

短小芽孢杆菌 1037 抗温和性噬菌体菌株 的筛选及投产¹⁾

蒋如璋 于利民²⁾
(南开大学生物系,天津)

侯炳炎 吴昆慧
(天津酶制剂厂)

由短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) 260/52 诱筛的 1037 菌株,在 500 升罐上产碱性蛋白酶的能力稳定在 8,000 单位/毫升以上,生产能力较出发菌株提高 40% 以上^[1]。但该菌株在 10 吨罐上的产酶水平并不高于出发菌株。发酵中表现出二级种子种龄显著延长,发酵周期延长,产酶速率低,泡沫增多,菌体生长略有下降等异常现象。发酵液经平板检查出现噬菌斑,从而证明为噬菌体感染。于是,开展了短小芽孢杆菌抗噬菌体菌株的筛选工作。本文报道有关噬菌体抗性菌株的筛选过程及投产情况。

材料和方法

(一) 菌株及噬菌体

1. 菌株 短小芽孢杆菌 1037 系短小芽孢杆菌 209 的一个衍生菌株;短小芽孢杆菌 289 系沈阳林土所分离,天津酶制剂厂保存。

2. 噬菌体 由天津酶制剂厂在不同地点采样、分离纯化的 pp1、pp2、pp3、pp4、pp5 和 pp6。

(二) 培养基

1. 肉汤培养基 牛肉膏 1%, 蛋白胨 1%, NaCl 0.5%, 蒸馏水配制, pH 7.2。固体培养则加琼脂 2%。

2. TY 培养基 按 Romig^[6] 法配制。用前加入 $\text{CaCl}_2(2.5 \times 10^{-3} M)$, $\text{MnCl}_2(10^{-5} M)$ 。固体加琼脂 1.5%; 半固体加琼脂 0.6%。

3. NBY 培养液 蛋白胨 0.3%, 酵母膏 0.3%, 牛肉膏 0.3%, NaCl 0.5%, 蒸馏水配制, pH 7.2。

4. 胨水 蛋白胨 1%, 蒸馏水配制, pH 7.0。

(三) 噬菌体的实验方法

1. 噬菌体原液的制备

(1) 液体法: 将敏感菌 1037 接入 50 毫升 TY 培养液, 36°C 摇床振荡培养 6 小时(菌液约 10^8 细胞/毫升)后, 加入 1 毫升 $1-5 \times 10^9$ PFU/ml (噬菌斑形成单位/毫升)的噬菌体液, 继续培养过夜。次日晨取菌悬液, 3,500 转/分离心 30 分钟, 上清液用 0.3μ 微孔滤膜过滤备用。滴度一般为 $1-9 \times 10^9$ PFU/ml。

(2) 固体法: 按中国科学院微生物研究所方法^[2]操作, 滴度一般可达 $10^{10}-10^{11}$ PFU/ml。

2. 噬菌斑观察

(1) 双层琼脂平板法: 按 Adams 法^[9], 37°C 温箱培养 8—12 小时后观察噬菌斑形态并计数。

(2) 软琼脂点滴法: 将适当稀释的噬菌体悬液混入 50°C 保温的半固体 TY 培养基内, 使噬菌体最终浓度约为 10^9 PFU/ml。用微细滴管取样点滴在上层含有指示菌的双层琼脂平板上, 37°C 培养 8—12 小时后观察噬菌圈形成。

3. 溶源性菌株的检查 将待测菌株转接 NBY, 36°C 振荡培养 48 小时后, 以新鲜 NBY 1:10 稀释, 80°C 保温 20 分钟, 继续振荡培养, 用软琼脂点滴法检查, 出现噬菌圈者则为溶源性菌株, 否则即为非溶源性菌株。此法用于抗温和性噬菌体菌株的初筛和复筛。

Jiang Ruzhang et al.: Screen of the Strain Resistant to Temperate Bacteriophage in *Bacillus pumilus* Str. 1037 and its Production.

1) 本文写成后蒙周与良教授审阅, 并提出宝贵意见, 特此致谢。苏秀英和王俊朴二同志曾参加部分工作。

2) 现在天津幸福食品厂工作。

4. 前噬菌体的诱导 用于抗温和性噬菌体菌株的复筛。

(1) 紫外线诱导: 将待测菌转接装有 5 毫升 TY 培养液的试管, 36°C 振荡培养过夜, 次日以新鲜 TY 1:10 稀释, 再振荡 3—4 小时, 用紫外线 (20 瓦、距离 30 厘米) 照射 60 秒, 继续振荡培养 2 小时后, 每管加入 0.5 毫升氯仿, 处理 30 分钟后, 以双层琼脂平板法观察噬菌斑形成。若出现噬菌斑, 则为溶源性菌株, 否则为非溶源性菌株。

