

苏芸金杆菌溶原性菌株的分离鉴定*

张 建 科

(西北农业大学农化系)

摘 要

把保藏的11株苏芸金杆菌分成两个试验菌株组,采用分群混合双层分离到4株带噬菌体的菌株 B_1 , B_2 , B_4 , B_5 ,并对其溶原性做了初步观察。经单菌落传代,加热处理芽孢以消除游离噬菌体,4个菌株皆继续释放噬菌体,且对本身释放的噬菌体具免疫性,由以上特点可以确定这4个带噬菌体菌株都是溶原性菌株。应用紫外线或丝裂霉素C对 B_4 , B_5 进行产生噬菌体的诱导效应试验, B_5 有明显的诱导效应,而 B_4 经诱导后噬菌体释放量增加不多。

关键词 苏芸金杆菌; 溶原性菌株

苏芸金杆菌作为杀虫剂,国内外已广泛应用,但在生产发酵过程中常受噬菌体侵染而遭受严重影响。在考虑烈性噬菌体危害的同时,不能忽视溶原性菌株释放的温和噬菌体,在一定的条件下可转变为烈性噬菌体。以前国外有人已证明苏芸金杆菌的某些菌株是溶原性的^[1-3],国内也有人根据实验与生产中出现的某些异常现象提出苏芸金杆菌中有溶原性菌株存在,但未确证。本工作就是从生产中常用的11株苏芸金杆菌中分离出溶原性菌株,并研究其有关特性,从而给以确证,供生产和科研参考。

材料与方法

1. 菌株及培养条件:从国内有关单位取得11株苏芸金杆菌(表1)。32℃摇床培养7小时达对数生长期。

2. 培养基:每升培养基中含蛋白胨10克,牛肉膏10克,葡萄糖1克,氯化钠5克。双层琼脂平板法上层培养基加琼脂7克,底层培养基加琼脂20克。用1N NaOH调pH到7.0~7.2。分装,灭菌备用;用蒸馏水配制1%蛋白胨水溶液,调pH到7作为噬菌体稀释液。分装,灭菌备用;用蒸馏水配制0.85%生理盐水作为细胞稀释液。分装,灭菌备用。

3. 噬菌体计数:采用双层琼脂平板法,以敏感菌株的对数生长液为指示菌。32℃培养10—24小时,计数噬菌斑。

* 本文于1986年4月3日收到。

• 此文是作者于一九八三年在西北大学生物系王国驹副教授指导下完成的毕业论文。

4. 溶原性菌株的初步确认: 采用分群混合双层法。此法涉及到多种噬菌体的混合。据报道^[4]噬菌体混合感染时会产生干扰作用或协同作用, 但在第二步还要单个测定各菌株是否带有噬菌体。因而即使第一步有干扰或协同作用, 在第二步却可以得到区别和消除, 故实验结果可靠。实验中有关的具体方法与步骤, 将分别在实验结果中叙述。

表1 试验菌株及来源

编号	菌 名	原 菌 号	来 源
B ₁	<i>B. thuringiensis</i> Var. <i>tianmensis</i>	7216	湖北天门县微生物所
B ₂	<i>B. thuringiensis</i> Var. <i>galleriae</i>	荆菌Ⅱ号	湖北荆州农科所
B ₃	<i>B. thuringiensis</i> Var. <i>galleriae</i>	48-41	广东微生物所
B ₄	<i>B. thuringiensis</i> Var. <i>berliner</i>	009	中国农科院
B ₅	<i>B. thuringiensis</i> Var. <i>tolworth</i>	013	中国农科院
B ₆	<i>B. thuringiensis</i> Var. <i>finitimus</i>	021	中国农科院
B ₇	<i>B. thuringiensis</i> Var. <i>alesti</i>	E-3	中国农科院
B ₈	<i>B. thuringiensis</i> Var. <i>sotto</i>	016	中国农科院
B ₉	<i>B. thuringiensis</i> Var. <i>galleriae</i>	087	中国农科院
B ₁₀	<i>B. thuringiensis</i> Var. <i>entomocidas</i>	010	中国农科院
B ₁₁	<i>B. thuringiensis</i> Var. <i>aizawai</i>	096	中国农科院

结 果

(一) 溶原性菌株的分离

分离溶原性菌株, 需先测知带噬菌体的菌株。测定带噬菌体菌株的方法有好几种, 我们根据自己的实验特点, 采用分群混合双层法^[4]。方法分两步进行。

1. 带噬菌体菌株与指示菌的初测: 把待测的11株菌株分别接种到液体培养基中, 32℃摇床培养12小时, 即用3000转/分离心15分钟, 取上清液, B₁—B₅等量混合为第一组, B₆—B₁₁等量混合为第二组, 然后分别以11个菌株为指示菌, 以双层琼脂平板法测定。结果为第一组上清液中有噬菌体存在, 而第二组上清液无噬菌体存在。

