

噬菌体的防治

中国科学院微生物研究所噬菌体组

自无产阶级文化大革命以来,我国群众性的应用微生物的科学实验活动已普遍展开。目前,微生物已被广泛地应用于农业、工业和医药卫生等方面。但在微生物生产和推广工作中,往往由于污染了噬菌体而给工作带来严重损失。

微生物工业生产中出现噬菌体是个普遍现象,我们在氨基酸、核苷酸、水杨酸、丙酮丁醇、抗菌素、酶制剂、微生物农药、菌肥的生产中都曾遇到噬菌体问题。由于对噬菌体了解较少,往往使人们迷惑不解和不知所措,以致误认为责任事故。另一方面,由于过高估计防治中的困难,认为必须长期停产或改换生产品种,甚至要搬迁厂址等等。其实,只要我们认识噬菌体的特点,采取积极的措施,完全有可能把其危害限制到最低程度。

一、一般特性

噬菌体是一种感染细菌或放线菌的病毒。广泛地分布在自然界,主要存在于有菌体生长的土壤、污水中。但是,它的个体比细菌小数百倍,可以附着于尘埃随风飘移。因此,能长久地扩散和传播到一定的范围,并能脱离寄主而存活,又能大量迅速繁殖子代噬菌体,(在十几分钟至一个小时内,一个细胞感染一个噬菌体后可以释放出数十个至数百个子代噬菌体),这样,在深层发酵和土法生产中污染噬菌体后,将会造成严重的危害。

另一方面,噬菌体对日光(紫外线)照射、高温、过偏的酸碱度和一些常用的杀菌剂非常敏感。一般说来,对寄主要求专一性很强:象产谷氨酸的北京棒状杆菌噬菌体就严格地限于侵染北京棒状杆菌。但也有些噬菌体可以感染相近的种或属的菌株,四环素生产菌的噬菌体就是一例。噬菌体较易发生突变,受不同因子影响可以发生各种突变,如寄主范围突变体等。

此外,在自然界还存在另一种类型的噬菌体,称作温和性噬菌体,它们以‘前噬菌体’的方式存在于寄主染色体中,可随寄主繁殖而增殖,延续传代,一般不引起细胞裂解,经过诱导可释放大量完整的具有侵染力的噬菌体,但需要一定的敏感菌株作为指示菌在双层平皿中出现噬菌斑,这种菌株叫作溶源性菌。在生产中有些细菌和放线菌都是溶源性菌,应该予以重视。

根据以上所谈到的有关噬菌体特点,我们可以寻找适当的有效措施,控制噬菌体的危害程度。

二、一些污染的现象

各种发酵系统污染噬菌体时,往往出现一些明显的异常变化:如碳源和氮源消耗的减缓,pH反常的改变,泡沫骤增,发酵醪液对流活动的减弱或停滞,发酵液色泽和稠度的改变,异常臭味的出现,菌体显著的减少和破碎引起光密度的下降和累积产物的锐减等等。一般根据每种发酵的特点,选择其中一项明显的和具有代表性的变化,作为判断感染噬菌体的依据。还可以直接利用双层琼脂法或单层琼脂法,观察噬菌斑的呈现来进行判定。将严重污染噬菌体的发酵液在平板上划线,也可以出现被噬菌体蚀空的圆形空斑。但是,这些方法都需要经过一段培养时间才能观察结果,不能在检查时立即确定。因此,有些单位对快速检查方法进行了一些探讨,如在杀螟杆菌生产中,利用对数期菌悬液,能在3—4小时内测出结果;在谷氨酸生产中,利用二羟基甲苯法测定感染噬菌体后的细胞所释放的核酸,来确定感染噬菌体问题。这些方法,还需要不断完善和改进,才能推广使用。

三、污染的原因

防治噬菌体,应该采取综合防治、防重于治的方针。首先,需要探明发生危害的原因和情况。利用双层琼脂法,检查空气过滤装置、发酵系统和车间内外环境。所取的检样可以包括土壤、污水、下水、空气、地面、管道、罐壁、容器、各种过滤材料、发酵液、排气、桌面、工作服、毛巾和鞋等。对于不能割制的对象可以用蘸无菌水的棉花擦拭其表面进行取样。通过检查可以分析噬菌体的污染来源和传播途径,以及进入发酵系统的缺口。在这里提出供作考虑的几个方面:1.由于空气过滤材料装置不良,引起倒置;灭菌后未能充分干燥;偶尔由于某些原因引起瞬时负压,导致发酵液倒吸进入过滤装置而失去过滤效能,造成污染倒罐;有时因过滤装置失效,并污染噬菌体,致使输入无菌室的空气含有一定数量的噬菌体。2.当罐内发生噬菌体污染后,通过排气、洗罐水或偶尔的溢液,可以大量散布噬菌体。车间内的空气流量计出口,可以将夹带在排气中

的噬菌体源源不断地传播到室内空气中,污染生产系统各个环节。3.通过工作人员取样检查和劳动操作,很易将沾污在手、工作服、容器、鞋和车辆上的噬菌体进行传播扩散。4.从明沟排出的污水,很易附着于尘埃土粒,随风飘流传播。

