DOI:10.15933/j.cnki.1004-3268.2007.12.002
河南农业科学

农用抗生素产生菌 TS67 诱变育种研究

王淑媛,王素英*,涂敏勤,马永金
(天津商学院 生物技术与食品科学学院,天津市食品生物技术重点实验室,天津 300134)

摘要:以海洋真菌(*Penicillum* sp)TS67 为出发菌株,分别采用紫外线、微波、亚硝酸、硫酸二乙酯对其孢子悬液进行诱变处理,经紫外诱变获得一株高产菌株 Z10,通过微波诱变获得一株高产菌株 W8。抑菌试验表明,二者的抑菌活性比原始菌株分别提高了 41.9%和 45.6%。经传代试验,Z10 和 W8 连续传代 10 次,遗传性状稳定性较好。

关键词:海洋真菌;农用抗生素;紫外线;微波;亚硝酸;硫酸二乙酯;抑菌活性
中图分类号:S476+8　　文献标识码:A　　文章编号:1004-3268(2007)12-0057-04

海洋真菌(*Penicillum* sp.)TS67 菌株是从渤海近海海域水样中分离获得的一株对玉蜀黍平脐蠕孢菌、大豆镰刀菌等多种植物病原真菌具有较高拮抗活性的生防菌,经初步鉴定为青霉属真菌,菌落深青色。对菌株 TS67 生理生化初步研究表明,该菌有可能是一种新型农用抗生素的产生菌,但同其他农用抗生素产生菌一样,其发酵产物中生物活性物质的含量很低,从而限制了对它的进一步研究和利用。为了提高其生物活性,本研究拟对 TS67 菌株进行不同的诱变处理以提高此菌株的抑菌活性,为其进一步的中试生产提供理论依据和实践经验。

1 材料和方法

1.1 试验材料与仪器

出发菌株:TS67 由天津市食品生物技术重点实验室从渤海近海海域水样中筛选获得;指示菌:玉蜀黍平脐蠕孢菌(*Bipolaris maydis*)为天津市食品生物技术重点实验室的保藏菌种;PDA 固体培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20g,琼脂粉 17~20 g,H_2O 1000 mL;海洋真菌发酵培养基:葡萄糖 10 g,蛋白胨 2 g,酵母膏 1 g,蒸馏水 400 mL,人工海水 600 mL。JY92-22 超声波细胞粉碎机:宁波新芝科器研究所。

1.2 试验方法

1.2.1 孢子悬液的制备　将斜面保存的海洋真菌 TS67 接种在海洋真菌 PDA 发酵培养基上,在 28 ℃恒温培养箱中活化 3 d,用 10 mL 无菌生理盐水洗下孢子制成菌悬液,用脱脂棉过滤除去菌丝体,移入装有玻璃珠的 150 mL 三角瓶中,在摇床上充分振荡 2 h,使孢子充分分散和活化,用血球计数板计数,调整孢子浓度为 10^6 个/mL[1]。

1.2.2 诱变处理

1.2.2.1 紫外诱变　将加入 8 mL 单孢子悬液的无菌培养皿,置 15 W 紫外灯 30 cm 处,开盖搅拌照射 0,30,60,90 s,2,4,6,9,15 min,于红光下稀释涂平板[2]。

1.2.2.2 微波诱变　在无菌培养皿中加入 10 mL 孢子悬液,放入微波炉中,调节微波火力强度为低火(700 W,22 kHz)打开皿盖分别用微波处理 0,5,10,15,20,25,30,40,60 s,稀释涂平板[3,4]。

1.2.2.3 亚硝酸诱变　在无菌试管中,加入 3 mL 孢子悬液,加入 1 mL 0.1 mol/L $NaNO_2$ 溶液和 1 mL pH4.6 醋酸缓冲液,分别处理 0,4,8,12,16,20,24,30 min 后,各取 2 mL 处理液,加入 10 mL 0.07 mol/L pH8.6 Na_2HPO_4 终止反应,稀释涂平板[5]。

1.2.2.4 硫酸二乙酯诱变　在 150 mL 三角瓶中,先加入 32mL pH7 的磷酸缓冲液和 8mL 孢子悬液,再加入 0.8 mL 硫酸二乙酯(硫酸二乙酯的最终体积分数为 2%),分别处理 0,3,6,9,15,25,40,60 min 后,各吸取 1 mL 诱变液,分别加入 0.5 mL 25%的硫代硫酸钠溶液终止反应,稀释涂平板[2]。

