

# 苏芸金杆菌 ( $H_{3a3b}$ ) 发酵中常见噬菌体的研究

吴继星 谢天健 陈在珥 黄炳高 林学耀

(湖北省农业科学院植保所, 武昌)

**摘要** 从生产车间周围分离到苏芸金杆菌 ( $H_{3a3b}$ ) 四种类型的噬菌体, 并对其进行了感染能力、pH 稳定性、热稳定性及紫外线照射失活试验, 尤其对生产危害最大的噬菌体 TP-1 进行了研究。以  $H_{3a3b}$ -85-10-6(S) 为供试菌株进行了发酵试验。

**关键词** 苏芸金杆菌; 噬菌体; 发酵; 菌株  $H_{3a3b}$ -85-10-6(S)

苏芸金杆菌作为细菌农药, 已在农林害虫防治中得到广泛的应用。但在该菌剂的发酵生产中, 常常遭到噬菌体的侵染, 从而严重地影响制剂的产量和质量。国内外对这类噬菌体曾进行了一些研究<sup>[1-4]</sup>。

1975 年以来, 我们对本所微生物实验工厂发酵生产中常见烈性噬菌体进行了研究, 根据不同菌株对噬菌体的抗性特征选用适合本厂条件的优良菌株上罐, 结果有效地防止了噬菌体造成的危害。本试验主要报道该厂生产中常见噬菌体的种类及其特征。

## 材料和方法

### (一) 供试菌株及指示菌

$H_{3a3b}$ -85-10-6(S), 为本所从出发菌株 HD-1 中筛选获得; HD-1、7216 为本所保存菌株; 82-6(1)-2 为湖北省生防站提供菌株。以上菌株的血清型均为  $H_{3a3b}$ 。

**指示菌的制备:** 取 HD-1 斜面菌种一环放入 100 ml 生理盐水中, 单孢分离后于 75℃ 25 分钟热处理; 然后接入 20 ml 液体培养基, 28—30℃ 摇床振荡培养, 8 小时再吸入 1 ml 转入另一摇瓶中, 振荡培养 8 小时供用。

### (二) 培养基

1. 斜面及平板培养基(%): 牛肉膏 0.5, 蛋白胨 1.0, NaCl 0.5, 底层和上层琼脂分别为 2.0 和 0.7, pH 6.8—7.0。

2. 液体摇瓶及发酵培养基(%): ①牛肉膏

0.5, 蛋白胨 1.0, NaCl 0.5, pH 6.8—7.0; ②豆饼粉 5.0, 玉米淀粉 2.0, 鱼粉 3.75,  $CaCO_3$  0.1, 灭菌前 pH 7.6。

### (三) 噬菌体的分离纯化及原液制备

1. 从本所微生物实验工厂发酵车间及实验室周围的湿土、丢弃的琼脂斜面、空气中取样, 置于 100 ml 生理盐水中充分振荡, 待溶液澄清后以 4000 r/min 离心 10 分钟, 上清液再以 G5 细菌过滤器过滤后备用。空气中取样为直接将混有指示菌的双层平板暴露于空气中 15 分钟。

2. 噬菌体的纯化及原液制备: 参照 Adams 的方法<sup>[5]</sup>, 将上清液 0.1 ml 和指示菌 0.2 ml 混匀倒双层平板, 30℃ 培养 20 小时后可见平板内混染多种形态的噬菌斑, 然后将其分离、纯化、得到噬菌斑大小、斑形一致的噬菌体。将纯化后的噬菌体分别接入 4 小时的指示菌中振荡培养, 8—14 小时培养液由浊变清时终止培养。随后加入 5% 的氯仿, 4000 r/min 离心、振荡, 取上清液按常规方法<sup>[6]</sup>测效价, 置冰箱备用。

### (四) 供试菌株对各类噬菌体的敏感性测定

待上层培养基融化降至 60℃ 左右时, 吸入 1 ml 预先制备, 浓度为  $1 \times 10^8$ /ml 的各测定菌株菌悬液, 混匀后迅速倒平板; 然后以不同噬菌体点滴其上, 30℃、20 小时后观察其噬菌斑出现情况, 初步确定其敏感性。随后仍采用点滴法, 分别置于 28、30、32、34、36、37℃ 温度下培养, 以噬菌体能否形成噬菌斑为指标, 测定不同

菌株在不同温度下对各种噬菌体的敏感性。

为了进一步考察 HD-1、H<sub>3a3b</sub>-85-10-6(S) 两菌株对该厂危害最大的噬菌体 TP-1 的敏感性, 将两菌株分别接入摇瓶 (装量 20 ml/500 ml), 于接种后 0—12、16、20 小时加入一定量的噬菌体, 在不同温度下培养, 中间观察菌体生长情况, 并于培养终止时测定活孢子数。

