

磷细菌突变株的诱变选育

李 华 陈万仁

(郑州大学化工学院 郑州 450002)

陈 欣

(南阳师范学院 南阳 473000)

摘 要 以有机 P(ACCC1008)为出发菌株,经紫外线、硫酸二甲酯单独处理和复合处理,获得一株 P 细菌高产菌株 D017P,该菌株具有稳定的遗传性能,其解 P 能力达到 95.45mg/ml P_2O_5 ,是原始出发菌株的 3.2 倍。同时通过酸碱和温度处理,获得了一株抗性变异株,其解 P 能力达 34.43mg/ml P_2O_5 ,较出发菌株提高 53.17%。

关键词 有机 P; 突变株; 诱变育种; 抗性变异株

化学肥料长期不合理的施用会造成土壤板结、土壤自然肥力下降,而生物肥料无公害,并能改善生态环境,对农业生产和环境保护都具有十分重要的意义。自前苏联研究人员蒙金娜 1935 年从土壤中分离出解 P 巨大芽孢杆菌 (*B. megatherium phosphaticum*)以来^[1],国内外相继开始了对解 P 细菌的研究。P 细菌肥料能将土壤中作物难于利用的 P 化物转化为可吸收的形态,可提高土壤肥力和改善作物 P 素营养。P 细菌肥料在我国农业生产中发挥了一定的积极作用。但是,由于现行的 P 细菌菌株解 P 能力低,对外界环境的抵抗力差,不适合农业生产的需要。为了选育优良的菌株,郑州大学工学院 P 肥与复肥研究所经过几年的努力,在出发菌株—巨大芽孢杆菌 ACCC1008(*Bacillus megatherium* de Bary)基础上,经过物理(UV)及化学(DMS)复合诱变,筛选出一株高产 P 细菌突变株 D017P 及抗高温、耐酸碱菌株 pHt 04P,并获得了纯培养物。现将诱变方法报告如下。

1 材料和方法

1.1 出发菌株

有机 P 细菌 ACCC1008 (巨大芽孢杆菌, *Bacillus megatherium* de Bary), 中国农科院菌保中心提供。

1.2 培养基

斜面培养基:马铃薯汁 1000ml,葡萄糖 20g,琼脂 20g, pH7.0~7.2;有机 P 合成琼脂培养基(%):(NH₄)SO₄ 0.05, MgSO₄ 0.03, NaCl 0.03, KCl 0.03, CaCO₃ 0.5, 葡萄糖 1, MnSO₄ (1%)微量, FeSO₄ (1%)微量, 卵磷脂 0.02, 琼脂 2.0, 水 100ml。

1.3 诱变剂

紫外线(UV)照射, 15W, 照距 30cm; 硫酸二甲酯 DMS (上海试剂总厂产品); 复合诱变剂: UV+DMS。

1.4 培养条件

斜面菌种与平板菌落培养: 37℃, 培养 24h; 摇瓶培养: 37℃, 往复式摇床(120 r/min), 振荡培养 24h。

1.5 诱变方法

斜面菌种 孢子悬液 计数并调整孢子浓度 诱变剂处理 倒平板 挑取有典型特征

的菌落→摇瓶初筛→复筛→传代试验。

1. 孢子悬液制备 将斜面活化培养 20~24h 的出发菌株,用无菌生理盐水洗下,接种至盛有玻璃珠的三角瓶中,于 30℃ 恒温振荡 30min 后,血球计数板计数并调整孢子浓度为 10^6 个/ml。

2. 紫外线诱变处理 在直径 9cm 的培养皿底座中,注入 10ml 菌悬液(用无菌操作法)置距灯光 30cm 处,打开培养皿上盖,进行不同时间的照射。处理后的操作均在红光下进行。所用的光源是长管型紫外灯,光距 30cm,功率 15W,温度 10℃ 左右。

3. 硫酸二甲酯诱变处理 将 DMS 先溶于助溶剂无水乙醇中,将菌悬液倾入盛有 15ml 0.1mol/L 磷酸缓冲液(pH7.0)的无菌三角瓶中,并加入 0.2ml DMS(1%V/V)使它们充分混合,于 30℃ 往复式摇床上恒温振荡不同时间后取出,放入 0.2ml 25% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 液中解毒,然后分离筛选。

4. 紫外线、硫酸二甲酯复合处理 先用 1%(V/V)的 DMS 0.2ml 振荡处理 20min、60min、90min、120min 后移出 2ml 菌液入 0.2ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (25%)+50ml 磷酸缓冲液中,中止化学诱变作用。

