

倪 赛,刘银春,李 健,等.具广谱抗菌活性桔青霉 PA-33 的诱变育种[J].江苏农业科学,2018,46(20):104-108.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.20.027

具广谱抗菌活性桔青霉 PA-33 的诱变育种

倪 赛,刘银春,李 健,李肖鹤,朱向东

(江西农业大学生物科学与工程学院,江西南昌 330045)

摘要:为增强产抗生素桔青霉(*Penicillium citrinum*) PA-33 的抗菌活性,提高所产抗生素的产量。以桔青霉 PA-33 菌株为出发菌株,以大肠杆菌为指示菌,分别采用紫外诱变、紫外-LiCl 诱变、紫外-亚硝酸复合诱变、微波诱变以及微波-超声波-3%硫酸二乙酯(diethyl sulfate,简称 DES)复合诱变等技术对桔青霉 PA-33 菌株孢子悬液进行诱变,筛选出抗菌活性增强的突变菌株,并测定突变菌株的遗传稳定性。筛选得到 5 株高产抗生素突变菌株 Li-1、N-25、H-14、WB-6、D-11,它们的抗菌活性提高率分别为 39.51%、39.19%、40.26%、32.29%、20.83%;其中突变菌株 Li-1、H-14、N-25 遗传稳定性较好,突变菌株 WB-6、D-11 遗传稳定性相对较差。桔青霉 PA-33 诱变育种效果明显,抗菌活性明显增强,能为其进一步工业化应用提供基础和依据。

关键词:桔青霉;广谱性;抗菌活性;诱变育种

中图分类号:S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)20-0104-05

微生物产品被广泛应用在医药生产、环境修复、日常用品等各方面。为满足人类大量需求,研究新的微生物品种已成为微生物应用的关键^[1]。由微生物产生的抗生素类药物是微生物诱变育种技术在制药领域中的重要应用^[2]。面对抗生素的产生很难通过单个编码基因或表达调控因子的改变而达到理想的效果这一现状,传统的诱变育种技术可以通过简便快速的诱变及适当的筛选手段而获得生产性能优良的工业菌株。因此,传统的诱变育种技术在目前抗生素产生菌的选育过程中具有不可取代的地位^[3]。除此之外,诱变育种技术对产抗生素微生物而言具有提高产量、提高纯度、改进发酵工艺和产生新抗生素等优点^[4]。直接从自然界中分离得到的野生型菌株性状不稳定,容易退化,无法满足实际需求,这就

须要利用育种方法对它们进行改造^[5]。微生物诱变育种通过改变微生物的遗传结构和功能,筛选出优良的突变型微生物。这种育种方式使微生物变异速度快、效率高,是食品加工和医药生产等工业的首选^[6]。目前,微生物诱变技术在制药中的研究主要以获得高产突变株为目的,通过诱变使酶活性极大提高,被广泛应用于临床诊断、生物农药及食品化妆品等方面^[2]。在霉菌中,因其种类繁多、分布广泛,又有菌丝和孢子等独有特性,故诱变育种具有比较独特的特点^[7]。除此之外,多种物理诱变和化学诱变方法的结合使用,在霉菌中产生了很好的效果,特别是物理诱变方法中的紫外线诱变和化学诱变方法中的氯化锂诱变相结合的运用较多^[2]。如张建勇等分别采用紫外线单因子诱变、紫外线-LiCl 复合诱变处理藤黄灰链霉菌,致使其新型抗生素藤黄灰链霉菌素产量提高 1.2 倍^[8]。此外,曹燕妮等以豌豆根瘤菌为出发菌株,利用紫外-LiCl-超声波复合诱变,以期获得高产辅酶 Q10 菌株^[9]。

目前,人工诱变的育种方式主要包括物理诱变、化学诱变和生物诱变^[7],在微生物育种中较常见的为物理诱变和化学诱变。此外应用较多的还有复合诱变,通常仅采用一种方法进行诱变,会使微生物产生抗性,从而降低突变率,复合诱变

