

环境参数变化对 γ 射线诱变微生物的影响

孟庆云 张 鹏

(北京化工大学 北京 100029)

摘要: 报告了在非自然环境中培养选育青霉菌菌株的一些结论。实验表明随着辐射剂量的增加菌株的致死率也相应增加;当辐照剂量相同时,与自然环境相比其致死率有所提高,且随着非自然环境参数值的增加而增加。当电场强度为 300kV/m、磁场强度为 600Gs 时,正变率有一极大值。

关键词: 非自然环境,诱变育种,青霉菌

中图分类号: Q93-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)03-0185-04

INFLUENCE ON γ RAY INDUCED MICROBE BY CHANGING ENVIRONMENTAL FACTOR

MENG Qing-Yun ZHANG Peng

(Beijing University of Chemical Technology Beijing 100029)

Abstract: This paper presents the conclusions of the breeding of *Penicillium* sp. in the none natural environment of Simulated Outer Space Cabin. The experiment shows that the increase of deadly rate is along with the increase of radiation dosage. It is found that its deadly rate is also increasing along with the electric field and magnetic field intensity under the same radiation dosage when cultivating the strain through the irradiation of ionization radiation in the electromagnetic field. When electric field intensity is 300kV / m and magnetic field intensity is 600Gs, there is one maximum to the positive variation rate.

Key words: Non-natural environment, Mutation breeding, *Penicillium*

众所周知,太空中的引力场、磁场和电场的强度数值比地球表面低,但其本底辐射的强度比地表面强。然而太空实验的环境参数不可改变,其单一环境参数值不是大于就是小于地面值。研究人员在进行研究时,很可能会遇到在某些实验中减少环境参数强度值对实验结果有利,而在另外一些实验中则正好相反。另外,在进行微生物诱变育种的搭机实验时,由于微生物具有生长旺、繁殖快,一般几十分钟就可繁殖一代的特点。当微生物发生遗传变异后,很难在航天飞机上立即进行后续的培养和筛选工作,从而导致实验失败。如能在地面上模拟太

空环境条件建造一个实验装置,使其环境参数可调,在这个装置中不但可以进行相应的太空实验,也可以进行在太空舱中无法进行的实验内容,从而弥补了太空实验中环境参数不可调的不足。

以往的某些太空育种实验之所以取得了良好的实验效果,我们认为这和太空与地面的环境参数数值相差较大有关。也就是说太空的环境参数数值大部分都小于地面值是某些实验成功的关键。本文所述的非自然环境,即包括了

收稿日期: 1999-02-19, 修回日期: 1999-11-22

一些环境条件参数的减弱,也包括加强。下述的实验均都是在这种情况下进行的。

目前,国内外所采用的诱变育种方法都属常规方法,菌株经诱变处理后,都是在自然环境中进行培养的^[1~3],如不在诱变方法和培养方法上改进,仅通过常规的诱变手段来获得正突变菌株的可能性相对较小。另外,诱变育种简单易操作,其实验过程不像基因工程那样复杂,几乎所有的微生物实验室都可以进行。如能在诱变方法上进行改良,从而提高突变率和正突变率,则诱变育种的发展前景依然是非常广阔的。

1 材料与方法

1.1 菌株

某抗生素制药厂生产用产黄青霉(P14B-4)。

1.2 物理诱变剂

γ 射线(⁶⁰Co)。

1.3 培养基

1.3.1 平板分离培养基:查氏培养基。

1.3.2 摇瓶发酵培养基: MgSO₄ 0.05g, KH₂PO₄ 0.06g, NaCl 4g, 玉米浆 2.5g, 蛋白胨 5g, 乳糖 15g, 水 1000mL, 灭菌条件 1.03 × 10⁵Pa; 20min, pH6.5~6.7。

1.4 实验方法

1.4.1 诱变处理方法:将制备好的单孢子悬液放入试管中(10⁷个/L),并采用平皿菌落法进行活菌计数。用 γ 射线照射,辐照剂量为2~10 × 10⁴rad,辐照时间约2h,室温约20℃。辐照后进行活菌计数。

