

灰鏈黴菌噬菌體的初步研究*

許文思 童 村 單紹霖 王文智 劉 堯

(化學工業部國營上海第三製藥廠)

放線菌噬菌體是鏈黴素工業生產上必須解決的關鍵問題。由於它體積的微小,和存在的廣泛,在現代機械設備的條件下,尚不能有效地防止鏈黴菌在發酵過程中不受它的侵蝕。爲了抑制噬菌體的繁殖,雖可以使用各種化學物質如草酸鹽,檸檬酸鹽等^[1],但最好方法,正如 Г. М. 瓦西列夫同志所指出的“最有效的方法就是在選種上能得到抗噬菌體的新菌種”^[2],在這方面研究最早的是 Woodruff 與 Waksman 等人^[3,4],他們在 Sandek 和 Colingsworth^[5]報導發現鏈黴菌噬菌體的同年(1947)就介紹了用雙層平板培養法,選育抗噬菌體的鏈黴菌菌種。嗣後 Carvajal^[6]進一步的指出;抗噬菌體的鏈黴菌新種,產生鏈黴素的能力不低於原菌種。他雖已發現鏈黴菌在液體培養基中感染噬菌體,後還能產生再生菌絲,他仍用雙層平板法選育新菌種。M. H. 彼什柯夫和 Я. H. 勞欽基契^[7]研究了再生菌絲生長現象並將抗噬菌體菌種選種工作,放在堅實基礎上。他們在液體培養基上經過一系列的觀察,確定了再生菌絲是由一部分抗噬菌體的嗜鹼性原形質發展而成的。因此他們稱這部分嗜鹼性原形質爲再生菌絲的核心。本實驗室在試製鏈黴素過程中,所遭遇到的放線噬菌體問題和抗噬菌體菌種的選育,就得益於上述的結論,在選育抗噬菌體菌種的同時,還對本實驗室所分離出來的灰鏈黴菌噬菌體進行了初步研究,茲將所得結果報告於下。

(一) 鏈黴菌噬菌體的發生和證實

1953年12月我廠用鏈黴菌 530 號菌種進行發酵研究工作,爲了在 200 公升發酵缸中發酵,乃先將該菌種種入 20 公升種籽缸內培養,開始時生長正常,但 24 小時後,發現培養物有不正常自溶現象,經顯微鏡檢查確定不是染菌,當時估計可能是由於放線菌噬菌體侵入的結果,所以就保存了這一缸培養液,並通過一系列試驗,肯定了噬菌體的存在。

1. 噬菌現象 將鏈黴菌 530 號菌種先接種於瓦克斯曼固態培養基斜面上,同時將斜面的下半部分用上述種子缸內菌絲自溶液的無菌濾液塗抹,在 27°C 培養 24—48 小時後,在斜面下半部顯出,由於塗有種子缸菌絲自溶液的無菌濾液,鏈黴菌已不能生長,

* 1956 年 4 月 20 日收到。

斜面的上半部分則生長良好，區別非常明顯，又將上述無菌濾液，用蒸餾水稀釋到 10^{-5} — 10^{-9} ，取一定量與鏈黴菌 530 號菌種培養 24 小時的菌絲，同時加入已鋪有一定量的瓦克斯曼固體培養基作為底層的雙碟中，再用 5 毫升未凝固的（40—60°C）固體培養基固定之。在 27°C 培養 24—48 小時後，在平板上就能出現因噬菌體侵蝕所形成的蝕孔，該蝕孔的數目和稀釋倍數成反比，在顯微鏡下觀察，被侵蝕的菌絲，是不正常形態。如用美藍液染色，則着色不勻。同一條菌絲粗細不一，有異常膨大的部分，一般的是短小、彎曲、粗大，這是明顯的有別於正常菌絲的。

2. 噬菌體在菌絲繁殖時才能繁殖 為了獲得噬菌體，我們在培養 24 小時的 530 號菌絲中，加入少量上述種子缸中的無菌濾液，在 27°C 繼續培養，530 號菌絲則很快溶解。24 小時後，在培養液中已無完整菌絲。用每分鐘 4000 轉離心機處理後，再經塞氏過濾器過濾，即得無菌濾液。將此濾液稀釋，在雙碟中和 530 號菌絲共同培養，每毫升約能產生 10^9 — 10^{10} 個蝕孔和原來種子缸中的無菌濾液產生蝕孔的能力一樣。而當培養基中沒有活的菌絲存在時，這種產生蝕孔的能力不能增加。

