

不产生胞外多糖的假单胞菌突变菌株 E₁₆

陆 杨 森

(安徽农业大学, 合肥 230036)

摘要 在适宜培养条件下, *Pseudomonas* sp. 31260 能将木糖转化为酸性胞外多糖 (EPS), 用甲基磺酸乙酯 (EMS) 诱变处理 *Pseudomonas* sp. 31260 得到一株完全不产生胞外多糖的突变菌株 E₁₆。

关键词 胞外多糖; 突变菌株 *Pseudomonas* sp. 31260

Pseudomonas sp. 31260 菌株, 能将木糖、酶水解获得的木聚糖 (Enzymatic digests of xylose) 及废亚硫酸盐纸浆, 转化为具有高商品价值的酸性胞外多糖 (Synthesizing acidic extracellular polysaccharides) 简称 EPS, 当进一步研究其合成途径及遗传的调控时, 需要有 EPS 缺陷型的突变菌株。

用甲基磺酸乙酯 (Ethyl methanesulfonate 简称 EMS) 处理 *Pseudomonas* sp. 31260^[1], 因该菌株菌体荚膜厚对诱变剂有强的抗性, 故采用多次、不断增高诱变剂用量的方法, 先获得 EPS 产量减少了的突变菌株 A, 突变株 A 再用 EMS 处理, 获得 EPS 产量更少的突变株 d, d 再用更高浓度 EMS 处理, 最终筛选出完全不产生 EPS 的突变菌株 E₁₆, 为进一步研究 EPS 代谢、遗传调控提供条件。

1 材料与方法

1.1 诱变出发菌株

Pseudomonas sp. 31260 由纽约州大学环境科学与森林学院 J. P. Nakas 教授的微生物实验室提供。

1.2 诱变剂

甲基磺酸乙酯 (Ethyl methanesulfonate) 由 J. P. Nakas 教授的实验室提供。

1.3 EPS 检测试剂

① Cellufluor (荧光发光剂) 亦由 J. P. Nakas 教授的实验室提供, 用来检测 EPS 的一种产生荧光的染料。当 *Pseudomonas* sp. 31260

生长在含有 Cellufluor 的琼脂平板上的菌落, 置于紫外线光 (U. V) 下, 菌落发出荧光, 表明含有 EPS, 如果经诱变处理的菌体, 生长在上述平板上, 置于 U. V. 光线下, 则菌落无荧光, 表明不产生 EPS, 即为突变菌株^[2]。

② EPS 沉淀剂: 15% 溴化十六碳烷基三甲铵 (Hexadecyltrimethyl-ammonium bromide) 或 95% 乙醇, 遇胞外多糖则产生白色絮状沉淀物。

1.4 培养基

矿质盐培养基: 含木糖 1%; NH₄Cl 1g/L; KH₂PO₄ 5.44g/L; 6ml/L 微量元素液 (250ml 含 MgSO₄ · 7H₂O 2.5g, MnCl₂ · 4H₂O 0.25g, FeSO₄ · 7H₂O 0.1g, CaCl₂ · 2H₂O 0.025g), 琼脂 15g, pH8.5, 另加入荧光染料 Cellufluor 200mg/L。

1.5 诱变处理

取培养 48h 的 *Pseudomonas* sp. 31260 一环接入有 50ml 培养基的三角瓶中, 置振荡机上振荡 (200 r/min), 保持 28℃, 培养 48h, 然后加入 1ml EMS, 继续培养 1h, 取出倒入灭菌离心管, 离心 30min (10000r/min), 倒去上层澄清液, 留下菌泥 (体), 加入 50ml 灭菌培养基 (不含 1% 木糖), 摇动、洗涤, 再离心, 弃去澄清液, 加入培养基 (含木糖 1%) 50ml 充分摇动,