2. 带噬菌体菌株的确认: 在出现噬菌斑或类噬菌斑的菌株组内采用原指示菌, 把该组中各上清液分别进行双层琼脂平板法测定, 初步确定带噬菌体菌株。最后给带噬菌体菌株的培养液的上清液中加入氯仿处理, 再用双层琼脂平板法测定, 进一步确定带噬菌体菌株。经反复测定, 肯定了B₁, B₂, B₄, B₅为带噬菌体菌株。

(二) 溶原性菌株的确认

1. 单菌落传代：把带噬菌体菌株分别用无菌生理盐水进行稀释至细胞浓度为100个/ml左右。吸取0.1ml移到固体平板培养基上，用玻璃刮铲充分涂匀，32℃培养24小时，挑取孤立菌落，用无菌生理盐水稀释，涂布于固体平板培养基上，32℃培养24小时。同时把单菌落接入液体培养基中，32℃摇床培养24小时，离心取上清液，用双层琼脂平板法测定噬菌体数目。如此挑取5代单菌落，即经过单菌落连续五次传代以除去游离噬菌体。经培养，4个菌株仍释放噬菌体，详见表2（以B₅为敏感菌）。

表2 单菌落后代培养物中噬菌体数 (个/ml)

菌株	0	1	2	3	4	5
B ₁	7×10^6	1×10^5	4.2×10^6	3.1×10^7	2.4×10^6	1.5×10^6
B ₂	1.4×10^5	8×10^5	2.4×10^6	1.25×10^5	4.31×10^5	2.09×10^5
B ₄	3.4×10^7	2.12×10^7	4.5×10^6	1.01×10^7	1.35×10^7	4.4×10^6
B ₅	7.5×10^6	2.0×10^7	4.6×10^6	1.06×10^7	5.3×10^6	3.25×10^6

2. 加热处理芽孢：取4个带噬菌体菌株分别接种到试管斜面培养基上，32℃培养2—3天，镜检有90%以上菌体已形成芽孢。用无菌生理盐水悬浮，连续离心洗涤三次以减少游离噬菌体。然后用无菌生理盐水稀释至细胞浓度为 10^8 — 10^9 个/ml，然后在95℃恒温水浴中置30分钟，灭活游离噬菌体。把上述处理过的芽孢接种到液体培养基中，32℃摇床培养12小时，离心取上清液，用双层琼脂平板法，以B₅为指示菌测定噬菌体数，结果如表3。

表3 芽孢悬液处理前后及处理过的芽孢经培养噬菌体变化 (个/ml)

菌株	处理前	处理后	培养后
B ₁	1.70×10^2	0	7.5×10^4
B ₂	8.50×10^2	0	7.0×10^4
B ₄	5×10^2	0	1.25×10^5
B ₅	1.63×10^3	0	2.72×10^4

由表3看出，芽孢悬液经处理后无噬菌体存在，通过培养B₁，B₂，B₄，B₅仍能产生噬菌体。

3. 免疫性试验：以B₁，B₂，B₄，B₅为指示菌，并用其自身释放的噬菌体进行感染，以敏感菌B₅为对照，用双层琼脂平板测定，结果如表4。

由表4可看出，只有在指示菌B₅上有溶菌现象，从而说明B₁，B₂，B₄，B₅对其自身释放的噬菌体有免疫性。

4. 诱导效应：

(1) 紫外线诱导：把菌株B₄，B₅接入液体培养基中32℃摇床培养12小时，然后吸取此菌液0.8ml接入20ml新鲜液体培养基中，继续培养6小时。取第二次培养后的菌液进行离心沉淀，弃去上清液，以无菌生理盐水悬浮、稀释至菌浓度为 10^5 ~ 10^6 个/ml。取此液

3 ml放入直径为7 cm的培养皿中,在紫外线(波长2537 Å, 15w)下照射(距离: 30cm)。将不同时间照射后的菌液用液体培养基稀释10倍,离心取上清液,测噬菌体数目,同时测各菌液中存活的细胞数(表5, 6)。

表4 各菌株对自身释放的噬菌体的免疫性

指示菌	B ₁	B ₂	B ₄	B ₅	蛋白胨液
B ₁	0	—	—	—	0
B ₂	—	0	—	—	0
B ₄	—	—	0	—	0
B ₅	—	—	—	0	0
B ₆	3×10^2	2.0×10^2	1.5×10^3	2.0×10^4	0

注:表中数字系各菌株经摇床培养12小时,菌液上清液稀释度为 10^{-4} 时0.2ml中的噬菌体数。

表5 紫外线对B₅菌株产生噬菌体的诱导效应

紫外线处理 时间(秒)	存活菌数		噬菌体数 (个/ml)	诱导后增加倍数
	$\times 10^3$ 个/ml	%		
0(对照)	156	100	265	0
5	67	43	525	2
10	42	27	720	3
15	34	22	750	3
20	2.1	1.4	1050	4
25	1.5	1	2720	11
30	0.8	< 1	1365	5

表5结果表明,菌株B₅经不同时间紫外线照射,菌液中的噬菌体数目都比对照增多,其中照射25秒的噬菌体数增长最多,是对照的11倍,故诱导效应显著。

由表6可知,经紫外线不同时间照射后的B₄菌悬液中的噬菌体数,比对照的减少。就照射过的菌液看,照射时间增长,活菌数逐渐减少,相反的噬菌体数却不断增加。其中照射25秒时的噬菌体数最多,是照射10秒时的3.5倍。因此紫外线照射对溶原性菌株B₄释放原噬菌体有一定诱导效应,但不甚明显。

