

微生物菌株的参数分析

刘 垂 耳

(安徽农学院, 合肥)

作者在本文中给出了菌株产量分布基本参数的微生物学解释, 及诱变剂发散效果与收敛效果的概念; 进而从我国微生物育种实践中归纳出产势 $A = \bar{X} \left(\frac{C_s}{6} \right)^{1/4} \left(1 + \frac{C_s}{8} \right)^{1/2}$ 及变势 $B = \bar{X} (6C_s^{-1})^{1/4} \left(1 + \frac{C_s}{8} \right)^{1/2}$ 这两个经验公式; 并给出了评价生产菌株、诱变剂及生产工艺的统计学方法。

本文用微生物菌株参数分析的方法, 通过对菌株产量分布的参数分析, 从而对菌株、诱变剂、生产工艺等作出评价。

菌株在生产中的表现, 实际上是其变异了的后代的群体的反映。即使“纯”的菌株, 其子代在目标产物 (抗菌素、氨基酸、酶、维生素、有机酸或有机溶剂等) 的产量上仍有差别。子代菌株产量的分布是正态的。

刘颐屏检验了产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*) 某菌株 361 株子代产量的分布 (本文所用育种资料, 均引自第二次微生物遗传与育种学术讨论会, 以下不再注明), 结果可用直方图表示如下 (图 1)。

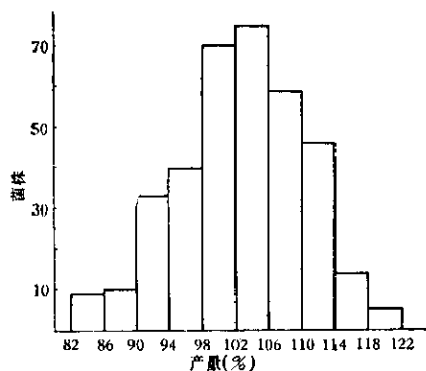


图 1 产黄青霉某菌株的产量分布

这个分布的偏度为 -0.0127 , 偏度的标准

误差为 0.13 ; 峰度为 -0.10 , 峰度的标准误差为 0.26 。由于偏度和峰度的绝对值都远小于它们各自的标准误差, 因而这个分布可以被认为是完美地遵循了正态规律^[1,2]。

一个菌株的子代产量的分布, 就叫做这个菌株的产量分布。

一、基本参数的微生物学解释

在一定的工艺条件下, 菌株目标产物的产量, 受一个或多个基因控制, 这些基因可称为产量基因群。

菌株产量分布的平均数 \bar{X} 即为其产量基因群总体的表现。

变异系数

$$C_v = \frac{s}{\bar{X}}$$

的倒数

$$C_s = \frac{\bar{X}}{s}$$

称为菌株产量分布的稳度, 这里 s 是产量分布的标准差; 并用稳度 C_s 作为菌株产量基因群遗传稳定性的表现。稳度 C_s 的值愈大, 则产量基因群的遗传稳定性愈强。

本文于 1979 年 3 月 10 日收到。

其逆亦真。

偏度 C_s 是分布对称性的表现^[1]，它的微生物学解释是菌株产量基因群的遗传趋势。在负偏的情况下，我们认为菌株产量基因群受到一个“负选择力”，高产变异株受到压抑，低产变异株获得充分表达，分布在左边拖着长尾，因而在“负选择力”的作用下，产量基因群的遗传趋势将是蜕化(图 2)；相对应地，正偏的情况下，分布在右边拖着长尾，“正选择力”的作用使菌株产量基因群获得进化的遗传趋势(这里的“蜕化”“进化”，仅就产量而言)(图 3)。

