

离子注入法选育高效降解蒽的鞘氨醇单胞菌突变株

王海^{1,2}, 张甲耀^{1*}, 方呈祥³, 秦广雍⁴, 魏明宝¹

(1. 武汉大学资源与环境科学学院, 武汉 430072; 2. 武汉市环境保护科学研究院; 3. 武汉大学中国典型培养物保藏中心; 4. 郑州大学离子束生物诱变育种研究中心, 郑州 420052)

摘要:鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp.) AN1 及其原生质体经 N^+ 离子注入诱变处理, 蒽的降解率分别提高了 29.3% 和 36.2%, 总变异率分别为 80%~100%、60%~80%, 耐蒽浓度分别达到 300 mg/L、400 mg/L; 突变株经 15 代遗传稳定性检测, 有 2 株(AN815-3, AN315-5) 的性状可稳定遗传, 其降解率分别为 73%、75%, 诱变效果显著。

关键词:离子注入; 环境微生物; 原生质体; 遗传稳定性

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2005)01-0150-04

Ion Beam Implantation in Breeding Efficient Degradation Bacteria

WANG Hai^{1,2}, ZHANG Jia-yao¹, FANG Cheng-xiang³, QIN Guang-yong⁴, WEI Ming-bao¹

(1. Institute of Environment and Resource, Wuhan University, Wuhan 430072, China; 2. Institute of Wuhan Environmental Protection; 3. CCTCC, Wuhan University, Wuhan 430072, China; 4. Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: *Sphingomonas* sp. AN1 was mutagenized and bred by N^+ implantation, mutants capable of degrading anthracene was obtained. The research review that the degrading rate increased by 29.3% and 36.2% while the mutagenized rate was 80%~100% and 60%~80%. In addition, the maximum concentration of enduring anthracene reached 300 mg/L and 400 mg/L. Their heritance stability were examined for fifteen transfers. Among these strains, two strains, AN815-3 and AN315-5, showed predominant character of survival ability and degrading activity. Their rate of degrading anthracene reached 73% and 75% respectively. Effect of positive mutagenesis is evident.

Key words: ion implantation; environmental microorganism; protoplast; heritance stability

离子注入是 80 年代兴起的一种材料表面处理技术^[1~3]。余增亮等人把离子注入这一高新技术率先应用于作物品种改良和生物效应研究, 取得了令人瞩目的成果^[4,5], 但这一技术在环境生物方面的研究与应用还很少见有报道^[6,7]。选育高效微生物是环境微生物应用于生物修复的关键一环, 一株降解环境污染物的菌, 一般均已经过数种常规物理化学手段多次处理, 其性能的进一步提高已非常困难^[8]。离子注入技术为微生物菌种选育提供了一种新途径, 其发现和建立对优良环境微生物的遗传育种具有重要现实意义。本文以武汉大学环境生物实验室分离纯化的降解蒽的鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp.) AN1 为材料, 开展了离子注入诱变育种的探索。首先对该菌进行离子注入, 3×10^{15} ions/cm² 剂量注入处理获得一株高效突变株, 然后以此菌株及其原生质体分别为出发菌, 进行第二次 N^+ 离子注入诱变, 得到了 2 株高效降解蒽突变株。

1 材料和方法

1.1 出发菌株及原生质体制备

鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp.) AN1 取自武汉大学环境生物实验室, 培养于 CM 培养基上, 温度 30℃, pH6.8~7.2。在起始浓度为 150 mg/L 的蒽溶液中, 菌浓度为 1×10^8 个/mL, 30℃ 150r/min 培养 30h 的降解率为 58%。原生质体的制备参见文献[9]。自新鲜斜面取一环接种于 5 mL LB 培养基中, 活化(30℃, 140r/min)16 h, 取一份以 5% 的接种量转接培养至对数生长期(6h), 制备原生质体, 用高渗培养液悬浮, 加终浓度为 10% 的无菌甘油置冰浴中保存备用。

1.2 培养基

(1) 完全培养基 CM 胰蛋白胨 10g, 酵母粉 5g, 蒽 150 mg, KH₂PO₄ 1.6g, K₂HPO₄ 0.4g, NaCl 10g, 蒸馏水定容至 1000 mL; 固体培养基加 2% 的琼脂, 121℃, 高压灭菌 20 min。

(2) LB 培养基 蛋白胨 10g, 酵母粉 5g, NaCl

收稿日期: 2004-02-24; 修订日期: 2004-05-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20277029)

作者简介: 王海(1974~), 男, 湖北五峰人, 硕士研究生, 主要从事环境生物学方面的研究。Email: wanghail63@163.com

* 通讯作者 Email: JYZhang@whu.edu.cn

10 g,蒸馏水 1.0 L,pH 7.2.

