

通过常温常压等离子体技术(ARTP)选育高产阿维链霉菌菌株

王佳欣¹, 韩广欣¹, 曹浩聪¹, 武琛洋¹, 王晨旭¹, 李春旺¹, 程曦², 姚清国^{1*}

¹石家庄学院化工学院, 河北 石家庄

²河北兴柏农业科技股份有限公司, 河北 石家庄

收稿日期: 2025年8月25日; 录用日期: 2025年12月23日; 发布日期: 2025年12月30日

摘要

阿维链霉菌是工业上生产阿维菌素的重要菌株, 其发酵效率高低关系到企业生产的效益。本研究采用常温常压等离子体(ARTP)技术对阿维链霉菌进行诱变选育, 首次诱变设置10 s~120 s共9个时间梯度, 分析不同处理对菌株致死率的影响, 在该区间内进一步缩小时间梯度范围(40 s、45 s、50 s、55 s、60 s)进行诱变, 并结合摇瓶发酵筛选高产突变株。结果显示, 经45 s诱变处理的突变株阿维菌素效价达8.85 g/L, 较原始菌株提升15.4%, 研究证实ARTP技术可通过诱变菌体并进一步筛选获得产率较高的突变株, 本研究为阿维菌素工业化生产构建了高效、可行的育种新策略。

关键词

阿维链霉菌, 常温常压等离子体, 诱变育种, 阿维菌素

Selection of High-Yield *Streptomyces avermitilis* Strains through Ambient Temperature and Pressure Plasma Technology

Jiaxin Wang¹, Guangxin Han¹, Haocong Cao¹, Chenyang Wu¹, Chenxu Wang¹, Chunwang Li¹, Xi Cheng², Qingguo Yao^{1*}

¹College of Chemical Engineering, Shijiazhuang University, Shijiazhuang Hebei

²Hebei Xingbai Agricultural Technology Co, Ltd., Shijiazhuang Hebei

Received: August 25, 2025; accepted: December 23, 2025; published: December 30, 2025

*通讯作者。

文章引用: 王佳欣, 韩广欣, 曹浩聪, 武琛洋, 王晨旭, 李春旺, 程曦, 姚清国. 通过常温常压等离子体技术(ARTP)选育高产阿维链霉菌菌株[J]. 微生物前沿, 2025, 14(4): 195-201. DOI: 10.12677/amb.2025.144023

Abstract

Streptomyces avermitilis is an important strain for industrial production of Avermectin, and its fermentation efficiency is closely related to the production benefits of enterprises. In this study, the ARTP (Atmospheric and Room Temperature Plasma) technology was used to mutagenize and select *Streptomyces avermitilis*. The first mutagenesis was set with 9 time gradients from 10 s to 120 s to analyze the effect of different treatments on the mortality rate of the strain. Within this range, the time gradient was further narrowed (40 s, 45 s, 50 s, 55 s, 60 s) for mutagenesis, and high-yield mutant strains were screened by shake flask fermentation. The results showed that the Avermectin titer of the mutant strain treated with 45 s mutagenesis reached 8.85 g/L, which was 15.4% higher than that of the original strain. The study confirmed that the ARTP technology can obtain mutant strains with higher production rates by mutagenizing the bacteria and further screening. This study has established a highly efficient and feasible new breeding strategy for the industrial production of Abamectin.

Keywords

Streptomyces avermitilis, Atmospheric and Room Temperature Plasma, Mutagenesis Breeding, Avermectin

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

阿维菌素作为一类由阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)产生的聚酮类大环内酯化合物,自20世纪70年代被发现以来,凭借高效广谱的抗寄生虫活性,已成为农业害虫防治与畜牧业寄生虫防控领域不可或缺的生物药剂。阿维链霉菌最早由日本北里研究所于1974年从静冈县土壤样品中分离获得[1]。阿维菌素具有16元大环内酯骨架与齐墩果糖基团,该基团在pH 5~9的中性环境中稳定性良好,且在200℃以下无明显热分解现象;其作用机制是通过增强无脊椎动物谷氨酸门控氯离子通道活性,最终导致神经传导阻断,阿维菌素由于自身无法穿透哺乳动物血脑屏障,因此具备高效低毒的核心优势。此外,阿维菌素在自然环境中仅需2~8周即可被微生物完全降解,高度契合当前绿色农业的发展需求[2]。

