

# 农用抗生素 TS99 高产菌株的选育

文才艺<sup>1</sup> 白建保<sup>2</sup> 吴元华<sup>3\*</sup>

- (1. 河南农业大学植物保护学院 郑州 450002)  
(2. 中国烟草总公司职工技术培训中心 郑州 450008)  
(3. 沈阳农业大学植物保护学院 沈阳 110161)

**摘要:** 在明确链霉素对农抗 TS99 产生菌 *Streptomyces fungicidicus* YH04 孢子的致死浓度为 1.2 µg/mL 的基础上, 以链霉素致死浓度为选择压力, 采用不同剂量的紫外线照射对菌株孢子进行诱变处理, 获得了大量的链霉素抗性基因突变株, 进而从中筛选到发酵效价较出发菌株提高 60% 以上, 且遗传稳定性良好的高产菌株 *Streptomyces fungicidicus* YH9407。

**关键词:** 农用抗生素, 紫外诱变, 链霉素致死突变, 诱变育种

## Screening of Agriantibiotic TS99 High-production Strain

WEN Cai-Yi<sup>1</sup> BAI Jian-Bao<sup>2</sup> WU Yuan-Hua<sup>3\*</sup>

- (1. Plant Protection College of Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002)  
(2. China Tobacco Training Center for Professional Technicians, Zhengzhou 450008)  
(3. Plant Protection College of Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161)

**Abstract:** Streptomycin-resistant mutants were obtained from original strains YH04 treated by UV (253 nm, 30 W, 45 s or 60 s) under the selection pressure of resistance to streptomycin (the lethal concentration is 1.2 µg/mL). *Streptomyces* Strain YH9407 with high antibiotic yield and genetic stability was obtained from streptomycin-resistant mutants. The yield of antibiotic TS99 is more than 60% higher than that of the original strain.

**Keywords:** Agriantibiotic, Ultraviolet induced, Streptomycin lethal mutator, Mutation breeding

选育效价高、稳定性好的优良菌株是抗生素筛选过程中的基础工作之一。随着遗传学、分子生物学的发展, 人们对抗生素生物合成途径及代谢调控机制了解的不断深入, 可以根据已知的或可能的生物途径、代谢调控机制和目的产物分子结构来设计筛选方法, 以获得能大量形成目的产物的高产突变菌株。目前, 我国大多数农用抗生素高产菌株都是通过这种途径获得的<sup>[1-6]</sup>。对于抗生素工业化生产来

说, 现代育种技术能加快育种速度, 提高菌种的生产能力, 简化生产工艺, 降低成本。但是, 在新型抗生素筛选的初期, 研究者对生产菌株的遗传背景和生化代谢途径缺乏足够的认识, 传统的育种方法则更为实用。YH04 是由沈阳农业大学植物病理研究室筛选的、产生新型四烯大环内酯类农用抗生素 TS99 的杀真菌链霉菌(*Streptomyces fungicidicus*)菌株, 目前已完成了对该菌的分类鉴定、发酵条件优

化、代谢产物的分离纯化、理化性质及活性物质结构测定等研究工作<sup>[7,8]</sup>。本试验以YH04为出发菌株,用链霉素抗性突变作为筛选模型,在含链霉素致死浓度的平板培养基上,经紫外线诱变获得突变菌株,有效地富集了正突变菌株,获得了农用抗生素TS99生产菌高产菌株。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

**1.1.1 菌株:**出发菌株杀真菌链霉菌YH04(*Streptomyces fungicidicus* YH04)和指示菌辣椒炭疽病菌(*Colletotrichum capsici*)均由沈阳农业大学植物病理学研究室分离、保存。

**1.1.2 培养基:**斜面和平板培养基(%):麸皮 2.5,可溶性淀粉 3.5,葡萄糖 1.7, NaCl 0.125, MgSO<sub>4</sub> 0.125, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.125, FeSO<sub>4</sub> 0.00125, KNO<sub>3</sub> 0.25, 琼脂 1.8, pH 7.2; 发酵培养基(%):花生饼粉 2.5, 淀粉 5.0, 酵母粉 0.8, 葡萄糖 0.02, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.08, CaCO<sub>3</sub> 0.32, NaCl 0.2, pH 7.0~7.2; PDA培养基(%):马铃薯 20, 葡萄糖 2, 琼脂 1.8。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 TS99粗提液的制备:**发酵液用5倍体积的无水乙醇处理后,静置30 min,过滤,滤液经减压浓缩后,硅胶柱层析得到TS99粗提液。

