

# 钝齿棒状杆菌噬菌体的鉴定及其核酸的分离和测定

余茂勋 那淑敏 徐星

(中国科学院微生物研究所, 北京)

对生产中广泛使用的钝齿棒状杆菌的噬菌体,进行了血清学分型,区分为两种血清型,并按代表株 B 271 和 B 275 的编号分别定名。这两株噬菌体的寄主范围十分严格,仅限于钝齿棒状杆菌及其相近的菌株。60°C 处理后基本上失活。B275 噬菌体对 pH 值的稳定性较 B 271 噬菌体稍强,但二者对柠檬酸钠的反应截然不同,在试验浓度范围内,前者表现稳定,而后者不稳定。一级生长曲线试验表明 B 271 和 B 275 的潜伏期分别为 78 和 65 分钟,裂解量分别为 44 和 54。B 271 和 B 275 的 DNA G-C% 分别为 57.80 和 64.87。此外,进行了电镜下的形态观察。

钝齿棒状杆菌 (*Corynebacterium crenatum*) AS 1.542 和 B9<sup>[3]</sup> 是国内目前普遍采用的较好的生产谷氨酸菌株,由前者诱变获得一些变异株可用来生产其它种类氨基酸<sup>[4]</sup>,所以查明这些菌株的噬菌体是十分必要的。关于该菌株的噬菌体已有单位做过一些工作,我们经过多年来的收集和分离,初步确定存在两株血清型,并对其一系列有关特性进行了研究。

## 材料和方法

### (一) 菌株和培养条件

钝齿棒状杆菌 AS 1.542 和所选用的测定菌株均系本所保存。钝齿棒状杆菌 B9 系杭州味精厂分离选育和提供。培养温度均为 30°C。

### (二) 培养基

参阅前报<sup>[1,2]</sup>。

### (三) 噬菌体的分离检查

参照过去的方法<sup>[1]</sup>从国内十几家工厂发酵罐内异常发酵液和污染空气中分得。

### (四) 抗血清制备和血清中和试验

按照 Adams 方法<sup>[5]</sup>进行。

### (五) 寄主范围测定

同前所用方法<sup>[1]</sup>。

### (六) 柠檬酸钠试验

利用不同浓度柠檬酸钠混合于上下层培养

基中,加入一定量噬菌体,测定噬菌斑的形成数目。

### (七) 对热和 pH 值稳定性试验

依照前法进行<sup>[1]</sup>。

### (八) 噬菌体核酸的提取和解链温度 ( $T_m$ ) 的测定

参照以前的方法<sup>[2]</sup>,按 Marmui 和 Doty 的方法<sup>[6]</sup>测定。

### (九) 一级生长曲线试验

按 Adams 方法<sup>[5]</sup>。

### (十) 电镜观察

按前所用方法和条件<sup>[1]</sup>。

## 结果和讨论

从各地所收集的 28 株噬菌体,根据血清中和反应试验,可以区分为两种血清型(表 1)。按分离结果,一般工厂大多都有这两种噬菌体存在,但以 B 271 分布为主。B 271 的噬菌斑较大,其斑径可达 0.5 毫米左右;而 B 275 的斑较小约在 0.1 毫米以下,不随培养时间延长而继续扩大,由于不

本文于 1978 年 8 月 8 日收到。

中国科学院化学研究所提供加湿配套装置,微生物研究所徐浩同志协助工作。福州味精厂王健同志参加部分试验。中国科学院生物物理研究所电镜组和广东省微生物研究所电镜组协助观察。

易观察很可能被忽视。

表 1 血清中和交叉反应

抗血清 (稀释度 1:100)	噬菌体	B 271	B 275
B 271(K = 350)		0	376
B 275(K = 2750)		208	0
对 照		213	418

寄主范围测定的结果(表 2)表明,

B 271 和 B 275 的寄主严格局限于钝齿棒状杆菌,而对相近的产谷氨酸菌中,仅可感染未定名的 T 6-13 菌株,其平板效应均超过钝齿棒状杆菌 B 9。从噬菌体的寄主范围和平板效应分析,可以认为不同来源的 T 6-13, AS 1.542 和 B 9 (HU 7251) 在亲缘关系上十分接近。根据北京棒状杆菌 (*Corynebacterium pekinense*)<sup>[1]</sup>、黄色短杆菌 (*Brevibacterium flavum*) 617 和钝齿棒状杆菌噬菌体的鉴定工作,这些菌株的噬菌体

