

离子注入微生物存活率与总抗氧化能力(T-AOC)的关系

张宁¹ 蒋剑春¹ 杨静¹ 安肖² 孙杨³

¹ (中国林业科学研究院林产化学工业研究所; 生物质化学利用国家工程实验室;

国家林业局林产化学工程重点开放性实验室; 江苏省生物质能源与材料重点实验室 南京 210042)

² (中国兽医药品监察所 北京 100081)

³ (广州天宝颂原生物科技有限公司 广州 510000)

摘要 研究了注入三孢布拉氏霉 (*Blakeslea trispora*)、里氏木霉 (*Trichoderma reesei*)、吸水链霉菌井冈变种 (*Streptomyces hygroscopicus* var. *Jingganggensis* Yen.) 和凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*) 的氮离子 (N^+) 不同注量与存活率以及总抗氧化能力 (T-AOC) 的变化规律。结果表明: N^+ 注入 *T.reesei*, *S.hygroscopicus* 和 *B.coagulans* 的存活曲线随着 N^+ 注量的增加均呈现“双马鞍型”变化, 不同于离子注入典型的“马鞍型”变化曲线, 并且 N^+ 注入 *B.trispora* 和 *T.reesei* 注量-T-AOC 曲线与注量-存活率曲线呈现一致的变化趋势, 由此推测, 离子注入微生物所诱导的 T-AOC 的强弱很有可能决定微生物的存活情况。

关键词 离子注入, (双) 马鞍型曲线, 总抗氧化能力

中图分类号 TQ922.9, Q933

离子束生物技术是一种新型的生物诱变技术, 被广泛应用于生物品种改良和转基因工程。经过二十多年的研究, 人们对离子注入诱变的生物学效应和作用机理有了初步的认识, 总结了这种诱变方式的一般规律。一般理论认为, 低能离子与生物物质相互作用大致可分为能量沉积、动量传递、质量沉积和电荷交换等 4 个原初反应过程。这 4 个过程差不多在 10^{-19} – 10^{-16} s 时间段内同时发生, 很难区分各自独立的作用。尽管如此, 许多研究者通过大量严格的实验, 证明了这些过程的生物学效应。研究表明, 虽然传统辐射与离子注入都有能量效应, 但两者的沉积方式有所不同。传统辐射在生物体的能量沉积是以电子阻止为主, 主要引起靶分子和原子的电离和激发。而低能离子的作用过程以核阻止为主, 主要引起靶原子的移位和重排, 并伴有级联碰撞的发生。相比之下, 低能离子在其射程内对生物组织的损伤更严重, 诱变效果更明显。同时, 离子注入诱变兼有物理、化学等多种诱变方法的特点, 是一种生理损伤小、突变谱广、突变频率高, 并有一定的重复性和方向性的诱变源^[1-3]。目前, 对于离子注入诱变的机理和相关机制仍在不断深入。本文以 *B.trispora*、*T.reesei*、*S.hygroscopicus* 和 *B.coagulans* 为试材, 开展了 N^+ 注入下其存活率与注量关系的研究, 以及不同注量对菌体总抗氧化能力 (T-AOC)

的影响, 探讨微生物在抵抗离子注入损害过程中菌体存活率与 T-AOC 的关系。

1 实验材料与方法

1.1 菌种和培养方法

Blakeslea trispora 由实验室筛选保藏。培养基的成份和用量: 玉米粉 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 麦芽浸粉 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 琼脂 $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 6.4, 培养温度 28°C 。

Streptomyces hygroscopicus var. *Jingganggensis* Yen. 由实验室筛选保藏。培养基的成份和用量: 葡萄糖 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, L-天冬酰胺 $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 琼脂 $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 未经调节, 培养温度 38°C 。

Bacillus coagulans 购买于中国典型培养物保藏中心。固体培养基的成份和用量: 蛋白胨 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 牛肉膏 $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 酵母膏 $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 葡萄糖 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 琼脂 $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; pH 7.0–7.2, 培养温度 50°C ; 种液培养基成份和用量: 葡萄糖 $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 酵母膏 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 蛋白胨 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 重质 CaCO_3 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 初始 pH 7.0–7.2。

