

卷曲链霉菌抗噬菌体菌株的选育

崔汉钧 张仪常

(中国科学院成都生物研究所、成都)

摘要 以抗菌素生产水平较高 (4500r/ml), 对噬菌体敏感的卷曲链霉菌出发菌, 经噬菌体自然选择, 紫外和亚硝基胍复合处理, 获得 5 个抗噬菌体的菌株。菌体形态无变异。摇瓶发酵水平为 4539—4649r/ml, 发酵罐产量平均为 4533r/ml, 最高达 6440r/ml。

关键词 抗菌素; 卷曲链霉菌; 噬菌体

卷曲霉素生产, 因遭受噬菌体污染, 长期生产不正常, 除设备和环境中存在大量噬菌体外, 生产菌种也被污染而严重退化, 经分离筛选结合抗血清处理, 获得不携带噬菌体的菌株, 但因生产厂家环境和设备系统中的噬菌体消除比较困难, 无法切断外源感染, 在研究噬菌体特征的基础上, 选育出 5 株抗噬菌体的卷曲链霉菌。选育抗噬菌体菌株, 是克服噬菌体危害的有效措施之一。在我国, 卷曲链霉菌抗噬菌体的菌株为首次选育成功。

材料与培养基

(一) 出发菌株

卷曲链霉菌 (*Streptomyces. Capreolus*), 由河南省安阳市第一制药厂生产菌分离筛选获得。

(二) 噬菌体

从河南省安阳市第一制药厂卷曲霉素生产

的异常发酵液中分离获得。

(三) 培养基

1. 斜面培养基: 高氏 1 号琼脂培养基。

2. 二级菌种培养基 (%): 蛋白胨 1, 葡萄糖 0.5, 可溶性淀粉 1, NaNO_3 0.2, NaCl 0.2, 酵母粉 0.3, CaCO_3 0.2, pH7.2。

3. 发酵培养基 (%): 蛋白胨 3, 葡萄糖 1.5, 可溶性淀粉 3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3, KH_2PO_4 0.01, CaCO_3 0.4, pH7.2。

4. 平皿培养基: 同二级菌种培养基加琼脂 2%, 上层加琼脂 0.7%。

实验与结果

(一) 噬菌体悬浮液的制备

用固体法^[1]富集噬菌体。用 Adams^[2] 双层法检测噬菌体效价。

(二) 出发菌的预处理

用 150ml 三角瓶,装发酵培养基 20ml,灭菌后接出发菌二级种子液 2ml, 28—30℃ 振荡培养 24 小时,加入 10^8 pfu/ml 噬菌体液 0.25ml,继续培养,于 48 和 72 小时再分别加入噬菌体液 2.5ml 及 2ml。96 小时取菌液少许,适当稀释后取 1ml 与等量上述噬菌体液混合,保温振荡 4 小时,进行平皿分离,待孢子培养成熟后,随机挑取单菌转入下半段涂有噬菌体液的斜面试管,28℃ 培养 7 天,选择上下菌苔均匀,孢子丰满的菌落,经常规摇瓶 (30ml/250ml) 发酵,选出 No. 2—8 菌株,抗菌素产量为 2419r/ml。

(三) 抗噬菌体菌株的初筛

采用液体再生菌丝法,即将上述 No. 2—8 菌制成孢子悬液,按感染系数 1:10 与噬菌体液混合接入摇瓶,培养 27 小时,取菌液分离,获单菌 465 个,用生物鉴定片法选出抑菌圈大的 34 个菌。以上述感染系数再经摇瓶筛选,获菌株 No. 21,生产水平为 3730r/ml。

(四) 抗噬菌体高产菌株的选育

1. 紫外与亚硝基胍 (NTG) 复合处理: 取第三代 No. 21 菌的孢子悬液于平皿中,在 15 瓦波长 2537 Å 紫外灯下 (距离 30cm) 照射 4—5 分钟,照射后,保持黑暗 3 小时,涂平皿,按陈中

孚等^[1]介绍的方法进行 NTG 处理,培养 6—7 天,挑取近 NTG 抑菌圈的单菌,经生物鉴定片法初筛,选出 19 株,再经摇瓶复筛,抗性检测,选取 1 株,抗菌素产量为 3614r/ml,再次分离筛选,得到产量在 3829.4—4359.9r/ml 的菌株 13 个。

