

## 水杨酸生产菌抗噬菌体菌株的选育

法幼华 黄淑惠 梁家驷 徐诗伟

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从氧化萘生成水杨酸的铜绿色假单胞杆菌 *Pseudomonas aeruginosa* AS 1.860 菌株的不正常发酵液中分离到了噬菌体, 这些噬菌体呈杆状, 命名为 SA 噬菌体。用它处理敏感菌株获得了一批抗噬菌体的产水杨酸菌株, 其中 B<sub>1</sub> 菌株在摇瓶和罐的发酵中产酸都不低于原敏感菌株的水平。根据敏感菌株及 SA 噬菌体耐热性的差异, 我们用热处理法获得了不含活细胞的噬菌体液, 实践证明此法简便而有效。

前文<sup>[1]</sup>曾报道了一株铜绿色假单胞杆菌 *Pseudomonas aeruginosa* AS 1.860 能氧化萘生成水杨酸, 产酸浓度达每升 19 克以上。但在 500 升罐试产一段时间后, 突然出现了极不正常的现象, 如产酸率下降, 菌液骤然变清, pH 回升, 镜检发现异常细胞等。经双层琼脂法检查发现有噬菌斑, 从而证明是噬菌体侵染所引起的<sup>[2]</sup>。为了使水杨酸的发酵恢复正常, 开展了选育抗噬菌体菌株的工作。

### 材料和方法

#### (一) 敏感菌株

铜绿色假单胞杆菌 AS 1.860 菌株, 28℃, 肉汤培养 16—20 小时。

#### (二) 培养基组成

肉汤培养基: 牛肉汁 100 毫升, 蛋白胨 1 克, 氯化钠 0.5 克, pH7.0—7.2。

分离培养基: 上述肉汤培养基 100 毫升加琼脂 2 克。(双层琼脂培养基上层为 100 毫升肉汤培养基加琼脂 0.8 克, 下层同分离培养基)

蛋白胨溶液: 蛋白胨 1 克, 蒸馏水 1 升, pH7.0。

种子培养基: 尿素 1.5 克,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2 克,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 克, KCl 0.1 克, 自来水 1 升, 自然 pH。萘 1 克(紫外线灭菌)。200 毫

升三角瓶装 20 毫升。

发酵培养基: 尿素 2 克,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  20 克, NaCl 10 克,  $\text{CaCO}_3$  20 克, KCl 5 克, 自来水 1 升, 自然 pH。萘 4 克(紫外线灭菌)。200 毫升三角瓶装 20 毫升。

以上培养基除萘外, 均用 120℃ 灭菌 20 分钟。

#### (三) 噬菌体的分离、纯化与增殖

取不正常的发酵液按通常采用的方法<sup>[3]</sup>分离、纯化, 制备效价为  $10^{10-11}$  单位/毫升的噬菌体液, 分装小试管, 4—6℃ 保存备用。

#### (四) 噬菌体液中残余菌体细胞的灭活方法

取上述噬菌体液在 60℃ 水浴中热处理 5 分钟后立即冷水冷却。

#### (五) 抗噬菌体菌株的分离筛选

取已侵染噬菌体的发酵液、变混浊的噬菌体液或噬菌斑上出现的复生菌落, 经平板分离, 挑出单菌落, 接到斜面上备筛选用。

初筛是把分离到的菌株分别在平板上先划线接种, 然后点种噬菌体液。另在含 3 毫升肉汤的试管中先接种 0.2 毫升噬菌体液, 再接一环该菌株。均以不接噬菌体的作为对照。28℃ 培养一天, 挑取在平板上不出现噬菌斑, 又在肉汤中生长正常的菌作为具初步抗性的菌株。再比较这些菌在摇瓶中的产酸能力, 挑选产酸不低于原敏感菌株,