Trichoderma reesei 购买于中国工业微生物菌种保藏中心。该菌生长于 PDA 培养基 (葡萄糖 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 马铃薯 $200\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 琼脂 $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), pH 自然, 培养温度 28°C 。

国家自然科学基金 (31100429) 资助

第一作者: 张宁, 女, 1978 年 7 月出生, 2008 年于南京工业大学获工学博士学位, 副研究员, Email: ningzhangemail@126.com

收稿日期: 初稿 2012-04-12, 修回 2012-07-13

1.2 样品处理

B. trispora、*S. hygroscopicus* 和 *T. reesei* 经固体培养基活化后, 孢子成熟, 用无菌水洗下新鲜孢子并振荡, 使孢子充分分散, 制成一定浓度 (3.0×10^5 – $5.0 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$) 的孢子悬浮液。取 0.1 mL 孢子悬浮液均匀涂布于无菌培养皿上, 以无菌风吹至干燥后进行 N^+ 注入。*B. coagulans* 种液培养 20h, 取种子液稀释 10 倍, 取 0.1 mL 均匀涂布于无菌平皿上, 以无菌风吹至干燥后进行 N^+ 注入。

1.3 低能离子注入工艺

离子注入机为西南核物理研究所研制的 LZD900 多功能离子注入机, 以能量为 10–20 keV 的 N^+ 不同注量 (0 – $400 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2}$) 进行注入, 靶室真空度为 $1.0 \times 10^{-3} \text{ Pa}$ 。将平皿置于靶台上, 以 5 s 脉冲式注入, 间隔 15–20 s, 以消除大剂量下热效应可能产生的负作用。然后取出平皿, 以 1 mL 无菌水洗脱, 涂平板培养基培养, 于适合温度培养至长出单菌落计算存活率。

1.4 菌体 T-AOC 的测定

采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒, 根据 Fe^{3+} 还原原理, 操作步骤按试剂盒说明书进行。总抗氧化能力用 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 蛋白表示。每个注量下的总抗氧化能力均测定 3 次, 根据平均值绘制注量-总抗氧化能力关系线图。

2 实验结果

2.1 “马鞍型”存活率曲线与 T-AOC 关系

2.1.1 N^+ 注入对 *B. trispora* 菌存活率的影响 从存活率曲线上可以看出 (见图 1), 随着 N^+ 离子注量的增加, *B. trispora* 的存活率曲线呈现典型的先降后升再降的“马鞍型”注量-效应曲线, 这被认为是离子注入诱变所特有的诱变效应, 也已被众多实验结果证实^[4-7], 与一般电离辐射造成的“指数型”剂量-效应曲线截然不同^[8,9]。从注入离子与菌体细胞相互作用关系的角度考虑, 出现这种现象的原因可能是低注量时离子只对孢子细胞表面进行损伤和刻蚀, 因而存活率较高; 随着注量的增加, 细胞表面刻蚀严重, 离子作用于细胞内部并产生大量自由基和软 X 射线等, 使存活率急剧下降, 但细胞某种修复机制被激活, 使得存活率有所回升; 当注量增加到一定值时, 细胞损伤已无法修复, 存活率再次下降^[10]。

