

弗氏柠檬酸细菌噬菌体的生物学特性

潘若男 汪建民 何晓青

(南昌市医学科学研究所,南昌) (江西省卫生防疫站,南昌)

从属内容菌谱分属于 3 个群的弗氏柠檬酸细菌噬菌体中,选出 13 株制成免疫血清,经血清中和试验,可将 51 株噬菌体分为 6 个血清群, 11 个血清型。以电镜观察形态为基础,结合一级生长试验,噬菌斑形态观察,对温度、pH 和柠檬酸钠试验,将 13 株噬菌体分为 3 类:

第一类 2 株。具有等轴六角形头部和易弯曲的长尾,尾部无收缩性,属于长尾病毒科。血清学属于 A 群和 B 群,群间有低度相关。属内容菌谱属于 ϕI 类。

第二类 4 株。具有长六角形的头部和复杂尾,属于肌病毒科。血清学同属 C 群。属内容菌谱分属于 ϕI 、 ϕII 和 ϕIII 类。

第三类 7 株。具有六角形头部和复杂尾,可能也属于肌病毒科。血清学分属于 D、E、F 群,群间有低度相关。属内容菌谱属于 ϕII 和 ϕIII 类。

关键词 弗氏柠檬酸细菌;噬菌体

为了在沙门氏菌的检验中建立肠杆菌科分属噬菌体的快速诊断方法,作者分离并筛选出具有属特异性的弗氏柠檬酸细菌 (*Citrobacter freundii*) 噬菌体 ϕI 、 ϕII 和 ϕIII 三个群^[1]。本文报道它们的生物学特性以及血清学试验的结果。

稀释至 10^3 pfu/ml,分装试管,每管 1ml,分别置不同温度水浴中处理 10 分钟和 70℃ 处理不同时间,取出后立即在冰水浴中冷却,取 0.1ml 作双层法噬菌斑计数。

2. pH 稳定性试验:参照文献[4],以营养肉汤为稀释液。

3. 柠檬酸钠试验:按文献[5]。

方 法

结 果

(一) 形态观察

取纯化后效价达 10^{10-11} pfu/ml 的噬菌体原液,用 pH 6.5 的 2% 磷酸钾进行负染色,然后在 JEM-100 CX 型电镜(日本电子)下观察。

(二) 血清中和试验

制备噬菌体的抗血清和测定 K 值均按 Adams 的方法^[2]。

(三) 一级生长试验

按 Adams 的方法^[2]进行试验。并绘制一级生长曲线^[3]。

(四) 噬菌斑形态的观察

在双层琼脂平板上观察,所用的培养基同前文^[1],上层的琼脂含量为 1%。

(五) 理化因素的影响

1. 热失活测定:噬菌体原液用 pH 7.4 肉汤

(一) 形态观察

13 株噬菌体根据形态特征可区分为 3 类(图版 I)。

第一类,有 19 和 44 两株。头部为等轴,六角形(直径 55—60nm),尾部长(140 nm),易弯曲,无收缩性。

第二类,有 33、42、49、53 四株。头部为长六角形,形态规则,形体大(110 × 80 nm)。尾部构造复杂,长 130 nm,可见颈

本文于 1982 年 7 月 13 日收到。

承江西省医学科学研究所电镜室陈德怀、王晓华、杨淑华同志摄制噬菌体电镜照片;南昌市卫生学校邹成同志摄制噬菌斑照片;本所陈淑萍同志参加部分实验工作,特此一并致谢。

部、尾鞘、基片及刺突, 个别的还可见到因尾部收缩而外露的尾髓尖端。

第三类, 有 40、41、64、75、65、67、72 七株。头部可因观察方向不同而显示正六角形或其他不规则形态, 图版 I-15 较清楚地显示噬菌体株 72 的立体构型。形体较小或中等大小, 直径 65—80nm。尾部长 (115—125nm), 末端膨大, 有的可见明显的基片, 有的可见类似刺突的结构, 但不清楚。67 和 72 两株的多数噬菌体可见已收缩的尾鞘、基片和露出于尾鞘外的尾髓。