收稿日期:2018-03-08

基金项目:国家自然科学基金(编号:21366012);江西省教育厅自然科学基金(编号:GJJ170286)。

作者简介:倪 赛(1992—),男,湖北天门人,硕士研究生,主要从事天然产物分离研究。E-mail:373455035@qq.com。

通信作者:朱向东,博士,副教授,主要从事天然产物分离和结构鉴定研究。E-mail:zhuxdau@jxau.edu.cn。

照相比增幅为 22.9%,与空白对照相比增幅为 16.4%。

62.5 g/L 精甲·咯菌腈悬浮种衣剂采用干稻种拌种,晾干后直接播种,操作简便,减少了水稻种子浸种催芽环节恶苗病菌的浸染,是防治水稻恶苗病的一项新型技术。本试验仅在武运梗 30 上用 62.5 g/L 精甲·咯菌腈悬浮种衣剂进行拌种试验调查,对其他水稻品种及拌种后晾干时间等内容还有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1]陈夕军,卢国新,童蕴慧,等.江苏水稻恶苗病病原菌研究[J].扬州大学学报(农业与生命科学版),2008,29(3):88-90.
- [2]朱桂梅,潘以楼,杨敬辉.水稻恶苗病产量损失率测定[J].江苏

农业科学,2001(5):43-45.

[3]李芝娟,马良勇,李西明,等.水稻恶苗病抗性的研究进展[J].中国稻米,2008(2):24-25.

[4]吉沐祥.预防水稻恶苗病新型种子处理剂[J].农家致富,2013(2):24.

[5]纪拥军,陈金宏,杨呈芹,等.种子处理对水稻恶苗病的防控效果[J].植物医生,2015,28(4):29-31.

[6]方兴洲,陈 莉,产祝龙,等.水稻恶苗病与浸种,催芽和播种等因子的关系研究[J].热带作物学报,2012,33(6):1107-1110.

[7]刘永锋,陈志谊,周保华,等.江苏省部分稻区恶苗病菌对水稻浸种剂的抗药性检测[J].江苏农业学报,2002,18(3):190-192.

[8]邵淑华.亮盾种衣剂在水稻上的应用效果[J].农业与技术,2014(2):113.

具有补充不同诱变方法之间缺陷的优势^[6]。本研究主要运用紫外诱变、紫外-LiCl 复合诱变、紫外-亚硝酸复合诱变、微波诱变以及微波-超声波-3% 硫酸二乙酯(diethyl sulfate, 简称 DES)复合诱变等技术对桔青霉(*Penicillium citrinum*) PA-33 菌株孢子进行诱变育种, 由此获得高产抗生素突变菌株, 以期对桔青霉 PA-33 菌株工业化应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

桔青霉 PA-33; 病原菌: 大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)。以上菌株保存于江西农业大学生物科学与工程学院实验室。

1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA): 马铃薯 200 g/L、葡萄糖 20 g/L、水 1 L、琼脂 15~20 g/L, pH 值自然。

马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB): 马铃薯 200 g/L、葡萄糖 20 g/L、水 1 L, pH 值自然。

1.3 菌株桔青霉 PA-33 诱变育种

1.3.1 孢子悬液的制备 将菌株 PA-33 活化后加入适量无菌生理盐水, 洗下孢子, 用无菌脱脂棉过滤除去菌丝体和培养基残渣, 装入带有玻璃珠的 100 mL 锥形瓶中, 并置于摇床上振荡 30 min, 使孢子充分分散, 调整孢子悬液浓度为 10^6 个/mL, 备用。

1.3.2 紫外诱变处理 (1) 在 9 个放置有无菌磁棒的培养皿中分别加入 8 mL 孢子悬液; (2) 将培养皿放置在事先预热 20 min 的 15 W 紫外灯下, 照射距离为 24 cm; (3) 在磁力搅拌器上打开皿盖, 分别照射 0 s、30 s、60 s、90 s、2 min、4 min、6 min、9 min、15 min; (4) 吸取处理后的孢子悬液 1 mL 依次进行 10 倍稀释, 吸取 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 等 3 个梯度孢子悬液 0.2 mL 涂平板, 重复 3 次, 28 ℃ 恒温培养 3~5 d, 根据菌落数计算致死率, 选择致死率为 90% 左右的条件作为紫外诱变的最适条件; (5) 诱变菌株初筛: 采用致死率为 90% 的条件诱变, 挑取菌落生长速度快且菌落直径大的单菌落, 进行复筛; (6) 将初筛的菌株分别接种至 PDB 培养基中, 置于 28 ℃、150 r/min 的摇床上培养 7 d, 以大肠杆菌为指示菌, 以原始菌株 PA-33 为对照, 采用管碟法测定各突变菌株发酵液的抑菌圈直径, 根据抑菌圈直径增加的大小确定最佳突变菌株。

