

盛 祖 嘉

(复旦大学生物系, 上海)

在发酵工业生产单位和微生物实验室中常常谈到菌种退化问题。但是究竟什么是菌种退化呢? 往往缺少明确的概念。菌种退化的现象很复杂, 原因也似乎是多样的, 而且有许多现象和菌种退化容易相混淆, 在微生物学领域中可以说是一个较少进行系统研究的课题。本文试行为菌种退化提出一个较为明确的概念, 分析菌种退化的现象和原因, 并试行提出一些防止菌种退化的措施。

什么是菌种退化

菌种退化涉及微生物的形态和生理种种方面的变化, 例如产量下降、产生孢子的能力的丧失等等。

菌种退化是指整个菌株的上述种种方面的变化, 而不是指单个细胞的变化。例如在诱变育种工作中经常可以观察到经诱变剂处理后出现不产孢子的菌落, 这一般是单个孢子中发生基因突变的结果, 不能称为菌种退化。

菌种退化是一个逐渐发展的过程, 一般发生在菌种接种传代过程中, 例如一个产生孢子的菌株在接种传代过程中逐渐变为不产孢子。所以如果这一退化是从个别细胞发生“不产孢子突变”开始, 然后在接种传代过程中突变类型在数量上逐渐取得优势从而导致退化, 那么这一退化和基因突变有关, 可是不等同于基因突变。基因突变和菌种退化属于不同范畴。

菌种退化可能是由于整个菌株的因子型的逐渐改变(例如上面所举的一个例子), 也可能在因子型不发生变化时发生, 这一点下面将举例说明。

菌种退化和环境条件有关, 但是应该和仅仅由于培养条件而引起的暂时的变化相区别。培养条件的改变可以使长孢子的菌株变为不长孢子, 使高产的菌株变为低产等等。但是和由于菌种退化而造成的这种变化不同, 仅仅由于培养条件的改变而引起的暂时的变化一般在一次接种中呈现出来, 而退化则是一个在多次接种传代中逐渐发展的过程。

杂菌污染可以导致产量下降。如果在接种传代过程中杂菌数逐渐增加, 那么会给人以菌种退化的印象。这种假象比较容易和真正的退化相区别, 通过划线分离一般可以检验产量下降是否由于杂菌污染。

因子型改变的情况下的菌种退化

在核苷酸和氨基酸生产中常应用微生物的营养缺陷型。有关的这一缺陷型基因发生回复突变就可以使产量下降; 在接种传代过程中回复子数在数量上逐渐取得优势的过程也就是菌种退化的过程。一种芽孢杆菌的产腺核苷的黄嘌呤缺陷型菌株, 随着接种传代次数的增加而同时呈现产量下降和回复子数的增加这一现象, 表 1 最足以说明因子型改变和菌种退化的关系。

表 1 产腺核苷的黄嘌呤缺陷型菌株在接种传代过程中产量和回复子数之间的关系^[1]

| 实验 | | 回复子比数 | 腺核苷产量(克/升) |
|----|-------------------------------|---------------------|------------|
| 1 |147..... | $1/4.5 \times 10^6$ | 13.5 |
| 2 |133..... | $1/2.4 \times 10^6$ | 14.9 |
| 3 | ·47·3·9·3·.....71..... | $1/2.2 \times 10^5$ | 10.7 |
| 4 | ·47·3·9·3·13·.....58..... | $1/3.5 \times 10^6$ | 13.1 |
| 5 | ·47·3·9·3·13·8·3·.....47..... | $1/5.3 \times 10^3$ | 8.1 |
| 6 | ·47·3·9·3·13·8·3·4·14·6·6·31· | $1/1.0 \times 10^3$ | 7.4 |

表 1 中一个黑点表示一次接种, 两个黑点中间的数字表示相隔的天数。从表 1 中数据可以看到: (1) 回复子比数愈大则腺核苷的产量愈低, 说明因子型的改变导致产量的退化; (2) 回复子的比数并不决定在斜面保藏的时间, 而决定在接种传代的次数, 说明在这里突变固然是菌种退化的最终原因, 但是在接种传代中回复子数量逐渐取得优势是菌种退化的决定性的因素。