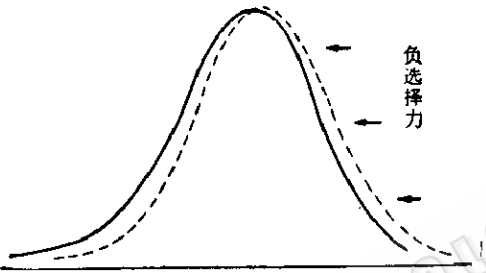


图 2 负的偏离

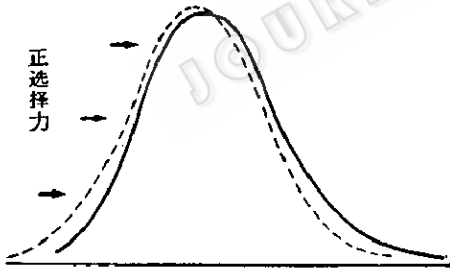


图 3 正的偏离

二、生产菌株的评价

优良的生产菌株应当具有高产、稳产、不易蜕化的特征，因而要求它的产量分布具有较大的平均数 \bar{X} 、稳度 C_r 和偏度 C_s 。参数

$$A = \bar{X} \left(\frac{C_r}{6} \right)^{1/6} \left(1 + \frac{C_s}{8} \right)^{1/2}$$

称为菌株的产势^[2]，并用产势 A 的数值来评价生产菌株，产势愈大，菌株愈优。

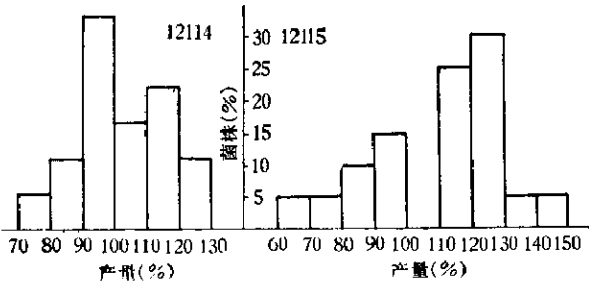


图 4 产黄青霉 12114 及 12115 菌株的产量分布

宋友礼等从产黄青霉远亲重组而得杂种姐妹菌株 12114 和 12115，它们的产量分布直方图如下(图 4)。分别计算它们的参数见表 1 结果。

表 1 12114 及 12115 产量分布的参数

	12114	12115
\bar{X}	102.21	108.91
s	13.75	21.15
C_r	7.43	5.15
C_s	-0.09	-1.91
A	105.26	94.35

从这两个菌株的参数计算结果可见，12115 菌株虽然平均数略高，但产量基因群的遗传稳定性较差，且有相当明显的蜕化趋势，如用之作为生产菌株，则将出现发酵效价波动大，并可能经常出现低产罐批。作为生产菌株的优劣，集中地反映在产势 A 上，12114 菌株的产势值比 12115 菌株高出约 11%，这个差别是显著的。因此，相对而言，用作生产菌株 12114 优于 12115 菌株。

三、诱变剂的评价

通过对菌株经诱变剂处理后所得各株产量的分布进行参数分析，可以对诱变剂的效果作出评价。

出发菌株的特性，对诱变效果的影响很大^[3-6]。由于出发菌株的特征不同，诱变的目的也不同。

有些研究单位认为，选用较“纯”的菌株，可以获得较好的诱变效果，因而常常选

用产量基因群高度稳定的菌株作为出发菌株。用诱变剂处理这类菌株,则望打破其产量基因群的稳定性,并获得尽可能多的正变异株,且正变的幅度愈大愈好。我们把要求诱变剂具备的这类效果,称为发散效果。

在育种过程中,往往得到一些中间菌株,产量虽高,波动亦大,不宜作为生产菌株投产。用诱变剂处理这类菌株,主要目的在于“纯”化,即提高其产量基因群的遗传稳定性,以获得优良的生产菌株。