1.3.3 紫外-LiCl 复合诱变处理 将紫外诱变致死率为 90% 的孢子悬液依次稀释 10 倍, 选取 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 稀释度的孢子悬液 200 μ L 涂布于含 LiCl 浓度为 0、0.3%、0.6%、1.0%、1.5%、2.0% 的 PDA 平板中, 每组重复 3 次, 参照“1.3.2”节方法确定最佳突变菌株。

1.3.4 紫外-亚硝酸复合诱变处理 (1) 将菌株 PA-33 参照紫外诱变致死率为 90% 的条件处理; (2) 在每个试管中分别加入 1 mL 0.2 mol/L NaNO_2 溶液、2 mL 孢子悬液、1 mL pH 值为 4.5 的醋酸缓冲液, 充分混匀后, 置于 27 ℃ 水浴锅中分别处理 0、5、10、15、20、30、45、60 min, 并加入 2 mL 0.07 mol/L pH 值为 8.6 的 Na_2HPO_4 溶液, 每组重复 3 次。参照“1.3.2”节方法确定最佳突变菌株。

1.3.5 微波诱变处理 (1) 火力强度的确定: 分别吸取 8 mL 菌株 PA-33 孢子悬液于 3 个培养皿中, 在不加盖条件下, 分别用额定功率 700 W、频率 22 kHz 的低火、中火、高火处理 20 s, 吸取处理后的孢子悬液 1 mL 进行 10 倍稀释, 吸取 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 3 个稀释度的孢子悬液 200 μ L 涂布于盛有 PDA 的平板中, 重复 3 次, 28 ℃ 恒温培养 3~5 d, 记录菌落数确定微波诱变火力强度。 (2) 致死率试验: 使用最合适的火力强度进行微波诱变试验, 分别吸取 8 mL 孢子悬液至平板中, 微波炉中分别低火处理 0、5、10、15、20、25、30、40、60 s, 每组重复 3 次。参照“1.3.2”节方法确定最佳突变菌株。

1.3.6 微波-超声波-3% 硫酸二乙酯(diethyl sulfate, 简称 DES)复合诱变处理 (1) 在 50 mL 锥形瓶中分别加入 16 mL pH 值为 7 的磷酸缓冲液、4 mL 突变菌株 WB-6 孢子悬液和 0.6 mL DES(DES 终浓度为 3%), 并在 200 W、22 kHz 超声波冰水浴条件下分别处理 0、3、6、9、15、25、40、60 min, 每组重复 3 次。参照“1.3.2”节方法确定最佳突变菌株。

1.3.7 突变菌株遗传稳定性试验 将各突变菌株连续传代 6 代, 测定其发酵液的抗菌活性。

1.3.8 突变菌株抗菌活性测试 利用管碟法, 以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌为指示菌, 测定突变菌株发酵液的抗菌活性。

2 结果与分析

2.1 菌株桔青霉 PA-33 紫外诱变

2.1.1 紫外诱变致死率试验 由图 1 可知, 在紫外灯功率 15 W、照射距离 24 cm 条件下, 随着诱变时间的增加, 紫外诱变致死率逐渐增大, 在 1.5 min 时, 致死率为 76.92%, 在 2 min 时, 致死率为 96.70%, 诱变时间超过 9 min 时, 致死率超过 99.00%。因此, 选择紫外诱变条件为紫外灯功率 15 W、照射距离 24 cm、照射时间 2 min。

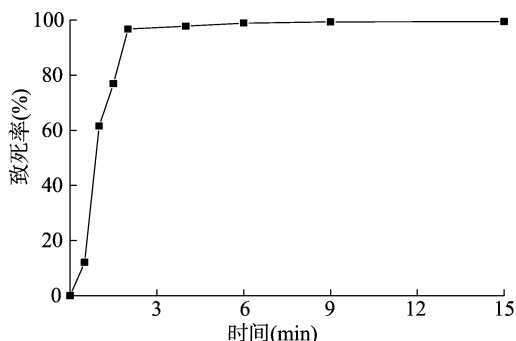


图1 紫外诱变致死率曲线

2.1.2 紫外诱变突变菌株筛选 从平板上挑取 44 个菌落进行复筛, 结果显示, 紫外线对菌株 PA-33 诱变效果较差, 仅有 8 个突变菌株的抑菌圈直径增大, 正向突变率仅为 18.18%, 其中突变菌株 UV-22 抑菌圈直径最大, 活性提高率却仅为 12.55% (表 1)。

