

生防菌株侧孢芽孢杆菌 BL-1 的诱变选育

赵云彤¹, 杜春梅², 张海秀³, 时新瑞¹

(1. 黑龙江省农业科学院 牡丹江分院, 黑龙江 牡丹江 157041; 2. 黑龙江大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150080; 3. 哈尔滨学院 理学院, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:侧孢芽孢杆菌 BL-1 是一株多功能生防菌, 试验证明它对多种农作物病原真菌与细菌具有抑制作用。在生物防治领域, 侧孢芽孢杆菌具有广阔的应用前景。通过测定侧孢芽孢杆菌 BL-1 对部分病原真菌和细菌的抑制效果, 并对其依次进行紫外线诱变、DES 诱变和亚硝酸诱变 3 次诱变处理, 最终获得一株高产突变株 HBL-B26, 其效价值由最初的 $15\text{AU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 提高到 $64.48\text{AU}\cdot\text{mL}^{-1}$, 约是出发菌株 BL-1 的 4.3 倍, 后经过传代 10 次试验表明, 该菌株的遗传性能比较稳定。

关键词:侧孢芽孢杆菌; 诱变; 育种

中图分类号:Q936

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2011)11-0039-05

侧孢芽孢杆菌 (*Brevibacillus laterosporus*) 是具有多种功能的微生物^[1-3]。其显著特点是有独木舟状侧孢, 侧孢与芽孢紧密相联, 当孢囊溶解后侧孢依然牢固和芽孢结合在一起。该菌的某些菌株可以产生伴孢晶体, 当孢囊消解时便会释放^[4-5]。国外对其功能研究极为活跃和深入, 尤其是俄罗斯、美国、英国、日本和比利时等国家^[6-10], 我国也开展了一些基础应用研究。

由于国内外许多文献相继报道侧孢芽孢杆菌具有杀虫、抗菌、抗肿瘤和降解污染物等多种生物功能^[11-15], 因此侧孢芽孢杆菌在微生物农药研究方面, 前景十分广阔。然而, 从自然界分离得到的菌种往往生产能力低, 遗传性状不稳定, 不能满足工业生产的需要。采用诱变育种不仅可以提高菌株的生产能力, 而且还可以改进产品质量, 简化生产工艺, 开发新品种^[16-18]。该试验通过对原始菌株进行物理和化学诱变, 旨在为进一步生产应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 试验菌株为侧孢芽孢杆菌 BL-1 (*Brevibacillus laterosporus*), 指示菌为甜瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*

Snyder & Hansen), 均为黑龙江大学微生物学省高校重点实验室保存菌种。

1.1.2 主要培养基 (1) 牛肉膏蛋白胨培养基: 牛肉膏 3 g, NaCl 1.0 g, 蛋白胨 5 g, 水 1 000 mL, pH7.0; (2) PDA 培养基: 200 g 已去皮的马铃薯切成块, 煮沸 0.5 h, 纱布过滤后滤液中加 20 g 蔗糖, 20 g 琼脂融化后, 加蒸馏水定容 1 000 mL, pH 自然; (3) 发酵液: 葡萄糖 $6\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 牛肉膏 $9\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, NaCl $4\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, MnSO_4 $0.05\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH7.0。

1.1.3 主要试剂 主要试剂有: 醋酸缓冲液、 Na_2HPO_4 溶液、磷酸缓冲液、 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaNO_2 溶液、0.85% 的生理盐水和 2% 的硫代硫酸钠。

1.2 方法

1.2.1 抑菌谱的测定 以实验室保藏的 8 种植物病原真菌和 6 种细菌为指示菌, 杯碟法测定侧孢芽孢杆菌 BL-1 菌株的发酵上清液对这些病原菌的抑菌效果。

1.2.2 生长曲线的测定 将活化后的菌株接一菌环于牛肉膏液体培养基中, 于 37°C 下 $180\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养 2~3 d, 然后按 2% 的接种量接种于 300 mL 牛肉膏液体培养基中。每隔 2 h 取样, 经适当稀释后, 使用紫外分光光度计, 在 600 nm 波长下测其 OD 值, 以时间为横坐标, OD 值为纵坐标作图, 绘出该菌株的生长曲线。

1.2.3 抗菌物质效价的确定 将发酵上清液用 pH6.5 的 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲液进行二倍稀释, 取样 100 μL 进行抑菌试验, 以观察不到抑菌圈出现的最高稀释浓度定义为一个活力单由 (1AU),

