

产谷氨酸北京棒状杆菌噬菌体的分离和鉴定

中国科学院微生物研究所噬菌体组

(北 京)

从国内一些工厂分离到 40 株噬菌体,经血清学分型,区分为三种血清型,按其代表株 $\Delta 2$ 、 $\Delta 3$ 和 $\Delta 133$ 的编号分别定名。对四株噬菌体进行了寄主范围、热失活、pH 稳定性、一级生长曲线试验和电镜观察,发现它们之间存在明显的差异。属于同一血清型的两株噬菌体在一些特征上也存在明显的差异。

北京棒状杆菌 (*Corynebacterium pekinense*) AS 1.299 是一株能大量积累 L-谷氨酸的菌株^[1]。在多年的生产中曾经出现噬菌体的危害,是生产中存在的一个重要问题。噬菌体的危害是国内外谷氨酸生产中的一个普遍存在的问题,已有不少有关的报道^[2-7]。

北京棒状杆菌投入生产仅二至三年后,即发现噬菌体的感染,一些工厂和研究单位都进行了不少有关噬菌体的防治工作^[6,7]。长期来,我们从一些工厂中采集了污染噬菌体的发酵液和各种样品,包括发酵系统中各环节的实物和空气、土样,进行分离,获得 40 株噬菌体。利用血清学方法对此进行分型。确定了三株不同血清型的代表,并进行了一系列的有关特性的研究。

材料和方法

(一) 菌株和培养条件

北京棒状杆菌 AS1.299 和所选用的测定菌株均系本所保存。培养温度为 32℃。北京棒状杆菌液体培养温度为 30℃,摇床冲程 7.6 厘米,每分 210 次。

(二) 培养基

牛肉汁培养基(克/升):牛肉膏 3、蛋白胨 5、氯化钠 5 和葡萄糖 10;上层培养基中加入琼脂 7,下层中加入 15, pH 7.0。

液体培养基(克/升):葡萄糖 20、玉米浆 8、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4、尿素 5; Fe^{++} 和 Mn^{++} 各为百万分之二,用蒸馏水配制, pH 7.0。每 200 毫升三角瓶装量为 20 毫升。

(三) 噬菌体的分离检查

按一般方法^[4]从各地车间采集异常发酵液、排出的污水污泥、过滤材料、排气和空气,以及管道、罐壁和阀门表面的样品进行检查,测定的敏感寄主菌为北京棒状杆菌 AS 1.299。

(四) 抗血清制备和血清中和试验

按照 Adams^[4]方法进行。

(五) 寄主范围测定

取效价为 10^3 单位/毫升的噬菌体液按双层法^[9]测定。

(六) 一级生长曲线试验

按 Adams^[11] 方法进行。试验用液体培养基。

(七) 对热和对 pH 稳定性试验

按我们过去使用的方法进行^[9]。不同 pH 的介质用 pH S-2 型酸度计测定,以 NaOH 和 HCl 调节各种 pH 值。

(八) 电镜观察

参照以往的方法^[9],并采取附有膜的铜网向噬菌斑沾贴,然后染色,其它条件和使用仪器与过去相同。

结果和讨论

从各工厂车间所采得的噬菌体,经过

本文于 1977 年 1 月 10 日收到。

血清中和反应试验(表1),可以区分为三种血清类型。三型的代表按分离样品编号为A2、A3和A133。所分离的噬菌体基本上隶属于A3型(占95%),而其余各型均仅占2.5%。在同一车间可以分离到一种以上的类型。这些噬菌体给谷氨酸生产带

来不少的危害^[6]。

根据寄主范围测定的结果(表2),这三株噬菌体呈现较为严格的专一性,仅仅感染北京棒状杆菌,对于所择其它菌株,包括相近同属的一些谷氨酸生产菌,均不能感染。而对于由AS1.299诱变所产生的一些不同类型的缺陷菌株,却基本上都能感染。AS1.218、AS1.293和AS1.689都是抗噬菌体菌株,以AS1.299为原始菌株选育而得,均不能被这些噬菌体感染,而AS1.733和AS1.734(耐链霉素菌株)与AS1.742和AS1.743(耐四环素菌株)也都不感染噬菌体。因此,在生产中利用这些菌株对防止噬菌体的危害可能是有价值