移取 8~10ml 于培养皿底盖中在 U·V 下 30cm 处照射 30 秒、7min、10min 后,倒平板,分离,以上操作均在红光下进行。

1.6 选育方法

每轮诱变均选择性地挑取菌落接入斜面,然后进行摇瓶初筛和复筛,选出解 P 能力高者进行下一轮诱变。

1.7 解 P 能力测定方法

采用钼锑抗比色法测定 P 含量^[2],测定仪器:59Wc 型分光光度计。

1.8 抗性变异株的筛选

1. 酸碱处理 将经过 UV 筛选后的菌株经斜面活化后,在无菌操作条件下,分别接入液体培养基中,于 30~37℃ 振荡培养 24h,取样,进行平板活计数,以后每隔 2h,分别调 pH 为 7,5,4,9,10 重复上述操作。

2. 温度处理 将经过酸碱(pH)处理后的菌株,继续置恒温水浴恒温培养至 38℃、42℃、46℃、50℃ 各处理 1h 后,取样,选择适当的稀释度进行平板活计数,30~37℃ 恒温培养 24h,挑出有特性的单个菌落,并反复纯化^[3,4,5]。

3. 抗性变异株解 P 能力测定 采用钼锑抗比色法测定有效 P 含量。

2 结果与分析

2.1 诱变谱系

原始出发菌株 ACCC1008 $\xrightarrow{\text{紫外线}}$ A001 $\xrightarrow{\text{DMS}}$ C003 $\xrightarrow{\text{紫外线}}$ D017P
 $\xrightarrow{\text{硫酸二甲酯}}$ C010

2.2 出发菌株对紫外线照射的敏感程度

将出发菌株置于紫外光下进行不同时间的照射,照射剂量及致死率情况见表 1。

2.3 各轮诱变解 P 能力比较

在同一摇瓶发酵条件下,将出发菌株与每轮诱变所得高产菌株进行比较,结果如表 2。

2.4 抗性变异株解磷能力测定

将经过酸碱和温度处理过的各抗性变异株进行解 P 能力的测定, 结果见表 3。

经酸碱、温度处理后的抗性变异株, 其解 P 能力有的出现了退化现象, 有的是正突变。其中 pHt05P 经过 pH=4~10 和 t=50 高温处理后, 既能承受酸碱、高温的不良环境, 而且解 P 能力较出发菌株略有提高; pHt04P 菌株能耐受 pH=4~10 和 t=50 的不良环境, 且解 P 能力较出发菌株提高 53.17%。

表 1 出发菌株对紫外线照射的敏感程度

照射时间 (分)	菌落数			平均 菌落数	致死率 (%)
	I	II	III		
0	303	305	350	319	--
0.5	64	60	58	61	80.88
1	3	2	4	3	99.06
3	0	1	3	1.3	99.59
5	3	2	2	2.3	99.28
7	2	2	1	1.7	99.46
15	1	1	2	1.3	99.59
30	0	0	0	0	100

表 2 选育过程各代菌株解磷能力比较

菌株	有效 P 光密度 (OD)	有效 P ₂ O ₅ 含量 (mg/ml)	增加量 (%)
出发菌株	0.037	22.48	--
C003	0.0915	50.10	122.86
C010	0.0795	44.02	95.82
D017P	0.181	95.45	324.6

2.4 抗性变异株解磷能力测定

将经过酸碱和温度处理过的各抗性变异株进行解磷能力的测定, 结果见表 3。

表 3 抗性变异株解 P 能力测定

编号	处理条件	有效 P 光密度				平均有效 P 光密度	有效 P ₂ O ₅ 含量 (mg/ml)	增加量 (%)
		I	II	III	IV			
出发菌株						0.128	22.48	--
pHt01P	ph=4~10, t ≤ 38	0.158	0.154	0.135	0.134	0.145	25.52	13.53
pHt02P	ph=4~10, t ≤ 42	0.114	0.112	0.110	0.103	0.110	11.12	--
pHt03P	ph=4~10, t ≤ 46	0.120	0.120	0.118	0.118	0.119	14.03	--
pHt04P	ph=4~10, t ≤ 50	0.210	0.206	0.202	0.178	0.199	34.43	53.17
pHt05P	ph=4~10, t ≤ 50	0.135	0.133	0.130	0.138	0.134	23.59	4.94
pHt06P	ph=4~10, t ≤ 46	0.089	0.087	0.085	0.078	0.085	8.68	--
pHt07P	ph=4~10,	0.095	0.085	0.080	0.079	0.085	8.68	--

