

文章编号: 1000- 1638(2006)01-0111-05

物理因子对微生物诱变作用的研究进展^{*}

石磊, 梁运章

(内蒙古自治区离子束生物工程重点实验室, 内蒙古大学, 呼和浩特 010021)

摘要: 微生物与食品卫生、医药健康、生态环境、资源使用、农畜牧业等多方面息息相关. 用于工业生产上的微生物主要是从自然界筛选或选育的, 为了获得优质、高产、低耗的工业微生物, 人们尝试采用各种物理因子对微生物进行诱变处理的试验研究, 并获取成功, 其中有些经诱变的微生物菌株已应用于工农业生产中. 介绍了近几年人们用激光、电磁波、离子束等几种物理因子对微生物进行处理得到的一些研究成果及基本机理分析.

关键词: 微生物; 激光; 电磁波; 离子束; 诱变

中图分类号: Q81 **文献标识码:** A

目前, 微生物在解决人类的粮食、能源、健康、资源和环境保护等问题中正显露出越来越重要且不可替代的独特作用. 现代化的发酵工业、抗生素工业、生物农药、菌化肥等工作已形成一定规模, 人们希望有更多的优质菌种应用于生产中. 由于微生物自发突变率非常低, 一般为 $10^{-6} \sim 10^{-10}$, 为了获得高产、优质、低耗的菌种, 人们常常通过外界物理、化学、生物因子等因素的改变诱发基因突变, 诱变处理后, 微生物的遗传物质 DNA 和 RNA 的化学结构发生改变, 从而引起微生物的遗传变异. 微生物研究的重点问题之一就是通过育种和诱变来提高微生物的工业效价. 在研究过程中物理因子以其安全、设备简单、操作方便、价格低廉、诱变率高等优点而受到人们的注意. 到目前为止, 国内外关于物理因子对微生物作用的研究已做了大量的工作并取得了一定的成效, 其中主要有激光、电磁波、离子束等. 如今, 越来越多的人开始关注物理因子处理微生物技术, 并用它来解决实际问题. 物理因子处理微生物技术的前景和潜力将随着各项研究的进行而日益显露出来.

1 激光对微生物诱变作用的研究

激光是一种光量子流, 又称光微粒. 激光对微生物的生物效应研究已有近 30 年的历史, 近几年来, 激光作用于微生物已诱变出优良的工业菌种, 人们正努力通过深入的研究寻找激光与微生物之间的作用机理.

用半导体激光诱变处理果胶酶产生菌——黑曲霉, 可使果胶酶产量提高 3 倍. He-Ne 激光和 LiCl 复合诱变产生 γ -亚麻酸的少根根酶得到高产菌株 RC378, 油脂含量和 GLA 含量比出发菌株分别提高 130.8% 和 276.7%. 用激光和亚硝基胍复合诱变菊粉酶产生菌黑曲霉得高产菊粉酶产生菌黑曲霉突变株 AL-154, 所得菊粉酶热稳定性较好, 酶活比出发菌株所产菊粉酶的活力提高近 3 倍^[1]. 以红曲酶 No. 20549 为出发菌株, 采用 Nd:YAG 激光进行诱变处理, 筛选获得洛伐他汀产量为 1.78 mg/g 的高产突变株 T 20013. 经过激光照射, 出发菌株的生理生化代谢流发生了一定程度的变化^[2].

在激光对微生物作用的研究中, 对激光作用于生物体产生可遗传的变异的机理还不很清楚, 目前

* 收稿日期: 2005-03-09; 修回日期: 2005-06-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(10465002)

作者简介: 石磊(1978-), 女, 内蒙古呼盟人, 2003 级硕士研究生.

