

在康宁木霉诱变育种过程中环境物理参数对致死率的影响

孟庆云¹⁾ 张 鹏²⁾ 张永嘉²⁾ 吴文格²⁾

(1) 北京化工大学应用数理系; 2) 化学工程学院, 北京 100029)

摘 要: 报告了使用物理诱变剂(紫外线)和化学诱变剂(亚硝基胍)对康宁木霉进行诱变处理时,环境物理因素对微生物致死率的影响。实验表明,当诱变剂的剂量或作用时间增加时(包括物理和化学诱变剂),微生物的致死率会明显上升;微生物经过物理或化学诱变剂的处理后,再将其放入非自然环境中培养(包括在电磁场中处理;在屏蔽室中处理及在高 本底辐射的情况下处理),其致死率会有所变化;在诱变时采用多种诱变剂,及在孢子悬液中添加微量元素和限量培养液是提高微生物致死率的另一种方法。

关键词: 致死率; 诱变; 环境物理参数

中图分类号: TQ 929.2; Q 93.3

引 言

地球除了受自身磁场、电场、引力场作用外,它还时刻受到来自于太空的宇宙射线场的冲击,在地球上生存的任何物种都要受到这些场的作用,当这些环境条件改变时,生物的生存方式也将随之发生变化,如太空育种实验。太空育种实验取得的良好效果和太空与地面的环境参数数值相差较大有关。在对微生物进行诱变处理时,其诱变剂发生作用时的环境物理参数对诱变效果的影响,是人们在以往研究^[1~6]中的盲点,本文将对环境物理参数对诱变效果的影响问题进行初步探讨。

1 实验材料

1.1 菌种

康宁木霉 13003 (*Trichoderma kongii*),轻工部食品发酵所。

1.2 培养基

灭菌条件: 1.03×10^5 Pa, 121 °C, 20 min 和 pH 值为 5.5。

(1) 麦芽汁琼脂斜面培养基为麦芽汁 5~6 Be, 琼脂 2%。

(2) 平皿分离培养基为麦芽汁 5~6 Be, 琼脂 2%, 去氧胆酸钠 0.12%~0.15%。

(3) 无机盐溶液培养基为 KH_2PO_4 0.2 g,

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.14 g, 尿素 0.03 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, CaCl_2 0.03 g, MnSO_4 0.156 g, CoCl_4 0.2 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 mg; H_2O 1 000 mL。

(4) 摇瓶发酵培养基为植粉(中粗) 5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2 g, KH_2PO_4 0.2 g, 自来水 50 mL, pH 值为 5.0。

2 实验方法

2.1 实验流程

原菌种 斜面培养 孢子或萌动孢子悬液的制备 菌种的诱变处理 平板分离培养 活菌计数 致死率计算。

2.2 诱变处理

分别使用物理诱变剂(紫外线)和化学诱变剂(亚硝基胍)对菌种进行诱变处理。

2.3 筛选方法

将诱变处理后的孢子悬液经分离培养后进行筛选。初筛采用文献[6]的方法,以滤纸条崩溃程度为指标进行实验。复筛以摇瓶发酵后样品的葡萄糖含量和粗蛋白含量为指标进行实验。样品中葡萄糖含量采用自制的葡萄糖分析仪(酶传感器法)测定。样品中粗蛋白的含量,利用北京真空仪表厂生产的 DDY-1 型快速定氮仪(凯氏定氮法)测定。

3 结果与讨论

3.1 诱变方法与条件对致死率的影响

以康宁木霉(13003)为出发菌株,将诱变处理过

的样品和对照样品的孢子液稀释涂平板 ,并在 28 下培养两天后取出 ,计算每个平皿上的单菌落数。以单菌落数在 10 ~ 30 个之间的稀释度为标准 ,进行致死率的计算。

3.1.1 亚硝基呱的质量浓度对致死率的影响 表 1 为采用不同亚硝基呱 (NTG) 质量浓度对康宁木霉致死率的影响 ,其诱变处理时间均为 90 min。

表 1 不同的亚硝基呱质量浓度对诱变致死率的影响

Table 1 Influence of various concentrations of NTG on killing rate

NTG 最终作用质量浓度/ (g L ⁻¹)	致死率/ %
0.200	39.4
0.400	51.9
0.800	54.1
1.000	63.0

由表 1 可见 ,随着 NTG 质量浓度的增加孢子的存活率逐渐在下降 ,致死率在上升 ,这表明诱变剂的浓度对诱变作用有明显的影响。根据文献 [6] 报道和笔者的经验 ,实验采用 0.400 g/L 作为诱变剂 NTG 的最终作用质量浓度。

3.1.2 亚硝基呱的作用时间 (t) 对致死率的影响 NTG 的最终作用质量浓度为 0.400 g/L ,不同处理时间对康宁木霉的致死率的影响见表 2。

表 2 不同的亚硝基呱作用时间对诱变致死率的影响

Table 2 Influence of action time of NTG on killing rate

t/ min	致死率/ %
30	31.6
60	49.8
90	58.1
120	69.6

由表 2 可见 ,采用相同的诱变剂 NTG 的最终作用浓度 ,随着处理时间的增加 ,孢子的致死率也呈现逐渐上升的趋势。在诱变康宁木霉菌种时 ,使用孢子悬液 ,其常规处理时间为 90 ~ 120 min^[6]。本实验处理时间为 90 min。

