

短小芽孢杆菌噬菌体的分离及特性

蒋如璋

(南开大学生物系, 天津)

李志新

(天津市利华食品厂, 天津)

马俊荣

(唐山市华北煤炭医学院卫生系, 唐山)

以短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) 1037 及其抗噬菌体衍生株为指示菌, 从噬菌体滋生环境中分离得到 10 株噬菌斑形态和宿主范围不同的 pp 系列噬菌体, 并对它们的血清型、宿主范围以及对热和对不同 pH 的稳定性进行了研究。结果表明, 在噬菌体滋生的环境中实际存在着不同血清型和宿主范围的噬菌体群体。由 pp 系列噬菌体与不同宿主菌之间的关系推测, 杂菌污染是噬菌体污染的导因, 因而认为在工业上防治噬菌体对生产的危害必须采取综合治理措施。

关键词 短小芽孢杆菌; 噬菌体

以 *B. subtilis* 为宿主分离得到的噬菌体, 有些也能感染 *B. pumilus* 的某些菌株^[1,2,3]而有关 *B. pumilus* 噬菌体的研究报道很少^[4]。在我国, *B. pumilus* 是碱性蛋白酶生产菌株之一, 在生产中曾发生过严重的噬菌体污染, 造成了一定经济损失^[5]。为了筛选抗噬菌体菌株及寻找防治噬菌体危害的措施, 本文报道以 *B. pumilus* 1037 及其抗噬菌体衍生株为指示菌从噬菌体大量滋生的环境中分离获得 pp1—pp10 共十株噬菌体, 并对它们的某些特性作了比较研究, 以期为发酵工业中噬菌体的综合防治和抗噬菌体菌株的应用提供理论依据。

材料和方法

(一) 菌株

Bacillus pumilus 1037 为噬菌体的典型宿主菌, 384 和 587 为 1037 的抗噬菌体

pp1—pp6 和 pp10 的抗性衍生菌株, S^r-1 为其抗链霉素衍生株; 289 为沈阳林土所分离的野生型菌株; AS1.271、AS1.326 由北京中国科学院微生物研究所提供; 65301 由天津河北制药厂提供。 *Bacillus subtilis* W-23、AS1.338、AS1.257、AS1.398; *Bacillus megaterium* AS1.127; *Bacillus thuringensis* AS 1.16; *Bacillus cereus* AS 1.126; *Bacillus polymyxa* AS 1.441 均由北京中国科学院微生物研究所提供。 *Bacillus subtilis* 168 和 SB19 由北京中国科学院遗传学研究所提供; ATCC 6633 由天津河北制药厂提供; 209 (BF7658 的衍生菌株) 为利华食品厂菌株。

本文于 1989 年 4 月 3 日收到。

天津市利华食品厂的舒威、慕春健、刘丽玲参与了部分试验工作。

致谢: 在噬菌体的分离和鉴定过程中, 曾得到中国科学院微生物研究所余茂尧先生的指导和帮助, 在此表示感谢。

(二) 培养基及培养条件

TY 培养基按 Romig^[3] 方法配制(采用日本多聚蛋白胨), 制作底层培养基时加 1.5% 琼脂粉, 上层培养基加 0.7% 琼脂粉。PBG 培养基组成为(g/L): 蛋白胨 10, 牛肉膏 7, 葡萄糖 10, NaCl 5, pH7.2。NBY 培养基(g/L): 蛋白胨 3, 牛肉膏 3, 酵母膏 3, NaCl 5, pH7.0。1% 蛋白胨水作为噬菌体稀释剂。培养温度为 37℃。

(三) 噬菌体效价测定及噬菌斑形态观察

采用 Adams 双层平板法^[4]。

(四) 噬菌体悬液制备

采用双层平板法^[4], 用玻璃刮子刮下斑与斑相连的上层琼脂, 搅碎, 加入 3ml 蛋白胨水浸泡 15 分钟, 离心取上清液, 再以孔径为 0.3 μm 的微孔滤膜过滤, 测定效价, 保存备用。

(五) 溶源性测验

按 Romig 法进行^[3], 将宿主菌与噬菌体悬液同时接入 NBY 培养液, 在摇床上培养 48 小时, 形成芽孢。以新鲜 NBY 培养液稀释 10 倍, 经 80℃ 处理 20 分钟以杀灭游离噬菌体, 冷却后, 继续在摇床上培养 6—8 小时, 利用双层平板法测定效价。以不加噬菌体的经同样培养的宿主菌作为对照, 如果对照无噬菌斑形成, 则样品中所出现的噬菌体即为芽孢内自发释放产生的。