有许多观点. 曹恩华等人通过一系列实验对激光辐照引起基因突变的机理进行了比较深入的讨论. 他们认为, 各波段的激光辐照均可引起基因突变, 紫外波段的激光辐照可直接导致 DNA 结构发生变化; 可见、红外波段的激光辐照在光酶剂的参与下使脂质过氧化产生活性氧自由基导致 DNA 损伤^[6]. 国内外普遍比较认同的一种解释是在激光辐照机体时产生光照活化效应, 使核仁器抑制解除而被活化, 并使 DNA-RNA-蛋白质系统活性提高、核糖体上蛋白质合成作用的活性增强, 这可使机体内的生物合成增强, 特别是三羧酸酶和细胞色素氧化酶活性提高, 从而提高细胞利用氧的能力并增强细胞合成 ATP 的能力^[8].

2 电磁波对微生物作用的研究

电磁波谱包含无线电波、微波、红外波、紫外波、X 射线、 γ 射线直至宇宙辐射, 电磁波对微生物作用已有广泛研究, 所产生的效应应用于微生物的育种诱变、灭菌、干燥工程、食品加工等方面. 微波是指频率在 300 MHz ~ 300 GHz 之间的电磁波, 具有波动性、高频性、热特性和非热特性特点, 微波技术具有操作简便、快速、高效安全、节能的优点. 采用微波诱变方法对井冈霉素生产菌株进行诱变处理, 挑取单个菌落摇瓶初筛、复筛、测定化学效价, 获得 4 株平均效价比出发菌株分别高出 17.5%、15%、20%、21.7% 的突变株, 并且遗传性能稳定^[6]. 采用微波辐照对黑曲霉木聚糖酶生产菌进行诱变处理, 选育到一株产量较高的生产菌 *A. niger* HD-3.6, 发酵单位从 15000 U/mL 提高到 21500 U/mL, 提高了 43.3%, 所选育的菌株经多次传代, 遗传性状十分稳定^[6]. 用微波对免疫抑制剂康乐霉素 C 的产生菌进行了菌种诱变, 获得康乐霉素 C 生产能力高于出发菌株 180% 的 M-13-21^[7].

紫外线波长范围为 10 ~ 380 nm, 也被广泛应用于微生物的诱变育种. 紫外线引起的生物体的主要损伤是相邻碱基形成二聚体阻碍碱基的正常配对而导致碱基置换突变^[8]. 以啤酒酵母 FB 作为出发菌株, 通过紫外线诱变, 并以发酵液中双乙酰含量为主要指标筛选获得一株优良啤酒酵母 UB2. 三角瓶低温发酵 8 d, 其发酵液中双乙酰含量为 0.088 5 mg/L, 比出发菌株 FB 降低 38%; 发酵液保持了亲株 FB 的优良风味和凝聚性, 且部分发酵性能有了较大的改善; 在 500 L 发酵罐中试实验中, UB2 菌株发酵过程中的双乙酰峰值为 0.17 mg/L, 比 FB 降低了 45%, 双乙酰还原速度较快, 比 FB 提前 1 d 达到质量标准, 发酵得到的酒液经品评认为口感优于亲株^[9]. 采用紫外线对多粘菌素 E 诱变, 并以重金属 Cu^{2+} 作为筛选因子, 获得一株遗传稳定且多粘菌素 E 发酵效价比出发菌株提高 45% 的菌株, 对该菌株再采用亚硝基胍(NTG)诱变, 以缬氨酸结构类似物 α 氨基丁酸作为筛选因子时得到一株产量提高 34% 的菌株^[10].