2.2 菌株桔青霉 PA-33 紫外-LiCl 复合诱变

2.2.1 菌株 PA-33 紫外-LiCl 复合诱变致死率试验 由图 2 可知, 菌株 PA-33 在紫外灯功率 15 W、照射距离 24 cm、照射时间 2 min 的诱变条件下, 随着 LiCl 浓度的增加, 其致死率整体增大, 在 LiCl 浓度为 0.6% 时, 致死率为 88.12%, LiCl

表 1 紫外诱变复筛菌株及其抗菌活性

突变菌株	抑菌圈直径 (mm)	活性提高 率(%)	突变菌株	抑菌圈直径 (mm)	活性提高 率(%)
UV-1	20.07±0.40	7.15	UV-32	20.76±0.61	10.84
UV-6	20.05±0.05	7.05	UV-35	19.57±0.38	4.48
UV-19	20.37±1.61	8.76	UV-41	19.65±0.99	4.91
UV-22	21.08±0.87	12.55	UV-44	20.67±0.50	10.36

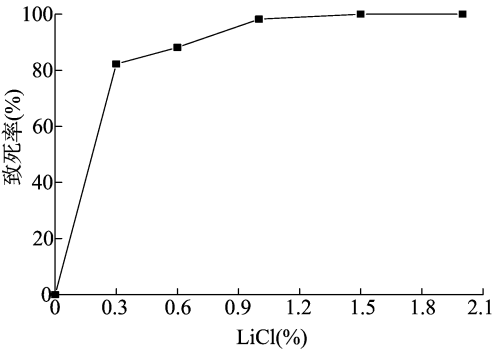


图2 紫外-LiCl 复合诱变致死率曲线

浓度继续增加到 1.5% 时,致死率达 100%。因此,确定紫外-LiCl 复合诱变条件为紫外灯功率 15 W、照射距离 24 cm、照射时间 2 min、LiCl 浓度为 0.6%。

2.2.2 紫外-LiCl 复合诱变突变菌株筛选 从平板上挑取 28 个菌株进行复筛,6 个突变菌株抗菌活性增强,正向突变率为 21.43%。由表 2 可知,突变菌株 Li-1 的抑菌圈直径最大,为 26.13 mm;活性提高率最大,为 39.51%。突变菌株 Li-13、Li-17、Li-19、Li-27、Li-28 活性提高率分别为 7.47%、3.58%、6.03%、11.05%、9.08%,其中突变菌株 Li-17 活性提高率最低,仅为 3.58%。

表 2 紫外-LiCl 复合诱变复筛菌株及其抗菌活性

突变菌株	抑菌圈直径 (mm)	活性提高 率(%)	突变菌株	抑菌圈直径 (mm)	活性提高 率(%)
Li-1	26.13±1.16	39.51	Li-19	19.86±0.74	6.03
Li-13	20.13±1.41	7.47	Li-27	20.80±1.37	11.05
Li-17	19.40±0.70	3.58	Li-28	20.43±0.22	9.08

2.3 菌株桔青霉 PA-33 紫外-亚硝酸复合诱变

2.3.1 菌株 PA-33 紫外-亚硝酸复合诱变致死率试验

由图 3 可知,菌株 PA-33 在紫外灯功率 15 W、照射距离 24 cm、照射时间 2 min 诱变的基础上,进行亚硝酸诱变,亚硝酸浓度为 0.2 mol/L 条件下,随着诱变时间的增加,其孢子致死率逐渐增大,当诱变时间为 30、45、60 min 时,孢子致死率分别为 76.47%、91.18%、94.12%。因此,确定紫外-亚硝酸复合诱变条件为紫外灯功率 15 W、照射距离 24 cm、照射时间 2 min、0.2 mol/L 亚硝酸作用时间 45 min。

2.3.2 紫外-亚硝酸复合诱变突变菌株筛选 从平板上挑取 41 个突变菌株进行复筛,其中 11 个突变菌株抗菌活性增强,正向突变率为 26.83%。由表 3 可知,突变菌株 H-14 和 N-25 抑菌圈直径最大,分别为 26.27、26.07 mm,活性提高率分别为 40.26%、39.19%。