(六) 宿主范围的测定

同时采用双层平板法、平板点滴法和溶源性测验法三种方法进行。用点滴法和双层平板法检测噬菌体在不同菌株的菌苔上形成噬菌斑的能力及噬菌斑形成的相对数。用溶源性检测法检测能否使被测菌株溶源化。如果噬菌体能使 *B. pumilus* 1037 以外的菌株溶源化, 则进一步用抗血清中和该溶源化菌株悬液, 如果中和后在含 *B. pumilus* 1037 双层平板上不出现噬菌斑,

而中和前能形成, 便证明噬菌斑确系待测噬菌体所致。

(七) 抗血清的制备和血清中和试验

按 Adams^[6] 方法进行, 制备的抗血清需经 56℃ 处理 30 分钟备用。

(八) 热失活测定

取 0.1ml 效价为 5×10^3 噬菌斑形成单位/毫升的噬菌体悬液加入 70℃ 预热的蛋白胨水中, 混合继续保温不同时间, 取样测定效价。

(九) 不同 pH 对噬菌体存活的影响

以 HCl 或 NaOH 将 PBG 培养基分别调 pH 为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0 (雷磁 25 型 pH 计)。加入定量的噬菌体悬液, 37℃ ± 0.5℃ 静置 24 小时后, 用蛋白胨水适当稀释后, 测定效价。

(十) *B. pumilus* 1037 溶源性的证明

按 Haas 等方法^[8], 采用丝裂霉素 C (日本 Kyowa Hakko Kogyo 公司出品) 诱导使 *B. pumilus* 1037 裂解, 用 PEG 6000 絮凝收集噬菌体。

结 果

(一) 噬菌体的分离和纯化

取感染噬菌体的发酵液及厂区内的水样和土样, 采用双层平板法直接分离, 或取适量样品加入接有宿主菌的 TY 培养液中, 37℃ 增殖后采用双层平板法分离, 由分离平板挑取单一噬菌斑, 连续纯化四次以上, 直至每一噬菌斑形态一致为止, 作为制备噬菌体原液。它们在 37℃ 培养 15 小时后均形成边缘清晰整齐、中心透明、由中心向外呈数量不同的一道道明暗圈的噬菌斑(图 1 以 pp3 为例), pp1 噬菌斑透明, 有一道宽晕圈; pp2 有两道晕圈; pp3 有多道晕圈; pp4 不透明; pp5 类似 pp1; pp7—pp9 类似 pp2; pp6 和 pp10 的中心透明圈

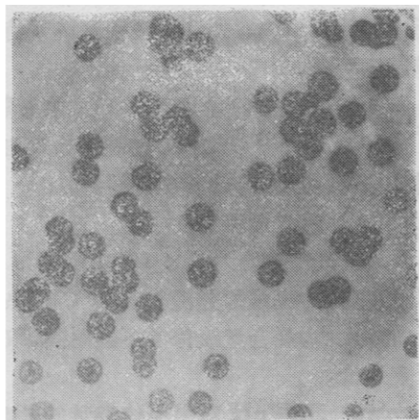


图1 pp3的噬菌斑形态

Fig.1 Plaque morphology of phage pp3

比 pp1 大。

(二) 溶源化试验

1. 宿主菌溶源性的证明：经丝裂霉素

表1 *B. pumilus* 1037 的 pp 系列噬菌体溶源菌的稳定性Table 1 The stability of lysogenization of pp-phages in *B. pumilus* 1037

世代 Generation	噬 菌 体 Phage										
	p1	p6	p10	p2	p3	p4	p5	p7	p9	p8	对照 Control
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

+: 释放游离噬菌体。

+: Release of free phages.

能表现不同的反应(表 3): (1) 能在双层平板上形成噬菌斑, 同时也能使宿主菌溶源化, 例如对 *B. pumilus* 1037 和 *B. subtilis* 209; (2) 只能形成噬菌斑, 不能使宿主菌溶源化, 例如对 *B. polymyxa* AS 1.441; (3) 只能使宿主溶源化, 而不形成噬菌斑, 例如对 *B. subtilis* W-23。上述不同反应表现出噬菌体与不同宿主菌之间不同的关系。

由于 pp 系列噬菌体不能以 *B. subtilis* 168 SB19 和 W-23 菌株为宿主, 所以它们不同于 SP 系列噬菌体^[1]的另一类群

C 诱导和电镜观察证明, *B. pumilus* 1037 本身系溶源性菌株, 但它所携带的是一种只包裹宿主 DNA 的缺陷噬菌体, 不能以任何一株所试验的菌株为宿主形成噬菌斑。因此, 该菌是一缺陷型噬菌体颗粒溶源性菌株^[12]。