那么不用缺陷型生产的菌种的退化又是怎样的呢? 在生产青霉素的菌种中曾经有人通过实验说明情况也正是这样^[2]。

首先从高产的(3,000 单位/毫升)菌株得到两个用分生孢子颜色和缺陷型作为标记的菌株 *br bio nic* 和 *w thi met* (*br* 表示棕色分生孢子, *bio* 表示生物素缺陷型, *nic* 表示烟酰胺缺陷型, *w* 表示白色孢子, *thi* 表示硫胺缺陷型, *met* 表示甲硫氨酸缺陷型), 它们仍然都是高产的。*w thi met* 菌株在 4℃ 中保藏大约半年, 产量并不下降。*br bio nic* 菌株每隔 2 周接种传代

一次,到第10代时产量下降到原来的75%,第11代时下降到50%,14代时下降到大约33%。这时把4℃中储藏的菌株和退化了的菌株分别进行单菌落分离,然后混合接种到基本培养基上,强制形成异核体。从异核体分离 *w thi met* 和 *br bio nic* 菌落各200个,分别测定它们的产量。结果发现全部 *w thi met* 菌株都是高产的,全部 *br bio nic* 菌株都是低产的。

在链孢霉和构巢曲霉等许多霉菌中已经确切地证明孢子颜色的改变和营养缺陷型性状,都是核基因突变的结果,所以完全可以相信青霉菌也是这样。在异核体中,不同类型的细胞核之间不发生基因重组,所以高产性状经常出现在 *w thi met* 菌株中,而低产性状经常出现在 *br bio nic* 菌株中,正好说明低产性状是核基因突变的结果。所以同样地基因突变是产量退化的原因,但是只有在接种传代过程中突变型取得数量上的优势时才呈现退化现象。

突变使原来纯的菌株变为不纯,不纯的菌株在接种传代过程中发生不同成份的比数的变化,从而导致退化。在诱变育种工作中常常发现最初分离得的高产菌株在传代复筛过程中产量下降,这是一种在特殊情况下的菌种退化现象,同样是由于不纯所引起的。DNA是一个双链分子,诱变剂处理一般只引起某一位置的一个链上的结构变化,因此经诱变剂处理以后出现不纯的菌落是正常的现象。可是我们希望得到的是高产的纯种,那么经诱变剂处理以后会不会出现纯种呢?

经诱变剂处理后出现纯的菌落常有报道。目前有几种假设企图说明这一现象。按比较受重视的单链失活假设,如果诱变剂使DNA双链的一个链在某一位置上发生一个以后造成基因突变的变化,而使另一个链上发生一个使它不再能作为复制的样板的变化,含有这样一个双链的细胞将生长成为一个纯的菌落。根据这一假设,可以预期诱变剂的剂量愈高时,突变型菌落中纯的菌落将会愈多。这一预测在一些微生物中已得到证实。例如用一种裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)的紫红色腺嘌呤缺陷型作为材料,观察紫外线剂量和白色回复突变菌落数,特别是和不纯的红白两色菌落数的关系时得到表2所列数据。

表2 裂殖酵母中不同剂量(用存活率表示)的紫外线和不纯菌落数之间的关系^[3]

| 存活率(%) | 菌落总数 | 突变菌落数 | | 突变频率 (突变菌落/10 ³) | 不纯菌落 百分值 |
|--------|-------|-------|-----|---------------------------------|-------------|
| | | 纯的 | 不纯的 | | |
| 100 | 12165 | 1 | — | 0.08 | — |
| 80—100 | 12060 | 13 | 12 | 2 | 48 |
| 60—80 | 8553 | 46 | 20 | 2.7 | 30 |
| 20—60 | 4922 | 65 | 17 | 16.7 | 21 |
| 1—20 | 9884 | 195 | 28 | 22.6 | 13 |

以上几种情况都属于因子型改变所导致的菌种退化。

因子型不改变的情况下的菌种退化

在链孢霉中曾经发现有这样一个菌株,它在接种传代过程中(在不见光处培养时)产生分生孢子一代比一代少,传到第7—8代时变为完全不产孢子。链孢霉中不产生分生孢子的突变型是很多的,可是上述这一孢子退化现象则经实验证明并非由于发生了“不产孢子突变”,然后这一突变型在传代过程中取得了数量上的优势的结果。

