

植物青枯菌噬菌体保存方法的研究

刘露¹, 林志坚¹, 周挺², 梁颀捷³, 顾钢^{2*}, 胡方平¹, 蔡学清^{1*}

(1. 福建农林大学植物保护学院, 福州 350002; 2. 福建省烟草公司烟草科学研究所, 福州 350003;
3. 福建省烟草公司三明市公司, 三明 365000)

摘要 噬菌体可用于防治植物青枯病, 但不易保存。本文对青枯病菌短尾噬菌体 P1、P2、P3 和 P4 株系的保存方法和条件进行了研究; 将各噬菌体原液、噬菌体原液: 青枯菌液=1:1、噬菌体原液: 青枯菌液: 40% 甘油=1:1:2、噬菌体原液: 青枯菌液: 80% 甘油=1:1:2 的处理分别置于 -75、-25、4℃、室温下保存, 再分别于 90、180、270、365 d 后取样测定噬菌体的效价。结果表明, -75℃ 和 -25℃ 下, 噬菌体原液: 青枯菌液: 40% 或 80% 甘油=1:1:2 保存的效果最好, 365 d 后效价仅下降 0~2 个数量级; 噬菌体原液: 青枯菌液=1:1 在 4℃ 和室温下保存效果也较好, 4℃ 保存 365 d 后效价仅下降 1~3 个数量级; 此处理在室温条件下保存也可达 270 d。因此, 以资源长期保存为目的可采用噬菌体原液: 青枯菌液: 40% 或 80% 甘油=1:1:2 保存于 -75℃ 或 -25℃ 下; 短期保存可采用噬菌体原液: 青枯菌液=1:1 保存于室温下。

关键词 青枯病菌; 噬菌体; 保存方法

中图分类号: S 476 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2020162

The preservation methods of *Ralstonia pseudosolanacearum* phage

LIU Lu¹, LIN Zhijian¹, ZHOU Ting², LIANG Banjie³, GU Gang^{2*}, HU Fangping¹, CAI Xueqing^{1*}

(1. College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;
2. Institute of Tobacco Science, Fujian Provincial Tobacco Company, Fuzhou 350003, China;
3. Fujian Sanming Tobacco Company, Sanming 365000, China)

Abstract Bacterial phage could be used to control crop bacterial wilt caused by *Ralstonia pseudosolanacearum*, however, the phage is a living parasite and is not easy to be preserved. In this study, the preservation methods of *Podoviridae* phage strain P1, P2, P3 and P4 were screened from the following four treatments, which included bacteriophage suspension, bacteriophage suspension: *R. pseudosolanacearum* suspension at 1:1, bacteriophage suspension: *R. pseudosolanacearum* suspension: 40% glycerol at 1:1:2 and bacteriophage suspension: *R. pseudosolanacearum* suspension: 80% glycerol at 1:1:2 were preserved at -75℃, -20℃, 4℃ and room temperature, respectively. The titer of the phage was detected by double-layer plate method after preservation for 90, 180, 270, 365 d. The results showed that the treatment of bacteriophage suspension: *R. pseudosolanacearum* suspension: 40% or 80% glycerol at 1:1:2 preserved at -75℃ and -25℃ was the best, and the phage titer reduced 0-2 magnitude after preservation for 365 d. At 4℃ and room temperature, the treatment of bacteriophage suspension: *R. pseudosolanacearum* suspension at 1:1 had a good effect, the titer reduced only 1-3 magnitude after preservation for 365 d at 4℃, and the phage in this treatment could also keep alive for 270 d at room temperature. The results indicated that the treatment of bacteriophage suspension: *R. pseudosolanacearum* suspension: 40% or 80% glycerol at 1:1:2 preserved at -75℃ and -25℃ is a method for long time preservation. The treatment of bacteriophage suspension: *R. pseudosolanacearum* suspension at 1:1 preserved at room temperature is a simple and reliable method.

