

万古霉素产生菌抗噬菌体突变株的选育

胡瑜君 王秀英 李英厚 张登科

(华北制药厂, 石家庄)

在万古霉素的生产过程中, 发现菌丝体突然自溶, 经噬菌斑检查, 证明是噬菌体侵染所引起的。用噬菌体或噬菌体、紫外线复合处理敏感菌株东方链霉菌 (*Streptomyces orientalis*) 3746, 得到抗噬菌体突变株 72-4-863、72-5-1077 和 72-6-1306, 产万古霉素的单位也较敏感株 3746 提高 500—1000 单位/毫升。

万古霉素 (vancomycin) 是由东方链霉菌 (*Streptomyces orientalis*) 产生的酸碱兼性抗菌素, 对许多革兰氏阳性病菌的感染有显著疗效。如对耐药性金黄色葡萄球菌感染之败血症、肺炎、脓胸、骨髓炎、心内膜炎、肠炎、皮肤及细胞组织感染, 对溶血链球菌引起的败血症, 肺炎双球菌引起的肺炎、肺脓肿均有显著疗效。

我们在万古霉素生产过程中, 种子罐培养 18—24 小时后, 菌丝体常常突然出现溶菌现象。发酵罐也发生过培养早期菌丝体的溶菌, 并且氨氮回升, pH 升高, 万古霉素的单位不再提高或者下降, 发酵液不易过滤等。根据这些现象, 我们认为可能是噬菌体侵染引起的。Smith, R. M. 等^[1]在保存的链霉菌菌种和发酵罐中曾发现了链霉菌的噬菌体, Раутенштейн, Я. И.^[2]曾提到噬菌体出现在许多生产部门中, 使生产过程受到严重的破坏。我们对溶菌的种子液、发酵液、进入发酵罐的无菌空气, 以及有关生产设备周围的空气, 进行了噬菌体检查试验, 在所测定的样品平皿中都出现了噬菌斑。因之证明了菌丝体的溶菌现象, 是由于噬菌体的侵染所引起的。

对于噬菌体的防治, 我们虽然也采取了一些措施, 如用酚、漂白粉、甲醛等消毒

剂, 对生产设备的周围进行消毒, 或缩短发酵周期, 来维持生产的进行, 但还不能较好地解决问题。毛主席教导我们: “矛盾的主要和非主要的方面互相转化着, 事物的性质也就随着起变化”。与其他防治方法相比较, 选育抗噬菌体的突变株, 使敏感菌转化成抗性菌, 是防治噬菌体侵染的一项较为有效的措施。本文介绍万古霉素产生菌抗噬菌体突变株的选育。

材料与方法

一、菌种

敏感菌种东方链霉菌 (*Streptomyces orientalis*) 3746 (简称 3746)。

二、培养基

(一) 肉汤培养基 (增殖噬菌体用) 浓缩液 10%, 蒸馏水 90%, 葡萄糖 0.5%, 灭菌前 pH 7.6 (浓缩液配方: 蛋白胨 10%, 氯化钠 5%, 牛肉膏 3%)。

(二) 鉴别抗性用固体培养基 肉膏 0.3%, 蛋白胨 1%, 葡萄糖 0.5%, 氯化钠 0.5%, 琼脂 2%, 消毒后 pH 7.2—7.4。

(三) 培养东方链霉菌培养基 即为常规培养东方链霉菌使用的斜面、种子、发酵培养基。万古霉素的效价采用微生物法测定, 检定菌为芽孢杆菌 (*Bacillus mycoides*) HB-2。

本文于 1973 年 7 月 8 日收到。

三、抗噬菌体突变株的筛选

(一)噬菌体的增殖 增殖方法系一般常规使用的方法,噬菌体效价一般控制在 10^7 — 10^8 单位/毫升*,保存于 4°C 冰箱中。

(二)出发菌株的选择 在进行抗噬菌体突变选育前,先对敏感的出发菌株进行选择,挑选产万古霉素能力较高的菌株作为出发菌株,敏感菌株 3746 在未经噬菌体处理前,先进行一次自然分离,或者进行三次自然分离后,又进行一次 Co^{60} 处理,挑出产生万古霉素的效价高于敏感菌株者,作为出发菌株。第三种则直接进行处理。

(三)处理方法

1. 噬菌体处理 将培养 9 天的 3746 斜面孢子,制备成浓度为 10^5 个/毫升左右的单孢子悬液。按孢子液浓度与噬菌体效价为 1:100 以上的比例,加入东方链霉菌固体培养基上,用玻璃刮棒涂匀, 30°C 培养 12 至 14 天观察。如有少数菌落形成,这些少数的菌落,可能具有抗性。