2.4 菌株桔青霉 PA-33 微波诱变

2.4.1 微波诱变火力强度确定 将菌株 PA-33 孢子悬液分别经微波低火、中火和高火处理 20 s,结果(表 4)显示,低

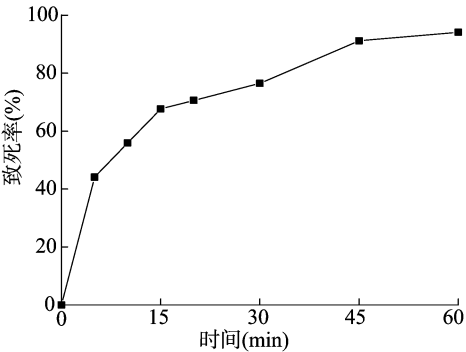


图3 紫外-亚硝酸复合诱变致死率曲线

表 3 紫外-亚硝酸复合诱变复筛菌株及其抗菌活性

突变菌株	抑菌圈直径 (mm)	活性提高 率(%)	突变菌株	抑菌圈直径 (mm)	活性提高 率(%)
H-5	20.86±0.90	11.37	N-21	19.40±0.34	3.58
H-11	20.40±0.41	8.92	N-23	19.76±0.56	5.50
H-12	21.06±0.47	12.44	N-24	19.13±0.33	2.14
H-14	26.27±0.19	40.26	N-25	26.07±0.22	39.19
N-12	20.73±0.16	10.68	N-26	19.56±0.45	4.43
N-19	20.00±0.57	6.78			

表 4 微波火力强度对菌株 PA-33 孢子存活能力的影响

火力强度	存活菌落数(个/mL)
低火	6.5×10^4
中火	0
高火	0

火处理组存活的菌落数为 6.5×10^4 个/mL,而中火和高火处理组无存活菌落数,因此选用低火作为微波诱变的火力强度。

2.4.2 菌株 PA-33 微波诱变致死率试验 由图 4 可知,菌株 PA-33 的孢子悬液经功率为 700 W、频率 22 kHz 的微波低火处理时,随着处理时间的延长,其孢子致死率逐渐增加,处理时间为 25 s 时,致死率为 85.88%,处理时间为 30 s 时,致死率已达到 90.40%,处理 60 s 时,致死率已接近 97%。因此,确定微波诱变菌株 PA-33 的条件为微波炉功率 700 W、频率 22 kHz,低火处理 30 s。

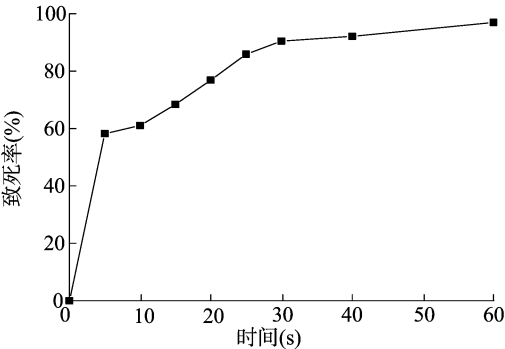


图4 微波诱变致死率曲线

2.4.3 菌株 PA-33 微波诱变突变菌株筛选 从平板上挑取 39 株突变菌株进行发酵,抑菌活性测试结果见表 5。共有 24 株突变菌株发酵液抑菌圈直径增强,正向突变率为 61.54%,其中突变菌株 WB-6 抑菌圈直径为 25.40 mm,抗菌活性提高率最高,为 32.29%。

表 5 微波诱变复筛菌株及其抑菌活性

突变菌株	抑菌圈直径 (mm)	活性提高 率(%)	突变菌株	抑菌圈直径 (mm)	活性提高 率(%)
WB-2	21.03±0.56	9.53	WB-23	20.67±1.09	7.66
WB-5	22.70±0.36	18.23	WB-25	19.67±0.57	2.45
WB-6	25.40±0.99	32.29	WB-26	22.93±0.25	19.43
WB-7	22.93±0.90	19.43	WB-28	21.60±0.33	12.50
WB-8	19.87±1.25	3.49	WB-29	19.47±0.25	1.41
WB-9	21.67±0.52	12.86	WB-31	21.40±0.16	11.46
WB-13	20.87±1.24	8.70	WB-32	22.47±0.25	17.03
WB-14	20.67±0.41	7.66	WB-33	21.73±0.09	13.18
WB-17	23.40±1.54	21.88	WB-34	19.53±0.25	1.72
WB-18	24.20±1.60	26.04	WB-36	21.00±0.16	9.38
WB-20	21.80±1.02	13.54	WB-37	20.07±0.34	4.53
WB-21	20.27±0.68	5.57	WB-39	19.47±0.25	1.41