Key words *Ralstonia pseudosolanacearum*; bacteriophage; preservation method

收稿日期: 2020-04-01 修订日期: 2020-05-14

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0201300); 中国烟草总公司福建省公司科技计划项目(闽烟司科[2017]2号); 福建农林大学科技创新项目(KFA17541A)

* 通信作者 E-mail: 顾钢 gugang318@163.com; 蔡学清 caixq90@163.com

作物青枯病是一类典型的土传细菌性维管束病害,易发生,难防治。20世纪初,Twort和d'Herelle发现并报道了噬菌体(bacteriophage, phage),其广泛存在于自然界中^[1-4]。由于其具有寄生专一性、不易产生抗性等特点,被冠以细菌的天然“杀手”而备受关注,具有巨大的应用潜力^[5-6]。噬菌体是严格的专性活体寄生物,无完整细胞结构,具有株系间差异大等特点,导致在保存上必须采用不同的方法^[7]。Ackermann等^[8]报道,芽胞杆菌噬菌体AP50在-80℃下仅能存活6个月,而肠杆菌噬菌体PRD1保存12年效价仅降低3个数量级;王绍花2010年报道德氏乳杆菌噬菌体phiLdb在4℃下可保存6个月^[9],于美玲2015年报道乳杆菌烈性噬菌体Lpla保存效果最好的温度是-80℃^[10]。高苗^[11]发现,青枯菌噬菌体 ϵ RS-1原液于4℃下保存6个月后尚存较高的活性。因此,要开发利用噬菌体,首要的问题就是噬菌体的长期保存。由于不同的噬菌体形态结构各异,对不同条件的响应能力不同,以何种形式或方法保存,目前尚无明确定论。本研究以福建不同烟区分离的4株青枯菌噬菌体为对象,研究不同保存条件下噬菌体的活性变化,寻找适合噬菌体长期保存的方法。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

青枯病菌 *Ralstonia pseudosolanacearum* Z5; 青枯病菌短尾噬菌体 P1, P2, P3 和 P4 均由本实验室分离、鉴定保存。

1.2 青枯病菌培养

将保存于-75℃的青枯病菌 Z5 活化后挑取单菌落于装有 100 mL NB 培养基(蛋白胨 5 g/L、牛肉浸膏 3 g/L、葡萄糖 2.5 g/L, pH 7.2)的三角烧瓶中, 28℃, 180 r/min 振荡培养至浓度约 1×10^8 cfu/mL, 备用。

1.3 噬菌体培养

按 1%(V/V)的接种量将噬菌体原液接种于 1.2 培养的青枯病菌悬浮液中, 摇匀, 静置 15 min, 28℃, 130 r/min 振荡培养 12~16 h, 获得噬菌体培养液, 12 000 r/min 离心 5 min 后经 0.45 μ m 滤膜抽真空过滤除菌, 上清液为噬菌体原液, 效价为 2×10^{10} PFU/mL, 备用。

1.4 噬菌体保存方法

设 4 个处理, 处理 1: 噬菌体原液; 处理 2: 噬菌体原液: 青枯菌液 = 1:1(V/V, 下同); 处理 3: 噬菌体原液: 青枯菌液: 40% 甘油 = 1:1:2(1 mL 噬菌体原液和 1 mL 青枯菌液以及 2 mL 40% 甘油的混合液); 处理 4: 噬菌体原液: 青枯菌液: 80% 甘油 = 1:1:2(1 mL 噬菌体原液和 1 mL 青枯菌液以及 2 mL 80% 甘油的混合液)。分别置于-75、-25、4℃和室温保存, 90、180、270 d 和 365 d 分别取样, 测定噬菌体的效价。

1.5 噬菌体的效价测定

噬菌体效价(plaque-forming unit, PFU): 是指每毫升样品中所含有的具有侵染性的噬菌体粒子数, 采用双层平板法测定, 具体测定方法参照高苗的方法^[11]。