参数

$$B = \bar{X}(6C_7^{-1})^{1/6} \left(1 + \frac{C_f}{8}\right)^{1/2}$$

称为菌株的变势,并用变势 B 的数值来评价诱变剂的发散效果。经诱变剂处理后产量分布的变势值愈大,则诱变剂对于出发菌株的发散效果愈好。如果出发菌株产量分布的平均数为 \bar{X}_1 , 变势为 B_1 , 诱变处理后产量分布的变势为 B_2 , 并且预期通过诱变处理获得提高产量 $\alpha\%$ 的突变株,那末,在 $(1+\alpha\%) \leq \frac{B_2}{B_1}$ 的前提下,获得预期效果的概率将不小于

$P\{B_2\bar{X}_1/B_1 \leq \xi\}$

$$= \frac{1}{\sigma_2 \sqrt{2\pi}} \int_{B_2\bar{X}_1/B_1}^{+\infty} \exp\left\{-\frac{(x - \mu_2)^2}{2\sigma_2^2}\right\} dx。$$

张筱玉等用快中子对红霉素链霉菌

菌(*Streptomyces erythreus*) 1-36 菌株进行诱变处理。1-36 菌株的产量分布及 1-36 菌株经 15、30、40 千拉德剂量的快中子诱变处理后的产量分布可用直方图表示如图 5。

表 2 1-36 菌株诱变后产量分布的参数

	1-36	15KRad	30KRad	40KRad
\bar{X}	93	103.5	98.5	83.5
s	6.03	24.64	13.19	11.58
C_7^{-1}	0.065	0.238	0.134	0.139
C_f	0.16	-1.17	-0.86	-2.23
B	80.26	101.7	89.63	68.7

从以上参数计算的结果可见,1-36 菌株产量基因群的遗传稳定性很强,稳度 C_f 达 15.42; 15 千拉德剂量的快中子对 1-36 菌株有良好的诱变效果,打破了出发菌株产量基因群的遗传稳定性,平均数也明显提高。虽然出现了明显的负偏,但仍使变势 B 从出发菌株的 80.26 提高到 101.7, 提高了 26.8%, 这是显著的, 这时获得高产突变株的概率不小于 $P_{15KRad}\{117.9 \leq \xi\} = 36.2\%$, 这个概率是相当大的。30 千拉德剂量的快中子对 1-36 菌株也有效,使变势 B 较出发菌株提高 11.7%, 但

$P_{30KRad}\{117.9 \leq \xi\} = 4.2\%$,

获得相应的高产突变株的概率比 15 千拉德剂量下降低了 9 倍;而 40 千拉德剂量的快中子对 1-36 菌株则是无效的。

事实上,张筱玉等正是在 15 千拉德剂量下用快中子诱变红霉素链霉菌 1-36 菌株,从而获得高产突变株 9-203 菌株,初筛时产量比 1-36 菌株提高 26.07%, 复筛时仍提高 16.45%, 全面投产后取得良好效果。

赵静岩等用 NTG (N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍) 诱变卡那霉素链霉菌(*Streptomyces kanamyceticus* N59-75 菌株,在分别以磷酸盐缓冲液和