(3) 微量元素溶液 ZnCl_2 40 mg, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 200 mg, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10 mg, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10 mg,蒸馏水定容至 1000 mL.

(4) 高渗培养基 SMM CaCl_2 20 mmol/L, MgSO_4 20 mmol/L,蔗糖 0.5 mol/L, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 4 g 蒸馏水定容至 1 000 mL, pH 7.5.

(5) 无机盐培养基 MM 0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.4 g KH_2PO_4 , 0.6 g Na_2HPO_4 , 0.02 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.0 g NH_4NO_3 , 蒸馏水定容至 1.0 L,pH7.0.

(6) 葱为唯一碳源的培养基 在上述无机盐培养基中加入不同量的溶于 N, N-二甲基甲酰胺 (DMF) 的葱溶液(每 100 μL DMF 含 1 mg 葱),配成葱悬液.

(7) 复壮培养基 LB 培养基加入 50 mmol/L 葡萄糖.

1.3 方法

(1) 样品的制备 自新鲜斜面取一环鞘氨醇单胞菌 AN1 于含有 5 mL 培养液大试管中,30℃,150r/min 活化 16h,然后以 5%接种量转接培养 6h,并制备原生质体.取转接培养 6h 的菌悬液及原生质体菌悬液经适当稀释后取 100 μL 均匀涂布于无菌空白平皿中心,在显微镜下观察无相互重叠的细胞为宜,在超净台上自然干燥后立即用于 N^+ 离子注入.

(2) N^+ 离子注入处理 在郑州大学离子束生物诱变研究中心离子注入机上进行,能量为 30keV,剂量为 0(对照) 1×10^{14} 5×10^{14} 8×10^{14} 1×10^{15} 3×10^{15} 8×10^{15} 1×10^{16} ions/ cm^2 ,注入靶室的真空度为 10^{-3} Pa,脉冲剂量为 10^{14} ions $\cdot(\text{cm}^2 \cdot \text{s})^{-1}$,每个脉冲剂量注入时间 6.004s.注入完毕,原生质体用 900 μL 无菌 SMM 将其洗脱,培养于 9 mL SMM 液中;转接培养 6h 的菌悬液用复壮培养液洗脱并培养

于 9 mL 复壮培养液中(分 3 批加入,分别为 2,2 和 6 mL,间隔 1 min 加入一批后温和转动试管混匀),30℃,100r/min 培养 1 h,然后涂平板.对照组作相同处理.

(3) N^+ 离子注入菌株对葱的降解效果测定 离子注入完毕,经上述处理后,自新鲜斜面换取生长良好的单个菌落在 LB 培养基中活化 14h,取活化菌液投加到起始浓度为 150 mg/L 的葱溶液中,使菌浓度为 1×10^8 个/mL,30℃ 150r/min 培养 30h,按文献[10]进行降解率的测定.

(4) N^+ 离子注入菌株存活率的测定 涂布的平板以每皿长出 100 左右的菌落为宜,30℃,培养 30h 后对菌落进行计数统计,以未经处理的出发菌株为对照,按文献[11]进行存活率的测定.

2 结果与分析

2.1 离子注入过程中真空对微生物存活率的影响

离子注入后的一段时间内,微生物的生物效应是不明显的,须经一到数天的潜伏期后才变得明显^[12].延迟出现的现象表明,离子注入微生物的生物效应存在一个或几个过程,使“分子辐射损伤”扩大,直至产生终点生物效应^[13,14],首先检测真空对菌体存活的影响.结果表明,真空对菌种的致死率在 10%~20%之间,存在于真空的时间越长菌种的死亡率越高,但短时处理变化不显著.在离子注入过程中可以忽略其真空效应.

2.2 N^+ 离子注入对鞘氨醇单胞菌存活能力和降解活性的影响

以真空下未进行离子注入的一组为对照,离子注入处理鞘氨醇单胞菌 AN1,实验结果见表 1.