表1 血清中和交叉反应

噬菌体 抗血清 (稀释度1:100)	A2	A3	A133
A2 K = 3000	0	340	308
A3 K = 600	218	0	311
A133 K = 1700	208	364	0
对 照	221	350	300

表2 寄主范围测定

菌 株	噬 菌 体			
	A2	A3	A133	A155
<i>Arthrobacter</i> sp. AS 1.8	—	—	—	—
<i>Arthrobacter</i> sp. AS 1.94	—	—	—	—
<i>Bacillus cereus</i> AS 1.26	—	—	—	—
<i>Bacillus licheniformis</i> AS 1.520	—	—	—	—
<i>Bacillus megaterium</i> AS 1.127	—	—	—	—
<i>Bacillus polymyxa</i> AS 1.224	—	—	—	—
<i>Bacillus subtilis</i> AS 1.105	—	—	—	—
<i>Bacillus subtilis</i> AS 1.106	—	—	—	—
<i>Bacillus subtilis</i> AS 1.337	—	—	—	—
<i>Bacillus subtilis</i> AS 1.361	—	—	—	—
<i>Bacillus subtilis</i> AS 1.398	—	—	—	—
<i>Brevibacterium ammoniagenus</i> AS 1.587	—	—	—	—
<i>Brevibacterium ammoniagenus</i> AS 1.617	—	—	—	—
<i>Brevibacterium flavum</i> AS 1.495	—	—	—	—
<i>Brevibacterium flavum</i> AS 1.581	—	—	—	—
<i>Brevibacterium flavum</i> AS 1.631	—	—	—	—
<i>Brevibacterium flavum</i> AS 1.632	—	—	—	—
<i>Brevibacterium</i> sp. AS 1.747	—	—	—	—
<i>Corynebacterium crenatum</i> AS 1.542	—	—	—	—
<i>Corynebacterium crenatum</i> HU 7251	—	—	—	—
<i>Corynebacterium crenatum</i> B9	—	—	—	—
<i>Corynebacterium crenatum</i> 7511	—	—	—	—
<i>Corynebacterium pekinense</i> AS 1.218	—	—	—	—
<i>Corynebacterium pekinense</i> AS 1.293	—	—	—	—
<i>Corynebacterium pekinense</i> AS 1.299	1.0	1.0	1.0	1.0

续表 2

菌 株	噬 菌 体			
	A2	A3	A133	A155
<i>Corynebacterium pekinense</i> AS 1.563	0.75—1.10	0.97	0.90—0.98	0.93—1.0
<i>Corynebacterium pekinense</i> AS 1.689	—	—	—	—
<i>Corynebacterium pekinense</i> AS 1.712	0.78—1.08	1.13—1.26	1.25—1.40	0.95—1.26
<i>Corynebacterium pekinense</i> AS 1.713	0.80—1.00	0.56—0.83	0.52—0.70	1.06—1.32
<i>Corynebacterium pekinense</i> AS 1.714	0.88—1.09	0.76—0.86	1.12—1.18	0.68—0.80
<i>Corynebacterium pekinense</i> AS 1.715	0.84—0.93	1.51—1.76	1.17—1.35	0.74—1.00
<i>Corynebacterium pekinense</i> AS 1.716	0.83—0.98	0.97—1.07	0.62—0.91	0.63—0.76
<i>Corynebacterium pekinense</i> AS 1.717	1.00—1.19	0.91—1.11	0.10—0.32	0.90—1.21
<i>Corynebacterium pekinense</i> AS 1.718	0.85—0.95	0.83—1.12	1.15—1.48	0.72—0.93
<i>Corynebacterium pekinense</i> AS 1.719	0.85—1.11	0.92—1.17	0.82—0.96	0.76—0.95
<i>Corynebacterium pekinense</i> AS 1.720	0.47—0.59	0.06—0.11	—	0.20—0.44
<i>Corynebacterium pekinense</i> AS 1.732	0.84—0.93	0.96—1.13	0.53—0.98	0.60—0.73
<i>Corynebacterium pekinense</i> AS 1.733	—	—	—	—
<i>Corynebacterium pekinense</i> AS 1.734	—	—	—	—
<i>Corynebacterium pekinense</i> AS 1.741	0.81—0.93	1.75—1.95	0.95—1.14	0.97—1.31
<i>Corynebacterium pekinense</i> AS 1.742	—	—	—	—
<i>Corynebacterium pekinense</i> AS 1.743	—	—	—	—
<i>Corynebacterium pekinense</i> AS 1.661	—	—	0.53	—
<i>Corynebacterium pekinense</i> AS 1.666	0.11	0.39	0.88	0.50
<i>Corynebacterium pekinense</i> AS 1.586	0.65	0.99	0.74	0.92
<i>Corynebacterium pekinense</i> 7338.	0.68	0.65	1.03—1.05	0.69—1.0
<i>Escherichia coli</i> AS 1.505	—	—	—	—
<i>Escherichia coli</i> K12 (λ) AS 1.358	—	—	—	—
<i>Micrococcus</i> sp. AS 1.493	—	—	—	—
<i>Micrococcus</i> sp. AS 1.494	—	—	—	—
<i>Lactobacillus plantarum</i> AS 1.555	—	—	—	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AS 1.512	—	—	—	—
<i>Pseudomonas fluorescens</i> AS 1.33	—	—	—	—
AS 1.583 (075)	—	—	—	—
AS 1.584 (10058)	—	—	—	—
AS 1.585 (2305)	—	—	—	—
T6-13	—	—	—	—