2. 紫外线与噬菌体复合处理 紫外灯的功率 30 瓦,波长 2537 \AA 。取 3746 的单孢子悬液 5 毫升,置于平皿中,距离紫外灯 66 厘米处振荡照射 60—90 秒,将照射液放置 37°C 恒温室 3 小时。取未稀释的处理孢子液与噬菌体液原液各 0.1 毫升,加入平皿中。还设想将处理液接种在含有万古霉素的固体平皿上,可能会对提高单位有益。因之同时以同样的处理将噬菌体液和经紫外线处理的孢子液,接种在含有 1000 微克/毫升万古霉素的固体平皿上,涂匀,置 30°C 培养 12 至 14 天后观察。如有个别菌落生长,它们对噬菌体可能具有抗性。

(四)斜面复筛 将经上述二种方法处理后在平皿上长出的菌落,用接种环分别挑取一环,接种到加有 0.1 毫升噬菌体液 (10^7 单位/毫升)的斜面上,培养 9—10 天,如果斜面上不出现噬菌斑,长出一片雪白的孢子,而对照在含同样量噬菌体液斜面上,培养后出现噬菌斑,甚至不长菌落,初步认为前者具有抗性。

(五)摇瓶复筛

1. 250 毫升摇瓶复筛 将斜面复筛时选出有抗性的斜面孢子,用无菌不锈钢铲挖一小块,接种到发酵摇瓶(摇瓶装量 40 毫升/250 毫升三角瓶),接种前每瓶加 10^7 单位/毫升噬菌体液 0.1 毫升,在摇床的同一层放有敏感菌加噬菌体液和

不加噬菌体液的各三瓶,作为对照,置 30°C 恒温室转速 220 转/分的摇床上振荡培养 144—168 小时,取样测万古霉素效价,如果测定的突变株的发酵单位不受影响,而对照受影响,则认为前者是具有抗性。如果在试验中观察到有抗性突变株的效价高于对照菌株时,从生产实践考虑,便将这些抗性突变株的原始斜面制备沙土孢子留种,并进一步进行研究。

2. 500 毫升摇瓶复筛 将上述制备的沙土孢子接种斜面,培养 9—10 天,用无菌不锈钢铲挖取斜面的 $1/4$,接种到母瓶(装量 100 毫升/750 毫升)中,在 30°C 恒温室振荡培养 24—48 小时,移种到加有 10^7 单位/毫升噬菌体 0.2 毫升的发酵摇瓶(装量 50 毫升/500 毫升)中,接种量为 5%。每组三个发酵瓶,同时以敏感菌作对照组(不加噬菌体和加噬菌体),置摇床同一层 30°C 恒温室振荡培养,至 144—168 小时取样测定万古霉素的效价。重复试验 2—3 次。若每次加噬菌体后效价不受影响,或高于敏感菌株的效价,则认为是抗性强效价高的突变株。

(六)固体平皿上噬菌斑检查

为了进一步证明复筛得到的突变株对噬菌体的抗性,我们又在固体平皿上做了噬菌斑的检查。将经过复筛后挑选的突变株母瓶培养的菌丝体 0.5 毫升,与 10^8 单位/毫升以上的噬菌体液 0.2 毫升一起加到平皿上,加入上层培养基后摇匀。同时将敏感菌株母瓶菌丝也按同样量加入平皿上作对照,加入 10^8 单位/毫升、 10^6 单位/毫升和 10^7 单位/毫升噬菌体 0.2 毫升,加入上层培养基后摇匀,一起放在 30°C 培养 24—28 小时,检查噬菌斑。如果敏感菌出现噬菌斑,而突变菌株在大量噬菌体存在下不出现噬菌斑,则可以认为该突变株是抗噬菌体的菌株。