本文于 1980 年 3 月 31 日收到。

且抗性稳定的菌,进一步做带噬菌体发酵试验。噬菌体的接种量一般为敏感菌细胞的 100—1000 倍。

### (六) 水杨酸的发酵及测定方法

按以前报道的方法<sup>[1]</sup>进行。

## 结 果

### (一) 铜绿色假单胞杆菌 AS 1.860 噬菌体

从不正常的水杨酸发酵液中分离到的噬菌体,经电子显微镜照片观察头部呈多面体柱状,尾端稍弯曲(图版 I-1, 2)。双层琼脂培养 24 小时,噬菌斑为圆形,直径小于 1 毫米,透明(图版 I-3),以后逐渐向外扩散致边缘不清,我们命名该噬菌体为 SA 噬菌体。

### (二) 抗噬菌体菌株的分离和摇瓶发酵

从不同试样中共分离到具初步抗噬菌体能力的菌株 62 株,这些菌株培养在点种噬菌体液的平板上不出现噬菌斑(图版 I-4)。并在接种过噬菌体的肉汤中生长正常,进而在摇瓶中比较了它们的产酸能力,发现 B<sub>6</sub> 和 B<sub>33</sub> 两株菌产酸都在每升 20 克以上,比敏感菌株高 20% 左右。从表 1 的结果还可以看到,它们在带噬菌体发酵时,产酸率也不下降,而敏感菌株则明显降低。

### (三) 发酵罐发酵试验

表 1 抗性菌株的抗性测定(摇瓶试验)

试验次数	1		2		3		+2P
	对照	+P	对照	+P	对照	+P	
水杨酸(克/升)							
菌株							
B <sub>6</sub>	21.9	21.9	22.4	21.6	21.3	21.3	21.5
B <sub>33</sub>	19.8	20.6	21.5	21.7	22.8	22.0	22.6
AS 1.860	18.3	16.8	18.3	16.2	17.4	14.4	—

对照:未加噬菌体。+P:接种时加噬菌体。+2P:接种时及培养 24 小时后都分别加噬菌体。

在 240 立升罐上用抗噬菌体 B<sub>6</sub> 菌株进行了发酵试验;还做了带噬菌体的发酵,用两种方法接种噬菌体,一是在 B<sub>6</sub> 菌株摇瓶种子培养阶段接种时,另一是在种子罐接种时。B<sub>6</sub> 菌株和 SA 噬菌体两者之比为 1:10<sup>2-3</sup>。发酵结果表明(表 2),B<sub>6</sub> 菌株在发酵罐上产酸也可达每升 20 克。不论什么时候接种噬菌体进行发酵,都不会影响 B<sub>6</sub> 菌株的产酸,我们共连续进行了一个月的带噬菌体发酵,产酸量一直稳定。

表 2 抗噬菌体 B<sub>6</sub> 菌株的带噬菌体罐发酵(240 升罐)

接种噬菌体时间	水杨酸(克/升)
对照(不加噬菌体)	20.0
摇瓶阶段	20.4
种子罐阶段	20.6

为了再次验证 B<sub>6</sub> 菌株的抗性,又在 500 立升罐试验了培养基不灭菌的发酵试验,连续共做了三次,平均产酸仍超过每升 20 克(表 3)。

表 3 B<sub>6</sub> 菌株的罐发酵(500 升罐,培养基不灭菌)

罐 批	水杨酸(克/升)
1	19.9
2	22.2
3	22.2

## 讨 论

1. 利用羧发酵生产水杨酸的微生物主要是铜绿色假单胞杆菌<sup>[1,3-6]</sup>。虽然从这种菌中分离到多种类型的噬菌体,并研究了它们的特性<sup>[7-10]</sup>。但至今在水杨酸发酵方面尚未见到有噬菌体侵染或分离出噬菌体的报道。我们从不正常发酵液中分离到了 SA 噬菌体,从而证明出现发酵不正常的原