3.1.3 环境辐射对亚硝基呱的诱变作用的影响 物理诱变剂和化学诱变剂都可以导致微生物遗传突变 ,但笔者认为物理诱变剂起主要作用 ,化学诱变剂仅起到了辅助作用。基于这种观点 ,设计了如下实验方案 :采用 0.400 g/L 的质量浓度作为 NTG 的最终作用浓度 ,处理 90 min ,将加入 NTG 的孢子悬液

的试管分别静止的置于不同环境进行诱变处理。结果如表 3 所示。

表 3 环境条件对致死率的影响

Table 3 Influence of environmental factor on killing rate

环境条件	致死率/ %
自然环境中 (1)	38.4
屏蔽室中 (2)	60.3
包埋在氢氧化钾中 (3)	55.3

表 3 中 ,当诱变在屏蔽室环境中进行时 ,由于物质屏蔽的作用 ,其本底辐射必然会小于自然环境 ;当诱变是将试管包埋在颗粒状氢氧化钾中进行时 ,由于氢氧化钾中含有大量的⁴⁰K 天然放射性核素 ,它辐射出 1.4 MeV 的 光子 ,从而加强了本底辐射。最初设想 ,条件 (3) 致死率应最高 ,利用条件 (2) 时其致死率应当最低。但由表中数据可见 ,条件 (2) 的致死率最高 ,条件 (1) 的最低 ,而条件 (3) 则居中。很显然这和预想的结果不一致。经分析认为 ,条件 (2) 使用了屏蔽室 ,由于在屏蔽室内不透光 ,这可避免 NTG 的光分解 ,从而使得 NTG 的有效浓度较其他两种方法要高一些 ,从而其致死率也相应的高一些。

3.1.4 紫外线作用时间对致死率的影响 将样品进行紫外线辐照 ,不同的辐照时间 (t₁) 对致死率的影响列于表 4。

表 4 紫外线照射对致死率的影响

Table 4 Influence of ultraviolet ray irradiation on killing rate

t ₁ / min	致死率/ %
0.5	31.8
1	40.9
2	49.3
3	54.5

由表 4 可见 ,随着辐照时间的增加 (即辐照剂量增加) ,致死率上升。说明增加辐照时间是提高致死率的较好的方法。

3.1.5 电磁场对紫外线诱变的致死率的影响 将经过紫外线辐照后的菌株在电磁场中进行培养 ,结果列于表 5。

由表 5 可见 ,随着辐照剂量增加 ,致死率也相应增加。由于电磁场的作用使得致死率进一步增加。比较表 4 和表 5 可以看出 ,孢子菌悬液在紫外线辐照后 ,再经电磁场培养 ,其致死率大幅度提高。

表 5 电磁场对紫外线诱变的影响

Table 5 Influence of electromagnetic field on mutation after ultraviolet ray irradiation

t_1/min	致死率/ %
0.5	42.4
1	51.5
2	59.7
3	69.7

3.1.6 微量元素、限量培养液对致死率的影响 微量元素、限量培养液对致死率的影响见表 6。

表 6 在培养液中添加微量元素和限量元素对致死率的影响

Table 6 Influence of adding trace element and limiting the quantity of cultivation liquid on killing rate

处理条件	致死率/ %
x	0
y	67.2
z	47.4
m	39.2

表 6 中 x 为对照样品, 未经任何处理; y 为菌悬液中加入微量元素溶液, 立即进行紫外线诱变处理; z 为菌悬液中加入微量元素溶液, 30 °C 恒温培养 140 min 后立即进行紫外线诱变处理; m 为菌悬液中加入微量元素溶液及限量培养液, 30 °C 恒温培养 140 min 后立即进行紫外线诱变处理。

由表 6 可见, 在菌悬液中加入微量元素溶液后立即进行紫外线诱变, 其致死率最高。而在加入微量元素溶液和限量培养液, 并在 30 °C 下培养 140 min 后, 其致死率则有明显的下降。

3.1.7 化学诱变剂和物理诱变剂的复合处理 在诱变实验中, 影响微生物致死率的因素很多, 例如, 诱变剂的种类、剂量(包括作用浓度和作用时间)、物理和化学环境条件及微生物的生长情况等。为了突出重点及实验方便, 继续以康宁木霉 13003 为出发菌株, 选择了孢子在诱变前不萌动、可见光以及复合诱变等 3 个能明显影响诱变过程的因素进行实验, 结果列于表 7。