**1.2.2 抑菌活性的测定:**将供试病原菌制成大约10<sup>8</sup> cfu/mL的孢子悬液,按照体积比为5%的比例混入45左右的PDA培养基中,混匀后迅速倒入15 cm×20 cm的方形培养皿中,待培养基凝固后将灭菌的直径为6 mm的牛津杯等距离均匀摆放(为了避免边缘效应,外围牛津杯距边缘3 cm左右)在平板上,每个牛津杯中加入100 μL除菌的发酵液或TS99粗提液,置于28℃恒温培养箱中培养3 d~4 d,用游标卡尺准确测量抑菌圈的直径。每一处理重复3次,取平均值。

**1.2.3 紫外诱变:**由斜面培养物制成孢子悬浮液,取5 mL于灭菌的培养皿中,置于波长为254 nm,功率为30 W的紫外灯下30 cm处,照射一定时间进行诱变。

**1.2.4 链霉素对*Streptomyces fungicidicus* YH04致死浓度的测定:**将*Streptomyces fungicidicus* YH04的孢子制成每毫升含10<sup>6</sup>个孢子的悬浮液,稀释100倍

后涂布于含有不同浓度链霉素的平板上,在28℃培养箱中培养3 d~7 d,观察菌落生长情况,并记录未长出菌落的链霉素最低作用浓度,即为链霉素对出发菌株的致死浓度。

**1.2.5 链霉素突变株高产菌株的筛选:**将含链霉素致死浓度平板上的突变菌落分别接种在高氏斜面上,28℃培养7 d后,接种到液体培养基中,摇瓶发酵,检测发酵液的抑菌效果。经初筛和复筛后,抑菌效果较出发菌株提高60%的菌株转接至高氏斜面(此为F<sub>1</sub>),从F<sub>1</sub>代斜面转接高氏斜面后,F<sub>1</sub>置冰箱保存,斜面试管在同样条件下培养7 d后为F<sub>2</sub>代,如此方式转接至F<sub>5</sub>代,然后分别将F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>、F<sub>3</sub>、F<sub>4</sub>、F<sub>5</sub>代斜面同时各转接至高氏茄子瓶斜面扩大培养7 d,铲块(大小相同的菌块)接种到种子培养基中培养48 h后,以接种量10%接种至发酵培养基中,28℃、160 r/min摇瓶发酵60 h,检测发酵液中活性组分的抑菌效果,筛选出发酵效价高、遗传稳定性良好的目的菌株。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株YH04的紫外诱变

试验结果表明,紫外线能有效地引起菌株YH04产生突变,不同处理时间所产生的突变存在明显的差异(见表1)。出发菌株经紫外线照射处理后,在28℃条件下培养3 d即可观察到菌落形成,孢子及孢子丝的表观形态和颜色与出发菌株基本一致。培养5 d~7 d后,可挑取突变菌落传代。从诱变剂量与菌株突变率的关系来看,处理30 s时,虽然突变率很高,但负突变率远远高于正突变率,筛选的工作量很大;处理45 s时,致死突变率为95.7%,正突变率较高,容易筛选到高产菌株;处理时间超过60 s时,致死突变率达98%以上,但相对正突变率较低。综合考虑筛选工作量和筛选效率,以紫外线照射45 s或60 s为最佳处理。

### 2.2 紫外诱变后菌落形态的变化

在培养过程中,出发菌株出现4种菌落形态。紫外诱变处理30 s后,菌落形态与出发菌株一致,无特殊或其它菌落类型出现。紫外诱变处理45 s后,除产生这4种形态的菌落外,还出现一种突起、光滑或者略有皱褶、中央呈半月形裂口的菌落(E),其出现的频率与A型菌落相当,明显高于其它3种类型。见图1。

