

红霉素链霉菌抗噬菌体菌株的选育*

张筱玉 俞学琴 胡树藩 徐育仁 叶爱琴

(上海第三制药厂, 上海)

在红霉素生产过程中, 曾多次出现噬菌体的感染。我们从被感染的发酵自溶液中分离出 7 株噬菌体, 并用电子显微镜观察了 P_1 、 P_3 、 P_6 的形态。

以不同类型的噬菌体选育出抗噬菌体菌株, 其中一些抗性菌株的抗菌素产量, 比敏感的发出发菌株高, 曾先后用于生产。用噬菌体处理得到的抗性菌株的产量, 比用物理或化学诱变因素处理得到的菌株提高幅度大。

抗菌素生产中, 首先是在链霉素的发酵中发现放线菌噬菌体的感染, 从自溶的发酵液中分离出灰色链霉菌的噬菌体, 并用该噬菌体选育得到抗该噬菌体的菌株^[1]。Раугенштейн 等^[2-3] 在红霉素链霉菌的培育过程中, 发现了红霉素链霉菌噬菌体, 并用电子显微镜观察了它们的形态。Kurylowicz 等^[4] 从红霉素发酵自溶液中分离到一株噬菌体, 用此噬菌体选育得到的抗性菌株, 与敏感菌株的抗菌素产量相似。金霉素链霉菌和利福霉素产生菌地中海链霉菌亦有噬菌体感染的报导^[5,6]。

在抗菌素工业生产中经常会出现噬菌体的危害, 虽然曾试图改进培养基的成分或改善环境条件, 以控制噬菌体的感染, 但较为经济有效的办法还是选育抗噬菌体的菌株。我厂在红霉素生产过程中, 曾先后多次出现噬菌体危害, 从感染的发酵液中, 分离出不同类型的红霉素链霉菌噬菌体, 并以不同类型的噬菌体选育抗噬菌体菌株, 得到比敏感菌产量提高的抗性菌株, 并用于生产。

材料和方法

一、菌株

红霉素链霉菌 (*Streptomyces erythreus*) P³²-

102^[7], 由上海医药工业研究院提供。

二、培养基

1. 斜面培养基 玉米浆 1.0% (湿重), 淀粉 1%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.3%, NaCl 0.3%, $CaCO_3$ 0.25%, 琼脂 2.2%, pH 7.0—7.2。

2. 种子培养基 黄豆饼粉 1.5%, 淀粉 4.0%, 糊精 2.0%, 葡萄糖 1.0%, 蛋白胨 0.5%, NaCl 0.4%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.25%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.025%, KH_2PO_4 0.02%, $CaCO_3$ 0.6%, pH 7.8—8.0。

3. 发酵培养基 黄豆饼粉 3.5%, 葡萄糖 3.0%, 淀粉 4.0%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, KH_2PO_4 0.025%, $CaCO_3$ 0.6%, 自然 pH (pH 7.0 左右)。前体: 丙醇 1%, 当种子培养液接入发酵培养基时一次加入。

斜面孢子接入种子培养基后, 置于旋转式摇床培养 52 小时左右, 以 8% 接种量接入发酵培养基, 再置于旋转式摇床培养 7 天, 培养温度均为 28℃, 然后采用生物检定法测定效价。检定菌为金黄八叠球菌 (*Sarcina aurescens*) PC 1001。

三、噬菌体

从红霉素发酵自溶液中分离出的红霉素链霉菌噬菌体。噬菌体试验用培养基:

1. 底层培养基 肉膏 0.3%, 蛋白胨 1.0%, NaCl 0.5%, 琼脂 2.2%, pH 7.1。

* 承复旦大学生物系电子显微镜室多次拍摄红霉素链霉菌的噬菌体照片, 特此表示感谢。

本文 1973 年 8 月 7 日收到。

2. 上层培养基 淀粉 1.0%, 蛋白胨 0.2%, NaCl 0.1%, NaNO_3 0.1%, K_2HPO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, FeSO_4 0.001%, 琼脂 1.0%, pH 7.8—8.0。