因是由 SA 噬菌体引起的。已知选育抗噬菌体菌株代替敏感菌株进行工业生产是防治噬菌体侵染的有效措施<sup>[2,12-13]</sup>。我们从 SA 噬菌体侵染敏感菌株的试样中分离到的 B<sub>6</sub> 抗噬菌体菌株,产酸达每升 20 克,不低于原菌株的水平,经摇瓶及罐发酵试验反复验证,它有高度的抗 SA 噬菌体的能力,抗性也是稳定的。

2. 一般经增殖培养得到的噬菌体液中残留有少量未被裂解的菌体细胞,为了去除它们,我们曾用细菌过滤器过滤,虽然除去了菌体,但噬菌体液的效价下降很多。我们比较了 SA 噬菌体和敏感菌株的耐热性,发现敏感菌株在 60℃ 水浴中处理 2 分钟就失去生长能力,而 SA 噬菌体在同样温度下处理 5—8 分钟仍有活力(表 4)。根据

表 4 敏感菌株和 SA 噬菌体的耐热性  
(热处理温度 60℃)

生长情况 微生物	处理 时间 (分)				
	2	5	8	10	12
敏感菌株	—	—	—	—	—
SA 噬菌体	+	+	+	—	—

(—) 表示不生长或失活; (—) 表示部分生长或部分失活; (+) 表示生长或未失活。

这一结果,将噬菌体液在 60℃ 水浴中热处理 5 分钟,就可杀死残余的菌体,而又保留了噬菌体液原有的效价(经双层琼脂检查效价未变),我们认为这是一种非常简便而有效的方法。在本文的试验中,我们使用了这一方法并取得了很好的效果。

## 参 考 文 献

- [1] 法幼华等: 微生物学报, 14(1):103—111, 1974.
- [2] 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, 1973 年.
- [3] Klausmerier, R. E. and R. J. Strawinski: *J. Bact.*, 73(4): 461—464, 1957.
- [4] Ishikura, T. et al: *Agr. Biol. Chem.*, 32(1): 12—20, 1968.
- [5] Kitai, A. and A. Ozaki: *J. Ferment. Technol.*, 47(9): 527—535, 1969.
- [6] Martonova, M. et al: *Folia Microbiol.*, 17(1): 63—65, 1972.
- [7] Feary, T. W. et al.: *J. Bact.*, 87(1): 196—208, 1964.
- [8] Taakeya, K. and K. Amaka: *Virology*, 28(1): 163—165, 1966.
- [9] Bradley, D. E.: *Bact. Rev.*, 31(4): 230—314, 1967.
- [10] O'Callaghan, R. J. et al.: *Virology*, 37(4): 642—648, 1969.
- [11] Miller, R. V.: *Virology*, 59(2): 566—569, 1974.
- [12] 张筱玉等: 微生物学报, 14(1):83—90, 1974.
- [13] 胡瑜君等: 微生物学报, 14(1):91—94, 1974.
- [14] 辽源市味精厂等: 吉林大学学报(自然科学版), 1975 年第 4 期, 第 88—97 页.
- [15] 合肥制药厂、上海植物生理研究所微生物室: 微生物学报, 17(4):318—322, 1977.

## SELECTION OF PHAGE-RESISTANT STRAIN FOR MICROBIOLOGICAL PRODUCTION OF SALICYLIC ACID

Fa Youhua Huang Shuhui Liang Jiayuan Xu Shiwei

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

The phages were isolated from the abnormal fermentation broth of *Pseudomonas aeruginosa* strain AS 1860 used in salicylate production from naphthlene. These phages were rod-like, and were named SA-phage. Some resistant strains were obtained by the treatment of the sensitive strain of *P. aeruginosa* with SA-

phage. Among them, the resistant strain B<sub>1</sub> produced salicylate as high as that of the parent sensitive strain under the conditions of both shaken flask and tank fermentation. Phage was freed from bacteria simply by heat treatment of the mixture, which selectively inactivated the bacteria.