

航天搭载对硅链霉菌菌株生理生化特性的影响

汪亚洁, 王晓桦*, 唐天成

(新疆山川秀丽生物有限公司, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要: 研究航天搭载对硅链霉菌菌株生理生化特性的影响。通过神舟九号飞船搭载硅链霉菌进行实验, 对航天诱变菌株的生理生化特性进行分析, 为我国微生物肥料行业整体的技术进步奠定基础。结果表明: (1) 搭载诱变菌株和 CK 菌株可以利用 10 种碳源, 也可以利用 10 种氮源; (2) 搭载诱变菌株和 CK 菌株都可以水解淀粉, 但都不产生 H₂S; (3) 在 4 ~ 45℃ 条件下, 搭载诱变菌株与 CK 菌株均可以生长, 并且生长状况差异不显著; 但在 55℃ 条件下, 2 种菌株均不能生长; (4) 搭载诱变菌株在 pH=6 ~ 10 条件下生长良好, 而 CK 菌株在 pH 为 7、8、9 条件下生长良好。搭载诱变菌株和 CK 菌株相比较, 在碳源利用、氮源利用、水解淀粉、不产生 H₂S 和温度耐受方面均无明显差别, 表现出相似性, 但在耐 pH 方面, 与 CK 菌株相比, 搭载诱变菌株生长的 pH 范围更广, 有更好的耐受性, 显示了搭载诱变菌株具有更强的抗逆性。

关键词: 太空搭载; 硅链霉菌; 生理生化特性

新疆气候干旱, 土壤 pH 较高, 水分和土壤化学性质都不利于链霉菌微生物的繁殖和作用的发挥, 因此提高链霉菌的抗逆性, 尤其是耐高 pH 的特性, 使之适应新疆石灰性土壤条件, 对于该类生物肥料的推广应用至关重要。随着我国“神舟”系列载人航天飞船的不断发射, 以及其它可利用的空间监测手段的应用, 为人类进入航天时代展示了美好的前景^[1-2]。近几年, 有关空间环境对微生物学性状的影响、应用及其分子遗传机制等逐渐成为研究热点, 微重力作为一个比较特殊的环境因子, 早已引起国内外研究学者的广泛关注^[3-4]。而经过航天诱变的微生物菌种变异幅度大, 有益变异增多。微生物生长周期短、体积小、重量轻、易变异等优势, 决定其在航天诱变育种中有其得天独厚的优势^[5-6]。通过神舟九号飞船搭载硅链霉菌菌株, 前期经过研究, 结合搭载诱变菌株的形态特征观察和 16S rDNA 同源性分析, 将搭载诱变菌株初步鉴定为硅链霉菌 *Streptomyces silaceus*; 为了进一步明确该菌株的基本属性及其分类鉴定, 对搭载诱变菌株的生理生化特性进行分析, 同时通过改变其生物

学功能, 从而在其中选育出有利、高效的正突变菌株, 为科学提高菌种的抗逆性和对新疆土壤的适应性奠定良好的基础。

1 材料与方法

1.1 试验区概况

搭载菌株的神舟九号航天飞船于北京时间 2012 年 6 月 16 日 18 时 37 分 24 秒在甘肃省酒泉卫星发射中心发射升空, 于 6 月 29 日 10 时 03 分在内蒙古四王子旗返回地面, 完成了菌种搭载任务。菌株返回地面后, 由中国科学院微生物应用研究所保藏中心保藏, 并对搭载诱变菌株进行筛选、培养, 选育工作。

1.2 材料

1.2.1 供试样品

硅链霉菌菌种、测试菌种均由新疆山川秀丽生物有限公司提供, 并对搭载诱变菌株和 CK (对照) 菌株的碳源利用、氮源利用、酶学实验、pH、温度耐受实验进行检测分析。