收稿日期: 2011-09-08

第一作者简介: 赵云彤 (1983-), 女, 黑龙江省双鸭山市人, 硕士, 研究实习员, 从事微生物和植物保护研究。E-mail: zyt-37@163.com。

通讯作者: 杜春梅 (1972-), 女, 山东省人, 博士, 副教授, 从事生物防治研究。E-mail: 80110507@sina.com。

其倒数即是原液的抗菌肽效价值($\text{AU} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

效价标准曲线的制作:先将经稀释法测量已知效价的发酵液等比稀释成 9 种浓度:0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 和 1.0。分别取 $100 \mu\text{L}$ 加于已制备好平板的 3 个间隔的牛津杯中。同时另外间隔的 3 个加入中心浓度发酵液(稀释成 0.5 倍) $100 \mu\text{L}$ 。每个浓度重复 3 个平板。以所得到的对应抑菌圈直径的差数为横坐标,对应的效价值对数为纵坐标,绘制标准曲线。

1.2.4 菌株的诱变选育 (1)紫外线(UV)诱变处理:开启紫外灯预热 20 min,吸取已制备的菌悬液 10 mL 于培养皿中,在暗室 30W 紫外灯下于 30 cm 处,分别照射 15、30、45、60、75、90 和 120 s,分别进行适当稀释后涂布于牛肉膏蛋白胨平板上,每个稀释度涂 3 个平皿,经 37°C 培养 2~3 d,观察计算每皿的菌落数,并与未经紫外照射的菌悬液所涂平板进行比较,重复 3 次,做出致死率曲线,得出最佳诱变剂量。选择死亡率为 70%~80%下生长出的单菌落 30 株,转接到斜面培养基,以原始菌株为对照,进行摇瓶发酵筛选。重复 3 次,计算其效价值的大小。

(2)硫酸二乙酯(DES)诱变:将经紫外诱变选出的优良菌株 30°C 下 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 10 h,制成约 10^8 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌悬液,从中取出 10 mL 的菌悬液形成 DES 含量为 0.05%、0.10%、0.20%、0.30%、0.40% 和 0.50% 的 6 个诱变梯度,以不加 DES 为空白对照。 28°C 、 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床振荡 30 min,然后向小三角瓶内加入 1 mL 2% 硫代硫酸钠终止诱变反应。处理后稀释涂平板, 37°C 下培养 48 h,统计菌落,计算致死率。选择死亡率为 70%~80%下生长出的单菌落 30 株,以原始出发菌株为对照,进行摇瓶发酵筛选。重复 3 次,计算其效价值的大小。

(3)亚硝酸(HNO_2)诱变:将 1 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaNO_2 和 1 mL 菌悬液与 1 mL 醋酸缓冲液在 30°C 水浴 1、2、3、5、7 和 9 min,处理相应的时间后加 7 mL pH 为 8.6 的 Na_2HPO_4 溶液终止反应。取样 $100 \mu\text{L}$,涂平皿,和未经处理的菌悬液所涂平板对照进行比较,计算出处理不同时间后菌株的死亡率。绘制死亡曲线。选择死亡率为 70%~80%下生长出的单菌落 30 株,转接到斜面培养基,以原始出发菌株为对照,进行摇瓶发酵筛选。重复 3 次,计算其效价值的大小。

1.2.5 高产菌株传代稳定性试验 为研究诱变

的高产菌株性能遗传特性是否稳定,将经连续诱变得到的高产菌株按斜面传代的方法,连续传 10 代,将每代的菌株进行摇瓶发酵,测定抑菌圈的直径及其效价值大小,以确定重组菌株的遗传稳定性。

2 结果与分析

2.1 侧孢芽孢杆菌 BL-1 抑菌谱测定

由图 1 可知,侧孢芽孢杆菌 BL-1 发酵上清液对 8 种植物病原真菌具有抑制作用。其中对水稻恶苗和烟草赤星抑制作用较好,抑菌直径分别达到 $(23.54 \pm 0.60) \text{ mm}$ 、 $(23.42 \pm 0.62) \text{ mm}$ 。