2. pp 系列噬菌体的溶源化试验: pp 系列 10 株噬菌体都能使 *B. pumilus* 1037 溶源化形成溶源孢子, 故对 1037 菌株来说, 这些噬菌体都是温和性噬菌体, 溶源性孢子经过连续 5 次传代, 都能自发释放游离噬菌体(表 1), 可见溶源性是稳定的。

(三) 宿主范围

pp 系列噬菌体都不同程度地感染两种以上的宿主菌株(表 2、表 3)。而且同一株噬菌体(例如 pp1)对不同宿主菌也可

的噬菌体。

(四) 血清型

血清交叉中和反应表明, 十株噬菌体分属四个血清型。血清型 I 包括 pp1 pp6 和 pp10; II 包括 pp2、pp3、pp4 和 pp5; III 包括 pp7 和 pp9; IV 为 pp8。各血清型代表株分别为 pp10, pp2, pp9 和 pp8。表 4 示四个血清型的噬菌体代表株的抗血清交叉中和反应结果。由表 4 可见, 在血清学上四个血清型之间是不相关的。

(五) 热失活

pp 系列噬菌体的热失活临界温度为

表 2 pp 系列噬菌体对不同宿主的出斑率
Table 2 Plaque-forming efficiency of pp-phages on different host strains

菌 株 Strains	pp 系列噬菌体 pp-phage									
		6	10	2	3	4	5	7	9	8
<i>B. pumilus</i> 1037	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>B. pumilus</i> 384	0	0	0	0	0	0	0	1.0	0.9	1.0
<i>B. pumilus</i> 578	0	0	0	0	0	0	0	1.3	0.8	1.2
<i>B. pumilus</i> S ^r -1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. pumilus</i> 289	0.8	0.5	0.5	0.9	0.2	0.5	0.8	1.0	1.25	0.01
<i>B. pumilus</i> AS1.271	0.01	1.0	0.015	1.0	0.4	0.7	0.7	0.09	0.05	0.01
<i>B. subtilis</i> 209	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. polymyxa</i> AS1.441	1.0	0.45	0.04	1.0	1.0	0.3	0.8	1.0	1.5	0.01
血清型 Serotype		I		II			III		IV	

表中数字为 pp 系列噬菌体对不同宿主的出斑率。

+: 表示相对出斑率很低, 且不稳定。

Numbers in the table are relative plaque-forming efficiency of pp-phages on different host strains.

+: Indicated that the relative plaque-forming efficiency is variable and quite low (among 0.001-0.01).

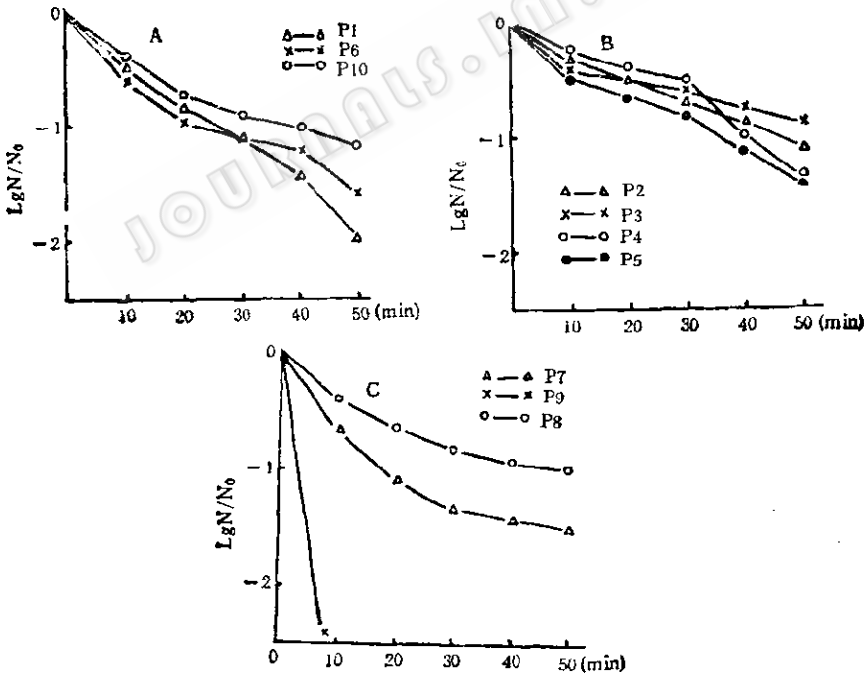


图 2 pp-噬菌体的热失活曲线

A. 血清型 I 噬菌体; B. 血清型 II 噬菌体; C. 血清型 III 和 IV 噬菌体

Fig. 2. Thermal inactivation of pp-phages

A. Inactivation of serotype I phages; B. Inactivation of serotype II phages; C. Inactivation of serotype III and IV phages