表 1 不同紫外诱变剂量下 YHO4 的突变率和致死率  
Table 1 Mutate rate and death incidence under different ultraviolet dosages

结果 Results	处理时间 Time of UV treatment (s)				
	30	45	60	75	90
致死率(%) Death rate(%)	87.6	95.7	98.2	99.5	99.8
正突变率(%) Positive mutate rate(%)	1.8	1.9	0.62	0.07	0.03
负突变率(%) Negative mutate rate(%)	10.6	2.4	1.18	0.43	0.17
突变率(%) Mutate rate(%)	12.4	4.3	1.80	0.50	0.20

表 2 不同链霉素浓度对出发菌株的致死率  
Table 2 Death rate of strain YH04 under different concentrations of streptomycin

链霉素浓度 (μg/mL) Concentration of streptomycin	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
孢子数(×10 <sup>6</sup> ) Amount of spores	256	131	96	30	11	0.5	0
致死率(%) Death rate	0	48.6	62.5	88.3	95.6	99.8	100

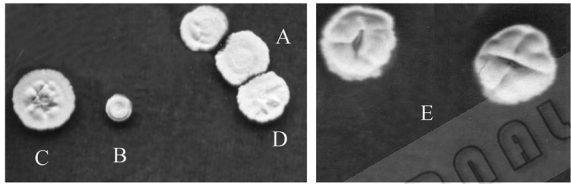


图 1 紫外诱变后菌株 YH04 的菌落形态  
Fig. 1 Colonial morphology of *Streptomyces* strain YH04 treated by UV

将不同形态的菌落各挑选 20 个,斜面培养后,摇瓶发酵并检测发酵液效价(以抑菌圈直径表示),结果表明,诱变前后,菌落形态与抗生素产生能力并没有相关性,提示该菌株表型基因的突变并不影响产生抗生素基因的表达和调控,而微生物自然突变常常导致其形态特征如菌落大小和形态、可溶性色素等变化。考虑到 A 型菌落出现的频率较高,生长迅速,产孢较其它类型早而且丰富,因此,在紫外诱变或推理选育时选取 A 型菌落。

2.3 链霉素对 YH04 的致死浓度测定

结果表明,出发菌株对链霉素非常敏感,当链霉素浓度为 0.6 μg/mL 时,菌落生长受到很大影响,表现为生长缓慢,并出现一些畸形、半秃或全秃的菌落;用定量的无菌水洗下每个平板的所有孢子,光学显微镜下计数(至少重复 3 次),当链霉素浓度

为 1.0 μg/mL 时,致死率为 99.8%;当链霉素浓度为 1.2 μg/mL 时,致死率为 100%(见表 2)。

2.4 链霉素抗性(Str<sup>r</sup>)突变株的筛选

结果表明(见表 3),在紫外照射时间分别为 45 s 和 60 s 时,1.2 μg/mL 的链霉素对于孢子的致死率不同,即紫外诱变对链霉素抗性的突变率有一定的影响。经紫外诱变处理后,产生了对链霉素具有一定抗性的菌株,这些菌株在含有链霉素致死浓度的平板上能正常生长,因此,相对于单纯链霉素抗性突变来说其突变率大幅度提高,有效地淘汰了野生型,富集了突变型菌株,从而提高了菌种选育的工作效率。

表 3 不同紫外线剂量在不同培养基上的致死率  
Table 3 Death rate on different plates under different ultraviolet dosages

紫外诱变时间(s) Time of UV	链霉素浓度(μg/mL) Concentration of streptomycin	致死率 (%) Death rate
45	0	96.5
	1.2	98.7
60	0	98
	1.2	99.9

2.5 Str<sup>r</sup>突变株的摇瓶发酵初筛结果

从紫外线照射时间分别为 45 s 和 60 s 及含链霉

素浓度 1.2 μg/mL 的平板上各挑取 150 个单菌落, 共计 300 个菌落转接斜面培养后, 摇瓶发酵后测定发酵液的效价(以抑菌圈直径表示), 突变株产量分布频率如图 2 所示。由此可见, 经紫外线照射后其链霉素抗性突变株具有很高的正突变率, 其中 45 s 组的正突变率略高于 60 s 组。从相对效价比出发菌株提高 30% 以上的菌株中挑选 200 株 A 型菌落形态的菌株作为初筛入选菌株, 再次连续 3 批摇瓶发酵。测定结果表明, 有 9 株突变株的发酵效果稳定且发酵效价始终较其它菌株高。进一步分析比较后得知, 这 9 株突变株中有 7 株来自 45 s+Str 处理组, 说明先将出发菌株在紫外线下照射 45 s 后, 再通过链霉素抗性突变筛选, 可以有效地富集正突变株。