通過以上試驗，證實該菌絲自溶液中確有噬菌體存在。因此由 530 號菌絲自溶液中分離出來的噬菌體，被稱為 530 號噬菌體，以下簡稱為 530-P。530-P 的培養液每毫升能產生蝕孔 10^9 — 10^{10} 個，所以它的濃度是 10^9 — 10^{10} 個/毫升。

3. 噬菌體的穩定性 將 530-P 培養液，在 4°C 冰箱中保存 7 天，其濃度減低 24% 左右。若在較低濃度下浮懸於蒸餾水中，死亡更快，在 72 小時即完全喪失活動力。嗣將該噬菌體原液，用冷凍乾燥處理並保存在真空安瓿中，經過兩年餘，活力尚未減少，這說明鏈黴菌噬菌體在冷凍乾燥環境下，能保存得很長時期，結果見表 1。

表 1

日 數	開 始	1	2	3	5	7	附 註
高濃度	3.8×10^9 /ml	4.0×10^9 /ml	—	3.2×10^9 /ml	3.1×10^9 /ml	2.9×10^9 /ml	在冰箱中
低濃度	813	283	9	0			浮懸在蒸餾水中

註：噬菌體濃度是以每毫升噬菌體溶液經過適當稀釋後和 530 號菌絲共同在雙碟上培養時能形成的蝕孔數來表示。

530-P 是不能耐滅菌溫度的，當加熱到 115°C，在 30 分鐘內活動力已全部消失。

(二) 變異作用與菌種選育

Woodruff 和 Carvajal^[3,6]認為選育抗噬菌體菌種的最好方法，是將對噬菌體敏感的鏈黴菌孢子和噬菌體同時在雙碟上培養，可以產生抵抗性的菌種，而且產生鏈黴素的能力不低於原菌種，這就是雙層平板法。

根據彼什柯夫和勞欽基契^[7]的工作，我們製定了再生菌絲選育方法。這是利用在

液體培養基中產生再生菌絲的特性並在固體培養基上培養這種菌絲分化後所產生的孢子。在實驗室中雙層平板與再生菌絲選育法皆用之。

雙層平板法是將熱熔的瓦克斯曼固態培養基冷至 $60-40^{\circ}\text{C}$ 後,加入 530 號菌種孢子浮懸液,再加入一定量噬菌體培養液。爲了防止染菌並篩除低單位菌種可加入 100—500 單位鏈黴素^[1],然後倒入已鋪有底層的雙碟內,在 27°C 培養,得到的菌種移種在瓦克斯曼培養基斜面上,以後再用黃豆餅培養基在搖瓶中測定抗噬菌體的能力和產生鏈黴素的活力。

再生菌絲選種法是選定一種液體培養基後,將對噬菌體敏感的鏈黴菌孢子和高濃度噬菌體同時種入培養基中,在 27°C 振盪培養。4 天以後,用顯微鏡檢查,可發現正常菌絲,到 6—7 天時由於再生菌絲的形成,能使培養基變爲很稠。將此再生菌絲繼續培養,一直到經過全部形態上的分化而自溶以後,將再生菌絲自溶液在適宜培養基上作劃線分離,將菌落再移種到加有 0.2% 天門冬素的瓦氏培養基斜面上,再在黃豆餅培養基中測定產生鏈黴素活力,和抗噬菌體能力。

所用培養基成分如下:

1. 黃豆餅培養基: 作爲菌落效價測定和噬菌體培養。

黃豆餅粉	1.5%;	蛋白腺(楊氏藥廠出品)	0.5%;	澱粉	1%;
葡萄糖	2%;	硫酸銨	0.25%;	硫酸鎂	0.025%;
磷酸二氫鉀	0.02%;	碳酸鈣	0.5%;	pH	7.6—7.8。