### (五) pH 稳定性测定

按照余茂劭等的方法<sup>[7]</sup>进行。

### (六) 紫外线照射失活试验

用 1% 的蛋白胨溶液将浓度为 10<sup>11</sup> 单位/ml 的噬菌体原液稀释至浓度为 2 × 10<sup>7</sup> 单位/ml, 吸取 1 ml 放入倒有底层培养基的、直径 9 厘米的培养皿中, 置于距 30 瓦的紫外线灯下 30 厘米处, 分别照射 10、20、30、40、50、60、70、80、100、120 秒后, 在红灯下再倒入混有指示菌的上层培养基, 黑暗条件下培养 20 小时比较其存活率。

### (七) 热稳定性测定

用无菌水将浓度为 10<sup>11</sup> 单位/ml 的各种噬菌体原液稀释至 2 × 10<sup>7</sup> 单位/ml, 然后各吸取 5 ml 分别置于 60、70、80、90、100℃ 水浴处理 20、30、40 分钟后, 用 4℃ 冷水迅速冷却; 分别吸取 0.5 ml 处理液和 0.2 ml 指示菌并与上层琼脂培养基混匀后倒平板, 观察其存活情况。

### (八) 发酵试验

7 吨发酵罐投料 3.5 吨培养基, 接入 200ml 孢子悬浮液 (1.5 × 10<sup>9</sup>/ml), 并于接种后 7 小

时加入 50 ml 效价为 6 单位/ml TP-1 噬菌体, 以搅拌速度为 200—230 r/min、罐压 0.3—0.5 kg/cm<sup>2</sup>、罐温 30—37℃ 条件下进行发酵试验, 分别观察菌体的生长情况, 并测定 pH 变化及终止培养时的活孢子数。

## 结 果

### (一) 噬菌体种类

从 56 个样品中分离到不同的噬菌体, 按照噬菌斑的形态特征及大小分别定为四种类型。

TP-1: 透明斑, 直径 3—3.7 毫米;

TP-2: 透明斑, 直径 1.5—2.8 毫米;

TP-3: 透明斑, 直径 0.5 毫米;

TP-4: 透明斑, 直径 2.5—3.5 毫米, 边缘不整齐, 斑外呈圆形晕圈。

### (二) 供试菌株在不同温度下对各类噬菌体的敏感性

平板测定的各菌株对噬菌体的裂解情况见表 1。

表 1 表明, 菌株 H<sub>3a3b</sub>-85-10-6(S) 在 36—37℃ 温度下对四类噬菌体都具有抗性, 其它各菌株在同样温度下仅对 TP-2、TP-4 具抗性, 而对 TP-1、TP-3 仍然敏感; 所有菌株在 28—32℃ 温度下对各种噬菌体均敏感。

为探讨不同温度下危害最大的烈性噬菌体 TP-1 对菌体的裂解情况, 分别选用 30℃、37℃ 两种温度、在不同时间加入 6 单位/ml 0.5 ml 噬菌体, 观察及测定结果见表 2。

表 2 表明, 两菌株在不同温度下对噬菌体

表 1 各菌株对噬菌体敏感性的平板测定结果

结果 温度(°C)	菌株 HD-1				7216				82-6(1)-2				H <sub>3a3b</sub> -85-10-6(S)			
	TP-1	TP-2	TP-3	TP-4	TP-1	TP-2	TP-3	TP-4	TP-1	TP-2	TP-3	TP-4	TP-1	TP-2	TP-3	TP-4
28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
34	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
36	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
37	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-

注: “+”: 形成噬菌斑; “-”: 不形成噬菌斑。

表2 两菌株在两种温度下对噬菌体 TP-1 的敏感性

加入噬菌体 时间 (h)	菌株 结果	30°C		37°C	
		HD-1	H <sub>3a3b</sub> -85-10-6(S)	HD-1	H <sub>3a3b</sub> -85-10-6(S)
0		×* 0**	× 0	× 0	× 0
4		× 0	× 0	× 0	± —
5		× 0	× 0	× 0	± —
6		× 0	× 0	× 0	± 0.9
7		× 0	× 0	± —	+ 56
8		× 0	× 0	± 13	+ 58
9		± —	± —	—	—
10		± 34	± 38	—	—
11		+ 60	+ 58	—	—
12		+ —	+ 54	+ —	+ 54
16		+ —	+ 56	+ —	+ 59
20		+ —	+ 56	+ —	+ 56
对照(不加)		+ 57	+ 59	+ 55	+ 55

\* ×: 全部裂解; ±: 部分裂解; +: 菌体正常; —: 未测定

\*\* 菌数: ×10<sup>4</sup>

表3 不同 pH 值下噬菌体的存活百分率\*

噬菌体	pH 值 存活百分率(%)	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0
		TP-1	0	19	76	95	100	89	39	24	—
TP-2	0	9.5	65	107	100	90	76	87	—	—	
TP-3	0	29	87	91	100	97	103	45	—	—	
TP-4	0	41	90	83	100	51	29	36	—	—	

\* 按 pH 7.0 为 100% 存活计算

TP-1 的敏感性差异显著。菌株 H<sub>3a3b</sub>-85-10-6(S) 在 37°C 温度下, 4 小时后加入噬菌体, 其抗性逐渐增强, 至第 7 小时则基本不受危害, 而在 30°C 温度下, 两菌株在 10 小时以前, 均不同程度被噬菌体裂解。

