

苏云金芽孢杆菌两株溶原性噬菌体的生物学特性

廖 威^{1,2} 孙 钊¹ 宋少云¹ 石 微¹ 庞 义^{1*}

(¹中山大学生命科学院有害生物控制与资源利用国家重点实验室 广州 510275)

(²广西职业技术学院食品技术系 南宁 530226)

摘 要 研究苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)的溶原性及其噬菌体的生物学特性,从生产菌株 MZ1 中分离了两株溶原性噬菌体。MZ1 经诱导后产生直径约为 3mm 和 1mm 的噬斑,分离获得属长尾噬菌体科的噬菌体 MZTP01 和 MZTP02 两株,分别对 6 株和 7 株不同亚种的 Bt 菌株具有侵染力,免疫血清与相应噬菌体的中和反应 K 值分别为 45 和 326,且两者无相关抗原性。MZTP01 抵抗酸、碱、紫外线和热的能力比 MZTP02 强,但抵抗有机溶剂的程度比 MZTP02 弱。MZTP01 的潜伏期为 80min,裂解量为 55;MZTP02 的潜伏期为 40min,裂解量为 175。核酸结构分析均表明为线性 dsDNA 分子。两基因组 DNA 的凝胶电泳表明分子量均在 9.4~23kb 之间,并被 *Hind* III 酶切分别产生 8 条和 9 条清晰条带。该菌株被证明为二元溶原菌,可能是造成生产损失的主要原因,为防治溶原性噬菌体提供了生物学信息。

关键词 :苏云金芽孢杆菌;溶原性;噬菌体;生物学特性

中图分类号:Q936 Q939 S476 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2007)01-0092-06

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)作为一种有效的生物杀虫剂早已得到广泛的应用^[1]。但在工业化生产中由其溶原性噬菌体(lysogenic phage)引起的发酵倒罐率轻者为 15%~30%,重者达到 50%~80%,甚至会导致工业的破产,因此溶原性噬菌体一直是 Bt 发酵工业中的最大危害^[2]。通过对 Bt 生产菌株溶原性噬菌体生物学特性的研究,可了解噬菌体与宿主之间的关系,进一步认识和控制溶原现象,促进 Bt 杀虫剂的商品化生产和应用。

危害苏云金芽孢杆菌的噬菌体分烈性噬菌体和溶原性噬菌体,1960 年 Foder 首次发现苏云金芽孢杆菌携带有溶原性噬菌体^[3]。40 多年来,国外学者对苏云金芽孢杆菌噬菌体的生物学特性有不少的报道,但国内在这方面的研究不多。1978 年何能波等首次分离获得六种 Bt 噬菌体并报道了它们的噬斑形态、宿主范围以及对 pH、UV 和热的稳定性^[4];1979 年颜望明等对 10 株 Bt 噬菌体进行了细致的形态观察和宿主范围的测定^[5];1982 年韩志毅首次在国内研究了几种 Bt 噬菌体的血清学性质^[6];1985 年王国珣在国内率先开展 Bt 噬菌体核酸方面的工作,

鉴定了核酸的类型和链型[☆]。2000 年王卫国研究了 3 株 Bt 噬菌体的核酸性质^[7];而对于苏云金芽孢杆菌溶原性噬菌体的研究,仅朱素娟等在 1987 年从苏云金芽孢杆菌中诱导出几种溶原性的噬菌体,但未进行深入的研究[◆]。

MZ1 是国内一株杀虫毒力较高的 Bt 生产菌株,但在其发酵生产中经常由于噬菌体的爆发而造成重大的经济损失。我们从该生产菌株中分离获得两株溶原性噬菌体 MZTP01 和 MZTP02,并研究了噬菌体及其噬斑的形态、宿主范围、血清学、一步生长曲线以及对物理和化学的稳定性等生物学特性。

1 材料和方法

1.1 材料

苏云金芽孢杆菌生产菌株(代号 MZ1, H_{3a313c}, 库斯塔克亚种)由广东北大新世纪生物工程有限公司提供。41 株 Bt 标准菌株由法国巴斯德研究所提供,其余 72 株 Bt 菌株均为本实验室分离保存。噬菌体指示菌 ZK1 是本研究采用交叉裂解法从本实验室所保藏的 113 株菌株中筛选得到。Bt 菌株使用