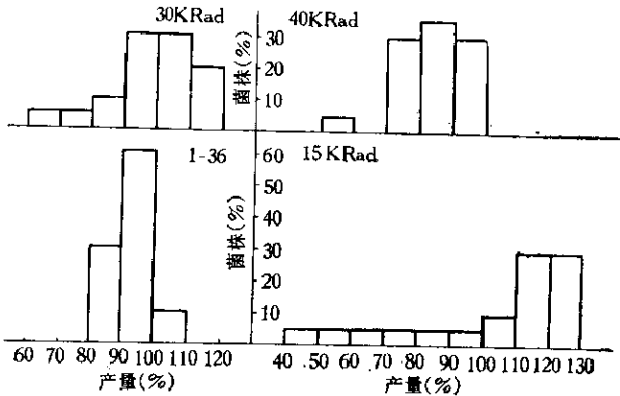


图 5 红霉素链霉菌 1-36 菌株的快中子诱变

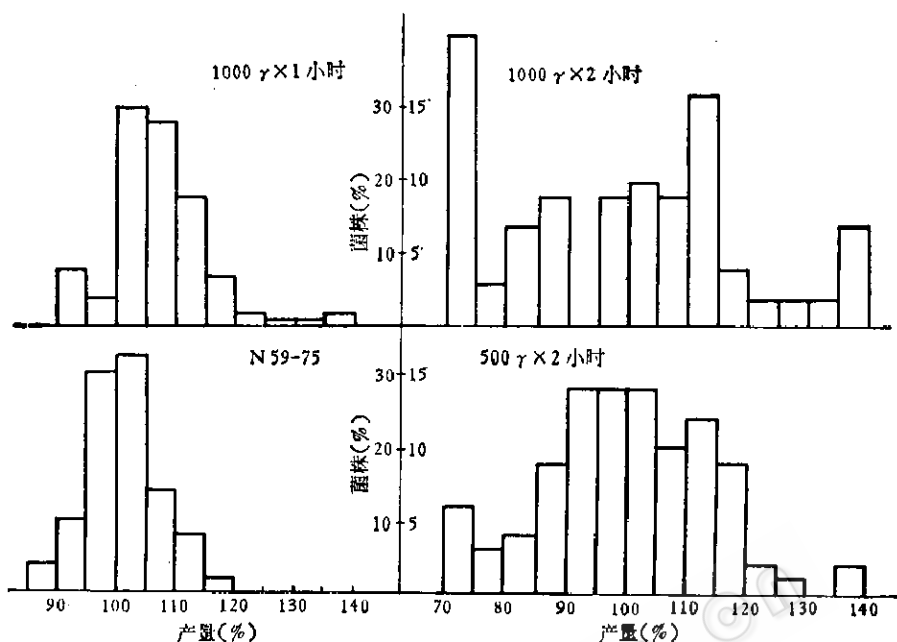


图6 卡那霉素链霉菌 N59-75 菌株的 NTG 诱变(磷酸盐缓冲液)

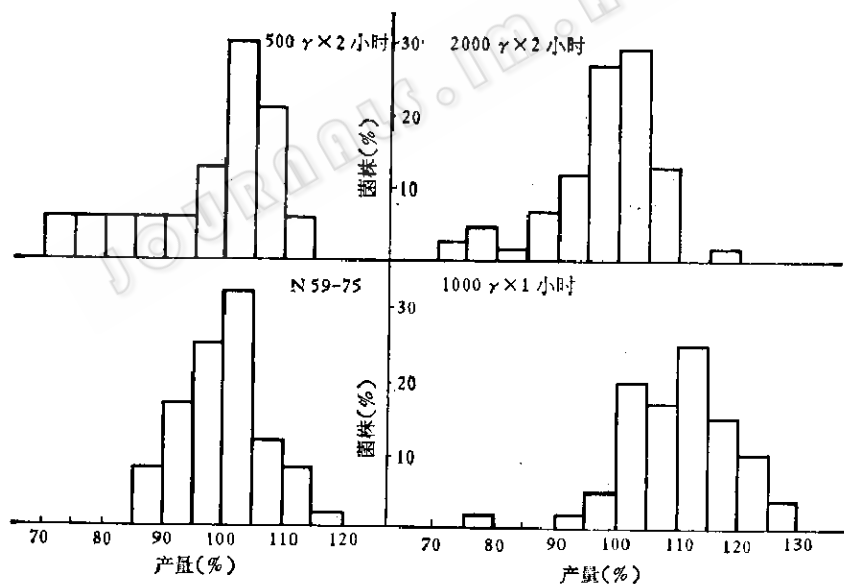


图7 卡那霉素链霉菌 N59-75 菌株的 NTG 诱变 (Tris-maleic 缓冲液)

Tris-maleic 缓冲液作介质的情况下,出发菌株及处理后的产量分布可用直方图表示如图6、图7。分别计算它们的参数,结果见表3、表4。从表中参数计算结果可见,在磷酸盐缓冲液介质中,NTG对N59-75菌株有良好的诱变效果,但在Tris-maleic缓冲液介质中效果不佳。Tris-maleic缓冲

