

四环素生产菌——金色链霉菌的噬菌体

余 茂 勃

(中国科学院微生物研究所,北京)

本文证实国内某些工厂四环素生产中的异常发酵现象是由噬菌体所引起的,从一些工厂中分离到噬菌体 SA1、SA2、SA3、SA4 和 SA5。对它们的噬菌斑进行了描述,在血清分型、寄主范围、热失活、pH 值的稳定性测定方面都进行了工作,同时在电镜下观察了形态和测量了大小。我们认为这些噬菌体都是属于同一血清型,形态基本相似,大小差异不显著,对 pH 值有广泛的适应性,对热抵抗力较强,但在这些特征和寄主范围内却存在一定差异。这类噬菌体和已知的金色链霉菌噬菌体是不相同的。

有关金色链霉菌 (*Streptomyces aurcofaciens*) 的噬菌体,从 1951 年来,已有一些报道^[4,11]。近年来,国内四环素生产中陆续出现异常发酵。天津、安阳等地一些制药厂经过分析检查,确证异常发酵是由噬菌体所造成的。我们从各地检查的样品中,分离到一批噬菌体,通过血清学和一些生物学特性的鉴定,证实所收集的 SA1、SA2、SA3、SA4 和 SA5 五株噬菌体都隶属于同一种血清型,在形态和大小上较相似,一些生物学有关特性基本上相近,这些结果为选育抗噬菌体菌株的工作提供依据。

材料和方法

(一) 菌株和培养条件

所用金色链霉菌 7103、7304 和 5010 由天津制药厂提供, JIC-B16 和噬菌体 SA5 由中国医学科学院药物研究所抗菌素研究室供给, 979 由河南安阳第二制药厂提供, 卡纳霉素链霉菌 (*Streptomyces Kanamyceticus*) 11 由北京制药厂供给。其余所用测定菌株均系本所保藏。试验中的指示菌为金色链霉菌 979。

斜面培养金色链霉菌的温度为 37°C, 5 天后即生成大量孢子。双层琼脂培养温度为 30°C。

(二) 培养基

孢子斜面培养基(克/升): 麸皮 36, 琼脂 20, (NH₄)₂ HPO₄ 0.3, K₂HPO₄·3H₂O 0.2, MgSO₄·7H₂O 0.1, 加水至 1000 毫升, 装入扁瓶, 灭菌 15 磅 30 分钟。用作培养金色链霉菌产生孢子。

Gause I 号合成培养基^[2]、Bennett 培养基^[10]和牛肉汁培养基, 上层加琼脂 7 克/升, 下层加量为 15 克/升。

地中海诺卡氏菌 (*Nocardia mediterranei*) 的培养基为 Bennett 培养基, 卡纳霉素链霉菌利用牛肉汁培养基, 其余菌株均利用 Gause 培养基。

(三) 分离和纯化方法

取各地异常发酵液或各种样品, 经双层琼脂法分离^[1], 连续单斑挑取 3—5 次以上, 待斑态和大小大致稳定一致, 可以认为纯化。

(四) 抗血清制备和血清中和反应

参照 Adams^[3] 方法进行。

(五) 寄主范围测定

利用双层琼脂法测定是否感染, 并计算平板效率, 按金色链霉菌 979 为 1.0 计。

(六) pH 稳定性的测定

利用 pH S 2 型酸度计测定所配制的各种 pH 值, 处理方法和条件同过去所使用的^[1]。

(七) 热失活测定

参照过去的方法^[1]进行。

本文于 1977 年 8 月 20 日收到。

(八) 电镜观察*

同过去的方法^[1]。

结果和讨论

从各地分到的噬菌体,按分离编号定名为 SA1 (天津)、SA2 (安阳)、SA3 (天津)、SA4 (广州)和 SA5 (合肥)。在 Gause 合成培养基上培养 14 小时,即呈现清晰的噬菌斑,斑的边缘整齐、清晰、斑径 1.5—2.0 毫米,它们之间在形态上没有显著的差异。在 JIC-B16 上,如 SA5 可以出现晕圈,直径为 3.0 毫米,中央清晰斑径为 1.0 毫米,这和 Козаченко 和 Михайлова^[8]报道的 II 型噬菌体所呈现的斑相似。在 7304 上可出现 1.2 毫米的清晰斑,晕圈斑径可达 3.0 毫米。Kuroda 和 Bradley 发现,将培养温度提高到 37°C 时,可以阻抑晕圈的出现^[4]。显然,晕圈的出现,不仅受到培养温度的影响,同时也取决于寄主-噬菌体系统,经过抗血清中和反应试验结果,这五株噬菌体都属于同一型(表 1)。