收稿日期:2007-05-22
基金项目:天津市高等学校科技发展基金项目(2004zd20)
作者简介:王淑媛(1982-),女,山西忻州人,在读硕士研究生,研究方向:微生物资源的前期开发与利用。
通讯作者:王素英(1964-),女,山西阳泉人,教授,博士,主要从事微生物资源的前期开发与利用工作。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

1.2.3 初筛 选择致死率为 90%的处理时间进行诱变，然后选择合适的稀释度进行涂布，吸取 0.2 mL诱变处理后的菌悬液涂布于 PDA 固体培养基于 28 ℃暗室倒置培养 2～3 d，挑取菌落生长较好及菌落均一的单菌落接种到于 PDA 固体培养基上做平板对峙试验，指示菌为玉蜀黍平脐孺胞菌，在 28 ℃恒温培养箱中培养 3～4 d，选取对病原菌拮抗活性较好的菌株进行进一步复筛鉴定。

1.2.4 复筛 挑取初筛中对病原菌拮抗活性较好的菌株接种到海洋真菌发酵培养基中，于 28 ℃，170 r/min 摇瓶培养 5～7 d，将得到的发酵液经 4000 r/min，离心 20 min，取上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤，用牛津杯测定其抑菌活性，每个牛津杯加发酵液量为 150 μL，指示菌同初筛。

1.2.5 传代稳定性试验 将筛选出的菌株连续传代 10 次，用牛津杯法检测其抑菌活性的变化。

2 结果与分析

2.1 致死效应

分别采用紫外、微波、硫酸二乙酯、亚硝酸 4 种诱变方法对海洋真菌 TS67 进行诱变，其致死率随处理时间的变化见图 1～4，由此可知，4 种诱变方案的致死率均随处理时间延长而增大。本试验以 90%致死率为指标选取诱变条件。从 4 个致死曲线图中可以看出，当致死率约 90%时，4 种诱变方法所采取的诱变条件各不相同：①紫外灯功率为 15 W，照射距离为 30cm，处理 6 min；②微波炉功率为 700 W，频率为22 kHz，处理25 s；③0.02 mol/L 亚硝酸，处理 20 min；④2%硫酸二乙酯，处理 40 min。

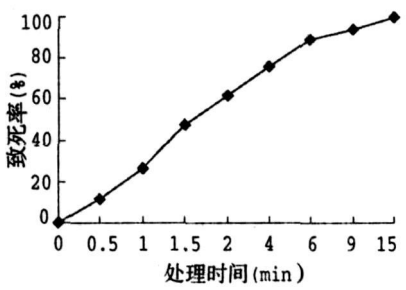


图 1 紫外诱变致死曲线

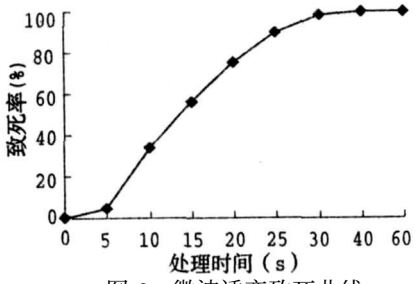


图 2 微波诱变致死曲线

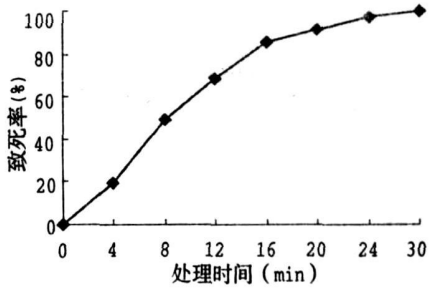


图 3 亚硝酸诱变致死曲线

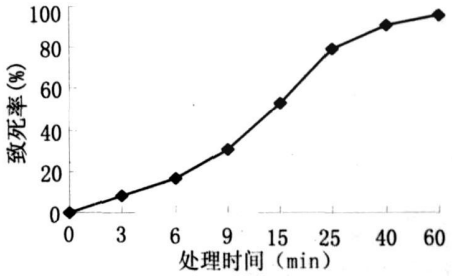


图 4 硫酸二乙酯诱变致死曲线

2.2 诱变效果

2.2.1 紫外诱变 经紫外诱变后，从平板上挑取 91 株菌进行初筛，经初筛选取 14 株拮抗活性好的菌株进行复筛，结果见表 1。其中诱变菌株 Z10 的抑菌活性比亲株 TS67 明显提高，牛津杯中加入等体积的发酵液(150 μL)，抑菌圈明显增大(图 5)，抑菌圈直径从原始菌株(TS67)的 16.0 mm 增大到 22.7 mm，其抑菌活性提高了 41.9%。