1.4.2 非自然环境下处理方法:辐照后将单孢子悬液立即在非自然环境中培养,未辐照的对照样品在自然环境中进行培养,但二者的培养温度及时间等条件是相同的。

非自然环境的培养条件和相应的参数为:磁场为匀强磁场,其磁力线是水平的,磁场方向与地磁场的磁力线垂直且由东指向西,磁场强度为4000~11000Gs;电场强度为200~600kV/m,该电场为匀强场,其方向与外加磁场的方向相垂直;培养时的温度为29℃;时间约为2h。培养后的微生物放在NdFeB永磁体周围静置培养,其永磁体表面磁场强度小于6000Gs(该磁场为非匀强场),其磁场方向和温度同前,培养时间10h。将经过上述处理的菌株在7℃下冷藏24h后,再进行活菌计数。

1.4.3 突变株的筛选:采用摇瓶发酵法进行初筛,测青霉素效价。选出效价比出发菌株高的突变株。将挑选出的菌株采用与初筛同样的条件进行复筛,测效价。并选出高产菌株进行稳定性实验。

1.4.4 青霉素效价测定:采用WZZ-2型青霉素效价旋光仪进行测定(上海物理光学仪器厂生产)。

2 结果与讨论

在实验中我们发现辐照条件,非自然环境中的培养条件对实验结果均有很大影响。

2.1 辐照条件

结果表明随着辐照剂量增加微生物的致死率也相应增加;经 γ 辐照后的菌株在自然环境与在非自然环境中培养其致死率是不同的。表

表1 致死率和 γ 射线剂量以及非自然环境条件间的关系

辐照剂量(10 ⁴ rad)	致死率(%)			
	自然环境中培养	非自然环境中培养		
		电场	磁场	电场+磁场
2	32	37	34	41
4	39	45	43	52
6	48	55	52	69
8	61	69	65	87
10	85	98	98	>99

注:电场强度E=250kV/m,磁场强度B=6500Gs

1 所列这两种情况下的致死率对比。

由表 1 可以看出: 在同一剂量, 经自然环境培养和非自然环境中培养的菌株, 其致死率区别较大。微生物经非自然环境中培养后, 其致死率要高于经自然环境中培养的微生物; 在电场中培养时, 微生物的致死率比在磁场中要高一些。将受损伤的微生物在静电、静磁场中培养时, 致死率有一定的叠加效应, 但不是简单的加和。

2.2 非自然环境条件的选择

实验中选择了 $7 \times 10^4 \text{rad}$ 的剂量来辐照青霉菌, 改变非自然环境中的电场和磁场的场强数值, 其青霉菌的致死率如表 2 所示。

由表 2 可看出: 随着电场和磁场强度的增

表2 电场和磁场强度数值变化对青霉菌的致死率及正突变率的影响

序号	1	2	3	4	5
电场强度 (kV/m)	200	300	400	500	600
致死率 (%)	47	58	70	83	99
正变率 (%)	2.12	2.59	2.47	1.21	0
磁场强度 (Gs)	4000	5000	6000	7000	8000
致死率 (%)	47	50	52	55	59
正变率 (%)	2.07	2.15	2.25	2.24	2.17

注: 计算正变率以摇瓶效价比出发菌株提高0.5%作为计数菌株

大, 致死率也有所提高, 但正变率有一个最适的电场、磁场强度范围。

2.3 突变菌株的稳定性试验

一般说, 菌株突变后都有发生回复突变的可能性, 因此进行菌株的稳定传代实验是必须的。表 3 所列的数据是以出发菌株在 $6 \times 10^4 \text{rad}$ 的辐照剂量下辐照, 辐照后在 $E = 300 \text{kV/m}$, $M = 6000 \text{Gs}$ 的非自然环境条件下筛选出来的变异菌株。由表 3 可以看出头 4 代的摇瓶效价呈下降趋势, 当变异菌株传至第 5 代时其摇瓶