如果孢子退化是由于“不产孢子突变”在数量上取得优势,那么退化了的菌丝体中的细胞核应该多数属于这一类型,那么将退化了的菌株和没有发现孢子退化现象的菌株去进行杂交时,应该在多数杂交子囊中得到4个子囊孢子属于产孢子类型,4个属于不产孢子类型。实验结果却是在每一个子囊中得到8个产孢子类型。这一事实说明孢子退化的过程并不是因子型逐渐改变的结果。不过在每一个子囊的8个孢子中有4个在接种传代中出现孢子退化现象,而另外4个则不发生退化现象。这一事实又说明孢子退化也为基因所控制,这一基因位置在第二染色体上^[4]。

在构巢曲霉中也有类似的报道。曾经发现如果用分生孢子接种传代,那么子囊孢子逐渐减少,如果用子囊孢子接种传代,那么分生孢子逐渐减少。把一个黄色分生孢子突变菌株多次用子囊孢子传代,最后得到一个产生很少分生孢子的黄色菌株;把另一个产生绿色孢子的非突变菌株多次用分生孢子传代,最后得到一个不产生子囊孢子的绿色菌株。把这两个退化菌株接种在一起,得到一个既产生子囊孢子又产生很多分生孢子的菌株,说明形成了异核体。从异核体的分生孢子或子囊孢子又可以重新分离得到产生黄色分生孢子和产生绿色分生孢子的菌株。

如果孢子退化是因子型改变的结果,那么按照同样的理由应该预期在一个分生孢子退化的菌株中,细胞核多数应属于不产生分生孢子类型,在一个子囊孢子退化菌株中,细胞核应多数属于不产生子囊孢子类型;而且正象青霉菌产量退化一例一样,从异核体所分离得到的黄色菌落应该属于不产生分生孢子的类型,而分离得到绿色菌落应该属于不产生子囊孢子的类型。可是事实上所得到的结果和上述链孢霉中所得到的结果相类似,从异核体分离得到的黄色菌株和绿色菌株都既产生子囊孢子又产生大量的分生孢子。这一实验结果同样说明孢子退化过程中并没有发生因子型的改变^[5]。

因子型不改变的情况下怎样会发生菌种退化?这

里面的生理上的变化还不了解。微生物在生长繁殖过程中使培养基的成份发生变化,这种变化不利于微生物的生活,所以接种到新鲜的培养基中的微生物都经历一个逐渐衰老的过程。但是把衰老的微生物再接种到新鲜的培养基中时又恢复了一切原有的性状。可见这种衰老现象和菌种退化无关;相反地,因子型不改变的情况下的菌种退化则必然涉及某些细胞内部的累积性的变化。

培养条件和菌种退化

培养或菌种保藏条件可以从多方面影响菌种退化。对于由于因子型的改变造成的退化,这些条件可以影响突变的发生,可以影响突变型和非突变型的数量上的变化,可以在不影响因子型的情况下影响表型;对于并非由于因子型的改变所造成的退化,可以通过某些生理上的影响而改变退化的进程。

影响基因突变的主要条件是温度。基因突变率随着温度的下降而减低。保藏在4℃中的放线菌孢子也发生自发突变。保藏在液氮中(温度为-196℃)的微生物是否发生突变有待于测定。一般培养基中不含有诱变物质或抗变物质,至少在菌种退化问题中可暂不讨论这些因素。

培养条件对于菌种退化的比较重要的影响是对于不同类型的细胞或细胞核的数量上的变化方面。对于细菌和酵母菌来讲,培养条件可以影响不同类型的细胞的比数,例如在上述产腺核苷的黄嘌呤缺陷型中,曾经发现在培养基中加入黄嘌呤、鸟嘌呤以及组氨酸和苏氨酸等可以降低回复子的比数。