(2) 丝裂霉素 C 诱导: 将待测菌转接 TY 培养液, 振荡培养至对数生长期, 用 TY 培养液稀释至 $2-5 \times 10^7$ 细胞/毫升, 置 37°C 水浴预热 5 分钟后, 加入丝裂霉素 C, 使其最终浓度为 1 微克/毫升, 继续保温 15 分钟, 离心洗涤后加入新鲜 TY 培养液, 36°C 振荡培养 2—3 小时后, 用双层琼脂平板法观察噬菌斑的形成。若出现噬菌斑则为溶源性菌株, 否则为非溶源性菌株。

(四) 非溶源性菌株的噬菌体抗性测验

1. 斜面测抗 将各非溶源性待测菌株转接斜面 2 只, 其一流加噬菌体液, 另一不加, 37°C 温箱培养过夜, 若不出现溶菌则为抗性菌株。

2. 抗性菌株的交叉抗性测验 取 0.2 毫升振荡培养至对数期的待测菌悬液, 分别与 0.1 毫升 10^5 PFu/ml pp1—pp6 噬菌体液混匀, 倒入双层琼脂平板培养, 并以敏感菌 1037 为对照。不形成噬菌斑者为抗性株, 抗二株以上 pp 系列噬菌体者, 则具有交叉抗性。

(五) 诱变剂及诱变处理

以甲基磺酸乙酯 (EMS) 和紫外线 (uv) 为诱变剂, 方法同前文^[1]。

敏感菌株 1037 $\xrightarrow{\text{诱变}}$ $\xrightarrow{\text{加噬菌体}}$ $\xrightarrow{\text{平板分离单菌落}}$ 斜面 \rightarrow 溶源性检查 (80°C, 20') $\xrightarrow{\text{淘汰溶源性菌株}}$
摇瓶测单位 $\xrightarrow{\text{淘汰低产菌株}}$ 斜面测抗 $\xrightarrow{\text{淘汰敏感菌株}}$ 溶源性复测 (80°C, 20'; uv 诱导) $\xrightarrow{\text{淘汰溶源性菌株}}$
摇瓶复测单位 $\xrightarrow{\text{筛选稳产高产菌株}}$ 交叉抗性测验 $\xrightarrow{\text{淘汰无交叉抗性及敏感菌株}}$ 溶源性复测 (丝裂霉素 C 诱导)
 $\xrightarrow{\text{淘汰溶源性菌株}}$ 抗温和性噬菌体菌株。

2. 抗性菌株的筛选 敏感菌株 1037 用 EMS 或 uv 诱变处理, 用 TY 培养液 1:10 稀释继

(六) 摇瓶筛选

经初筛选出的非溶源性菌株, 分别接摇瓶, 并同时加入 10^8 PFu/ml 的噬菌体, 36°C 往复摇床 (振幅 8 厘米, 110 次/分) 振荡培养 28 小时。以出发菌株 1037 和加噬菌体的 1037 的摇瓶作为对照。

(七) 蛋白酶活力测定

采用福林法, 方法同前文^[7]。

(八) 抗热孢子形成比 (S/N) 的测定

方法同前文^[1]。

结果和讨论

(一) 温和性噬菌体的证明

噬菌体分为温和性噬菌体和烈性噬菌体。温和性噬菌体可使寄生细菌溶源化而成为溶源性菌株, 这种菌种虽不感染同源噬菌体, 但在理化条件变化或在有异源噬菌体存在时, 仍会表现噬菌体感染的种种异常现象。所以, 有必要先检验分离的六株噬菌体是不是温和性噬菌体。

最简单的方法是将敏感菌株 1037 与各单一噬菌体同时接入 NBY, 培养成芽孢, 再以新鲜培养基 1:10 稀释, 并在 80°C 下处理 20 分钟后进行培养, 如仍能检出大量游离噬菌体, 则所测噬菌体为温和性噬菌体。经重复试验证明, pp1—pp6 六株噬菌体都是温和性噬菌体。

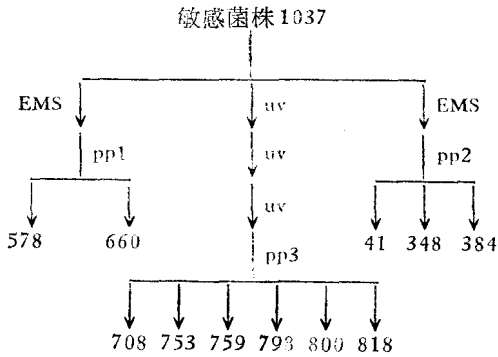
(二) 抗温和性噬菌体菌株的筛选

1. 筛选方案 短小芽孢杆菌 1037 是一个溶源性菌株。它在有 pp 系列噬菌体存在时往往表现不出发酵单位下降 (资料未列出), 因此, 不能采用一般筛选抗噬菌体菌株的方法^[3-6]来筛选抗温和性噬菌体菌株, 而必须着眼于淘汰溶源性菌株。我们采用了如下的筛选方案:

