

北京棒状杆菌 AS1.299 噬菌体形态 及生物学特性的研究

赵志山 单志萍 王森

(东北师范大学生物系, 长春)

从味精厂的发酵废液中, 分离出四株噬菌体, 通过血清学研究, 可以区分为四种血清型, 同时还进行了寄主范围、一级生长曲线、pH 稳定性及热失活测定。对噬菌体的形态作了电镜观察, 发现它们之间不但在形态上不同, 而且各自的生物学特性也有明显区别。

关键词 形态学

1981年, 我们从吉林省辽源味精厂的北京棒状杆菌发酵废液中, 经分离纯化, 发现噬菌斑形态大小不同的四种噬菌体, 编号为 Z_A、Z_B、Z_S 和 Z_P, 可区分为四种血清型; 通过噬菌体某些生物学特性研究, 发现它们之间存在着明显差别; 电镜观察指出, 三株噬菌体是有尾的, 这与某些研究报道相似^[1], 有一株还未观察到有尾部存在, 需进一步观察。对每种噬菌体某些重要生物学特性的研究, 不但可以进一步证明它们之间的区别, 而且为防治噬菌体对生产菌的侵染提供科学依据。

材料和方法

(一) 菌株、噬菌体和培养条件

菌株由辽源味精厂提供, 北京棒状杆菌 AS 1.299 (*Corynebacterium pekinense*) 来自中国科学院微生物研究所。培养温度 31℃, 摇瓶振荡培养 180 次/分。噬菌体样品系从辽源味精厂发酵废液中分离。

(二) 培养基

牛肉汁培养基(%): 牛肉膏 1、蛋白胨 1、葡萄糖 0.5、NaCl 0.5。上层平板培养基加琼脂 1%, 下层平板培养基加琼脂 2%, pH7.0。

液体培养基: 葡萄糖 2.5%、玉米浆 0.8%、

K₂HPO₄ · 3H₂O 0.1%、MgSO₄ · 7H₂O 0.05%、尿素 2.5%、FeSO₄ · 7H₂O 2ppm、MnSO₄ · 7H₂O 2ppm, pH7.0。

250ml 三角瓶装 20ml 培养基。

(三) 噬菌体的分离、纯化和浓缩

将感染噬菌体的废发酵液离心, 利用双层平板法, 经 31℃ 培养 24 小时, 然后挑取不同形态和大小的单噬菌斑, 制成悬液, 稀释为不同浓度, 再作双层平板培养。反复纯化 3—5 次, 直至噬菌斑大小一致, 即为纯化的噬菌体^[2]。

将纯化噬菌斑放入少量蛋白胨液, 然后制成平板, 培养后斑连斑, 取上清液, 离心 (5,000 转/分) 此液即为浓缩液, 效价可达 10⁹~10¹¹ pfu/ml, 放入冰箱保存备用^[3]。

(四) 抗血清制备及血清中和反应

按通常方法^[4]制备每种噬菌体抗血清。然后把血清经 56℃ 处理 30 分钟, 再按 Adams^[5] 方法进行血清中和交叉反应试验。

(五) 寄主范围测定

取效价为 10³ pfu/ml 的噬菌体液加入待试菌液, 按双层平板法测定每种噬菌体的平板效应。

(六) 噬菌体一级生长曲线和裂解量测定

本文于 1984 年 7 月 31 日收到。

本研究工作承中国科学院微生物研究所余茂致教授指导; 中国人民解放军军医大学、白求恩医科大学及东北师大生物系电镜室协助摄制照片, 特此致谢。

按 Adams^[2] 方法进行。

(七) pH 稳定性测定

用 NaOH 和 HCl 将 1% 蛋白胨液调制成为 pH2—12 的不同系列。然后分别取不同 pH 的蛋白胨液 4.5ml 加入试管中, 放在 25℃ 水浴中, 待温度稳定后, 加入效价为 10^7 pfu/ml 的噬菌体液 0.5ml, 保温 1 小时后, 用 pH 7.0 的蛋白胨液进行适当稀释, 再按双层平板法培养、计数^[2]。

