

# 亚硝基胍诱变处理氧化亚铁硫杆菌的育种研究

蒋金龙, 贾建波

(淮阴工学院生物工程与化学工程系, 江苏 淮安 223001)

**摘要:**对亚硝基胍(MNTG)处理对数期氧化亚铁硫杆菌的诱变育种进行了研究,考察了不同浓度诱变剂和不同诱变处理时间对诱变效应的影响,发现诱变后菌株的氧化活性在原先的基础上提高了4倍。菌株经诱变剂处理后再冷却处理,可减少回复突变,使氧化活性再提高近一倍。

**关键词:**亚硝基胍;氧化亚铁硫杆菌;诱变育种

**中图分类号:**TD925.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-6532(2005)01-0021-04

目前,生物浸取技术在国外得到了广泛应用,涉及范围已包括金、铜、铀等金属<sup>[1]</sup>,通过浸出获得的金属产量也在不断增加,但是在我国生物浸取技术工业化应用极少,大多数的研究都还处在实验室阶段。其原因除了我国的工矿企业投入不足,不够重视外,对微生物冶金技术的基础研究也落后于国外。在生物浸取技术中应用较多的菌种是氧化亚铁硫杆菌,由于其生长速度比较缓慢,所以金属浸出的速度慢,浸出周期长,从而影响了生物浸取技术的工业化应用。因此除了加强细菌浸出工艺条件和浸出过程的研究外,还应加强其上游育种技术的研究,以获得高效浸矿菌株。微生物的育种技术主要有诱变育种、杂交育种、原生质体融合、基因工程等<sup>[2]</sup>。而其中诱变育种是目前应用最多也最经济实用的育种方法。诱变育种可以采用物理方法如紫外诱变,也可以采用化学诱变

剂<sup>[3-4]</sup>处理。目前化学诱变剂处理浸矿菌种的报道甚少,本文采用超强诱变剂亚硝基胍诱变处理处于对数期的氧化亚铁硫杆菌,从诱变剂浓度、诱变时间、诱变后处理上进行了研究,为获得高效浸矿菌株提供了一条有效的途径。

## 1 化学诱变育种机理

微生物的突变在自然条件下可自发进行,但是自发突变的突变率很低,获得符合要求的突变株的几率更低。因此人们往往通过人工的物理化学因素作用来提高菌株的突变率,使具有有利性状的突变株筛选的可能性大大增加。化学诱变剂主要是通过干扰DNA复制,使其遗传物质发生改变而突变。本文采用的诱变剂亚硝基胍(NTG)<sup>[5]</sup>是一种能与核酸碱基作用的双功能烷化剂,

products, such as H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentration, activation temperature, activation time were optimized. At the same time, the optimal technological conditions for preparing activated clay were determined. The high-efficient activated clay having higher decolorizing rate (>98%) and higher lime activity (220~250) is successfully produced.

**Key words:** Ca-bentonite; Activated clay; Activation

收稿日期:2004-03-03

作者简介:蒋金龙(1975-),男,讲师,硕士,主要从事细菌浸出的研究。

万方数据

可与 DNA 分子的许多部位发生作用,结果使 DNA 分子增加了烷基侧链(烷化作用),从而改变了 DNA 分子结构,同时它还能在 DNA 双链间形成共价键,这样就阻碍了在 DNA 复制过程中双链的解开,引起突变。

## 2 实验部分

### 2.1 实验材料

菌种:氧化亚铁硫杆菌野生型菌株,从江西德兴铜矿堆浸场酸性水中分离。

培养基:9K 培养基,用 1:1 硫酸调至 pH = 2.0。

化学诱变剂:1-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNTG)。

### 2.2 实验仪器

超净工作台,生物显微镜(YS100),振荡培养箱(DHZ-C),冰箱,血球计数器,高压灭菌锅(LDZX),精密 pH 计(PHS-3C),恒温培养箱(DNP-9052)。

### 2.3 实验方法

#### 2.3.1 出发菌株的筛选

取 95mL9K 培养基于 250mL 锥形瓶,接种 5mL 氧化亚铁硫杆菌菌液( $10^7 \sim 10^8$  个 T.f 菌/mL),置于振荡培养箱中 30℃ 下振荡培养,取对数期菌液作为诱变处理出发菌株。

#### 2.3.2 诱变处理及筛选

取某一浓度的亚硝基胍溶液 1mL 于锥形瓶中加入 9mL 处于对数期的菌液,振荡一定时间,然后加入 90mL9K 培养基终止诱变,放入振荡培养箱中于 30℃、110r/min 下培养,每隔一定时间取菌液分析测定。

