

固氮菌高产菌株的诱变育种

李 华 王光龙

(郑州工业大学化工系)

摘 要: 本文以圆褐固氮菌为出发菌株,经紫外线诱变处理,获得两株最高正变株,其固氮能力较出发菌株分别提高112.47%和110.79%;对其用酸碱及温度继续处理,得到一株抗性变异株,其固氮能力较出发菌株分别提高458.65%。

关键词: 圆褐固氮菌,菌种筛选,诱变处理

中图分类号: TQ446.1

随着人口的增长,人类对粮食需求也不断增长,对化肥需要量就越来越大。化肥生产不仅会污染环境,消耗能源,而且成本也较高。再则化学肥料的长期施用会造成土壤板结,自然肥力下降,反而会影响农作物的生长。开辟新的肥料来源就显得十分必要。近期出现的生物肥料就是一种较为理想的肥料来源。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。目前,农业生产中利用生物固氮获得氮肥,为农业开辟肥源,已越来越引起人们的重视,据统计,目前用工业合成氨的办法固定空气中氮素作为肥料,只占地球固氮量的20%,绝大部分靠生物固氮^[1]。生物固氮和新型生物肥料的研究已被发达国家作为二十一世纪主攻课题。我国对生物肥料的研究从80年代初开始日益受到重视。九·五期间国家把生物工程技术列入“九·五”化学工业重点开发项目。固氮菌肥料虽然在我国已有应用,但是现行的菌株固氮能力低,对外界环境的抵抗力差,不适合农业生产的需要。为了选育优良生物固氮菌株,我们对固氮菌进行了诱变育种实验研究,得到两株正突变株,其固氮能力较出发菌株分别提高112.47%,110.79%,并且通过酸碱、温度处理,得到一株正抗性变异株,其固氮能力较出发菌株提高458.65%,且能耐受酸碱(pH=4~10)、温度(≤45℃)的不良环境,对外界环境具有更大的适应性。

1 材料和方法

1.1 出发菌种 本实验室保藏的圆褐固氮菌株(*Azotobacter chroococcum*)

1.2 培养基及培养条件

(1)培养基: 采用阿须贝(Ashby)无氮培养基

(2)培养条件: 斜面及平板培养:25~30℃,培养3天

摇瓶培养:25~30℃,往复式摇床(120r·p·m),振荡培养3天。

1.3 诱变育种

(1)紫外线(uv)处理

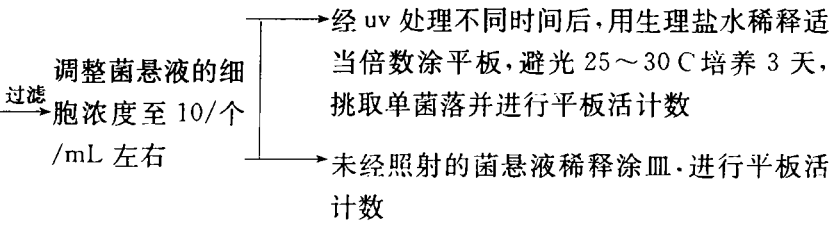
a、诱变剂 u·v 照射:15W,照射距离30cm

b、诱变过程 出发菌株 $\xrightarrow[盐水洗菌苔]{1ml \text{ 无菌生理}}$ 摇瓶 $\xrightarrow[玻璃珠打散细胞团]{摇床振荡 30min}$



化工部科技攻关项目(95-03-01)

收稿日期:1995-11-12



(2)培养测定

采用文献^[2]介绍的土壤培养法进行突变株固氮能力测定

- a. 土壤培养,称取 50g 土壤,置于预先灭过菌的 500mL 三角瓶中,加入 1g 甘露醇,混匀后,加水到最大持水量的 50%,然后,接入固氮菌突变株,塞上棉塞,于恒温箱(27℃)中培养 10~15 天。
- b. 测定全氮含量:培养结束后,准确称取 1g 土壤,按土壤全氮测定操作步骤,用自动定氮仪进行全氮含量测定^[3]

(2)抗性变异株的筛选

- a、酸碱处理 将经过 u·v 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,27℃下振荡 3 天,取样,进行平板活计数,以后每隔 2h,分别调 pH 为 5、4、9、10 重复上述操作。
- b、温度处理 将酸碱(pH)处理后的菌株,继续置恒温水浴中温至 35℃、40℃、45℃、50℃,各处理 1 小时后,取样,选择适当稀释度进行平板活计数,27℃培养 3 天,挑出单个菌落,并反复纯化。
- c、培养测定:同前。

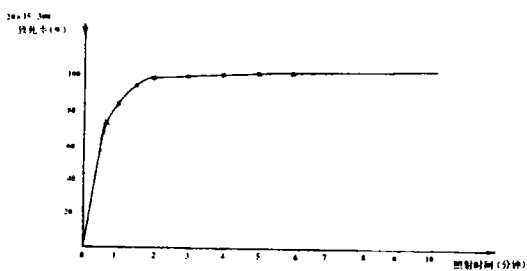


图 1 uv 处理时固氮菌的致死曲线

2 结果及讨论

2.1 出发菌株对 uv 照射的敏感程度

表 1 紫外线照射固氮菌致死率情况

编号	照射时间 (分钟)	菌落数(个)			平均菌落数 (个)	致死率(%)
		I	II	III		
uv01N	20"				无法计数	—
uv02N	30"				无法计数	—
uv03N	40"	396	335	316	349	71.08
uv04N	50"	334	352	336	340.7	71.76
uv05N	1'	221	212	189	207	82.85
uv06N	1.5'	96	94	62	84	93.04
uv07N	2'	34	23	36	31	97.43
uv08N	3'	4	5	3	4	99.67
uv09N	4'	5	1	1	2.3	99.81
uv10N	5'	0	0	0	0	100
对照	0	1191	1162	1267	1206.7	—

