

一种微生物诱变育种的初筛方法

复旦大学遗传研究所、微生物教研组 上海新型发酵厂

提高初筛效率是微生物诱变育种工作中的一个重要环节。在柠檬酸生产菌黑曲霉(*Aspergillus niger*)的选育工作中,曾经有人采用微量滴管接种、纸片培养方法,根据指示剂变色圈直径和菌落直径的比值进行初筛^[1];在蛋白酶生产菌酱油曲霉(*Aspergillus sojace*)的选育工作中,根据酪蛋白培养基上透明圈直径和菌落直径的比值进行初筛^[2];在头孢霉素生产菌(*Cephalosporium* sp.)的选育工作中,根据抑菌圈直径和菌落直径的比值进行初筛^[3]。在这些工作中比值的大小都和摇瓶发酵产量相一致,说明这些方法都是可行的。为了进一步提高工作效率,在柠檬酸生产菌的诱变育种工作中,我们改进了纸片培养中的接种方法。

我们所采用的接种工具是一块直径略小于培养皿的圆形不锈钢薄板,一面装有两个把手,另一面装有 16 根直径约 1 毫米、长约 1 厘米的“V”型不锈钢丝(图 1)。接种时把孢子悬浮液 10 毫升放在直径 9 厘米的培养皿中,用接种板将悬浮液

孢子悬浮液的孢子浓度不宜过浓,过浓则难以得单孢子菌落,而且指示剂变色圈过于拥挤,不便于测量;浓度也不宜过稀,过稀则滤纸得不到充分利用,增加了接种工作量。一般以每一不锈钢丝所带有的每一微滴中平均含有大约 0.5 个孢子为宜。用这一浓度的孢子悬浮液接种时,大约半数微滴中将出现孢子,大约三分之一微滴中将含有单个孢子。这可以根据泊松(Poisson)公式推算得到。

根据泊松公式 $P_x = \frac{m^x}{x!} e^{-m}$, 可以求得每一微滴中平均孢子数(m)和全部微滴中含有 1 个孢子的微滴的百分数(P_1)以及含有 1 个以上(包括 1 个)孢子的微滴的百分数($1 - P_0$)之间的关系(图 2)。上式中 m 是每一微滴中孢子平均数, P_x 是含有 x 个孢子(x 等于 0、1、2、……等)的微滴的百分数, P_0 表示不含孢子的微滴的百分数。

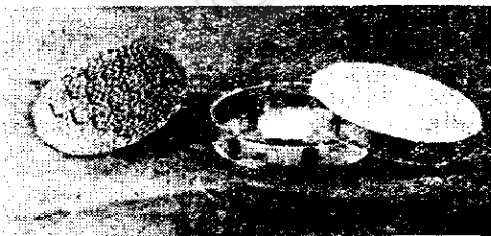


图 1 接种板和盛放纸片的培养皿
培养皿的四周是四只用来搁置纸片的牛津小杯,中央是浸有 3% 甘油的脱脂棉花

接种到新华三号滤纸上,滤纸预先浸入含有指示剂溴甲酚绿(0.02%)的培养基中,然后将滤纸搁置在另一培养皿中的四只牛津小杯上,中央放一小块浸有 3% 甘油的脱脂棉花以保持湿度(图 1)。经培养以后,可以看到菌落四周因产酸而改变颜色;测量指示剂变色圈直径和菌落直径,求得比值作为产酸高低的指标。全部接种工作在接种罩内进行。

