

苏芸金杆菌噬菌体的种类、性质及其防治*

姚忻容 李文采 陈 静

(湖南省微生物研究所,长沙)

苏芸金杆菌做为杀虫制剂,国内外已广泛应用。但在其发酵阶段,往往遭到噬菌体污染,严重地影响产品的质量和产量。为了使生产能正常进行,我们对苏芸金杆菌噬菌体的种类,性质及其防治进行了如下几项工作,现报道如下。

2. 噬菌体分离: 根据 Adams^[2] 双层琼脂法。用 140 和 7216 菌作指示菌。

3. 光密度: 摇瓶培养液稀释 20 倍,在 420 毫微米波长下测定光密度,以负对数值 (-LogT 值)表示^[3]。

材 料 和 方 法

1. 菌株: 本所保存的苏芸金杆菌标准血清型菌株。试验用的寄主菌、指示菌和溶原菌须经处理。方法是: 将孢子液经 85℃ 水浴热处理 15 分钟杀死附着在细菌体表的噬菌体^[4]。

实 验 结 果

一、按噬菌斑特征进行噬菌体分类

从多种样品中,分离到 4 种有稳定特征的噬菌斑,其特征见表 1 和图 1。

表 1 四种噬菌斑的特征

| 噬 菌 体 名 称 | 指示菌 | 噬菌斑大小 (毫米) | 噬 菌 斑 形 状 | 来 源 |
|--|------|---------------|---------------------|-------------|
| D ₁ | 7216 | 4—5 | 透明,清晰,外有一模糊圆 圈空斑 | 7216 发酵液和空气 |
| D ₂ | 7216 | 2—3 | 透明斑中心有一菌落 | 7216 的发酵液 |
| D ₃ 7216, D ₃ HD-1, D ₃ NO ₃ , D ₃ 青虫菌 D ₃ 杀螟杆菌, D ₃ D ₃₇₇ , D ₃ 021, D ₃ 096 | 140 | 2—3 | 同 D ₂ | 各变种摇瓶发酵液 |
| D ₄ | 140 | 0.5—1 | 透明空斑,外有一模糊圆 圈 | 空 气 |
| D ₄ H ₇₀ , D ₄ 058 | 140 | 2—3 | 透明空斑 | 各变种摇瓶发酵液 |

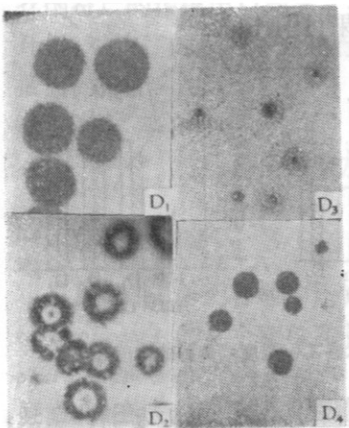


图 1 四种噬菌体的噬菌斑

结果表明,按噬菌斑特征可分为四种噬菌体。由于 7216 等 8 个菌株产生的噬菌斑特征与 D₂ 相似,故在 D₂ 名称后标出菌株名称来表示。而 H₇₀ 等两个菌株产生与 D₂ 完全不同的透明空斑,则以另一种噬菌体 D₄ 名称后标出菌株的名称表示。在分离的 1—9 个血清型菌株,唯有 140 菌未得到噬菌体,但该菌株对上述噬菌体都很敏感。

* 噬菌斑的显微镜照片由甘运凯副教授拍摄;张淑芝同志参加部分工作。

二、苏芸金杆菌及其噬菌体的溶原性

以纯化的噬菌体 D_2 感染 7216 菌，在蛋白胨双层琼脂上产生中心菌落(溶原菌)噬菌斑，将中心菌落孢子经热处理后培养的斜面幼龄菌(6—7 小时)做成菌悬液，在 30 瓦紫外灯下照射 30—60 分钟，在连续照射五代和其分离单株均测到噬菌体，结果见表 2。

表 2 紫外线诱发噬菌体

| 噬菌体 (个/毫升) | 代数 | | | |
|---------------|----------|-------------------|----------|-------------------|
| | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 7216-5 | 178 | 80 | 0 | 50 |
| 7216-8 | 约 10^3 | 约 5×10^2 | 约 10^3 | 约 5×10^2 |

试验还表明 7216 的溶原菌对噬菌体 D_2 的超感染具有免疫能力(无噬菌斑出现)。

上述结果和 Donald 等^[4]所描述枯草杆菌温和噬菌体的特征相同，证明 D_2 是能使 7216 溶原化的温和噬菌体。各变种菌在摇瓶发酵液中释放出类似 D_2 的噬菌体，但其斜面上的幼龄菌经紫外线诱发却未分离到噬菌体，所以苏芸金杆菌是否溶原菌，尚需进一步证实。自发释放的噬菌体是否是温和噬菌体，还需进一步研究。