液可以被认为在这里具有相当大的“负选择力”,使得在这种介质中NTG处理N59-75菌株后的三个分布的偏度 C_s 值都较出发菌株显著降低,其中,在1000微克/毫升 $\times 1$ 小时剂量下,尽管分布的平均数 \bar{X} 是所有八个分布中最大的,但它的偏度 C_s 却是最小的,因而它的变势 B 仅较出发

菌株提高约 4%，并不显著。

表 3 磷酸盐缓冲液中 N59-75 菌株诱变后产量分布的参数

磷酸盐缓冲液	N59-75	500 微克/毫升 × 2 小时	1000 微克/毫升 × 1 小时	1000 微克/毫升 × 2 小时
\bar{X}	101.2	100.1	107.5	99.2
s	6.43	14.2	8.5	19.8
C_s^{-1}	0.064	0.142	0.079	0.199
C_s	0.295	0.058	0.61	0.195
B	87.34	97.8	98.58	102.18

表 4 Tris-maleic 缓冲液中 N59-75 菌株产量分布的参数

Tris 缓冲液	N59-75	1000 微克/毫升 × 1 小时	1000 微克/毫升 × 2 小时	2000 微克/毫升 × 2 小时
\bar{X}	100.15	110.15	97.5	97.3
s	6.98	9.28	11.22	9.09
C_s^{-1}	0.0697	0.0842	0.115	0.0934
C_s	0.15	-1.32	-0.93	-0.93
B	87.53	90.98	86.0	90.98

磷酸盐缓冲液介质中，在 500 微克/毫升 × 1 小时、1000 微克/毫升 × 1 小时及 1000 微克/毫升 × 2 小时三种剂量下，诱变后产量分布的变势 B 较出发菌株分别提高了约 12%、13% 和 17%，都是显著的；且

$$P_{1000} \text{ 微克/毫升} \times 1 \text{ 小时} \{114.4 \leq \xi\} = 15\%,$$

$$P_{1000} \text{ 微克/毫升} \times 2 \text{ 小时} \{118.4 \leq \xi\} = 14.3\%,$$

也就是说，在 1000 微克/毫升 × 1 小时剂量下获得高产突变株的概率，以及在 1000 微克/毫升 × 2 小时剂量下获得更高产的突变株的概率，都是比较小的。

事实上，赵静岩等以 N59-75 为出发菌株，在磷酸盐缓冲液介质中，在 1000 微克/毫升 × 1 小时剂量下，获得高产突变株 102 菌株；并在 1000 微克/毫升 × 2 小时剂量下获得高产突变株 41 菌株。102 菌株全面投产后，年度平均效价较 N59-75 菌株提高 26.05%。接着，41 菌株全面投产后，月度平均效价又较 102 菌株提高 14%。他们还试图在 Tris-maleic 缓冲液介质内用 1000 微克/毫升 × 1 小时剂量 NTG 诱变 N59-75 菌株而获得高产突变株，但未能得到。这里，提供了又一个参数分析与选种实践高度吻合的实例。

评价诱变剂的收敛效果，可以引用产势 A 的概念与公式。

宋友礼等所得到的产黄青霉杂种 12116 菌株产量基因群的遗传性状不够理想。他们用紫外线对 12116 菌株进行了诱变处理。出发菌株及紫外线处理后的产量分布，可用直方图表示如下(图 8)。分别计算