(八) 热失活测定

将效价为 10^7 pfu/ml 的每种噬菌体 0.5ml, 分别加到 4.5ml pH 7.0 的蛋白胨液中, 然后放在 60℃ 水浴中, 按一定时间间隔取样, 取出的样品立即放入冰箱中降温。进行适当稀释后, 按双层平板法培养、计数^[2]。

(九) 电子显微镜观察

用附有膜的钢网, 滴上少量经过纯化、浓缩的

噬菌体液, 或用附有膜的铜网轻轻贴在待观察的噬菌斑上, 待自然干燥后, 用磷钨酸 (pH7.0, 3%) 负染约 10 分钟, 自然干燥后在电镜下进行观察。

结果和讨论

(一) 噬菌斑形状和大小

将分离纯化的每种噬菌体, 按双层平板法培养 24 小时后, 观察噬菌斑形态并量其大小: 噬菌体 Z_A 形成的斑为圆形、透明, 约 8mm; 噬菌体 Z_B 的斑为圆形、透明, 约 5mm; 噬菌体 Z_S 的斑为圆形、透明, 约 1mm; 噬菌体 Z_P 的斑圆形、透明, 约 2mm。

(二) 血清中和交叉反应

将每种噬菌体制成适当效价的抗血

表 1 血清中和交叉反应

Table 1 Serological relation between phages

噬菌体 Phage Antiserum (1:100)	Z_B	Z_P	Z_S	Z_A
Z_B K = 1600	0	226	231	273
Z_P K = 930	209	0	210	242
Z_S K = 500	237	320	0	203
Z_A K = 1900	210	206	188	0
对 照 Control	241	322	238	283

清, 然后利用血清中和交叉反应, 区分它们之间的血清学关系, 结果见表 1。

从表 1 可知, 这四株噬菌体在血清学上可区分为四种血清型。这说明每株噬菌体的蛋白质外壳结构不同。

(三) 寄主范围

利用四株噬菌体对所试菌株分别进行寄主范围测定, 然后观察其感染程度, 计算出斑率, 结果见表 2。

由表 2 可见, 这四株噬菌体对不同株的北京棒状杆菌均能感染, 但感染程度不一, 对其他菌株不感染。 Z_B 对 AS1.716,

Z_S 对 AS1.713, Z_A 对 AS1.563 感染率低, 而 Z_P 特殊, 可感染抗噬菌体菌株 AS1.293, 并与其他三株噬菌体不同, 可感染 AS1.661 而不感染 AS1.586。但这四株噬菌体对抗噬菌体菌株 AS1.218 和 AS1.292 均不感染。