噬菌体效价(PFU/mL) = 平均噬菌斑数 $\times 2 \times$ 稀释倍数。

2 结果与分析

4 种不同处理的噬菌体分别在-75、-25、4℃、室温下保存的结果见表 1~表 4。结果表明, -75℃和-25℃下保存(表 1、表 2), 4 种处理的保存效果都较好, 365 d 后效价下降 0~3 个数量级, 其中噬菌体 P4 株系的保存效果最好, 其次为噬菌体 P1 和 P2 株系, 噬菌体 P3 株系较差, 如保存 365 d 后噬菌体 P4 株系效价只下降 0~1 个数量级, 噬菌体 P3 株系效价却下降 1~3 个数量级; 4℃下保存(表 3), 噬菌体原液处理和噬菌体原液: 青枯菌液 = 1:1 处理的保存效果最好, 365 d 后效价下降 1~5 个数量级, 其中噬菌体 P4 株系效价只下降 1 个数量级, 噬菌体原液: 青枯菌液: 40% 甘油 = 1:1:2 处理的保存效果次之, 365 d 后效价下降 5~7 个数量级, 噬菌体原液: 青枯菌液: 80% 甘油 = 1:1:2 处理的保存效果最差, 90 d 后效价下降 6~7 个数量级; 室温保存的效果总体较差(表 4), 但其中噬菌体原液: 青枯菌液 = 1:1 处理的保存效果相对较好, 180 d 后效价下降 1~2 个数量级, 270 d 后效价下降 6~7 个数量级; 其次为噬菌体原液处理, 噬菌体 P1 和 P2 株系保存 90 d 后全部失活, 而噬菌体 P3 和 P4 株系保存 180 d 后, 其效价下降 6 个数量级; 噬菌体原液: 青枯菌液: 40% 甘油或 80% 甘油 = 1:1:2 处理的保存 90 d 后, 噬菌体 P1、P3 和 P4 株系全部失活, 但噬菌体 P2 株系采用噬菌体

原液:青枯菌液:40%甘油=1:1:2处理,保存 365 d 仍有较高的活性,效价仅仅下降 3 个数量级。

表 1 -75℃ 下不同处理对噬菌体保存效果的影响¹⁾

Table 1 Influence of different treatments to the titer of phage at -75℃

噬菌体 Phage	处理 Treatment	效价/PFU·mL ⁻¹ Titer				
		90 d	180 d	270 d	365 d	
P1	噬菌体原液 Bacteriophage suspension	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ⁹	10 ⁹	
	噬菌体原液:青枯菌液=1:1 Bacteriophage suspension:R. <i>pseudosolanacearum</i> suspension = 1:1	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁸	
	噬菌体原液:青枯菌液:40%甘油=1:1:2 Bacteriophage suspension:R. <i>pseudosolanacearum</i> suspension:40% glycerol=1:1:2	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ⁹	
	噬菌体原液:青枯菌液:80%甘油=1:1:2 Bacteriophage suspension:R. <i>pseudosolanacearum</i> suspension:80% glycerol=1:1:2	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰	
	P2	噬菌体原液 Bacteriophage suspension	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰
P2	噬菌体原液:青枯菌液=1:1 Bacteriophage suspension:R. <i>pseudosolanacearum</i> suspension = 1:1	10 ¹⁰	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁸	
	噬菌体原液:青枯菌液:40%甘油=1:1:2 Bacteriophage suspension:R. <i>pseudosolanacearum</i> suspension:40% glycerol=1:1:2	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰	
	噬菌体原液:青枯菌液:80%甘油=1:1:2 Bacteriophage suspension:R. <i>pseudosolanacearum</i> suspension:80% glycerol=1:1:2	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰	
	P3	噬菌体原液 Bacteriophage suspension	10 ¹⁰	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁷
		噬菌体原液:青枯菌液=1:1 Bacteriophage suspension:R. <i>pseudosolanacearum</i> suspension = 1:1	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁸
噬菌体原液:青枯菌液:40%甘油=1:1:2 Bacteriophage suspension:R. <i>pseudosolanacearum</i> suspension:40% glycerol=1:1:2		10 ¹⁰	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁸	
噬菌体原液:青枯菌液:80%甘油=1:1:2 Bacteriophage suspension:R. <i>pseudosolanacearum</i> suspension:80% glycerol=1:1:2		10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁸	
P4		噬菌体原液 Bacteriophage suspension	10 ¹⁰	10 ⁹	10 ¹⁰	10 ⁹
	噬菌体原液:青枯菌液=1:1 Bacteriophage suspension:R. <i>pseudosolanacearum</i> suspension = 1:1	10 ¹⁰	10 ⁹	10 ¹⁰	10 ⁹	
	噬菌体原液:青枯菌液:40%甘油=1:1:2 Bacteriophage suspension:R. <i>pseudosolanacearum</i> suspension:40% glycerol=1:1:2	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ⁹	
	噬菌体原液:青枯菌液:80%甘油=1:1:2 Bacteriophage suspension:R. <i>pseudosolanacearum</i> suspension:80% glycerol=1:1:2	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰	

1) 初始效价为 2×10^{10} PFU/mL;表 2~表 4 同。

Initial titer: 2×10^{10} PFU/mL. The same in table 2,3 and 4.