#### 2.3.3 分析方法

菌液中  $Fe^{2+}$  的浓度用重铬酸钾容量法测定,氧化活性采用亚铁离子氧化法,细菌数的测定采用血球计数器计数。

## 3 实验结果

### 3.1 不同浓度的诱变剂对诱变效应的影响

从一定浓度的亚硝基胍溶液中,分别取万方数据

1mL 加入到 9mL 菌液中去,使其最终浓度分别为 50ug/mL、20ug/mL、15ug/mL、10ug/mL、5ug/mL,振荡 15min,用 9K 培养基大量稀释至 10 倍,使诱变反应终止,细菌致死率与诱变剂浓度的关系见图 1。由图 1 可知,诱变剂浓度越大,细菌致死率越高。在亚硝基胍浓度为 20ug/mL 时,细菌死亡率为 95.2%。将稀释后的菌液振荡培养三代后,测定菌液的氧化活性见图 2。由图 2 可知亚硝基胍浓度越大,获得的诱变菌氧化活性越大,在浓度为 20 ug/mL 时,细菌的氧化活性为 0.64g/L·h,是未经诱变处理的菌株氧化活性的 4 倍。

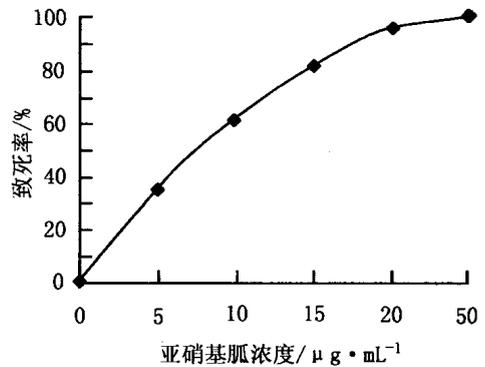


图 1 诱变剂浓度与致死率的关系

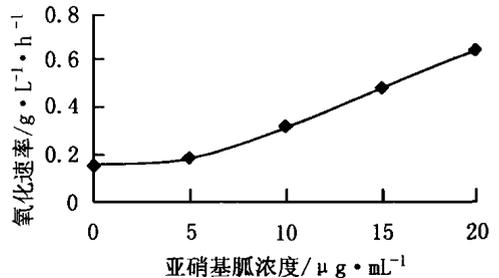


图 2 诱变剂浓度对诱变效应的影响

### 3.2 不同诱变处理时间对诱变效应的影响

诱变剂亚硝基胍浓度分别为 20ug/mL、15ug/mL、10ug/mL、5ug/mL,处理 17min,培养三代后测定菌液的氧化活性,与处理 15min 的结果比较,得图 3。

从图3中可以看出在亚硝基胍浓度为

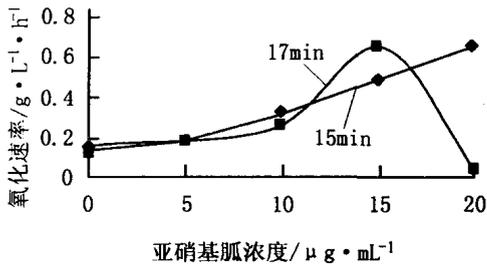


图 3 诱变处理时间对诱变效应的影响

20 $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,随着处理时间的增加,细菌的致死率增大,获得的菌液氧化活性很低。而亚硝基胍浓度为 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,处理 17min 获得的菌液氧化活性最大。由此可以看出诱变效应不仅与诱变剂浓度有关,还与处理的时间有关,需综合考虑来确定合理的处理时间和诱变剂浓度。

### 3.3 诱变后冷却处理对诱变效应的影响

*T. f* 菌经冷却处理后可以减少暗修复、重组修复、SOS 修复系统的作用<sup>[6]</sup>,故可以提高正突变效果。将浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的亚硝基胍处理 15min 后的菌液稀释终止诱变,再置于 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱放置 12h 后进行培养,三代后测定菌液的氧化活性,将结果与同批诱变处理但未经冷却的菌液氧化活性比较,得表 1。从表 1 中可以看出经冷却处理后,由于减少了回复突变,增加了正突变效果,细菌的氧化活性比未处理的提高了近一倍。

表 1 诱变后冷却处理对诱变效应的影响

项 目	繁殖耗时 /h	氧化活性 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
冷却处理	44	1.20
未冷却处理	44	0.63

## 4 讨论与分析

1. 虽然亚硝基胍在近中性的环境下诱变效果最好,在酸性条件下会分解,产生有害的有机物,抑制 *T. f* 菌的生长,使诱变效果降低,但是由于 *T. f* 菌生长于酸性环境中,本文为方便起见,处理时溶液为微酸性,终止反应