γ 射线是一种波长极短的电磁波, 波长约为 0.001 ~ 0.004 nm, 具有很大的能量. γ 射线中经常以 ^{60}Co γ 射线对微生物作用进行诱变选育. 通过采用不同剂量的 ^{60}Co γ 射线, 对南昌霉素产生菌——南昌链霉菌 80-5.3-116 菌株的孢子进行处理. 结果表明, 3 万伦琴的诱变剂量在对孢子致死率达 90% 左右时, 具有较好的诱变效应. 初筛摇瓶产量正变率达到 21.08%; 挑取的菌株经过初筛和复筛, 获得 3r-68、3r-15 和 3r-373 个菌株, 4 批次发酵平均单位达 7000 $\mu\text{g/mL}$ 以上, 比出发菌株提高产量 70%, 单次摇瓶单位高达 10000 $\mu\text{g/mL}$ ^[11]. 通过 γ 射线照射和亚硝基胍交替处理, 诱变纤维素酶高产菌株, 得到一株纤维素酶高产菌株 T801, 与出发菌株相比, 其产酶能力提高 1.77 倍. 并且在适宜的生长条件下, 该诱变株产酶能力高于国内外一些已知的纤维素酶高产菌株如 QM9414 等, 具有重大的实用价值^[12].

电离辐射是射线将能量直接传递给生物分子. 从照射之时起, 在细胞学上观察到可见损伤的过程包括物理、物理化学和化学三个阶段, 在此过程中辐射能量的吸收和传递、分子的激发和电离、自由基的产生和化学键的断裂等都是在有机体内进行的. 能量的吸收和传递使细胞中排列有序的生物大分子处于激发和电离状态, 特殊的生物结构也使电子传递和自由基链锁反应得以进行, 这样导致了初始的生物化学损伤. 由于亚细胞的破坏引起了酶的释放, 代谢的方向性和协调性的紊乱促使初始的生物化学损伤得到了进一步的发展, 引起了机体内的进一步变化^[13]. 具体机理有待进一步研究.

3 离子束对微生物作用的研究

离子注入技术是一种新的诱变改良方法, 近几年发展非常迅速, 主要集中于植物和工业微生物优良株的选育或改良, 以获得高收益的目标产物为目的, 并取得了可观的社会效益和经济效益, 备受国内外关注。而且离子注入技术与目前其他的诱变源相比, 具有高 LET 值、集束性好、射程可控、能量沉积和质量沉积区域集中; 能量、质量、电量、剂量具有多种组合等优点, 可以获得更高的突变率和更广的突变谱, 在不同的作物及菌种的诱变育种中发挥巨大的作用^[4]。离子注入技术在微生物诱变育种方面取得的成果也层出不穷, 是一种很有潜力的微生物诱变选育新方法。

利用 N^+ 注入之江菌素, 产生菌素高产菌种的选育, 能明显使供试菌诱发突变, 总变异率为 42.4% ~ 73.0%, 其中正变率为 5.8% ~ 36.2%, 特别是 $12 \times 10^{15} N^+ / cm^2$ 到 $15 \times 10^{15} N^+ / cm^2$ 剂量时, 具有很好的正变效果, 其正变率高达 30% 以上, 而且变异菌种性状(产素能力)能稳定遗传, 筛选的优良菌种成功通过中试, 具备实际应用能力^[5]。赵洪英^[6]等用 N^+ 束注入庆大霉素产生菌进行诱变, 经筛选得到了高产抗突变菌种, 摇瓶发酵表明其产抗能力可提高 27.39%, 成果显著。分别用低能离子 H^+ 、 N^+ 、 Ar^+ 注入在 V_c 高产菌株中, 研究 H^+ 、 N^+ 、 Ar^+ 三种离子注入 V_c 生产菌所产生的生物学效应, 确定了最适注入剂量和最佳注入离子, 并由此筛选出 4 株高产菌, 其糖酸(克分子)转化率由 80% 提高到 94% 以上, 并已通过工业生产试验, 为企业带来显著的经济效益, 同时也为工业微生物的选育提供了一条全新的途径^[7]。张勇^[8]等利用实验室自行分离的纤溶酶产生菌 B. L. PY, 对其注入不同剂量 N^+ , 以研究离子注入对其产酶能力的影响, 结果最高产量可提高 51.13%, 由此说明使用离子注入所引起的诱变效应是显著的, 是一种有效的诱变方式。与紫外诱变和 NTG 诱变有所不同的是, 离子诱变过程中正突变频率受缓冲体系的影响并不大。姚建铭^[9]等用 30keV、 $5 \times 10^{15} N^+$ 注入利福霉素产生菌, 先用利福霉素 SV 浓度梯度平板, 筛选出自身抗性菌株, 再以此抗性菌株为出发菌, 经离子束反复诱变、筛选、分纯, 筛选到高产菌株 2953[#], 较出发菌效价提高 18%。7 m³ 罐实验, 效价可达 68630 $\mu g / mL$, 比同期对照高了 35%; 30 m³ 生产罐实验, 最高罐批效价为 6137 $\mu g / mL$, 平均提高 10%。