经 30keV N^+ 注入的降解葱菌的存活率与入射剂量呈一定的相关性,从表中可以看出,离子注入后的菌株存活率具有随注入剂量的增大先减小,但到达一定剂量时又增大,然后再减小的趋势,这与余增

表 1 第 1 次离子注入 *Sphingomonas* sp. 的诱变效果
Table 1 Result of mutagenized strain after first ion implanting

组别	注入剂量 / ions $\cdot\text{cm}^{-2}$	活菌浓度 / 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$	存活率 / %	降解率 / %	降解率提高幅度 / %	最高耐葱浓度 / mg $\cdot\text{L}^{-1}$
对照	0	58×10^5	100	58	0	150
1	1×10^{14}	60.5×10^4	10.43	58.8	1.5	200
2	5×10^{14}	266×10^3	4.5	58.2	0.4	200
3	8×10^{14}	192×10^2	0.3	58.9	1.6	200
4	1×10^{15}	42×10^4	7	59.2	2.0	200
5	3×10^{15}	270×10^3	4.65	60.7	4.6	250
6	8×10^{15}	130×10^3	2.24	60	3.5	250
7	1×10^{16}	145×10^2	0.25	59	1.8	200

亮^[15,16]的研究相一致.鞘氨醇单胞菌 AN1 经一次诱变后,降解活性未见显著增加,但耐蒽浓度却随不同注入剂量有不同程度的增加,尤其在曲线的峰值区域 3×10^{15} 剂量注入诱变,耐蒽浓度可达 250 mg/L,而出发菌耐蒽浓度仅 150 mg/L,即降蒽菌经离子注入后对蒽的毒性耐受能力增强,但诱变后降解活性提高不显著.

2.3 N^+ 离子注入鞘氨醇单胞菌亲本株和原生质体的 2 次诱变效应

鉴于离子注入对鞘氨醇单胞菌诱变后出现的上述特性,进行了第 2 次离子注入诱变.以第 1 次离子注入 3×10^{15} 诱变所得菌株,同时也将其制备成原生质体,分别为出发菌株进行第 2 次离子注入诱变.诱变结果见表 2 和表 3,从表可知,亲本菌株和原生质体经第 2 次 N^+ 离子注入诱变后,在起始浓度为 150 mg/L 的蒽溶液中,使投加的菌浓度为 1×10^8 个/mL,30℃ 150r/min 培养 30h,蒽降解率分别达到

75%、79%,分别提高了 29.3%、36.2%,突变率分别为 80%~100%、60%~80%,耐蒽浓度分别达到 300 mg/L、400 mg/L.

实验结果表明,经过先后 2 批离子注入处理实验,出发菌株经 2 次离子注入诱变后可获得存活能力与降解活性都较高的菌株.在第一次离子注入的基础上,进行原生质体形态的离子注入也是行之有效的诱变方法,但注入剂量需适中,至少低于正常形态菌 1~2 个数量级.从突变株对蒽的降解率、降解率提高幅以及耐受性方面来看,原生质体诱变效果略好于出发菌原形态的诱变效果,这是原生质体以其独特的特性获得的较好育种效果^[17].结果还表明,连续 2 次的离子注入诱变,明显提高了降解蒽菌的存活能力与降解活性,尤其是第 2 次的离子注入诱变效果极其显著.这主要与离子注入伴随有质量沉积、动量传递效应有关,并且突变株有一个进化和适应过程^[16].

表 2 离子注入对鞘氨醇单胞菌亲本菌株的 2 次诱变效果

Table 2 Effect of mutagenized strain by second ion implanting

组别	诱变剂量 /ions·cm ⁻²	存活率 / %	最高耐蒽浓度 / mg·L ⁻¹	耐高浓度蒽 菌株数/株	降解率 / %	降解率提 高率/ %	正突变(突 变株数)/ %	负突变(突 变株数)/ %	不突变(突 变株数)/ %
对照	0		150		58				
1	5×10^{14}	1.14	250	5	65	12.1	40(2)	40(2)	20(1)
2	3×10^{15}	20.28	300	7	69	18.9	57.1(4)	28.6(2)	14.3(1)
3	8×10^{15}	0.3	250	3	75	29.3	66.7(2)	33.3(1)	0

表 3 离子注入对鞘氨醇单胞菌原生质体的 2 次诱变效果

Table 3 Effect of ion implanting protoplast of strain secondly

组别	诱变剂量 /ions·cm ⁻²	存活率 / %	最高耐蒽浓度 / mg·L ⁻¹	耐高浓度蒽 菌株数/株	降解率 / %	降解率提 高率/ %	正突变(突 变株数)/ %	负突变(突 变株数)/ %	不突变(突 变株数)/ %
对照	0		150		58				
1	1×10^{14}	4.7	250	8	66	13.8	62.5(5)	25(2)	12.5(1)
2	8×10^{14}	18.2	350	10	72	24.1	20(2)	40(4)	40(4)
3	3×10^{15}	9.4	400	5	79	36.2	20(1)	60(3)	20(1)

