

从曝气池中分离的噬菌体的形态学观察

罗成 王春生 梁世平

谢裕敏 王孔星 李荣森

(中国科学院武汉病毒研究所, 武昌)

摘要 本文对从武汉枕木防腐厂及武汉石化总厂两个曝气池中分离的噬菌体进行增殖, 提纯及电镜观察, 7株噬菌体按目前公认的分类方法分属于长尾科和短尾科。讨论了噬菌体、寄主与水源的关系, 噬菌体形态与环境的关系。

关键词 噬菌体; 曝气池

近年来噬菌体在环境科学中得到广泛的应用, 这是由于 1. 噬菌体的存在可以作为相应的寄主存在的指征^[1-3]; 2. 许多噬菌体理化性质及分布与人的许多病原病毒有平行的相关性, 因此被用来作为环境污染指数^[4]; 3. 由于在自然生态中大多数噬菌体的抗性较寄主强, 并且还具自然净化环境的作用^[4, 5]。最近报道可用来追踪环境, 以获得污染原分散方向, 污染原毒性强烈程度, 自然净化程度, 移动速率等参数^[6]。本文报道用电镜观察到的这些曝气池中的噬菌体形态及其分类地位。

材料与方 法

(一) 菌种及噬菌体

Aeromonas sp. II5A, 能降解 β -BHC 和 γ -BHC (农药六六六)。

Pseudomonas sp. PCB12, 能降解多氯联苯 (PCB)。

E. coli 282 (F⁺)。

以上三株菌都由本所环保室提供, 7株噬菌体均用这三种指示菌从曝气池中分离得到。

(二) 取样及样品处理

夏季, 在武汉石化总厂和铁道部汉阳枕木防腐厂从已进入处理中期, 并正在搅拌的曝气池中取样, 各取 500 毫升, 放 4℃ 静置数日, 离心 (5000r/min) 10 分钟。取上清液经 G6 烧结玻璃过滤器过滤, 然后按 1:1 的比例与 2 倍

的 LB 培养液混合, 再分别接种 II5A, PCB12 和 282 到三只摇瓶里, 置 282 于 37℃, 置 II5A 和 PCB12 于 30℃, 120r/min 振荡培养 16 小时。在每一摇瓶中加 3% (V/V) 的氯仿, 振荡 5 分钟, 静置, 取上层水相离心, 将上清液倒入灭菌的烧杯中, 加 PEG6000 到终浓度为 8%, 加 NaCl 至终浓度为 0.5mol/L 为止, 搅匀, 置 4℃ 过夜, 次日可观察到有絮状沉淀, 小心地转入离心管, 5000r/min 4℃ 离心 20 分钟, 弃上清液, 加 LB 培养液直至溶解全部沉淀, 此样品可用于滴定和电镜观察。

(三) 噬菌斑滴定

按文献[7]的方法进行, 未经生物学富集的本底浓度都小于 10²pfu/ml, 经生物学富集和 PEG6000 浓缩的 II5A 的噬菌体达到 3 × 10¹²pfu/ml, *E. coli* 282 的噬菌体达到 1.7 × 10¹²pfu/ml, PCB12 的噬菌体为 4.5 × 10⁸pfu/ml。

(四) 电镜观察

按文献[7]的方法进行。

结果与讨论

(一) 噬菌体形态结构及分类

从这三种菌株中分离到的噬菌体其形态、大小及分类地位见图版 I 和表 1。虽然 B12P2 尾较短, 但按国际病毒命名委员会细菌病毒小组提出的分类原则, 要 25nm 以下才为短尾科,