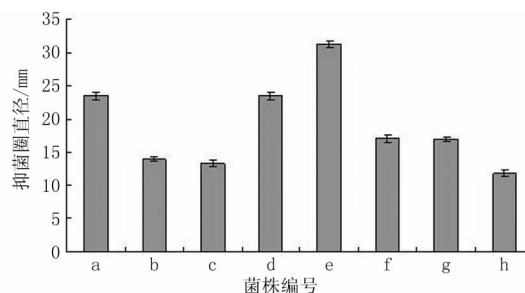


图 1 侧孢芽孢杆菌 BL-1 对植物病原真菌抑菌效果
a 为烟草赤星;b 为甜瓜枯萎;c 为小麦根腐;d 为水稻恶苗;
e 为小麦赤霉;f 为黄瓜枯萎;g 为辣椒根腐;h 为水稻纹枯

侧孢芽孢杆菌 BL-1 对多种细菌(包括 G^+ 和 G^-)也有明显的抑制作用,由图 2 可知,对枯草芽孢杆菌的抑制作用最强,可达 $17.62 \pm 0.57 \text{ mm}$ 。对产气芽孢杆菌的抑制作用最弱,为 $12.50 \pm 0.58 \text{ mm}$ 。

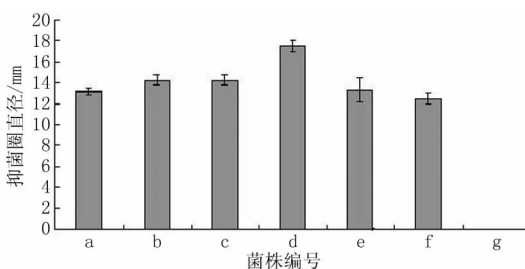


图 2 侧孢芽孢杆菌 BL-1 对细菌抑菌效果
a 为金黄色葡萄球菌;b 为铜绿假单胞菌;c 为蜡样芽孢杆菌;
d 为枯草芽孢杆菌;e 为苏云金芽孢杆菌;f 为产气芽孢杆菌;
g 为埃希大肠杆菌 DH5α

2.2 生长曲线的绘制

对侧孢芽孢杆菌 BL-1 的生长曲线进行了测定(见图 3)。

从 BL-1 菌株的生长曲线可以看出,在培养 6~12 h 时,细胞快速生长,进入对数生长期,而 12 h 后菌体浓度不再增大。因此,要采取培养 10~12 h 的 BL-1 细胞进行诱变试验。

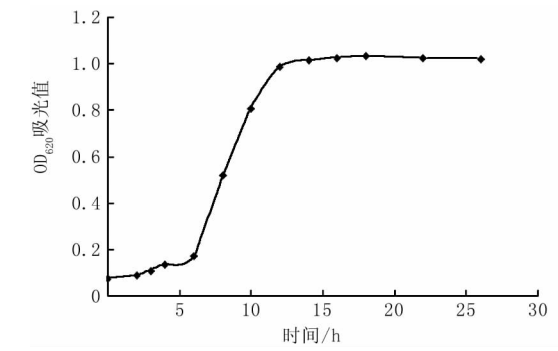


图3 侧孢芽孢杆菌 BL-1 的生长曲线

2.3 效价标准曲线的绘制

由二倍系列稀释法测定侧孢芽孢杆菌 BL-1 发酵上清液的效价,侧孢芽孢杆菌 BL-1 发酵上清液在稀释 3 倍时没有抑菌效果,发酵上清液点样量为 200 μL ,稀释 3 倍即达到最高稀释浓度,此时发酵液的浓度为原来的 1/3 倍,由此可得该发酵上清液的效价值为 15 $\text{AU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

根据所得效价值,按照 1.2.3 方法测得抗菌肽效价标准曲线见图 4。

曲线回归方程 $y=0.094\ 9x+0.882\ 5$,回归系数 $R^2=0.990\ 8$,抑菌圈直径差与效价对数值成良好的线性关系, $R^2=0.990\ 8$,因此选取该曲线为标准曲线。