2.4 鞘氨醇单胞菌亲本菌株和突变株的生长状况比较

鞘氨醇单胞菌活化 14h 后,按 1%接种量接种于含有 150 mg/L 蒽的 CM 培养液中,每间隔 1h 测其 OD₆₀₀ 值,按文献^[11]所述绘制生长曲线如图 1 所示.从图 1 可以看出,鞘氨醇单胞菌经 N^+ 离子注入诱变后,其对数生长期从 6h 提前为 2h 启动,生长期提前,增殖速度快.对菌株诱变前后进行平板菌落大小比较,如图 2 所示,从图中可以看出,离子注入的出发菌只能生长于蒽含量为 150 mg/L 的无机盐培养基,第 1 次离子注入后获得菌株可以生长于蒽含量为 300 mg/L 的无机盐培养基,第 1 次离子注入所获得菌株为出发菌,将其制备成原生质体进行第 2 次离子注入诱变,获得菌株可以生长于蒽含量为

400 mg/L 的无机盐培养基,菌落明显比诱变前长得大,表明由于蒽的不断降解,逐渐消除了高浓度蒽对蒽降解的抑制作用,从而使鞘氨醇单胞菌突变株耐受蒽和利用蒽的能力增强.

2.5 突变菌株降解蒽性状的遗传稳定性检测

经初筛挑取注入剂量为 8×10^{15} ions/cm² 和 3×10^{15} ions/cm² 的离子注入突变菌各 3 株,蒽初始浓度为 200 mg/L,其降解率分别为 75%、79%,进行遗传稳定性检测.将获得的 6 株较高降解率的突变菌株,经繁殖转移 15 代后,再测定降解率,结果有 4 株的降解率下降 30%,2 株保持第 1 代的降解率.如表 4 所示,这 2 株菌(AN815-3, AN315-5)的降解率分别为:73%、75%.以这 2 株菌为出发菌进行耐蒽性研究,结果表明,在蒽选择压力条件下的存活能力

明显增强,耐蒽浓度可达 400 mg/L.

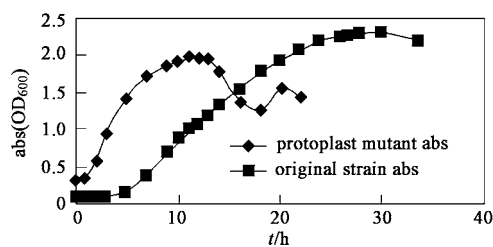
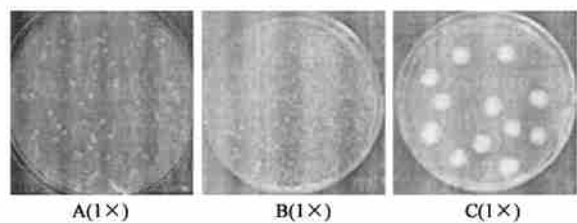


图 1 诱变前后生长情况比较

Fig.1 The comparison of living state infrom and after ion implantation



A. 未经离子注入的出发菌在蒽含量为 150 mg/L 的无机盐培养基培养 3 d; B. 经一次离子注入诱变的菌株在蒽含量为 300 mg/L 的无机盐培养基培养 3 d; C. 离子注入 protoplast 的诱变菌株在蒽含量为 400 mg/L 的无机盐培养基培养 3 d.

图 2 鞘氨醇单胞菌诱变前后在无机盐培养基生长情况比较

Fig.2 The comparison of strain's shape on basal substrate infrom and after ion implantation

表 4 离子注入鞘氨醇单胞菌的遗传稳定性检测

菌株	implanted ion beam					
	离子注入剂量/ ions·cm ⁻²					
	8 × 10 ¹⁵			3 × 10 ¹⁵		
第一代降解率/ %	AN-1	AN-2	AN-3	AN-4	AN-5	AN-6
15 代后的降解率/ %	75	75	75	79	79	79
繁殖转移 15 代后耐蒽浓度/ mg·L ⁻¹	45	50	73	52	75	49
			400		400	

3 讨论

将离子注入这一新技术作为微生物诱变育种手段应用于环境生物工程中,进行降解蒽菌的选育研究,取得了的较好诱变效果.有如下问题需要进一步探索:

(1) 2 次的 N⁺ 离子注入诱变效果明显优于 1 次离子注入诱变效果,说明伴随有质量沉积 动量传递效应的离子注入处理,突变株有一个进化和适应过程.