用以上二种方法得到的抗性强效价高的突变株后,还进行自然分离一次或二次,以纯化菌种和稳定其性状。

试验结果

一、抗噬菌体突变株的获得

用噬菌体处理敏感菌株 3746,在 160

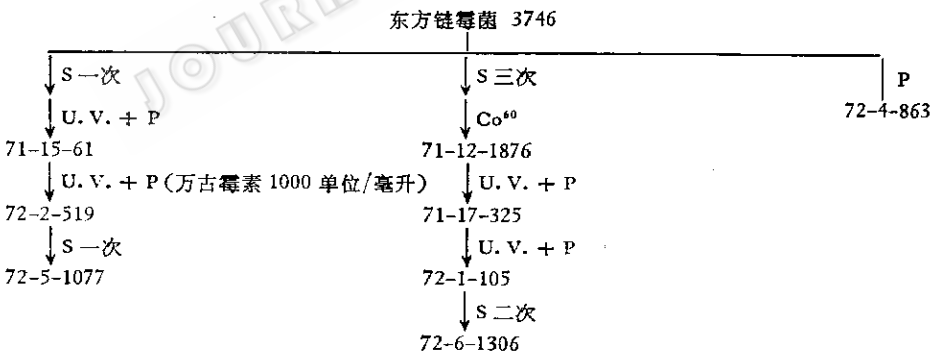
* 单位/毫升为 P.F.U./毫升。

表 1 噬菌体对突变株与敏感株产万古霉素效价的关系

万古霉素效价 (单位/毫升)	菌 号	71-15-61 突 变 株	71-17-325 突 变 株	敏 感 株 3746 (对 照)
加 噬 菌 体 (10 ⁷ 单位/毫升 0.1 毫升)		6493	6217	0
不 加 噬 菌 体 (对 照)		6554	6050	5886

株中筛选出一株抗噬菌体的突变株 72-4-863, 产万古霉素的效价较低一些, 未继续进行研究。对敏感菌株 3746 进行一次自然分离纯化, 用紫外线和噬菌体复合处理, 得到一株抗噬菌体突变株 71-15-61。第三种处理是, 对敏感菌株 3746 连续进行三次自然分离纯化, 并用 Co⁶⁰ (距离 90 公分) 照射 5 分钟, 得到 71-12-1876 突变株。对 71-12-1876 突变株再用紫外线和噬菌体复合处理, 得到 71-17-325 突变株。71-15-61 突变株、71-17-325 突变株与敏感菌株 3746 摇瓶产万古霉素效价的比较见表 1。

抗噬菌体突变株 71-15-61 比敏感株 3746 产万古霉素的效价提高了 500 单位/毫升。对 71-15-61 突变株和 71-17-325 突变株分别用紫外线和噬菌体复合处理, 得到的突变株也分别进行自然分离纯化, 得到 72-5-1077 突变株和 72-6-1306 突变株, 产万古霉素的效价均比敏感株 3746 提高 1000 单位/毫升。72-5-1077 突变株已用于生产。抗噬菌体突变株的选育系谱如下, 与敏感菌株产万古霉素效价的比较如表 2。



注: S 自然分离 U.V. 紫外线 P 噬菌体

表 2 突变株与敏感株产万古霉素效价的比较

抗 噬 菌 体 突 变 株		敏 感 菌 株 3746 (对照, 单位/毫升)	抗性突变株较敏感株 效价提高 (单位/毫升)
菌 号	效价(单位/毫升)		
72-4-863	6456	5886	570
71-15-61	6732	6221	511
71-17-325	6751	6193	588
72-5-1077	7252	6021	1231
72-6-1306	7401	6317	1084

通过噬菌体和紫外线复合处理及用噬菌体单一处理,得到的抗性突变株产万古霉素的效价,较敏感株 3746 提高 500—1000 单位/毫升。

二、突变株的抗噬菌体测定

将突变株 72-5-1077、72-6-1306 和 72-4-863 分别接种平皿,按噬菌斑的测定方法每平皿加 10^8 单位/毫升噬菌体 0.2 毫升,培养后均不出现噬菌斑。敏感株 3746 每皿加噬菌体 10^8 单位/毫升 0.2 毫升处理

作为对照, 37°C 培养 1 天后不生长菌丝体。在加 10^2 单位/毫升噬菌体 0.2 毫升,平皿便有噬菌斑出现。结果说明抗噬菌体突变株 72-5-1077、72-6-1306 和 72-4-863,对噬菌体是具有抗性的。

参 考 资 料

- [1] Smith, R. M., et al.: *J. Bact.*, 54: 545, 1947.
- [2] Раутенштейн, Я. И. (严幼宽译): 噬菌作用, 科学出版社, 北京, 1957.

SELECTION OF PHAGE-RESISTANT MUTANT OF VANCOMYCIN PRODUCING STRAINS

HU YU-CHUN, WANG XIU-YING,

LI YING-HOU AND ZHANG DENG-KE

(The North China Pharmaceutical Industry, Shichichuang)

The Phenomenon of lysogeny was found in the vancomycin producing micro-organism, *Streptomyces orientalis*. From the Cultural filtrates, actinophages have been isolated.

The present note summarizes the selection of phage resistant mutants.

When phage-sensitive strain was treated with highly concentrated phage filtrate (10^6 P.F.U./ml) and ultraviolet light combined with actinophages, phage-resistant mutants have been obtained and retained their capacity to produce vancomycin.