注：以平板效应表示感染的程度，“—”表示不感染。

的。

一级生长试验(表3)表明,在生产条件下,三株噬菌体的潜伏期都在一小时以上,裂解量基本上相近。从我们工作中发现另一株与 A3 型血清有关的 A155 噬菌体,它的裂解量超过 A3 的一倍,故将结果列在一起,说明相关血清型的不同噬菌体之间,存在着生物学的差异。这些结果与产谷氨酸菌——乳糖发酵短杆菌(*Brevibacte-*

表 3 一级生长曲线试验结果

噬菌体	潜伏期(分)	裂解量(平均释 放数/细胞)
A2	105	78
A3	80	86
A133	75	82
A155	89	166

rium lactofermentum) 的噬菌体的裂解量相近似,而潜伏期较高^[12,14],而五株嗜氨小杆菌(*Microbacterium ammoniaphilum*)的

表 4 噬菌体对 pH 的稳定性

存活率 (%) 噬菌体	pH											
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A2	0	0	54	86	97	100	83	85	86	94	89	
A3	0	0.0001	70	67	88	100	91	98	73	90	85	
A133	0	0	63	69	95	100	81	87	77	70	32	
A155	0	0.0006	33	100	100	100	92	92	89	83	—	

噬菌体的潜伏期和裂解量的波动幅度较为广^[10]。

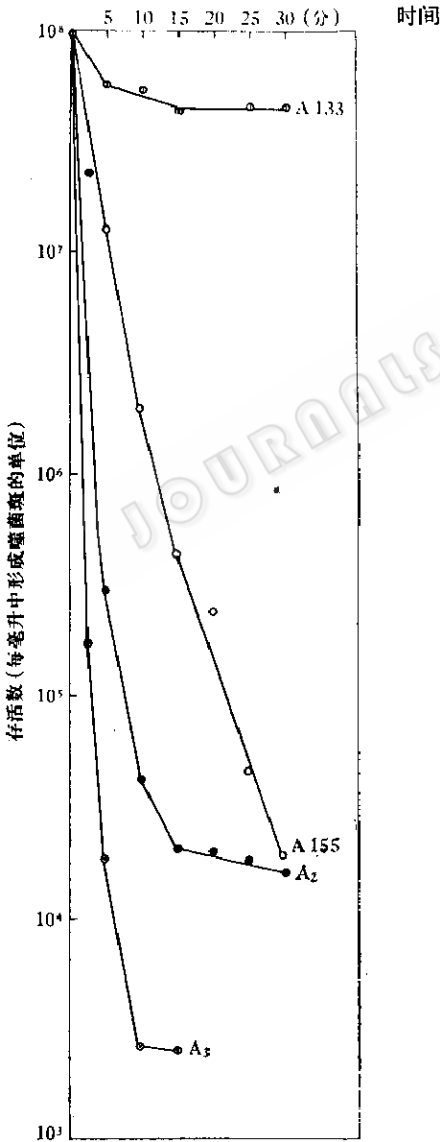


图 在60℃ 时四株噬菌体的失活

从 60℃ 热失活试验的结果(图)分析, A133 对热较为稳定,而其余三者热稳定性较差,对热的稳定性依 A155、A2 和 A3 的先后顺序降低。根据这一现象进一步确定 A133 在 70℃处理10分钟后,仍有0.0066% 的存活,而在 80℃ 处理 5 分钟已全部失活(表 5), 这与 OKi 等人^[13]的试验结果相似,在生产中,此结果可供采取适宜有效处理温度时作参考。