表 1 噬菌体抗血清中和反应

噬菌体	SA3 抗血清 K = 250 1:100	对 照	处 理
SA1		161	0
SA2		157	0
SA3		175	0
SA4		195	0
SA5		134	0

表 2 展示五株噬菌体的寄主范围测定结果,大致上相同,但对 *S. globisporus* AS 4.744 和 AS4.92, *S. odorifer* AS4.942 与 *S. lilacinovercillatus* AS4.923 菌株上呈现不同。此外,在敏感菌株上的平板效率也有显著差异。五株噬菌体都能感染 *S. coelicolor* AS4.461,这与 Weindling 和 Kapros^[5]的结果不同。从上述测定看来,可以认为 SA1、SA2、SA3、SA4 和 SA5 都是多价噬菌体,与 Weindling 等人^[6]的噬菌体具有种内特异性是不相同的。

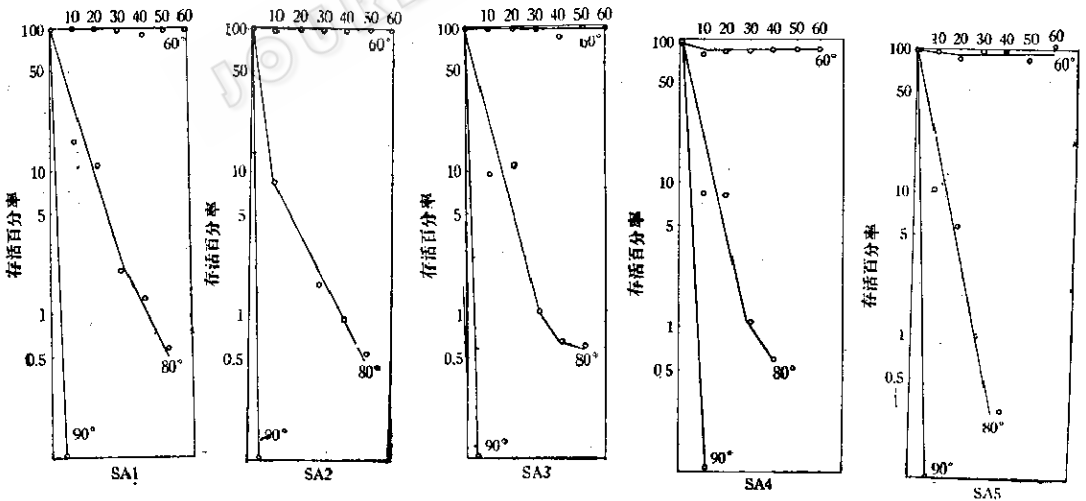


图 1 噬菌体的热失活存活率

从图 1 可以见到五株噬菌体对于热失活的存活率,不论 60°C、80°C 和 90°C 温度对它们的影响基本是相似的,对热具有较高的抵抗力。与 Алиханян 和 Федорова 的

