

铜蒸气激光辐照棘孢小单孢菌的研究

吴振倡* 余二红 应伟均 杜珠还 陈学旺

(浙江大学生命科学研究室)

石宝驹 孙威 姚志欣 汪永江

(浙江大学物理系)

提要: 用铜蒸气激光辐照棘孢小单孢菌(*Micromonospora echinospora*)后, 分离得到庆大霉素发酵单位提高10%以上的辐照株。其单孢子的表面结构在扫描电镜下观察未见到有孔穴或异常变化。

Study on irradiation of micromonospora echinospora with copper vapor laser light

Wu Zhenchang, Yu Hong, Ying Weijun, Du Zhuhuan, Chen Xuewang

(Life Science Lab., Zhejiang University)

Shi Baoju, Sun Wei, Yao Zhixing, Wang Yongjiang

(Department of Physics, Zhejiang University)

Abstract: High yielding strain of micromonospora echinospora was obtained by irradiation with copper vapor laser light for 90 minutes. The surface of the spores after irradiation was unchanged when it was observed with a scanning electronmicroscope.

实验条件与方法

(一)出发菌株: 棘孢小单孢菌 X-1

(二)培养基

1. 平板分离培养基: 可溶性淀粉 1%, 硝酸钾 0.1%, 氯化钠 0.05%, 磷酸氢二钾 0.03%, 硫酸镁 0.05%, 硫酸亚铁 0.001%, 琼脂 2%, 自然 pH, 自来水配制。

2. 斜面培养基: 小麦麸皮 1.5%, 硝酸钾 0.1%, 硫酸镁 0.05%, 氯化钠 0.05%,

可溶性淀粉 1%, 天门冬素 0.002%, 磷酸氢二钠 0.03%, 碳酸钙 0.1%, 琼脂 2%, 自来水配制, 消前 pH 7.2。

3. 种子培养基: 淀粉 2%, 玉米粉 1.5%, 黄豆饼粉 0.5%, 蛋白胨 0.1%, 葡萄糖 0.4%, 硝酸钾 0.05%, 碳酸钙 0.6%, 氯化钴 1r/ml, 自来水配制, pH 自然。

4. 发酵培养基: 淀粉 5%, 玉米粉 1.5%, 花生饼粉 0.5%, 黄豆饼粉 2.5%, 鱼

收稿日期: 1984年9月19日。

* 杭州第二制药厂。

粉1%，碳酸钙0.5%，硫酸铵0.1%，氯化钴4r/ml，自来水配制，消前pH7.2。

(三) 培养条件：斜面、平板、种子、发酵均在33~34°C培养，斜面生长8天，平板生长11天，种子培养40小时左右，发酵周期5天。种子与发酵瓶均在旋转式摇床培养，摇床转数为220 R. P. m。种子培养液接入发酵摇瓶的接种量为10%。

(四) 效价测定：用琼脂扩散法测定效价，检定菌为短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)。

(五) 辐照方法及筛选：用浙大制铜蒸气激光器辐照(辐照功率密度为：25.4mW·cm⁻²)棘孢小单孢菌的单孢子悬浮液30、60、90分钟后，稀释分离在分离平板上，33±1°C培养11天后，挑选菌落，接种斜面，待斜面孢子成熟后进行摇瓶筛选。

(六) 纸层析与生物显层及印影法：纸层析与生物显层及小组分含量测定详见文献[1]，检定菌为短小芽孢杆菌。

生物显层后的抑菌圈，采用下述方法印影：在上述生物显层板上注入0.5%美蓝液浸染4~6分钟后，倾去美蓝液，加入碱性乙醇冲洗1~2分钟，倾去所有溶液，然后用酸性乙醇冲洗1~2分钟，再倾去所有溶液。自来水冲洗，用层析滤纸在生物显层板上印影。

