

四环素生产菌抗噬菌体菌株的选育

合肥制药厂
(合肥)

上海植物生理研究所微生物室
(上海)

从四环素生产菌金霉素链霉菌 (*Streptomyces aureofaciens*) 849 号菌株的不正常发酵液中分离出了噬菌体。这些噬菌体为蝌蚪形,对金霉素链霉菌具有专一性,并且裂解能力很强,命名为 HF 噬菌体。用 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍诱变并结合噬菌体处理的方法,获得了一批抗噬菌体的金霉素链霉菌菌株,其中的一些菌株生产四环素的能力不低于原来的敏感菌株,已用于生产。

从发现链霉素生产菌灰色链霉菌的噬菌体以来^[1-3],几乎所有重要抗菌素的生产菌都遇到过噬菌体^[4-13]。生产四环素的菌种——金霉素链霉菌的噬菌体,曾在国内生产四环素的工厂中出现,给四环素生产带来了严重影响。在防治噬菌体的过程中已逐步积累了许多经验,取得了一定成绩。然而不少工厂在一定季节里,噬菌体的危害仍很猖獗。选育抗噬菌体菌株是防治噬菌体危害的一条重要途径。我们通过诱变育种的方法,从敏感菌株的突变体中选出了一批四环素生产菌的抗噬菌体菌株。通过生产中的试用,表明这些抗性菌株的四环素生产能力不低于原来的敏感菌株。由于抗性菌株的采用,生产环境中原来存在的噬菌体亦大为减少。

材料和方法

(一) 菌种

金霉素链霉菌(*Streptomyces aureofaciens*) 849 号菌株。该菌株用于生产四环素,作为选育抗噬菌体菌株的出发菌株。

(二) 培养基成分

玉米浆蛋白胍琼脂培养基(%)：葡萄糖 1, NaCl 0.5, CaCO₃ 0.05, 蛋白胍 0.5, 玉米浆 0.5, 溶于蒸馏水后调节 pH 为 7.2—7.4, 滤纸过滤。

用于平板下层时琼脂为 2, 上层时为 1。

增殖培养基(%)：葡萄糖 2, 牛肉膏 0.5, 蛋白胍 0.5, 酵母膏 0.5, 玉米浆 0.5, NaCl 0.25, CaCl₂ 0.05, 蒸馏水配制, pH7.2, 滤纸过滤。

肉汤培养基(%)：蛋白胍 1, 牛肉膏 0.5, NaCl 0.5, 蒸馏水配制, pH7.0—7.2。

斜面培养基(%)：麸皮 3, MgSO₄ 0.005, KH₂PO₄ 0.01, (NH₄)₂HPO₄ 0.015, 琼脂 2.2, 蒸馏水配制, 自然 pH。

分离培养基(%)：下层淀粉 2, 蛋白胍 0.05, KH₂PO₄ 0.08, 琼脂 2; 上层用麦芽糖 1 代替淀粉, 其它同下层, 蒸馏水配制, pH6.5—6.8。

摇瓶种子培养基(%)：淀粉 4, 黄豆饼粉 2, 酵母粉 0.5, 蛋白胍 0.5, (NH₄)₂SO₄ 0.3, CaCO₃ 0.4, NaBr 0.2, MgSO₄ 0.025, KH₂PO₄ 0.02, 自来水配制, 自然 pH, 500 毫升三角瓶装液 50 毫升。

摇瓶发酵培养基(%)：淀粉 9, 黄豆饼粉 3, 蛋白胍 1.5, 酵母粉 0.3, (NH₄)₂SO₄ 0.3, CaCO₃ 0.5, NaBr 0.25, MgSO₄ 0.025, 糊精 1, 花生饼粉 1, M-促进剂 (2-巯基苯丙噻唑) 0.0025, 自来水配制, 自然 pH, 500 毫升三角瓶装液 40 毫升。

以上培养基均在 120℃ 灭菌 25 分钟。

(三) 噬菌体的分离纯化

取不正常发酵液经 3500 转/分离心 15 分钟后, 将上清液用肉汤培养基适当稀释, 取金霉素链霉菌 849 号菌株的孢子悬浮液与其混合铺双层平

板, 28℃ 培养 1—2 天, 平板上即长出单个噬菌斑。用接种针穿刺噬菌斑后洗入肉汤培养基中, 适当稀释后再铺双层平板, 又可出现单个噬菌斑, 如此重复 5 次, 得到形态均一的噬菌斑。用无菌滴管取一个噬菌斑接种入寄主菌 849 号菌株培养液中(用增殖培养基 28℃ 振荡培养 8 小时), 再振荡培养 16 小时, 此时培养液由微浑变为澄清, 得到噬菌体裂解液, 将此裂解液先后用无菌滤纸和微孔滤膜(孔径 0.45 微米) 过滤, 滤液的噬菌体效价约在 10^{10} 单位/毫升以上。增殖噬菌体时, 寄主菌的孢子悬液与噬菌体的比例一般为 100:1。寄主菌的斜面 37℃ 培养 4—5 天, 孢子成熟后在冰箱中保存备用。