对于放线菌和霉菌来讲,培养条件可以影响菌丝体中不同类型的细胞核的比数。在米曲霉中曾经得到一个在酪蛋白培养基上生长较快的变异菌株,它的酪蛋白酶产量高于原来的菌株约一倍。通过和上述青霉素产量退化一例中相类似的实验,可以知道这是核基因突变的结果。从酪蛋白酶高产菌株(F)得到带有黄色分子孢子和赖氨酸缺陷型标记的菌株(*y lys F*);从低产菌株(f)得到带有白色孢子和亮氨酸缺陷型标记的菌株(*w leu f*)。把两者混合接种在具有取样支管的生长管(图1)的一端,待菌丝生长达到另一端后从生长管的几个位置上取出分生孢子样品,测定分生孢子的类型。



图1 具有取样支管的生长管

实验结果说明如果培养基中含有酪蛋白,那么异核体中F型核很快地在数量上由劣势转为优势(表

3)。

表3 米曲霉的异核体在酪蛋白培养基上生长过程中两种类型的核的比数的改变情况^[6]

| 孢子取样位置 (厘米) | 孢子类型(%) | | |
|----------------|----------------|----------------|-----|
| | <i>y lys F</i> | <i>w leu f</i> | 异核 |
| -1—0 | 2.5 | 91.6 | 5.9 |
| 15—16 | 89.0 | 9.0 | 2.0 |
| 22—23 | >98 | <1 | <1 |

如果培养基中不含酪蛋白而含有水解酪蛋白,那么两种类型的核的数量上的变化就没有明显的倾向了。

正象上面已经一再指出的,在接种传代过程中突变型在数量上逐渐取得优势使菌种呈现退化现象,可见培养条件对于菌种退化的影响主要也就在这一方面。

当然任何遗传性状的表现都是遗传因子和环境条件的相互作用的结果;任何遗传性状都不是绝对不能改变的。野生型在一定条件下可以象突变型,突变型在一定条件下可以象野生型。

正常的能产生分生孢子的链孢霉菌株在某些培养基上不产生孢子。相反地,不产孢子的突变型在某些培养基上能产生孢子;所以就孢子的退化来讲,这些培养条件就能在不影响因子型的情况下防止菌种的孢子退化。

在链孢霉中曾经进行过许多关于产生分生孢子的代谢基础的研究,非但通过培养条件的改变可以任意地使野生型菌株产生或不产生分生孢子,而且还可以使不产孢子的突变型产生孢子^[7]。

对于并非由于因子型的改变的菌种退化,培养条件有时也有很大的影响。例如上面所讲关于链孢霉的孢子退化一例中,曾经发现孢子的退化只发生在黑暗中而且在低温(25℃)中,如果在光照下培养,则不发生退化,把已经退化的菌株接种在斜面上,放在光照下培养时也会象正常菌株一样产生孢子。其中生理上的原因同样还不了解。

防止退化的措施

根据以上关于菌种退化的现象和原因的分析,下面试行提出一些防止退化的措施,其中有一些措施已经早已应用。由于菌种退化问题的复杂性,各种生物、各种退化现象的个别情况又各不相同,对于退化的原因也还了解得不够,所以这里所提的所谓措施也是极为原则性的;要解决具体问题,还得从实际情况出发,经过试验,采取措施。

基因突变是菌种退化的一个重要的原因,所以防止突变也是防止退化的一个措施。一般来讲,低温保

菌可以减少突变的发生；关于菌种保藏的具体方法不属于本文范围，故不再介绍。

在利用营养缺陷型进行生产的菌种中，回复突变使原来的遗传性障碍解除，导致代谢途径的改变，从而使产量下降。在这种情况下，在原有的遗传性障碍旁边加设一道障碍，那么只有当两个缺陷型基因同时发