2. 蔡氏 (Czapek) 培養基作產生再生菌絲用。

3. 瓦克斯曼液體培養基作產生再生菌絲用。

分離培養基除了瓦氏固態培養基外,又製定了一種酵母膏培養基,成分如下:

葡萄糖	2%;	酵母膏(國產)	2%;	KH_2PO_4	0.1%;	pH	7.6—7.8;	瓊脂	0.5%。
-----	-----	---------	-----	--------------------------	-------	----	----------	----	-------

應用雙層平板法將 530 號菌種通過 530-P 處理後得到 5 種不同型菌落: (1) 針帽型,菌落細小如針尖,有抵抗噬菌體能力,但移種時,生長不好,不能繁殖; (2) 酵母型,祇長營養菌絲,不長氣生菌絲,不易移殖; (3) 野生型,形態正常,生長快,抗性好,但不產生鏈黴素; (4) 異常型,菌落表面有不規則皺紋,又可分爲生孢子和不生孢子兩種,移種時不易生長,也不能產生鏈黴素; (5) 正常型,易生產孢子,鏈黴素生產能力也不低於原種,但祇能抗低濃度的噬菌體。

用此方法共選出正常型集落 500 餘個,將幾個效價較高的變異菌落,列於表 2。

經再生菌絲處理,所得的菌落,大約可分爲正常型大菌落和針帽型小菌落。這些正常型菌落在瓦氏培養基上不易生長芽孢,在酵母膏培養基上,生長較好,這些正常型集落能抵抗高濃度的 530 噬菌體,而且它們產生鏈黴素的能力也不低於原種,結果見表 3。

表 2 用雙層平板法選出的抗噬菌體鏈黴菌菌種的抗性和效價測定

選得菌種	出發菌種	分離培養基	效價/ml	噬 菌 體 抵 抗 力		
				3.0×10^9 /ml	3.0×10^8 /ml	3.0×10^7 /ml*
R ₁	530	瓦氏培養基	600	—	—	+
R ₃	530	瓦氏培養基	500	—	—	+
R ₁₀₁₄	530	瓦氏培養基	550	—	—	+
530			500	—	—	—

* 這 3 種噬菌體濃度是指 1 毫升培養液中所含有的噬菌體數目。“—”號表示不能生長。

表 3 抗噬菌體菌種所產生的鏈黴素效價比較

(表中菌種都是用再生菌絲體選育出來的)

菌 種	出發菌種	再生菌絲培養基	分離培養基	斜面接種培養基	效 價
X ₁	R ₁	蔡氏培養基	酵母膏培養基	天門冬素培養基	400
X ₄	R ₁	蔡氏培養基	酵母膏培養基	天門冬素培養基	550
X ₁₀	R ₁	蔡氏培養基	酵母膏培養基	天門冬素培養基	500
R ₁₈₄	R ₁	黃豆餅培養基	酵母膏培養基	酵母膏培養基	540
R ₁₉₂	R ₁	黃豆餅培養基	酵母膏培養基	酵母膏培養基	430
R ₂₈₃	R ₁	黃豆餅培養基	酵母膏培養基	酵母膏培養基	550
R ₄₄₂	R ₁₀₁₄	黃豆餅培養基	蔡氏培養基	酵母膏培養基	600
530					550

(三) 噬菌體的類型

在研究過程中,由 R₁₈₄ 與 R₂₈₃ 兩菌種,又分離出兩個噬菌體,分別稱之為 R_{184-P}, R_{283-P},經交叉抵抗試驗證明,這兩個噬菌體非但彼此不同,且與 530 噬菌體亦有區別,見表 4。

表 4 各種菌種對噬菌體的抵抗力

菌種 噬菌體	R ₁	R ₃₈₉	R ₁₈₄	R ₁₀₁₄	530	X ₄	S ₁₅
530-P	—	+	+	—	—	+	+
184-P	—	—	—	—	—	+	+
283-P	—	—	+	—	—	+	+