基金项目:十五国家科技攻关计划项目—发酵工程关键技术研究与重大产品开发课题(2001BA708B07-03)

* 通讯作者。Tel:86-20-84113860;E-mail:ls12@zsu.edu.cn

作者简介:廖 威(1964-),男,广西人,博士,主要从事微生物学研究。Tel:86-771-2983116;E-mail:laoweimail@163.com

其他作者:艾云灿

收稿日期:2006-05-23;接受日期:2006-06-28;修回日期:2006-07-18

☆ 王国珣,韩志毅.苏云金杆菌噬菌体生物学特性的研究.《微生物学论文集》,1985,75-81.

◆ 朱素娟.苏云金芽孢杆菌的溶原性.《杀虫微生物》,第一卷,1987,88-90. 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

LB 培养基,于 28℃ 培养过夜,液体培养摇床转速为 250r/min。双层琼脂平板的制作和使用按照余茂效的方法进行^[8]。

1.2 生产菌株 MZ1 及其噬菌体的诱导和分离纯化

生产菌株 MZ1 的纯化方法按照平板划线法进行^[9]。MZ1 经丝裂霉素 C (mitomycin C, 德国 Roche 公司)诱导的培养液与指示菌 ZK1 培养液混合后在双层琼脂平板上培养过夜而产生大量的噬菌体。噬菌体的浓缩纯化采用 CsCl (美国 Sigma 公司)梯度离心法进行^[10]。

1.3 电子显微镜观测方法

按照负染色的方法进行^[11]。

1.4 稳定性的测定

噬菌体对 pH 值、紫外线、热稳定性的测定按照文献[4]的方法进行。与有机溶剂的作用试验按 Verheust^[12]的方法进行。

1.5 血清中和反应及其交叉中和试验

抗体的制备采用免疫家兔(新西兰大白兔,购自广东省医学实验动物中心)的方法进行^[8]。

中和反应试验:K 值计算公式为 $K = 2.3D/t \times \log P_0/P$ [P_0 为噬菌体初始浓度, P 为作用一定时间 (min) 后噬菌体的浓度, D 为抗体的最终稀释倍数]。抗体以 1:100 或 1:1000 稀释;高滴度的噬菌体抗原稀释至 10^7 pfu/mL。在 28℃ 条件下,0.1mL 噬菌体抗原与 0.9mL 稀释抗体混合,以 5min 间隔,取样 0.1mL 于 9.9mL 冷稀释液中以终止中和反应,再取 0.1mL 用双层平板法计数。用同样的方法可进行交叉中和反应试验,以确定两株噬菌体的抗原相关性。

1.6 一步生长曲线

按照 Adams 方法操作并绘制一步生长曲线^[13]。每隔 10min 取样一次,每次取 200 μ L 噬菌体和指示菌的混合培养液,与 0.7% 琼脂的培养基混匀后倒双层琼脂平板,28℃ 培养过夜,计算各次取样噬菌体的滴度,取 3 个批次的平均值作一步生长曲线。

1.7 核酸吸收峰的绘制方法

提取噬菌体 DNA,按 1:1000 稀释,测定各波长下的吸收值,以波长对该波长下的吸收值作图。

1.8 核酸类型、构型和链型的分析方法

核酸类型分析是以二苯胺与 DNA 反应显示蓝色的方法来确定,用酵母 RNA 做对照。核酸构型分析是以完整核酸的琼脂糖凝胶电泳来确定。琼脂糖的浓度为 1%,胶厚 4~5mm。核酸链型分析是以吡啶橙染色法作鉴定。该法以噬菌体核酸在琼脂糖凝胶上电泳后,用 0.01% 吡啶橙染色 10min,以蒸馏水