生回复突变时才足以解除障碍，这样，虽然实际上并没有防止突变的发生，可是从效果上来看等于防止了基因突变，也就防止了菌种退化。

例如在上面所讲利用黄嘌呤缺陷型生产腺核苷的一例中，所用的菌株原来具有 1 和 2 两处遗传性障碍（图 2）。

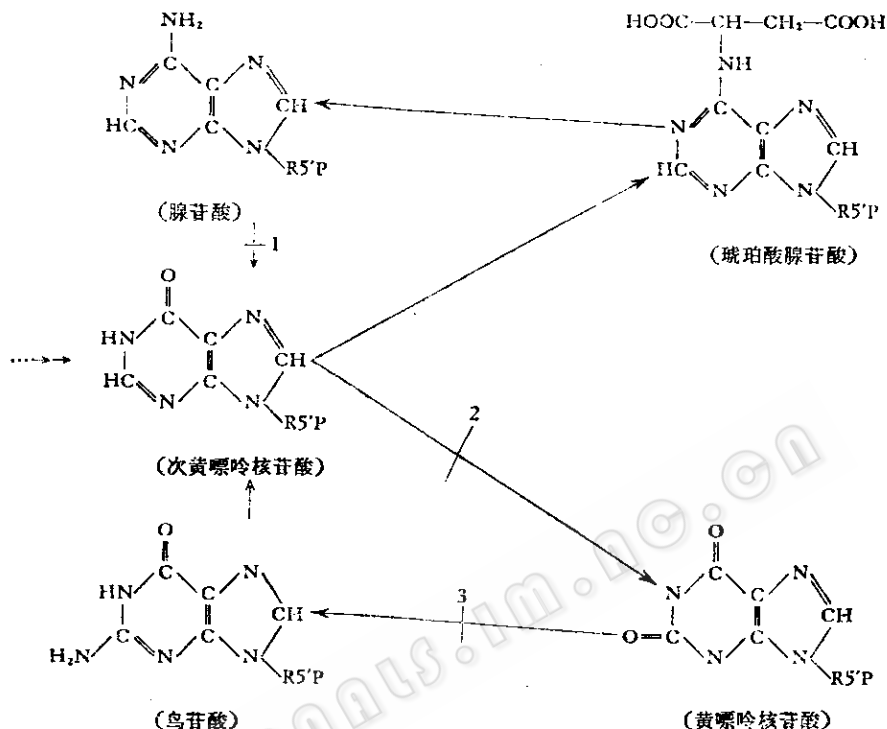


图 2 几种核苷酸的代谢途径和腺核苷生产芽孢杆菌的遗传性代谢障碍位置

次黄嘌呤核苷酸是腺苷酸和鸟苷酸的共同前体。造成遗传性障碍 2 的这一突变使通向鸟苷酸的途径阻塞，于是所有的前体都转向腺苷酸的合成。造成遗传性障碍 1 的这一突变使腺苷酸脱氨酶失活，这就更有利于腺苷酸的积累。突变基因 2 发生回复突变后使通向鸟苷酸的途径变为畅道，于是腺苷酸的产量便下降。在突变型 2 的基础上再加上一个突变 3 就足以使菌种保持稳定，不发生产量退化。原因是只有当 2、3 两个基因都发生回复突变才使通向鸟苷酸的途径得以畅通，而两个突变发生在同一细胞中的机会是很难得的。事实上这样一个稳定菌株确能保持产量稳定。这样一个稳定菌株的筛选可以通过不同的途径。如果产物的代谢途径已经了解的话，可以按照代谢途径来筛选。例如在这一例子中，在黄嘌呤缺陷型细菌中筛选一个鸟嘌呤缺陷型就可以达到目的。此外在这一例子中也可以筛选一个在基本培养基上不出现回复子的菌株。事实上用这一方法选得的一个稳定菌株经鉴定是鸟嘌呤缺陷型。

以上是就基因突变这一角度出发所可以采取的措

施。从突变型通过接种传代而可能取得数量上的优势这一角度出发，则至少可以采取下面这三、四种措施来防止菌种的退化。

首先是少传代，这一措施已为生产单位所广泛采用。其次是进行单菌落分离，这一措施同样已为生产单位所广泛采用。另外一种办法是选择一种有利于高产（或其他有利性状）菌株而不利低产（或其他不利性状）菌株的培养条件。至于这是怎么样的条件，对于各个菌种、各种退化的情况想必都不相同，必须通过实验才能掌握。单菌落分离和一定的培养条件相结合应该是一种更为有效的措施。例如，对于杀螟杆菌的毒力退化问题，曾经有人建议接种虫体复壮。从理论上来看，细菌侵入虫体才能繁殖，也才能毒害虫体，因此虫体这一培养条件至少有利于侵入能力较强的细菌的繁殖，而侵入能力也是决定细菌毒力的一个重要因素。所以将退化菌株接种虫体，再从虫体中进行单菌落分离按理可以起复壮作用。