### (三) pH 测定

在不同 pH 值条件下四种噬菌体的稳定性测定结果见表 3。

表 3 结果表明, 四种噬菌体在 pH 5—8 时均较稳定, 而在 pH 3.0 和 11—12 时全部失活, TP-2 在 pH 4.0 时存活极少, 而在 pH 10.0 时则较稳定。

### (四) 紫外线照射

四种噬菌体经不同时间的紫外线照射后存

活率结果见表 4。

表 4 指出, 紫外线对噬菌体具有明显的灭活效果, 但不同噬菌体之间存在较大的差异, 其中 TP-4 对紫外线最敏感, 照射 10 秒钟后其存活率仅 0.02%; 紫外线对 TP-3 的灭活效果最差, 照射 10 秒钟还有 56% 存活, 即使照射 120 秒钟, 仍有 19.5% 存活。

### (五) 热稳定性测定

噬菌体在不同温度下处理不同时间的存活数表明, 噬菌体对高温极敏感; 四种噬菌体在 60°C 处理 30 分钟以上均失活; 除 TP-4 外, TP-1、TP-2、TP-3 分别在 70°C、20 分钟的存活数为 3.5、5、9 单位/ml。

表 4 噬菌体经紫外线照射下的存活率\*

噬菌体	照射时间 (秒)										
	10	20	30	40	50	60	70	80	100	120	
TP-1	16.3	10.7	2.5	3.7	1.95	4.5	0.37	0.80	0.90	0.09	0.09
TP-2	1.7	1.6	3.9	4.2	1.56	0.42	0.69	0.90	1.30	0.08	0.08
TP-3	56	74	56	69	26	44	26	23	18.7	19.5	19.5
TP-4	0.02	0.09	0.016	0.03	0.05	0.06	0.04	0.06	0.003	0.005	0.005

\* 按对照 100% 计算

表 5 发酵试验结果

噬批	pH 变化	时 间 (小时)														发酵周期 (h)	菌数 (10 <sup>8</sup> /ml)
		4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	27	29			
21-102		6.6	6.4	6.5	6.7	6.8	6.8	6.9	6.9	7.0	7.3	7.7				25	72
22-107		6.5	6.4	6.5	6.6	6.7	6.9	6.9	7.1	7.1	7.2	7.6				24.5	70
22-115		6.8	6.5	6.6	6.7	6.7	6.8	6.9	7.0	7.1	7.3	7.7				25	75
21-124		6.4	6.4	6.5	6.6	6.6	6.7	6.8	6.9	7.1	7.2	7.6				24.5	68
HD-1		6.6	6.4	6.5	6.6	6.6	6.6	6.7	6.7	6.8	6.9	7.0	7.2	7.4		29	60

### (六) 发酵试验

将 H<sub>3a3b</sub>-85-10-6(S) 进行了 7 吨发酵罐试验 HD-1 作对照(见表 5)。

表 5 结果指出, H<sub>3a3b</sub>-85-10-6(S) 具有良好的发酵性能。在本厂发酵条件下, 即使在接种 7 小时后进入少量噬菌体, 也不受其感染。从发酵水平看, 与 HD-1 比较, 不仅发酵周期缩短 4 小时, 而且平均菌数也提高 18% 以上; 另外, pH 值变化正常, 发酵中泡沫易于控制。

者认为改用 60—80℃ 处理 25 分钟为宜。

3. 鉴于噬菌体在不同温度下溶菌能力差异极大, 从生产角度考虑, 结合厂家发酵过程中常见噬菌体的类型, 有针对性的筛选适合本厂条件的优良菌株, 结合环境消毒等综合措施是防治噬菌体危害的有效方法。如本试验选用的菌株 H<sub>3a3b</sub>-85-10-6(S) 进行的发酵实验表明, 在发酵生产中克服噬菌体的危害是提高产品质量、降低成本的有效措施。

## 讨 论

1. 根据上述各项试验结果, 表明苏芸金杆菌(血清型 H<sub>3a3b</sub>) 深层发酵生产中, 普遍存在噬菌体的威胁, 尤其是裂解能力强、噬菌斑最大的 TP-1 危害最大, 是重点防治对象。

2. 高温对各类噬菌体具有强烈的灭活作用, 但噬菌体对不同温度具有不同的敏感性。实验表明, 采用过去常规 60℃ 20 分钟热处理法并不能全部杀灭菌体携带的烈性噬菌体, 作

## 参 考 文 献

- [1] Yoder, P. E. and E. L. Nelson: *J. Insect. Pathol.*, 2: 198, 1960.
- [2] Chopman, H. M. and J. R. Norris: *J. Appl. Bact.*, 29(3): 529—535, 1966.
- [3] Colasito, D. J. and M. H. Rogoff: *J. Gen. Virol.*, 5(2): 267—274, 1969.
- [4] 沙棣云等: 昆虫学报, 18(3), 273—280, 1975.
- [5] Adams, M. H.: *Bacteriophages* Interscience Publishers, New York, 1959.
- [6] 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.
- [7] © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>