(七) 电镜观察：用S-450扫描电镜1.5万倍观察。

结果与讨论

(一) 铜蒸气激光对棘孢小单孢菌的致死作用

随铜蒸气激光辐照时间从30分钟到90分钟不断延长，棘孢小单孢菌的致死率不断上升，残存率不断下降(见图1)。

(二) 棘孢小单孢菌经铜蒸气激光辐照后，其庆大霉素产量的诱变效应

棘孢小单孢菌经铜蒸气激光辐照后，其

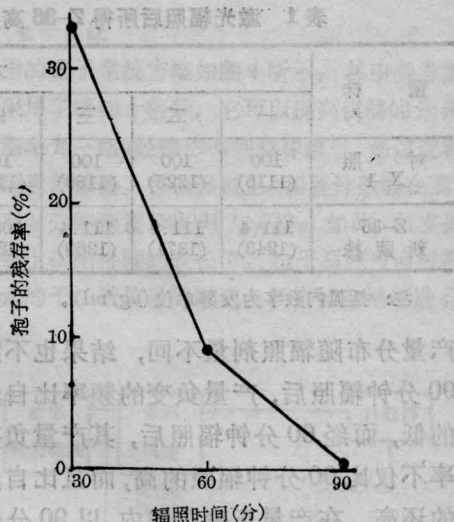
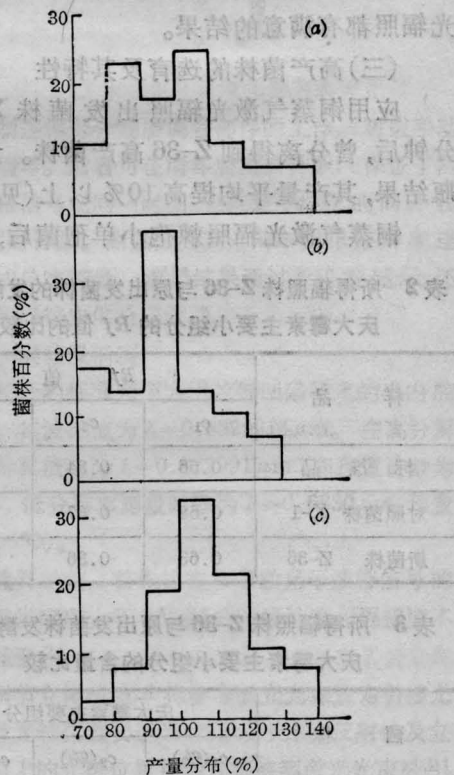


图1 铜蒸气激光辐照棘孢小单孢菌后孢子的残存率



(a) 自然分离; (b) 激光辐照60分钟; (c) 激光辐照90分钟

图2 棘孢小单孢菌经铜蒸气激光辐照后其庆大霉素产量的诱变效应

表1 激光辐照后所得Z-36高产菌株与出发菌株X-1的庆大霉素发酵单位的比较

菌株	庆大霉素发酵单位 (%)										
	一	二	三	四	五	六	七	八	九	十	平均
对照 X-1	100 (1116)	100 (1225)	100 (1139)	100 (1146)	100 (1156)	100 (1147)	100 (1171)	100 (1183)	100 (1124)	100 (1187)	100 (1159)
Z-36 新菌株	111.4 (1243)	111.9 (1371)	111.4 (1269)	108.4 (1242)	110.9 (1282)	110.7 (1270)	109.1 (1278)	110.7 (1310)	110.9 (1247)	108.6 (1289)	110.4 (1280)

注：括弧内数字为发酵单位(μg/ml)。

产量分布随辐照剂量不同，结果也不同。经90分钟辐照后，产量负变的频率比自然分离的低，而经60分钟辐照后，其产量负变的频率不仅比90分钟辐照的高，而且比自然分离的还高。在产量正变范围内，以90分钟辐照后其正变频率为最高，其次是自然分离。而60分钟辐照后，其产量正变的频率比自然分离还要低。这表明应用铜蒸气激光辐照微生物要选择适宜的辐照剂量，并不是所有的激光辐照都有满意的结果。

(三) 高产菌株的选育及其特性

应用铜蒸气激光辐照出发菌株X-1 90分钟后，曾分离得到Z-36高产菌株。十批摇瓶结果，其产量平均提高10%以上(见表1)。

铜蒸气激光辐照棘孢小单孢菌后，绝大

表2 所得辐照株Z-36与原出发菌株的发酵液的庆大霉素主要小组分的Rf值的比较

样品	Rf 值		
	c ₁	c ₂	c _{1a}
标准品	0.66	0.34	0.16
对照菌株 X-1	0.68	0.37	0.17
新菌株 Z-36	0.63	0.36	0.16