漂洗,于紫外线下观察照相。 λ DNA 为对照。

1.9 核酸操作的方法

核酸的提取、基因组酶切和 DNA 凝胶电泳的操作根据分子克隆手册进行^[10]。

2 结果和分析

2.1 溶原性噬菌体 MZTP01 和 MZTP02 的噬斑特征及其噬菌体颗粒形态

Bt 生产菌株 MZ1 的溶原性噬菌体有大小两种类型的斑点:大斑点半透明,圆形,边缘整齐,直径约为 3mm (图 1-A),平均滴度为 8.5×10^8 pfu/mL,成斑时间为 8h。小斑点清晰透明,圆形,边缘整齐,直径约为 1mm,平均滴度 9×10^7 pfu/mL,成斑时间为 12h (图 1-B)。大小两种斑点分别命名为噬菌体(斑) MZTP01 和 MZTP02。两株噬菌体是从生产菌株 MZ1 通过丝裂霉素 C 诱导出来的,说明生产菌株 MZ1 为溶原性菌株,且为二元溶原菌。MZTP02 噬菌体在平板培养时,随着培养时间的延长往往在噬斑内形成一环状菌带(图 1-A),从环状菌带中挑出的菌体经培养后,不再被原噬菌体感染和裂解。

噬菌体 MZTP01 和 MZTP02 在电子显微镜下的颗粒形态有所不同。MZTP02 头部为正二十面体,大小约为 82nm \times 85nm,尾部能够弯曲,大小约为 220nm \times 18nm (图 1-A1);MZTP01 头部不属于正二十面体,大小约为 75nm \times 55nm,尾部大小约 183nm \times 12nm (图 1-B1)。除了头部稍有差异外,MZTP01 的其它形态与 MZTP02 相似。从形态上看,两株噬菌体均属长尾噬菌体(*Siphoviridae*),但两株噬菌体的尾部都没有观察到该科噬菌体典型的梭状。

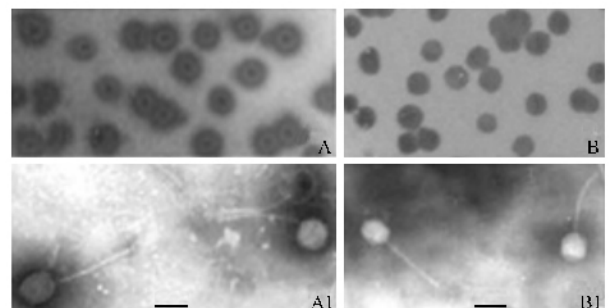


图 1 噬菌体 MZTP01 和 MZTP02 在双层琼脂平板上形成的斑点和在电子显微镜下的颗粒形态

Fig.1 Plaques and TEM images of phage MZTP02 (A) and MZTP01 (B). A and A1 represented the plaque and TEM image of MZTP02; B and B1 represented the plaque and TEM image of MZTP01. Indicator strain: ZK1; Bar: 50nm.

2.2 噬菌体 MZTP01 和 MZTP02 的敏感菌株

测定两株噬菌体 MZTP01 和 MZTP02 对 113 株 Bt 的侵染能力,能形成噬菌斑的敏感菌株的结果见表 1。MZTP01 对 6 株(血清型)Bt 菌株具有侵染及裂解细胞形成斑点的能力;而 MZTP02 对其中的 7 株(血清型)Bt 菌株具有侵染及裂解细胞形成清晰噬菌体斑点的能力。两株噬菌体有相近的宿主范围,只是 MZTP02 的宿主范围稍广些,而且形成的斑点较大,故对生产菌株 MZ1 的危害比 MZTP01 更大。可见,噬菌体 MZTP02 侵染 Bt 菌株 H25 血清型的能力最强,指示菌 ZK1 与之同一血清型,生产菌株 MZ1 在此条件下不被裂解成斑。

表 1 噬菌体 MZTP01 和 MZTP02 的敏感菌株

No.	Serotype	Subspecies	MZTP01	MZTP02
1	H ₂₅	<i>B. thuringiensis coreanensis</i>	++	+++
2	H ₁₄	<i>B. thuringiensis israelensis</i>	+/-	++
3	H ₂₁	<i>B. thuringiensis colmeri</i>	++	++
4	H ₂₅	<i>B. thuringiensis coreanensis</i>	+	+++
5	H ₃₃	<i>B. thuringiensis ieeis</i>	-	+
6	H ₃₆	<i>B. thuringiensis malaysiensis</i>	++	++
7	H _{3abc}	<i>B. thuringiensis alesti</i>	+	++

"+" sensitive; "-" insensitive; "+/-" partially sensitive; No 1 was strain ZK1.