註: S₁₅ 是 X₄ 經單孢子分離而來;“+”表示能抵抗。

530-P 能溶解 R₁、R₁₀₁₄ 與原種, R_{283-P} 能溶解原種與 R₁、R₁₀₁₄ 和 530,但不能溶解 R₁₈₄,而 R_{184-P} 能溶解 R₁、R₁₀₁₄、R₃₈₉、530 和原種。由於這 3 株噬菌體的溶解性能不同,可以認為是 3 個不同型的。在我們選育所得的菌種中, X₄ 系統(包括 S₁₅)能抗 3 種噬菌體,在抗性上和其他菌種比較,有顯著的優點,當利用這些抵抗力菌種在 200 公升發酵缸中發酵和提純時,發現這種抵抗力菌種和原種已經發生生理上的變異,如發酵時間延長,產生色素影響提純工作,同時 530 號菌種,在生長到 72 小時時菌絲開始溶

解,到 80—92 小時,效價達到最高峯,一般約為 400—600 單位/ml,而抵抗性菌種要到 92 小時後才開始溶解,到 110—120 小時,效價達到 550—700 單位/ml。530 號發酵液,經離子交換劑,提取後得到 600 微克/公絲白色粗製品,並很容易得出氯化鈣複鹽結晶,但由這些抵抗性菌種所得的發酵液,用同樣方法提取,提出的粗製品效價只有 500 微克/公絲而且是黃色。除用 S_{15} 菌種的發酵液,曾得出氯化鈣複鹽結晶外,其他抵抗性菌種的發酵液,還沒有做出結晶。我們推測,經噬菌體處理而得的抵抗性菌種變異較大,除產生鏈黴素外,可能還產生甘露糖鏈黴素和色素,所以不能為一般提煉方法所分離,這一推想,很值得作進一步的證實。

結 論

在鏈黴素發酵過程中,突然發生了菌絲不正常的溶化現象,經研究證明了這種現象是由於放線菌噬菌體的侵入所引起,用再生菌絲法,選出了能抵抗噬菌體的新菌種 X₁ 等。菌種經噬菌體處理,菌落形態和菌種生理上均有甚大變化,效價並未降低。但由有抗噬菌體性能的菌種所產生的發酵液,在提純上還有困難。

參 考 文 獻

- [1] Perlman D.: *J. Bact.*, **61**, 135—143, 1951.
- [2] Г. М. 瓦西列夫: 論我國的抗生素研究和生產的任務, 25 頁, 1952.
- [3] Woodruff H., etc.: *J. Bact.*, **54**: (4) 535, 1947.
- [4] Waksman S., etc.: *J. Bact.*, **54**, 451—466, 1947.
- [5] Sandek, E. C. and D. R. H. Colingsworth: *J. Bact.*, **54**: 1047, 1947.
- [6] Carvajal F.: *Mycologia* **45**: (2) 209, 1953.
- [7] Пенков М., Раутенштейн Я. и Др.: *Микробиология*, **21**: 615, 1952.
- [8] Reilly, H. C.: Isolation of Streptomycin-producing strains of *St. griseus*. *J. Bact.*, **54**: 27, 1947.

A PRELIMINARY STUDY ON THE PHAGE OF *ST. GRISEUS*

Hsu Wen-shih, Tung Tsun, Shan Shao-lin, Wang Wen-chih and Liu Yao

The Shanghai National No. III Pharmaceutical Plant

(ABSTRACT)

Lysis was noticed all at a sudden in a streptomycin fermentation tank in 1953. The lysis was attributed to the presence of a phage which was isolated and preserved by lyophilization. Treating the phage sensitive strain of *St. griseus* with this phage in a double layer pour plate quite a number of abnormal colonies were obtained. Their potency was not lower than that of the original strain but their phage resistance was low. From the secondary mycelial growth of a phage treated shake-flask culture, however, many phage resistant colonies were grown out on a yeast extract containing medium. Their streptomycin producing capacity was unaltered. From the phage treated colonies new phages were isolated. By a cross resistance test it was proved that the newly isolated phages were of different types and their lysogenicity was different from that of the first isolated strain.

Using the phage resistant strains for streptomycin production in a 200 l fermentor the fermentation cycle was prolonged. With the exception of a strain S₁₅ from whose fermentation broth a CaCl₂-complex salt of streptomycin hydrochloride was obtained, many other strains gave rise to pigmented fermentation broth containing unknown antibiotic substances rendering the streptomycin unextractable by the conventional method.