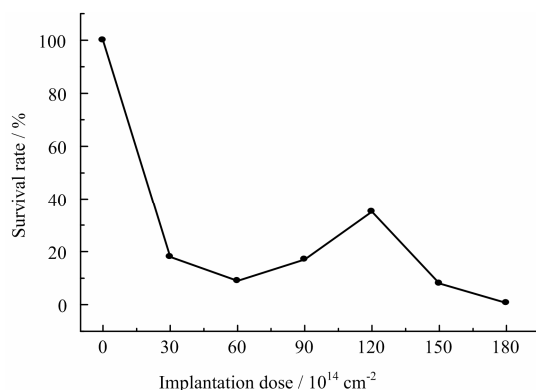


Fig.1 Survival rate of *B. trispora* implanted by N^+ of 10 keV

2.1.2 N^+ 注入对 *B. trispora* 菌 T-AOC 的影响 图 2 表明, *B. trispora* T-AOC 在注量为 $60 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2}$ 处减到最弱, 随后逐渐增强, 在注量为 $120 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2}$ 处增至最强并超过对照水平后又缓慢减弱。与 *B. trispora* 注量-存活率曲线一样都是在这两个注量处呈现先降后升再降的变化趋势。由此推测, 存活率回复峰的出现有可能是注入离子与菌体内修复酶共同作用的结果。离子注入过程中, 大量堆积的电荷可形成一个弱电场, 这种电场的刺激效应足以激活细菌体内的各种酶, 尤其是修复酶, 从而提高了损伤修复的效率, 这也是形成“马鞍型”存活率曲线的原因之一。

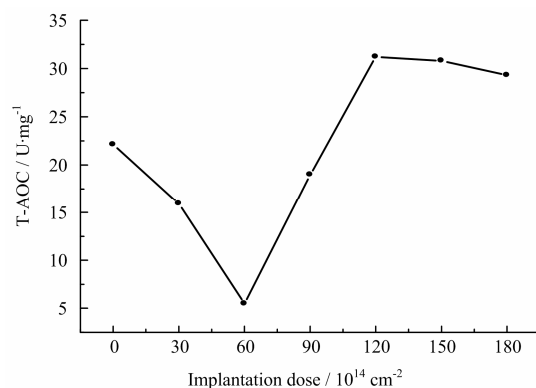


Fig.2 Effect of N^+ ion implantation on T-AOC activity of *B. trispora*

2.2 “双马鞍型”存活率曲线与 T-AOC 关系

2.2.1 N^+ 注入对 *T. reesei*、*B. coagulans* 和 *S. hygroscopicus* 菌存活率的影响 由图 3 可知, *T. reesei* 经 N^+ 注入处理后注量-存活率曲线与经典的“马鞍型”曲线不同, 分别在注量为 $150 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2}$ 和 $250 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2}$ 处出现了两个回复峰, 从而呈现“双马鞍型”。这与离子注入井冈霉素产生菌 *S. hygroscopicus*^[11] 和乳酸产生菌 *B. coagulans*^[12] 的实验结果相似 (见图 4 和图 5)。这说明“双马鞍型”存活率曲线也是注入离子与生物体相互作用的特征

表现之一,与经典的“马鞍型”曲线一样具有一定的代表性,并不是离子注入某个菌种所产生的特定效应。存活率曲线中两次回复峰的出现说明注入离子与菌体的相互作用机制更为复杂,从而证明了离子注入诱变在机理上不同于传统诱变方法,这也是离子注入诱变过程中微生物细胞生理损伤小,突变率高的原因。菌体 T-AOC 作为多种酶促型抗氧化剂和非酶促型抗氧化剂共同作用结果,可以直接反应出注入离子与某些菌体间相互作用的效应关系,所以本文继续考察了 N^+ 注入对 *T.reesei* 存活及 T-AOC 的影响。