(四) 菌株抗噬菌体性能的检验

将经过处理后获得的菌株的孢子悬液与上层分离培养基一起铺成平板, 凝固后将效价为 10^4 — 10^7 单位/毫升的噬菌体液滴在平板表面, 28℃ 培养 1—2 天。敏感菌株或局部抗性菌株在平板上出现噬菌斑乃至融合为裂解区; 抗性菌株则正常生长, 不出现噬菌斑。经平板检验为抗性菌株后, 再作液体培养检验。

液体培养检验的方法是: 将待试验菌株的孢子接种到增殖培养基中, 同时加入不同浓度的噬菌体(10^6 — 10^{10} 单位/毫升)。以不加噬菌体的作为空白对照。28℃ 振荡培养 1—5 天, 每天观察菌的生长情况。如空白对照中菌株生长, 加噬菌体后不生长或生长差的即为敏感菌株或局部抗性菌株, 如加噬菌体与不加噬菌体后均生长良好的, 即为抗性菌株。

(五) 摇瓶发酵试验

将金霉素链霉菌斜面上的孢子接入种子培养基中, 28℃ 振荡培养 24 小时, 以约 7% 的体积比接种入发酵培养基, 28℃ 振荡培养 6 天(往复式摇床, 105 次/分, 振幅 7 厘米)。

抗噬菌体菌株的选育方法在结果中叙述。

结 果

(一) 金霉素链霉菌的噬菌体

发现噬菌体后, 从发酵液和生产四环素的车间内外泥土及水中分离噬菌体, 挑取 14 个噬菌斑, 经纯化后培养成含 10^{10} 单

位/毫升以上的噬菌体液, 其电子显微镜照片显示噬菌体为蝌蚪形, 有一条细长尾巴(见图 1)。在玉米浆-蛋白胨琼脂双层平板上, 噬菌斑为圆形, 培养 24 小时后直径为 1.5—2.0 毫米, 透明, 随培养时间延长, 噬菌斑逐渐扩大并出现晕环。我们将该噬菌体命名为 HF 噬菌体。



图 1 金霉素链霉菌的噬菌体 100,000 ×

HF 噬菌体的最适繁殖温度为 28℃, 当温度升至 37℃ 时, 该噬菌体不能在液体培养基中增殖, 并随时间延长而缓慢地丧失活力。在 37℃ 时, 琼脂平板上测得的噬菌体效价与该平板在 28℃ 时的效价比较, 约减低 10^4 单位/毫升。

用 22 株不同类群的链霉菌标准菌株, 17 株在实验室中分离的不同种的链霉菌及 5 株产四环素的链霉菌, 试验了它们对 HF 噬菌体的敏感性。发现除 5 株产生四环素的菌株外, 都不被 HF 噬菌体裂解。5 株敏感菌株都是不同工厂的生产菌株, 编号为 979, 849, 1616, 5010 和 2-4。由此可见, HF 噬菌体是对四环素产生菌金霉素链霉菌特异的。

(二) 抗噬菌体菌株的选育

用噬菌体处理敏感菌株往往可以得到抗性突变株。链霉素^[2,3]、红霉素^[8,9]、利福霉素^[6]、制酵母菌素^[12]、卡那霉素等的生产

菌的抗噬菌体菌株都是这样选育的。HF 噬菌体烈性很强、噬菌斑非常透明,涂了大批噬菌体和寄主菌孢子悬液的平板,28℃ 培养半月以上,不再能看到菌落。用液体培养,即在增殖培养基中接种寄主菌的孢子(浓度为 10^6 个/毫升) 28℃ 振荡培养 8 小时后加入效价为 10^8 单位/毫升的 HF 噬菌体,继续振荡培养 6—9 天,有时长达 18 天才能见到菌体轻微生长。将长了菌的培养液稀释,用分离培养基分离,37℃ 培养 5—10 天后在平板上长出菌落。这些菌落大多形态不规则,大小不齐,少数菌落不生孢子,有些菌落与 849 号菌株的形态相似。经抗噬菌体性能检查,除极少数外,都仍是敏感菌株。