为加入大量 9K 培养基。从实验数据看,通过诱变处理后,菌液的氧化活性大大提高,繁殖时间大大缩短。

2. 亚硝基胍的诱变效果与其浓度和诱变时间有关,诱变剂浓度越高致死率越高,在较高的致死率,即亚硝基胍浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,所得的诱变菌液氧化活性比原始菌提高 4 倍。这说明在较高的致死率下,有较好的正突变效果。同时随着处理时间的增加,致死率相应提高,此时在略低的浓度(15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )下,得到的菌液氧化活性最大,但在较高浓度(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )下,最后得到的菌液氧化活性却非常低。所以在诱变处理时这两种因素需综合考虑,以求获得最大的诱变效果。

3. 一些异养菌经过冷却处理可以减少回复突变,*T. f* 菌经冷却处理也有这种效果。在本文中经冷却处理后得到的细菌菌液氧化活性比未处理的提高了近一倍。

4. 诱变处理后如何采取有效的筛选方法获得高效、遗传稳定的诱变菌是菌种选育成功的关键。由于 *T. f* 菌在固体培养基上生长缓慢,其最佳生长条件为  $\text{pH} = 2.0 \sim 3.5$ ,其他细菌很难在此条件下生长,同时由于采用化学诱变剂,尽管大量稀释但还是对细菌的生长产生了一些不利的影响,所以采用摇瓶培养法来筛选突变菌,产生正突变的细菌生长旺盛,氧化活性高,在培养的过程中逐渐占优势,这点在实验中已得到证实。然后再采用平板分离法根据细菌的特性如菌落大小和出现快慢进行分离。通常,先出现的菌落或大菌落的活性较大。

5. 选择适合 *T. f* 菌分离的固体培养基也很重要。普通琼脂做凝固剂得到的固体培养基,由于对自养的 *T. f* 菌有抑制作用,很难得到菌落,在实验中仅在菌液稀释程度为  $10^{-1}$  的涂布平板上出现了红棕色菌落,且难以分离。日产 Agar 和琼脂糖效果较好,可以在稀释度较大的菌液平板上产生单一菌落,适合分离。

# 几种锆类化合物添加剂对硬硅钙石形貌的影响

陈淑祥, 倪文, 江翰, 董文辉

(北京科技大学土木与环境工程学院, 北京 100083)

**摘要:**考察了几种锆类化合物添加剂对硬硅钙石形貌的影响。实验结果表明:锆英石和氧化锆作为添加剂时,硬硅钙石结晶不好,纤维结合紧密,形成了密实、团聚的硬硅钙石二次粒子,此结构倾向于制备高强度绝热制品;使用氧氯化锆作为添加剂所制备的硬硅钙石结晶良好,所生成的硬硅钙石二次粒子具中空结构,此种结构易于形成超轻绝热制品。

**关键词:**硬硅钙石; 添加剂; 锆类化合物

**中图分类号:**TQ175.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-6532(2005)01-0024-05

硬硅钙石( $6\text{CaO} \cdot 6\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )型硅酸钙材料由于具有容重小、导热系数低、使用温度高等优点被广泛应用于工业保温隔热材

料<sup>[1-3]</sup>。目前制备硬硅钙石型硅酸钙主要利用动态水热法。影响硬硅钙石的形成因素有很多,例如压力、温度、保温时间、原料品种、

## 参考文献:

- [1]《浸矿技术》编委会编. 浸矿技术[M]. 北京:原子能出版社,1994.
- [2]周德庆. 微生物学教程[M]. 北京:高等教育出版社,1993:242.
- [3]李改平,等. 三种化学诱变剂对汤姆青霉 PT95 化学诱变效应的研究[J]. 山西大学学报(自然

科学版),2002,25(2):59~62.

- [4]童雄. 微生物浸矿的理论与实践[M]. 北京:冶金工业出版社,1997:40.
- [5]陶文沂. 工业微生物生理与遗传育种学[M]. 北京:中国轻工业出版社,1997.
- [6]张在海,等. 氧化亚铁硫杆菌亚铁氧化活性诱变育种理论探讨[J]. 铜业工程,2001(1):12~15.

## Study on Breeding of Thiobacillus Ferrooxidans Mutagenized with NTG

JIANG Jin-long, JIA Jian-bo

(Huaiyin Institute of Technology, Huai'an, Jiangsu, China)

**Abstract:** The article studied on mutagenic breeding of Thiobacillus ferrooxidans in logarithmic growth phase with MNTG. The effects of different concentrations of mutagen and different mutagenized times on mutagenesis were studied. It was found that the oxidizing activity of the strains after mutagenesis was increased about 4 times. The strains mutagenized were refrigerated. This disposal could decrease reversion and improve its oxidizing activity about one time.

**Key words:** MNTG; Thiobacillus ferrooxidans; Mutagenic breeding

收稿日期:2004-03-12

基金项目:国家自然科学基金项目(批准号:50172009);教育部跨世纪优秀人才计划资助项目

作者简介:陈淑祥(1972-),男,在读博士研究生,从事无机材料研究。