产量提升与品质优化是阿维菌素工业化生产的核心目标,而菌种选育则是实现这一目标的关键手段。在众多育种技术中,诱变育种因操作简便、无需明确菌株遗传背景等特点,在工业微生物菌株改良中应用广泛[3]。其中,常温常压等离子体(Atmospheric and Room Temperature Plasma, ARTP)诱变技术自本世纪初起逐渐成为物理诱变领域的研究热点。该技术通过氦气放电产生的活性粒子,可同步作用于微生物的细胞壁、细胞膜与DNA分子,诱导DNA发生断裂、交联等多种类型的损伤,进而引发基因突变,具有突变率高、无环境污染、设备便携等显著优势[4]。目前,ARTP技术已在工业微生物育种领域取得诸多成功应用,例如莫芳华等通过ARTP诱变选育的耐盐产香酵母菌株,其酯类产量较出发菌株提升42%[5]。李晓芳等利用该技术获得的L-异亮氨酸高产大肠杆菌,发酵效价可达38.6 g/L[6]。栾书慧等则通过ARTP诱变使安丝菌素P-3的产量提高1.8倍[7]。这些研究充分证实,ARTP技术在提升微生物次级代谢产物产量方面效果显著,且在效价提升幅度、操作安全性及便捷性等维度,均优于传统的紫外线(UV)诱变与化学诱变技术,更契合工业化育种的实际需求。

尽管阿维菌素育种已取得长足进展,但仍面临诸多挑战。日本北里研究所最初分离的野生型阿维链霉菌,阿维菌素产量极低(仅 10~50 $\mu\text{g/mL}$),且产物包含 8 种组分,其中仅 B1a 组分药效佳、毒性低。美国默克公司通过物理与化学诱变结合的方式,将菌株产量提升至 500~1000 $\mu\text{g/mL}$,同时使 B1a 组分比例超过 60%。国内研究团队也针对本土生产工艺,选育出适配性更强的生产菌株,目前国内阿维菌素工业生产中,菌株 B1a 组分比例已超 80%,产量可达 5 g/L 以上。然而,现有工业菌株仍存在遗传稳定性差、发酵周期长、效价波动较大等问题,制约了阿维菌素产业的进一步提质增效[8]。

基于此,本研究以阿维链霉菌为出发菌株,围绕 ARTP 诱变参数优化与高产突变株筛选展开系统研究。研究旨在确立阿维链霉菌 ARTP 诱变的最优工艺参数,筛选获得阿维菌素产量显著提升且遗传稳定的突变菌株,并初步探究 ARTP 诱变对菌株生长代谢的影响机制。预期研究成果不仅能为微生物高效育种提供理论依据,更能为阿维菌素绿色生产技术升级提供优质菌株资源与实践参考,推动行业可持续发展。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料与试剂

阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)由河北兴柏农业科技股份有限公司提供(原始菌株阿维菌素 B1a 效价为 7.67 g/L)。

平板培养基:可溶性淀粉 4 g/L,酵母浸粉 2 g/L,胰蛋白胨 2 g/L,葡萄糖 5 g/L,麦芽浸粉 5 g/L,琼脂 20 g/L。pH 自然,121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min。

摇瓶培养基:可溶性淀粉 4 (g/L),酵母浸粉 2 (g/L),胰蛋白胨 2 (g/L),葡萄糖 5 (g/L),麦芽浸粉 5 (g/L)。pH 自然,121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min,250 mL 摇瓶装液量 100 mL。

可溶性淀粉、酵母浸粉、胰蛋白胨、琼脂、葡萄糖、麦芽浸粉和甲醇。

2.2. 主要仪器设备

ARTP 等离子诱变系统(ARTP-M 型,无锡源清天木生物科技有限公司);小型冷水机(LX-150 型,北京长流科学仪器有限公司);高纯氦气(99.999%,石家庄市西三教实用气体有限公司);生化培养箱(SPL-250 型,天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司);高压蒸汽灭菌器(LDZX-75L 型,上海医疗器械厂);高效液相色谱仪(LC-100 型,上海伍丰科学仪器有限公司);生物显微镜(XSP-2C 型,上海天珠光学仪厂);高速冷冻离心机(H1650R 型,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