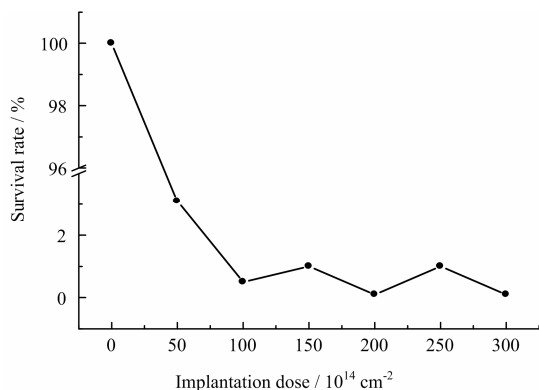


Fig.3 Survival rate of *T.reesei* implanted by N^+ of 10 keV

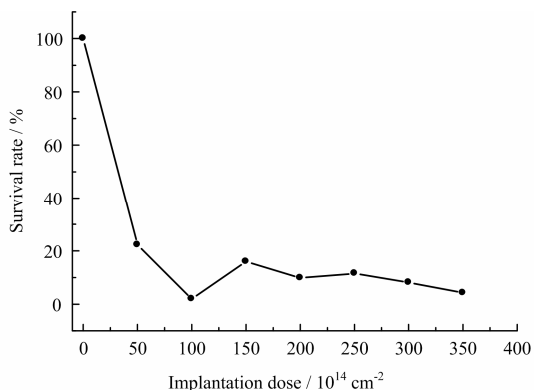


Fig.4 Survival rate of *S.hygroscopicus* implanted by N^+ of 15keV

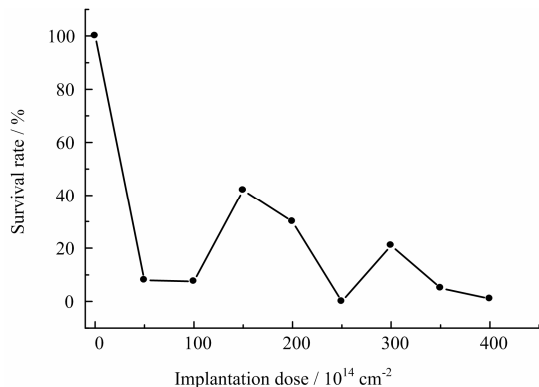


Fig.5 Survival rate of *B.coagulans* implanted by N^+ of 20 keV

2.2.2 N^+ 注入对 *T.reesei* T-AOC 的影响 由图 6 可知,离子注入 *T.reesei* 后, T-AOC 亦在注量为 $150 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2}$ 和 $250 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2}$ 处出现两个马鞍点,这一变化趋势与 *T.reesei* 注量-存活率曲线也完全一致。根据 N^+ 注入 *B.trispora* 和 *T.reesei* 所得到的“马鞍型”及“双马鞍型”存活率曲线与 T-AOC 关系曲线都在相同注量处达到“马鞍”点,推测存活率与菌体的 T-AOC 之间存在某种关系,随着离子注量的增加,多种酶促型抗氧化剂和非酶促型抗氧化剂被不断地损伤和修复,从而导致菌体存活率不只是一味的下降,而是在相应的注量处出现回复,直到注入离子对细胞造成的直接损伤已无法修复,菌体的存活率才最后下降。可以说离子注入微生物所诱导的 T-AOC 的强弱很有可能决定微生物的存活情况。

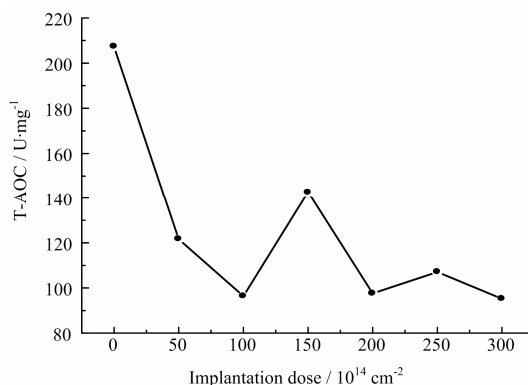


Fig.6 Effect of N^+ ion implantation on T-AOC activity of *T.reesei*

3 讨论

自上世纪 80 年代中期离子束生物工程学研究在我国兴起以来,离子注入生物学在基础研究和应用研究上都取得了很大的发展,并取得了可观的社会效益和经济效益。已有研究表明,低能离子注入生物体是集能量沉积、动量传递、质量沉积,电荷中和与交换于一体的联合作用过程,从而比单一能量的 γ -rays 辐射对生物体的作用表现出更广泛的生物学效应,其独特的“马鞍型”及“双马鞍型”存活率曲线都无法用现有的辐射损伤理论来解释,宋道军等^[13]曾推测这是由于离子注入下诱导产生了新的辐射损伤修复机制作用的结果,对此我们从酶的角度展开了研究。

菌体 T-AOC 是多种酶促型抗氧化剂和非酶促型抗氧化剂共同作用的结果。作者在此前的研究^[14]中发现, N^+ 注入 *B.trispora* 菌,当 N^+ 注量低于 $60 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2}$ 时, N^+ 注入诱导的过氧化物歧化酶

