

新型胶冻样芽孢杆菌及其突变株的诱变选育

李 华 陈万仁 王光龙

【郑州大学工学院 郑州 450002】

摘 要 以胶冻样芽孢杆菌菌株 (ACCC10012) 为出发菌株, 经紫外线诱变处理, 获得两株胶冻样芽孢杆菌高产菌株 UV09K, UV16K, 其解 K 能力较出发菌株分别提高 1282.35%, 1909.80%。同时通过酸碱和温度处理, 获得了一株抗性变异株 PHt10K, 该菌株能承受 pH=4~10, t 50 的不良环境, 而且解 P 解 K 能力较出发菌株提高 35.97%, 23.53%。

关键词 胶冻样芽孢杆菌; 菌种筛选; 诱变处理

中图分类号 S154.3

目前, 我国农业土壤中缺 K 问题越来越明显, 一方面, 我国 K 素化肥生产能力严重不足, 每年需要进口; 另一方面, 我国耕作层的土壤中含有大量 K, 但这些 K 绝大部分存在于铝硅酸盐中, 不能被植物吸收利用, 土壤中天然存在的胶冻样芽孢杆菌能够分解硅酸盐类, 并为植物所利用。该类细菌在我国的生物肥中已有应用, 但是现行的硅酸盐细菌矿化能力不理想, 对外界环境的抵抗能力差, 针对上述情况, 我们近几年一直开展高效胶冻样芽孢杆菌菌株的研究, 筛选优良的胶冻样芽孢杆菌菌株, 以更好地利用 K 矿资源和土壤中的难溶性 K 盐, 同时使之对外界环境有更大的适应性, 更好地满足农业生产的需要。

1 材料和方法

1.1 出发菌株

胶冻样芽孢杆菌 ACCC10012 (Bacillus mucilaginosus Krassilnikov): 由中国农科院菌保中心提供。

1.2 培养基及培养条件

1.2.1 培养基 斜面培养基: 见文献[1]。营养缺素培养基: 见文献[2]。

1.2.2 培养条件 斜面及平板培养: 28~30℃, 2~3 天。摇瓶培养: 28~30℃, 往复式床 (120 转/分), 振荡培养 2~3 天。

1.3 紫外线(UV)诱变及突变株的筛选。

1.3.1 诱变剂 紫外线 (UV) 照射 (功率: 15 瓦, 照距 30cm)

1.3.2 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

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

1.3.4 解 P 能力测定方法 采用钼锑抗比色法测定 P^[3,4], 测定仪器 59WC 微机型可见分光光度计。

1.3.5 解 K 能力的测定

采用文献^[1, 2]所报道的营养缺素筛选法, 将 UV 处理后的突变株接入液体营养缺素培养基中, 恒温培养 10 天后, 将所培养的各待筛选菌株进行以 1.1 kg/cm² 高压蒸汽杀菌, 静置 2~3 天后, 待死亡的胶冻样芽孢杆菌菌体中的 K 游入液体中, 进行消化处理, 用原子吸收分光光度计进行有效 K 含量的测定。

1.4 抗性变异株的筛选

1.4.1 酸碱处理 将经过 UV 筛选后的突变株经斜面活化后, 在无菌操作条件下, 分别接入液体培养基中, 28~30℃ 震荡培养 48h, 取样, 进行平板活计数, 以后每隔 2h, 分别调 pH 为 4, 8, 10 重复上述操作。

1.4.2 温度处理 将经过酸碱(pH)处理后的菌株, 继续置恒温水浴中恒温至 45℃、50℃, 各处理 1h 后, 取样, 选择适当稀释度进行平板活计数, 28~30℃ 培养 2 天。挑出单个菌落, 并反复纯化^[5~8]。

