地方性炭疽强毒菌株,以及弱毒炭疽杆菌共计 102 株,完全能够裂解。对其他需氧芽孢杆菌,如蜡状芽孢杆菌,鞣状芽孢杆菌,巨大芽孢杆菌,枯草芽孢杆菌等共计 13 株,全部未能裂解。证明其宿主范围广泛,

特异性强。详见下表。

AP631 株噬菌体对炭疽杆菌与需氧芽孢杆菌裂解情况

实验用菌种		裂解情况		
类 别	株 数	裂解株数	不裂解株数	
炭疽芽孢杆菌	强毒菌株	94	94	0
	弱毒菌株	8	8	0
需氧芽孢杆菌	蜡状杆菌	6	0	6
	鞣状杆菌	2	0	2
	巨大杆菌	2	0	2
	枯草杆菌	3	0	3
合 计		115	102	13

参 考 文 献

- [1] Гамалея, Н. Ф. и др.: «Бактериофаги и их применение в мелиценой практика», Медгиз, Москва, 1958.
- [2] Pesch, K. L.: *Centralbl f. Bakt. I. Orig.*, 93:525, 1924.
- [3] Cowles, P. B.: *J. Bact.*, 21:160, 1931.
- [4] McCloy, E. W.: *J. Hyg.*, 49:114, 1951.
- [5] Brown, E. R.: *J. infect. Dis.*, 96:34, 1955.
- [6] Stamatin, N. et al.: *An. Inst. Pasteur*, 96(4):502, 1959.
- [7] Ciucă, M. et al.: *Arch Roumanies Path. Expir. et Microbiol.*, 18(2):169, 1959.
- [8] Ivánovics, G. et al.: *Acta Microbiol. Budapest*, 5(4):89, 1958.
- [9] Lantös, J. et al.: *Ibid.*, 7(1):31, 1960.
- [10] Lantös, J. et al.: *Ibid.*, 8(4):379, 1961.
- [11] Ivánovics, G. et al.: *Ibid.*, 9(3):237, 1962.
- [12] Ivánovics, G. et al.: *J. gen. Microbiol.*, 28(1):87, 1962.