四、抗性菌株的选育方法

1. 噬菌体双层琼脂法 平皿上加入100个左右噬菌体, 被测菌株用培养48小时的培养液。平皿于37℃培养24—48小时, 如无噬菌斑出现, 则初步证明此菌株对该噬菌体具有抗性。进一步在液体培养过程中加入噬菌体, 如菌丝体生长正常, 对红霉素发酵无影响, 说明此菌株对该噬菌体具有抗性。

2. 紫外线(UV) 波长2537 Å, 功率30瓦, 将单孢子悬液置紫外灯下30厘米处照射, 并往复摇动。

3. Co^{60} γ-射线、X射线 将单孢子悬液封于小安瓿管内照射。 Co^{60} 为5万伦琴, X射线为5千伦琴。

4. 氮芥(NM) 氮芥盐酸盐以碳酸氢钠活化, 作用浓度为1毫克/毫升, 作用一定时间后用解毒剂(100毫升蒸馏水中含碳酸氢钠68毫克及甘氨酸60毫克)中止作用。

5. 乙烯亚胺(EI) 单孢子悬液在1:5000浓度下作用一定时间后, 以稀释法中止作用。

6. N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG) 以pH 6磷酸缓冲液配制MNNG溶液。将单孢子悬液与MNNG溶液混合, 作用浓度为100微克/毫升, 在28℃恒温摇床处理一定时间。

经上述诱变因素处理后的孢子悬液, 稀释后在平皿涂布, 置37℃培养, 待菌落生长成熟后, 挑选部分菌落接种斜面进行摇瓶筛选。

实验结果

一、噬菌体的分离及形态观察

在红霉素发酵过程中, 多次出现发酵液在几小时内突然变稀, 镜检发现菌丝体自溶, 氨基氮上升, pH上升, 可能此现象系噬菌体感染所致。取变稀的发酵液, 离心, 上清液再经赛氏滤器过滤, 得无菌滤液。以此无菌滤液稀释, 利用双层琼脂法观察有噬菌斑出现, 证明发酵液变稀确系由噬