2.3 噬菌体 MZTP01 和 MZTP02 稳定性测定

两种噬菌体的抗逆性测定结果显示:使用不同 pH 值处理时, MZTP01 比 MZTP02 抵抗酸碱的能力更强(表 2);对紫外线的抵抗能力前者也比后者强(表 3);两种噬菌体在 60℃ 下处理不同的时间均有失活,其存活率随着处理时间延长而下降(表 4)。另外,在 70℃、80℃、90℃ 和 100℃ 各处理 20min 后, MZTP02 在这 3 个温度下均全部失活; MZTP01 在 70℃ 下处理 10min 后仍有 0.01% 的存活率,经 80℃ (包括 90℃ 和 100℃) 处理 20min 后才全部失活。两种噬菌体抵抗有机溶剂失活的作用差别也很大。MZTP02 对有机溶剂的敏感程度比 MZTP01 要低。

表 2 噬菌体 MZTP01 和 MZTP02 对 pH 值的稳定性

pH	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MZTP01	0	38	45	89	121	100	100	101	89	81	79
MZTP02	0	0	0	17	85	100	77	63	21	0	0

Survival rate as 100% when pH is 7.0.

表 3 噬菌体 MZTP01 和 MZTP02 对紫外线的稳定性

Exposure time/s	CK	10	20	40	80	120
MZTP01	100	36.55	17.86	9.85	5.25	0
MZTP02	100	9.25	1.01	0	0	0

MZTP01 悬液以 1/20 的体积加入氯仿并混匀后全部失活,但 MZTP02 失活率低于 20%。同一噬菌体对不同的有机溶剂也有不同的抵抗力。MZTP01 加入 1/20 的乙醚后,失活率低于 50%。对有机溶剂的不同敏感程度说明两噬菌体的结构不同,脂含量越大的噬菌体受有机溶剂的影响也就越大。可见,噬菌体 MZTP01 与 MZTP02 的稳定性不同,说明两者的噬菌体颗粒结构不同。

表 4 噬菌体 MZTP01 和 MZTP02 对热的稳定性

Treatment time/min	1	2	3	4	5	10	15	20	25	30
MZTP01 (%)	16	10	2	0.2	0.18	0.17	0.14	0.14	0.12	0.10
MZTP02 (%)	10	1	0.1	0.5	0.01	0.08	0.007	0	0	0

Treatment temperature was 60℃. Data in last two lines were survival rate (%).

2.4 噬菌体 MZTP01 和 MZTP02 的血清中和反应及其交叉中和试验

两株噬菌体的抗血清中和反应试验结果见表 5。K 值越大,表示中和反应越完全,时间越长,中和反应的程度越大。MZTP02 的抗血清稀释倍数比较高,中和反应比较完全,说明其抗血清有较强的中和噬菌体 MZTP02 的能力。

表 5 噬菌体 MZTP01 和 MZTP02 的中和反应

Phage	P ₅₀ (titre)	P(titre)	ID ₅₀ dilution times)	(min)	K
MZTP01	1 × 10 ⁷	1 × 10 ⁶	100	5	45
MZTP02	1 × 10 ⁷	2 × 10 ⁶	1000	5	326

两株噬菌体交叉中和反应结果表明,噬菌体 MZTP01 抗血清对噬菌体 MZTP02 不发生中和反应, K 值为 0;反之亦然。故两者无抗原相关性(表 6)。

表 6 噬菌体 MZTP01 和 MZTP02 的交叉中和反应

Phage	MZTP02	MZTP01
MZTP01 antiserum(1:100)	0	45
MZTP02 antiserum(1:1000)	326	0
CK	0	0

Data in the table were K values. CK: serum before immunity.