2.5 菌株桔青霉 PA-33 微波-超声波-3% DES 复合诱变

2.5.1 微波-超声波-DES 复合诱变致死率试验 微波诱变突变菌株 WB-6 孢子悬液经超声波联合 3% DES 诱变处理不同时间。由图 5 可知,随着诱变时间的延长,其孢子悬液致死率不断增加。当处理时间为 15 min 时,致死率已达到 88.89%;当处理时间为 60 min 时,致死率达到 98.77%。因此,确定超声波-3% DES 诱变条件为 200 W、22 kHz 超声波强度、3% DES 处理 15 min。

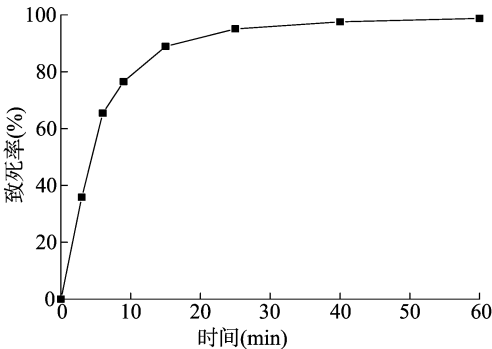


图 5 微波-超声波-3% DES 复合诱变致死率曲线

2.5.2 微波-超声波-3% DES 复合诱变突变菌株筛选 挑取 29 株突变菌株用于抗菌活性测试,由表 6 可知,共有 18 株突变菌株发酵液抗菌活性增强,正向突变率为 62.07%,其中突变菌株 D-11 抑菌圈直径为 23.20 mm,抗菌活性提高率最大,达到 20.83%。

2.6 突变菌株传代稳定性测试

由图 6 可知,突变菌株 Li-1、H-14、N-25 的传代稳定性较好,传代至 6 代抗菌活性基本稳定。突变菌株 WB-6、D-11 的传代稳定性较差,发酵液抑菌圈直径总体呈下降趋

表 6 微波-超声波-3% DES 复合诱变复筛菌株及其抑菌活性

突变菌株	抑菌圈直径 (mm)	活性提高 率(%)	突变菌株	抑菌圈直径 (mm)	活性提高 率(%)
D-6	20.06±0.09	5.52	D-20	20.80±0.99	8.33
D-7	20.47±0.50	6.61	D-21	21.87±0.81	13.91
D-8	20.00±0.65	4.17	D-22	21.33±0.84	11.09
D-11	23.20±0.75	20.83	D-23	21.40±0.28	11.46
D-12	22.23±0.52	15.78	D-24	20.87±0.94	8.70
D-13	21.40±0.59	11.46	D-25	20.60±0.43	7.29
D-14	22.73±1.27	18.39	D-27	20.60±0.59	7.29
D-16	22.40±0.43	16.67	D-28	20.07±0.66	5.57
D-19	21.20±1.07	10.42	D-29	19.60±0.28	2.08

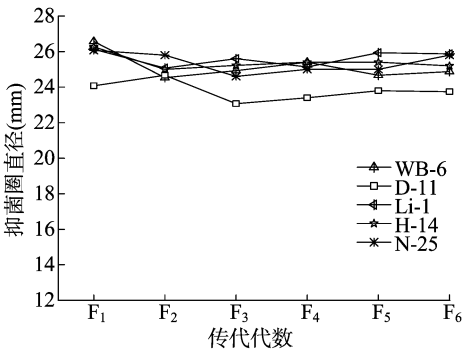


图 6 突变菌株传代稳定性

势,突变菌株 WB-6 抗菌活性提高率维持在 30.97%~32.29%,突变菌株 D-11 的抗菌活性提高率变化区间为 23.17%~28.51%。综上,突变菌株 Li-1、H-14、N-25 是传代稳定性较好的菌株,突变菌株 WB-6、D-11 传代稳定性较差。

2.7 突变菌株抗菌活性测试

与原始菌株 PA-33 发酵液抗菌活性相比,突变菌株 Li-1 对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、大肠杆菌的抑菌圈直径分别增加 5.53、9.80、6.53、7.40 mm;突变菌株 H-14 对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、大肠杆菌的抑菌圈直径分别增加 4.66、7.54、5.20、7.54 mm;突变菌株 N-25 对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、大肠杆菌的抑菌圈直径分别增加 4.33、9.07、5.73、7.34 mm;突变菌株 WB-6 对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、大肠杆菌的抑菌圈直径分别增加 4.13、6.27、6.06、6.67 mm;突变菌株 D-11 对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、大肠杆菌的抑菌圈直径分别增加 3.23、4.67、3.33、5.34 mm。其中突变菌株 Li-1 抗菌活性最大,突变菌株 H-14、N-25、WB-6 次之,D-11 抗菌活性最小(表 7)。