菌体感染所致。由噬菌斑的数目计算噬菌体的效价。从发酵液内分离的噬菌体, 一般可达到 10^{10} P. E. U./毫升以上。分离得到的噬菌体置4℃冰箱保存。

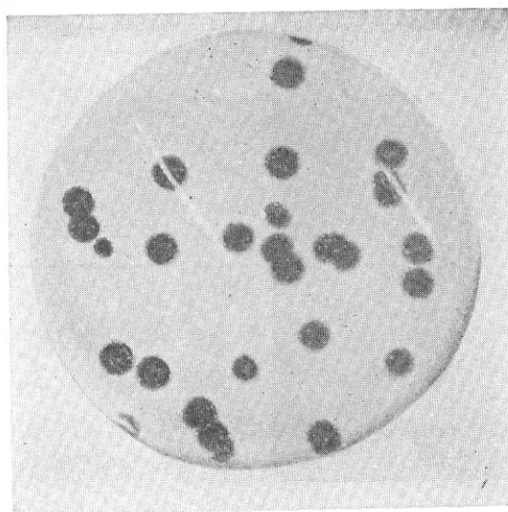
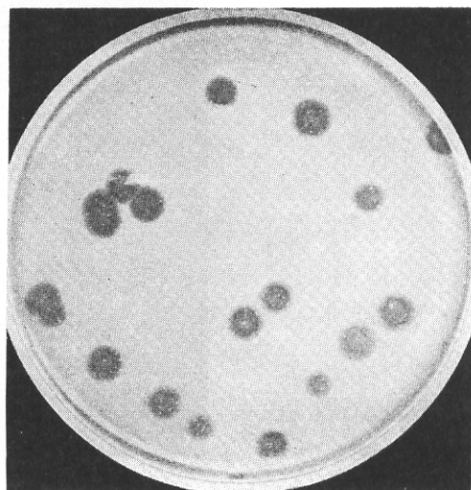
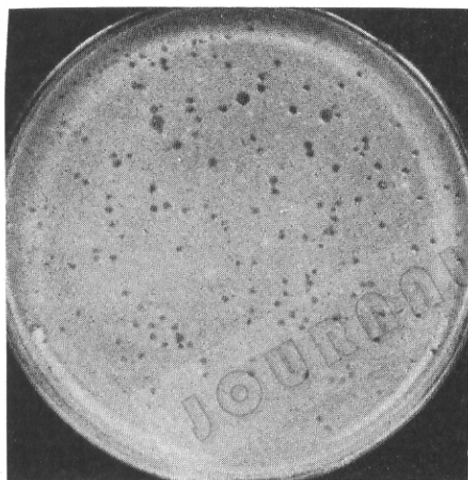
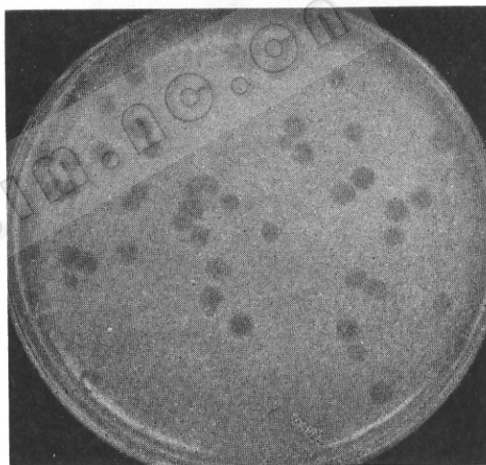
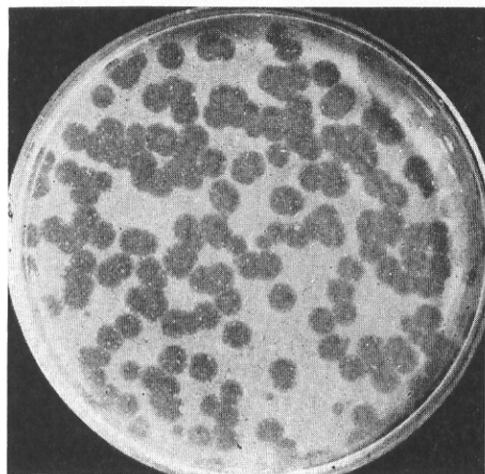
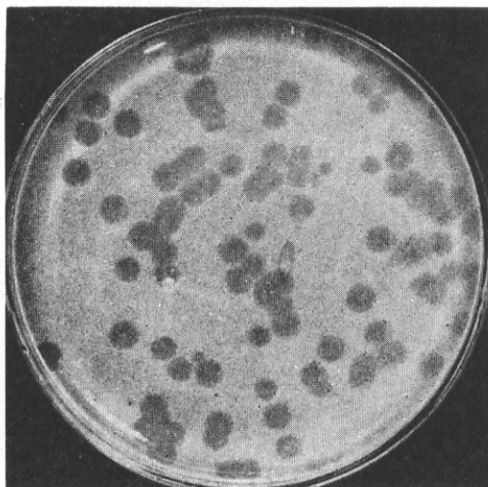
在红霉素生产过程中, 自1966年以来先后出现过八次噬菌体的感染。分离的噬菌体编号分别为 P_1 、 P_2 、 P_3 、 P_4 、 P_5 、 P_6 、 P_7 、 P_8 (图1)。根据噬菌斑的形态, 可分为 P_1 、 P_3 、 P_5 、 P_6 、 P_7 的噬菌斑大、清晰透明; P_4 、 P_8 的噬菌斑小、呈半透明, 其中有少量透明斑。(P₂噬菌体未保留)。历次出现的噬菌体列于表1。

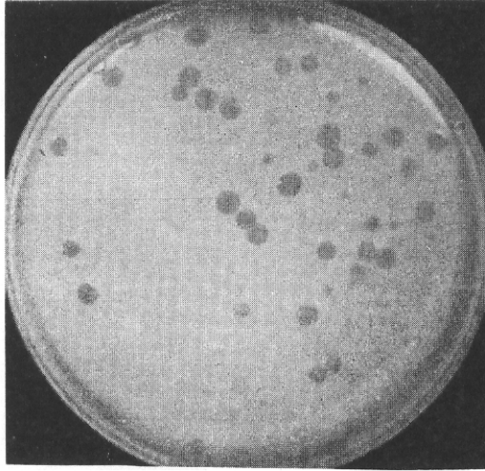
表1 噬菌体编号及分离菌株

噬菌体编号	分离菌株
P_1	P^{32} -102
P_2	P^{32} -102
P_3	2-67
P_4	2-62
P_5	U-67, 2-62
P_6	U-67
P_7	4-88
P_8	3-81