三型噬菌体显著不同,他们的 I 和 II 型在 70°C 处理 10 分钟已接近全部失活,而 III

* 电镜观察由中国科学院生物物理研究所和广东省微生物研究所电镜组协助完成。

表2 寄主范围的测定

被 测 菌 株	噬 菌 体				
	SA1	SA2	SA3	SA4	SA5
	平 板 效 率				
<i>Streptomyces aureus</i> AS 4.526	—	—	—	—	—
<i>S. antibioticus</i> AS 4.199	—	—	—	—	—
<i>S. antibioticus</i> AS 4.567	—	—	—	—	—
<i>S. rimosus</i> AS 4.69	—	—	—	—	—
<i>S. rimosus</i> AS 4.748	—	—	—	—	—
<i>S. fradiae</i> AS 4.685	—	—	—	—	—
<i>S. fradiae</i> AS 4.684	—	—	—	—	—
<i>S. globisporus</i> AS 4.3	—	—	—	—	—
<i>S. globisporus</i> AS 4.744	—	—	0.19—0.66	0.37	—
<i>S. globisporus</i> AS 4.92	—	0.041—0.51	0.97	—	—
<i>S. griseus</i> AS 4.181	—	—	—	—	—
<i>S. aureofaciens</i> AS 4.182	—	—	—	—	—
<i>S. caespitosus</i> AS 4.922	—	—	—	—	—
<i>S. chromogenes</i> AS 4.919	—	—	—	—	—
<i>S. aureofaciens</i> JIC-B16	0.11—0.22	0.11—0.35	0.10—0.40	0.10—0.29	0.33
<i>S. aureofaciens</i> 979	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>S. aureofaciens</i> 7304	0.43—0.74	0.53—0.80	0.40—0.90	0.57—0.70	0.71
<i>Nocardia mediterranei</i> AS 4.895	—	—	—	—	—
<i>S. biverticillatus</i> AS 4.930	—	—	—	—	—
<i>S. hydroviolascens</i> AS 4.1004	—	—	—	—	—
<i>S. aureolongisporus</i> AS 4.914	—	—	—	—	—
<i>S. roseofulvus</i> AS 4.912	—	—	—	—	—
<i>S. odorifer</i> AS 4.942	—	—	—	—	0.035—0.26
<i>S. violaceorubens</i> AS 4.956	—	—	—	—	—
<i>S. lilacinovorticillatus</i> AS 4.923	0.082—0.47	0.07	0.41	0.07—0.091	—
<i>S. olivaceus</i> AS 4.943	0.55	0.48	0.095	0.25	0.12
<i>S. lavendulae</i> AS 4.201	—	—	—	—	—
<i>S. coelicolar</i> AS 4.461	0.52	0.16—0.40	0.77	0.04	0.18
<i>S. venezuelae</i> AS 4.223	—	—	—	—	—
<i>S. aureus</i> AS 4.896	—	—	—	—	—
<i>S. hydroscopicus</i> AS 4.917	—	—	—	—	—
<i>S. malachitofusus</i> AS 4.970	—	—	—	—	—
<i>S. microflavus</i> var. <i>lactosus</i> AS 4.1007	—	—	—	—	—
<i>S. erythreus</i> AS 4.894	—	—	—	—	—
<i>Nocardia mediterranei</i> AS 4.918	—	—	—	—	—
<i>S. aureofaciens</i> 5010	0.35	0.22	0.19—0.44	0.32—0.77	0.19
<i>S. griseochromogenes</i> AS 4.892	—	—	—	—	—
<i>S. lavendularectus</i> AS 4.913	—	—	—	—	—
<i>S. viridochromogenes</i> AS 4.689	—	—	—	—	—
<i>S. fulvovectus</i> AS 4.908	0.11—0.19	0.16—0.50	0.12—0.21	0.53—0.61	0.65
<i>S. ahydroscopicus</i> AS 4.938	—	—	—	—	—
<i>S. kanamyceticus</i> 11	—	—	—	—	—

型更为敏感,在 55℃ 已经失活^[7],因此,对热较 I, II 和 III 型稳定。

对 pH 稳定性的试验,显然在 pH 4.0—10.0 都是稳定的,SA4 在 pH 3.0 时仍有较高的存活率,SA2 在偏碱时显示不稳定。不论 pH 值怎样变动,噬菌体 SA2、SA3、SA4 和 SA5 在低 pH 值时仍有一定数量

的存活。这对生产工艺流程中利用草酸酸化提取四环素后的菌体残渣处理,具有突出的意义,应该引起充分的注意,因为仍有一定数量噬菌体存活于残渣中。为了防止噬菌体的污染和扩散,必须严格控制残渣,禁止任意在厂内或附近堆放。