(二) 血清中和试验

利用噬菌体与抗血清中和试验可测出噬菌体的血清 K 值 (中和试验的速度常数)。它可说明抗血清的效价及该噬菌体尾部蛋白质的抗原性。

13 株噬菌体的血清 K 值 (表 5) 与噬菌体的形态密切相关。形态为第一类的 K 值偏低, 为 41 和 74。第二类的 K 值高, 最高可达 1490。第三类的 K 值中等, 约 200 左右, 但 67 和 72 两株偏低。13 株噬菌体的抗血清用各株噬菌体测定 K 值, 以测定株与免疫株 K 值之比率作为两株噬菌体之间的血清学相关度, 可看出各株噬菌体之间的亲缘关系。13 株噬菌体之间的血清学相关度见表 1。除 40、64、75 三株相关度很高, 应属同一血清型以外, 其余每一株噬菌体均为一个独立的血清型。血清型 3、4、5、6 应属同群, 血清型 9、10、11 应属同群, 故可将 11 个血清型归为 6 个血清群。A、B 群之间, D、E、F 群之间, 均有低度相关。血清学分类与形态分类的结果基本一致。

51 株噬菌体测定血清学相关度的结果见表 2—4。 ϕ I 类噬菌体 14 株, 分别属于 1、2、3、4 血清型。 ϕ II 类噬菌体 24 株, 分别属于 5、7、8 型。其中 7 型又可根据

血清学相关度的差别分为 7a 和 7b, 7a 对 3 份抗血清的相关度均达到同样的高度, 7b 仅对 64 (8a) 的抗血清达到高的相关度。 ϕ III 类噬菌体 13 株, 分别属于 6、9、10、11 型, 还有 2 株未分型, 应属于血清群 F。51 株血清学分型的结果与 13 株的结果一致。

(三) 一级生长试验

测得 13 株噬菌体的潜伏期和平均释放量 (表 5)。形态为第一类的两株长尾噬菌体的潜伏期最短, 只有 12 分钟; 其他各株噬菌体均在 16—26 分钟之间。形态为第一类的和第二类的噬菌体平均释放量小, 第三类的噬菌体平均释放量除噬菌体株 72 外都比较大, 其中以噬菌体株 75 的平均释放量最大, 为 112 个。

(四) 噬菌斑形态观察

在双层琼脂平板上大致可以看出有四种不同形态的噬菌斑:

1. 噬菌斑直径 3—6mm, 同心圆形, 中心透明, 外为一混浊的晕圈, 如噬菌体株 19。
2. 噬菌斑直径 3mm, 透明, 边缘整齐, 如噬菌体株 44。
3. 噬菌斑直径 1.5—3 mm, 同心圆形, 外为一混浊的晕圈, 如噬菌体株 75。
4. 噬菌斑直径 0.5—1.5 mm, 透明, 边缘不整齐, 如其他各株噬菌体。

(五) 理化因素的影响

1. 温度: 形态为第一类和第二类的噬菌体对温度比较敏感, 10 分钟灭活温度为 68—72℃, 经 70℃ 处理 10 分钟, 失活 82—100%。第三类的噬菌体比较耐热, 除噬菌体株 65 外, 10 分钟灭活温度为 75—80℃, 经 70℃ 处理 10 分钟失活 57—64%, 处理 30 分钟后仍有少量存活。

2. pH: pH 在 4—10, 各株噬菌体均比较稳定。经 pH 3.0 处理 1 小时, 噬菌体大部失活。其中以形态为第二类的噬菌体抵抗力较强, 经 pH 3.0 处理 1 小时后, 仍有

表 1 13 株噬菌体血清学相关度
Table 1 Serological relatedness among 13 strains of bacteriophages