表3 传代稳定性比较

传代数	1	2	3	4	5	6	7	8
摇瓶效价增加比率 (%)	9.78	7.63	6.59	5.55	5.53	4.50	4.48	4.47

效价基本不在变化了。

由以上结果看, 将经电离辐射辐照后的菌株放入非自然环境中培养时, 其环境条件的参数值对青霉菌的致死率和正变率有一定的影响。将经过一定辐照的青霉菌在非自然环境中进行培养时, 其生长是良好的。在实验中我们还发现一般情况下诱变后青霉菌在培养基上生长时所形成的菌落形状为圆形斑点, 在某些实验条件下菌落的形状为环状。这一形状与产量之间具有密切的关联性。

地球本身是一个巨大的带电体, 磁体和具有较大质量的星体, 在地球周围, 除了有万有引力场外, 还有地电场和地磁场。当改变环境条件时, 例如在现有的地电磁场等物理环境参数值的基础上再外加一个强度值较大的外场, 特别是在外加高压静电场和磁场条件下。这种环境条件的改变必然对构成生物体物质电荷分布、排列、运动发生作用, 从而影响生物体生命活动的许多方面。据报道, 在外加静电场和离子雾的作用下, 诱导膜电位增大, ATP 合成量明显增加, 有机物和能量代谢以及矿物质的代谢也增加了。电场还影响自由基活动, 蛋白质和酶活性, 甚至影响电子传递过程的生物氧化作用和还原作用, 以及影响生物电流、生物电场的主要载体等^[6]。实验表明合适的磁场对 *Frankia* sp. 的生长和固氮作用具有良好的影响^[7]。电磁场等物理环境参数的改变, 对微生物的遗传物质的复制也有重要影响^[8,9]。

当微生物经过化学诱变剂或物理诱变剂的作用而使其 DNA 结构发生变化, 在修复其受损

伤 DNA 时不是在自然环境条件中进行的,也就是说将受损伤的微生物的生长环境条件改变一下(如改变环境物理参数中的电场,磁场的强弱和方向等),其修复过程的方向也必将改变,修复过程的结果就会发生变化,这样就有利于产生变异菌株。综上所述,自然环境条件变化后,微生物要适应这种变化,当菌株自身的遗传物质的结构发生变化时,人为的制造一个能够适应 DNA 结构变化的菌株生长的非自然环境条件,使 DNA 受损伤的微生物能够生存下来或者使 DNA 发生某种错误修复的微生物能够很好的生存下来,这就可以提高突变率和正变率并培养出新的微生物菌种。

综合以上实验结果和讨论我们认为,与自然环境条件相比较,将经过电离辐射处理的菌种在非自然环境条件中进行培养时, DNA 发生变异的微生物的一些特性可以很好的保留下来,这无疑是 DNA 受损伤的微生物其生存环境和没有受损伤的微生物的生存环境不同的一个

很好的证明。在非自然环境中进行诱变育种,为我们改良传统的微生物诱变育种实验提供了一个较好的途径。

参 考 文 献

- [1] 赵良启, 张丽珍, 张建国等. 微生物学通报, 1998, 25(6): 329~331.
- [2] 陈红歌, 苗雪霞, 张世敏等. 微生物学通报, 1997, 24(5): 272~274.
- [3] 沈淑渝, 王怡平, 乔昌济等. 微生物学通报, 1996, 23(5): 282~285.
- [4] Gascon J, Oubina A, Ana P *et al.* Current Microbiology, 1995, 30(3): 177~182.
- [5] 王德培, 高大滩, 彭志英等. 微生物学通报, 1998, 25(1): 17~19.
- [6] 周鸿宾, 刘信. 微生物学报, 1990, 30(2): 149~153.
- [7] 黎先栋, 王淑慧. 生物化学与生物物理学进展, 1986, 3: 36~39.
- [8] Staczek J, Marino A A, Gilleland L B *et al.* Current Microbiology, 1998, 36(5): 298~301.
- [9] 孟祥兵, 孙志贤. 科学通报, 1998, 43(14): 1523~1527.