余增亮等人通过多年研究总结出低能离子注入生物后, 可产生集能量沉积、动量传递、质量沉积和电荷的中和与交换四种联合作用为一体的集体生物学效应, 从而产生较高的突变频率和丰富的诱变图谱, 因而其作用过程和作用内容比其它电离辐射更复杂、丰富而广泛^[10]。

大量的遗传改良的实践促进了离子束注入微生物机理研究的进展, 但就离子注入的研究而言, 其基础理论研究还远落后于应用研究, 尤其是在质量沉积效应、动量传递效应和电荷作用效应方面的研究更是如此。从离子注入那一时刻起到终点生物学效应, 时间跨越 $10^{-19} \sim 10^{-9}$ 秒, 空间从微生物分子的损伤到宏观性状的变异其效应不知放大了多少倍, 期间在微生物体内发生的反应有物理、化学、生物的反应, 作用过程十分复杂^[11]。有人认为低能离子注入导致细胞损伤和生物诱变是由注入离子的扩散或注入离子引起的某些次级过程的间接作用所致; 有人认为注入离子靠动量传递引起生物组织表面溅射, 使后来离子注入到几十甚至上百微米的深度, 这就是说, 离子注入导致生物诱变与其刻蚀所致的直接作用有关^[12]; 另一些人则认为在离子注入过程中, 一些入射离子能够到达细胞内部, 与生物关键大分子如 DNA 发生直接作用, 引起 DNA 断裂, 碱基受损, 同时激活生物体内的各种损伤修复过程, 最终导致产生各种不同的生物学终点效应^[13]。

内蒙古自治区离子束生物工程重点实验室是内蒙古政府拨专款建立起来的面向自治区的开放实验室。实验室进行了低能 N^+ 注入木聚糖酶及注入金霉素链霉菌选育高产菌菌株的研究, 获得木聚糖酶高产突变菌株, 其木聚糖酶活力达到国家先进水平; 利用低能 N^+ 选育金霉素链霉菌, 获得三株突变株, 效价分别提高了 15.3%、16.8%、17.0%; 在低能离子注入生物体的相互作用的原初机制研究方面, 提出了一个计算低能离子注入生物体中穿透深度的方法, 根据该模型具体计算了 30 keV 的 N^+ 束注入水稻种子和 100 keV 的 As^+ 束注入细菌的穿透深度, 计算结果与实验资料一致。实验室还利用高压静电场对黑曲霉和金霉素链霉菌进行了处理, 表明: 相同处理时间, 黑曲霉 A3 的存活率随着电

压的增高而下降;而一定的高压静电场对金霉素链霉菌的存活率具有激活的作用.