以 P^{32} -102菌株为指示菌, 用双层琼脂法比较历次噬菌体的噬菌斑形态, 如图1所示。 P_4 噬菌体形成噬菌斑的时间较其他噬菌体要迟8—12小时。

将噬菌体培养液点在带有支持膜的铜网上, 以少量33—36%甲醛(铜网放在双碟内, 甲醛放在双碟内的另一小容器内), 在40—50℃的烘箱中烘干与固定10—15分钟, 然后以2%磷钨酸负染色, 干后镜检。用电子显微镜DXA₃-8观察, P_1 、 P_3 、 P_6 的形态基本相似, 大小有些差异, 如表2和图2所示。 P_4 、 P_5 、 P_7 和 P_8 的电子显微镜观察正在进行中。关于噬菌体的血清分型也正在试验。

P₁P₃P₄P₅P₆P₇

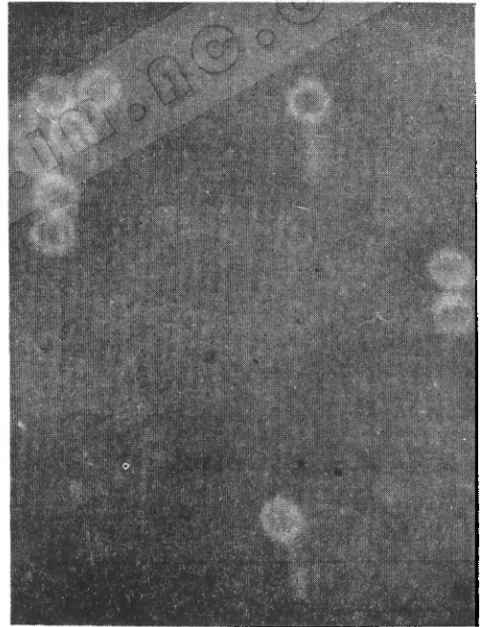


P₈

图1 生产上历次发生的红霉素链霉菌噬菌体的噬菌斑形态
(P₁、P₃、P₄、P₅、P₆、P₇、P₈)



P₁ ×100000



P₃ ×100000



P₆ ×100000

图2 红霉素链霉菌噬菌体 P₁、P₃、P₆ 的形态

表 2 P₁、P₃、P₆ 噬菌体的大小

噬菌体编号	噬菌体大小 (Å)	
	头 部	尾 部
P ₁	555	1222
P ₃	413	740
P ₆	500	888

二、抗噬菌体菌株的选育

抗噬菌体菌株的选育效果曾用下列三种方法进行比较。

(1) 红霉素链霉菌孢子先经紫外线诱变,然后将此处理液涂布在含有 0.2 毫升效价为 10⁷/毫升噬菌体的平皿培养基上,如存在抗性突变菌株,就能在此平皿上生长。

(2) 红霉菌孢子接入种子培养基,待生长 48 小时后加入效价为 10⁹/毫升以上的噬菌体 1 毫升,继续培养,红霉素链霉菌菌丝体自溶,培养液变稀,定时取样涂布平皿培养,都没有菌落出现。再继续培养至再生菌丝体出现,然后进行平皿分离,挑选菌落,筛选抗性菌株。

(3) 红霉素链霉菌孢子先经紫外线诱变,再接入种子培养基,待生长 48 小时后加入 10⁹/毫升噬菌体 1 毫升,继续培养,培养液变稀,再生菌丝体出现后,再加噬菌体反复感染,培养一定时间后进行平皿分离,从中筛选抗性菌株。

结果指出,第一种方法获得高产抗性菌株的机率很小。曾以 P³²-102 菌株的单孢子悬液,经紫外线照射 30、60 秒,在所分离的处理液中,得到 81 号菌株,稍具有