2. 噬菌体自然选择: 将 No. 21 菌孢子悬液直接进行平皿分离,获单株 1500 个,通过生物鉴定片选出 6 株,以 1:10 的感染系数加噬菌体进行摇瓶发酵,选出抗菌素生产水平高的单株,重复筛选,获得生产水平 3716—4700 r/ml 的菌株 10 个。

(五) 抗性菌株的生产稳定性

上述两种方法选育 10 代以上的单株,分别用三级培养基进行摇瓶发酵 (9ml/100l),加二级种子液和 10^6 pfu/ml 噬菌体液各 1ml,培养 96 小时,经检测,选出生产水平在 4000r/ml 以上的菌株 10 个,再以高浓度噬菌体感染 (感染系数 $1:2 \times 10^5$),常规摇瓶发酵并设对照,发酵终了,进行抗菌素产量和抗性水平检测,结果如表 1。

所测菌株,抗菌素产量均在 4000r/ml 以上,抗性水平相当,表 1 中选出的 5 株 8411—

表 1 菌株的摇瓶发酵单位和抗性水平

菌株号	正常摇瓶发酵单位 (r/ml)	噬菌体感染摇瓶发酵单位 (r/ml)	对噬菌体的抗性水平 (pfu/ml)			
			2×10^1	2×10^2	2×10^3	2×10^4
8411—1	4649	4590	—	—	—	—
8411—2	4649	4408	—	—	—	—
8411—3	4539	4700	—	—	—	—
8411—4	4649	4640	—	—	—	—
8411—5	4649	4697	—	—	—	—
CK	4473	无	++	+++	+++	+++

注: 用双层法检测 “—” 表示不出斑; “++” 表示大量出斑; “+++” 表示生产菌全部被噬菌体裂解。

表 2 抗噬菌体菌株大罐生产水平

日期	3	7	11	13	14	16	18	19
罐号	301	303	301	303	302	304	301	303
放罐单位 (r/ml)	3075	2647	5175	4150	6440	5376	4230	5175

1、2和4为紫外与 NTG 复合处理, 8411—3和5是噬菌体自然选择的菌株, 生产水平略高于出发菌。

1985年元月3至19日, 使用8411—1、4、5三个菌株, 在7—10吨罐中试验, 发酵单位列于表2, 其中发酵水平最高的是8411—5。

(六) 抗噬菌体菌株发酵周期的测定

卷曲链霉菌原发酵周期为96小时, 经过选育获得的抗噬菌体菌株, 在大罐中发酵周期明显缩短。用常规摇瓶发酵, 定时取样测定抗菌素发酵单位, 结果可见, 发酵75至96小时, 产量都在4000r/ml以上, 而以78小时生产水平最高(见图1)。

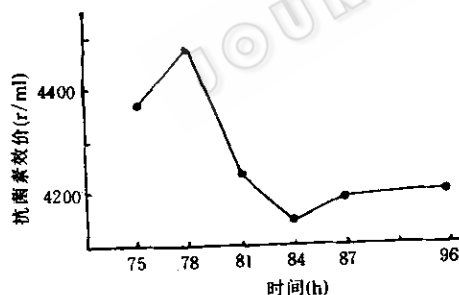


图1 发酵时间与抗菌素生产的关系

从河南省安阳市第一制药厂卷曲霉素生产的异常发酵液中, 分离得到一株噬菌体, 定名为 $\phi sc^{[1]}$, 侵染力很强, 对卷曲霉素生产危害很大。我们通过噬菌体自然选择结合理化因子诱变处理, 选育出5株抗噬菌体的卷曲链霉菌, 在工厂环境和设备中存在着大量噬菌体的情况下投入生产, 表现了良好的抗性, 经多次传代, 生产性能稳定, 部份罐批因生产工艺条件的影响, 发酵单位较低。

由摇瓶和大罐试验结果可见, 单独采用噬菌体自然选择, 方法简单易行, 可以获得优良的抗噬菌体菌株。两种方法选获的菌株, 菌体和菌落形态均无变异, 而发酵周期比原菌种缩短, 从而提高了经济效益。菌株对发酵基质的代谢水平也有一些变化, 我们正在研究改进发酵原材料配方, 以进一步降低生产成本。

参 考 文 献

- [1] 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, 北京, 第33—34页, 1974。
- [2] Adams. M. H.: Bacteriophages, Interscience pub. Inc., New York, pp. 450—451, 1959.
- [3] 陈中孚等: 遗传, 4(1): 36—37, 1982。
- [4] 崔汉钧等: 微生物学报, 26(3): 226—231, 1986。