4 多种物理因子组合对微生物的作用的研究

人们利用单一物理因子作用于微生物的同时,开始尝试用多种物理因子组合作用微生物,研究微生物的诱变和育种,也取得了较好的结果.采用紫外线和微波处理黑曲霉孢子,获得 1 株比出发菌株果胶酶产生能力提高 2 倍的突变株 3502,在用正交试验优选而得的最佳固体发酵条件下酶活力达 $2644 \text{ U/g}^{[4]}$.以果胶酶产生菌——黑曲霉为研究对象,采用 He-Ne 激光, Ar^+ 激光进行辐照,经单孢子分离、产酶发酵,研究激光的不同辐照与产酶的关系,同时筛选出高产菌株,实验结果表明,He-Ne、 Ar^+ 激光对黑曲霉果胶酶具有诱变效应,能使诱变株产酶活性提高,导致黑曲霉果胶酶较高的产量变异^[5].以宇佐美曲霉白色突变株 B₁ 为出发菌株,通过微波诱变和亚硝基胍、硫酸锂复合诱变剂点选平板法诱变,选育到一株产酸性蛋白酶的高产菌——栗色变种 L336,遗传性状非常稳定^[6].

5 展 望

总之,物理因子的生物效应研究是生命科学的重要内容也是物理学与生物学自身发展、相互渗透、分支交融的必然结果.物理因子诱变微生物的研究与应用具有极其重要的实践意义.当前发酵工业和其他微生物部门所使用的高产菌株几乎毫不例外地是通过诱变育种而明显提高其生产性能的.不久的将来,微生物的诱变育种将广泛应用于食品卫生,医药健康,环境利用,资源使用,农畜牧业等领域.同时,我们也意识到很多物理因子诱变的微生物菌株尚处于实验室阶段,或刚刚走向工业化道路,要使之为民服务还有很长的路要走.而且我们对其中诱变的机理还很不清楚,只是在大量的实验基础上进行了一些初步的研究探讨或还没有进行研究.

物理因子诱变微生物育种属于交叉学科,包括了物理学、生物学、生物化学等学科,它的发展还需要各种人才的综合,今后要加强各研究队伍间的交流与合作,充分发挥物理学、生物学、生物化学等学科的交叉优势,合理利用物理、化学、生物等多重因子结合的手段作用于微生物,更好的提高微生物的诱变率和稳定性,保持微生物工业产品的优质高产和低耗;同时要搞清各种物理因子作用于微生物的机理、物理因子影响微生物机体的原因和具体过程以及物理因子导致微生物发生诱变的原因.

物理因子诱变育种技术作为一种新兴的交叉学科,显现了巨大的优势,物理诱变突变率高、操作简单.加之物理因子介导转基因的可能性,使其在微生物育种中更具有目的性和针对性.随着研究程度的深入,研究范围的拓宽,相信物理因子在微生物诱变育种中能发挥巨大的作用.

参考文献:

- [1] 陈云琳,刘晓娟,闻建平.激光诱变微生物技术的研究进展[J].生物物理学报,2003,19(4):354~358.
- [2] 洪智勇,毛宁.激光对红曲霉的诱变作用[J].激光杂志,2002,23(5):53~54.
- [3] 毛宁,陈必链.激光在工业微生物育种中的应用研究[J].应用激光,1997,17(1):27~29.
- [4] 陈云琳,刘晓娟,闻建平.激光诱变微生物技术的研究进展[J].生物物理学报,2003,19(4):354~358.
- [5] 陈力力,鲁迎新.微波诱变选育井冈霉素高产菌[J].生物技术,2003,13(5):14~15.
- [6] 李永泉.微波诱变选育木聚糖酶高产菌[J].微波学报,2001,17(1):51~53.
- [7] 周建琴,高荣梅.康乐霉素 C 产生菌的微波诱变[J].生物学杂志,2002,19(4):12~13.
- [8] 沈萍.微生物学[M].北京:高等教育出版社,2003.206~211.
- [9] 唐晓达,张秀丽,蔡车国,等.低双乙酰啤酒酵母菌种选育及其中试[J].厦门大学学报(自然科学),2003,42(4):509~512.
- [10] 邢维玲,周希贵,王贺祥.多粘菌素 E 高产菌株的选育[J].中国抗生素杂志,2002,27(6):326~328.
- [11] 魏赛金,付学琴,程新.⁶⁰Co γ 射线对南昌霉素产生菌的诱变选育[J].江西农业大学学报(自然科学版),2002,24(2):186~189.
- [12] 董志扬,祝令香,于魏.纤维素酶高产菌株的诱变选育及产酶条件研究[J].核农学报,2001,15(1):26~31.