表3 所得辐照株Z-36与原出发菌株发酵液的庆大霉素主要小组分的含量比较

菌株	庆大霉素主要组分		
	c ₁ (%)	c ₂ (%)	c _{1a} (%)
对照株 X-1	100.0	103.7	100.0
辐照株 Z-36	103.5	100.0	100.2

多数辐照株的庆大霉素小组分组成比例及Rf值与原出发菌株相似(见表2与图3)，其中Z-36菌株，在发酵液中有有效小组分c₁含量提高3%左右，而c₂含量下降3%左右(见表3与图3)。



图3 棘孢小单孢菌发酵滤液层析后生物显层图谱

- 1—Z-36菌株的发酵滤液层析图谱
- 2—标准品层析图谱
- 3—对照X-1菌株的发酵滤液层析图谱

曾对激光辐照后新菌株的单孢子进行扫描电镜观察，未发现有孔穴或表面结构异常变化(见图4)。这对激光辐照株的推广应用，提供了参考价值。

上述结果表明铜蒸气激光辐照棘孢小单孢菌具有较满意的实验结果。这不仅仅是产量正变的频率较高，而产量负变的频率较低，

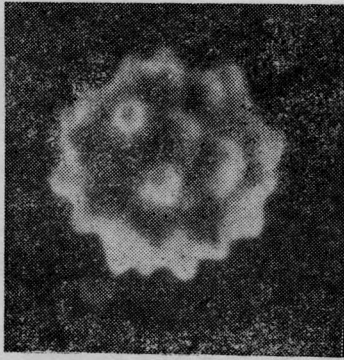


图4 激光辐照后,电镜观察辐照株
的单孢子表面结构
(15000×14)

还在于得到了产量提高10%以上的高产菌株,其单孢子表面结构经电镜观察,未发现孔穴或表面结构异常变化,这和徐浩等人用二氧化碳激光辐照枯草杆菌AS1.831后扫描电镜观察无明显可见的损伤或孔洞的结果相类似^[2]。大多数激光辐照株其庆大霉素

小组分组比例及Rf值与原出发株相似,其中得到了有效小组分c₁含量提高而c₂含量相应下降的新菌株。有人在用⁶⁰Co辐照小单孢菌时,得到了高产菌株,但未报道有效小组分c₁含量增高而c₂含量下降的变化^[3]。

看来,用铜蒸气激光辐照棘孢小单孢菌,对提高抗生素的产量及其有效小组分的含量方面已展示了应用的前景。激光辐照作为微生物育种的手段,是值得推广应用的。

对物理系的周一江、季建宝及激光组其他同志支持与帮助激光辐照;浙江省电镜室张来友同志帮助电镜拍照,深表谢意。

参 考 文 献

- [1] Arie Rosner *et al.*; *J. Antibiotics*, 1980, **33**, No. 6, 600~603.
- [2] 徐浩等;《微生物学报》1978, **18**, No. 1, 71~75.
- [3] 林玲等;《抗生素》, 1984, **9**, No. 2, 138~139.

(上接第663页)

上基团振动的1432 cm⁻¹有谱线出现,它可归属为ν(C—O)+δ(C—H)^[6]的振动。另外表征ν(C—O)^[6]振动的谱线1502 cm⁻¹也出现,这是其余两种样品所没有的,它是与其它二种样品不同的侧链基团的振动,也是HpD-II较之其它样品疗效高的主要原因之一。对谱线中出现表征ν(Fe—O₂)振动的572 cm⁻¹的原因,估计有二种可能:(i)样品在制备时动物全血中的铁未移净;(ii)样品在制备过程中不慎掺进了铁离子。

谨向对完成此文给予热忱帮助和有益讨论的刘厚祥、王振亚、孙凤仪、袁唤标等同志

表示衷心的感谢。

参 考 文 献

- [1] S. Asher, K. Sauer; *J. Chem. Phys.*, 1976, **64**, 4115.
- [2] L. Chinsky, P. Y. Turpin; *Biopolymers*, 1978, **17**, 1347.
- [3] L. D. Barrm, A. Szabo; *J. Amer. Chem. Soc.* 1975, **97**, 660.
- [4] R. L. Lipson, M. J. Gray; *Proc. 9th Internat. Cancer. Congr.*, 1966, p. 393.
- [5] J. E. Falk; *Porphyryns and Metalloporphyryns*, New York, 1964.
- [6] J. M. J. R. Kincaid; *J. Amer. Chem. Soc.*, 1978, **100**, 6078.