2.5 噬菌体 MZTP01 和 MZTP02 的一步生长曲线

根据 3 个批次的噬菌体滴度的平均值作出了噬菌体 MZTP01 和 MZTP02 的一步生长曲线(图 2)。噬菌体 MZTP02 的潜伏期为 40min,裂解量为 175;噬菌体 MZTP01 的潜伏期为 80min,裂解量为 55。MZTP02 的裂解量要比 MZTP01 大两倍以上,而潜伏

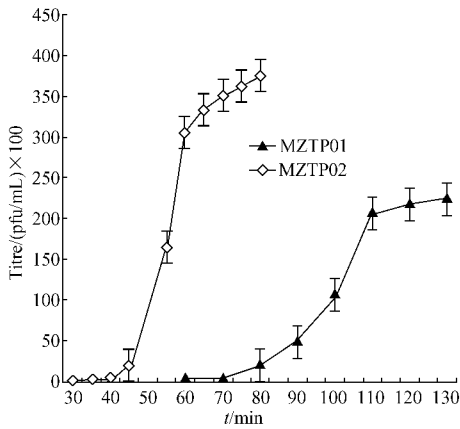


图 2 噬菌体 MZTP01 和 MZTP02 的一步生长曲线

Fig.2 One-step growth curves of phages MZTP01 and MZTP02. Initial concentrations of MZTP02 and MZTP01 were 200 and 400pfu/mL, respectively.

期反而短了一倍。根据噬菌体的一步生长曲线,对噬菌体 MZTP02 来说,无论从裂解量还是从潜伏时间来看,都更有利于获得高滴度的噬菌体,以便于提取基因组核酸用于后续的研究。

2.6 噬菌体 MZTP01 和 MZTP02 遗传物质的生化特性

2.6.1 核酸的吸收曲线:两种噬菌体的核酸经提取后,用蒸馏水稀释,进行紫外扫描分析。结果 MZTP01 和 MZTP02 两种噬菌体的核酸溶液在 190 ~ 330nm 的波长范围内都有吸收峰,其中 260nm 处出现最大值,两者均显示出典型的核酸特征吸收曲线。这一现象说明所提取的物质为核酸(图 3)。

2.6.2 两株噬菌体的核酸类型、构型和链型的分析:MZTP01 和 MZTP02 的核酸均与二苯胺呈蓝色反应,核酸 λDNA 与二苯胺反应也呈现蓝色,而对照的酵母 RNA 与二苯胺反应则呈现无色。利用核酸

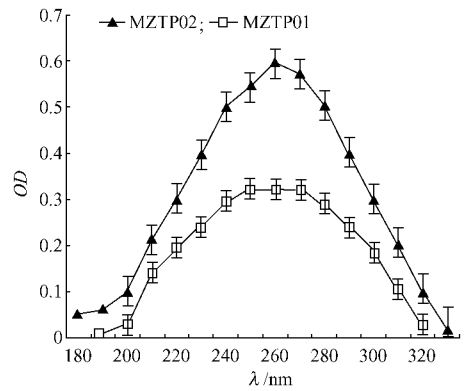


图 3 噬菌体 MZTP01 和 MZTP02 核酸的紫外线吸收峰

Fig.3 UV absorption of phages MZTP01 and MZTP02.

酶消化结果表明,两株噬菌体的核酸仅对 DNase 敏感,对 RNase 不敏感。这两个试验均说明,两株噬菌体的核酸均为 DNA。

完整核酸的电泳结果只有一条清晰的条带(图 4),说明不可能同时存在超螺旋环状、切口环状和线状 3 种构象,而具有线状结构的可能性最大。

MZTP01 和 MZTP02 核酸经琼脂糖凝胶电泳后,在紫外灯下呈现绿色,对照核酸 λDNA 也呈绿色,说明两株噬菌体核酸可能为双链 DNA。

另外,据报道目前只要有尾噬菌体都属于 dsDNA^[14,15],可见,噬菌体 MZTP01 和 MZTP02 的核酸为双链线状 DNA 分子。

2.6.3 核酸分子量的预测及其限制性酶切图谱的分析:MZTP01 和 MZTP02 的核酸基因组 DNA 及其限制性酶切电泳结果表明,两株噬菌体的分子量范围均落在 9.4 ~ 23.1kb 之间(图 4-A, C)。MZTP02 基因组 DNA 被 *Hind* III 酶切产生 9 条清晰的条带(图 4-B),带的大小分别为 3.8kb; 3.8kb; 2.0kb; 1.5kb;