表 5 A133 的热失活存活百分数

存活率 (%) 温度(℃)	时间 (分)			
	5	10	20	30
70	0.0077	0.0066	0	0
80	0	0	0	0

这些噬菌体适应的 pH 范围较广,在 pH 4—12 内均能存活,较乳糖发酵短杆菌^[11,13]和嗜氨小杆菌^[10]噬菌体的适应范围为广泛。因此在生产中,一些工厂在使用废碱液杀灭噬菌体时,必须严格保持有效的 pH 水平, 才能获得良好的消灭噬菌体效果。

表 6 四株噬菌体的大小

噬菌体	头部(毫微米)	尾部(毫微米)
A2	67	244×21
A3	66	240×17
A133	28	64×6.8
A155	43	207×11

用电镜观察四株噬菌体的形态和大

小,它们都具有头部和尾部(图版1)。A2 头部外廓呈现明显的六边形。A133 的尾部是可收缩的,而其余三者则呈现弯曲,属于非收缩型。根据表6分析,A133 是比较小的噬菌体,A2 和 A3 的大小相近,是比较大的,而 A155 的大小则介于中间。

综合上述各方面的结果,可以确定所分离的噬菌体隶属于三种血清类型,分别以 A2、A3 和 A133 为代表。同一血清型的噬菌体中不仅存在着形态和大小的差异,同时还有其它特征,包括生物学特征的不同。

参 考 资 料

- [1] 陈琦等:微生物学报,13: 1—6,1973。
[2] 本江元吉:发酵协会誌,25: 454—476, 1967。

- [3] 土屋卓兒:日本農芸化学会誌,37: 686—689, 1963。
[4] 冲 俊一:日本農芸化学会誌,38: 192—197, 1964。
[5] 瀬戸 進:日本農芸化学会誌,39: 41—47, 1965。
[6] 中国科学院微生物研究所噬菌体组:噬菌体及其防治,科学出版社,1973。
[7] 辽源市味精厂等:吉林大学学报(自然科学版),4: 88—97,1975。
[8] Adams, M. H.: Bacteriophages, Interscience Publishers, Inc., New York, 1959。
[9] 余茂効等:微生物学报,14: 216—233, 1974。
[10] 瀬戸 進:日本農芸化学会誌,39: 48—53, 1965。
[11] 冲 俊一:日本農芸化学会誌,38:198—201, 1964。
[12] 冲 俊一:日本農芸化学会誌,38:376—380, 1964。
[13] Oki, T. et al.: Agr. Biol. Chem., 31: 1040—1046, 1967。
[14] Oki, T. et al.: ibid, 31: 1466—1473, 1967。

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PHAGES ATTACKING L-GLUTAMIC ACID-PRODUCING BACTERIA

Research Group of Phages, Institute of Microbiology, Academia Sinica
(Beijing)

Corynebacteria pekinese AS 1.299 is one of the widely used strains for the production of L-glutamic acid in China. Forty phage isolates were collected from several factories and identified as three serotypes designated as A2, A3 and A133. Four representatives of these three serotypes (A2, A3, A133 and A155) were characterized by host-range and one-step growth experiments. None of them is capable of infecting selected bacterial strains other than *C. pekinese* AS 1.299. and many of its variants. Their latent periods were 105, 80, 75 and 89 minutes

and burst sizes 78, 86, 82 and 166, respectively.

All these four phages are more stable at pH 4—12. In thermal-inactivation test A133 is more stable than others. However, they were all activated at 80°C.

Electron micrograph with PTA negative staining have shown that they are tadpole-like with a flexible tail in the case of A2, A3 and A155, and contractible tail in A133. Their morphological differences were described and dimensions measured.