1.4.3 抗性变异株吸收利用 K 长石、P 矿石能力测定 同前述方法。

2 结果及讨论

2.1 出发菌株对 UV 照射的敏感程度

UV 处理时, 胶冻样芽孢杆菌的致死曲线如图

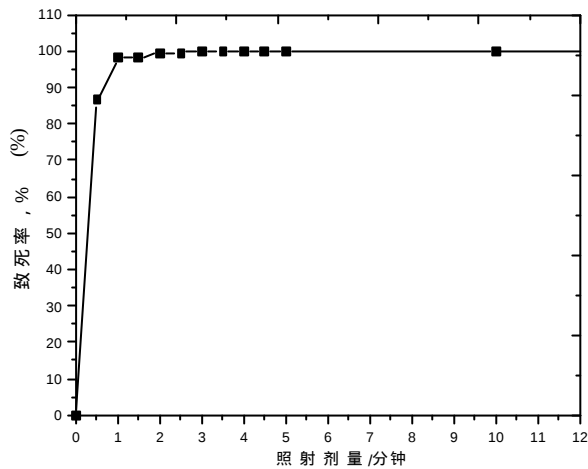


图 1 胶冻样芽孢杆菌致死曲线

Fig. 1 ACCC10012 lethal curve

所示。

2.2 不同处理剂量的诱变效应

出发菌株经 UV 不同剂量进行诱变处理后, 不同突变菌株吸收利用 K 长石、P 矿石能力测定如表 1 所示。

由表 1 中数据可以看出, 出发菌株经 UV 处理后, 突变株 11、17、19 的解 P 能力低于出发菌株, 其余突变菌株的解 P 解 K 能力均高于出发菌株。其中突变株 UV09K、UV16K 吸收利用 K 长石的能力较出发菌株提高 1282.35%、1909.80%, 吸收利用 P 矿石的能力较出发菌株提高 25.14%、24.25%。

2.3 抗性变异株解磷解钾能力测定

将抗性变异株 (经酸碱、温度处理后) 接入灭过菌的缺素液体培养基中, 培养 6 天后, 进行有效 P、有效 K 含量测定。

表 1 紫外线不同剂量下处理的诱变效果

Table 1 Mutation effect under different dose of ultraviolet

突变株编号	处理时间 (分钟)	平均吸光值 [*]	速效 K(K ₂ O) (mg/ml)	提高(%)	平均吸光度值 [*]	有效 P(P ₂ O ₅) (mg/ml)	提高(%)
UV08K	0.5	0.124	4.62	805.88	--	--	--
UV09K	1.0	0.182	7.05	1282.35	0.132	235.41	25.14
UV10K	1.5	0.153	5.84	1045.10	0.116	208.38	10.78
UV11K	2	0.147	5.59	996.08	0.094	171.22	-8.98
UV12K	2.5	0.127	4.75	831.37	0.111	199.93	6.28
UV13K	3	0.113	4.16	715.69	0.139	247.23	31.43
UV14K	3.5	0.080	2.77	443.14	0.110	198.24	5.39
UV15K	4	0.150	5.71	1019.61	--	--	--
UV16K	4.5	0.258	10.25	1909.80	0.131	233.72	24.25
UV17K	5	0.089	3.15	517.65	0.095	172.91	-8.08
UV18K	10	0.061	1.98	288.24	0.131	233.72	24.25
UV19K	30	0.061	1.98	288.24	0.102	184.73	-1.80
对照	0	0.026	0.51	--	0.104	188.11	--

* 3 个平行样的均值

表 2 抗性变异株解 P 解 K 能力测定

Table 2 Determination of the phosphate-decomposing capacity of the mutation-resistant mutant

菌株	编号	处理条件	有效 P ₂ O ₅ (mg/ml)	提高(%)	速效 K ₂ O (mg/ml)	提高(%)
UV16K	PHt02K	PH=4~8	25.96	--	2.69	--
	PHt03K	PH=4~10	47.91	--	3.61	1.12
	PHt04K	t 45 *	58.05	3.00	2.61	--
	PHt05K	t 50 *	69.87	23.97	4.07	14.01
UV09K	PHt06K	PH=4~7	25.96	--	3.19	--
	PHt07K	PH=4~8	37.78	--	3.86	8.12
	PHt08K	PH=4~10	66.49	17.97	2.27	--
	PHt09K	t 45 *	41.16	--	2.86	--
	PHt10K	t 50 *	76.63	35.97	4.41	23.53
对, 888			56.36	--	3.57	--

