

苏芸金杆菌抗噬菌体菌株的选育

河南省洛阳林药厂苏芸金杆菌车间试验室

苏芸金杆菌深层发酵过程中,噬菌体的危害是影响生产的主要障碍。用玉米浆培养基(玉米浆 3.2%,豆饼粉 1.2%,玉米粉 0.6%,淀粉 0.4%,酵母粉 0.2%)发酵,最高峰菌数能达 35—45 亿/毫升,有时由于污染了噬菌体,放罐时菌数只剩 20 亿/毫升。用液配方培养基(豆饼粉 7%,玉米粉 7%,酵母粉 6%)发酵,最高峰菌数能达 140—180 亿/毫升,而放罐时有时却只有 100 亿/毫升左右。甚至有时造成倒罐。几年来,我们除了采取工艺改革、空间消毒等措施外,还专门组织有关人员对抗菌选育做了大量工作。近年来使用的菌种 70% 是抗噬菌体菌株(以下简称抗株),生产产品 200 多吨,据有关单位反映,杀虫效果良好。现将甲基硫酸乙酯(简称 EMS)和硫酸二乙酯(简称 DES)选育抗株的初步试验介绍如下。

一、筛选抗株的准备工作

(一) 噬菌体的制备

将溶菌倒罐的发酵液离心沉淀,取上清液于三角瓶或大试管内,加入 1—2 滴氯仿备用。

将苏芸金杆菌接一环于牛肉膏或玉米浆培养液中,培养到对数期(约 3—4 小时),加入上述噬菌体液 2 毫升,继续培养到大部分细胞被裂解。按此方法可连续进行多次,即可达到噬菌体的增殖目的。

(二) 常用培养基

筛选抗株经常用的培养基有普通牛肉汁培养基、玉米浆培养基(见前)、半固体培养基(1%琼脂)等。

二、诱变处理方法

(一) EMS 处理方法

将苏芸金杆菌敏感菌株接一环于 15 毫升牛肉汁培养液中,培养到对数期(约 3—4 小时),取菌液 10 毫升离心(4000 转/分) 15 分钟,倒去上清液,加 10 毫升 pH7.0 的磷酸缓冲液洗涤,连续离心洗涤 3 次,最后用磷酸缓冲液稀释到 10^8 细胞/毫升。取此菌悬液 5 毫升和 0.75 毫升 EMS 同时加入带有玻璃珠的无菌三角瓶里,32—37℃ 振荡处理 30 分钟后,立即稀释 100 倍。取 1 毫升稀释液加入 15 毫升牛肉汁培养液里,培养到对数期,取 1 毫升此菌液加到 15 毫升玉米浆培养液中,同时加 1 毫升已制备好的噬菌体液,放摇床振荡培养,直到形成芽孢(约 14—18 小时)。培养液经 75—85℃ 热处理 30 分钟后平皿划线分离,12 小时后挑出单个菌落于牛肉汁琼脂培养基斜面,32—35℃ 培养 48 小时后镜检,选择芽孢整齐、晶体大、晶体面多的菌株进行平皿测抗。平皿测定抗噬菌体的方法是:在平皿里先倒 15 毫升牛肉汁琼脂培养基作底层,再将待测菌株的菌悬液 0.1 毫升加入冷却到 45—50℃ 的半固体培养基中并混匀,迅速倒入平皿内摇匀。凝固后点加各种型号的噬菌体液。30—35℃ 培养 8—24 小时后取出观察是否出现溶菌斑。若有溶菌斑则表明不抗。若无溶菌斑则证明有抗性,可做摇瓶发酵试验。摇瓶发酵的方法是:将平皿测抗表现有抗性的菌株,接一环于 15 毫升玉米浆培养液中,培养到对数期,加 1 毫升噬菌体液继续培养到形成芽孢(应有不加噬菌体的对照摇

表 1 EMS 诱变部分结果

菌 号	镜 检 情 况				平 皿 测 抗				摇瓶发酵 高峰菌数 (亿/毫升)	摇瓶发酵 终了菌数 (亿/毫升)	pH
	芽孢形态	芽孢数 (%)	晶体形态	晶体数 (%)	1	2	3	4*			
14-1	整 齐	98	菱形	50	+	+	±	+	37.8	34.2	7.6
14-2	整 齐	98	菱形	50	+	+	±	+	35.6	31.5	7.3
19-1	较整齐	95	菱形	55	+	+	+	+	40	38.4	8.0
19-2	较整齐	95	菱形	55	+	+	+	+	35.7	31.4	8.6
苏敏-1	较整齐	95	菱形	50	-	-	-	-	溶菌		
苏敏-2	较整齐	95	菱形	50	-	-	-	-	32	27	7.6

* 1, 2, 3, 4 表示不同类型的噬菌体。“+”表示抗,“-”表示不抗。表 1 中 14, 19 为抗株菌号,苏敏是苏芸金杆菌敏感菌株,14-1, 19-1, 苏敏-1 为摇瓶中加 4 型噬菌体,14-2, 19-2, 苏敏-2 为不加噬菌体摇瓶。

瓶),中间应定期抽样检查,记录最高峰菌数和孢子数,用对照摇瓶比较优劣。然后将摇瓶发酵试验中表现抗性良好、产量高的菌株制成孢子悬液,75—85℃热处理30分钟,平皿划线分离。一般经摇瓶发酵试验性能良好的菌株可直接用于发酵罐生产。EMS诱变处理的部分结果见表1。

(二) DES 处理方法

接种培养、离心洗涤、制备菌悬液与 EMS 处理方法中各项相同。取4毫升菌悬液加入盛有16毫升pH 7.0的磷酸缓冲液的无菌三角瓶中,再加入0.2毫升

DES原液,32—37℃振荡处理40分钟,立即加入0.5毫升25%的硫代硫酸钠溶液中中止反应。然后取1毫升处理液加入无菌的15毫升牛肉汁培养液中,后处理方法与EMS的后处理方法一样。诱变部分结果见表2。

近几年来我们共选出符合生产要求的抗株30多株,已应用生产的有15株。试验的大量事实说明,EMS和DES是两种致死率低、诱变率高的化学诱变剂。在筛选抗噬菌体工作中,应随时掌握调换诱变剂及菌种的使用。即使选出了一批抗性好、产量高的菌株,也不能长期连续使用。为了保证发酵生产的正常进行,必须经常不断地选种和育种。

表2 DES 诱变部分结果

菌号	镜 检 情 况				平 皿 测 抗				摇瓶发酵 高峰菌数 (亿/毫升)	摇瓶发酵 终止菌数 (亿/毫升)	pH
	芽孢形态	芽孢数 (%)	晶体形态	晶体数 (%)	1	2	3	4			
20-1	整 齐	90	菱形	60	±	+	+	+	38	32.3	8.0
20-2	整 齐	90	菱形	60	±	+	+	+	36.9	34.6	8.2
22-1	较整齐	90	菱形	60	±	+	+	+	41	38.7	8.2
22-2	较整齐	90	菱形	60	±	+	+	+	35	31.7	7.5
2-1	整 齐	98	圆形	70	—	+	+	+	40	37.8	
2-2	整 齐	98	圆形	70	—	+	+	+	43	39.6	

注:表2中20,22,2号均为抗株编号,20-1为加4型噬菌体,22-1为加3型噬菌体,2-1为加2型噬菌体。20-2,22-2,2-2均为不加噬菌体。