(2) 丝裂霉素C诱导:把经过二次摇床培养的菌液,改用液体培养基稀释至菌浓度为 10^8 — 10^7 个/ml,在34℃预热15分钟,然后加入丝裂霉素C(日本,协和发酵工业株式会社出品),使其最终浓度为每毫升3微克,34℃振荡培养15分钟,弃去上清液,加入等量液体培养基,然后每隔一定时间测活菌数及噬菌体数,结果如表7, 8。

表6 紫外线对B₁菌株产生噬菌体的诱导效应

紫外线处理时间 (秒)	存 活 菌 数		噬 菌 体 数 ($\times 10^2$ 个/ml)
	$\times 10^3$ 个/ml	%	
0 (对照)	2880	100	38
10	850	30	6
15	660	23	6
20	310	11	8
25	33	1	20
30	< 1		16

从表 7 资料知, B₁经丝裂霉素C诱导处理后,噬菌体数随着时间的延长而增加,到190分钟时增加近1000倍,而活菌数减少10倍,从此增减情况看,诱导效应很显著。

表 8 资料表明,菌株 B₁经丝裂霉素C不同时间处理后,活菌数无明显减少,噬菌体数无显著增多。故丝裂霉素C对菌株 B₁原噬菌体释放无明显诱导效应。

表7 丝裂霉素C对B₁菌株产生噬菌体的诱导效应

间隔时间 (分钟)	活细菌数 (个/ml)	噬斑数 (个/ml)
0	5×10^4	5.55×10^6
30	4×10^4	2.5×10^7
70	4.1×10^4	3.45×10^6
110	3.8×10^3	1.65×10^9
150	6.51×10^3	3.1×10^9
190	4.84×10^3	4.6×10^9

表8 丝裂霉素C对B₁菌株产生噬菌体的诱导效应

间隔时间 (分钟)	活细菌数 (个/ml)	噬斑数 (个/ml)
0	56×10^3	6×10^5
40	52×10^3	5.10×11^5
80	35×10^3	5.05×10^5
120	49×10^3	6.75×10^5
160	57×10^3	4.5×10^5
200	54×10^3	2.2×10^5

四、 讨 论

溶原性菌株有两个特征^[1,9],①其在繁殖过程中不断释放噬菌体;②溶原性菌株对自身释放的噬菌体具免疫性。B₁, B₂, B₄, B₅菌株经单菌落传代,消除游离噬菌体,连续5次,所得单菌落经摇床培养后与原始菌一样,仍能释落大量噬菌体。加热处理芽孢除去游离噬菌体,存活的芽孢在培养繁殖过程中仍能释放噬菌体。但对本身释放的噬菌体具免疫性。据这两点可以确定B₁, B₂, B₄, B₅4个菌株都是溶原性菌株。

紫外线和丝裂霉素C对不同的溶原性细菌及不同的溶原性菌株释放噬菌体的诱导效应是有差别的。从我们的实验结果看,紫外线和丝裂霉素C对菌株B₅有明显的诱导效应。对菌株B₄紫外线具有一定的诱导效应,而丝裂霉素C却无诱导效应。是否由于丝裂霉素C剂量不适,还是由于菌株B₄对丝裂霉素C不敏感还需进一步试验。

参 考 文 献

- [1] Colasito, D. J., and Rogoff, M. H. J.: *Gen. Virol.* 5, 1969: 275—281.
- [2] Раутенштейн, Я. И. и Др.: МИКРОБИОЛОГИЯ, 40(3)1971: 532—539.
- [3] Раутенштейн, Я. И. и Др.: МИКРОБИОЛОГИЯ, 41(1)1972: 177—178.
- [4] 陈慎等: 微生物学报, 12(1)1966: 81—85.
- [5] Lwoff, A.: *Bacteriol. Rev.* 17, 1953: 269—337.
- [6] Berani, G.: *Advan Virus Res.*, 5, 1958: 151—190.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF SEVERAL LYSOGENIC STRAINS OF BACILLUS THURINGIENSIS

Zhang Jianke

(Northwestern Agricultural University)

Abstract

Four phage-carrying strains of *Bacillus thuringiensis* (B₁, B₂, B₄, B₅) were isolated from 11 preserved strains by group-mixture test method, and a preliminary observation was made of their lysogeny. After serial isolation of single colony or heat treatment of spores to get rid of free phage, the bacteria were still capable of releasing phage. The bacteria also showed a complete resistance to infection with the phage released by themselves. Based on these characteristics, *Bacillus thuringiensis* strains 1, 2, 4, 5 (B₁, B₂, B₄, B₅) were considered to be typical lysogenic strains. Treatment with Mitomycin C or irradiated with ultraviolet light resulted in a great increase in phage production of B₅. But no obvious effect of induction to B₄ could be found.

Key Words *bacillus thuringiensis*; lysogenic strains