表 1 紫外线诱变复筛菌株及其抑菌活性

菌株编号	抑菌圈直径(mm)	活性提高率(%)	菌株编号	抑菌圈直径(mm)	活性提高率(%)
Z1	18.0	12.5	Z8	16.0	—
Z2	20.3	26.9	Z9	20.0	25.0
Z3	17.5	9.4	Z10	22.7	41.9
Z4	16.4	2.5	Z11	17.3	8.1
Z5	19.5	21.9	Z12	18.6	16.3
Z6	17.0	6.3	Z13	8.0	—
Z7	13.7	—	Z14	19.0	18.8

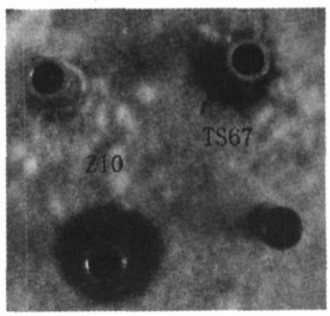


图 5 Z10 和 TS67 发酵液的抑菌活性

2.2.2 微波诱变 微波诱变处理后，从平板上挑取 94 株菌进行初筛，经初筛选取 20 株拮抗活性好的

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

菌株进行复筛，结果见表 2，其中诱变菌株 W8 的抑菌圈直径由原始菌株的 16.0mm 增大到 23.3mm（图 6），抑菌活性比亲株 TS67 提高 45.6%。

表 2　微波诱变复筛菌株及其抑菌活性

菌株编号	抑菌圈直径（mm）	活性提高率（%）	菌株编号	抑菌圈直径（mm）	活性提高率（%）
W1	18.0	12.5	W11	19.1	19.4
W2	17.5	9.4	W12	20.6	28.8
W3	20.0	25.0	W13	17.0	6.3
W4	18.5	15.6	W14	19.3	20.6
W5	19.0	18.8	W15	18.0	12.5
W6	17.2	7.5	W16	16.5	3.1
W7	8.0	—	W17	16.0	—
W8	23.3	45.6	W18	12.5	—
W9	8.0	—	W19	19.5	21.9
W10	18.6	16.3	W20	21.6	35.0

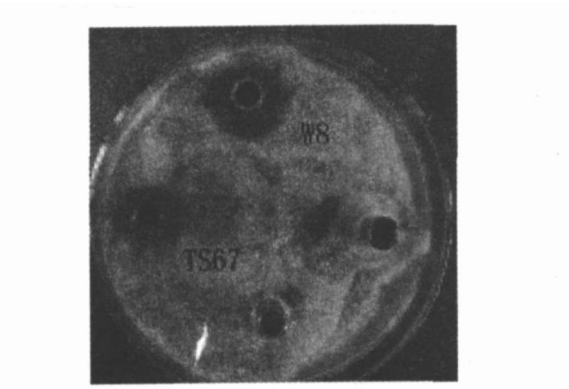


图 6　W8 和 TS67 发酵液的抑菌活性

2.2.3　亚硝酸诱变　采用亚硝酸诱变后，从平板上挑取 105 株菌进行初筛，经初筛选取 14 株拮抗活性好的菌株进行复筛，结果见表 3。牛津杯中加入等体积的发酵液，比原始菌株抑菌圈直径最大只增加 2.5mm，活性最大提高率为 15.6%。

2.2.4　硫酸二乙酯诱变　通过硫酸二乙酯诱变后，从平板上挑取 107 株菌进行初筛，经初筛选取 16 株拮抗活性好的菌株进行复筛，结果见表 4。采用硫酸二乙酯单因子诱变 TS67，诱变效果较差，抑菌活性增辐小，活性最大提高率只有 11.3%，抑菌圈直径由原始菌株的 16.0mm 最高到 17.8mm。