2.4 紫外诱变

2.4.1 紫外诱变时间的选择 由图 5 可知,随着紫外线照射时间的增加,出发菌株的致死率不断

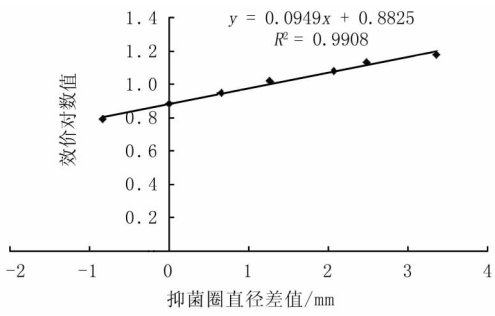


图4 抑菌物质的效价标准曲线图

增大,照射 10 s 时,致死率为 14.3%,照射 60 s,致死率增大到 77.2%;照射 120 s,致死率达到 96.5%。目前一般采用致死率为 70%~80%或更低的剂量,因为这种情况下正突变的几率比较大,所以该试验选择紫外线照射时间 60~70 s,作为最佳的诱变时间。

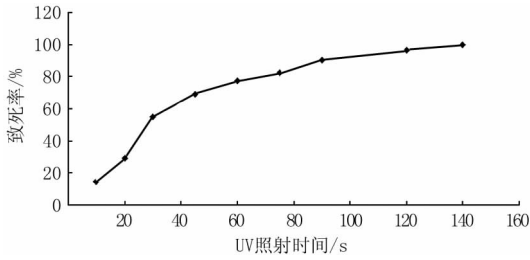


图5 紫外诱变处理致死曲线

2.4.2 紫外诱变正突变株的筛选 挑取诱变后的 90 株单菌落于 30℃ 下进行摇瓶发酵,再按照 1.4.3 的方法测定发酵液效价值,共得到 3 株正突变菌株(见表 1)。

表1 紫外线(UV)诱变筛选结果

菌株编号	诱变前菌株 BL-1	UBL-A02	UV 诱变后菌株 UBL-A06	UBL-B31
效价值/ $\text{AU}\cdot\text{mL}^{-1}$	15.00	25.83 ± 0.73	23.80 ± 0.76	26.48 ± 0.65
效价提高率/%	0	72	58	76

由表 1 可知,经过筛选后得到了 3 株正突变株 UBL-A02、UBL-A06 和 UBL-B31,其中 UBL-B31 菌株的效价最高,效价值为 $26.48\pm0.65\text{AU}\cdot\text{mL}^{-1}$,与出发菌株相比较,其效价约提高了 76%。因此选择 UBL-B31 作为下一步进行 DES 诱变的出发菌株。

2.5 DES 诱变

2.5.1 DES 诱变剂量的选择 不同浓度的 DES 诱变处理与菌株的致死率之间存在明显的剂量关系(见图 6),当浓度达到 0.5% 时,致死率达到 100%。该试验选择致死率为 70%~80%的诱变处理时间,因此确定 DES 诱变最佳浓度

为 0.1%。

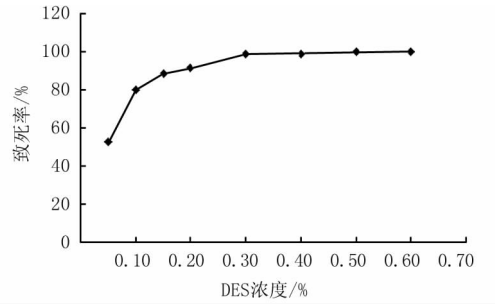


图6 DES 诱变处理致死曲线

2.5.2 DES 诱变正突变株的筛选 对菌株 UBL-B31 进行 DES 诱变处理,作用时间为 10 min,

将诱变获得的 90 株菌株进行摇瓶发酵,经过测定 发酵液效价值,筛选到 2 株正突变株(见表 2)。

表 2 DES 诱变筛选结果

菌株编号	诱变前菌株 UBL-B31	UBL-A07	UV 诱变后菌株 UBL-B09
效价值/ $\text{AU}\cdot\text{mL}^{-1}$	26.48 ± 0.65	43.01 ± 2.95	33.02 ± 2.38
效价提高率/%	0	62	25

由表 2 可知,UBL-A07 菌株与出发菌株相比较,其效价提高 62%。因此选择 UBL-A07 作为下一步诱变的出发菌株。

2.6 亚硝酸诱变

2.6.1 亚硝酸诱变剂量的选择 由图 7 可看出,随着 HNO_2 作用时间的延长,致死率不断增加, HNO_2 作用 1 min 致死率达到 36.5%,3 min 致死率 72.6%,9 min 接近 100%。由此表明 HNO_2 诱变的致死效应较强,选择作用时间 3.5 min,即致死率在 70%~80%的时间作为最佳处理时间。