表 3 不同 pH 值处理下噬菌体的存活率

存活率 (%) \ pH	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0	13.0	14.0
噬菌体														
SA1	0	0	23	95	95	98	100	99	99	96	90	89	0	0
SA2	0	0.03	77	106	96	96	100	112	110	84	31	0.75	0.24	0
SA3	0	0.034	74	80	96	98	100	97	100	98	97	93	0	0
SA4	0	0.023	97	97	97	99	100	93	90	82	80	77	0	0
SA5	0	0.003	72	97	94	95	100	95	95	85	78	82	0	0

根据电镜观察(图版 I-1—5),五株噬菌体的形态基本上是相似的,所测得的大小有一些差异。它们的头部都是椭圆形,但在较高放大倍数下可以看到是多边形结构,长与宽的比值在 0.61—0.78 (依次 SA1—SA5 为 0.75, 0.78, 0.70, 0.63 和 0.61) 之间。尾部长度 SA1 和 SA2 之间很接近,而 SA4 和 SA5 较长。有的尾端可以看到基片,SA5 的基片呈现圆盘状。

表 4 噬菌体的大小测定

噬菌体	头部(毫微米)	尾部(毫微米)
SA1	80×60	167×10
SA2	77×60	147×10
SA3	95×67	161×12
SA4	100×63	200×10
SA5	93×57	171×12

这些噬菌体和 Раутштейн 和 Мах^[11] 所报道的 I 型和 II 型的噬菌体在形态上完全不同,在金属投影测定的头部 59 × 59 毫微米,是圆形的轮廓。

根据以上的分析,我们认为金色链霉菌噬菌体 SA1、SA2、SA3、SA4 和 SA5 按血清学分析,都属于同一类型;在热失活和

形态大小方面,基本上相似,相互之间还有一些差异;在寄主范围和对不同 pH 值的稳定性的测定中,似乎相互之间的差异较为明显。这种血清型的噬菌体与已知的金色链霉菌的噬菌体是不同的。

参 考 资 料

- [1] 余茂勋、贾盘兴、徐星、靳传富: 微生物学报, 14, 216, 1974.
- [2] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组: 《链霉菌鉴定手册》, 658—660 页, 科学出版社, 1975.
- [3] Adams, M. H.: Bacteriophages, Interscience Publishers, Inc., New York, 1959.
- [4] Kuroda, S. and Bradley, S. G.: Can J. Microbiol., 13, 1569, 1967.
- [5] Weindling, R. and Kapros, Ch.: Bacteriol. Proc., 48, G38, 1951.
- [6] Weindling, R., Tresner, H. D. and Backus, E. J.: Nature, 189, 603, 1961.
- [7] Алиханян, С. И. и Федорова, И. В.: Микробиол., 34, 450, 1965.
- [8] Козаченко, В. И. и Михайлова, Г. Р.: ibid., 34, 456, 1965.
- [9] Михайлова, Г. Р. и Трусова, А. С.: ibid., 33, 987, 1964.
- [10] Раутштейн, Я. И., Жунаева, В. В., Хохлова, Ю. М., Нестерова, Н. Г. и Москаленко, Л. М.: ibid., 44, 899, 1975.
- [11] Раутштейн, Я. И. и Мах, Ф.: ibid., 30, 1016, 1961.

CHARACTERIZATION OF PHAGES ATTACKING TETRACYCLINE PRODUCING STRAINS OF *STREPTOMYCES AUREOFACIENS*

Yu Mao-xiao

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

It has been proved that abnormal fermentation in tetracycline production by *Streptomyces aureofaciens* in our country is mainly due to phage infection. Phages SA1, SA2, SA3, SA4, and SA5, were isolated from their fermentation factories. These phages were characterized in following aspects: serological neutralization reaction, host-range relationship, thermal inactivation and stability at different pH values. Morphology of five phages was studied in the electron microscope and their dimensions were determined.

It is concluded that phages SA1, SA2, SA3, SA4, and SA5 all belong to the same sero type. Their morphology and dimensions are very similar. These five phages are stable over a wide range of pH. They are also thermostable, withstanding elevated temperatures. However, they are also sufficiently different in these characterizations and host-range relationship. Phages SA1, SA2, SA3, SA4 and SA5 are different from all known phages attacking *Streptomyces aureofaciens*.