血清群 serogroups	血清型 serotypes	噬菌体株号 phages	噬菌体抗血清 anti-phage sera													
			19	44	33	42	49	53	40	64	75	41	65	67	72	
A	1	19	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	2	44	5	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	3	33	0	0	100	33	28	26	0	0	0	0	0	0	0	0
C	4	42	0	0	31	100	25	19	0	0	0	0	0	0	0	0
C	5	49	0	0	5	6	100	22	0	0	0	0	0	0	0	0
C	6	53	0	0	4	4	21	100	2	0	0	0	0	0	0	0
D	7	40	0	0	0	0	0	0	100	83	71	5	0	13	17	17
D	7	64	0	0	0	0	0	0	45	100	69	0	0	7	12	12
D	7	75	0	0	0	0	0	0	90	80	100	0	0	9	17	17
E	8	41	0	0	0	0	0	0	3	6	5	100	0	0	10	10
F	9	65	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	100	18	27	27
F	10	67	0	0	0	0	0	0	2	3	4	0	6	100	38	38
F	11	72	0	0	0	0	0	0	2	5	4	2	6	20	100	100

表 2 ϕ I 类噬菌体的血清学相关度
Table 2 Serological relatedness of phage group ϕ I

血清群 serogroups	血清型 serotypes	噬菌体株号 phages	噬菌体抗血清 anti-phage sera			
			19(6a)	44(9a)	33(7)	42(6b)
A	1	19(6a), 19(6b), 42(9a)	52-100	0	0	0
B	2	44(9a), 44(9b)	5-11	100-136	0	0
C	3	33(7), 19(8) 42(7)	0	0	100-129	31-48
C	4	42(6b), 42(6c), 42(10), 18(10a), 19(10) 18(10b)	0	0	28-39	81-100

表 3 ϕ II 类噬菌体的血清学相关度
Table 3 Serological relatedness of phage group ϕ II

血清群 serogroups	血清型 serotypes	噬菌体株号 phages	噬菌体抗血清 anti-phage sera				
			40(8a)	75(12a)	64(8a)	41(10a)	49(10a)
D	7a	40(8a), 40(6), 40(9), 36(8), 75(7), 75(12a)	54-120	61-115	99-132	0-6	0
D	7b	40(12), 40(11), 40(7), 64(7), 64(8), 64(9), 64(10), 64(11), 64(12), 47(12a), 47(10a), 49(12)	35-67	28-57	69-129	0	0
E	8	41(10a), 41(8), 41(7)	3-4	6-7	2-9	95-100	0
C	5	47(8), 49(10c) 49(6)	0		0	0	67-105

表 4 ϕ III 类噬菌体的血清学相关度Table 4 Serological relatedness of phage group ϕ III

血清群 serogroups	血清型 serotypes	噬菌体株号 phages	噬菌体抗血清 anti-phage sera			
			72(7b)	67(12a)	65(9b)	53(6)
F	11	72(7b), 56(10b), 56(8b), 70(9), 67(10a), 69(12)	85-115	16-27	4-38	0
F	10	67(12a)	38	100	6	0
F	9	65(9b), 65(12a)	27-32	24-28	95-100	0
F		50(10), 56(12b)	114-129	88-145	54-108	0
C	6	53(6), 72(7a)	0	0	0	49-100

表 5 噬菌体的一级生长试验和抗血清的 K 值

Table 5 One step growth assay and the K value of antisera of phages

形态分类 morphological pattern	噬菌体株号 phages	抗血清的 K 值 K value of antisera	潜伏期(分) latent period (minutes)	平均释放量 burst size
1	19	74	12	26
1	44	41	12	27
2	33	1490	26	10
2	42	1180	26	29
2	49	354	26	35
2	53	420	23	32
3	40	135	22	83
3	64	196	20	56
3	75	192	16	112
3	41	176	26	54
3	65	175	20	52
3	67	51	19	104
3	72	46	20	32