抗性,而产量比 P³²-102 菌株低。有的菌株虽具有抗性,但几乎不产生红霉素。第二种方法,再生菌丝体出现的时间比第一种处理方法的时间长。从再生菌丝体分离出来的菌株,大部分不具有抗性,而且生产能力比原种低,例如,用此法得到的 59 号菌株发酵水平为 1600—2000 微克/毫升。第三种方法分离的菌落形态变异大,正常型菌落少,获得抗性菌株多,其中有的菌株生产能力与原种相仿,有的菌株则有提高。经摇瓶初筛、复筛得到的 U-27、U-67 菌株,产量比 P³²-102 略高,曾用于生产。

P₃噬菌体对红霉素链霉菌的危害大,在选育抗 P₃的菌株时,我们以 P₃噬菌体 1 毫升(10⁹/毫升)与 U-67 菌株的孢子同时接种于 40 加仑种子罐通气培养,培养三天后出现少量菌丝体。取此培养液接种斜面,并在斜面上再涂以 P₃,待菌落的孢子成熟后,进行单孢子平皿分离,再挑选部分菌落接斜面,进行摇瓶初筛。在筛选的 80 株菌株中,对 P₃均具有抗性,其中以 2-62 菌株的效价较高。

P₄噬菌体是在 2-62 菌株试生产过程中出现的。P₄噬菌体大部分为噬菌斑小、半透明,有少量透明斑。我们以 P₄噬菌体中的半透明及透明噬菌斑分别处理 2-62 菌株。2-62 菌株经半透明噬菌斑的噬菌体处理出现的菌落变异类型多,形态与原种的差别大。经噬菌斑透明的噬菌体处理后,出现形态变异率也高,但菌落变异类型比前者少。结果见表 3。

表 3 P₄噬菌体对 2-62 菌株引起的形态变异

P ₄ 噬菌体	菌落类型	观察菌落数	梅花型	馒头型	弱孢子型*	盆型	不育型	正常型	变异菌落数	变异率 (%)
噬菌斑半透明的噬菌体		706	82	11	537	41	—	35	671	95.4
噬菌斑透明的噬菌体		230	—	2	226	—	1	1	229	99.5

* 弱孢子型与梅花型的形态相似,但孢子量少。

将不同类型的单菌落进行摇瓶初筛,我们发现平皿上呈梅花型或馒头型的菌落,孢子都较丰富。但接种斜面后,在下代中有部分菌株在斜面上形成的孢子却很少,营养菌丝色深,这些菌株的效价也都比较低;而孢子丰富、营养菌丝色淡的菌株效价则较高。从半透明噬菌斑的噬菌体处理得到 2-62T₂₆;从透明噬菌斑的噬菌体处理得到 2-62R₃, 这些菌株对 P₄ 都具有抗性。

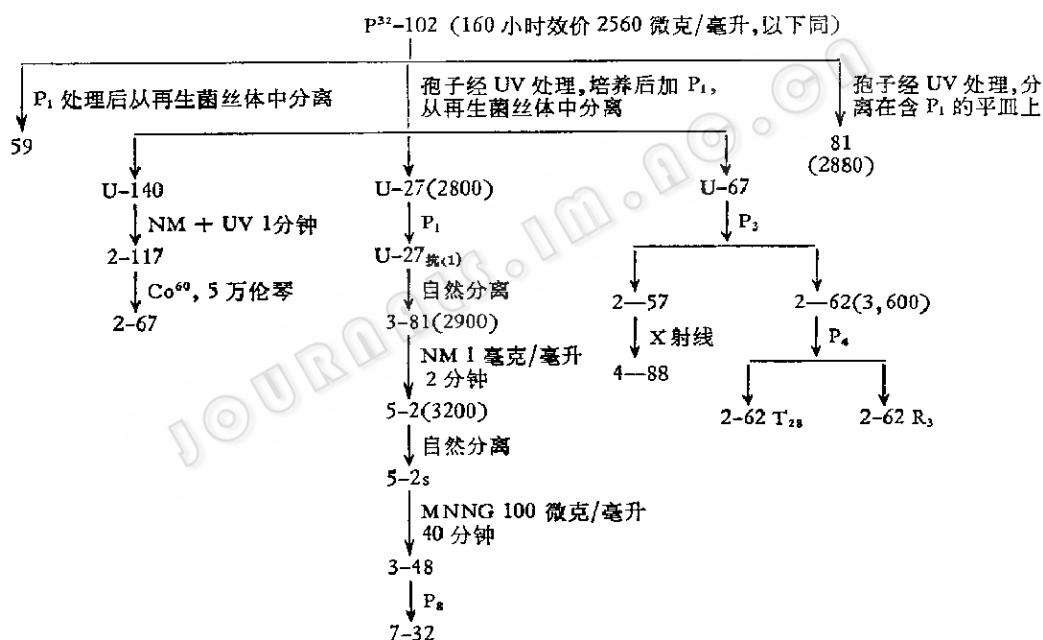
选育抗 P₈ 噬菌体的菌株时,用 P₈ 噬菌体与 3-48 菌株充分混合后接种在斜面上,