其致死曲线见图 1

2.2 不同处理剂量的诱变效应

出发菌株经 u · v 不同剂量进行诱变处理后,不同突变株固氮能力测定如表 2 所示

表 2: uv 不同剂量下处理的诱变效果

突变株编号	处理时间	滴定体积		全氮量 N%	提高(%)
		(ml)			
uv01N	20"	3.8	0.0566	35.73	
uv02N	30"	1.3	0.0194	—53.48	
uv03N	40"	4.4	0.0655	57.07	
uv04N	50"	3.7	0.0551	32.13	
uv05N	1'	4.7	0.0700	67.87	
uv06N	1.5'	6.0	0.0894	114.39	
uv07N	2'	5.7	0.0849	103.60	
uv08N	3'	3.8	0.0566	35.73	
uv09N	4'	4.8	0.0715	71.46	
对照	0	2.8	0.0417	—	

由于 2 数据可以看出,出发菌株经 u · v 处理后,除突变株 uv02N 的固氮能力低于出发菌株外,其余突变株的固氮能力均高于出发菌株,其中突变株 uv06N、uv07N 固氮能力较出发菌株提高 114.39%,103.60%,由致死率曲线可知,上述两种突变株所对应的致死率分别为 93.04%,97.43%。

表 3 uv06N 和 uv07N 复筛后固氮能力测定

编号	滴定体积(ml)			平均滴定体积 (ml)	全氮量 N%	提高(%)
	I	Ⅱ	Ⅲ			
uv06N	6.0	5.9	5.95	5.95	0.0886	112.47
uv07N	5.7	6.9	5.1	5.90	0.0879	110.79
对照	2.8	2.6	2.9	2.80	0.0417	—

由复筛结果可以看出,uv06N、uv07N 固氮能力比较稳定,经反复纯化、培育后,选其为最优菌株

2.3 抗性变异株固氮能力测定

将抗性变异株(经酸、碱、温度处理)用土壤培养法培养 10 天后,进行固氮能力测定

表 4 抗性变异株固氮能力测定

菌株	编号	处理条件	滴定体积(ml)		平均滴定 体积(ml)	全氮量 N%	提高(%)
			I	Ⅱ			
uv06N	2#	pH=4~10	2.40	2.00	2.20	0.0328	215.38
	4#	t≤45℃*	3.70	4.20	3.90	0.0581	458.65
	5#	t≤50℃*	3.20	3.30	3.20	0.0477	358.65
uv07N	8#	pH=4~10	2.80	4.00	3.40	0.0506	386.54
	9#	t≤45℃*	3.20	3.20	3.20	0.0477	358.65
	10	t≤50℃*	2.40	2.10	2.25	0.0335	222.12
出发菌株	对照		0.60	0.80	0.70	0.0104	—

* 注:经温度处理前,已进行了酸碱(pH=4~40)处理

由表 4 数据可知,经过酸碱、温度处理后的抗性变异株固氮能力均出现正变效应,但是与 u · v 诱变相比,固氮能力不及 u · v 处理,但是 4# 菌株经酸碱(pH=4~10),温度(t≤45℃)处理后,对外界环境的抵抗力增强,既能承受 pH=4~10,t≤45℃的不良环境,而且固氮能力也较出发菌株提高 458.65%。

3 结 论

3.1 固氮菌经过 $u \cdot v$ 诱变处理,可以筛选到较出发菌株固氮能力有不同程度提高的突变株,其中我们从 3055 个菌落中筛选出的 2 株最高正变株,其固氮能力为 0.0886%、0.0879%,较出发菌株提高 112.47%、110.79%。

3.2 通过试验发现,菌体致死率与突变株固氮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。

3.3 圆褐固氮菌是中温性微生物,适宜生长温度在 25~30℃ 之间,据文献^[4]记载,固氮菌在 45~50℃ 中 30 分钟就全部死亡,这与我们的试验结果不太一致,我们的试验结果(表 4)表明,固氮菌在 45℃ 条件处理 60 分钟,还有 30 个左右细菌,继续在 50℃ 下处理 1 小时,尚有 20 左右个固氮菌,这表明,固氮菌经过诱变处理后,对温度的抵抗性有所增强。

3.4 经酸碱($pH=4 \sim 10$)、温度($t \leq 45^\circ C$)处理后筛选出的抗性变异株,不仅其固氮能力较出发菌株提高 458.65%,而且,由于此菌株能耐受酸碱($pH=4 \sim 10$)、温度($t \leq 45^\circ C$)的不良环境,该菌株在推广应用方面有更广阔的前景。

3.5 虽然我们筛选出了优良的固氮菌株,但是要将它用于农业生产,其稳定性尚待深入研究。

参 考 文 献

- 1 陈因等,《生物固氮》,上海科学技术出版社,1985。
- 2 许光辉、郑洪元,《土壤微生物分析方法手册》,农业出版社,1980,P242。
- 3 劳家桢,《土壤农化分析手册》,农业出版社,1988。
- 4 陈华癸,《微生物学》,农业出版社,1962。

Screening Mutants of High—yield Azotobacterium

Li Hua , Wang Guanglong

(Chemical Engineering Dept. Zhengzhou University of Technology)

Abstract Two high positive strains ,whose capabilities of nitrogen—fixing increase 112.47%、110.79% comparing with the starting strain,were obtained by subjecting the starting strain —Azotobacterium to mutagenic agents—uv ; Continuing treatments with acid, alkali and heating , a strain whose capability of nitrogen—fixing increase 458.65% comparing with the starting strain was obtained.

Key words azotobacterium,screening, mutagenic treatment.