2.5 D017P、pHt04P 菌株的遗传稳定性试验

将 D017P、pHt04P 进行连续 30 次的传代试验, 将 30 次的斜面同时活化进行发酵试验, 结果如表 4。

表 4 D017P、pHt04P 传代试验

代数	P ₂	P ₄	P ₁₀	P ₂₀	P ₃₀
D017P 有效 P ₂ O ₅ 含量 (mg/ml)	95.45	96.86	92.45	90.88	91.23
pHt04P 有效 P ₂ O ₅ 含量 (mg/ml)	34.43	33.83	35.14	31.56	33.52

2.6 D017P 最适发酵条件的确定

应用碳源、氮源、碳氮化、金属离子等成分对 D017P 解 P 能力的影响试验, 初步确定其优化培养基为(%) : 麦麸汁 15, 蔗糖 2, CaCO₃ 0.5, MgSO₄ 0.03, FeSO₄ 0.003。在此培养基上, D017P 解 P 能力可以稳定在 90.88~95.45mg/ml, 达到出发菌株的 3.2 倍。

2.7 紫外线与硫酸二甲酯诱变效果比较

在选定的诱变剂量作用下, 紫外线和硫酸二甲酯的诱变效果是有差异的。

由表 5 可知, 在选定的剂量下, 紫外线是高致死率、低正向突变率的诱变剂, 而 DMS 则是低致死率, 高正向突变率的诱变剂, 有较强诱变效果。

表 5 紫外线与 DMS 的诱变效果比较

诱变剂	致死率 (%)	正变率 (%)	负变率 (%)
紫外线	85	7.6	70
硫酸二甲酯	40	60	20

2.8 D017P、pHt04P 菌株的田间试验

为考察突变株的增产效果, 我们委托河南省农科院土壤肥料研究所在玉米作物上进行了田间实验。试验设在河南省农科院试验地, 土壤肥力中等。

供试品种: 玉米种子郑单 8 号, 重复 3 次, 随机排列, 小区面积 15.6 m², 田间管理同一般丰产田。田间实验结果表明: 诱变后的生物肥料与对照 CK(出发菌株)相比, 皆有增产效果。其中, 诱变后的 D017P 较对照增产 8.3%, 增产效果较为明显, pHt04P 次之, 增产幅度为 3.4%。

施用生物肥后, 对玉米植株生育性状和产量也有良好的影响, 苗期叶色浓绿, 抗倒伏, 根系发达, 次生根多。

3 结 论

1. 经过物理和化学复合诱变后得到的 P 细菌突变株 D017P, 其解 P 能力达 95.45mg/ml P₂O₅, 较出发菌株提高 324.6%。同时通过酸碱和温度处理, 获得的抗性变异株 pHt04P, 其解 P 能力达 34.43mg/ml P₂O₅, 较出发菌株提高 53.17%。

2. D017P 菌株是经过多次单一及复合的诱变处理, 每次的诱变效果逐步积累。

3. 从整体诱变过程来看, 复合诱变效果最好, 物理诱变次之, 复合诱变对 P 细菌的处理是一条有目的培养高产菌株的有效途径。

4. 经酸碱(pH=4~10)、温度(t=50)处理后的抗性变异株 pHt04P, 虽然其解 P 能力不及紫外线诱变, 但是, 它优于出发菌株。同时, 由于此菌株能耐受酸碱(pH=4~10), 高温(t=50)的不良环境, 因此, 该菌株在推广应用方面有更广阔的前景。

5. 突变株 D017P、pHt04P 经过多次传代实验, 解 P 能力分别稳定在 90.88~95.45mg/ml, 31.56~35.14mg/ml 之间, 具有稳定的遗传性能。

6. 在筛选过程中, 我们初步体会到, 通过单因子诱变处理, 获得优良菌株的可能性较少, 若采用几种诱变剂交替处理 P 细菌, 逐步积累, 可获得理想的 P 细菌变异菌株。

参 考 文 献

- 1 陈华癸. 微生物学. 北京: 农业出版社, 1962, 223
- 2 劳家桢. 土壤农化分析手册. 北京: 农业出版社, 1988, 273~275
- 3 许光辉等. 土壤微生物分析方法手册. 北京: 农业出版社, 1980, 242
- 4 李华, 王光龙等. 磷细菌突变株生理特性的研究. 高校化学工程学报, 1999, 13(3): 240~244
- 5 李华, 陈万仁. 胶质芽孢杆菌及其突变株生理特性的初步研究. 土壤肥料, 2001, 38(2): 28~32