表 7 突变菌株抗菌活性测试

突变菌株	病原细菌抑菌圈直径(mm)			
	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	苏云金芽孢杆菌	大肠杆菌
Li-1	21.80±0.99	28.33±0.85	25.20±0.33	26.13±0.09
H-14	20.93±0.19	26.07±0.94	23.87±0.25	26.27±0.09
N-25	20.60±0.43	27.60±0.43	24.40±0.99	26.07±0.34
WB-6	20.40±0.16	24.80±0.82	24.73±1.25	25.40±0.16
D-11	19.50±0.43	23.20±0.28	22.00±1.42	24.07±0.09
PA-33(CK)	16.27±0.68	18.53±0.34	18.67±0.09	18.73±0.62

3 结论与讨论

分别采用紫外诱变、紫外-LiCl 复合诱变、紫外-亚硝酸复合诱变、微波诱变以及微波-超声波和 3% DES 复合诱变菌株 PA-33, 分别筛选得到抗菌活性提高最大的突变菌株 Li-1、N-25、H-14、WB-6、D-11, 它们对大肠杆菌的抗菌活性分别提高 39.51%、39.19%、40.26%、32.29%、20.83%。通过传代稳定性测试, 突变菌株 Li-1、H-14、N-25 是传代稳定性较好的菌株, 突变菌株 WB-6、D-11 传代稳定性较差。紫外单因子诱变突变菌株的活性提高率最高仅为 12.55%, 而在紫外诱变基础上, 进行 LiCl 诱变后, 抗菌活性明显增强, 最高活性提高率增至 39.51%; 同时在紫外诱变基础上进行亚硝酸诱变后, 得到突变菌株 N-25、H-14 的抗菌活性明显增强, 活性提高率分别增至 39.19%、40.26%。紫外诱变对菌株 PA-33 的诱变效果较差, 可能是因为紫外线主要阻碍碱基间的正常配对和妨碍双链的解开而使菌株发生变异, 其引起的突变单一^[10], 形成的突变体类型较少。而在紫外诱变基础上进一步进行 LiCl 和亚硝酸诱变使得菌株 PA-33 产生高比例点突变和低比例的染色体畸变, 从而使诱变效果增强。朱峰等分别使用 3 种复合诱变方法处理 Snea253-GL8 菌株, 筛选出高杀虫活性和稳定高产的突变株^[11]。韩娜应用亚硝酸结合消泡剂诱变选育得到的 9S-189 菌株, 该菌株能显著提高对消泡剂的耐性并能够更适应高消泡剂的环境^[12]。Xu 等将 *Streptomyces pristinaespiralis* CGMCC 0957 菌株经紫外线诱变结合耐自身产物抗性筛选, 获得普纳霉素高产菌株^[13]。刘明志等以产紫杉醇内生真菌葡萄座腔菌菌株 J11 为出发菌, 经甲基磺酸乙酯和制霉菌素复合诱变, 得到诱变菌株 J11-8, 产紫杉醇量提高 66.5%^[14]。胡丹东等以产核酸酶 P1 桔青霉 050421 为出发菌株, 经紫外线诱变处理, 其突变菌株 050421-A 产酶活性比出发菌株提高了约 68.1%, 同时将此菌株再经过化学试剂 LiCl 处理, 得到遗传稳定性较好的菌株 050421-A-AB, 其产酶活性在紫外诱变基础上提高了 40.05%, 比原始出发菌株 050421 提高了约 138.88%^[15]。

微波诱变以及微波-超声波-3% DES 复合诱变效果相对较好, 其中微波-超声波-3% DES 复合诱变效果明显低于微波单因子诱变效果, 突变菌株 D-11 的抗菌活性提高率明显低于突变菌株 WB-6, 微波单因子诱变效果明显, 原因可能是以下 3 个方面^[16]: (1) 微波是一种电磁波, 可使单孢子内 DNA 分子氢键和碱基对及化学力受损, 最终引起分子结构发生变化, 导致遗传变异; (2) 微波极强的穿透效应, 使细胞壁内外水分子产生剧烈运动, 从而改变细胞壁通透性, 使胞内物质被释放出来; (3) 微波所产生的瞬时热效应, 易引起酶失活, 从而造成细胞的生理、生化变异和微生物的动态代谢平衡发生紊乱, 从而改变其代谢途径。鲍勇阳等采用微波-DES 复合诱变, 以产淀粉酶黑曲霉为出发菌株, 得到的突变株再经发酵优化后, 其 α -淀粉酶的酶活性最高达到 6 011 U/g^[17]。苏龙等以产核酸酶 P1 桔青霉为出发菌株, 通