表 2 -25℃ 下不同处理对噬菌体保存效果的影响

Table 2 Influence of different treatments to the titer of phage at -25℃

噬菌体 Phage	处理 Treatment	效价/PFU·mL ⁻¹ Titer			
		90 d	180 d	270 d	365 d
P1	噬菌体原液 Bacteriophage suspension	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹
	噬菌体原液:青枯菌液=1:1 Bacteriophage suspension:R. <i>pseudosolanacearum</i> suspension = 1:1	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁸
	噬菌体原液:青枯菌液:40%甘油=1:1:2 Bacteriophage suspension:R. <i>pseudosolanacearum</i> suspension:40% glycerol=1:1:2	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹
	噬菌体原液:青枯菌液:80%甘油=1:1:2 Bacteriophage suspension:R. <i>pseudosolanacearum</i> suspension:80% glycerol=1:1:2	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹
	P2	噬菌体原液 Bacteriophage suspension	10 ⁹	10 ¹⁰	10 ⁹
噬菌体原液:青枯菌液=1:1 Bacteriophage suspension:R. <i>pseudosolanacearum</i> suspension = 1:1		10 ⁹	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁸
噬菌体原液:青枯菌液:40%甘油=1:1:2 Bacteriophage suspension:R. <i>pseudosolanacearum</i> suspension:40% glycerol=1:1:2		10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹
噬菌体原液:青枯菌液:80%甘油=1:1:2 Bacteriophage suspension:R. <i>pseudosolanacearum</i> suspension:80% glycerol=1:1:2		10 ¹¹	10 ⁹	10 ⁹	10 ¹⁰

续表 2 Table 2 (Continued)

噬菌体 Phage	处理 Treatment	效价/PFU·mL ⁻¹ Titer			
		90 d	180 d	270 d	365 d
P3	噬菌体原液 Bacteriophage suspension	10 ¹⁰	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁷
	噬菌体原液:青枯菌液=1:1 Bacteriophage suspension: <i>R. pseudosolanacearum</i> suspension = 1:1	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁷
	噬菌体原液:青枯菌液:40%甘油=1:1:2 Bacteriophage suspension: <i>R. pseudosolanacearum</i> suspension:40% glycerol=1:1:2	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹
	噬菌体原液:青枯菌液:80%甘油=1:1:2 Bacteriophage suspension: <i>R. pseudosolanacearum</i> suspension:80% glycerol=1:1:2	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹
	P4	噬菌体原液 Bacteriophage suspension	10 ¹⁰	10 ⁹	10 ⁹
P4	噬菌体原液:青枯菌液=1:1 Bacteriophage suspension: <i>R. pseudosolanacearum</i> suspension = 1:1	10 ⁹	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ⁹
	噬菌体原液:青枯菌液:40%甘油=1:1:2 Bacteriophage suspension: <i>R. pseudosolanacearum</i> suspension:40% glycerol=1:1:2	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ⁹
	噬菌体原液:青枯菌液:80%甘油=1:1:2 Bacteriophage suspension: <i>R. pseudosolanacearum</i> suspension:80% glycerol=1:1:2	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ⁹