2.3. 实验方法

2.3.1. 菌种活化与培养

在超净工作台中,用灼烧冷却的接种环挑取原始菌株菌落,划线接种于平板培养基,28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 7 d 至孢子成熟(菌落呈灰白色、表面褶皱)。

2.3.2. 孢子悬浮液制备

用 5 mL 无菌水冲洗成熟菌落,通过三层擦镜纸过滤除去菌丝残渣,使用血球计数板计数,用无菌水稀释至孢子浓度为 10^6 个/mL,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.3.3. ARTP 诱变处理

将灭菌不锈钢载片置于超净台,每片滴加 20 μL 孢子悬浮液,自然晾干后备用。设置 ARTP 参数为气流量 10 SLM,输出功率 120 W,等离子体发射源与载片距离 2 mm。处理时间梯度为 0 s(对照)、10 s、

20 s、30 s、40 s、50 s、60 s、80 s、100 s、120 s，每组 3 次重复。处理后将载片转移至含 1 mL 无菌水的 EP 管，振荡 1 min 洗脱孢子，取 200 μ L 涂布平板，28 $^{\circ}$ C 培养 7 d 后计数菌落数。

致死率计算：致死率(%) = (1 - 处理组菌落数/对照组菌落数) \times 100%。

2.3.4. 摇瓶发酵实验

挑取纯化后的单菌落接种至摇瓶培养基，28 $^{\circ}$ C、120 r/min 振荡培养 96 h。培养结束后取样测定阿维链霉菌的生物量与阿维菌素效价。

2.3.5. 阿维菌素效价检测

样品前处理：取 1 mL 发酵液离心(12,000 r/min, 10 min)，弃上清，菌丝体中加入 1 mL 甲醇，超声提取 30 min (功率 300 W，温度 25 $^{\circ}$ C)，8000 r/min 离心 5 min，上清经 0.22 μ m 有机滤膜过滤，滤液用于后续检测。

液相色谱条件：色谱柱采用 C18 柱子(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)，流动相甲醇：水比值为 9:1。流速为 1.0 mL/min，检测波长(245 nm)柱温为 30 $^{\circ}$ C，进样量(20 μ L)。

效价计算：配制 1.0/L 的阿维菌素标准溶液，进样测定峰面积，效价(g/L) = (样品峰面积 \times 标准品浓度 \times 稀释倍数)/标准品峰面积。

3. 结果与分析

3.1. ARTP 诱变致死曲线分析

处理时间梯度为 0 s(对照)、10 s、20 s、30 s、40 s、50 s、60 s、80 s、100 s、120 s，每组 3 次重复。不同诱变时间对阿维链霉菌孢子的致死效应如图 1 所示。随着处理时间延长，菌株致死率呈逐渐上升趋势，10 s 处理致死率为 22.1%，30 s 时升至 54.7%，40 s~60 s 区间致死率快速增至 65.1%~90.8%，80 s 处理致死率达 97.8%，120 s 时孢子完全致死，如图 2 所示。这一结果符合诱变育种的“马鞍型”致死规律，即中等致死率区间(60%~80%)更易获得正突变体。综合考虑突变率与菌株存活能力，确定 40 s~60 s 为最佳诱变时间范围。

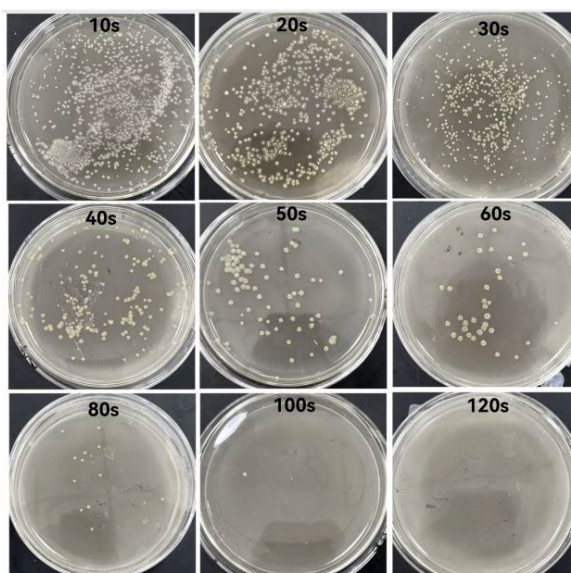


Figure 1. Growth of *Streptomyces avermitilis* on plates under different mutagenesis times
图 1. 不同时间诱变阿维链霉菌在平板上的生长情况