[13] 夏寿萱. 分子放射生物学 [M] . 北京: 高等教育出版社, 1992, 9 ~ 28.

[14] 向砥, 李炯, 姚建铭, 等. 离子注入选育高产壮观链霉菌的研究 [J] . 激光生物学报, 2002, 11(4) : 278 ~ 280.

[15] 桑金隆, 竺莉红, 李孝辉. 离子注入诱变选育之江菌素产生菌 [J] . 科技通报, 2002, 18(1): 63 ~ 66.

[16] 赵洪英, 李彦, 裴鸿娇. N^{+} 离子束注入庆大霉素产生菌诱变效应研究 [J] . 天津理工学院学报, 2001, 17(1): 14 ~ 17.

[17] 虞龙, 许安, 王纪. 低能离子注入在 Vc 高产菌株选育中的应用 [J] . 激光生物学报, 1999, 8(3) : 217 ~ 220.

[18] 张勇, 王忠彦, 胡承. 离子诱变选育纤溶酶高产菌及其发酵条件的研究 [J] . 四川大学学报(自然科学版), 2002, 39(4) : 780 ~ 783.

[19] 姚建铭, 朱皖宜, 王纪. 离子注入诱变利福霉素生产菌 [J] . 激光生物学报, 1999, 8(3) : 214 ~ 216.

[20] 宋道军, 姚建铭, 邵春林. 离子注入微生物产生“马鞍型”存活曲线的可能作用机制 [J] . 核技术, 1999, 22(3) : 129 ~ 132.

[21] 陈宇, 林梓鑫, 张峰. 离子注入微生物的生物效应研究 [J] . 中国抗生素杂志, 1998, 23(6): 415.

[22] 宋道军, 余汛, 姚建铭. 低能离子束对微生物细胞的刻蚀与损伤研究 [J] . 生物化学与生物物理学报, 1998, 30(6) : 571 ~ 574.

[23] 余增亮. 粒子束生物技术引论 [M] . 合肥: 安徽科学技术出版社, 1996, 176 ~ 194.

[24] 李廷生, 王平诸. 鲍宇茹果胶酶高产菌株 *Aspergillusniger*3502 的选育 [J] . 郑州工程学院学报, 2001, 22(4): 12 ~ 23.

[25] 陈金烟, 陈细香, 陈晓敏. $He-Ne$ 及 Ar^{+} 激光对黑曲霉产果胶酶的诱变效应 [J] . 泉州师专学报(自然科学), 2000, 18(2): 75 ~ 77.

[26] 李永泉, 翁醒华, 贺筱蓉. 微波诱变结合化学诱变选育酸性蛋白酶高产菌 [J] . 微生物学报, 1999, 39(2): 181 ~ 184.

(责任编辑 李国栋)

Research Progress in Interaction between Microorganism and Physical Mutagenic Factors

SHI Lei, LIANG Yun-zhang

(*Key Laborary of Ion Beam Bioengineering of NeiMongol Autonomous Region,
NeiMongol University, hohhot 010021, PRC*)

Abstract: Microorganism is connected with medicine and health, entironment, resources using, farming and stockbreeding. The microorganism used in industry is mostly selected from nature. In order to get a kind of mutative microorganisms with high quality, high yield and low wastage, various physical mutagenic experiments are tried and acquired success. Some mutagenic microorganisms have been used in industry and agriculture. Some of research and foundational mechanism analysis are presented about the interaction between microorganism and physical mutagenic factors, such as laser, hertzian waves, ion beam etc.

Key words: microorganism; laser; hertzian waves; ion beam; mutation