(2) 原生体离子注入诱变总变异率达 60 % ~ 87.5 %,其中正变率达 20 % ~ 66.7 %,这可能是原生质体扩大了离子束作用对象,离子束对降解蒽菌的诱变发挥了更大的作用.

(3) 离子注入变异菌株性状能稳定遗传,筛选的优良菌株进行诱变前后生长曲线比较,诱变后,对数

生长期从 6h 提前为 2h,增殖速度快,且菌落明显比诱变前长得大,表明鞘氨醇单胞菌经 N⁺ 离子注入后耐蒽和利用蒽的能力大大增强,这为其在环境生物修复工程中的实际应用奠定了基础.

(4) 研究中发现,经 2 次诱变后所得突变株的耐蒽浓度的提高与蒽降解活性的提高呈现一定的相关性,但其中的机理还有待进一步研究证明.

研究表明,离子注入生物体具有质量沉积和能量沉积双重效应,离子与生物大分子相互作用的分子机理及途径还有待于进一步阐明,但作为不同于传统的一种崭新的生物工程技术,它可用于植物、动物及微生物的品种改良、转基因工程及生命起源的研究,其应用前景十分广阔.离子注入是一种很有潜力的微生物诱变选育新方法.

致谢:本研究中离子注入操作由郑州大学离子束生物诱变育种研究中心李宗伟老师协助完成,谨致谢忱.

参考文献:

[1] WANG X Q, Jianr-wei HAN, Chun-lin SHAO, *et al.* Synthesis of amino acids from sodium carboxylic induced by Kev nitrogen ions[J]. *Viva Origino*, 1998, **26**(2) : 109 ~ 115 .

[2] LI Sheng, ZHANG Huan, WU Jian, *et al.* Preliminary study on the application of induced mutation of low-energy N⁺ ion in implantation in silkworm breeding[J]. *Anhui Agricultural University*(in Chinese), 1994, **21**(3) : 326 ~ 327 .

[3] Kimura K, Oota Y, Nakajima K, Suzuki M, *et al.* Molecular effect on projected range in ultralow-energy ion implantation[J]. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 2003, **211**(2) : 206 ~ 210 .

[4] WU Li-fang, LI Hong, YU Zeng-liang. The Application of Ion Beam in Life Science[J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 1999, **8**(4) : 298 ~ 304 .

[5] YU Zengliang. Interaction between low energy ions and the complicated organism m[J]. *Plasma Science and Technology*, 1999, **1**(1) : 79 ~ 85 .

[6] 英荣, 肖亚中, 王硕为, 等. 离子注入法对白腐真菌诱变效应的初步研究——多酚氧化酶菌株的选育[J]. *激光生物学报*, 2002, **11**(3) : 212 ~ 215 .

[7] 宫春波, 刘鹭, 谢丽源, 等. 离子注入微生物诱变育种研究进展[J]. *生物技术*, 2003, **13**(2) : 47 ~ 48 .

[8] 孔繁翔. *环境生物学*[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000 .

[9] WANG G, DU LX. Preparation and regeneration of protoplasts of *Curvularia Lunati*[J]. *Microbiology*, 1999, **26**(1) : 21 ~ 23 .

[10] 王丽, 黄君礼, 柳知非. 二氧化氯对蒽去除效果及反应机理研究[J]. *青岛建筑工程学院学报*, 2000, **21**(4) : 53 ~ 55 .

[11] 沈萍, 范秀容, 李广武. *微生物学实验*(第三版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 1999. 214 ~ 217 .

[12] 李永红. 离子束的生物效应及诱变机理研究进展[J]. *河南农业大学学报*, 2002, **36**(2) : 159 ~ 163 .

[13] 余增亮, 邱励俭, 霍裕平. 离子注入生物效应及育种研究进展[J]. *安徽农学院学报*, 1991, **18**(4) : 251 ~ 257 .

[14] SHAO Chun-lin, XU An, YU Zeng-liang. Charge exchange effect of ion implantation to biomolecules[J]. *Nuclear Techniques*, 1997, **20**(2) : 70 ~ 73 .

[15] YU Zeng-liang. Ion beam and life science-a new research field[J]. *Physics*, 1997, **26**(6) : 333 ~ 338 .

[16] YU Zeng-liang. Interaction between low energy ions and the complicated organism m[J]. *Plasma Science and Technology*, 1999, **1**(1) : 79 ~ 85 .

[17] 邹坚. 应用原生质体诱变技术筛选井冈霉素高产菌种的研究[J]. *现代农药*, 2003, **2**(2) : 27 ~ 28 .