1.2.2 培养基

制作碳源利用培养基、氮源利用培养基、淀粉水解培养基、柴斯纳琼脂、PSB 培养、Bennett 培养基。

1.3 方法

1.3.1 碳源利用测定

将搭载诱变菌株和 CK 菌株分别接种在加有 D- 阿拉伯糖、D- 棉子糖等碳源利用培养基的平板

收稿日期: 2021-11-30; 录用日期: 2022-02-08

基金项目: 新疆自治区专利实施计划项目 (2015SS1017)。

作者简介: 汪亚洁 (1983-), 助理研究员, 硕士研究生, 从事微生物肥料技术与推广应用。E-mail: 40715426@qq.com。

通讯作者: 王晓桦, E-mail: 734013808@qq.com。

上, 置于 28℃ 光照培养箱内恒温培养, 在 7 和 14 d 分别观察菌株的生长情况。如菌株在培养基上生长, 则表示菌株能利用该碳源; 如菌株不生长, 表示菌株不能利用该碳源。

1.3.2 氮源利用测定

将搭载诱变菌株和 CK 菌株分别接种在加有硝酸钠、硫化铵等 10 种氮源利用培养基的平板上, 置于 28℃ 光照培养箱内恒温培养, 在 7 和 14 d 分别观察菌株的生长情况。如菌株在培养基上生长, 则表示菌株能利用这种氮源; 如菌株不生长, 表示菌株不能利用该氮源。

1.3.3 淀粉水解测定

将搭载诱变菌株和 CK 菌株接种在淀粉琼脂的平板上, 采用点接法, 直径不超过 5 mm, 置于 28℃ 培养 10 d 后, 在菌落周围滴加碘液检测, 若菌落周围呈现透明圈时, 表示菌种产生淀粉酶; 若菌落周围染成蓝色, 不出现透明圈, 说明该菌株不产生淀粉酶。

1.3.4 产 H₂S 测定

将搭载诱变菌株和 CK 菌株分别接种在柴斯纳琼脂培养基的平板上, 分别在 7 和 14 d 培养后观察是否产生黑色素。如无黑色素产生, 说明不产生 H₂S; 如有黑色素产生, 说明有产生 H₂S。

1.3.5 pH 耐受测定

将 PSB 培养基灭菌后, 在无菌条件下用灭菌的 2 mol/L NaOH 和 2 mol/L HCl 溶液将 PSB 培养基的 pH 值分别调至 6.0、7.0、8.0、9.0、10.0, pH 值用 pH 计 METTLER TOLEDO 测量。将搭载诱变菌株和 CK 菌株分别按照 0.5% 的接种量接种至调节好 pH 值的 PSB 培养基中, 置于 25℃、180 r/min 恒温摇床上培养 6 d 后, 分别用预先烘干并称重的 50 mL 离心管在 10000 转速下常温离心 10 min, 收集沉淀菌体和离心上清液。将菌体置于 60℃ 下烘干至恒重后, 用电子天平称量菌体干重。

1.3.6 温度耐受测定

将搭载诱变菌株和 CK 菌株接种在 Bennett 培养基上, 分别置于 5、15、25、35、45、55℃ 黑暗培养 16 d, 观察记录其生长情况, 每组设 5 个重复。

2 结果与分析

2.1 碳源利用

碳源作为培养基的主要成分之一, 为细胞提供能源, 组成菌体细胞成分碳架, 构成代谢产物。碳源利用实验结果显示: 搭载诱变菌株在 10 种碳源

培养基上经过 7 和 14 d 后, 菌株均可以生长, 即可以利用这 10 种碳源, CK 菌株在 10 种碳源培养基上经过 7 和 14 d 培养后, 菌株也可以生长, 即也可以利用这 10 种碳源 (表 1)。并且搭载诱变菌株和 CK 菌株对这 10 种碳源的利用能力无明显差异。

表 1 碳源利用实验结果

| 碳源 | 因子一 (7 d) | | 因子二 (14 d) | |
|---------|-----------|-------|------------|-------|
| | 搭载诱变菌株 | CK 菌株 | 搭载诱变菌株 | CK 菌株 |
| D- 阿拉伯糖 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| D- 棉子糖 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 果糖 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| D- 半乳糖 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| α- 乳糖 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| D- 木糖 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 蔗糖 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| L- 山梨糖 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 甘露醇 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 纤维二糖 | 1 | 1 | 1 | 1 |