表 2 噬菌体寄主范围测定结果

菌 株	噬 菌 体	
	B271	B275
<i>Arthrobacter</i> sp. AS 1.8	—	—
<i>Arthrobacter</i> sp. AS 1.94	—	—
<i>Bacillus polymyxa</i> AS 1.224	—	—
<i>Bacillus polymyxa</i> AS 1.441	—	—
<i>Bacillus subtilis</i> AS 1.15	—	—
<i>Bacillus subtilis</i> AS 1.354	—	—
<i>Bacillus subtilis</i> AS 1.398	—	—
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i> AS 1.587	—	—
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i> AS 1.616	—	—
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i> AS 1.617	—	—
<i>Brevibacterium flavum</i> AS 1.495 (617)	—	—
<i>Brevibacterium flavum</i> AS 1.581 (672)	—	—
<i>Corynebacterium crenatum</i> AS 1.542	0.55—0.88	0.59—0.84
<i>Corynebacterium crenatum</i> B9	1.0	1.0
<i>Corynebacterium crenatum</i> HU 72511	1.1—1.4	0.71—1.47
<i>Corynebacterium pekinense</i> AS 1.299	—	—
<i>Corynebacterium pekinense</i> AS 1.563	—	—
<i>Corynebacterium pekinense</i> AS 1.712	—	—
<i>Corynebacterium pekinense</i> AS 1.715	—	—
<i>Corynebacterium pekinense</i> AS 1.716	—	—
<i>Corynebacterium pekinense</i> 7338	—	—
<i>Escherichia coli</i> AS 1.588	—	—
<i>Escherichia coli</i> K12 AS 1.747	—	—
<i>Micrococcus</i> sp. AS 1.493	—	—
AS 1.545	—	—
AS 1.583 (075)	—	—
AS 1.584 (10058)	—	—
AS 1.585 (2305)	—	—
AS 1.721 (10391)	—	—
T6-13	1.07—1.13	1.0—1.2

注:以平板效应表示感染程度,以 B 9 细菌感染为 1.0 计,“—”表示不感染。

表 3 柠檬酸钠对噬菌体成斑百分数的影响

噬菌体	柠檬酸钠 (%)						
	0	0.1	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0
B271	100	91	7.7	0	0	0	0
B275	100	98.9	100.3	95.5	96.2	90.3	99.3

具有界限分明和严格的寄主范围。这种情况,在 Крылов 等人<sup>[15]</sup>报道的  $\phi B$  噬菌体中也有类似的表现,它只感染 *Brevibacterium flavum* BS 22, 而对相近的 *Brevibacterium divaricatum* 或 *C. glutamicus* 均不感染。至今在我们所收集的国内一些产谷氨酸菌株的噬菌体中,尚未发现有对不同类型菌株

具有侵染的能力。

利用柠檬酸对钙或其它二价阳离子的结合,可以间接表明噬菌体吸附的特征,这是区别噬菌体吸附特性的一种简易方法。柠檬酸钠可以抑制噬菌体的吸附和继续生长以及细胞的裂解<sup>[16]</sup>, 这一现象可作为噬菌体特性的一种指标。我们利用柠檬酸钠区分噬菌体 B 271 和 B 275 的这方面特性,发现二者对试剂的反应截然不同(表 3)。因为产谷氨酸菌株在吸附过程中对于  $Ca^{2+}$  或其它二价阳离子需求,存在不同的类型<sup>[12-14]</sup>。因此,在生产中采取柠檬酸(柠檬酸钠)或草酸一类药物预防噬菌体的侵染时,应该注意污染的噬菌体类型。

从热失活的曲线(图1)可以看出,60℃处理 10 分钟后,两种噬菌体的存活率(%)分别迅速下降到  $2.3 \times 10^{-5}$  和  $4.3 \times 10^{-4}$ , 20 分钟后全部失活。因此可以充分利用适当温度处理,达到消除噬菌体的目的。