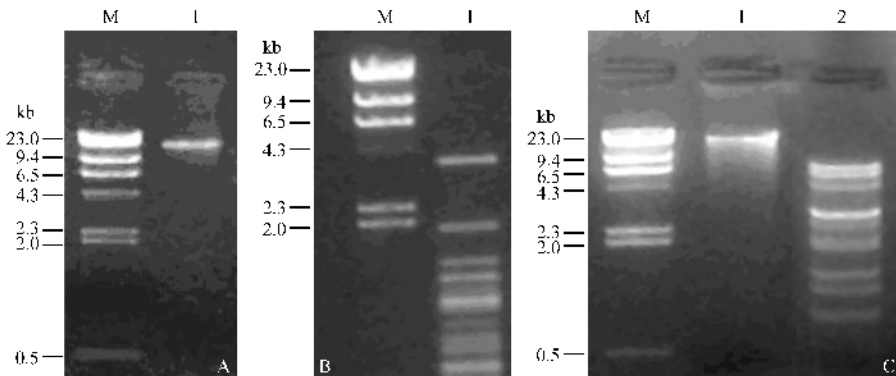


图 4 噬菌体 MZTP02 (A, B) 和 MZTP01 (C) 基因组核酸及其限制性酶切电泳图谱

Fig.4 Agarose gel analysis of phages MZTP02 (A, B) and MZTP01 (C) genomic DNA and their restriction maps. M: λDNA-*Hind* III marker.

Lane I (A): phage DNA of MZTP02; Lane I (B): digested fragments with *Hind* III from phage DNA of MZTP02; Lane I (C): phage DNA of MZTP01;

Lane I (C): digested fragments with *Hind* III from phage DNA of MZTP01.

1.4kb ;1.1kb ;1.0kb ;0.4kb 和 0.2kb。MZTP01 基因组 DNA 被 *Hind*III 酶切至少产生 8 条带(图 4-C),带的大小分别为 6.5kb ;4.3kb ;3.0kb ;2.2kb ;2.0kb ;1.6kb ;1.4kb 和 1.0kb。故两噬菌体的 *Hind*III 限制性酶切图谱不相同。

3 讨论

苏云金芽孢杆菌 MZ1 菌株是一株对鳞翅目害虫具有较高毒力的生产用菌株^[11],但用这一菌株生产的 Bt 制剂质量不够稳定甚至生产失败。本研究从 MZ1 菌株中分离得两株溶原性噬菌体 MZTP01 和 MZTP02 根据其生物学特性看,这两株噬菌体可能是危害和造成宿主菌非正常生长的关键原因。

MZ1 菌株经 mitomycin C 诱导后用指示菌检测出两种类型的噬菌体斑点,大斑直径约为 3mm,小斑直径约为 1mm,而且形状相对稳定,可初步判断至少存在两种噬菌体。后经噬菌体分离纯化以及限制性酶切图谱分析,证明了 Bt 生产菌株 MZ1 为二元溶原菌,二元溶原菌前人已有类似报道^[16]。一种苏云金芽孢杆菌菌株能携带多种溶原性噬菌体,使得生产过程中爆发噬菌体危害的几率加大。此外,噬菌体对宿主有一定的专一性,但是在苏云金芽孢杆菌里并不明显,本研究结果也证明,一种噬菌体可以侵染多个不同亚种的苏云金芽孢杆菌菌株(表 1)。两株噬菌体交叉中和反应结果表明,MZTP01 和 MZTP02 无抗原相关性(表 6),因此,两株噬菌体可以共存于一个宿主中。

MZ1 大斑噬菌体在平板培养时,随培养时间的延长会在噬斑内形成一环形的菌带。从环形菌带中挑出的菌体经培养后,不再被原噬菌体感染和裂解,说明新的菌株已发生遗传变异而且对这种噬菌体产生了抗性,这在生产菌种选育上有重要意义,事实上已被采用^[2]。有报道认为,苏云金芽孢杆菌含有两种限制系统来修饰其核酸,这两种限制系统决定了噬菌体的敏感性和遗传信息的水平传递^[17],故随着苏云金芽孢杆菌与某种噬菌体相互作用时间的延长,宿主从一种限制修饰系统转换为另一种限制修饰系统,使原来敏感的噬菌体失去敏感性,从而产生了不被原噬菌体感染和裂解的新菌株。但是,得到的变异株是否保持对目标害虫的毒力,则需要通过生物测定来决定。