(四) 一级生长曲线

一级生长曲线和裂解量的测定结果如表 3。

由表 3 所列结果可知, 这四株噬菌体潜伏期不同, 一般在 64—109 分钟, 裂解量在 73—179。 Z_B 潜伏期最短, 只有 64 分钟,

表 2 噬菌体寄主范围测定
Table 2 Host range of phages

菌株 Strain	噬菌体 Phage	Z _B	Z _P	Z _S	Z _A
<i>Bacillus licheniformis</i> AS 1.52		—	—	—	—
<i>Bacillus subtilis</i> AS 1.105		—	—	—	—
<i>Brevibacterium ammentagenus</i> AS 1.617		—	—	—	—
<i>Brevibacterium flavum</i> AS 1.495		—	—	—	—
<i>Corynebacterium crenatum</i> B9		—	—	—	—
<i>Corynebacterium pekinens</i> AS 1.293		—	0.21	—	—
<i>Corynebacterium pekinens</i> AS 1.292		—	—	—	—
<i>Corynebacterium pekinens</i> AS 1.299		1.0	1.0	1.0	1.0
<i>Corynebacterium pekinens</i> AS 1.563		0.84	0.46	0.90	0.47
<i>Corynebacterium pekinens</i> AS1.712		0.81	0.84	0.78	0.78
<i>Corynebacterium pekinens</i> AS 1.713		0.94	0.71	0.50	0.80
<i>Corynebacterium pekinens</i> AS 1.586		0.93	—	0.91	0.68
<i>Corynebacterium pekinens</i> AS 1.661		—	0.41	—	—
<i>Corynebacterium pekinens</i> AS 1.716		0.41	0.74	0.97	0.91
<i>Corynebacterium pekinens</i> AS 1.734		—	—	—	—
<i>Corynebacterium pekinens</i> AS 1.218		—	—	—	—
<i>Lactobacillus plantarum</i> AS 1.555		—	—	—	—
<i>Pseudomonas fluorescens</i> AS 1.33		—	—	—	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AS 1.512		—	—	—	—
<i>Micrococcus</i> sp. AS 1.493		—	—	—	—
<i>Escherichia coli</i> AS 1.505		—	—	—	—

表 3 噬菌体一级生长实验和裂解量
Table 3 One-step growth and burst size of phages

噬菌体 Phage	潜伏期 (分) Latent period (min)	裂解量(平均释放数/细胞) Burst size (Phage/cell)
Z _B	64	94
Z _P	83	179
Z _S	85	149
Z _A	109	73

表 4 不同 pH 值对噬菌体的影响
Table 4 Effect of pH values on phages

存活率(%) Survival	pH	噬菌体 Phage										
		2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0
Z _B		0	0.005	0.0026	41	87	100	100	99	98	95	93
Z _P		0	0	0	0.062	44	100	95	74	73	75	62
Z _S		0	0	0.0013	49	57	100	86	93	91	92	49
Z _A		0	0	0	51	60	100	74	75	98	96	60

Z_S 和 Z_A 的潜伏期与余茂效等^[4]报道的相近。研究清楚噬菌体的潜伏期, 对利用药物防治噬菌体, 在时间上提供了依据。这四株噬菌体的裂解量最大是 Z_P 为 179, 最小的是 Z_A 为 73。就潜伏期和裂解量而言, 危害最大的是 Z_P 噬菌体, 最小的是 Z_A , 但环境条件也是很重要的。

(五) 噬菌体对 pH 的稳定性

pH 的高低对噬菌体的影响很大, 这反映出噬菌体对 pH 的敏感程度。根据测定结果(表 4), 这四株噬菌体在 pH 5—12 范

围内均可存活, 但 pH 稳定的适应范围在 pH6—11。其中 Z_B 噬菌体 pH 适应范围较其他三株广些, Z_P 、 Z_A 和 Z_S 噬菌体对偏低的 pH 都很敏感, 尤其 Z_P 更为敏感, pH5 时的存活率只有 0.062%。所以, 生产中可以利用噬菌体对 pH 的反应不同, 来杀灭噬菌体。

(六) 噬菌体对热的稳定性

将四株噬菌体放在 60℃ 水浴中, 作热失活试验, 它们对热的稳定性差别很大, 结果见表 5 和图 1。

表 5 Z_P 噬菌体热失活试验

Table 5 Effect of temperature on phage Z_P

存活率(%) Survival °C	分钟 (min)						
		5	10	15	20	25	30
70		0.0016	0.0012	0.0012	0.0011	0	0
80		0	0	0	0	0	0

从实验结果可以看出, 噬菌体 Z_A 、 Z_B 和 Z_S 对热的稳定性均较差, 而 Z_P 对热的稳定性较强, 甚至在 70℃ 处理 20 分钟仍有 0.0011% 的存活。

(七) 电镜观察

根据多次电子显微镜的观察, 发现这四株噬菌体的形态和大小有很大差别, 结果如表 6 和图 2。

表 6 噬菌体的形态和大小

Table 6 Morphology and size of phages

噬菌体 Phage	头部(nm) Head	尾部(nm) Tail
Z_B	41	265×7.9
Z_A	62	190×4
Z_S	50	250×8.4
Z_P	34	尚未观察到 have not been observed