用 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍诱变(简称 MNNG)处理 根据我们的经验,用 MNNG 处理,常可使菌株对噬菌体的敏感性改变。先将 849 号菌株的孢子悬液用功率为 500 瓦的超声波破碎器处理(频率为 18—20KC) 2 分钟,得到浓度为 1.9×10^9 个/毫升的均匀分散的孢子悬液,再用溶于 0.1 M pH6 的三羟甲基氨基甲烷和顺丁烯二酸缓冲液中,浓度为 0.1—3 毫克/毫升的亚硝基胍处理,调节孢子悬液浓度为 10^7 个/毫升,28℃ 振荡保温 2 小时,离心收集孢子,用无菌水洗 2 次,适当稀释后与噬菌体一起加入融化的上层分离培养基中,均匀混和后倒入下层分离培养基平板上,使之凝固。上层培养基中噬菌体的效价不低于 10^9 单位/毫升。平板在 28℃ 培养 5—10 天后,长出的菌落大多为白色,较 849 菌株的菌落小,菌落中央光秃,无气生菌丝。少数菌落生灰色孢子。将长孢子的菌落移种入斜面,检查对噬菌体的抗性,发现约 20% 的菌株为抗性菌株。

MNNG 诱变并结合噬菌体处理 将按上述方法经 MNNG 处理过并洗过的 849 菌

株的孢子悬液(浓度与未处理前相同)2—5 毫升,加入 50 毫升增殖培养基或种子培养基中,同时加入效价为 10^{10} 单位/毫升的 HF 噬菌体液 1 毫升,28℃ 振荡培养 2—8 天,可见到菌明显生长。取培养液用分离培养基分离,平板上层中加有 10^9 单位/毫升的 HF 噬菌体。28℃ 培养 5—8 天后,生长出的菌落多数与 849 号菌株形态相似,有一些菌落生孢子较少,将菌落接种在加有 10^{10} 单位/毫升 HF 噬菌体的斜面上,待菌落长好后,检验其抗噬菌体性能,约有 50% 的菌株为抗性菌株。

(三) 摇瓶发酵试验

将选出的抗性菌株与亲株进行发酵试验。除少数菌株因在种子培养基中不生长、未获结果外,从大量抗性菌株中选得较原始菌株的四环素产量稍高或相当的菌株 9 株。将这 9 株菌进行单孢子分离,每株分出 10—30 株单菌,再进行发酵试验,比较它们产生四环素的能力。将产量较高的菌株用砂土管保藏。共得到分属于 9 株菌的 27 株单菌,这 9 株菌的编号是 5, 81, 124, 125, 127, 135, 141, 143 和 146。在试验条件下,它们产四环素的能力比原始菌株高 10—20%。

为了弄清培养基中存在噬菌体时是否影响抗性菌株的四环素产量,取 124 和 146 两株菌进行了试验。发酵结果表明,在发酵培养基中加入 10^5 — 10^8 单位/毫升的 HF 噬菌体,不影响四环素的产量。

(四) 发酵罐发酵试验

用抗噬菌体菌株 125 和 146 进行发酵罐发酵生产四环素试验,生产工艺与用敏感菌株时相同。由于抗性菌株生长较慢,故将种子培养温度提高至 32℃,以便使其生长速度和敏感菌株相接近。41 罐批抗性菌株的发酵试验结果见表 1,由结果可见,抗性菌株生产四环素的能力不低于敏感菌