2.6 高产菌株的复筛

将初筛中较理想的 9 株进行摇瓶发酵复筛。结果表明(见表 4), 9 株突变株均比出发菌株效价(以 TS99 粗提物的抑菌圈直径表示)提高 40% 以上, 其中, 菌株 YH9407 摇瓶发酵水平较出发菌株提高了

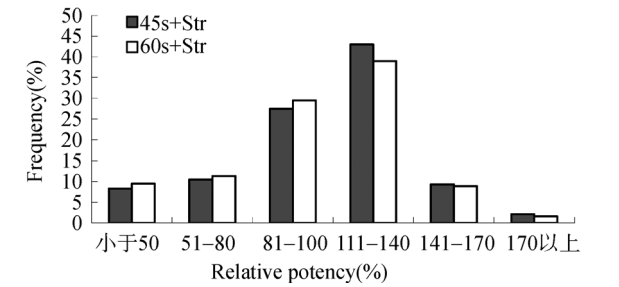


图 2 突变株产量分布  
Fig. 2 Productivity distribution of mutants

60% 以上。  
2.7 高产菌株 YH9407 的遗传稳定性  
用连续传代的方法考察了菌株 YH9407 的遗传稳定性, 经过多次传代后, F<sub>2</sub>、F<sub>3</sub>、F<sub>4</sub>、F<sub>5</sub> 各代菌株相对发酵效价(相对于 F<sub>1</sub>)分别为 102%、101%、99.8 % 和 100%(见表 5)。由此可见, 突变株 YH9407 连续转接 5 代后, 其产生抗生素能力和高产性能的遗传特征稳定。

表 4 高产菌株的复筛结果 Table 4 Results of high-production strains re-screened from mutants							
菌株 Strains	抑菌圈直径(mm)Diameter of inhibition zone					平均值* Average value	相对效价 Relative potency (%)
	1	2	3	4	5		
CK(YH04)	18.3	17.8	18.5	18.6	18.0	18.24 ± 0.336 F	100
YH2404	25.6	26.1	26.5	26.8	25.3	26.06 ± 0.619 DE	143
YH4605	26.7	26.3	26.8	27.0	26.1	26.58 ± 0.370 CDE	146
YH5405	25.8	26.2	26.5	26.8	25.5	26.16 ± 0.523 DE	143
YH5408	26.8	27.5	27.4	28.0	27.0	27.34 ± 0.467 BC	150
YH5602	25.3	25.8	26.0	26.4	25.3	25.76 ± 0.472 E	141
YH8403	27.6	28.0	27.9	28.5	27.0	27.80 ± 0.552 B	152
YH9405	26.8	27.5	26.2	26.5	26.6	26.72 ± 0.487 CD	147
YH9407	29.6	29.4	29.7	29.8	29.3	29.56 ± 0.207 A	162
YH9408	28.7	27.5	27.8	28.2	27.2	27.88 ± 0.589 B	153

\*经 SAS 统计软件 Duncan 多重比较, 显著水平 P=0.0001.

表 5 YH9407 的遗传稳定性试验结果 Table 5 Genetic stability of strain YH9407					
结果(Results)	世代(Generations)				
	F1	F2	F3	F4	F5
抑菌圈直径 (mm)	29.7	30.5	29.6	29.5	29.7
Diameter of inhibition zone	29.8	30.3	30.0	29.8	29.9
	29.3	29.8	30.1	29.2	29.5
平均值(mm) Average value	29.6	30.2	29.9	29.5	29.7
相对值(%) Relative value	100	102	101	99.8	100