表 3 4℃下不同处理对噬菌体保存效果的影响

Table 3 Influence of different treatments to the titer of phage at 4℃

噬菌体 Phage	处理 Treatment	效价/PFU·mL ⁻¹ Titer				
		90 d	180 d	270 d	365 d	
P1	噬菌体原液 Bacteriophage suspension	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	
	噬菌体原液:青枯菌液=1:1 Bacteriophage suspension: <i>R. pseudosolanacearum</i> suspension = 1:1	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁷	
	噬菌体原液:青枯菌液:40%甘油=1:1:2 Bacteriophage suspension: <i>R. pseudosolanacearum</i> suspension:40% glycerol=1:1:2	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ³	
	噬菌体原液:青枯菌液:80%甘油=1:1:2 Bacteriophage suspension: <i>R. pseudosolanacearum</i> suspension:80% glycerol=1:1:2	10 ³	0	0	0	
	P2	噬菌体原液 Bacteriophage suspension	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁷
P2	噬菌体原液:青枯菌液=1:1 Bacteriophage suspension: <i>R. pseudosolanacearum</i> suspension = 1:1	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁷	
	噬菌体原液:青枯菌液:40%甘油=1:1:2 Bacteriophage suspension: <i>R. pseudosolanacearum</i> suspension:40% glycerol=1:1:2	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	
	噬菌体原液:青枯菌液:80%甘油=1:1:2 Bacteriophage suspension: <i>R. pseudosolanacearum</i> suspension:80% glycerol=1:1:2	10 ⁴	0	0	0	
	P3	噬菌体原液 Bacteriophage suspension	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁷
	P3	噬菌体原液:青枯菌液=1:1 Bacteriophage suspension: <i>R. pseudosolanacearum</i> suspension = 1:1	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸
噬菌体原液:青枯菌液:40%甘油=1:1:2 Bacteriophage suspension: <i>R. pseudosolanacearum</i> suspension:40% glycerol=1:1:2		10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	
噬菌体原液:青枯菌液:80%甘油=1:1:2 Bacteriophage suspension: <i>R. pseudosolanacearum</i> suspension:80% glycerol=1:1:2		10 ³	0	0	0	
P4		噬菌体原液 Bacteriophage suspension	10 ¹⁰	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹
P4		噬菌体原液:青枯菌液=1:1 Bacteriophage suspension: <i>R. pseudosolanacearum</i> suspension = 1:1	10 ¹⁰	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹
	噬菌体原液:青枯菌液:40%甘油=1:1:2 Bacteriophage suspension: <i>R. pseudosolanacearum</i> suspension:40% glycerol=1:1:2	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁴	
	噬菌体原液:青枯菌液:80%甘油=1:1:2 Bacteriophage suspension: <i>R. pseudosolanacearum</i> suspension:80% glycerol=1:1:2	10 ⁴	0	0	0	

表 4 室温下不同处理对噬菌体保存效果的影响

Table 4 Influence of different treatments to the titer of phage at room temperature

噬菌体 Phage	处理 Treatment	效价/PFU·mL ⁻¹ Titer				
		90 d	180 d	270 d	365 d	
P1	噬菌体原液 Bacteriophage suspension	0	0	0	0	
	噬菌体原液:青枯菌液=1:1 Bacteriophage suspension: <i>R. pseudosolanacearum</i> suspension=1:1	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁴	0	
	噬菌体原液:青枯菌液:40%甘油=1:1:2 Bacteriophage suspension: <i>R. pseudosolanacearum</i> suspension:40% glycerol=1:1:2	0	0	0	0	
	噬菌体原液:青枯菌液:80%甘油=1:1:2 Bacteriophage suspension: <i>R. pseudosolanacearum</i> suspension:80% glycerol=1:1:2	0	0	0	0	
	P2	噬菌体原液 Bacteriophage suspension	0	0	0	0
P2	噬菌体原液:青枯菌液=1:1 Bacteriophage suspension: <i>R. pseudosolanacearum</i> suspension=1:1	10 ⁹	10 ⁸	10 ³	0	
	噬菌体原液:青枯菌液:40%甘油=1:1:2 Bacteriophage suspension: <i>R. pseudosolanacearum</i> suspension:40% glycerol=1:1:2	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁷	10 ⁷	
	噬菌体原液:青枯菌液:80%甘油=1:1:2 Bacteriophage suspension: <i>R. pseudosolanacearum</i> suspension:80% glycerol=1:1:2	0	0	0	0	
	P3	噬菌体原液 Bacteriophage suspension	10 ⁴	10 ⁴	0	0
	P3	噬菌体原液:青枯菌液=1:1 Bacteriophage suspension: <i>R. pseudosolanacearum</i> suspension=1:1	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁴	0
噬菌体原液:青枯菌液:40%甘油=1:1:2 Bacteriophage suspension: <i>R. pseudosolanacearum</i> suspension:40% glycerol=1:1:2		0	0	0	0	
噬菌体原液:青枯菌液:80%甘油=1:1:2 Bacteriophage suspension: <i>R. pseudosolanacearum</i> suspension:80% glycerol=1:1:2		0	0	0	0	
P4		噬菌体原液 Bacteriophage suspension	10 ⁶	10 ⁴	10 ²	0
P4		噬菌体原液:青枯菌液=1:1 Bacteriophage suspension: <i>R. pseudosolanacearum</i> suspension=1:1	10 ⁹	10 ⁸	10 ³	0
	噬菌体原液:青枯菌液:40%甘油=1:1:2 Bacteriophage suspension: <i>R. pseudosolanacearum</i> suspension:40% glycerol=1:1:2	0	0	0	0	
	噬菌体原液:青枯菌液:80%甘油=1:1:2 Bacteriophage suspension: <i>R. pseudosolanacearum</i> suspension:80% glycerol=1:1:2	0	0	0	0	