由表 6 和图 1 可以看出:

1. 噬菌体 Z_A : 头部比其他三株的大,

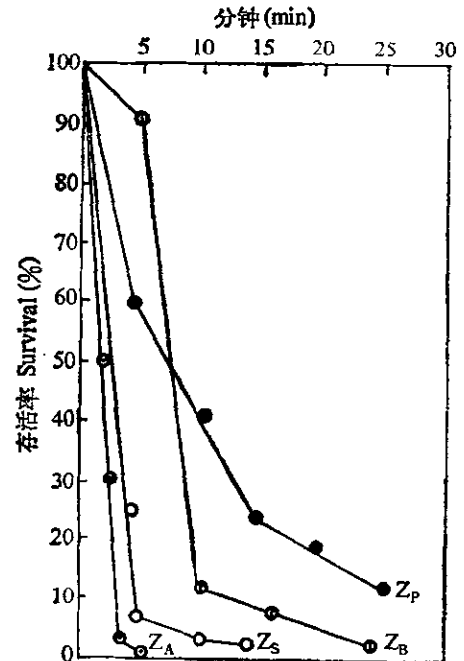


图 1 60℃ 时噬菌体的热失活

Fig. 1 Phage inactivating by heating at 60°C



图 2 噬菌体的电镜照片

Fig. 2 Electron micrographas of phages

1. $Z_A(\times 290,000)$; 2. $Z_B(\times 192,000)$;
3. $Z_S(\times 240,000)$ 。

头部外形呈六角形多面体，尾部较短、弯曲，但较粗，末端膨大，无收缩性尾鞘(图 2-1)，与 A_2 相似。

2. 噬菌体 Z_B : 头部中等，外形为正六角形多面体，尾部比其他三株长，无收缩性尾鞘，(图 2-2)，这与 A_{155} 相似。

3. 噬菌体 Z_S : 头部较大，呈非正六角形多面体，尾细长，属非收缩性尾(图 2-3)，这与 A_3 有些相似。

4. 噬菌体 Z_P : 经多次电镜观察，此株头部很小，近六角形多面体，尚未观察到尾部。

根据上述所测各项结果和电镜观察，北京棒状杆菌 AS 1.299 感染的四株噬菌体 Z_A 、 Z_B 、 Z_S 和 Z_P 分属于四种不同血清型，它们的生物学和形态特性也有很大差别。噬菌体 Z_B 、 Z_S 和 Z_A 均有头部和很长尾部，均为非收缩性尾。 Z_P 有头部，尚未观察到尾部。研究噬菌体形态及生物学特性，在生产中不仅有助于识别它们，对于采取相应措施防治也有重要意义。

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(3): 211—216, 1977。
- [2] 余茂效等: 微生物学报, 14(2): 216—223, 1974。
- [3] 颜望明等: 微生物学报, 19(1): 43—51, 1979。
- [4] 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, 北京, 1973。
- [5] Adams, M. H.: Bacteriophages, Interscience Publishers, Inc, New York, 1959。

STUDIES ON MORPHOLOGY AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF *CORYNEBACTERIUM PEKINENSE* AS 1.299 PHAGES

Zhao Zhishan Shan Zhiping Wang Miao

(*Department of Biology, Northeast Normal University, Changchun*)

Four phages were isolated from the lysats of abnormal fermentation. They were identified as Z_A , Z_S , Z_B , Z_P , and characterized by serological reactions, host-range relationship, one-step growth experiment, pH-stability and heat-stability, and morphology of four phages was observed in the electron microscope. The latent periods and burst sizes determined by one-step growth experiments showed different parameters among them. Their

stability at different pH was detemined, they were more stable at pH 6—11, but phage Z_P was more stable at pH 6.

The survival rates of four phages were declined rapidly at 60°C, but Z_P could survive at 70°C.

Key word

Morphology