### 3 讨论

在抗生素产生菌的菌种选育过程中,面临的首要问题是巨大的筛选工作,因此,建立每个菌种简单而又能反映最终效价高低的初筛方法是非常重要的。本研究在明确链霉素对 *Streptomyces fungicidicus* YH04 的致死浓度为 1.2  $\mu\text{g/mL}$  的前提下,结合菌株的表型变异,采用不同剂量的紫外线照射对菌株孢子进行诱变处理,然后将诱变处理后的孢子涂布在含链霉素致死浓度的高氏平板培养基上,获得了大量的链霉素抗性基因突变株,进而从中筛选到发酵效价较出发菌株提高 60% 以上,且遗传稳定性良好的高产菌株 *Streptomyces fungicidicus* YH9407,表明以链霉素抗性基因突变作为农用抗生素 TS99 产生菌的半理性筛选模型是十分有效的。

尽管链霉素抗性突变与抗生素合成基因突变相关这一现象早已被人们所认识,并由此建立了许多非常实用的抗生素产生菌半理性或理性推理选育模型,但是,迄今人们对其相关联的机理尚不明确。据报道,在链霉菌野生型菌株中引入链霉素抗性基因突变能极大地提高其抗生素合成能力<sup>[9,10]</sup>。本研究结果表明, *Streptomyces fungicidicus* YH04 的链霉素抗性突变株在紫外线诱变时具有很高的正突变率,表明该菌株对以核糖体为定向作用靶位的链霉素抗性突变与其抗生素合成能力突变具有正相关,但是与其表型变异无关。该研究结果对我们今后采用分子生物学技术手段进行菌种改良具有重要的参考价值。

### 参 考 文 献

[1] 顾觉奋,王鲁燕,倪孟祥,等. 抗生素. 上海: 上海科

学技术出版社, 2001, pp. 21-34.

- [2] 陶纯长, 谌 颀, 郭美锦, 等. 链霉素抗性突变理性筛选 avermectin 高产菌株. 中国抗生素杂志, 2002, 27(9): 521-523.
- [3] 涂国全, 钟承赞, 黄 林. 通过获得链霉素抗性基因突变株筛选小诺霉素高产菌株. 微生物学通报, 2004, 31(4): 19-22.
- [4] 涂国全, 刘 姝, 黎循航. 通过获得链霉素抗性基因(str)突变株筛选梅岭霉素高产菌株. 中国抗生素杂志, 2002, 27(6): 321-325.
- [5] 陈春福, 郭一平, 王永胜, 等. 林可霉素产生菌的推理选育. 中国抗生素杂志, 2002, 27(7): 394-397.
- [6] 李淑彬, 杨劲松, 刘 阳, 等. 抗真菌抗生素高产菌株的推理选育及其发酵调控研究. 中山大学学报(自然科学版), 2001, 40(4): 13-16.
- [7] 文才艺, 吴元华, 祁 岑, 等. 农用抗生素 TS99 产生菌 YH9407 的研究. 沈阳农业大学学报, 2004, 35(2): 93-96.
- [8] 文才艺, 吴元华, 李洪连. 新型农用抗生素 TS99 的理化性质及其稳定性研究. 河南农业大学学报, 2007, 41(1): 99-102.
- [9] Hesketh A, Ochi K. A novel method for improving *Streptomyces coelicolor* A3(2) for production of actinorhodin by introduction of *rpsL*(encoding ribosomal protein S12) mutations conferring resistance to streptomycin. *J Antibiot*, 1997, 50: 532-535.
- [10] Hosoya Y, Okamoto S, Muramatsu H, et al. Acquisition of certain streptomycin-resistant(str) mutations enhance antibiotic production in bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1998, 42(8): 2041-2047.

### 稿件书写规范

#### 论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定,计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体),不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下,希望作者参照执行。

时间: 年用 a; 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度)和 N(当量浓度)等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 OD(斜体)表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 D 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 物理量符号采用斜体,单位用正体并用括号括起,例如:  $t(\text{h})$  (表示时间,单位是小时)。带数值的计量单位: 计量单位不能省略,例如: 20 cm  $\times$  0.3 cm, 不能写成 20  $\times$  0.3 cm; 3 ~5 不可写成 3~5 ; 3%~6%不可写成 3~6%等。