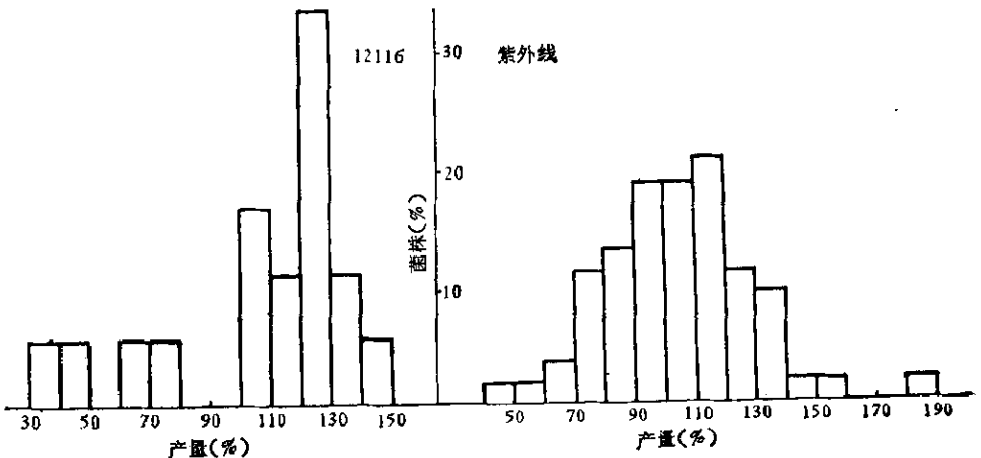


图 8 产黄青霉 12116 菌株的紫外线诱变

它们的参数,结果见表 5。

表 5 12116 菌株诱变后产量分布的参数

	12116	紫 外 线
\bar{X}	106.2	105
s	32.4	26.5
C_i	3.28	3.96
C_i	-1.16	0.586
A	88.75	101.55

从以上参数计算的结果可见,出发菌株经紫外线诱变后,平均数 \bar{X} 无显著变化,稳度 C_i 有所上升,偏度 C_i 有大幅度增加,产势 A 提高了约 14.5%。可以认为,紫外线在这里有较强的“正选择力”,对 12116 菌株有良好的诱变效果。

事实上,宋友礼等用紫外线处理 12116 菌株,获得了高产突变株 602 菌株和 604 菌株,产量有很大提高。

四、生产工艺的评价

在恰当的工艺条件下,只要样本充分大,微生物菌株目标产物的产量分布将遵循正态规律。但这种工艺条件,不一定符合生产的需要。在实际生产工艺下,分布可能偏离正态,这种偏离是实际生产工艺施加于菌株产量基因群的“选择力”所导致的。

我们将

$$S_{C_i} = \sqrt{\frac{6n(n-1)}{(n-2)(n+1)(n+3)}}$$

(n 是样本中的样品数) 称为偏度 C_i 的标准误差,并把参数

$$C_i = -C_i/S_{C_i}$$

称为产量分布的可进度。当 $C_i > 1.96$ 时,菌株负偏显著,说明在这种生产工艺下,低产变异株充分表达,高产变异株大有潜力,因而改进工艺以提高效价的可能性是大的;当 $C_i > 2.576$ 时,这种可能性是很大的。相反,当 $C_i < -1.96$ 时,这种可能性难以出现;当 $C_i < -2.576$ 时,这种可

能性将很难出现。

在车间成批生产条件下,可以通过充分多的罐批效价来评价生产工艺。在排除明显异常罐批后,正常罐批效价分布的可进度 G_i 值,即为是否需要改进生产工艺的重要指征。

五、两点建议

实施微生物参数分析时,建议重视以下两点:

1. 加大样本

微生物菌株的参数分析,是一种统计学方法,样本要充分大,结论才可靠。常看到一些研究菌株产量分布的实例,每个样本只包含二、三十个样品,应当指出,这是不够的。本文开头引用的那个例子,样本包含着 361 个样品,由于样本较大,结果就比较理想。加大样本,工作量要相应地增加,因而,采用先进技术,提高育种工作的机械化自动化水平,是必要的。