(POD)、过氧化氢酶(CAT)和总超氧化物歧化酶(SOD)的活性以及菌体清除 $O_2^{\cdot-}$ 和 $OH^{\cdot}$ 的能力减弱,导致菌体存活率降低,而随着注量的增加,*B.trispora* POD、SOD酶的活性以及清除 $O_2^{\cdot-}$ 和 $OH^{\cdot}$ 的能力均有所增强,菌体T-AOC也逐渐增大,所以菌体的存活率也有所增大,但随着注量的继续增加,虽然此时菌体T-AOC依然很强,但离子注入对细胞造成的直接损伤已无法修复,导致菌体的存活率再次下降。由此推测,离子注入*B.trispora*所诱导的T-AOC的变化是导致*B.trispora*注量-存活率曲线呈现“马鞍型”化趋势的原因之一;综合 N^+ 注入*T.reesei*“双马鞍型”存活率曲线与T-AOC的相应关系,我们推测,离子注入*T.reesei*所诱导的T-AOC的变化很有可能是导致*T.reesei*注入量-存活率曲线呈现“双马鞍型”变化趋势的原因之一。由此认为离子注入微生物所诱导的T-AOC的强弱与其存活率的关系很有可能不是某种微生物的特定效应,而是具有普遍性,即离子注入微生物所诱导的T-AOC的强弱很有可能决定微生物的存活情况。此外,离子注入井冈霉素产生菌*S.hygrosopicus*和乳酸产生菌*B.coagulans*后也得到“双马鞍型”存活率曲线,说明“双马鞍型”存活率曲线也是注入离子与生物体相互作用的特征表现之一,与经典的“马鞍型”曲线一样具有一定的代表性,并不是离子注入某个菌种所产生的特定效应。

本文仅从酶的角度对离子注入生物体所产生的“马鞍型”存活率曲线加以解释,其实影响生物效应的离子注入因素多而并存,较难判断效应与诸因素必然、偶然或直接、间接的联系,关于离子注入与所诱导的生物学效应,包括蛋白质的变性、酶活性和结构的变化、细胞死亡及基因突变等关系还需要大量的实验验证分析。如果能够将离子注入参数与所诱导的生物学效应建立起某种相对应关系,则可以对工业微生物进行定向改良。

参考文献

- 1 余增亮. 离子束生物技术引论 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1998: 67-76
YU Zengliang. Introduction to ion beam biotechnology [M]. Hefei: Anhui Science & Technology Publishing House, 1998: 67-176
- 2 崔艳红, 李培庆. 新型诱变源及其在微生物育种上的研究进展 [J]. 河南科技学院学报(自然科学版), 2005, 33(4): 5-9
CUI Yanhong, LI Peiqing. New mutagen source and its in microorganism breeding research progress [J]. Journal of
- Henan Institute of Science and Technology(Natural Science Edition), 2005, 33(4): 5-9
- 3 Sassner P, Galbe M, Zacchi G. Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different raw materials [J]. Biomass Bioenergy, 2008, 32: 422-430
- 4 刘国生, 侯瑛, 吴飞燕, 等. 离子注入诱变选育肌苷高产菌株[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2009, 29(4): 224-228
LIU Guosheng, HOU Ying, WU Feiyan, et al. Screening strains with high yield of inosine mutated by ions implantation [J]. J Radia Res Radiat Process, 2009, 29(4): 224-228
- 5 孙同毅, 殷向斌, 郝继兴, 等. 高活力碱性蛋白酶产生菌的选育与发酵放大[J]. 辽宁工程技术大学学报(自然科学版), 2009, 28(4): 679-682
SUN Tongyi, YIN Xiangbin, HAO Jixing, et al. Selection and fermentation scale-up of high-activity alkaline protease [J]. Journal of Liaoning Technical University (Natural Science Edition), 2009, 28(4): 679-682
- 6 庞敏, 姚建铭. 低能 N^+ 注入产色氨酸酶大肠杆菌的育种研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2009, 27(3): 167-172
PANG Min, YAO Jianming. Breeding of tryptophanase-producing *Escherichia coli* by use of N^+ ion beam implantation [J]. J Radiat Res Radiat Process, 2009, 27(3): 167-172
- 7 张东辉, 李培睿, 李宗义, 等. 絮凝剂高产菌株的离子注入诱变选育[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(10): 4401-4403
ZHANG Donghui, LI Peirui, LI Zongyi, et al. Mutation breeding of flocculant high-producing strain by ion implantation [J]. Journal of Anhui Science, 2009, 37(10): 4401-4403
- 8 那治国, 马永强, 张浩, 等. 紫外诱变高去酰胺活性碱性蛋白酶产生菌的研究 [J]. 食品与发酵技术, 2009, 45(1): 30-34
NA Zhiguo, MA Yongqiang, ZHANG Hao, et al. Study on the ultraviolet mutagenesis of strain producing alkaline protease with high deamidation [J]. Food and Fermentation Technology, 2009, 45(1): 30-34
- 9 李芹, 周礼红, 钱仕元, 等. 抗真菌抗生素产生菌UEZC的 ^{60}Co γ 射线诱变育种 [J]. 贵州农业科学, 2009, 37(3): 55-57
LI Qin, ZHOU Lihong, QIAN Shiyuan, et al. The mutation breeding of the antifungal antibiotics producing strain UEZC by the treatment of ^{60}Co γ -ray [J]. Guizhou Agri-