本文系作者 1989.10—1990.9 在美国纽约州大学环境科学与林业学院 J. P. Nakas 教授微生物实验室所做的部分研究
1994-01-17 收稿

倒入无菌的 250ml 三角瓶中, 置摇瓶机振荡, 28℃ 培养 12h,

1.6 突变菌株的分离与筛选

用稀释平板分离法, 即取 1ml 经诱变处理的菌悬液制成系列稀释液。吸取 1ml 稀释为 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} 菌悬液分别置入无菌培养皿, 然后各加入已融化并冷却至 50℃ 15ml 培养基 (内含 Cellufluor), 混合均匀、冷却、置 28℃ 培养 2—6d, 待菌落长出后, 挑选菌落变小, 在 U. V 照射下无荧光出现的菌落, 进一步纯化分离, 继续检测 10d, 无荧光出现的菌落, 说明该菌株确实不产生 EPS, 是突变菌株, 挑取一环接种于斜面试管培养、保存。

1.7 诱变程序和 EMS 剂量^[3]

出发菌株 *Pseudomonas* sp. 31260
 $\xrightarrow[1h]{1mlEMS/50ml\text{ 培养液}}$ 变异菌株 A (菌落变小, EPS 少)
 $\xrightarrow[1h]{1.5mlEMS/50ml\text{ 培养液}}$ 突变菌株 d (菌落比前变小, EPS 更少)
 $\xrightarrow[1h]{2mlEMS/50ml\text{ 培养液}}$ 突变菌株 E_{16} (菌落更小, 不产生 EPS)。

1.8 代谢产物 EPS 的检测

从平板分离得到的在 U. V 照射下无荧光反应的变异菌株 d 及 E_{16} , 分别接入内装 100 ml 培养液的 250ml 三角瓶中, (d 及 E_{16} 各接入三瓶), 在 28℃ 进行摇瓶培养 8d, 离心, 去掉细胞, 获取上层溶液, 加入过量的沉淀剂 15% 溴化十六碳烷基三甲铵 (Hexadecyltrimethylammonium bromide) 或 95% 乙醇, 如无白色絮状沉淀出现即表明无 EPS 产生, 确属 EPS 缺陷型的突变菌株。

2 结果与讨论

经过三次的浓度递增的 EMS 诱变处理, 获得突变菌株 d 及 E_{16} , 其菌落大小及在含 Cellufluor 荧光染料的培养基上生长的菌落对

表 1 突变菌株的菌落大小及 U. V 反应

	<i>Pseudomonas</i> sp. 31260	突变株 d	突变株 E_{16}
菌落大小 (直径 mm)	7.1	2.85	1.92
U. V 荧光反应*	+++++	+	—
荚膜	厚	薄	无
G 氏染色反应	—	—	—

* “+”示有荧光反应, 多者为强, “—”示无荧光反应

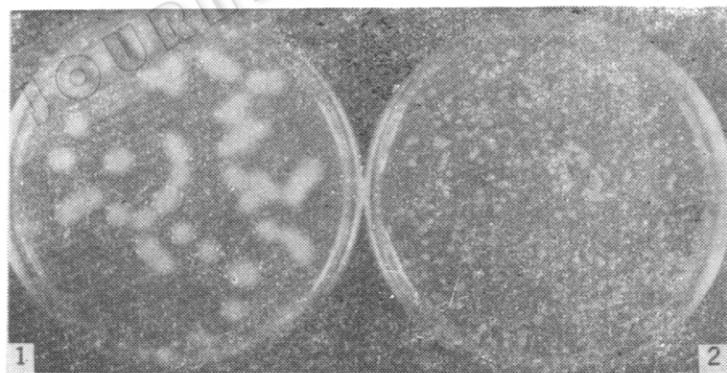


图 1 诱变前后菌落大小的变化

(1) 诱变前 *Pseudomonas* sp. 31260 (2) 突变株 E_{16}

表 2 发酵液的对沉淀剂的反应

	<i>Pseudomonas</i> sp. 31260	突变株 d	突变株 E_{16}
发酵液	灰白色、粘稠	灰白色、粘稠度低	淡黄色、半透明
15% 溴化十六碳烷基三甲铵	产生大量白色絮状物	产生少量白色絮状物	没有白色絮状物
95% 乙醇	产生大量白色絮状物	有少量白色絮状物	没有白色絮状物