长出 2 个菌落,将这两个菌落传代,分别再与 P₈ 接触,并作平皿分离。分离的单菌落经摇瓶发酵初筛,并以种子培养液用双层琼脂法测定抗性,这些菌株对 P₈ 噬菌体均具有抗性,其中 7-32 菌株经摇瓶试验,产量比 3-48 菌株提高 5—10%。

三、红霉素产生菌抗性菌株的选育系谱及抗性比较

以 P³²-102 菌株为原始出发菌株,利用物理、化学诱变因素及噬菌体的交替处理,通过多次选育的菌株系谱如下。

红霉素产生菌抗性菌株选育系谱



经多次试验结果指出,以噬菌体处理所得到的抗性菌株的产量,比用物理或化学诱变因素处理所得到的菌株提高幅度大。如产量提高的 U-27、U-67、2-62、7-32 等菌株,就是分别用 P₁、P₄、P₈ 等噬菌体处理后得到的。

我们对系谱中的菌株作了抗噬菌体能力的比较,将分离的 7 株噬菌体稀释至一定浓度,每一平皿内加入噬菌体约 100 个左右,采用双层琼脂法,37℃ 培养,观察

有无噬菌斑出现,结果如表 4。

讨 论

抗噬菌体菌株的选育,对于用放线菌或细菌生产的发酵工业是很重要的。目前对抗噬菌体菌株的抗性获得存在不同的看法。有的认为抗噬菌体的突变菌株一般不需经诱变剂处理,而是由微生物的自发突变产生的,而噬菌体本身仅起到筛选作用,把未经发生突变的菌株裂解掉,筛出抗性

表4 红霉素产生菌抗性菌株抗噬菌体能力的比较

噬菌体编号 菌株编号	P ₁	P ₃	P ₄	P ₅	P ₆	P ₇	P ₈
P ³² -102	+	+	+	+	+	+	+
U-140	+	+	+	+	+	+	+
U-27	-	-	+	+	+	-	
U-67	-	+	+	+	+	+	
2-117	+	+	+	+	+	+	
2-67	+	+	+	+	+	+	
2-62	+	-	-	+	+	+	+
2-57	+	-	+	+	+	+	
3-81	-	-	+	+	-	-	+
5-2	-	-	+	-	-	-	+
5-2s	-	-	+	-	-	-	+
3-48		-	+				+
7-32	+	-	-	-	+	+	-
2-62 T ₂₈		-	-				
2-62 R ₃		-	-				

注: + 出现噬菌斑; - 无噬菌斑出现。

菌株。Torosjan^[8]用诱变剂处理红霉素链霉菌,使它与噬菌体接触,获得了抗噬菌体的菌株,认为这种抗性突变与噬菌体的存在无关。Alikhanian等^[9]利用放线菌噬菌体选育链霉菌、红霉素链霉菌和夹竹桃霉菌,观察到显著的诱变效应,经噬菌体处理过的菌株抗菌素产量有明显的变异。Ильина等^[10]曾从红霉素链霉菌ЛСЭ-2577发酵过程中分离出一烈性噬菌体“CB”,由此噬菌体选育得的抗性菌株产量都降低,最高的也只有原株的50%;当用温和性噬菌体No. 121处理,得到的抗性菌株产量不降低,而与原株相似。