注: 如菌株在培养基上生长, 则表示菌株能利用这种碳源, 以 1 表示; 如菌株不生长, 表示菌株不能利用该碳源, 以 0 表示。

2.2 氮源利用

氮源构成菌体细胞结构物质, 为微生物提供能源, 合成含氮代谢产物, 在碳源不足时也可以用作碳源。氮源利用实验结果显示, 搭载诱变菌株在 10 种氮源培养基上经过 7 和 14 d 后, 菌株均可以生长, 即可以利用这 10 种氮源, CK 菌株在 10 种氮源培养基上经过 7 和 14 d 后, 菌株也可以生长, 即也可以利用这 10 种氮源 (表 2)。并且搭载诱变菌株和 CK 菌株对这 10 种氮源的利用能力无明显差异。

表 2 氮源利用实验结果

| 氮源 | 因子一 (7 d) | | 因子二 (14 d) | |
|--------|-----------|-------|------------|-------|
| | 搭载诱变菌株 | CK 菌株 | 搭载诱变菌株 | CK 菌株 |
| 蛋白胨 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| L- 丙氨酸 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| L- 脯氨酸 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| L-d 冬碱 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| L- 精氨酸 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| L- 色氨酸 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| L- 亮氨酸 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| L- 酪氨酸 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| L- 赖氨酸 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| L- 丝氨酸 | 1 | 1 | 1 | 1 |

注: 如菌株在培养基上生长, 则表示菌株能利用这种氮源, 以 1 表示; 如菌株不生长, 表示菌株不能利用该氮源, 以 0 表示。

2.3 酶学及产生 H₂S 实验

淀粉水解测定结果显示, 经过 7、14 d 培养的搭载诱变菌落周围呈现透明圈, CK 菌落周围也呈现透明圈, 说明搭载诱变菌株和 CK 菌株都可以水解淀粉。产生 H₂S 实验结果显示, 经过 7、14 d 培养的搭载诱变菌株不产生黑色素, 而 CK 菌株也不产生黑色素, 说明搭载诱变菌株和 CK 菌株都不产生 H₂S (表 3)。

表 3 酶学实验结果

| 项目 | 因子一 (7 d) | | 因子二 (14 d) | |
|---------------------|-----------|-------|------------|-------|
| | 搭载诱变菌株 | CK 菌株 | 搭载诱变菌株 | CK 菌株 |
| 水解淀粉 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 产生 H ₂ S | 1 | 1 | 0 | 0 |

注: 水解淀粉: 菌落周围出现透明圈, 说明该菌株可以水解淀粉, 以 1 表示; 菌落周围染成蓝色, 不出现透明圈, 说明该菌株不可以水解淀粉, 以 0 表示。产生 H₂S: 菌株产生黑色素, 说明该菌株可以产生 H₂S, 以 1 表示; 菌株不产生黑色素, 说明菌株不产生 H₂S, 以 0 表示。

2.4 pH 耐受实验

不同微生物对 pH 要求不同, 大多数可生存的 pH 范围在 4 ~ 10 之间, 各种微生物都有其生长的最低、最适、最高 pH, 低于最低或者超过最高 pH 时, 微生物生长受到抑制或者导致死亡。搭载诱变菌株和 CK 菌株的 pH 耐受实验结果显示: 在 pH 为 7、8、9 条件下, 搭载菌株与 CK 菌株生长情况无明显差别, 但在 pH 为 6、10 条件下, 搭载菌株较 CK 菌株生长情况更好, 搭载菌株显示了较高 pH 耐受能力 (表 4)。

表 4 pH 耐受实验

| 菌株 | pH 值 | | | | |
|--------|------|----|-----|-----|----|
| | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 搭载诱变菌株 | ++ | ++ | +++ | +++ | ++ |
| CK 菌株 | + | ++ | ++ | +++ | + |