*经温度处理前, 已进行了酸碱(pH=4~10)处理。

由表 2 可知, 经过酸碱、温度处理后的抗性变异株解 P、解 K (吸收利用磷矿石、钾长石) 能力有的出现了退化现象, 吸收利用磷矿石、钾长石的能力不及紫外线照射, 但 PHt10K 菌株经酸碱 (pH=4~10)、温度 (50) 处理后, 对外界环境的抵抗力明显增强, 既能承受 pH=4~10, t 50 的不良环境, 而且解 P 解 K 能力较出发菌株提高 35.97%, 23.53%。

2.4 突变株的遗传稳定性试验

将胶冻样芽孢杆菌突变株 UV09K、PHt10K 连续转接 10 次斜面, 将 10 次的斜面同时活化进行发酵实验, 结果如表 3。

表 3 胶冻样芽孢杆菌突变株的传代试验 (单位: mg/ml)

Table 3 Multiplying test of ACCC10012 mutant

代数	P ₂	P ₄	P ₆	P ₈	P ₁₀
UV09K(有效 P ₂ O ₅)	234.34	261.36	237.71	271.52	230.01
UV09K(有效 K ₂ O)	7.32	6.57	6.06	7.02	5.72
PHt10K(有效 P ₂ O ₅)	78.11	75.86	79.24	78.11	87.12
PHt10K(有效 K ₂ O)	4.80	4.05	4.18	3.66	4.41

表 3 表明, 上述各突变株经多次传代, 解 P 能力 UV09K 稳定在 230.01~271.52mg/ml 之间, PHt10K 稳定在 75.86~87.12mg/ml 之间。解 K 能力 UV09K 稳定在 5.72~7.32mg/ml 之间, PHt10K 稳定在 3.66~4.80mg/ml 之间, 均具有稳定的遗传性能。

3 结 论

1. 胶冻样芽孢杆菌经过 UV 诱变处理, 可以得到一些较出发菌株的解 P 解 K 能力有不同程度提高的突变株。其中筛选出的最高两株正变株, 其

解 K 能力分别为 7.25 mg/ml(K₂O) 和 10.25mg/ml(K₂O), 较出发菌株提高 1282.35%、1909.80%。

2. 由死亡曲线可知, 上述两种诱变剂量所对应的致死率为 98.1%、99.40%, 文献[2]最高正变株对应的致死率为 90%。通过实验发现, 菌株致死率与突变株的解 P 解 K 能力并不成线性关系。因此, 正变株的选育必须通过实验来进行。

3. 筛选出的胶冻样芽孢杆菌突变株经过多次传代试验, 解 P 解 K 能力比较稳定, 具有稳定的遗传性能。

4. 经酸碱 (pH=4~10)、温度 (50) 处理后的抗性变异株, 虽然其解 P 解 K 能力不及 UV 诱变, 但是, 它优于出发菌株, 其解 P 解 K 能力较出发菌株提高 35.97%、23.53%, 同时由于此菌株能耐酸碱 (pH=4~10)、高温 (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。

参考文献

- 1 陈华癸. 微生物学实验. 北京: 农业出版社, 1962, 130~137
- 2 尹莘耘. 钾细菌肥. 北京: 农业出版社, 1960, 40~44
- 3 许光辉, 郑洪元. 土壤微生物分析方法手册. 北京: 农业出版社, 1986, 242
- 4 劳家桢. 土壤农化分析手册. 北京: 农业出版社, 1988, 273~275
- 5 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
- 6 李华, 陈万仁等. 固氮菌及其突变株生理特性的研究. 土壤肥料, 2000, 37 (4): 37~41
- 7 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): 28~33

NEW STRAIN OF ACCC10012 AND ITS MUTAGENIC SCREENING

Li Hua Chen Wanren Wang Guanglong

(Chemical Engineering College, Zhengzhou University, Zhengzhou 450002)

Abstract Two highly productive phosphorus strains, UV09K and UV16K, whose capability of decomposing phosphate rocks increases by 1282.35% and 1909.80% respectively compared with that of the parent strain, were obtained by exposing the parent strain ACCC10012 to ultraviolet. When the two strains were treated with acid, alkali and temperature, a mutation-resistant strain PHt10K was obtained. The new strain can survive under the condition of pH = 4~10 and t ≤ 50℃ and its phosphate-decomposing capacity was 35.98% and 23.53% respectively higher than its parent strains.

Key words ACCC10012, Screening, Mutagenic treatment