UV 照射下荧光反应状况见表 1 和图 1。突变菌株 E_{16} 菌落很小,无荧光反应,荚膜消失。

当将出发菌株 *Pseudomonas* sp. 31260 及突变菌株 d 及 E_{16} ,分别接入装有 100ml 培养基的 250ml 三角瓶,进行摇瓶培养(200r/min),保持 28℃,培养 8d,离心,上层发酵液的状况及对沉淀剂的反应见表 2 及图 2。

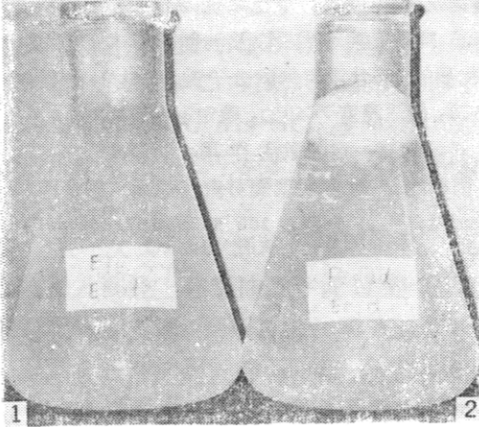


图 2 示发酵液与 95% 乙醇的反应

- (1) 突变株 E_{16} 反应没有白色絮状物 (无 EPS)
(2) *Pseudomonas* sp 31260 反应产生大量白色絮状物 (EPS)

表 2 及图 2 说明 *Pseudomonas* sp. 31260 能产生大量的 EPS,而经诱变筛选出的突变菌株 d 和 E_{16} 白色絮状物逐渐减少甚至完全失去了产生 EPS 的能力。

取洁净 250ml 三角瓶 9 只,分别准确加入 100ml 培养基,灭菌,分成三组,每组三瓶,分别

接入 *Pseudomonas* sp. 31260, 突变菌株 d 及 E_{16} 的菌种, 28℃ 摇瓶发酵 8d, 经离心、95% 乙醇沉淀、洗涤、半透膜透析、真空干燥、获得干的 EPS 产品, 同样证明突变菌株 E_{16} 已失去了产生 EPS 的能力, 是 EPS 缺陷型菌株, 产量状况见表 3。

表 3 EPS 产量 (g/100ml 发酵液)*

菌 株	培养 4d	培养 8d
<i>Pseudomonas</i> sp 31260	0.4280	0.5713
突变株 d	0.1655	0.3714
突变株 E_{16}	0	0

* 摇瓶重复 3 次平均值

综上所述, 用 20μl/ml EMS 诱变处理 *Pseudomonas* sp. 31260, 筛选出变异菌株 A, 再用 30μl/ml EMS 处理变异菌株 A, 筛选出变异菌株 d, 又用 40μl/ml EMS 处理变异菌株 d, 最终筛选出完全不产生 EPS 的突变菌株 E_{16} 。表明用逐步加大 EMS 剂量、连续诱变、筛选是获得突变菌株的有效方法。

参 考 文 献

- [1] A Darzins, A M Chakrabarty. J Bacteriology, 1984, 159 (1):9-18.
- [2] D Davidson Easson, J R Anthony, J Sinskey, et al. J Bacteriology, 1987, 169(10):4518-4524.
- [3] 《微生物诱变育种》编写组. 微生物诱变育种, 北京: 科学出版社, 1973, 39-59.

A MUTANT E_{16} WITH COMPLETE LOSS OF EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDES PRODUCTION

Lu Yangsen

(Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract *Pseudomonas* sp. 31260 is capable conversion of xylose to acidic extracellular polysaccharides (EPS), Mutagenesis of *Pseudomonas* sp. 31260 with Ethyl methanesulfomate (EMS) resulted in a mutant E_{16} deficient in EPS production on solid and in liquid medium.

Key words Extracellular polysaccharides, Mutant