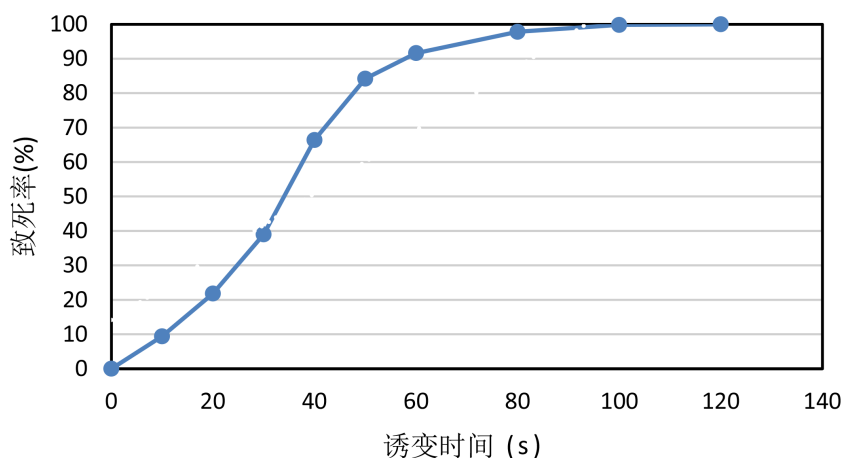


Figure 2. ARTP mutagenic lethal curve

图 2. ARTP 诱变致死曲线

3.2. ARTP 诱变后摇瓶发酵效价测定

在第一次诱变的基础上, 选取了 40 s~60 s 区间的菌株进行第二次诱变处理后, 突变株菌落形态发生显著变化, 选取诱变的菌株进行后期发酵效价分析(通过摇瓶实验选取), 诱变后的菌落颜色更深, 呈深灰色, 表面褶皱更密集, 边缘更整齐, 直径增大。这种形态变化可能与菌株细胞壁结构改变、营养吸收能力提升直接相关。

诱变后各时间组突变株的阿维菌素效价如图 3 所示。45 s 处理组效价最高, 达 8.85 g/L, 较原始菌株 (7.67 g/L) 提升 15.4%。高效液相色谱分析显示, 突变株的阿维菌素 B1a 特征峰, 且无新杂峰出现, 表明诱变未改变主要产物类型(图 3)。

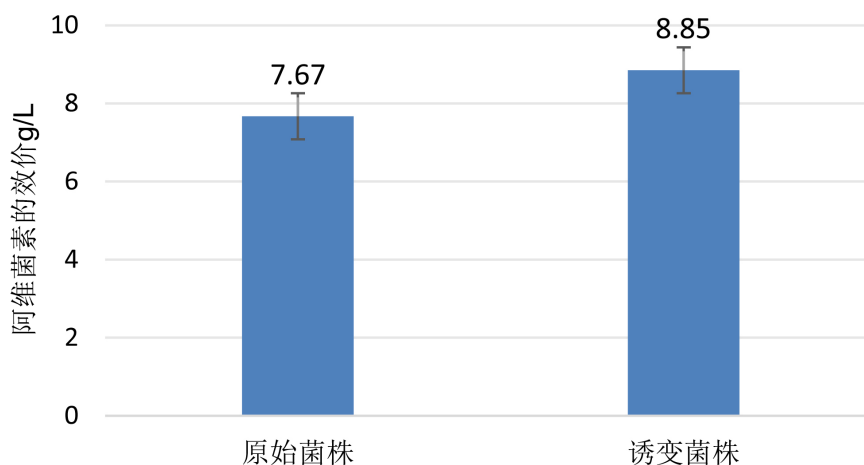


Figure 3. Morphological changes before and after mutation

图 3. 诱变前后的形态变化

4. 讨论

4.1. ARTP 诱变参数优化的实践意义

本研究通过梯度实验系统筛选, 最终确定阿维链霉菌 ARTP 诱变的最佳工艺参数为气流量 10 SLM、

功率 120 W、处理时间 40 s~60 s, 该参数组合下, 高产后代比例显著提升。这一结果不仅与 ARTP 技术在其他放线菌育种中的诱变规律高度契合, 更具备明确的工业化应用价值。栾书慧等在安丝菌素生产菌(同属放线菌)的 ARTP 诱变研究中发现, 40 s~50 s 的处理时间可使菌株正突变率达到峰值, 与本研究确定的时间范围基本一致[7], 进一步印证了该参数区间对放线菌诱变的普适性。