表1 噬菌体形态结构及其分类(单位: nm)

| 噬菌体 | 寄主 | 头部 | 尾部* | 末端结构 | 收缩** | 压缩比 | 科 |
|---------|-------|---------|-------------------|---------|------|--------|-----|
| I15P1 | I15A | 50×55 | 827×10 | 无,但尾可弯曲 | - | | 长尾科 |
| I15P2 | I15A | 50×55 | 148×8 | 无 | - | | 长尾科 |
| I15P3 | I15A | 104×80 | 110×22 (44×30) | 有基板尾丝 | ⊕ | 110:44 | 肌尾科 |
| I15P4 | I15A | 66×90 | 207×8 | 无,但尾可弯曲 | - | | 长尾科 |
| E1282P1 | 282 | 120×90 | 115×15 (60×30) | 有基板,尾丝 | ⊕ | 115:60 | 肌尾科 |
| B12P1 | PCB12 | 100×110 | 60×25 | 有基板 | + | | 肌尾科 |
| B12P2 | PCB12 | 65×65 | 60×7 | 无,但尾可弯曲 | - | | 长尾科 |

* 括号内的数据指收缩时的大小。

** -: 不能收缩; ⊕: 能收缩,但呈未收缩状; +: 能收缩,而且处于收缩状。

所以它仍属长尾科, I15P1 和 I15P2 都来自同一寄主,但 I15P1 的尾比 I15P2 的尾长近 5 倍, I15P1 这种形态是较罕见的。

(二) 噬菌体的分离与回收

由于从 PCB12 和 I15A 两株菌中都分离出两种或两种以上的噬菌体,而未进行噬菌体的纯分离,因此是混合噬菌体滴定,噬菌既不整齐,但整个斑大小在 1—3mm 之间,按照成絮理论^[7],再按照 Yamamoto 的 PEG 沉淀原理^[8],选 8% PEG6000 沉淀,结果浓缩效果很好,根据浓缩的体积计算,浓缩了 100—1000 倍。此外用过滤污水作为通常的噬菌体原液来接种,其增殖结果与通常的噬菌体扩增效果基本上吻合,取自这两种曝气池的污水对寄主细胞的生长无明显影响。

(三) 生活源污水的检查及噬菌体种类检出

在这次分离中,我们选非降解细菌 *E. coli* 282 (F⁻) 菌株是为了证实其中有无单链核酸 (SSDNA, SSRNA) 类噬菌体存在,并在培养和滴定中均加 Ca⁺⁺。结果未发现这类微小球形的单链核酸噬菌体。根瘤性微毛需在 30℃ 以上条件合成和单链核酸噬菌体专性感染 *E. coli* F⁻ 的现象,基本上可判断这两曝气池中不

含生活源污水。I15A 为两个科的 4 种噬菌体感染,有可能 I15A 适应环境能力强,分布广,在进化中接受并获得了多种噬菌体的感染受体,如大肠杆菌,从 PCB12 分离出两种噬菌体,但分属两个科。已知大肠杆菌噬菌体种类和数量极多,而这样的污水中只分离出一种,并且是易感染的肌尾科噬菌体,有可能是以沥青为主要碳源的环境中,大肠杆菌较难生长的缘故。此外,由于在提取噬菌体中加了氯仿,故对氯仿敏感的含脂质的噬菌体未被检出。

(四) 噬菌体形状与环境压力

噬菌体形态与环境类型无论是从本文还是总结别人的工作都很难看出二者之间有无内在联系。但有些形状特别的噬菌体是否与环境选择压力有关,比如本文中的噬菌体 I15P1 尾特别长。尾长可否增加它吸附并感染寄主的机率,虽不能用动物生存中颈鹿现象来简单演绎微生物世界的类似现象,而根据结构与功能相统一的原理可能表明这种内在联系的存在。此问题有待于更深入的研究。

参 考 文 献

- [1] Seeley, N. D. et al.: *J. of Applied Bacteriology*, 53: 1—17, 1982.
- [2] Seeley, N. D. et al.: *J. of General Virology*,

46: 87—95, 1980.

[3] 罗成: 病毒学杂志, 4(2): , 1989。

[4] 罗成等: 生物学杂志, 5: 20—24, 1987。

[5] 方中达等. 中国农业科学, 2: 73, 1978。

[6] Primrose, S. B. et al.: *Applied and Environme-*

ntal Microbiology, 43: 694—701, 1982.

[7] 罗成等: 病毒学报, 3(4): 361—368, 1987。

[8] Yamamoto, K. R. et al.: *Virology*, 40: 734—744, 1970.