10—24% 存活; 而其他噬菌体的存活率均低于 3%(表 6)。

3. 柠檬酸钠: 测定柠檬酸钠对噬菌体的影响, 可以说明噬菌体在吸附过程中对钙离子的需要。柠檬酸钠可以与钙离子结合, 阻止需要钙离子的噬菌体在细胞上吸附。表 7 表明, 形态为第一类和第二类的噬菌体均对 2% 柠檬酸钠不敏感, 而第三类的噬菌体对此均敏感。

讨 论

根据以上试验结果, 并参考国际病毒分类委员会的第二次报告^[6] 和 Bradley 提出的噬菌体分类法^[7], 将 13 株弗氏柠檬酸细菌噬菌体分为 3 类:

第一类 2 株, 均属于 ϕ I 类。具有等轴六角形头部和易弯曲的长尾, 尾部无收缩性。这一类噬菌体为 Bradley B 群, 属于长

表 6 不同 pH 值对噬菌体存活的影响

Table 6 The effect of pH values on phages

pH	19	44	33	42	49	53	40	64	75	41	65	67	72
	(噬菌体存活% survival % of phage)												
3.0	0.5	0.6	10	12	22	24	3	0	0.5	0.5	2	0.2	0
4.0	75	63	76	96	79	89	106	51	96	74	73	73	70
5.0	87	80	91	96	95	81	108	86	103	80	94	82	84
6.0	101	88	100	94	90	85	109	92	114	83	96	95	100
7.0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
8.0	102	85	87	83	93	93	96	104	97	104	76	104	85
9.0	76	82	70	72	106	88	95	87	92	97	95	102	99
10.0	95	76	81	89	89	73	103	89	102	76	87	82	81

表 7 柠檬酸钠对噬菌体成斑率的影响

Table 7 Effect of sodium citrate on phages

柠檬酸钠 Sodium citrate (%)	19	44	33	42	49	53	40	64	75	41	65	67	72
	(噬菌体成斑% survival % of phages)												
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0.25	95.5	77.2	98.4	99.8	103	94.4	90.2	93.4	94.2	96.1	94.1	94.5	45.8
0.5	97.5	74.6	99.5	96.7	99.4	91.7	85.5	64.5	98.4	52.2	86.0	87.2	25.2
1.0	102	73.1	95.7	94.9	101	99.0	40.4	15.6	80.0	6.3	76.0	48.0	5.7
2.0	103	71.2	90.3	71.8	105	61.3	0	0	0	0	0	0	0
4.0	103	66.0	92.5	0	73.4	0	0	0	0	0	0	0	0

尾病毒科 (Styloviridae)。尾部抗原性弱,血清K值低。血清学属于A群和B群,群间有低度的相关。潜伏期短,平均释放量小。但因在一定时间内增殖的代数多了,故产生的噬菌体的总数呈对数增长,因而噬菌斑就大。这可以解释 Elford 和 Andrews (1932)^[6] 所描述的小噬菌体产生大噬菌斑的原因。对温度、pH 比较敏感,对柠檬酸钠不敏感。

第二类 4 株,包括 ϕ I 类的 2 株, ϕ II 和 ϕ III 类的各 1 株。具有长六角形头部和复杂尾部。这一类噬菌体的形态与 T2 噬菌体相似,现在认为是由连接的两个半个的二十面体构成^[9,10],为 Bradley A 群中的大噬菌体,属于肌病毒科 (Myoviridae)。尾部抗原性强,故血清K值高,虽具有不同的

溶菌谱,但血清学同属于C群。潜伏期长在一定时间内增殖代数少,最后噬菌体总数不多,故形成较小的噬菌斑,可以解释大噬菌体产生小噬菌斑的原因。对温度比较敏感,对 pH 较稳定,对柠檬酸钠不敏感。