表 3　亚硝酸诱变复筛菌株及其抑菌活性

菌株编号	抑菌圈直径（mm）	活性提高率（%）	菌株编号	抑菌圈直径（mm）	活性提高率（%）
N1	18.4	15.0	N8	17.3	8.1
N2	17.0	6.3	N9	8.0	—
N3	10.5	—	N10	18.0	12.5
N4	8.0	—	N11	18.2	13.8
N5	18.5	15.6	N12	17.5	9.4
N6	16.0	—	N13	16.3	1.9
N7	17.5	9.4	N14	14.8	—

表 4　硫酸二乙酯诱变复筛菌株及其抑菌活性

菌株编号	抑菌圈直径（mm）	活性提高率（%）	菌株编号	抑菌圈直径（mm）	活性提高率（%）
D1	16.5	3.1	D9	8.0	—
D2	16.4	2.5	D10	17.1	6.9
D3	8.0	—	D11	17.0	6.3
D4	16.9	5.6	D12	16.6	3.8
D5	17.2	7.5	D13	17.8	11.3
D6	10.5	—	D14	15.6	—
D7	17.3	8.1	D15	17.5	9.4
D8	8.0	—	D16	16.0	—

2.2.5　诱变方案的比较　在 TS67 诱变试验中，采取了紫外诱变、微波诱变、亚硝酸诱变、硫酸二乙酯诱变，对其诱变效果进行比较（表 6）可知，以微波诱变效果最好，活性提高率大于 10%以上的菌株数占复筛菌株数的 60%，其中有 2 株的活性提高率大于等于 30%，活性平均提高率为 14.9%，活性最大提高率为 45.6%；其次是紫外诱变，经紫外诱变后，活性提高率大于 10%以上的菌株数占复筛菌株数的 50%，其中 1 株诱变菌的活性提高率大于等于 30%，活性平均提高率为 13.5%，活性最大提高率为 41.9%；亚硝酸和硫酸二乙酯诱变两种化学与以上两种物理诱变相比，诱变效果明显较差，活性平均提高率分别为6.8%，4.0%，活性最大提高率分别只有 15.6%，11.3%。

表 6　不同诱变方法的诱变效果

诱变方案	不同活性提高率的菌株数				活性平均提高率（%）	活性最大提高率（%）
	≤10%	10%~20%	20%~30%	≥30%		
紫外	7	3	3	1	13.5	41.9
微波	8	6	4	2	14.9	45.6
亚硝酸	10	4	0	0	6.8	15.6
硫酸二乙酯	15	1	0	0	4.0	11.3

2.3　传代稳定性试验

经 Z10 和 W8 各自连续传代 10 次后，其形成的抑菌圈直径基本稳定在 22.7mm（图 5）和 23.3mm（图 6）。

3　讨论

试验结果表明，在几种诱变方案中，微波诱变对 TS67 的诱变效果最好，这与微波　（下转第 79 页）

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

参考文献:

[1] 崔德杰, 张玉龙. 土壤重金属污染现状与修复技术研究进展[J]. 土壤通报, 2004, 35(3): 127—131.
[2] 陈承利, 廖敏. 重金属污染土壤修复技术研究进展[J]. 广东微量元素科学, 2004, 11(10): 1—8.
[3] 夏来坤, 郭天财, 康国章, 等. 土壤重金属污染与修复技术研究进展[J]. 河南农业科学, 2005(5): 88—92.
[4] 王学峰, 皮运清, 史选, 等. 新乡市污灌农田中重金属的污染状况调查[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2005, 33(3): 95—97.
[5] 李其林, 赵中金, 黄昀. 重庆市近郊蔬菜基地土壤和蔬菜中重金属的质量现状[J]. 重庆环境科学, 2000(6): 33—36.
[6] 李海华, 张杰, 申灿杰. 郑州市近郊土壤和蔬菜中重金属污染状况调查与评价[J]. 河南农业科学, 2007(1): 90—92.
[7] 匡少平, 徐仲, 张书圣. 水稻对土壤中重金属激素铅的吸收效应及污染防治[J]. 环境科学与技术, 2002, 26(2): 32—34.
[8] 周东美, 王玉军, 仓龙, 等. 土壤及土壤—植物系统中复合污染的研究进展[J]. 环境污染治理技术与设备, 2004, 5(10): 1—8.
[9] 魏复盛, 陈静生. 中国土壤环境背景值研究[J]. 环境科学, 1991, 12(4): 12—19.
[10] 高翔云, 汤志云, 李建和, 等. 国内土壤环境污染现状及防治措施[J]. 环境保护, 2006(4): 50—53.
[11] GB15618—1995, 土壤环境质量标准[S].
[12] 何增耀. 环境监测[M]. 北京: 农业出版社, 1998.
[13] 杨金燕, 杨肖娥, 何振立, 等. 土壤中铅的吸附—解吸行为研究进展[J]. 生态环境, 2005(1): 102—107.
[14] 杨金燕, 杨肖娥, 何振立. 土壤中铅的来源与生物有效性[J]. 土壤通报, 2005, 36(5): 765—772.
[15] 伍钧, 孟晓霞, 李昆. 铅污染土壤的植物修复研究进展[J]. 土壤, 2005, 37(3): 258—264.
[16] 张胜, 胡炳义, 陈龙. 重金属及有机物污染土壤的植物修复机制[J]. 河南农业科学, 2006(7): 10—14.
[17] 张正洁, 李东红, 许增贵. 我国铅污染现状、原因及对策[J]. 环境保护科学, 2005, 31(4): 41—42, 47.
[18] 宋玉芝. 土壤铅污染对水稻生长影响的研究[J]. 南京气象学院学报, 2005, 28(4): 536—541.
[19] 尚英男, 尹观, 倪师军, 等. 成都市土壤—植物系统铅污染状况初步研究[J]. 广东微量元素科学, 2005, 12(3): 8—13.
[20] 田应兵, 程水源, 周建利, 等. 城郊菜地土壤重金属含量及其影响因素[J]. 湖北农业科学, 2005(2): 66—70.
[21] 李海玲, 黄华芳, 任春霞. 现代土壤铅污染监测的测定方法[J]. 湖州师范学院学报, 2005, 27(1): 51—54.

(上接第 59 页) 和微生物相互作用的机理有关。首先, 微波是一种电磁波, 能引起水、蛋白质、脂肪和碳水化合物等极性分子的转动, 尤其是水分子在 2450MHz 微波的作用下, 能在 1s 内 180°来回转动 24.5 亿多次, 从而引起分子间强烈摩擦, 使得单孢子内 DNA 分子氢键和碱基堆集化学力受损, 最终引起 DNA 分子结构发生变化, 导致遗传变异[6]; 其次, 微波具有极强的穿透效应, 能同时使细胞壁内外的水分子产生剧烈运动, 从而引起细胞壁通透性发生变化更容易使胞内物质释放出来; 微波引起强烈热运动所产生的瞬时热效应, 容易引起酶失活, 从而引起细胞的生理、生化变异, 同时微波对微生物的诱变过程中, 微生物的动态代谢受到微波"干扰"而平衡发生紊乱, 从而使代谢途径发生改变[7,8]。目前大多数研究报道在微波诱变中, 单孢子悬液辐射照射 120s 左右时致死率达 90%, 而在本试验中, 单孢子悬液辐射照射 25s 时致死率能达 90%, 因此, TS67 的单孢子悬液对微波辐射特别敏感, 能够取得较好的诱变效果。微波诱变的机理包含以上几个方面, 在本试验中, 究竟是微波辐射直接作用于微生物 DNA 引起变异, 还是其穿透力使得细胞壁通透性增加, 导致核质变换而引起突变, 目前尚不明了, 有待于进一步研究。

参考文献:

[1] 王惠, 童应凯, 吴兆亮. 亚硝酸诱变选育黄霉素高产菌的研究[J]. 饲料工业, 2006, 27(8): 17—19.
[2] 王绍树. 食品微生物实验[M]. 天津: 天津大学出版社, 1996.
[3] 陈力力, 鲁迎新. 微波诱变选育井冈霉素高产菌[J]. 生物技术, 2003, 13(5): 14—15.
[4] 李永泉. 微波诱变选育木聚糖酶高产菌[J]. 微波学报, 2001, 17(1): 51—53.
[5] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
[6] 黄卡玛, 刘永清, 唐敬贤, 等. 电磁波对化学反应的非热作用及其在电磁生物非热效应机理研究中的意义[J]. 微波学报, 1996, 12(2): 126—132.
[7] 李豪, 车振明. 微波诱变微生物育种的研究[J]. 山西食品工业, 2005(2): 5—6.
[8] 贾红花, 周华, 韦萍. 微波诱变育种研究及应用进展[J]. 工业微生物, 2003, 33(2): 46—50.

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net