过微波诱变, 得到 1 株产核酸酶较高的生产菌 SL5, 其产生的核酸酶 P1 酶活性提高了 84.00%^[18]。田利飞等以 YC34 菌株为出发菌株, 通过紫外诱变、微波诱变、LiCl 诱变 3 种方式依次进行复合诱变处理后, 获得突变株 YC34-1, 其初发酵液的酶活性增加了 183.3%^[19]。

参考文献:

- [1] Parekh S, Vinci V A, Strobel R J. Improvement of microbial strains and fermentation processes[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2000, 54(3): 287-301.
- [2] 刁欢, 汤强, 阮玲玲. 诱变育种技术在微生物制药中的应用研究进展[J]. 长江大学学报(自然科学版), 2014, 11(35): 56-58.
- [3] 王建玲, 许铭玉, 石天歌, 等. 紫外诱变选育恩拉霉素高产菌株[J]. 工业微生物, 2015, 45(5): 23-28.
- [4] 徐婉如. 秦艽内生真菌的诱变育种及其发酵条件优化[D]. 西安: 西北大学, 2008: 11.
- [5] 杨树林, 严菊芬, 齐宁波, 等. 温莪术内生真菌 *Gibberella moniliformis* EZG0807 诱变及其诱变株遗传稳定性研究[J]. 中国生物工程杂志, 2014, 34(5): 23-29.
- [6] 李翔. 微生物诱变育种技术[J]. 现代商贸工业, 2017, 38(34): 185-187.
- [7] 熊进, 黄魁英, 曹丁, 等. 诱变育种方法在霉菌中的应用[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(9): 198-201.
- [8] 张建勇, 牛晋阳, 陈贵斌, 等. 新型抗生素 AGPM 产生菌藤黄灰链霉菌的诱变育种[J]. 微生物学通报, 2003, 30(2): 24-28.
- [9] 曹燕妮, 岳田利, 袁亚红, 等. 辅酶 Q₁₀ 高产菌株的诱变选育[J]. 食品科学, 2012, 33(11): 121-125.
- [10] 朱瑞敏, 邱晨曦, 韩悦, 等. 微生物育种物理诱变技术 ARTP 的应用进展[J]. 生物技术世界, 2016(4): 20-23.
- [11] 朱峰, 田成丽, 陈井生, 等. 3 种诱变因子对链霉菌 Snea253-GL8 菌株的诱变效果[J]. 上海农业学报, 2015, 31(6): 24-29.
- [12] 韩娜. 化学诱变筛选耐消泡剂的阿维菌素高产菌株[J]. 中小企业管理与科技, 2014, 11(8): 319.
- [13] Xu B, Jin Z H, Wang H Z, et al. Evolution of *Streptomyces pristinaespiralis* for resistance and production of pristinamycin by genome shuffling[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 80(2): 261-267.
- [14] 刘明志, 吕镇城, 冉梦莲, 等. 产紫杉醇葡萄座腔菌 J11 菌株诱变获得高产菌株[J]. 药物生物技术, 2015, 22(1): 45-48.
- [15] 胡丹东, 崔玉娟. 一株高产核酸酶 P1 菌株的诱变选育[J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 2008, 44(6): 79-81.
- [16] 王淑媛. 青霉 TS67 的诱变选育及抗真菌作用机理研究[D]. 天津: 天津商业大学, 2008: 25.
- [17] 鲍勇阳, 王露, 王德培. 高产淀粉酶黑曲霉菌种诱变选育及固态发酵条件研究[J]. 井冈山大学学报(自然科学版), 2015, 36(1): 40-45.
- [18] 苏龙, 陈显玲. 微波诱变选育核酸酶 P1 高产菌株[J]. 中国酿造, 2008(5): 62-64.
- [19] 田利飞, 涂璇, 龚大春, 等. 高产核酸酶菌株的分离、筛选与诱变育种[J]. 中国农学通报, 2012, 28(15): 158-162.