2.6.2 HNO_2 诱变正突变株的筛选 选择 HNO_2

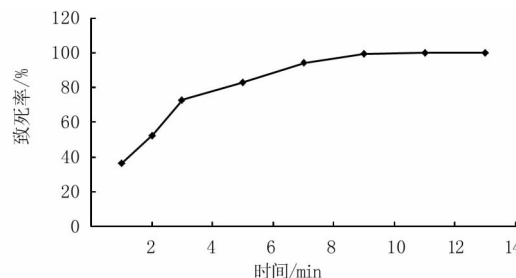


图 7 HNO_2 致死率曲线图

最佳诱变时间,将诱变获得的 100 株菌株进行摇瓶发酵,经过测定发酵液效价值,筛选到 2 株正突变株(见表 3)。

表 3 HNO_2 诱变处理筛选结果

菌株编号	诱变前菌株 UBL-A07	HBL-A16	UV 诱变后菌株 HBL-B26
效价值/ $\text{AU}\cdot\text{mL}^{-1}$	43.01 ± 2.95	65.49 ± 5.41	64.48 ± 5.01
效价提高率/%	0	52	50

由表 3 可知,经过筛选 HBL-A16 菌株的效价最高,效价为 $65.49\pm5.41 \text{ AU}\cdot\text{mL}^{-1}$,比出发菌株的效价提高了 52%。

2.7 高产菌株传代稳定性试验

将诱变后的高产突变株 HBL-B26 与 HBL-

A16 在斜面上连续传代 10 次,每一代斜面均进行发酵培养,其中 HBL-B26 的效价值比较稳定(见表 4)。

表 4 菌株传代稳定性试验

传代次数	2	4	6	8	10
效价值/ $\text{AU}\cdot\text{mL}^{-1}$	63.38 ± 4.86	61.53 ± 4.92	63.09 ± 5.02	62.87 ± 4.77	62.32 ± 5.23

3 结论

侧孢芽孢杆菌 BL-1 是一株生防菌,应用前景广阔,对其依次进行紫外线诱变、DES 诱变和亚硝酸 3 次诱变处理,通过测定发酵液的效价值进行突变株的筛选,最终获得 1 株高产突变株 HBL-B26,其效价值由初始菌株的 $15 \text{ AU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 提高到 $64.48 \text{ AU}\cdot\text{mL}^{-1}$,约是出发菌株 BL-1 的 4.3 倍,后经过传代 10 次试验表明,该菌株的遗传性能比较稳定,对其微生物农药方向的研究提供了研究基础。

参考文献:

- [1] Takeuchi T. Spergualin a novel antitumor antibiotic produced by *Bacillus laterosporus*[J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 1984,11(12 Pt 2):2633-2639.
- [2] Tian B,Li N,Lian L,et al. Cloning,expression and deletion

of the cuticle-degrading protease BLG4 from nematophagous bacterium *Brevibacillus laterosporus* G4[J]. *Arch Microbiol*,2006,186(4):297-305.

- [3] Viviane Zahner,Leon Rabinovitch,Phylip Suffys,et al. Genotypic Diversity among *Brevibacillus laterosporus* Strains[J]. *Appl Environ Microbiol*,1999;65(11):5182-5185.
- [4] Smirnova T A,Minenkova I B,orlova M V,et al. Res. The crystal-forming strains of *Bacillus laterosporus* *Microbiol*. 1996,147:343-350.
- [5] Smirnova T A,poglasova M N,orlova M V,et al. The ultrastructure spores and crystals of *bacillus laterosporus* biotechnology(Russia)1997,1:29-36.
- [6] 杜春梅,王薇,葛菁萍,等.生防菌 BL-21 的鉴定及其活性产物[J]. *植物保护学报*,2007,34(4):359-365.
- [7] Oliveira E J,Rabinovitch L,Monnerat R G,et al. Molecular characterization of *Brevibacillus laterosporus* and Its potential use in biological control[J]. *Appl Environ Microbiol*. , 2004,70(11):6657-6664.