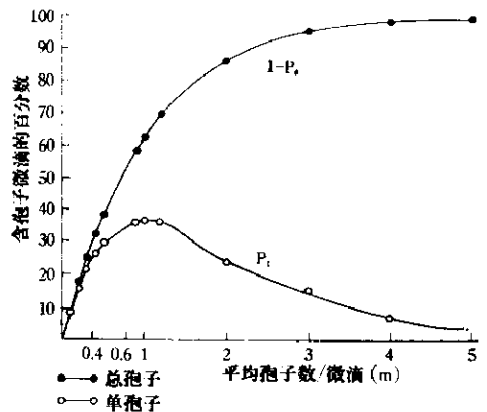


图 2 表示每微滴中孢子平均数和全部微滴中含有 1 个孢子以及含有 1 个以上(包括 1 个)孢子的微滴的百分数之间的关系的曲线

首先根据图 2 可以测定每一微滴的体积。将一定浓度的孢子悬浮液接种到若干纸片上,经培养以后,观察全部接种位置上有几个位置出现菌落,求得含有孢子的微滴的百分数,然后从 $1 - P_0$

本文 1973 年 7 月 27 日收到。

曲线查得每微滴中平均孢子数。通过血球计数器计数可以求得每毫升中孢子平均数。这两个数字相除就可以推算得到每微滴的体积。我们所用接种板的微滴的体积经推算为 $1/14000$ 毫升。

根据孢子悬浮液浓度和微滴的体积，就可以求得作为接种用的悬浮液的稀释倍数。根据多次实验，测得实际生长菌落数约为血球计数器测得孢子数的 65%。一支试管斜面用 5—10 毫升水洗下孢子，不经玻璃珠振荡，直接通过一层宣纸过滤后，所得到的悬浮液的孢子浓度约为 1×10^6 孢子/毫升（孢子分散度约 92%）。每微滴的孢子平均数 $m = \frac{1 \times 10^6 \times 0.65}{14000} = 46$ 。如果要求每微

滴的孢子平均数为 0.6 个，则稀释倍数为 $\frac{46}{0.6} = 77$ 倍。按图 2 中 $1 - p_0$ 曲线可以查得，用这一稀释悬浮液接种时预期 43% 微滴中含有孢子；按 p_1 曲线可以查得 33% 微滴中含有 1 个孢子。这也就是在每一个纸片上大约将有 7 个接种位置上出现菌落，大约 5 个位置上出现单孢子菌落。实际数值和预期数值基本上相符。

用 N-甲基-N' 硝基-N-亚硝基胍 (0.2 毫克/毫升)，在 37°C 中处理悬浮在 pH6.0 的磷酸缓冲液中的孢子，处理 1 小时的存活率是 42%。这时

每微滴中孢子平均数 $m = \frac{1 \times 10^6 \times 0.65 \times 0.42}{14000} =$

19.5，稀释倍数应为 $\frac{19.5}{0.6} = 33$ 倍。

纸片接种后，在 30°C 或 32°C 中培养。不经处理的培养物培养约 50—60 小时，经处理的培养物培养约 70—80 小时，然后取出，测量单孢子菌落的指示剂变色圈直径和菌落直径。测量工作由固定两人进行，每一菌落由两人各测一次后取平均值。两人所测得的比值相差不大于 1 的可达 75% 左右。测量后继续培养，待孢子长出后，在含有 0.2% 脱氧胆酸钠的察氏培养基上划线分离，然后接种斜面。测量不在接种罩内而且敞开培养皿进行。

初步实验结果说明不论是否经处理，单孢子菌落的比值都呈常态分布；经诱变剂处理后的比值分布范围较不经处理者显然扩大；比值大小和摇瓶产酸高低在一定范围内基本上相一致。经二次处理筛选曾得到比原种 *Aspergillus usamii* N 558 产量提高约 20% 的菌株。

参 考 资 料

- [1] James, L. V., Rubbs, S. D. and Gardner, G. F.: *J. Gen. Microbiol.*, 14:223, 1956.
- [2] Sekine, H., Nasuno, S. and Iguchi, N.: *Agr. Biol. Chem.*, 33:1477, 1969.
- [3] Stauffer, J. F., Schwartz, L. J. and Brady, C. L.: *Develop. Indust. Microbiol.*, 7:104, 1966.