从作用机制来看, 该参数组合产生的活性粒子(如 $\cdot\text{OH}$ 、 O_2^- 、 N_2^+ 等)浓度处于适中水平: 一方面, 活性粒子可穿透阿维链霉菌细胞壁, 对 DNA 分子造成适度损伤, 如单链断裂、碱基修饰等, 为基因突变提供充足诱因; 另一方面, 避免了因活性粒子过量导致的 DNA 不可逆损伤(如双链断裂)或细胞结构破坏, 从而降低菌株致死率。而当处理时间超过 80 s 时, 菌株致死率骤升至 90% 以上, 推测其原因在于长时间等离子体处理产生的累积热效应与过量活性氧(ROS)积累, 导致细胞内蛋白质变性、酶活性丧失, 这与张雪提出的“适度损伤假说”完全相符。此外, 10 SLM 的氦气流量设定可确保活性粒子均匀分布, 避免局部粒子浓度过高或过低, 为诱变效果的稳定性提供保障, 这一参数选择也为后续同类放线菌 ARTP 育种提供了可参考的工艺基准。

4.2. 突变株高产特性的调控机制推测

本研究筛选获得的高产突变株产阿维菌素的效价为 8.85 g/L, 较出发菌株分高 15.4%。突变株展现出效价与生物量同步提升的特性, 推测存在以下调控机制为 ARTP 诱导的 DNA 损伤激活菌株的 SOS 修复系统, 在修复过程中可能发生基因重排, 导致次级代谢调控基因(如 *aveR*、*aveI*)表达增强[9]; 菌丝生长能力显著增强可能与初级代谢途径关键酶(如葡萄糖激酶、柠檬酸合成酶)活性提高相关, 为阿维菌素合成提供更多前体物质(丙二酰-CoA、甲基丙二酰-CoA) [10]; 细胞膜通透性改变可能促进产物分泌, 减少反馈抑制。后续需通过转录组学与代谢组学分析验证这些假设。

本研究未来可引入响应面法(RSM)等统计学工具, 构建三因素三水平的交互实验模型, 通过回归分析找到真正的参数最优点, 进一步提升正突变率与高产菌株比例, 有望实现阿维菌素产量的协同提升, 为工业化菌株改良提供更高效的技术路径。

基金项目

石家庄市重点研发及中小企业创新计划“基于等离子体诱变的阿维链霉菌工业菌株选育”(241490202A)。

参考文献

- [1] 刘耀川, 赵刚, 宁静, 等. 阿维菌素的研究进展[J]. 现代畜牧兽医, 2012(1): 60-62.
- [2] 孙作阳, 黄彬彬, 林瑞娜, 等. 甲基阿维菌素苯甲酸盐微乳剂热贮稳定性研究[J]. 华东昆虫学报, 2008, 17(3): 179-183.
- [3] 陈强, 黄建忠. 工业微生物诱变育种技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(2): 573-586.
- [4] 张雪, 张晓菲, 王立言等. 常压室温等离子体生物诱变育种及其应用研究进展[J]. 化工学报, 2014, 65(7): 2676-2684.
- [5] 莫芳华, 何静, 邢浩然, 等. 常压室温等离子体诱变选育耐盐产香酵母菌株[J]. 中国调味品, 2024, 49(10): 39-42+49.
- [6] 李晓芳, 刘慧燕, 潘琳, 等. 常温常压等离子体诱变选育高产 L-异亮氨酸大肠杆菌[J]. 生物技术通报, 2022, 38(1): 150-156.
- [7] 栾书慧, 成筱钰, 康前进, 等. 基于 ARTP 诱变的安丝菌素 P-3 高产菌株高通量筛选[J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(Z3): 3079-3087.

- [8] 陈金松, 刘梅, 张立新. 从阿维菌素获得诺贝尔奖到中国创造[J]. 微生物学报, 2016, 56(3): 543-558.
- [9] 田靖, 张惟材. 阿维菌素的生物合成及代谢工程研究进展[J]. 生物技术通讯, 2006(3): 447-450.
- [10] 李淑焕, 薄永恒. 阿维菌素生物合成基因结构研究进展[J]. 山东畜牧兽医, 2019, 40(7): 72-74.