第三类 7 株,包括 ϕ II 类的 4 株和 ϕ III 类的 3 株。具有六角形头部和复杂尾。这一类噬菌体的形态与 Bradley 的 E1 噬菌体相似,为 A 群中的小噬菌体^[7],可能也属于肌病毒科。尾部抗原性次于第二类或偏低,分属于 D、E、F 群,群间有低度相关。潜伏期中等或偏长,平均释放量大,噬菌斑均小。个别的噬菌体株如 75 的潜伏期较短,释放量高达 112,具有中等大的噬菌斑。对温度较不敏感(噬菌体株 65 除外),对 pH 和柠檬酸钠均敏感。

参 考 文 献

- [1] 潘若男等: 中华微生物学和免疫学杂志, **1**: 260—264, 1981。
- [2] Adams, M. H.: *Bacteriophages*, Interscience Publ. Inc., New York, 1959.
- [3] Benzer, S.: *J. Bacteriol.*, **63** (1): 59—72, 1952.
- [4] 余茂効等: 微生物学报, **14**(2): 216—223, 1974。
- [5] 余茂効等: 微生物学报, **19** (3): 297—301, 1979。
- [6] Fenner, F. (廖延雄等译): «病毒的分类与命名», 科学出版社, 北京, 1980。
- [7] Bradley, D. E.: *Bacteriol. Rev.*, **31** (4): 230—314, 1967.
- [8] Elford, W. J. and C. H. Andrews: *Brit. J. Exptl. Pathol.*, **13**: 446, 1932.
- [9] Martin, S. J.: *The Biochemistry of Viruses*, Cambridge University Press, 1978.
- [10] Douglas, J.: *Bacteriophages*, Chapman and Hall, London, 1975.

BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE BACTERIOPHAGES OF *CITROBACTER FREUNDII*

Pan Ruonan Wang Jianmin

(Nanchang Institute of Medical Science, Nanchang)

He Xiaoqing

(Sanitary and Anti-epidemic Station of Jiangxi, Nanchang)

Fifty-one strains of bacteriophages of *Citrobacter freundii* can be divided into 6 serogroups and 11 serotypes by serological neutralization assay. Thirteen phage strains belong to three lyso-pattern groups in this genus by their serological assay. They also can be classified to 3 groups by their morphological observation under the electron microscope, one step growth experiment, plaque morphology, heat inactivation, effect of pH and sodium citrate test.

Group I includes two phages, having a hexangular head with axial symmetry, 55—60 nm in diameter and a flexible tail, 140 nm long. This group belongs to two serogroups, i.e. A and B, and includes in the family *Styloviridae*. Some relatedness between these two serogroups was also revealed. Their latent period and burst size were assayed by one step growth experiment to be 12 minutes and 26—27, respectively. The large plaque forming phages are sensitive to heat and pH treatment at pH 3, but stable in the treatment with 2% sodium citrate. Their lyso-patterns includes ϕ I in the *Citrobacter*.

Group II includes four phages, having a protruding hexangular head, 110×80 nm in size, with a contractible complex tail, 130

nm long. This group belongs to *Myoviridae*, serogroup C, their latent period and burst size being 23—26 minutes and 10—35, respectively. The small plaque forming phages are sensitive to heat and not very sensitive to pH 3 treatment, but stable in 2% sodium citrate. Their lyso-patterns includes ϕ I, ϕ II and ϕ III in the genus *Citobacter*, respectively.

Group III includes three phages, having a hexangular head, 65—80 nm in diameter with a contractible complex tail, 115—125 nm long. These phages belong to serogroups D, E and F, respectively and might be included in the family *Myoviridae*.

Less relatedness appeared between these serogroups. Their latent period and burst size are 19—26 minutes and 32—104, respectively. These phages form small plaques. But plaques of middle size are formed by strain 75 in this group with different latent period (16 min) and burst size (112).

They are not sensitive to heat, except strain 65, but sensitive to pH 3 and 2% sodium citrate treatments. Their lyso-patterns are included in ϕ II and ϕ III.

Key words

Citrobacter freundii; Bacteriophage