表3 pp 系列噬菌体的宿主范围
Table 3 The host range of pp-phages

菌株 Strain	pp 系列噬菌体 pp-phages									
	1	6	10	2	3	4	5	7	9	8
<i>Bacillus pumilus</i>										
1037	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
384	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)
578	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)
S ^c -1	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-
289	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
AS1.271	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
AS1.326	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65301	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>										
W23	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
168	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SB19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ATCC6633	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AS1.338	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AS1.257	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AS1.398	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
209	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>Bacillus licheniformis</i> 2709	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus megaterium</i> AS1.127	(-)	(-)	(-)	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus thuringiensis</i> AS1.16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> AS1.126	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus polymyxa</i> AS1.441	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
血清型 Serotype	I			II				III		IV

+: 形成噬菌斑, 不溶源化 Plaque forming, nonlysogenization.

-: 不形成噬菌斑, 也不溶源化 No plaque forming, nonlysogenization.

(+): 形成噬菌斑, 也可溶源化 Plaque forming, lysogenization.

(-): 不形成噬菌斑, 但使菌溶源化 No plaque forming, nonlysogenization.

表4 pp 系列噬菌体抗血清交叉中和反应
Table 4 Cross neutralization of antisera of pp-phages

抗血清 Antiserum(1:50)	噬 菌 体			
	pp10	pp2	pp9	pp8
pp10(K = 60)	0	287	191	215
pp2 (K = 25)	272	0	186	242
pp9 (K = 114)	359	270	0	259
pp8 (K = 183)	301	274	184	0
胨水(对照) Control	328	285	210	247

60—70℃ 之间。80℃ 处理 20 分钟足以使游离噬菌体失去活性。热失活进程曲线遵从一级反应规律(图 2)。同一血清型噬菌体的热失活曲线相近, 但血清型 III 的 pp7 和 pp9 的热失活曲线表现出显著差异。

(六) pH 对噬菌体存活的影响

不同 pH 对 pp 系列噬菌体存活的影响见图 3。所有十株噬菌体在 pH6—10 范围内较稳定, 在 pH8.0 最稳定。在高 pH 值时较在低 pH 值稳定, pH6.0 以下时噬菌体失活很快。这与其宿主菌 *B. pumilus*

1037 对介质 pH 的要求一致。 *B. pumilus* 1037 在发酵过程中 pH 变化为 6—9 之间。

由图可见血清型 I 噬菌体的 pH 稳定性较一致; II、III 型有一定的株间差异; III 型噬菌体中的 pp9 在 pH 低于 7.0 时很不稳定: pH6.0 时存活只有 0.51%, pp7 为 8.82%。

讨 论

以 *B. pumilus* 1037 为宿主不仅可以直接从环境中分离出不同血清型的噬菌体(血清型 I 和 II), 而且可以分离得到虽属同一血清型而宿主范围不同的噬菌体(血清型 I 中的 pp10)。以抗株 *B. pumilus* 578 为宿主又可分离得到属其它血清型的噬菌体(血清型 III 和 IV)。这一结果表明, 在噬菌体滋生的环境中, 实际存在的是一个噬菌体群体。贾盛兴等^[9]关于 *B. subtilis* BF 7658 噬菌体研究中亦曾得出同样结论。因此预期不同噬菌体的相对数量将会随着环境条件, 尤其是宿主菌的变化而消长。

游离噬菌体虽经 80℃ 处理 20 分钟即可失活, 但因形成溶源孢子, 增加了杀灭噬菌体的难度。所以溶源化现象是工业上噬菌体防治中值得重视的一个问题。

血清型 III 的噬菌体 pp7 和 pp9 的热稳定性和不同 pH 对其存活的影响明显不同。这一现象暗示它们虽属同一血清型, 但仍可能是不同的噬菌体, 例如二者 DNA 的 G+C% 不同, 该差别的性质值得进一步研究。

宿主范围测定结果表明, 同一噬菌体对不同宿主来说可能是温和性的、烈性的或专性溶源性的。这说明噬菌体与不同宿主之间有复杂的关系, 并暗示我们在生产上杂菌污染与噬菌体危害之间存在着内在的联系。可以设想, 若在 *B. pumilus* 1037