注: + 为可以生长, ++ 为生长一般, +++ 为生长良好。

2.5 温度耐受实验

温度耐受实验结果显示, 在 4 ~ 45℃ 条件下, 搭载菌株与 CK 菌株均可以生长, 在 15 ~ 35℃ 条件下, 搭载菌株与 CK 菌株生长良好, 并且生长情况差异不显著; 但在 55℃ 下, 两株菌均不能生长 (表 5)。

表 5 温度耐受实验

| 菌株 | 温度 | | | | | |
|--------|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 4℃ | 15℃ | 25℃ | 35℃ | 45℃ | 55℃ |
| 搭载诱变菌株 | + | ++ | ++ | ++ | + | - |
| CK 菌株 | + | ++ | ++ | ++ | + | - |

注: + 为可以生长, ++ 为生长良好, - 为不能生长。

3 结果与讨论

通过对搭载诱变菌株与地面对照 (CK) 菌株在碳源利用、氮源利用、水解淀粉、pH、温度耐受等生理生化特征方面进行比较得出: 搭载诱变菌株和 CK 菌株相比较, 在碳源利用、氮源利用、水解淀粉、不产生 H₂S 和温度耐受方面均无明显差别, 表现出相似性, 但在耐 pH 方面, 与 CK 菌株相比, 搭载诱变菌株生长的 pH 范围更广, 有更好的耐受性, 显示了更强的抗逆性。

神舟九号飞船搭载的微生物菌株, 经过前期研究, 将搭载诱变菌株初步鉴定为链霉菌 *Streptomyces silaceus*; 本实验结果显示, 搭载诱变菌株和 CK 菌株都可以利用 D-阿拉伯糖等 10 种碳源和蛋白胨等 10 种氮源, 均可以水解淀粉, 在温度耐受方面也无明显差异, 体现了菌株的相对稳定性, 保持了链霉菌的特性, 进一步验证了搭载菌株为链霉菌 *Streptomyces silaceus*。

大量研究表明, 空间各种条件如宇宙射线、交变磁场、微重力、高真空等环境因素对微生物生长、繁殖产生了显著影响^[7-11], 张文利等^[12]利用神舟三号飞船搭载的树莓试管苗发现其叶片细胞形状、叶绿体、线粒体等细胞结构变化较大。另外, 通过神舟八号搭载的果胶酶菌株, 与地面对照菌株相比持续产霉能力增强, 产霉能力最稳定^[13]; 搭载神舟五号的茅台大曲酵母菌, 搭载诱变的菌株在耐有机溶剂、耐酶解、耐酒精、耐热性方面均高于搭载前菌株^[14]。这些与本实验结果有所不同, 还需要进一步深入研究。

链霉菌除具有微生物能够解离土壤中的氮、磷、钾养分, 提高化肥的利用率外, 还能够促进作物生长, 抑制病菌生长。但是土壤中自然生长的链霉菌数量少, 且在高 pH 条件下不易存活, 本实验研究结果显示, 搭载诱变菌株与 CK 菌株相比较, pH 范围更广, 有更好的耐受性, 显示了更强的抗逆性。这与搭载神舟五号的茅台大曲酵母菌,

搭载诱变的菌株的细胞结构发生了变异菌体的抗逆性增强结果一致^[14-15]。经太空搭载诱变的菌株,返回地面后,对诱变菌株进行了定向选育,选育出耐高 pH 的菌株,明确了太空环境可提高硅链霉菌对土壤酸碱性的抗逆性,显著提升了硅链霉菌的生物有效性和对土壤 pH 适应的广谱性,为新疆盐碱土改良利用提供高效产品和技术保障。

参考文献:

- [1] 薛惠峰,王家胜,周少鹏,等. 我国航天育种三十年发展现状、问题与建议[J]. 中国航天, 2017(12): 19-22.
- [2] 吴前进,蒋兴村. 微生物航天诱变育种及其产业化[C]. 中国空间科学学会空间生命专业委员会 2003 年中国空间生命科学与航天医学会议. 2003.
- [3] 王伟,薛小平,杨慧. 微重力环境下的细菌生物学效应[J]. 生命的化学, 2011, 31(1): 162-166.
- [4] 赵一洲,李正茂,刘福才,等. 粳稻盐粳 188 航天诱变 SP2 代的性状变异与选择[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(6): 58-61.
- [5] 吕彦妮,罗爱玉,宋秀秀,等. 辣椒新品种航椒红海特征特性及高产栽培技术[J]. 农业科技通讯, 2021(8): 316-318.
- [6] 郑伟,郭泰,王志新,等. 大豆航天育种研究进展[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2015(5): 1-9.
- [7] 刘建福,黄安民,钟书醇,等. 神舟八号航天搭载武夷岩茶品种形态变异研究[J]. 福建茶叶, 2013(5): 8-10.
- [8] 陈卫英,陈真勇,杨军. 航天诱变向日葵突变株系盛花期的光合特性[J]. 西北农业学报, 2012, 21(8): 139-145.
- [9] 杨永升,李朝阳,杨慧旗,等. 航天搭载材料及诱变后代选择的研究与应用[J]. 中国种业, 2013(6): 18-20.
- [10] 王洋洋,韩雨,盛云燕. 空间诱变对薄皮甜瓜 SP1 田间主要性状变异的影响[J]. 北方园艺, 2013(24): 14-17.
- [11] 邹东原,陈秀新,范继红. 空间搭载对芹菜生物量积累及生理特性的影响[J]. 北方园艺, 2013(19): 41-44.
- [12] 张文利,潘毅,薛淮,等. 神舟三号飞船搭载的树莓试管苗超微结构及其 RAPD 分析[J]. 作物学报, 2004, 30(12): 1284-1286.
- [13] 马成,马伟超,安建平,等. 神舟八号航天搭载诱变选育果胶酶高产菌株[J]. 食品工业科技, 2013(13): 184-186.
- [14] 史东健,王昌禄,郭坤亮,等. 太空搭载对茅台大曲酵母生理特性的影响[J]. 中国酿造, 2008(15): 61-63.
- [15] 史东健,王昌禄,龚国利,等. 太空搭载对酵母菌抗逆性的影响[J]. 中国酿造, 2008(17): 42-44.

Effects of spaceflight on the physiological and biochemical characteristics of *Streptomyces silicium* bacterial fertilizer strain

WANG Ya-jie, WANG Xiao-hua*, TANG Tian-cheng (Xinjiang Shanchuan Xiuli Biology Co., Ltd., Urumqi Xinjiang 830011)

Abstract: The effect of spaceflight on the physiological and biochemical characteristics of *Streptomyces silicium* bacterial fertilizer strain was studied. *Streptomyces silicium* bacterial fertilizer strain was carried by Shenzhou 9 spacecraft for experiment, and the physiological and biochemical characteristics of stain after spaceflight mutagenesis were analyzed, which laid the foundation for the overall technological progress of national microbial fertilizer industry. Results showed that: (1) The loaded strain and CK strain could utilize ten carbon sources and ten nitrogen sources; (2) Both the loaded strain and the CK strain could hydrolyze starch, but neither produced H₂S; (3) Under the condition of 4 ~ 45 °C, both the loaded strain and the CK strain could grow, and the growth situation was not significantly different; but at 55 °C, neither strains could grow; (4) The strains grow well under the condition of pH=6 ~ 10 after loading. The CK strains grow well under the conditions of pH=7, 8, 9. There were no significant difference in carbon source utilization, nitrogen source utilization, hydrolyzed starch, no H₂S production and temperature tolerance between the loaded strain and the CK strain, but in terms of pH tolerance, the loaded strain could grow in a wider pH range, had better tolerance, and thus showed stronger stress resistance.

Key words: spaceborne; *Streptomyces silicium*; physiological and biochemical properties