

文章编号: 0254-0096(2008)01-0061-04

三种化学诱变剂对产氢细菌 *Ethanoligenens* sp. ZGX4 的诱变效应

郑国香, 任南琪, 李永峰, 林海龙

(哈尔滨工业大学市政环境学院, 哈尔滨 150090)

摘要: 分别采用3种不同化学诱变剂(硫酸二乙酯(DES)、1-甲基-3-硝基-1-亚硝基胍(NTG)和吡啶黄)对产氢细菌 *Ethanoligenens* sp. ZGX4 进行了诱变处理。DES法获得4种突变体类型, 且出现一种自絮凝很强产氢突变类型; NTG法致死率最高, 只得到一种类型产氢突变株; 吡啶黄法死亡率最低(为21.8%~23.1%), 获得2种突变类型。实验证明, DES法的诱变效应最好。高产氢气能力突变株的菌落直径变大、透明, 但其他形态特征与对照没有太大差异。

关键词: 化学诱变; 产氢发酵细菌; 突变体

中图分类号: X703

文献标识码: A

0 前言

生物制氢因其可利用发酵细菌、光合细菌及藻类将废水和有机废弃物转化为氢的优点吸引了人类的关注, 其中发酵法生物制氢能以相对较高效率实现能源再生的同时减少了废物的污染强度^[1,2]。反应系统内的产氢菌种的释氢能力相对较低是影响生物制氢工业化进程的限制因素之一, 针对如何提高菌种产氢能力的研究成为生物制氢领域的研究热点之一。目前, 质子自杀法^[3,4]和烯丙基乙醇方法^[5-7]是生物制氢领域获得突变体的主要方法。传统的化学诱变方法在工业微生物育种上, 特别是筛选高产、优质的菌种突变体中仍占据着不可忽视的地位, 而选择诱变剂是否得当直接关系到突变株获得的质量和进程。为了进一步提高发酵产氢产酸菌种的释氢能力, 本文利用3种化学诱变剂处理产氢细菌 ZGX4, 以获得高效稳定的产氢突变体。

1 材料与方法

1.1 菌种

Ethanoligenens sp. ZGX4 取自本实验室连续流搅拌槽式反应器(CSTR)内的厌氧活性污泥, 采用改进后的 Hungate 厌氧滚管技术^[8]和培养瓶平板法^[9]分

离纯化得到, 是一株严格厌氧乙醇型产氢细菌。

1.2 培养基

液体培养基(g/L): 葡萄糖 10, 蛋白胨 2.0, 牛肉膏 1.0, 酵母汁 1.0, NaCl 4.0, K_2HPO_4 1.5, L-半胱氨酸 0.5, $FeCl_2 \cdot H_2O$ 0.1, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.1, 维生素与微量元素各 10mL; 刃天青(0.2%) 1mL; pH 值为 6.0。

分离培养基(g/L): 胰蛋白胨 1.0, 琼脂 20~25, 其他成分如液体培养基。

1.3 分析方法

挥发酸和醇类测定: 使用国产 GC122 型气相色谱仪和 CDP-2S 色谱数据处理机及软件。取 1mL 培养液, 同时加入 6 mol/L 的 HCl 溶液 2 滴, 离心 5000r/min, 取上清液 2 μ L 进样, $\Phi 5mm \times 2m$ 不锈钢螺旋柱, 内装担体 GDX-103(60-80 目) + 2% H_3PO_4 , 氢火焰检测器, 氮气作载体, 流速 60 mL/min; 氢气流速 50 mL/min; 空气流速 490 mL/min; 汽化室温度 210 $^{\circ}C$; 柱和检测室温度 190 $^{\circ}C$ 。

氢气和二氧化碳测定: 使用 SC-II 型气相色谱仪, 取气相样品进样, 柱长 2m, 担体为 TDS-01, 60~80 目, 热导池检测器, 氮气作载气, 流速为 70 mL/min, 柱和检测室 150 $^{\circ}C$ 。

1.4 产氢量和产氢能力的测定

收稿日期: 2006-09-09

基金项目: 国家自然科学基金(30470054); 国家重点基础研究 973 发展计划(G2000026402)

通讯作者: 任南琪(1959—), 男, 博士、教授, 主要从事废水处理工程、环境微生物学、生物能源等。mq@hit.edu.cn

产氢能力实验采用间歇试验装置参考文献[8]。将按 2% 的接菌量接入产氢细菌,反应有效体积为 50 mL。筛出的菌株扩大培养是在恒温空气浴摇床振荡培养,培养条件控制在温度 37℃,摇床转速为 120r/min。