四、综合防治措施

(一) 消灭噬菌体的各种来源

通过检查发现问题后,首先应采取相应的方法消除设备装置中存在的缺陷和不合理部分,将罐内和管道的死角消除。对空气过滤器的净化应予以充分注意,实行严格的定期灭菌,并且确保干燥。对沾污噬菌体的地点可采用漂白粉水和石灰乳杀灭;合理改建排水沟道;修改碴土路面为沥青或水泥路面;改革排气装置,增设分离器,排气时应先对噬菌体进行处理后再放出,对生产系统和车间内部,除上述药物外,根据使用的对象和目的不同,可以采用新吉尔灭、过氧化氢、升汞、甲醛、乙醇、高锰酸钾和肥皂等,它们都具有杀灭噬菌体的能力。至于农村中土坑固体发酵法生产菌肥和农用抗菌素时,每批生产后,必须严格地进行消毒措施,包括铲除陈土和填入新土和使用廉价有效的消毒剂。当发生污染噬菌体时,应先使用石灰乳或漂白粉液彻底杀灭,然后再换土,对邻近的土坑也应处理。目前,有些生产微生物杀虫剂和5406菌肥工厂在制作粉剂和露天干燥时,带菌的粉剂微粒随风飘扬,其扩散直径可达四百米以上。因此,噬菌体也有机会传播,一些溶源性菌体传播到周围环境中,将自发地释放噬菌体,还可能发生突变,加剧噬菌体污染和传播。此外,有些工厂利用废渣时,在车间附近进行干燥,如四环素废渣虽已酸化处理,由于仍有噬菌体可以存活,因而也能继续污染环境,这应引起充分的重视。

(二) 预测

为了及时知道周围空气中噬菌体数量的变化,可以利用双重琼脂法,曝气30分钟,进行预测预报发生噬菌体危害的可能性,这种措施对于有的工厂可能是有益的,根据及时的警报,采取积极的措施,控制噬菌体的危害。

(三) 清洁卫生

从上述情况看来,在综合防治噬菌体中,对发酵工业提出一个保持微生物正常发酵的环境卫生问题。首先,应从思想上予以充分的重视,认识噬菌体在发酵生产中的危害性,只要我们掌握住噬菌体的特点,发动群众有的放矢地采取有力措施,噬菌体的危害是完全可以被克服的。在统一认识的基础上,制订必要的卫生制度,杜绝噬菌体的各种污染途径,消灭噬菌体;严格保证种子的安全生产和完善的管理;加强发酵车间四

周环境的绿化和美化,搞好环境保护工作。这些是实行以防为主的一个主要方面。

(四) 补救方法

不少工厂根据本厂的特点,对噬菌体的污染采取了一些切合实际而且行之有效的补救方法。如在谷氨酸生产中,有的厂对每批种子进行双层法检查,同时对被检种子进行降温保压,使接入罐内的种子保证无噬菌体污染,消除了噬菌体危害。利用噬菌体对其寄主范围要求严格的特点,可以备有在发酵特征上基本相近而又不相互抑菌的不同菌株,在罐内发生污染噬菌体时,大量接入另一菌种的种子或发酵液,继续发酵,以达到挽救损失而不致倒罐。当早期发现噬菌体侵染,残糖较高时,可以适当提高温度,85—95℃维持10—15分钟,尽量减少培养基中营养成分的破坏,而又能杀灭噬菌体,再补充一些促进细胞生长的玉米浆,重新大量接种,加速菌体生长发育,进行发酵。利用草酸、柠檬酸或其铵盐和钠盐,对于预防噬菌体的污染和继续侵染,确保种子的安全生产均有成效,还能产生提高产酸的趋势。据报道,三聚磷酸钠和植酸钠也有良好的药效。在丙酮丁醇生产中,对噬菌体和菌种进行充分的工作的基础上,可以有计划地轮换更替使用不同菌种进行生产,达到防治噬菌体的效果。利用枯草杆菌产生酶制剂时,可以有效地利用吡啶阻抑噬菌体的发展。一些抗菌素,如氯霉素和四环素类抗菌素,在低浓度时可阻抑噬菌体的发展,而对菌体生长却没有显著的抑制,也可以达到防治的目的。总之,发酵中加添药物阻抑噬菌体,尤其对医药和食品方面,必须严格注意产品中的残药量,能否符合卫生标准和长期积累的问题。

(五) 使用抗噬菌体的菌株

防治噬菌体的另一途径是选育和使用抗噬菌体菌种,这是一种较为经济和有效的手段。不少抗菌素的生产中采取此法获得显著的效果,链霉素生产中改用抗噬菌体菌株后,赢得长期稳定的不断高产的局面。开展选育工作前,应该充分收集和分离有代表性的噬菌体,作为选育的标准。这就有必要搞清环境中该菌株的噬菌体群。利用自然突变所获得的抗噬菌体菌株可能较为稳定,但有的菌种出现抗性突变的频率不高,可以辅以理化诱变剂和多种因子复合处理。选育的步骤和方法应根据要求,首先考虑抗性和生产单位。此外,也应照顾到发酵和提取的要求,以及其它产物的可能性。选育的机率不仅与方法有关,很重要的是涉及到出发菌株。初步选出的抗噬菌体菌株应用来进行环境中噬菌体的再分离和测定,便于补遗缺漏收集的噬菌体,通过再选育而获得真正实用的抗种。抗噬菌体菌种投入生产后,其它相应的管理和卫生工作也应紧

密协调配合,确保新菌种能长期使用。

总之,使用抗噬菌体菌种是防治噬菌体危害的一种有效手段,但并不是唯一有效的。作为综合防治的

基础,应该充分实现微生物正常发酵的环境卫生。在这一基础上,综合使用各种结合具体情况的方法,才能积极有效地控制噬菌体危害。