- cultural Sciences, 2009, **37**(3): 55-57
- 10 虞龙, 许安, 王纪, 等. 低能离子注入在 Vc 高产菌选育中的应用[J]. 激光生物学报, 1999, **8**(3): 217-220
YU Long, XU An, WANG Ji, *et al.* The application of low energy ion implantation in breeding of high yield Vc strains [J]. Acta Laser Biology Sinica, 1999, **8**(3): 217-220
- 11 安肖, 虞龙. 钛离子注入井冈霉素生产菌株的诱变效应[J]. 生物加工过程, 2008, **6**(2): 56-60
AN Xiao, YU Long. The mutagenic effect of the validamycin producing strain implanted by titanium (Ti) ion [J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2008, **6**(2): 56-60
- 12 虞龙, 孙杨, 谢飞, 等. 两种气体离子源氮离子注入细菌的诱变效应比较[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2007, **25**(5): 261-265
YU Long, SUN Yang, XIE Fei, *et al.* Compare of N-ion implantation effects on *Bacillus coagulans* by use of two kinds of ion sources[J]. J Radiat Res Radiat Process, 2007, **25**(5): 261-265
- 13 宋道军, 姚建铭, 邵春林, 等. 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
SONG Daojun, YAO Jianming, SHAO Chunlin, *et al.* A possible mechanism of dose related survival of microorganism implanted by N^+ ions [J]. Nuclear Techniques, 1999, **22**(3): 129-132
- 14 ZHANG Ning, YU Long. Effect of N^+ ion implantation on antioxidase activity in *Blakeslea trispora* [J]. Radiation Physics and Chemistry, 2008, **77**: 1046-1049

Study on the relationship between survival rate and total antioxidant capacity (T-AOC) of microbe implanted by N^+ ion

ZHANG Ning¹ JIANG Jianchun¹ YANG Jing¹ AN Xiao² SUN Yang³

¹(Institute of Chemical Industry of Forest Products, CAF; National Engineering Lab. for Biomass Chemical Utilization;

Key and Open Lab. on Forest Chemical Engineering, SFA;

Key Lab. of Biomass Energy and Material, Jiangsu Province, Nanjing 210042, China)

² (China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

³ (Guangzhou Tianbao Songyuan biology technology company, Guangzhou 510000, China)

ABSTRACT The relationships between doses–survival rate and doses–T-AOC of *Blakeslea trispora* and *Trichoderma reesei* by N^+ ion implantation were investigated. The results showed that the curves of survival rate of *T.reesei*, *Streptomyces hygroscopicus* var. *Jingganggensis* Yen. and *Bacillus coagulans* were all represented “double saddle shape” with increasing N^+ implanted dose, which were different from the classic “saddle shape” curves. And the dose–T-AOC curves of *B.trispora* and *T.reesei* revealed the same trend as the dose–survival rate ones. It can be suggested that the variation of T-AOC probably decided the microbe survival situation after being implanted by low-energy N^+ ion.

KEYWORDS Ion implantation, (Double) saddle shape, Total antioxidant capacity

CLC TQ922.9, Q933