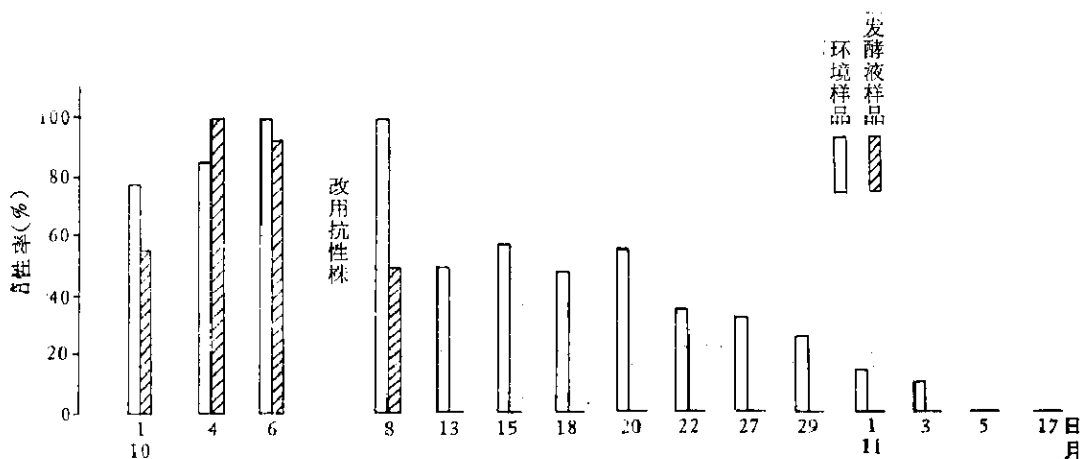


图2 噬菌体检测阳性率变动情况

株。

表 抗性菌株与敏感菌株四环素产量的比较

菌株	罐批数	四环素平均产率 (%)
敏感菌株 0	18	100*
抗性菌株 146	25	97.2
抗性菌株 125	16	108.2

* 因感染噬菌体而减产或倒罐者,未统计。

(五) 采用抗噬菌体菌株前后噬菌体分布的调查

我们在噬菌体危害严重时改用了抗噬菌体菌株。未采用抗性菌株前,几乎所有种子罐和发酵罐,以及环境中均可分离到大量噬菌体。在使用抗性菌株后,很快就在发酵罐中检测不到噬菌体了;环境中噬菌体的数量也随时间而逐渐减少,三星期的不断检测中,已逐渐减少(见图2)。

讨 论

选育抗噬菌体菌株代替敏感菌株进行抗菌素生产,已证明是防治噬菌体危害卓有成效的方法。有些作者认为物理或化学因子诱变方法不适合选育链霉菌抗噬菌体菌株^[2,14];有些作者在使用烈性噬菌体处理未获好效果后、改用温和噬菌体来选育抗性菌株^[9];另一些作者用噬菌体处理的方

法获得抗性菌株后,再用物理或化学因子处理来提高该抗性菌株的抗菌素产量^[6]。我们的结果表明, MNNG 诱变并结合噬菌体处理的方法,可以提高选育抗噬菌体菌株的效率,而且所得的菌株,产生抗菌素的能力不低於敏感菌株。

参 考 资 料

- [1] Saudek, E. C. and Colingsworth, D. R.: *J. Bacteriol.*, 54: 41, 1947.
- [2] Carvajal, F.: *Mycologia*, 45: 209, 1953.
- [3] 许文思等: *微生物学报*, 5: 154, 1957.
- [4] Weindling, R. et al.: *Nature*, 189: 603, 1961.
- [5] Кузнецов, В. Д.: *Антибиотики*, 8: 887, 1963.
- [6] Thiemann, J. E. et al.: *Appl. Microbiol.*, 12: 261, 1964.
- [7] 武汉抗菌素厂等: *武汉大学学报*, 1975 年第 1 期, 41 页。
- [8] 张筱玉等: *微生物学报*, 14: 83, 1974.
- [9] Ильина, Т. С. и Жданов, В. Г.: *Микробиология*, 33: 516, 1964.
- [10] 胡瑜君等: *微生物学报*, 14: 91, 1974.
- [11] Кузнецов, В. Д. и Брызаглова, Л. С.: *Антибиотики*, 16: 892, 1971.
- [12] Журалева, Н. П. и Др.: *Антибиотики*, 20: 787, 1975.
- [13] Дещиц, Л. А. и Гольдан, С. Ю.: *Антибиотики*, 16: 50, 1971.
- [14] Padhya, A. C. and Layer, V. N.: *J. Scient. & Industr. Res.*, 20: 132, 1961.

SELECTION OF PHAGE-RESISTANT STRAINS OF *STREPTOMYCES AUREOFACIENS* FOR TETRACYCLINE PRODUCTION

Hefei Pharmaceutical Plant

(Hefei)

Laboratory of Microbiology, Institute of Shanghai Plant Physiology

(Shanghai)

Actinophages were isolated from the abnormal fermentation broth of *Streptomyces aureofaciens* used in tetracycline production are tadpole-like and specific for *S. aureofaciens* with high virulence. It is difficult to obtain strains resistant to these actinophages by the traditional method, such as phage-treatment of the sensitive strain of *S. aureofaciens*. However, using N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine as mutagen and phage-treatment in combination some resistant strains were obtained. In the shaken

flask fermentation, nine strains of these resistant strains gave tetracycline yields as high as that of the parent sensitive strain. Data from a total of 41 batches of tank fermentation with two resistant strains showed that their yield was the same as that of the parent strain. Owing to the application of these resistant strains in production, the actinophage population in the neighbourhood of the plant declined rapidly and eventually no actinophage could be isolated by the routine method.