三、噬菌体 D_1 、 D_2 、 D_3 的一些性状

1. 噬菌体溶菌曲线和生长：将三种噬菌体

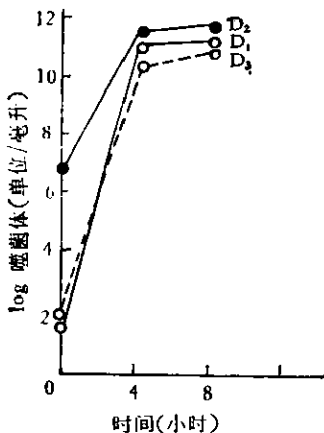


图 2 三种噬菌体的溶菌曲线和生长

制成悬液，分别和 7216 孢子接入摇瓶培养基中，30℃ 振荡培养 16 小时，定时测定光密度和噬斑数。结果见图 2。

结果表明，从三种噬菌体不同接种量看， D_1 和 D_3 于寄主的对数生长期前后溶菌显著， D_2 次之。而噬菌体的生长速度，均以接种后 0—4 小时最快。

2. 噬菌体生长和 pH 的关系：用 NaOH 和 HCl 调节摇瓶液 pH 至 4—10，分别接入三种噬菌体和 7216 孢子，30℃ 振荡 24 小时测定光密度和噬斑数，结果见图 3。

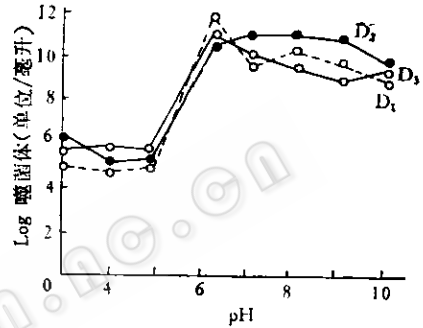


图 3 三种噬菌体在不同 pH 培养时的溶菌和生长

结果说明，噬菌体 D_1 和 D_3 在 pH6—9 的范围内均显著溶菌， D_2 次之。三种噬菌体对 pH 的反应无显著差异，以 pH6—10 最稳定。7216 菌生长的最适 pH 是在噬菌体最稳定的范围，但二者尚有区别，7216 菌在 pH8 生长最好，而噬菌体在 pH6 为高峰。

3. 噬菌体生长和温度的关系：试验温度分别为 30 和 34℃，将三种噬菌体分别和 7216 孢子接入摇瓶培养液，振荡培养 24 小时测定光密度和噬斑数。结果见图 4。

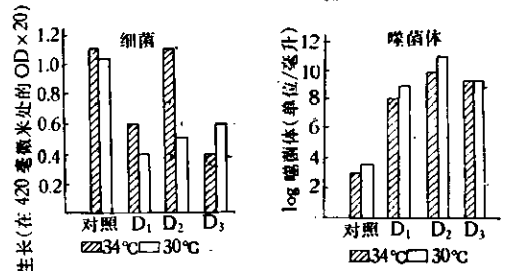


图 4 三种噬菌体在不同温度培养时的溶菌和生长

结果表明，噬菌体的溶菌能力在 30℃ 强，

生长迅速；在 34℃ 溶菌能力弱，生长缓慢。而 7216 菌在 34℃ 生长迅速，30℃ 缓慢。图 4 右图对照为 7216 自发释放的噬菌体。

四、抗噬菌体菌株的选育

采用噬菌体 D₁ 和 D₂ 作为生物因子，按常规方法^[5,6]筛选得到抗噬菌体 D₁ 和 D₂ 的菌株 54 号。将抗株和原种敏感菌株进行培养性状、产芽孢晶体情况、初孵家蚕毒力等比较，其结果相近，但抗株的发酵能力好，结果见表 3。

表 3 抗株和原种发酵情况比较

| 菌株号 | 进罐批数 | 重消批数 | 倒罐批数 | 重消率 (%) | 倒罐率 (%) | 半成品菌数 (亿/毫升) | 成品菌数 (亿/克) |
|------|------|------|------|---------|---------|--------------|------------|
| 原 14 | 61 | 2 | 6 | 3 | 9 | 21.27 | 135.3 |
| 抗 54 | 73 | 0 | 0 | 0 | 0 | 22.89 | 138.3 |

在发酵中使用抗株以后，发酵车间空气中的噬菌体显著下降。

讨 论

引起发酵液中菌体溶菌的噬菌体 D₁，其斑形最大，寄主范围广，空气中存在数量多，溶菌能力最强。各变种自发释放的噬菌体，其菌体生长，产芽孢晶体均很正常。这些噬菌体大量感染正常菌株，其分离单株菌数无影响，但晶体略有减少。从以上可知，由噬菌体的溶菌曲线和形态特征及来源，可以确定它的种类，进而采取防治措施。

参 考 文 献

- [1] Ernest jawetz et al.: *Review of Medical Microbiology*, 4: 362—370, 1960.
- [2] Adams, M. H.: *Bacteriophage*, New York, interscience publishers, INC, 1959.
- [3] 松井正規ら: 発酵と工業, 35(4): 294—308, 1977.
- [4] Donald, H. Dean et al.: *J. Virol.*, 20(2): 509—519, 1976.
- [5] 中国科学院微生物研究所: 微生物学革命资料汇编, 第五集, 19 页。
- [6] 沙棧云等: 昆虫学报, 18(3): 273—280, 1977.