关于噬菌体的分类鉴别,可以使用噬斑形态^[18,19]、噬菌体形态特征^[19]、宿主范围、血清学方法和限制性内切核酸酶图谱等,从不同层次上来区分

噬菌体的种与亚种。当从其它的生物学特征上难以区别噬菌体之间的差异时,限制性内切酶图谱能提供灵敏、准确可靠的指标。本研究两种噬菌体的限制性内切核酸酶图谱不一致(图 4),加上噬斑形态、噬菌体形态、宿主范围和血清抗原都有差异,充分表明这两株噬菌体的结构是不同的。

MZ1 菌株产生的噬菌体可以通过电子显微镜来观察,该菌株所释放噬菌体的头部为 20 面体,尾部较长,可以弯曲但不能收缩。根据 2005 年国际病毒分类委员会第八次报告所提出的分类准则,本研究所分离的两株噬菌体应为长尾噬菌体科(*Siphoviridae*)中的 B1 型。此噬菌体的形态类似于何能波报道的 TP35,但在其尾部未发现有类似于 TP35 的梭标状器官^[18]。据报道,目前只要有尾噬菌体都属于 dsDNA^[14,15],MZ1 菌株所产生的两株噬菌体的核酸应为 dsDNA,这与我们对这两株噬菌体的核酸类型、构型和链型的试验结果相符合,为下一步测定其基因组序列提供了科学依据。

从有机溶剂影响噬菌体稳定性的生理性试验中得知,用氯仿可以提取对有机溶剂敏感性程度不高的噬菌体 MZTP02 的基因组 DNA,但如果用于提取敏感性程度比较高的 MZTP01 则效果不佳,后者可改用 $ZnCl_2$ 来提取^[12],但这样很难得到大量的核酸 DNA。而且,电子显微镜观察中发现噬菌体 MZTP02 的颗粒要比 MZTP01 的大,故 PEG 沉淀法不能有效地浓缩噬菌体 MZTP01,这对提取 MZTP01 的基因组 DNA 更为不利。虽然根据限制性酶切图谱得到两株噬菌体的核酸分子量范围,但精确分子量的确定有赖于噬菌体基因组的全序列测定,因前者会出现干扰因素,如不完全酶解、大小相同片段的重叠等;结合基因组序列分析可进一步认识和控制溶原与裂解基因、了解噬菌体与宿主互作关系,从而更好地控制噬菌体在 Bt 杀虫剂生产过程中的随机爆发,稳定产品质量,降低生产成本,提高市场竞争力。

最近,我们已完成噬菌体 MZTP02 基因组全系列分析(GenBank, accession number :AY894696)以及部分功能基因的研究,结果将另文发表。

参 考 文 献

- [1] 龙紫新, 庞义. 昆虫的细菌病. 见: 蒲蛰龙. 昆虫病理学. 第一版. 广州: 广东科技出版社, 1994.
- [2] 喻子牛. 苏云金芽孢杆菌. 第一版. 北京: 科学出版社, 1990.
- [3] Foder PE, Nerson EL. Bacteriophage for *Bacillus thuringiensis* Berliner and *Bacillus anthracis* Cohm. *J Insect Pathol*, 1960 **2**: 198