培养条件除了能影响退化菌株的不同类型细胞或细胞核的比数以外，还能在不影响因子型的情况下影

响表型。上面已经指出在一定的培养条件下链孢霉的某些不产孢子的突变型能产生孢子。对于其它菌种、其他性状培养条件能否起到类似的作用则也要根据具体情况进行分析,才能采取相应的措施。

利用不同类型的细胞进行接种传代,或许也是值得尝试的一种措施。在上面所讲有关构巢曲霉孢子退化一例中,曾经观察到这样的现象:用分生孢子传代14次后构巢曲霉就变为完全不产子囊孢子;如果在传到第5代或第9代后改用子囊孢子传代,那么经几次传代后产生子囊孢子的能力又可以完全恢复。同样地,在用子囊孢子传代过程中分生孢子逐渐减少,但是如果在中途改用分生孢子传代,那么产生分生孢子的能力也会逐渐恢复。在其他微生物中有关其他性状的退化中是否可以采取类似的措施来防止退化还有待于探索。

关于诱变剂处理后的退化问题,或许可以采取两种相应的措施。第一是着眼于诱变剂的使用,上面已经指出高剂量的紫外线有利于得到较多的纯的菌落,也就是不容易发生退化的菌株。所以至少就这一方面来考虑似乎以应用较高剂量的诱变剂为有利。此外高剂量的紫外线和低剂量的亚硝基胍这一类高效率诱变剂的联合使用,或许也是一个值得尝试的方法。第二是着眼于纯化,对于初筛时产量高的菌株进行单菌落分离后再行复筛或许是一个可以采用的措施。

在文献中也可以看到有关于用诱变剂使退化菌株复壮的报道。既然许多退化现象的最终原因是基因突变,所以诱变剂应该对于防止退化可以起一定的作用。不过诱变剂都有杀菌作用;一个处在退化过程中的菌株中包含着不同类型的细胞或细胞核,它们对于同一

诱变剂的杀菌作用可能有不同程度的反应,如果某一诱变剂对于退化类型具有更大的杀伤作用,那么用这一种诱变剂处理以后再进行单菌落分离就可以更为有效地得到复壮菌株。如果诱变剂的作用果然是在这一方面,那么原则上和应用一定的培养条件并通过单菌落分离得到复壮菌株是同一原理(即设法改变不同类型的细胞或细胞核的比数)的应用的不同侧面。

按照这一原理,不具诱变作用的物理或化学因素同样可以应用于菌种复壮。至于什么因素对于什么微生物的什么性状的退化可以起复壮作用,那也只有通过实践才能知道。

本文所讨论的菌种退化问题只限于和核基因有关的方面。在资料中可以看到一些由于细胞质基因突变而造成的菌种退化。不过这些退化大多涉及霉菌的生活力,还没有看到过有关产量的报道,也还不知道这一类退化在生产实践上究竟有多大意义,这里就不再讨论了。

参 考 资 料

- [1] Haneda, K., Komatsu, K., Kodaira, R. and Ohsawa, A.: *Agr. Biol. Chem.*, **36**: 1453—1460, 1972.
- [2] McDonald, K. D.: *Nature*, **218**: 371—372, 1968.
- [3] Nasim, A. and Auerbach, C.: *Mutation Res.*, **4**: 1—14, 1967.
- [4] 盛祖嘉: *Bot. Gaz.*, **113**: 203—206, 1951.
- [5] Jinks, J. L.: *Nature*, **174**: 409—410, 1954.
- [6] Kiritani, K.: *Zeit. Vererb.*, **90**: 182—189, 1959.
- [7] Turian, G. and Bianchi, D. E.: *Bot. Rev.*, **38**: 119—154, 1972.