1.5 化学诱变

1.5.1 硫酸二乙酯(DES)的诱变

将 ZGX4 培养到对数期,离心收集菌体制成菌悬液,4000r/min 离心 10min,弃上清液后用 pH = 7.2 浓度为 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液洗涤 2~3 次,并用缓冲液稀释至 10^7 个/mL。取 5mL 该悬浮液加入 5mL 已灭菌无氧的前述磷酸缓冲液中,加入 5mL 硫酸二乙酯(DES)(体积分数为 2% 溶液,用前述磷酸缓冲液配制)溶液,充分混合后,置于 37℃ 下,分别振荡处理 15、30、45、60 min 后加入 0.5mL 2% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 中止反应。以 10 倍稀释法作一系列稀释,取 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 稀释液各 0.1mL 涂布于固体分离培养基上,每个稀释度涂 3 个平板。于 37℃ 厌氧箱中倒置培养 3~5d 后菌落计数,算出 10、25、45、60min 的存活率、致死率。观察诱变效应,挑出菌落形态差异明显的突变菌落继代培养。

1.5.2 1-甲基-3-硝基-1-亚硝基胍(NTG)

同上述方法制成浓度为 10^7 个/mL 的菌悬液,用 pH = 7.0 浓度为 0.05 mol/L 的磷酸缓冲液配制 NTG 溶液,使其最终浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。取 1mL 菌悬液加入 9mL 上述的磷酸缓冲液充分混合,于 37℃ 下振荡培养 15、30、40、60min 后,分别加入 90mL 同样的磷酸缓冲液。取 1mL 梯度稀释至 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} ,涂于琼脂分离培养基上,放于 37℃ 保温厌氧条件下培养。菌落记数,计算存活率和致死率。挑出菌落形态差异明显的突变菌落继代培养。

1.5.3 吡啶黄的诱变

以上述相同方法制成菌悬液浓度为 10^7 个/mL,取 9mL 菌悬液 + 1mL 吡啶黄溶液(15 $\mu\text{g}/\text{mL}$,用 pH = 7.0 的 0.05 mol/L 的磷酸缓冲液配制),37℃ 恒温下振荡培养 3h,加入 90mL 相同的磷酸缓冲液,取 1mL 稀释至 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} ,涂平板,37℃ 保温厌氧条件下培养。菌落记数,计算存活率和致死率。

2 结果与讨论

2.1 硫酸二乙酯(DES)的诱变效应

表 1 给出了 DES 对产氢细菌 ZGX4 的诱变作用,

随着 DES 处理作用时间的增加,菌种存活率越低(相应的死亡率越高)突变体出现的几率也越大。从表 2 所得到的突变体菌落特征来看,得到了 4 种不同类型的突变株,其中 A 类型突变株的形态特征与对照(乳白色、圆型光滑不透明凸起菌落,直径 1.0~2.5mm)很类似,区别在于菌落的直径比对照大,约 1.5~3.0mm 且透明。A 类型菌株的产氢性能来分析,产氢能力高于对照 38%~47%;B 型突变体的产氢能力增幅在 34%~41%,特别指出的是这种类型的突变体在液体发酵过程中表现出很强的自絮凝现象;而对于 C 和 D 类型的突变株进行产氢能力测试,结果是产氢能力与对照相当或者低于对照,显现了负面效应。

表 1 DES 对产氢细菌 ZGX4 的诱变作用

Table 1 Mutagenesis effect of DES on H_2 -producing strain ZGX4

作用时间 /min	稀释倍数	每皿 菌落数/ 个·皿 ⁻¹	存活率/%	死亡率/%
0	10^{-1}	622		
0	10^{-2}	231		
0	10^{-3}	61		
15	10^{-1}	402	64.6	35.4
15	10^{-2}	151	65.4	34.5
15	10^{-3}	39	63.9	36.1
30	10^{-1}	238	38.2	61.8
30	10^{-2}	101	43.7	56.3
30	10^{-3}	21	34.4	65.6
40	10^{-1}	131	21.0	79.0
40	10^{-2}	51	22.1	77.9
40	10^{-3}	17	27.9	72.1
60	10^{-1}	71	11.4	88.5
60	10^{-2}	38	16.5	83.5
60	10^{-3}	9	14.8	85.2

表 2 DES 诱变突变株的特征

Table 2 Character of mutants by DES mutagenesis

突变株 类型	菌落直 径/mm	菌落形态 特征	产氢 能力	氢气 比例
A	1.5~3.0	乳白色、光滑圆型、透明凸起菌苔	+++	68%~88%
B	2.0~3.2	乳黄色、圆型不透明凹陷	+++	57%~81%
C	0.5~2.0	白色、圆型褶皱不透明、扁平	+	32%~54%
D	0.8~2.5	乳白色、不规则褶皱、不透明凸起菌苔	+	30%~49%