续振荡 4—5 小时后, 加入噬菌体 (最终浓度约 10^8 PFu/ml), 继续振荡培养过夜。次日, 适当

稀释涂平板, 置 37°C 温箱培养 24 小时, 室温放置 24 小时后, 随机挑单菌落转接斜面。

按上述筛选方案, 由 686 个单株中筛选出了 30 个非溶源性菌株。其中有 15 个菌株对 6 株噬菌体表现不同程度的交叉抗性。在这 15 株中, 有 12 株抗 6 株噬菌体。溶源性及交叉抗性复测证明, 有 11 株确系抗 pp1—pp6 菌株。它们的筛选谱系如下:



各步的筛选效率见表 1。由表 1 看出, 溶源性检测一步就淘汰了 70% 以上的溶源性菌株。因此, 这是一个很有效的方法。在筛选过程中发现有些菌株是拟抗性菌株^[40]。

(三) 抗株与出发菌株的菌落形态及孢子

形成比 (S/N) 的比较

从具有交叉抗性的菌株中挑出 384、578 和 708 三个菌株, 分别在肉汤平板上作单菌落分离, 37°C 温箱培养 48 小时后, 观察单菌落的形态特征, 并接 NBY 培养液, 进行抗热孢子形成比的测验, 结果见表 2。由表 2 可见 384 等三个抗株与敏感株 1037 相比, 菌落形态基本相同, 只是抗热孢子比 (S/N) 值在本实验条件下略有差异。

(四) 中型发酵试验及投产

1. 中型发酵试验 按前文^[7]的方法先后以 384、578 和 708 三个抗性菌株进行了 500 升罐发酵试验, 结果见表 3。由表 3 可见种龄和发酵周期已恢复正常^[7]。虽然在发酵罐内仍然可以检出约 $10^2-3 \times 10^4$ PFU/ml 的噬菌体, 但并不影响发酵进程。平均发酵单位不低于敏感菌株 1037 的水平^[4]。

2. 投产情况 自投产以来, 用 10 吨和 20 吨发酵罐共生产了 65 批次, 结果见表 4。发酵总平均单位为 8,305/毫升, 较 260/Ω 发酵单位提高了 70%, 每吨酶制剂粮耗由原来的 807 公斤降为 447 公斤, 下降率为 44.6%。由单罐发

表 1 各筛选操作步骤的筛选效率¹⁾

诱变剂	噬菌体	挑单株数	溶源性检测		摇瓶初筛		斜面测抗		摇瓶复筛		溶源性复测		交叉抗性测验		丝裂霉素 C 诱导	
			L	NL	高产	低产	R	S	高产	低产	L	NL	R	S	R	L
EMS	pp1	150	90	60	20	40	20	0	20	0	6	14	5	9	2	0
EMS	pp2	310	244	66	17	49	14	3	14	0	8	6	6	0	3	0
uv	pp3	146	109	37	18	19	18	0	18	0	11	7	7	1	6	1
uv	pp6	80	66	14	6	8	6	0	6	0	4	2	0	2	0	0
合计		686	509	177	61	116	58	3	58	0	29	29	18	12	11	1
筛选效率 (%)		100	74.2	25.8	8.9	16.9	8.5	0.4	8.5	0	4.2	4.2	2.5	1.7	1.6	0.15

1) L 溶源性菌株; NL 非溶源性菌株; R 抗性菌株; S 敏感性菌株。

表 2 抗株及敏感株 1037 的菌落特征和 S/N 值的比较

菌株	菌落平均直径 (毫米)	菌落形态				S/N
		色泽	周缘	折皱特征	质地	
384	2.5	浅黄	稍不整齐	同心, 放射状	干燥, 不透明	0.81—1.0
578	1.5—2.0	浅黄	稍不整齐	同心, 放射状	干燥, 不透明	0.83—1.0
708	2.5	浅黄	稍不整齐	同心, 放射状	干燥, 不透明	0.81—1.0
1037	2.5	浅黄	稍不整齐	同心, 放射状	干燥, 不透明	0.41—0.71