2. 提高随机性

目前育种条件下,样本随机性的干扰因子很多。采用标准培养基,保证各样品工艺条件基本一致等等,都有助于提高样本的随机性。

实践证明,经验指导下育种,获得优良菌株的概率大于随机选种^[3]。但随机选种仍有必要。建议在总工作量 R 中,随机性工作量 P 应不小于经验性工作量 Q , 这里, $R = P + Q$, 且 $P \geq \frac{1}{2} R$ 。菌株的参数分

析,应当在随机性的基础上进行,但比较随机性与经验性的两个产量分布,可以对“经验”的正确与否及优缺点所在给出恰当的评价。

注: 产势 $A = \bar{X} \left(\frac{C_i}{6} \right)^{1/3} \left(1 + \frac{C_i}{8} \right)^{1/3}$ 是本文作者得出的一个经验公式。考虑到 A 应当与 \bar{X} 、 C_i 、 C_i 成正变,且 C_i 恒等正值, C_i 可正可负,故可假设

$$A = \bar{X} \left(\frac{C_t}{a} \right)^\alpha \left(1 + \frac{C_s}{b} \right)^\beta,$$

这里, a 、 b 是待定的系数, α 、 β 是待定的指数。

因为 $P\{\bar{X} - 3s \leq \xi \leq \bar{X} + 3s\} \approx 99\%$, 故一般情况下 C_t 应不小于 3, 取 3 乘以 2 即为式中 C_t 的分母

$$a = 6.$$

因为 $P\{\bar{X} - 2s \leq \xi \leq \bar{X} + 2s\} \approx 95\%$, 故可“制造”这样一个菌株, 其 95% 子代产量恰为 x_1 , 而另外 5% 子代产量恰为 $x_1 < \bar{X} - 2s$, 此菌株产量分布的偏度 $C_s = -4.2$, 取其绝对值的近似整数值 4 乘以 2, 即为式中 C_s 的分母 $b = 8$ 。

再用二元回归的方法, 以

$$A = \bar{X} \left(\frac{C_t}{6} \right)^\alpha \left(1 + \frac{C_s}{8} \right)^\beta$$

去考察一系列选种实例, 并考虑到计算上的方便, 就有

$$\alpha = \frac{1}{6}, \quad \beta = \frac{1}{2}.$$

参考文献

- [1] 杨纪珂:《数理统计在医学科学中的应用》, 上海科学技术出版社, 上海, 1964 年。
- [2] 复旦大学数学系:《概率论与数理统计》, 上海, 1961 年。
- [3] 盛祖嘉: 微生物遗传育种国外动态介绍,《微生物育种学术讨论会文集(国外资料评述)》, 科学出版社, 北京, 1974 年。
- [4]《微生物诱变育种》编写组:《微生物诱变育种》, 科学出版社, 北京, 1973 年。
- [5] 微生物育种学术讨论会编:《微生物育种学术讨论会文集(研究报告)》, 科学出版社, 北京, 1975 年。
- [6] 复旦大学生物系:《微生物的选种和育种》, 上海人民出版社, 上海, 1972 年。

THE PARAMETRIC ANALYSIS ON MICROBIAL STRAINS

Liu Chui-yu

(Anhui Agricultural College, Hefei)

The microbiological explanation of the basic parameters for the productive distribution of strains, and the conceptions of the divergent effects and the convergent effects of the mutagens are given in this paper. The following empirical equations:

$$A = \bar{X}(Ct/6)^{1/6}(1 + Cs/8)^{1/2} \text{ (called}$$

productive capacity) and $B = \bar{X}(6Ct^{-1})^{1/6}(1 + Cs/8)^{1/2}$ (called variate capacity) were obtained from the microbial breeding practice in China. Then the statistical method to estimate the productive strains, the mutagens and technology of production are given in this paper.

更正

《微生物学报》第 20 卷第 1 期“争光霉素的研究 II. 争光霉素的分离、纯化、理化性质及鉴定”一文, 作者是在中国医学科学院药物研究所抗菌素室时做的此项研究工作。现作者单位改为中国医学科学院抗菌素研究所。