表 7 多因素实验结果

Table 7 Results of many-sided factors

诱变方法	致死率/ %
a	71.5
b	54.9
c	53.5
d	44.1
e	42.1

表 7 中方法 a 用功率为 30 W 的紫外灯, 灯与试管的距离为 22.5 cm, 加入亚硝基胍辐照(避光) 2 min; 方法 b 用功率为 30 W 的紫外灯, 灯与试管的距离为 22.5 cm, 加入亚硝基胍(见光)辐照 2 min; 方法 c 用功率为 30 W 的紫外灯, 灯距试管的距离为 22.5 cm, 辐照时间 2 min; 方法 d 亚硝基胍(见光); 方法 e 亚硝基胍(见光, 孢子悬液未经孢子萌动)。

由表 7 可见: (1) 不同的实验方法其结果不同, 如, 对于致死率来说有 $b > c > d$ 。这表明使用多种诱变剂进行复合处理时, 致死率会大幅度提高; (2) 比较方法 a 和 b 的实验结果发现, 方法 a 的致死率大于方法 b。这是由于光会使诱变剂 NTG 部分分解, 从而降低了其有效浓度, 使致死率有所下降; (3) 方法 b 的致死率略大于方法 c, 这是由于两种诱变剂共同作用的结果, 但这并没使致死率大幅度提高, 而是略有提高, 因为 NTG 的作用结果会被紫外灯所发出的可见光部分修复, 从而降低了化学诱变剂的诱变效果; (4) 方法 d 的致死率略大于方法 e, 这是由于方法 e 的孢子没有萌动, 对化学诱变剂的敏感程度较低, 因此其致死率也较低。

3.2 复筛结果

经上述诱变处理和分离培养后, 挑选出来 340 菌株进行初筛, 滤纸条崩溃程度高于出发菌株的有 55 株, 约占 16%。从中挑选出 10 株菌进行复筛。结果如表 8 所示。

由表 8 实验结果可见, 由复筛所挑选出的每株菌的葡萄糖含量和粗蛋白含量均高于出发菌株康宁木霉(13003)。特别是编号为 4-a-11 的菌株其利用纤维素的能力最强, 在 100 g 发酵液中含葡萄糖 3 600 mg, 比出发菌株高 1.4 倍; 其粗蛋白含量为 32.46 g, 比出发菌株提高了 73.3%。

表 8 复筛结果

Table 8 Results of compound screen

菌号	w(葡萄糖)/(mg g ⁻¹)	菌体蛋白得率/ %
13003	15. 00	18. 73
1-a-5	27. 00	26. 62
1-c-6	28. 50	30. 79
2-b-17	24. 00	23. 92
2-c-9	19. 50	19. 73
2-d-1	24. 00	20. 56
3-a-9	22. 50	20. 91
3-b-15	28. 50	28. 53
4-a-4	33. 00	26. 18
4-a-11	36. 00	32. 46
4-d-8P	19. 50	21. 34

4 结 论

影响康宁木霉(13003)致死率的因素很多,除了诱变剂量外,其它的环境因素对致死率的影响也是不可忽略的。

(1) 当诱变剂的剂量增加时(无论是物理诱变剂还是化学诱变剂)或诱变剂的作用时间增加时,微

生物的致死率都会明显的增加。

(2) 经过物理诱变剂或化学诱变剂的处理后,再经非自然环境中培养,一般说其致死率会有所上升。其中包括在电磁场中处理;在屏蔽室中处理及在高本底辐射的情况下处理。

(3) 使用多种诱变剂,及在孢子悬液中添加微量元素和限量培养液是提高致死率的一种方法。

(4) 利用本文所提供的诱变方法,可获得比出发菌株的葡萄糖含量高得多的菌株。

参 考 文 献

[1] 谭蓓芙,王大 . 一个嗜热分解纤维素的梭菌新种的分离和鉴定. 微生物学报,1992,32(3):155~160

[2] 孟庆云,张鹏. 非自然环境中选育青霉素菌种的研究. 北京化工大学学报,1999,26(4):91

[3] 阳葵,王福东,冯霞,等. 磷化水处理菌种在甾体微生物转化过程中的效应. 微生物学通报,1999,26(5):336~338

[4] 廖爱芳,林永株. 液氮超低温保存放线菌条件研究. 微生物学通报,1999,26(4):271~273

[5] 陈红歌,苗雪霞,张世敏,等. 植酸酶高产菌性的诱变选育. 微生物学通报,1997,24(5):272~274

[6] 章名春. 微生物诱变育种. 北京:科学出版社,1973. 52

Influence of environmental physical parameters on the killing rate of *Trichoderma Kongii* in breeding

MENG Qing-yun¹⁾ ZHANG Peng²⁾ ZHANG Yong-jia²⁾ WU Wen-ge²⁾

(1)Department of Applied Mathematics and Physics; 2) College of Chemical Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: This paper reports the influence environmental physical parameters on the killing rate of microbes in *Trichoderma Kongii*(13003) breeding with physical (ultraviolet ray) and chemical (NTG) mutagens. Experimental results show that the killing rate of microbes clearly goes up as the dose of mutation agent or action time increases. The killing rate will vary if the microbes are cultivated in a non-natural environment (processed in an electromagnetic field, in a shielded room and in a high background of radiation) after being induced. Adding trace element and limiting the quantity of cultivation liquid is another way to increase the killing rate of the induced microbes.

Key words: killing rate; mutation; physical parameters of environment