表3 抗株在500升罐上的发酵试验情况

菌株	批次	平均种龄(小时)	发 酵		最高单罐水平 (单位/毫升)	吨酶粮耗 (公斤)
			周期(小时)	单位/毫升		
384	5	15.7±1.32	16.0±1.5	9,085±1,727	11,652	397
578	2	15	20	9,534	9,785	377
708	4	15.0±2.0	22.0±1.5	9,332±1,806	11,060	385

表4 10吨和20吨罐生产情况¹⁾

菌株	生产罐(吨)	批次	平均种龄 (小时)	发 酵		最高单罐水平 (单位/毫升)	平均发酵水平 (单位/毫升)	吨酶粮耗 (公斤)
				周期(小时)	单位/毫升			
384	10	15	15 ± 1.6	20 ± 1.6	8,789 ± 2,437	13,826	8,195	452.8
	20	25	16 ± 1.4	17 ± 2	7,603 ± 3,221	12,442		
578	10	13	16 ± 1.3	21 ± 1.7	9,237 ± 1,021	10,836	8,415	442.2
	20	6	16 ± 2.9	16.5 ± 3.1	7,670 ± 3,223	9,777		
平均	—	—	—	—	—	8,305	—	447.5

1) 酶收率按0.65计;麸皮3斤折粮1斤。

酵最高水平及标准偏差可以看出生产还不够稳定。大罐取样检测,噬菌体浓度变动在 1×10^3 — 3.7×10^4 PFU/ml 范围内。发酵单位提高后,制剂的酶活也由原来的 50,000—60,000 单位/克提高到 80,000—100,000 单位/克,这就为细菌碱性蛋白酶的推广应用提供了新的可能性。

比增大(12小时以后),产酶很快达到高峰;当抗热孢子比达 0.56 时,发酵液酶活单位下降。

与出发菌株 1037 在 500 升罐上的发酵进程曲线^[1]相比,抗株 578 开始产酶的时间提前了 6—8 小时,发酵周期由原来的 25—30 小时缩短为 18—22 小时。抗株 384 亦表现类似特性。所以,这些优良的生产性状似乎是这类抗株共有的。这是否与噬菌体抗性突变同时影响了产酶和孢子形成的正常调节机制还有待研究。

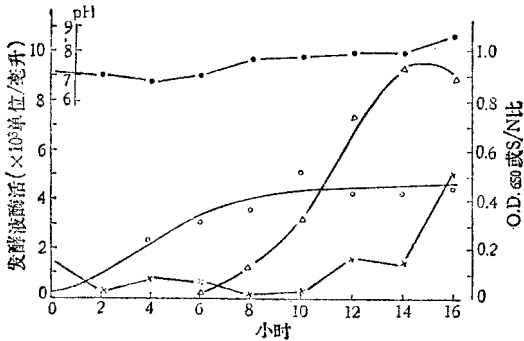


图1 抗株 578 在 20 吨罐上的发酵进程曲线

○—○ 菌体生长, O. D.₆₅₀; ×—× S/ N 比;
△—△ 发酵单位; ●—● pH 值。

3. 抗株在发酵罐上的发酵进程 为了探索抗株的生长特性及产酶规律,考察了抗株 578 在 20 吨罐上的发酵进程,典型结果见图 1。由图 1 可见,生长、抗热孢子形成(S/N)、pH 和产酶之间有一定的依存关系。发酵前期至中期(2—10 小时),群体中的抗热孢子比一直保持在 0.03—0.1 之间,并高速率产酶;当群体中抗热孢子

参 考 文 献

- [1] 生物系微生物专业 74 级毕业实践小组、天津酶制剂厂: 1978。南开大学学报(自然科学版),(2): 85。
- [2] 中国科学院微生物研究所噬菌体组: 1973。噬菌体及其防治,科学出版社。
- [3] 北京大学制药厂生物化学专业多粘菌素 E 研制小组: 1973。北京大学学报,第 1—8 页。
- [4] 上海溶剂厂培菌室: 1975。微生物育种学术论文集(研究报告),科学出版社,第 51 页。
- [5] 胡愈君等: 1975。微生物育种学术论文集(研究报告),科学出版社,第 56 页。
- [6] 合肥制药厂、上海植物生理研究所微生物室: 1977。微生物学报,17(4): 318。
- [7] 天津酶制剂厂、南开大学生物系: 1977。遗传学报,4(3): 248。
- [8] Romig, W. R.: 1961. *J. Bacteriol.*, 82:135.
- [9] Adams, M. H.: 1959. *Bacteriophages*. Interscience Publishers, INC. New York.
- [10] Hayes, W.: 1968. *The Genetics of Bacteria and their Viruses*. Blackwell Scientific Publication, Oxford and Edinburgh. pp. 448—451.