在我厂红霉素生产过程中出现的八次噬菌体危害中,大部分噬菌体的噬菌斑大而清晰透明。红霉素链霉菌被感染后,在几小时至十几小时内细胞即被完全裂解,释放出大量的噬菌体。而P₄和P₈噬菌体对寄主细胞作用表现不同,感染寄主细胞后,在寄主细胞内潜伏较长的时间,因而在平皿上出现噬菌斑的时间较前者要长,噬

菌斑小而呈半透明。同时在液体培养中对寄主细胞所引起的裂解弱,因而制备时效价不易提高。

在我们选育抗噬菌体菌株的试验中,敏感菌株经不同噬菌体处理后有三种表现:1.部分菌株获得抗性;2.抗菌素产量表现出不同变异范围,得到比原种提高的变异菌株;3.形态变异频率大,较化学的或物理的诱变因素显著,其中尤以用P₄噬菌体处理的结果最明显。P₄噬菌体中有两种噬菌斑,2-62菌株经P₄噬菌体处理后出现的形态变异率都在90%以上。

在诱变育种及噬菌体的处理筛选得到的菌株中,U-27菌株对P₁、P₃、P₇具有抗性;3-81菌株对P₁、P₃、P₆、P₇具有抗性;5-2菌株对P₁、P₃、P₅、P₆、P₇具有抗性;7-32菌株对P₃、P₄、P₅、P₈具有抗性,对P₃的抗性最强;2-62T₂₈、2-62R₃菌株对P₃、P₄具有抗性。这种抗性是由于噬菌体侵入红霉素链霉菌后,使其溶源化,表现出对同源噬菌体感染的免疫性?抑是由于噬菌体不能在菌体表面吸附所表现的真正抗性?有待进一步证明。对P₅、P₆、P₇的抗性表现稍差,有时亦会出现少量的噬菌斑,但在液体培养中裂解能力弱。

在选育抗性菌株的过程中,变株除具有抗性的变异外,产生红霉素的量也逐步提高,这一现象不仅具有实践意义,其遗传学机制也是值得探讨的。

经电子显微镜观察,P₁、P₃、P₆噬菌体形态基本上相似,均具有一个六角形的头部和一可以弯曲的尾部,但在大小上有些差异。

参 考 资 料

- [1] Carvajal, F.: *Mycologia*, 45:209, 1953.
- [2] Раугенштейн, Я. И., и т. д.: *Микробиология*, 31:49, 1962.
- [3] Раугенштейн, Я. И. и Ретинская, В. И.:

- Микробиология*, 32:642, 1963.
- [4] Kurylowicz, W. et al.: *Med. Dosw. Mikrobiol.*, 22:303, 1970.
- [5] Weindling, R. et al.: *Nature*, 189:603, 1961.
- [6] Thiemann, J. E. et al.: *Nature*, 193:1104, 1962.
- [7] 俞定安、郑丽君: 全国第三次抗菌素学术会议论文集, 第二册, 抗菌素生产工艺, 70 页, 1965.
- [8] Torosjan, M. V.: *Genetics (USSR)*, 5:123, 1966.
- [9] Alikhanian, S. I.: *Advan. Appl. Microbiol.*, 4:1—48, 1962.
- [10] Ильина, Т. С. и Жбанов, В. Г.: *Микробиология*, 33:516, 1964.

SELECTION OF PHAGE-RESISTANT STRAINS IN *STREPTOMYCES ERYTHREUS*

CHANG SHIAO-YU, YU HSUEH-CHIN, HU SHU-FAN,

HSU YU-JEN AND YEH AI-CHIN

(The Shanghai No. 3 Pharmaceutical Plant, Shanghai)

Phage contamination frequently occurs during erythromycin fermentation. From the contamination broth, seven strains of phage were isolated, and three of these (P_1 , P_2 and P_3) have been examined by electron microscope.

Phage resistant strains of *Streptomy-*

ces erythreus were obtained in this study, and some of these produced more erythromycin than the phage-sensitive strains. Since then, successive phage-resistant strains have been made in the large scale production of erythromycin in our plant.