- [4] 何能波, 陈见璋, 林彩婵. 苏云金芽孢杆菌的六种噬菌体. 微生物学报, 1978, 18(3): 220-224.
- [5] 颜望明, 蔡德霖, 王绮文. 苏云金杆菌噬菌体的形态观察及噬菌体 GP-10 在寄主细胞内增殖. 微生物学报, 1979, 19(1): 45-51.
- [6] 韩志毅. 苏云金杆菌噬菌体的血清学性质. 西北大学学报, 1982(2): 119-121.
- [7] 王卫国, 阚远钧, 孙富林. 3 株苏云金芽孢杆菌噬菌体的核酸性质. 中国生物防治, 2000, 16(2): 69-73.
- [8] Yu M, Si S. Bacteriophage Experiment Technology. A Laboratory Manual. Beijing: Science Press, ISBN 7-03-002228-9, 1991, 19-23.
- [9] 诸葛健, 王正祥编著. 工业微生物实验技术手册. 第一版. 北京: 中国轻工业出版社, 1994.
- [10] Sambrook J, David WR. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, 147-185.
- [11] 廖 威, 宋少云, 陈维春, 等. 用 PCR 法检测苏云金杆菌的溶原性噬菌体. 农业生物技术学报, 2006, 14(1): 149-150.
- [12] Verheust C, Jensen G, Mahillon J. pGIL01, a linear tectival plasmid prophage originating from *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis. *Microbiol*, 2003, 149: 2083-2092.
- [13] Adams MH. Bacteriophages. New York, London and Sydney: Wiley Interscience. 1959 450-451.
- [14] Anderson ES. Influence of the delta transfer factor on the phage sensitivity of Salmonellae. *Nature*, 1966, 212: 795-799.
- [15] Tosi M, Anderson DL. Antigenic properties of bacteriophage phi 29 structural proteins. *J Virol*, 1973, 12(6): 1548-1559.
- [16] Kochkina ZM, Blokhina TP, Rautenshtein II. Polylysogeny in *Bacillus thuringiensis* var. *Galleriae* cultures. *Mikrobiologiya*, 1977, 46: 730-736.
- [17] Azizbekian RR, Netyksa EM. Comparative phage sensitivity of R- and S-strains of *Bacillus thuringiensis*. *Mikrobiologiya*, 1978, 47: 527-33.
- [18] 何能波, 司樛东, 余茂效. 噬菌体图谱. 第一版. 北京: 科学出版社, 1991.
- [19] Chapman HM, Norris JR. Four new bacteriophages of *Bacillus thuringiensis*. *J Appl Bacteriol*, 1966, 29: 529-535.

Biology of two lysogenic phages from *Bacillus thuringiensis* MZ1

LIAO Wei^{1,2}, SUN Fan¹, SONG Shao-yun¹, SHI Wei¹, PANG Yi^{1*}

[¹ State Key Laboratory of Biocontrol, Sun Yat-Sen (Zhongshan) University, Guangzhou 510275, China]

(² Department of food technology, Guangxi Polytechnic, Nanning 530226, China)

Abstract A *Bacillus thuringiensis* (Bt) fermentative strain MZ1 (subsp. *kurstaki*), from a company in Meixian County of Guangdong Province, produce toxins during sporulation and are extensively used in the field to control pest insects (Lepidoptera) in China. But some unknown or random factors that inhibited or stopped *B. t* growth in the fermentation can be regarded as reflecting the exist of lysogenic phage. Therefore, strain MZ1 and its lysogenic phages were studied in this paper. With indicator strain ZK1, two kind of phage plaques, one with about 3mm diameter and the other with about 1mm diameter, can be observed after strain MZ1 cultured in plates or flasks was induced by mitomycin C. Then, two lysogenic phages, namely MZTP01 and MZTP02, were isolated and characterized in biology. They belonged to family *Siphoviridae*, which had icosahedral heads (MZTP01: 32nm × 85nm; MZTP02: 75nm × 55nm) and long tails (MZTP01: 220nm × 18nm; MZTP02: 183nm × 12nm) without flexibility. Host range examination showed that six and seven (including indicator strain ZK1) out of 113 *B. t* strains saved in our laboratory were sensitive to MZTP01 and MZTP02, respectively. MZTP01 was more stable than MZTP02 against pH value, ultraviolet and heat treatment, but contrary against organic solvents. For MZTP01 and MZTP02, K values in the neutralization reactions were 45 and 326, respectively. Both phages had no relationship in their antigenicity. Burst size of phage MZTP02 was 175, two times more than that of MZTP01. Latent time of MZTP02 was 40min, one times shorter than that of MZTP01. It was suggested that both phages DNA be linear dsDNA through the typical absorption curves, reaction with diphenylamine, DNase sensitivity and acridine orange staining. And this was in good accord with the previous findings that all tailed phages being dsDNA moleculars. The genomic DNA and their restriction maps showed that both molecular weights should be between 9.4~23kb. Both phage genomic DNAs were digested by *Hind*III, producing eight and nine bands, respectively.

The results above show that strain MZ1 is proved a double lysogen. It is considered to be the main reason of great losses in the production. The biological information of the two lysogenic phages belonging to strain MZ1 is provided to help solve the problem and the two lysogenic phages is prepared for complete DNA sequencing in the next step.

Keywords: *Bacillus thuringiensis* (Bt); Lysogeny; Bacteriophage; Biology