2.2 NTG 的诱变效应

表 3 和表 4 可以看出,使用超诱变剂 NTG 处理产氢细菌 ZGX4,菌株的死亡率高于 DES。NTG 能使细胞发生一次或多次突变,还能使多基因并发突变,在复制叉附近一个基因突变能诱发附近位置的基因陆续连锁突变,这种并发突变的几率必小于点突变几率^[10],实验结果也证实了这点(见图 4)。NTG 诱发 ZGX4 只得到了一种突变类型菌株,这种类型菌株的产氢能力比对照高出 35%~49%。

表 3 NTG 对产氢细菌 ZGX4 的诱变作用

Table 3 Mutagenesis effect of NTG on H₂-producing strain ZGX4

作用时间 /min	稀释倍数	每平皿 菌落数/ 个·平皿 ⁻¹	存活率/%	死亡率/%
0	10 ⁻³	582		
0	10 ⁻⁴	201		
0	10 ⁻⁵	49		
10	10 ⁻³	421	72.3	27.7
10	10 ⁻⁴	147	73.1	26.9
10	10 ⁻⁵	37	75.5	24.5
25	10 ⁻³	371	63.7	36.2
25	10 ⁻⁴	123	61.2	38.8
25	10 ⁻⁵	31	63.3	36.7
45	10 ⁻³	274	47.1	52.2
45	10 ⁻⁴	98	48.7	51.3
45	10 ⁻⁵	23	46.9	53.1
60	10 ⁻³	151	25.9	75.1
60	10 ⁻⁴	59	29.4	70.6
60	10 ⁻⁵	11	22.4	77.6

表 4 NTG 诱变突变体的特征

Table 4 Character of mutants by NTG mutagenesis

突变株 类型	菌落直径 /mm	菌落形 态特征	产氢 能力	氢气 比例
A	1.2~3.0	乳白色、光滑圆型、 透明凸起菌苔	+++	58%~ 78%

2.3 吡啶黄的诱变效应

表 5 和表 6 显示了吡啶黄对产氢细菌 ZGX4 的诱变效应,从存活率和死亡率角度分析可知,吡啶黄处理 ZGX4 后,菌株的存活率比 DES 和 NTG 诱变法都高。诱变得到 2 种突变体类型,因为它的诱变机理是移码诱变剂与 DNA 相互结合引起碱基增添或缺失而造成突变,这需要一个逐渐插入 DNA 碱基间的过程^[11],所以诱变效应没有 DES 和 NTG 强。氢气能力测试结果显示,A 型突变株的产氢能力呈现正突变趋势,产氢能力比对照高 31%~43%,而 B 型突

变株的产氢能力则表现为负面增长。

表 5 吡啶黄对产氢细菌 ZGX4 的诱变作用

Table 5 Mutagenesis effect of acridine yellow on H₂-producing strain ZGX4

作用时间 /min	稀释倍数	每平皿 菌落数/ 个·平皿 ⁻¹	存活率/%	死亡率/%
对照	10 ⁻¹	693		
对照	10 ⁻²	181		
对照	10 ⁻³	52		
吡啶黄	10 ⁻¹	542	78.2	21.8
吡啶黄	10 ⁻²	138	76.2	23.8
吡啶黄	10 ⁻³	40	76.9	23.1

表 6 吡啶黄诱变突变体的特征

Table 6 Character of mutants by acridine yellow mutagenesis

突变株 类型	菌落直径 /mm	菌落形 态特征	产氢 能力	氢气 比例
A	1.2~3.0	淡黄色、光滑圆型、 透明凸起菌苔	+++	54%~ 79%
B	0.5~2.0	淡黄色、不规则褶 皱不透明、扁平	+	31%~ 47%

2.4 三种化学诱变方法的对比

诱变剂的作用机理直接决定其诱变效应的强弱,也相应决定了获得突变体类型的多少。本实验采用了 3 种诱变方法对产氢细菌 ZGX4 进行突变体筛选,其中 DES 法得到了 4 种类型突变株,NTG 法获得一种类型突变株,吡啶黄法得到 2 种突变类型突变株。DES 是一种烷化剂,通过烷化基团使 DNA 分子上的碱基及磷酸部分烷化,DNA 复制时导致碱基配对错误而引起突变。例如当烷基加到鸟嘌呤(G)与胸腺嘧啶(T)的氢键相结合从而使 G:C→A:T 及 G:C→C:G 或 G:C→T:A 颠换而导致突变。此外,DES 还可以引起 DNA 分子中磷酸和糖之间的共价键断裂而造成突变。因此,DES 是一种很强的诱变剂,这也是它能够产生多种突变体类型的根本原因。NTG 是一种超强诱变剂,作用在复制叉附近,极易诱发突变而得到多重突变株出现,但多重突变的几率要小于点突变的几率,所以 NTG 法得到的突变体类型少于 DES 法。而作为一种移码诱变剂,吡啶黄法处理产氢细菌 ZGX4 得到了 2 种突变类型的突变体,由于这类诱变剂与 DNA 接触后,能逐渐插入两个碱基之间引起移码突变,这需要一个插入的过程,因此它的诱变效应也没有 DES 强。