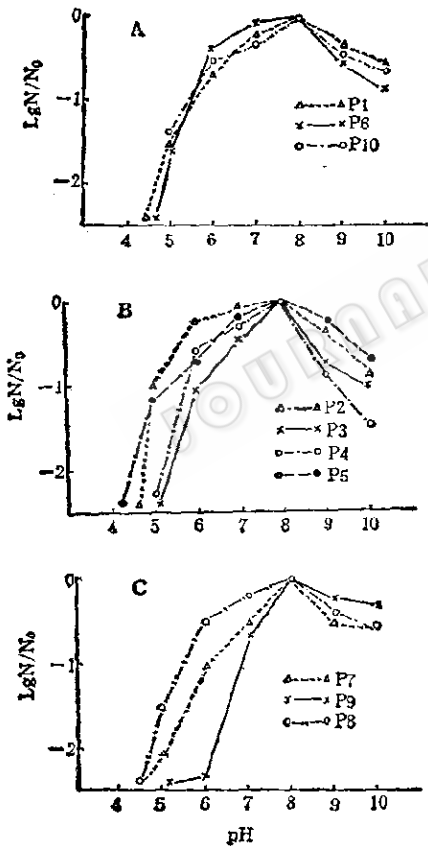


图3 不同 pH 对 pp-噬菌体存活的影响

A. 血清型 I 噬菌体; B. 血清型 II 噬菌体;

C. 血清型 III 和 IV 噬菌体

Fig. 3 Effect of pH on survival of pp-phages.

A. Phages of serotype I; B. Phages of serotype II; C. Phages of serotype III and IV.

的发酵过程中染了杂菌 *B. subtilis* W23 (pp1) 或 *B. megaterium* AS1.127 (pp10) 就有可能导致噬菌体 pp1 或 pp10 的滋生, 最终导致噬菌体对生产的危害。这种可能性在余茂效的报道中可以得到验证^[10]。所以, 在工业上防治噬菌体必须采取综合措施, 将重点放在环境治理和加强生产管理上, 同时辅助以噬菌体抗性菌株和不同特性菌种的交替使用。

此外, 噬菌体在微生物及分子遗传学以及基因工程技术发展中起着重要作用, 本研究室已证明噬菌体 pp5 具有普遍性遗传转导能力^[11]。将 pp 系列噬菌体改造作为 *Bacillus* 属基因克隆载体的工作也在进行中。

参 考 文 献

- [1] Lovett, P.S. et al.: *J. Virol.*, **13**(1): 81—87, 1974.
- [2] Lovett, P.S. et al.: *J. Bact.*, **101**: 603—608, 1970.
- [3] Romig, W.R. et al.: *J. Bact.*, **82**: 135—141, 1961.
- [4] Lovett, P.S.: *J. Virol.*, **47**: 743—752, 1972.
- [5] 蒋如璋等: 遗传, **2**(1): 81—84, 1980.
- [6] Adams, M. H.: *Bacteriophages*, p.450—451, Interscience Publishers, Inc. New York, 1959.
- [7] 中国科学院微生物研究所噬菌体组: 噬菌体及其防治, p.31—36, 科学出版社, 北京, 1973.
- [8] Haas, M. et al.: *J. Virol.*, **3**: 233—247, 1969.
- [9] 贾益兴等: 病毒学报, **2**: 360—365, 1986.
- [10] 余茂效等: 微生物学报, **26**(3): 232—237, 1986.
- [11] 耿运琪等: 遗传学报, **15**: 450—454, 1988.
- [12] 蒋如璋等: 微生物学报, **30**: 365—368, 1990.

ISOLATION OF BACTERIOPHAGE OF *BACILLUS PUMILUS* AND STUDIES ON THEIR PROPERTIES

Jiang Ruzhang

(Department of Biology, Nankai University, Tianjin)

Li Zhixin

(Tianjin Li Hua Food Factory, Tianjin)

Ma Junrong

(Department of Hygienics, North China Medical College for Coal, Tangshan)

Using *B. pumilus* 1037 and its derivative strains as host bacteria, 10 pp-phages had been isolated from environment in the plant. Serotype, host range, thermal stability and the effect of pH on survival of these phages were studied. The result showed that in fact there was a population of phages around the environment. Based on the relationships between pp-phage and different host bacteria, we deduced that phage fault in fermentation

industry was caused by invasion of foreign bacteria at beginning. Therefore, the comprehensive measures in harness must be adopted in the industry to prevent and control the harmfulness of phages.

Key words

Bacillus pumilus; pp-phage