两株噬菌体的 pH 稳定范围在 pH 7.0—

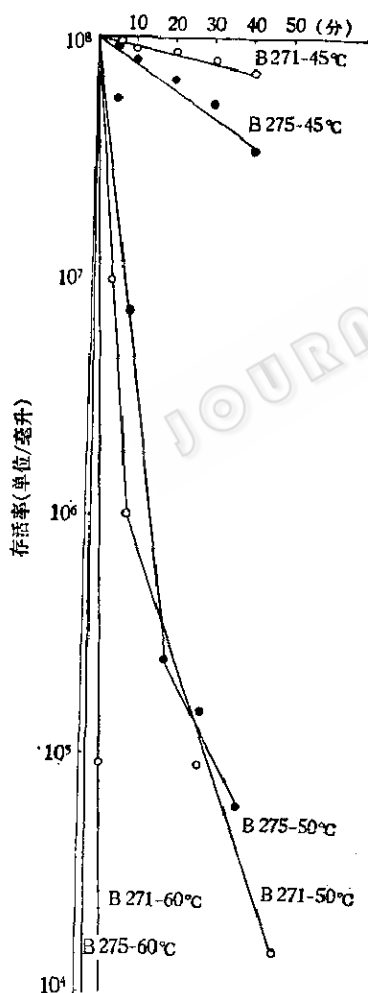


图 1 噬菌体的热失活

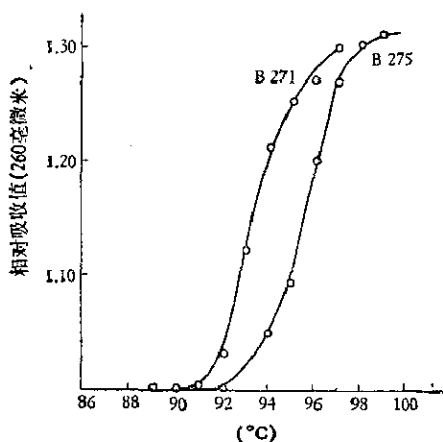


图 2 噬菌体 DNA 增色性曲线

表4 噬菌体在不同 pH 值时的稳定性

存活率 (%) 噬菌体	pH	pH 值										
		2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0
B 271		0	0	17	36	64	100	99	99	92	91	9.1
B 275		$1.7 \times 10^{-4}$	$1.7 \times 10^{-3}$	27	92	97	100	82	82	100	87	2.7

11.0 之间,但 B 275 噬菌体在 pH 5.0—6.0 之间的存活率仍保持较高水平,二者在偏酸或偏碱时明显失活,比北京棒状杆菌的噬菌体的 pH 稳定范围较窄<sup>[1]</sup>,与其它谷氨酸菌株的噬菌体的 pH 稳定性相似<sup>[10]</sup>。

经过酚法提取两株噬菌体的核酸,它们都是 DNA。测定 B 271 和 B 275 的 DNA 的解链温度,分别为 93°C 和 95.9°C (图 2),计算 G-C% 的结果列入表 6。这数值与已发表的产谷氨酸菌的噬菌体 DNA 的 G-C% 相近似<sup>[1,11]</sup>。