3 结 论

化学诱变剂在微生物高产菌株的突变体筛选过程中占举足轻重的地位,特别在工业微生物育种中,很多优质高产而且遗传稳定的突变菌株都是利用化学诱变剂处理筛选得到的。本实验选用 3 种化学诱变剂对发酵产氢产酸细菌 *Ethanoligenens* sp. ZGX4 进行了诱变处理,对比得出:

1) 3 种化学诱变剂对产氢细菌 *Ethanoligenens* sp. ZGX4 的诱变效应显示出差异,其中以 DES 法诱变效果最佳,可以获得种类较多的突变类型,而且出现一种自絮凝很强的突变菌株。这种类型突变菌株在液体发酵培养过程中结块集结生长,是实现生物治理污染方法中较理想的生物功能性菌种;

2) 尽管 3 种化学诱变剂所得到的突变体类型数量不同,但从产氢能力的测试分析,发现高产正突变体的菌落类型没有发生太大的变化,与对照 ZGX4 菌落形态整体类似,差异之处在于高产突变株的菌落直径大于对照且菌落透明,在菌落附着之处的培养基中出现明显的气泡,这可为进一步大量筛选高效产氢突变株提供很重要的参考信息;

3) 3 种化学诱变方法中出现的菌落直径缩小、形状不规则不透明且菌苔扁平特征类型的突变体,其产氢能力基本呈现负增长趋势,这直接为平板分离筛选高产稳定产氢突变体的获得提供比对参考。

[参考文献]

[1] Das D, Veziroglu T N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature[J]. Int J Hydrogen Energy,

2001, 26:13—28.

- [2] Lin C Y, Lay C H. Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora [J]. Int J Hydrogen Energy, 2004, 29:41—45.
- [3] Winkelman J W, Clark D. Proton suicide general method for direct selection of sugar transport and fermentation defective mutants[J]. J Bacteriol, 1987, 160:687—690.
- [4] Pablo H C, Mendez B S. Direct selection of *Clostridium acetobutylicum* fermentation mutants by a proton suicide method [J]. Appl Environ Microbiol, 1990, 56(2): 578—580.
- [5] Rogers P, Palosaari N. *Clostridium acetobutylicum* mutants that produce butyraldehyde and alter quantities of solvents[J]. Appl Environ Microbiol, 1987, 53(12): 2761—2766.
- [6] Clark D, Cronan J E Jr. A cetaldehyde coenzyme a dehydrogenase of *Escherichia coli* [J]. J Bacteriol, 1980, 144:179—184.
- [7] Mai-Jan F, Kiswar Y A, Clark D. Mutants of *E. coli* deficient in the fermentative lactate dehydrogenase [J]. J Bacteriol, 1989, 171:342—348.
- [8] 林 明,任南琪,王爱杰,等.产氢发酵细菌培养基的选择和改进[J].哈尔滨工业大学学报,2003, 35(4): 398—402.
- [9] 李永峰,任南琪,陈 瑛,等.发酵产氢细菌分离培养的厌氧实验操作技术[J].哈尔滨工业大学学报,2004, 36(12): 1589—1592.
- [10] 施巧琴.工业微生物育种学[M].北京:科学出版社,2003.
- [11] An G H, Bielich J, Auerbach R, et al. Isolation and characterization of carotenoid hyperproducing mutant of yeast by flow cytometry and cell sorting[J]. Bio Technology, 1991, 1: 70—73.

MUTAGENESIS OF THREE CHEMICAL MUTAGEN ON HYDROGEN-PRODUCING BACTERIUM *ETHANOLIGENENS* SP. ZGX4

Zheng Guoxiang, Ren Nanqi, Li Yongfeng, Lin Hailong

(School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstract: A preliminary study on chemical mutagenesis of diethyl sulfate (DES), 1-methyl-3-nitryl-1-nitrosoguanidine (NTG) and acridine yellow on H_2 -producing strain *Ethanoligenens* sp. ZGX4 was discussed and showed different mutagenic effects. Four kinds of mutants were obtained by DES mutagenesis, among which included a kind of H_2 -producing mutant with stronger auto flocculation capacity; The death rate of NTG was maximum and attained one kind of mutant; The death rate of acridine yellow was 21.8% ~ 23.1% and 2 kinds of mutant were got. Compared with NTG and acridine yellow, the mutagenesis of DES was the best. The morphological characteristic of high efficient mutants was similar with that of control strain except that colonies diameter became bigger and transparent.

Keywords: chemical mutagenesis; fermentative hydrogen-producing bacterium; mutant