- [8] T. Foeldes I, BaÁnhegyi Z, Herpai L, et al. Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and in vitro screening for antagonism against hytopathogenic, foodborne pathogenic and spoilage microorganisms[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 89, 840-846.
- [9] Favret M E, Yousten A A. Insecticidal activity of *Bacillus laterosporus*[J]. *Invertebr Pathol.*, 1985, 45(2):195-203.
- [10] Orlova M V, Smirnova T A, Ganushkina L A, et al. Insecticidal activity of *Bacillus laterosporus* *Appl Environ Microbiol.*, 1998, 64:2723-2725.
- [11] 赵秋敏, 陈月华, 蔡峻, 等. 一株产几丁质酶、抑真菌的侧孢芽孢杆菌[J]. *中国生物防治*, 2006, 22(增刊):42-46.
- [12] 黎定军, 陈武, 罗宽. 侧孢芽孢杆菌 2-Q-9 外泌抑菌物质性质[J]. *湖南农业大学学报*, 2007, 33(4):471-475.
- [13] 任召珍, 郑媛, 孙谧. 海洋侧孢短芽孢杆菌 Lh-1 抗菌活性物质的分离及特性研究[J]. *微生物学报*, 2007, 47(6):997-1001.
- [14] 李伟杰, 姜瑞波. 侧孢短芽孢杆菌 X10 拮抗物质的提取和特性分析[J]. *生物学杂志*, 2006, 23(5):16-20.
- [15] 宫占元, 王艳杰, 李永鹏. 侧孢芽孢杆菌降解有机磷能力的研究[J]. *黑龙江八一农垦大学学报*, 2006, 18(1):2-14.
- [16] 房耀维, 范琳, 牛艳芳, 等. 工业微生物育种技术研究进展[J]. *内蒙古师范大学学报*, 2003, 32(2):158-161.
- [17] 聂明, 李怀波. 工业微生物遗传育种的研究进展[J]. *现代食品科技*, 2005, 21(3):184-187.
- [18] 张彭湃. 微生物菌种选育技术的发展与研究进展[J]. *生物学教学*, 2005, 30(9):3-5.

The Mutation Breeding Research of *Bacillus laterosporus* BL-1

ZHAO Yun-tong¹, DU Chun-mei², ZHANG Hai-xiu³, SHI Xin-rui¹

(1. Mudanjiang Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Mudanjiang, Heilongjiang 157041; 2. Life Sciences College of Heilongjiang University, Harbin, Heilongjiang 150080)

Abstract: *Bacillus laterosporus* BL-1 was inhibitory to *Magnaporthe grisea*, *Fusarium graminearum* and other phytopathogenic fungi. It can also inhibit the reproduction of *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and some other bacteria. For these reasons, *Bacillus laterosporus* may play an important role in the field of biological control. In the research, the inhibitory effect of BL-1 to some phytopathogenic fungi and bacteria were tested. The high-yield mutant strain HBL-B26 was obtained from BL-1 by series of mutagenic treatment, i. e. UV, DES and HNO₂. The activity of fermentation liquid of HBL-B26 was 64.48 AU·mL⁻¹, which was 4.3 times more than the initial strain BL-1. Subculture test indicated that the hereditary character of HBL-B26 was stable.

Key words: *Bacillus laterosporus*; mutation; breeding

全国自然科学(中文)核心期刊 中国农业核心期刊
全国优秀农业期刊 中国北方优秀期刊 黑龙江省优秀期刊
欢迎订阅 2012 年《北方园艺》

邮发代号:14-150 全国各地邮局(所)均可订阅

《北方园艺》是由黑龙江省农业科学院主管、黑龙江省园艺学会和黑龙江省农业科学院主办的以科学研究和技术普及相结合的园艺类综合性科技期刊。该刊内容丰富、栏目新颖、技术实用、信息全面。设有试验研究、研究简报、设施园艺、栽培技术、园林花卉、生物技术、植物保护、贮藏保鲜加工、土壤与肥料、食用菌、中草药、新品种选育、产业论坛、专题综述、经验交流、农业经纬等栏目。内容涵盖园艺学的蔬菜、果树、观赏园艺、植物保护等研究的新成果、新技术、新品种、新经验。竭诚欢迎全国各地科研院所人员、大专院校师生,各省、市、县、乡、镇农业技术推广人员、农民科技示范户等踊跃订阅。

国内外公开发行,半月刊,每月 15、30 日出版,每册定价 7.00 元,全年 168.00 元,邮发代号 14-150,全国各地邮局均可订阅,或直接向编辑部汇款订阅,订阅者请在汇款单附言栏内写清订购份数,收件人姓名及详细地址、邮编。

地址:黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路 368 号《北方园艺》编辑部

邮编:150086 电话:0451-86674276

E-mail:bfyybjb@163.com