表5 一级生长曲线试验

噬菌体	潜伏期(分)	裂解量(每个细胞平均释放数)
B 271	78	44
B 275	65	54

表6 噬菌体 DNA 的  $T_m$  值和 G-C%

噬菌体	$T_m$ 值	G-C%
B 271	93°C	57.80
B 275	95.9°C	64.87

表7 两株噬菌体的大小

噬菌体	大小(毫微米)	
	头 部	尾 部
B 271	37×35	170×8
B 275	79×71	378×10

在电镜下观察两株噬菌体的形态,它们都具有一可弯曲的非收缩性尾部,没有发现其它附属的结构,B 275 的头部和尾部比 B 271 显著大(表 7),但它们的形态相

似,见图 3、图 4。

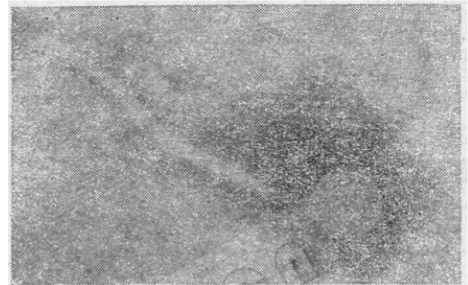


图3 噬菌体 B 271 的形态 275,000×

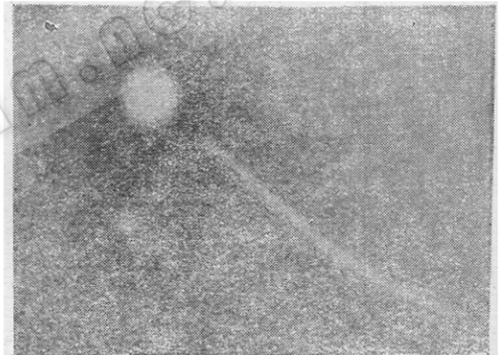


图4 噬菌体 B 275 的形态 120,000×

从以上结果可见两株噬菌体存在明显的差异,表现在抗原性的不同和柠檬酸钠对其成斑率的影响上,而这些标准都是区别噬菌体特性的重要依据<sup>[6,8]</sup>。在其它特性方面,如一级生长曲线、DNA 的 G-C% 和噬菌体的大小也存在明显的不同。

## 参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所噬菌体组:微生物学报,17:211—216,1977。
- [2] 那淑敏、徐星、余茂勋:微生物学报,19:41—44,1979。
- [3] 陈琦、李玲阁:微生物学报,15:119—124,1975。
- [4] 唐任天、郭永复、陈琦:微生物学报,18:45—51,

- 1978。
- [5] Adams, M. H.: Bacteriophages, Interscience Publishers Inc., New York, 1959.
- [6] Adams, M. H. and E. Wade: *J. Bacteriol.*, **68**: 320—325, 1954.
- [7] Kaiser, A. D. and D. S. Hogness: *J. Mol. Biol.*, **2**: 392—415, 1960.
- [8] Kowalski, M., R. Staniewski and L. Halabis: *Acta Microbiol. polon.*, **12**: 175—180, 1963.
- [9] Marmur, J. and P. Doty: *J. Mol. Biol.*, **5**: 109—118, 1962.
- [10] Oki, T., T. Matsui and A. Ozaki: *Agr. Biol. Chem.*, **31**: 1040—1046, 1967.
- [11] Oki, T. and K. Ogata: *Amino Acid and Nucleic Acid*, **17**: 102—108, 1968.
- [12] Oki, T. and A. Ozaki: *Agr. Biol. Chem.*, **31**: 1466—1473, 1967.
- [13] Oki, T. and A. Ozaki: *Agr. Biol. Chem.*, **32**: 320—328, 1968.
- [14] Seto, S., T. Osawa and S. Yamamoto: *Agr. Biol. Chem.*, **32**: 261—266, 1968.
- [15] Крылов, В. Н., Т. Г. Плотникова, Г. И. Каратаев, Г. А. Удровский и В. Н. Зиновьева: *Генетика* **13**: 1260—1267, 1977.
- [16] Марацц, П. А., Л. Н. Москаленко и Я. И. Раутенштейн: *Микробиология*, **42**: 1088—1094, 1973.

## CHARACTERIZATION OF *CORYNEBACTERIUM CREMATUM* PHAGES AND ISOLATION AND DETERMINATION OF THEIR NUCLEIC ACIDS

Yu Mao-xiao Na Shu-min Hsu Hsing

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

L-Glutamic acid-producing bacteria — *Corynebacterium crenatum* AS 1.542 and B9 are the current productive strains in China. Two serotypes of phage designated as B271 and B275 attacking *C. crenatum* were characterized by host-range, one step growth experiment and G-C% of their DNA. Neither of them is capable of infecting selected bacterial strains other than *C. crenatum* and its closely related strain T6-13. Their latent periods were 78 and 65 minutes and burst sizes 44 and 54, respectively. The  $T_m$  of B271 and B275 DNAs were 93° and 95.9°C, respectively. Their G-C% calculated by Doty's equation were 57.80 and 64.87, respectively.

In sodium citrate test a striking difference between B271 and B275 was

found with B271 highly sensitive to divalent cations for adsorption, while B275 was rather insensitive. This fact must be considered in the control of phage infections with chelating agents such as oxalic acid or citric acid. It is proved that this test is also useful in the characterization of phages of L-glutamic acid-producing bacteria.

Both phages are more stable at pH 7.0—11.0, but phage B275 is also stable at pH 5.0—6.0. The survival rates of these phages decline rapidly at 60°C.

Electron micrographs of these phages have shown that they are tadpole-like type with a flexible tail. They are similar in outline but quite different in size.