3 讨论

噬菌体的保存方法已有报道,主要集中在对动物病原细菌噬菌体的保存,常见的有噬菌体原液或噬菌体原液加入甘油、DMSO 等保护剂,于室温、4℃、冻干、-75℃或液氮保存^[7,11-19],但噬菌体不同,效果也不同。如李陇平等^[18]报道金黄色葡萄球菌烈性噬菌体加入 7% DMSO, -80℃冷藏 3 个月,效价与初始效价保持同一个指数级;黎尔纳等^[19]报道 3 株木糖氧化无色杆菌噬菌体原液加入甘油或 DMSO 后,于 -80℃、-20℃和 4℃保存 16 个月后,其中 2 株的效价能稳定在初始状态,1 株的效价降低 1 个数量级。本研究结果与前人的研究结果相似,供试的 4 株噬菌体同法同温保存,但效果不同,如采用噬菌体原液:青枯菌液:80%甘油=1:1:2 方法 -75℃保存 365 d,噬菌体 P3 株系的效价下降 2 个数量级,而噬菌体 P1、P2 和 P4 株系的效价稳定

在初始状态;采用噬菌体原液室温保存,90 d 后噬菌体 P1 和 P2 株系全部失活,270 d 后噬菌体 P3 株系全部失活,而噬菌体 P4 株系仍有活性。

Golec 等^[20]报道, -80℃下有尾噬菌体储存于宿主体内,不会影响噬菌体和宿主的生存能力;高苗^[11]报道噬菌体原液+20%甘油室温和 4℃保存 6 个月后均检测不到噬菌斑。本研究结果显示,室温和 4℃下添加宿主可提升保存效果,添加甘油反而不利;低温下(-75℃和 -25℃)添加宿主对噬菌体的保存效果影响不大,但添加甘油可提升保存效果。室温下,噬菌体原液:青枯菌液=1:1 保存 180 d,效价下降 1~2 个数量级,而噬菌体原液保存的效价下降了 6 个数量级或全部失活;另外,添加甘油处理的噬菌体 90 d 后全部失活(噬菌体 P2 株系除外);-75℃和 -25℃下,添加甘油处理的保存 365 d,噬菌体效价降幅最大的仅 2 个数量级。由于噬菌体是一种寄生于活体细胞内的非细胞生物,一旦离开寄主就不

能独立新陈代谢,但低温可降低其新陈代谢,保持活性,因此低温可提高噬菌体的保存效果;室温下,由于噬菌体的代谢活动正常,需要充足的宿主,因此添加宿主有利于噬菌体保持活性,若添加甘油,宿主受甘油保护,噬菌体的侵染几率下降或完全不能侵入,导致效价下降。

综上所述,噬菌体原液:青枯菌液=1:1处理在4种温度下保存都能保持较高的活性,尤其是室温保存180 d后,噬菌体效价仅下降1~2个数量级,保存270 d后噬菌体仍有较高的活性。该方法不需要添加保护剂,不受试验条件限制,可为今后噬菌体制剂的生产及应用提供参考依据,是青枯菌噬菌体最简单可行的保存方法。另外,无论何种处理,-75℃和-25℃的保存效果都表现最好,可长期保存噬菌体。

参考文献

- [1] TWORT F W. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses [J]. *The Lancet*, 1915, 2(4814): 1241-1243.
- [2] D'HERELLE F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques [J]. *Comptes Rendus de L'Académie des Sciences de Paris*, 1917, 165: 373-375.
- [3] BREITBART M, ROHWER F. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? [J]. *Trends in Microbiology*, 2005, 13(6): 278-284.
- [4] VOS M, BIRKETT P J, BIRCH E, et al. Local adaptation of bacteriophages to their bacterial hosts in soil [J]. *Science*, 2009, 325(14): 833.
- [5] 苏靖芳, 于浩, 刘俊杰, 等. 青枯雷尔氏菌噬菌体研究进展[J]. *土壤与作物*, 2017, 6(1): 61-66.
- [6] 蔡刘体, 汪汉成, 袁赛飞, 等. 青枯菌特异性噬菌体的研究进展与应用[J]. *生物技术通讯*, 2012, 23(6): 887-890.
- [7] JOŃ CZYK E, KŁAK M, MIEDZBYBRODZKI R, et al. The influence of external factors on bacteriophages review [J]. *Folia Microbiologica*, 2011, 56(3): 191-200.
- [8] ACKERMANN H W, TREMBLAY D, MOINEAU S. Long-term bacteriophage preservation [J]. *World Federation for Culture Collections Newsletter*, 2004, 38: 35-40.
- [9] 王绍花. 乳杆菌噬菌体的分离、功能基因表达及抗噬菌体菌株的选育[D]. 济南: 山东大学, 2010: 39-41.
- [10] 于美玲. 两株乳杆菌噬菌体的分离鉴定及抗噬菌体菌株的筛选[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2015: 38.
- [11] 高苗. 青枯雷尔氏菌噬菌体的分离鉴定及应用研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2015: 11-12.
- [12] 许维素, 宋增福, 陈彪. 一种噬菌体的保存方法: CN105950570A [P]. 2016-09-21.
- [13] 王国治, 彭丽, 陈保文, 等. 一种分枝杆菌噬菌体的保存方法: CN101302498[P]. 2008-11-12.
- [14] WAGNER N, BRINKS E, SAMTLEBE M, et al. Whey powders are a rich source and excellent storage matrix for dairy bacteriophages [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 241: 308-317.
- [15] PUAPERMPOONSIRI U, FORD S J, VAN DER WALLE C F. Stabilization of bacteriophage during freeze drying [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010, 389(1/2): 168-175.
- [16] DINI C, URRAZA P J D. Effect of buffer systems and disaccharides concentration on *Podoviridae* coliphage stability during freeze drying and storage [J]. *Cryobiology*, 2013, 66(3): 339-342.
- [17] 金晓琳, 张克斌, 胡福泉. 噬菌体最佳保存方法探讨[J]. *第三军医大学学报*, 2001, 23(7): 863-864.
- [18] 李陇平, 张智英. 金黄色葡萄球菌烈性噬菌体的分离鉴定和最佳保存方法研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2011, 38(6): 141-146.
- [19] 黎尔纳, 马艳艳, 程伟伟, 等. 3株木糖氧化无色杆菌烈性噬菌体的最佳保存方法研究[J]. *军事医学*, 2016, 40(10): 814-818.
- [20] GOLEC P, DABROWSKI K, HEJNOWICZ M S, et al. A reliable method for storage of tailed phages [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, 84(3): 486-489.
- (责任编辑: 田 喆)
- (上接 127 页)
- [17] 周晓榕, 韩凤阳, 昊翔, 等. 变温和恒温对沙葱萤叶甲发育速率的影响[J]. *环境昆虫学报*, 2016, 38(5): 931-935.
- [18] 潘飞, 陈绵才, 肖彤斌, 等. 变温对昆虫生长发育和繁殖影响的研究进展[J]. *环境昆虫学报*, 2014, 36(2): 240-246.
- [19] LI Boliang, XU Xiangli, JI Jiayue. Effects of constant and stage-specific-alternating temperature on the survival, development and reproduction of the oriental armyworm, *Mythimna separata* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2018, 17(7): 1545-1555.
- [20] 黄林茂, 黄寿山. 黑肩绿盲蝽捕食褐飞虱卵的功能与数值反应[J]. *生态学报*, 2010, 30(15): 4187-4195.
- [21] 丁岩钦. 昆虫数学生态学[M]. 北京: 科学出版社, 1994: 257-258, 303-304.
- [22] 唐艺婷, 王孟卿, 陈红印, 等. 益蝽对草地贪夜蛾高龄幼虫的捕食能力评价和捕食行为观察[J]. *中国生物防治学报*, 2019, 35(5): 698-703.
- [23] 蒋兴川, 桂富荣, 陈斌, 等. 南方小花蝽在不同试验空间对西花蓟马的捕食及搜寻效应[J]. *生物安全学报*, 2012, 21(1): 20-26.
- [24] 陈雪梅, 谷星慧, 洗继东, 等. 叉角厉蝽对烟草上斜纹夜蛾搜索效率影响因子的研究[J]. *环境昆虫学报*, 2021, 43(1): 224-232.
- (责任编辑: 杨明丽)